

# ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU POREMEĆENOG VASKULARNOG ODGOVORA POD UTJECAJEM VISOKOG UNOSA NATRIJEVA KLORIDA KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

---

Ćosić, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:300285>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Anita Ćosić

**ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU POREMEĆENOG  
VASKULARNOG ODGOVORA POD UTJECAJEM VISOKOG UNOSA  
NATRIJEVA KLORIDA KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Anita Ćosić

**ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U RAZVOJU POREMEĆENOG  
VASKULARNOG ODGOVORA POD UTJECAJEM VISOKOG UNOSA  
NATRIJEVA KLORIDA KOD SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

*Doktorska disertacija*

Osijek, 2016.

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

Rad ima 117 listova.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Mikrocirkulacija .....	1
1.1.1. Moždana cirkulacija.....	1
1.1.2. Uloga otporničkih krvnih žila.....	1
1.2. Protokom posredovana dilatacija.....	2
1.3. Važnost endotela i pojava endotelne disfunkcije.....	3
1.3.1. Endotelni čimbenici relaksacije.....	4
1.4. Renin-angiotenzin sustav (RAS) .....	6
1.4.1. Angiotenzin II (ANG II) .....	7
1.5. Oksidativni stres.....	8
1.5.1. Uloga antioksidativnih enzima i „hvatača“ superoksida TEMPOLA.....	9
1.5.2. Oksidativni stres i endotelna funkcija.....	13
1.6. Štetnosti prekomjernog unosa kuhinjske soli na zdravlje – globalna inicijativu za smanjenje unosa kuhinjske soli.....	14
1.6.1. Akutni i kronični utjecaj natrijeva klorida na cirkulaciju – dosadašnja animalna istraživanja.....	15
1.7. Hipoksijom inducirani faktor – 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ).....	19
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	21
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	22
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	23
4.1. Ustroj studije.....	23
4.2. Ispitivane grupe.....	23
4.3. Mjerenje krvnoga tlaka.....	24
4.4. Skupljanje arterijskih uzoraka krvi.....	24
4.5. Funkcionalna studija - protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije....	24
4.6. Relativni izražaj gena određen PCR metodom u realnom vremenu.....	25
4.7. Protočna citometrija.....	25
4.8. Parametri oksidativnog stresa (FRAP i TBARS).....	27
4.9. Statistička analiza.....	27

<b>5. REZULTATI</b> .....	29
5.1. Opći podaci o izmjerenim vrijednostima krvnog tlaka, težine i funkcionalnosti srednje moždane arterije.....	29
5.2. Bazični odgovor središnje moždane arterije niskoslane i visokoslane ispitivane skupine na protokom potaknutu dilataciju.....	30
5.3. Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a (zasebno i u međusobnoj kombinaciji) na protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije ispitivane skupine na niskoslanu dijetu.....	31
5.4. Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a (zasebno i u međusobnoj kombinaciji) na protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije ispitivane skupine na visokoslanu dijetu.....	35
5.5. Učinak <i>in vitro</i> primjene TEMPOLA na promjenjenu razine dilatacije središnje moždane arterije niskoslane i visokoslane skupine.....	36
5.6. Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOLA na promjenjenu razine dilatacije središnje moždane arterije.....	38
5.7. Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOLA na mehanizme protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije kod niskoslane skupine.....	39
5.8. Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOLA na mehanizme protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije kod visokoslane ispitivane skupine.....	43
5.9. Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) središnje moždane arterije (o endotelu ovisna vazodilatacija).....	44
5.10. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju središnje moždane arterije (o endotelu neovisna vazodilatacija).....	45
5.11. Izražaj gena uključenih u dilatacijske putove kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora .....	46
5.12. Izražaj antioksidativnih gena kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora utvrđena PCR metodom u stvarnom vremenu (rtPCR).....	47
5.13. Izražaj i uloga HIF-1 $\alpha$ gena i njegovih poznatih ciljnih gena kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora prilikom akutnog unosa soli.....	48
5.14. Aktivacija pomoćničkih, citotoksinih i regulatornih T stanica u uzorcima periferne krvi i slezene.....	50
5.15. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u uzorcima periferne krvi, limfnim čvorovima i slezeni.....	54
5.16. Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima iz periferne krvi, limfnih čvorova i slezene..	60

5.17. Serumna razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativni kapacitet (FRAP)...	65
<b>6. RASPRAVA</b> .....	67
6.1. Utjecaj kratkotrajnog unosa visokih koncentracija soli na promjenu krvnog tlaka.....	68
6.2. Bazični vaskularni odgovor srednje moždane arterije i razina nastalog oksidativnog stresa kod visokog unosa natrijevog klorida u funkcionalnim <i>in vitro</i> studijama.....	68
6.3. Mehanizmi protokom posredovane dilatacije i izražaj gena uključenih u dilatacijske putove srednje moždane arterije kod visokog unosa natrijevog klorida u funkcionalnim <i>in vitro</i> studijama.....	70
6.4. Izražaj antioksidativnih gena, razina oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta u arterijskim uzorcima krvi.....	72
6.5. Izražaj HIF-1 $\alpha$ transkripcijskog faktora te njegovih popratnih gena.....	73
6.6. Aktivacija i razina oksidativnog stresa na leukocitima tijekom visokoslane dijeta te njihova uloga u poremećenom vaskularnom odgovoru kod visokog unosa natrijevog klorida.....	74
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	77
<b>8. SAŽETAK</b> .....	78
<b>9. SUMMARY</b> .....	80
<b>10. LITERATURA</b> .....	82
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	107

## Kratice

**ACh** – acetilkolin

**ADP**- adenzin difosfat

**Ang II** – angiotenzin II

**ATP** - adenzin trifosfat

**AT** – angiotenzinski receptor

**CAT** – katalaza

**COX** – enzim ciklooksigenaza

**COX-1** – enzim ciklooksigenaza-1

**COX-2** – enzim ciklooksigenaza-2

**ED** – endotelna disfunkcija

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

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

**EETs** – epoksieikozatrienoična kiselina (engl. epoxyeicosatrienoic acid)

**eNOS** – endotelna dušik-oksid sintaza (engl. endothelial nitric-oxide synthase)

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

**FRAP** - engl. ferric reducing ability of plasma

**GPx** – glutation peroksidaze

**GPx1** - glutation peroksidaza 1

**GPx4** - glutation peroksidaza 4

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

**HIF-1 $\alpha$**  - hipoksijom inducirani faktor – 1 alfa



**HO•** - hidroksil radikal

**INDO** – indometacin

**iNOS** – inducibilna dušik-oksidi sintaza (engl. inducible nitric-oxide synthase)

**L-NAME** – N-nitro-L-arginine metil ester

**MDA** - malondialdehid

**NADPH** – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NaCl** – natrijev klorid

**NO** – dušikov oksid (engl. nitric oxide)

**NOS** – dušik-oksidi sintaza (engl. nitric-oxide synthase)

**NS** dijeta – niskoslana dijeta

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - superoksidni anion

**ONOO<sup>-</sup>** - peroksinitrit

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

**PHD** -prolil hidroksilaza

**RAS** - renin-angiotenzin sustav

**ROS** – slobodni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

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

**SOD** - superoksid dismutaza

**TBARS** – eng. Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**TE** -Trolox

**TXA<sub>2</sub>** – tromboksan A<sub>2</sub>

**VEGF** - faktor rasta endotela krvnih žila (engl. vascular endothelial growth factor)

**VS** dijeta– visokoslana dijeta

## Popis tablica

**Tablica 1.** Vrijednosti tjelesne mase, krvnog tlaka i opće informacije o funkcionalnosti srednje moždane arterije **(29. stranica)**

**Tablica 2.** Relativan izražaj gena ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2) te dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS) **(46. stranica)**

**Tablica 3.** Relativni izražaj antioksidativnih gena SOD izoformi, glutation peroksidaza i katalaze **(47. stranica)**

**Tablica 4.** Relativni izražaj transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  i njegovih poznatih ciljnih gena VEGF i HIF prolil hidroksilaza (PHD) **(48. stranica)**

**Tablica 5.** Značajne korelacije izražaja transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  i antioksidativnih gena (MnSOD, GPx1 i CAT) te njegovih ciljnih gena (PHD1 i VEGF) **(49. stranica)**

## Popis slika

**Slika 1.** Bazični odgovor srednje moždane arterije na promjenu gradijenta tlaka kod niskoslane skupine životinja (N=16) i životinja na visokoslanjoj dijeti (N=15) izražena kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti (**30. stranica**)

**Slika 2.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a (svaki inhibitor zasebno) na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja (**31. stranica**)

**Slika 3.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS) s inhibitorom L-NAME-om, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima ciklooksigenaza i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja (**32. stranica**)

**Slika 4.** Učinak inhibicije ciklooksigenaza s inhibitorom indometacinom, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja (**33. stranica**)

**Slika 5.** Učinak inhibicije metabolita EETs-a s njegovim selektivnim inhibitorom MSPPOH, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i ciklooksigenaza na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja (**34. stranica**)

**Slika 6.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u visokoslanjoj ispitivanoj skupini životinja (**35. stranica**)

**Slika 7.** Odgovor središnje moždane arterije u niskoslanjoj skupini na protokom posredovanu dilataciju primjenom TEMPOLA *in vitro* pri različitim gradijentima tlaka (**36. stranica**)

**Slika 8.** Odgovor središnje moždane arterije u visokoslanjoj skupini na protokom posredovanu dilataciju primjenom TEMPOLA *in vitro* pri različitim gradijentima tlaka te dodatna potvrda stvarnog učinka TEMPOLA i povećane razine oksidativnog stresa dodatkom inhibitora L-NAME (**37. stranica**)

**Slika 9.** Učinak TEMPOLA *in vivo* primjenom na promjenu razine protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije u ispitivanim skupinama (**38. stranica**)

**Slika 10.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* primjenu TEMPOLA u isto vrijeme (**39. stranica**)

**Slika 11.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS) s inhibitorom L-NAME-om, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima ciklooksigenaza i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju

(FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* TEMPOL (40. stranica)

**Slika 12.** Učinak inhibicije ciklooksigenaza s inhibitorom indometacinom, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* TEMPOL (41. stranica)

**Slika 13.** Učinak inhibicije metabolita EETs-a s njegovim selektivnim inhibitorom MSPPOH, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i ciklooksigenaza na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* TEMPOL (42. stranica)

**Slika 14.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u visokoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* primjenu TEMPOLA u isto vrijeme (43. stranica)

**Slika 15.** Bazični odgovor srednje moždane arterije na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) u svim pokusnim skupinama (44. stranica)

**Slika 16.** Bazični odgovor srednje moždane arterije dodatkom NO donora natrijevog-nitroprusida na protokom posredovanu dilataciju u svim pokusnim skupinama (45. stranica)

**Slika 17.** Primjer analize rezultata metodom protočne citometrije uzoraka periferne krvi (A) i slezene (B). Mononuklearne stanice su izolirane iz periferne krvi i slezene te obojene na FITC-CD4, PE-Cy7-CD8, CD25 i APC-PE-Foxp3 antitijela (50. stranica)

**Slika 18.** Frekvencije (%) aktiviranih CD4 (pomoćničkih; A) i CD8 (citotoksičnih; B) T stanica te regulatornih T stanica (Foxp3+; C) između mononuklearnih stanica periferne krvi (51. - 52. stranica)

**Slika 19.** Frekvencije (%) aktiviranih CD4 (pomoćničkih; A) i CD8 (citotoksičnih; B) T stanica te regulatornih T stanica (Foxp3+; C) u slezeni štakora za sve ispitivane grupe (52. - 53. stranica)

**Slika 20.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u različitim stanicama periferne krvi štakora (54. stranica)

**Slika 21.** Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u stanicama periferne krvi limfocitima (A), monocitima (B) i granulocitima (C) prije i nakon PMA stimulacije (55. stranica)

**Slika 22.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora (**56. stranica**)

**Slika 23.** Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije (**57. stranica**)

**Slika 24.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora (**57. stranica**)

**Slika 25.** Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije (**58. stranica**)

**Slika 26.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz slezene štakora (**59. stranica**)

**Slika 27.** Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz slezene štakora prije i nakon PMA stimulacije (**59. stranica**)

**Slika 28.** Primjer analize mjerenja izražaja integrina LFA-1 na leukocitima periferne krvi štakora protočnom citometrijom (**60. stranica**)

**Slika 29.** Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima (A), monocitima (B) i granulocitima (C) iz periferne krvi štakora (**61. - 62. stranica**)

**Slika 30.** Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima mezenteričnih (A) i perifernih (B) limfnih čvorova štakora (**63. stranica**)

**Slika 31.** Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima slezene štakora (**64. stranica**)

**Slika 32.** Serumska razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) izmjerena iz uzoraka arterijske krvi (**65. - 66. stranica**)

**Slika 33.** Shematski prikaz utjecaja visokog unosa soli na povećanu proizvodnju oksidativnog stresa i smanjenu vazodilataciju središnje moždane arterije (**76. stranica**)

## **1. UVOD**

### **1.1. Mikrocirkulacija**

Najvažnije funkcije cirkulacijskog sustava kao što su prijenos hranjivih tvari u tkiva i uklanjanje staničnih izlučevina odvijaju se upravo u mikrocirkulaciji. Mikrocirkulacija svakog organa posebno je ustrojena kako bi mogla obavljati funkcije pojedinog organa.

#### **1.1.1. Moždana cirkulacija**

Regulacija moždanog protoka krvi je od izuzetne važnosti za mogućnost izvršavanja brojnih moždanih funkcija. Takva kompleksna funkcija zahtijeva kompleksne regulatorne mehanizme koje osigurava dinamička interakcija mehanotransdukcije, metaboličkih (npr. adenozin), kemijskih (promjene  $p\text{CO}_2$ , pH i  $p\text{O}_2$ ) i drugih čimbenika, primjerice, uloga glija stanica, pericita i živčana kontrola regulacije moždanog protoka krvi (1-13). Svi mehanizmi moraju biti u skladu s ograničenim prostorom (lubanja) (14) uz održavanje relativno stalnog moždanog protok krvi unatoč varijacijama tlaka i protoka što se već dugi niz godina istražuje. Ukupni moždani protok krvi mora biti relativno konstantan kako bi se omogućilo stabilno i kontinuirano snabdjevanje moždanog tkiva i održavanje intrakranijalnog volumena i tlaka stalnim. Autoregulacija cerebralnog protoka krvi je sposobnost mozga da održava relativno konstantan protok krvi usprkos promjenama u perfuzijskom tlaku i ovisi o mnogim čimbenicima kako bi zadržala odgovarajuću prokrvljenost, kao što su simpatička živčana aktivnost, vaskularni renin angiotenzinski sustav ili faktor koji smanjuje ili povećava moždani protok ovisno o tlaku ugljičnog dioksida u arterijskoj krvi ( $\text{Pa}_{\text{CO}_2}$ ) (15).

#### **1.1.2. Uloga otporničkih krvnih žila**

Bitna uloga kardiovaskularnog sustava je osigurati dovoljan protok krvi kroz različita tkiva i organe tako da oni mogu zadržati svoj lokalni protok ovisno o njihovim metaboličkim potrebama. Primarna uloga otporničkih žila je regulacija lokalnog protoka krvi (16). Otporničke arterije imaju ključnu ulogu u kontroli stvaranja otpora krvnom protoku te samim time u kontroli krvnog tlaka i održavanju konstantnog dotoka krvi u tkiva, kao što su bubrezi, srce i mozak (17).

## 1.2. Protokom posredovana dilatacija

Prvi eksperimentalni dokaz arterijskog širenja nakon povećanja protoka krvi prikazao je u svojim pokusima Schretzenmaier 1933. godine (18). Mehanizam protokom posredovane dilatacije je proučavan u raznim krvnim žilama (19-23), ovisan je o vrsti krvožilja i veličini krvne žile i moguć je jedino otpuštanjem endotelnih vazoaktivnih posrednika (24-25). Vazodilatacija na silu smicanja (protokom potaknuta dilatacija (FID)) je proces ovisan o endotelu te važan za održavanje vaskularne homeostaze. Povećanje smicanja tijekom strujanja stimulira oslobađanje vazoaktivnih tvari iz endotela, uključujući dušikov oksid (NO), prostacikline i iz endotela hiperpolarizirajuće faktore (engl. endothelium derived hyperpolarizing factors; EDHF) (26-28). Pojedina istraživanja su dokazala kako NO ima nedvojbeno najveću ulogu u održavanju dilatacije krvne žile te kako povećani oksidativni stres smanjuje razinu dostupnog NO pa tako i razinu protokom posredovane dilatacije (29). U humanim studijama pokazano je da, osim NO, postoje drugi faktori koji mogu kompenzirati nedostatak NO i omogućiti nesmetano odvijanje FID-a (30). Proizvodnja NO-a potaknuta laminarnim žilnim stresom barem je djelomično odgovorna za protokom potaknuto izlučivanje PGI<sub>2</sub> (25) koji je inače značajan inhibitor agregacije trombocita. Između ostalog, vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) također može umjesto dušikova oksida biti posrednik o endotelu ovisne dilatacije u otporničkim arterijama visceralnog masnog tkiva kod koronarne arterijske bolesti (31) što su potvrdili i Miura i suradnici. Oni su dokazali kako žilni stres dovodi do povećanja endotelnog otpuštanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod pacijenata s poznatom srčanom bolesti te se i on smatra jednim od EDHF (32) u malim arterijama, a u velikim je cerebralnim arterijama aktivator kalijjskih kanala (33). Razna istraživanja upućuju na to kako bi porast oksidativnog stresa mogao biti glavni mehanizam koji podupire razvoj vaskularne endotelne disfunkcije. Smanjena razina protokom posredovane dilatacije je jedan od prvih znakova razvoja kardiovaskularnih bolesti (npr. hipertenzije) (29) i aterosklerotskih srčanih bolesti (34). Također brojna novija istraživanja naglašavaju negativni efekt povećanog oksidativnog stresa na mehanizme dilatacije i pojavu endotelne disfunkcije (29, 36).

### 1.3. Važnost endotela i pojava endotelne disfunkcije

Za endotel se nekoć mislilo da je samo " celofanski omot " vaskularnog stabla bez drugih posebnih funkcija osim da je selektivno propustan za vodu i elektrolite (37). Međutim, ogromni napredak od 80-ih dovodi do razumijevanja složenih funkcija ovog velikog endokrinog organa. Prvenstveno, nakon otkrića 1980. kako acetilkolin jedino u prisutnosti endotelne stanice dovodi do vazodilatacije arterija (38), uvidjela se važnost endotelne stanice za vaskularnu homeostazu. Endotelne stanice oblažu cijeli krvožilni sustav od srca pa do najmanjih kapilara. Te stanice imaju vrlo posebne i jedinstvene funkcije koje imaju najvažniju ulogu u vaskularnoj biologiji, a uključuju filtraciju tekućina, kao što je u glomerulima bubrega, održavanje tonusa krvnih žila, hemostazu, prijenos hormona i drugih hranjivih tvari (39). Pod fiziološkim uvjetima, endotelne stanice sposobne su sintetizirati i lučiti veliki spektar antiaterosklerotskih tvari, od kojih je najviše pozornosti zauzeo dušikov oksid (NO) (40). U normalnim uvjetima endotelna stimulacija potiče proizvodnju i oslobađanje NO koji difundira kroz okolna tkiva i stanice te pokazuje svoju kardiovaskularnu zaštitnu ulogu opuštanjem stanica glatkih mišića, sprječavanjem adhezije leukocita i njihovu migraciju u arterijskom zidu, mišićnu staničnu proliferaciju, adheziju trombocita te agregaciju i izraz adhezijskih molekula (40-41).

U uvjetima bolesti, uključujući prisutnost kardiovaskularnih čimbenika rizika, endotel prolazi funkcionalne i strukturne promjene te gubi svoju zaštitnu ulogu i poprima proaterosklerotsku strukturu (40). Gubitak normalne funkcije endotela naziva se "disfunkcija endotela", koja je karakterizirana smanjenom bioraspoloživostu NO koja može biti posljedica smanjene proizvodnje NO od strane NOS, ili češće, povećanja reaktivnih kisikovih radikala (ROS) (40-41). Endotelna disfunkcija (ED) predstavlja promijenjeno funkcioniranje endotela koje je karakterizirano smanjenom vazodilatacijom, proupalnim stanjima i protrombotičkim svojstvima (42). Disfunkcija endotela je nezavisni prediktor kardiovaskularnog rizika. Utvrđeno je da nastaje starenjem, ali i u mnogim drugim uvjetima povezanim s povećanim kardiovaskularnim rizikom kao što su hipertenzija, ateroskleroza, dijabetes, dislipidemija, pretilost, pušenje, zatajenja bubrega (42). Disfunkcija endotela prvi je put opisana u ljudskom hipertenzije 1990 godine (43). Poremećena vazodilatacija u hipertenzije potvrđena je brojnim studijama u različitim krvnim žilama, uključujući male otporničke žile (44-45). Smanjena vazodilatacija također je opisana kod dijabetesa tipa 1 (46), tipa 2 (47-49), bolesti koronarnih arterija (50), zatajivanja srca (51) te kronične insuficijencije bubrega (42-54). Osim toga, nastajanje endotelne disfunkcije nije samo povezano s kardiovaskularnim bolestima, ali može



prethoditi njihovom nastanku, kao što je prikazano u studiji u kojoj su se proučavali potomci utvrđenih hipertenzivnih pacijenata (55). Kod tih ispitanika se pokazala također disfunkcija endotela unatoč tome što su normotenzivni. Druga studija je pokazala endotelnu disfunkciju bez definiranih simptoma kod djece i mladih s visokim rizikom za aterosklerozu (56). Također, kod normotenzivnih, normoglicemičnih rođaka koji su prvo koljeno bolesnika s dijabetesom tipa 2, dokazana je disfunkcija endotela povezana s inzulinskom rezistencijom (57). Endotelna disfunkcija je dokazana kod dislipidemije (58), a također može biti povezana s pretiilošću (59), fizičkom neaktivnošću (60), i pušenjem (61), u odsutnosti dokazanih kardiovaskularnih bolesti.

### **1.3.1. Endotelni čimbenici relaksacije**

U cilju kontrole i održavanja krvnih žila, endotelne stanice sintetiziraju i otpuštaju razne vazoaktivne čimbenike. Neki dovode do opuštanja glatkih mišićnih stanica (npr. prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ), dušikov oksid (NO), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), epoksieikozatrienoična kiselina (EETs; engl. epoxyeicosatrienoic acid), endotelni hiperpolarizirajući faktori (EDHF), dok drugi dovode do vazokonstrukcije (npr. tromboksan $\text{A}_2$ , isoprostani, superoksidni anion,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , endotelin-1, angiotenzin II) (62-64). O endotelu ovisna relaksacija krvnih žila je proizvod velikog broja tvari (npr. acetilkolina, ATP-a i ADP-a, bradikinina, histamina, trombina, serotoninina). S nekima od njih, opuštanje može biti ograničeno na određeno mjesto i / ili krvnu žilu. Endotelni čimbenici relaksacije (EDRFs; engl. endothelium-derived relaxing factors) stimuliraju gvanilat ciklazu vaskularnog glatkog mišića rezultirajući porastom cikličkog GMP-a aktivirajući relaksaciju. EDRF se brzo inaktivira hemoglobinom i superoksidima. Protokom potaknuta sila smicanja („shear stress“) također potiče otpuštanje EDRF koji između ostalog sprječavaju prijanjanje trombocita uz stijenku krvnih žila (65).

Iako se prvotno mislilo kako je EDRF jedna molekula koja je odgovorna za relaksaciju do sada su otkriveni brojni endotelni čimbenici relaksacije koji pripadaju EDRF skupini od kojih se većina otpušta u odgovoru na povećanu koncentraciju unutarstaničnoga kalcija. Najvažniji EDRF su dušikov oksid (NO), prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (engl. endothelial-derived hyperpolarization factors, EDHF).

Za dušikov oksid (NO) je 1979. otkriveno da je moćan vazodilatator (66), a kasnije je identificiran kao endotel relaksirajući faktor (EDRFs) (38). Ima čitav niz fizioloških funkcija uključujući relaksaciju glatkih mišića i inhibiciju agregacije trombocita (67). No, NO nije samo bitan vazodilatator, također inhibira prijanjanje i agregaciju trombocita, smanjuje

adheziju leukocita na endotel i potiskuje proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Brojne bolesti su povezane sa smanjenom sintezom i / ili povećanom razgradnjom vaskularne NO. To su hiperkolesterolemija, šećerna bolest, hipertenzija i pušenje. Disfunkcija endotela uzrokovana ovim poremećajima doprinosi promjenama u vaskularnoj funkciji i strukturi. Smanjenje aktivnosti vaskularne NO igra značajnu ulogu u razvoju ateroskleroze. Godine 1987. otkriveno je kako uzgojene endotelne stanice otpuštaju NO i na taj način inhibiraju adheziju i agregaciju trombocita (68). No je inače sintetiziran iz L arginina pomoću NO sintaze (NOS). Do danas su identificirane tri izoforme NOS-a: eNOS, iNOS i nNOS. Iako se njihova cDNA nalazi se u gotovo svim stanicama sisavaca, pod fiziološkim uvjetima, eNOS je glavna NOS membranska izoforma izražena u endotelnim stanicama. Nasuprot tome, upala i oštećenje stanica, često su povezana s izražajem iNOS-a (69). Dušikov oksid se otpušta iz endotelnih stanica i pod osnovnim uvjetima i stimulacijom agonista. Sila smicanja („shear stress“) i pulsni protok glavni su podražaji koji uzrokuju oslobađanje NO i dilataciju pod bazalnim uvjetima (70), ali također i čimbenici poput acetilkolina, bradikinina, trombin, adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP) (38, 71-75).

Prostaciklin je glavni metabolit arahidonske kiseline proizvedene iz ciklooksigenaze endotelnih stanica (76). Aktivira IP receptore glatkih mišića i, u većini normalnih arterija, dovodi do relaksacije. Ovisno o arteriji i / ili vrsti može doći do pojave hiperpolarizacije, koja uključuje otvaranje jednog ili više tipova kalijevih kanala. Prema tome, ATP-kontrolirani kalijevi kanali (K-ATP), velika provodljivost kalcijem-aktiviranih kalijevih kanala (BKCa) i / ili naponom aktivirani kalijevski kanali (KV) mogu biti povezani s prostaciklinom potaknutom relaksacijom (77). Pozitivan učinak prostaciklina je u smanjenju rizika nastanka tromboze, remodeliranje vaskularnog glatkog mišićja i omogućavanje vazodilatacije, a otpušta se samo na poticaj različitih agonista (78-79). Njegovo djelovanje se isprepliće s učincima NO-a, jer omogućavaju međusobno otpuštanje i djelovanje u endotelnim i vaskularnim mišićnim stanicama (80).

Potencijalni EDHFa razlikuju se po vrsti i vaskulaturi, a djeluju tako da povećavaju vodljivost kalija ( $K^+$ ) što rezultira naknadnim poticanjem depolarizacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica i opuštanjem (81-83). Acetilkolin uzrokuje hiperpolarizaciju glatkih mišića u arterijama s netaknutim endotelom (84-86) koja je podržana nekim od agonista  $K^+$  kanala i nije pod utjecajem inhibitora sinteze dušičnog oksida ili ciklooksigenaza i pripisuje se oslobađanju EDHFs. Istraživanja na izoliranim žilama su opisala vazodilataciju koja može biti oslabljena pomoću inhibitora citokroma P450 (87-88). EDHFs otvora  $K^+$  kanale glatkih

mišićnih stanica čime izbacivanje  $K^+$  iz njegovog kemijskog gradijenta rezultira hiperpolarizacijom membrane. Postoji niz molekula ili posrednika koji djeluju kao EDHF u različitim vrstama i tkivima:  $K^+$ , metaboliti citokroma P450 (EETs), produkti lipooksigenaze, sam NO, slobodni radikali kisika ( $H_2O_2$ ), cAMP, natriuretski peptid tip C (89-92).

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

Renin-angiotenzin sustav (RAS) je glavni homeostatski sustav koji kontrolira volumen tjelesnih tekućina, ravnotežu elektrolita, krvni tlak, kao i normalnu inervaciju i endokrinu funkciju povezanu s kardiovaskularnom kontrolom te je presudan za održavanje arteriolarne strukture i vaskularne reaktivnosti (93). Ključan je faktor u mnogim slučajevima esencijalne hipertenzije, kao što je uspješno liječenje visokog krvnog tlaka s inhibitorima angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) i blokatorima Ang II receptora. RAS pokazuje svoje efekte kroz efektorsku molekulu angiotenzina II, koji se veže na specifične angiotenzin receptore vezane na membranu u različitim tkivima, uključujući vaskulaturu (94-95).

Renin je enzim koji ograničava brzinu formacije Ang II (96). Renin je aspartilna proteaza koja se sintetizira i oslobađa iz jukstaglomerularnih stanica smještenih u aferentnim i eferentnim arteriolama bubrežnih glomerula kao odgovor na različite podražaje, uključujući sniženje renalnog perfuzijskog tlaka (97), povećanu aktivnost bubrežnih simpatičkih živaca i smanjenu količinu dospjelog NaCl-a u maculi densa iz jukstaglomerularnih stanica (98). Renin cijepa angiotenzinogen, glikoprotein koji se sastoji od 429 aminokiseline (MW = 53-57 kDa), sintetizira se u hepatocitima (99) do dekaeptidnog angiotenzina I (100), koji se dalje obrađuje s ACE u angiotenzin II, moćni vazoaktivni oktapeptid.

Novija istraživanja su pokazala nekoliko strukturnih promjena gena koji kodiraju komponente RAS-a koji se odnose na razvoj esencijalne hipertenzije kod ljudi i na životinjskim modelima hipertenzije. Hashum i suradnici (101) su analizom haplotipova kod ljudi pokazali značajno različitu razdiobu haplotipova između normotenzivnih pojedinaca i ispitanika s esencijalnom hipertenzijom u odnosu na gen renina. Visoki unos soli jedan je od glavnih faktora rizika u razvoju i održavanju hipertenzije. Važne regulatorne interakcije odvijaju se između RAS-a, dušikovog oksida (NO) i  $O_2^-$  u bubrežima, gdje  $O_2^-$  djeluje kao vazokonstriktor i unapređuje reapsorpciju natrija u tubulima dok NO pokazuje suprotne učinke.  $O_2^-$  brzo stvara interakciju s NO, a na taj način, kada  $O_2^-$  proizvodnja raste, to smanjuje biološku raspoloživost NO što dovodi do oštećenja funkcije organa. Istovremeno, aktiviranje RAS-a može izazvati proizvodnju  $O_2^-$  i NO-a (102). To sugerira da uravnotežena

interakcija između RAS, NO i  $O_2^-$  omogućuje koordiniranu regulaciju funkcije bubrega, a neravnoteža je povezana s patofiziologijom osjetljivosti na sol i hipertenzije (102). U posljednjih nekoliko godina objavljena su istraživanja koja pokušavaju razjasniti potiče li povećana dijetetska sol proupalni, aterosklerotski proces (103) ili je zapravo zaštitna zbog suzbijanja RAS-a (104). Pojedine studije su pokazale kod osoba na visokoslanjoj dijeti da imaju abnormalni odgovor Ang II što rezultira značajnim porastom krvnog tlaka (105) i govori o mogućnosti štetnog utjecaja aktivacije RAS-a u raznim kardiovaskularnim bolestima koje bi se mogle spriječiti lijekovima koji blokiraju RAS (106-109). Dok su druge studije s eksperimentalnim životinjskim modelima pokazale važnu ulogu normalnog funkcioniranja RAS u održavanju vaskularne strukture i reaktivnosti. Obnova RAS funkcije eliminira oksidativni stres i vraća mehanizme vazodilatacije (110-113).

#### **1.4.1. Angiotenzin II (Ang II)**

Angiotenzin II (Ang II) je oktapeptidni hormon koji ima središnju ulogu u kardiovaskularnoj homeostazi. Tipično za mnoge proteine, Ang II je dobio ime na temelju prvotno pokazane biološke funkcijeda djeluju kao vazoaktivni agonist i induciranje kontrakcije krvnih žila. Tijekom godina, Ang II je pokazao da igra važnu ulogu u posredovanju hipertenzije, srčane insuficijencije, srčane pregradnje, dijabetesa te proliferativnog i upalnog odgovora na ozljedu arterije (114).

Angiotenzin II receptori imaju brojne utjecaje na kontrolu krvožilja u cjelini, a posebno na mikrocirkulaciju. Do sada su poznata najmanje dva angiotenzinska receptora: AT1 i AT2. Vaskularni učinak Ang II posredovanje je i AT1 i AT2 receptora (115-116). Nekoliko drugih vrsta receptora mogu odgovoriti na Ang II ili fragmente peptida koji se odnose na Ang I ili Ang II, iako ti odgovori nisu tako dobro karakterizirani kao odgovori na AT1 i AT2 receptora za aktivaciju.

Brojne kliničke i laboratorijske studije podupiru hipotezu da je renin-angiotenzinski sustav (RAS) relevantan u patogenezi kardiovaskularnih bolesti te je promijenilo tradicionalni pogled na ulogu angiotenzina (Ang) II. Povijesno gledano, na Ang II se gledalo samo kao na regulator hormona koji regulira krvni tlak, otpuštanje aldosterona i reapsorpciju natrija. Sada je općenito prihvaćeno da Ang II može aktivirati stanice koje reguliraju izražaj mnogih tvari, uključujući faktore rasta, citokine, kemokine i adhezijske molekule koji su uključeni u rast stanica / apoptozu, fibrozu i upalu (117-121). Proizvodnja Ang II u arterijskoj stijenci je važna za normalnu regulaciju arterijskog tonusa te je uključena u patogenezi ateroskleroze. U

ljudskim aterosklerotskim lezijama lokalni RAS je aktiviran što predstavlja visoku razinu ACE, Ang II i angiotenzin tipa 1 receptora (AT1) (122). Drugo važno zapažanje je da monociti / makrofagi prisutni kod vaskularnih lezija izražavaju visoku aktivnost ACE (123) i također tijekom diferencijacije monocita u makrofage, postoji aktivacija RAS i ponovno izražaj AT2 (124).

### 1.5. Oksidativni stres

Posljednja dva desetljeća oksidativni stres je jedan od najvažnijih gorućih tema među istraživačima diljem svijeta. Nekoliko endogenih stanica i staničnih komponenti sudjeluju u pokretanju i širenju ROS. Svi ti čimbenici igraju ključnu ulogu u održavanju stanične homeostaze. Oksidativni stres nastaje kada homeostatski procesi zakažu i kapacitet slobodnih radikala premaši obrambeni tjelesni kapacitet, čime se potiče izazivanje staničnih ozljeda i oštećenja tkiva. Ovo oštećenje može uključivati DNA i proteine sadržane u stanicama zbog peroksidacije lipida stanične membrane, ulaska kalcija te mitohondrijskog oticanja i lize (125-127). Štetno djelovanje slobodnih ROS radikala uzrokuju potencijalnu biološku štetu nazvanu oksidativni stres (128). To je vidljivo u biološkim sustavima kod prekomjerne proizvodnje ROS i / ili nedostatka enzimskih i neenzimskih antioksidanata. Oksidativni stres je složen proces. Njegov utjecaj na organizam ovisi o vrsti oksidansa, o mjestu i intenzitetu stvaranja, o sastavu i djelovanju različitih antioksidanata te o sposobnosti oporavka sustava (129).

Pojam "ROS" uključuje sve nestabilne metabolite molekularnog kisika ( $O_2$ ) koji imaju višu reaktivnost nego  $O_2$ , poput superoksid radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilnog radikala ( $HO \cdot$ ) i ne radikalnih molekula kao što je vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Ovi metaboliti su generirani kao nusprodukti normalnog aerobnog metabolizma, ali njihova se razina povećava pod stresom što dokazuje da je osnovni zdravstveni rizik. Mitohondrij je glavna stanična organela odgovorna za ROS proizvodnju (130-131). ATP se stvara u mitohondriju nizom procesa oksidativne fosforilacije. Tijekom ovog postupka, jedan ili dva elektrona redukcije mogu se pojaviti umjesto četiri elektrona redukcije  $O_2$ , što dovodi do nastanka  $O_2^{\cdot-}$  ili  $H_2O_2$  te se ove vrste mogu pretvoriti potom u druge oblike ROS-a. Drugi izvori ROS mogu biti reakcije koje uključuju peroksisomalne oksidaze (132), citokrom P-450 enzim (133), NAD(P)H oksidaze (134), ili ksantin (135).

Istraživanja na animalnim modelima hipertenzije, kod kojih je utvrđena snižena razina Ang II, pokazala su značajno povišenu produkciju ROS-a u stijenkama 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 (136).

### **1.5.1. Uloga antioksidativnih enzima i „hvatača“ superoksida TEMPOLA**

Da bi se suzbijanje štetnih učinaka oksidativnog stresa i slobodnih radikala moglo odvijati u stanici, sustav se brani na nekoliko načina poput sprečavanja štete, popravak mehanizama za ublažavanje oksidacijskog oštećenja, fizičkih mehanizama za zaštitu od oštećenja i najvažnijeg obrambenog mehanizma antioksidansima koji su u pravilu uvijek prva linija obrane. Endogenu antioksidativnu obranu obuhvaća splet antioksidativnih enzimatskih i neenzimatskih molekula koje su obično distribuirane u citoplazmi i različitim staničnim organelima.

Nekoliko sveprisutnih primarnih antioksidativnih enzima, kao što su SOD, katalaza, te neke podskupine peroksidaza kataliziraju kompleksnu kaskadu reakcija pretvorbe ROS-a u stabilnije molekule, kao što su voda i O<sub>2</sub>. Osim primarnih antioksidativnih enzima, veliki broj sekundarnih enzima djeluje zajedno s antioksidansima male molekularne težine i formira redoks cikluse koji osiguravaju neophodne kofaktore za primarne funkcije antioksidativnih enzima. Neenzimatski antioksidansi male molekulske mase (npr. GSH, NADPH, tioredoksin, vitamin E i C, te metali u tragovima, kao što je selen) također djeluju kao izravni hvatači („scavengers“) ROS-a. Ti enzimatski i neenzimatski antioksidativni sustavi su neophodni za opstanak, održavaju unutarstaničnu redoks ravnotežu i umanjuju nepoželjna stanična oštećenja uzrokovana ROS-om (137). Superoksidni anioni su primarni ROS-ovi generirani iz molekularnog kisika (138). Ako je dušikov oksid (NO), koji je proizveden od strane dušik monoksid sintaze, prisutan u blizini, superoksidni anion reagira s njim što dovodi do stvaranja peroksinitrita. Peroksinitrit se koristi za oksidativno uništavanje bakterija kako bi zaštitilo zacjelivanje lezija, ali je također jako toksično oksidacijsko sredstvo. Kako bi izbjegli štetne reakcije, prekomjerno proizvedeni superoksid anion je dizmutiran u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od strane SOD-a.

Postoje tri (3) SOD izoforme: bakar-cink SOD (CuZn SOD ili SOD-1), mangan SOD (MnSOD ili SOD-2) lokalizirani u mitohondrijima i vanstanični oblik EC-SOD ili SOD-3. Iako je subcelularni položaj svake izoforme SOD jedinstven, tek nedavno su se pojedina istraživanja počela fokusirati na funkcionalnu važnost pojedinih SOD izoformi unutar stijenki krvnih žila u normalnim uvjetima ili tijekom poremećaja krvožilja. Izražaj i aktivnost SOD-a vjerojatno imaju veliki utjecaj na odgovor vaskularnih stanica na akutni i kronični oksidativni stres (139-140). Izoforma CuZn SOD, prema dosadašnjim istraživanjima, izražena je u

relativno visokoj razini u svim stanicama, uključujući krvne žile gdje prevladava izoforma SOD (kad je izražen kao postotak ukupnog SOD djelovanja). Na primjer, u normalnoj aorti miša i kod CuZn SOD-deficitarnih miševa pokazalo se kako se aktivnost CuZn SOD računa za 50% do 80% od ukupne SOD aktivnosti (141-142). MnSOD predstavlja oko 2% do 12% od ukupnog vaskularnog SOD i EC-SOD predstavlja ostatak (143-144). Sličan uzorak izražaja zabilježen je u ljudskoj arteriji (145-146).

Smanjena razina CuZn SOD povećanim razinama vaskularnog superoksida i peroksinitrita, povećava miogeni ton, pojačava se vazokonstriksijski odgovor te smanjuje o endotelu ovisna (NO posredovana) dilatacija kod velikih arterija i u mikrocirkulaciji (142, 147-148). Povećanja vaskularne propusnosti nakon ishemije su uvelike promijenjena kod CuZn SOD-deficitarnih miševa (149). Promjene u izražaju CuZn SOD također mogu utjecati na vaskularnu strukturu. Na primjer, pojedini rezultati upućuju na to da nedostatak CuZn SOD uzrokuje hipertrofiju moždanih arteriola (150).

Pod normalnim uvjetima, mitohondrijski lanac prijenosa elektrona je glavni izvor superoksida, pretvarajući otprilike 5% molekularnog O<sub>2</sub> u superokside. Zbog svoje substancične lokalizacije, MnSOD se smatra prvom linijom obrane protiv oksidativnog stresa. Ovu činjenicu podupire otkriće da miševi s potpunim deficitom MnSOD umiru u roku od nekoliko tjedana nakon rođenja i pokazuju različite fenotipove (ovisno o genetskoj podlozi) uključujući degeneraciju živaca, srčane abnormalnosti i opsežna mitohondrijska oštećenja (139).

Vaskularni izražaj i/ ili aktivnost MnSOD mogu biti promijenjene u nekoliko fizioloških i patofizioloških stanja. Na primjer, MnSOD je posebno osjetljiv i reagira na povećani oksidativni stres. Promotorske regije gena MnSOD sadrže elemente odgovorne za redoks-osjetljive transkripcijske čimbenike aktivator protein-1 (AP-1) i nuklearni faktor-kB (NF-kB), koji su izuzetno važni u regulaciji različitih upalnih srodnih gena (151). Bolesti povezane s vaskularnim oksidativnim stresom također izazivaju promjenu izražaja MnSOD. Na primjer, u vaskularnom tkivu, lipopolisaharidi i proupalni citokini povećavaju superokside i izražaj MnSOD (151-155). Vaskularni mRNA izražaj CuZn SOD i MnSOD se mijenja u promatranom vremenskom periodu tijekom ateroskleroze (početno povećanje onda s vremenom smanjeni izražaj) (156-157). U većini slučajeva, funkcionalni značaj tih razlika za vaskularni izražaj ili aktivnost MnSOD nisu u potpunosti poznati. Studije na MnSOD heterozigotnim deficitarnim miševima su pokazale kako MnSOD štiti od oštećenja vaskularnog mitohondrija i razvoja ateroskleroze (158), kao i oksidiranog LDL-inducirane

DNA fragmentacije i aktivacije kaspaze u vaskularnom mišiću (141). Pojačani izražaj MnSOD upotrebom virusnog i liposomalnog prijenosnog gena proizvela je korisne učinke kod nekoliko modela bolesti krvnih žila. Korištenjem ovih pristupa, pojačani izražaj MnSOD smanjuje razinu superoksida i poboljšava funkciju endotela kod hiperkolesterolemije, dijabetesa i modelu hipertenzije s niskim reninom (159-161) uz istodobno sprječavanje nastanka hiperglikemijom- induciranih reaktivnih kisikovih spojeva u endotelu (162).

EC-SOD je jedina SOD izoforma koja je izražena izvan stanice, vezana na tkivo putem svojih heparin-vezujućih domena koje imaju afinitet prema proteinu za heparan sulfat proteoglikan na površini stanice u bazalnim membranama i u izvanstaničnom matriksu (163-164). EC-SOD lokaliziran u stijenci krvne žile, posebice između endotela i vaskularnih mišića (164-165). Izražaj EC-SOD u vaskularnim stanicama i unutar stijenci krvnih žila može se mijenjati kao odgovor na različite podražaje, uključujući vježbanje, faktore rasta, citokine, vazoaktivne stimulanse uključujući Ang II i NO te homocisteine, kao i tijekom hipertenzije, ateroskleroze i dijabetesa (143, 146, 165-171).

Glutation peroksidaze (GPx) su skupina 8 (GPx1-8) enzima koji su važni za prevođenje i smanjenje razine  $H_2O_2$ . GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo i zahtijevaju selen (172-173) za svoje antioksidativno djelovanje. U mozgu, selenoproteini GPx-1-3 postoje kao tetramerni proteini koji se sastoje od četiri identične podjedinice, a svaki monomer ima molekularnu težinu 22-23 kDa (174), a GPX4 ima aktivnost kao monomer (175). GPx1 i 4 nalaze se samo u mitohondrijima, jezgri i citoplazmi (176), te GPX1, također poznat kao GSHPx, prisutan je u neuronima i glija stanicama (177-178). Prekomjerni izražaj GPx smanjuje gubitke neurona, smanjuje akumulaciju vodikovog peroksida i peroksidaciju lipida u neurotoksičnim uvjetima (179). Glutation peroksidaza i katalaza smanjuju razinu vodikovog peroksida samostalnim djelovanjem, ali učinkovitije smanjuju toksičnost egzogenog vodikovog peroksida zajedničkim djelovanjem (180).

Katalaza (CAT,  $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  – oksidoreduktazna) je enzim s dugom poviješću koja seže do 19. stoljeća kad je postao jedan od prvih izvora vrijednih informacija o prirodi i ponašanju enzima (181). Ime katalaza je dano enzimu 1900. zahvaljujući njegovom katalitičkom djelovanju na vodikov peroksid (182). Katalaza je prije svega unutarstanični enzim. Njegove najviše koncentracije u sisavaca mogu se naći u eritrocitima, jetri i povremeno u bubregu (183). Ima dominantnu ulogu u kontroli koncentracija  $H_2O_2$  (184-185),



a time i štiti stanice gušterače od oštećenja s  $H_2O_2$ . Katalaza je enzim vrlo velike aktivnosti, jedna molekula katalaze može reducirati  $\approx 6$  milijuna molekula  $H_2O_2$  do vode i kisika, u jednoj minuti. U uvjetima oksidacijskog stresa ovaj enzim predstavlja neophodnu komponentu antioksidacijskog sustava. Osim katalaznog, enzim može imati i peroksidacijsko djelovanje koje prevladava pri fiziološkim koncentracijama vodikovog peroksida ( $<10^{-6}$  M) (186). Niska aktivnost katalaze zabilježena je kod pacijenata sa shizofrenijom, aterosklerozom (187) i dijabetesom (188-189).

Porast interesa u istraživanju uloge oksidativnog stresa kod niza različitih bolesti usmjerila je pozornost na proučavanje lijekova koji sprječavaju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ili mijenjaju njihov metabolizam. Odgovor na ta pitanja mogao bi pobliže dati uvid u temeljnu ulogu ROS u patofiziologiji i ukazati na buduće terapijske ciljeve. TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) je član obitelji nitroksidnih spojeva koji su opsežno proučavani u životinjskim modelima povećanja ROS i njegovih učinaka na hipertenziju i endotelnu funkciju (190-193). Reakcija TEMPOLA sa superoksidnim anionom ( $O_2^{\cdot-}$ ) i formiranje vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) je kao oponašanje („mimetic“) superoksid dismutaze (SOD). Luo i suradnici (194) su izvijestili kako je učinak TEMPOLA u kataliziranju metabolizma staničnog  $O_2^{\cdot-}$  vrlo sličan nativnom SOD i samo neznatno manji od stanice permeabilizirane pegiliranim oblikom SOD (PEG-SOD). Ipak, neke studije su dokumentirale dodatne važne biokemijske učinke nitroksida u olakšavanju metabolizama ROS-a i reaktivnih dušikovih spojeva. Doista, usporedba učinkovitosti TEMPOLA u metaboliziranju stanične  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ili u zaštiti oštećenja stanica uzrokovanih hidroksilnim radikalima ( $OH\cdot$ ) pokazala je osjetljivost TEMPOLA najveću za  $OH\cdot$ , nešto manju za  $H_2O_2$  i najmanju za  $O_2^{\cdot-}$ . TEMPOL je djelotvoran u kataliziranju i sprječavanju nastanka  $OH\cdot$  iz  $H_2O_2$  u prisutnosti prijelaznih metala (195-196). Vaskularno remodeliranje predznak je loših kardiovaskularnih ishoda kod bolesnika s hipertenzijom i zato je vrlo bitan faktor za ranu intervenciju i sprječavanje pogoršanja stanja krvnih žila (197). TEMPOL smanjuje medijalnu migraciju vaskularnih stanica glatkog mišića i vaskularno remodeliranje u ozlijeđenim arterijama (198). Ligacije ogranaka mezenterične arterije uzrokuje protokom izazvano remodeliranje krvnih žila u preživjelim arterijama koje je smanjeno kod pretilih „Zucker“ dijabetičnih štakora, ali obnovljeno tri tjedna nakon oralne upotrebe TEMPOLA (199). TEMPOL sprječava učinke visokih koncentracija glukoze sprečavajući oksidaciju i inaktivaciju kalcij adenzin trifosfataze sarkoplazmatskog / endoplazmatskog retikuluma koja posreduje inhibitorne učinke NO na staničnu migraciju (200). Dakle, TEMPOL se pokazao

vrlo učinkovit u sprječavanju ili vraćanju vaskularnog remodeliranja prateći vaskularni oporavak, produljenu hiperglikemiju ili hipertenzije u nekoliko modela.

### **1.5.2. Oksidativni stres i endotelna funkcija**

Oksidativni stres nastaje prilikom neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog obrambenog mehanizma. Mjesto djelovanja kardiovaskularnih rizičnih čimbenika i razvoja kardiovaskularne bolesti je u vaskularnom endotelu, a oksidativni stres ima važnu ulogu u aktivaciji endotela, razvoju ateroskleroze i hipertenzije koje vode progresiji strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja (201). Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) nastaju na mjestima upale i ozljede, a pri niskim koncentracijama mogu funkcionirati kao signalne molekule koje sudjeluju u reguliranju temeljnih staničnih aktivnosti, kao što su rast stanica i prilagodbe stanica; dok pri višim koncentracijama, ROS može prouzročiti stanične ozljede i smrt. Vaskularni endotel koji regulira prolaz makromolekula i cirkulirajućih stanica iz krvi do tkiva, glavni je cilj oksidativnog stresa te igra ključnu ulogu u patofiziologiji nekoliko vaskularnih bolesti i poremećaja. Fiziološki ROS održava vaskularni integritet i regulira funkciju endotela, krvnih žila i normalnu vaskularnu reaktivnost. U patološkim uvjetima povećane koncentracije ROS-a dovode do disfunkcije endotela i aktivacije patoloških mehanizama koji sudjeluju u razvoju hipertenzije, kao što su promicanje rasta vaskularnih glatkih mišićnih stanica, povećana kontraktilnost te invazija monocita i upala. Povećava propusnost endotela krvnih žila i pospješuje prijanjanje leukocita što je povezano s promjenama u endotelnom prijenosu signala i redoks-reguliranim transkripcijskim čimbenicima (202). Povećanjem razine oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog izražaja proupalnih citokina, što uzrokuje prekomjerno pobuđivanje imunološkog sustava. Na taj način dovodi do aktivacije endotela, infiltracije stijenke krvnih žila leukocitima i razvoja upale koja vodi razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti.

U imunološkom sustavu ROS ima fiziološku ulogu u signalizaciji koja se vjerojatno proteže na svaki tip stanice. Kao i svaki signalni mehanizam, ROS može postati citotoksičan ako je signal prejak, ako traje predugo ili ako se pojavi u pogrešno vrijeme na pogrešnom mjestu. Stanice održavaju homeostazu unatoč proizvodnji ROS-a, ne samo katabolizirajući ROS nego i popravljajući oksidativnu ozljedu (203). Stvaranje ROS-a važan je mehanizam kojim stanice imunološkog sustava, u prvom redu makrofazi (monociti i neutrofilii), uništavaju štetne mikroorganizme što dovodi i do oštećenja normalnog tkiva domaćina.

Gotovo svaka stanična komponenta može biti meta ROS-a. Učinci ROS-a na stanicu ovise o razini stanične izloženosti što za posljedicu ima pojačanu funkciju antioksidativnih mehanizama i potiče stanične zaštitne mehanizme (204). Ako je stanica izložena visokim razinama ROS-a, aktivira se upalni odgovor karakteriziran povećanim razinama TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, povećanim izražajem adhezijskih molekula i promotora oksidativnog stresa.

### **1.6. Štetnosti prekomjernog unosa kuhinjske soli na zdravlje – globalna inicijativa za smanjenje unosa kuhinjske soli**

Kao što su pokazale brojne epidemiološke studije, moždani udar glavni je uzrok smrti u modernom zapadnom društvu, a unos visokih koncentracija soli usko je povezan s njezinom pojavom (93,205-206). Oslabljena funkcija cerebralnih krvnih žila, osobito otporničkih, ima važnu ulogu u patofiziološkim mehanizmima moždanog udara. Nažalost, potencijalni utjecaj visokih unosa soli u prehrani na funkcioniranje otporničkih krvnih žila i njegovi temeljni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Prema analizi Hea i MacGregora (207) na primjeru Velike Britanije utvrđeno je kako bi smanjenje unosa kuhinjske soli s 10–12 g/dan (koliki je danas približan europski prosjek) na 5–6 g/dan što je preporuka Svjetske zdravstvene organizacije (208) spriječilo 35.000 smrti na godinu zbog cerebrovaskularnih inzulata i ishemičke bolesti srca (IBS) te dodatnih 35.000 nesmrtonosnih događaja. Smanjenje za samo 1 g/dan spriječilo bi 6700 smrti na godinu od navedenih bolesti. To na svjetskoj razini znači da bi smanjenje unosa kuhinjske soli na 6 g/dan spriječilo približno 2,5 milijuna smrti zbog navedenih oboljenja. S obzirom na dnevni unos soli, Hrvatska se nalazi na trećem mjestu u Europi, a osim toga i pri vrhu po smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. Pokrenut je strateški plan za redukciju unosa soli s ciljem da menze, vrtići, škole nude hranu s manje soli, ali i šećera i masnoće. Istraživanja su pokazala da prosječan dnevni unos kuhinjske soli u Hrvatskoj iznosi 11,6 grama (muškarci 13,3 grama, žene 10,2 grama) što je više nego dvostruko veće od preporučenog dnevnog unosa.

Prilikom definiranja i određivanja dovoljne dnevne količine soli najveći problem stvaraju skriveni izvori NaCl-a, jer 75-80% soli unosimo bez znanja kroz razne gotove i polugotove prehrambene proizvode, dok 15% dodajemo sami (205).

Zbog toga je nužno potrebna edukacija, što individualna, što na globalnoj razini. Dobar primjer toga napravile su Finska i Velika Britanija provođenjem raznih nacionalnih programa o štetnosti prekomjernog unosa kuhinjske soli na zdravlje i pokazale kako je to ozbiljan problem kojemu treba posvetiti pozornost. U Finskoj, od 1980. godine, u industrijski

proizvedenoj hrani smanjena je koncentracija kuhinjske soli i na taj način je uočen smanjen dijastolički arterijski tlak za 10 mmHg (WHO, 2006). Potom je i čitav niz drugih zemalja krenio slijediti ovakav primjer. Britanski program Consensus Action on Salt and Health (CASH) pokrenut je prije 10-tak godina, a 2005. godine je prerastao u program svjetskih razmjera pod naslovom World Action on Salt and Health (WASH). Od 2007. i Europska unija (EU) razvija inicijativu za smanjenje unosa kuhinjske soli te je razradila plan postupnog smanjivanje soli u prehrambenim proizvodima za 4% na godinu. Republika Hrvatska se također uključila 2008. godine tako što je Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi odobrilo projekt pod nazivom „Smanjenje konzumiranja soli u Hrvatskoj“ (205).

### **1.6.1. Akutni i kronični utjecaj natrijeva klorida na cirkulaciju – dosadašnja animalna istraživanja**

Štakori su najčešći eksperimentalni modeli koji su korišteni za ispitivanje vaskularne reaktivnosti i endotelne funkcije. Najčešće su ispitivane funkcije aortalnih prstenova i cerebralnih arterija. Rezultati navedenih studija pokazali su značajno oštećenu vaskularnu reaktivnost na različite fiziološke stimuluse u provodničkim krvnim žilama, otporničkim krvnim žilama te u mikrocirkulaciji (111, 209-212). Animalna istraživanja o utjecaju visokih koncentracija NaCl-a na pojavu endotelne disfunkcije krvnih žila prvenstveno se razlikuju po duljini trajanja dijetnog protokola i koncentraciji konzumirane soli (112, 136, 213).

Prva eksperimentalna zapažanja 1987. (214) su sugerirala da visoki unos soli u hrani može dovesti do promjene funkcije vaskularnog endotela, neovisno o povećanju arterijskog tlaka. Od tada postaje sve jasnije da je učinak visokog unosa soli na endotelne funkcije značajniji u velikim arterijama nego u manjim otporničkim žilama. Ispitivanja na životinjama dala su različite nalaze na pitanje postaje li ili ne endotelna funkcija u velikim arterijama narušena konzumacijom visokih koncentracija soli, prije svega s obzirom na proizvodnju NO. Pojedina istraživanja su utvrdila kako nakon 8 tjedana visokog unosa soli, modulirajući utjecaj neidentificiranog iz endotela nastalog relaksirajućeg faktora na agonist-induciranu vazokonstrikciju, smanjila se u torakalnoj aorti (214), a također i novije studije su pokazale da se endotelna sposobnost za agonist-inducirano oslobađanje NO-a izgubila u istim žilama nakon samo tri dana visokog unosa soli (212, 215). Međutim, ovi rezultati su suprotni drugima koji su za slično razdoblje visokog unosa soli utvrdili kako se povećava agonist-inducirano oslobađanje NO iz endotela aorte, vjerojatno putem aktivacije TGF- $\beta$  ovisnog signalnog puta koji vodi do povećanja Akt- ovisne fosforilacije eNOS-a (216-219). U ovom

slučaju nisu doneseni pravi zaključci koliki unos soli može utjecati na razinu izražaja eNOS-a u velikim arterijama. Različite studije na aortama štakora, hranjenih visokim dozama soli pokazuju da se proteinska razina eNOS povećava (218), smanjuje (220) ili ostaje nepromijenjena (221-222). Za razliku od različitih nalaza u aorti, bilo je više skladnih rezultata koje su ispitivale utjecaj visokih koncentracija soli na periferne otporničke žile. Studije s naglaskom na male mišićne arterije i arteriole dovele su do definitivnog i ujednačenog zaključka kako visoki unos soli može dovesti do disfunkcije endotela koja je najčešće karakterizirana smanjenom bioraspoloživošću NO.

Taj efekt je jasno dokumentiran u skeletnim mišićima, cerebralnoj i mezenteričkoj vaskulaturi. U većini slučajeva, ukupno smanjena o endotelu ovisna dilatacija kod štakora hranjenih visokim dozama soli, zajedno s opažanjem da inhibicija NOS uzrokuje isti stupanj smanjenja kod štakora hranjenih normalnom prehranom, snažno ukazuje da nema kompenzacijskih povećanja dilatacije pomoću drugih vazoaktivnih molekula. Ipak, postoji nekoliko israživanja koja govore u prilog kompenzacijskih mehanizama kod VS dijete, tako da se aktiviraju o endotelu ovisni hiperpolarizirajući faktori koji nadoknađuju gubitak dilatacije mezenteričnim otporničkim arterijama kod SD štakora (8% NaCl-a kroz 4 tjedna) (223) i Dahl SS štakora (8% NaCl-a kroz 4 tjedna) (224) te da povećano oslobađanje o endotelu ovisnih faktora kontrakcije (više nego gubitak o endotelu ovisnih vazodilatatora kao što su EDHF ili NO) doprinose oslabljenoj relaksaciji bubrežnih arterija kod spontano hipertenzivnih štakora na visokoslanjoj dijeti (6% NaCl 8 tjedana) (225).

U skeletnim mišićima štakora i miševa, istraživanja intravitalnom mikroskopijom, pokazala su da je u stabilnom stanju (tj " kod odmora") tonus arteriola i protok krvi ostao nepromijenjen kod VS prehrane (226-229). U skladu s tim nalazima, izravno mjerenje mikrovaskularnog tlaka i cijelog krvnog protoka kroz organe potvrdilo je da su ukupni otpor kroz vaskularne organe, kao i njegova razmjerna raspodjela u različitim segmentima mikrovaskularne mreže, pod utjecajem visokog unosa soli (230-231). Međutim, kada je izazvana o endotelu ovisna dilatacija s ACh, razina dilatacije arteriola skeletnih mišića kod životinja hranjenih visokom dozom soli, bila je značajno manja u odnosu na odgovore dobivene u životinja hranjenih normalnom količinom soli (213, 232). O endotelu ovisna dilatacija arteriola skeletnih mišića prilikom hemodinamskog smicanja (tj "tijek posredovanog pucanja") također je smanjena kod štakora hranjenih VS dijetom (227), što znači da je taj učinak nije ograničen na reakcije posredovane receptorima. Dilatacija otporničkih žila

skeletnih mišića na ACh i druge agoniste ovisne o endotelu te povećana sila smicanja, uglavnom (ali ne potpuno) je posredovana otpuštanjem NO (233-235).

U štakora i miševa hranjenih normalnim koncentracijama soli, dodatak inhibitora NOS-a (analoga L-arginina) smanjio je razinu o endotelu ovisne dilatacije na jednaku razinu koja je uočena kod skupine na VS dijeti, ali također je uočeno i da inhibitor nije imao utjecaj na smanjenu endotel ovisnu dilataciju u visokoslanoj skupini, što još jednom potvrđuje kako visoka sol smanjuje razinu dostupnog NO (226-227, 236-237).

Učinak visokog unosa soli na endotelnu funkciju u otporničkim moždanim krvnim žilama sličan je onome koji se navodi u skeletnim mišićima. Konzumiranje visokoslane dijete u štakora, za samo 3 dana uvelike smanjuje o endotelu ovisnu dilataciju na ACh u moždanim kortikalnim arteriolama (238), kao i u središnjoj moždanoj i bazilarnoj arteriji (210-211, 239-240). Ovo smanjenje dilatacije pripisano je također selektivnim gubitom NO aktivnosti na temelju mjerenja razine NO u stijenkama krvožilja upotrebom 4,5 diaminofluorescein (DAF-2) testa (240), kao i različito djelovanje inhibitora NOS na dilataciju potaknutu s ACh u žilama štakora hranjenih normaliziranom hranom i hranom s visokim udjelom soli koje je slično dokazima kod žila skeletnih mišića (211). Otpornost mezenterične arterije izolirane kod štakora hranjenih VS dijetom također pokazuju ozbiljno smanjenje o endotelu ovisne dilatacije na ACh i njegovog analoga metakolina, kao i na histamin te drugih o endotelu ovisnih dilatatora (241).

Uz vrlo malo iznimaka, široko rasprostranjeno smanjenje biorasploživog NO u otporničkim žilama životinja hranjenih visokim koncentracijama soli očito ne prati bilo kakve promjene u unutarnjoj reakciji VSM na NO. Dilatacija kao odgovor na različite donore NO, koji djeluju izravno na VSM, pokazala se normalnom u skeletnim mišićima, otporničkim moždanim i mezenteričnim žilama kod životinja na visokoslanjoj prehrani u usporedbi sa skupinom koja je konzumirala niske koncentracije soli (226-228, 242-243).

Sve je više dokaza koji upućuju na to kako  $O_2^{\cdot-}$  igra središnju ulogu u smanjenoj raspoloživosti NO-a. Ovaj visoko reaktivni metabolit kisika je već dugo poznat da oksidira iz endotela nastali NO i time ometa njegovo djelovanje na tonus krvnih žila (244-246). Povećana razina  $O_2^{\cdot-}$  je uključena u narušavanje o endotelu ovisne vaskularne kontrole koja je povezana s različitim patološkim stanjima, uključujući hipertenziju, ishemijsko-reperfuzijske ozljede i dijabetes (247-248).

Tretman sa SOD ili TEMPOLOM vraća razinu dilatacije i NO razinu do razine (209, 212-213, 215, 249) izmjerene kod životinja hranjenih normalnom koncentracijom soli što ukazuje da je  $O_2^{\cdot-}$  odgovoran je za oksidaciju NO pod tim uvjetima. Uz ubrzano raspadanje iz endotela nastalog NO,  $O_2^{\cdot-}$  formirana u vaskularnim stijenkama životinja hranjenih visokom soli može izravno utjecati na unutarstanične signalne puteve, koji obično povećavaju aktivnost eNOS-a, što vodi do smanjene proizvodnje NO. Na primjer, inducirani agonist hiperpolarizacije endotelne stanične membrane, koji je važan čimbenik u povećanju produkcije NO, znatno je smanjen u aorti štakora hranjenog s VS dijetom, a to je djelomično zbog pogoršanja intermedijerane provodljivosti  $Ca^{2+}$  - osjetljivih  $K^+$  (IKCa) kanala (250). Postoji nekoliko mogućih izvora  $O_2^{\cdot-}$  u vaskularnoj stijenci, uključujući mitohondrijski respiratorni lanac, NAD(P)H ksantin oksidaze, ciklooksigenaze, citokrom P-450 enzim i NOS (248). Antioksidativni sustavi su također prisutni u održavanju stanične redoks homeostaze i sprječavanju prekomjernog nakupljanja  $O_2^{\cdot-}$  te njegovih reaktivnih metabolita (251).

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 prehrambene soli može dovesti do smanjenog izražaja CuZn SOD izoforme i mangan (Mn) SOD u otporničkim krvnim žilama (112, 211). Međutim, taj učinak nije uniforman za svaku vaskulaturu; visok unos soli nema utjecaja na izražaj niti CuZn SOD ili MnSOD u mezenteričnim arterijama (251) niti na izražaj CuZn SOD u arterijama skeletnih mišića (232). Postoje dokazi koji ukazuju na to da visoki unos soli može dovesti do smanjene aktivnosti SOD u arteriolama. Povećanje razine  $O_2^{\cdot-}$  u arteriolama, koje prati farmakološku inhibiciju CuZn SOD, znatno je manje kod štakora hranjenih VS dijetom, nego u onih hranjenih NS dijetom, sugerirajući da je CuZn SOD aktivnost niža u arteriola kod štakora hranjenih visokim koncentracijama soli (232).

Točni uzročnici koji dovode do povećanja  $O_2^{\cdot-}$  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 tom pogledu.

Studije na životinjama pokazale su da je ključna poveznica između visokoga unosa soli i razvoja endotelne disfunkcije angiotenzin II (Ang II) (210). Unos povećane količine soli u organizam dovodi do smanjenja koncentracije Ang II u plazmi. Potom je ustanovljeno da

snižene vrijednosti Ang II dovode do povećanja oksidativnoga stresa i oštećenja vaskularne reaktivnosti (136). Ta tvrdnja potvrđena je uvođenjem intravenskih infuzija subpresorskih doza Ang II tijekom visokoslane dijeta što je odvelo do uspostavljanja normalne vaskularne relaksacije i sniženja slobodnih kisikovih radikala na normalne vrijednosti (211).

Sumirano, povećani oksidativni stres definitivno je u podlozi narušene, o endotelu ovisne, vaskularne relaksacije u svim životinjskim modelima s VS prehranom, koji uglavnom utječu na proizvodnju ili bioraspoloživost NO. Međutim, podaci o učinku VS prehrane na mehanizme FID otporničkih žila, posebice u moždanoj cirkulaciji i ulozi vaskularnih antioksidativnih obrambenih mehanizama, kao i potencijalne interakcije s leukocitima u cirkulaciji, još su uvijek rijetki i nisu u potpunosti jasno definirani.

### **1.7. Hipoksijom inducirani faktor – 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ )**

HIF-1 je heterodimerni kompleks koji se sastoji od hipoksično inducibilne podjedinice HIF-1 $\alpha$  i konstitutivno eksprimirane podjedinice HIF-1 $\beta$ . Ti proteini pripadaju osnovnoj heliks-petlja-heliks Per-ARNT-Sim (bHLH - PAS) proteinskoj obitelji (253). bHLH i PAS su potrebni za formaciju heterodimera između HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  podjedinica omogućujući specifično vezanje za hipoksija odgovarajuće elemente (HRE) DNA sekvence (254). HIF-1 $\beta$  je konstitutivno izražen jezgrin protein, dok se HIF- $\alpha$  inducira hipoksijom (253). Postoje tri izoformna oblika HIF- $\alpha$ , pri čemu su HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  međusobno vrlo slična i oba sposobna djelovati s elementima odgovora na hipoksiju (HRE) i inducirati transkripciju (255). Eksperimenti upućuju da aktivacija HIF-1 uključuje redoks ovisnu stabilizaciju HIF-1 $\alpha$  proteina (256). U uvjetima hipoksije HIF-1 $\alpha$  se translocira se u jezgru i heterodimerizira s  $\beta$  podjedinicom te formira HIF-1 kompleks (257). U uvjetima dostatne količine kisika dolazi do razgradnje HIF-1 $\alpha$  podjedinice. Identificirane su dvije odvojene domene unutar HIF-1 $\alpha$  podjedinice, koje su odgovorne za mehanizam kojim stanični kisik regulira HIF-1 aktivnost. Razgradna domena ovisna o kisiku (ODD) HIF-1 $\alpha$  sadrži dva prolilna ostatka (Pro 402 i Pro 564) i posreduje interakciju s von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaznim kompleksom. Prolilni ostaci se hidroksiliraju specifičnim HIF prolil-hidroksilazama (PHD1, PHD2, PHD3) i na taj se način HIF-1 $\alpha$  degradira (257-258). Drugi mehanizam utječe na C-terminalnu aktivacijsku domenu (CAD), hidroksilirajući asparaginski ostatak te je taj faktor inhibicije nazvan FIH-1 (257). HIF prolil hidroksilaze i FIH-1 služe kao senzori za kisik u putevima odgovornim za hipoksiju (259). HIF hidroksilaze su Fe(II) ovisne dioksidogene koje imaju veliku sposobnost vezanja kisika čime omogućuju stabilnost HIF u



hipoksičnim uvjetima. Jedan od važnih gena vezanih uz HIF je i faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF) koji se u stanjima hipoksije također snažano luči. Kada u hipoksičnim uvjetima dođe do dimerizacije HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  molekule, ovaj se kompleks veže za elemente odgovora na hipoksiju na 5'-kraju VEGF gena i aktivira njegovu transkripciju (260).

No, o ulozi HIF-1 $\alpha$  i njegovih ciljnih gena u stanjima povišenog oksidativnog stresa i pri unosu visokih koncentracija soli ima malo podataka. U dosadašnjim istraživanjima utjecaja unosa visokih koncentracija soli i navedenog transkripcijskog faktora, studije su se bazirale na promjenama vezanim uz utjecaj soli na modifikaciju HIF-1 $\alpha$  u bubrežima. Transkripcijski faktor induciran hipoksijom HIF -1 $\alpha$  značajno je izražen u bubrežnoj moždini te je dokazano kako je razina HIF-1 $\alpha$  značajno povećana prilikom visokog unosa soli (261). Pretpostavlja se da HIF-1 $\alpha$  posredovana regulacija gena u bubrežnim srži predstavlja važan molekularnu adaptivni mehanizam kao odgovor na visok unos soli i igra ključnu ulogu u održavanju razine natrija. Prema našim saznanjima, do sada nitko nije ispitivao izražaj navedenih gena u modelu središnje moždane arterije u uvjetima akutnog unosa visokih koncentracija soli.

## **2. HIPOTEZA**

Vaskularni odgovor na protokom posredovanu dilataciju kod visokoslane dijeta određen je sintezom reaktivnih kisikovih spojeva u vaskularnoj stijenci i utječe na mehanizme vaskularne reaktivnosti.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) odrediti bazični vaskularni odgovor te razjasniti mehanizme protokom posredovane dilatacije srednje moždane arterije kod visokog unosa natrijevog klorida u funkcionalnim *in vitro* studijama;
- 2) utvrditi izražajnost gena navedenih u protokolu istraživanja uključenih u dilatacijske putove kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora kvantitativnom PCR metodom u stvarnom vremenu;
- 3) odrediti izražajnost antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga (izoforme superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC-SOD), glutation-peroksidaze 1 i 4 (GPx1 i 4), te katalaze (CAT)) u krvnim žilama mozga i utvrditi ulogu HIF-1 $\alpha$  gena u promijenjenim mehanizmima;
- 4) utvrditi dolazi li do aktivacije leukocita tijekom visokoslane dijeta te njihovu ulogu u poremećenom vaskularnom odgovoru kod visokog unosa natrijevog klorida

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Ustroj studije**

Unos niskoslane (0.4% NaCl) i visokoslane hrane (4% NaCl) vršio se konzumiranjem komercijano dostupne hrane za male laboratorijske životinje (proizvođač Mucedola, Italija). Životinje su u isto vrijeme imale dostupnu običnu vodu ili vodu u kojoj je otopljena kemikalija TEMPOL (1 mM) (262). Hranu i tekućinu su uzimale prema vlastitoj potrebi tijekom 7 dana. Nakon 7 dana dijete, štakori su izvagani te anestezirani kombinacijom ketanesta S 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) (263). Životinjama je prije dekapitacije izmjeren krvni tlak uvođenjem katetera u femoralnu arteriju te je nakon toga kroz isti kateter dobivena čista arterijska krv za određivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta. Potom su životinje dekapitirane te je izolirana srednja moždana arterija (funkcionalne studije), krvne žile mozga (rtPCR), skupljeni su uzorci miješane (arterijska i venska) krvi (protočna citometrija), periferni i mezenterični limfni čvorovi te slezena (protočna citometrija). 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. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa:602-04/14-08/06, Broj: 2158-61-07-14-04).

### **4.2. Ispitivane grupe**

Istraživanje je provedeno na zdravim muškim Sprague - Dawley štakorima starosti 11-12 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 4 skupine (N – broj životinja):

- 1) Niskoslana (NS) skupina (N= 5-16, konzumirala je standardnu hranu za štakore i običnu pitku vodu)
- 2) Visokoslana (VS) skupina (N= 5-15, životinje su konzumirale hranu s visokim udjelom soli (4% NaCl-a) i običnu pitku vodu 7 dana)
- 3) Niskoslana (NS) skupina + TEMPOL (N= 5-10, životinje su istovremeno konzumirale standardnu hranu za štakore i vodu s otopljenim TEMPOLOM 7 dana)
- 4) Visokoslana (VS) skupina + TEMPOL (N= 5-16, životinje su istovremeno konzumirale hranu s visokim udjelom soli (4% NaCl-a) i vodu s otopljenim TEMPOLOM 7 dana)

### **4.3. Mjerenje krvnoga tlaka**

Štakori su anestetizirani kombinacijom ketamina (75 mg / kg) i midazolama (2,5 mg / kg). PE-50 kateter smo uveli u lijevu femoralnu arteriju. Životinje su ostavljene 10 minuta dok se krvni tlak stabilizirao, a nakon toga krvni tlak je mjereno tijekom 1 minuta, te je srednja vrijednost izračunata iz dobivenih vrijednosti. Srednji arterijski tlak je mjereno pomoću Spacelabs Medical sustava (Spacelabs Medical, Inc., Redmond, WA, USA) (263).

### **4.4. Skupljanje arterijskih uzoraka krvi**

Nakon izmjerenog krvnog tlaka, kroz kateter je uzet uzorak arterijske krvi u epruvetu bez antikoagulansa kako bi smo dobili uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 min/3500 rpm te je potom odvojen serum od krvnih stanica i pohranjen u hladnjaku na -80 °C do upotrebe u svrhu određivanja parametara oksidativnog sresa (FRAP i TBARS).

### **4.5. Funkcionalna studija - protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije**

Nakon dekapitacije, pomoću mikrokirurškog pribora i operacijskog mikroskopa iz mozga je izolirana središnja moždana arterija, te je potom postavljena između staklenih mikropipeta (vanjskog promjera ~ 100-200  $\mu\text{m}$ ) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom (37 °C) fiziološkom slanom otopinom (PSS, pH = 7.4  $\pm$  0.05) sastava (u mM / l): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 CaCl<sub>2</sub>·1.6MgSO<sub>4</sub>, 1.18 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 0.026 EDTA i 5.5 glukoze. Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i balans N<sub>2</sub>. Krajevi moždane arterije su pričvršćeni tankim šavom (10-0 nylon Black) za pipete. Nakon postavljanja u komoricu arterija je inkubirana 60 minuta (111). Žila je cijelo vrijeme snimana infracrvenom kamerom te se slika prikazuje na monitoru. Promjena promjera krvne žile mjerena je pomoću softvera Pressure Myograph System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT (Danish Myo Technology). Kao bazični odgovor, mjerio se unutarnji promjer žile nakon inkubacije, a zatim nakon protokom-posredovane promjene promjera, koja se postiže različitim gradijentima tlaka,  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg. Za procjenu endotel-ovisne vazodilatacije, koristio se acetilkolin (ACh). Protokom-posredovana dilatacija krvnih žila mjerila se u odsutnosti i prisutnosti: a) inhibitora NO sintaze (NOS), N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estera (L-NAME); b) inhibitora ciklooksigenaze, indometacina (INDO); c) selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze, MS-PPOH; d) NO donora, natrijeva nitroprusida (SNP) i e) "hvatača" superoksidnih radikala, TEMPOLA. Na kraju pokusa svaka je žila perfundirana s otopinom PSS-a bez iona kalcija kako bi se utvrdio maksimalni promjer krvne žile.

#### **4.6. Relativni izražaj gena određen PCR metodom u realnom vremenu**

U zasebnoj skupini pokusa, iz mozga su izolirane sve krvne žile i prikupljene za određivanje relativnog izražaja gena primjenom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (rtPCR). Moždane krvne žile su pohranjene u RNeasy lysis buffer (Qiagen, SAD), u omjeru 1: 5 RNeasy lysis buffer. To je netoksični reagens za pohranjivanje tkiva koji trenutno prodire u tkivo te omogućuje njegovo očuvanje, zamrzavanje uzoraka i deaktiviranje RNA-ze. Do daljnjeg procesuiranja, uzorci su pohranjeni na -80 ° C. Homogenizacija uzorka i ukupna RNA je ekstrahirana pomoću TRI reagents (Life Technologies, USA) prema protokolu od strane Chomczynski i sur. (1987) (264). Koncentracija RNA i čistoća uzoraka određivana je pomoću Nanophotometer P300 UV / VIS, IMPLLEN, a potvrda postojanosti i prisutnosti RNA provedena je postavljanjem uzoraka na 1%-tnom agaroznom gelu. Pročišćavanje uzoraka i dobivanja cDNA je provedeno prema uputama proizvođača: Sigma-Aldrich i Applied Biosystems.

Određen je izražaj gena: izoforme superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD, MnSOD, EC SOD), hipoksijom inducirani faktor - 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ), ciklooksigenaze 1 i 2 (COX-1 i COX-2), katalaza, glutation peroksidaze 1 i 4 (GPx1 i GPx4), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), inducibilna dušik oksid sintaza (iNOS), endotelna dušik oksid sintaza (eNOS), HIF prolil hidoksilaze (PHD1, PHD2 i PHD3). Izražaj gena normaliziran je u odnosu na izražaj gena hipoksantin-guanin phosphoribosyltransferase (HPRT). Određivanje izražaja svih navedenih gena izmjereno je na uređaju PCR-u u realnom vremenu Bio Rad CFX96.

#### **4.7. Protočna citometrija**

*Priprema uzoraka:*

Periferna krv je sakupljena u tubicama koje su sadržavale 6-10% 0.5 M EDTA. Ostala tkiva su po izolaciji bila homogenizirana u fosfatnom puferu (PBS-u, pH 7,2-7,4) korištenjem mikroskopskih predmetnih stakalaca s brušenim rubovima te filtrirana kroz pamučnu vatu. Dobivena stanična suspenzija se 1x ispirala u PBS-u (1x 5 min centrifugiranja na 400xg i +4°C) te resuspendirala u adekvatnom volumenu svježeg PBS-a. Koncentracija stanica je bila prilagođena na 1x10<sup>7</sup>stanica/ml.

### *Površno i unutarstanično bojanje*

Leukociti iz različitih uzoraka bili su bojani na a) CD45 i CD11a markere, ili b) CD8, CD4, CD25 i Foxp3 korištenjem protutijela proizvođača BD Bioscience i eBioscience. U tu svrhu, 50  $\mu$ L suspenzije stanica ili pune krvi bilo je dodano u 50  $\mu$ l suspenzije gore navedenih protutijela (u završnom razrjeđenju 1:200) te su uzorci bili inkubirani 30 minuta na hladnom (+2-8°C) i tamnom mjestu. Nakon perioda inkubacije stanice su bile 1x isprane (5 min centrifugiranja na 400xg, +4°C) te resuspendirane u 500 $\mu$ l 1x CellFixu. Iznimno, nakon inkubacije s protutijelima, uzorci krvi su bili podvrgnuti dodatnom koraku lize eritrocita korištenjem komercijalnog pufera za lizu eritrocita (Lysis buffer, BD Biosciencema). Svakom uzorku pune krvi bilo je dodano 2ml 1x otopine za lizu te su nakon 15 minuta inkubacije uzorci bili 2x isprani i na kraju resuspendirani u 500  $\mu$ l 1x CellFixu. Uzorci su do analize na protočnom citometru bili pohranjeni na +4°C. U slučaju unutarstaničnog bojanja protokol je proveden prema uputama proizvođača (eBioscience), nakon toga je dodano 50  $\mu$ l protutijela PE-anti-Foxp3 u završnom razrjeđenju 1:50 te inkubirano na sobnoj temperaturi 30 min te potom isprano 2x. Po završnom ispiranju stanicama je dodan 1x CellFix te su uzorci analizirani na protočnom citometru. Protokoli su kombinirani iz više različitih istraživanja te prilagođeni našim uzorcima (265-266).

### *Provjera stanične vijabilnosti:*

Stanična vijabilnost je provjerena korištenjem 7-AAD. 100  $\mu$ l uzorka stanica inkubirano je sa 1 $\mu$ L 7-AAD 5 do najviše 15 minuta na +4°C te su uzorci odmah potom bili analizirani na protočnom citometru zbog mogućnosti nespecifičnog ulaska boje u stanice kod produžene inkubacije. Nisu se poduzimali koraci ispiranja uzorka.

### *Mjerenje unutarstanične produkcije ROS-a:*

U svrhu određivanja razine oksidativnog stresa (proizvodnje vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>)) korišten je diklorofluorescein diacetat (DCF-DA). DCF-DA je bio pripremljen u završnoj koncentraciji 10 $\mu$ M. 10 $\mu$ L otopine je dodano suspenziji stanica (50 $\mu$ l stanica+40 $\mu$ l PBS-a) te su uzorci bili očitani nakon 30 minuta inkubacije na +4°C. Uzorci s DFC-DA su prije analize bili 1x isprani u 2ml PBS-a te resuspendirani u 450 $\mu$ l PBS-a (5 min centrifugiranje na +4°C, 400xg). Nakon očitavanja svakom uzorku je bilo dodano 50 $\mu$ l 1 mM forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, Calbiochem, Darmstadt, Germany) za stimulaciju produkcije ROS-a te su uzorci nakon 30 minuta inkubacije na +4°C bili ponovno

očitanu na protočnom citometru. Protokoli su također kombinirani iz više različitih istraživanja te prilagođeni našim uzorcima (267-268).

#### *Analiza uzoraka na protočnom citometru*

Za analizu uzoraka i pohranu podataka korišten je protočni citometar FACS Canto II (BD Bioscience; 488 laser za ekscitaciju te 530/30 BP filter za analizu) i Diva 6 program. Završne analize učinjene su pomoću besplatnog programa za analizu FSC datoteka, Flowing software (by Perttu Terho).

#### **4.8. Parametri oksidativnog stresa (FRAP i TBARS)**

Mjerenje oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu izmjereno je pomoću standardiziranih protokola spektrofotometrijskim metodama. TBARS (269) metoda se temelji na reakciji malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta peroksidacije lipida, s tiobarbiturnom kiselinom (TBA, od engl. tiobarbituric acid). Za korekciju pozadinske apsorbancije, vrijednosti apsorbancije na 572 nm su se oduzele od vrijednosti dobivenih na 532 nm, što predstavlja apsorpcijski maksimum od TBA: MDA. Kao standard upotrebljavao se MDA, a rezultati su bili uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću MDA i izraženi kao mikromolarni MDA ekvivalent.

FRAP (270) metoda je korištena za određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme. U ovom testu,  $\text{Fe}^3\text{-TPTZ}$  se reducira do  $\text{Fe}^2\text{-TPTZ}$  uz prisustvo antioksidanasa i nastalo je plavo obojenje čija je apsorbancija mjerena na 593 nm. Rezultati su bili uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću Troloxa (TE) te su izraženi kao mikromolarni TE ekvivalenti. Dobivene vrijednosti očitane su nananofotometru P300 UV/VIS, IMPLLEN.

#### **4.9. Statistička analiza**

Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. Dilatacija koju proizvodi protok, acetilkolin i natrijev-nitroprusid, izražena je u postotku uvijek 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. Za usporedbu rezultata genskog izražaja i rezultata protočne citometrije korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke One-Way ANOVA ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Kod pojedinih rezultata, za utvrđivanje međusobne razlike normalno



raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina koristio se Studentov t test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U test. Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA). Za utvrđivanje povezanosti HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog faktora s ostalim ispitivanim genima korišten je Pearsonov koeficijent korelacije r (MedCalc 10.2.0.0.). Statistička je značajnost podešena na  $P < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opći podaci o izmjerenim vrijednostima krvnog tlaka, težine i funkcionalnosti srednje moždane arterije

U studiju su bili uključeni zdravi, normotenzivni muški Sprague-Dawley štakori starosti 11 tjedana. Svakoj životinji je mjerena tjelesna masa te krvni tlak. Prilikom funkcionalnih studija na početku pokusa (nakon inkubacije 60 minuta) mjerena je promjer središnje moždane arterije pri  $\Delta 0$  mmHg kao i maksimalna dilatacija arterije (dodatkom PSS otopine bez kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$  free otopine)) i aktivni ton (%). Svaka arterija koja se nije mogla maksimalno dilatirati nakon dodatka  $\text{Ca}^{2+}$  free otopine ili nije dilatirala na dodatak acetilkolina bila je isključena iz istraživanja. Aktivni ton (%) žile je izračunat kao  $[(D_{\text{max}} - D_{\text{baz}})/D_{\text{max}}] * 100$ , gdje su  $D_{\text{max}}$  i  $D_{\text{baz}}$  maksimalna dilatacija žile i bazalni promjer moždane arterije pri  $\Delta 0$  mmHg.

**Talica 1.** Vrijednosti tjelesne mase, krvnog tlaka i opće informacije o funkcionalnosti srednje moždane arterije

Ispitivana skupina	Dob (tjedana)	Tjelesna masa (g)	Srednji arterijski tlak (mmHg)	Promjer središnjem moždane arterije pri $\Delta 0$ mmHg ( bez protoka) ( $\mu\text{m}$ )	Maksimalna dilatacija MCA ( $\text{Ca}^{2+}$ free) ( $\mu\text{m}$ )	Aktivni ton (%)
NS	11	349.5 $\pm$ 33.96	112.48 $\pm$ 2.16	130.56 $\pm$ 7.73	240.29 $\pm$ 13.24	48.27 $\pm$ 0.55
VS	11	369.8 $\pm$ 26.83	107.15 $\pm$ 3.01	126 $\pm$ 7.25	238.12 $\pm$ 8.37	48.10 $\pm$ 1.84
NS+TEMPOL	11	378.9 $\pm$ 9.77	107.48 $\pm$ 2.04	133.92 $\pm$ 5.86	231.6 $\pm$ 6.72	44.41 $\pm$ 2.10
VS+TEMPOL	11	364.5 $\pm$ 7.22	101.42 $\pm$ 3.43	124.25 $\pm$ 5.79	227.19 $\pm$ 9.40	46.48 $\pm$ 1.30

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

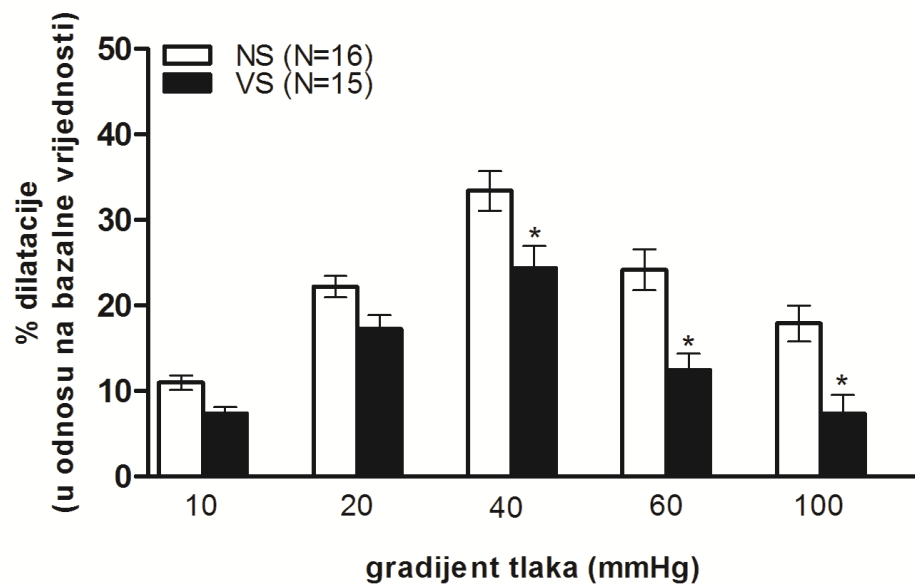
NS- niskoslana skupina; VS-visokoslana skupina

Nisu utvrđene značajne razlike u tjelesnoj masi šakora kao i vrijednostima krvnog tlaka ( $p=0.077$ ) između ispitivanih skupina.

Sve središnje moždane arterije su bile podjednagog bazalnog i maksimalnog promjera kao i vrijednosti aktivnog tona (%) bez statistički značajne razlike između grupa ( $p>0.05$ ) što je potvrda pravilne izolacije središnje moždane arterije i pravilno odrađenih funkcionalnih studija (Talica 1.)

## 5.2. Bazični odgovor središnje moždane arterije niskoslane i visokoslane ispitivane skupine na protokom potaknutu dilataciju

Protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije smanjena je u skupini životinja na visokoslanjoj dijeti pri svakom gradijentu tlaka, a značajno pri gradijentima  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  mmHg ( $p < 0.05$ ) (Slika 1).



\*  $P < 0.05$  NS vs. VS

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

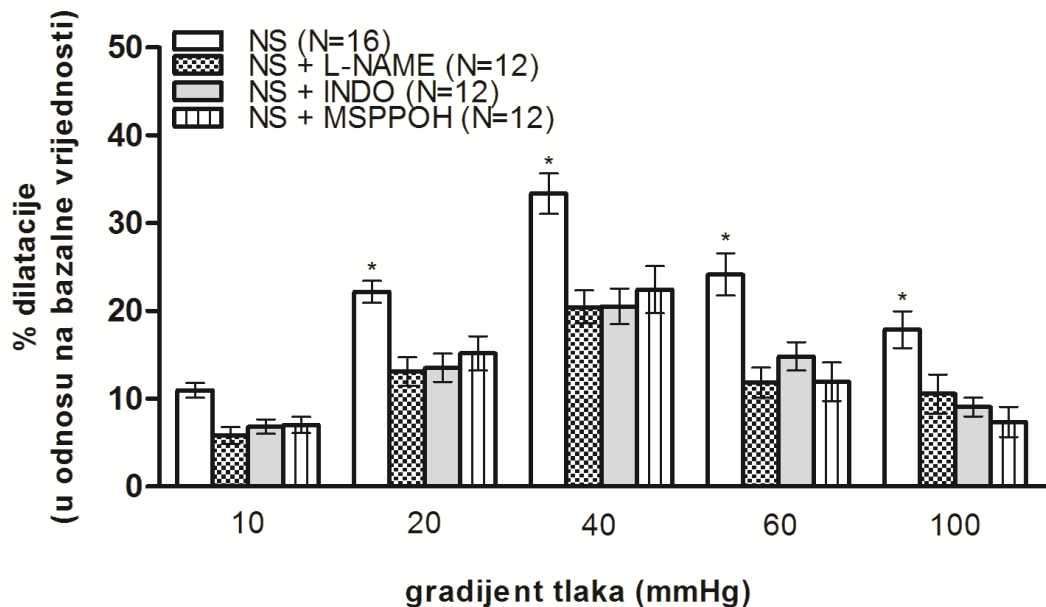
NS - niska sol

VS - visoka sol

*Slika 1. Bazični odgovor srednje moždane arterije na promjenu gradijenta tlaka kod niskoslane skupine životinja (N=16) i životinja na visokoslanjoj dijeti (N=15) izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti.*

### 5.3. Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a (zasebno i u međusobnoj kombinaciji) na protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije ispitivane skupine na niskoslanjoj dijeti

U prisutnosti inhibitora NO sintaze (L-NAME ( $10^{-5}$ M)), ciklooksigenaza (indometacin (INDO;  $10^{-5}$ M)) te selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze (MS-PPOH ( $10^{-5}$ M)) značajno je smanjena protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije u niskoslanjoj skupini pri svakom ispitivanom gradijentu tlaka ( $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg) osim  $\Delta 10$  mmHg ( $p < 0.05$ ) (Slika 2).

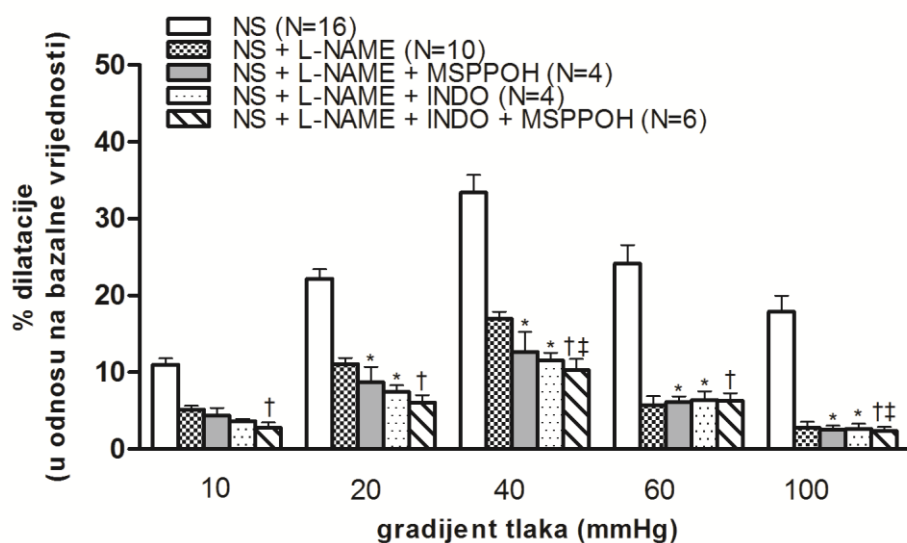


\*  $P < 0.05$  NS vs. NS + L-NAME; NS + INDO; NS + MSPPOH  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
 NS - niska sol

**Slika 2. Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a (svaki inhibitor zasebno) na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja**

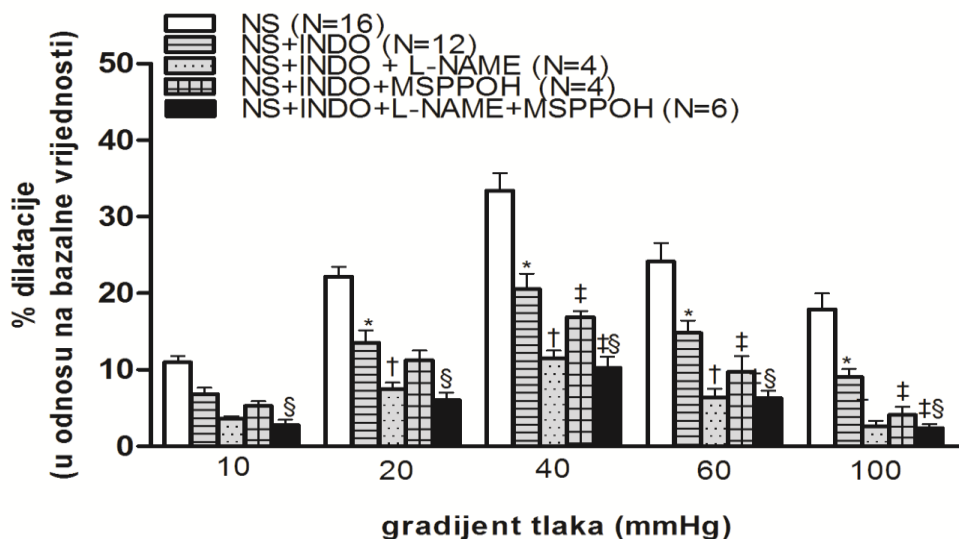
U svrhu utvrđivanja zauzima li pojedini ispitivani inhibitora primarnu ulogu u odgovoru središnje moždane arterije na razinu protokom posredovane dilatacije u niskoslanoj skupini mjerena je razina protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije u prisutnosti različitih kombinacija prije spomenutih inhibitora.

Kombinacijom inhibitora značajno je smanjena protokom posredovana dilatacija pri većini gradijenata tlaka ( $p < 0.05$ ) u odnosu na bazični odgovor a isto tako i na primjenu svakog inhibitora zasebno. Također statistički značajna razlika dobivena je i između odgovora krvne žile primjenom svakog inhibitora pojedinačno i u prisutnosti sva tri inhibitora zajedno (Slika 3, 4 i 5). Protokom posredovana dilatacija u skupini kontrolnih životinja ovisna je o razini NO, metabolitima ciklooksigenaza i EET-a.



\*  $P < 0.05$  NS vs. NS + L-NAME+MSPPOH; NS + L-NAME+INDO  
 †  $P < 0.05$  NS vs. NS + L-NAME+INDO+MSPPOH  
 ‡  $P < 0.05$  NS + L-NAME vs. NS + L-NAME+INDO+MSPPOH  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
 NS - niska sol

**Slika 3. Učinak inhibicije NO sintaze (NOS) s inhibitorom L-NAME-om, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima ciklooksigenaza i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanoj ispitivanoj skupini životinja**



\*  $P < 0.05$  NS vs. NS+INDO

†  $P < 0.05$  NS vs. NS+INDO+L-NAME

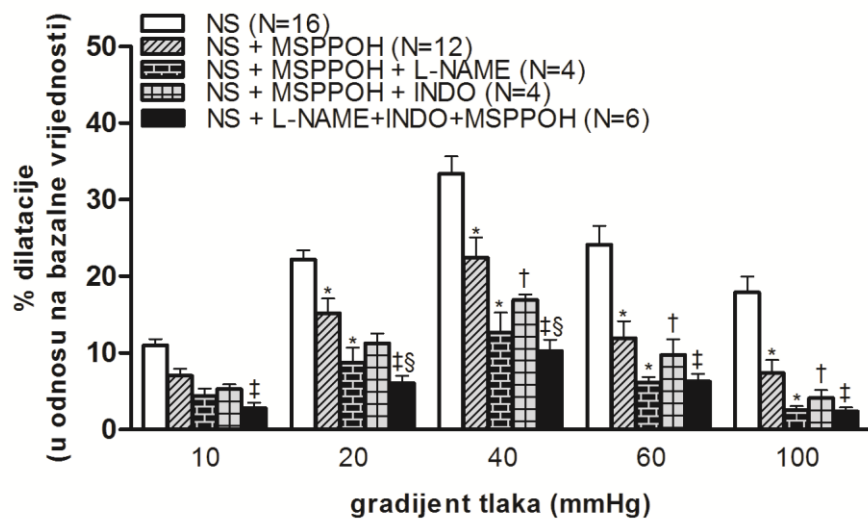
‡  $P < 0.05$  NS vs. NS+INDO+MSPPOH; NS+INDO vs. NS+INDO+L-NAME+MSPPOH

§  $P < 0.05$  NS vs. NS+INDO+L-NAME+MSPPOH

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

NS - niska sol

**Slika 4.** Učinak inhibicije ciklooksigenaza s inhibitorom indometacinom, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja

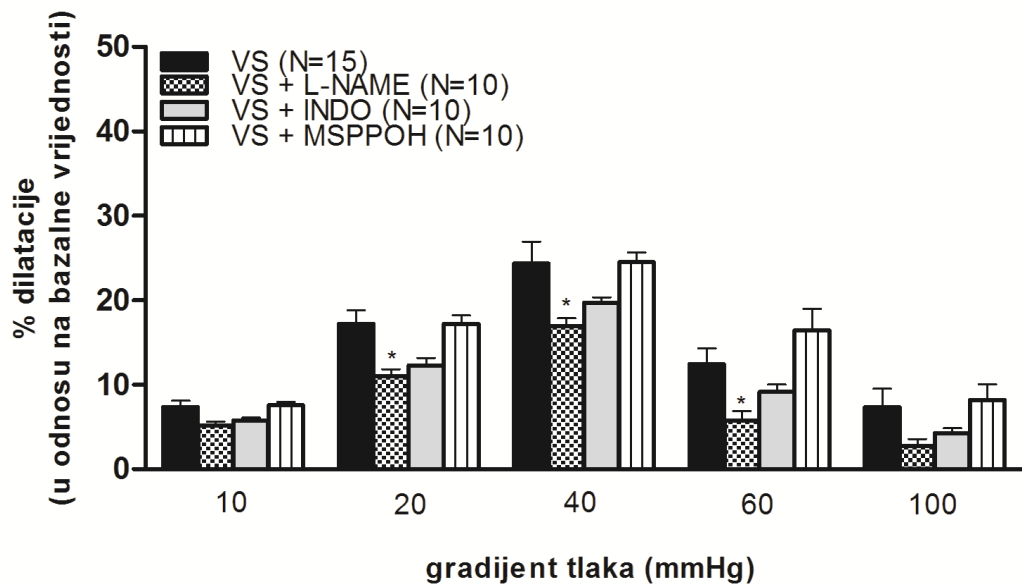


\*P<0.05 NS vs. NS+ MSPPOH; NS+MSPPOH+L-NAME  
 †P<0.05 NS vs. NS+MSPPOH+INDO  
 ‡P<0.05 NS vs. NS+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 §P<0.05 NS+MSPPOH vs NS+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM  
 NS - niska sol

**Slika 5. Učinak inhibicije metabolita EETs-a s njegovim selektivnim inhibitorom MSPPOH, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i ciklooksigenaza na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja**

#### 5.4. Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a (zasebno i u međusobnoj kombinaciji) na protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije ispitivane skupine na visokoslanjoj dijeti

Od svih ispitanih inhibitora, jedino je prisutnosti L-NAME-a ( $10^{-5}$ M) značajno smanjila protokom posredovana dilataciju središnje moždane arterije u visokoslanjoj skupini pri gradijentima tlaka  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$  i  $\Delta 60$  mmHg ( $p < 0.05$ ) što daje predpostaviti kako NO ima primarnu ulogu u razini protokom posredovane dilatacije u visokoslanjoj ispitivanoj skupini (Slika 6.) te kako ta razina nije ovisna o ciklooksigenazama i metabolitima EETs-a.



\*  $P < 0.05$  VS vs. VS + L-NAME

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

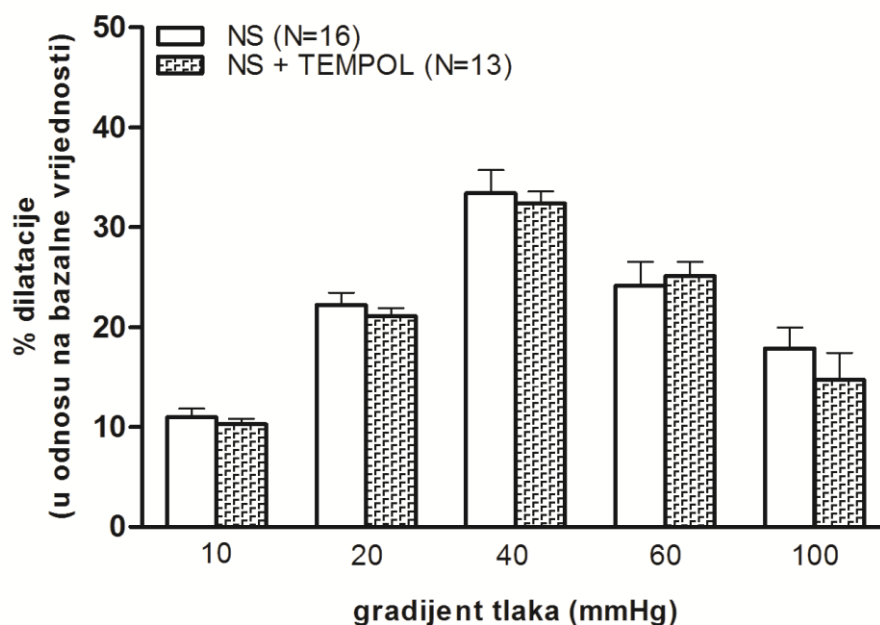
VS - visoka sol

**Slika 6. Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u visokoslanjoj ispitivanoj skupini životinja**



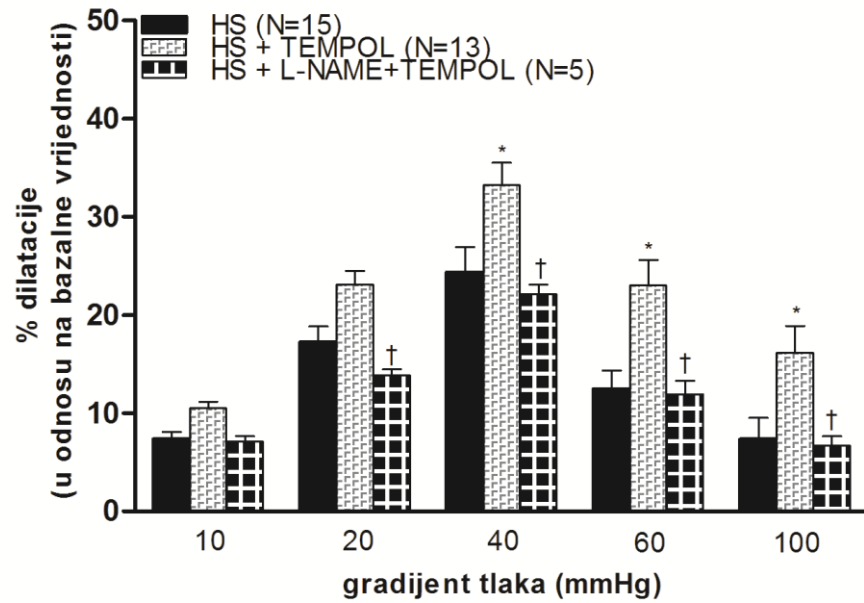
### 5.5. Učinak *in vitro* primjene TEMPOLA na promjenjenu razine dilatacije središnje moždane arterije niskoslane i visokoslane skupine

TEMPOL (100  $\mu\text{mol/L}$ ) *in vitro* značajno poboljšava razinu dilatacije u visokoslanjoj skupini u usporedbi s njegovim bazalnim vrijednostima izmjerenim pri različitim gradijentima tlaka ( $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg) (Slika 8.), dok u niskoslanjoj skupini TEMPOL nije imao nikakvog efekta na promjenu razine dilatacije središnje moždane arterije (Slika 7.). Naknadni dodatak *in vitro* L-NAME-a (nakon TEMPOLA) ponovno smanjuje razinu protokom posredovane dilatacije na njegove bazalne vrijednosti (Slika 8.) pri svakom gradijentu tlaka osim  $\Delta 10$  mmHg. Rezultati potvrđuju povećanu razinu oksidativnog stresa konzumiranjem povišenih koncentracija NaCl-a i njegovu nedvojbenu ulogu na smanjenu razinu protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije.



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
NS - niska sol

**Slika 7. Odgovor središnje moždane arterije u niskoslanjoj skupini na protokom posredovanu dilataciju primjenom TEMPOLA *in vitro* pri različitim gradijentima tlaka**



\* P < 0.05 VS vs. VS + TEMPOL

† P < 0.05 VS + TEMPOL vs. VS + L-NAME + TEMPOL

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM

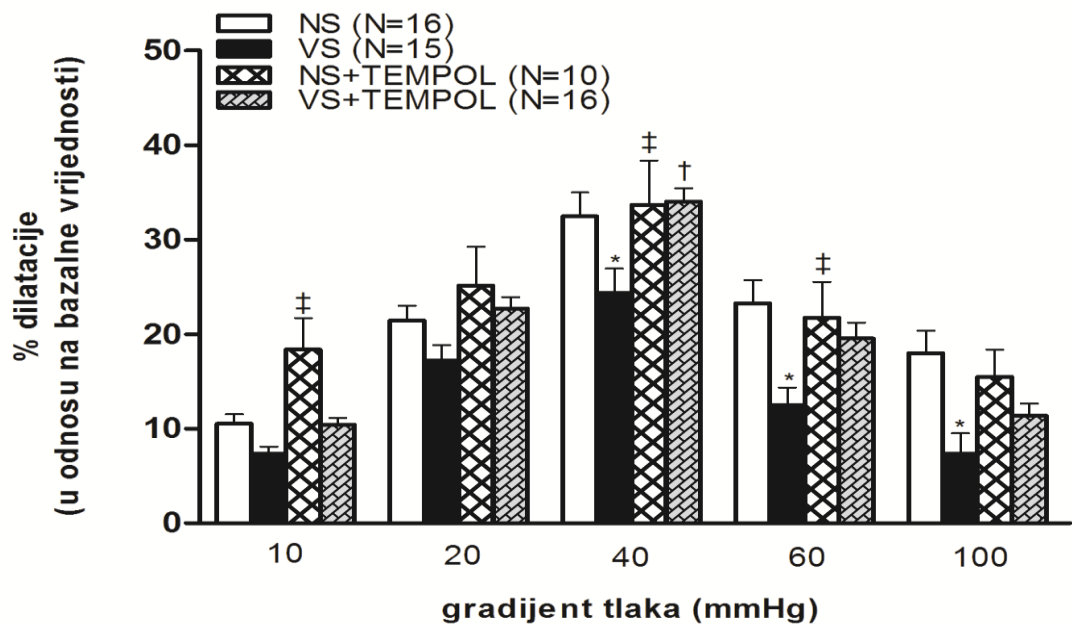
VS - visoka sol

***Slika 8. Odgovor središnje moždane arterije u visokoslojnoj skupini na protokom posredovanu dilataciju primjenom TEMPOLA in vitro pri različitim gradijentima tlaka te dodatna potvrda stvarnog učinka TEMPOLA i povećane razine oksidativnog stresa dodatkom inhibitora L-NAME***

## 5.6. Učinak *in vivo* primjene TEMPOLA na promjenjenu razine dilatacije središnje moždane arterije

Utvrđivanjem kako dodatak TEMPOLA *in vitro* poboljšava protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije koja je narušena unosom povišenih koncentracija soli (5.5.; Slika 8.), dodatnim skupinama životinja smo uz isti režim prehrane (NS i VS) tijekom tjedan dana dodali da konzumiraju vodenu otopinu TEMPOLA (1mM).

TEMPOL *in vivo* (Slika 9.) popravlja razinu protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije u skupini životinja koja je konzumirala visokoslanu hranu pri svakom gradijentu tlaka do razine dilatacije koja je utvrđena u niskoslanj skupini i to značajno pri  $\Delta 40$  mmHg ( $p < 0.05$ ) te nije imao dodatni efekt na niskoslanu skupinu i promjenu dilatacije u odnosu na njezinu kontrolnu skupinu (NS).



\*  $P < 0.05$  NS vs. VS

†  $P < 0.05$  VS vs. VS+TEMPOL

‡  $P < 0.05$  VS vs. NS+TEMPOL

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

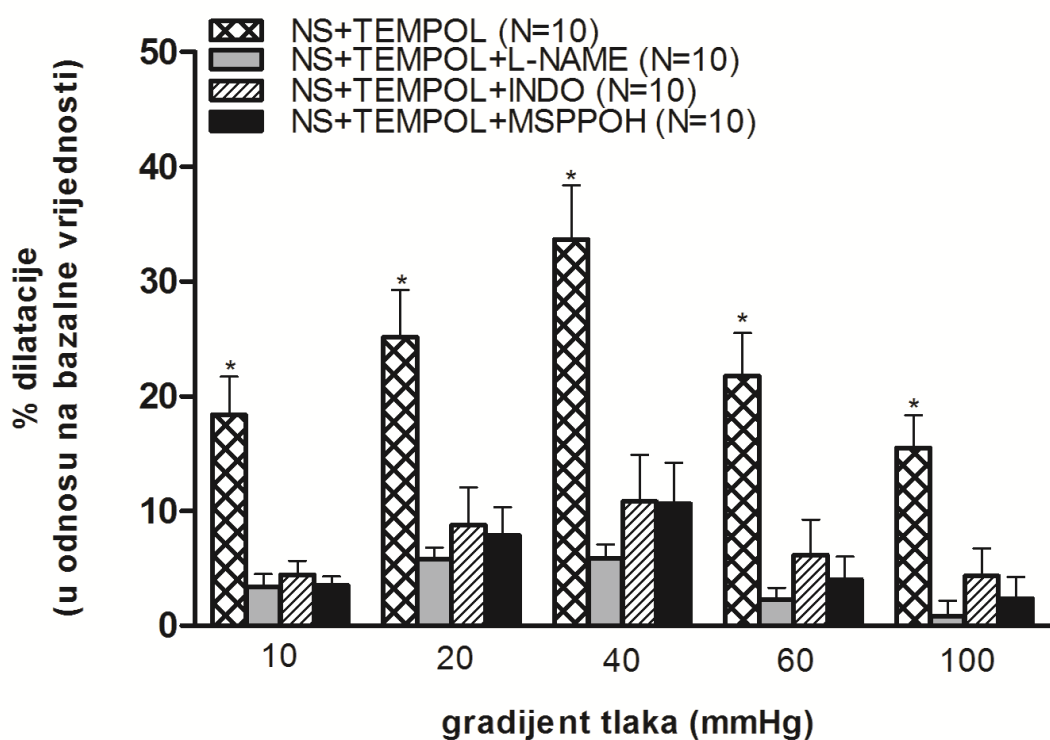
NS - niska sol

VS - visoka sol

**Slika 9. Učinak TEMPOLA *in vivo* primjenom na promjenu razine protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije u ispitivanim skupinama**

### 5.7. Učinak *in vivo* primjene TEMPOLA na mehanizme protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije kod niskoslane skupine

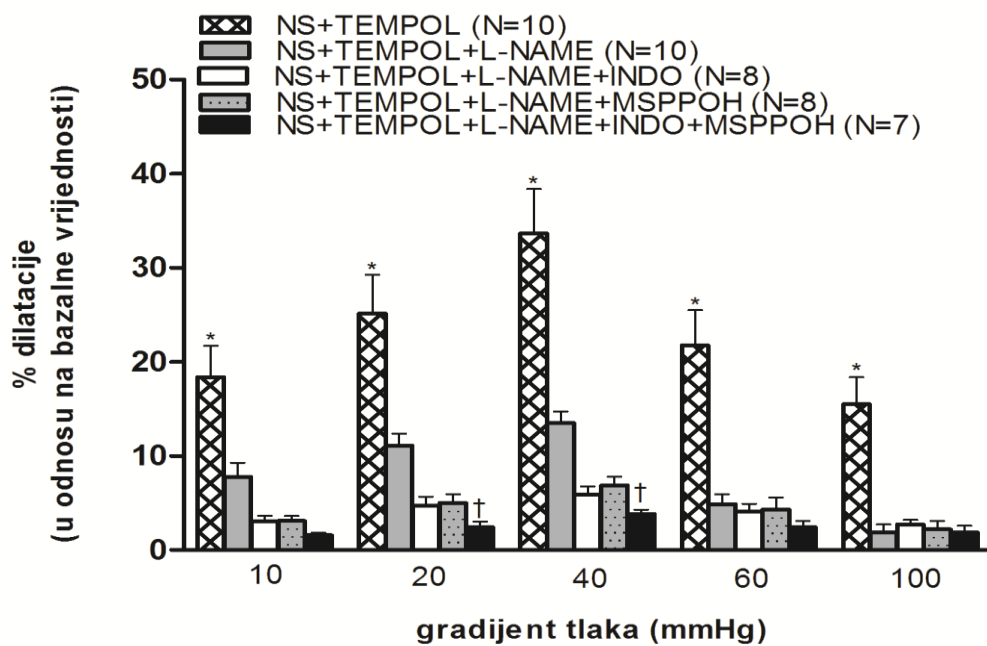
U prisutnosti svih ispitivanih inhibitora (L-NAME ( $10^{-5}$ M)), INDO ( $10^{-5}$ M) te MS-PPOH ( $10^{-5}$ M)) značajno je smanjena protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije u NS+TEMPOL skupini pri svakom ispitivanom gradijentu tlaka  $\Delta 10$ ,  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg ( $p < 0.05$ ) (Slika 10).



\*  $P < 0.05$  NS+TEMPOL vs. NS+TEMPOL+L-NAME;  
NS+TEMPOL+INDO; NS+TEMPOL+MSPPOH;  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
NS - niska sol

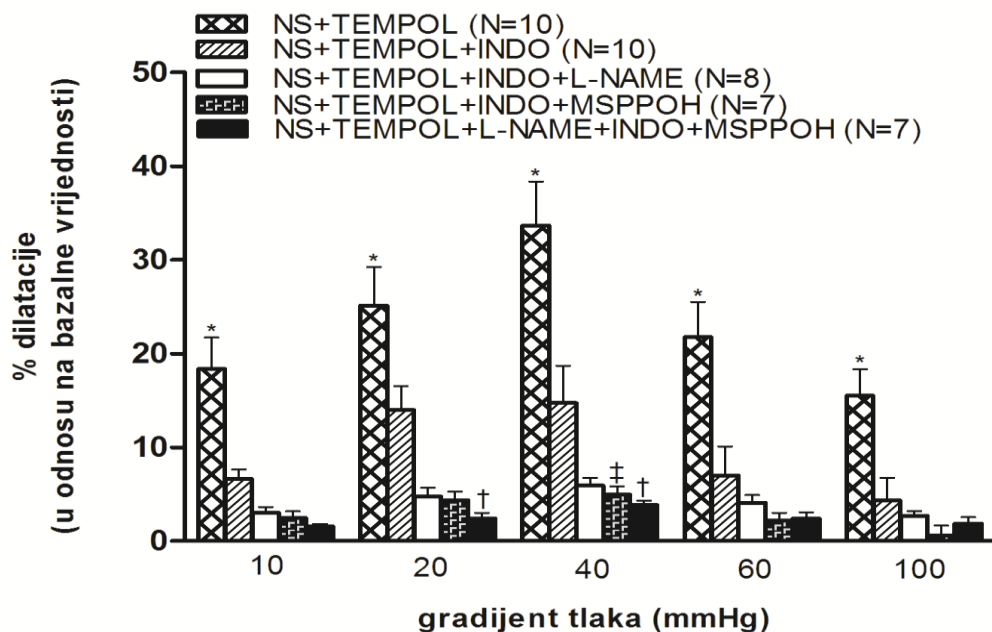
*Slika 10. Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz in vivo primjenu TEMPOLA u isto vrijeme*

Kombinacijom inhibitora značajno je smanjena protokom posredovana dilatacija pri svakom ispitanom gradijentu tlaka ( $p < 0.05$ ) u odnosu na bazični odgovor a isto tako i na primjenu svakog inhibitora zasebno. Također statistički značajna razlika dobivena je razlika i između odgovora krvne žile primjenom svakog inhibitora pojedinačno i u prisutnosti sva tri inhibitora zajedno pri gradijentima tlaka  $\Delta 20$  i  $\Delta 40$  mmHg (Slika 11, 12 i 13) što pokazuje kako je protokom posredovana dilatacija u ovoj skupini ovisna o razini NO, metabolitima ciklooksigenaza i EET-a.



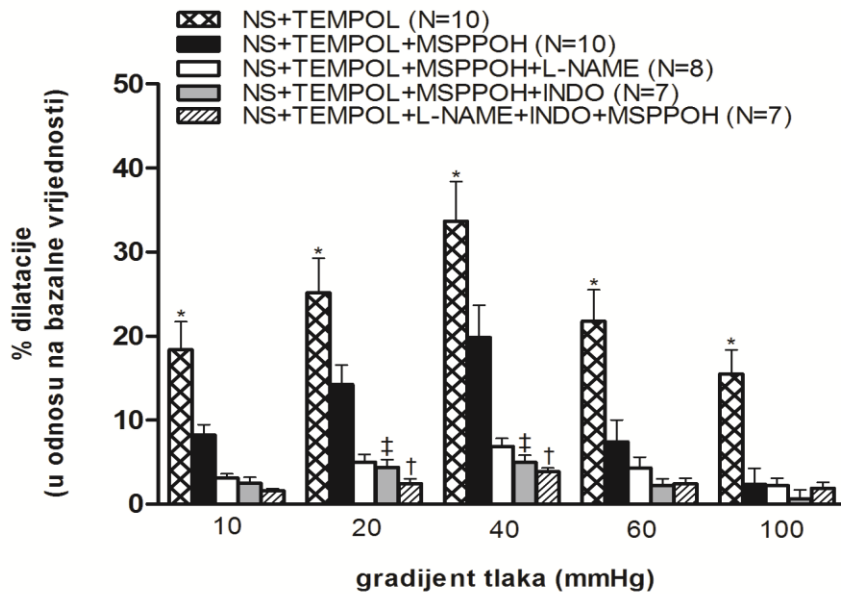
\*  $P < 0.05$  NS+TEMPOL vs. NS+TEMPOL+L-NAME;  
NS+TEMPOL+L-NAME+INDO; NS+TEMPOL+L-NAME+MSPPOH;  
NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
†  $P < 0.05$  NS+TEMPOL+L-NAME vs. NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
NS - niska sol

**Slika 11. Učinak inhibicije NO sintaze (NOS) s inhibitorom L-NAME-om, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima ciklooksigenaza i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz in vivo TEMPOL**



\*  $P < 0.05$  NS+TEMPOL vs. NS+TEMPOL+INDO; NS+TEMPOL+INDO+L-NAME; NS+TEMPOL+INDO+MSPPOH; NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 †  $P < 0.05$  NS+TEMPOL+INDO vs. NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 ‡  $P < 0.05$  NS+TEMPOL+INDO vs. NS+TEMPOL+INDO+MSPPOH  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM  
 NS - niska sol

**Slika 12.** Učinak inhibicije ciklooksigenaza s inhibitorom indometacinom, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* TEMPOL

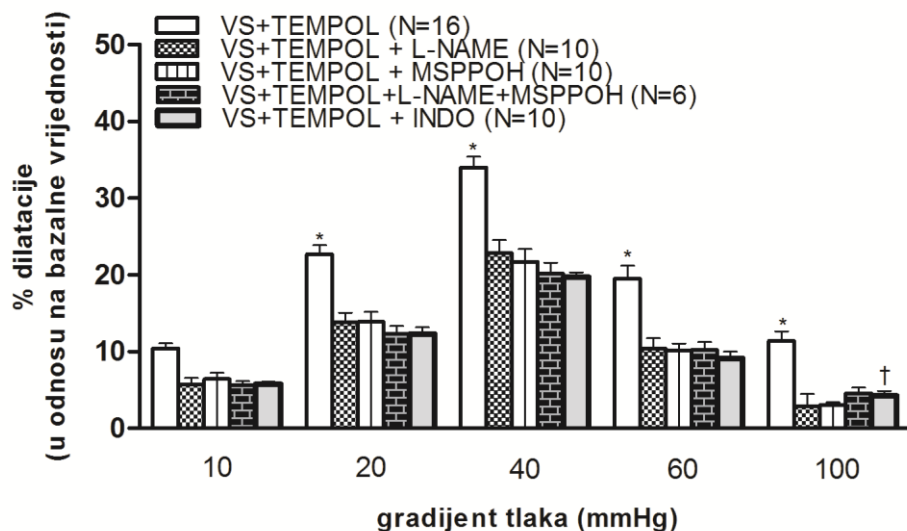


\* P < 0.05 NS+TEMPOL vs. NS+TEMPOL+MSPPOH; NS+TEMPOL+MSPPOH+L-NAME; NS+TEMPOL+MSPPOH+INDO; NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 † P < 0.05 NS+TEMPOL+MSPPOH vs. NS+TEMPOL+L-NAME+INDO+MSPPOH  
 ‡ P < 0.05 NS+TEMPOL+MSPPOH vs. NS+TEMPOL+MSPPOH+INDO  
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM  
 NS - niska sol

**Slika 13. Učinak inhibicije metabolita EETs-a s njegovim selektivnim inhibitorom MSPPOH, zasebno i u kombinaciji s inhibitorima sintaze (NOS) i ciklooksigenaza na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u niskoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz in vivo TEMPOL**

## 5.8. Učinak *in vivo* primjene TEMPOLA na mehanizme protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije kod visokoslane ispitivane skupine

U prisutnosti inhibitora NO sintaze (L-NAME ( $10^{-5}$ M)) i te selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze (MS-PPOH ( $10^{-5}$ M)) značajno je smanjena protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije u visokoslanjoj+TEMPOL skupini pri svakom ispitivanom gradijentu tlaka ( $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg) osim  $\Delta 10$  mmHg ( $p < 0.05$ ) u odnosu na bazalne promjene dilatacije pod utjecajem promjene gradijenta tlaka dok je inhibitor ciklooksigenaza (indometacin (INDO;  $10^{-5}$ M)) pokazao značajan utjecaj na smanjenje protokom posredovane dilatacije samo pri  $\Delta 100$  mmHg ( $p < 0.05$ ). Kombinacija inhibitora L-NAME-a i MS-PPOH također je značajno smanjila protokom posredovanu dilataciju u odnosu na bazalno mjerenje pri  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  mmHg ( $p < 0.05$ ) ali ne u odnosu na svaki inhibitor zasebno ( $p > 0.05$ ) (Slika 14).



\*  $P < 0.05$  VS+TEMPOL vs. VS+TEMPOL + L-NAME; VS+TEMPOL + MSPPOH; VS+TEMPOL+L-NAME+MSPPOH

†  $P < 0.05$  VS+TEMPOL vs. VS+TEMPOL+INDO

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

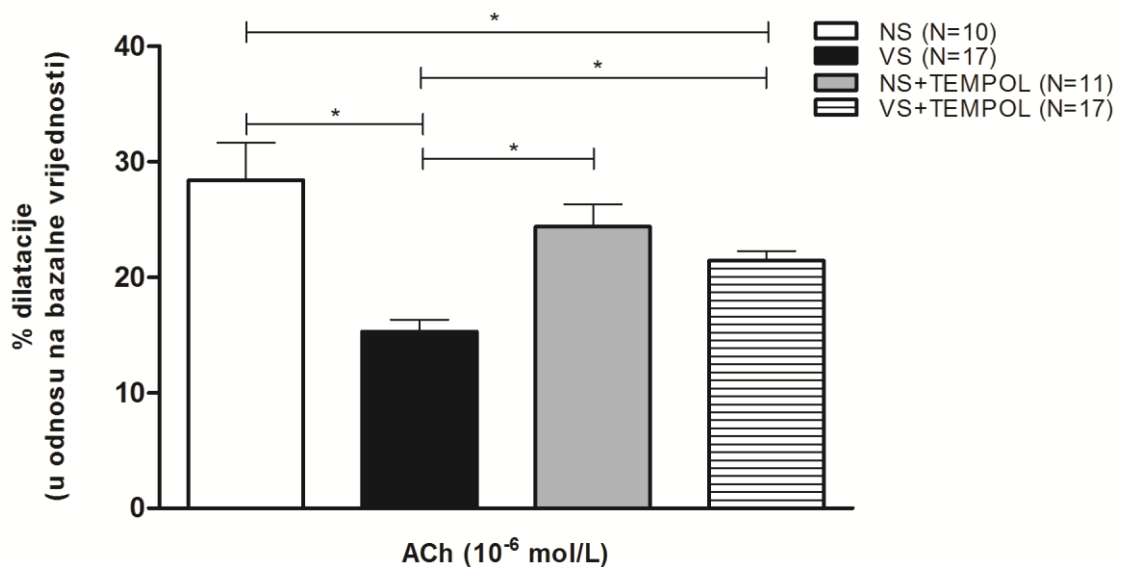
VS - visoka sol

**Slika 14.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom posredovanu dilataciju (FID) središnje moždane arterije u visokoslanjoj ispitivanoj skupini životinja uz *in vivo* primjenu TEMPOLA u isto vrijeme



### 5.9. Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) središnje moždane arterije (o endotelu ovisna vazodilatacija)

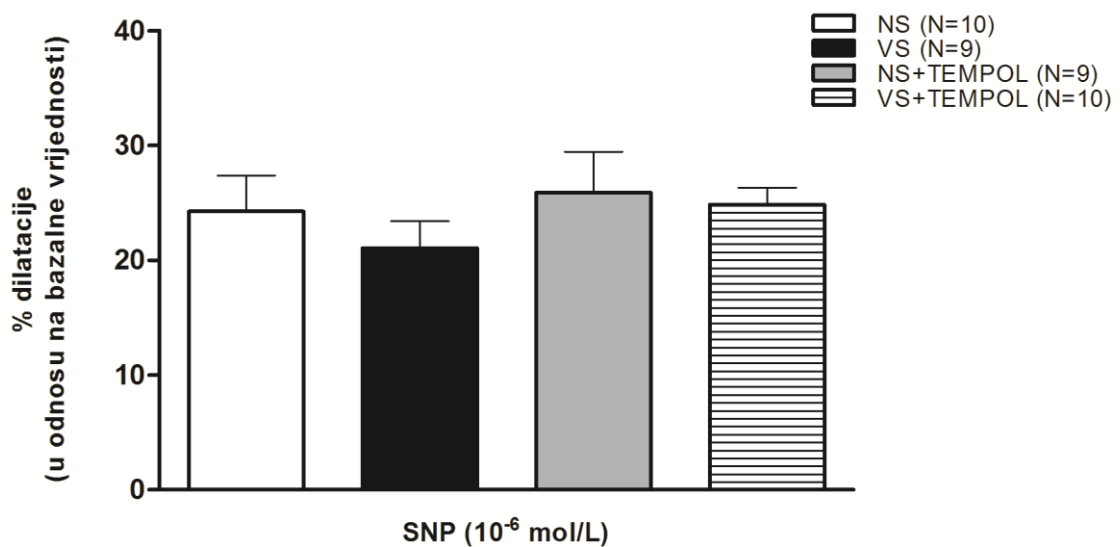
Dilatacijski je odgovor srednje moždane arterije visokoslane skupine manje osjetljiv na protok uspoređujući s moždanim arterijama preostalih pokusnih skupina ( $P < 0.05$ ). TEMPOL je djelomično ali statistički značajno povratio dilatacijski odgovor na ACh ( $p < 0.05$ ) u odnosu na visokoslanu skupinu (Slika 15). Ovi podaci ukazuju na smanjenu osjetljivost središnje moždane arterije prilikom akutnog povišenog unosa soli na o endotelu ovisnu vazodilataciju.



*Slika 15. Bazični odgovor srednje moždane arterije na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) u svim pokusnim skupinama*

### 5.10. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju središnje moždane arterije (o endotelu neovisna vazodilatacija)

Vaskularni odgovor na o endotelu-neovisnog donora NO (SNP) je očuvan i nisu utvrđene razlike između ispitivanih grupa ( $p>0.05$ ) (Slika 16).



*Slika 16. Bazični odgovor srednje moždane arterije dodatkom NO donora natrijevog-nitroprusida na protokom posredovanu dilataciju u svim pokusnim skupinama*

### 5.11. Izražaj gena uključenih u dilatacijske putove kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora

Izražaj ciklooksigenaza (COX-1 i 2) značajno je manji nakon tjedan dana visokoslane prehrane (COX-1  $p=0.017$ ; COX-2  $p=0.009$ ) što podupire dobivene rezultate u funkcionalnim studijama (Tablica 2).

TEMPOL primjena *in vivo* uz visokoslanu dijetu ipak povećava relativni izražaj COX-1 u odnosu na visokoslanu skupinu ali bez statističke značajnosti ( $p=0.076$ ) te utječe na povećanu izražajnost COX-1 kod niskoslane skupine u odnosu na ostale skupine ( NS vs. NS+TEMPOL  $p=0.024$ ; NS+TEMPOL vs. VS  $p<0.001$ ; NS+TEMPOL vs. VS+TEMPOL  $p=0.008$ ). Dok kod mjerenja izražaja COX-2 gena TEMPOL nije doveo do većanog izražaja u odnosu na niskoslanu skupinu ( $p>0.05$ ) (Tablica 2).

**Tablica 2.** Relativan izražaj gena ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2) te dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS)

Eksperimentalna grupa	COX-1	COX-2	eNOS	iNOS
NS	1.49±0.16	1.09±0.10	0.589±0.26	2.56±1.49
VS	1.01±0.12	0.62±0.11	0.43±0.45	0.47±0.33
NS+TEMPOL	1.96±0.11	0.68±0.12	4.27±0.58	4.71±0.96
VS+TEMPOL	1.37±0.13	0.68±0.14	0.56±0.13	0.65±0.11

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±SEM

U izražaju iNOS gena između ispitivanih skupina postoji značajna razlika  $p<0.001$ , značajno je smanjena nakon 7 dana akutnog unosa soli u odnosu na NS skupinu i skupinu NS+TEMPOL ( $p<0.05$ ) što podržava funkcionalne rezultate da TEMPOL *in vivo* ne utječe na izražaj iNOS gena kod visokoslane dijetete ( $p>0.05$ ).i izražaj eNOS-a nije značajno promjenjen između nisko i visokoslane skupine ( $p>0.05$ ) (Tablica 2).

## 5.12. Izražaj antioksidativnih gena kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora utvrđena PCR metodom u stvarnom vremenu (rtPCR)

Genski izražaj SOD izoformi nije se značajno promjenila između visokoslane i niskoslane skupine iako nakon 7 dana visokoslane dijetete ima tendenciju pada. Sukladno s činjenicom kako TEMPOL „oponaša“ SOD, prilikom primjene TEMPOLA *in vivo* izražaj sve tri SOD izoforme je značajno porasla ( $p < 0.05$ ). Izražaj glutation peroksidaze 1 (GPx1) nije se značajno promjenio između NS i VS dijetete ( $p > 0.05$ ) ali je TEMPOL doveo do smanjenja izražajnosti svih skupina u odnosu na niskoslanu dijetetu bez TEMPOLA. Uspoređujući izražajnost GPx4 (t-testom) između NS i VS skupine utvrđeno je značajno smanjenje GPx4 nakon tjedan dana akutnog unosa hrane s 4% NaCl-a ( $p = 0.041$ ) i to je jedini ispitivani antioksidativni gen čija se izražaj značajno smanjila akutnim unosom VS. TEMPOL *in vivo* povećava razinu GPx4 u odnosu na njihovu kontrolnu skupinu (NS vs. NS+TEMPOL, VS vs. VS+TEMPOL;  $P < 0.05$ ). Sol nije pokazala utjecaja na promjenu izražajnosti katalaze. Katalaza se značajno promjenila jedino u skupini NS+TEMPOL u odnosu na sve druge ispitivane skupine ( $p < 0.05$ )(Tablica 3).

**Tablica 3.** Relativni izražaj antioksidativnih gena SOD izoformi, glutation peroksidaza i katalaze

Eksperimentalna grupa	Cu/Zn SOD	MnSOD	EC SOD	CAT	GPx1	GPx4
NS	1.09±0.18	0.9±0.19	0.60±0.20	0.87±0.11	1.23±0.38	0.82±0.17
VS	0.97±0.14	0.79±0.16	0.51±0.11	0.74±0.19	0.92±0.22	0.64±0.06
NS+TEMPOL	1.57±0.05	1.47±0.21	1.66±0.10	2.93±0.25	0.85±0.22	1.61±0.20
VS+TEMPOL	1.29±0.19	0.88±0.08	1.41±0.15	0.64±0.03	0.57±0.04	1.30±0.08

### 5.13. Izražaj i uloga HIF-1 $\alpha$ gena i njegovih poznatih ciljnih gena kod srednje moždane arterije Sprague Dawley štakora prilikom akutnog unosa soli

Izražaj HIF-1 $\alpha$  gena nije se značajno promjenio kroz tjedan dana unosa povećanih koncentracija soli ( $p=0.264$ ) dok se primjenom TEMPOLA razina HIF-1 $\alpha$  gena značajno povećala u odnosu na NS i VS skupinu ( $p<0.05$ ).

Primjena TEMPOLA *in vivo* značajno povećava izražajnost VEGF gena u odnosu na NS i VS skupinu ali je također uočena i smanjena izražajnost VEGF-a u skupini VS+TEMPOL u odnosu na NS+TEMPOL skupinu ( $p<0.05$ ).

HIF protil hidrosilazna (PHD) izražaj nije se značajno promjenio visokim unosom soli ( $p>0.05$ ). TEMPOL značajno povećava izražaj svih PHD izoformi u skupini NS+TEMPOL u odnosu na druge ispitivane skupine ( $p<0.05$ ). IzražajPHD1, osim toga, značajno je povećana u skupini VS+TEMPOL u odnosu na čistu VS skupinu ( $p<0.05$ ) (Tablica 4).

**Tablica 4.** Relativni izražaj transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  i njegovih poznatih ciljnih gena VEGF i HIF protil hidrosilaza (PHD)

<b>Ekspirimentalna grupa</b>	<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>VEGF</b>	<b>PHD1</b>	<b>PHD2</b>	<b>PHD3</b>
<b>NS</b>	0.77 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.12
<b>VS</b>	0.66 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.08
<b>NS+TEMPOL</b>	1.05 $\pm$ 0.09	1.63 $\pm$ 0.1	2.28 $\pm$ 0.2	1.78 $\pm$ 0.11	1.71 $\pm$ 0.14
<b>VS+TEMPOL</b>	0.97 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.07	0.83 $\pm$ 0.09

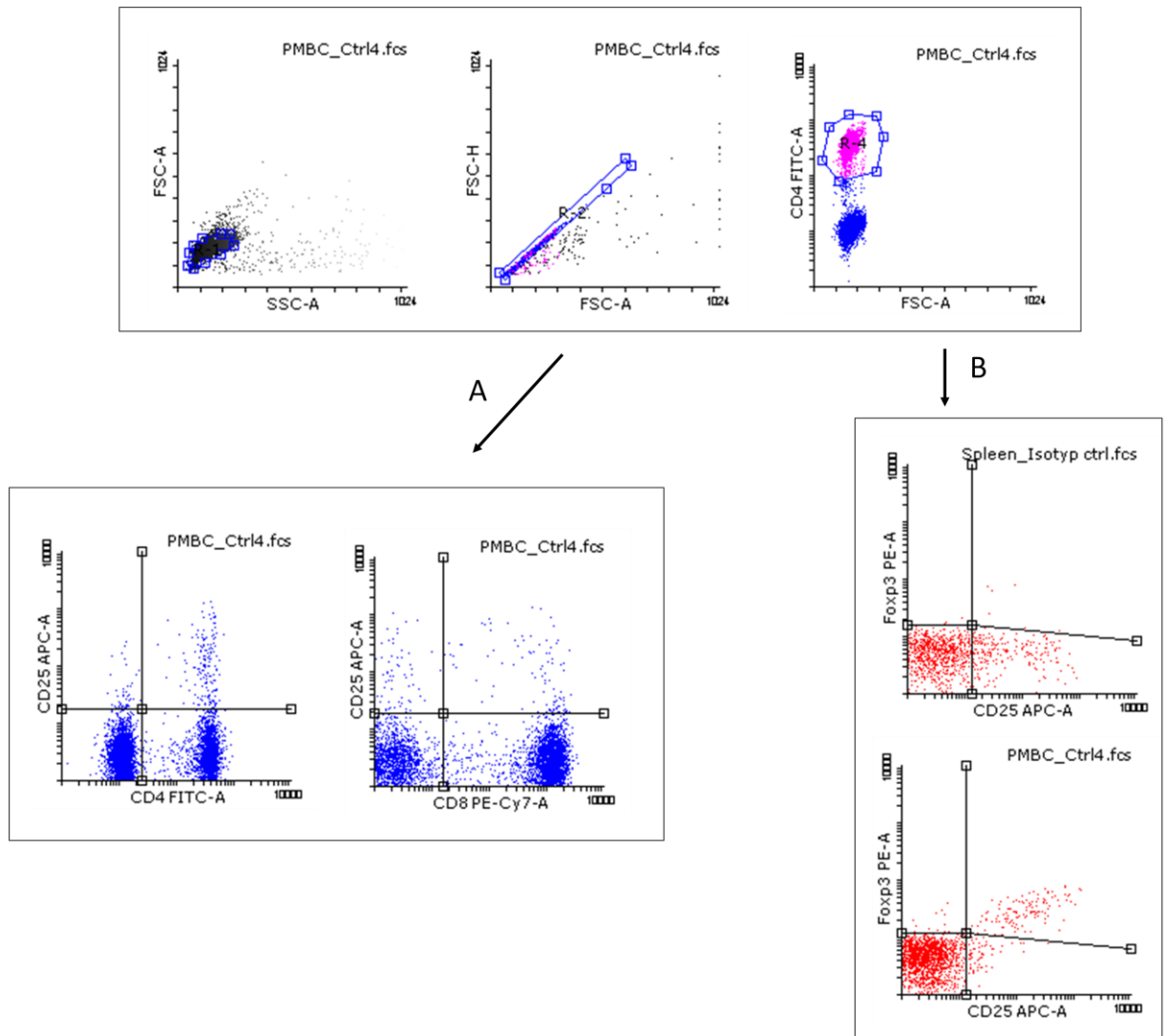
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM

Dobivenim korelacijama HIF-1 $\alpha$  s ostalim ispitivanim genima uočeno je da najveći broj značajnih pozitivnih korelacija ima upravo s antioksidativnim enzimima MnSOD ( $r = 0.935$ ;  $p = 0.002$ ) i GPx1 ( $r = 0.834$ ;  $p = 0.02$ ) u VS skupini te u VS+ TEMPOL skupini s CAT ( $r = 0.925$ ;  $p = 0.024$ ). U ostalim skupinama uočene su korelacije s njegovim ciljnim genima. Kod NS skupine jedina dobivena značajna korelacija je s VEGF ( $r = - 0.903$ ;  $p = 0.036$ ) te u NS+TEMPOL skupini s PHD1 ( $r = 0.899$ ;  $p = 0.038$ ) (Tablica 5). U odnosu na ostale ispitivane gene nije uočena značajna korelacija.

**Tablica 5.** Značajne korelacija izražaja transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  i antioksidativnih gena (MnSOD, GPx1 i CAT) te njegovih ciljnih gena (PHD1 i VEGF)

HIF-1 $\alpha$		MnSOD	GPx1	CAT	PHD1	VEGF
NS skupina	Koef. korelacije	0,432	0,325	0,244	-0,273	<b>-0,903</b>
	p vrijednost	0,393	0,53	0,642	0,657	<b>0,036</b>
	N	6	6	6	5	<b>5</b>
VS skupina	Koef. korelacije	<b>0,935</b>	<b>0,834</b>	0,723	-0,567	0,223
	p vrijednost	<b>0,002</b>	<b>0,02</b>	0,066	0,24	0,671
	N	<b>7</b>	<b>7</b>	7	6	6
NS+TEMPOL skupina	Koef. korelacije	0,491	-0,26	0,079	<b>0,899</b>	0,736
	p vrijednost	0,323	0,619	0,9	<b>0,038</b>	0,156
	N	6	6	5	<b>5</b>	5
VS+TEMPOL skupina	Koef. korelacije	0,787	0,221	<b>0,925</b>	-0,238	0,633
	p vrijednost	0,114	0,721	<b>0,024</b>	0,699	0,252
	N	5	5	<b>5</b>	5	5

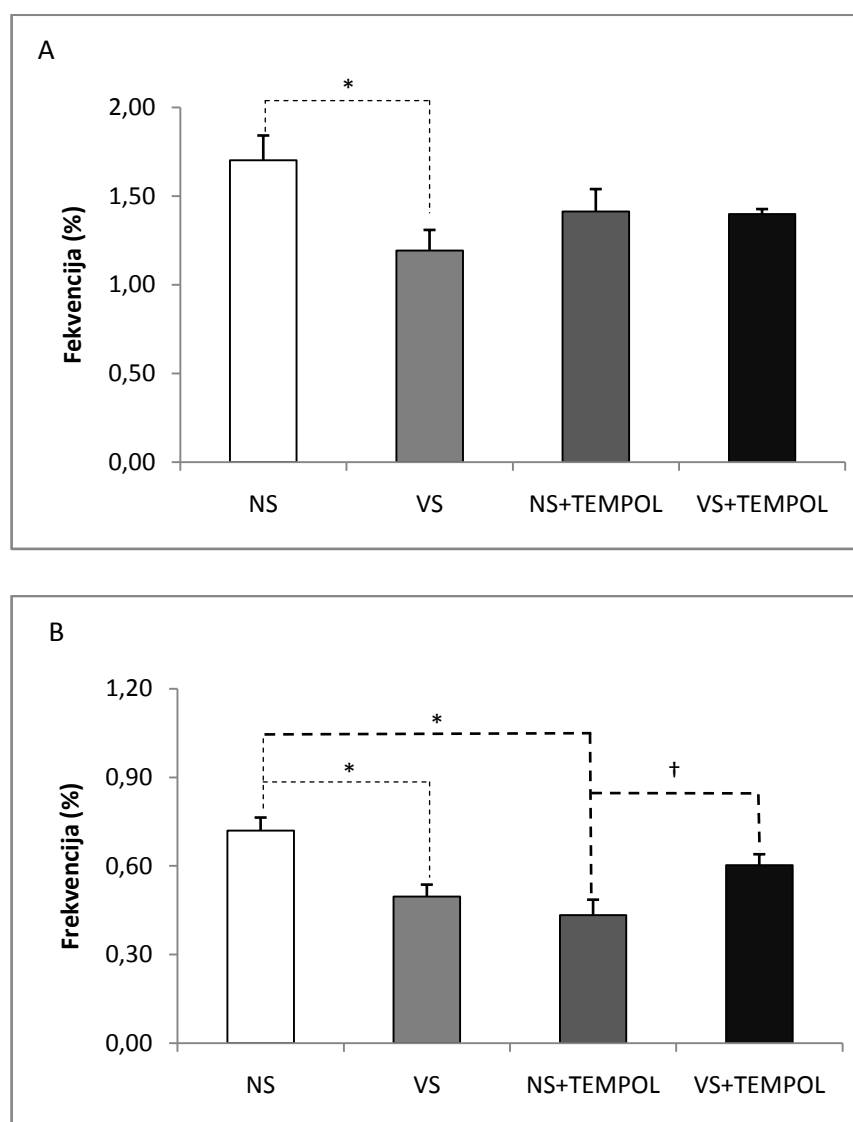
## 5.14. Aktivacija pomoćničkih, citotoksičnih i regulatornih T stanica u uzorcima periferne krvi i slezene



*Slika 17. Primjer analize rezultata metodom protočne citometrije uzoraka periferne krvi (A) i slezene (B). Mononuklearne stanice su izolirane iz periferne krvi i slezene te obojene na FITC-CD4, PE-Cy7-CD8, CD25 i APC-PE-Fcyp3 antitijela. Iz dobivenih rezultata izračunata je frekvencija (%) pojedinih populacija stanica.*

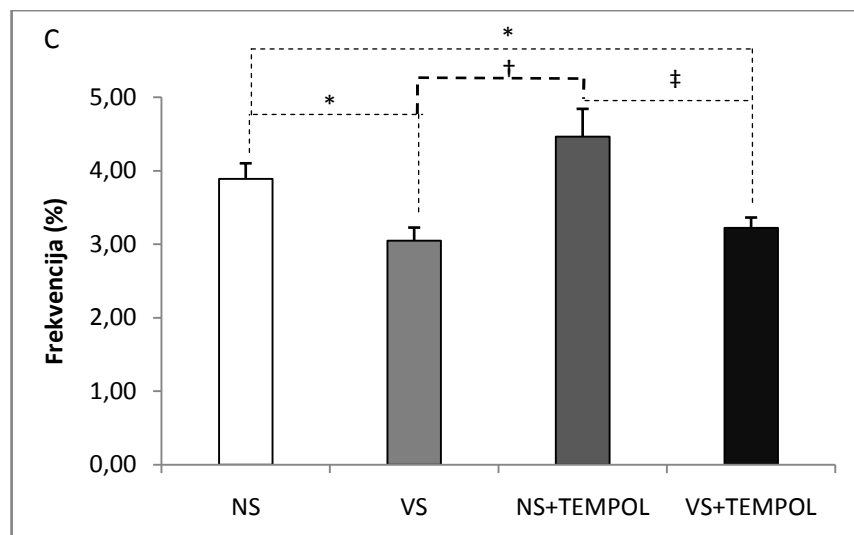
Visokim unosom soli izmjerena je smanjena frekvencija pomoćničkih (Slika 15A;  $p=0.033$ ), citotoksičnih (Slika 18B;  $p=0.002$ ) i regulatornih (Slika 18C;  $p=0.01$ ) stanica u perifernoj krvi u odnosu na niskoslanu skupinu. Holm-Sidak statističkom metodom utvrđena je značajna razlika između svih grupa u frekvenciji pomoćničkih T stanica ( $p=0.004$ ).

Smanjena frekvencija citotoksičnih stanica iz pune krvi utvrđena je u NS +TEMPOL skupini u odnosu na NS skupinu ( $p<0.001$ ) i VS+TEMPOL skupinu ( $p=0.017$ ) (Slika 18B).



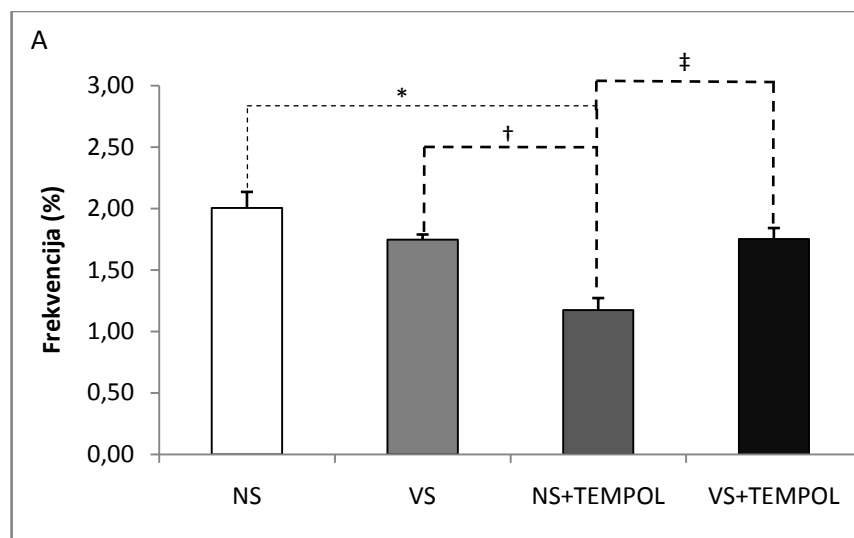
Dok je frekvencija pomoćničkih T stanica značajno povećana u NS+TEMPOL skupini u usporedbi s VS ( $p<0.001$ ) i VS+TEMPOL skupini ( $p=0.002$ ). Niskosлана skupina također je pokazala povećanu frekvenciju pomoćničkih stanica i u usporedbi s VS+TEMPOL grupom ( $p=0.033$ ) (Slika 18C).



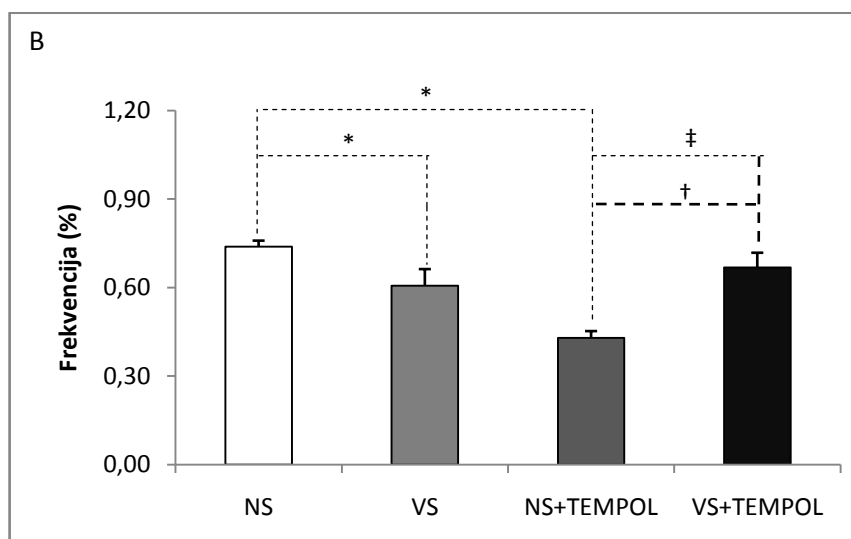


**Slika 18. Frekvencije (%) aktiviranih CD4 (pomoćničkih; A) i CD8 (citotoksičnih; B) T stanica te regulatornih T stanica (Foxp3+; C) između mononuklearnih stanica periferne krvi**

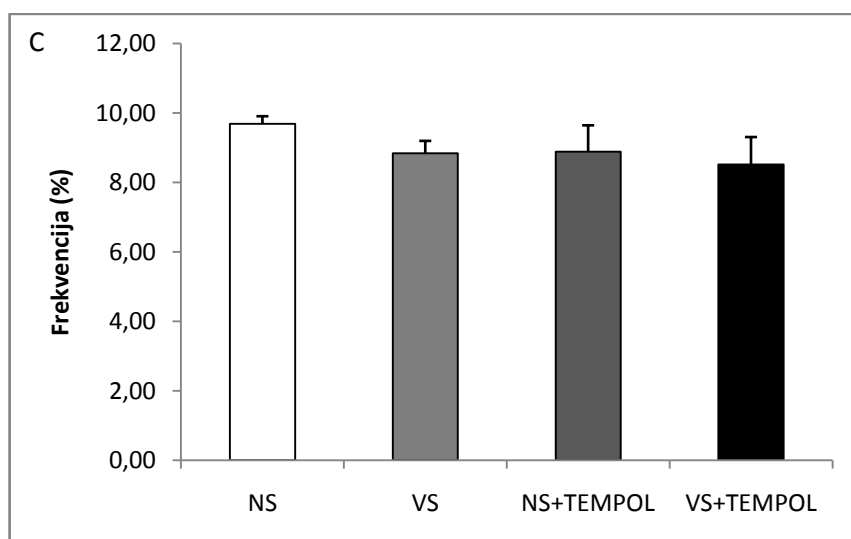
Uzorci slezene za skupinu NS+TEMPOL pokazali su značajno manju frekvenciju pomoćničkih stanica u odnosu na druge skupine (p<0.001 značajnost u odnosu na sve ispitane skupine)



Frekvencija citotoksičnih T stanica u slezeni značajno je smanjena kod visokog unosa soli te NS skupine na TEMPOLU u odnosu na NS (NS vs. VS  $p=0.036$ ; NS vs NS+TEMPOL  $p<0.001$ ) te kod NS+TEMPOL skupine u odnosu na VS ( $p=0.007$ ) i VS+TEMPOL ( $p<0.001$ ).



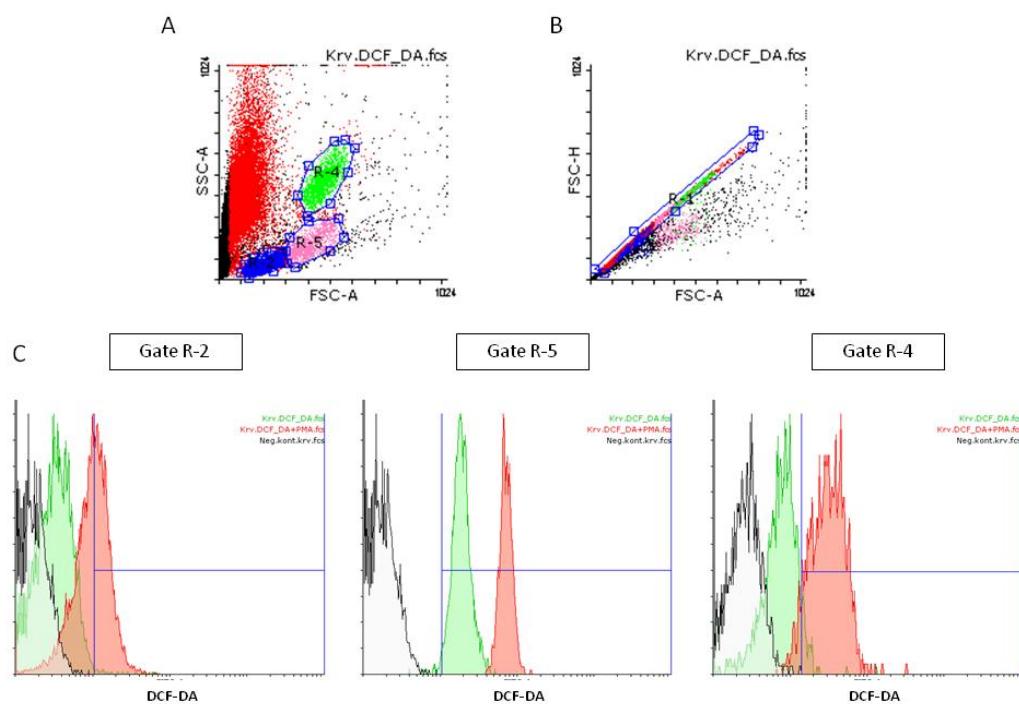
U slezeni nije utvrđena značajna razlika u frekvenciji regulatornih stanica između grupa ( $p=0.559$ ).



**Slika 19. Frekvencije (%) aktiviranih CD4 (pomoćničkih; A) i CD8 (citotoksičnih; B) T stanica te regulatornih T stanica (Foxp3+; C) u slezeni štakora za sve ispitivane grupe**

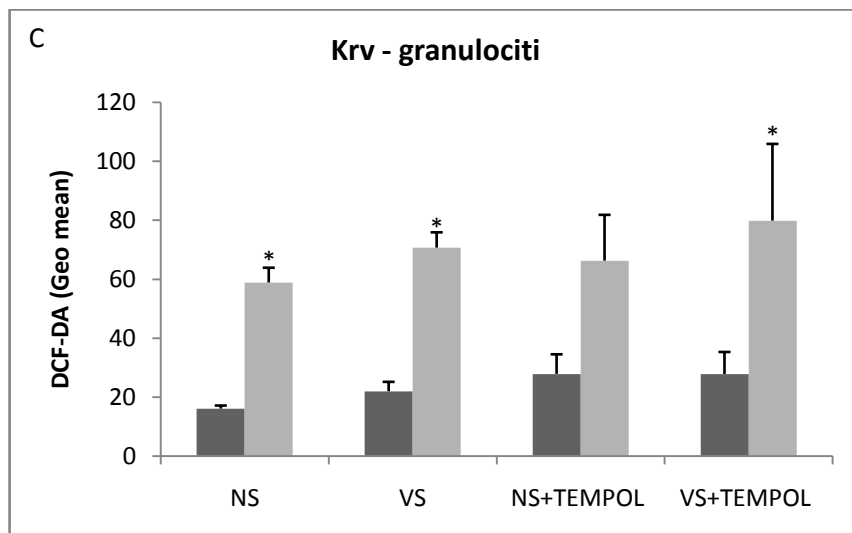
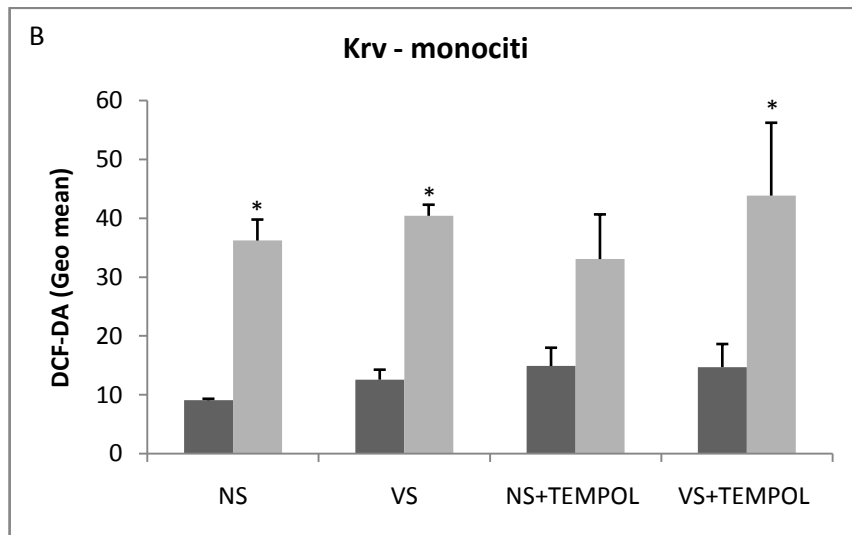
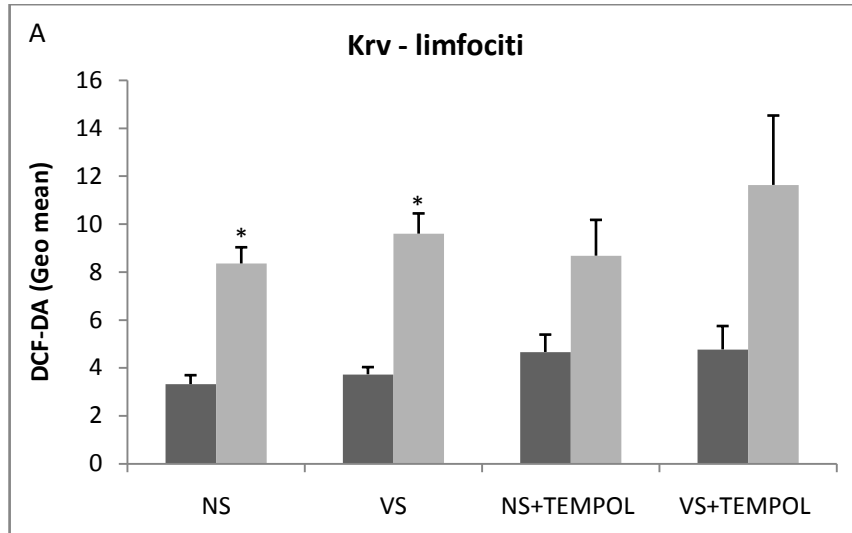
### 5.15. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u uzorcima periferne krvi, limfnim čvorovima i slezeni

U bazičnim mjerenjima oksidativnog stresa nije uočena razlika između ispitivanih grupa ( $p>0.05$ ). PMA stimulacija je u većini uzoraka dovela do statistički značajno povećane proizvodnje ROS-a, uz iznimku stanica periferne krvi kod NS+TEMPOLA (za sve ispitane stanice periferne krvi) i VS+TEMPOL (limfociti) (Slika 21). Leukociti iz periferne krvi imaju nižu razinu oksidativnog stresa, osnovnu i poslije PMA stimulacije.



**Slika 20. Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u različitim stanicama periferne krvi štakora**

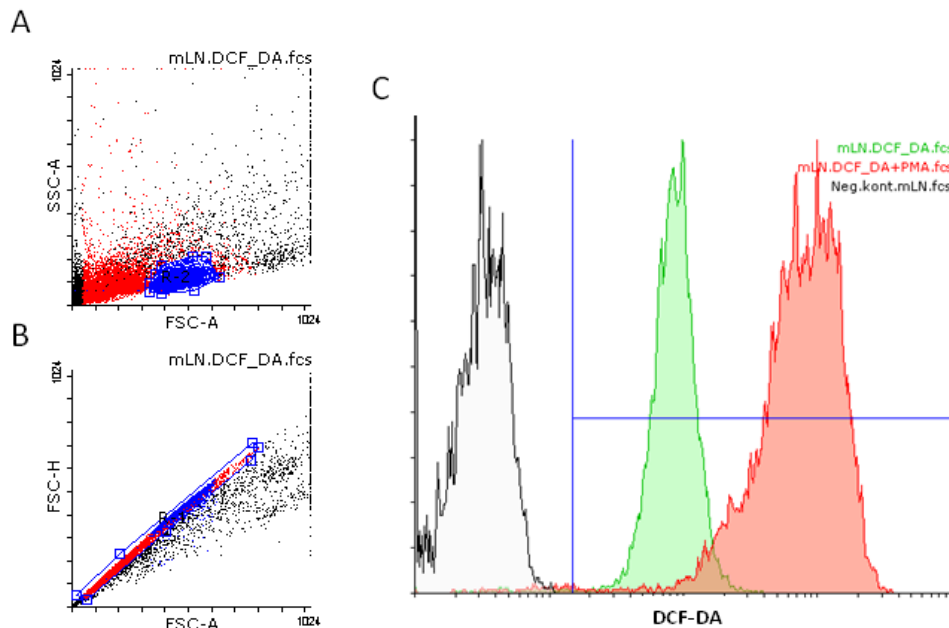
Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika B), definirane su subpopulacije leukocita (slika A): R-2 odgovara limfocitima, R-5 monocitima, a R-4 granulocitima. Geometrijska srednja vrijednost izražaja DCF-DA određena je pomoću histograma (Slika C).



**Slika 21. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u stanicama periferne krvi limfocitima (A), monocitima (B) i granulocitima (C) prije i nakon PMA stimulacije**

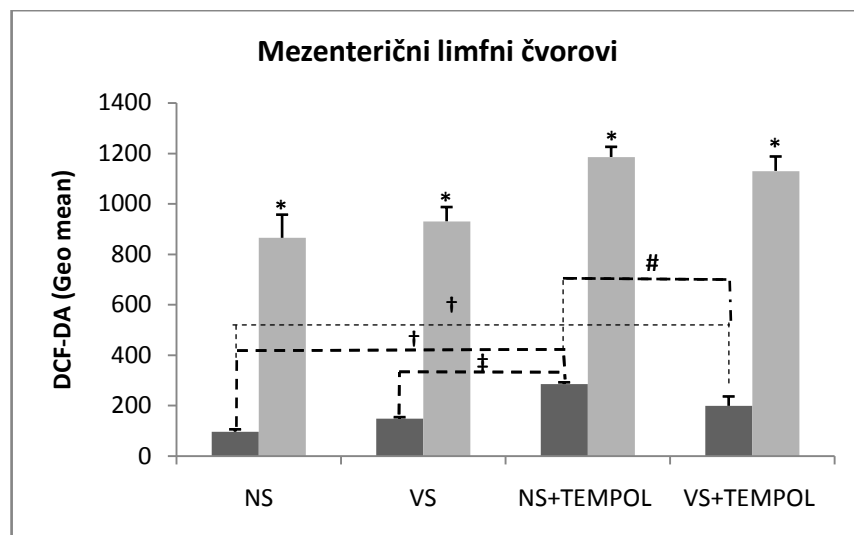
Dijeta s visokim udjelom soli pokazala je značajno povećanu bazičnu razinu oksidativnog stresa kod limfocita izoliranih iz mezenteričnih limfnih čvorova ( $p=0.004$ ; t-test) (Slika 23) te povišenom proizvodnjom ROS-a nakon PMA stimulacije u perifernim limfnim čvorovima ( $p=0.037$ ; t-test) (Slika 25).

Limfociti izolirani iz perifernih limfnih čvorova su u obje skupine na TEMPOLU imali značajno višu razinu oksidativnog stresa u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p<0.05$ ) (Slika 25).

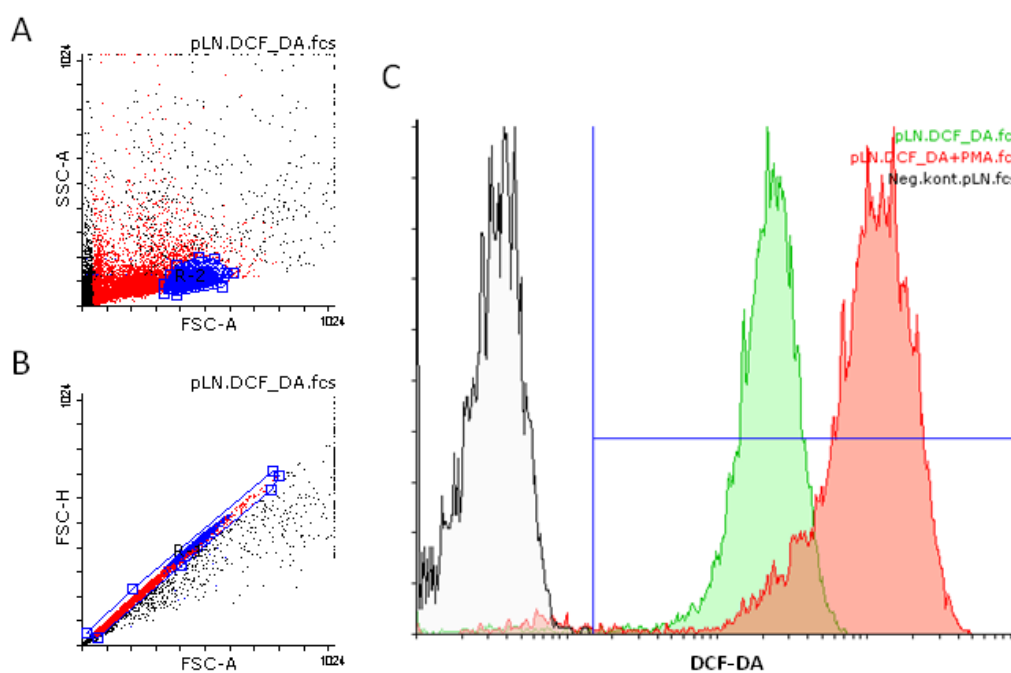


**Slika 22. Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora.**

Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika B), definirana je populacije limfocita R-2 (slika A) te određena geometrijska srednja vrijednost izražaja DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika C).

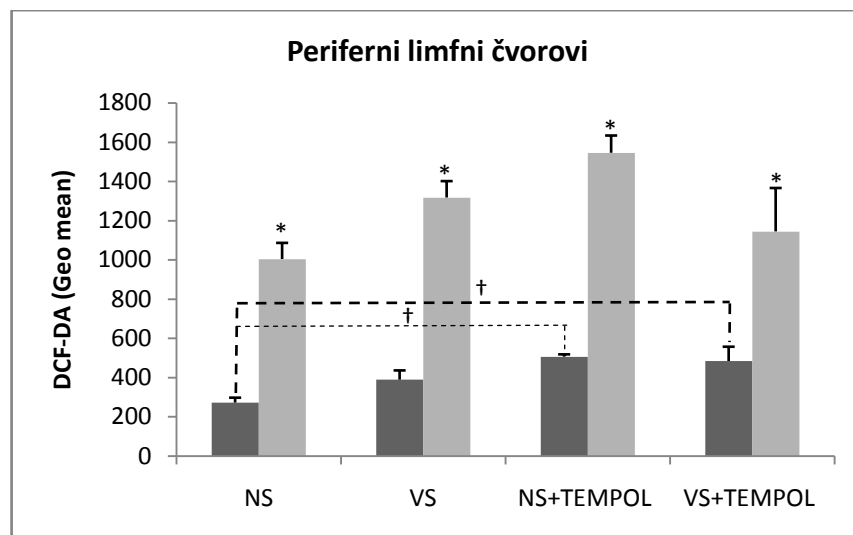


**Slika 23.** Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije



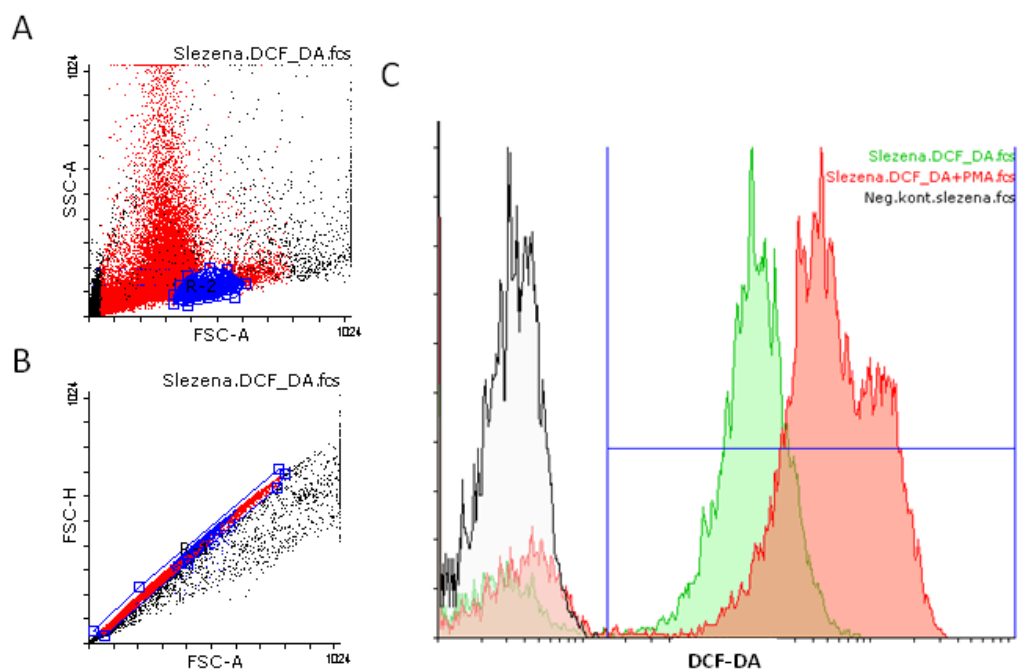
**Slika 24.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora.

Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika B), definirana je populacijalimfocita R-2 (slika A) te određena geometrijska srednja vrijednost izražaja DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika C).



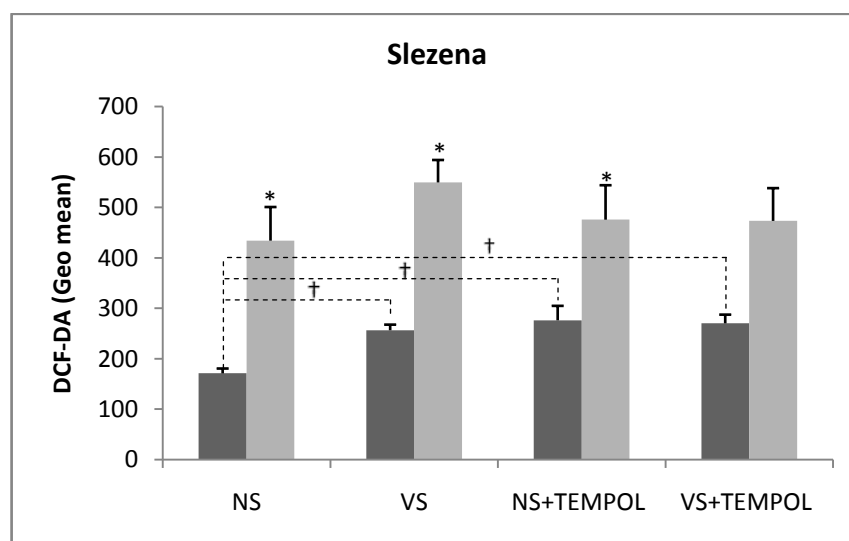
**Slika 25. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije**

Visoke koncentracije soli značajno su povećale bazičnu razinu oksidativnog stresa i kod slezene ( $p=0.001$ ; t-test). Limfociti izolirani iz slezene u NSskupini su imali značajno nižu razinu ROS-a u usporedbi sa svim ostalim skupinama ( $p<0.05$ ; Slika 27).



**Slika 26.** *Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz slezene štakora.*

*Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika B), definirana je populacije limfocita R-2 (slika A) te određena geometrijska srednja vrijednost izražaja DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika C)*

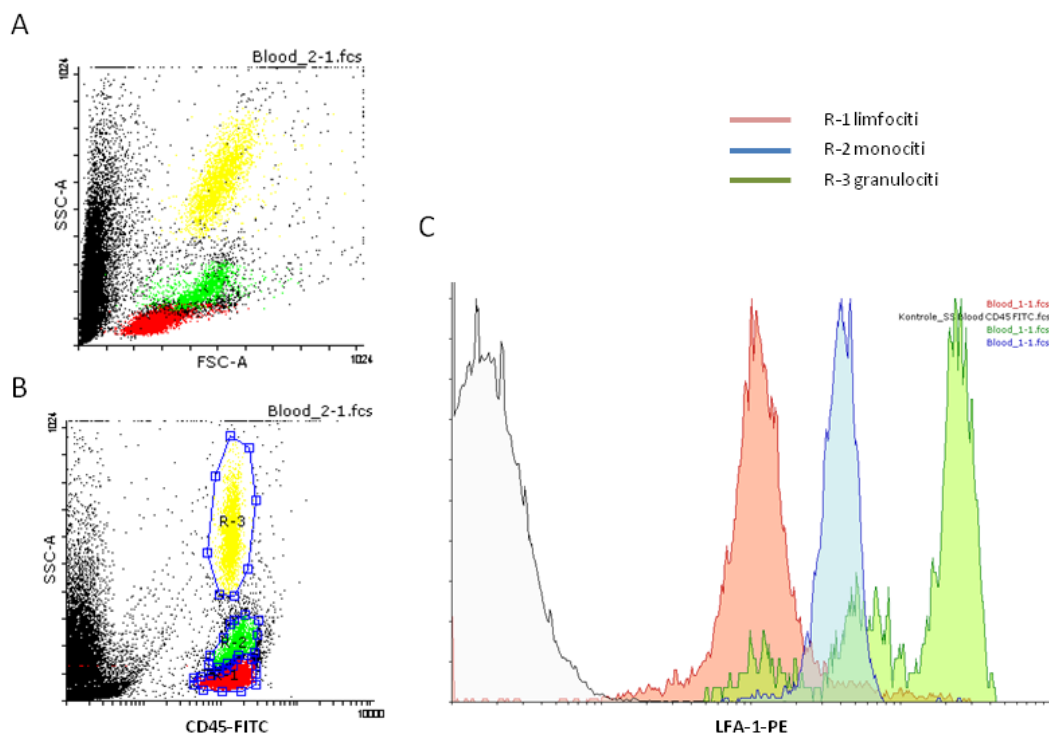


**Slika 27.** *Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz slezene štakora prije i nakon PMA stimulacije*



## 5.16. Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima iz periferne krvi, limfnih čvorova i slezene

Analiza podataka pokazala je tendenciju smanjenja izražaja LFA na leukocitima iz svih tkiva osim perifernih limfnih čvorova uslijed visokog unosa soli (Slike 29, 30 i 31). Nije pronađena statistički značajna razlika ( $p > 0.05$ ) u izražaju LFA-1 između grupa u svim ispitivanim uzorcima (periferna krv, limfni čvorovi i slezena).

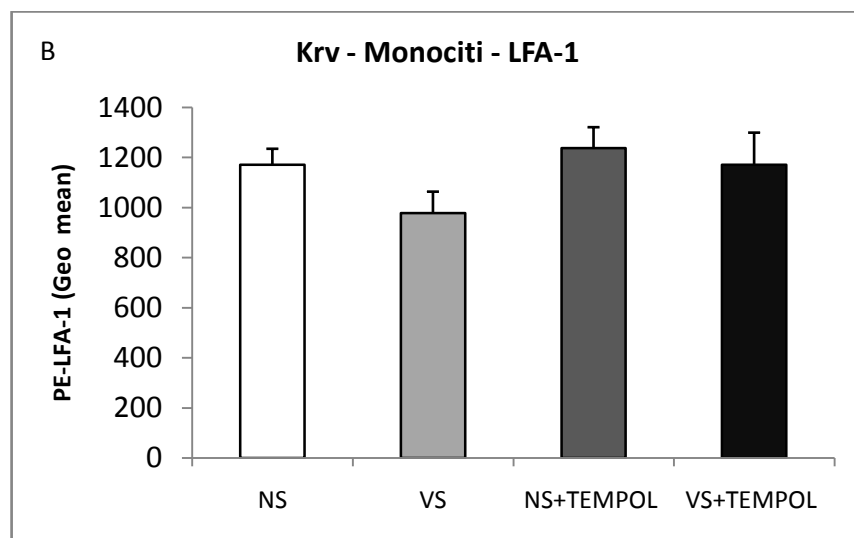
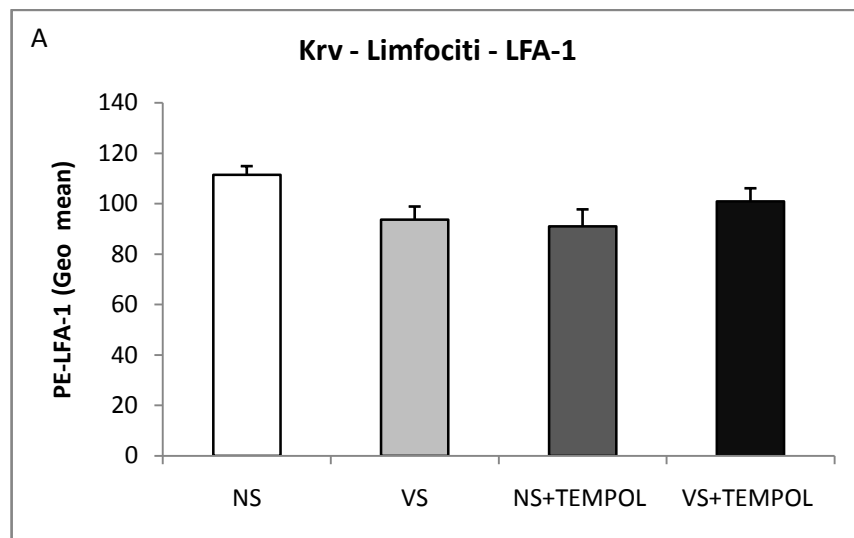


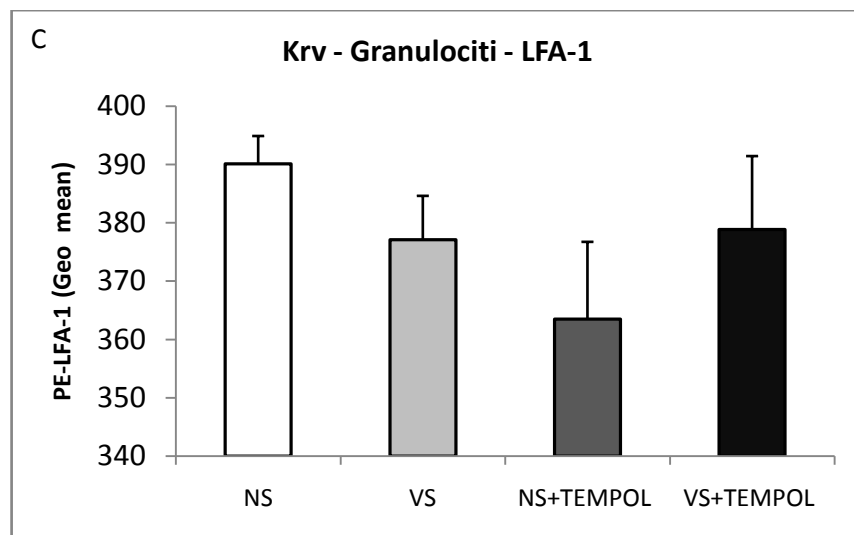
**Slika 28. Primjer analize mjerenja izražaja integrina LFA-1 na leukocitima periferne krvi štakora protočnom citometrijom.**

Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica, definirane su subpopulacije leukocita periferne krvi pomoću izražaja CD45-FITC i SSC detektora: R-1 odgovara limfocitima, R-2 monocitima, a R-3 granulocitima. Geometrijska srednja vrijednost izražaja integrina LFA-1 određena je pomoću histograma (Slika C).

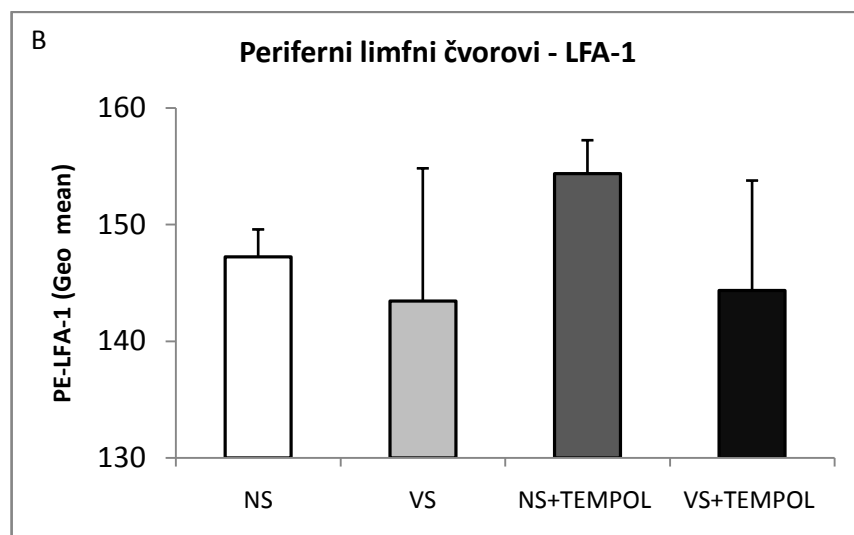
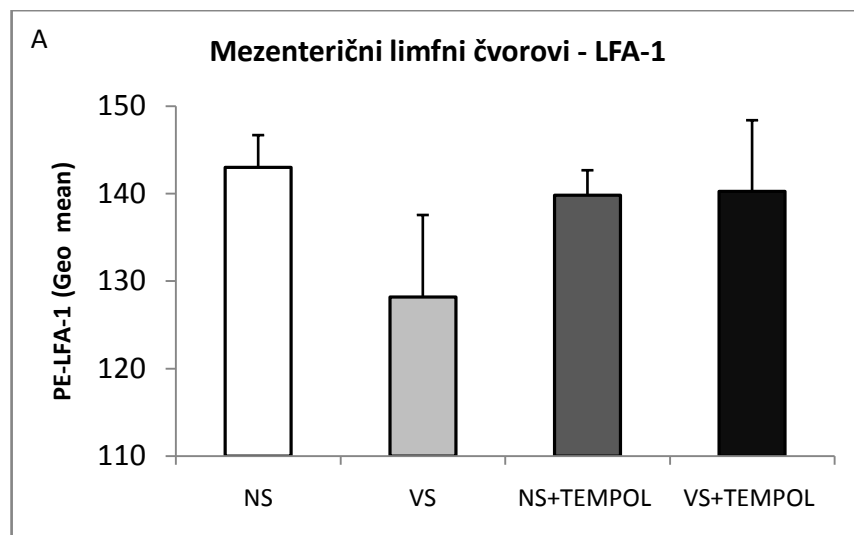
Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica, definirane su subpopulacije leukocita periferne krvi pomoću izražaja CD45-FITC i SSC detektora te određena geometrijska srednja florescencije u PE kanalu što odgovara vrijednost izražaja integrina LFA-1.

Usporedba studentovim t testom je pokazala i statistički značajno smanjen izražaj na limfocitima iz krvi kod HS grupe u odnosu na NS skupinu životinja (Slika 29;  $p=0,028$ ).

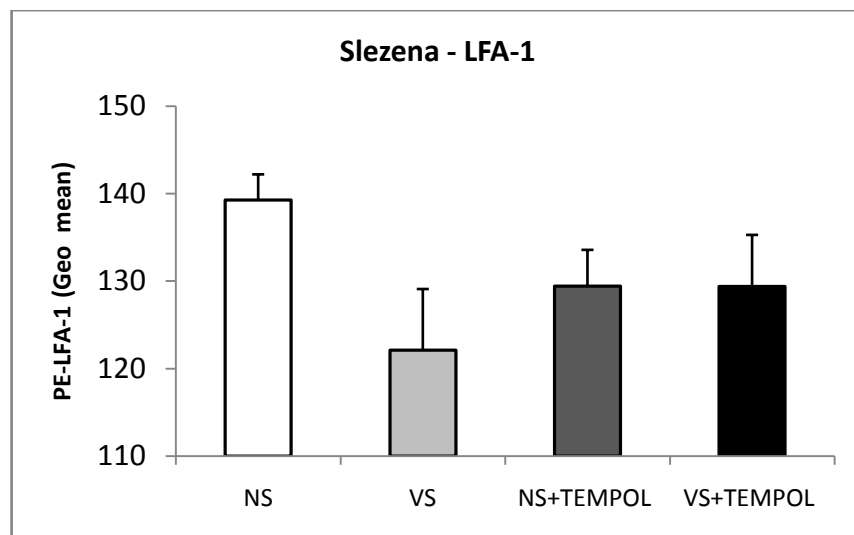




*Slika 29. Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima (A), monocitima (B) i granulocitima (C) iz periferne krvi štakora*



*Slika 30. Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima mezenteričnih (A) i perifernih (B) limfnih čvorova štakora*

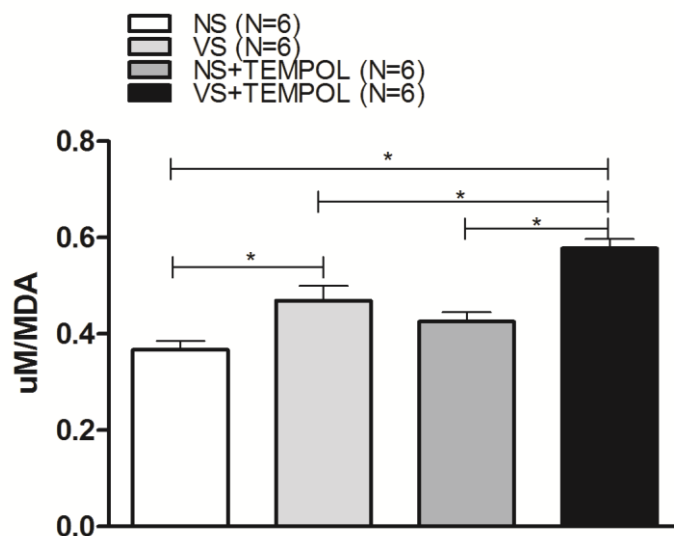


*Slika 31. Izražaj integrina LFA-1 na limfocitima slezene štakora*

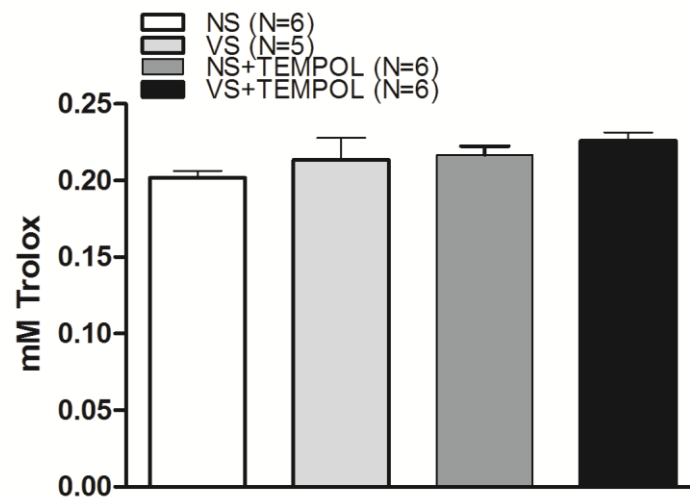
### 5.17. Serumska razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativni kapacitet (FRAP)

U skupini VS utvrđena je značajno veća razina oksidativnog stresa u odnosu na NS skupinu ( $p=0.012$ ). Također skupina VS + TEMPOL značajno je pokazala najvišu razinu izmjerenih produkata lipidne peroksidacije u odnosu na druge skupine (VS+TEMPOL vs. NS  $p < 0.001$ ; VS+TEMPOL vs. NS+TEMPOL  $p < 0.001$ ; VS+TEMPOL vs. VS  $p = 0,003$ ) (Slika 32A). Antioksidativni kapacitet između svih ispitanih grupa nije se značajno promijenio, ali ima veliku tendenciju koja bi se mogla utvrditi povećavanjem broja uzoraka ( $p=0.054$ ) (Slika 32B).

A



**B**



*Slika 32. Serumska razina oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) izmjeren iz uzoraka arterijske krvi*

## 6. RASPRAVA

Prikazana studija je prva koja ispituje utjecaj akutnog unosa visokih koncentracija soli na protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije kod SD štakora, mehanizme kojima se odvija dilatacija te pobliže razjašnjava ulogu antioksidativnih obrambenih mehanizama i moguću ulogu leukocita kod povećanog oksidativnog stresa.

Glavne spoznaje ovog istraživanja su: a) razina krvnog tlaka se ne mijenja značajno tijekom 7 dana VS prehrane i ne izaziva pojavu hipertenzije; b) akutni unos visokih koncentracija soli narušava protokom posredovani odgovor središnje moždane arterije *in vitro*; c) utvrđena je oporavljena protokom posredovana dilatacija u *in vivo* i *in vitro* uvjetima u prisutnosti „hvatača“, superoksida TEMPOLA što dokazuje povećanu razinu oksidativnog stresa nastalog pod utjecajem visokog unosa soli te nedvojbenu ulogu oksidativnog stresa i slobodnih radikala u smanjenoj razini dilatacije krvne žile; d) dodatni dokaz povećanog oksidativnog stresa utvrđen je inhibicijom učinka TEMPOLA pomoću inhibitora NO sintaze L-NAME koji je ponovno pokazao oslabljenu protokom posredovanu dilataciju; e) mehanizmi kojima se odvija protokom posredovana dilatacija su različiti ovisno o dijetnom protokolu, dilatacija kod NS prehrane ovisna je o razini NO, cikooksigenazama i metabolitima EETs-a podjednako dok je dilatacija središnje moždane arterije kod VS skupine ovisna jedino o razini dostupnog NO; f) rezultati genskog izražaja enzima uključenih u dilatacijske putove i antioksidativnih enzima podupiru navedene funkcionalne rezultate; g) niski izražaj GPx4 kod VS skupine, za razliku od drugih mjernih antioksidativnih gena, vjerojatno ima najvažniju ulogu u povećanju razine oksidativnog stresa, zajedno s povećanim oksidativnim stresom u perifernim limfnim organima i povećanom proizvodnjom plazmatskih produkata lipidne peroksidacije; h) HS može utjecati na aktivaciju leukocita te na ekspanziju/diferencijaciju Foxp3+ regulatornih T stanica pa možemo pretpostaviti kako je to povezano s povećanim nastankom oksidativnog stresa tijekom visokog unosa soli.



## **6.1. Utjecaj kratkotrajnog unosa visokih koncentracija soli na promjenu krvnog tlaka**

Dosadašnja istraživanja opisuju na različite načine povezanost visokog unosa soli i promjene krvnog tlaka, ovisno o modelu (ljudski ili životinjski) te o dužini trajanja visokoslane dijeta (271-273). Brojne studije, pa tako i naša na životinjama, ali i ljudima pokazale su kako 3-7 dana visokoslane dijeta ne mijenja značajno vrijednost krvnog tlaka (274-277) te su rezultati naše studije konzistentni s prijašnjim istraživanjima (Tablica 1). Također je model na SD štakorima i dobar dokaz kako su rezultati vjerodostojni s obzirom da su to inače normotenzivne životinje (278). Uklapanjem rezultata krvnog tlaka u druge dobivene rezultate može se zaključiti kako promjena krvnog tlaka prilikom akutnog unosa visokih koncentracija soli nije ovisna o nastaloj endotelnoj disfunkciji i povećanom oksidativnom stresu.

## **6.2. Bazični vaskularni odgovor srednje moždane arterije i razina nastalog oksidativnog stresa kod visokog unosa natrijevog klorida u funkcionalnim *in vitro* studijama**

U Tablici 1. prikazane su opće funkcionalne karakteristike krvnih žila za sve ispitivane skupine. Vrlo je važno voditi računa o parametrima kao što su mogućnost maksimalne dilatacije te dilatacije krvne žile u stanjima kada nema protoka kao i aktivnog tona žile. U našim istraživanjima nije utvrđena razlika u navedenim parametrima što govori u prilog da su dobiveni rezultati konzistentni i da su izolirane žile koje smo uključili u istraživanje bile funkcionalne.

Ranije studije na životinjama su pokazale kako je ključna poveznica između unosa VS i razvoja endotelne disfunkcije Ang II (112) te da VS smanjuje koncentraciju plazmatskog Ang II. Niske razine ANG II su povezane s povećanjem razine oksidativnog stresa i oštećenja vaskularne reaktivnosti (136). Intravenska infuzija supresorskih doza Ang II u štakora na visokoslanjoj prehrani dovodi do ponovne uspostave normalne vaskularne relaksacije krvnih žila i smanjenja koncentracije slobodnih kisikovih radikala na normalne vrijednosti (211).

Smanjena protokom posredovana dilatacija je predznak razvoja kardiovaskularnih bolesti. Koller i suradnici (30) su utvrdili kako je kod spontano hipertenzivnih štakora smanjena dilatacija u arteriolama *in vitro*. Druga studija je kod dijabetičnih i pretilih štakora također pokazala da povećan protok kronično smanjuje endotel ovisnu vazodilataciju što je vidljivo iz smanjenja protokom posredovane dilatacije (FMD), te ACh potaknute relaksacije

pri većim protocima u usporedbi s normalnim protocima kroz mezenterične otporničke arterije (199).

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje ispituje promjene u protokom posredovanoj dilataciji srednje moždane arterije kod SD štakora tijekom akutnog konzumiranja većih količina soli. Sol značajno smanjuje protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije u odnosu na NS skupinu što još jednom potvrđuje njezinu ulogu u nastanku disfunkcije endotela (Slika 1). Kao što je već spomenuto, vazodilatacija, kao odgovor na nagle promjene protoka (vaskularnog stresa), jedna je od glavnih uloga endotela.

Endotel također posreduje vazomotorni odgovor na različite podražaje, kao što je ACh ili fizička sila, otpuštanjem različitih vazoaktivnih posrednika, kao što su endotel relaksirajući čimbenici (EDRF), NO, prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) ili endotelni faktori kontrakcije (EDCF), na primjer endotelin (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) i slobodni kisikovi radikali (ROS) (62, 279).

NO igra važnu ulogu u održavanju bazalnog tonusa krvnih žila (71) i ima središnju ulogu u vazodilataciji (72), sprječava adheziju i migraciju leukocita u arterijskom zidu i inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (73). Glavni faktor koji uzrokuje produkciju NO je sila smicanja koja potiče fosforilaciju eNOS i stimulaciju receptora endotelnih stanica (280) što rezultira aktivacijom Ca<sup>2+</sup>-aktivirani K<sup>+</sup> (K<sub>Ca</sub>) kanala na površini endotelnih stanica te dovodi do oslobađanja K<sup>+</sup> iz stanica i ulazak Ca<sup>2+</sup> u stanicu (281). Štoviše, ACh, bradikinin, trombin, adenozin difosfat (ADP) i adenozin trifosfat (ATP) uzrokuju opuštanje glatkih mišićnih stanica i stimuliraju produkciju NO (73-75).

U svim ispitivanim grupama izolirane moždane arterije su se značajno dilatirale pri svakom gradijentu tlaka uz najznačajniju dilataciju pri  $\Delta 40$  mmHg. Najvažniji nalaz ovog dijela studije je da tjedan dana konzumiranja visokih koncentracija soli narušava protokom posredovanu dilataciju središnje moždane arterije kod SD štakora. Slobodni kisikovi radikali proizvode se u različitim fiziološkim metaboličkim procesima, a njihovo prekomjerno stvaranje dovodi do nastanka oksidativnog stresa. Stvaraju se u svim stanicama krvnih žila (endotela, glatkih mišića) kao i u perivaskularnim adipocitima (282) te u cirkulirajućim leukocitima (283). ROS sudjeluju u vaskularnoj signalizaciji u fiziološkim i patološkim uvjetima. Endotelne stanice proizvode slobodne kisikove radikale uključujući superoksid (O<sup>2-</sup>), vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>), hidroksilni radikal (HO•) i neke druge koji mogu izravno djelovati kao EDCF npr. tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) i prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ .

(PGF2 $\alpha$ ) (274, 284) ili posredno, smanjenjem bioraspoloživosti NO [Huie & Padmaja 1993]. Ispitivanja na životinjama su pokazala da povećan oksidativni stres smanjuje razinu NO koji je važan posrednik u protokom posredovanoj dilataciji (30). Dobro je poznato da VS povećava razinu oksidativnog stresa (136). Utvrdili smo kako dodatak TEMPOLA *in vivo* u VS ishranu ponovno poboljšava razinu dilatacije arterije u odnosu na VS skupinu čak do razine dilatacije koja je ostvarena kod NS skupine, dok na NS skupinu TEMPOL nije imao efekta. Kao dodatna potvrda uključenog oksidativnog stresa kod soli, uključivanjem inhibitora L-NAME, ponovno je narušena dilatacija što daje potvrdu da je razina protokom posredovane dilatacije ovisna o razini NO (Slika 9). Naši rezultati također potvrđuju kako je o endotelu ovisna vazodilatacija na ACh značajno smanjena nakon visokog unosa soli, što predstavlja dodatnu potvrdu endotelne disfunkcije i smanjene dostupnosti NO (Slika 15). Funkcionalna sposobnost stanica vaskularnih glatkih mišića testirana je pomoću endotel neovisnog donora NO natrijeva-nitroprusida (SNP) te je utvrđeno kako je odgovor očuvan u svim skupinama (Slika 16).

### **6.3. Mehanizmi protokom posredovane dilatacije i izražaj gena uključenih u dilatacijske putove srednje moždane arterije kod visokog unosa natrijevog klorida u funkcionalnim *in vitro* studijama**

Kad se značajno smanji biodostupnost NO, endotel aktivira razne kompenzacijske fiziološke putove. U tom slučaju, narušena endotel ovisna vazodilatacija djelomično se održava, proizvodnjom i oslobađanjem drugih endotelnih vazodilatatora osim NO, kao što su prostanoidi (prostaciklin) i drugi endotel hiperpolarizirajući faktori (EDHFs). Endotelna disfunkcija potiče stvaranje drugih štetnih metabolita za stijenke arterija, uključujući endotelin-1 (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub>, prostaglandin H<sub>2</sub> i ROS (41), s raznim proaterosklerotičnim značajkama (vazokonstrikcija). Prema tome, disfunkcija endotela, uzrokovana deficitom NO i aktivacijom endotel ovisne vazokonstrikcije, definitivno je uključena u patogenezu ateroskleroze i tromboze (41, 285). S povećavanjem broja istraživanja utvrđeno je kako osim NO, također i COX može utjecati na promjenu dilatacije i razinu relaksacije krvne žile (24, 26, 72, 74). PGI<sub>2</sub> je važan EDRF koji se djelomično oslobađa kao odgovor na vaskularni stres (27, 286). Sintetizira ga enzim COX-1 iz arahidonske kiseline (287), a djeluje na povećanje koncentracije cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) u stanicama glatkih mišića i trombocitima, što rezultira opuštanjem glatkih mišića te inhibicijom agregacije trombocita (288). PGI<sub>2</sub> olakšava otpuštanje NO iz endotelnih stanica, ali za razliku od NO, PGI<sub>2</sub> ne pridonosi održavanju bazalnog tonusa krvnih žila, velikih

krvnih žila, ali se otpušta na inicijativu raznih agonista (25, 78). Proizvodnja prostaciklina iz endotelnih stanica je povećana s povećanim COX-2 ovisnim stanjima. Pokazano je da inhibitor NOS uzrokuje ~ 50% -tno smanjenje u proizvodnji prostaglandina (289), što znači da je polovica vaskularne proizvodnje prostaciklina inducirano vaskularnim stresom ovisna o NO signalizaciji.

Matrougui i suradnici (290) pokazali su kako visoke koncentracije soli od 8% zajedno s inhibicijom COX-2 uzrokuju smanjenu protokom posredovanu dilataciju rezistentnih arterija. Rezultati dobiveni primjenom TEMPOLA *in vivo* u VS skupini vezani uz poboljšanje dilatacije uz neovisnost razine dilatacije o INDOMETACINU te nepromijenjeni izražaj COX-2 gena nego samo povećani COX-1 izoforme sukladni su s navedenim istraživanjem.

Mjerenjem razine protokom posredovane dilatacije kod NS i VS skupine u ovisnosti o prisutnosti pojedinih inhibitora utvrđena je razlika u mehanizmima koji dovode do dilatacije. Dilatacija NS skupine je značajno smanjena u prisutnosti sva tri inhibitora zasebno (L-NAME, INDO i MSPPOH), kombinaciji bilo koja dva navedena inhibitora ili u prisutnosti sva tri inhibitora zajedno u odnosu na bazalna mjerenja dilatacije potaknute protokom. Također je kombinacija sva tri inhibitora još dodatno smanjila razinu dilatacije u usporedbi s primjenom svakog pojedinog inhibitora zasebno (Slika 2, 3, 4 i 5).

Za razliku od NS skupine, kod VS skupine dilatacija potaknuta protokom pokazala se ovisna jedino o razini NO (slika 6). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je protokom posredovana dilatacija moždane arterije kod NS prehrane ovisna o metabolitima NO, COX-u i EETs-ima podjednako, odnosno da niti jedan od metabolita nije pokazao kako zauzima primarnu ulogu u utjecaju na razinu dilatacije dok kod unosa soli, dilatacija ovisi primarno o razini NO. TEMPOL se kao „hvatač“ radikala pokazao dobar model za uočavanje i dokazivanje oksidativnog stresa ali i za utvrđivanje uloge antioksidativnih enzima na mehanizme kojima se provodi dilatacija. Uvođenjem uz VS prehranu *in vivo* TEMPOLA protokom posredovana dilatacija središnje moždane arterije se značajno poboljšala do razine u NS skupini uz primarnu ovisnost prema metabolitima NO i EETs-a. Naša molekularna analiza potvrđuje funkcionalne eksperimentalne rezultate (Tablica 2). Prema našim spoznajama nema prethodnih podataka o izmjerenom mRNA izražaju iNOS i eNOS gena u krvnim žilama mozga. Neke druge studije su utvrdile da je kratkoročni unos soli tijekom 48h (8% NaCl) rezultirao značajnim smanjenjem iNOS-a u kori bubrega i aort, a eNOS-a u aorti (291).

Nedostatak NO, bilo zbog niske proizvodnje ili smanjene biorasploživosti NO kao posljedica nastalog oksidativnog stresa, najvažniji su razlozi za oslabljenu protokom posredovanu dilataciju moždanim arterijama kod VS skupine životinje.

#### **6.4. Izražaj antioksidativnih gena, razina oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta u arterijskim uzorcima krvi**

Postoji nekoliko važnih antioksidativnih enzima koji su uključeni u proces smanjenja razine ROS, kao što su SOD, katalaza i GPx (292).

Lenda i suradnici (213, 232) ističu u svojim istraživanjima kako je kod VS djeteta smanjen proteinski izražaj antioksidativnih enzima (SOD izoformi) ili njihova aktivnost, te da oksidativni stres kao posljedica smanjenog izražaja, smanjuje dilataciju štakorskih kapilara spinotrapeznih mišića (arterija i vena). U našim istraživanjima vidljiva je tendencija smanjenja izražaja SOD izoformi kod VS djeteta, ali nismo dobili statistički značajnu razliku. Jedan od mogućih razloga je taj da smo mi prvi koji su utvrđivali mRNA izražaj navedenih izoformi u ovom modelu dok su prijašnja istraživanja utvrđivala proteinsku razinu. TEMPOL *in vivo* je ponovno povećao razinu sve tri SOD izoforme i kod NS i VS skupine, i što je njegova primarna uloga te s jedne strane služi i kao kontrola da je TEMPOL postigao svoj efekt te da je doza bila dovoljna kako bi se povećala razina SOD izoformi.

Izražaj drugih ispitanih antioksidativnih gena (GPx i katalaza) kod VS prehrane na modelu središnje moždane arterije, prema našim saznanjima, do sada nije zabilježen. Poznato je da su i GPx1 i GPx4 važni enzimi za proces fosfolipidne peroksidacije, osobito GPx4 koji nas štiti od lipidne peroksidacije (293). U ovom istraživanju, VS kroz tjedan dana ima najveći utjecaj na razinu GPx4, koja je bila značajno smanjena u odnosu na NS skupinu što dodatno pridonosi mogućnosti povećanog oksidativnog stresa (Tablica 3). Iako GPx4 štiti organizam od lipidne peroksidacije, u isto vrijeme kao produkt stvara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dokaz tome je mjerenje serumske razine oksidativnog stresa TBARS metodom kojom je na još jedan dodatni način potvrđena povećana razina oksidativnog stresa kod unosa visokih koncentracija soli. TBARS metoda mjeri produkte lipidne peroksidacije (malondialdehid) (Slika 32). Zanimljivo je kako smo u skupini VS+TEMPOL uočili još višu razinu oksidativnog stresa nego kod čiste VS skupine iako TEMPOL služi kao antioksidans. Takvo pojačano stvaranje produkata lipidne peroksidacije može biti rezultat dodatnog stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz GPx4 gena koji je jače izražen u VS+TEMPOL skupini nego kod čiste slane prehrane. Također izražaj katalaze između NS, VS i VS+TEMPOL skupine nije se značajno promijenio te nije bilo moguće da katalaza

prevede nastalu količinu  $H_2O_2$  u vodu i smanji razinu oksidativnog stresa. Tjedan dana visokoslane prehrane unatoč svim parametrima nije značajno promijenilo antioksidativni kapacitet plazme (Slika 32). Budući da se mRNA izražaj drugih antioksidativnih enzima nije promijenio tijekom VS prehrane, rezultati ukazuju na to da je GPx4 možebitno najvažnija izoforma u moždanim krvnim žilama koje su odgovorne za održavanje oksidativnog statusa.

### **6.5. Izražaj HIF-1 $\alpha$ transkripcijskog faktora te njegovih popratnih gena**

Jedna od nepoznanica kod primjene visokog udjela natrijevog klorida je izražaj hipoksijom induciranog faktora -1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) u mikrocirkulaciji. Za sada jedina istraživanja koja povezuju HIF-1 $\alpha$  i visokoslanu dijetu su provedena na promatranju bubrega i izražaju gena HIF-1 $\alpha$  u bubrezima. To istraživanje je pokazalo kako HIF-1 $\alpha$  i njegovi ciljani geni imaju važnu ulogu u regulaciji izlučivanja natrija i krvnoga tlaka (294). Izražaj HIF-1 $\alpha$  kao i HIF prolil hidroksilaze PHD1, PHD2 i PHD3 povećana je u bubrezima u prisutnosti visokih koncentracija soli (261). Do sada nije provedeno niti jedno istraživanje koje je ispitalo izražaj HIF-1 $\alpha$  gena u krvnim žilama mozga i utvrdilo utjecaj tog gena na druge antioksidativne enzime te na povećanu razinu oksidativnog stresa. Izražaj HIF-1 $\alpha$ , kao i njegovih popratnih gena, nije se značajno promijenio nakon tjedan dana visokog unosa soli (Tablica 4), stoga se može pretpostaviti kako akutan period slane dijetete ne dovodi do značajne hipoksije u mozgu i njegovim krvnim žilama. Pojedina istraživanja su naglasila kako izražaj HIF-1 $\alpha$  gena ovisi uvelike o izražaju MnSOD u stanjima adekvatne koncentracije kisika ali i u stanjima hipoksije (295). S obzirom da se izražaj tog antioksidativnog gena kod VS prehrane nije značajno promijenio, moguće je da je to još jedan od razloga nepromijenjenog izražaja HIF-1 $\alpha$ . No, uvođenjem TEMPOLA koji kako je već spomenuto „oponaša“ SOD, osim izražaja MnSOD porastao je sukladno tome i izražaj HIF-1 $\alpha$  što učvršćuje navedenu pretpostavku. Konzistentnost i točnost izmjerenog izražaja HIF-1 $\alpha$  potvrđuju izmjereni izražaji ostalih popratnih gena koji su pokazali da se kreću u istom smjeru (Tablica 4). U VS skupini HIF-1  $\alpha$  značajno pozitivno korelira s antioksidativnim enzimima MnSOD i GPx1 što ukazuje kako je HIF-1  $\alpha$  ovisan o razini oksidativnog stresa i razini antioksidativnih enzima (Tablica 5). Pojedina istraživanja na drugim modelima su pokazala kako MnSOD utječe na sam izražaj HIF-1  $\alpha$  na način da svojom povećanim izražajem blokira učinak transkripcijskog faktora te kako povećani izražaj GPx1 nema utjecaja na promjenu HIF-1 $\alpha$  (296-297). No, s obzirom kako se ni izražaj tih gena nije značajno promijenio tijekom tjedan dana visokog unosa soli vrlo vjerovatno bi duži period slane dijetete pokazao u kojem mjeri je HIF-1 $\alpha$

uključen u stvaranje povećanog oksidativnog stresa ili kako ga oksidativni stres i antioksidativni enzimi moduliraju.

### **6.6. Aktivacija i razina oksidativnog stresa na leukocitima tijekom visokoslane dijeta te njihova uloga u poremećenom vaskularnom odgovoru kod visokog unosa natrijevog klorida**

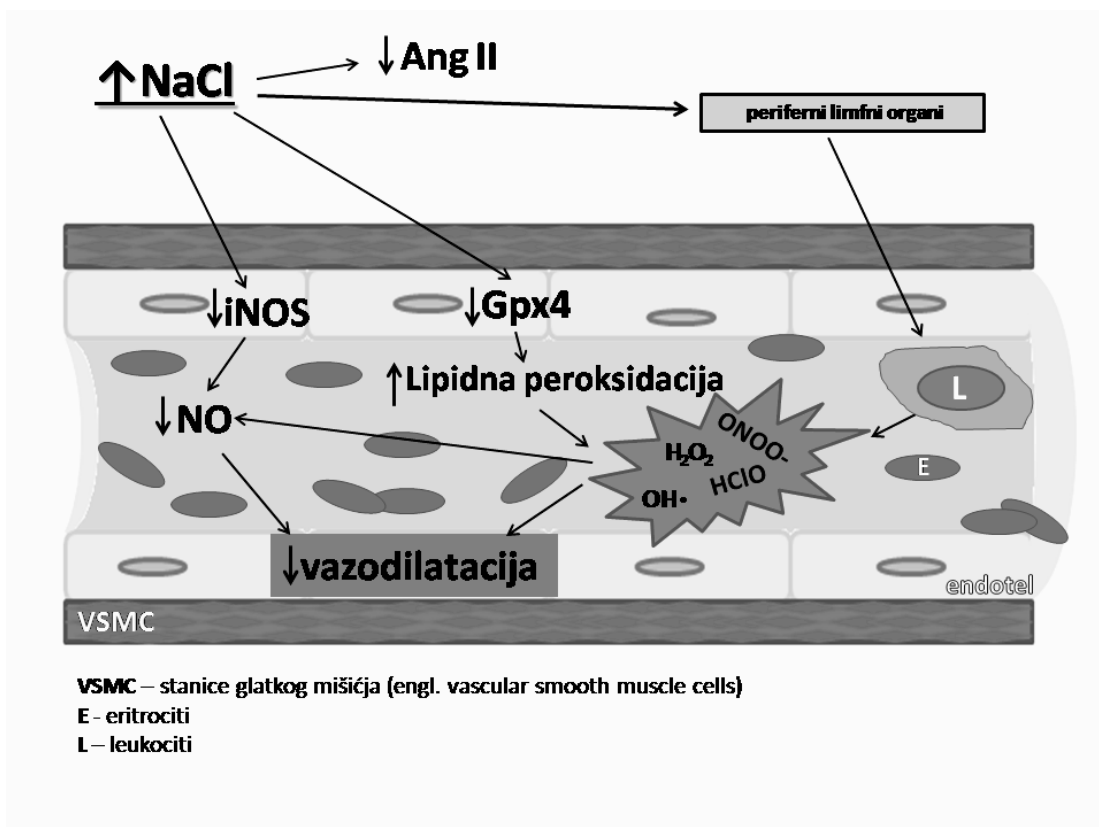
Nedavne studije su pokazale kako visoki unos soli u hrani može utjecati na normalno funkcioniranje imunološkog sustava. Posebice, pokazano je da povećane koncentracije soli u fiziološkim uvjetima *in vivo* značajno pojačavaju indukciju mišjih i ljudskih Th17 stanica i smanjuju funkciju T regulatornih stanica koje zajedno olakšavaju razvitak autoimunosti (298-299). U našim istraživanjima dobili smo rezultate koji su na prvi pogled suprotni našoj hipotezi. Frekvencije aktiviranih pomoćničkih, citotoksičnih te regulatornih T stanica u perifernoj krvi značajno se smanjila nakon tjedan dana visokoslane prehrane (Slika 18), dok je u uzorcima slezene jedino razina pomoćničkih leukocita bila značajno manja nakon unosa visokih koncentracija soli (Slika 19B). Moguće objašnjenje dobivenih rezultata je da korištena protutijela detektiraju samo neaktivne stanice pojedinih podvrsta leukocita te bi bilo potrebno provjeriti dobivene rezultate nekim specifičnijim protutijelom. ROS je povezan s pojačanim odgovorom, apoptozom i aktivacijom T stanica (283, 300). Podrijetlo unutarstaničnog ROS-a u limfocitima dolazi iz najmanje dva izvora - egzogeni ROS proizveden iz dendritičnih stanica i fagocita te intracelularno proizveden ROS tijekom različitih staničnih procesa, uključujući i T staničnim receptorima posredovana aktivacije T stanica. Dok egzogeni ROS može dovesti do nastanka oksidativnog stresa, endogeno proizvedeni ROS prvenstveno djeluju kao signalne molekule koja promoviraju ili aktivaciju ili apoptoze T stanica (283). U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između ROS-a i antioksidanata, a ometanje te ravnoteže može dovesti do pojačanog ili oslabljenog odgovora T-stanica što dovodi do razvoja raznih patoloških pojava. Oksidativna oštećenja se pojavljuju kada unutarstanična razina ROS-a premaši antioksidativni kapacitet stanica. Mjerenje unutarstanične razine ROS-a je korisno u utvrđivanju izvora viška ROS-a.

Naše istraživanje je pokazalo da povećan unos soli dovodi do značajnog porasta produkcije reaktivnih spojeva kisika u limfocitima iz perifernih organa (Slika 23, 25 i 27), a također postoji i tendencija porasta oksidativnog stresa u leukocitima iz krvi (Slika 21). U ovom istraživanju uvrđili smo da VS ishrana značajno inducira razinu bazalnog unutarstaničnog ROS-a u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova i slezene

(Slika 23 i 27), kao i unutarstaničnu proizvodnja ROS-a u perifernim limfnim čvorovima nakon PMA stimulacije (Slika 25). Ograničenje ovog istraživanja je nedostatak diferencijacije između različitih T / B-staničnih podskupina, kao i nemogućnost da se procijeni njihovo funkcionalno stanje. Međutim, naši rezultati ukazuju na to da je oksidativna ravnoteža limfocita znatno izmijenjena i rezultira povećanom unutarstaničnom razinom ROS-a i možebitno mijenja njihovu normalnu funkciju.

Stanice imunološkog sustava, uključujući limfocite T, posjeduju receptore za Ang II, no njihova uloga u aktivaciji limfocita i promoviranju aterogenih procesa još uvijek nije poznata. U tu svrhu, istraživanje smo proširili na određivanje izražaja LFA-1, integrina koji sudjeluje u adheziji leukocita iz krvi na aktivirani endotel, što je prvi korak u transmigraciji leukocita na mjesto upale. Poznato je da uslijed kemokina, koje luče endotelne stanice na mjestu upale, dolazi do povećanja izražaja LFA-1 na površini leukocita kao i promjene njegovog afiniteta za stanične adhezijske molekule na površini endotela. Dobiveni rezultati pokazuju tendenciju smanjenja izražaja LFA-1 na limfocitima životinja koje su bile na kratkotrajnoj dijeti s visokim unosom soli (Slika 29, 30 i 31). Rezultati su se pokazali suprotni postavljenoj hipotezi da će kratkotrajni visok unos soli dovesti do aktivacije leukocita. Moguće objašnjenje je promjena konformacije LFA-1 koju nije bilo moguće pouzdano mjeriti primijenjenim monoklonskim protutijelom.





**Slika 33. Shematski prikaz utjecaja visokog unosa soli na povećanu proizvodnju oksidativnog stresa i smanjenu vazodilataciju središnje moždane arterije**

*Iz prijašnjih istraživanja je poznao kako visoki unos soli smanjuje razinu AngII koji posljedično smanjuje razinu dostupnog NO. U našim istraživanjima, tjedan dana visokog unosa soli značajno smanjuje izražaj GPx4, antioksidativnog enzima, i iNOS-a te oboje predstavlja dodatnu potvrdu povećanog oksidativnog stresa koji nastaje u krvnim žilama mozga te zajedno s dodatnim oksidativnim stresom koji se akumulira u perifernim organima utječe na smanjenu razinu protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije.*

## 7. ZAKLJUČCI

- Dijeta s visokim udjelom soli tijekom 7 dana nije dovela do značajnih promjena krvnoga tlaka kod SD štakora
- Unošenjem visokih koncentracija NaCl-a u razdoblju od tjedan dana, narušava se o endotelu ovisna protokom posredovana dilatacija u otporničkim moždanim krvnim žilama *in vitro* u odnosu na razinu dilatacije kod skupine na niskoslanoj prehrani
- Mehanizmi protokom posredovane dilatacije su različiti kod niskoslane i visokoslane dijete – dilatacija središnje moždane arterije kod niskoslane skupine ovisna je o razini NO, metabolitima ciklooksigenaza i metabolitima EETs-a podjednako tj. niti jedan ne zauzima primarnu ulogu dok je protokom posredovana dilatacija kod visokoslane dijete isključivo ovisna o razini dostupnog NO. Dobiveni funkcionalni podaci su podkrijepljeni molekularnim mRNA izražajem metabolita uključenih u navedene dilatacijske putove
- TEMPOL *in vivo* i *in vitro* poboljšava razinu protokom posredovane dilatacije što potvrđuje ključnu ulogu oksidativnog stresa u narušavanju razine protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije pod utjecajem visokog unosa soli
- Izražaj svih ispitivanih antioksidativnih enzima se smanjuje, ali jedina značajna razlika u mRNA izražaju utvrđena je kod GPx4 koji očito ima bitnu ulogu u nastanku povećanog oksidativnog stresa kod središnje moždane arterije. Dodatna potvrda te činjenice dobivena je izmjerenim, značajno povišenim razinama lipidne peroksidacije kod unosa VS uz nepromijenjeni antioksidativni kapacitet
- Smanjena razina ili smanjena bioraspoloživost NO može bitno nastaje zbog značajno smanjenog izražaja iNOS-a ili nastalog oksidativnog stresa
- Genskim izražajem transkripcijskog faktora HIF-1 $\alpha$  i njegovi ciljnih gena nije utvrđena njihova značajna uloga u povećanju razine nastalog oksidativnog stresa pod utjecajem akutnog unosa visokih koncentracija soli međutim kod visokog unosa soli HIF-1 $\alpha$  pokazuje pozitivnu korelaciju s antioksidativnim enzimima što govori u prilog kako bi duži period unosa NaCl-a mogao značajno modificirati njegov izražaj
- Visoki unos soli prehranom povećava proizvodnju ROS-a u perifernim limfnim organima i tako stvara dodatnu razinu oksidativnog stresa, za koje pretpostavljamo, može pridonijeti smanjenoj vazodilataciji središnje moždane arterije

## 8. SAŽETAK

**Ključne riječi:** mikrocirkulacija, oksidativni stres, protokom posredovana dilatacija, visoko slana dijeta

**Cilj:** Utvrditi bazični odgovor i razjasniti mehanizme protokom posredovane dilatacije (FID) te izražaj antioksidativnih gena, gena uključenih u dilatacijske putove središnje moždane arterije (MCA), razinu leukocitne aktivacije i ulogu oksidativnog stresa u MCA kod Sprague-Dawley (SD) štakora na visokoslanoj (VS) dijeti.

**Metode:** Zdravi muški SD štakori starosti 11 tjedana hranjeni su standardnom hranom (0,4% NaCl, NS grupa) ili hranom s 4% NaCl (VS grupa) tjedan dana, s ili bez dodatka TEMPOLA *in vivo*. Reaktivnost MCA u odgovoru na stupnjevito povećanje protoka izmjerena je u odsutnosti ili prisutnosti inhibitora sintaze dušičnog oksida (L-NAME), ciklooksigenaze 1 i 2 (COX-1,2) indometacina (INDO), selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze (MS-PPOH) i „hvatača“ superoksidnih radikala TEMPOLA. mRNA izražaj antioksidativnih enzima (SOD izoformi, glutation peroksidaze 1 i 4 (GPx 1 i GPx4), katalaze (CAT)) i gena uključenih u dilatacijske putove ((COX-1, 2, hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ), inducibilna i endotelna dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i HIF prolil hidroksilazne izoforme) utvrđen je kvantitativnom PCR metodom u stvarnom vremenu. Protočnom citometrijom iz uzoraka pune krvi, mezenteričnih i perifernih limfnih čvorova te slezene utvrđeni su odnosi pomoćničkih i citotoksičnih limfocita T, aktiviranih regulatornih FoxP3 pomoćničkih limfocita T te razina oksidativnog stresa. Krvni tlak, razina lipidne peroksidacije i antioksidativnog kapaciteta izmjereni su za sve skupine.

**Rezultati:** FID je smanjen u VS skupini pri svakom gradijentu tlaka u odnosu na NS skupinu. FID kod VS skupine posredovan je primarno NO. TEMPOL poboljšava FID u VS grupi dok na NS skupinu nije imao utjecaj. Izražaj GPx4 i iNOS u VS skupini značajno je smanjen. VS značajno povećava bazičnu proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala u leukocitima, mezenteričnim limfnim čvorovima i slezeni, te unutarstaničnu proizvodnju nakon stimulacije u perifernim limfnim čvorovima. Antioksidativni kapacitet i krvni tlak nisu se značajno promijenili.

**Zaključak:** Unos soli poremećuje vaskularnu reaktivnost na FID. Ovi podaci po prvi put pokazuju kako su mehanizmi FID različiti kod unosa niske i visoke koncentracije soli,

dokazuju komplementarnost mehanizama FID-a kod MCA zdravog endotela. Niski izražaj GPx4, povećana proizvodnja superoksida u leukocitima, zajedno sa smanjenim izražajem iNOS-a uzrokuju nastanak oksidativnog stresa i smanjuju biološku raspoloživost NO čime se poremećuje FID kod VS skupine.

## 9. SUMMARY

### THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN DEVELOPMENT OF IMPAIRED VASCULAR RESPONSE UNDER THE INFLUENCE OF HIGH SODIUM CHLORIDE INTAKE IN SPRAGUE-DAWLEY RATS

**Key words:** microcirculation, oxidative stress, flow-mediated dilation, high salt diet

**Objective:** To determine basic vascular response and to clarify the mechanisms of flow-induced dilatation (FID) of middle cerebral artery (MCA) of Sprague-Dawley (SD) rats on a high salt (HS) diet by expression of the essential antioxidant genes, genes involved in the dilation pathways, level of leukocyte activation and the role of oxidative stress.

**Methods:** 11-weeks old healthy male SD rats were divided in low salt group (LS) fed with standard rat chow (0.4% NaCl) and high salt group (HS) fed food with 4% NaCl for 1 week with/without addition TEMPOL *in vivo*. Vascular reactivity of MCA in response to FID in the absence/presence of inhibitors of the nitric oxide synthase (NOS) (L-NAME), cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1,2) indomethacin (INDO), selective inhibitor of microsomal CYP450 epoxidase activity (MS-PPOH) and superoxide dismutase (SOD) mimetic TEMPOL was examined. mRNA levels of antioxidative enzymes (SOD isoforms, glutathione peroxidases (GPx 1 and GPx4), catalase (CAT)) and enzymes involved in dilatation pathways of MCA (COX-1, 2, hypoxia-induced factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF), and HIF prolyl hydroxylases isoforms) were determined by quantitative real-time PCR from brain blood vessels. Relations of helper and cytotoxic T lymphocytes, activated regulatory Foxp3 helper T lymphocytes and level of oxidative stress in leukocytes from the blood and peripheral organs were examined by flow cytometry. Blood pressure, lipid peroxidation products and antioxidant capacity of plasma were measured for both groups.

**Results:** FID was reduced in HS group compared to LS group. L-NAME, INDO and MS-PPOH (independently) significantly reduced FID in LS group, FID in HS group was mediated by NO. TEMPOL restored FID in HS group to basal levels while in LS group TEMPOL had no effect. Expression of GPx4 and iNOS in HS group was significantly

decreased. HS intake significantly increased basic reactive oxygen species production in the leukocytes of mesenteric lymph nodes and spleenocytes, and intracellular production after stimulation in peripheral lymph nodes. Antioxidant enzymes activity and BP were not affected by HS diet.

**Conclusion:** HS intake impaires vascular responses to FID. These data for the first time show that mechanisms of FID are different in LS and HS groups. Low GPx4 expression, increased superoxide production in leukocytes, together with decreased iNOS expression underlies increased oxidative stress and reduced nitric oxide bioavailability in HS group, which caused impairment of FID in HS group without changes in BP values.

## 10. LITERATURA

- 1) Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010; 468:232–243.
- 2) Betz E. Cerebral blood flow: Its measurement and regulation. *Physiol Rev*. 1972; 52:595–630
- 3) Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan J, Jefcoat C, Falck JR, Campbell WB, Roman R. Formation and action of a p-450 4a metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol*. 1994; 266:H2098–H2107.
- 4) Harper AM. Autoregulation of cerebral blood flow: Influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1966; 29:398–403.
- 5) Kontos HA. Regulation of the cerebral circulation. *Annu Rev Physiol*. 1981; 43:397–407.
- 6) Lassen NA. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev*. 1959; 39:183–238.
- 7) Lassen NA. Control of cerebral circulation in health and disease. *Circ Res*. 1974; 34:749–760.
- 8) McHedlishvili G. Physiological mechanisms controlling cerebral blood flow. *Stroke*. 1980; 11:240–248.
- 9) McHedlishvili GI, Mitagvaria NP, Ormotsadze LG. Vascular mechanisms controlling a constant blood supply to the brain ("autoregulation"). *Stroke*. 1973; 4:742–750
- 10) van Beek AH, Claassen JA, Rikkert MG, Jansen RW. Cerebral autoregulation: An overview of current concepts and methodology with special focus on the elderly. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28:1071–1085.
- 11) Rosenblum WI, Wei EP, Kontos HA. Dilation of rat brain arterioles by hypercapnia in vivo can occur even after blockade of guanylate cyclase by odq. *Eur J Pharmacol*. 2002; 448:201–206.
- 12) Kovach AG, Dora E, Szedlaczek S, Koller A. Effect of the organic calcium antagonist d-600 on cerebrocortical vascular and redox responses evoked by adenosine, anoxia, and epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1983; 3:51–61.

- 13) Dora E, Koller A, Kovach AG. Effect of topical adenosine deaminase treatment on the functional hyperemic and hypoxic responses of cerebrocortical microcirculation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984; 4:447–457.
- 14) Schaller B, Graf R. Different compartments of intracranial pressure and its relationship to cerebral blood flow. *J Trauma.* 2005; 59:1521–1531.
- 15) Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990; 2: pp. 161–192.
- 16) Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res.* 2001;38:1-12.
- 17) Michael J. Mulvany , C. Aalkjaer, A. M. Heagerty. *Resistance Arteries, Structure and Function: Proceedings.* Excerpta Medica. 1991; ISBN 10: 0444891935
- 18) Schretzenmayr A. *Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit.* *Pflügers Arch* 1933; 232: 743-748
- 19) 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.
- 20) Hull SS, Kaiser L, Jaffe MD, et al. Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels.* 1986; 23:183–198
- 21) Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol.* 1991;259: H1063–H1070.
- 22) 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.
- 23) Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res.* 1993;72:1276–1284.
- 24) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91:1314–9.
- 25) Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994;267:H326-32.
- 26) Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res.* 1990;67:529–534.
- 27) 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.



- 28) Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC, Falck JR, Gutterman DD. Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H491–H499.
- 29) Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994;74:416-421.
- 30) Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001;103:1752-8.
- 31) 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.
- 32) Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res*. 2003;93:573–80.
- 33) Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;285:H2255–63.
- 34) Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-74.
- 35) Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, Hockenberry JC, Gutterman DD. *Circ Res*. 2014 Aug 15;115(5):525-32.
- 36) Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, Hockenberry JC, Gutterman DD. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circ Res*. 2014; 115(5):525-32.
- 37) Wilson SH, Lerman A. Function of Vascular Endothelium. *Heart Physiology and Pathophysiology* 2001:27.
- 38) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373–376.
- 39) Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation* 2013; 20(3):239–247.
- 40) Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989; 13: 658–667.

- 41) Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2003;9: 2385–2402.
- 42) 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
- 43) Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990; 323: 22–27
- 44) Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19: 415–420
- 45) Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000;101: 1653–1659
- 46) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF Jr, Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H2392–H2398
- 47) Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 2001;103: 1238–1244.
- 48) Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A. Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus. Evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation.* 2002;106: 3037–3043.
- 49) Endemann D, Pu Q, De Ciuceis C, Savoia C, Virdis A, Neves MF i suradnici. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension.* 2004;43: 399–404
- 50) Monnink SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW i sur. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: A comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med.* 2002;50: 19–24

- 51) Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C i sur. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002; 106: 3073–3078
- 52) Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, Pinkney JH. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: Roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16: 1189–1197
- 53) Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart*. 2000; 83: 205–209
- 54) Yildiz A, Oflaz H, Pusuroglu H, Mercanoglu F, Gencallac H, Akkaya V, Ikizler TA, Sever MS. Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;41: 616–623
- 55) Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996; 94: 1298–1303
- 56) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340: 1111–1115
- 57) Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S i sur. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*. 2000;101: 1780–1784.
- 58) Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM i suradnici. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation*. 2003;108: 1059–1063
- 59) Raitakari M, Ilvonen T, Ahotupa M, Lehtimaki T, Harmoinen A, Suomi P i suradnici. Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: Role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 124–128
- 60) Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Best MJ, Taylor RR, O’Driscoll JG. Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: Pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H2679–H2687

- 61) Oida K, Ebata K, Kanehara H, Suzuki J, Miyamori I. Effect of cilostazol on impaired vasodilatory response of the brachial artery to ischemia in smokers. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10: 93–98
- 62) Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovasc Med J.*2010;4:302-312.
- 63) Gonçalves Dias R, Negrão CE, Krieger MH. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq Bras Cardiol.*2011;96(1):68-75.
- 64) Vila E, Salaiques M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2005;288(3):H1016-21.
- 65) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.
- 66) Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res.*1979; 5: 211–24.
- 67) Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl.*1996; 55: S2–5.
- 68) Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327, 524–526
- 69) Radomski MW, Salas E. Biological significance of nitric oxide in platelet function. In *Nitric oxide: a modulator of cell-cell interactions in the microcirculation* edited by P.Kubes, 1995; pp. 43–74. Heidelberg, Springer Verlag.
- 70) Cooke JP, Rossitch Jr E, Andon NA, Loscalzo J and Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J. Clin. Invest.*1991; 88, 1663–1671.
- 71) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.*1989; 2:997-1000.
- 72) Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.*2006;147:S193-S201.
- 73) Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.*2002;53:503-14.
- 74) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.*1986;250: H1145–9.

- 75) Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research. From the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly*.2010;140:w13122.
- 76) Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1979; 30:293–331.
- 77) Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: the complete story. Boca Raton, Taylor & Francis CRC press; 2006: 1–298.
- 78) Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol*.1992;105:485–9.
- 79) Nakayama T. Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*.2006;4:351–9.
- 80) Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol*.1988;95:1197–1203.
- 81) Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(6):1215–1225.
- 82) Fleming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension*.2006;47(4):629–633.
- 83) Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23(8):374–380.
- 84) Bolton TB, Clapp LH. Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 1986;87(4):713–723.
- 85) Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British Journal of Pharmacology*. 1988;95(4):1165–1174.
- 86) Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995;92(11):3337–3349.
- 87) Miura H, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circ Res*.1998;83:501–7.

- 88) Coats P, Johnston F, MacDonald J, i sur. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation*.2001;103:1702–8.
- 89) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*.1998;396:269–72.
- 90) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*.1994;368:850–3.
- 91) Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*.2003;81:1013–28.
- 92) Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*.2011;164:839–52.
- 93) Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney & blood pressure research*.2011;34:1-11.
- 94) Baudouin M, Meyer P, Worcel M: Specific binding of 3H-angiotensin II in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 42:4 34–440.
- 95) Devynck MA, Pernollet MG, Meyer P, Femandjian S, Fromageot P: Angiotensin receptors in smooth muscle cell membranes. *Nat New Biol* 1973; 245:55–58.
- 96) Tigerstedt R, Bergman PG: Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 1988; 8: 223.54.
- 97) Tobian L, Tombouljian A, Janecek J: The effect of high perfusion pressure on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 1959; 38: 605–610.
- 98) Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA: Arterial pressure regulation: overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 1972; 52:584–594.
- 99) Ohkubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S: Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2 196– 2200.
- 100) Skeggs LT, Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertension. *J Exp Med*. 1954; 99(3):275–282.

- 101) Hasimu B, Nakayama T, Mizutani Y, Izumi Y, Asai S, Soma M, Kokubun S, Ozawa Y: Haplotype analysis of the human renin gene and essential hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 308–312.
- 102) Kopkan L, Cervenka L: Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. *Physiol Res* 2009; 58(Suppl 2):S55–S67.
- 103) Wild J, Soehnlein O, Dietel B, Urschel K, Garlich CD, Cicha I. Rubbing salt into wounded endothelium: sodium potentiates proatherogenic effects of TNF- $\alpha$  under non-uniform shear stress. *Thromb Haemost.* 2014;112(1):183-95
- 104) Tikellis C1, Pickering RJ, Tsorotes D, Huet O, Chin-Dusting J, Cooper ME, Thomas MC. Activation of the Renin-Angiotensin system mediates the effects of dietary salt intake on atherogenesis in the apolipoprotein E knockout mouse. *Hypertension.* 2012;60(1):98-105.
- 105) Chamarthi B, Williams JS, Williams GH. A mechanism for salt-sensitive hypertension: abnormal dietary sodium-mediated vascular response to angiotensin-II. *J Hypertens.* 2010;28(5):1020-6.
- 106) Schiffrin EL. Correction of remodeling and function of small arteries in human hypertension by cilazapril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 27(suppl 2):S13–S18.
- 107) Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med* 2002;113:409-18
- 108) Iadecola C, Gorelick PB. Hypertension, angiotensin, and stroke: beyond blood pressure. *Stroke.* 2004;35:348–50.
- 109) Didion SP, Faraci FM. Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke.* 2003;34:2038–42.
- 110) Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomic SS.13BN rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(1):H188-95.
- 111) Drenjancevic-Peric I, Weinberg BD, Greene AS, Lombard JH. Restoration of cerebral vascular relaxation in renin congenic rats by introgression of the Dahl R renin gene. *Am J Hypertens.* 2010; 23(3):243-8.
- 112) 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 expression. *Am J Hypertens.* 2013;26(6):739-747.

- 113) Priestley JR, Buelow MW, McEwen ST, Weinberg BD, Delaney M, Balus SF i sur. Reduced angiotensin II levels cause generalized vascular dysfunction via oxidant stress in hamster cheek pouch arterioles. *Microvasc Res.* 2013;89:134-45.
- 114) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S i sur. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension.* 2001; 38: 1382–1387.
- 115) Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165: 196-203.
- 116) Murphy TJ, Takeuchi K, Alexander RW. Molecular cloning of AT1 angiotensin receptors. *Am J Hypertens.* 1992; 5: 236S-242S.
- 117) Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int.* 1996;49: 578–597.
- 118) Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 1998;83:1182–1191.
- 119) Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; 38(3 Pt 2):635-8.
- 120) Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2000;86: 1187–1189.
- 121) Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10:321–329.
- 122) Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000;101:1372–1378.
- 123) Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation.* 1996;94:2756–2767.
- 124) Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K i sur. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens.* 1999;17:537–545.
- 125) D. J. Reed. “Toxicity of oxygen” in *Molecular and Cellular Mechanisms of Toxicity*, F. De Matteis and L. L. Smith, Eds., 1995. pp. 35–68, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- 126) M. Younes. Free radicals and reactive oxygen species, in toxicology, ‘By H. Marguardt, *Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney.* *Kidney International.*, 1999; vol. 67, no. 4, pp. 1371–1380.



- 127) D. B. Marks, A. D. Marks, C. M. Smith. Oxygen metabolism and toxicity, in *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 1996; pp. 327–340, Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.
- 128) P. Kovacic, J. D. Jacintho. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*. 2001; vol. 8, no. 7, pp. 773–796.
- 129) Z. Ďuračková. Oxidants, antioxidants and redox stress, in *The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy*, Z. Ďuračková and S. Knasmüller, Eds., pp. 11–59, SAP, Bratislava, Slovakia, 2007.
- 130) Y. Liu, G. Fiskum, D. Schubert. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*. 2002; vol. 80, no. 5, pp. 780–787.
- 131) M. Inoue, E. F. Sato, M. Nishikawa i sur. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; vol. 10, no. 23, pp. 2495–2505.
- 132) M. Dvorakova, B. Höhler, R. Vollerthun, T. Fischbach, W. Kummer. Macrophages: a major source of cytochrome b558 in the rat carotid body. *Brain Research*. 2000. vol. 852, no. 2, pp. 349–354.
- 133) M. Geiszt, A. Kapus, K. Németh, L. Farkas, E. Ligeti. Regulation of capacitative  $Ca^{2+}$  influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; vol. 272, no. 42, pp. 26471–26478.
- 134) G. Cheng, Z. Cao, X. Xu, E. G. V. Meir, J. D. Lambeth. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5 . *Gene*. 2001; vol. 269, no. 1-2, pp. 131–140.
- 135) G. Dorsam, M. M. Taher, K. C. Valerie, N. B. Kuemmerle, J. C. Chan, R. C. Franson. Diphenyleneiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A(2) in rat mesangial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000; vol. 292, no. 1, pp. 271–279.
- 136) 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;45:687-691.
- 137) Z. Ďuračková. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*. 2010; vol. 59, no. 4, pp. 459–469.
- 138) Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64:97-112.

- 139) Packer L, Ed. *Methods in Enzymology*. 2002; Volume 349. San Diego, Calif: Academic Press.
- 140) Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cerebral Blood Flow Metabol*. 2001; 21: 2–14.
- 141) Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J i sur. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1131–1138.
- 142) Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res*. 2002; 91: 938–944.
- 143) Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998; 101: 2101–2111.
- 144) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1631–1639.
- 145) Stralin P, Kurlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 2032–2036.
- 146) Landmesser U, Merten R, Speikermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2000; 101: 2264–2270.
- 147) Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(1):H40-5.
- 148) Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2003; 60: 635–642.
- 149) Kondo T, Reaume AG, Huang T-T, Carlson E, Murakami K, Chen SF i sur. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1997; 17: 4180–4189.
- 150) Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM. Deficiency of copper-zinc superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy. *FASEB J*. 2003; 17: A63–A64.
- 151) MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL. Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radical Res*. 2001; 34: 325–336.

- 152) Suzuki K, Tatsumi H, Satoh S, Senda T, Nakata T, Fujii J, Taniguchi N. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: localization and mechanism of induction. *Am J Physiol.* 1993; 265: H1173–H1178.
- 153) Visner GA, Chesrown SE, Monnier J, Ryan US, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188: 453–462.
- 154) Ruetzler CA, Furuya K, Takeda H, Hallenbeck JM. Brain vessels normally undergo cyclic activation and inactivation: Evidence from tumor necrosis factor- $\alpha$ , heme oxygenase-1, and manganese superoxide dismutase immunostaining of vessels and perivascular brain cells. *J Cerebral Blood Flow Metabol.* 2001; 21: 244–252.
- 155) Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mugge A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension.* 1999; 33: 1243–1249.
- 156) 't Hoen PAC, Van der Lans CAC, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJC, Twisk J. Aorta of apoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circulation Res.* 2003; 93: 262–269.
- 157) Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C i sur. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res.* 2003; 40: 87–96.
- 158) Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z i sur. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation.* 2002; 106: 544–549
- 159) Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol.* 2001; 280: H2516–H2523.
- 160) Zanetti M, Sato J, Jost CJ, Gloviczki P, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Human Gene Therapy.* 2001; 12: 1407–1416.
- 161) Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation.* 2003; 107: 1053–1058.
- 162) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y i sur. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000; 404: 787–790.

- 163) Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984; 222: 649–655.
- 164) Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest.* 1996; 75: 617–636.
- 165) Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 239–249.
- 166) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999; 85: 23–28.
- 167) Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol Med.* 2002; 33:337–349.
- 168) Stralin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol.* 2001; 281: H1621–H1629.
- 169) Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biol Med.* 2003; 35: 236–256.
- 170) Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation.* 2001; 104: 1165–1170.
- 171) Davis ME, Cai H, McCann L, Fukai T, Harrison DG. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003; 284: H1449–1453.
- 172) Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973;179:588–590.
- 173) Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973;32:132–134.
- 174) Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem.* 1983;133:51–69.
- 175) Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clin Sci (Lond)* 2000;98:593–599.

- 176) Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs J.* 2008;275:3959–3970.
- 177) Trepanier G, Furling D, Puymirat J, Mirault ME. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience.* 1996;75:231–243.
- 178) Power JH, Blumbergs PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 2009;117:63–73.
- 179) Wang H, Cheng E, Brooke S, Chang P, Sapolsky R. Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults. *J Neurochem.* 2003;87:1527–1534.
- 180) Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* 1997;759:67–75.
- 181) Zámocký M., Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999;72, 19- 66.
- 182) Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. A preliminary note. *Science.* 1900;11, 701-702.
- 183) Deisseroth, A., Dounce, A. L. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 1970;50, 319-375.
- 184) Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN: Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996;87:1569–1599.
- 185) Mueller S, Riedel HD, Stremmel W: Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removing enzyme in human erythrocytes. *Blood.* 1997; 90:4973–4978.
- 186) Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch.* 2010; 48: 909-930.
- 187) Go'th L, Vitai M. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clin Chem.* 1996; 42:341–342.
- 188) Go'th L, Eaton J. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000;356:1820–1821.
- 189) Go'th L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clin Chem.* 2000; 46:564– 566.

- 190) Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS, et al. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13:294–300.
- 191) Bonini MG, Mason RP, Augusto O. The mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) diverts peroxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15:506–511.
- 192) Simonsen U, Christensen FH, Buus NH. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacol Ther.* 2009; 122:109–124.
- 193) Simonsen U, Rodriguez-Rodriguez R, Dalsgaard T, Buus NH, Stankevicius E. Novel approaches to improving endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilatation. *Pharmacol Rep.* 2009; 61:105–115.
- 194) Luo Z, Chen Y, Chen S, Welch W J., Andresen BT, Jose PA i sur. Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009;157, 935-943.
- 195) Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC i sur. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42:1632–1650.
- 196) Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm Rev.* 2008; 60:418–469.
- 197) Schiffrin EL. Effects of antihypertensive drugs on vascular remodeling: do they predict outcome in response to antihypertensive therapy? *Curr Opin Neph Hypertens.* 2001; 10:617–624.
- 198) Jagadeesha DK, Miller FJ Jr, Bhalla RC. Inhibition of Apoptotic Signaling and Neointimal Hyperplasia by Tempol and Nitric Oxide Synthase following Vascular Injury. *J Vasc Res.* 2009; 46:109–118.
- 199) Belin de Chantemele EJ, Vessieres E, Guihot AL, Toutain B, Maquignau M, Loufrani L i sur. Type 2 diabetes severely impairs structural and functional adaptation of rat resistance arteries to chronic changes in blood flow. *Cardiovasc Res.* 2009; 81:788–796.
- 200) Tong X, Ying J, Pimentel DR, Trucillo M, Adachi T, Cohen RA. High glucose oxidizes SERCA cysteine-674 and prevents inhibition by nitric oxide of smooth muscle cell migration. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44:361–369.
- 201) Virdis A, Duranti E, Taddei S. Review Article Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens.* 2011;2011:916310.

- 202) Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C719–41.
- 203) Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Review Article Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Dis Markers.* 2013;35(6):773-90.
- 204) Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;15; 83(12): 1643–1654.
- 205) 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.
- 206) Jelakovic B, Premuzic V, Skupnjak B, Reiner Z. Kuhinjska sol - skriveni otrov u svakodnevnoj hrani. *Liječnički vjesnik : glasilo Hrvatskog liječničkog zbora. Supplement.* 2009; 131:146-154.
- 207) He FJ, MacGregor GA. How far should salt intake be reduced? *Hypertension* 2003;42:1093–9.
- 208) WHO: The World Health Report 2002 – Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: WHO; 2003.
- 209) Zhu J, Huang T, Lombard JH. Effect of High-Salt Diet on Vascular Relaxation and Oxidative Stress in Mesenteric Resistance Arteries. *J Vasc Res* 2007; 44:382-390.
- 210) Durand MJ, raffia G, Weinberg BD, Lombard JH. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299:H1024-H1033.
- 211) McEwen ST, Schmidt JR, somber L, de la Cruz L, Lombard JH. Time-Course and Mechanisms of Restored Vascular Relaxation by Reduced Salt Intake and Angiotensin II Infusion in Rats Fed a High-Salt Diet. *Microcirculation.* 2009; 16(3):220-234.
- 212) Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 286:H575-H583.
- 213) Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Jul;279(1):H7-H14.

- 214) Luscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular " responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension* . 1987;9: 157-163
- 215) Zhu J, Drenjancevic-Peric I, McEwen S, Friesema J, Schulta D, Yu M, Roman RJ, Lombard JH. Role of superoxide and angiotensin II suppression in salt-induced changes in endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling and NO production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291: H929-H938.
- 216) Ying WZ, Aaron K, Sanders PW. Dietary salt activates an endothelial proline-rich tyrosine kinase 2/c-Src/phosphatidylinositol 3-kinase complex to promote endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Hypertension*. 2008;52: 1134-1141.
- 217) Ying WZ, Aaron KJ, Sanders PW. Transforming growth factor- $\beta$  regulates endothelial function during high salt intake in rats. *Hypertension* . 2013;62: 951-956.
- 218) Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt increases endothelial nitric oxide synthase and TGF- $\beta$ 1 in rat aortic endothelium. *Am J Physiol*. 1999;277: H1293-H1298.
- 219) Ying WZ, Sanders PW. Increased dietary salt activates rat aortic endothelium. *Hypertension*. 2002;39: 239-244.
- 220) Vital SA, Terao S, Nagai M, Granger DN. Mechanisms underlying the cerebral microvascular responses to angiotensin II-induced hypertension. *Microcirculation*. 2010; 17: 641-649.
- 221) Mattson DL, Higgins DJ. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* . 1996;27(part 2): 688-692.
- 222) Ni Z, Oveisi F, Vaziri ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *Hypertension*. 1999; 34: 552-557.
- 223) Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol*. 2002;543: 255-260.
- 224) Goto K, Kansui Y, Oniki H, Ohtsubo T, Matsumura K, Kitazono T. Upregulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor compensates for the loss of nitric oxide in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2012; 35: 849-854.
- 225) Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M. Excessive salt or cholesterol intake alters the balance among endothelium-derived factors released from renal arteries in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34: 533-539.



- 226) Boegehold MA. Effect of dietary salt on arteriolar nitric oxide in striated muscle of normotensive rats. *Am J Physiol.* 1993;264: H1810-H1816.
- 227) Boegehold MA. Flow-dependent arteriolar dilation in normotensive rats fed low- or high-salt diets. *Am J Physiol.* 1995;269: H1407-H1414.
- 228) Frisbee JC, Falck JR, Lombard JH. Contribution of cytochrome P-450 omega-hydroxylase to altered arteriolar reactivity with high-salt diet and hypertension. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol).* 2000;278: H1517- H1526.
- 229) Frisbee JC, Lombard JH. Development and reversibility of altered skeletal muscle arteriolar structure and reactivity with high salt diet and reduced renal mass hypertension. *Microcirculation.* 1999;6: 215-225.
- 230) Boegehold MA. Effect of salt-induced hypertension on microvascular pressures in skeletal muscle of Dahl rats. *Am J Physiol.* 1991;260: H1819- H1825.
- 231) Boegehold MA, Huffman LJ, Hedge GA. Peripheral vascular resistance and regional blood flows in hypertensive Dahl rats. *Am J Physiol.* 1991; 261: R934-R938.
- 232) Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. *J Vasc Res.* 2002;39: 41-50.
- 233) Friebel M, Klotz KF, Ley K, Gaehtgens P, Pries AR. Flow-dependent regulation of arteriolar diameter in rat skeletal muscle in situ: Role of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *J Physiol.* 1995;483(Pt 3): 715-726.
- 234) Lash JM, Bohlen HG. Time- and order-dependent changes in functional and NO-mediated dilation during exercise training. *J Appl Physiol.* 1997; 82: 460-468.
- 235) Nakamura T, Prewitt RL. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on arcade arterioles of rat spinotrapezius muscles. *Am J Physiol.* 1991; 261: H46- H52.
- 236) Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High dietary salt alters arteriolar myogenic responsiveness in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1998;275: H2095-H2104.
- 237) Nurkiewicz TR, Wu G, Li P, Boegehold MA. Decreased arteriolar tetrahydrobiopterin is linked to superoxide generation from nitric oxide synthase in mice fed high salt. *Microcirculation.* 2010;17: 147-157.
- 238) Liu Y, Rusch NJ, Lombard JH. Loss of endothelium and receptor-mediated dilation in pial arterioles of rats fed a short-term high salt diet. *Hypertension.* 1999;33: 686-688.
- 239) McEwen ST, Balus SF, Durand MJ, Lombard JH. Angiotensin II maintains cerebral vascular relaxation via EGF receptor transactivation and ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H1296-H1303.

- 240) Sylvester FA, Stepp DW, Frisbee JC, Lombard JH. High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: H353-H363.
- 241) Raffai G, Durand MJ, Lombard JH. Acute and chronic angiotensin- (1-7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301: H1341- H1352.
- 242) Frisbee JC, Lombard JH. Chronic elevations in salt intake and reduced renal mass hypertension compromise mechanisms of arteriolar dilation. *Microvasc Res*. 1998; 56: 218-227.
- 243) Frisbee JC, Lombard JH. Acute elevations in salt intake and reduced renal mass hypertension compromise arteriolar dilation in rat cremaster muscle. *Microvasc Res*. 1999; 57: 273-283.
- 244) Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320: 454-456.
- 245) Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*. 1993;18: 195-199.
- 246) Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986; 250: H822- H827.
- 247) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research* . 2000;87: 840-844.
- 248) Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: R1014-R1030.
- 249) Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High salt intake reduces endotheliumdependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292: R1550-R1556.
- 250) Bondarenko A, Panasiuk O, Stepanenko L, Goswami N, Sagach V. Reduced hyperpolarization of endothelial cells following high dietary Na<sup>+</sup>. Effects of enalapril and tempol. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39: 608-613.
- 251) Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* . 2004;44: 381-386.
- 252) Raffai G, Durand MJ, Lombard JH. Acute and chronic angiotensin- (1-7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301: H1341- H1352.

- 253) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:5510–5514.
- 254) Crews ST . Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*. 1998; 12:607– 620.
- 255) Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarkis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-5684.
- 256) Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 32253-32259.
- 257) Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia – inducible factor-1. *Biol Chem* 1997; 378: 609-616.
- 258) Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268: 21513-21518.
- 259) Metzén E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klingler M. Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003; 116: 1319-1326.
- 260) Shih SC, Claffey KP. Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 347-357.
- 261) Li N, Chen L, Yi F, Xia M, Li PL. Salt-Sensitive Hypertension Induced by Deletion of Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$  in the Renal Medulla. *Circ Res*. 2008;102:1101–8.
- 262) Shane A, Phillips, E. B. Olson, Julian H. Lombard, Barbara J. Morgan . Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries *Journal of Applied Physiology* . 2006 ; Vol. 100 no. 4, 1117-1123.
- 263) Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjančević I . Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats - potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diabetes & Vascular Disease Research*. 2015;12; 33-45.
- 264) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.

- 265) Hyung-Ran K, Anbok L, Eun-Jeong C, Jeong-Hae K, Woosung L, Hyeon Kook L i sur. Attenuation of Experimental Colitis in Glutathione Peroxidase 1 and Catalase Double Knockout Mice through Enhancing Regulatory T Cell Function. PLoS ONE. 2014; 9(4): e95332.
- 266) Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA i sur. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. Nature. 2013; vol doi:10.1038/nature11868
- 267) Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. Fertil Steril. 2009 Aug;92(2):819-27.
- 268) Meszaros G, Szalay B, Toldi G, Kaposi A, Vas B, Treszl A. TECHNICAL BRIEF, Kinetic Measurements Using Flow Cytometry: New Methods for Monitoring Intracellular Processes. Assay Drug Dev Technol. 2012; 10(1): 97–104.
- 269) Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aquat Toxicol. 2003; 63:447–463.
- 270) Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239: 70–76.
- 271) Moreira MC, da Silva EF, Silveira LL, de Paiva YB, de Castro CH, Freiria-Oliveira AH i sur. High sodium intake during postnatal phases induces an increase in arterial blood pressure in adult rats. Br J Nutr. 2014;112(12):1923-32.
- 272) Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse Cardiovascular Effects of Acute Salt Loading in Young Normotensive Individuals. Hypertension 2008; 51:1525-1530.
- 273) Starmans-Kool MJ, Stanton AV, Xu YY, McGThom CA, Parker KH, Hughes AD. High dietary salt intake increases carotid blood pressure and wave reflection in normotensive healthy young men. J Appl Physiol 2011; 110:468-471.
- 274) Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, Seric V, Mihaljevic I, Drenjancevic I. The role of cyclooxygenase-1 in high salt diet- induced microvascular dysfunction in humans. The Journal of Physiology. 2015 DOI: 10.1113/JP271631 (e-published ahead of print)
- 275) Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. J Clin Hypertens (Greenwich) 2002; 4(4):274-6.

- 276) Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH, Phillips SA, Drenjancevic, Ines. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A2(TXA2) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney & blood pressure research* . 2013;37:432-442.
- 277) Vollmer WM, Sacks FM, Ard J i sur. DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects of diet and sodium intake on blood pressure: subgroup analysis of the DASH-Sodium trial. *Ann Intern Med*. 2001; 135:1019-1028.
- 278) Coyle P. Different Susceptibilities to Cerebral Infarction in Spontaneously Hypertensive (SHR) and Normotensive Sprague-Dawley Rats. *Stroke*. 1986;Vol 17, No 3.
- 279) Crimi E, Ignarro LJ , Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res*.2007; 41:1364-1375.
- 280) Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2000;48:13-22.
- 281) Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001. 281:L529-533.
- 282) Bulloch JM, Daly CJ. Autonomic nerves and perivascular fat: interactive mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2014;143(1):61-73.
- 283) Belikov AV, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci*. 2015; 22(1):85.
- 284) Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989; 257:H33–37.
- 285) Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J i sur. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005; 23: 233–246.
- 286) Okahara K, Sun B, Kambayashi J. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.1998;18:1922–6.
- 287) Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*. 2007;49(3):590-6.
- 288) Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):894-912.

- 289) Wang W and Diamond SL. Does elevated nitric oxide production enhance the release of prostacyclin from shear stressed aortic endothelial cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233:748–51.
- 290) Matrougui K, Loufrani L, Lévy BI, Henrion D. High NaCl intake decreases both flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone in resistance arteries from normotensive rats: involvement of cyclooxygenase-2. *Pharmacol Toxicol.* 2001;89(4):183-7.
- 291) Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens.* 2001;14(2):155-63.
- 292) Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem.* 1997, 272:18515-18517
- 293) Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta.* 1982;710(2):197-211.
- 294) Li N, Yi F, dos Santos EA, Donley DK, Li PL. Role of renal medullary heme oxygenase in the regulation of pressure natriuresis and arterial blood pressure. *Hypertension.* 2007; 49(1):148-54.
- 295) Kaewpila S, Venkataraman S, Buettner GR, Oberley LW. Manganese Superoxide Dismutase Modulates Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Induction via Superoxide. *Cancer Res.* 2008;68(8): 2781–2788.
- 296) Autheman D, Sheldon RA, Chaudhuri N, von Arx S, Siegenthaler C, Ferriero DM, Christen S. Glutathione peroxidase overexpression causes aberrant ERK activation in neonatal mouse cortex after hypoxic preconditioning. *Pediatr Res.* 2012;72(6):568-75.
- 297) Wang M, Kirk JS, Venkataraman S, Domann FE, Zhang HJ, Schafer FQ i sur. Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor. *Oncogene.* 2005;24(55):8154-66.
- 298) Kleinewietfeld M1, Manzel A, Titze J, Kvakon H, Yosef N, Linker RA, Muller DN & Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature.* 2013;496(7446):518-522.
- 299) Hernandez AL, Kitz A, Wu C, Lowther DE, Rodriguez DM, Vudattu N i sur. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2015; 125(11):4212-4222.

- 300) Cemerski S, Cantagrel A, Van Meerwijk JP & Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19585-19593.
- 301) Amico D, Spadoni T, Rovinelli M, Serafini M, D'Amico G, Campelli N, Svegliati Baroni S & Gabrielli A. Intracellular free radical production by peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis: role of NADPH oxidase and ERK1/2. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17:68.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Anita Ćosić, mag. ing. proc.**

Datum rođenja: 30. lipnja 1986.

Adresa: Zagrebačka 26, 31220 Višnjevac, Hrvatska

Email adresa: [anita.cosic@mefos.hr](mailto:anita.cosic@mefos.hr)

Matični broj znanstvenika: 326344

### **Obrazovanje:**

- listopad 2004. - srpanj 2009.: Prehrambeno – tehnološki fakultet, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku
- 2010.: Pedagoško – psihološka izobrazba, Filozofski fakultet Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku
- siječanj 2011. – do danas: Poslijediplomski studij *Biomedicina i zdravstvo*, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### **Radno iskustvo:**

- travanj 2010. – listopad 2010. : OŠ Grigor Vitez (biologija i kemija)
- siječanj 2011. - do danas: asistentica na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- studeni 2011. - do danas: vanjska suradnica u naslovnom suradničkom zvanju asistenta na predmetu *Fiziologija s patofiziologijom* na Studiju fizioterapije Veleučilišta Lavoslava Ružičke u Vukovaru
- ožujak 2013. – svibanj 2013.: Medicinska škola Osijek (Medicinska hematologija-vježbe)

### **Tečajevi trajnoga usavršavanja:**

- 15.4.2011. - Training in Transgenic Research Methodology in Biomedicine and Biotechnology (project CABCOS). Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
- 16.06.2011. - Radionica: „Ergonomija za stručnjake u medicini rada i rehabilitaciji“ , Medicinski fakultet Osijek
- 29.06.2011. - Radionica: „Kako sveučilišta mogu poboljšati zapošljivost osoba s invaliditetom“ ,



Medicinski fakultet Osijek

- rujan – prosinac 2011. Pečuh, Mađarska – Erasmus program Department of Immunology and biotechnology, School of Medicine Pecs, University Pecs, Hungary Real time PCR
- 7.11.2011. – 9.11.2011- Applied Biosystems, Biotechnology and real time PCR, Osijek, Hrvatska
- 10.12.2011.–Tečaj DL-101 Osnovni tečaj o intelektualnom vlasništvu, WIPO (World Intellectual Property Organisation) program, online tečaj
- 10.-14.12.2012. - Laboratory immunetechniques in molecular biology research, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska
- 11.-15.2.2013. - Developmental biology of peripheral lymphoid tissues – crossroad between immunology and embryology, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska
- 2014. Osposobljavanje laboratorijskim životinjama, kategorija C, Veterinarski fakultet, Zagreb

**Strani jezici:** engleski jezik – aktivno

**Stipendije i nagrade:**

- Erasmus stipendija 2011; 2016
- Stipendija Interuniverzitetskog centra Dubrovnik 2011 za sudjelovanje na 11th EFCC Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry
- Nagrada za oralnu prezentaciju na 1st Int Doct Workshop u Pečuhu, 2012
- Stipendija za sudjelovanje na Hypertension 2014, Atena, Grčka
- Stipendija za sudjelovanje na FEPS2014, Budimpešta, Mađarska

**Aktivnost u znanstvenim projektima:**

- Djelovanje kisika na vaskularnu funkciju u zdravlju i bolesti, broj projekta: 219-2160133-2034, Ministarstvo Znanosti, Obrazovanja i Športa Republike Hrvatske, voditelj projekta: Ines Drenjančević.
- Suradnik na projektu “HEALTH IMPULSE” – Health IMproving poPULation initiative reSEarch - Improving the health of the border population: a joint initiative in immunological research HUHR/1001/2.1.3/0006, IPA Hungary - Croatia cross border project, voditeljica: Ines Drenjančević
- IPA Mađarska-Hrvatska projekt prekogranične suradnje Health impulse (istraživač)

- UNIOS projekt: "Visfatin i proaterogeni procesi u masnom tkivu dječje dobi", voditelj projekta: Kristina Selthofer-Relatić
- Znanstvenog centra izvrsnosti Proizvodnja i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane (MedResFF) (istraživač)
- HRZZ projekt „Poremećena vazorelaksacija i endotelno - leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ # IP-2014-09-6380 (istraživač)

**Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:**

1. Cosic, Anita; Jukic, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljevic, Zrinka; Novak, Sanja; Vukovic, Rosemary; Ines Drenjancevic. 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 2016, doi: 10.1113/JP272297 (prihvaćen za publikaciju)
2. 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
3. Čavka, Ana; Stupin, Marko; Pandurić, Ana; Plazibat, Ana; Ćosić, Anita; Rašić, Lidija; Debeljak, Željko; Martinović, Goran; Drenjančević, Ines. Adrenergic System Activation Mediates Changes in Cardiovascular and Psychomotoric Reactions in Young Individuals after Red Bull© Energy Drink Consumption. // International Journal of Endocrinology. 2015 (2015)
4. Kibel, Aleksandar; Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Falck, John R.; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats - potential role of epoxyeicosatrienoic acids. // Diabetes & Vascular Disease Research. 12 (2015) ; 33-45
5. Čavka, Ana; Ćosić, Anita; Grizelj, Ivana; Koller, Akos; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H.; Phillips, Shane A.; Drenjančević, Ines. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A2(TXA2) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. // Kidney & blood pressure research. 37 (2013) , 4/5; 432-442
6. Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Kibel, Dijana; Šerić, Vatroslav; Ćosić, Anita. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats

exposed to acute hyperbaric oxygenation. // Undersea & hyperbaric medicine. 40 (2013) , 4; 319-328

7. Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Ćosić, Anita; Falck, John R.; Drenjančević, Ines. Effects of hyperbaric oxygenation on vascular reactivity to angiotensin II and angiotensin-(1-7) in rats. // Undersea & hyperbaric medicine. 39 (2012) , 6; 1053-1066

8. Novak, Sanja; Divkovic, Dalibor; Drenjancevic, Ines; Cosic, Anita; Selthofer-Relatic, Kristina. Visfatin serum level and expression in subcutaneous and visceral adipose tissue in prepubertal boys. // Pediatric Obesity. (2015) (prihvaćen za publikaciju)

#### **Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

1. Divković, Dalibor; Selthofer-Relatić, Kristina; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines; Kristek, Jozo; Radić, Radivoje. Serum visfatin concentration in eutrophic and overweight/obese male children in early childhood. // Periodicum biologorum. 116 (2014) , 1; 101-106

2. Palenkić, Hrvoje; Bačun, Tatjana; Ćosić, Anita; Lovričević, Ivo; DeSyo, Drago; Drenjančević, Ines. Serum Levels of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in early postoperative period and three months after eversion carotid endarterectomy.. // Medicinski glasnik Ljekarske komore Zeničko-dobojskog kantona. 11 (2014.) , 2; 313-319

3. Višević, R; Mihalj, M; Novak, S; Ćosić, A; Žulj, M; Unfirer, S; Drenjančević, Ines. Basic mechanisms and manifestations of endothelial dysfunction in autoimmune diseases. // Medicinski vjesnik. 44 (2012) ; 1-4

#### **Kongresno priopćenje (sažetci) u CC časopisima:**

1. Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. Acute salt loading affects vascular function without significant change in body fluid status and body composition in young healthy women // Journal of Hypertension Volume 33, Suppl.1. 2015.

2. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Role of Tempol on the level of oxidative stress and gene expression in high salt diet fed Sprague-Dawley rats // 25th European Meeting on Hypertension and

Cardiovascular Protection : abstracts ; u: Journal of hypertension 33 (2015) (S1) ; PP.41.25. 2015. e506-e507

3. Mihalj, Martina; Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. Short term high salt diet suppresses t cell activation and Treg expansion in Sprague- Dawley rats // Journal of Vascular Research 52(suppl 1):1-88 / Rossi, Marco ; Koller, Akos ; Dulak, Jozef, editor(s). Karger, 2015. 44-44

4. Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Unfirer, Sanela; Drenjančević, Ines. Hyperbaric oxygenation tretment modulates gene expression in aortas of healthy and diabetic male Sprague Dawley rats // Journal of Vascular Research 52(suppl 1):1-88 / Rossi, Marco ; Koller, Akos ; Dulak, Jozef, editor(s). Karger, 2015. 45-46

5. Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Kralik, Zlata; Kralik, Gordana; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Effect of omega-3 enriched food on oxidative stress levels in young healthy men // Journal of Hypertension Volume 33, Suppl.1. 2015. e147-e148

6. Stupin, Marko; Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. The effects of chronic exercise on body composition, hemodynamic parameters and microvascular reactivity in young healthy men // Journal of Hypertension Volume 33, Suppl.1. 2015. e149-e150

7. Cavka, Ana; Stupin, Marko; Rasic, Lidija; Cosic, Anita; Izakovic, Kresimir; Drenjancevic, Ines. Impact of acute exercise on microvascular reactivity in healthy sedentary subjects and trained rowers: possible role of blood pressure increase during exercise // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book. 2014. e641

8. Cosic, Anita; Novak, Sanja; Cavka, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljevic, Zrinka; Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Drenjancevic, Ines. Influence of high salt diet on hif-1 alpha and antioxidative enzymes mrna expression in blood vessels of young male Sprague-Dawley rats // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book. 2014. e519

9. Čavka, Ana; Novak, Sanja; Mihaljević, Zrinka; Grizelj, Ivana; Ćosić, Anita; Lončarić, Zdenko; Popović, Brigita; Drenjančević, Ines. Reduced dietary zinc and selenium levels impairs vascular function via oxidative stress in Sprague-Dawley rats aortas // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 51-S4-E6

10. Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Dijana; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. The effect of hyperbaric therapy on the levels of oxidative stress // *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 166-P12.3
11. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Adipocytokines and inflammation as a link between obesity and related endothelial dysfunction // *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 130-P9.10
12. Lončarić, Zdenko; Drenjančević, Ines; Popović, Brigita; Karalić, Krunoslav; Ivezić, Vladimir; Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Singh, Bal Ram. Increasing selenium concentration in animal tissues by wheat agrofortification // *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 140-P9-35
13. Novak, Sanja; Cosic, Anita; Mihalj, Martina; Jelakovic, Bojan; Tolusic Levak, Maja; Orsic Fric, Vlasta; Mogus, Mate; Zibar, Lada; Drenjancevic, Ines. Location and mRNA expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in kidneys of female Sprague-Dawley rats one year after unilateral nephrectomy // *Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book*. 2014. e265
14. Novak, Sanja; Divković, Dalibor; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines; Selthofer-Relatić, Kristina. Correlation of visfatin mRNA expression in subcutaneous adipose tissue with anthropometrical measures and biochemical parameters of youth male // *Acta Physiologica* Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 135-P9.23
15. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Koller, Akos; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Phillips, Shane A; Drenjancevic, Ines. The Effects of AT1 Receptor Blockade on Skin Microcirculatory Blood Flow and Thromboxane A2 (TXA2) Production in Young Healthy Women // *The FASEB Journal* 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald, editor(s). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.14
16. Čavka, Ana; Ćosić, Anita; Rašić, Lidija; Grizelj, Ivana; Jelaković, Bojan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2 derived prostaglandins alters microvascular reactivity during high salt loading in young healthy humans // 23rd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection (ESH2013) : abstracts ; u: *Journal of*

**Kongresno priopćenje (sažetci) u ostalim časopisima:**

1. Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Lenasi, Helena; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. Short-term high salt diet impairs microvascular endothelial function in young healthy salt-resistant women // Journal of Vascular Research 52(suppl 1):1-88 / Rossi, Marco ; Koller, Akos ; Dulak, Jozef, editor(s). Karger, 2015. 63
2. Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Čavka, Ana; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Mechanisms of vascular responses to changes in flow in cerebral resistance arteries of healthy Sprague-Dawley rats // Journal of Vascular Research 52(suppl 1):1-88 / Rossi, Marco ; Koller, Akos ; Dulak, Jozef, editor(s). Karger, 2015. 72-73
3. Stupin, Marko; Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Lenasi, Helena; Drenjančević, Ines. Acute exhausting exercise session affects microvascular endothelial function in young healthy athletes // Journal of Vascular Research 52(suppl 1):1-88 / Rossi, Marco ; Koller, Akos ; Dulak, Jozef, editor(s). Karger, 2015. 72
4. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Alteration of vasorelaxation in response to reduced pO<sub>2</sub> in aortas of diabetic rats - effects of hyperbaric oxygenation // Proceedings of The Physiological Society 31. PCB175
5. Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Altered aortic reactivity by diabetes mellitus in ovariectomized rats: role of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) // Proceedings of The Physiological Society 31. 2014. C66
6. Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Effect of high salt diet on expression of antioxidative enzymes, hypoxia inducible factor 1 alpha and cyclooxygenase 1 and 2 in blood vessels of Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society 31. 2014. PCB177

7. Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Mechanism of flow-induced dilation of middle cerebral arteries in diabetic Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society 31. 2014.
8. Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Loncaric, Zdenko; Popovic, Brigita; Drenjancevic, Ines. Effects of dietary zinc and selenium on vascular responses to acetylcholine and reduced pO<sub>2</sub> in aortic rings of male Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCD377
9. Cosic, Anita; Cavka, Ana; Rasic, Lidija; Drenjancevic, Ines. Does oxidative stress has effect on microvascular reactivity in young healthy individuals? // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCD372
10. Cosic, Anita; Novak, Sanja; Cavka, Ana; Popovic, Brigita; Loncaric, Zdenko; Drenjancevic, Ines. Effect of variable selenium and zinc food content on the level of oxidative stress in Sprague-Dawley rats // Periodicum Biologorum, Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines, editor(s). Zagreb, 2013. 21
11. Drenjančević, Ines; Kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlović, Dragan; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradžiković, Ivana. Hyperbaric oxygenation - the role of EETs // 3. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of The Physiological Societies : abstracts ; u: Periodicum Biologorum 115 (2013) (S2) / Vitale, Branko ; Drenjančević, Ines, editor(s). Zagreb, 2013. 26-26
12. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses of middle cerebral arteries to flow-induced dilation of ovariectomized Sprague-Dawley rats // Periodicum biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko ; Drenjancevic, Ines, editor(s). Zagreb, 2013.
13. Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses to acetylcholine- and hypoxia-induced dilation of diabetic ovariectomized rats // Biopolymers & Cell 2013. Vol. 29. N2 supplementary 1-100 / El'Skaya, Anna V, editor(s). Kijev, Ukrajina, 2013. 56-56
14. Ivic, Ivan; Novak, Sanja; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Loncaric, Zdenko; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Altered vascular response to acetylcholine and reduced pO<sub>2</sub>

in isolated carotid arteries in rats fed by chow containing varied zinc and selenium content // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCC398

15. Dumančić, Dijana; Kibel, Aleksandar; Šerić, Vatroslav; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. Immediate effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure, acid-base and blood gas status and parameters of oxidative stress in healthy male rats // Physiology 2012 : Poster Communications ; u: Proceedings of The Physiological Society 27 (2012) ; PC157. London, 2012.

16. Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Ćosić, Anita; Falck, J.R.; Drenjančević, Ines. Modulation of aortic reactivity to angiotensin-(1- 7) with intermittent hyperbaric oxygenation in diabetic rats // Physiology 2012 : Poster Communications ; u: Proceedings of The Physiological Society 27 (2012) ; PC177. London, 2012.

#### **Sažetci u zbornicima skupova:**

1. Ćosić, Anita; Davidović Cvetko, Erna; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. Changes in baseline flow-induced dilation response and interdependence of gene expression caused by the high salt intake in Sprague- Dawley rats // 79th meeting of the Hungarian Physiological Society and the Annual Meeting of the Hungarian Microcirculatory and Vascular Biology Society : Abstract Book. 2015. 136-137

2. Ćosić, Anita; Grizelj, Ivana; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Increased oxidative stress upon high salt diet impaires flow-induced dilation in Sprague- Dawley rats // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 22

3. Davidović Cvetko, Erna; Milas Ahić, Jasminka; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. Nutritional NaCl intake and bone remodeling in young healthy people // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 24

4. Stupin, Marko; Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. Microvascular reactivity in healthy sedentary subjects and trained rowers before and after exposure to acute exhausting rowing training // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 10



5. Divković, Dalibor; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines; Selthofer-Relatić, Kristina. Serum concentration of visfatin and mRNA visfatin expression in adipose tissue in preadolescent boy // . 6. Hrvatski kongres o debljini s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik
6. Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines. High dietary salt intake impairs vascular reactivity in both micro- and macrocirculation in young healthy individuals // 65th SIF National Congress Book of Abstracts. 2014. 31
7. Čavka, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Grizelj, Ivana; Jelaković, Bojan; Phillips, Shane A.; Drenjančević, Ines. Acute high salt intake is associated with impaired micro- and macrovascular reactivity in young healthy individuals // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 2014. 23-23
8. Kibel, Aleksandar; Novak, Sanja; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Čavka, Ana; Kibel, Dijana; Drenjančević, Ines. Evaluation of vascular responses to angiotensin ii and angiotensin-(1-7) after hyperbaric oxygenation and the role of epoxyeicosatrienoic acids // Third International Symposium on Hypertension ISHOP3 Abstract Book. 2014. 5
9. Mihalj, Martina; Cosic, Anita; Bilonić, Sandra; Zulj, Marinko; Drenjančević, Ines; Včev, Aleksandar; Barbić, Jerko. Self-perceived competency in transferable skills of PhD students at Medical Faculty Osijek, Croatia // Abstract book. 2014. 34-34
10. Ćosić, Anita; Mihalj, Martina; Včev, Aleksandar; Bilonić, Sandra; Barbić, Jerko; Drenjančević, Ines. Compliance with ORPHEUS standards at one Croatian school – student's prospective // ORPHEUS conference book. 2013.
11. Ćosić, Anita; Talapko, Jasminka; Drenjančević, Domagoj. Molecular diagnosis of viral hepatitis // Knjiga sažetaka: Krvlju prenosive bolesti- prevencija, dijagnostika, liječnje / Mirjana Stupnišek, editor(s). Zagreb, studeni 2013. : Hrvatska laboratorijska udruga - HLU, 2013. 2
12. Mihalj, Martina; Ćosić, Anita; Drenjančević, Ines; Bilonić, Sandra; Včev, Aleksandra. Implementation of ORPHEUS standards in PhD program of biomedicine and health at the Faculty of Medicine Osijek, Croatia // ORPHEUS conference book. 2013.
13. Ćosić, Anita; Kibel, Aleksandar; Čavka, Ana; Drenjančević, Ines. Oxidative stress in Sprague-Dawley healthy rats that underwent hyperbaric oxygenation // 1st International

Doctoral Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS/UP) : Book of Abstracts. Pečuh, 2012. 18-19

14. Novak, Sanja; Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Aleksandar; Drenjančević, Ines. Influence of hyperbaric oxygen treatment on vascular gene expression in healthy Sprague-Dawley rats // 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences of the University of Pécs (1st IDWoNS/UP) : book of abstracts. Pečuh, Mađarska, 2012. 30-31

15. Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Mihalj, Martina; Novak, Sanja; Dujić, Željko; Ćavar, Ivan; Drenjančević, Ines. Students' evaluation and satisfaction with physiology course at medical faculties in Croatia and Bosnia and Herzegovina // Book of abstracts AMEE 2011.

#### **Pasivno sudjelovanje na znanstvenim skupovima:**

1. II. Hrvatski simpozij prediktivne medicine s međunarodnim sudjelovanjem: Uloga laboratorijske medicine u prediktivnoj medicini: onkološke bolesti“. Zagreb, Hrvatska, 2011.

2. Congress of Croatian society of medical biochemists: 2. Croatia symposium of predictive medicine with international attendance: Role of laboratory medicine in predictive medicine: oncology diseases. Dubrovnik, Hrvatska, 2012.

#### **Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:**

1. Hrvatsko društvo fiziologa
2. Hrvatsko društvo za hipertenziju
3. The Physiological Society (UK)