

# Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a na razinu oksidativnog stresa u humanim aortalnim endotelnim stanicama (HAEC)

---

Ivković, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:152:774360>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mateja Ivković**

**UTJECAJ RAZLIČITIH  
KONCENTRACIJA KUHINJSKE SOLI  
(NaCl) U MEDIJU NA OKSIDATIVNI  
STRES HUMANIH AORTALNIH  
ENDOTELNIH STANICA (HAEC)**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mateja Ivković**

**UTJECAJ RAZLIČITIH  
KONCENTRACIJA KUHINJSKE SOLI  
(NaCl) U MEDIJU NA OKSIDATIVNI  
STRES HUMANIH AORTALNIH  
ENDOTELNIH STANICA (HAEC)**

**Završni rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod i Katedra za fiziologiju i imunologiju

Mentorica rada je: Prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Neposredni voditelj: dr. sc. Nikolina Kolobarić

Rad ima 24 stranice, 5 slika i 0 tablica

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Prehrana bogata kuhinjskom soli i njezin utjecaj na zdravlje</b> .....	1
<b>1.2. Oksidativni stres</b> .....	2
<b>1.3. Antioksidativni sustav</b> .....	3
<b>1.3.1 Antioksidativni enzimi</b> .....	3
<b>1.3.2 Neenzimski antioksidansi</b> .....	4
<b>1.4. Metode detekcije oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta</b> .....	5
<b>1.5. HAEC stanične kulture</b> .....	5
<b>1.6. Protočna citometrija</b> .....	6
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	7
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	8
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
<b>4.1. Ustroj studije</b> .....	9
<b>4.2. Materijali</b> .....	9
<b>4.3. Metode</b> .....	9
<b>4.3.1. Uzgoj i tretiranje HAEC različitim koncentracijama NaCl-a</b> .....	9
<b>4.3.2. Mjerenje razina oksidativnog stresa u HAEC nakon inkubacije u mediju s različitim koncentracijama NaCl-a metodom protočne citometrije</b> .....	10
<b>4.4. Statističke metode</b> .....	11
<b>5. REZULTATI</b> .....	12
<b>6. RASPRAVA</b> .....	16
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	18
<b>8. SAŽETAK</b> .....	19
<b>9. SUMMARY</b> .....	20
<b>10. LITERATURA</b> .....	21
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	24

## POPIS KRATICA

8-izo-PGF $2\alpha$  – izoprostan proizveden neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline u membranskim fosfolipidima

ANG II - angiotenzin II

DCF-DA - 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat

DHE – dihidroetidij

EC-SOD – izvanstanična superoksid dismutaza

FRAP – sposobnost plazme da reducira željezo ( engl. *ferric reducing ability of plasma*)

GPx – glutation-peroksidaza

GSH – glutation

GSSG – oksidirani oblik glutationa

HAEC – humane aortalne endotelne stanice

LSGS – suplement niskog serumskog rasta

Mn-SOD – mangan superoksid dismutaza

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PBS – 1x fosfatno puferirana fiziološka otopina

PMA – forbol 12-miristat 13-acetat

RAS - renin-angiotenzinski sustav

RNS - dušikovi slobodni radikali (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS - kiskovi slobodni radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SOD – superoksid dismutaza

TBARS – tiobarbituranski reaktivni spojevi (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)

Zn/Cu SOD – cink/bakar superoksid dismutaza

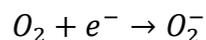
## 1.UVOD

### 1.1.Prehrana bogata kuhinjskom soli i njezin utjecaj na zdravlje

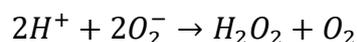
Kuhinjska sol (NaCl) glavni je izvor natrijevih iona za ljudsko tijelo. Stoljećima se kuhinjska sol smatrala zdravim i korisnim sastojkom. Tada je hranu bilo potrebno konzervirati, a danas, razvojem tehnologije i drugih načina konzerviranja hrane, prekomjerno dodavanje kuhinjske soli je nepotrebno (1). Iako je izum hladnjaka/zamrzivača smanjio potrebu za dodavanjem kuhinjske soli u hranu, potrošnja i unos NaCl-a dramatično su porasli u posljednjih nekoliko desetljeća. Značajne količine kuhinjske soli posebice su prisutne u industrijski prerađenoj hrani, kao što su gotova jela i pekarski proizvodi. Osim kao konzervans, NaCl se može koristiti i u medicinske svrhe. Velik broj istraživanja potvrdio je da je kuhinjska sol važan faktor koji utječe na promjene u razinama arterijskog tlaka (3). Prekomjerna konzumacija kuhinjske soli povezana je s koronarnom bolešću srca, hipertrofijom lijeve klijetke i mikroalbuminurijom, a uključena je i u proces aterosklerotične tromboze (1). Istraživanja pokazuju da je prosječni dnevni unos kuhinjske soli 12 - 16 grama, a da tijelo odrasle osobe treba 4 - 6 grama kuhinjske soli dnevno za pravilno funkcioniranje (4). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), preporučena količina kuhinjske soli koju bi ljudi trebali konzumirati je 5 grama dnevno (2). Prehrana s visokim udjelom kuhinjske soli osim što uzrokuje povišen tlak, također dovodi do endotelne disfunkcije koja je preteča aterosklerotske vaskularne bolesti (5) i u podlozi je svih kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti. Endotel nije samo fizička barijera između krvi i tkiva, već i aktivni organ uključen u održavanje homeostaze tijela (5,6). Danas je dobro poznato da je povećana koncentracija kuhinjske soli u prehrani važan čimbenik rizika za smanjenu funkciju endotela čak i u odsutnosti promjena arterijskog tlaka (5,6). Pretjerani unos kuhinjske soli u organizam može dovesti do poremećaja vaskularne reaktivnosti i endotelne disfunkcije. Također dovodi do inhibicije renin-angiotenzin sistema (RAS), povećanog oksidativnog stresa i razvoja vaskularne upale i pojačane endotelno-leukocitne interakcije (3). Studije na životinjama pokazuju da je supresija angiotenzina II (ANG II) glavna poveznica između visokog unosa NaCl-a i endotelne disfunkcije. Dodatno, istraživanja su pokazala da snižavanje razine ANG II (pod utjecajem visokog unosa kuhinjske soli u organizam) dovodi do povećanog oksidativnog stresa (6).

## 1.2. Oksidativni stres

Koncept oksidativnog stresa u biologiji i medicini iznesen je 1985. godine (7). Oksidativni stres složen je proces koji se definira kao stanje neravnoteže između staničnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija u organizmu, u korist oksidansima, koja vodi do oštećenja kao što su peroksidacija stanične membrane, iscrpljivanje energije i istjecanje sadržaja lizosoma (8,9). U patofiziološkim uvjetima oksidansi nastaju kao normalan produkt aerobnog metabolizma (8,10). Do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala dolazi u stanjima povišenog oksidativnog stresa, kada stanice koje su zadužene za razgradnju ne obavljaju svoju funkciju, odnosno, ne razgrađuju reaktivne kisikove slobodne radikale (8). Slobodni radikali su nestabilne molekule ili ioni velike reaktivnosti, koji u organizmu stupaju u niz kemijskih i biokemijskih reakcija i izazivaju strukturne i funkcionalne poremećaje. Slobodne radikale dijelimo u dvije skupine: endogene i egzogene slobodne radikale. Slobodne radikale koji uneseni hranom, lijekovima, pesticidima i vodom nazivamo egzogeni slobodni radikali. Endogeni slobodni radikali se otpuštaju prilikom fizičkog napora, nagle promjene temperature ili prilikom stresa. U endogene slobodne radikale ubrajamo dvije velike skupine radikala koje čine kisikovi slobodni radikali (reactive oxygen species – ROS) i dušikovi slobodni radikali (reactive nitrogen species – RNS) (11). Kisikovi radikali su najvažnija vrsta slobodnih radikala koja nastaje unutar organizma živih bića (15). ROS imaju i ulogu kao drugi glasnici unutar stanica te služe u zaštiti i obrani stanica domaćina tako što uspješno uklanjaju patogene (12). U ROS se ubrajaju vodikov peroksid, „singlet“ kisik, superoksid, ozon i organski peroksidi. Mitohondrij je glavna stanična organela odgovorna za proizvodnju ROS-a. Redukcijom molekularnog kisika ( $O_2$ ) nastaje superoksid ( $O_2^-$ ) koji je prekursor u nastanku drugih kisikovih slobodnih radikala.



Dismutacijom superoksida nastaje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ).



Slobodni kisikovi radikali mogu nastati i razvezivanjem procesa elektronskog transfera i kod nekih enzima koji stvaraju vazoaktivne metabolite, npr. dušik oksid sintetaza (NOS), što je opisano kod prekomjernog unosa soli (6).



### 1.3. Antioksidativni sustav

Antioksidativnim mehanizmima u normalnim uvjetima iz stanica se uklanja ROS. Kod narušenih antioksidativnih mehanizama ili prekomjernog stvaranja ROS-a dolazi do njihova nakupljanja i nastanka oksidativnog stresa (14). Iako je ROS u većim koncentracijama u organizmu štetan i povezan je s brojnim patološkim stanjima, također, u brojnim fiziološkim procesima ima glavnu ulogu u ispravnom funkcioniranju stanice kao signalne molekule. Svaki spoj koji se nalazi u manjoj koncentraciji od spoja koji se oksidira i znatno odgađa ili sprječava oksidaciju te tvari nazivamo antioksidansom (13). Mnogobrojne podjele spojeva s antioksidacijskom aktivnošću može klasificirati prema podrijetlu (egzogeni i endogeni) i mjestu djelovanja (membranski, izvanstanični i stanični), prema topljivosti u vodi ili lipidima, na enzime i male molekule (13,15). Na primjer, izvanstanični biološki važni antioksidansi su transferin, laktoferin, haptoglobin, albumin i mnogi drugi. U membranske antioksidanse ubrajamo  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten i koenzim Q, dok stanične antioksidanse čine superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i glutation-peroksidaza (15). Primarnu crtu antioksidativne zaštite i uklanjanje slobodnih radikala obavlja enzimski mehanizam (SOD, katalaza i glutation-peroksidaza), dok neenzimski antioksidativni sustav predstavlja sekundarnu crtu zaštite. Neenzimski antioksidativni mehanizam čine askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) te određeni metali u tragovima (17).

#### 1.3.1 Antioksidativni enzimi

Antioksidativni enzimi su enzimi čija je funkcija uklanjanje slobodnih radikala iz svih stanica (17). Superoksid-dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira promjenu superoksidnog radikala u vodikov peroksid i kisik i čini reakciju primarne obrane od oksidacijskog stresa (14). Kod ljudi postoje tri oblika enzima: citosolski (cink/bakar superoksid-dismutaza (Zn/Cu SOD) ili SOD1), mitohondrijski (mangan superoksid-dismutaza (Mn-SOD) ili SOD2) i izvanstanični (EC-SOD ili SOD3). Kada je povećano stvaranje superoksidnog radikala, tada se aktivnost enzima inducira kemikalijama. Odgovor stanice na oksidativni stres javit će se u obliku povećanja koncentracije izoformi SOD-a. Aktivnost SOD1 i SOD3 dokazano raste do odrasle dobi, dok u određenim staničnim organelama su inaktivni. Katalaza je lokalizirana unutar

peroksisoma, organelama u kojima se nalazi glikolat-oksidaža koja katalizira stvaranje vodikova peroksida. Za vodikov peroksid je vrlo važno da se brzo razgrađuje jer time skraćuje put potencijalnog štetnog djelovanja na organizam u smislu stvaranja drugih slobodnih radikala (16). Katalaza se može pronaći u jetri, srcu i mišićima. Glutation-peroksidaža (GPx) je glavni enzim koji uklanja vodikov peroksid nastao djelovanjem SOD-a. Lokalizirana je djelomično unutar staničnih membrana i sadržava selen. U ljudskom organizmu poznata su 4 oblika tog enzima: stanična, plazmatska, fosfolipid-hidroperoksid-glutation-peroksidaža i gasterintestinalna peroksidaža (13). Jedna od važnih funkcija glutaciona u organizmu je vraćanje vitamina važnih za organizam u aktivan oblik i tako održava ravnotežu unutar organizma.

### 1.3.2 Neenzimski antioksidansi

Neenzimski antioksidansi također imaju važnu ulogu u obrani organizma od štetnih djelovanja oksidativnog stresa. Sekundarnu crtu obrane predstavljaju neenzimski antioksidansi u koje se svrstavaju askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) (15). Vitamin C ima važnu ulogu u biološkim oksido-redukcijskim procesima i staničnom disanju (13). Uloga askorbinske kiseline je da reducira  $\alpha$ -tokoferolni radikal, perokside i ostale radikale. Pripada skupini vitamina topivih u vodi, a može se naći u pojedinim prehrambenim proizvodima kao što su voće i povrće. Zbog svoje jake antioksidativne funkcije upotrebljava se u liječenju ishemije srca i Parkinsonove bolesti (18). Vitamin E pripada skupini vitamina topivih u mastima i čine ga  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\lambda$ -tokoferol. Štiti od lipidne peroksidacije prekidanjem lančane reakcije nastajanja radikala. Sastavni je dio bioloških membrana i lipoproteina u krvi (18). Glutation (GSH) je reducirani oblik koji čini gotovo 95% od ukupnog glutaciona, a ostalih 5% čini oksidirani oblik glutaciona (GSSG). Glutation ima važnu ulogu u uklanjanju vodikova peroksida i sudjeluje s antiapoptotskim i proapoptotskim proteinima pomoću čega štiti stanicu od apoptoze (17). Beta-karoten je provitamin A topiv u lipidima. Djeluje antioksidacijski, primarno uklanjajući singlet kisik. Beta-karoten pripada skupini biljnih pigmenta, karotenoida koji daju boju voću i povrću (16).

#### 1.4. Metode detekcije oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Zbog nestandardizirane metode mjerenja određivanje razine oksidativnog stresa još nije ušlo u svakodnevnu kliničku praksu. Ispitivanje oštećenja na staničnim komponentama, mjerenjem razine enzimskih komponenti te mjerenjem razine reaktivnih kisikovih komponenti (ROS-a) može se odrediti utjecaj oksidativnog stresa. Spektrofotometrija je jedna od metoda koja se koristi za procjenu razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta. Za uspješno određivanje potreban je kvalitetan uzorak venske krvi. Mjerenje koncentracije tiobarbituratskih reaktivnih spojeva (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) je jedna od spektrofotometrijskih metoda za određivanje razine oksidativnog stresa. Za mjerenje antioksidativnog kapaciteta plazme koristi se spektrofotometrijska metoda određivanja sposobnosti reduciranja željeza u plazmi ( Ferric reducing ability of plasma, FRAP). Osim spektrofotometrijskih mjerenja, procjenu intracelularne proizvodnje ROS-a moguće je provesti i pomoću metode protočne citometrije (19) Za određivanje razine vodikova peroksida i peroksinitrata koristi se 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF-DA), a za određivanje slobodnog kisikovog radikala koristi se dihidroetidij (Dihydroethidium, DHE). Uzorak koji se koristi za protočnu citometriju je također venska krv, točnije, razina ROS-a procjenjuje se u leukocitima periferne krvi (granulociti, monociti i limfociti) (19). Naposljetku, komercijalnim ELISA kitovima moguće je odrediti primjerice koncentraciju proteina 8-izo-PGF2 $\alpha$  (izoprostan proizveden neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline u membranskim fosfolipidima), Cu/Zn SOD (SOD izoforma odgovorna za dismutaciju) u serumu, GPx1 (antioksidativni enzim koji katalizira redukciju vodikova peroksida u vodu) i katalaze (antioksidativni enzim koji pretvara vodikov peroksid u kisik i vodu) (19).

#### 1.5. HAEC stanične kulture

Humane aortalne endotelne stanice (HAEC) izolirane su iz ljudske torakalne i abdominalne aorte. HAEC su korisne za proučavanje vaskularnih bolesti kao što su tromboza, ateroskleroza i hipertenzija (21). Endotelne stanice obavljaju mnoge važne funkcije, uključujući prepoznavanje i prilagodbu tjelesnim tekućinama, mehaničke i hemodinamske promjene (20). Njegove najvažnije funkcije su: kontrola vaskularnog tonusa, inhibicija agregacije trombocita, regulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih

stanica i regulacija propusnost stijenke krvnih žila (19). Kultura stanica uključuje uzgoj stanica izoliranih iz različitih životinjskih i ljudskih tkiva. Stanične kulture pripremljene iz tkiva ili organa uzetih izravno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama, koje se subkulturom i postupcima imortalizacije mogu transformirati u stanične linije u kojima se stanice mogu neograničeno razmnožavati (proliferirati) u odgovarajućim uvjetima.

### **1.6. Protočna citometrija**

Protočna citometrija (Flow Cytometry, FC) je tehnika koja se koristi za otkrivanje i mjerenje fizikalnih i kemijskih karakteristika populacije stanice ili čestice (22). U tom se postupku uzorak koji sadrži stanice ili čestice suspendira u tekućini i ubrizgava u instrument protočnog citometra. Uzorak je fokusiran da idealno protječe po jednu stanicu kroz lasersku zraku, gdje je raspršena svjetlost karakteristična za stanice i njihove komponente. Stanice su često označene fluorescentnim markerima pa se svjetlost apsorbira i zatim emitira u pojasu valnih duljina. Deseci tisuća stanica mogu se brzo ispitati, a prikupljeni podaci obrađuju računalom.

### **2. HIPOTEZA**

Utjecaj različitih koncentracija kuhinjske soli (NaCl) na oksidativni stres humanih aortalnih endotelnih stanica. Povećana koncentracija kuhinjske soli će imati štetniji učinak na stanice, odnosno povećati će produkciju reaktivnih kisikovih radikala i time povećati stres stanice.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj različitih koncentracija NaCl (320, 350 i 380 mosmol/kg) na biomorfološka svojstva HAEC stanica odnosno razinu oksidativnog stresa mjerenu metodama DCF-DA i DHE na protočnom citometru.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija na humanim aortalnim endotelnim stanicama.

### 4.2. Materijali

Kao materijal istraživanja koristile su se humane aortalne endotelne stanice. Stanice su podijeljene u 4 skupine: (1) kontrolna (270 mosmol/kg); (2) skupina (320 mosmol/kg); (3) skupina (350 mosmol/kg); (4) skupina (380 mosmol/kg).

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Uzgoj i tretiranje HAEC različitim koncentracijama NaCl-a

HAEC stanice (Innoprot, Barcelona, Spain) su uzgojene u odgovarajućem mediju za uzgoj (Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium; Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, SAD) koji je nadopunjen nisko-serumskim dodatkom za rast (Low serum growth supplement, LSGS; Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, USA) HAEC su do konfluencije uzgajane u inkubatoru (Shel Lab, CO<sub>2</sub> Series, Sheldon manufacturing Inc, Cornelius, OR, SAD) u odgovarajućim uvjetima: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, > 80 % vlažnost (Slika 1. a).

Osmolalnost kontrolnog medija bila je 270 mosmol/kg (133 mmol/l natrija). Medij sa visokom koncentracijom pripremljen je dodavanjem NaCl-a (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska) do ukupne osmolalnosti od 320 mosmol/kg (158 mmol/l), 350 mosmol/kg (173 mmol/l) i 380 mosmol/kg (188 mmol/l) (Slika 1. b). Nakon što su stanice u uzgojnim bocama (T-25, Nunc, ThermoFisher Scientific, MA, SAD) dosegle 80 % konfluentnost, kontrolni medij je zamijenjen medijem s visokom koncentracijom NaCl-a ovisno o pripadnosti eksperimentalnoj grupi. Nakon 72 sata u pripadajućem mediju, stanice su prikupljene i pripremljene za protokol bojanja.

MTT test korišten je kao indikator vijabilnosti stanica. Stanice su nasadene na ploču s 96 jažica. Nakon 24 h, 48 h i 72 h 10 µL osnovne otopine MTT dodano je u svaku jažicu i ploča je stavljena u inkubator na 4 sata da se proizvedu kristali formazana. Nakon inkubacije

dodano je 100  $\mu\text{L}$  MTT otapala da se otope stvoreni kristali formazana i mikroploča je očitana na 595 nm.



Slika 1. Medij za uzgoj humanih endotelih stanica s pripadajućim nisko-serumskim dodatkom za rast (a). Natrijev klorid (NaCl) (b)

Izvor: fotografirala autorica rada

#### 4.3.2. Mjerenje razina oksidativnog stresa u HAEC nakon inkubacije u mediju s različitim koncentracijama NaCl-a metodom protočne citometrije

Stanice su isprane u  $1\times$  fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (eng. Phosphate buffered saline, PBS) i pripremljene za protokol bojenja. Diklorfluorescein diacetat (DCF-DA) korišten je za određivanje razine vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i peroksinitrita ( $\text{ONOO}^-$ ). Dihidroetidij (DHE) koristio se za određivanje razine superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) u HAEC stanicama. Stanice su resuspendirane u  $100\ \mu\text{L}$   $1\times$  PBS i inkubirane s DCF-DA ili DHE ( $10\ \mu\text{M}$  konačna koncentracija) 30 minuta na  $+4\ ^\circ\text{C}$ . Nakon razdoblja inkubacije, uzorci obojeni DCF-DA resuspendirani su u  $350\ \mu\text{L}$   $1\times$  PBS i očitani na protočnom citometru. Uzorci obojeni DHE dodatno isprani  $1\times$  PBS-om prije ponovne suspenzije u  $1\times$  PBS-u i očitavanja na protočnom citometru. Nakon početnih očitavanja,  $50\ \mu\text{L}$   $1\ \text{mM}$  forbol 12-miristat 13-acetata (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) je dodan u svaki uzorak kako bi se stimulirala proizvodnja ROS-a. Nakon 15-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su ponovno očitani na citometru. Za procjenu intracelularne proizvodnje ROS-a upotrijebljen je protočni citometar FACS Canto



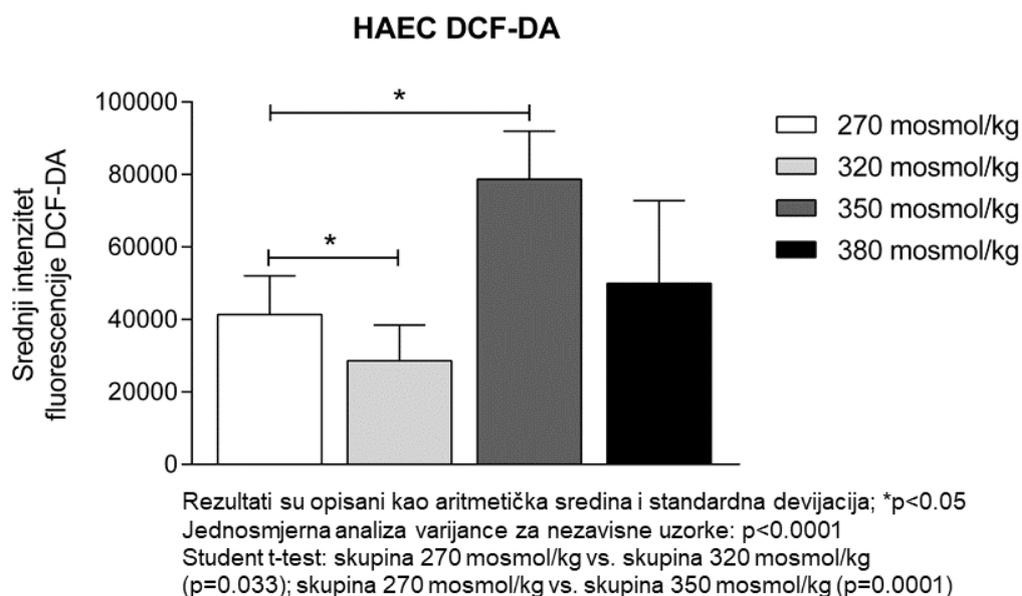
II (BD Bioscience; 488 ekscitacijski laser i filter za analizu 530/30 BP, Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD). Analiza i vizualizacija podataka su provedene pomoću softvera Flow Logic (Inivai Technologies, Mentone, Australija).

### 4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Za statističku analizu i usporedbu rezultata korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (One-Way ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Studentov t-test korišten je pri usporedbi parametara među eksperimentalnim skupinama. Kada varijable nisu normalno distribuirane, korišten je Mann-Whitneyjev U test. Razina statističke značajnosti je određena sa  $p < 0,05$ . Koristit će se statistički program SigmaPlot 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD), Excel 2016 (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD) te GraphPad Prism5 (San Diego, CA, SAD)

## 5. REZULTATI

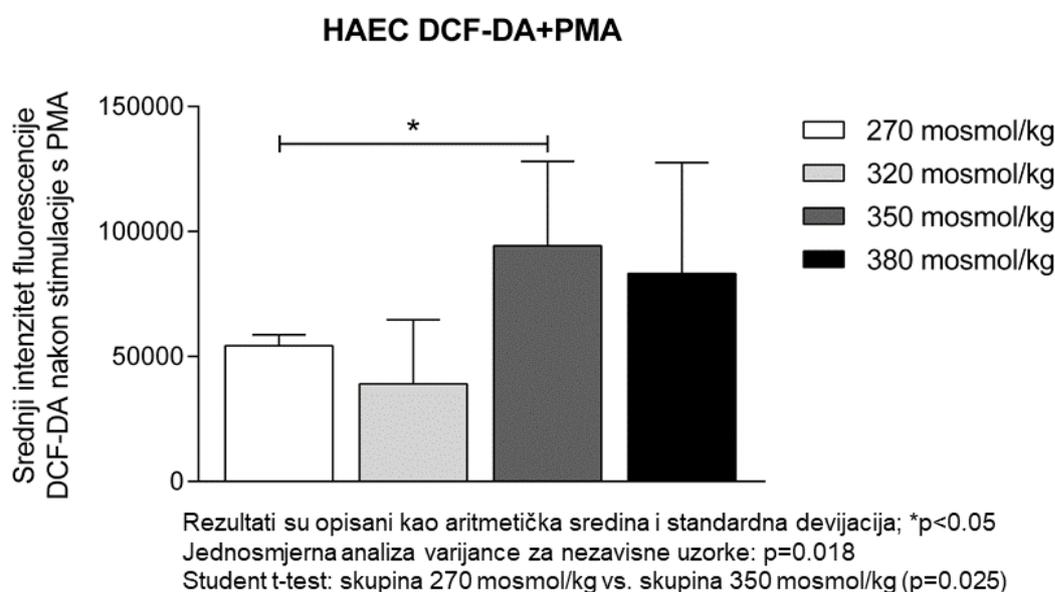
Slika 2. prikazuje stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita zabilježenog bojanjem DCF-DA u HAEC koje su izložene različitim koncentracijama NaCl-a. Zabilježena je statistički značajna promjena u razini oksidativnog stresa prilikom tretiranja stanica različitim koncentracijama NaCl-a (jednosmjerna analiza varijance za nezavisne uzorke;  $p < 0,0001$ ), prilikom čega je najveća produkcija radikala zabilježena u skupini 350 mosmol/kg. Student t-testom je utvrđeno da je došlo do značajnog sniženja produkcije radikala u skupini 320 mosmol/kg ( $p = 0,033$ ) te značajnog povećanja produkcije u skupini 350 mosmol/kg ( $p = 0,0001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom 270 mosmol/kg.



**Slika 2.** Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a u mediju za uzgoj stanica na razine vodikovog peroksida i peroksinitrita kod HAEC nakon 72 sata. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Legenda: HAEC – humane aortalne endotelne stanice; DCF-DA - Diklorfluorescein diacetat; NaCl – Natrijev klorid; T – standardna devijacija; \*  $p < 0,05$ .

Slika 3. prikazuje stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita zabilježenog bojanjem DCF-DA nakon stimulacije s PMA u HAEC koje su izložene različitim koncentracijama NaCl-a. Zabilježena je statistički značajna promjena u razini oksidativnog stresa prilikom tretiranja stanica različitim koncentracijama NaCl-a ( $p = 0,018$ ), prilikom

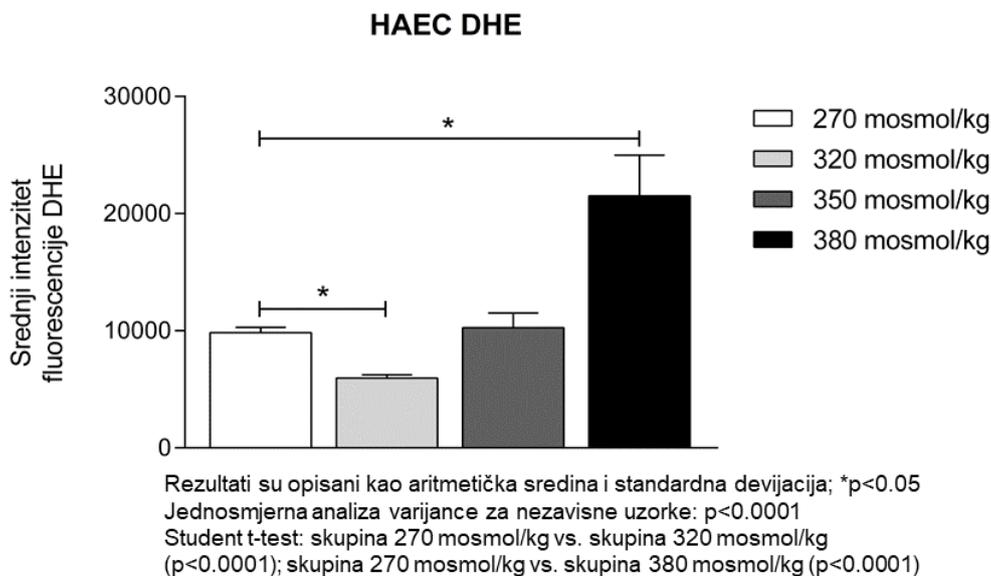
čega je najveća produkcija radikala zabilježena u skupini 350 mosmol/kg. Student t-testom je utvrđeno da je došlo do značajnog povećanja produkcije radikala u skupini 350 mosmol/kg ( $p = 0,025$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom 270 mosmol/kg.



**Slika 3.** Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a u mediju za uzgoj stanica na razine vodikovog peroksida i peroksinitrita nakon stimulacije s PMA kod HAEC nakon 72 sata.

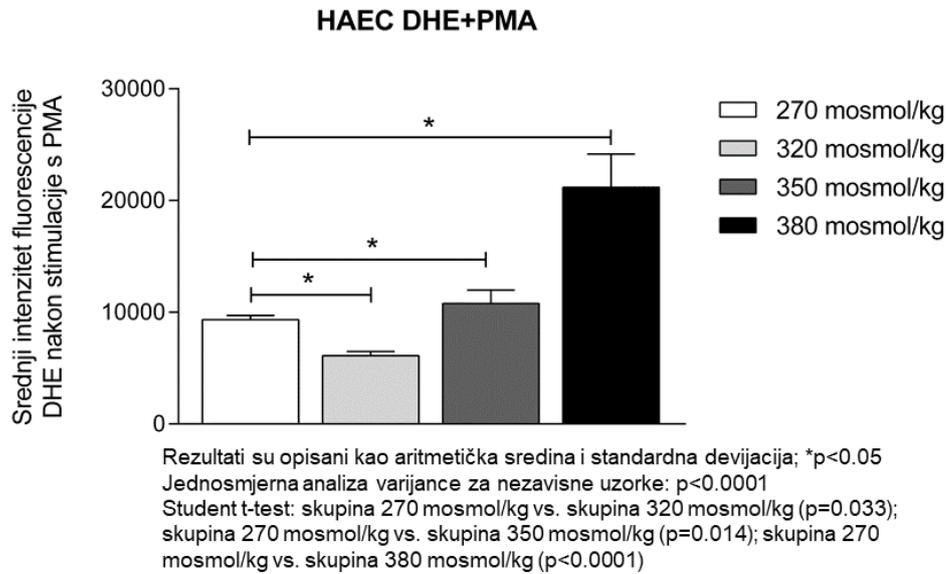
Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Legenda: HAEC – humane aortalne endotelne stanice; DCF-DA - Diklorfluorescein diacetat; PMA - forbol 12-miristat 13-acetat; NaCl – Natrijev klorid; T – standardna devijacija; \*  $p < 0,05$ .

Slika 4. prikazuje intenzitet stvaranja superoksidnog aniona zabilježenog bojanjem DHE u HAEC koje su izložene različitim koncentracijama NaCl-a. Zabilježena je statistički značajna promjena u razini oksidativnog stresa prilikom tretiranja stanica različitim koncentracijama NaCl-a ( $p < 0,0001$ ), prilikom čega je najveća produkcija radikala zabilježena u skupini s najvećom koncentracijom NaCl-a u mediju (380 mosmol/kg). Student t-testom je utvrđeno da je došlo do značajnog sniženja produkcije radikala u skupini 320 mosmol/kg ( $p < 0,0001$ ) te značajnog povećanja produkcije u skupini 380 mosmol/kg ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom 270 mosmol/kg.



**Slika 4.** Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a u mediju za uzgoj stanica na razinu superoksidnog aniona kod HAEC nakon 72 sata. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Legenda: HAEC – humane aortalne endotelne stanice; DHE - Dihidroetidijum; NaCl – Natrijev klorid; T – standardna devijacija; \*  $p < 0,05$ .

Slika 5. prikazuje stvaranje superoksidnog aniona zabilježeno bojanjem DHE nakon stimulacije s PMA u HAEC koje su izložene različitim koncentracijama NaCl-a. Zabilježena je statistički značajna promjena u razini oksidativnog stresa prilikom tretiranja stanica različitim koncentracijama NaCl-a ( $p < 0,0001$ ), prilikom čega je najveća produkcija radikala zabilježena u skupini s najvećom koncentracijom NaCl-a u mediju (380 mosmol/kg). Student t-testom je utvrđeno da je došlo do značajnog sniženja produkcije radikala u skupini 320 mosmol/kg ( $p = 0,033$ ) te značajnog povećanja produkcije u skupinama 350 mosmol/kg ( $p = 0,014$ ) i 380 mosmol/kg ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom 270 mosmol/kg.



**Slika 5.** Utjecaj različitih koncentracija NaCl-a u mediju za uzgoj stanica na razinu superoksidnog aniona nakon stimulacije s PMA kod HAEC nakon 72 sata. Rezultati su opisani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Legenda: HAEC – humane aortalne endotelne stanice; DHE - Dihidroetidijum; NaCl – Natrijev klorid; T – standardna devijacija; \*  $p < 0,05$ .

## 6. RASPRAVA

Kuhinjska sol neophodan je dodatak ljudskoj prehrani, ima važnu ulogu u funkcioniranju organizma i mnogim fiziološkim procesima. Da bi se zadovoljila dnevna potreba, potrebno je unijeti 5 g soli, dok odrasla osoba prosječno unese 11,6 g soli dnevno. Dnevni unos soli može se povećati pretjeranim zasoljavanjem pojedinih namirnica koje u svom izvornom obliku već sadrže onu količinu soli koja je ljudskom organizmu dostatna. Povećane količine soli imaju ulogu u stvaranju slobodnih kisikovih radikala koji imaju ulogu u metabolizmu, proliferaciji i angiogenezi endotelnih stanica (23). Disfunkcija endotelnih stanica uzrokovana povećanjem ROS-a dovodi do razvoja ateroskleroze, hipertenzije, ishemije srca i drugih vaskularnih oboljenja (24).

Smanjena produkcija antioksidansa ili prekomjerna produkcija kisikovih slobodnih radikala dovode do povećane produkcije oksidativnog stresa (25). Antioksidansi su spojevi koji su zaduženi za neutralizaciju ROS-a, no kada taj mehanizam zakaže dolazi do oštećenja endotela. Sjedilački način života, prekomjerna tjelesna težina i loše prehrabne navike dovode do smanjene produkcije antioksidansa koja naposljetku dovodi po povećane razine oksidativnog stresa i oštećenja endotelne funkcije (26).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija NaCl-a (320 mosmol/kg, 350 mosmol/kg i 380 mosmol/kg) na biomorfološka svojstva HAEC stanica odnosno razinu oksidativnog stresa mjerenu pomoću DCF-DA i DHE na protočnom citometru. Rezultat ovog istraživanja pokazao je da stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita zabilježenog bojanjem DCF-DA u HAEC stanicama prvotno pada u stanicama izloženim koncentraciji NaCl-a od 320 mosmol/kg, zatim inicijalno raste pri koncentraciji od 350 mosmol/kg i zatim ponovo pada pri koncentraciji od 380 mosmol/kg. DCF-DA fluorescira samo sa radikalima koji se nalaze u stanici, a najviše je specifičan za hidrosilne radikale (27). Pri koncentraciji od 320 mosmol/kg dolazi do smanjenog stvaranja oksidativnog stresa, zbog smanjene produkcije vodikovog peroksida i peroksinitrita. Uzork tome je najvjerojatnije prilagodba stanice na povećanu razinu NaCl-a. Tu promjenu nazivamo stanična adaptacija, stanice se prilagođavaju promjenama u okolišu mijenjajući ekspresiju gena, sintezu proteina i oslobađanje oksidativnog stresa (28). Pri koncentraciji od 350 mosmol/kg proizvodnja ROS-a inicijalno raste nakon stanične prilagodbe. NaCl mijenja redoks stanje stanice i utječe na povećanu proizvodnju oksidativnog stresa, odnosno vodikovog peroksida i peroksinitrita (28). Zatim pri koncentraciji od 380 mosmol/kg razina oksidativnog stresa naglo pada jer je došlo

do toksičnog učinka soli na stanice i stanice su se prezasatile NaCl-om, smanjile stvaranje oksidativnog stresa i uništile se. Naime, prethodno istraživanje pokazalo je da povećanje oksidativnog stresa pri nižim koncentracijama soli praćeno inicijalnim smanjenjem oksidativnog stresa pri višim koncentracijama soli dovodi do prezasićenja stanice i njenog uništenja (29). S druge strane, DHE bilježi stvaranje oksidativnog stresa primarno u obliku superoksidnog aniona. Rezultati mjerenja superoksidnog aniona pokazali su smanjeno stvaranje oksidativnog stresa pri koncentraciji od 320 mosmol/kg, zatim povećanje pri koncentracijama od 350 mosmol/kg i 380 mosmol/kg. Prvotno smanjenje oksidativnog stresa uzrokovano je zbog adaptacije stanica na povećanje osmolalnosti medija. Sposobnost stanica da proizvode ROS smanjeno je prilikom osmotskog stresa, odnosno, promijenjena ravnoteža između iona i vode dovodi do promjena u volumenu i funkcioniranju stanica (30). Povećanje razine oksidativnog stresa pri koncentracijama od 350 mosmol/kg i 380 mosmol/kg uzrokovano je povećanjem koncentracije soli. Povećana koncentracija soli uzrokuje povećano stvaranje superoksidnog aniona, odnosno povećano stvaranje oksidativnog stresa koje će dovesti do endotelne disfunkcije (31).

Uzimajući u obzir sve navedeno, može se reći kako povećana koncentracija soli djeluje drugačije na aktivaciju superoksidnog aniona, vodikovog peroksida i peroksinitrita. Zabilježeni oksidativni stres obilježen DCF-DA, odnosno oksidativni stres uzrokovan vodikovim peroksidom i peroksinitritom, najrelevantniji je pri koncentraciji od 350 mosmol/kg, dok oksidativni stres obilježen s DHE, odnosno oksidativni stres uzrokovan superoksidnim anionom, nastavlja rasti povećanjem koncentracije NaCl-a.

## 7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Povećana koncentracija soli uzrokuje povećano stvaranje oksidativnog stresa u kulturi HAEC stanica, međutim, taj efekt ovisi o koncentraciji NaCl u mediju.
- Koncentracija soli od 320 mosmol/kg djeluje adaptivno na stanicu i snižava oksidativni stres.
- Koncentracija soli od 350 mosmol/kg djeluje na povećanje oksidativnog stresa zabilježenog DCF-DA i DHE.
- S povećanjem koncentracije NaCl-a u mediju raste oksidativni stres, ali se vrsta reaktivnih radikala mijenja s promjenom koncentracije od vodikova peroksida i peroksinitrita pri 350 mosmol/kg do superoksida kod 380 mosmol/kg.
- Jednake promjene uočene su i kod nestimuliranih stanica i kod stanica stimuliranih s PMA.



## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih koncentracija NaCl (320, 350 i 380 mmol/L) na biomorfološka svojstva HAEC stanica odnosno razinu oksidativnog stresa mjerenu metodama DCF-DA i DHE na protočnom citometru.

**Ustroj studije:** Eksperimentalna studija na humanim aortalnim endotelnim stanicama.

**Materijali i metode:** Kao materijal istraživanja koristile su se humane aortalne endotelne stanice. Stanice su podijeljene u 4 skupine: (1) kontrolna (270 mosmol/kg); (2) skupina (320 mosmol/kg); (3) skupina (350 mosmol/kg); (4) skupina (380 mosmol/kg). Nakon 72 sata izloženosti različitim koncentracijama NaCl-a pripremljene su za protokol bojanja. Za određivanje razine vodikova peroksida korišten je DCF-DA, a za određivanje razine superoksidnog aniona korišten je DHE. Nakon inkubacije uzorci su očitani na protočnom citometru.

**Rezultati:** Različite koncentracije NaCl-a djeluju različito na povećanje oksidativnog stresa. Oksidativni stres (vodikov peroksid) najviši je pri koncentraciji od 350 mosmol/kg, dok produkcija superoksida raste sa povećanjem koncentracije NaCl-a.

**Zaključak:** Ovisno o koncentraciji NaCl u staničnom mediju, mijenja se produkcija reaktivnih kisikovih radikala, uz generalno povećanje oksidativnog stresa.

**Ključne riječi:** oksidativni stres; HAEC; DCF-DA; DHE; visok unos soli

## 9. SUMMARY

The effect of various NaCl concentration in medium on the oxidative stress in human aortic endothelial cells (HAEC)

**Objectives:** The aim of this research was to investigate the influence of different concentration levels of sodium chloride (320,350 and 380 mmol/L) on biomorphological traits of HAEC, and the level of oxidative stress measured with DCF-DA and DHE method on the flow cytometer.

**Study design:** Experimental research on human aortic endothelial cells.

**Material and methods:** The human aortic endothelial cells were used as research material. The cells were divided into 4 groups: (1) control (270mosmol/kg); (2) group (320mosmol/kg); (3) group (350mosmol/kg); (4) group (380 mosmol/kg). After 72-hour exposure to different concentrations of sodium chloride, the cells were prepared for staining protocol. To determine the hydrogen peroxide level, DFC-DA will be used; and to determine superoxide anion level, DHE will be used. After the incubation, the samples were analyzed on a cytometer.

**Results:** Different sodium chloride levels have different influence on the level of oxidative stress. Oxidative stress (hydrogen peroxide) is most relevant at a concentration of 350 mosmol/kg, while oxidative stress (production of superoxide) increases in higher NaCl concentration.

**Conclusion:** Depending on the concentration of NaCl in the cellular medium, the production of reactive oxygen radicals changes, with a general increase in oxidative stress.

**Key words:** oxidative stress; HAEC; DCF-DA; DHE; high-salt intake

**10. LITERATURA**

1. Jelaković B, Kaić-Rak A, Miličić D, Premužić V, Skupnjak B, Reiner Z. Manje soli – više zdravlja. Hrvatska inicijativa za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli (CRASH). *Lijec Vjesn.* 2009;131(3-4):87-92.
2. Jelaković B, Premužić V, Skupnjak B, Reiner Z. Kuhinjska sol - skriveni otrov u svakodnevnoj hrani. *Lijec Vjesn.* 2009;131(5-6):146-154.
3. Boegehold MA, Drenjančević I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Comprehensive Physiology.* 2016;6:215-254
4. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2011; 6 (3-4), 141-147
5. Greaney JL, DuPont JJ, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Edwards DG, Farquhar WB. Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: role of oxidative stress. *J. Physiology* 2012;590:5519-5528.
6. Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Feb;286(2):H575-83.
7. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.
8. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82:291-5
9. Davies KJ, Pryor WA, Ollinger K, Brunk UT. Cellular injury by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(5):565-574.
10. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90 (17):7915-7922.
11. Di Mateo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;9829176.
12. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018; 100:1-19.
13. Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Čvorišćec D, Čepelak I, urednice. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 638-648.

14. Adwas AA, Elsayed ASI, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(1):43-47.
15. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1): 9-19
16. Santos-Sanchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Canongo C, Hernandez-Carlos B. *Antioxidants*. 5 izd. London; IntechOpen Book Series Physiology; 2019.
17. Shang T, Liu Z, Liu CJ. Antioxidant Vitamin C attenuates experimental abdominal aortic aneurysm development in an elastase-induced rat model. *Journal of Surgical Research*. 2014;188:316-325.
18. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L i sur. Enhanced Antioxidative Defense by Vitamins C and E Consumption Prevents 7-Day High-Salt Diet-Induced Microvascular Endothelial Function Impairment in Young Healthy Individuals. *J Clin Med*. 2020;9(3):843.
19. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unifirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, Drenjančević I i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn*. 2012;44(1-4);135-146.
20. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. *Cells in focus: endothelial cell*. 12. izd., London. Elsevier. 2002; 1508-1512.
21. Lu Y, Sun Y, Drummer C, Nanayakkara GK, Shao Y, Saaoud F, i sur. Increased acetylation of H3K14 in the genomic regions that encode trained immunity enzymes in lysophosphatidylcholine-activated human aortic endothelial cells – Novel qualification markers for chronic disease risk factors and conditional DAMPs. *Redox Biol*. 2019;10:101221.
22. McKinnon KM. *Flow Cytometry: An Overview*. *Curr Protoc Immunol*; 2019. 120;5.1-5.11
23. Alhayaza R, Haque E, Karbasiafshar C, Sellke FW, Ruhul Abid M. The Relationship Between Reactive Oxygen Species and Endothelial Cell Metabolism. *Front Chem*. 2020;8;1-21.
24. Aldosari S, Awad M, Harrington EO, Sellke FW, Ruhul Abid M. Subcellular Reactive Oxygen Species (ROS) in Cardiovascular Pathophysiology. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(1);14
25. Doshii SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *Journal of Midlife Health*. 2013;4:140-146.

26. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*; 2011; 34;665-673.
27. Gardiner B, Dougherty JA, Ponnalagu D, Singh H, Angelos M, Chen C i Khan M. Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits. *Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems*. Cham (CH): Springer;2020. Chapter 4
28. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Methods Mol Biol*. 2010;594:57-72.
29. Calabrese EJ i Baldwin L. The Hormetic Dose-Response Model Is More Common than the Threshold Model in Toxicology. *Toxicol Sci*. 2003;71(2);246-250.
30. Manchanda G i Garg N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant*. 2008;30;595-618.
31. Kopkan L, Hess A, Huskova Z, Červenka L, Navar LG i Majid DSA. High-salt intake enhances superoxide activity in Enos knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299(3);F656-F663.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Mateja Ivković**

Datum i mjesto rođenja: 15. rujna 2001., Vukovar

Adresa stanovanja: Miroslava Krleže 10, 32 000 Vukovar, Republika Hrvatska

e-pošta: mateja.ivkovic032@gmail.com

### **Obrazovanje:**

- rujan 2016. – lipanj 2020.: Gimnazija Vukovar
- rujan 2020. – danas: sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku