

# Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi Sprague Dawley štakora

---

Planinac, Jovana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:989005>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Jovana Planinac**

**Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na  
razinu staničnog oksidativnog stresa kod  
mononuklearnih stanica periferne krvi  
Sprague Dawley štakora**

**Završni rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Jovana Planinac**

**Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na  
razinu staničnog oksidativnog stresa kod  
mononuklearnih stanica periferne krvi  
Sprague Dawley štakora**

**Završni rad**

**Osijek, 2015**

Rad je ostvaren u Medicinskom fakultetu Osijek, Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

Mentor rada doc.dr.sc. Martina Mihalj

Rad ima 42 lista i 21 sliku.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Martini Mihalj na stručnoj i moralnoj podršci te pomoći tijekom istraživanja i izrade završnog rada. Zahvaljujem se Sanji Novak i Aniti Ćosić na trudu, strpljenju i korisnim savjetima tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Unos soli, kardiovaskularne bolesti i rizici .....	1
1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav .....	1
1.3. Hipertenzija i kardiovaskularne bolesti pogoduju razvoju ateroskleroze.....	2
1.4. Oksidativni stres i izvor reaktivnih kiskovih spojeva u tkivima .....	3
1.5. Antioksidatini mehanizmi.....	4
1.6. Oksidativni stres i imunološki odgovor.....	5
2. HIPOTEZA .....	6
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE .....	8
4.1. Animalni model visokog unosa soli .....	8
4.2. Metode.....	9
5. REZULTATI.....	12
6. RASPRAVA.....	35
7. ZAKLJUČAK .....	38
8. SAŽETAK.....	39
9. SUMMARY .....	40
10. LITERATURA.....	41
11. ŽIVOTOPIS .....	42

## I. POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz eksperimentalnih grupa

Slika 2. Tjelesna težina životinja u pojedinim ispitivanim skupinama

Slika 3. Antioksidativni kapacitet plazme je određen indirektno mjerenjem sposobnosti plazme da reducira željezo (FRAP)

Slika 4. Razina oksidativnog stresa u plazmi određena je mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS)

Slika 5. Primjer analize mjerenja razine oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u različitim stanicama periferne krvi štakora

Slika 6. Primjer analize mjerenja razine oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora

Slika 7. Primjer analize mjerenja razine oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora

Slika 8. Primjer analize mjerenja razine oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz slezene štakora.

Slika 9. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u monocitima periferne krvi štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 10. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima periferene krvi štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 11. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u granulocitima periferene krvi štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 12. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz mezenteričkih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 13. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 14. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz slezene štakora prije i nakon PMA stimulacije.

Slika 15. Primjer analize mjerenja ekspresije integrina LFA-1 na leukocitima periferne krvi štakora protočnom citometrijom

Slika 16. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima periferne krvi štakora

Slika 17. Ekspresija integrina LFA-1 na monocitima periferne krvi štakora

Slika 18. Ekspresija integrina LFA-1 na granulocitima periferne krvi štakora

Slika 19. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima mezenteričkih limfnih čvorova štakora

Slika 20. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima perifernih limfnih čvorova štakora

Slika 21. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima slezene štakora



## II. POPIS KRATICA

ROS - reaktivne vrste kisika (od *engl.* Reactive Oxygen Species)

DCF-DA-2',7'- diklorodihidrofluorescein diacetat

DHE - dihidroetidij

FRAP - sposobnosti plazme da reducira željezo (od *engl.* Ferric reducing ability of plasma).

TBARS - reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (od *engl.* Thiobarbituric acid reactive substances)

LFA-1- leukocitni funkcijski antigen-1 (*eng.* Lymphocyte function-associated antigen 1)

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (od *eng.* Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

SOD - superoksid dismutaza

HSD – dijeta s visokim udjelom soli (od *engl.* High salt diet)

HBO2 – hiperbarična oksigenacija

IL-1 - interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

TNF $\alpha$  – tumorski nekrotizirajući čimbenik alfa

## 1. UVOD

### *1.1. Unos soli, kardiovaskularne bolesti i rizici*

Kuhinjska sol je važan čimbenik rizika za hipertenziju i pridonosi povećanju ukupnog kardiovaskularnog rizika. Povećani unos soli u ljudskom organizmu pokreće brojne prilagodbene mehanizme za izlučivanje njegovog viška. Evolucijske studije su pokazale da je ljudska vrsta milijunima godina uzimala hranu <1 g soli dnevno, a namjerno dodavanje soli u hranu je započelo tek prije 5.000 – 10.000 godina što, u slučaju prekomjernog unosa, danas snažno povezujemo s porastom arterijskog tlaka. Dnevna potreba organizma za soli je 5 g na dan, ali ta se granica često prelazi. 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. SZO-je je objavila rezultate koji govore da su kronične nezarazne bolesti, u koje ubrajamo arterijsku hipertenziju, dijabetes, debljinu, srčane, bubrežne i plućne bolesti te rak, odgovorne za 86% preuranjenih smrtnih slučajeva u Europi. Prekomjerni unos soli je neposredni i/ili posredni čimbenik rizika za pojavu svih navedenih bolesti. Kada bi se unos soli sveo na preporučene vrijednosti, spriječilo bi se oko 2,5 milijuna smrti godišnje na svijetu (WHO, 2006.) 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 sa ciljem da menze, vrtići, škole nude hranu s manje soli, ali i šećera i masnoće. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, s hipertenzijom koja je vodeći faktor rizika. Te bolesti zahvaćaju više od 600 milijuna ljudi, procjenjuje se da će do 2025. godine 29 % ljudske populacije patiti od hipertenzije. Iako, treba naglasiti da su u patofiziologiji kardiovaskularnih bolesti upleteni višestruki biološki putevi i prema tome se rizik od budućnosti kardiovaskularnih oboljenja ne može procijeniti iz samo jednog markera.[5]

### *1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav*

Dokazano je da dijeta s visokim udjelom soli rezultira značajnim porastom arterijskog tlaka te se ove promjene dovode u izravnu vezu s porastom reaktivnih vrsta kisika (ROS-a).

Povećan unos soli hranom potiskuje renin angiotenzinski sustav (RAS) i poznat je čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prijašnje studije su pokazale da supresija RAS-a slanom hranom dovodi do poremećene o endotelu ovisne dilatacije zbog povećanog oksidativnog stresa i promjene u stvaranju vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline. Zanimljivo je, da su dosadašnje studije pokazale da i angiotenzin II, također, potiče stvaranje oksidativnog stresa u središnjem živčanom sustavu i endotelnim stanicama stimulacijom aktivacije NAD(P)H oksidaze, ksantin oksidaze i ciklooksigenaze (COX-1,2) što rezultira porastom krvnog tlaka i razvojem hipertenzije. NAD(P)H ima vodeću ulogu u proizvodnji ROS-a koji dovode do povišenog krvnog tlaka. ROS reagiraju s dušičnim monoksidom (NO), ključnim medijatorom vazodilatacije, stvarajući izuzetno toksične spojeve peroksinitrite (ONOO-) što vodi ka već spomenutom poremećaju krvožilne reaktivnosti.

### ***1.3. Hipertenzija i kardiovaskularne bolesti pogoduju razvoju ateroskleroze***

Osnovna patološka promjena u podlozi kardiovaskularnih bolesti je ateroskleroza, koja je karakterizirana upalom i proliferacijom stanica u stijenci krvnih žila što rezultira postepenim suženjem arterije odnosno njezinim začepljenjem.

Oksidativni stres predstavlja zajednički mehanizam ozljeda mnogih vrsta bolesti, a to se događa kada postoji neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog odbrambenog 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 koji vode ka progresiji strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja [5]. U kardiovaskularnim bolestima redoks neravnoteža izaziva aktivaciju brojnih signalnih puteva posredovanih ROS-om.

Istraživanja na brojnim animalnim modelima hipertenzije, uključujući i model infuzije angiotenzina II, pokazala su značajno povišenu produkciju ROS-a u stijenkama krvnih žila te njihov izravni učinak na razvoj hipertenzije. S druge strane, studije koje su proučavale učinke supresije angiotenzina II (farmakološkom primjenom ACE inhibitora ili povećanim unosom soli) pokazale su oštećenu funkciju mikrocirkulacije i povećanu produkciju ROS-a, kao posljedica oštećenih antioksidativnih mehanizama (smanjen izražaj superoksid dismutaze u endotelnim stanicama) [3]. Postoje brojni dokazi da povećani oksidativni stres u stijenci

krvnih žila vodi k aktivaciji endotela i razvoju upale, koja dugoročno može rezultirati ateroskleroznim procesima i razvojem kardiovaskularnih bolesti.

#### ***1.4. Oksidativni stres i izvor reaktivnih kisikovih spojeva u tkivima***

Oksidativni stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Uslijed prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika ili smanjene sposobnosti pojedinih stanica da ih razgradi dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala, njihovog nakupljanja u stanici te oštećenja stanica i tkiva.

Izraz "reaktivne vrste kisika" (ROS) uključuje superoksid ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kisik ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) i organske peroksidge. Osim toga, superoksid ( $O_2^-$ ) u reakciji s dušičnim monoksidom (NO) daje vrlo toksične spojeve peroksinitrite ( $ONOO^-$ ), koji se vežu na tetrahidrobiopterin ( $BH_4$ ) i time smanjuju funkciju endotelne NO sintetaze tj. produkciju najvažnijeg vazodilatatora NO. ROS su sveprisutni derivati kisika, nalaze se u svim biološkim sustavima, važni su posrednici rasta stanica, prijanjanja, diferencijacije, starenja i apoptoze. Fiziološka stopa stvaranja ROS-a u ravnoteži je sa stopom uklanjanja [4]. Kada se te vrste nalaze u suvišku mogu izazvati štetu djelujući izravno ili kao intermedijatori u različitim signalnim putevima. U patofiziološkim stanjima glavni izvori ROS-a uključuju: 7 izoforma NADPH oksidaza (koji su različito izraženi u različitim stanicama i vrstama), mitohondrijski respiratorni transportni lanac, ksantin oksidazu, citokrom P450 i metabolizam arahidonske kiseline.

U mitohondrijskom respiratornom lancu superoksidni radikal  $O_2^-$  stvara se kontinuirano tijekom aerobnog metabolizma. Utvrđeno je da 1 do 2 posto od ukupnog broja elektrona koji prolaze respiratornim lancem nikad ne stigne do kraja nego stvara superoksid radikal. Taj radikal može nastati i kao posljedica djelovanja imunološkog sustava, preciznije leukocita koji u okruženju mikroorganizama ili nekih drugih patogena počinju proizvodnju velikog broja superoksidge.

Ksantin oksidoreduktaza funkcionira kao ksantin dehidrogenaza (XDH) koja prenosi elektron do  $NAD^+$  i stvara NADH ili XO formu, koja prenosi elektron do  $O_2$  i potiče stvaranje oksidativnog stresa. Oksidansi stvoreni staničnom NADPH oksidazom sudjeluju u mnogim biološkim procesima kao važni posrednici u signalnim putevima i efektorske molekule [5].

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.

### ***1.5. Antioksidativni mehanizmi***

U fiziološkim uvjetima stanice imaju antioksidativni obrambeni sustav kako bi se spriječilo štetno djelovanje ROS-a, koji nastaju kao nusproizvodi staničnog metabolizma. Antioksidansi su male molekule koje mogu izbaciti slobodne radikale prihvatanjem ili doniranjem elektrona. Mehanizmi djelovanja antioksidansa su istjerivanje ROS-a i njihovih prekursora, inhibicija stvaranja ROS-a i povećanje endogene antioksidativnog kapaciteta.

Enzimski antioksidativna obrana uključuje superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu i katalazu. Neenzimska antioksidativna obrana uključuje vitamin C, vitamin E, karotenoide, flavonoide. Prva linija odbrane protiv stanične oksidativne ozljede uključuje katalazu, superoksid dismutazu i glutation peroksidazu.

Egzogeni antioksidansi vitamin C i E štite tijelo od štetnog djelovanja slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativni stres te onemogućuju oksidaciju LDL kolesterola koja pospješuje ateroskleroze.

Redoks reakcije koje su posredovane ROS-om dovode do gubitka elektrona u ciljnoj molekuli koja time mijenja svoju strukturu i funkciju. Gotovo svaka stanična komponenta može biti meta ROS-a. Učinci ROS-a na stanicu ovisi o razini stanične izloženosti. Izloženost stanice niskim do umjerenim razinama ROS-a dovodi do pojačane funkcije antioksidativnih mehanizama i potiče stanične zaštitne mehanizme [4]. Ako je stanica izložena visokim razinama ROS-a, aktivira se upalni odgovor karakteriziran povećanim razinama TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, povećanom ekspresijom adhezijskih molekula i promotora oksidativnog stresa.

### ***1.6. Oksidativni stres i imunološki odgovor***

U oksidativnom stresu dolazi do prekomjerne ekspresije proupalnih citokina, time i do prekomjernog pobuđivanja imunološkog sustava. U slučaju vaskularnog endotela, oksidativni stres dovodi do aktivacije endotela, infiltracije stjenke krvnih žila leukocitima i razvoja upale koja vodi ka razvoju ateroskleoze i kardiovaskularnih bolesti.

U imunološkom sustavu ROS, također, 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 [6]. Osim toga, stvaranje ROS-a je jedan od glavnih mehanizama kojim stanice imunološkog sustava, u prvom redu makrofazi (monociti i neutrofilni), uništavaju štetne mikroorganizme. Prilikom upalnog odgovora, upravo zbog tog mehanizma, dolazi i do oštećenja normalnog tkiva domaćina.

## **2. HIPOTEZA**

Ispitat ćemo hipotezu da kratkotrajni povećani unos soli dovodi do promjene u antioksidativnom sustavu leukocita što će rezultirati povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih radikala i aktivacijom leukocita.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- 1) Izmjeriti proizvodnju slobodnih kisikovih radikala (ROS) kod leukocita Sprague Dawley štakora hranjenih hranom s visokim udjelom soli (7 dana, 4% NaCl) te kontrolne skupine štakora.
- 2) Odrediti stupanj aktivacije leukocita određivanjem ekspresije integrina LFA-1 kod leukocita Sprague Dawley štakora hranjenih hranom s visokim udjelom soli te kontrolne skupine štakora.
- 3) Ispitati ulogu superoksid dismutaze (SOD) u stvaranju ROS-a u leukocitima *in vivo* primjenom analoga SOD-a (TEMPOL) kod Sprague Dawley štakora hranjenih hranom s visokim udjelom soli (7 dana, 4% NaCl) te kontrolne skupine štakora.
- 4) Odrediti oksidativni status i antioksidativni kapacitet iz seruma ispitivanih životinja te dobivene rezultate usporediti s razinom oksidativnog stresa u leukocitima životinja.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. *Animalni model visokog unosa soli*

U istraživanju smo koristili Sprague Dawley štakore, starosti između 10 i 12 tjedana, podijeljene u 4 skupine:

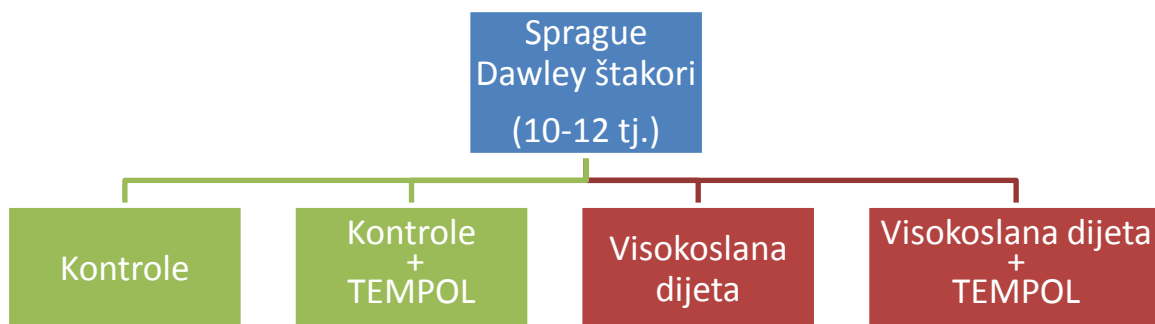
Aa) Kontrolna skupina životinja,

Ab) Kontrolna skupina životinja na TEMPOL-u,

Ba) Štakori na visokoslanjoj dijeti,

Bb) Štakori na visokoslanjoj dijeti i TEMPOL-u.

Kao pozitivna kontrola, u studiju je dodana skupina životinja koja je jednokratno bila izložena hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO<sub>2</sub>) zbog poznatog učinka jednokratne HBO<sub>2</sub> na rast oksidativnog stresa.



Slika 1. Prikaz eksperimentalnih grupa

## 4.2. Metode

### 1) Protokol hranjenja i prikupljanja tkiva:

Životinje su od prvog dana pokusa, a ovisno o protokolu, dobivale odgovarajuću hranu (standardna hrana za laboratorijske životinje ili hrana s visokim udjelom soli, 4%, Mucedola, Italija) i vodu za piće (s TEMPOL-om ili bez TEMPOL-a, 1mM u vodovodnoj vodi). Osmi dan životinje su bile žrtvovane te sakupljeni uzorci tkiva: 1) periferna krv, 2) periferni limfni čvorovi, 3) mezenterički limfni čvorovi i 4) slezena.

Životinje koje su služile kao pozitivne kontrole bile su jednokratno izložene HBO<sub>2</sub>. HBO<sub>2</sub> tretman je provedena u barokomori za male životinje (Đuro Đaković), u kojoj su životinje bile izložene 100% kisiku pri 2,4 bara tijekom 60 minuta uz 15 minuta postepene kompresije i dekompresije.

### 2) Protočna citometrija:

#### *Priprema uzoraka:*

Periferna krv je bila 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 sa brušenim rubovima te filtrirana kroz pamučnu vatu. Dobivena stanična suspenzija se 1x ispirala u PBS-u (1x 5 min centrifugiranja na 400xg i +4oC) te resuspendirala u adekvatnom volumenu svježeg PBS-a. Koncentracija stanica je bila prilagođena na 1x10<sup>7</sup>stanica/ml.

#### *Površno stanično bojanje*

Leukociti iz različitih uzoraka bili su bojani na CD45 i CD11a markere korištenjem protutijela FITC mišji protu štakorski CD45 Ig (BD Bioscience) i PE mišji protu štakorski CD11a Ig (BD Bioscience). U tu svrhu, 50 µL suspenzije stanica ili pune krvi bilo je dodano u 50 µl suspenzije gore navedenih protutijela (u završnom razrijeđenju 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, +4oC) te resuspendirane u 500µl PBS-a sa 0,1% paraformaldehida (0,1% PFA u PBS-u). 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 te na kraju resuspendirani u 500  $\mu$ l 0,1% PFA u PBS-u. Uzorci su do analize na protočnom citometru bili pohranjeni na +4°C.

*Provjera stanične viabilnosti:*

Stanična vijabilnost je bila 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:*

Za određivanje razine oksidativnog stresa (proizvodnje vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i peroksinitrita (ONOO-)) korišten je diklorofluorescein diacetat (DCF-DA). DCF-DA je bio pripremljen kao otopina završne koncentracije 10 $\mu$ M. 10 $\mu$ L otopine je dodano suspenziji stanica (50 $\mu$ l stanica+40 $\mu$ l PBS-a) te su uzorci biti očitani odmah nakon 30 minuta inkubacije na +4°C. Uzorci sa 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 očitani na protočnom citometru.

*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).

### 3) ODREĐIVANJE TBARS i FRAP

Tijekom pokusa određivane su reaktivne supstance tiobarbituricne kiseline (TBARS od *engl.* Thiobarbituric acid reactive substances) i sposobnosti plazme da reducira željezo (FRAP od *engl.* Ferric reducing ability of plasma)

Mjerenje oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) u serumu izmjereno je pomoću standardiziranih protokola. Ukratko, TBARS metoda se temelji na reakciji malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta peroksidacije lipida, s tiobarbituricnom 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 u koncentraciji 40, 20, 10, 5, 2,5, 1 i 0,5  $\mu\text{M}$ , a rezultati su bili uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću MDA i izraženi kao mikromolarni MDA ekvivalent.

FRAP metoda je bila 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), analog vitamina E topivog u vodi, te izraženi kao mikromolarni TE ekvivalenti.

### 4) STATISTIKA

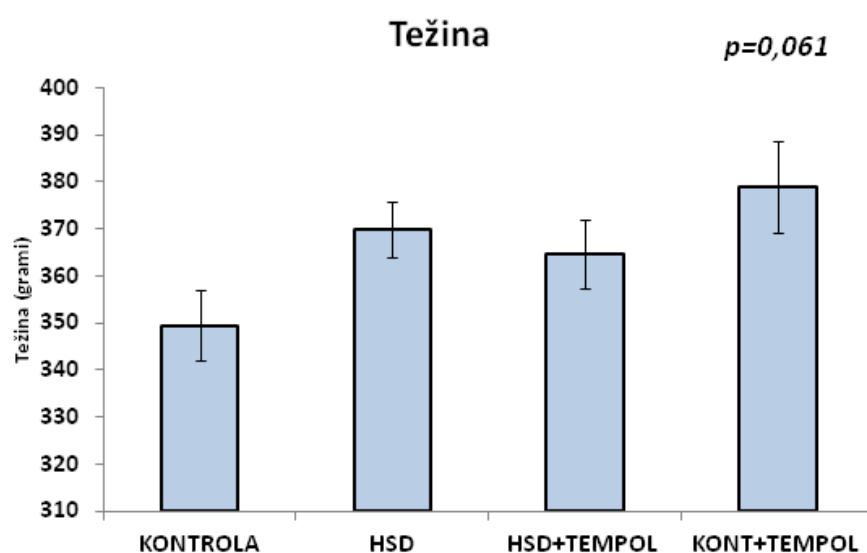
Veličina uzorka određena je na temelju preliminarnih rezultata istraživanja. Za uočavanje učinka  $0,5 \pm 0,2$  uz  $\alpha=0,05$  i snagu testa 0,8 potrebna veličina uzorka je najmanje 5 životinja po skupini (4 skupine, 20 životinja). Za usporedbu rezultata između grupa koristili smo jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (one-way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Kruskal-Wallis test. Za višestruku usporedbu između parova korišteni su "post hoc" Tukey ili Dunnov test. Za testiranje povezanosti između izmjerenih parametara korišteni su Pearsonov i Spearmanov test korelacije. Razina statističke značajnosti određena je kao  $p < 0,05$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. Korišten je statistički program SigmaPlot (inačica 11.0, Systat Software, Inc, Chicago, USA) i SPSS (inačica 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. REZULTATI

U pokus su bile uključene životinje starosti 12 tjedana $\pm$ 1tjedan. U trenutku uključivanja u pokus životinje su težile 365,7 $\pm$ 7,65g te nije bilo značajne razlike između grupa (Slika 2;  $p=0,061$ ).

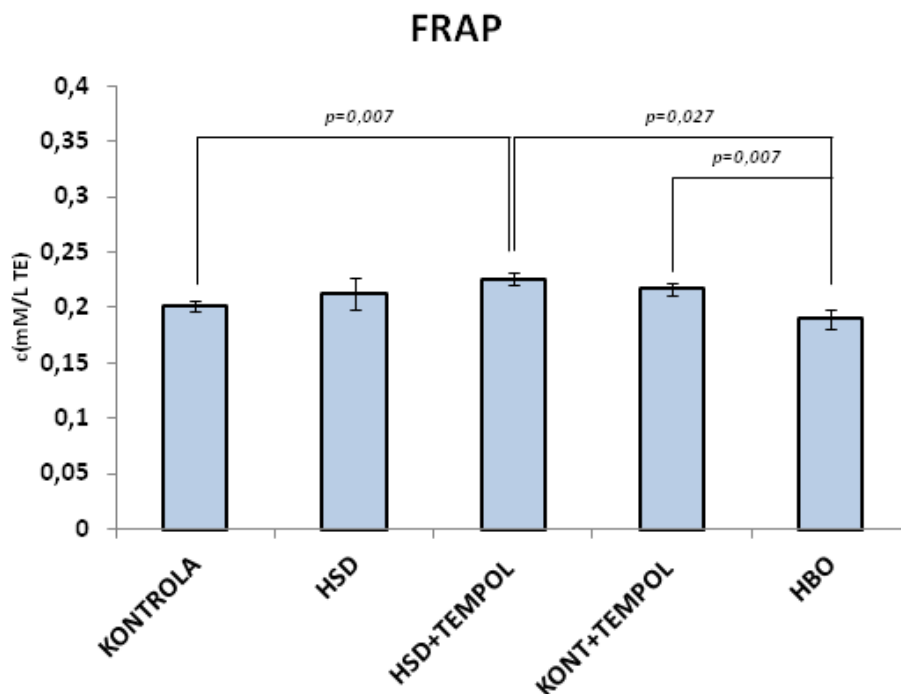
Kontrolna skupina životinja imala je statistički značajno niži antioksidativni kapacitet u odnosu na HSD+TEMPOL skupinu životinja (Slika 3;  $p=0,007$ ). Životinje koje su jednokratno bile izložene hiperbaričnoj oksigenaciji, također, su imale značajno niži antioksidativni kapacitet u odnosu na kontrolnu i HSD skupinu životinja koje su primale TEMPOL (Slika 3;  $p=0,007$  i  $p=0,027$ ).

Razina oksidativnog stresa određena je mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS). Rezultati su pokazali značajnu razliku između ispitivanih skupina (Slika 4;  $p<0,001$ ). Najviša razina oksidativnog stresa izmjerena je kod životinja koje su jednokratno bile izložene hiperbaričnoj oksigenaciji. Njihova razina TBARS-a je bila značajno veća u odnosu na sve ostale ispitivane skupine. Dijeta s visokim udjelom soli, također, je dovela do porasta TBARS-a, u odnosu na kontrolnu skupinu i kontrolnu skupinu kojaj je primala TEMPOL. Zanimljiv je nalaz da su HSD+TEMPOL životinje imale značajno viši TBARS u odnosu na HSD skupinu (Slika 4;  $p=0,014$  t-test). Ta razlika je posljedica aktivnosti TEMPOLA kao SOD-mimetika, koji superoksid pretvara u vodikov peroksid.



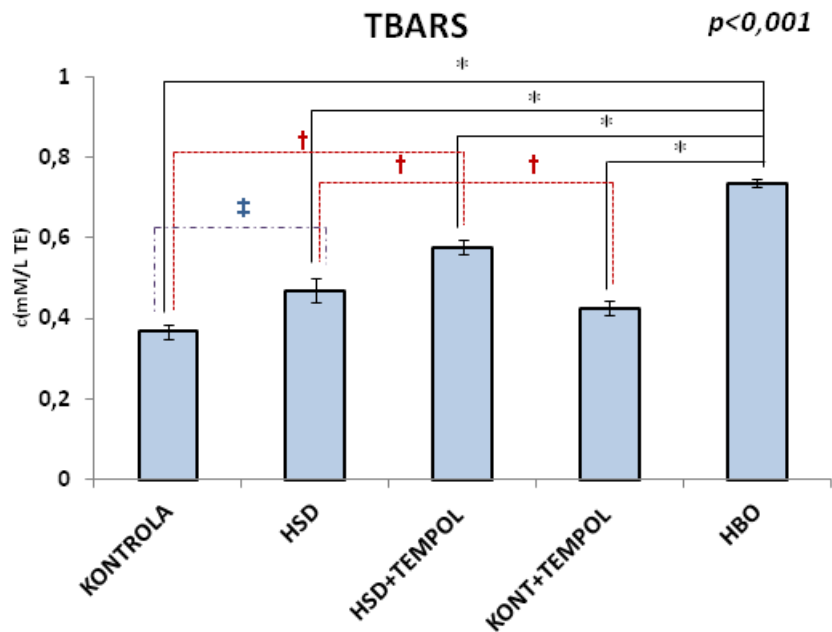
**Slika 2. Tjelesna težina životinja u pojedinim ispitivanim skupinama**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom (*p* vrijednost je prikazana na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti.



**Slika 3.** Antioksidativni kapacitet plazme je određen indirektno mjerenjem sposobnosti plazme da reducira željezo (FRAP od *engl.* Ferric reducing ability of plasma).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci ( $p=0,022$ ) te studentovim  $t$  testom (vrijednost je prikazana na slici), a  $p<0,05$  se smatrao statistički značajnim, HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBO – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 4. Razina oksidativnog stresa u plazmi određena je mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturine kiseline (TBARS od *engl.* Thiobarbituric acid reactive substances)**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednost je prikazana na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; \*statistički značajno u odnosu na HBO<sub>2</sub> skupinu; † statistički značajno u odnosu na HSD+TEMPOL skupinu; ‡ statistički značajno kontrola vs. HSD; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti, HBOT– skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



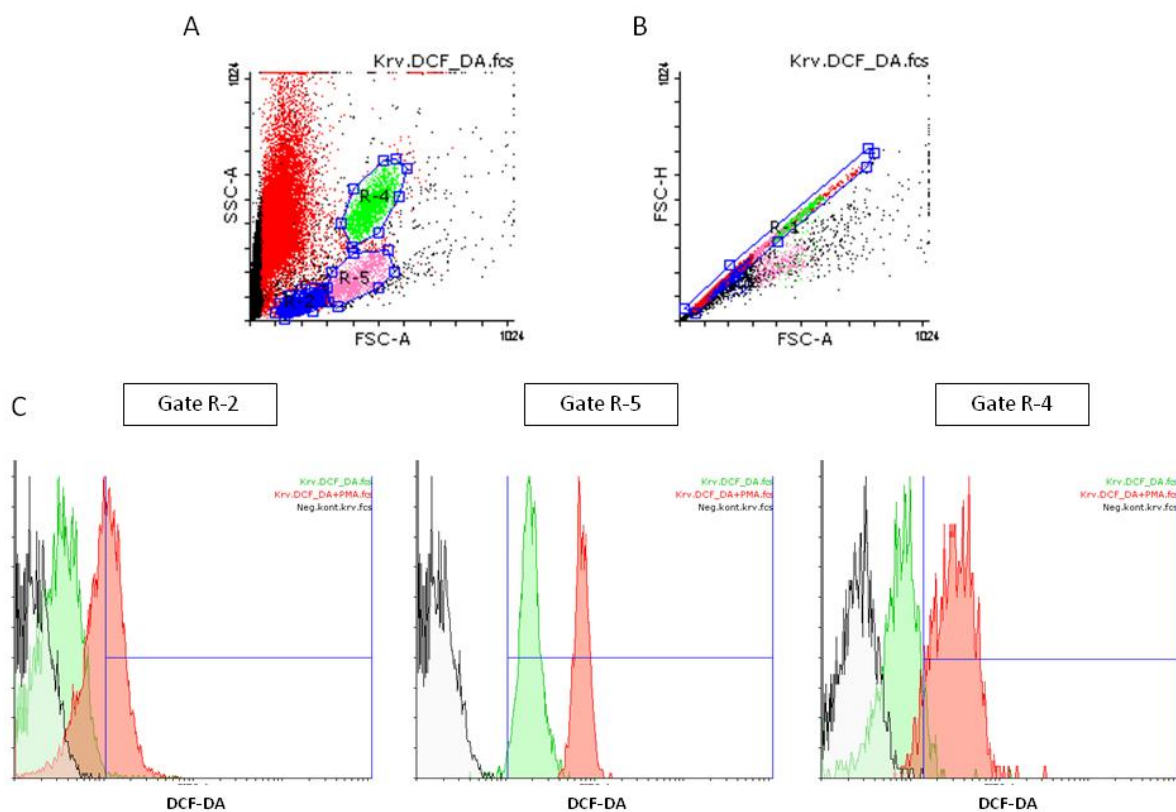
DCFH-DA je korišten za procijeniti razinu oksidativnog stresa u leukocitima, uključujući razine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipokloritne kiseline, peroksinitrita i hidroksilnih radikala. Nakon očitavanja bazičnih vrijednosti, unutarstanična proizvodnja ROS-a stimuliran je dodatkom 100 nM forbol-12-miristat-13-acetata (PMA), nakon čega je učinjena druga analiza stanica. Slike 5-8 prikazuju metode analize rezultata mjerenja oksidativnog stresa pomoću DCF-DA na protočnoj citometriju u različitim tkivima. Ukratko, određena je geometrijska sredina fluorescencije za svaku definiranu populaciju jednostrukih živih stanica (limfocite, monocite i granulocite). Nebojane stanice iz odgovarajućih tkiva korištene su kao negativne kontrole. Analiza je provedena na limfocitima (Slika 5. i 10), monocitima (Slika 5 i 9) i granulocitima (Slika 5 i 11) izoliranim iz periferne krvi te limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih organa; perifernih limfnih čvorova (Slika 6 i 13), mezenteričnih limfnih čvorova (slika 7 i 12) i slezene (Slika 8 i 14).

Općenito, leukociti iz periferne krvi imaju nižu razinu oksidativnog stresa, osnovnu i poslije PMA stimulacije. PMA stimulacija je u većini uzoraka dovela do statistički značajno povećane proizvodnje ROS-a, uz iznimku stanica periferne krvi kod skupina na tepolu (Slika 9-11). Dijeta s visokim udjelom soli rezultirala je s značajno povećanom bazičnom razinom oksidativnog stresa kod limfocita izoliranih iz mezenteričkih limfnih čvorova ( $p=0,004$ ; t-test) i slezene ( $p=0,001$ ; t-test), te povišenom proizvodnjom ROS-a nakon PMA stimulacije u perifernim limfnim čvorovima ( $p=0,037$ ; t-test).

Statistički značajna razlika pokazuje udvostručen iznos vodikovog peroksida inducirano pomoću PMA u limfocitima.

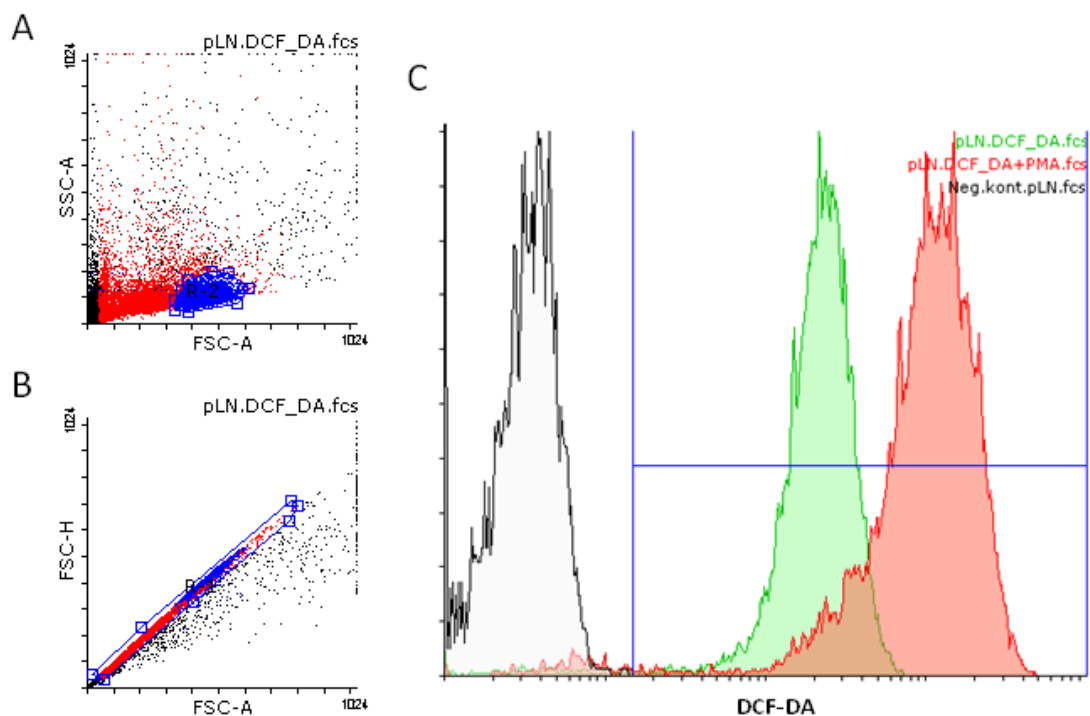
U mezenteričkim i perifernim limfnim čvorovima sve ispitivane skupine su pokazale značajno nižu razinu osnovnog oksidativnog stresa u odnosu na životinje koje su jednokratno bile izložene HBO<sub>2</sub> (Slike 12 i 13).

Osim toga, limfociti izolirani iz perifernih limfnih čvorova su u obje skupine na TEMPOL-u imali značajno višu razinu oksidativnog stresa u usporedbi s kontrolnom skupinom (Slika 13,  $p<0,001$ ). Slično tome, limfociti izolirani iz slezene u kontrolnoj skupini su imali značajno nižu razinu ROS-a u usporedbi sa svim ostalim skupinama (Slika 13,  $p=0,001$ ).



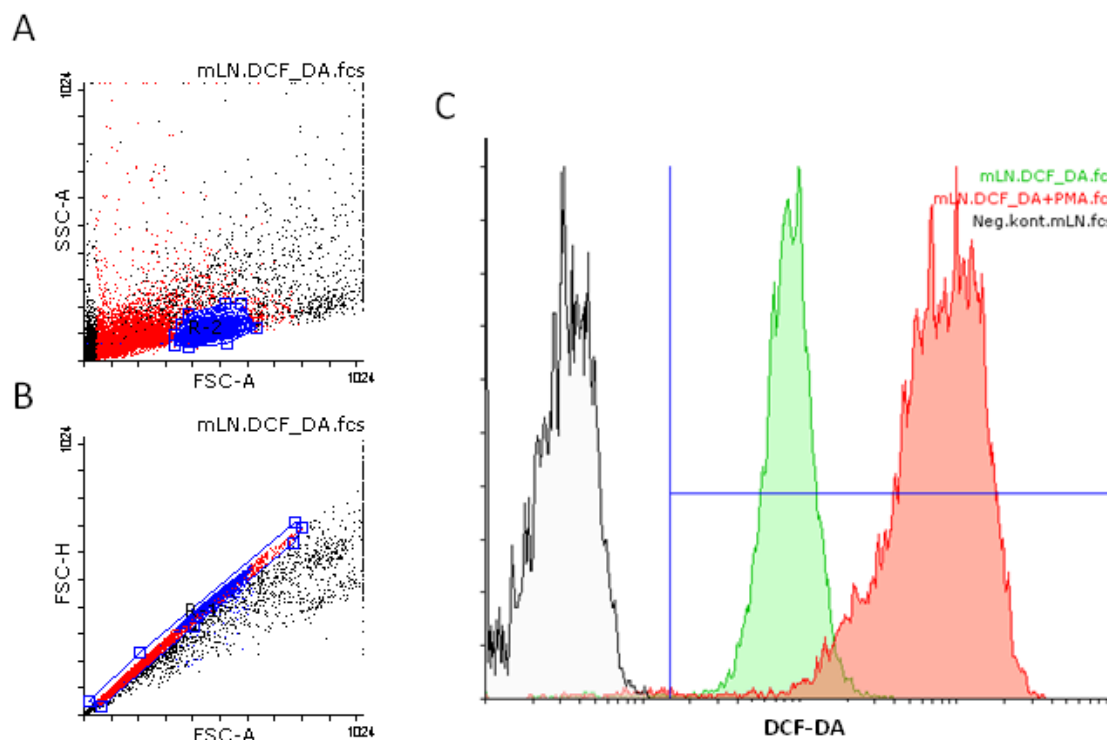
**Slika 5. Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u različitim stanicama periferne krvi štakora**

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



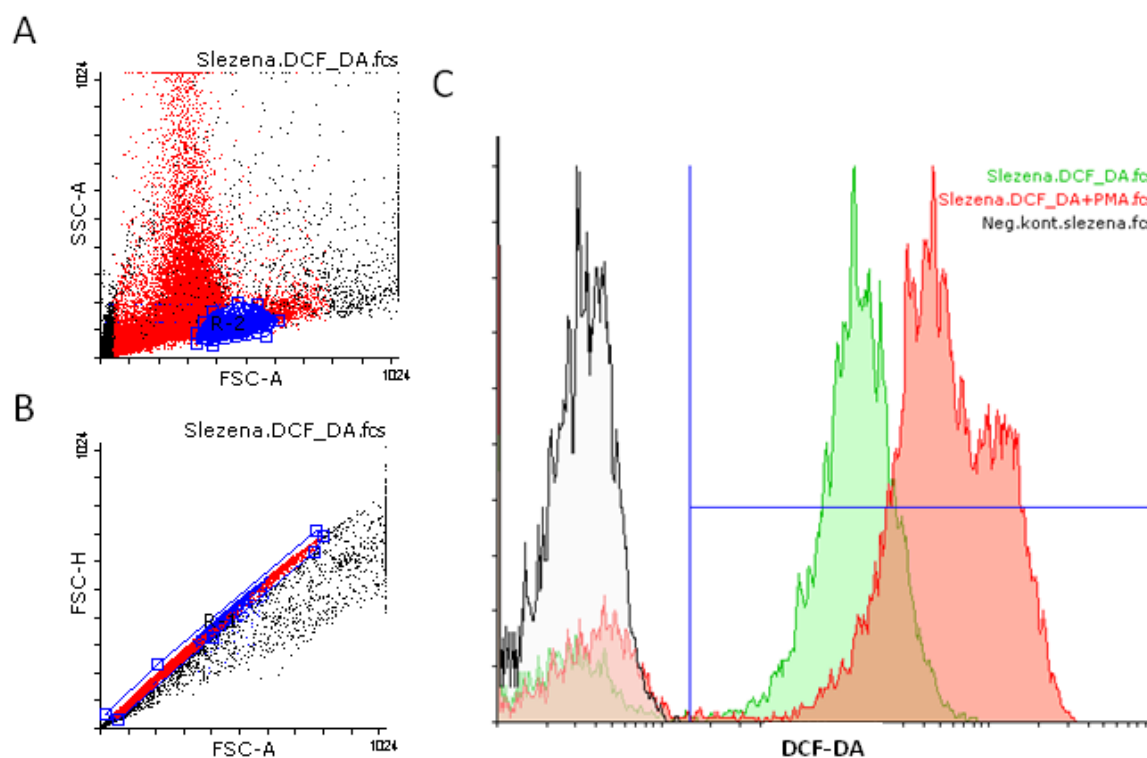
**Slika 6.** Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnig+h čvorova štakora.

*Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika 6B), definirana je populacija limfocita R-2 (slika 6A) te određena geometrijska srednja vrijednost ekspresije DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika 6C).*



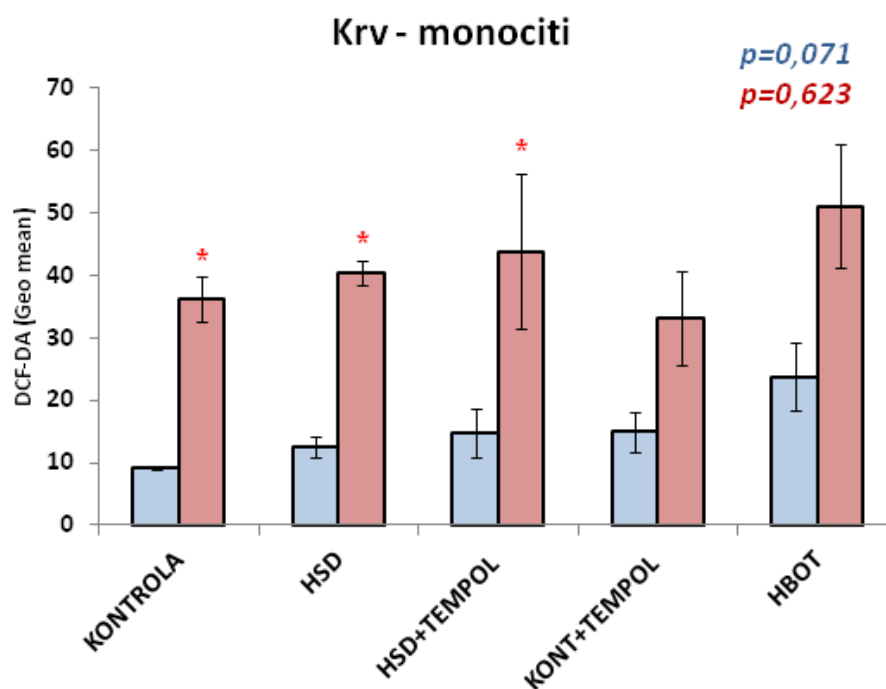
**Slika 7. Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz mezenteričnih limfnih čvorova štakora.**

*Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika 7B), definirana je populacije limfocita R-2 (slika 7A) te određena geometrijska srednja vrijednost ekspresije DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika 7C).*



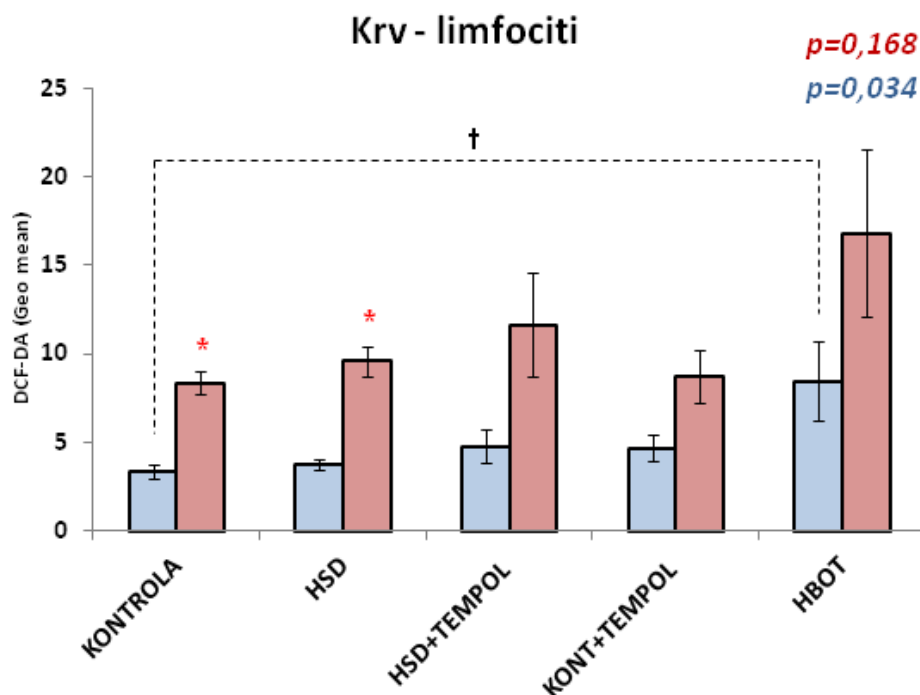
**Slika 8. Primjer analize mjerenja razine vodikovog peroksida i peroksinitrita pomoću diklorofluorescein diaceta (DCF-DA) na protočnoj citometriji u limfocitima izoliranim iz slezene štakora.**

*Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica putem R-1 (slika 8B), definirana je populacije limfocita R-2 (slika 8A) te određena geometrijska srednja vrijednost ekspresije DCF-DA u FITC detektoru pomoću histograma (Slika 8C).*



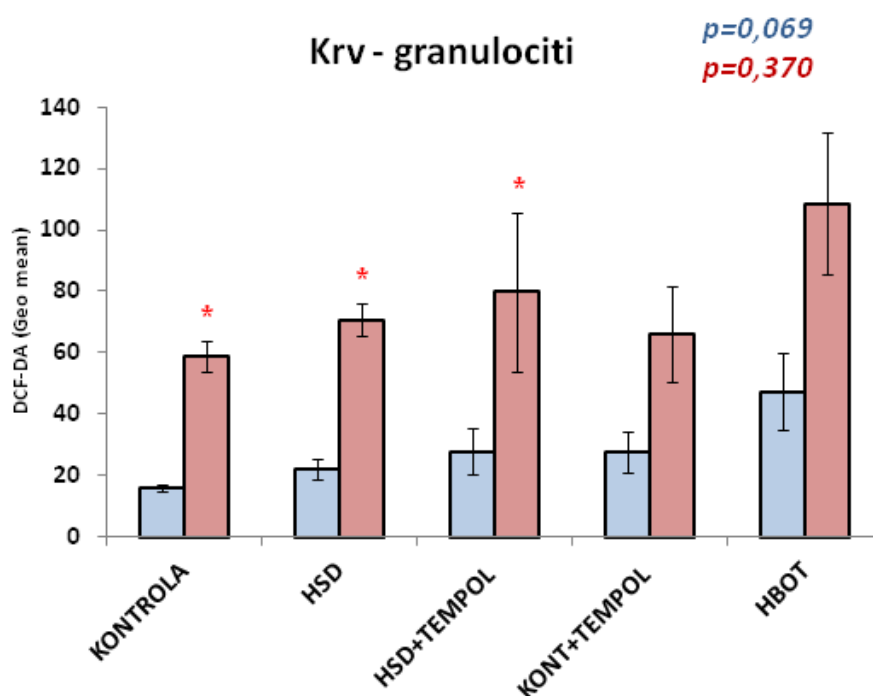
**Slika 9. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u monocitima periferene krvi štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalne vrijednosti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 10. Razina vodi oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima periferene krvi štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).**

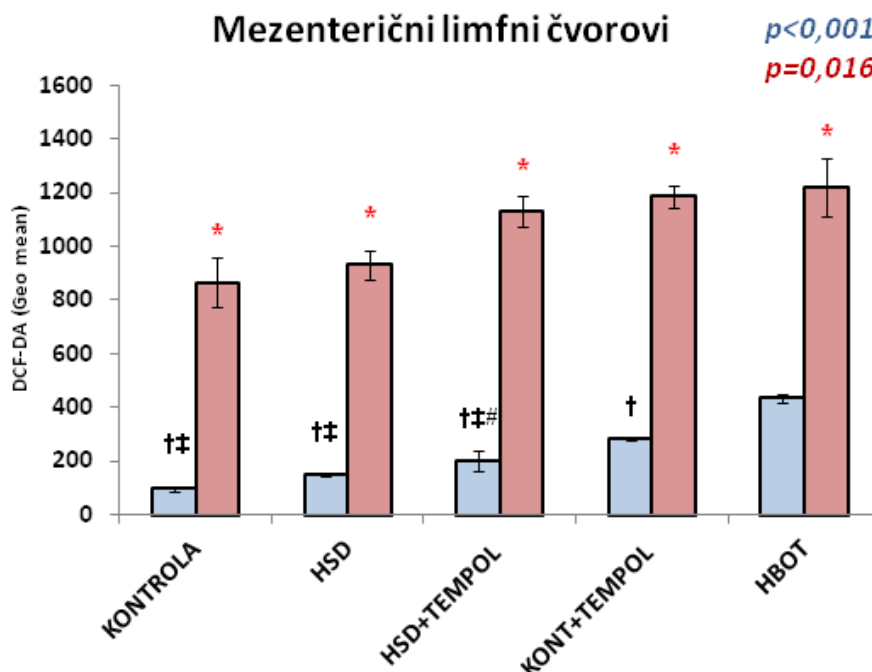
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalnu vrijednost; †statistički značajno za kontrolu u odnosu na HBOT skupinu; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 11. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u granulocitima periferene krvi štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).**

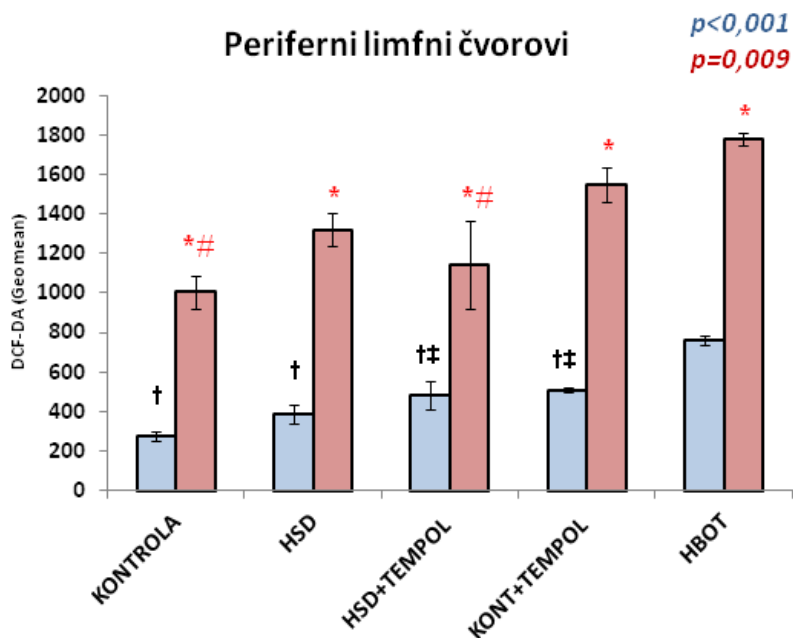
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalnu vrijednost; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.





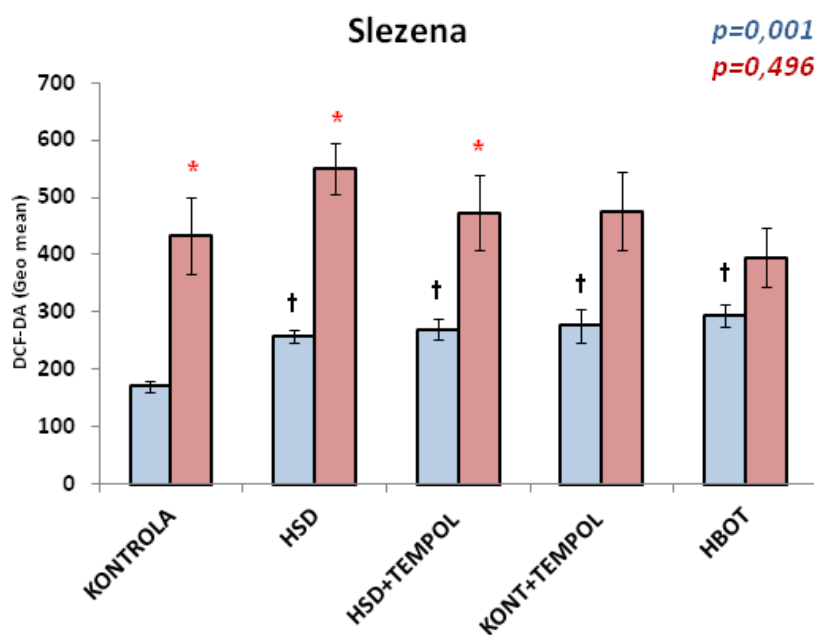
**Slika 12. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) peroksinitrita u limfocitima izoliranim iz mezenteričkih limfnih čvorova štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalnu vrijednost; †statistički značajno u odnosu na HBOT skupinu; ‡ statistički značajno u odnosu na KONT+TEMPOL skupinu; # stat. značajno HSD+TEMPOL vs. KONTROLA; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 13. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz perifernih limfnih čvorova štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).**

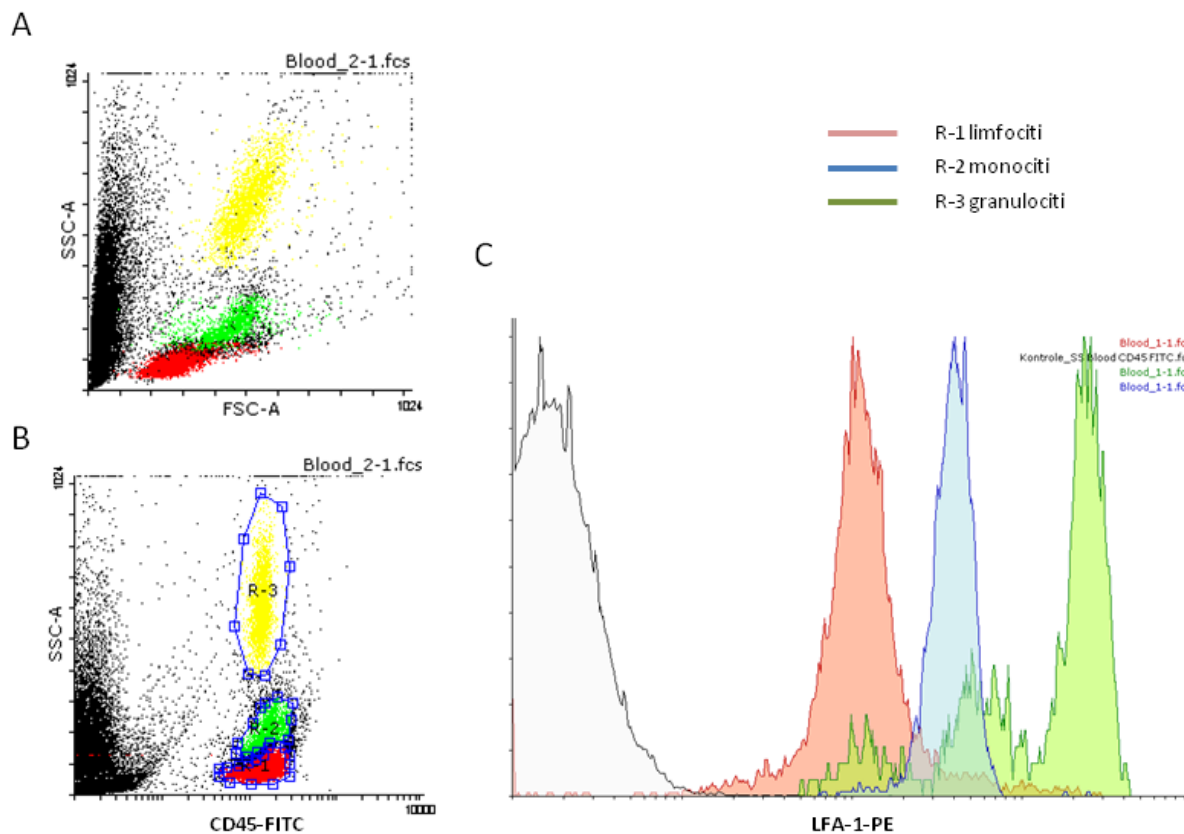
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalnu vrijednost; †statistički značajno u odnosu na HBOT skupinu; ‡ statistički značajno u odnosu na KONTROLNU skupinu; # stat. značajno nakon stimulacije u odnosu na HBOT skupinu; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 14. Razina oksidativnog stresa (vodikovog peroksida i peroksinitrita) u limfocitima izoliranim iz slezene štakora prije (plavi stupci) i nakon PMA stimulacije (crveni stupci).** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; \*statistički značajno u odnosu na bazalne vrijednosti; †statistički značajno u odnosu na KONTROLNU skupinu; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.

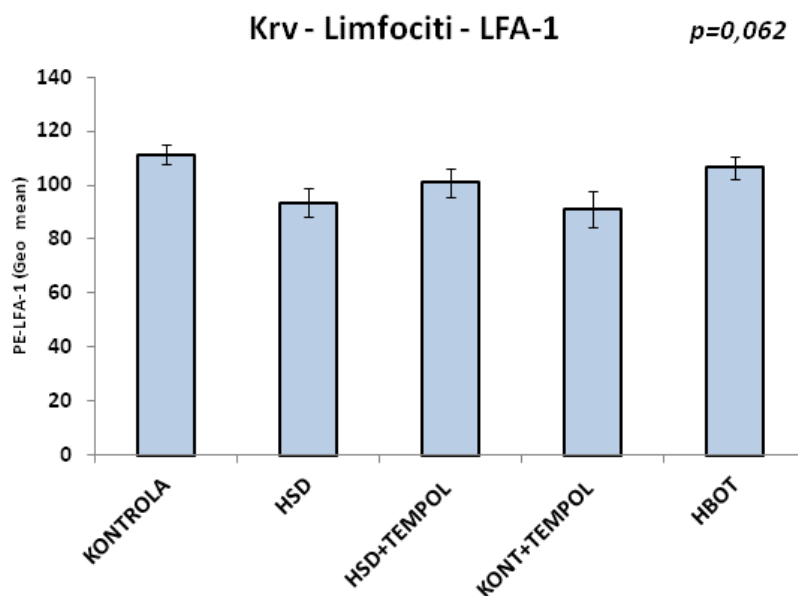
Slika 15 prikazuje metodu analize izražaja leukocitnog funkcijskog antigena 1 (LFA-1) na površini leukocita pomoću protočne citometrije. Ukratko, nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica, definirane su subpopulacije leukocita periferne krvi pomoću ekspresije CD45-FITC i SSC detektora te određena geometrijska srednja florescencije u PE kanalu što odgovara vrijednost ekspresije integrina LFA-1.

Analiza podataka pokazala je tendenciju smanjenja izražaja LFA na leukocitima iz svih tkiva osim perifernih limfnih čvorova uslijed visokog unosa soli (Slike 16-21). Usporedba studentovim t testom je pokazala i statični značajno smanjenu ekspresiju na limfocitima iz krvi kod HSD grupe u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 16;  $p=0,028$ ). Druge značajne razlike nisu otkrivene.



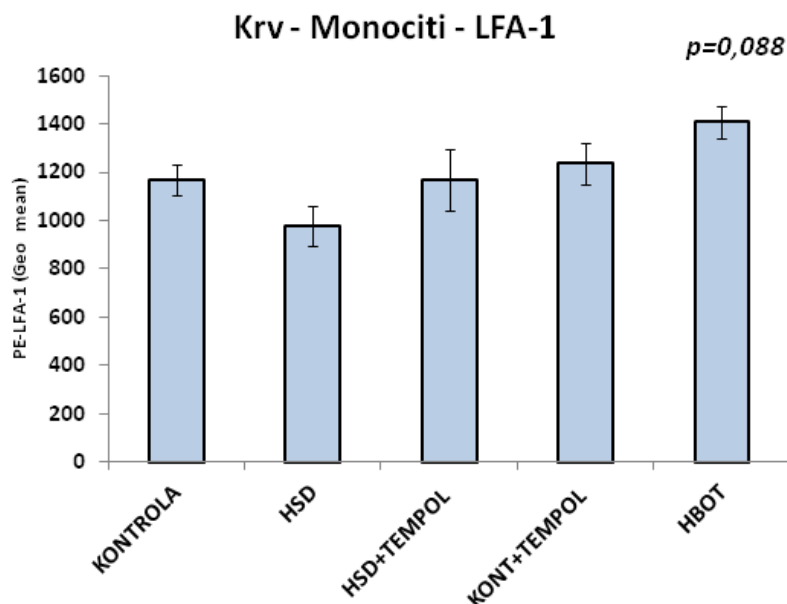
**Slika 15. Primjer analize mjerenja ekspresije integrina LFA-1 na leukocitima periferne krvi štakora protočnom citometrijom.**

*Nakon isključivanja dvostrukih/sljepljenih stanica, definirane su subpopulacije leukocita periferne krvi pomoću ekspresije CD45-FITC i SSC detektora (Slika 15B): R-1 odgovara limfocitima, R-2 monocitima, a R-3 granulocitima. Geometrijska srednja vrijednost ekspresije integrina LFA-1 određena je pomoću histograma (Slika 15C).*



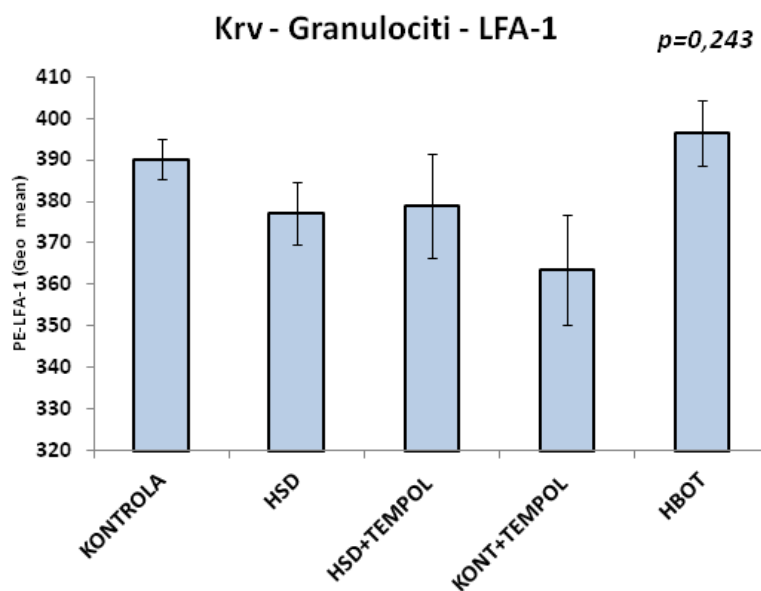
**Slika 16. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima periferne krvi štakora**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom (*p* vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 17. Ekspresija integrina LFA-1 na monocitima periferne krvi štakora**

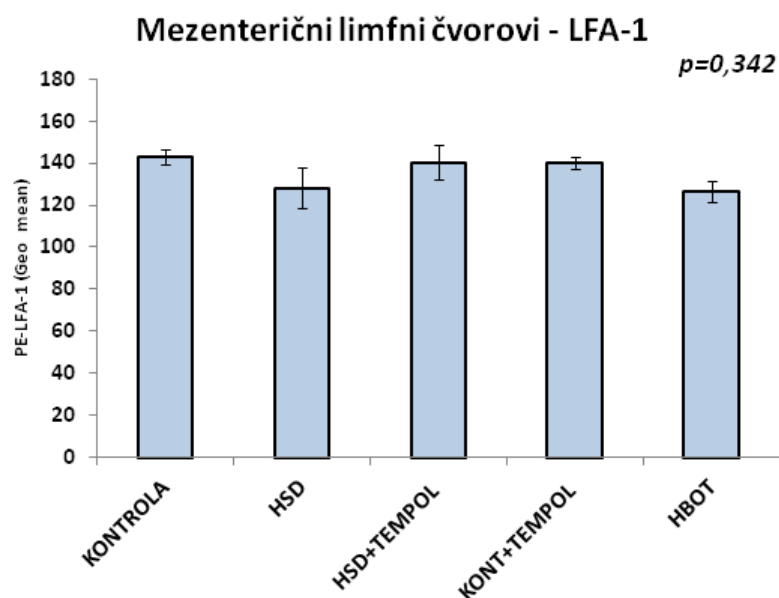
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 18. Ekspresija integrina LFA-1 na granulocitima periferne krvi štakora**

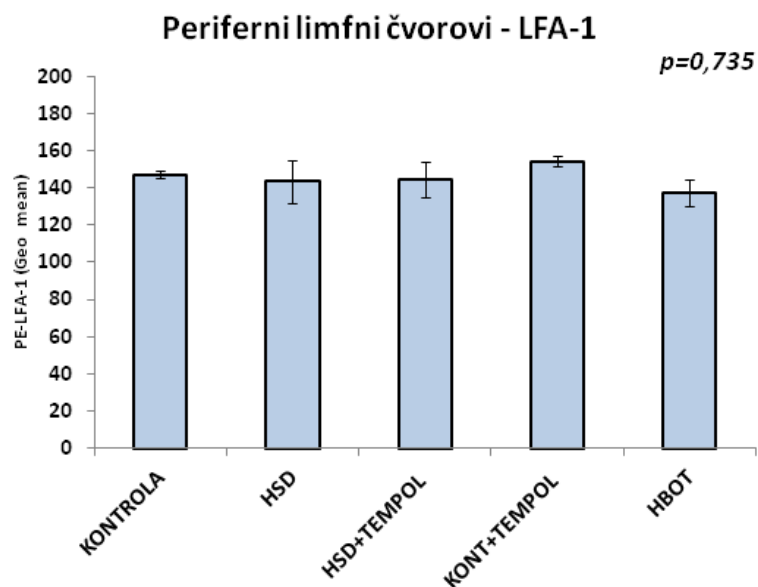
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.





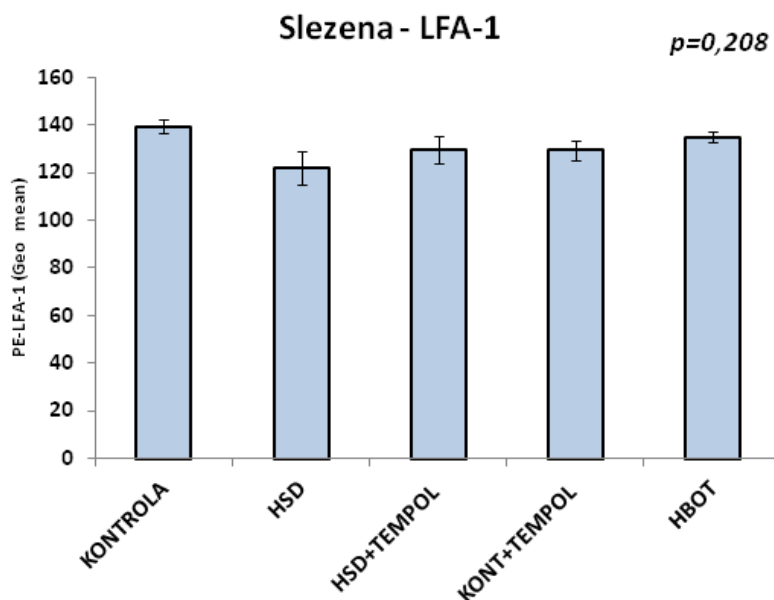
**Slika 19. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima mezenteričkih limfnih čvorova štakora**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 20. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima perifernih limfnih čvorova štakora**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100% kisikom.



**Slika 21. Ekspresija integrina LFA-1 na limfocitima slezene štakora**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednje vrijednosti. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci i Holm-Sidak post hoc analizom ( $p$  vrijednosti su prikazane na slici), a  $p < 0,05$  se smatrao statistički značajnim; HSD – skupina štakora na visokoslanjoj dijeti; HBOT – skupina štakora jednokratno izložena hiperbaričnoj oksigenaciji 100 % kisikom.

## 6. RASPRAVA

Brojna dosadašnja istraživanja na animalnim modelima te humane studije donijeli su nedvojbene dokaze o štetnim i nepovoljnim učincima povećanog unosa soli na organske sustave u ljudskom organizmu. Velike doze soli dovode do oštećenja mikrocirkulacije i do povišenih razina ROS-a. Kod štakora hranjenih visokoslanom dijetom došlo je do endotelne stanične apoptoze i indukcije ROS-a. ROS su visoko reaktivni i kratkoživi spojevi (poluživot u rasponu od nekoliko nanosekundi do milisekundi), koji reagiraju sa ostalim molekulama, pokreću lančanu reakciju i dovode do oštećenja. Utjecaj oksidativnog stresa na hipertenziju već dugo je proučavana tema. Povećani oksidativni stres u stijenci krvnih žila vodi k aktivaciji endotela i razvoju upale, koja dugoročno može rezultirati aterogenim procesima i razvojem kardiovaskularnih bolesti.

U našem istraživanju potvrđeno je da je protočna citometrija korisna i točna metoda za mjerenje razine ROS-a u stanicama izoliranim iz periferne krvi, perifernih limfnih čvorova, mezenteričnih limfnih čvorova islezene. Još jedna velika prednost ove metode u mjerenju razine ROS-a je u tome što uzorci s vrlo malim brojem stanica mogu biti točno vrednovani. Tome u prilog ide i nalaz značajno povišenog oksidativnog stresa u skupini životinja koje su jednokratno bile izložene HBO<sub>2</sub> jer se zna iz prijašnjih studija da akutna hiperbarična oksigenacija dovodi do značajnog porasta proizvodnje ROS-a.

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.

U usporednom humanom istraživanju dokazano je da je protočna citometrija osim za parametre apoptoze i koncentracije leukocita pogodna i za mjerenje koncentracije spermija i DNA oštećenje spermija [2].

U navedenom istraživanju koje se provodilo na uzorcima ljudske sperme, razine ROS-a određivane su koristeći paralelne metode kemiluminiscencije uz pomoć luminola i lucigenina te protočne citometrije uz pomoć DCF-DA i dihidroetidija. Rezultati su pokazali da je metoda bazirana na protočnoj citometriji učinkovita za mjerenje ROS-a te pokazuje veću specifičnost za žive spermatozoide..

Prethodna istraživanja bazirana na protočnoj citometriji dokazala su daje superoksid glavni kisikov spoj koji sudjeluje u apoptozi stanica, a mitohondriji su primarni izvor superoksida i mitohondrijske SOD koja katalizira pretvorbu superoksida u kisik ili vodikov peroksid [4].

Naše istraživanje je pokazalo da povećan unos soli dovodi do značajnog porasta produkcije reaktivnih spojeva kisika u limfocitima iz perifernih organa, a također postoji i tendencija porasta oksidativnog stresa u leukocitima iz krvi. U skladu s time je i naš nalaz povećane razine lipidne peroksidacije (TBARS) koju smo mjerili iz seruma ispitivanih životinja. Naši rezultati su u skladu s prethodnim studijama koje su proučavale učinke supresije angiotenzina II (farmakološkom primjenom ACE inhibitora ili povećanog unosa soli), koje su također pokazale oštećenu funkciju mikrocirkulacije i povećanu produkciju ROS-a, kao posljedica oštećenih antioksidativnih mehanizama (smanjen izražaj superoksid dismutaze u endotelnim stanicama). Povećan unos soli hranom potiskuje renin angiotenzinski sustav (RAS) i poznat je čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prijašnje studije su pokazale da supresija RAS-a slanom hranom dovodi do poremećene o endotelu ovisne dilatacije zbog povećanog oksidativnog stresa i promjene u stvaranju vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline. Ti rezultati su vrlo zanimljivi i suprotni brojnim studijama na koje su su pokazale da angiotenzin II, također, potiče stvaranje oksidativnog stresa u endotelnim stanicama stimulacijom aktivacije NAD(P)H oksidaze, ksantin oksidaze i ciklooksigenaze (COX-1,2). NAD(P)H ima vodeću ulogu u proizvodnji reaktivnih kisikovih spojeva (ROS od engl. reactive oxygen species), a kao posljedica njihovog djelovanja može doći i do povišenog krvnog tlaka. ROS reagiraju s dušičnim monoksidom (NO), ključnim medijatorom vazodilatacije, stvarajući izuzetno toksične spojeve peroksinitrite (ONOO-) što vodi ka već spomenutom poremećaju krvožilne reaktivnosti.

U svakom slučaju, povećani oksidativni stres u stijenci krvnih žila vodi k aktivaciji endotela i razvoju upale, koja dugoročno može rezultirati aterognim procesima i razvojem kardiovaskularnih bolesti.

Nedavna istraživanja su pokazala da stanice imunološkog sustava, uključujući limfocite T, posjeduju receptore za Angiotenzin II, no njihova uloga u aktivaciji limfocita i promoviranju aterogenih procesa još uvijek nije poznata. To je bio i poticaj našem istraživanju u kojem smo odredili izražaj integrina leukocitnog funkcijskog antigena 1 (LFA-1) na leukocitima iz periferne krvi i limfocitima iz perifernih limfnih organa. Naime, LFA-1 je integrin 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 ekspresije LFA-1 na površini leukocita, kao i promjene njegovog afiniteta za stanične adhezijske molekule na površini endotela. Naše istraživanje je pokazalo tendenciju smanjenja ekspresije LFA-1 na limfocitima životinja koje su bile na kratkotrajnoj dijeti s visokim unosom soli. Rezultati su suprotni našoj početnoj 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.

Na temelju provedenog istraživanja, djelomično smo potvrdili hipotezu da kratkotrajni povećani unos soli dovodi do promjene u antioksidativnom sustavu leukocita što će rezultirati povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih radikala, ali ne i aktivacijom leukocita.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provednog istraživanja možemo zaključiti:

- Primijenjena metoda za mjerenje oksidativnog stresa bazirana na protočnoj citometriji i DCF-DA je pouzdana za određivanje proizvodnje ROS-a u leukocitima periferne krvi i perifernih limfnih organa.
- Kratkotrajni visoki unos soli dovodi do povećanog oksidativnog stresa u leukocitima iz perifernih limfnih organa, a i općenito do povećane lipidne peroksidacije u organizmu (TBARS određen iz seruma).
- Primjena SOD mimetika TEMPOL-a nije dovela do redukcije oksidativnog stresa, a razlog tomu je vjerojatno povećanje koncentracije  $H_2O_2$ , koji nastaje kao krajnji produkt reakcije koju katalizira SOD/TEMPOL.
- Kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli nije dovela do povećanja izražaja LFA-1 integrina na površini leukocita, koja bi govorila u prilog njihove aktivacije- Mogući razlog za to je kratki period povećanog unosa soli ili promjena u aktivnu konformaciju LFA-1, koja ostaje djelomično neprepoznata od strane primjenjenog monoklonskog protutijela.

## 8. SAŽETAK

Povećan unos soli hranom potiskuje renin angiotenzin sustav (RAS) i poznat je čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prijašnje studije su pokazale da supresija RAS-a slanom hranom dovodi do poremećene o endotelu ovisne dilatacije zbog povećanog oksidativnog stresa i promjene u stvaranju vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline. U ovom istraživanju smo ispitali pretpostavku da kratkotrajni povećani unos soli dovodi do promjene u antioksidativnom sustavu leukocita što rezultira povećanim stvaranjem slobodnih kisikovih radikala i aktivacijom leukocita. Rezultati istraživanja su potvrdili da kratkotrajna dijeta s povećanim udjelom soli dovodi do porasta oksidativnog stresa u leukocitima iz perifernih limfnih organa, ali ne i do njihove aktivacije.



## 9. SUMMARY

**Title: Effects of short term high salt diet on the cellular oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells of Sprague Dawley rats.**

Increased dietary salt suppresses the renin angiotensin system (RAS) and it is a known risk factor for cardiovascular diseases. Recent studies showed that high salt intake-mediated suppression of the RAS led to impaired endothelium-dependent dilatation due to increased oxidative stress and changes in the production of vasoactive metabolites of arachidonic acid. Present study examined the hypothesis that short-term increase in salt intake can lead to changes in the antioxidant system of leukocytes, resulting in increased production of oxygen free radicals and leukocyte activation. Our results confirmed increased oxidative stress in leukocytes isolated from peripheral lymphoid organs of animals exposed to high salt diet; however, this did not result in increased leukocyte activation

## 10. LITERATURA

1. Balaraman Kalyanaraman , Victor Darley-Usmar , Kelvin J.A. Davies , Phyllis A. Dennery ,Henry Jay Forman , Matthew B. Grisham ,Giovanni : Free Radical Biology & Medicine ;52 (2012)
2. Reda Mahfouz,Rakesh Sharma, Jakob Lackner, Nabil Aziz and Ashok Agarwal : H.C.L.D. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa.
3. Gergo Meszaros, Balazs Szalay, Gergely Toldi,Ambrus Kaposi, Barna Vas and Andras Treszl: TECHNICAL BRIEF, Kinetic Measurements Using Flow Cytometry: New Methods for MonitoringIntracellularProcesses.
4. Sudjit Luanpitpong, Pithi Chanvorachote, Ubonthip Nimmannit, Stephen S. Leonard ,Christian Stehlik , LiyingWang: Mitochondrialsuperoxidemediatesdoxorubicin-induced keratin°Cyteapoptosisthroughoxidativemodificationof ERK andBcl-2 ubiquitination, BiochemicalPharmacology; 83 (2012)
5. Agostino Viridis, Emiliano Duranti, and Stefano Taddei: *Review Article*Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II; (2011.)
6. Ramón Rodrigo,Matías Libuy, Felipe Feliú, and Daniel Hasson:*Review Article*Oxidative Stress-Related BiomarkersinEssentialHypertensionandIschemia-ReperfusionMyocharordialDamage;(2013.)
7. Carl Nathan and Amy Cunningham-Bussell Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactiveoxygenspecies

## 11. ŽIVOTOPIS

JOVANA PLANINAC

Datum i mjesto rođenja:

- 11.05.1993., Vukovar

Obrazovanje:

- 2007.-2012. Gimnazija Vukovar
- 2012.-2015. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku