

# Utjecaj primjene blokatora angiotenzin II AT-1 receptora (losartana) na izražaj proteina ciklooksigenaze I i II u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

---

Papak, Zdenka

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:546576>

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**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Zdenka Papak**

**UTJECAJ PRIMJENE BLOKATORA  
ANGIOTENZIN II AT-1 RECEPTORA  
(LOSARTANA) NA IZRAŽAJ  
PROTEINA CIKLOOKSIGENAZE I I II  
U KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-  
DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U  
OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Zdenka Papak**

**UTJECAJ PRIMJENE BLOKATORA  
ANGIOTENZIN II AT-1 RECEPTORA  
(LOSARTANA) NA IZRAŽAJ  
PROTEINA CIKLOOKSIGENAZE I I II  
U KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-  
DAWLEY ŠTAKORA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**Rad je izrađen u:** Medicinski fakultet Osijek, Katedra za fiziologiju i imunologiju

**Mentorica rada:** prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med., predsjednica Katedre za fiziologiju i imunologiju

**Neposredna voditeljica:** dr. sc. Zrinka Mihaljević, prof.

**Broj stranica:** 24

**Broj slika:** 8

**Broj tablica:** 0

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na utrošenom vremenu i vođenju tijekom pisanja ovoga rada.*

*Također, zahvaljujem dr. sc. Zrinki Mihaljević, prof. na pomoći oko provođenja eksperimenta, na brojnim savjetima, strpljenju i izdvojenom vremenu za moje brojne upite.*

*Zahvaljujem svim prijateljima koji su mi ovo razdoblje života učinili ljepšim i zabavnijim i koji su bili uz mene u svim teškim i lijepim trenucima mogega školovanja.*

*Posebnu i najveću zahvalnost upućujem svojoj obitelji i roditeljima koji su mi omogućili studiranje te uvijek bili uz mene i bodrili me. Bili su mi oslonac i potpora u svim nedaćama i padovima. Hvala im na povjerenju koje su mi ukazali tijekom studiranja.*







## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Hipertenzija.....	1
1.2 Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav .....	1
1.3 Losartan .....	1
1.4 Ciklooksigenaza 1 (COX-1) i ciklooksigenaza 2 (COX-2).....	2
2. HIPOTEZA.....	4
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	5
4. MATERIJALI I METODE.....	6
4.1 Eksperimentalni životinjski model .....	6
4.2 Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom .....	7
4.3 Western blot.....	8
4.3.1 Prijenos proteina na membranu (eng. <i>blotting</i> ) .....	10
4.3.2 Blokiranje membrane i inkubacija s protutijelima .....	11
4.3.3 Kemiluminiscencijska detekcija.....	12
4.4 Statistička analiza .....	12
5. REZULTATI .....	13
6. RASPRAVA.....	17
7. ZAKLJUČAK.....	19
8. SAŽETAK.....	20
9. SUMMARY .....	21
10. LITERATURA .....	22
11. ŽIVOTOPIS .....	24

## POPIS KRATICA

ACE (eng. *angiotensin-converting enzyme*) – konvertaza angiotenzina

AT1 – angiotenzin II receptor tip 1

AT2 – angiotenzin II receptor tip 2

BSA (eng. *bovine serum albumin*) – goveđi serumski albumin

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

COX-1 – ciklooksigenaza 1

COX-2 – ciklooksigenaza 2

dH<sub>2</sub>O – destilirana voda

EDTA (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraoctena kiselina

HRP (eng. *horseradish peroxidase*) – peroksidaza iz hrena

LT – leukotrien

LX – lipoksin

PBS (eng. *phosphate-buffered saline*) – fosfat puferirana fiziološka otopina

PG – prostaglandin

PGI<sub>2</sub> – prostaciklin

PVDF (eng. *polyvinylidene difluoride*) – polivinilidenfluorid

RT (eng. *room temperature*) – sobna temperatura

SD – standardna devijacija

SDS (eng. *sodium dodecyl sulphate*) – natrij dodecil sulfat

TBST (eng. *mixture of tris-buffered saline (TBS) and Tween 20*) – mješavina tris puferirane fiziološke otopine i spoja Tween 20

Tris - (engl. *(hydroxymethyl)aminomethane*) – hidroksilmetil aminometan

Tx – tromboksan

TxA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>

WHO (eng. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija



## 1. UVOD

### 1.1 Hipertenzija

Hipertenzija (povišeni krvni tlak) je jedan od vodećih čimbenika rizika smrtnosti. Prevalencija je hipertenzije u 2015. godini, u muškaraca u dobi od 18 i više godina bila oko 24 %, te oko 20 % kod žena, što je vrlo veliki udio. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) navodi kako su prvih pet zemalja s najvećim udjelom muškaraca s visokim krvnim tlakom u 2015. godini bile zemlje srednje i istočne Europe: Hrvatska, Latvija, Litva, Mađarska te Slovenija. Približno dva od pet muškaraca imali su visok krvni tlak (1). Hipertenzija, kao doživotna bolest koja ima vrlo malo simptoma sve dok ne dostigne uznapredovali stadij, jedinstveni je terapijski problem. Kako bi se učinkovito liječila potrebno je promijeniti način života te redovito uzimati lijekove (2).

### 1.2 Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka te u metabolizmu elektrolita. Angiotenzin II najvažniji je hormon toga sustava. Djelovanjem renina, enzima koji proizvode jukstaglomerularne stanice aferentne renalne arteriole, iz angiotenzinogena nastaje dekaeptid angiotenzin I. Konvertaza angiotenzina (ACE – engl. *angiotensin-converting enzyme*) uklanja dvije aminokiseline s karboksilnog kraja angiotenzina I, te nastaje oktapeptid angiotenzin II. Angiotenzin II vrlo je snažan vazokonstriktor. Povišuje krvni tlak u žilama tako da inhibira otpuštanje renina iz jukstaglomerularnih stanica te stimulira oslobađanje aldosterona, a aldosteron uzrokuje zadržavanje  $\text{Na}^+$  i vode. Angiotenzin II veže se na specifične transmembranske angiotenzinske receptore koji su smješteni u raznim tkivima pa tako i u krvnim žilama. Poznata su dva takva receptora, angiotenzin II receptor tip 1 (AT1) i angiotenzin II receptor tip 2 (AT2) (3).

### 1.3 Losartan

Losartan je sintetski, nepeptidni, selektivni blokator angiotenzin II AT1 receptora. Koristi se za liječenje hipertenzije te kroničnog zatajenja srca (2). Losartan i njegov glavni metabolit karboksilne kiseline E-3174 kompetitivno se vežu na AT1 receptor te tako blokiraju fiziološke učinke angiotenzina II, vazokonstrikciju i otpuštanje aldosterona. Također se veže i za AT2 receptor, ali njihov je afinitet mnogo manji (4). Eliminacijom

negativne povratne sprege angiotenzina II na sekreciju renina povećava se reninska aktivnost plazme koja dalje vodi do porasta angiotenzina II u plazmi. Unatoč tomu, na učinkovitu blokadu receptora upućuju održana supresija koncentracije aldosterona te antihipertenzivno djelovanje. Prijašnja istraživanja pokazuju da inhibicija AT1 receptora losartanom kod zdravih osoba podiže koncentraciju tromboksana ( $\text{TxA}_2$ , vazokonstriktora ovisnog o ciklooksigenazi) i angiotenzina II u plazmi te povećava reninsku aktivnost plazme (5). Nakon tri dana od prestanka uzimanja losartana razina angiotenzina II te razina reninske aktivnosti plazme vraćaju se na početne vrijednosti (6).

#### 1.4 Ciklooksigenaza 1 (COX-1) i ciklooksigenaza 2 (COX-2)

Ciklooksigenaze (COX) su glikoproteini koji se nalaze u membranama većine stanica. Mnoga dosadašnja istraživanja dokazuju prisutnost dvaju oblika enzima ciklooksigenaze (COX), COX-1 i COX-2. Oba oblika sudjeluju u sintezi mnogih vrsta prostaglandina, no ovdje valja naglasiti njihovu ulogu u sintezi vazoaktivnih prostaglandina te u sintezi tromboksana. Enzim COX-1 pretežito se nalazi u trombocitima gdje sudjeluje u sintezi tromboksana  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) koji djeluje vazokonstriktorski. Za razliku od COX-1, COX-2 smješten u stanicama endotela sudjeluje u sintezi prostaciklina ( $\text{PGI}_2$ ), koji ima snažan vazodilatacijski učinak (7). Enzimi ciklooksigenaze kataliziraju sintezu prostaglandina (PG), tromboksana (Tx), leukotriena (LT) i lipoksina (LX) gdje im je supstrat slobodna arahidonska kiselina (3). Arahidonska kiselina, supstrat enzima ciklooksigenaze, najvećim se dijelom nalazi u mastima, kao što su fosfolipidi stanične membrane (8). Primarni su produkti sinteze prostaglandinski endoperoksidi ( $\text{PGH}_2$  i  $\text{PGG}_2$ ) koji su pri fiziološkoj temperaturi i pH vrlo nestabilni. Daljnjim enzimskim i neenzimskim djelovanjem nastaju prostaglandini  $\text{I}_2$  (prostaciklin  $\text{PGI}_2$ ),  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ),  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ),  $\text{D}_2$  ( $\text{PGD}_2$ ) te tromboksan  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ). Vrsta nastalih metabolita ovisi o stanicama u kojima nastaju, jer svaki tip stanica proizvodi samo jednu vrstu prostanoida, ovisno o enzimima koje sadrže (9). U trombocitima se tako uz djelovanje enzima tromboksan-sintaze, endoperoksidi prevode u tromboksan ( $\text{TxA}_2$ ), a u endotelnim stanicama djelovanjem enzima prostaciklin-sintaze nastaje prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ) (10). Prostaglandin i ostali metaboliti imaju kratko vrijeme poluživota te se ne pohranjuju u stanice, nego se odmah nakon sinteze oslobađaju. U organizmu se stvaraju kao odgovor na određene fiziološke i patofiziološke procese kako bi održali homeostazu. Neke su od njihovih brojnih uloga u organizmu: regulacija upalnog i imunološkog odgovora, agregacija trombocita te regulacija bubrega i gastrointestinalnog

sustava. Za ovaj je rad posebno važno istaknuti njihovu ulogu u kardiovaskularnom sustavu. Ovisno o vrsti prostaglandina, neki imaju vazodilatirajuću ulogu, dok su neki jaki vazokonstriktori. Prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ) je glavni vazodilatirajući prostaglandin koji stvaraju endotelne stanice. Vežući se za svoje receptore na glatkim mišićima stanica vaskularne stijenke povećava koncentraciju cAMP-a te uzrokuje vazodilataciju. Za razliku od  $\text{PGI}_2$ , tromboksan ( $\text{TxA}_2$ ) ima vrlo jak vazokonstriktorski učinak (9).

## **2. HIPOTEZA**

Blokada receptora za angiotenzin II, AT1 receptora dovodi do promjene izražaja enzima ciklooksigenaze 1 i 2 na proteinskoj razini u moždanim krvnim žilama.



### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je istraživanja utvrditi izražajnost proteina enzima ciklooksigenaze 1 i ciklooksigenaze 2 u krvnim žilama štakora koji su tjedan dana pili vodu s losartanom (blokatorom angiotenzin II AT-1 receptora) na modelu zdravih Sprague-Dawley štakora pomoću molekularne metode Western blot.

#### 4. MATERIJALI I METODE

Izražaj proteina COX1 i COX2 određen je korištenjem Western blot metode u uzorcima krvnih žila mozga. Metoda se temelji na specifičnom vezanju protutijela na izolirane proteine. Zbog premale količine uzorka za određivanje izražaja proteina kao jedan uzorak korištene su krvne žile mozga dviju životinja.

##### 4.1 Eksperimentalni životinjski model

Korišteni su muški Sprague-Dawley štakori u dobi od 9 do 11 tjedana starosti. Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine: prva su skupina bile kontrolne životinje (CTRL) koje su pile običnu vodu, a druga skupina životinje koje su primale losartan kroz vodu za piće (CTRL+LOSARTAN). Cijelo vrijeme trajanja protokola životinje iz obiju skupina imale su dostupnu standardnu hranu za laboratorijske glodavce (proizvođač Mucedola, Italija) s 0,4 %-tnim udjelom natrijeva klorida. Skupina CTRL+LOSARTAN u vodi za piće primala je 40 mg losartana (ukupna dnevna doza) kroz sedam dana. Životinje su žrtvovane osmi dan te su izolirane krvne žile mozga. Svi štakori, podijeljeni u skupine prema opisu te uzgojeni u Vivariju Medicinskoga fakulteta u Osijeku, a u starosti od 8 tjedana bili su prebačeni iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe radi prilagodbe na novi prostor i kako bi se smanjio stres zbog premještanja. Štakorima iz druge skupine po navršetku deset tjedana starosti obična voda zamijenjena je otopinom losartana kroz sedam dana. Prije žrtvovanja dekapitacijom štakori su izvagani, zatim anestetizirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma), te ostavljeni kratko vrijeme kako bi započelo djelovanje anestetika. Krvne su žile mozga po izolaciji pohranjene u Eppendorf tubice i stavljene u tekući dušik te nakon toga prebačene na -80°C sve dok nije došlo vrijeme za homogenizaciju uzoraka. Uzorci su tučkom u tarioniku usitnjeni do praha u tekućem dušiku, nakon toga izvagani te dodatno homogenizirani, pomoću mehaničkog homogenizatora na 4 °C kako bi se izbjegla denaturacija proteina, u homogenizacijskom puferu kako bi se stvorila tekuća suspenzija tkiva za centrifugiranje. Dodan je 1 ml homogenizacijskog pufera na 100 mg usitnjenog tkiva krvnih žila mozga. Homogenizacijski pufer sastojao se od 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,4 % SDS-a, i koktela inhibitora proteaza (0,4 µl/100µl). Dodan je Triton-X, u koncentraciji 0,062 %, u kojoj ne interferira s Bradfordom, a koncentracija SDS-a smanjila se na 0,1 %, da bi određivanje proteina po Bradfordu bilo pravilnije. Koktel inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5 ml dH<sub>2</sub>O)

također se koristila kako bi se spriječila razgradnja proteina. Centrifugiranje se odvijalo 30 minuta na 17000 g, 4 °C. Supernatanti su alikvotirani te pohranjeni na -80 °C do korištenja.

#### 4.2 Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom

Kako bismo odredili koncentraciju proteina u našim uzorcima, dobiveni supernatant podvrgnuli smo Bradford metodi. To je kolorimetrijska metoda koja se najčešće koristi u svrhu određivanja koncentracije proteina u uzorcima. Temelji se na reakciji proteina s određenim reagensom pri čemu nastaje obojeni kompleks, a intenzitet je boje proporcionalan koncentraciji proteina te se plavo obojenje mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm. Za određivanje koncentracija potrebno je napraviti baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost očitane apsorbancije o koncentraciji proteina u uzorku. Baždarni se dijagram radi mjerenjem apsorbancija niza otopina goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (11). Koristili smo standarde otopine BSA u koncentracijama; 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,4 mg/ml. Priredili smo dvije replike svakog standarda, a kao slijepu probu koristili smo homogenizacijski pufer istog sastava kao i pufer u kojem smo homogenizirali uzorke. Stock otopina BSA pripremljena je otapanjem 100 mg BSA u 10 ml destilirane vode (10 mg/ml). Zatim je pripremljena Stock otopina BSA pohranjena u alikvotima od 1 ml na -20 °C, a nakon odmrzavanja koristili smo ju za pripremu standarda. Koristili smo gotovi Bradfordov reagens, a standardna krivulja, kao što je već naglašeno, napravljena je uz pomoć standarda BSA poznate koncentracije kako bi se očitala koncentracija nepoznatih uzoraka (mjerenje apsorbancije na valnoj duljini 595 nm).

Budući da je uzorak krvnih žila jednog štakora količinski premalen za provođenje Western blot analize, uzorke krvnih žila mozga iz dvaju tipova životinja iste skupine štakora zajedno smo homogenizirali tako da je svaki od krvnih žila mozga tvorio tzv. „pool“. Priređene standarde koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,4 mg/ml nanijeli smo na mikrotitarsku pločicu, za usporedbu njihove apsorbancije s apsorbancijom nepoznatih uzoraka. Nulta je proba bila kao kontrola za poravnavanje spektrofotometra na vrijednost apsorbancije 0. Volumen uzorka nepoznate koncentracije, koji smo nanijeli na mikrotitarsku pločicu, bilo je potrebno prilagoditi tako da se izmjerena apsorbancija nalazi unutar intervala koji je izmjeren za uzorke BSA poznatih koncentracija. Nakon pripreme standarda, u ostale jažice dodali smo ekstrakt proteina nepoznate koncentracije u različitim

volumenima. Zatim je u svaku jažicu dodano 250  $\mu$ l Bradfordovog reagensa, a u posljednje četiri jažice dodan je čisti reagens. Budući da do reakcije dolazi vrlo brzo, unutar deset minuta od dodavanja reagensa mjerili smo apsorbanciju na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini 595 nm.

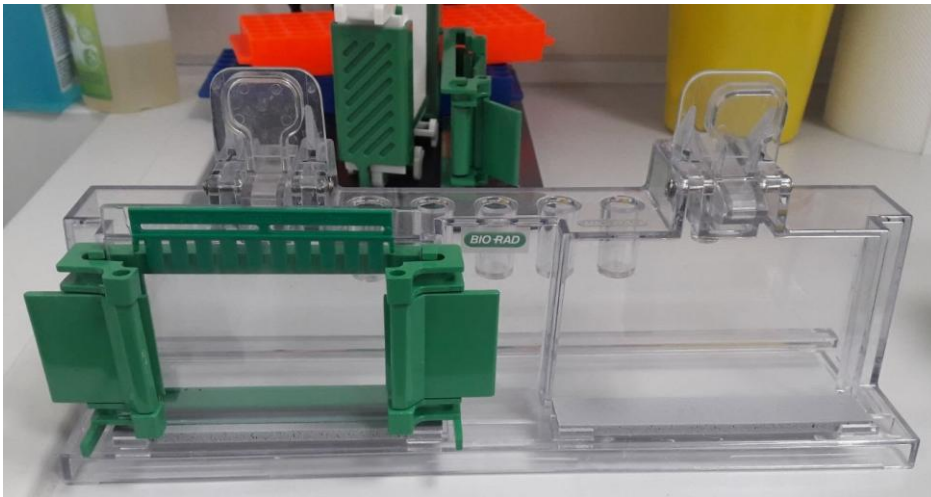
### 4.3 Western blot

Western blot metoda je kojom se može detektirati specifičan protein iz smjese proteina. Prvi je korak poliakrilamid gel elektroforeza. Određena masa ukupnih staničnih protein koja se nanosi na poliakrilamid gel može biti denaturirana ili u nativnoj konformaciji. Djelovanjem električnog polja proteini se razdvajaju temeljem njihove molekulske mase, proteini manje mase putuju brže, a proteini veće mase putuju sporije kroz poliakrilamid gel. Nakon razdvajanja proteini s gela pod utjecajem električne struje određene jakosti prebacuju se na membranu na kojoj se fiksiraju. Ciljani se proteini na kraju detektiraju kemiluminiscencijom tj. vezanjem specifičnih antitijela koja uz dodatak supstrata emitiraju svjetlost, a ti se signali registriraju pomoću digitalne kamere (Bio-Rad ChemiDoc Touch).

Kao što je objašnjeno u prethodnom tekstu, uzorci žila mozga usitnjeni su u tekućem dušiku (mehanički homogenizirani), te prebačeni u Eppendorf tubicu. Tkivo je zatim izvagano te je dodan homogenizacijski pufer u omjeru 1 ml pufera na 100 mg tkiva. Uzorci su zatim centrifugirani 30 min na 17000 g, 4 °C, a supernatan je alikvotiran i pohranjen na -80 °C do analize. Jedan alikvot iskoristili smo za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu koristeći BSA kao standard, a druge smo alikvote koristili za Western blot analizu. Važno je napomenuti da su uzorci prije nanošenja na gel prokuhani s Laemli puferom u omjeru 1:1.

Nakon pripreme i pohrane uzoraka za analizu slijedi priprema gelova za elektroforezu. Za početak složili smo stakla te ih stavili na postolje za izljevanje gelova (Slika 1.), stavili smo češljic za jažice i obilježili na staklima ispod donjeg ruba češljica razinu do koje ćemo izliti donji gel te smo ga nakon toga maknuli. Zatim smo otpipetirali potrebne sastojke za pripremu 10 %-tnog donjeg gela te ih postavili na magnetsku mješalicu da se otopina zagrije na sobnu temperaturu. 10 %-tni donji gel, gel za razdvajanje, koji odgovara veličini proteina izlijevamo između stakala do prethodno obilježene razine. Donji je gel važno odmah nadslojiti s otprilike 1 ml izopropanola kako bismo blokirali kontakt sa zrakom koji bi spriječio polimerizaciju gela. U međuvremenu dok se donji gel polimerizira, 45 min do 1 h, pripremljen je 4 %-tni gornji gel (eng. *stacking gel*). Neposredno prije izlijevanja

gornjeg gela površina je donjeg gela pažljivo isprana s  $\text{dH}_2\text{O}$  te posušena filter papirom (pazeći da se površina donjeg gela ne ošteti), potom se 4 %-tni gornji gel izlije do ruba stakla te se umetne češljic. Gornji se gel polimerizira 30 - 45 min. Nakon polimerizacije, sustav za elektroforezu postavljen je u kadicu koja je bila napunjena prethodno pripremljenim puferom (10 puta Stock; Tris-base, glicin, SDS). Pufer mora prekrivati jažice. Češljic se zatim pažljivo uklanja, a jažice se dobro ispiru puferom za elektroforezu kako bi se uklonio nepolimerizirani akrilamid. Nakon toga nanosi se uzorak s puferom za nanošenje uzoraka na gel, 5 - 10  $\mu\text{l}$  po jažici. U postavljenom sustavu (Slika 2.) elektroforeza je provedena na 200 V const. dok uzorci nisu prešli iz gornjeg u donji gel, potom 100 V const. do kraja (1 - 1,5 h, na 4 °C). Elektroforeza traje sve dok fronta boje pufera za nanošenje uzoraka (oko 6 kDa veličine) ne dođe do donjeg ruba gela.



**Slika 1.** Postavljen sustav za polimeriziranje gelova za elektroforezu (izvor: original autorice rada)



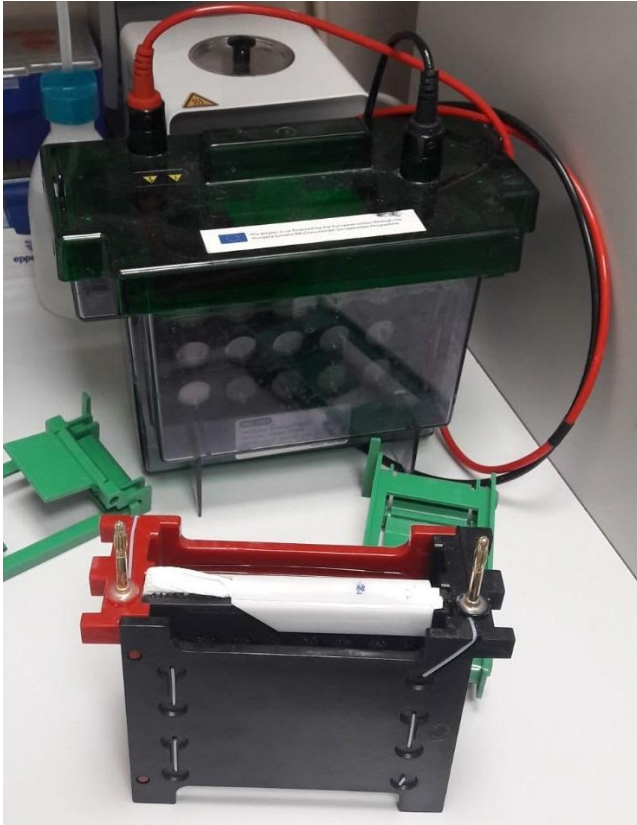
**Slika 2.** Postavljen sustav za provođenje elektroforeze (izvor: original autorice rada)

### 4.3.1 Prijenos proteina na membranu (eng. *blotting*)

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom, proteini s gela prebačeni su na membranu. Pufer za prijenos proteina na membranu prethodno je ohlađen na 4 °C, membrana i filter papir izrezani su prema dimenzijama gela te namočeni sa spužvicama. PVDF membrana prethodno je aktivirana metanolom. Po završetku elektroforeze, stakla su izvađena iz sustava te je gornji (“*stacking*”) gel odstranjen, a donji gel s proteinima pažljivo je prenesen u posudu s hladnim puferom za prijenos. Potom se slaže tzv. sendvič: na crni šupljikavi okvir postavlja se spužvica (eng. *fiber pads*), filter papir te PVDF (eng. *Polyvinylidene difluoride membrane*) membrana, a na PVDF membranu položi se donji gel, filter papir i spužvica. Potrebno je valjkom prijeći preko složenog sendviča kako bi se uklonili mjehurići zraka (Slika 3.). Cijela se struktura na kraju pričvrsti bijelim (prozirnim) šupljikavim okvirom te se postavlja u kadicu za transfer (Slika 4.). Transfer se provodi 1,5 h na 200 mA const i 4 °C. Po završetku transfera membrane su obojene Amid-BlueBlack bojom (na nekoliko sekundi uronjene u boju), a potom su odmah prebačene u kadicu s otopinom za odbojavanje (propanol, octena kiselina i dH<sub>2</sub>O), 3 puta po 5 min.



**Slika 3.** Posuda s puferom i potrebnim komponentama za transfer (izvor: original autorice rada)



**Slika 4.** Kadica za transfer proteina s gela na membranu (izvor: original autorice rada)

#### 4.3.2 Blokiranje membrane i inkubacija s protutijelima

Nakon odbojavanja membrana je isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu (tris-base, NaCl, mQ H<sub>2</sub>O, Tween-20) 2 x po 15 min. Potom je membrana blokirana u 4 %-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu u TBST-u minimalno 30 min (RT). Blokiranje se provodi kako bi se reduciralo nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Ako se membrana previše blokira može doći do redukcije signala, a ako se premalo blokira, može doći do jakog pozadinskog obojenja. Završetkom blokiranja, membrana je inkubirana u otopini za primarna protutijela (3 %). Priprema se 1,5 – 2 ml otopine po jednoj membrani. Membrana se inkubirala u primarnim protutijelima preko noći na 4 °C na rotary shakeru, potom je isprana u TBST-u 4 x po 15 min. Korišteno je zečje protu-štakorsko poliklonalno protutijelo (Proteintech Group, Cat. No. 13393-1-AP), u razrjeđenju 1:500 za COX-1 te zečje protu-štakorsko poliklonalno protutijelo (Proteintech Group, Cat. No. 12375-I-AP), u razrjeđenju 1:500 za COX-2. Izražaj proteina normaliziran je prema izražaju β-aktina i rezultati su prikazani kao relativan izražaj u odnosu na β-aktin. Za određivanje izražaja β-aktina korišteno je mišje protu-štakorsko primarno monoklonalno protutijelo Sigma, A5316-.2ML u razrjeđenju 1:7500.

Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, membrana je inkubirana sekundarnim protutijelima koja se nanose u 0,5 % blocking otopini (Chemiluminiscence Blotting Substrate) u koncentraciji 1  $\mu$ L/ml. Inkubacija je trajala dva sata na sobnoj temperaturi, a potom je uslijedilo ispiranje 4 x po 15 min u TBST-u. Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozje protu-zečje HRP (eng. *horseradish peroxidase*) obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1:7500 te kozje protu-mišje HRP obilježeno protutijelo u razrjeđenju 1:7500 za određivanje  $\beta$ -aktina.

#### 4.3.3 Kemiluminiscencijska detekcija

Nakon ispiranja membrana je lagano obrisana, na nju je stavljen kemiluminiscencijski reagens (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA) te je inkubirana jednu minutu (na sobnoj temperaturi). Nakon završetka inkubacije višak je reagensa uklonjen, a membrana je stavljena između dviju folija kako se ne bi posušila te su istisnuti mjehurići zraka. Membrana je potom snimljena na Medicinskom fakultetu Osijek na Bio-Rad ChemiDoc Touch uređaju.

Kao kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju, određena je koncentracija  $\beta$ -aktina (oko 42 kDa).  $\beta$ -aktin koristi se kao kontrola u Western blot metodi zato što je jedan od visoko konzerviranih proteina u eukariotskim stanicama.

#### 4.4 Statistička analiza

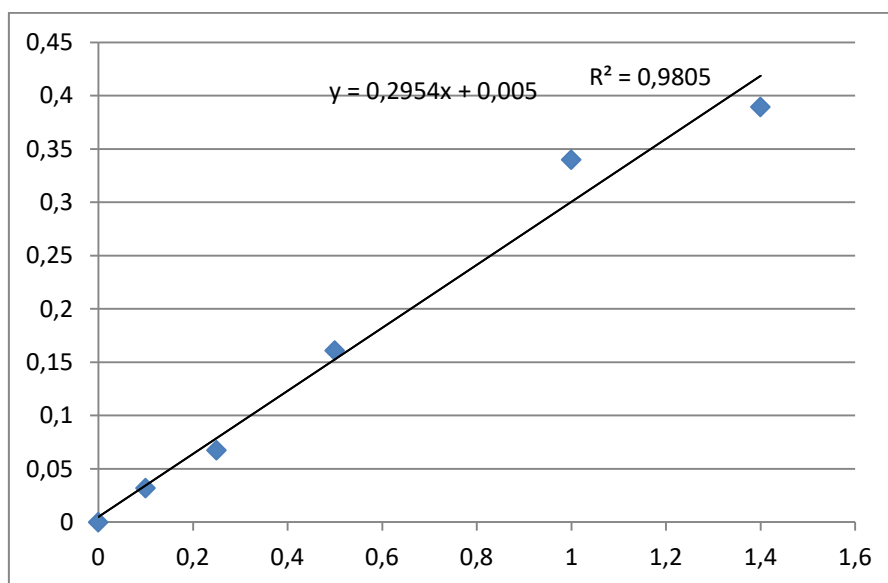
Svi su rezultati prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Za utvrđivanje međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli, između dviju nezavisnih grupa koristio se Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Wilcoxonov rank-sum test. Kao prag statističke značajnosti uzet će se  $p < 0,05$ .

Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot, v11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD) statistički program.



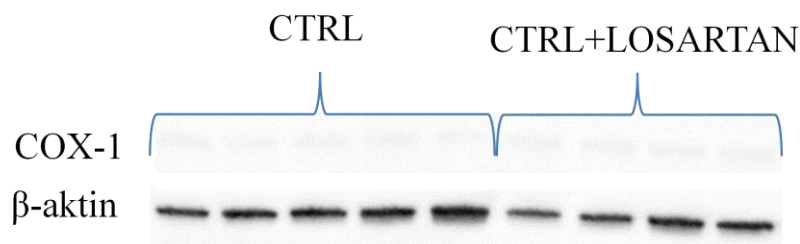
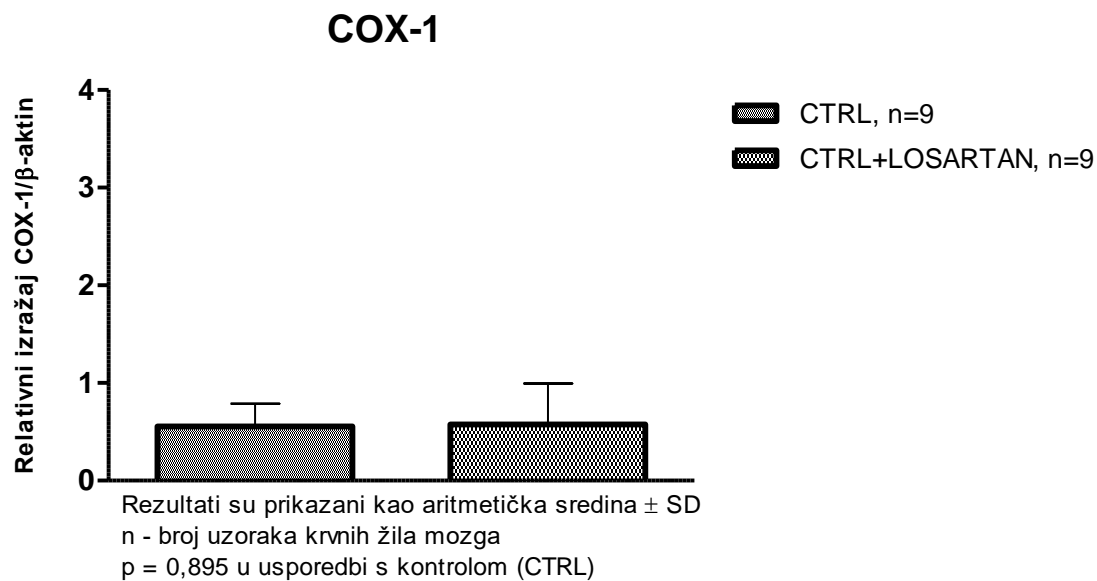
## 5. REZULTATI

Rezultat spektrofotometrijske Bradford metode određivanja koncentracije proteina jest kalibracijska krivulja iz koje se očitavaju nepoznate koncentracije proteina. Kalibracijsku krivulju smo izradili mjerenjem apsorbancije niza otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) poznatih koncentracija (Slika 5.).

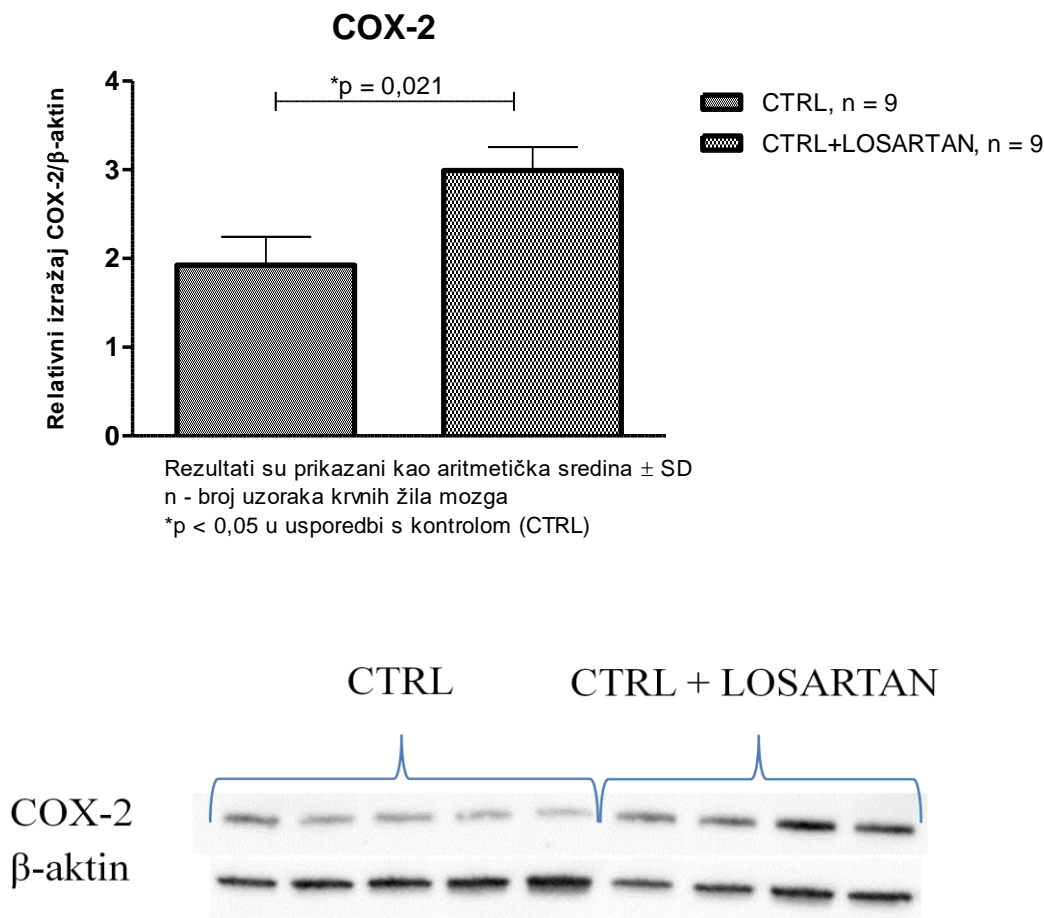


**Slika 5.** Prikaz standardne krivulje BSA po kojoj su očitane koncentracije proteina u uzorcima. Krivulja prikazuje ovisnost koncentracije proteina (x-os) o apsorbanciji (y-os). Jednadžba pravca je  $y = 0,2954 x + 0,005$ .

Dobiveni rezultati mjerenja prikazuju statistički značajno povećan ( $p < 0,05$ ) relativan izražaj COX-2 u CTRL+LOSARTAN skupini u usporedbi s CTRL skupinom. U izražaju COX-1 u CTRL-LOSARTAN skupini može se uočiti vrlo mala razlika u odnosu na CTRL skupinu, no ta razlika nije statistički značajna. (Slika 6. i 7.)

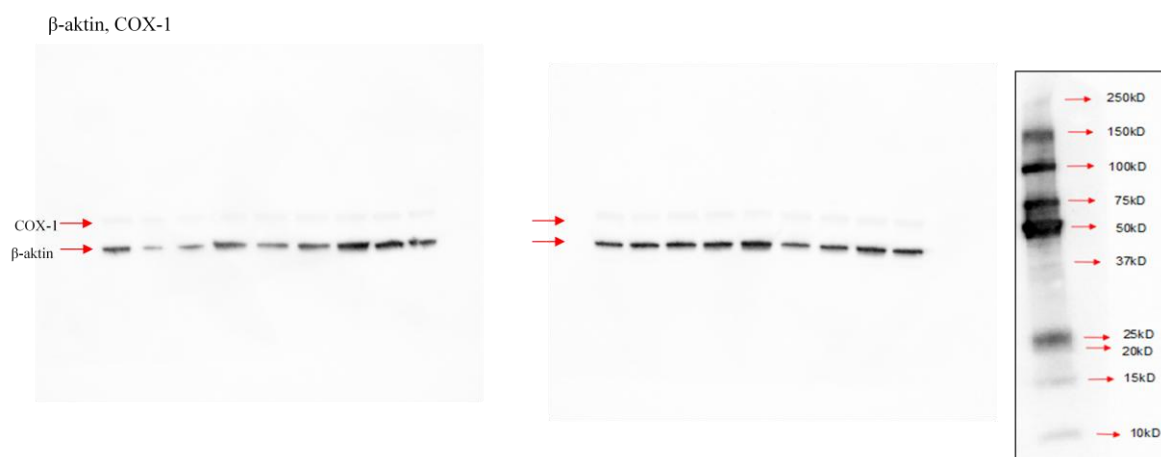


**Slika 6.** Relativan izražaj COX-1 u uzorcima krvnih žila mozga životinja koje su pile običnu vodu (CTRL) i životinja koje su kroz sedam dana primale losartan kroz vodu za piće (CTRL+LOSARTAN). Izražaj je normaliziran prema izražaju za protein  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani grafički kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD) i slikovno (slike *Western blota* uslikane su digitalnom kamerom Bio-Rad ChemiDoc Touch); p = 0,895 (Studentov t-test) u usporedbi s kontrolom (CTRL); n predstavlja broj uzoraka, pri čemu su jedan uzorak činile krvne žile mozga dviju životinja.

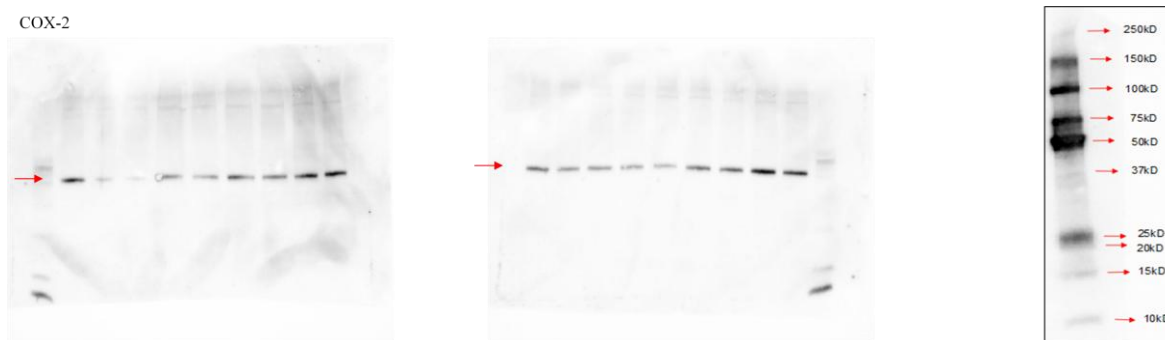


**Slika 7.** Relativan izražaj COX-2 u uzorcima krvnih žila mozga životinja koje su pile običnu vodu (CTRL) i životinja koje su kroz sedam dana primale losartan kroz vodu za piće (CTRL+LOSARTAN). Izražaj je normaliziran prema izražaju za protein  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani grafički kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD) i slikovno (slike *Western blota* uslikane su digitalnom kamerom Bio-Rad ChemiDoc Touch); \*p < 0,05 (Studentov t-test) u usporedbi s kontrolom (CTRL); n predstavlja broj uzoraka, pri čemu su jedan uzorak činile krvne žile mozga dviju životinja.

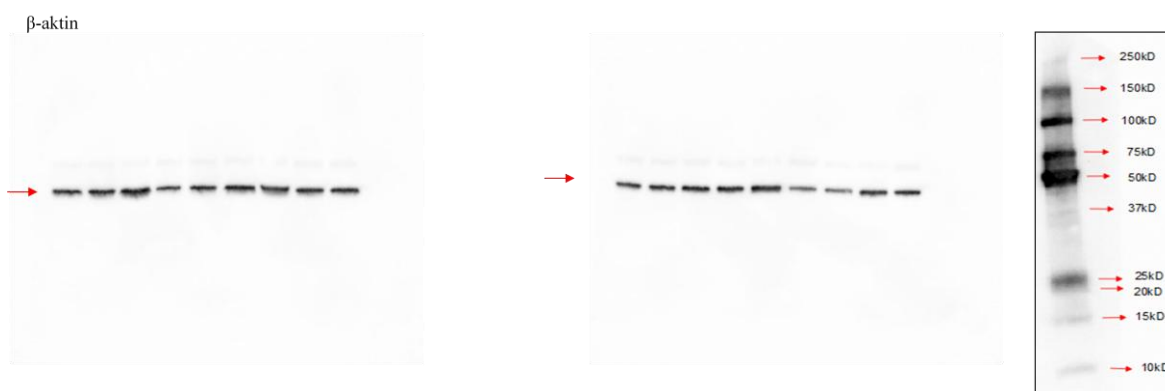
**A**



**B**



**C**



**Slika 8.** Originalne slike blotova COX-1 i β-aktina (A), COX-2 (B) te β-aktina (C). Slike su snimljene na uređaju Bio-Rad ChemiDoc Touch na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Ciljani protein bili su COX-1 čija veličina iznosi oko 68 kDa, COX-2 veličine oko 69 kDa te β-aktin veličine oko 45 kDa.

## 6. RASPRAVA

Hipertenzija kao jedan od vodećih čimbenika rizika smrtnosti jedinstveni je terapijski problem. Kako bi se liječila osim promjene načina života važno je redovito uzimati lijekove. U ovom istraživanju smo koristili losartan kao jedan od vrlo često primjenjivanih lijekova u liječenju hipertenzije. Losartan se kompetitivno veže na AT-1 receptor te tako sprječava fiziološke učinke angiotenzina II (vazokonstrikciju), što rezultira vazodilatacijom. Cilj je ovog istraživanja bio utvrditi izražajnost proteina enzima COX-1 i COX-2 u krvnim žilama zdravih štakora koji su tjedan dana pili vodu s losartanom. COX-1 i COX-2 sudjeluju u sintezi mnogih vrsta prostaglandina, no za ovaj rad važno je istaknuti njihovu ulogu u sintezi vazoaktivnih prostaglandina te tromboksana. COX-1 sudjeluje u sintezi tromboksana koji ima vazokonstriksijsko djelovanje, a COX-2 sudjeluje u sintezi prostaciklina koji djeluje vazodilacijski. Kako je opisano u metodama, utvrđen je odgovarajući protokol za Western blot koji se može koristiti i u svrhu istraživanja drugih proteina. Rezultat koji smo dobili u ovom istraživanju omogućio je analizu razlike ekspresije COX-1 i COX-2 između dviju skupina Sprague Dawley (SD) štakora, kontrolne (CTRL) i losartanske skupine (CTRL-LOSARTAN). Iz proteinskih pruga dobivenih kemiluminiscencijskom metodom možemo uočiti da je do vidljive razlike, između skupine koja je bila na losartanskoj terapiji i o ne koja nije bila, došlo samo kod enzima COX-2. Kod COX-1 nema vidljive razlike. Statističkom analizom napravljenom Studentovim t-testom dobiven je  $p = 0,895$  za COX-1 te za COX-2  $p = 0,021$ . Budući da je kao prag statističke značajnosti uzet  $p < 0,05$ , možemo zaključiti da je povećan izražaj COX-2 u CTRL+LOSARTAN skupini u usporedbi s CTRL skupinom statistički značajan, a kod izražaja COX-1 nema statistički značajne razlike između tih dviju skupina. Budući da je COX-2 smješten u stanicama endotela gdje sudjeluje u sintezi vazodilatirajućeg prostaciklina ( $PGI_2$ ), možemo pretpostaviti da je djelovanje losartana, koji blokiranjem angiotenzin II AT-1 receptora djeluje vazodilatirajuće, povećalo ekspresiju COX-2. Nedavnim istraživanjem koje se provodilo na Medicinskom fakultetu Osijek proučavan je utjecaj blokade receptora AT-1 na koncentraciju  $TxA_2$  u plazmi te je uočeno veliko povećanje razine  $TxA_2$  u plazmi nakon jednog tjedna primjene losartana, inhibitora receptora AT-1. Pretpostavljeno je da je do toga došlo zbog potencijalne interakcije inhibicije receptora AT-1 i metabolizma tromboksana  $A_2$  ( $TxA_2$ ) tako što inhibicija receptora AT-1 sprječava interakciju  $TxA_2$  s pripadajućim receptorima. (5) Uzmemo li u obzir dobivene rezultate, možemo pretpostaviti da do značajnije promjene u izražaju COX-

1, kojeg pretežito ima u trombocitima gdje sudjeluje u sintezi tromboksana  $\text{TxA}_2$ , nije došlo jer je povećana razina  $\text{TxA}_2$  signalizirala smanjenje stvaranja COX-1. Hipoteza je ovog rada djelomice potvrđena, za COX-2 hipoteza je potvrđena budući da je došlo do promjene u izražaju, a za COX-1 hipoteza nije potvrđena jer nema statistički značajne razlike.

## **7. ZAKLJUČAK**

Primjena blokatora angiotenzin II AT-1 receptora (losartana) tijekom sedam dana dovela je do značajnijeg povećanja u izražaju enzima ciklooksigenaza 2 (COX-2) u moždanim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora. U izražaju enzima ciklooksigenaza 1 (COX-1), za razliku od COX-2, nije došlo do značajnije promjene.

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Utvrditi izražajnost proteina enzima ciklooksigenaze 1 i ciklooksigenaze 2 u krvnim žilama štakora koji su tjedan dana pili vodu s losartanom (blokatorom angiotenzin II AT-1 receptora) na modelu zdravih Sprague-Dawley štakora pomoću molekularne metode Western blot.

**Materijali i metode:** Zdravi muški Sprague-Dawley (SD) štakori u dobi 9 - 11 tjedana starosti. Jedna je skupina štakora pila običnu vodu (CTRL skupina, kontrolna), a druga je skupina štakora kroz vodu za piće primala 40 mg losartana (ukupna dnevna doza) kroz sedam dana (CTRL+LOSARTAN skupina). U uzorcima krvnih žila mozga Western blot metodom, određen je izražaj proteina ciklooksigenaze 1 (COX-1) i ciklooksigenaze 2 (COX-2).

**Rezultati:** Izražaj COX-2 statistički je značajno povećan u CTRL+LOSARTAN skupini u usporedbi s CTRL skupinom. Razlika izražaja COX-1 u CTRL-LOSARTAN skupini u odnosu na CTRL skupinu nije statistički značajna.

**Zaključak:** Primjena blokatora angiotenzin II AT-1 receptora (losartana) tijekom sedam dana uzrokuje značajnije povećanje u izražaju enzima ciklooksigenaza 2 (COX-2) u moždanim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora. U izražaju enzima ciklooksigenaza 1 (COX-1), za razliku od COX-2, nema značajnije promjene.

**Ključne riječi:** COX-1, COX-2, losartan, Western blot



## 9. SUMMARY

### THE EFFECT OF BLOCADE OF ANGIOTENSIN II AT-1 RECEPTORS (LOSARTAN) ON THE PROTEIN EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE I AND II IN BLOOD VESSELS OF SPRAGUE-DAWLEY RATS

**Aim:** To determine the expression of the enzyme cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 protein in the blood vessels of the rats that were weekly drinking water with losartan (angiotensin II receptor AT-1 blocker) on a model of healthy Sprague-Dawley rats using a Western blot molecular method.

**Materials and Methods:** Healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were 9-11 weeks old. One group of rats was drinking common water (CTRL group, control), and the other group of rats received 40 mg of losartan (total daily dose) through water for seven days (CTRL + LOSARTAN group). The expression of cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) proteins in brain blood vessel samples was determined by the usage of the Western blot method.

**Results:** Expression of COX-2 was statistically significantly increased in the CTRL + LOSARTAN group compared to the CTRL group. And the difference in expression of COX-1 in the CTRL-LOSARTAN group compared to the CTRL group is not statistically significant.

**Conclusion:** In intake of angiotensin II AT-1 receptor blocker (losartan) in organism for seven days causes a significant increase in the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) enzyme in the brain blood vessels of Sprague-Dawley rats. There are no significant changes in expression of enzyme cyclooxygenase 1 (COX-1).

**Key words:** COX-1, COX-2, losartan, Western blot

**10. LITERATURA**

- 1) World Health Organization. Data and analysis on raised blood pressure. Dostupno na adresi: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_text/en/). Datum pristupa: 1.6.2018.
- 2) Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 3) Muray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
- 4) Drugs.com. Losartan. Dostupno na adresi: <https://www.drugs.com/losartan.html>. Datum pristupa: 2.6.2018.
- 5) Čavka A. Utjecaj dijete s visokim udjelom soli na mikrovaskularnu reaktivnost u populaciji zdravih mladih žena [doktorski rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet; 2013. Dostupno na stranici: <https://dr.nsk.hr/islandora/object/mefos:391/preview>  
Datum pristupa: 6.9.2018.
- 6) Halmed. Losartan Mylan 50 mg filmom obložene tablete. Dostupno na adresi: <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Losartan-Mylan-50-mg-filmom-oblozene-tablete/14412/>.
  - a) Datum pristupa: 2.6.2018.
- 7) Jukić A, Kaliterna Martinović D, Radić M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of cardiovascular diseases. *Reumatizam*. 2010;57(1):26-8
- 8) Musiek ES, Milne GL, McLaughlin BA, Morrow JD. Cyclopentenone Eicosanoids as Mediators of Neurodegeneration: A Pathogenic Mechanism of Oxidative Stress-Mediated and Cyclooxygenase-Mediated Neurotoxicity. *Brain Pathol*. 2005 Apr; 15(2): 149–158.
- 9) Čavar I. Uloga prostanoida u mehanizmima akutnog toksičnog oštećenja jetre acetaminofenom u miševa [doktorska disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2010. Dostupno na stranici: <http://bib.irb.hr/prikazi-rad?rad=546964>  
Datum pristupa: 3.6.2018.
- 10) FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation*. 1983;67:1174-1177.

- 11) Sesar V. Određivanje koncentracije proteina-usporedba Bradford, Lowry i Biuret metode [diplomski rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za kemiju; 2017.

Dostupno na stranici:

<https://repositorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos%3A199>

Datum pristupa: 10.8.2018.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Zdenka Papak

Datum i mjesto rođenja: 31. prosinca 1995., Bjelovar, Republika Hrvatska

Adresa: Vinogradska 5, Ilok 32236, Republika Hrvatska

e-pošta: papakzdenka@gmail.com

JMBAG: 0236216187

Obrazovanje: 2002. – 2010. Osnovna škola Julija Benešića, Ilok

2010. - 2014. Srednja škola Ilok, smjer opća gimnazija, Ilok

2014. - 2018. sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku