

Utjecaj visokoslane prehrane na genski izražaj antioksidativnih enzima u mikro- i makrocirkulaciji te bubrezima mladih Sprague-Dawle štakora

Alpeza, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:089889>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Andrea Alpeza

UTJECAJ VISOKOSLANE PREHRANE

NA GENSKI IZRAŽAJ

ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U

MIKRO- I MAKROCIRKULACIJI TE

BUBREZIMA MLADIH SPRAGUE-

DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE

Andrea Alpeza

UTJECAJ VISOKOSLANE PREHRANE

NA GENSKI IZRAŽAJ

ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U

MIKRO- I MAKROCIRKULACIJI TE

BUBREZIMA MLADIH SPRAGUE-

DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, Katedra za fiziologiju i imunologiju
Mentor rada: doc. dr. sc. Anita Matic, dipl. ing., Katedra za fiziologiju i imunologiju

Rad ima 27 listova i 3 tablice.

ZAHVALA

Prije svega veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić na pomoći oko pisanja ovog rada, pristupačnosti i korisnim savjetima. Uvelike ste mi olakšali ovo razdoblje.

Draga obitelji, hvala vam što ste vjerovali u mene.

Drage lavice i dragi shady, hvala vam na svemu, čekaju nas neke nove avanture!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Natrij	1
1.1. Sol u prehrani	1
1.1.2. SZO smjernice	1
1.2. Utjecaj visokoslane prehrane na makrocirkulaciju.....	2
1.2.1. Hipertenzija	3
1.2.2. Kardiovaskularne bolesti.....	3
1.2.3. Cerebrovaskularne bolesti	3
1.2.4. Bubrežne bolesti	4
1.3. Utjecaj visokoslane prehrane na mikrocirkulaciju	4
1.3.1. Važnost endotela.....	4
1.3.2. Endotelna disfunkcija.....	5
1.3.3. Utjecaj soli na endotel.....	5
1.4. Oksidativni stres i ROS.....	6
1.4.1. Fiziološka uloga.....	6
1.4.2. Štetni učinci	6
1.5. Antioksidativni sustavi.....	7
1.5.1. Enzimatski antioksidanti	7
1.5.2. Neenzimatski antioksidanti	8
2. HIPOTEZA	9
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
4. MATERIJALI I METODE.....	11
4.1. Ustroj studije	11
4.2. Materijali	11
4.3. Metode	11
4.3.1. RNA izolacija	12
4.3.2. PCR u realnome vremenu.....	12
4.4. Statističke metode.....	12
5. REZULTATI.....	14
5.1. Genski izražaj ciljnih antioksidativnih enzima u aortama Sprague-Dawley štakora	14

5.2. Izražaj antioksidativnih gena u mikrocirkulaciji štakora tretiranih visokoslanom i niskoslanom prehranom.....	15
5.3. Izražaj antioksidativnih gena u bubrezima mladih Sprague-Dawley štakora	16
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	19
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. LITERATURA	22
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

ADH – antidiuretski hormon

AT1 – angiotenzin II receptor tipa I

CAT – katalaza

Cu/Zn SOD – bakar/cink superoksidna dismutaza

EC-SOD – izvanstanična superoksidna dismutaza (prema engl. *Extracellular Superoxide Dismutase*)

eNOS – endotelna sintaza dušikovog (II) oksida

GPx – glutation peroksidaza

GSH/GSSG - reducirani/oksidirani glutation

KVB – kardiovaskularne bolesti

Mn SOD – manganova superoksidna dismutaza

NaCl – natrijev klorid

NADPH – reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NO – dušikov (II) oksid

PCR – lančana reakcija polimeraze (prema engl. *Polymerase Chain Reaction*)

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sustav

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (prema engl. *Reactive Oxygen Species*)

rtPCR – PCR u realnome vremenu (prema engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*)

SOD – superoksidna dismutaza

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TRx – tioredoksinski sustav

1. UVOD

1.1. Natrij

Natrij je glavni kation u izvanstaničnoj tjelesnoj tekućini te neophodna tvar potrebna za održavanje volumena plazme, acido-bazne ravnoteže, prijenosa živčanih impulsa te normalnog rada stanica (1). Procjenjuje se da nam za ove vitalne funkcije treba 500 mg natrija dnevno. Gotovo 100 % unesenog natrija apsorbira se tijekom probave, a izlučivanje je mokraćom primarni mehanizam održavanja ravnoteže natrija (2). Čak su i u vrućoj, vlažnoj klimi gubici natrija izmetom i znojem minimalni (1, 3). U uvjetima ekstremne vrućine i intenzivne tjelesne aktivnosti koja rezultira velikom proizvodnjom znoja, gubici su natrija znojenjem povećani i uočljivi; bez obzira na to, većina pojedinaca može nadoknaditi natrij konzumacijom hrane, bez dodataka ili posebno formuliranih proizvoda (1, 4).

1.1.1 Sol u prehrani

Natrijev klorid (NaCl) glavni je sastojak obične kuhinjske soli koja predstavlja glavni izvor natrija u prehrani. Aromatizira hranu i koristi se kao stabilizator (5). Nakon otkrića svojstava konzervansa prije otprilike 5000 godina, sol je postala roba koja se najviše oporezuje i trguje na svijetu (6). Uobičajeni unos natrija u svijetu kreće se između 3,5 – 5,5 g dnevno (što odgovara 9 – 12 g soli dnevno), s izrazitim razlikama na globalnoj razini. Većina soli u našoj prehrani dolazi iz komercijalno pripremljene hrane, a ne iz soli koja se dodaje kuhanju kod kuće ili iz soli dodane za stolom prije jela (7, 8). Budući da se sol široko koristi u preradi i proizvodnji hrane, prerađena hrana čini oko 75 % konzumiranog natrija (9). To uključuje prerađenu hranu poput kruha, prerađeno meso poput slanine, grickalice poput pereca i kokica te začine poput sojinog umaka (10). Dakle, prehrana bogata prerađenom hranom, a siromašna svježim voćem i povrćem često ima puno natrija (1, 11).

1.1.2. SZO smjernice

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje smanjenje unosa natrija radi smanjenja krvnog tlaka te rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB), moždanog udara te koronarne bolesti kod odraslih (1). Prema smjernicama iz 2013. godine, odrasli (16 godina i

više) bi trebali unositi manje od 2 g natrija ili 5 g soli na dan (10). Preporučuje se i smanjenje unosa natrija radi kontrole krvnog tlaka u djece (2 - 15 godina). Preporučenu maksimalnu razinu unosa od 2 g natrija na dan treba prilagoditi prema dolje na temelju energetske potrebe djece. Ove se preporuke odnose na sve pojedince, sa ili bez hipertenzije (uključujući trudnice i dojilje), osim na pojedince koji uzimaju terapiju koja može dovesti do hiponatrijemije ili akutnog edema, ili one koji zahtijevaju dijetu pod nadzorom liječnika (npr. pacijenti sa zatajenjem srca) (1, 12). Mjere javnog zdravstva za smanjenje natrija mogu uključivati označavanje hrane i proizvoda, edukaciju potrošača, ažuriranje nacionalnih prehrambenih smjernica te pregovore s proizvođačima hrane o smanjenju količine soli u prerađenoj hrani (10). Budući da postoji trend porasta količine obroka koji se konzumiraju izvan kuće, ključno je sudjelovanje ugostiteljske industrije u programima smanjenja soli (13). Uspješna provedba ovih mjera dovela bi do smanjenja morbiditeta i mortaliteta, poboljšanja kvalitete života milijuna ljudi te konačno do znatnoga smanjenja u troškovima zdravstvene zaštite (1, 14, 15). Ovo možemo vidjeti na primjeru Ujedinjenog Kraljevstva koje je postiglo smanjenje udjela soli od 20 – 50 % u mnogim prehrambenim proizvodima tijekom desetljeća, što je dovelo do istovremenog pada krvnog tlaka i smrtnosti od KVB (6, 16). SZO je postavila globalni cilj smanjenja unosa soli u prehrani za 30 % do 2025. godine (17).

1.2. Utjecaj visokoslane prehrane na makrocirkulaciju

Dijeta s visokim udjelom soli jedan je od glavnih čimbenika rizika u razvoju i održavanju hipertenzije (18). Porast natrija u plazmi dovodi do premještanja tekućine iz unutarstaničnog u izvanstanični odjeljak, stimuliranja središta žeđi i izlučivanja antidiuretskog hormona (ADH). Sustav renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) jedan je od najvažnijih mehanizama kontrole hemodinamičke stabilnosti koji regulira krvni tlak, volumen tekućine te ravnotežu natrija i kalija. Iz tog razloga, promjena bilo koje molekule koja sačinjava RAAS pridonosi razvoju arterijske hipertenzije (19, 20). Prekomjerni unos soli normalno potiskuje RAAS, što zauzvrat smanjuje reapsorpciju natrija i time olakšava njegovo izlučivanje. Kako funkcionalno pogoršanje bubrega i strukturne promjene napreduju, dolazi do zadržavanja natrija i vode i povećane rezistencije krvožilnog sustava, što zauzvrat utječe na opterećenje srca (6, 21, 22, 23). Pokazalo se da visoka dijetalna sol uzrokuje ili je povezana sa sistemskom vaskularnom disfunkcijom, arterijskom ukočenošću, promijenjenom bubrežnom funkcijom, hipertrofijom lijeve klijetke, poremećajima cerebralne cirkulacije te mnogim drugim poremećajima (24).

1.2.1. Hipertenzija

Hipertenzija je globalna epidemija koja pogađa preko milijardu ljudi širom svijeta (25). Procijenjeno je da će 2025. godine 30 % odrasle populacije biti hipertenzivno, odnosno da će ukupan broj hipertenzivnih osoba porasti za 60 %. Na temelju rezultata studije o epidemiologiji arterijske hipertenzije u Hrvatskoj, ukupna prevalencija hipertenzije u Hrvatskoj iznosi 37,5 %, pa ne treba čuditi da je kardiovaskularni morbiditet u Hrvatskoj također vrlo visok (>54 % u 2004.) (18, 26). Hipertenzija je višečimbenično stanje na čiji nastanak mogu utjecati okolišni, prehrambeni i nasljedni čimbenici (27). U više od 90 % slučajeva ima nepoznatu etiologiju te se dijagnosticira kao esencijalna ili primarna hipertenzija. Preostalih 10 % slučajeva dijagnosticira se kao sekundarna hipertenzija kojoj su u podlozi bubrežne, kardiovaskularne, neurološke i endokrine bolesti. Kronični visoki tlak stvara mehanička oštećenja duž krvožilnog sustava, srca i bubrega. Uz mehanički stres, oksidativni stres, kronična upala te aktiviranje popravljajčkih mehanizama dovode do oštećenja krajnjih organa, uglavnom zbog fibroze (19).

1.2.2. Kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne su bolesti povezane s raznim rizičnim čimbenicima od kojih se najviše ističu hiperkolesterolemija, hipertenzija, pušenje, dijabetes, neuravnotežena prehrana, stres i sjedilački način života (28). Pokazano je da visokosлана prehrana može povećati rizik od KVB (23, 29). Visoki serumski natrij u plazmi duboko utječe na funkcionalne osobine velikih elastičnih arterija i povezan je s relativnim povećanjem sistemskog perifernog otpora. Visoke vrijednosti krvnog tlaka tijekom duljeg vremenskog intervala dovode do progresivnih strukturnih promjena u arterijskoj stijenci velikih elastičnih arterija, s posljedičnim povećanjem krutosti arterija, što je opisano i potvrđeno u nekoliko studija (7, 30). Visok unos natrija i povećana razina krvnog tlaka povezani su s disfunkcijom endotela, generaliziranom aterosklerozom, aterosklerotskim stenozama, aneurizmama aorte te preuređivanjem malih i velikih arterija. U srcu to dovodi do hipertrofije lijeve klijetke, fibrilacije atrijske, koronarne mikroangiopatije, koronarne bolesti srca i zatajenja srca (6).

1.2.3. Cerebrovaskularne bolesti

Moždani udar glavni je uzrok smrti među cerebrovaskularnim bolestima u zapadnom društvu, a visok unos soli usko je povezan s njegovom pojavom (31). Hipertenzija povećava

rizik od akutne hipertenzivne encefalopatije, moždanog udara, intracerebralnog krvarenja, lakunarnog infarkta, lezija bijele tvari i vaskularne demencije (6). Također, visokosлана prehrana modificira vaskularnu reaktivnost na različite fiziološke podražaje, uključujući cerebralnu cirkulaciju (32). Cerebralna autoregulacija sposobnost je mozga da održi perfuziju unatoč promjenama u sistemskom arterijskom tlaku. Istraživanja su na glodavcima pokazala da visokosлана prehrana oštećuje cerebralnu autoregulaciju (24, 33). Oštećena funkcija cerebralnih krvnih žila, posebno otporničkih krvnih žila, značajno sudjeluje u mehanizmima moždanog udara (31).

1.2.4. Bubrežne bolesti

Bubrezi igraju ključnu ulogu u kontroli krvnog tlaka kroz natriurezu i diurezu, RAAS sustav i regulaciju aktivnosti simpatičkog živčanog sustava. Jedan su od organa zahvaćenih hipertenzijom, što rezultira funkcionalnim i strukturnim oštećenjima s posljedičnom disfunkcijom bubrega, što inducira pogoršani fenotip hipertenzije (19). Hipertenzija dovodi do albuminurije, proteinurije, smanjene brzine glomerularne filtracije, kronične bubrežne insuficijencije i zatajenja bubrega (6, 34). Unos soli je također povezan s razvojem oštećene funkcije bubrega u općoj populaciji neovisno o njezinim učincima na krvni tlak. Broj ljudi s završnom fazom bubrežne bolesti postupno se povećava u cijelom svijetu, što rezultira povećanjem broja dijaliznih pacijenata (35). Kronična aktivacija RAAS-a promovira i nastavlja kronične bolesti bubrega (36).

1.3. Utjecaj visokoslane prehrane na mikrocirkulaciju

Mikrocirkulacija je završna mreža sistemske cirkulacije koja se sastoji od arteriola, postkapilarnih venula i kapilara. Odgovorna je za prijenos kisika iz eritrocita u parenhimske stanice. Ostale funkcije uključuju regulaciju razmjene otopljene tvari između unutaržilnog i tkivnog prostora, prijenos hormona i hranjivih tvari te posredovanje aktivnosti imunološkog sustava i hemostaze (37).

1.3.1. Važnost endotela

Endotel postavlja unutarnju stijenku krvožilnog sustava i regulira bitne funkcije poput vaskularnog tonusa, cirkulacije krvnih stanica, upale te aktivnosti trombocita (38). Čini se da ima presudnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa (39). Vazodilatacija kao odgovor na naglu

promjenu protoka jedna je od glavnih karakteristika endotela (31). Endotel kontrolira vaskularni tonus oslobađanjem vazokonstriktora kao što je endotelin-1 te vazodilatatora poput dušikovog (II) oksida (NO), prostaciklina ili natriuretskih peptida. Vazodilatatori izvedeni iz endotela posjeduju i antiagregacijska svojstva, suzbijaju vaskularnu stenozu te usporavaju hipertrofiju srca (38). NO je potreban za pravilnu modulaciju protoka krvi (28). Igra važnu ulogu u održavanju bazalnog vaskularnog tonusa, vazodilataciji te u inhibiciji proliferacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila (31). Studije na životinjama ukazuju da NO ima važnu ulogu u hemodinamici bubrega i homeostazi natrija, inducirajući bubrežnu vazodilataciju i natriurezu (37, 39). U posljednjem desetljeću važnost procjene mikrovaskularne funkcije postala je očita u istraživanjima patofiziologije KVB (40).

1.3.2. Endotelna disfunkcija

Endotelna disfunkcija podrazumijeva oštećenu proizvodnju različitih glasnika izvedenih iz endotela što rezultira vazokonstriktornim, proupalnim i proaterotrombotičkim fenotipom koji dovodi do poremećene regulacije perfuzije i vaskularnog tonusa (38). Smatra se da je preteča KVB te početni događaj u aterogenezi (41). Čimbenici rizika povezani s endotelnom disfunkcijom su hipertenzija, hiperkolesterolemija, dijabetes i kronično pušenje. Također je jasno povezana s oksidativnim stresom. Smanjena aktivnost endotelne sintaze dušikovog (II) oksida (eNOS), inaktivacija prostaciklin sintaze, oksidativna aktivacija sistema endotelin-1 i izravna inaktivacija NO igraju važnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije (38).

1.3.3. Utjecaj soli na endotel

Prethodne kliničke studije nisu mogle razdvojiti učinke unosa soli i krvnog tlaka na funkciju endotela, budući da su se pretežno izvodile na hipertenzivnim bolesnicima. Nedavna istraživanja pokazuju da prekomjerna konzumacija soli može biti jedan od faktora koji doprinosi razvoju endotelne disfunkcije čak i ako nema povišenog krvnog tlaka (42, 43). Natrij smanjuje funkcionalnost endotela i narušava vazodilataciju ovisnu o endotelu (41). U normalnim uvjetima, vazodilatacija inducirana acetilkolinom podrazumijeva ekspresiju eNOS, a time i aktivnosti NO (44). Visok plazmatski natrij smanjuje ekspresiju eNOS i proizvodnju NO (41). Ova je promjena povezana s disfunkcijom endotela jer se fiziološki NO oslobađa posmičnim stresom i tako uzrokuje vazodilataciju (23). Dakle, jedan od mehanizama kojim akutno opterećenje soli utječe na krvožilnu funkciju je promijenjena proizvodnja i bioraspodjeljivost NO (42). Brojne studije na pokusnim životinjama pokazale su da je endotelna

disfunkcija zbog visokoslane prehrane povezana s povećanim oksidativnim stresom (31). Uz to, može smanjiti i antioksidativne obrambene mehanizme. Konkretno, modeli glodavaca pokazali su da visokosлана prehrana smanjuje ekspresiju superoksid dismutaze ovisne o bakru/cinku (24).

1.4. Oksidativni stres i ROS

Oksidativni je stres pojava uzrokovana neravnotežom između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, prema engl. *Reactive Oxygen Species*) u stanicama i tkivima te sposobnosti biološkog sustava da ukloni te produkte. ROS su reaktivne molekule izvedene iz molekularnog kisika koje mogu samostalno postojati s jednim ili više nesparenih elektrona. To uključuje superoksidne radikale, vodikov peroksid, hidroksilne radikale, singletni kisik i druge. ROS uglavnom proizvode mitohondriji tijekom fizioloških i patoloških stanja. Aktivacija imunoloških stanica, upala, infekcija, rak, pretjerano vježbanje, mentalni stres i starenje odgovorni su za endogenu proizvodnju slobodnih radikala. Egzogeno proizvodnja slobodnih radikala može nastati kao rezultat izloženosti zagađivačima iz okoliša, teškim metalima (kadmij, živa, olovo), određenim lijekovima (ciklosporin, gentamicin), kemijskim otapalima, kuhanju (rabljeno ulje i masnoća), cigaretnom dimu, alkoholu i zračenjima. Proizvodnja ROS-a u osnovi se oslanja na enzimatske i neenzimatske reakcije (28).

1.4.1. Fiziološka uloga

Kada se održavaju na niskoj ili umjerenoj razini, ROS su od presudne važnosti za ljudsko zdravlje (28). Stvaranje ROS-a evolucijski je očuvan proces koji služi u staničnom signalnom mehanizmu, kao i u obrambenom mehanizmu od mikrobne invazije (45). Imaju ključnu regulatornu ulogu u unutarstaničnim signalnim kaskadama u nekoliko tipova stanica kao što su fibroblasti, endotelne stanice, vaskularne glatke mišićne stanice, srčani miociti i tkivo štitnjače. Procesi poput fosforilacije proteina, apoptoze, imunosti i diferencijacije ovise o pravilnoj proizvodnji ROS-a (28).

1.4.2. Štetni učinci

Akumulacija ROS-a može poremetiti stabilnost mitohondrijske membrane, što će u konačnici pokrenuti aktivaciju kaspaze i smrt stanice. Dakle, premoćna proizvodnja ROS-a može uništiti strukturu organela i biomolekula poput proteina, lipida i nukleinskih kiselina, što

dovodi do upalnog odgovora koji je poznati temeljni mehanizam za razvoj bolesti poput dijabetesa, raka, ateroskleroze i KVB (45). Tijekom posljednjih godina, podaci istraživanja istaknuli su da bi oksidativni stres trebalo smatrati primarnim ili sekundarnim uzrokom mnogih KVB, budući da djeluje uglavnom kao okidač ateroskleroze (28). Također, studije na životinjama pokazale su da povećani oksidativni stres smanjuje proizvodnju NO, koji je važan posrednik dilatacije izazvane protokom (31). I *in vivo* i *ex vivo* studije pružile su dokaze koji podupiru ulogu oksidativnog stresa u aterosklerozi, hipertenziji, srčanoj hipertrofiji i kongestivnom zatajenju srca. Oksidativni je stres također uključen u mnoštvo bolesti koje utječu na bubrežni aparat, kao što su glomerulo- i tubulointersticijski nefritis, zatajenje bubrega, proteinurija i uremija. Proizvodnja ROS-a inducira regrutiranje upalnih stanica što dovodi do početne upalne faze, a kasnije formiranje obilnog fibrotičnog tkiva koje potencijalno dovodi do zatajenja bubrega (28).

1.5. Antioksidativni sustavi

Ljudsko je tijelo uspostavilo nekoliko strategija za suzbijanje učinaka slobodnih radikala. Antioksidativni se sustav dijeli na endogeni i egzogeni. Endogeni se sastoji od enzimatskih i neenzimatskih molekula. Pored njih, postoji nekoliko egzogenih antioksidativnih molekula, kao što su fenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, vitamini i minerali (28). Antioksidativni sustavi mogu manipulirati razinom ROS-a regulirajući ekspresiju gena i povezane signalne putove kako bi održali homeostazu te integritet staničnih struktura (45).

1.5.1. Enzimatski antioksidanti

Enzimatski antioksidanti sastoje se od superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i tioredoksin (Trx) sustava. Superoksidne dismutaze pronađene u ljudskom organizmu mogu se klasificirati na citoplazmatske bakar-cink superoksidne dismutaze (Cu/Zn SOD), mitohondrijske manganove superoksidne dismutaze (Mn SOD) te izvanstanične SOD (EC-SOD, prema engl. *Extracellular Superoxide Dismutase*). SOD može katalizirati superoksid u kisik i vodikov peroksid. Čini se da je SOD prva linija obrane od slobodnih radikala. CAT može neutralizirati vodikov peroksid razgrađujući ga na molekularni kisik i vodu. Obitelj GPx sastoji se od tri evolucijske skupine: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 i GPx4/GPx7/GPx8. Mogu koristiti glutation kao reduktant za kataliziranje vodikovog peroksida u vodu, odnosno odgovarajuće alkohole (45). GPx4 najvažnija je izoforma u

moždanim žilama odgovorna za održavanje oksidacijskog statusa (31). Trx se sustav sastoji od nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NAD(P)H), tioredoksin reduktaze i tioredoksina. Osigurava elektrone tiol-ovisnim peroksidazama za uklanjanje ROS-a velikom brzinom. Sudjeluje i u popravku DNA i proteina regulacijom aktivnosti mnogih redoks-osjetljivih transkripcijskih čimbenika. Također, Trx sustavi imaju presudnu ulogu u imunološkom odgovoru, virusnim infekcijama i staničnoj smrti (46).

1.5.2. Neenzimatski antioksidanti

Neenzimatski antioksidanti mogu neutralizirati oksidativni učinak promicanjem antioksidativnog enzima ili izravnom preradom oksidativne lančane reakcije. Glutation je glavni antioksidans i redoks regulator u stanicama. Nalazi se visokim razinama u većini stanica u kojima postoji u dva stanja: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Igra presudnu ulogu u zaštiti staničnih makromolekula od endogenih i egzogenih reaktivnih vrsta kisika i dušika. Uz svoje ključne uloge u redoks homeostazi, djeluje i kao kofaktor za mnoštvo enzima. Vitamin A ili retinol je karotenoid koji se proizvodi u jetri. Može izravno vezati peroksilne radikale prije nego što šire peroksidaciju na lipide. Vitamin C ili askorbinska kiselina učinkovit je u uklanjanju aniona superoksidnog radikala, vodikovog peroksida, hidroksilnog radikala, singlet kisika i reaktivnog dušikovog oksida. Vitamin E ili α -tokoferol ima 8 izoformi koje zaustavljaju peroksidaciju lipida. Može se regenerirati kroz vitamin C kako bi se održao antioksidativni potencijal. Najvažniji minerali koji imaju antioksidativnu funkciju su selen i cink. Također, mnogi metaboliti u ljudskom organizmu imaju antioksidativno djelovanje. Nekonjugirani oblik bilirubina koji cirkulira u zdravih osoba ima antioksidativna svojstva. Također, studije pokazuju da jedna molekula melatonina ima sposobnost uklanjanja do 10 molekula ROS-a (45, 47).

2. HIPOTEZA

Visokoslana prehrana dovodi do snižavanja izražaja antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD, GPx1 i GPx4) u krvnim žilama i bubrezima te povećava razinu oksidativnog stresa u organizmu.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja:

- 1) ispitati relativan izražaj važnih antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD, GPx1 i GPx4) u mikro-, makrocirkulaciji te bubrezima pod utjecajem visokoslane prehrane
- 2) ispitati uzrokuje li duži vremenski period visokoslane prehrane značajne promjene u razini antioksidativnih enzima u odnosu na akutnu primjenu

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (Sprague-Dawley štakorima). Ovo je istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-105).

4.2. Materijali

U istraživanju su se koristili zdravi muški Sprague-Dawley štakori starosti 3 tjedna. Životinje su do trenutka ulaska u protokol konzumirale standardnu hranu za štakore (Mucedola, Italija) koja sadrži 0,4 % NaCl-a u svom sastavu.

Životinje su bile podijeljene u 4 skupine (broj životinja po skupini N = 3):

- 1) Visokoslana skupina 7 dana - skupina životinja koja je kroz tjedan dana konzumirala hranu s visokim udjelom NaCl-a (4 % NaCl-a);
- 2) Kontrolna skupina 7 dana - skupina životinja koja je još dodatnih tjedan dana konzumirala standardnu hranu za štakore koja sadrži 0,4 % NaCl-a;
- 3) Visokoslana skupina 30 dana - skupina životinja koja je kroz 30 dana konzumirala hranu s visokim udjelom NaCl-a (4 % NaCl-a);
- 4) Kontrolna skupina 30 dana - skupina životinja koja je još dodatnih 30 dana konzumirala standardnu hranu za štakore koja sadrži 0,4 % NaCl-a.

Nakon ulaska u protokol i konzumacije određenog tipa ishrane kroz 7 ili 30 dana, životinje su žrtvovane te su prikupljeni uzorci tkiva za analizu genskog izražaja.

4.3. Metode

Uzgoj i protokol na životinjama proveden je u nastambi za životinje, Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek.

Nakon 7 ili 30 dana dijetnog protokola, štakori su izvagani te anestetizirani kombinacijom ketanest S 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), nakon čega su žrtvovani dekapitacijom. Izolirane su krvne žile mozga, aorta i bubrezi. Uzorci su pohranjeni u RNAlater® Solution (Applied Biosystems, SAD) u omjeru 1 : 5. RNAlater® Solution je tekući, netoksični reagens za pohranu tkiva koji trenutno prodire u tkivo te smanjuje potrebu za brзом obradom ili smrzavanjem uzoraka, a inaktivira i RNaze. Do daljnje obrade uzorci su bili pohranjeni na -80 °C.

Za određivanje izražaja antioksidativnih gena iz uzoraka krvnih žila mozga, aorte i bubrega korištena je molekularna metoda PCR u realnome vremenu (rtPCR, prema engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Geni čiji se izražaj mjerio su: izoforme superoksidne dismutaze (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD), GPx1 i GPx4. Izražaj antioksidativnih gena obavio se metodom rtPCR na uređaju Bio Rad CFX96.

4.3.1. RNA izolacija

Homogenizacija je uzoraka provedena prema protokolu koji je opisan u znanstvenome radu „*Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*“ (48). Izolacija je uzoraka (krvne žile mozga, aorta, bubrezi) provedena pomoću tekućeg dušika u tarioniku i uzorak je usitnjen do praha. Uzorku je potom dodan 1 mL trizola. Trizol je toksični reagens za izolaciju visokokvalitetne ukupne RNA ili istodobnu izolaciju RNA, DNA i proteina iz različitih bioloških uzoraka. Zatim je dodano 100 µL 1-brom-3-klorpropana kako bi se svi slojevi odvojili. Nakon toga su se uzorci naglim pokretima promućkali 15 sekundi te su bili ostavljeni na sobnoj temperaturi 8 minuta kako bi se inkubirali. Potom su centrifugirani 15 minuta na 1200 RPM-a. Po završetku, supernatant je odvojen u sterilne Eppendorf tubice, u koje je dodano po 500 µL izopropanola kako bi se RNA odvojila od staničnog sadržaja (DNA, proteini, lipidi i sl.). Zatim su uzorci lagano promućkani 15 do 20 sekundi te inkubirani 8 minuta na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je ponovno centrifugiranje 8 minuta na 1200 RPM-a. Nakon toga slijedilo je ispiranje s 1 mL 75 %-tnog etanola bez mućkanja i centrifugiranje 5 minuta na 7500 RPM-a, a postupak s etanolom ponavljao se dva puta. Nakon čišćenja etanolom i sušenja uzoraka dodano je 30 µL čiste vode te je izmjerena koncentracija RNA i njezina čistoća.

4.3.2. PCR u realnome vremenu

U ovome je istraživanju provedeno određivanje ekspresije gena za antioksidativne enzime metodom PCR u realnome vremenu pomoću uređaja Bio Rad CFX96 iz uzoraka štakorskih moždanih krvnih žila, aorte te bubrega. PCR (lančana reakcija polimeraze, prema engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda amplifikacije relativno kratkih odsječaka DNA u velik broj kopija koje zatim služe u daljnjim istraživanjima. *Real-time* PCR kombinacija je standardnog PCR-a i fluorescentnog mjerenja. Preciznija je i brža metoda (dobivanje rezultata za 30 minuta) od standardnog PCR-a, ali i skuplja. Reakcijska se smjesa sastoji od kalupa (DNA, cDNA, RNA), oligonukleotidnih početnica, četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq DNA polimeraze (u slučaju RNA kalupa enzim je reverzna transkriptaza), iona Mg^{2+} , PCR pufera te fluorescentne boje ili fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba. Nukleinske se kiseline eksponencijalno umnažaju ciklusima koji se ponavljaju. Svaki se ciklus sastoji od razdvajanja roditeljske DNA, odnosno denaturacije pri 95 °C tijekom 15 s, potom hlađenja na 55 do 60 °C koje omogućuje hibridizaciju početnica (optimalne duljine 20-25 nukleotida) s komplementarnim sljedovima, te elongacije, odnosno sinteze novonastale DNA. Optimalna je temperatura Taq DNA polimeraze za elongaciju 72 °C. U svakom se ciklusu broj DNA molekule udvostručio, a novi lanci predstavljaju kalup za sintezu nove DNA u svakom idućem ciklusu. Široko se primjenjuje za kvantifikaciju ekspresije gena, detektiranje patogena, SNP (prema engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*) genotipizaciju i dr.

4.4. Statističke metode

Za statističku je analizu korišten Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc., Chicago, USA). Veličina uzorka određena je pomoću SigmaPlot v11.2 (Systat Software, Inc.) statističkog programa. Uz $\alpha = 0,05$ te snagu testa od 0,80 te predviđenu najmanju mjerljivu razliku u prosječnim vrijednostima od 0,05, potrebno je minimalno 3 pokusne životinje po skupini. Numerički su podatci opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli među svim ispitivanim nezavisnim skupinama testirane su analizom varijance (ANOVA), a u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak post hoc testom. Razina statističke značajnosti određena je sa $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Genski izražaj ciljnih antioksidativnih enzima u aortama Sprague-Dawley štakora

Iz izoliranih se uzoraka tkiva aorti nakon izolacije RNA odredio izražaj antioksidativnih enzima Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD, GPx1 i GPx4. Izražaj navedenih gena mjerio se za dvije niskoslane skupine te dvije visokoslane skupine s različitom dužinom dijetnog protokola (7 i 30 dana). Rezultati pokazuju kako dužina trajanja slanog protokola ili koncentracija soli nije uspjela promijeniti izražaj svih, odnosno većine gena. Jedine razlike su uočene u genskom izražaju Mn SOD gdje se pokazalo da 30 dana visokoslane dijetete ima višu razinu navedenog gena u odnosu na visokoslano dijetu koja je konzumirana tjedan dana ($p = 0,04$) (Tablica 1). Definitivno SOD izoforma Mn SOD ima najznačajniju ulogu u mehanizmima regulacije oksidativnog stresa kod jako mladih štakora.

Tablica 1. Relativni genski izražaj antioksidativnih enzima SOD izoformi (Cu/Zn SOD, GPx1, GPx4 i katalaze u aortama Sprague-Dawley štakora)

Uzorak - AORTA	Aritmetička sredina (standardna devijacija)				
	Relativan izražaj gena				
Pokusna skupina (N - broj životinja)	Cu/Zn SOD	Mn SOD	EC-SOD	GPx1	GPx4
Niskoslana skupina 7 dana (N = 3)	0,73 (0,21)	0,85 (0,24)	0,89 (0,11)	0,68 (0,21)	1,68 (0,58)
Visokoslana skupina 7 dana (N = 3)	0,66 (0,66)	0,11 (0,12)	0,25 (0,16)	0,64 (0,70)	0,34 (0,16)
Niskoslana skupina 30 dana (N = 3)	0,62 (0,34)	1,02 (0,44)	1,72 (0,98)	0,75 (0,15)	1,65 (0,86)
Visokoslana skupina 30 dana (N = 3)	2,16 (1,28)	0,98 (0,34)*	1,08 (0,37)	1,19 (0,47)	1,06 (0,28)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

* $p < 0,05$ visokoslana skupina 7 dana vs. visokoslana skupina 30 dana ($p = 0,04$)

5.2. Izražaj antioksidativnih gena u mikrocirkulaciji štakora tretiranih visokoslanom i niskoslanom prehranom

Nakon dekapitacije životinje, omogućen je pristup mozgu i njegovim krvnim žilama te je uslijedila izolacija RNA i određivanje gena PCR metodom u realnome vremenu. Jednako kao u makrocirkulaciji, promjene uzrokovane kratkotrajnim i/ili dugotrajnim unosom hrane s visokim postotkom soli uzrokovale su značajne promjene samo u izražaju Mn SOD (Tablica 2.) u mikrocirkulaciji. Rezultati pokazuju kako tjedan dana visokoslane prehrane značajno snižava Mn SOD u odnosu na njegovu niskoslanu skupinu ($p = 0,01$) te da 30 dana visokog unosa soli ponovno vraća razinu Mn SOD na razinu izmjerene izražaja za niskoslanu skupinu ($p = 0,02$).

Navedeni je rezultat dodatna potvrda daleko najveće važnosti Mn SOD za oksidativni status kod mladih štakora.

Tablica 2. Genski izražaj ciljnih antioksidativnih gena u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora

Uzorak - KŽM Pokusna skupina (N - broj životinja)	Aritmetička sredina (standardna devijacija)				
	Relativan izražaj gena				
	Cu/Zn SOD	Mn SOD	EC-SOD	GPx1	GPx4
Niskoslana skupina 7 dana (N = 3)	1,01 (0,05)	0,19 (0,23)*	0,24 (0,02)	1,50 (0,13)	1,30 (0,35)
Visokoslana skupina 7 dana (N = 3)	0,29 (0,30)	0,02 (0,03)	0,08 (0,09)	3,07 (2,39)	0,46 (0,28)
Niskoslana skupina 30 dana (N = 3)	0,64 (0,33)	0,22 (0,01)	0,29 (0,09)	1,31 (0,31)	1,32 (0,12)
Visokoslana skupina 30 dana (N = 3)	0,78 (0,55)	0,16 (0,08)*	0,17 (0,09)	0,79 (0,50)	0,85 (0,42)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

* $p < 0,05$ visokoslana skupina 7 dana vs. niskoslana skupina 7 dana ($p = 0,01$); visokoslana skupina 30 dana ($p = 0,02$)

KŽM - krvne žile mozga

5.3 Izražaj antioksidativnih gena u bubrezima mladih Sprague-Dawley štakora

Budući da bubrezi imaju važnu ulogu u regulaciji koncentracije natrija i njegovih neželjenih posljedica na kardiovaskularni sustav, potrebno je vidjeti kako bubrezi reguliraju antioksidativne enzime te koji će se od gena pokazati ključnim. Nije došlo do značajnih promjena u izražaju gena, kao što je to slučaj u krvim žilama (Tablica 3).

Tablica 3. Relativan izražaj antioksidativnih enzima u bubrezima štakora podvrgnutih visokoslanoj prehrani 7 i/ili 30 dana

Uzorak - bubrezi	Aritmetička sredina (standardna devijacija)				
	Relativan izražaj gena				
Pokusna skupina (N - broj životinja)	Cu/Zn SOD	Mn SOD	EC-SOD	GPx1	GPx4
Niskoslana skupina 7 dana (N = 3)	2,32 (1,72)	0,26 (0,07)	0,47 (0,09)	0,76 (0,20)	0,36 (0,53)
Visokoslana skupina 7 dana (N = 3)	3,11 (2,98)	0,28 (0,23)	0,33 (0,21)	0,46 (0,22)	1,34 (1,03)
Niskoslana skupina 30 dana (N = 3)	3,12 (1,94)	0,58 (0,15)	0,37 (0,06)	1,06 (0,12)	4,01 (0,49)
Visokoslana skupina 30 dana (N = 3)	6,22 (4,66)	0,34 (0,23)	0,23 (0,13)	0,78 (0,55)	1,82 (1,09)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija

6. RASPRAVA

U normalnim uvjetima, mnoštvo snažnih antioksidativnih mehanizama štiti krvne žile i organe od štetnih učinaka povišene razine superoksida i drugih ROS-ova. Međutim, pomak u redoks ravnoteži prema oksidativnom stresu (zbog povećane proizvodnje ROS-a, oslabljene funkcije antioksidativnih obrambenih mehanizama ili kombinacije ova dva čimbenika) ima višestruke štetne učinke na krvne žile i ciljane organe. Jedan od glavnih štetnih učinaka oksidativnog stresa u krvnim žilama je disfunkcija endotela koja je snažan prognostički čimbenik višestrukih kardiovaskularnih bolesti poput hipertenzije, ishemije miokarda, moždanog udara te iznenadne srčane smrti. Zajednički nazivnik u endotelnoj disfunkciji je smanjena dostupnost NO kojega proizvode i oslobađaju endotelne stanice. Posljedica je ovog događaja gubitak sposobnosti opuštanja krvožilnog sustava ovisnog o endotelu, poticanje upale, proliferacija stanica te hipertrofija glatkih mišićnih vlakana stijenki krvnih žila. Povišena razina ROS-a također može poremetiti normalne mehanizme transdukcije signala u stanicama endotelnih i krvožilnih glatkih mišića te promovirati stvaranje dodatnog ROS-a (31, 49).

Do danas su od svih antioksidativnih enzima najviše istražene promjene izražaja SOD izoformi pod utjecajem visokoslane prehrane. Visok unos soli u prehrani može dovesti do smanjena izražaja Cu/Zn SOD i Mn SOD u mikrocirkulaciji (50). Međutim, ovaj učinak nije ujednačen u svim krvožilnim sustavima. Prekomjerna dijetalna sol nema utjecaja na izražaj niti jedne od navedenih SOD izoformi u mezenteričnim rezistentnim arterijama ili na izražaj Cu/Zn SOD u arteriolama skeletnih mišića (51). Postoje dokazi koji ukazuju na to da visok unos soli može dovesti do smanjene aktivnosti arteriolarnog SOD-a. Povećanje arteriolarnog superoksida, koje prati farmakološku inhibiciju Cu/Zn SOD, znatno je manje kod štakora koji se hrane hranom s visokim udjelom soli nego kod onih koji se hrane normalnom slanom hranom, što sugerira da je aktivnost Cu/Zn SOD niža u arteriolama štakora koji su hranjeni visokoslanom dijetom. Mitohondriji su glavni organeli za proizvodnju staničnog superoksida u aerobnim organizmima (52). Proizvedeni se superoksid zatim uz pomoć mitohondrijske Mn SOD pretvara u vodikov peroksid koji se potom pretvara u vodu pomoću katalaze i glutathion peroksidaze. Nedostatak Mn SOD dovodi do povišenja nezadržanog superoksida što može uzrokovati oksidativni stres, upala i ozljedu tkiva. Zapravo, homozigotni miševi s nedostatkom Mn SOD (Mn SOD $-/-$) umiru od proširene kardiomiopatije, masne jetre i brojnih drugih komplikacija u roku od nekoliko dana nakon rođenja. S druge strane, heterozigotni miševi s

djelomičnim nedostatkom Mn SOD mogu preživjeti, ali u tom slučaju pokazuju znakove oštećenju i starenju mitohondrija koji su izazvani superoksidom (53). Ranije su studije pokazale da dijeta s visokim udjelom soli uzrokuje hipertenziju kod miševa s nedostatkom Mn SOD, ali ne i kod miševa divljeg tipa (54). Oksidativni stres i bubrežna intersticijska upala stalno su prisutni te igraju glavnu ulogu u povišenju arterijskog tlaka u životinjskim modelima genetske i stečene hipertenzije. Oksidativni stres u bubrežima i krvožilnim tkivima može povisiti arterijski tlak pomoću nekoliko mehanizama, uključujući inaktivaciju posredovanu superoksidom, oštećenja uzrokovana smanjenom proizvodnjom dušikovog oksida (55) i nakupljanjem proupalnih spojeva, te nakupljanjem vazokonstriktivnih i antinatriuretskih izoprostana (56). Uz to, oksidativni stres aktivira redoks-osjetljivi nuklearni faktor κ B i time potiče intersticijsku upalu (57). Također, aktivacija angiotenzinskog receptora tip 1 (AT1) pojačava stvaranje superoksida i oksidativni stres aktiviranjem NAD(P)H oksidaza. Ovi događaji djeluju sinergistički u promicanju hipertenzije. Rezultati su ovog istraživanja pokazali kako akutni visoki unos soli dovodi do snižavanja (značajnog ili ima tendenciju) Mn SOD izoforme u mikro- i makrocirkulaciji. No, zanimljivo je kako duži period visokoslane prehrane ponovno povećava izražaj navedenog enzima i to do razine koja je uočena u niskoslanjoj skupini. Pretpostavka je da dužim periodom unosa soli organizam kompenzira prvotno nastali oksidativni stres te se „navikava” na novonastalo stanje. Promjena se Mn SOD jedino nije uočila u bubrežima, uzrok čega može biti bolja regulacija u tim organima te potrebe za dužim periodom i/ili većim koncentracijama soli kako bi se uočile promjene.

Ćosić i suradnici su ispitivali promjene važnih antioksidativnih gena u mikrocirkulaciji krvnih žila mozga kod zrelih štakora te su uočili kako je tjedan dana visokog unosa soli od 4 % uzrokovalo promjenu GPx4 enzima. Razina se tog enzima značajno snizila nakon konzumacije soli 7 dana, bez utjecaja na druge ispitivane antioksidativne enzime (SOD, GPx1 i katalaza). Isto tako, aktivnost svih navedenih enzima nije se mijenjala u serumu (31, 49). U ovome se istraživanju GPx izoforme nisu značajno mijenjale niti u jednom od ispitivanih uzoraka.

Ovakvi rezultati daju zaključiti kako unos visokih koncentracija soli neupitno povećava oksidativni stres u organizmu, ali da su uzrok tih promjena tj. kretanje izražaja pojedinih antioksidativnih enzima različiti ovisno o modelu, koncentraciji NaCl-a te dužini trajanja protokola.

7. ZAKLJUČAK

- 1) Unos visokih koncentracija soli nije imao značajan utjecaj na promjene većine antioksidativnih enzima, što može biti posljedica činjenice da su pokusi rađeni na mladim štakorima koji bolje kompenziraju nastale promjene i povećanje oksidativnog stresa
- 2) Dužina protokola ishrane nije imala utjecaja na razinu antioksidativnih gena u bubrezima
- 3) Mn SOD antioksidativni enzim jedini se značajno mijenjao u mikro- i makrocirkulaciji
- 4) Dužim se trajanjem visokoslane ishrane razina Mn SOD povećala u odnosu na kraći period istog dijetnog protokola

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Ispitati relativan izražaj važnih antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD, GPx1 i GPx4) u mikro-, makrocirkulaciji te bubrezima pod utjecajem visokoslane prehrane.

NACRT STUDIJE: Kontrolirani pokus na animalnom modelu

MATERIJALI I METODE: Sprague-Dawley muški štakori starosti 3 tjedna podijeljeni su u 4 skupine. Dvije skupine štakora konzumirale su niskoslanu prehranu koja sadrži 0,4 % NaCl-a u svom sastavu (kroz 7 ili 30 dana), dok su druge dvije skupine konzumirale visokoslanu prehranu koja sadrži 4 % NaCl-a (kroz 7 ili 30 dana). Nakon završenog dijetnog protokola, životinje su žrtvovane dekapitacijom te su prikupljeni uzorci aorti, krvnih žila mozga te bubrega iz kojih se rtPCR metodom odredio genski izražaj ciljnih antioksidativnih enzima.

REZULTATI: Visokosлана prehrana uzrokovala je značajnu promjenu Mn SOD antioksidativnog gena u aortama te krvnim žilama mozga. 30 dana visokog unosa soli dovelo je do značajno većeg izražaja Mn SOD u odnosu na akutni (7 dana) protokol. Također, 7 dana visokoslane ishrane značajno je snizio izražaj istog gena u odnosu na niskoslanu skupinu. Ostali antioksidativni enzimi nisu se značajno mijenjali između ispitivanih skupina u svim uzorcima.

ZAKLJUČAK: Mlađi štakori bolje kompenziraju štetne utjecaje visokoslane prehrane te je potreban duži period takve ishrane kako bi se pokazali štetni učinci. Mn SOD ima najznačajniju ulogu u promjeni antioksidativnog statusa. Kod dužeg perioda visokoslane prehrane dolazi do aktivacije kompenzacijskog mehanizma i regulacije oksidativnog stresa povećanjem izražaja Mn SOD.

KLJUČNE RIJEČI: antioksidativni enzimi; bubrezi; cirkulacija; oksidativni stres; štakori; visokosлана dijeta

9. SUMMARY**INFLUENCE OF HIGH SALT DIET ON ANTIOXIDANT ENZYMES GENE
EXPRESSION IN MICRO-, MACROCIRCULATION AND KIDNEYS OF YOUNG
SPRAGUE-DAWLEY RATS**

OBJECTIVES: To examine the relative expression of important antioxidant enzymes (Cu/Zn SOD, Mn SOD, EC-SOD, and GPx1 GPx4) in micro, macrocirculation and kidneys under the influence of high salt diet.

STUDY DESIGN: Controlled experiment in animal model

MATERIALS AND METHODS: Sprague-Dawley male rats at 3 weeks of age were divided into 4 groups. Two groups of rats consumed a low-salt diet containing 0,4 % NaCl in their composition (for 7 or 30 days) and the other two groups consumed a high-salt diet containing 4 % NaCl (for 7 or 30 days). After completion of the dietary protocol, the animals were sacrificed by decapitation. From the samples of aorta, blood vessels of the brain and kidneys, the gene expression of target antioxidant enzymes was determined by real-time PCR.

RESULTS: A high salt diet caused a significant change in the Mn SOD antioxidant gene in the aorta and blood vessels of the brain. 30 days of high salt intake lead to significantly higher expression of Mn SOD compared to the acute (7 days) protocol. Also, 7 days of a high-salt diet significantly lowered the expression of the same gene relative to the low-salt group. Other antioxidant enzymes did not change significantly between test groups in all samples.

CONCLUSION: Younger rats compensate harmful effects of a high-salt diet better and it would take a longer period of such diet to show the harmful effects. Mn SOD has the most significant role in changing the antioxidant status. A longer period of high-salt diet leads to activation of the compensatory mechanism and regulation of oxidative stress by increasing expression of Mn SOD.

KEYWORDS: antioxidant enzymes; circulation; high-salt diet; kidneys; oxidative stress; rats

10. LITERATURA

1. World Health Organization (WHO). Guideline: Sodium intake for adults and children. Genève, Switzerland: World Health Organization; 2012.
2. Holbrook JT, Patterson KY, Bodner JE, Douglas LW, Veillon C, Kelsay JL, i sur. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. *Am J Clin Nutr.* 1984;40(4):786–93.
3. Sawka MN, Montain SJ. Fluid and electrolyte supplementation for exercise heat stress. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2 Suppl):564S-72S.
4. Zeidel ML. Salt and water: not so simple. *J Clin Invest.* 2017;127(5):1625–6.
5. Harvard.edu. Salt and Sodium. Dostupno na adresi: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/salt-and-sodium>. Datum pristupa: 18.5.2021.
6. He FJ, Tan M, Ma Y, MacGregor GA. Salt reduction to prevent hypertension and cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(6):632–47.
7. Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P, Parati G. Sodium intake and hypertension. *Nutrients.* 2019;11(9):1970.
8. Qian Q. Salt, water and nephron: Mechanisms of action and link to hypertension and chronic kidney disease: Salt, water and nephron. *Nephrology (Carlton).* 2018;23 Suppl 4:44–9.
9. Ha SK. Dietary salt intake and hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12(1):7–18.
10. WHO. WHO issues new guidance on dietary salt and potassium. Dostupno na adresi: https://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt_potassium_20130131/en. Datum pristupa: 18.5.2021.
11. Webster JL, Dunford EK, Neal BC. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(2):413–20.
12. Chen X, Wang Y. Tracking of blood pressure from childhood to adulthood: a systematic review and meta-regression analysis. *Circulation.* 2008;117(25):3171–80.
13. Galletti F, Strazzullo P. The blood pressure-salt sensitivity paradigm: pathophysiologically sound yet of no practical value. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(9):1386–91.

14. World Health Organization(WHO). Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Genève, Switzerland: World Health Organization; 2009.
15. WHO. The atlas of heart disease and stroke. Dostupno na adresi: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en. Datum pristupa: 18.5.2021.
16. He FJ, Pombo-Rodrigues S, Macgregor GA. Salt reduction in England from 2003 to 2011: its relationship to blood pressure, stroke and ischaemic heart disease mortality. *BMJ Open*. 2014;4(4):e004549.
17. Malta D, Petersen KS, Johnson C, Trieu K, Rae S, Jefferson K, i sur. High sodium intake increases blood pressure and risk of kidney disease. From the Science of Salt: A regularly updated systematic review of salt and health outcomes (August 2016 to March 2017). *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018;20(12):1654–65.
18. Drenjančević-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;34(1):1–11.
19. Muñoz-Durango N, Fuentes CA, Castillo AE, González-Gómez LM, Vecchiola A, Fardella CE, i sur. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system beyond blood pressure regulation: Molecular and cellular mechanisms involved in end-organ damage during arterial hypertension. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):797.
20. Rossier BC, Bochud M, Devuyst O. The hypertension pandemic: An evolutionary perspective. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(2):112–25.
21. Yoon HE, Choi BS. The renin-angiotensin system and aging in the kidney. *Korean J Intern Med*. 2014;29(3):291–5.
22. Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circ Res*. 2015;116(6):1007–21.
23. Gonzalez SR, Ferrão FM, Souza AM de, Lowe J, Morcillo L da SL. Inappropriate activity of local renin-angiotensin-aldosterone system during high salt intake: impact on the cardio-renal axis. *J Bras Nefrol*. 2018;40(2):170–8.
24. Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB. The influence of dietary salt beyond blood pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2019;21(6):42.
25. Foss JD, Kirabo A, Harrison DG. Do high-salt microenvironments drive hypertensive inflammation? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(1):R1–4.

26. Jelaković B, Zeljković-Vrkić T, Pećin I, Dika Z, Jovanović A, Podobnik D, i sur. Arterial hypertension in Croatia. Results of EH-UH study. *Acta Med Croatica*. 2007;61(3):287–92.
27. Komnenov D, Levanovich PE, Rossi NF. Hypertension associated with fructose and high salt: Renal and sympathetic mechanisms. *Nutrients*. 2019;11(3):569.
28. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, i sur. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-13.
29. Patel Y, Joseph J. Sodium intake and heart failure. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9474.
30. Ungvari Z, Tarantini S, Donato AJ, Galvan V, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging. *Circ Res*. 2018;123(7):849–67.
31. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, i sur. 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;594(17):4917–31.
32. Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, i sur. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in *Tff3^{-/-}/C57BL/6N* knockout and WT (*C57BL/6N*) control mice. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5188.
33. Allen LA, Schmidt JR, Thompson CT, Carlson BE, Beard DA, Lombard JH. High salt diet impairs cerebral blood flow regulation via salt-induced angiotensin II suppression. *Microcirculation*. 2019;26(3):e12518.
34. Sunil KN, Muzahir HT, Franz M, Gregory YHL. Target organ damage in hypertension: Pathophysiology and implications for drug therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(13):1581–92.
35. Sugiura T, Takase H, Ohte N, Dohi Y. Dietary salt intake is a significant determinant of impaired kidney function in the general population. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(4):1245–54.
36. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):363–82.
37. Guven G, Hilty MP, Ince C. Microcirculation: Physiology, pathophysiology, and clinical application. *Blood Purif*. 2020;49(1–2):143–50.
38. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, i sur. Targeting vascular (endothelial) dysfunction: Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1591–619.
39. Bragulat E, de la Sierra A. Salt intake, endothelial dysfunction, and salt-sensitive hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2002;4(1):41–6.

40. Tibirićá EV, Lorenzo A de, Oliveira GMM de. Microcirculation and cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol.* 2018;111(2):120–1.
41. Imaizumi Y, Eguchi K, Murakami T, Arakawa K, Tsuchihashi T, Kario K. High salt intake is independently associated with hypertensive target organ damage. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2016;18(4):315–21.
42. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian J-T, Wang E, i sur. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016;34(4):676–84.
43. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension.* 2008;51(6):1525–30.
44. Patik JC, Lennon SL, Farquhar WB, Edwards DG. Mechanisms of dietary sodium-induced impairments in endothelial function and potential countermeasures. *Nutrients.* 2021;13(1):270.
45. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532–53.
46. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:75–87.
47. Rizzo AM, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, i sur. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol.* 2010;698:52–67.
48. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156–9.
49. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S, Tartaro Bujak I, Mihaljevic B, Lombard JH, Drenjancevic I. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):H718-H730.
50. Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a High Salt Diet on Microvascular Antioxidant Enzymes. *Journal of Vascular Research.* 2002; 39(1):41–50.
51. Beyer AM, Raffai G, Weinberg BD, Fredrich K, Rodgers MS, Geurts AM, et al. Amelioration of salt-induced vascular dysfunction in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive rats by missense mutation of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(3):H339-47.

52. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482(3):426–431.
53. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, I SUR. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 ($^{-/-}$) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(5):2278–83.
54. Rodriguez-Iturbe B, Sepassi L, Quiroz Y, i sur. Association of mitochondrial SOD deficiency with salt-sensitive hypertension and accelerated renal senescence. *J Appl Physiol*. 2007;102(1):255–60.
55. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840–4.
56. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999;34(4):943–9.
57. Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. The role of renal microvascular disease and interstitial inflammation in salt-sensitive hypertension. *Hypertens Res*. 2010;33(10):975–80.

11. ŽIVOTOPIS

Andrea Alpeza

Datum rođenja: 7. studenoga 1996.

Adresa: Koranska 31a, 31000 Osijek, Hrvatska

Email adresa: aalpeza@mefos.hr

JMBAG: 0236219493

Obrazovanje:

2015. - do danas: Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij Medicine, Medicinski fakultet Osijek

2011. - 2015.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku