

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Petra Jakšić

**ULOGA TEMPOL-A NA PROTOKOM
POTAKNUTU DILATACIJU KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA
TERAPIJI LOSARTANOM**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Petra Jakšić

**ULOGA TEMPOL-A NA PROTOKOM
POTAKNUTU DILATACIJU KOD
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA
TERAPIJI LOSARTANOM**

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 ima 20 stranica i 2 slike.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Renin-angiotenzin sustav	1
1.2. Građa krvnih žila i funkcija endotela	2
1.2.1. Uloga endotela u regulaciji vaskularnog tonusa	2
1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID)	3
1.4. Reaktivni kisikovi radikali i oksidativni stres	3
1.5. Antioksidansi	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJ	7
4. MATERIJALI I METODE	8
4.1. Eksperimentalne životinje	8
4.2. Izolacija moždane arterije	8
4.3. Postupak mjerenja promjera krvne žile	9
4.4. Statističke metode	9
5. REZULTATI	10
5.1. Učinak <i>in vitro</i> primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju središnje možane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine	10
6. RASPRAVA	12
7. ZAKLJUČAK	14
8. SAŽETAK	15
9. SUMMARY	16
10. LITERATURA	17
11. ŽIVOTOPIS	20

POPIS KRATICA

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim

ANG II – angiotenzin II

AT1 – tip 1 receptor angiotenzina II

cAMP – ciklički adenozin monofosfat

CTRL – kontrolna grupa

ED – endotelna disfunkcija

EDCF – endotelni čimbenici kontrakcije (engl. endothelial-derived constricting factors)

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

ET-1 – endotelin-1

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

HO[•] – hidroksilni radikal

H₂O₂ – vodikov peroksid

JG – jukstaklomerularne stanice

LDL – lipoprotein niske gustoće (engl. low-density lipoprotein)

L-NAME – N ω -nitro-L-arginin metil ester

NO – dušikov oksid (engl. nitric oxide)

O₂^{•-} – superoksidni radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit

PGI₂ – prostaglandin

RAS – renin-angiotenzin sustav

ROS – reaktivni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

RO₂[•] – peroksilni radikal

SOD – superoksid dismutaza

1. UVOD

1.1. Renin-angiotenzin sustav

Renin-angiotenzin sustav (RAS) jedan je od najvažnijih hormonskih sustava koji nadgleda funkcije kardiovaskularnog sustava, bubrega i nadbubrežne žlijezde, regulira krvni tlak, volumen tekućine i ravnotežu natrija i kalija. Renin je aktivni proteolitički enzim koji nastaje proteolizom prekursora prorenina, a odgovoran je za razne fiziološke funkcije, uključujući i kontrolu krvnog tlaka. Glavni izvor renina su bubrežne jukstaglomerularne stanice (JG) koje otpuštaju renin iz granula u krvotok (1). Otpuštanje renina potiče smanjen arterijski tlak u bubregu, simpatička aktivacija te smanjena dostava ili povećava koncentraciju natrija u distalnim tubularnim kanalčićima. U cirkulaciji renin djeluje na svoj supstrat angiotenzinogen, koji se sintetizira u jetri. Renin odcjepljuje od angiotenzinogena decapeptid angiotenzin I, a on se cijepa angiotenzin-konvertirajućim enzimom (ACE) u fiziološki aktivni vazokonstriktorski oblik angiotenzin II (ANG II) (2).

ANG II je glavni efektor renin-angiotenzin sustava te ima nekoliko bitnih uloga: a) djeluje vazokonstriktorno na krvne žile, b) djeluje na nadbubrežnu žlijezdu kako bi pojačao lučenje aldosterona koji održava ravnotežu vode i elektrolita, c) aktivira simpatikus, d) potiče fibrozu, hipertrofiju i proliferaciju (3). Posrednici djelovanja ANG II su AT1 receptori koji se nalaze u krvnim žilama, bubregu i jetri te AT2 koji se nalaze u srži nadbubrežne žlijezde, mozgu itd. (4). AT1 receptori posrednici su u aktivnostima koje imaju potencijalno štetne posljedice; može doći do nastanka oksidativnog stresa, upalnih procesa i ateroskleroze (5). Za sprječavanje nastanka štetnih posljedica ANG II odgovorni su antagonisti AT1 receptora. Oni onemogućuju vezanje ANG II na receptore čime se smanjuje njegova biodostupnost (6). Danas se koriste za liječenje različitih patoloških stanja, uključujući hipertenziju, dijabetičku nefropatiju, kongestivno zatajenje srca, mikroalbuminuriju itd. (7). U nekim istraživanjima dokazano je da supresija Ang II uzrokuje produkciju ROS-a u stijenkama krvnih žila, a kao posljedica toga nastaje oštećenje funkcije krvne žile (8).

1.2. Građa krvnih žila i funkcija endotela

Unutrašnji sloj krvne žile naziva se Tunica intima, a izgrađuju ga endotelne stanice. Preostala dva dijela žile su Tunica media koja je odgovorna za vazodilataciju i vazokonstrikciju, a čine ju slojevi glatkih mišićnih stanica, i Tunica adventicia, vanjski sloj, koji se sastoji od vezivnog tkiva, a omogućuje adheziju za susjedne organe (9).

Cijeli krvožilni sustav obložen je endotelom, vrlo dinamičnim, višefunkcionalnim organom. Endotelne stanice, koje imaju i sintetičku i metaboličku ulogu, ključne su u održavanju vaskularnog tonusa i vaskularne homeostaze. Homeostaza se održava pomoću medijatora čija lučenja reguliraju otpuštanje vazoaktivnih tvari, proliferaciju glatkih mišićnih stanica, hemostazu i koagulaciju, migraciju leukocita, metabolizam lipida, izlučivanje citokina (10, 11). Endotelne stanice djeluju i kao polupropusna barijera koja omogućuje prijenos molekula iz krvi u intersticij i stanice dok svojom autokrinom, parakrinom i endokrinom funkcijom djeluju na različite stanične linije; mišićne stanice, leukocite, trombocite, ali i mnoga druga tkiva (12).

1.2.1. Uloga endotela u regulaciji vaskularnog tonusa

Endotel izlučujući vazoaktivne medijatore djeluje na promjenu strukture i funkcije glatkog mišićja. To su dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI_2) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (EDHF, engl. endothelial-derived hyperpolarizing factor). Poznati su pod nazivom endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors, EDRF). Oslobađaju se na podražaj hormona, neurotransmitera i mehaničkog žilnog stresa, a uzrokuju vazodilataciju glatkih mišićnih stanica (10, 13). Osim EDRF postoje i endotelni čimbenici kontrakcije (engl. endothelial-derived constricting factors, EDCF) koji također uzrokuju kontrakciju, a to su endotelin-1 (ET-1) i tromboksan (TxA_2) (12).

Dušikov oksid je slobodni radikal koji nastaje iz L-arginina, a sintetizira ga endotelna NO sintetaza. Osim što je bitan vazodilatator, NO sprječava agregaciju i adheziju trombocita, migraciju leukocita, oksidaciju LDL-a te proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Povećana razina unutarstaničnog kalcija dovodi do aktivacije fosfolipaze A koja uzrokuje otpuštanje arahidonske kiseline iz fosfolipida. Enzim ciklooksigenaza-1 iz arahidonske kiseline sintetizira prostaglandin H_2 iz kojeg nastaje drugi vrlo važan EDRF prostaciklin. Uz njega nastaje i endotelni čimbenik kontrakcije tromboksan, koji zajedno s PGI_2 održava stalne

uvjete krvne žile (13, 14). Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici, kao što su ciklički adenzin monofosfat (cAMP), metaboliti citokroma P450, NO, slobodni radikali kisika i drugi, uzrokuju hiperpolarizaciju manjih krvnih žila kada je inhibirano djelovanje NO i PGI₂ (13).

1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID)

Vazodilatacija uzrokovana opuštanjem glatkih mišićnih stanica uzrokuje povećanje protoka krvi zbog smanjene otpornosti na krvožilni sustav. Stoga proširenje krvnih žila dovodi do neposrednog smanjenja krvnog tlaka (14). Protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation, FID) važan je fiziološki mehanizam koji regulira vaskularni tonus i homeostazu (15). Cijeli taj mehanizam održava se pomoću već spomenutih vazoaktivnih medijatora koje proizvodi endotel krvnih žila. Jedno od glavnih svojstava normalne funkcije endotela je mogućnost izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka koju uzrokuje žilni stres (13). Ispitivanja na životinjama pokazala su da se prilikom povećanja krvnog protoka povećava i promjer krvne žile samo kod dobro očuvanog endotela (14, 15).

Pri endotelnoj disfunkciji (ED), koja podrazumijeva oštećenje endotela i njegove funkcije, dolazi do poremećaja vazodilatacijske sposobnosti ovisne o endotelu. Karakterizira ju fenotip koji je obrnut normalnom endotelu (16); dolazi do vazokonstrikcije, povećane propusnosti endotela za makromolekule, povećanje ekspresije adhezijskih molekula, proliferacije i migracije glatkih mišićnih stanica, stvaranja prokoagulacijskih molekula, trombina, agregacije i adhezije trombocita i odlaganja fibrina (12).

1.4. Reaktivni kisikovi radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su kemijski, vrlo nestabilni i reaktivni spojevi koji u svojoj vanjskoj orbitali imaju jedan ili više nesparenih elektrona te da bi ga sparili, reagiraju s organskim i anorganskim molekulama kao što su lipidi, ugljikohidrati, nukleinske kiseline i proteini i pritom ih oštećuju. Najznačajniji i najzastupljeniji slobodni radikali u našem organizmu su reaktivni kisikovi radikali, ROS (engl. Reactive Oxygen Species) i reaktivni dušikovi spojevi (RNS) kao što je NO koji je biokemijski značajni slobodni radikal. Među ROS ubrajamo superoksidni radikal (O₂^{•-}), peroksilni radikal (RO₂[•]), hidroksilni radikal (HO[•]), singlet kisika, a od neradikala vodikov peroksid (H₂O₂), hipoklorit itd. Primarnim kisikovim

radikalom smatra se $O_2^{\cdot-}$ koji u reakcijama s ostalim molekulama direktno ili indirektno stvara sekundarne radikale (17). U upalnim stanjima stanice imunskog sustava stvaraju i $O_2^{\cdot-}$ i NO koji, ako su u blizini, skupa reagiraju te formiraju peroksinitrit ($ONOO^-$) koji je vrlo toksičan (18). Takva lančana reakcija u kojoj jedan ROS stvara drugi tipična je za slobodne radikale (19). U organizmu male količine ROS-a dio su normalne fiziologije, a nastaju na respiracijskom lancu unutar mitohondrija, gdje su neophodni za stvaranje energije te u obrani organizma od patogena. Mogu nastati i u enzimskim reakcijama redukcije te reakcijama autooksidacije (19).

Pretjerano nakupljanje slobodnih radikala, bilo zbog povećane količine ROS-a ili smanjene količine antioksidansa, u organizmu dovodi do oksidativnog stresa, tj. poremećaja ravnoteže oksidacijsko-redukcijskih reakcija. Pritom dolazi do pojačane oksidacije, a kao posljedica toga stvaraju se velike količine ROS-a (20). Oksidativni stres uzrokuje poremećaje fiziološke funkcije pa tako mijenja i funkciju endotela krvnih žila.

1.5. Antioksidansi

Kisik je kemijski element koji je zbog svoje elektronske konfiguracije vrlo toksičan, no unatoč tomu neophodan je za preživljavanje aerobnog organizma. Kako bi se obranio od njegove toksičnosti, organizam je razvio spojeve koji se nazivaju antioksidansi. Oni održavaju nisku razinu slobodnih radikala, dopuštajući im da obavljaju korisnu biološku funkciju bez nanošenja velike štete organizmu (18). Antioksidansi formiraju nekoliko mehanizama, a oni uključuju sprječavanje nastanka i uklanjanje ROS-a te popravak i uklanjanje oštećenih molekula (21). Dijelimo ih na izvanstanične (transferin, haptoglobin itd.), stanične (superoksid dismutaza, SOD; Zn/Cu SOD i Mn SOD, katalaza, glutation peroksidaza te vitamin C) i membranske (α -tokoferol, β -karoten) (21). Antioksidansi kao što su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) i glutation poboljšavaju funkciju endotela i bioaktivnost NO (22).

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-a 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-a i njegovih učinaka na

hipertenziju i endotelnu funkciju (23). Reakcija TEMPOL-a sa superoksidnim anionom ($O_2^{\cdot-}$) i formiranje vodikova peroksida (H_2O_2) je kao oponašanje („mimetic“) superoksid dismutaze (SOD), primarni antioksidativni enzim (24). Osim toga, metabolizira, detoksicira te sprječava stvaranje ili djelovanje hidroksilnog aniona, singlet kisika, peroksidnog radikala i mnogih drugih ROS-a (25). Pospješuje i biodostupnost NO-a i katalitički uklanja visoko reaktivne peroksinitrite ($ONOO^-$) koji nastaju reakcijom između $O_2^{\cdot-}$ i NO (23).

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da će djelovanjem Losartana protokom potaknuta dilatacija biti narušena zbog povećane razine oksidativnog stresa te da će TEMPOL oporaviti narušenu protokom potaknutu dilataciju smanjujući razinu oksidativnog stresa.

3. CILJ

Cilj ovog istraživanja je:

- 1) odrediti učinak TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju kod pokusnih životinja (štakori soja Sprague-Dawley) na terapiji Losartanom pomoću metode mjerenja protokom potaknute dilatacije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije Medicinskog fakulteta u Osijeku. Korišteni su Sprague-Dawley (SD) muški štakori u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Svi su štakori iz vlastitog uzgoja Vivarija pri Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Štakori su podijeljeni u dvije skupine:

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

Pri trajanju protokola životinje će iz obje skupine imati dostupnu standardnu hranu za laboratorijske glodavce (Mucedola, Italija) sa 0,4 % udjelom natrijeva klorida. Skupina CTRL + Losartan će u vodi za piće primiti 40 mg Losartana (dnevna doza) kroz 7 dana te će životinje biti žrtvovane 8. dan.

4.2. Izolacija moždane arterije

Model na kojem se određuje ranije opisana protokom potaknuta dilatacija (26) na sustavu tlačnog miografa (The Myograph System, DMT) je izolirana središnja moždana arterija koja se izolira iz mozga nakon dekapitacije. Prije dekapitacije eksperimentalne životinje se važu, a potom anesteziraju 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).

Izolirana se arterija pomoću mikrokirurškog pribora i mikroskopa očisti od vezivnog tkiva te se postavlja između dvije staklene mikropipete (vanjskog promjera ~ 100 – 200 μ m) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom (37 °C) fiziološkom otopinom (PSS, pH = $7,4 \pm 0,05$; sastava (u mM/l): 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO₄, 1,6 CaCl₂, 1,18 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 0,026 EDTA i 5,5 glukoze).

4.3. Postupak mjerenja promjera krvne žile

Nakon stavljanja u komoricu, kako bi se procijenio osnovni (bazalni) promjer žile, slijedi njezina inkubacija u trajanju 60 minuta pri tlaku $\Delta 80$ mmHg (P1 je 80 mmHg, P2 0 mmHg). Žila je cijelo vrijeme snimana infracrvenom kamerom te se slika prikazuje na monitoru, a bilježe se promjene promjera žile. Nakon inkubacije krvna će žila zatim biti 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). Gradijent tlaka rezultirat će nastankom protoka PSS otopine kroz postavljenu krvnu žilu.

Nakon što se odrede bazalne vrijednosti promjera izolirane krvne žile, mjeri se vaskularni odgovor krvne žile u prisutnosti TEMPOL-a, koji se stavljaju u komoricu na vrijeme inkubacije 20 – 30 min. Nakon inkubacije ponavlja se mjerenje promjera krvne žile ovisno o tlačnim gradijentima. Zatim se protokol mjerenja protokom potaknute dilatacije ponovio nakon zajedničke inkubacije TEMPOL-a i L-NAME-a (N ω -nitro-L-arginin metil ester), inhibitora NO sintaze. Na kraju eksperimentalnog protokola PSS otopina se u sustavu zamjenjuje PSS Ca-free otopinom. Zbog nedostatka Ca dolazi do maksimalne dilatacije krvne žile te je omogućeno mjerenje maksimalnog promjera krvne žile. Podaci onih krvnih žila koje nisu pokazivale značajnu razinu aktivnog tonusa (oko 50 %) izuzimaju se iz obrade.

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

4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. Mean \pm standard error od the mean (SEM)). Za prikazivanje rezultata korišteni su statistički programi SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc.) te GraphPad Prism5. Mjerena dilatacija koja je rezultat protoka izražena je u postotku u odnosu na osnovne vrijednosti dobivene mjerenjem pri $\Delta 0$ mmHg. Koristo se Two-way ANOVA test (GraphPad Prism 5) za ispitivanje razlika u vaskularnoj reaktivnosti među skupinama. Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

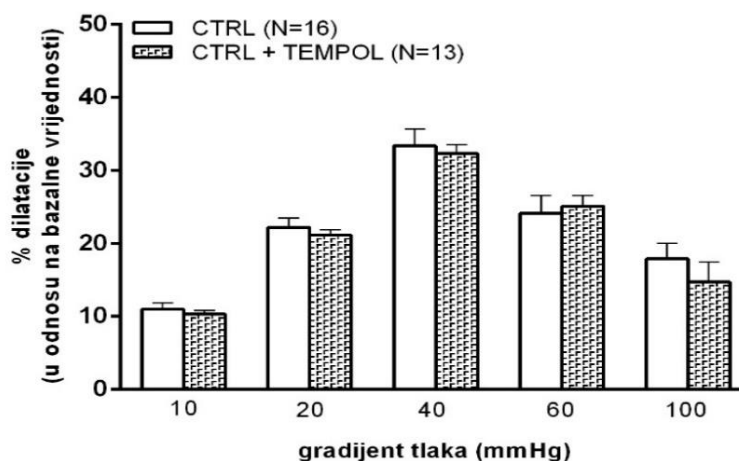
5. REZULTATI

5.1. Učinak *in vitro* primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju središnje moždane arterije kontrolne i eksperimentalne skupine

TEMPOL (100 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro* poboljšava razinu dilatacije u eksperimentalnoj skupini životinja koje su bile na terapiji Losartanom u usporedbi s njegovim bazalnim vrijednostima izmjerenim pri različitim gradijentima tlaka, a značajno pri gradijentu $\Delta 100$ mmHg (Slika 2.) dok u kontrolnoj skupini TEMPOL nije imao učinka na promjenu razine dilatacije središnje moždane arterije (Slika 1.).

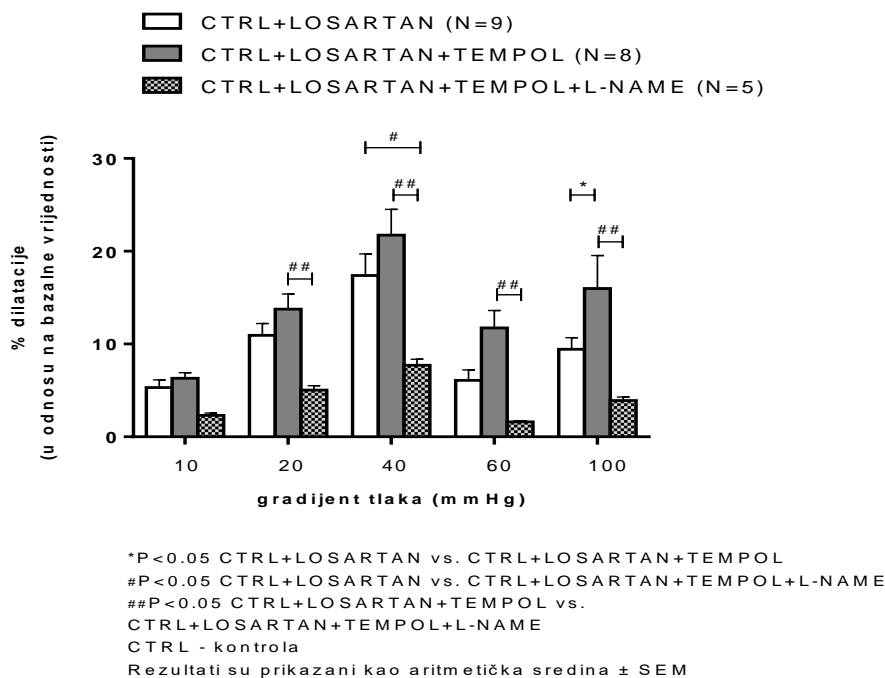
Naknadno dodan *in vitro* L-NAME (nakon TEMPOL-a) kod životinja koje su bile na terapiji Losartanom značajno smanjuje razinu protokom potaknute dilatacije pri svakom gradijentu tlaka osim pri $\Delta 10$ mmHg (Slika 2.).

Rezultati potvrđuju povećanu razinu oksidativnog stresa stvorenog prilikom terapije Losartana te njegovu nedvojbenu ulogu na smanjenu razinu protokom posredovane dilatacije središnje moždane arterije te značajnu ulogu NO-a u mehanizmu dilatacije.



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

Slika 1. Odgovor središnje moždane arterije u kontrolnoj skupini na protokom potaknutu dilataciju primjenom TEMPOL-a pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti. P vrijednosti iznose: $\Delta 10$ P < 0,9999, $\Delta 20$ P < 0,9999, $\Delta 40$ P < 0,9999, $\Delta 60$ < 0,9999 te $\Delta 100$ < 0,9999.



Slika 2. Odgovor središnje moždane arterije kod životinja na terapiji Losartanom (N=9), životinja na terapiji Losartanom u prisutnosti TEMPOL-a (N=8) te životinja na terapiji Losartanom u prisutnosti TEMPOL-a i L-NAME-a (N=5) na protokom potaknutu dilataciju pri različitim gradijentima tlaka, izražen kao postotak (%) dilatacije u odnosu na bazalne vrijednosti. P vrijednosti iznose:

$\Delta 10 P = (N=9) \text{ vs. } (N=8) = 0,9096; (N=9) \text{ vs. } (N=5) = 0,5162; (N=8) \text{ vs. } (N=5) = 0,3296$

$\Delta 20 P = (N=9) \text{ vs. } (N=8) = 0,4675; (N=9) \text{ vs. } (N=5) = 0,0838; (N=8) \text{ vs. } (N=5) = 0,0068$

$\Delta 40 P = (N=9) \text{ vs. } (N=8) = 0,1680; (N=9) \text{ vs. } (N=5) = 0,0018; (N=8) \text{ vs. } (N=5) < 0,0001$

$\Delta 60 P = (N=9) \text{ vs. } (N=8) = 0,0509; (N=9) \text{ vs. } (N=5) = 0,2352; (N=8) \text{ vs. } (N=5) = 0,0013$

$\Delta 100 P = (N=9) \text{ vs. } (N=8) = 0,0195; (N=9) \text{ vs. } (N=5) = 0,1142; (N=8) \text{ vs. } (N=5) = 0,0001$

6. RASPRAVA

Prikazana studija ispituje utjecaj primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju kod zdravih muških Sprague-Dawley štakora, odnosno štakora koji su bili na terapiji Losartanom. U prvoj smo skupini imali zdrave netretirane štakore (CTRL) dok smo u drugoj imali štakore koji su bili na terapiji Losartanom (CTRL+Losartan). Mjerenje protokom potaknute dilatacije napravljeno je prema standardiziranom protokolu na uzorcima središnje moždane arterije (26).

Glavne spoznaje ovog istraživanja su: 1) primjena TEMPOL-a kod zdravih netretiranih životinja ne dovodi do promjene razine dilatacije središnje moždane arterije; 2) TEMPOL koji djeluje kao „hvatač“ superoksida značajno oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju nastalu primjenom Losartana što dokazuje povećanu razinu oksidativnog stresa zbog djelovanja Losartana te ulogu oksidativnog stresa i slobodnih radikala u smanjenoj razini dilatacije krvne žile; 3) NO ima značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, koju smo potvrdili dodavanjem inhibitora NO sintetaze (L-NAME) u komoricu nakon inkubacije TEMPOL-om kod tretiranih životinja, nakon čega smo dobili značajno smanjenu protokom potaknutu dilataciju.

Prethodne studije iz našeg laboratorija koje su proučavale vaskularnu funkciju u različitim stanjima povećane razine oksidativnog stresa, kao što su akutna hiperbarična oksigenacija ili povećan unos soli, pokazuju kako je upravo vaskularna funkcija zapravo narušena, odnosno smanjena je osjetljivost na različite vazodilatacijske podražaje (27, 28). Rezultati ove studije pokazuju kako je i ona u skladu s našim prethodno navedenim studijama. Naime, kod zdravih netretiranih životinja ni ne očekujemo povećanu razinu oksidativnog stresa te zbog toga primjena TEMPOL-a kod te skupine životinja ne mijenja razinu dilatacije središnje moždane arterije dok ju značajno poboljšava upravo u stanju povećane razine oksidativnog stresa, a to je upravo stanje koje nastaje primjenom Losartana. Vazodilatacija kao odgovor na nagle promjene protoka (vaskularnog stresa) jedna je od glavnih uloga endotela i upravo je očuvanost endotela ključna za fiziološki mehanizam protokom potaknute dilatacije. NO ima važnu ulogu u održavanju bazalnog tonusa krvnih žila i ima središnju ulogu u vazodilataciji i glavni faktor koji uzrokuje produkciju NO upravo je sila smicanja (29). Ulogu NO-a u mehanizmu dilatacije u ovom istraživanju potvrdili smo dodavanjem L-NAME-a u komoricu nakon inkubacije TEMPOL-om kod tretiranih životinja (stanje povećanog oksidativnog stresa) kako bismo inhibirali proizvodnju NO-a, nakon čega smo dobili značajno smanjenu

protokom potaknutu dilataciju i time potvrdili važnost NO-a. Sažeto, možemo reći kako primjena Losartana narušava o endotelu ovisnu protokom potaknutu dilataciju u otporničkim moždanim krvnim žilama povećavajući proizvodnju oksidativnog stresa, što smo potvrdili dodavanjem TEMPOL-a.

7. ZAKLJUČAK

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

- 1) primjena TEMPOL-a ne dovodi do promjene razine protokom potaknute dilatacije središnje moždane arterije kod zdravih netretiranih SD štakora;
- 2) TEMPOL koji djeluje kao „hvatač“ superoksida značajno oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju nastalu primjenom Losartana, što dokazuje povećanu razinu oksidativnog stresa nastalog djelovanjem Losartana te ulogu oksidativnog stresa i slobodnih radikala u smanjenoj razini dilatacije krvne žile;
- 3) NO ima značajnu ulogu u mehanizmu protokom potaknute dilatacije, što je potvrđeno smanjenom dilatacijom nakon dodavanja inhibitora NO sintetaze (L-NAME) kod tretiranih životinja.

8. SAŽETAK

Cilj: Glavni cilj ovog istraživanja je odrediti učinak TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju kod Sprague-Dawley štakora na terapiji Losartanom.

Materijali i metode: U istraživanje su bili uključeni zdravi muški Sprague-Dawley (SD) štakori podijeljeni u dvije skupine: zdravi netretirani štakori (N = 9) te štakori na terapiji Losartanom (N = 10). Prije dekapitacije štakori su anestetizirani ketaminom (75 mg/kg) i midazolamom (0,5 mg/kg). Srednje cerebralna arterija je izolirana i inkubirana pri tlaku $\Delta 80$ mmHg. Zatim se mjerio promjer ovisno o tlačnim gradijentima, prvo bazalne vrijednosti, a zatim u prisutnosti TEMPOL-a te TEMPOL-a i L-NAME-a (inhibitor NO sintaze) ovisno o tlačnim gradijentima. Na kraju protokola odredio se maksimalni promjer krvne žile.

Rezultati: Rezultati pokazuju da TEMPOL (100 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro* poboljšava razinu dilatacije u eksperimentalnoj skupini životinja koje su bile na terapiji Losartanom dok u kontrolnoj skupini TEMPOL nije imao učinka na promjenu razine dilatacije središnje moždane arterije. Naknadno dodan *in vitro* L-NAME (nakon TEMPOL-a) značajno smanjuje razinu protokom potaknute dilatacije, što potvrđuje povećanu razinu oksidativnog stresa stvorenog djelovanjem Losartana.

Zaključak: Dokazano je da primjena TEMPOL-a ne dovodi do promjene razine protokom potaknute dilatacije središnje moždane arterije kod zdravih kontrolnih SD štakora dok kod tretiranih životinja TEMPOL značajno oporavlja narušenu protokom potaknutu dilataciju nastalu primjenom Losartana, što dokazuje povećanu razinu oksidativnog stresa nastalog djelovanjem Losartana. Značajna uloga NO-a u mehanizmu protokom potaknute dilatacije potvrđena je dodavanjem inhibitora NO sintetaze nakon inkubacije TEMPOL-om kod tretiranih životinja, nakon čega smo dobili značajno smanjenu protokom potaknutu dilataciju.

Ključne riječi: Losartan; oksidativni stres; protokom posredovana dilatacija

9. SUMMARY

Role of TEMPOL on the flow-induced dilatation in Sprague-Dawley rats on Losartan therapy

Objective: The main goal of this study was to determine the role of TEMPOL in the flow-induced dilatation in Sprague-Dawley rats on Losartan therapy.

Methods: Healthy male SD rats were divided into two groups: healthy untreated rats (N = 9) and the rats on Losartan therapy (N = 10). Prior to decapitation, the rats were anesthetized with ketamin (75 mg/kg) and midazolam (0,5 mg/kg). The middle cerebral artery was isolated and incubated at a pressure of $\Delta 80$ mmHg. After that a basal diameter values were measured depending on the pressure gradients. After the basal diameter values were determined, the blood vessel diameter was measured in the presence of TEMPOL, and TEMPOL and L-NAME (NO synthase inhibitor), depending on the pressure gradients. In the end the maximum blood vessel diameter was measured.

Results: The results show that TEMPOL (100 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro* improved the level of dilatation in experimental group of animals treated with Losartan therapy, but it did not have an effect on the level of the middle cerebral artery dilatation in the control group. Subsequent addition of *in vitro* L-NAME (after TEMPOL) significantly reduces the level of flow-induced dilatation, which confirms the increased level of oxidative stress caused by Losartan therapy.

Conclusion: TEMPOL does not change the level of flow-induced dilatation of the middle cerebral artery in healthy untreated SD rats, while in treated animals TEMPOL significantly recovers the impairment of flow-induced dilatation caused by the use of Losartan, proving the increased oxidative stress caused by Losartan. Significant role of NO in the mechanism of flow-induced dilatation was confirmed by adding NO synthase inhibitors after incubation with TEMPOL in treated animals. After that the flow-induced dilatation was significantly reduced.

Key words: Losartan; flow-induced dilatation; oxidative stress

10. LITERATURA

1. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol.* 2003; 552(Pt 3): 667–671.
2. Ljutić D, Jeličić I. Lijekovi koji djeluju na renin-angiotenzin-aldosteronski sustav. *Med.* 2010; 19(2): 139–146.
3. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261–71.
4. Ilic V, Ilic M, Magić Z. Polimorfizam gena renin angiotenzin sistema u prevenciji i lečenju dijabetesne nefropatije MD. 2012; 4(1): 043–049.
5. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264: 224–36.
6. Knežević A. Antagonisti angiotenzinskih receptora. *Kardio list.* 2010; 5(11): 270.
7. Van Zwieten PA. Angiotensin II receptor antagonists (AT₁-blockers, ARBs, sartans): similarities and differences. *Neth Heart J.* 2006; 14(11): 381–387.
8. 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 Apr; 45(4): 687–91.
9. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015; 129(2): 83–94.
10. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004; 93: 105–13.
11. Ngai CY, Yao X. Vascular Responses to Shear Stress: The Involvement of Mechanosensors in Endothelial Cells. *The Open Circulation and Vascular Journal.* 2010; 3: 85–94.
12. Čavka A, Tadžić R., Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M. Endotelna funkcija – funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn.* 2012; 44(1–4): 135–146.
13. Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol. Res.* 2014; 30(3): 141–148.
14. Siddiqui A. Effects of Vasodilation and Arterial Resistance on Cardiac Output. *J Clin Exp Cardiol.* 2011; 2: 170.

15. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, i sur. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circ.* 2001; 103(15): 1992–8.
16. Ruzic A, Miletic B, Nola AI, Persic V, Razov Radas M, Vcev A: Endotelna disfunkcija u enigmatskoj slagalici kardiovaskularnih bolesti. *Med glas* 2009; 6: 2–15.
17. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44–84.
18. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 312–322.
19. Čvorišćec D, Čepelak I, ur. Štrausova medicinska biokemija. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
20. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5): 981–990.
21. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003; 79: 195–200.
22. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5): 981–990.
23. Neil S, Huh J, Baronas V, McFarland HF, Cherukuri M, Mitchell JB i sur. Oral administration of the nitroxide radical TEMPOL exhibits immunomodulatory and therapeutic properties in multiple sclerosis models. *Brain Behav Immun.* 2017; 62: 332–343.
24. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm Rev.* 2008; 60: 418–469.
25. Beigrezaei S, Nasri H. Tempol as an antioxidant; an updated review on current knowledge. *Ann Res Antioxid.* 2017; 2(1): e01.
26. 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.
27. 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.

28. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute Hyperbaric Oxygenation, Contrary to Intermittent Hyperbaric Oxygenation, Adversely Affects Vasorelaxation in Healthy Sprague-Dawley Rats due to Increased Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Apr 29; 2018: 7406027.
29. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: S193–S201.

11. ŽIVOTOPIS

Petra Jakšić

Datum rođenja: 11. veljače 1997. god.

Adresa: Antuna Gustava Matoša 10, 31 551 Belišće, Republika Hrvatska

E-mail: petrajaksic55@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola Ivana Kukuljevića, Belišće

2011. – 2015. Srednja škola Valpovo

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku