

Utjecaj angiotenzina II i tempola na promjenu genskog izražaja upalnih biljega u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora pod utjecajem visokoslane prehrane

Bolmanac, Klaudija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:100113>

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

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klaudija Bolmanac

**UTJECAJ ANGIOTENZINA II I
TEMPOLA NA PROMJENU GENSKOG
IZRAŽAJA UPALNIH BILJEGA U
UPALNIM ŽILAMA MOZGA
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA POD
UTJECajem VISOKO SLANE
PREHRANE**

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klaudija Bolmanac

**UTJECAJ ANGIOTENZINA II I
TEMPOLA NA PROMJENU GENSKOG
IZRAŽAJA UPALNIH BILJEGA U
UPALNIM ŽILAMA MOZGA
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA POD
UTJECajem VISOKO SLANE
PREHRANE**

Završni rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek

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

Rad ima 22 stranice i 5 slika

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kuhinjska sol - sastav i preporučeni unos	1
1.2. Štetnost prekomjernog unosa soli u organizam	1
1.3. Važnost angiotenzina II i TEMPOL-a kod visokog unosa soli	1
1.4. Oksidacijski stres	2
1.5. Antioksidativni enzimi	2
1.5.1. Superoksid dismutaza	3
1.5.2. Katalaza	3
1.5.3. Glutation peroksidaza	3
1.6. Nastanak upale pod utjecajem soli	4
1.7. Upalni parametri (IL-6, IL-1, MPC)	4
1.8. Stanične adhezivne molekule (ICAM i E-selektin)	5
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
4. MATERIJALI I METODE	10
4.1. Ustroj studije	10
4.2. Materijali	10
4.3. Metode	10
4.3.1. Anestezija	10
4.3.2. Skupljanje uzoraka	11
4.3.3. RNA izolacija	11
4.3.4. Pročišćavanje uzoraka i sinteza cDNA	11
4.3.4. PCR u realnom vremenu	11
4.4. Statističke metode	12
5. REZULTATI	13
5.1. Genski izražaj upalnih biljega IL-1, IL-6 i MPC u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora	13
5.2. Genski izražaj cirkulirajućih adhezijskih molekula (E-selektina i ICAM) u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora	15
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	19

8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. LITERATURA	22
11. ŽIVOTOPIS	28

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

ANG– angiotenzin II

AT1R– receptor tipa 1 za angiotenzin II

AT2R–receptor tipa 2 za angiotenzin II

ATP– adenzin trifosfat

CAMs– molekule stanične adhezije (prema eng. *cellular adhesive molecule*)

CCL5– kemokinski ligand 5

cDNA– komplementarna DNA (prema eng. *complementary deoxyribonucleic acid*)

ESL1– ligand E- selektina

HUVEC– poprečna veza ICAM antitijela u staničnim kulturama (prema eng. *human umbilical vein endothelial cell*)

ICAM– intracelularna adhezijska molekula (prema eng. *intracellular adhesive molecule*)

IL- 8– interleukin 8

IL-1R1– interleukin 1 receptor 1

IL-1R2– interleukin 1 receptor 2

IL-6– interleukin 6

MPC-1– monocitni kemoatraktant protein (prema eng. *monocyte chemoattractant protein*)

NFκB– nuklearni faktor- kappa B

NO– dušikov oksid (prema eng. *nitrogen oxide*)

PCR– lančana reakcija polimeraze (prema eng. *polymerase chain reaction*)

PSGL1– P-selektin glikoproteinskog liganda 1

RASsu– stav renin- angiotenzin

ROS– slobodni kisikovi radikali (prema eng. *radical oxygen species*)

SIL-6Rα– topljiva forma interleukin 6 receptora

SOD– superoksid dizmutaza

TEM– transendotel leukocitna migracija

TEMPOL– 4-hydroxy- 2,2,6,6- tetramethylpiperidine-1-oxyl

VCAM– molekula adhezije vaskularnih stanica (prema eng. *vascular cell adhesive molecule*)

1. UVOD

1.1. Kuhinjska sol - sastav i preporučeni unos

Kuhinjska sol odnosno natrij klorid glavni je izvor iona natrija i klora ljudskome organizmu. Ioni natrija i klora igraju vrlo važnu ulogu u regulaciji krvnoga tlaka i prijenosu živčanih impulsa. Natrij klorid je bezbojni kristal molekulske mase 58,442 g/mol, a svoj specifični slani okus dobiva većinom od iona natrija u spoju. Sol je topiva u vodi i u organskim otapalima poput etanola i metanola. Po podacima koje je izdala Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, prema engl. *World Health Organization*) preporučeni dnevni unos kuhinjske soli je 5 g/dan.

1.2. Štetnost prekomjernog unosa soli u organizam

Najčešća i najpoznatija posljedica prevelikog unosa soli u organizam jest povećanje arterijskog krvnog tlaka koje je u etiopatogenezi različitih kardiovaskularnih bolesti, i konačnog oštećenja i zatajenja srca i bubrega. Do navedenih zdravstvenih problema dolazi zbog oštećenja endotela krvnih žila. Endotel oblaže cijeli krvožilni sustav te time obavlja vrlo velike funkcije (kontrola vaskularnoga tonusa, sprječavanje agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i slično) (1). Endotel ima autokrino, parakrino i endokrino lučenje te tim funkcijama djeluje na mnoge stanične linije poput trombocita, leukocita te glatkih mišićnih stanica, djelujući i na udaljenija tkiva. Oštećenjem i pojavom bolesti endotela opisujemo „disfunkciju endotela“ koja se očituje smanjenjem raspoloživosti dušikova oksida ili povećanjem količina kisikovih radikala. Posljedično se javlja smanjena vazodilatacija, proupalna stanja i protrombotička svojstva (1).

1.3. Važnost angiotenzina II i TEMPOL-a kod visokog unosa soli

Angiotenzin II (ANG II) glavni je peptid u renin-angiotenzin sustavu. U najbitnije uloge ANG II ubrajamo regulaciju krvnog tlaka i homeostazu elektrolita te je među najjačim regulatorima izlučivanja natrija putem bubrega. Istraživanja su pokazala da ne samo da sudjeluje u proliferaciji, apoptozi i fibrozi stanica, nego je i proinflamatorni hormon koji proizvodi molekule poput kemokina i citokina i uzrokuje migraciju upalnih stanica. Svojim djelovanjem može prouzročiti kronične bolesti srca i bubrega; u srčane bolesti najčešće ubrajamo aterosklerozu i hipertenziju. ANG II potiče mnogo signalnih puteva, a jedan od njih uključuje slobodne kisikove radikale (ROS) od kojih su najbitniji superoksid anion i vodikov peroksid. Kada dođe do povećanja koncentracije ovih oksida dolazi do endotelne disfunkcije jer utječu

na signaliziranje ANG II. Svoju ulogu provodi preko dva receptora; receptora tipa 1 za ANG II (AT1R) i receptora tipa dva (AT2R). AT1R upravlja svim poznatim ulogama ANG II poput vazokonstrikcije i regulacija krvnog tlaka dok AT2R posreduje antiproliferativna, proapoptotska i vazodilatacijska svojstva ANG II (2). Proizvodnja ANG II u arterijskoj stijenci važna je za normalnu regulaciju arterijskog tonusa te je uključena u patogenezi ateroskleroze (3). Provedbom istraživanja na animalnim modelima na dijeti s visokim udjelom soli, pokazalo se da imaju manje koncentracije ANG II u plazmi i veći oksidativni stres što uzrokuje povećane koncentracije ROS-a u krvnim žilama.

TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) član je obitelji nitroksidnih spojeva. TEMPOL oponaša superoksid dizmutazu tako što reagira sa superoksidnim anionom i stvara vodikov peroksid. Učinak TEMPOLA vrlo je sličan superoksid dizmutazi jer katalizira metabolizam staničnog O_2^- . TEMPOL ima najveću osjetljivost za OH^\bullet , nešto manju za H_2O_2 i najmanju za O_2^- .

1.4. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres posljedica je prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika (oksidansi, radikali) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima (4). Slobodne kisikove spojeve (ROS) stvaraju mitohondriji stanica živih organizama u kojima se nalazi transportni lanac elektrona za proizvodnju energije u stanici (5). U slobodne ROS radikale ubrajamo superoksidni radikal (O_2^\bullet), hidroksilnog radikala (HO^\bullet) i ne radikalne molekule kao što je vodikov peroksid (H_2O_2). U mitohondriju se procesom oksidativne fosforilacije stvara ATP gdje se tijekom ove reakcije može se stvoriti jedan ili dva elektrona redukcije umjesto četiri elektrona redukcije O_2 , te zbog toga nastaju O_2^\bullet ili H_2O_2 (3). Ovi slobodni radikali prisutni su i kod normalnog aerobnog metabolizma, ali se njihovim prekomjernim stvaranjem oštećuje funkcija biomolekula. U niskim koncentracijama ROS služe kao signalne molekule koje kontroliraju rast stanica, dok pri povišenim koncentracijama uzrokuje oštećenje stanica te time potiče razvoj ateroskleroze i hipertenzije (6). Povećana razina oksidativnog stresa uzrokuje povećanu aktivaciju imunološkog sustava, time dolazi do aktivacije endotela, nagomilavanje leukocita u krvnim žilama i razvoja upalnog stanja.

1.5. Antioksidativni enzimi

Antioksidansi onemogućavaju prekomjerno stvaranje slobodnih radikala tako što utječu na njihovo razlaganje u organizmu. Stanice mogu same proizvoditi antioksidanse, ali najviše se unose hranom i to najčešće voćem i povrćem. Antioksidansi se dijele na enzimske i

neenzimske tvari, a obje vrste imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i glutation S-transferaza (7).

1.5.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) ima 3 izoforme. Enzimirazlažu superoksidni anion na molekularni kisik i vodikov peroksid. Kao kofaktore koriste metalne ione te zbog toga pripadaju skupini metaloenzima (8). Nalaze se na mjestima najveće produkcije superoksidnog aniona, a ta mjesta su mitohondrij, manja količina u peroksisomina te izvan stanice. U citoplazmi se nalazi Cu/Zn-SOD (SOD1), u mitohondriju se nalazi Mn-SOD (SOD2), a izvan stanice se nalazi EC-SOD (SOD3). CuZn-SOD je homodimer i on je izražen u svim stanicama. Smanjenjem njegove koncentracije u organizmu povećava se razina vazokonstrukcije i smanjuje se dilatacija arterija i u mikrocirkulaciji (7). Mn-SOD je homotetramer i njega se može naći u mitohondrijskom matriksu i njega se smatra prvom linijom obrane od oksidacijskog stresa. Povećan izražaj Mn-SOD poboljšava funkciju endotela (7). EC-SOD nalazi se u izvanstaničnom prostoru i njegova funkcija izražena je kod bolesti kao što su dijabetes, ateroskleroza i hipertenzija (7).

1.5.2. Katalaza

Katalaza je unutarstanični enzim kojemu se najviše koncentracije nalaze u eritrocitima, jetri i manjim dijelom u bubregu (7). U eukariota, katalaze su homotetramerni enzimi kojima se na aktivnom mjestu nalazi hem skupina (7). Za razliku od hemoglobina, hem skupina katalaze sadrži željezo u stabilnijem obliku (Fe^{3+}). Mehanizam rada katalaze odvija se u dva koraka: u prvom se koraku vodikov peroksid reducira do vode, dok u drugom koraku vodikov peroksid oksidira do kisika. Aktivnost katalaze ovisi o vrsti tkiva i procesa. Povećana aktivnost katalaze može se primijetiti kod bolesti jetre, gušterače i hemolitičkih bolesti dok je kod malignih oboljenja i dijabetesa smanjena (8).

1.5.3. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza nije jedan enzim već je skupina od osam enzima koji su važni za smanjenje razine vodikova peroksida. To su selenocistein enzimi koji za svoj rad zahtijevaju glutation kao redukcijsko sredstvo i selen za antioksidacijsko djelovanje. Izražena je već pri blagom oksidacijskom stresu, za razliku od katalaze koja je izražena kod težeg oksidacijskog stresa (7).

1.6. Nastanak upale pod utjecajem soli

Poznato je da prekomjerman unos NaCl u organizam povećava mogućnost razvitka hipertenzije (7). Endotelna disfunkcija javlja se kod povećane razine oksidativnog stresa jer dolazi do povećane aktivnosti endotelnih stanica i nakupljanja leukocita (1). Posljedično se može narušiti imunološka ravnoteža i dovesti do razvitka vaskularne upale. Istraživanjima je dokazano da se smanjenjem unosa soli u organizam smanjuje i mogućnost razvitka kardiovaskularnih bolesti (9). Istraživanja na miševima dokazala su da visoka razina soli u prehrani uzrokuje upalne bolesti tkiva i autoimune bolesti. Endotelna disfunkcija jedna je od centralnih karakteristika hipertenzije, karakterizira je poremećena vaskularna reaktivnosti i povezana je s prekomjernim izražajem leukocitnih adhezijskih molekula i lokalnom upalom. Nedavna istraživanja prikazala su kako velika količina natrija može aktivirati upalu urođenog i stečenog imunskog sustava. Ne samo da povećava krvni tlak i mogućnost infarkta, visokoslana prehrana narušava imunski odgovor tako što promovira razvitak T stanica i upalna oštećenja na ciljane organe (9). Osim što podiže krvni tlak i rizik od infarkta, visokoslana prehrana narušava normalnu funkciju imunog odgovora tako što potiče razvoj T stanica i upalnih ozljeda ciljanih organa. Narušavanjem ravnoteže Th17/Treg izazvana visokim unosom soli može imati utjecaj na razvoj vaskularne upale i oštećenje organa (7). Prevala Th17 stanica potiče izlučivanje velikog broja proupalnih citokina, dok Treg stanice smanjuju upalni odgovor.

1.7. Upalni parametri (IL-6, IL-1, MPC)

Prekomjernim unosom kuhinjske soli potiču se hemodinamske promjene koje dovode do vaskularne upale i povezan je s odgovorom imunološkog sustava (7). Prekomjernim unosom soli dolazi do proizvodnje citokina. Interleukin-6 multifunkcionalni je citokin koji je originalno identificiran kao faktor diferencijacije B stanica i uključen je u sazrijevanje stanica koje izlučuju antitijela (9). Osim toga IL-6 uključen je u dodatne aktivnosti poput utjecaja na T stanice, krvne žile i neurone. IL-6 u visokim razinama izlučuje se kod nekoliko upalnih bolesti kao što su sistemski juvenilni artritis, sistemski lupus, Crohnova bolest i reumatoidni artritis. IL-6 igra važnu ulogu u regrutiranju leukocita *in vivo*. Kompleks IL-6 i sIL-6R α mogu aktivirati endotelne stanice da izlučuju interleukin-8 i monocitni kemoatraktantni protein (MPC-1) koji induciraju adheziju i ekspresiju molekula (10). Kada njegova aktivnost kao proinflamatorni citokin ustraje, akutna upala pretvara se u kroničnu i dolazi do imunskog odgovora. U kroničnoj upali, IL-6 ima štetno djelovanje i favorizira nakupljanje mononuklearnih stanica na mjestu ozljede kroz konstantno lučenje MPC-1, angioproliferacije

i antiapoptotske funkcije T stanica (11). Membranski kofaktor protein (MPC) je široko rasprostranjen regulatorni protein koji inhibira aktivaciju komplemента na stanicama domaćinima. Osim na eritrocitima, MPC je nađen na svakoj ispitanoj stanici. MPC pripada obitelji znanoj kao regulatori aktivacije komplemента. MPC je također receptor za tri ljudska patogena: virus ospica, grupa A *Streptococcus pyogenes* i patogena *Neisseria* (12). Također djeluje na samu reprodukciju tako što se nalazi u unutarnjoj akrosomalnoj membrani ljudskog spermatozoa gdje sudjeluje u interakciji spermatozoa i oociste kod oplodnje. Prekomjerno je izražen kod različitih ljudskih tumora i ključan je u malignim transformacijama i kod tumorskih terapeutika (12). Sudjeluje u različitim signalnim putevima, kao npr. povećavanje aktivnosti i preživljenja makrofaga, uključujući proizvodnju citokina i dušikovog oksida, regulira autofagiju epitelnih stanica kod napada patogena i kod oksidativnog stresa te modulira aktivaciju T stanica (13).

Interleukin alfa bitan je medijator imunog i upalnog odgovora koji funkcionira kao izlučeni i kao membranom vezani citokin. Prisutan je u zdravom organizmu kod hematopoetskih i nehematopoetskih stanica. Povećanje njegovog izlučivanja potiču faktori rasta i proinflamatorni faktori te stresom vezani stimulansi. Stanična smrt zbog ozljede uzrok je pasivnog priljeva citosolnog pro-IL-1 α i aktivacije upale ovisne o IL-1R1 (13). Ova pretpostavka dokazana je u više istraživanja gdje su nekrotične stanice u miševa potaknule neutrofilnu upalu koja je bila totalno ovisna o prisutnosti IL-1 α u nekrotičnim stanicama i IL-1R1 signaliziranju na stromalnim nehematopoetskim stanicama. Ovime je dokazano da je citosolni pro-IL-1 α glavni uzročnik upale u nekrotičnim stanicama te da je IL-1 α „alarm“ koji upozorava da je došlo do ozljede. Istim istraživanjem dokazano je da pro-IL-1 α vezan i za inhibitorni IL-1R2 u citosolu koji može prevenirati ili smanjiti jačinu upalnog odgovora u nekrotičnim stanicama (13).

1.8 Stanične adhezivne molekule (ICAM i E-selektin)

Kronična upala poznata je kao najvažniji čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti koja je odgovorna za gotovo 30% svih smrtnih slučajeva u zemljama s niskim i srednjim dohotkom (14, 15, 16). Upala može modificirati i morfologiju i funkciju endotelnih stanica, trajno aktivirati endotelne stanice i doprinijeti endotelnoj disfunkciji (17). Nadalje, povećanje citokina uzrokuje izražaj gena za glikoproteine endotelnih stanica kao što je E-selektin, intercelularna adhezijska molekula (ICAM) i vaskularna adhezijska molekula (VCAM) (18). U normalnim uvjetima, molekule stanične adhezije (CAMs) povezane su s adhezijom

staničnog matriksa i komunikacijom stanica-stanica, tako da te molekule mogu kontrolirati kretanje i migraciju leukocita kroz endotel. Međutim, pod nekim abnormalnim uvjetima kao što je hipertenzija, povećana razina CAMs-a može rezultirati ubrzanjem napredovanja ateroskleroze (19).

ICAM-1 je glikoprotein stanične površine izražen na niskoj bazalnoj razini u imunološkim, endotelnim i epitelnim stanicama, ali je pojačano reguliran kao odgovor na upalnu stimulaciju (20). Funkcija ICAM-1 najbolje je proučavana u transendotelu leukocita migraciju (TEM), gdje ICAM-1 regulira kotrljanje leukocita i adhezivne interakcije sa stijenkom žile, te vodi prelazak leukocita preko endotelnog sloja (21, 22). U novije vrijeme, funkcionalne studije utvrdile su nekoliko novih uloga ICAM-1 kao odgovor na ozljede epitela, urođeni i adaptivni imunološki odgovori na upalu i tumorigenezu (23). Stoga se ICAM-1 pojavio kao glavni regulator mnogih bitnih funkcija tkiva, kako na početku tako i pri rješavanju patoloških stanja. ICAM-1 je već neko vrijeme od kliničkog i terapijskog interesa, međutim inhibicija funkcije ICAM-1 nije dala značajan klinički učinak u poboljšanju razrješenja patoloških stanja (24,25,26). U endotelnim se stanicama pokazalo da ICAM-1 regulira unutarstanične razine Ca^{2+} i dovodi do aktivacije kontraktilnosti miozina, a oba su ključna za održavanje funkcionalne barijere (27). Štoviše, pokazalo se da ICAM regulira propusnost endotelnih stanica u zdravih i upaljeno tkivo (28). Zanimljivo, dok u zdravom tkivu ICAM-1 regulira kontrolu funkcije barijere putem signaliziranja aktivacije protein kinaze C, nakon upalne stimulacije, angažman ICAM-1 cirkulirajućim leukocitima doveo je do aktivacije Src kinaze za povećanje propusnosti otopljene tvari (29). ICAM bi također mogao modulirati propusnost endotelnih stanica regulacijom proizvodnje citokina. Poprečna veza ICAM antitijela u staničnim kulturama (HUVEC) povećala je proizvodnju IL-8 i CCL5 gdje se pokazalo da obje molekule narušavaju endotelnu propusnost (30, 31).

E-selektin, molekula vaskularne adhezije, igra ključnu ulogu u prometu stanica u fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Uključen je u proces adhezije, proliferacije, mirovanja stanice i rezistenciju leukocita, hematopoetskih matičnih stanica i stanica raka na lijekove. E-selektin je potencijalno obećavajuća meta za nekoliko terapijskih i medicinskih stanja zbog njegovog prekomjernog izražaja u tkivima zahvaćenim upalom, infekcijom ili malignitetom (32). E-selektin se ne izražava u fiziološkim uvjetima, osim u mikrocirkulaciji kože, ali se brzo inducira upalnim citokinima. Nakon ozljede, E-selektin se veže na endotelne stanice, omogućujući pričvršćivanje neutrofila na stijenku žile i posljedično agregaciju te tako potiče upalu i imunološke ozljede (33). Predstavlja najspecifičniju molekulu stanične adhezije (CAMs) koju izražavaju endotelne stanice, s ICAM-1 i VCAM-1 molekulom.

E-selektin pripada obitelji selektina CAMs-a i posreduje u prvom koraku kotrljanja leukocita i trombocita na endotel preko svojih liganda, uglavnom P-selektin glikoproteinskog liganda 1 (PSGL1) i liganda E-selektina (ESL1). Izražaj E-selektina se pojačava u upalnim stanjima te se ova molekula na površini stanice može cijepati aktivnim procesom odvajanja posredovanim kaspazama i stvaranjem topljivih izoformi. Poznato je da razina sE-selektina odražava aktivacijski status endotelnih stanica. Zanimljivo, pokazalo se da sE-selektin u serumima zadržava sposobnost prijanjanja na svoj ligand na cirkulirajućim leukocitima, čime se smanjuje sposobnost imunoloških stanica da se mobiliziraju na mjestu upale. Smatra se da ovaj mehanizam varalice predstavlja samoograničavajući proces kako bi se izbjegla štetna upala zbog nekontroliranog prikupljanja leukocita u tkivima (34)

2. HIPOTEZA

Primjenom subpresorskih doza angiotenzin II i TEMPOLA aktivira se genski izražaj različitih upalnih parametara pod utjecajem visokoslane prehrane. Angiotenzin II dovodi do značajnijih promjena upalnih parametara od TEMPOLA.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja:

- a) ispitati utjecaj subpresorskih doza angiotenzina II i TEMPOLA na promjenu genskog izražaja upalnih parametara pod utjecajem visokoslane prehrane u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora
- b) prema dobivenim rezultatima utvrditi da li angiotenzin II ili TEMPOL ima veći utjecaj na gensku promjenu ispitivanih upalnih parametara u krvnim žilama mozga

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedena studija je eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (Sprague-Dawley štakorima). Ovo istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-107).

4.2. Materijali

Istraživanje je provedeno na zdravim, muškim Sprague-Dawley štakorima starosti 9 - 11 tjedana.

Životinje su bile podijeljene u 4 skupine:

1) NISKOSLANA skupina (životinje su konzumirale standardnu hranu za laboratorijske štakore koja sadrži 0.4% NaCl-a);

2) VISOKOSLANA skupina (životinje su konzumirale tijekom 7 dana specijalnu hranu s visokim udjelom soli 4% NaCl-a)

3) VISOKOSLANA+ANGII skupina (životinje su konzumirale tijekom 7 dana specijalnu hranu s visokim udjelom soli 4% NaCl-a, 4. dan takve ishrane ugrađena im je potkožno osmotska minipumpa koja je otpuštala 100ng/kg/min angiotenzina II kroz 3 dana)

4) VISOKOSLANA+TEMPOL skupina (životinje su konzumirale tijekom 7 dana specijalnu hranu s visokim udjelom soli 4% NaCl-a i uz to imale konstantno dostupnu vodu u kojoj je bio otopljen TEMPOL u koncentraciji 1 mmol/L)

Uzgoj, dijetni protokol na životinjama te prikupljanje uzoraka provedeno je u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek, a mjerenje genskog izražaja u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

4.3. Metode

4.3.1. Anestezija

Nakon 7 dana dijetnog protokola štakori će biti izvagani te anestezirani kombinacijom ketanest S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma) i potom dekapitirani. Način usmrćivanja životinje (dekapitacija uz premedikaciju midazolam/ ketanest) je najprikladniji protokolu.

4.3.2. Skupljanje uzoraka

Nakon što su životinje uspavane i dekapitirane, izolacijom mozga prikupljene su krvne žile mozga te nakon izolacije smrznute u tekućem dušiku i skladištene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izvođenja pokusa.

4.3.3. RNA izolacija

Izolacija uzoraka krvnih žila mozga provedena je pomoću tekućeg dušika u tarionik. Dodatkom tekućeg dušika na uzorak, uzorak se smrzne te se vrlo lako tučkom usitni do praha. U tako usitnjeni uzorak dodano je 1 mL trizola i 100 μL 1-brom-3-klor-propana kako bi se svi slojevi odvojili. Uzorci su potom naglo promiješani 15 sekundi i inkubirani na sobnoj temperaturi 8 minuta. Potom su centrifugirani 15 minuta na 1200 okr/min. Nakon centrifugiranja, odvojen je supernatant u nove sterilne Eppendorf tubice te je u njih dodano 500 μL izopropanola kako bi se RNA odvojila od staničnog sadržaja. Uzorci su potom lagano promućkani 15 sekundi te ponovno inkubirani 8 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom centrifugirani 8 minuta na 1200 okr/min. Nakon toga uzorci su isprani, dva puta, s 1 mL 75 %-tnog etanola bez mućkanja i centrifugirani 5 minuta na 7500 okr/min. U tako pročišćene uzorke dodano je 30 μL čiste vode te je izmjerena koncentracija RNA i čistoća uzorka na nanofotometru P300 UV/VIS, IMPLLEN (Implen, Njemačka).

4.3.4. Pročišćavanje uzoraka i sinteza cDNA

Pročišćavanje uzoraka provodi se prema uputama proizvođača Sigma-Aldrich. U uzorak se doda 1 μL amplifikacijskog i reakcijskog pufera te inkubira 15 minuta na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim se zaustavlja reakcija s 1 μL STOP otopine pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 10 min. Nakon toga slijedi provođenje sinteze cDNA koja se vrši prema uputama komercijalno dostupnog kita visokog kapaciteta s inhibitorom RNase (eng. *High Capacity cDNA kit*). Pojedine kemikalije iz kita se dodaju prema uputama te se svaki uzorak potom postavlja u uređaju Bio Rad CFX96. Protokol traje tri sata ($25\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$; $37\text{ }^{\circ}\text{C}/2\text{ sata}$; $85\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{ sat}$). Nakon toga sintetizirana cDNA se razrijedi 5x s NFW vodom (Sigma Aldrich, Njemačka) te se takva koristila za utvrđivanje genskog izražaja metodom PCR u stvarnom vremenu.

4.3.4. PCR u realnom vremenu

Ovo istraživanje je ispitivalo genski izražaj upalnih biljega u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora. Upalni biljezi koje smo istraživali metodom PCR (lančana reakcija polimeraze) u realnom vremenu su IL-1, IL-6, MPC, te adhezivne molekule ICAM i E-selektin. U svrhu mjerenja genskog izražaja koristili smo uređaj Bio Rad CFX 96. Metoda PCR u realnom vremenu predstavlja kombinaciju standardnog PCR-a i mjerenja

fluorescencije, a vrši umnažanje relativno kratkih dijelova DNA u velikom broju kopija. Ova metoda se pokazala puno preciznijom od standardnog PCR-a, ali predstavlja financijski skuplju metodu. Reakcijska smjesa sadrži cDNA (engl. complementary DNA) i RNA, oligonukleotidne početnice deoksiribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq DNA polimerazu, ione magnezija, PCR pufer i fluorescentnu boju (SYBR Green I) ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. Bez obzira na slijed DNA baza, boja SYBR Green I veže nespecifično u utore dvolančane DNA. To uzrokuje fluoresciranje DNA bez vezanja na jednolančanu DNA. Nukleinske kiseline se potom značajno umnažaju ciklusima koji se ponavljaju. U svakom se ciklusu vrši razdvajanje roditeljske DNA tj. proces denaturacije pri 95 °C, 15 s. Potom slijedi hlađenje (na 55 do 60 °C) što omogućuje hibridizaciju tj. sljepljivanje početnica s komplementarnim sljedovima. Posljednji korak je elongacija pri 72 °C gdje ključnu ulogu ima Taq DNA polimeraza. Kraj DNA se skraćuje svakim ciklusom, a novi lanac DNA predstavlja kalup za vezanje početnica i sintezu nove DNA svakom idućem ciklusu.

4.4. Statističke metode

Za statističku je analizu korišten Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc., Chicago, USA). Numerički su podaci 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 s $p < 0,05$. Veličina uzorka određena je pomoću SigmaPlot v11.2 (Systant 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 potrebne su minimalno 3 pokusne životinje po skupini.

5. REZULTATI

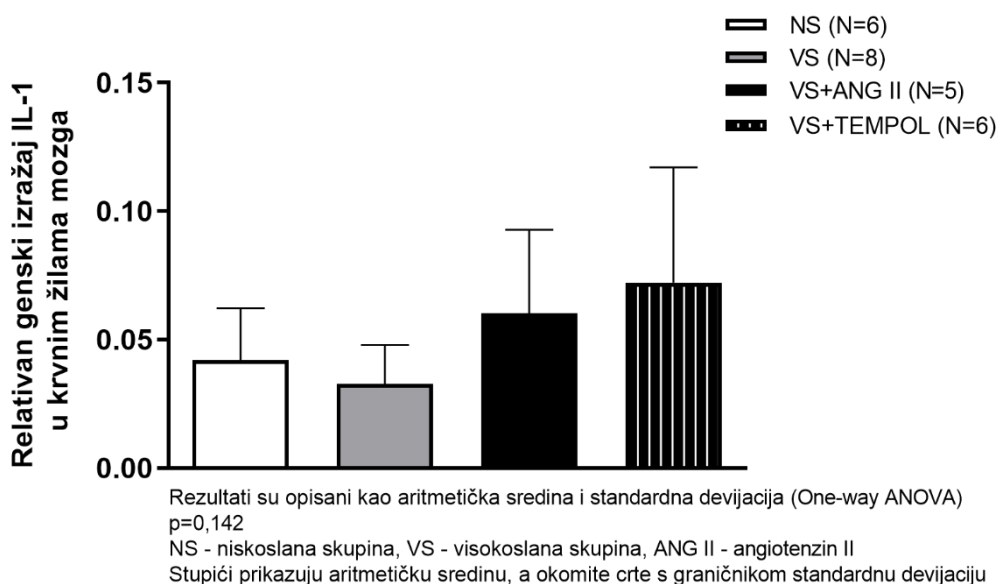
5.1. Genski izražaj upalnih biljega IL-1, IL-6 i MPC u krvnim žilama mozga

Sprague-Dawley štakora

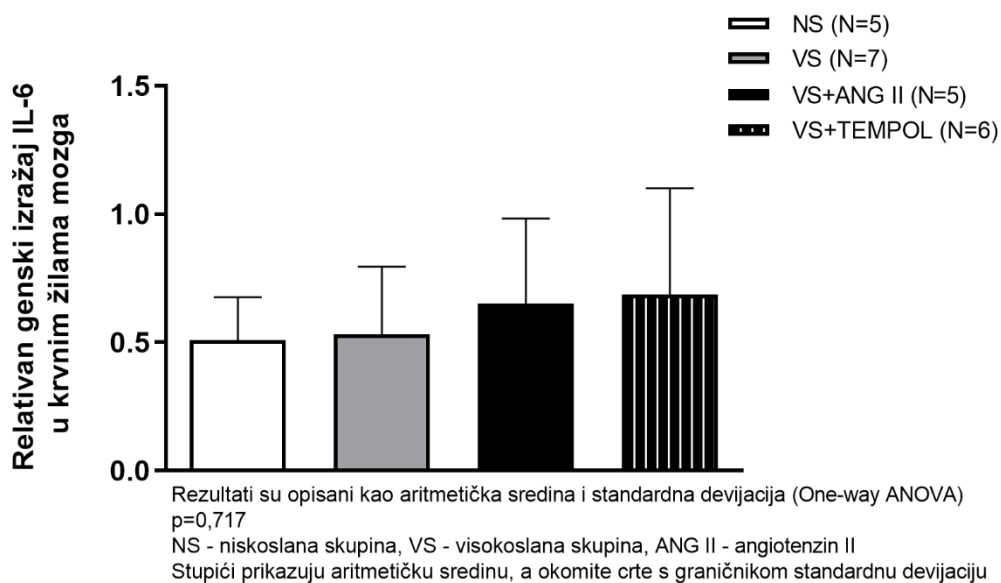
U uzorcima izolirane mRNA iz uzoraka krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora koji su bili podijeljeni u 4 skupine (niskoslana (NS), visokoslana (VS) te dvije dodatne visokoslane skupine koje su primile dodatnu infuziju angiotenzinom II ili konzumirane TEMPOL otopljen u tekućoj vodi) odredili smo upalne citokine IL-1 (**Slika 1A**), IL-6 (**Slika 2B**) i MPC (**Slika 3C**).

Analizom dobivenih rezultata nije utvrđena značajna statistička razlika u genskom izražaju navedenih upalnih citokina između ispitivanih skupina (IL-1 $p=0,142$; IL-6 $p=0,717$; MPC $p=0,126$; One-Way ANOVA). No, skupina VS+ANG II pokazuje najveću tendenciju sniženja razine MPC (**Slika 3C**) u odnosu na VS skupinu iako nije utvrđena statistički značajna razlika.

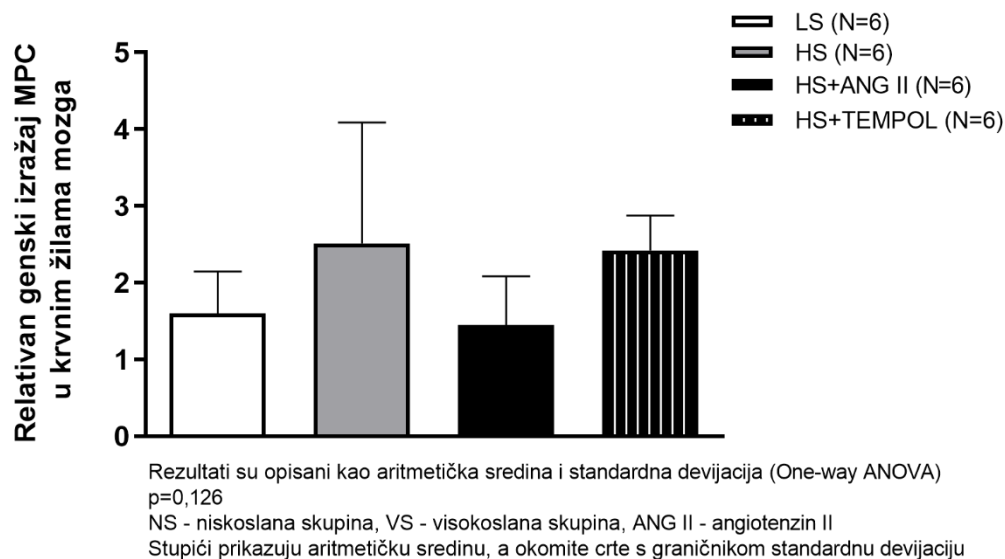
A



Slika 1. Relativan genski izražaj upalnih citokina IL-1 (**A**) u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

B

Slika 2. Relativan genski izražaj upalnih citokina IL-6 (**B**) u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

C

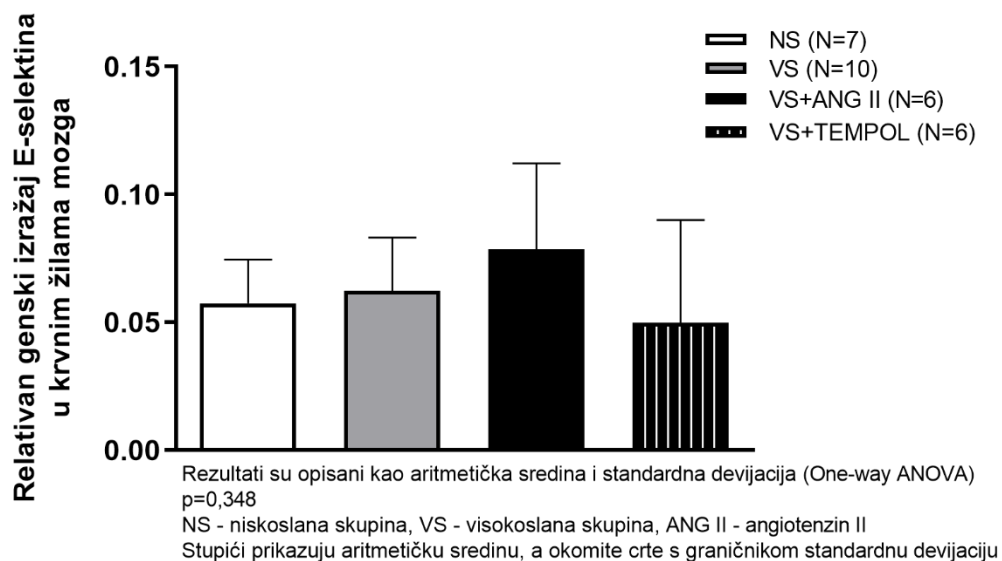
Slika 3. Relativan genski izražaj upalnih citokina MPC (**C**) u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

5.2. Genski izražaj cirkulirajućih adhezijskih molekula (E-selektina i ICAM) u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora

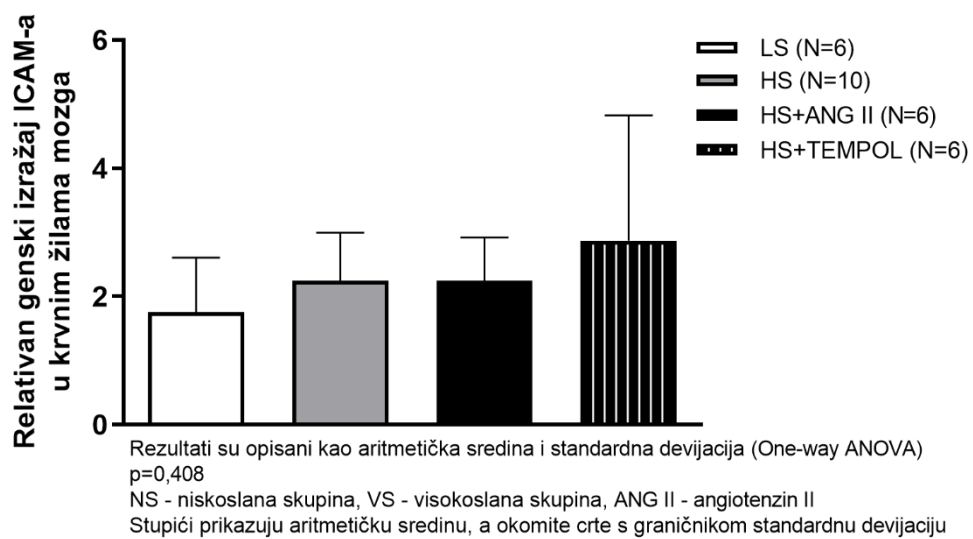
Iz istih uzoraka odredili smo relativan genski izražaj E-selektina (Slika 4A) i ICAM-a (Slika 5B) kao parametre koji predstavljaju cirkulirajuće adhezijske molekule.

Nije utvrđena značajna statistička razlika između ispitivanih skupina mjerenjem genskog izražaja adhezijskih molekula (E-selektin $p=0,348$; ICAM $p=0,408$; One-Way ANOVA).

A



Slika 4. Relativan genski izražaj adhezijske molekule E-selektina (A) u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

B

Slika 5. Relativan genski izražaj adhezijske molekule ICAM-a (**B**) u uzorcima krvnih žila mozga Sprague-Dawley štakora

6. RASPRAVA

Povećane koncentracije ROS dovode do endotelne disfunkcije i aktivacije štetnih mehanizama ključnih za razvoj hipertenzije, kao što je poticanje rasta mišićnih stanica, povećana kontraktilnost te upala (29). Uzrokuje povećanu propusnost vaskularnog endotela i potiče adherenciju leukocita, što je povezano s promjenama endotelne signalizacije i redoks reguliranim transkripcijskim čimbenicima (35, 36, 37.)

ANG II predstavlja glavni aktivni i konačni proizvod RAS sustava. ANG II je vazokonstriktor odgovoran za većinu učinaka RAS sustava, kao što su vazokonstrikcija venula i arteriola, lučenje antidiuretskog hormona, aktivacija simpatikusa, stimulacija centra za žeđ, što u konačnici rezultira povećanjem sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka. Međutim, za razliku od ovih sustava, kod akutnog visokog unosa soli dolazi do endotelne disfunkcije u uvjetima snižene razine ANG II i ne uzrokuje promjenu krvnog tlaka (38).

Sustav podložan ROS-u može postati citotoksičan ako je signal prevelik ili dugotrajan. Stanice održavaju homeostazu unatoč proizvodnji ROS, ne samo katabolizirajući ROS, već i popravljajući oksidativne ozljede. Stvaranje ROS-a važan je mehanizam kojim stanice imunološkog sustava, prvenstveno makrofaga, uništavaju štetne mikroorganizme, što oštećuje normalno tkivo domaćina. Ako je stanica izložena visokim razinama ROS-a, upalni odgovor karakteriziraju povećane razine upalnih parametara, adhezijskih molekula i promotora oksidativnog stresa (39). Sve veći interes za ulogu oksidativnog stresa, apoptoze i upale u nizu bolesti doveo je do traženja lijekova koji sprječavaju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i smanjuju upalni odgovor (40). Iz brojnih razvijenih i istraženih antioksidanata, TEMPOL ima neka jedinstvena svojstva. To je membranski propusni „čistač“ radikala, koji ima aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (mimetičke) s potencijalom da spriječi toksičnost organa mozga, srca, jetre i bubrega (41). Pokazalo se da TEMPOL smanjuje cerebralni edem u hipoksičnom mozgu i također štiti neurodegenerativni poremećaj kod miševa (42, 43). TEMPOL ima zaštitni učinak obnavljanjem oksidativne ravnoteže u mitohondrijima protiv oksidativnog oštećenja unutar stanica. Abouzied i suradnici pokazali su njegovu terapijsku ulogu protiv akutne ozljede jetre putem obnove ekspresije nuklearnog faktora-kappa B (NF-kB) (44). Ćosić i suradnici prethodno su pokazali da visokoslana dijeta značajno povećava razine ROS u krvi bazalno/nakon stimulacije, limfnim čvorovima i slezeni. Nastali oksidativni stres svojom prisutnošću u mikrocirkulaciji povećava razinu oštećenja. Mjerenjem genskog izražaja upalnih parametara kod niskoslane i visokoslane

prehrane u prisutnosti ANG II ili TEMPOLA nije utvrđena pojavu upalnih stanja, rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku, iz čega bi se dalo zaključiti da mjerenje genskog izražaja nije dovoljno osjetljiva metoda za ispitivanje mjerenih biljega upale. Niska razina ANG II uzrokovana visokim unosom soli dovodi do aktivacije imunološkog sustava, povećavajući izražaj adhezijskih molekula (45). Povećanje razine oksidativnog stresa dovodi do prekomjernog izražaja proupalnih citokina, što uzrokuje pretjeranu stimulaciju imunološkog sustava. Tako dolazi do aktivacije endotela, infiltracije stijenke krvne žile leukocitima, te razvoja upale što dovodi do razvoja ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (46, 47).

ICAM-1 je molekula koja regulira kotrljanje leukocita i adhezivne interakcije sa stijenkom žile, te vodi prelazak leukocita preko endotelnog sloja. U današnje vrijeme studije su utvrdile nove uloge ICAM-1 kao odgovore na ozljede epitela, urođeni i adaptivni imunološki odgovori na upalu i tumorigenezu. U endotelnim stanicama se pokazalo da ICAM-1 regulira unutarstanične razine Ca^{2+} i dovodi do aktivacije kontraktilnosti miozina. Rezultati studije Mihalj i suradnici pokazuju da visokoslana prehrana dovodi do značajno povećane izražaja CD49d/VLA-4 na monocitima (ligand endotelnog VCAM-1) i CD11a/LFA-1 na CD8 limfocitima (ligand za endotelni ICAM-1), što se dodatkom ANG II snižava do razine izmjerene u niskoslanjoj skupini (48). Naše istraživanje koje je provedeno na krvnim žilama mozga naime nije pokazalo isti rezultat, jer se genski izražaj mjerenih adhezijskih molekula (E-selektina i ICAM-a) nije značajno mijenjao. Prema tome, dalo bi se zaključiti da je direktno mjerenje razine adhezijskih molekula na monocitima i limfocitima ipak osjetljivija metoda od mjerenja genskog izražaja.

7. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci ove studije su:

- 1) ANG II i TEMPOL nisu uzrokovali značajnu promjenu genskog izražaja upalni biljega u uvjetima visokoslane prehrane
- 2) Od svih ispitanih parametara, jedino MPC u skupini HS+ANG II ima tendenciju sniženja u odnosu na HS skupinu
- 3) Povećanje broja uzoraka ili produženje vremena terapije bi možda pokazalo dodatne razlike u genskom izražaju izmjerenih parametara

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati utjecaj visokoslane prehrane te ulogu angiotenzina II i TEMPOLA na genski izražaj biljega upale (IL-1, IL-6, MPC, E-selektina i ICAM-a) u krvnim žilama mozga muških Sprague-Dawley štakora.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

Materijali i metode: Muški Sprague-Dawley štakori starosti 9 - 11 tjedana podijeljeni su u 4 skupine. Jedna od skupina je bila podvrgnuta niskoslanjoj prehrani te u konzumirale prehranu koja sadrži 0,4 % NaCl-a, te ostale tri skupine koje su konzumirale visokoslanu prehranu koja sadrži 4 % NaCl-a u svom sastavu tijekom 7 dana. Uz prehranu s visokim udjelom soli dvjema skupinama je uveden i dodatni tretman. Jedna je od skupina tijekom cijelog protokola konzumirala vodu u kojoj je bio otopljen TEMPOL u koncentraciji 1 mmol/L, dok je drugoj visokoslanjoj skupini 4. dan ugrađena potkožno osmotska minipumpa koja je otpuštala 100ng/kg/min ANG II kroz 3 dana. Nakon završenog protokola životinje su anestetizirane, dekapitirane te su im izolirane krvne žile mozga iz kojih je metodom PCR u realnom vremenu određen genski izražaj upalnih biljega (IL-1, IL-6, MPC, E-selektin i ICAM).

Rezultati: Analizom genskog izražaja nije utvrđena značajna statistička razlika u vrijednostima između ispitivanih skupina (IL-1 $p=0,142$; IL-6 $p=0,717$; MPC $p=0,126$; E-selektin $p=0,348$; ICAM $p=0,408$). Skupina HS+ANG II za biljeg MPC pokazuje tendenciju sniženja genskog izražaja u odnosu na HS skupinu, ali bez dobivene značajnosti.

Zaključak: Angiotenzin II i TEMPOL nisu uzrokovali značajnu promjenu genskog izražaja upalnih biljega u odnosu na visokoslanu prehranu. Bilo bi potrebno povećati broj uzoraka ili produžiti vrijeme terapije kako bi se uočile potencijalne razlike.

Ključne riječi: angiotenzin II, PCR u stvarnom vremenu, Sprague-Dawley štakori, TEMPOL, upalni biljezi, visokosлана dijeta

9. SUMMARY

The effect of angiotensin II and TEMPOL on inflammatory markers' gene expression changes in brain blood vessels of Sprague-Dawley rats under the influence of a high salt diet

Objectives: To investigate the influence of a high-salt diet and the role of angiotensin II and TEMPOL on the gene expression of inflammation markers (IL-1, IL-6, MPC, E-selectin and ICAM) in the brain blood vessels of male Sprague-Dawley rats.

Study design: Experimental research

Materials and Methods: Male Sprague-Dawley rats, 9-11 weeks old were divided into 4 groups. One of the groups was subjected to a low-salt diet and consumed a diet containing 0,4% NaCl, and the other three groups who consumed a high-salt diet containing 4% NaCl in its composition for 7 days. In addition to a high-salt diet, additional treatment was introduced for the two groups. One group consumed water in which TEMPOL was dissolved at a concentration of 1 mmol / L throughout the protocol, while the other high-salt group was fitted with a subcutaneous osmotic minipump on day 4 that released 100 ng / kg / min angiotensin II for 3 days. After the protocol was completed, the animals were anesthetized, decapitated, and their brain blood vessels were isolated, from which the gene expression of inflammatory markers (IL-1, IL-6, MPC, E-selectin, and ICAM) was determined by real-time PCR.

Results: Analysis of gene expression did not reveal a significant statistical difference between the examined groups (IL-1 $p = 0,122$; IL-6 $p = 0,717$; MPC $p = 0,126$; E-selectin $p = 0,348$; ICAM $p = 0,408$). The HS + ANG II group for the MPC marker shows a tendency to decrease gene expression compared to the HS group, but without the obtained significance.

Conclusion: Angiotensin II and TEMPOL did not cause a significant change in the genetic expression of inflammatory markers compared to a high-salt diet. It would be necessary to increase the number of samples or extend the time of therapy to notice potential differences.

Keywords: angiotensin II, high-salt diet, inflammatory markers, real-time PCR, Sprague-Dawley rats, TEMPOL

10. LITERATURA

1. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer T, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcijafunkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski Vjesnik*. 2012; 44:135-146 [pristupljeno 03.02.2022.] Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/187756>
2. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Molecular Medicine*. 2010 Jul 15;2(7):247–57.
3. Ćosić A. uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod sprague-dawley štakora [Disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2016 [pristupljeno 03.02.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300285>
4. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix: Specijalizirani medicinski dvomjesečnik*: 2004:98-102.
5. Tomac P. Promjena proteinskog izražaja antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora primjenom subpresorskih doza angiotenzina II kod unosa visokih koncentracija soli [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2019 [pristupljeno 19.01.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:445517>
6. Sies H, Brendt C, Jones DP. Oxidative stress, *Annual Review of Biochemistry* 2017 86:1, 715-748. [pristupljeno: 26.02.2022.] Dostupno na: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
7. Zidar M. Utjecaj visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na genski izražaj antioksidativnih enzima i biljega upale u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3 [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2021 [pristupljeno 20.01.2022.] Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1142751>
8. Šurina M. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018 [pristupljeno 20.01.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:679487>
9. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. *Immunity*. Volume 50, Issue 5, 16.4.2019. [pristupljeno 23.02.2022.] Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761319301438#>
10. Rose-John S. [Internet]. Interleukin-6 Family Cytokines. 2019 [pristupljeno 23.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28620096/>

11. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 8.; 2006 [pristupljeno 21.01.2022.] Dostupno na: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar1917>
12. Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections. *Current Opinion in Immunology*. 2021 [pristupljeno 24.01.2022.] Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.005>
13. di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*. 2016 [pristupljeno 26.01.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5152572/>
14. V. Fuster, B.B. Kelly (Eds.), *Promoting cardiovascular health in the developing world*, Institute of Medicine (2010) [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45693/>
15. F. Farsi, J. Heshmati, A. Keshtkar, et al. Can coenzyme Q10 supplementation effectively reduce human tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in chronic inflammatory diseases? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials *Pharmacol Res*, 148 (2019), Article 104290) [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31185284/>
16. Mitra Hariri , Hamid Reza Baradaran , Ali Gholami The effect of soy protein containing soy isoflavones on serum concentration of cell adhesion molecules: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Med*. 2021 Sep;61:102764. doi: 10.1016/j.ctim.2021.102764 [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34333131/>
17. K. Yamamoto, J. Ando New molecular mechanisms for cardiovascular disease: Blood flow sensing mechanism in vascular endothelial cells *J Pharmacol Sci*, 116 (4) (2011), pp. 323-331 [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21757846/>
18. R.P. Schleimer, B.K. Rutledge Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters *J Immunol*, 136 (2) (1986), pp. 649-654 [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://www.jimmunol.org/content/136/2/649/tab-article-info>
19. K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated *Nat Rev Immunol*, 7 (9) (2007), pp. 678-689 [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717539/>
20. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biol Med*. 2000;28:1379–1386. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924857/>

21. Wee H, Oh HM, Jo JH, Jun CD. ICAM-1/LFA-1 interaction contributes to the induction of endothelial cell-cell separation: implication for enhanced leukocyte diapedesis. *Exp Mol Med*. 2009;41: 341–348. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701983/>
22. Gorina R, Lyck R, Vestweber D, Engelhardt B. beta2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. *J Immunol*. 2014;192:324–337. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24259506/>
23. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614819/>
24. Wichert S, Juliusson G, Johansson A, et al. A single-arm, open-label, phase 2 clinical trial evaluating disease response following treatment with BI-505, a human anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody, in patients with smoldering multiple myeloma. *PLoS One*. 2017;12:e0171205. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28158311/>
25. Philpott JR. Antisense inhibition of ICAM-1 expression as therapy provides insight into basic inflammatory pathways through early experiences in IBD. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8:1627–1632. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18774928/>
26. Yacyshyn B, Chey WY, Wedel MK, et al. A randomized, double-masked, placebo-controlled study of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1, for the treatment of subjects with active Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:215–220. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17296530/>
27. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol*. 2000;165:3375–3383 [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10975856/>
28. Sarelius IH, Glading AJ. Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue Barriers*. 2015;3:e985954. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4372019/>
29. Sumagin R, Lomakina E, Sarelius IH. Leukocyte-endothelial cell interactions are linked to vascular permeability via ICAM-1-mediated signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

- 2008;295:H969–H977. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18641276/>
30. Dragoni S, Hudson N, Kenny BA, et al. Endothelial MAPKs direct ICAM-1 signaling to divergent inflammatory functions. *J Immunol.* 2017;198:4074–4085. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421301/>
31. Yu H, Huang X, Ma Y, et al. Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions. *Int J Biol Sci.* 2013;9:966–979. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24155670/>
32. Muz B, Abdelghafer A, Markovic M, Yavner J, Melam A, Salama NN, Azab AK. Targeting E-selectin to Tackle Cancer Using Uproleselan. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 18;13(2):335. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33477563/>
33. Effects of tumor necrosis factor and E-selectin on coronary artery flow. Liu WB, Han XH, Guo YY, Zhang DM, Tang FJ, Zhao L, Ji LL, Guo FM. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Apr;21(8):1843-1849. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na:
<https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1843-1849-Effects-of-tumor-necrosis-factor-and-E-selectin-on-coronary-artery-flow-.pdf>
34. Increased levels of soluble forms of E-selectin and ICAM-1 adhesion molecules during human leptospirosis. Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, Reboux AH, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. *PLoS One.* 2017 Jul 7;12(7):e0180474. [pristupljeno 25.02.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28686648/>
35. Jukic I, Mihaljevic Z, Matic A, Mihalj M, Kozina N, Selthofer-Relatic K, Mihaljevic D, Koller A, Tartaro Bujak I, Drenjancevic I. Angiotensin II type 1 receptor is involved in flow-induced vasomotor responses of isolated middle cerebral arteries: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021 Apr 1;320(4):H1609-H1624. doi:10.1152/ajpheart.00620.2020. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na:
<https://journals.physiology.org/doi/prev/20210305-aop/abs/10.1152/ajpheart.00620.2020>
36. 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. doi: 10.1152/ajpheart.00097.2018. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00097.2018>
37. Mihalj M, Matic A, Mihaljevic Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators Inflamm.*

- 2019 Sep 17;2019:6715275. doi: 10.1155/2019/6715275. [pristupljeno 01.03.2022.]
Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1014913>
38. 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. doi: 10.1152/ajpheart.00097.2018. Epub 2018 Jun 15. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na:
<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00097.2018>
39. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol*. 2012;15; 83(12): 1643–1654. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22469513/>
40. Ham PB and Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol* 2017; 157: 92–116. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27321753/>
41. Ham PB and Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol* 2017; 157: 92–116. [pristupljeno 01.03.2022.] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27321753/>
42. Ahmed LA, Shehata NI, Abdelkader NF, et al. TEMPOL, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PloS One* 2014; 9: e108889. [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108889>
43. Ghosh MC, Tong WH, Zhang D, et al. TEMPOL mediated activation of latent iron regulatory protein activity prevents symptoms of neurodegenerative disease in IRP2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12028–12033 [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18685102/>
44. Abouzied MM, Eltahir HM, Taye A, et al. Experimental evidence for the therapeutic potential of TEMPOL in the treatment of acute liver injury. *Mol Cell Biochem* 2016; 411: 107–115 [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26441060/>
45. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević 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. [pristupljeno 01.03.2022]
Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5009804/>
46. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Review Article Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Dis Markers*.

2013;35(6):773-90. [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24347798/>

47. Mihalj M, Matić A, Mihaljević Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators Inflamm.* 2019 Sep 17;2019:6715275. doi: 10.1155/2019/6715275. [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/1014913>
48. Mihalj M, Matić A, Mihaljević Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators Inflamm.* 2019 Sep 17;2019:6715275. doi: 10.1155/2019/6715275. [pristupljeno 01.03.2022] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6766117/>

11. ŽIVOTOPIS

Klaudija Bolmanac, studentica 3. godine preddiplomskog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Osobni podaci:

Datum i mjesto rođenja: 08.02.1999., Osijek

Adresa stanovanja: Vukovarska 84, 31000, Osijek

E-mail: klaudija.bolmanac@gmail.com/kbolmanac@mefos.hr

Telefon: 091/9365007

Školovanje:

2005. – 2013. Osnovna škola Vijenac, Osijek

2013. – 2017. Medicinska škola Osijek, smjer dentalni tehničar

2018. – 2022. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Osobne vještine:

Hrvatski jezik– materinji

Strani jezik– engleski