

Utjecaj arterijskog krvnog tlaka na biljege oksidativnog stresa u novootkrivenih hipertenzivnih bolesnika

Teodosić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:849654>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

Studij medicine

Andrea Teodosić

**UTJECAJ ARTERIJSKOGA KRVNOG
TLAKA NA BILJEGE OKSIDATIVNOGA
STRESA U NOVOOTKRIVENIH
HIPERTENZIVNIH BOLESNIKA**

Diplomski rad

Osijek, 2016.

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

Studij medicine

Andrea Teodosić

**UTJECAJ ARTERIJSKOGA KRVNOG
TLAKA NA BILJEGE OKSIDATIVNOGA
STRESA U NOVOOTKRIVENIH
HIPERTENZIVNIH BOLESNIKA**

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek.

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

Rad ima 32 lista, 4 tablice i 4 slike.

Sadržaj

POPIS KRATICA	III
1. UVOD.....	1
1.1. Arterijska hipertenzija.....	1
1.2. Liječenje arterijske hipertenzije	2
1.2.1. Inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori).....	3
1.2.2. Blokatori kalcijevih kanala (kalcijevski antagonisti).....	4
1.3. Oksidativni stres	4
1.3.1. Hipertenzija i oksidativni stres.....	5
1.4. Endotelna disfunkcija.....	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. MATERIJALI I METODE.....	10
4.1. Populacija ispitanika.....	10
4.2. Protokol istraživanja.....	10
4.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	11
4.3.1. Prikupljanje uzoraka krvi.....	11
4.3.2. TBARS.....	11
4.3.3. FRAP	13
4.4. Statističke metode	14
5. REZULTATI	15
5.1. Karakteristike ispitanika.....	15
5.2. Biokemijski parametri ispitanika.....	16
5.3. Hemodinamski parametri ispitanika (promjene arterijskoga tlaka).....	17
5.4. Biokemijski parametri u 24 h urinu	18
5.5. Parametri oksidativnog stresa	19
5.5.1. TBARS.....	19
5.5.2. FRAP	20
6. RASPRAVA	21
7. ZAKLJUČCI.....	24
8. SAŽETAK.....	25

9. SUMMARY	26
10. LITERATURA	27
11. ŽIVOTOPIS.....	32

POPIS KRATICA

- TOD – ciljno oštećenje organa (engl. *target organe damage*)
- RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sustav
- GWA – cjelogenomska analiza udruženosti (engl. *genome wide association*)
- SNP – polimorfizam jednoga nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
- ACE – angiotenzin konvertirajući enzim
- AT1 – angiotenzin 1
- ROS – reaktivni oblici kisika (engl. *reactive oxygen species*)
- NO – dušikov oksid
- ACEI – skupina ACE inhibitori
- CaB – skupina kalcijских blokatora
- TBARS – engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*
- FRAP – engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*
- BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
- WHR – omjer struk–bokovi (engl. *waist- to- hip ratio*)
- RPM – okretaja po minuti (engl. *revolutions per minute*)
- ESH – Europsko društvo za hipertenziju (engl. *European Society of Hypertension*)
- TBA – tiobarbiturna kiselina (engl. *thiobarbituric acid*)
- TCA – trikloroctena kiselina (engl. *trichloroacetic acid*)
- MDA – malondialdehid
- TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazin
- HCl – klorovodična kiselina
- FeCl³ – željezo(III) klorid
- MAP – srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*)
- PP – tlak pulsa (engl. *pulse pressure*)
- CRP – C-reaktivni protein

1. UVOD

1.1. Arterijska hipertenzija

Krvni tlak varijabilna je kvantitativna osobina koja prema populacijskim studijama pokazuje normalnu distribuciju s blagim pomakom u desno. Vrijednosti krvnog tlaka sklone su promjenama, one mogu biti spontane ili pod utjecajem vanjskih faktora (1). Postoji povezanost između vrijednosti krvnog tlaka i razvoja cerebrovaskularnih bolesti, poput moždanog udara, infarkta miokarda te razvoja zatajenja srca i kronične bubrežne bolesti. Javlja se i hipertrofija lijeve klijetke, proteinurija i retinopatija, a sva oštećenja koja nastaju u tijelu kao posljedica povišenog krvnog tlaka nazivaju se ciljno oštećenje organa (engl. *target organ damage*, TOD) (2, 3). Ne postoji točna razina razgraničenja koja odvaja normalne vrijednosti krvnog tlaka od patoloških, odnosno ne postoji točna vrijednost arterijskog tlaka pri kojoj započinju kardiovaskularne i renalne komplikacije (4). Prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju optimalnim krvnim tlakom smatraju se vrijednosti niže od 120 mmHg za sistolički te vrijednosti niže od 80 mmHg za dijastolički tlak. Arterijska hipertenzija definirana je vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka ≥ 140 mmHg te dijastoličkog ≥ 90 mmHg (5). Sistolički tlak bolje korelira s oštećenjima ciljanih organa nego dijastolički (6). Hipertenzija se klasificira prema uzroku te razlikujemo primarnu i sekundarnu hipertenziju. Esencijalna, primarna ili idiopatska hipertenzija definira se kao povišen krvni tlak kod kojeg su svi sekundarni uzroci poput hiperaldosteronizma, opstrukcije renalne arterije, feokromocitoma, Cushingova sindroma te bolesti štitnjače, isključeni. Znatno je veći udio bolesnika koji boluju od esencijalne hipertenzije. Postotak oboljelih od esencijalne hipertenzije u odnosu na primarnu u različitim svjetskim centrima iznosi između 86 i 94 %. (7). Patofiziološki, u hipertenziji dolazi do povećanog perifernog otpora koji je posljedica strukturnih, funkcionalnih i mehaničkih promjena u malim otporničkim arterijama. Funkcionalne promjene uključuju oštećenu endotelnu funkciju te relaksaciju ovisnu o endotelu. Naglasak na strukturnim promjenama je u promjeni omjera medije i lumena krvne žile koji rezultira eutrofičnim ili hipertrofičnim remodeliranjem krvne žile. Posljedično, promjenama sastavnica izvanstaničnog matriksa poput kolagena I i III, fibronektina i elastina dolazi do vaskularne fibroze, a time i povećane čvrstoće arterija, odnosno promjene njezinih mehaničkih funkcija (8).

O esencijalnoj se hipertenziji danas govori kao o sindromu složene etiologije. Na razvoj utječu čimbenici okoliša, ali i genetički čimbenici i epigenetički čimbenici (9). Posljednjih nekoliko godina naglasak je na prekomjernom unosu soli kao važnom čimbeniku u razvoju hipertenzije. Brojne su studije pokazale povezanost prevelikog unosa soli, većeg od 5 grama dnevno, i povišenih vrijednosti krvnog tlaka. Patofiziološka podloga te korelacije leži u supresiji renin-angiotenzin-aldosteron sustava koji nastaje kao posljedica visokog udjela soli u svakodnevnoj prehrani (10). U 30 – 50 % slučajeva esencijalna je hipertenzija nasljedna, a u prilog tome govori pozitivna obiteljska anamneza kao i obiteljske i populacijske studije (11, 12). Genetika hipertenzije složena je; do sada nije pronađen gen koji ima glavnu ulogu u razvoju hipertenzije kod ljudi, no posljednje studije cjelogenomske analize udruženosti (engl. *genome wide association study*, GWA) te njihova metaanaliza naglašavaju postojanje 29 polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) povezanih sa sistoličkim ili dijastoličkim tlakom (13).

U posljednjih nekoliko desetljeća hipertenzija je jedan od vodećih uzroka onesposobljenosti i prijevremenog umiranja (engl. *the disability adjusted life-year*, DALYs) (14). Više od 25 % svjetske populacije ima dijagnosticiranu hipertenziju te se procjenjuje kako će do 2025. godine taj postotak porasti i iznositi 29 % svjetske populacije, odnosno 1,56 milijardi ljudi (15, 16). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji bolesti koronarnih arterija te kardiovaskularne bolesti vodeći su uzroci smrti u svijetu (17). Prospektivne studije naglašavaju linearnu povezanost između vrijednosti krvnog tlaka te smrtnosti od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (18). U Hrvatskoj 44,2 % stanovništva ima hipertenziju (19). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2015. godinu hipertenzija je šesti uzrok smrti u Hrvatskoj (1589 umrlih) (20).

1.2. Liječenje arterijske hipertenzije

Liječenje arterijske hipertenzije uključuje farmakoterapiju te promjenu životnog stila. Promjena životnog stila iznimno je važna u prevenciji hipertenzije te ima važnu ulogu u kontroli krvnoga tlaka kod normotenzivnih pojedinaca, jednako kao i kod osoba s dijagnosticiranom hipertenzijom koje uzimaju propisanu farmakoterapiju (5). Metaanalize pokazale su kako redukcija konzumacije soli dovodi do umjerenog smanjenja vrijednosti krvnog tlaka te značajnog smanjenja vrijednosti krvnog tlaka (4 – 5 mmHg) kod hipertenzivnih pacijenata. Stoga su današnje preporuke ne konzumirati više od 5 g soli dnevno (21). Naglasak je i na kontroli tjelesne težine te primjeni odgovarajuće prehrane jer je

poznato kako smanjenje tjelesne težine u pretilih pacijenata poboljšava učinkovitost antihipertenzivne terapije, ali i smanjuje brzinu nastajanja kardiovaskularnih rizika (22). Također, redovita tjelesna aktivnost ima pozitivan utjecaj u prevenciji i kontroli hipertenzije. Aerobne vježbe poput brzog hodanja, trčanja i plivanja smanjuju vrijednosti krvnog tlaka te se stoga preporučuju svim pacijentima najmanje tri puta tjedno (23).

Prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju, farmakoterapija uključuje primjenu diuretika, beta-blokatora, kalcijских antagonista, ACE inhibitora te blokatora AT1 receptora. Svi navedeni lijekovi upotrebljavaju se pri započinjanju liječenja hipertenzije, kao i održavanju ciljanih vrijednosti krvnoga tlaka. Moguća je njihova uporaba kao monoterapija ili u određenim kombinacijama (5).

1.2.1. Inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori)

ACE inhibitori zajedno s blokatorima AT1 receptora i oralnim antagonistima renina pripadaju skupini lijekova koju nazivamo inhibitorima renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) (24). RAAS je homeostatski sustav koji ima ulogu u kontroli volumena tjelesnih tekućina te održavanju ravnoteže elektrolita, krvnog tlaka te neuronalne i endokrine funkcije povezane s kardiovaskularnom kontrolom. Također, ima ulogu u održavanju arteriolarne građe i krvožilne reaktivnosti (10). Mehanizam djelovanja ACE inhibitora uključuje inhibiciju angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE) koja sprječava stvaranje angiotenzina II iz angiotenzina I te razgradnju bradikinina na inaktivne metabolite. Angiotenzin II potentan je vazokonstriktor koji ima ulogu u regulaciji krvnoga tlaka djelujući na krvne žile i bubrege. Vazokonstriktorski učinak angiotenzina II snažniji je u arteriolama nego venama. Djelujući izravno te stimulacijom lučenja aldosterona, angiotenzin II uzrokuje zadržavanje soli i vode (25). Uloga ACE inhibitora u kontroli krvnog tlaka rezultat je inhibicije RAAS, ali i stimulacije kalikrein-kininskog sustava. Na taj način ACE inhibitori smanjuju periferni otpor i ostvaruju svoj antihipertenzivni učinak (24). U odnosu na drugu antihipertenzivnu terapiju smatra se da ACE inhibitori imaju slabiju sposobnost prevencije moždanog udara. U usporedbi s blokatorima angiotenzinskih receptora, ACE inhibitori imaju veću sposobnost prevencije srčanog udara. Osim u liječenju hipertenzije ACE inhibitori korisni su i u terapiji kroničnog zatajenja srca, kao i kod bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću i dijabetesom jer smanjuju proteinuriju i stabiliziraju funkciju bubrega (5).

1.2.2. Blokatori kalcijevih kanala (kalcijevski antagonisti)

Blokatori kalcijevih kanala, koje nazivamo i kalcijevskim antagonistima, pripadaju skupini vazodilatatora, a hipotenzivan učinak ostvaruju smanjujući periferni otpor. Djeluju na L-tip kalcijevih kanala koje nalazimo u srčanom, skeletnom i glatkom mišićju, ali i u neuronima, endokrinim stanicama i kostima (24). Djelovanje kalcijevskih antagonista temelji se na mehanizmu inhibicije utoka kalcija u glatke mišićne stanice stijenki arteriola što dovodi do dugotrajne relaksacije i posljedično do smanjenja perifernog otpora. Osim kao antihipertenzivi blokatori kalcijevih kanala upotrebljavaju se i kao antiaritmici te u terapiji angine pektoris (26).

1.3. Oksidativni stres

Paradoksom aerobnog života nazivamo činjenicu da je kisik molekula koja je neophodna za život svih aerobnih organizama, ali istovremeno uzrokuje oštećenja stanice te time posreduje u nastanku mnogih bolesti kao i starenju organizma (27). Oksidativni stres pojam je koji označava neravnotežu u stvaranju reaktivnih oblika kisika (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i antioksidansa (28). Reaktivni kisikovi oblici, odnosno kisikovi radikali, nestabilne su molekule s jednim nesparenim elektronom u vanjskoj ljusci, što ih čini iznimno reaktivnima. U njih ubrajamo superoksidni radikal ($\cdot\text{O}_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\cdot\text{HO}$) i peroksilni radikal ($\text{ROO}\cdot$) (29). Kisikovi radikali u organizmu nastaju djelovanjem vanjskih faktora poput ionizacijskog zračenja (X-zrake) i ultraljubičastog zračenja te kao nusprodukti normalnog aerobnog metabolizma. Izvori kisikovih radikala u organizmu neenzimatske su reakcije iona prijelaznih metala (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Fe^{2+}), respiracijski prasak neaktiviranih makrofaga te procesi fiziološke oksidacije reduciranih flavinskih koenzima koje se odvijaju u mitohondrijskim i mikrosomalnim lancima za prijenos energije (30). Također, reaktivni oblici kisika (ROS) nastaju na mjestima ozljede i upale. Stvaranje ROS-a predstavlja važan mehanizam obrane imunološkog sustava. Uz pomoć kisikovih radikala makrofazi uništavaju štetne mikroorganizme, ali na taj način dovode i do oštećenja tkiva domaćina. Koliko će biti oštećena stanica domaćina ovisi o mogućnosti aktivacije obrambenog mehanizma antioksidansima (31). U niskim koncentracijama kisikovi radikali mogu imati ulogu signalnih molekula te sudjelovati kao posrednici u regulaciji temeljnih staničnih

aktivnosti poput rasta i prilagodbe stanice. Pri visokim koncentracijama, kisikovi radikali mogu uzrokovati ozljedu i smrt stanica (32). Oštećenje tkiva koje uzrokuju kisikovi radikali naziva se oksidacijskim oštećenjem, a posljedice tih oštećenja uključuju promjene na dušikovim bazama DNA, lipidnu peroksidaciju i promjenu aminokiselina u proteinima. Prisutnost kisikovih radikala može dovesti do citotoksičnog učinka na stanice što rezultira indukcijom apoptoze, mutacija, kromosomskih aberacija ili karcinogeneze. Tvari koje štite od štetnog djelovanja kisikovih radikala jesu antioksidansi. Razlikujemo unutarstanične, membranske i izvanstanične antioksidanse, čiji je cilj spriječiti oksidacijsko oštećenje (33). Prekomjerna proizvodnja ROS-a ili nedostatak antioksidansa dovest će do neravnoteže između oksidacijskih i redukcijskih procesa koji se neprestano odvijaju u organizmu, a to stanje nazivamo oksidativnim stresom (30).

Oksidativni stres ima važnu ulogu u razvoju disfunkcije endotela. Poznato je nekoliko mehanizama kojima oksidativni stres pridonosi oštećenju endotela. Smanjujući djelovanje dušikova oksida, važnog endotelnog vazodilatatora, oksidativni stres ima ulogu u patofiziologiji mnogih bolesti poput hipertenzije, hiperkolesterolemije, dijabetesa pa čak i promjena koje nastaju u krvnim žilama kao posljedica pušenja (34). Endotel krvnih žila ima ulogu u regulaciji prolaza makromolekula i cirkulirajućih stanica iz krvi do tkiva. Djelovanjem kisikovih radikala dolazi do poremećaja te funkcije, što ima ključnu ulogu u patofiziologiji nekoliko bolesti krvnih žila. Naime, povećana propusnost endotela i povećano prijanjanje leukocita dovodi do promjena u endotelnom prijenosu signala i redoks-reguliranim transkripcijskim čimbenicima. Na taj način aktiviran endotel vodi do razvoja ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (32).

1.3.1. Hipertenzija i oksidativni stres

U hipertenziji dolazi do povećanog stvaranja kisikovih radikala koji nisu u ravnoteži s raspoloživim antioksidansima, što dovodi do oksidativnog stresa. Izvor kisikovih radikala u hipertenziji i bolesti krvnih žila koji se javljaju uz hipertenziju jesu ksantin-oksidaza, NAD(P)H oksidaza, ciklooksigenaza (COX) i nefunkcionalna NO sintaza (NOS) (8). Istraživanja na animalnim modelima pokazala su povećanu aktivnost ksantin-oksidaze, a time i povećan nastanak kisikovih radikala kao nusproizvoda reakcije, kod hipertenzivnih štakora. Na istim animalnim modelima primjenom alopurinola, inhibitora ksantin-oksidaze, nije došlo do smanjenja vrijednosti tlaka, što indicira da je na tim animalnim modelima povećano stvaranje kisikovih radikala posljedica, a ne uzrok nastanka hipertenzije (35). Smanjena

aktivnost NO sintaze kao posljedica nedostatka supstrata arginina ili kofaktora tetrabiopterina (BH_4), stanje poznato kao biokemijsko rasplitanje (engl. *uncoupling*), javlja se u hipertenziji, ali i dijabetesu. Smanjena aktivnost NO sintaze kao izvora kisikovih radikala u hipertenziji potvrđena je na humanim studijama, gdje je došlo do značajnog smanjenja oksidativnog stresa primjenom prekursora BH_4 (36, 37). U posljednjih nekoliko godina mnoge su studije pokazale ulogu NAD(P)H oksidaze kao važnog izvora reaktivnih kisikovih oblika. Aktivacija NAD(P)H oksidaze regulirana je brojnim faktorima, poput vazoaktivnih hormona, faktorima rasta (TGF- β) te mehaničkim poticajem koji uključuje žilni stres (engl. *shear stress*) i rastezanje same krvne žile. Angiotenzin II sudjeluje u nastanku ROS-a aktivirajući NAD(P)H oksidazu, što je i dokazano na eksperimentalnima animalnim modelima (38).

1.4. Endotelna disfunkcija

Stijenke krvnih žila čini endotel, jednoslojni pločasti epitel mezodermalnog podrijetla koji oblaže sve dijelove krvožilnog i limfnog sustava (39). Endotel je dinamičan organ koji ima važnu ulogu u odgovoru kardiovaskularnog sustava na mehaničke i humoralne podražaje te sposobnost hemodinamičke adaptacije na akutne i kronične potrebe tkiva za opskrbom krvlju. Ključan je u kontroli vaskularnog tonusa te promjena vaskularnog protoka krvi (40 – 42). Endotel ima i antitrombogenu ulogu jer njegova prisutnost sprječava interakciju trombocita sa subendotelnim tkivom i posljedično onemogućava nakupljanje trombocita (39).

Važna je uloga endotela sposobnost izazivanja vazodilatacije. Izraz endotelna funkcija upotrebljava se upravo u kontekstu sposobnosti endotela da otpušta vazoaktivne tvari koje nazivamo endotelnim čimbenicima relaksacije (eng. *Endothelium-derived relaxing factors*, EDRF). Endotelni čimbenici relaksacije jesu dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI_2) te endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF) koji predstavljaju kompenzacijski mehanizam vazodilatacije ovisne o endotelu u slučajevima smanjene biodostupnosti NO. Uloga dušikova oksida jest u opuštanju glatkih mišićnih stanica, sprječavanju adhezije leukocita i njihove migracije u arterijskom zidu, kao i sprječavanje mišićne stanične proliferacije i adhezije trombocita (43, 44). Endotel kontrolira izlučivanje citokina te stvaranje i ekspresiju adhezijskih molekula (45). Vazokonstriktorski faktori također su supstrat endotela; naime, u cilju kontrole i održavanja krvnih žila endotelne stanice otpuštaju i tromboksan A₂, endotelin-1, angiotenzin II i mnoge druge (46).

U uvjetima bolesti dolazi do funkcionalnih i strukturnih promjena endotela prilikom kojih se protuupalna, antiagregacijska i vazodilatacijska uloga endotela mijenja, endotel gubi svoju zaštitnu ulogu te poprima proaterosklerotsku strukturu. Upravu takvu promjenu fenotipa endotela nazivamo endotelnom disfunkcijom (43, 44). Endotelna disfunkcija pojam je u čijoj se podlozi nalazi oštećenje endotela i poremećaj njegove funkcije. Poremećaj funkcije endotela uključuje niz patoloških stanja poput poremećaja antikoagulantnih i protuupalnih svojstava, disregulacije proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranja propusnosti vaskularne stijenke. Naglasak u endotelnoj disfunkciji jest na gubitku vazodilatacijskog učinka endotela čiji je uzrok neadekvatna raspoloživosti NO koja može biti posljedica smanjene sinteze dušikova oksida ili povećanja kisikovih radikala (ROS) (34). Pri određivanju težine vaskularnog oštećenja važna su dva faktora endotelne disfunkcije: povećana permeabilnost endotela te povećana adhezija leukocita koji predstavljaju važne faktore u nastajanju tkivnog edema i ekstravazacije leukocita (32). Kardiovaskularne bolesti povezane su s endotelnom disfunkcijom te je poznato kako je status funkcije endotela prediktor kardiovaskularnog ishoda (47). U patogenezi ateroskleroze disfunkcija endotela predstavlja inicijalni korak (48). Osim u kardiovaskularnim bolestima endotelna disfunkcija dokazana je kod dislipidemije (49), a poznata je povezanost s pretilošću (50), fizičkom neaktivnošću (51) i pušenjem (52).

Poznato je kako se endotelna disfunkcija javlja u esencijalnoj hipertenziji, ali prethodi li poremećaj funkcije endotela nastanku hipertenzije ili je ona posljedica same bolesti, ostaje nepoznato (53). U esencijalnoj hipertenziji dolazi do oštećenja L-arginin/NO puta, smanjenog stvaranja dušikova oksida kao i smanjenog vaskularnog odgovora na primjenu egzogenog NO. Trenutno još nije u potpunosti jasna uzročno-posljedična veza između smanjene bioraspoloživosti NO i patogeneze esencijalne hipertenzije, no općeprihvaćena je činjenica kako je smanjena bioraspoloživost NO u pacijenata s esencijalnom hipertenzijom posljedica smanjenog stvaranja i supresije NO u stanju povećanog oksidativnog stresa. Budući da je endotelna disfunkcija obećavajuća meta u terapiji esencijalne hipertenzije u budućnosti, potrebno je pomno istražiti kliničku značajnost endotelne disfunkcije te pronaći prikladan biomarker koji bi omogućio procjenu same funkcije endotela (54).

2. HIPOTEZA

Normalizacija arterijskog krvnog tlaka antihipertenzivnom terapijom koja uključuje blokatore kalcijских kanala ili ACE inhibitore vodi smanjenju biljega oksidativnog stresa u krvi, neovisno o vrsti antihipertenzivne terapije.

3. CILJ

Cilj je ovog istraživanja izmjeriti biljege oksidativnog stresa spektrofotometrijskim metodama TBARS i FRAP te utvrditi povezanosti vrijednosti arterijskog tlaka s biljezima oksidativnog stresa kod hipertenzivnih bolesnika prije i osam tjedana nakon uvođenja antihipertenzivne terapije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Populacija ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika dobrovoljaca kojima je u ambulanti za hipertenziju KBC-a Osijek dijagnosticirana esencijalna hipertenzija. U studiju nisu bili uključeni ispitanici koji u svojoj povijesti bolesti imaju bolesti srca, bubrega i perifernih krvnih žila. Također, isključni kriterij bio je i uzimanje lijekova koji mogu utjecati na vaskularnu reaktivnost. Svi su ispitanici prije sudjelovanja u istraživanju bili obaviješteni o ispitivanju te je bilo odgovoreno na sva njihova pitanja. Ispitanici su potpisali informirani pristanak. Protokol i postupak istraživanja zadovoljili su standarde najnovijeg izdanja Helsinške deklaracije, a bili su odobreni od strane Etičkog povjerenstva za istraživanja Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/16-08/15, broj: 2158-61-07-16-15) te Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (broj: R2-: 18722-5/2015).

4.2. Protokol istraživanja

Istraživanje je bilo randomizirano i dvostruko slijepo. Ispitivač i ispitanik nisu znali u kojoj se skupini nalazi ispitanik, tj. uzima li ACE inhibitore ili blokatore kalcijjskih kanala do završetka protokola. Ispitanici su bili podijeljeni u dvije eksperimentalne skupine: skupina ACE inhibitori (ACEI), minimalne doze $1 \times 0,5$ mg, i skupina Ca blokatori (CaB), minimalne doze 1×5 mg. Ispitanici su sami sebi bili kontrola. Obje skupine sastojale su se od deset ispitanika. Randomizacija je provedena tako što je slučajnim odabirom brojeva redosljeda dolaska u ambulantu za hipertenziju određena vrsta terapije. Terapija koju su ispitanici uzimali bila je u skladu sa smjernicama ESH-a iz 2013. godine, prema kojima se liječenje hipertenzije može započeti bilo kojim lijekom iz pet skupina antihipertenziva. Uzimanje uzoraka krvi za određivanje parametara oksidativnog stresa izvršeno je prije početka uzimanja terapije te nakon osam tjedana uzimanja terapije u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta. Uzorci krvi prikupljeni su nakon pola sata mirovanja u ležećem položaju. Također, prilikom svakog posjeta laboratoriju ispitanicima je izmjerena tjelesna visina i tjelesna masa te opseg struka i bokova za utvrđivanje antropometrijskih mjera i indeksa tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI). Vrijednosti arterijskog tlaka izmjerene su nakon 15 minuta mirovanja u sjedećem položaju za vrijeme prvog i drugog posjeta laboratoriju.

Mjerenje je izvršeno poluautomatskim tlakomjerom (OMRON). Srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*, MAP) i tlak pulsa (engl. *pulse pressure*, PP) određeni su pomoću formula. Srednji arterijski tlak jest vrijednost koja se dobije zbrajanjem dvostrukog dijastoličkog tlaka i sistoličkog tlaka te se dobivena vrijednost podijeli s tri. Tlak pulsa razlika je sistoličkog i dijastoličkog tlaka (25).

4.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

4.3.1. Prikupljanje uzoraka krvi

Svakom ispitaniku uzorkovana je venska krv prije i nakon osam tjedana uzimanja terapije. Uzorak je prikupljen nakon pola sata mirovanja u ležećem položaju. Uzorci su prikupljeni u epruvetu bez antikoagulansa kako bismo dobili uzorak seruma te jedan uzorak pune krvi. Prikupljena krv centrifugirana je 10 minuta na 3500 rpm te je potom odvojen serum od krvnih stanica i pohranjen u hladnjaku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe s ciljem određivanja parametara oksidativnog stresa.

4.3.2. TBARS

TBARS (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) je spektrofotometrijska metoda čiji je standardizirani protokol upotrijebljen za mjerenje oksidativnog stresa u serumu (55). TBARS metodom mjere se produkti lipidne peroksidacije koji se vežu za tiobarbiturnu kiselinu (engl. *Thiobarbituric acid*, TBA) pri niskom pH. Metoda je nespecifična jer se i druge tvari, uključujući i proteine, vežu za TBA. Stoga se najprije dodaje trikloroocetna kiselina (TCA) kako bi se istaložili proteini, a zatim se rabi dobiveni supernatant za mjerenje. Kao standard je upotrijebljen malondialdehid (MDA). Razina oksidativnog stresa dobivena metodom TBARS temelji se na reakciji malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, s TBA.

Kako bi došlo do koagulacije proteina, 1 ml seruma dodano je 2 ml 20 % TCA. Nakon toga uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 10000 rpm na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja odvojeno je 1,5 ml supernatanta kojem je dodano 1,5 ml 0,67 % TBA. Novodobiveni uzorak stavljen je u vodenu kupelj na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u razdoblju od 10 minuta. Nakon vađenja uzorka iz vodene kupelji primjećuje se ružičasto obojenje koje nastaje kao posljedica reakcije MDA i

TBA. Nakon hlađenja uzorak se očitava u spektrofotometru na valnim duljinama od 532 nm i 572 nm. Razlog očitavanja na dvije valne duljine jest korekcija pozadinske apsorpcije. Naime, vrijednosti apsorpcije na 572 nm odnosi se na šumove, odnosno apsorpciju molekula koje se nalaze u uzorku, ali nisu produkt reakcije MDA/TBA. Vrijednosti dobivene na 532 nm predstavljaju apsorpcijski maksimum MDA/TBA. Oduzimanjem vrijednosti apsorpcije dobivenih na 572 nm i 532 nm dobiva se stvarna vrijednost apsorpcije MDA/TBA. Dobivene vrijednosti očitane su u nanofotometru P300 UV/VIS, IMPLEN. Rezultati su bili uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću MDA i izraženi kao mikromolarni MDA ekvivalent.



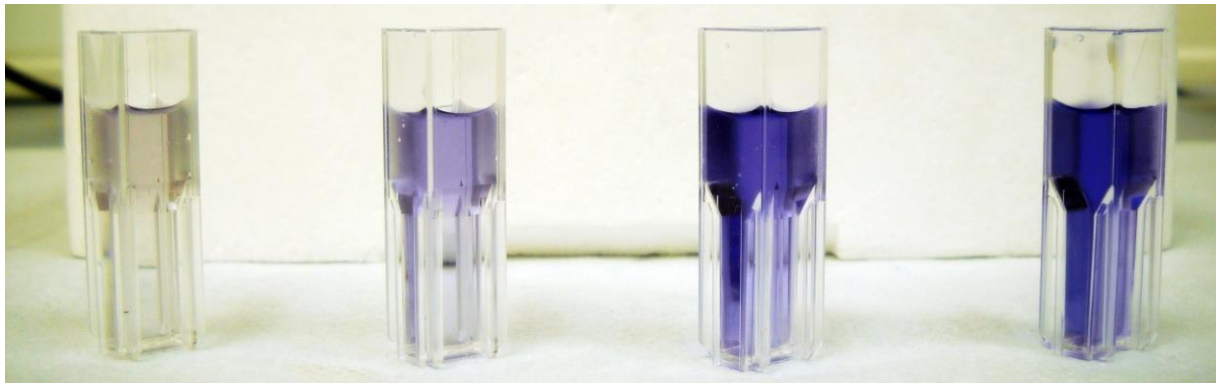
Slika 1. TBARS. Ružičasto obojenje nastalo reakcijom MDA/TBA nakon kuhanja u kupelji

4.3.3. FRAP

FRAP (engl. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) je spektrofotometrijska metoda kojom se mjeri antioksidativni kapacitet plazme. Upotrijebljen je standardizirani protokol (56). FRAP mjeri sposobnost antioksidansa u uzorku da reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} ion.

FRAP reagens sastoji se od 388 mM acetatnog pufera (pH vrijednost 3,6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) otopljenog u 40 mM HCl te 20 mM $FeCl^3$ (željezo(III) klorida) otopljenog u vodi. U 75 μ l plazme dodano je 2,25 ml reagensa. Nakon 4 minute očitane su vrijednosti u spektrofotometru.

U ovom testu došlo je do redukcije Fe^3 -TPTZ u Fe^2 -TPTZ uz prisutnost antioksidansa pri čemu je nastalo plavo obojenje čija je apsorbancija mjerena na 593 nm. Rezultati su bili uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom s pomoću Troloxa (TE) te su izraženi kao mikromolarni TE ekvivalenti. Dobivene vrijednosti očitane su u nanofotometru P300 UV/VIS, IMPLEN.



Slika 2. FRAP. Plavo obojenje koje nastaje redukcijom Fe^3 -TPTZ u Fe^2 -TPTZ

4.4. Statističke metode

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost (standardna devijacija). S pomoću t - testa za ovisne uzorke (engl. *paired t-test*) uspoređene su vrijednosti prikupljenih varijabli prije i nakon osam tjedana uzimanja terapije unutar skupine, a t-testom između skupina. U slučaju kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenjen je Wilcoxonov test sume rangova (engl. *Wilcoxon rank-sum test*). Za jednostavnu povezanost između dvaju parametara upotrijebljena je Pearsonova ili Spearmanova korelacija, ovisno o normalnosti distribucije uzorka. Za statističku analizu upotrijebio se Sigma Plot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA). S pomoću Sigma Plot v11.2 programa izračunali smo veličinu uzorka te ona za snagu testa od 0,8, p vrijednost manju od 0,05 iznosi šest ispitanika po skupini.

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

Dvadeset ispitanika kojima je hipertenzija dijagnosticirana u ambulanti za hipertenziju podijeljeni su u dvije skupine: skupinu ACEI (srednja dob 46 (14)) te skupinu CaB (srednja dob 36(12)). Prvotna raspodjela ispitanika uključivala je po 10 ispitanika u svakoj skupini. Naknadnom analizom laboratorijskih nalaza kod jednog ispitanika iz skupine ACEI pronađen je uzrok sekundarne hipertenzije – Cushingov sindrom. Budući da je studija uključivala samo ispitanike s esencijalnom hipertenzijom, ispitanik je isključen iz studije. Dva ispitanika iz skupine CaB vlastitom odlukom nisu uzimali propisanu terapiju, što je utvrđeno tek pri kontrolnom pregledu nakon osam tjedana. Tijekom razdoblja od osam tjedana jedan ispitanik iz skupine CaB isključen je iz studije zbog kardiovaskularnih komplikacija koje su se javile naknadno. Budući da bolesti srca predstavljaju isključni kriterij istraživanja, podatci ispitanika nisu ušli u statističku obradu. U konačnici u statističku obradu istraživanja ušlo je osam ispitanika iz skupine ACEI te šest ispitanika iz skupine CaB. Karakteristike ispitanika i antropometrijski parametri mjereni su u pojedinoj skupini ispitanika prije i nakon protokola (tablica 1). BMI i WHR nisu se značajno promijenili nakon protokola niti u jednoj ispitivanoj skupini. Nije uočena razlika među skupinama u navedenim parametrima.

Tablica 1. Karakteristike ispitanika

	ACEI		CaB	
	prije	poslije	Prije	poslije
Dob	46 (14)		36 (12)	
tjelesna težina, kg	76,87 (14,42)	75,14 (15,13)	77,16 (12,68)	78,0 (15,55)
tjelesna visina, m	1,67 (0,12)	1,67 (0,12)	1,68 (0,12)	1,68 (0,12)
BMI, kg/m²	26,9 (4,7)	27,6 (4,2)	27 (2,6)	27,1 (3,1)
WHR	0,86 (0,04)	0,86 (0,04)	0,79 (0,05)	0,79 (0,05)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SD)

BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struk bokovi;

ACEI – skupina koja je pila ACE inhibitor; CaB – skupina koja je pila blokatore kalcijских kanala

5.2. Biokemijski parametri ispitanika

Tablica 2. prikazuje promjene biokemijskih parametara prije i nakon osam tjedana uzimanja terapije u svih ispitanika. Statistički značajne promjene vidljive su u promjeni koncentracije natrija prije i nakon uzimanja terapije u skupini ACEI. Razina CRP-a nije se statistički značajno promijenila niti u jednoj skupini, no u skupini ACEI pokazuje tendenciju smanjenja, ali bez statističke značajnosti. Ostali mjereni parametri nisu se značajno promijenili nakon protokola niti u jednoj ispitivanoj skupini.

Tablica 2. Biokemijski parametri u krvi

	ACEI		CaB	
	Prije	poslije	prije	poslije
Na , mmol/L	139,8 (2,2)	136,0 (0,8)*	138,4 (2,3)	137,0 (1,4)
K , mmol/L	4,3 (0,6)	4,2 (0,3)	4,2 (0,5)	4,1 (0,2)
GUK , mmol/L	5,5 (1,1)	5,4 (0,4)	5,4 (1,1)	5,2 (0,3)
Aldosteron , pmol/L	333 (120)	330 (100)	219 (55)	168 (28)
PRA , ng/ml/h	1,17 (0,67)	3,04 (3,23)	0,60 (0,54)	0,79 (0,57)
CRP , mg/L	2,75 (1,69)	1,80 (0,93)	3,61 (1,68)	2,00 (1,70)
Kolesterol , mmol/L	6,06 (0,64)	5,55 (0,80)	5,51 (0,85)	4,51 (0,88)
HDL , mmol/L	1,33 (0,33)	1,33 (0,21)	1,20 (0,30)	0,94 (0,11)
LDL , mmol/L	3,90 (0,47)	3,32 (0,68)	3,56 (0,67)	2,75 (0,55)
Trigliceridi	1,83 (0,85)	1,62 (0,72)	1,46 (0,44)	1,14 (0,74)
Kreatinin , μ mol/L	68,57 (8,75)	67,0 (10,64)	64,50 (8,80)	64,00 (7,13)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SD).

* P = 0.009, ACEI skupina: Na prije vs. poslije
(*t*-test; *paired t*-test)

ACEI – skupina koja je pila ACE inhibitor; CaB – skupina koja je pila blokatore kalcijevih kanala;
Na – natrij, K – kalij; GUK – glukoza u krvi; PRA – plazma reninska aktivnost; CRP – C-reaktivni protein

5.3. Hemodinamski parametri ispitanika (promjene arterijskoga tlaka)

Tablica 3. pokazuje promjene hemodinamskih parametara u obje skupine. U skupini ACEI došlo je do statistički značajnog smanjenja sistoličkoga tlaka, srednjeg tlaka pulsa i tlaka pulsa prije i nakon provedenog protokola. U skupini CaB uočena je statistički značajna razlika u sistoličkom i dijastoličkom tlaku te tlaku pulsa prije i nakon provedenog protokola.

Tablica 3. Hemodinamski parametri ispitanika

		ACEI	CaB
1. pregled	sistolički tlak	166 (26)	154 (12)
	dijastolički tlak	94 (9)	97 (5)
	srednji arterijski tlak	118 (14)	99 (44)
	tlak pulsa	71 (19)	57 (9)
Kontrolni pregled	sistolički tlak	140 (15)*	128 (7) ⁺
	dijastolički tlak	87 (4)	85 (8) [‡]
	srednji arterijski tlak	104 (7) [§]	99 (8)
	tlak pulsa	52 (14)	43 (4) [¶]

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SD).

ACEI – skupina koja je pila ACE inhibitor; CaB – skupina koja je pila blokatore kalcijevih kanala;

* P = 0,013 – sistolički tlak u ACEI skupini prije vs. poslije protokola

⁺ P = 0,007 – sistolički tlak u CaB skupini prije vs. poslije protokola

[‡] P = 0,011 – dijastolički tlak u CaB skupini prije vs. poslije protokola

[§] P = 0,019 – srednji arterijski tlak u ACEI skupini prije vs. poslije protokola

^{||} P = 0,016 – tlak pulsa u ACEI skupini prije vs. poslije protokola

[¶] P = 0,021 – tlak pulsa u CaB skupini prije vs. poslije protokola

(*t-test; paired t-test*)

5.4. Biokemijski parametri u 24 h urinu

Tablica 4. prikazuje biokemijske parametre mjerene u 24 h urinu. Nije uočena statistički značajna promjena u mjerenim parametrima nakon navedenog protokola niti u jednoj skupini ispitanika.

Tablica 4. Biokemijski parametri u 24 h urinu

	ACEI		CaB	
	prije	Poslije	prije	poslije
Na, mmol/dU	155,28 (65,32)	154,43 (9,94)	167,57 (49,50)	126,56 (14,86)
K, mmol/dU	53,96 (18,00)	45,36 (22,05)	64,10 (10,81)	50,70 (4,11)
Koeficijent kreatinina, μmol/24h/kg	178,67 (42,36)	137,80 (40,78)	170,17 (39,46)	169,75 (49,98)
KEK, ml/s/1,73m²	2,11 (0,61)	1,72 (0,40)	2,16 (0,21)	1,95 (0,43)
Proteini, mmol/dU	115,33 (57,49)	110,83 (55,96)	133,66 (49,27)	110,00 (11,74)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (SD).

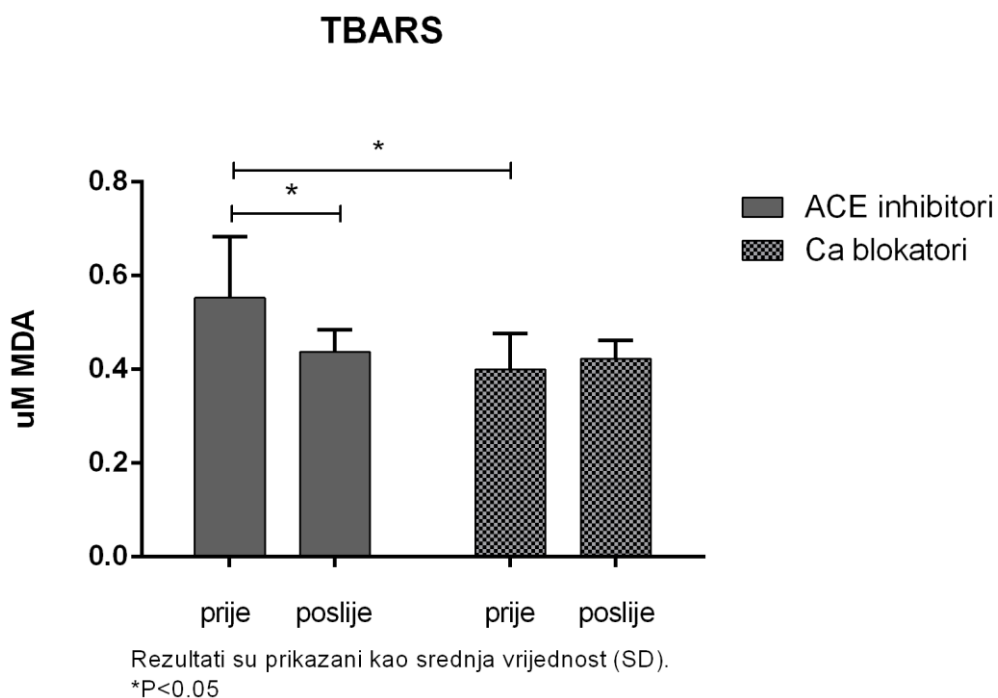
ACEI– skupina koja je pila ACE inhibitor; CaB – skupina koja je pila blokatore kalcijskih kanala;

Na – natrij, K– kalij; KEK– klirens endogenoga kreatinina

5.5. Parametri oksidativnog stresa

5.5.1. TBARS

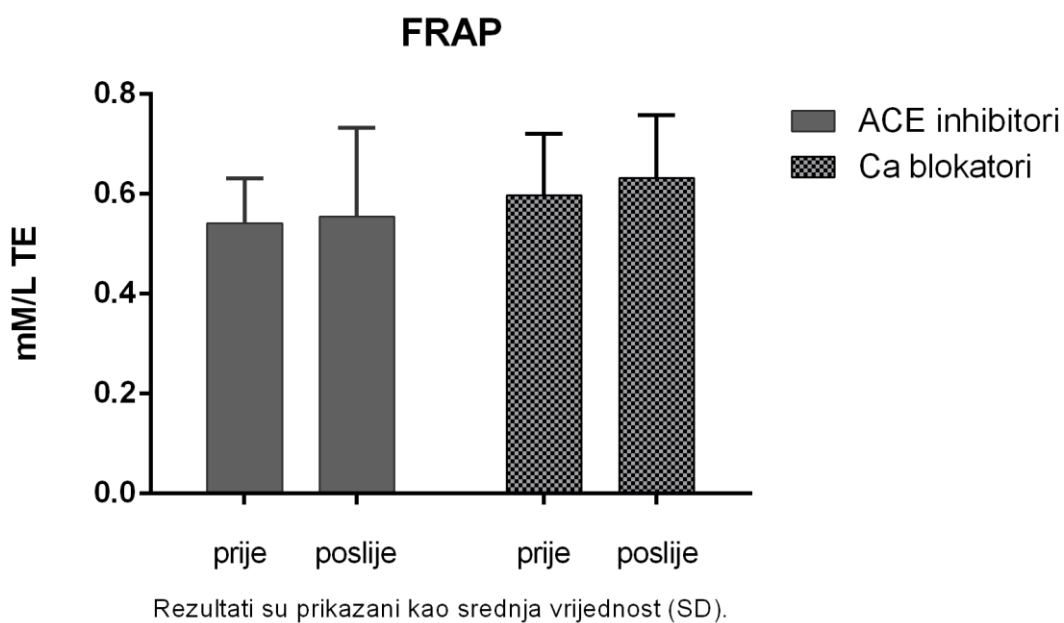
Metodom TBARS uočeno je statistički značajno smanjenje razine oksidativnog stresa u skupini ACEI nakon provedenog protokola, dok u CaB skupini nije uočena statistički značajna promjena. Postojala je razlika između skupina u bazalnim vrijednostima razine oksidativnog stresa: u ACEI skupini bile su više vrijednosti nego u skupini CaB. Nakon provedenog protokola nije postojala razlika u razini oksidativnog stresa između skupina. Na slici 3 prikazane su vrijednosti razine oksidativnog stresa prije početka uzimanja terapije te nakon osam tjedana uzimanja terapije. Nije uočena statistički značajna povezanost između mjerenih sastavnica tlaka i razine oksidativnog stresa niti u jednoj skupini prije i poslije navedenog protokola (Pearsonova korelacija).



Slika 3. Promjena razine oksidativnog stresa mjerena metodom TBARS. Razina oksidativnog stresa bila je statistički značajno smanjena u skupini ACEI. Postoji statistički značajna razlika između bazalnih vrijednosti ACEI i CaB skupine (*t-test; paired t-test*).

5.5.2. FRAP

Metodom FRAP nije uočena promjena antioksidativnog kapaciteta nakon provedenog protokola niti u jednoj skupini, kao što je vidljivo na Slici 4.



Slika 4. Promjena antioksidativnog kapaciteta mjerena metodom FRAP u skupinama ACEI i CAB. Promjena antioksidativnog kapaciteta nije statistički značajno promijenjena niti u jednoj skupini (*t-test*; *paired t-test*).

6. RASPRAVA

Najvažniji rezultat ove studije predstavlja činjenica kako je tijekom osam tjedana monoterapije došlo do normalizacije vrijednosti krvnoga tlaka neovisno o vrsti terapije u objema promatranim skupinama. Također, u skupini ACEI došlo je do smanjenja razine oksidativnog stresa.

Skupine se nisu razlikovale prema izmjerenim antropometrijskim parametrima, kao što je prikazano u Tablici 1., što pokazuje da je randomizacija bila uspješna te da parametri poput BMI-a i WHR-a nisu mogli utjecati na razlike u rezultatima krvnog tlaka i oksidativnog stresa između skupina.

Skupine se nisu razlikovale prema biokemijskim parametrima prije terapije, na što ukazuje Tablica 2. Nakon terapije u skupini ACEI došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije natrija u krvi, no unutar fizioloških razina. Razlog tome jest inhibicija angiotenzin konvertirajućeg enzima koja dovodi do smanjenja angiotenzina II što ima za posljedicu smanjenu reapsorpciju natrija i vode (25). U skupini CaB nije došlo do smanjenja koncentracije natrija, što je bilo i očekivano s obzirom na različit mehanizam djelovanja blokatora kalcijских kanala odnosu na ACE inhibitore (24). Niti u jednoj skupini nije došlo do statistički značajne promjene u biokemijskim parametrima prije i nakon terapije. Poznato je da pri niskim koncentracijama ROS imaju ulogu signalnih molekula, no u povećanim koncentracijama izazivaju oštećenje stanice (32). Budući da su ROS važan dio imunološkog sustava, povećane koncentracije nalazimo i tijekom upale ili ozljede (31). Iz tog razloga svim ispitanicima izmjerene su vrijednosti CRP-a prije i nakon uzimanja terapije. Vrijednosti CRP-a kod svih ispitanika bile su u fiziološkim granicama što otklanja mogućnost da je povećan oksidativni stres posljedica upalnih promjena.

Nakon protokola došlo je do očekivanog smanjenja arterijskog tlaka u objema skupinama ispitanika, neovisno o vrsti terapije. Takav rezultat govori u prilog činjenici kako se liječenje esencijalne hipertenzije kod novootkrivenih bolesnika može započeti bilo kojom od pet preporučenih skupina lijekova koje uključuju ACE inhibitore, AT1 blokatore, diuretike, beta blokatore te kalcijske antagoniste (5).

I dalje nije u potpunosti jasna uloga oksidativnog stresa u kliničkoj hipertenziji. Eksperimentalno je dokazano kako oksidativni stres s ostalim prohipertenzivnim faktorima poput prekomjernog unosa soli, aktivacije simpatikusa i RAAS utječe na povišenje tlaka (57). Naša studija nije pokazala korelaciju između krvnog tlaka i razine oksidativnog stresa prije niti nakon provedenog protokola. Studija SABPA (engl. *Sympathetic Activity and Ambulatory Blood Pressure in Africans*) navodi korelaciju oksidativnog stresa sa vrijednostima sistoličkog tlaka i tlaka pulsa na muškim ispitanicima. Također, više bazalne vrijednosti razine oksidativnog stresa mjerene metodom TBARS utvrđene su kod hipertenzivnih muškaraca u odnosu na normotenzivne muškarce (58, 59). U istraživanju koje su proveli Śladowska-Kozłowska i suradnici na djeci kojoj je dijagnosticirana hipertenzija, navode povezanost između razine oksidativnog stresa i stupnja hipertenzije, odnosno vrijednosti krvnog tlaka te ciljnog oštećenja organa (TOD) prije početka uzimanja terapije. Nakon godinu dana provedene terapije promjene u razini oksidativnog stresa korelirale su s TOD, no ne i s vrijednostima krvnoga tlaka (60). Suprotno prethodno navedenim istraživanjima, istraživanje koje su proveli Redón i suradnici navodi kako ne postoji korelacija između vrijednosti krvnoga tlaka i razine oksidativnog stresa, premda su hipertenzivni pacijenti u odnosu na normotenzivne imali više vrijednosti oksidativnog stresa i niže vrijednosti antioksidativnog kapaciteta. Studija je uključila 66 hipertenzivna pacijenta i 16 normotenzivnih pacijenata (61). Ostavlja se otvorena mogućnost kako do korelacije krvnoga tlaka u našem istraživanju nije došlo zbog malog broja ispitanika te kratkog trajanja protokola, samo osam tjedana, s obzirom na to da su populaciju ispitanika činili novootkriveni hipertenzivni bolesnici koji prije nisu uzimali nikakvu antihipertenzivnu terapiju.

Danas je poznato kako postoji potreba usmjeriti terapiju, ali i dijagnostiku, prema ranom otkrivanju endotelne disfunkcije i oksidativnog stresa jer ti procesi dovode do razvoja ateroskleroze, a time i do razvoja kardiovaskularnih komplikacija u budućnosti (62). Skupine lijekova kod kojih je eksperimentalnim istraživanjima dokazan utjecaj na smanjenje razine oksidativnog stresa jesu ACE inhibitori, blokatori AT1 receptora, statini te nebivolol (63). U našoj studiji u skupini ACEI došlo je do smanjenja razine oksidativnog stresa mjerene metodom TBARS, za razliku od skupine CaB gdje nije došlo do smanjenja razine oksidativnog stresa nakon provedenog protokola. Ne možemo sa sigurnošću tvrditi da do smanjenja razine oksidativnog stresa u skupini ACEI dolazi kao posljedica same terapije jer su početne vrijednosti oksidativnog stresa bile značajno više u skupini ACEI u odnosu na početne vrijednosti CaB skupine. Razlike u početnoj vrijednosti ne mogu se objasniti jer nije

postojala razlika u antropometrijskim, kao i biokemijskim parametrima mjerenim u urinu i serumu prije početka uzimanja terapije. Baykal i suradnici u studiji provedenoj na 102 pacijenta s dijagnosticiranom hipertenzijom te u 51 kontroli navodi smanjenje razine oksidativnog stresa u skupini koja je uzimala ACE inhibitore i AT1 blokatore, odnosno lijekove iz skupine inhibitora RAAS. U toj studiji hipertenzivni pacijenti bili su podijeljeni u pet skupina prema prepisanoj terapiji, a razina oksidativnog stresa mjerena je tijekom tri mjeseca uzimanja terapije. Ista studija nije dokazala smanjenje razine oksidativnog stresa u skupinama koje su uzimale kalcijske blokatore, beta-blokatore, te blokatore alfa-receptora (64). I druga istraživanja navode prednost inhibitora RAAS u snižavanju razine oksidativnog stresa i povećanju antioksidativnog kapaciteta (60). Budući da je poznato kako angiotenzin II djelujući na NAD(P)H oksidazu predstavlja važan izvor ROS-a, postoji mogućnost da je smanjenje razine oksidativnog stresa upravo posljedica blokade tog redoks signalnog puta (38).

Mali broj ispitanika mogao bi biti jedno od ograničenja ovog istraživanja. Međutim, ovdje je riječ o pilot-studiji koja je postavila temelj i nove smjerove kojima bi trebalo nastaviti istraživanje kako bi se razjasnila dodatna pitanja. Bez obzira na to što je došlo do statistički značajnog smanjenja vrijednosti arterijskog tlaka u obje skupine prije i nakon provedenog protokola, nemoguće je kontrolirati suradljivost pacijenta (engl. *compliance*) glede pridržavanja redovitog uzimanja terapije i promjene životnog stila koja bi umanjila utjecaj prohipertenzivnih faktora poput visokog unosa soli u svakodnevnoj prehrani.

7. ZAKLJUČCI

- Monoterapija koja uključuje ACE inhibitore ili kalcijske blokatore dovodi do uspješne redukcije krvnog tlaka.
- Razina oksidativnog stresa smanjena je jedino u skupini ACE inhibitora.
- Oksidativni stres nije posljedica smanjenog redukcijskog kapaciteta plazme.
- Nije dokazana povezanost između vrijednosti krvnoga tlaka i razine oksidativnog stresa.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je istraživanja izmjeriti biljege oksidativnog stresa metodama TBARS i FRAP te utvrditi povezanost vrijednosti arterijskog krvnog tlaka s biljezima oksidativnog stresa kod novootkrivenih hipertenzivnih bolesnika prije i nakon osam tjedana uzimanja terapije

Materijali i metode: U studiju je uključeno 20 novootkrivenih hipertenzivnih bolesnika koji su podijeljeni u dvije skupine prema antihipertenzivnoj terapiji: skupinu ACEI (uzima ACE inhibitore) i skupinu CaB (uzima blokatore Ca kanala). Ispitanicima je uzorkovana venska krvi prije i nakon osam tjedana uzimanja terapije. Uzorci krvi iskorišteni su za određivanje biljega oksidativnog stresa metodama TBARS i FRAP.

Rezultati: Ne postoji povezanost između vrijednosti arterijskog tlaka i vrijednosti oksidativnog stresa. Nakon osam tjedana uzimanja terapije u skupini ACEI došlo je do smanjenja oksidativnog stresa metodom TBARS, dok u skupini CaB nije došlo do takvih rezultata. Nakon osam tjedana terapije došlo je do normalizacije vrijednosti krvnoga tlaka.

Zaključak: ACE inhibitori i kalcijски antagonisti jednako su vrijedne monoterapije za redukciju krvnoga tlaka, a samo ACEI dovode do smanjenja razine oksidativnog stresa.

Ključne riječi: ACE inhibitori; Ca blokatori; endotelna disfunkcija; hipertenzija; oksidativni stres

9. SUMMARY

Influence of Arterial Blood Pressure on Oxidative Stress in Newly Diagnosed Hypertensive Patients

Aim: The aim of this study was to determine the correlation between values of arterial blood pressure and oxidative stress in newly diagnosed hypertensive patients before and after eight weeks of prescribed therapy.

Materials and methods: Study included 20 newly found hypertensive patients. Subjects were divided into two groups, according to the prescribed therapy. Group ACEI took ACE inhibitors and group CAB took calcium channel blockers. There were ten subjects in each group. Blood samples for determination of oxidative stress via TBARS and FRAP assays were collected before and after eight weeks of therapy.

Results: Correlation between values of arterial blood pressure and oxidative stress levels was not found. There was a significant decrease of oxidative stress in ACEI group and there was not any significant decrease in CAB group. After eight weeks of antihypertensive therapy there was a significant decrease of arterial blood pressure in both groups.

Conclusion: ACE inhibitors and calcium channel blockers are equally good antihypertensive therapy. Only ACE inhibitors lead to decrease of oxidative stress.

Key words: ACE Inhibitors; Calcium Channel Blockers; Endothelial Dysfunction; Hypertension; Oxidative Stress

10. LITERATURA

- 1) Parati G, Di Rienzo M, Ulian L, Santucci C, Girard A, Elghozi JL, i sur. Clinical relevance blood pressure variability. *J Hypertens Suppl.* 1998;16(3):25-33.
- 2) Nadar SK, Tayebjee MH, Messerli F, Lip GY. Target organ damage in hypertension: pathophysiology and implications for drug therapy. *Curr Pharm Des.* 2006;12(13):1581-92.
- 3) Ayodele OE, Alebiosu CO, Akinwusi PO, Akinsola A, Mejiuni A. Target organ damage and associated clinical conditions in newly diagnosed hypertensives attending a tertiary health facility. *Niger J Clin Pract.* 2007;10(4):319-25.
- 4) Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation.* 2000;101(3):329-35.
- 5) Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, i sur. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;31(7):1281-357.
- 6) Wang KL, Cheng HM, Chuang SY, Spurgeon HA, Ting CT, Lakatta EG, i sur. Central or peripheral systolic or pulse pressure: which best relates to target-organs and future mortality? *J Hypertens.* 2009;27(3):461-7.
- 7) Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina.* 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
- 8) Virdis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens.* 2011;2011:1-7.
- 9) Mills RM. Epigenetics and Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2011;13(1):21-8
- 10) Drenjancević Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin- Angiotensin System. *Kidney Blood Press Res* 2011; 32:1-11
- 11) Luft FC. Twins in cardiovascular genetic research. *Hypertens.* 2001;37:350-6
- 12) Butler MG. Genetics of hypertension. Current status. *J Med Liban.* 2010;58(3):175-8.
- 13) Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, i sur. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature.* 2011;478(7367):103-9.

- 14) Bromfield S, Muntner P. High Blood Pressure: The Leading Global Burden of Disease Risk Factor and the Need for Worldwide Prevention Programs. *Curr Hypertens Rep.* 2013;3:134-6.
- 15) Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005;365(9455):217-23.
- 16) Lackland DT, Weber MA. Global burden of cardiovascular disease and stroke: hypertension at the core. *Can J Cardiol.* 2015;31(5):569-71.
- 17) World Health Organisation: Fact Sheet: The Top Ten Causes of Death. Fact sheet No 310. Geneva, WHO, 2014.
- 18) Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration, Ying A, Arima H, Czernichow S, Woodward M, Huxley R, i sur. Effects of blood pressure lowering on cardiovascular risk according to baseline body-mass index: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2015;385(9971):867-74.
- 19) Hrabak Žerjavić V, Kralj V, Živka D, Jelakovic B. Epidemiologija hipertenzije, moždanog udara i infarkta miokarda u Hrvatskoj. *Medix.* 2010; 87/88:102-7.
- 20) Znaor A, Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Rodin U, Čorić T, i sur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2015. godinu. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016.
- 21) He FJ, Li J, Macgregor GA. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane Database Systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2013;346:325-46.
- 22) Hinderliter AL, Sherwood A, Craighead LW, Lin PH, Watkins L, Babyak MA, i sur. The long-term effects of lifestyle change on blood pressure: One-year follow-up of the ENCORE study. *Am J Hypertens.* 2014;27(5):734-41.
- 23) Molmen-Hansen HE, Stolen T, Tjonna AE, Aamot IL, Ekeberg IS, Tyldum GA, i sur. Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19(2):151-60.
- 24) Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Temeljna i klinička farmakologija.* 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 25) Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija.* 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
- 26) Epstein M. *Calcium antagonist in clinical medicine.* 3. izd. Philadelphia: Hanley and Belfus; 2002.

- 27) Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:1-31.
- 28) Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49:3-8.
- 29) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biokemija* 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013
- 30) Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 31) Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, i sur. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(12):1643-54.
- 32) Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:719-41.
- 33) Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Total D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija- uzroci i posljedice. *Medicina* 2007;43:84-93
- 34) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4
- 35) Laakso JT, Teräväinen TL, Martelin E, Vaskonen T, Lapatto R. "Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats," *J Hypertens.* 2004;22(7):1333-40
- 36) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D. "Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase," *Circulation.* 2002;105(14):1656-62.
- 37) Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K. "Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals,". *Am J Hypertension.* 2002;15(4):326-32.
- 38) Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006 15;71(2):247-58
- 39) Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije*. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
- 40) Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 39:287-324.
- 41) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.

- 42) Ružić A, Miletić B, Nola AI, Peršić V, Ražov Radas M, Včev A. Endotelna disfunkcija u “enigmatskoj slagalici” kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas*. 2009;6(1):2-15.
- 43) Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertens*. 1989;13:658-67.
- 44) Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*. 2003;9:2385-402.
- 45) Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. Structures and functions of the endothelium. *Rev Prat* 1997; 47:2223-6.
- 46) Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:302-12
- 47) Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med*. 2010;4(3):351-60.
- 48) Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Wainstein MV, Boff W, Puñales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes*. 2015;6(5):679-92.
- 49) Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, i sur. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation*. 2003;108:1059–63.
- 50) Raitakari M, Ilvonen T, Ahotupa M, Lehtimäki T, Harmoinen A, Suomi P, i sur. Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: Role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:124–8.
- 51) Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Best MJ, Taylor RR, O’Driscoll JG. Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: Pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:2679-87.
- 52) Oida K, Ebata K, Kanehara H, Suzuki J, Miyamori I. Effect of cilostazol on impaired vasodilatory response of the brachial artery to ischemia in smokers. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:93-8.
- 53) Mordi I, Mordi N, Delles C, Tzemos N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2016;34:47-53.

- 54) Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Triantafyllou A, Douma S. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17(11):85.
- 55) Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol.* 2003; 63:447-63.
- 56) Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-6.
- 57) Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(1):164-82.
- 58) Kruger R, Schutte R, Huisman HW, Van Rooyen JM, Malan NT, Fourie CM, i sur. Associations between reactive oxygen species, blood pressure and arterial stiffness in black South Africans: the SABPA study. *J Hum Hypertens.* 2012;26(2):91-7.
- 59) Mels CM, Schutte AE, Schutte R, Pretorius PJ, Smith W, Huisman HW, i sur. 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, reactive oxygen species and ambulatory blood pressure in African and Caucasian men: the SABPA study. *Free Radic Res.* 2014;48(11):1291-9.
- 60) Sladowska-Kozłowska J, Litwin M, Niemirska A, Płudowski P, Wierzbicka A, Skorupa E. Oxidative stress in hypertensive children before and after 1 year of antihypertensive therapy. *Pediatr Nephrol.* 2012; 27(10):1943-51.
- 61) Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, i sur. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003 May;41(5):1096-101.
- 62) Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol.* 2015;71:40-56.
- 63) Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(6):313-9.
- 64) Baykal Y, Yilmaz MI, Celik T, Gok F, Rehber H, Akay C, i sur. Effects of antihypertensive agents, alpha receptor blockers, beta blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers and calcium channel blockers, on oxidative stress. *J Hypertens.* 2003;21(6):1207-11.

11. ŽIVOTOPIS

Andrea Teodosić

Datum i mjesto rođenja: 7. svibnja 1991., Našice, Republika Hrvatska

Adresa: Braće Radića 6, 31 500 Našice, Hrvatska

E- adresa: teodosic.andrea@gmail.com

Obrazovanje:

listopad 2010. – danas: integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine,

Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

veljača 2015. – lipanj 2015.: Medical University of Warsaw, Poljska; Erasmus + mobilnost

rujan 2006. – lipanj 2010.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

rujna 1999. – lipanj 2005.: Glazbena škola „Kontesa Dora“, Našice, smjer: klavir

Članstva:

2010. – 2014. Europska medicinska studentska asocijacija (EMSA) i Studentska sekcija Hrvatskog liječničkog zbora (SSHLZ)

Ostale aktivnosti:

2012. – 2014.: demonstrator na Katedri za anatomiju i neuroznanost, Medicinski fakultet Osijek

2013. – 2014.: demonstrator na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek

2012. – 2013.: sudjelovanje na Tjednu mozga (radionice: „Što je to u mojoj glavi?“, „Stres pred javni nastup“)

2013. – 2015.: suorganizatorica projekta „Teddy Bear Hospital“, Osijek

2013. – 2015.: glavna organizatorica projekta „Teddy Bear Hospital“, Našice