

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Dora Rudić

**DJELOVANJE LOSARTANA NA
PROTOKOM POTAKNUTU
DILATACIJU KOD ZDRAVIH
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Dora Rudić

**DJELOVANJE LOSARTANA NA
PROTOKOM POTAKNUTU
DILATACIJU KOD ZDRAVIH
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor: doc.dr.sc. Ivana Jukić, dr.med.

Rad sadrži: 3 slike i 18 stranica

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Mikrocirkulacija i uloga endotela.....	1
1.2. Protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation, FID).....	2
1.3. Renin-angiotenzin sustav (RAS).....	2
2. HIPOTEZA.....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	6
4. MATERIJALI I METODE.....	7
4.1. Eksperimentalni životinjski modeli.....	7
4.2. Postupak izolacije srednje moždane arterije.....	7
4.3. Određivanje protokom potaknute dilatacije.....	7
4.4. Statističke metode.....	8
5. REZULTATI.....	9
5.1. Bazični odgovor središnje moždane arterije kontrolne skupine i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju.....	9
5.2. Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) središnje moždane arterije (o endotelu ovisna vazodilatacija).....	10
5.3. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju središnje moždane arterije (o endotelu neovisna vazodilatacija).....	11
6. RASPRAVA.....	12
7. ZAKLJUČAK.....	13
8. SAŽETAK.....	14
9. SUMMARY.....	15
10. LITERATURA.....	16
11. ŽIVOTOPIS.....	18

KRATICE

VSMC - stanice glatkog mišićja u krvnim žilama (engl. vascular smooth muscle cells)

NO – dušikov oksid (engl. nitrogen oxide)

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

RAS – renin-angiotenzin sustav

ANG II – angiotenzin II

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim, enzim za konverziju (engl. angiotensin-converting enzyme)

JG stanice – jukstaglomerularne stanice

ANG I – angiotenzin I

AT1 – angiotenzin II receptor tip 1 (engl. angiotensin II type 1 receptor)

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

GDP- gvanozin-difosfat (engl. gvanosine-diphosphate)

GTP – gvanozin-trifosfat (engl. gvanosine-triphosphate)

cAMP – ciklički adenozin-monofosfat

MAP – mitogen aktivirajući protein

EGF – epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor)

ATRAP – protein povezan s AT receptorom (engl. AT receptor associated protein)

ARB – AT receptor blokeri (engl. AT1 receptor blocker)

ACh – acetilkolin (engl. acetylcholine)

AChID – acetilkolin potaknuta dilatacija (engl. acetylcholine-induced dilation)

SNP – natrij nitroprusid (engl. sodium nitroprusside)

1. UVOD

1.1. Mikrocirkulacija i uloga endotela

Kardiovaskularni sustav kao jednu od svojih brojnih zadaća ima i osiguravanje dostatnog protoka krvi kroz organske sustave i organe u tijelu, a potom ga oni lokalno reguliraju prema trenutačnim metaboličkim okolnostima. Pri regulaciji lokalnog krvnog protoka, otporničke krvne žile izvršavaju zadaću kardiovaskularnog sustava. One pružaju najveći otpor krvnom protoku i svojim djelovanjem sudjeluju u održavanju sustavnog krvnog tlaka. Upravo su poremećaji perifernog otpora kod otporničkih krvnih žila glavni faktori nastanka raznih patoloških stanja kardiovaskularnog sustava (1).

Histološki, stijenke krvnih žila građene su od endotelne stanice i stanice glatkog mišića (VSMC). Endotel predstavlja granicu između krvi unutar krvnih žila i okolnog tkiva. Štoviše, otpuštajući razne vazoaktivne posrednike, endotel utječe na aktivnost VSMC. Ta aktivnost podrazumijeva promjenu u promjeru krvnih žila (2). Endotel je strukturno vrlo jednostavan organ, oblaže cjelokupno krvožilje, a prosječna težina iznosi mu otprilike jedan kilogram. Stanice koje ga sačinjavaju su iznimno dinamične te imaju važnu metaboličku i sintetsku ulogu. Zahvaćajući VSMC, trombocite i leukocite, endotelne stanice ispoljavaju svoje autokrino, parakrino te endokrino djelovanje (3,4).

Endotel aktivno kontrolira izmjenu molekula u odgovoru na molekularne signale te kontrolira vaskularnu permeabilnost. Nadalje, sudjeluje u održavanju vaskularnog tonusa i upravo su promjene vaskularnog protoka isprepletene s djelovanjem endotela. U situacijama nagle promjene protoka krvi (žilni stres) endotel ima sposobnost izazivanja vazodilatacije svojim endokrinim djelovanjem tj. otpuštanjem vazoaktivnih posrednika. Točnije, aktivacijom endotela kao odgovor na različite podražaje može doći do promjena u permeabilnosti endotela, sekreciji citokina, privlačenju leukocita iz cirkulacije, stimulacije vazokonstrukcije te povećanoj sklonosti ka stvaranju tromba. Ove promjene događaju se u patološkim stanjima poput septičnog šoka, dijabetesa, hipertenziji (5). Iz tog nam razloga proučavanje endotela i razumijevanje njegove aktivnosti doprinosi jasnijem razumijevanju patogeneze kao i terapije za mnoge bolesti.

Disfunkcija endotela ima štetne funkcionalne posljedice na vaskulaturu, uključujući remodeliranje vaskulature. Disfunkcija se povezuje s oslabljenim protokom krvi kroz tkiva posebice inducirana stresom i paradoksalnom vazokonstrukcijom većih krvnih žila. Oksidacija lipoproteina niske gustoće, inaktivacija dušikovog monoksida (NO) nakon oslobađanja iz

endotelnih stanica ili smanjena sinteza i oslobađanje NO-a iz endotela su svi mogući mehanizmi kojima dolazi do endotelne disfunkcije. Međutim, postoje brojne opcije za vraćanje endotela u prvobitno stanje poput primjene prekursora NO-a, snižavanje razine kolesterola u krvi, tjelovježba, konzumacija antioksidansa (vitamin C) i sl. (6).

1.2. Protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation, FID)

Protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation, FID) bitan je fiziološki stimulans regulacije vaskularnog tonus i homeostaze periferne cirkulacije. To je endotelni mehanizam koji se odvija posredovanjem vazoaktivnih posrednika iz endotela, a događa se u cjelokupnom krvožilju organizma (7). Brojna istraživanja dokazala su kako do povećanja žilnog stresa dolazi upravo povećanjem protoka u krvnim žilama sa stalnim promjerom. Također, jedino kod arteriola s očuvanom endotelnom funkcijom putem protokom potaknute dilatacije može doći do povećanja promjera krvnih žila (8).

Tijekom strujanja povećanje smicanja potiče otpuštanje vazoaktivnih tvari iz endotela, uključujući NO, prostacikline te iz endotela hiperpolarizirajuće faktore. Određena istraživanja ukazala su na najistaknutiju ulogu upravo NO-a u održavanju dilatacije krvne žile. Isto tako, dokazano je kako povećani oksidativni stres smanjuje razinu dostupnog NO-a pa tako i razinu protokom potaknute dilatacije (9).

1.3. Renin-angiotenzin sustav (RAS)

Renin-angiotenzin sustav (RAS) glavni je homeostatski sustav za kontrolu volumena tjelesnih tekućina, ravnotežu elektrolita, krvni tlak, normalnu inervaciju i endokrinu funkciju. Povezan je s djelovanjem kardiovaskularnog sustava te je od presudne važnosti za održavanje arteriolarne strukture i vaskularne reaktivnosti. RAS ispoljava svoje djelovanje putem molekule angiotenzina II (ANG II), koji se veže za specifične angiotenzin receptore na membranama stanica raznih tkiva, isto tako i u vaskulaturi (10).

ANG II svojim prijenosom signala utječe na brojne organske sustave i organe (vaskulatura, srce, bubreg, mozak) te na upale, metaboličku disfunkciju i proces starenja (11). Samim time ANG II ima sposobnost aktivacije stanica koje reguliraju izražaj mnogih tvari, uključujući faktore rasta, citokine, kemokine i adhezijske molekule koji su uključeni u rast stanica ili apoptozu, fibrozu i upalu (12).

U sintezi ANG II sudjeluju njegovi prekursori uz pomoć enzima za konverziju (angiotenzin-konvertirajući enzim, ACE) i djelovanje renina. Po svojoj kemijskoj strukturi, renin je

proteinski enzim sintetiziran u bubregu. Njegova sinteza potaknuta je sniženjem arterijskog tlaka, a može se sintetizirati u inaktivnom obliku tj. kao prorenin. Prorenin se skladišti zatim u jukstaglomerularnim (JG) stanicama, a one su zapravo modificirane glatke mišićne stanice. Anatomski, pronalazimo ih uz bubrežni glomerul unutar stijenke aferentnih arteriola. Zbog specifičnosti smještaja JG stanica, podložne su osjetljivosti pod utjecajem promjene krvnog tlaka (13). Stoga, pri sniženju krvnog tlaka, u njima dolazi do cijepanja prorenina i posljedično, nastanka i otpuštanja renina. Dio oslobođenog renina ulazi u krvotok bubrega i zatim se širi cirkulacijom po čitavom tijelu, a ostatak se zadrži u bubrežnim tekućinama. Kao što je prethodno navedeno, renin je enzim i njegovim djelovanjem nastaje dekaeptid angiotenzin I (ANG I). Supstrat te reakcije je plazmatski globulin angiotenzinogen. Kroz period cirkuliranja renina u krvotoku (30-60 min), on inducira sintezu ANG I. Nekoliko sekundi do minuta uslijed njegove sinteze, dolazi do odvajanja dvije aminokiseline s ANG I te nastaje oktapeptid ANG II. Ovu reakciju katalizira enzim za pretvorbu angiotenzina lociran u endotelu malih plućnih krvnih žila. Reakcija se ne odvija isključivo u plućima već postoje i lokalni enzimi za pretvorbu angiotenzina u npr. bubrežima i krvnim žilama (14).

ANG II pripada skupini hormona koji se vežu za receptore na staničnoj površini (14). U ljudskom organizmu dosad su otkrivena dva angiotenzinska receptora, AT1 i AT2. Oba imaju brojne utjecaje pri kontroliranju vaskulature i posebice mikrocirkulacije. Posredovanjem obaju receptora, ANG II ostvaruje svoj učinak na krvne žile i endotel (15).

Za ovo istraživanje usredotočiti ćemo se na AT1 receptore. Sastavljeni su od 359 aminokiselina te pripadaju superobitelji receptora staničnih površina u ljudi, poznatim kao receptori vezani za G-protein. Karakterizira ih građa od sedam hidrofobnih transmembranskih domena. Signal se kod ovih receptora prenosi putem heterotrimernog ($\alpha\beta\gamma$) posrednika koji je u inaktivnom stanju vezan za gvanozin-difosfat (GDP). Kada dođe do vezanja ANG II za receptor, mijenja se položaj podjedinica posrednika. Točnije, GDP zamjeni gvanozin-trifosfat (GTP) na α -podjedinici te se zajedno odvoje od ostatka ($\beta\gamma$) intermedijera. Odvojena α -podjedinica potom se veže za efektor pri čemu ga aktivira. Efektori mogu biti: Ca^{2+} , Cl^- ili K^+ kanali, fosfolipaza C, protein kinaza C, tirozin kinaze i sl. (16).

Jedan od osnovnih načina preko kojih se ostvaruje vazokonstrikcija s ANG II preko prijenosa signala s AT1 receptorima jest upravo inhibicija adenilil ciklaze koja posljedično dovodi do smanjivanja intracelularnih vrijednosti cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP). Međutim, unutar stanice aktivacijom AT1 receptora dolazi do aktivacije drugih glasnika poput fosfolipaze

C, IP₃, diacilglicerola, mobilizacije Ca²⁺ te potom aktiviranja protein kinaze C (17). AT₁ receptori provode signale Ca/IP₃ signalnim putem, što za posljedicu ima akutni odgovor poput kontrakcije endotela krvnih žila. Aktivira se i MAP (mitogen-aktivirajući protein) kinaza i EGF (epidermalni faktor rasta, engl.epidermal growth factor) receptora na membrani stanice (18).

Što se tiče lokalizacije i ekspresije AT receptora, i AT₁ i AT₂ široko su rasprostranjeni po ljudskom organizmu. Posebice ih možemo pronaći na područjima bitnim za kontrolu krvnog tlaka kao što su endotel krvnih žila, bubrezi, srž nadbubrežne žlijezde, mozak itd. Pri samoj reakciji vezanja ANG II za AT₁ receptor, protein povezan s angiotenzinskim receptorom – ATRAP (engl. angiotensin receptor-associated protein) pomaže tako što stabilizira receptor. Izuzev vazokonstrikcije, AT₁ sudjeluje i u induciranju sekrecije aldosterona iz nadbubrežne žlijezde i reapsorpcije natrija u proksimalnim bubrežnim tubulima preko ANG II. Također, negativnom povratnom spregom ANG II preko AT₁ receptora dovodi do inhibicije lučenja renina (19).

Losartan pripada skupini lijekova koji blokiraju AT₁ receptore (engl. AT₁ receptor blocker, ARB). To je lijek koji inhibira vezanje ANG II za AT₁ receptor te je pri tome inhibirana uobičajena vazokonstrikcija i lučenje aldosterona. Za posljedicu imamo niži krvni tlak, smanjeni otpor unutar krvnih žila, smanjeno lučenje kalija te povećano lučenje vode i natrija. Kompetitivna inhibicija Losartana prisutna je u više organskih sustava u organizmu, ali i na razini endotela.

Ranija istraživanja iz našeg laboratorija pokazala su da je supresija RAS-a (slanom hranom) uzrokovala oslabljenu o endotelu ovisnu dilatacije zbog promjene u sintezi vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline te povećanog oksidativnog stresa (20). Stoga smo željeli istražiti kakav će utjecaj na o endotelu ovisan mehanizam protokom potaknute dilatacije imati smanjena dostupnost angiotenzina II i povećan oksidativni stres, koji će nastati djelovanjem Losartana.

2. HIPOTEZA

Temeljna pretpostavka ovog istraživanja jest da će djelovanje Losartana dovesti do promjene u vazodilatacijskom odgovoru na protokom potaknutu dilataciju.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je:

- 1) odrediti djelovanje Losartana na protokom potaknutu dilataciju kod pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley), pomoću metode mjerenja protokom potaknute dilatacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalni životinjski modeli

Za istraživanje su korišteni muški Sprague-Dawley štakori starosti 9-11 tjedana. Svi štakori su iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu Osijek. Samo istraživanje provedeno je u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Štakori su podijeljeni u dvije skupine:

- 1) Kontrolna skupina (CTRL) – zdravi netretirani štakori (N = 9),
- 2) CTRL + Losartan skupina – štakori koji su primali Losartan kroz vodu za piće (N = 10).

4.2. Postupak izolacije srednje moždane arterije

Tijekom protokola životinje iz obje skupine imale su dostupnu standardnu prehranu za laboratorijske glodavce (Mucedola, Italija) s 0,4 % NaCl. Eksperimentalna skupina životinja (CTRL+Losartan) je kroz 7 dana u vodi za piće dobivala i 40 mg Losartana (dnevna doza). Osmog dana samog protokola životinje su bile žrtvovane. Nakon vaganja, anestezirali smo ih kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Poslije toga izvršili smo dekapitaciju i izolirali središnju moždanu arteriju koja je model na kojem smo određivali protokom potaknutu dilataciju na sustavu tlačnog miografa (21) (The Myograph System, DMT).

Svi eksperimentalni postupci bili su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609). Poduzete su sve mjere da bi se spriječila patnja životinja. Sva istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

4.3. Određivanje protokom potaknute dilatacije

Izolirana žila postavi se u komoricu i inkubira 60 minuta pri tlaku od $\Delta 80$ mmHg (P1 je 80 mmHg, P2 0 mmHg) te se zatim odredi osnovni (bazalni) promjer žile. Poslije inkubacije krvna žila je bila izložena protoku koji se postiže istodobnim promjenama ulaznog (inflow) i izlaznog (outflow) tlaka (tlačni gradijenti $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$ i $\Delta 100$ mmHg). Nakon izmjerenih bazalnih vrijednosti promjera krvne žile pri različitim gradijentima tlaka, izmjerili smo o endotelu ovisnu dilataciju u prisutnosti acetilkolina ($100 \mu\text{L}$; 10^{-6} mol/L) i o endotelu neovisna

dilatacija u prisutnosti izravnog NO donora, natrijevog nitroprusida ($100 \mu\text{L}$; 10^{-6} mol/L). Zbog gradijenta tlaka dobili smo protok pripremljene fiziološke otopine (engl. physiological salt solution, PSS) kroz postavljenu žilu. Na kraju se izmjerio maksimalni promjer krvne žile, no prethodno se PSS otopina tj. fiziološka otopina ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,005$; sastava (u mM /l): 119 NaCl, 24 NaHCO_3 , 5,5 glukoze, 4,7 KCl, 1,6 CaCl_2 , 1,18 NaH_2PO_4 , 1,17 MgSO_4 i 0,026 EDTA) u sustavu zamjenila s PSS Ca-free otopinom. Pri obradi rezultata nismo uzeli podatke krvnih žila koje nisu pokazale značajnu razinu aktivnog tonus (oko 50 %). Kroz cijeli protokol žile su snimane infracrvenom kamerom te prikazivane na monitoru, a tako smo i bilježili promjene promjera žila.

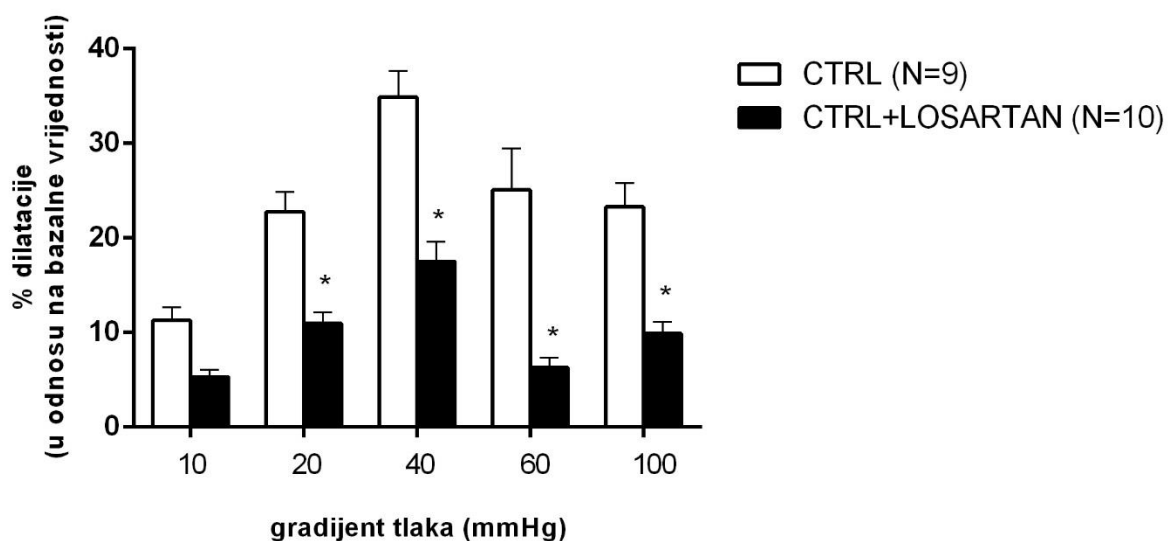
4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. Mean \pm standard error of the mean (SEM)). Za prikazivanje rezultata su korišteni statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism5. Mjerena dilatacija koja je rezultat protoka je izražena u postotku u odnosu na osnovne vrijednosti dobivene mjerenjem pri $\Delta 0 \text{ mmHg}$. Koristio se Two-Way ANOVA test (GraphPad Prism5) za ispitivanje razlika u vaskularnoj reaktivnosti među skupinama. Kod pojedinih rezultata utvrđivanja međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih grupa koristio se Studentov t-test (kod bazičnog odgovora na acetilkolinom potaknutu dilataciju i natrijevim nitroprusidom potaknutu dilataciju). Razina statističke značajnosti je postavljena na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Bazični odgovor središnje moždane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine na protokom potaknutu dilataciju

Protokom potaknuta dilatacija središnje moždane arterije značajno je smanjena u eksperimentalnoj skupini životinja, odnosno životinja koje su bile na terapiji Losartanom u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno netretirane životinje, osim pri tlačnom gradijentu od 10 mmHg (Slika 1.).

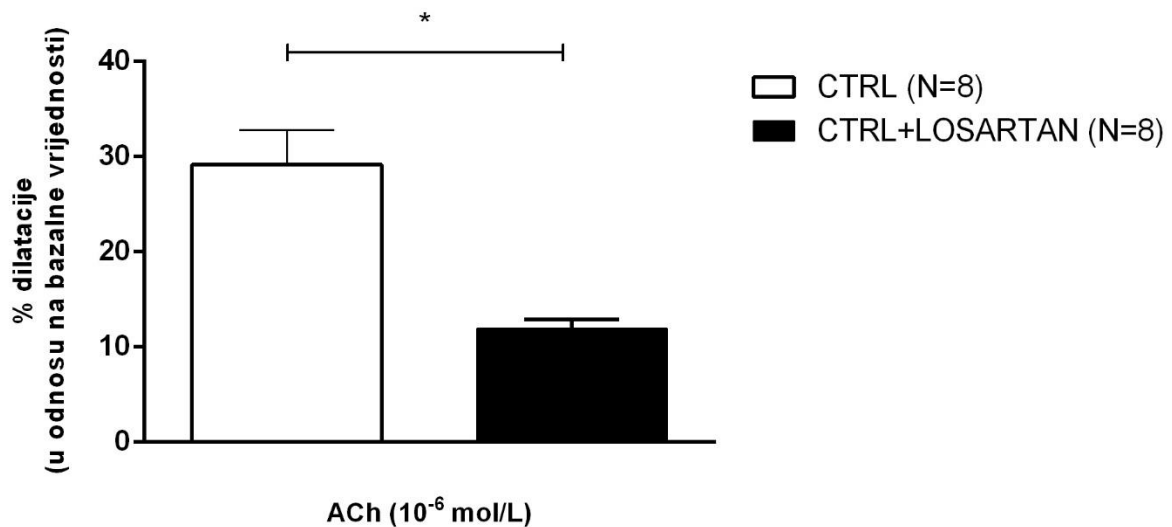


* $P < 0.05$ CTRL vs. CTRL+LOSARTAN
 CTRL - kontrola
 Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM

Slika 1. Bazični odgovor središnje moždane arterije na promjenu gradijenta tlaka kod kontrolne, netretirane skupine životinja (N = 9) i životinja na terapiji Losartanom (N = 10) izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti. P vrijednosti iznose: $\Delta 10$ P = 0,2275, $\Delta 20$ P = 0,0009, $\Delta 40 < 0,0001$, $\Delta 60 < 0,0001$ te za $\Delta 100$ P = 0,0001.

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

Dilatacijski je odgovor središnje moždane arterije skupine tretiranih životinja manje osjetljiv na dilataciju potaknutu acetilkolinom u usporedbi s kontrolnom skupinom životinjom (*Slika 2.*). Ovi podaci ukazuju na smanjenu osjetljivost središnje moždane arterije na o endotelu ovisnu dilataciju, koju uzrokuje acetilkolin, nakon terapije Losartanom.



* $P < 0.05$ CTRL vs. CTRL+LOSARTAN

CTRL - kontrola

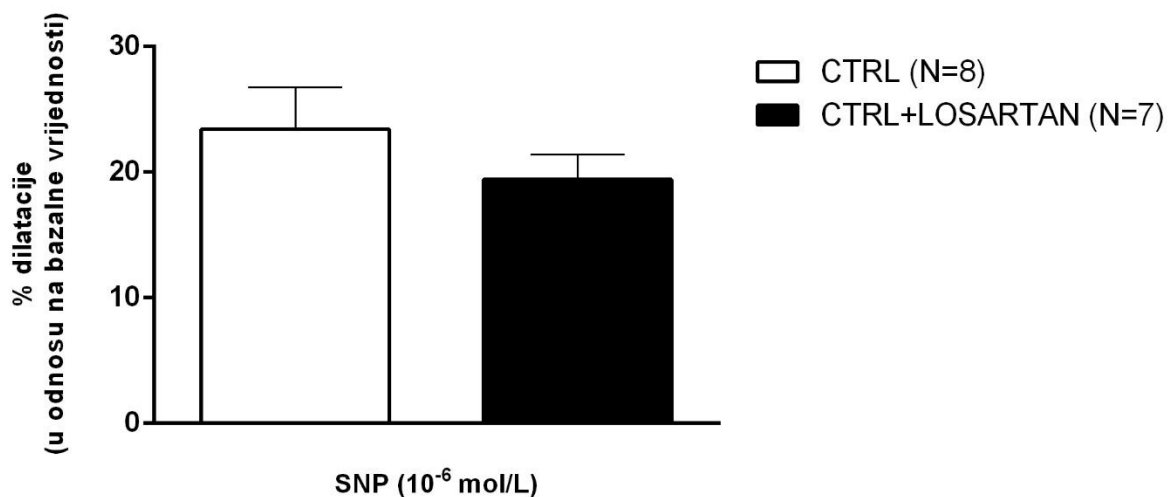
ACh - acetilkolin

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM

Slika 2. Bazični odgovor srednje moždane arterije na acetikolinom potaknutu dilataciju (AChID) u kontrolnoj i pokusnoj skupini životinja. Za ovo mjerenje korišten je Studentov t-test ($P = 0,002$).

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

Vaskularni odgovor na o endotelu neovisnog donora NO-a, natrijevog nitroprusida (SNP), je očuvan i nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (*Slika 3.*).



CTRL - kontrola
 SNP - natrijev nitroprusid
 Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM

Slika 3. Bazični odgovor središnje moždane arterije na NO donora, natrijevog nitroprusida, na protokom posredovanu dilataciju u kontrolnoj i pokusnoj skupini. Za ovo mjerenje je također korišten Studentov t-test ($P = 0,1857$).

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem dobili smo uvid u protokom, acetilkolinom te natrijevim nitroprusidom potaknutu dilataciju središnjih moždanih arterija u zdravih muških Sprague-Dawley štakora na terapiji Losartanom. Kod protokom i acetilkolinom potaknute dilatacije uočen je značajno smanjen odgovor u skupini koja je bila na terapiji Losartanom u odnosu na kontrolnu grupu štakora. Vaskularni odgovor na natrijev nitroprusid (SNP), koji je o endotelu-neovisni donor NO-a, je očuvan i nisu utvrđene razlike između ispitivanih grupa.

Razlog zbog kojeg bi protokom potaknuta dilatacija mogla biti u tolikoj mjeri smanjena vjerojatno leži u smanjenom vaskularnom odgovoru zbog blokade vezanja ANG II za AT1 receptor pod djelovanjem Losartana, čime je smanjen cjelokupni fiziološki učinak ANG II na razini endotela. S obzirom da je došlo do značajnog smanjenja pri acetilkolinom potaknutoj (o endotelu ovisna dilatacija), a pri natrijevim nitroprusidom potaknutoj dilataciji (o endotelu neovisnoj dilataciji) nije primjećeno smanjenje, možemo reći kako je osjetljivost središnje moždane arterije na endotel-ovisnu vazodilataciju smanjena nakon terapije Losartanom u zdravih Sprague-Dawley štakora. Usporedno možemo navesti kako je infuzijom ANG II u kongeničnih štakora na prehrani bogatoj soli vraćen normalan vazodilatacijski odgovor na acetilkolin središnjih moždanih arterija (22). Očuvan vaskularni odgovor na NO donora (SNP) potvrđuje kako je smanjena vazodilatacija uzrokovana upravo smanjenom funkcijom endotela, s obzirom da mehanizam kojim SNP izaziva dilataciju zaobilazi endotel.

Mehanizmi djelovanja ANG II i AT1 receptora u zdravoj populaciji nisi proučavani u tolikoj mjeri kao u hipertenzivnih pacijenata i pacijenata s rizikom od kardiovaskularnih komplikacija. Iz tog razloga, ne možemo sa sigurnošću objasniti mehanizam u zdravih modela, ali postoje indikacije da blokada AT1 receptora ima različite učinke na zdrave odnosno hipertenzivne ispitanike ili ispitanike oboljele od metaboličkih poremećaja (23).

7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedenog istraživanja mogu se izvesti zaključci:

- 1) Losartan narušava protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije tretiranih štakora;
- 2) Terapija Losartanom smanjuje osjetljivost središnje moždane arterije tretiranih štakora na acetilkolin, odnosno značajno smanjuje vaskularni odgovor na o endotelu ovisnu vazodilataciju;
- 3) Odgovor središnje moždane arterije na dodatak o endotelu–neovisnog donora NO-a natrijevog nitroprusida podjednak je u obje skupine.

8. SAŽETAK

CILJ: Odrediti utjecaj terapije Losartanom na protokom potaknutu dilataciju (FID) u zdravih Sprague-Dawley štakora.

MATERIJALI I METODE: Za istraživanje su korišteni zdravi muški Sprague-Dawley štakori te su podijeljeni u kontrolnu grupu (CTRL, N = 9) i CTRL + Losartan grupu (N = 10) koja je u vodi za piće primala 40 mg Losartana dnevno kroz 7 dana. Osmi dan životinje su žrtvovane. Prije anesteziranja kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (0,5 mg/kg), pokusne životinje se izvažu. Slijedila je dekapitacija i izolacija središnje moždane arterije te njeno postavljanje na sustav tlačnog miografa (The Myograph System, DMT) za primjenu metode protokom potaknute dilatacije. Arteriju smo postavili na komoricu, inkubirali ju 60 minuta pri tlaku $\Delta 80$ mmHg za procjenu bazalnog promjera. Nakon inkubacije, arterija je izložena protoku koji dobivamo istovremenim promjenama ulaznog i izlaznog tlaka uz tlačne gradijente $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$, $\Delta 100$ mmHg, te je nakon bazalnog mjerenja, mjerena dilatacija u prisutnosti acetilkolina (ACh) i natrijevog nitroprusida (SNP). Na kraju eksperimenta PSS otopina, koja je protokom stvarala gradijent tlaka, zamijenjena je PSS Ca-free otopinom zbog mjerenja maksimalnog promjera arterije.

REZULTATI: Rezultati pokazuju smanjen dilatacijski odgovor na protokom potaknutu dilataciju i smanjenu osjetljivost na acetilkolin u eksperimentalnoj skupini, odnosno kod životinja koje su bile na terapiji Losartanom, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih netretiranih štakora. Odgovor na SNP, koji je izravni donor NO-a, bio je podjednak u obje skupine.

ZAKLJUČAK: Istraživanjem smo dokazali kako Losartan smanjuje vazodilatacijski odgovor središnje moždane arterije na o endotelu ovisan stimulus, odnosno na protokom potaknutu dilataciju i acetilkolin.

Ključne riječi: acetilkolin, endotel, Losartan, protokom potaknuta dilatacija, središnja moždana arterija

9. SUMMARY

The effect of Losartan on flow-induced dilation in healthy Sprague-Dawley rats

AIM: Determine the effect of Losartan therapy on the flow-induced dilation (FID) in healthy Sprague-Dawley male rats.

MATERIALS AND METHODS: Healthy male Sprague-Dawley rats were used for the study and they were divided into a control group (CTRL, N = 9) and a CTRL + Losartan group (N = 10), which received a daily dose of 40 mg of Losartan in their drinking water for 7 days. On the 8th day they were sacrificed. Prior to anesthesia with the combination of ketamine (75 mg/kg) and midazolam (0,5 mg/kg), the experimental animals were weighed. The middle cerebral artery was isolated and set for flow induced dilation measurements (on a pressure myograph system, The Myograph System, DMT). After the incubation (60 minutes at the pressure of $\Delta 80$ mmHg), the arteries were exposed to the flow, which is obtained by simultaneous changes of in-flow and out-flow pressure with pressure gradients of $\Delta 10$, $\Delta 20$, $\Delta 40$, $\Delta 60$, $\Delta 100$ mmHg. After the measurement of basal response, the vascular response was measured in the presence of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP). At the end of the experiment, the PSS solution, which generated the pressure gradient through flow, was replaced by a PSS Ca-free solution for the purpose of measuring the maximum artery diameter.

RESULTS: The results showed that the flow induced dilation was decreased in the experimental group of rats that were on Losartan therapy, and dilation to acetylcholine was also reduced in the group of Losartan treated rats, compared to the control group of healthy untreated rats. The response to the direct NO donor, sodium nitroprusside, was not significantly different between the tested groups.

CONCLUSION: Losartan reduces the vasodilation response of the middle cerebral artery to the endothelium-dependent stimulus, that is, to the flow-induced dilation, as well acetylcholine.

Key words: acetylcholine, endothelium, flow-induced dilation, Losartan, middle cerebral artery

10. LITERATURA

- 1) Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija – udžbenik. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
- 2) Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *Jvasc Res* 2001; 38:1-12.
- 3) Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004; 93:105-13.
- 4) Hinsbergh WM van. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 1997;17:1018-23.
- 5) Moreira MB, Garcia-Cardena G, Lumertz Saffi MA, Libby P. Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes. 2018, Pages 485-491.
- 6) Drexler H, Hornig B. Endothelial Dysfunction in Human Disease. *JMCC*. 1999 Jan: Vol 31, Pages 51-60.
- 7) 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.
- 8) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
- 9) Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*.1994;74:416-421.
- 10) Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. HighSalt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney & blood pressure research*.2011;34:1-11.
- 11) Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V i sur. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1627-1738.
- 12) Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res*. 2000;86: 1187–1189.
- 13) Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Aug;287(2):F329-35. Epub 2004 Apr 13.
- 14) Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW i Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

- 15) Cavanagh EM de, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens*. 2010 Dec;23(12):1318-25.
- 16) Hughes AD. Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle. *Journal of Human Hypertension* (1998) 12, 275–281
- 17) Watts SW, Kanagy NL, Lombard JH. *Microcirculation: Chapter - Receptor-Mediated Events in the Microcirculation*. 2. izd. 2008, Pages 285-348.
- 18) Wong MKS. *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research; Chapter 29 – Renin-Angiotensin System*. 2016, Pages 253-254, e29-2-e29-3.
- 19) Harrison DG, Luther JM. *Vascular Medicine: A companion to Braunwald's Heart Disease (Second Edition); Chapter 6 – Vascular Pharmacology*. 2013, Pages 75-93.
- 20) Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, Vukovic R, Drenjancevic I. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
- 21) Grizelj I, Cavka A, Bian JT, Szczurek M, Robinson A, Shinde S, Nguyen V, Braunschweig C, Wang E, Drenjancevic I, Phillips SA. Reduced flow-and acetylcholine-induced dilations in visceral compared to subcutaneous adipose arterioles in human morbid obesity. *Microcirculation*; 2015; Jan;22(1):44-53.
- 22) 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 Jun;26(6); 739-747.
- 23) Reed R, Kolz C, Potter B, Rocic P. The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jan;28(1):61-7

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Dora Rudić

Datum i mjesto rođenja: 17.3.1997., Osijek, Hrvatska

Adresa: Primoštenska 12, 31327 Bilje

Telefon: 099/829 02 09

E-mail: dorarudic173@gmail.com

Obrazovanje:

2004.-2011. Osnovna škola Bilje, Bilje

2011.-2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija Osijek

2015.-2018. Medicinski fakultet Osijek