Utjecaj kratkotrajne slane dijete na izražajnost HIF1alfa u krvnim žilama štakora

Grgić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:936893

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Karla Grgić

UTJECAJ KRATKOTRAJNE SLANE DIJETE NA IZRAŽAJNOST HIF-1ALFA U KRVNIM ŽILAMA ŠTAKORA

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Karla Grgić

UTJECAJ KRATKOTRAJNE SLANE DIJETE NA IZRAŽAJNOST HIF-1ALFA U KRVNIM ŽILAMA ŠTAKORA

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je izrađen: Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Neposredni voditelj: Zrinka Mihaljević, prof.

Broj stranica:23

Broj slika:7

Broj tablica:0

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. HIF-1 alfa.....1

1.2. Učinci prekomjernog unosa soli.....2

2. HIPOTEZA.....4

3. CILJ RADA.....5

4. MATERIJALI I METODE.....6

4.1. EKSPERIMENTALNI ŽIVOTINJSKI MODEL.....6

4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA BRADFORD METODOM 7

4.3. WESTERN BLOT.....10

4.3.1. BLOKIRANJE MEMBRANE I INKUBACIJA S PROTUTIJELIMA.....11

4.3.2. KEMILUMINISCENCIJSKA DETEKCIJA.....12

4.3.3. ISPIRANJE VEZANIH PROTUTIJELA S MEMBRANE.....12

4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....13

5. REZULTATI.....14

6.RASPRAVA.....16

7. ZAKLJUČAK.....18

8. SAŽETAK.....19

9. SUMMARY.....20

10. LITERATURA.....21

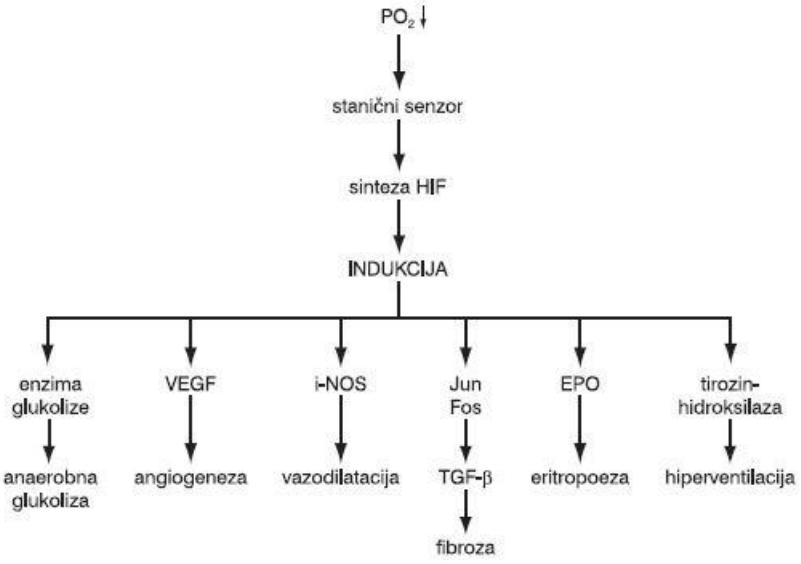
11. ŽIVOTOPIS.....23

1.UVOD

Trenutno je u svijetu barem 970 milijuna ljudi s povišenim krvnim tlakom (hipertenzijom). U razvijenim zemljama oko 330 milijuna ljudi ima hipertenziju, kao i oko 640 milijuna ljudi u zemljama u razvoju. Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO) ocijenila je hipertenziju kao jedan od vodećih uzroka prerane smrti širom svijeta te je taj problem u porastu. Procjenjuje se da će 2025. biti oko 1.56 milijardi odraslih osoba s visokim krvnim tlakom (1).Visoki unos soli poznati je čimbenik rizika za razvoj hipertenzije te je uzročno povezan s razvojem endotelne disfunkcije. Mehanizmi poremećaja reaktivnosti krvnih žila s unosom soli su djelomično poznati, ali nije jasan signalni put. S obzirom na svoje ciljne gene, čiji enzimski produkti su u podlozi endotelne disfunkcije, transkripcijski čimbenik HIF-1 alfa ima važnu ulogu. HIF-1 alfa (hypoxia-inducible factor-1 alpha) glavni je transkripcijski čimbenik adaptivnog odgovora na hipoksiju.Pod hipoksičnim uvjetima aktivira transkripciju gena koji pomažu stanici da se prilagodi na novonastale uvjete.Ciljni geni su mu eritropoetin, transporteri glukoze, glikolitički enzim, VEGF (vascular endothelial growth factor), HILPDA (hypoxia inducible lipid droplet associated) i drugi geni čiji proteinski produkti povećavaju dopremu kisika ili olakšavaju metaboličku prilagodbu na hipoksiju. Također igra važnu ulogu u embrionalnoj vaskularizaciji, tumorskoj angiogenezi i patofiziologiji ishemične bolesti(2).

1.1. HIF-1 alfa

HIF je heterodimerni protein sastavljen od alfa podjedinice koja je regulirana od strane kisika i konstitutivno izraženu beta podjedinicu. Alfa podjedinice budu degradirane tijekom normoksije uglavnom preko proteasom ovisnog puta nakon hidroksilacije dvaju prolinskih ostataka preko prolil-hidroksilaza (PHD) (3). Tijekom hipoksije, HIF se veže za specifične pobuđivače brojnih gena i potiče njihov izražaj. U svim stanicama potiče sintezu glikolitičkih enzima i time anaerobnu glikolizu, u endotelnim stanicama potiče sintezu žilnog čimbenika rasta (VEGF) i angiogenezu te inducibilne sintetaze dušičnog oksida i NOS i vazodilataciju, u bubregu potiče sintezu eritropoetina (EPO) sa susljednom eritropoezom, a u karotidnom tjelešcu potiče sintezu tiroksin hidroksilaze s posljedično povećanom sintezom dopamina i hiperventilacijom. U dugotrajnijoj hipoksiji poticanje izražaja gena Jun i Fos u fibroblastima potiče sintezu transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF-β). Taj potiče umnožavanje fibroblasta i sintezu kolagena s posljedičnom fibrozom hipoksičnog tkiva (slika 1.).



Slika 1. Hipoksični poticaj genskog izražaja (Gamulin, Marušić, Kovač, 2011.)

Poznata je uloga HIF-a u zaštiti bubrega. Korištenje PHD inhibitora kao što su željezni kelatori u modelima transplantacije bubrega, pokazali su da indukcija HIF-1α štiti tubularne stanice od ishemičnog oštećenja (3).

1.2.Učinci prekomjernog unosa soli

Sol, ili natrijev klorid, esencijalna je za život. Zapravo, niti jedan mineral nije nam potrebniji od natrija. Natrij omogućuje živcima primanje i slanje impulsa, pomaže mišićima u radu i čuva stanice i funkcije mozga. Druga komponenta ovog kemijskog spoja, klorid, također ima vrlo važnu ulogu u organizmu. On pomaže u održavanju acido-baznog statusa, pomaže u apsorpciji kalija, poboljšava krvnu sposobnost micanja štetnog ugljičnog dioksida iz tkiva u pluća, te najvažnije, sastavni je dio želučane kiseline koja sudjeluje u razgradnji i probavljanju hrane.Stoga natrijev klorid je nutrijent koji organizam ne može sam proizvesti nego se mora unositi hranom(5).

Unos soli može se izraziti kao unos natrija i to kao masa u gramima ili koncentracija u milimolima (mmol natrija), ili pak kao masa natrijevog klorida(1gnatrijeva klorida= 17,1 mmol natrija ili 393,4 mg natrija; 1 mmol Na = 23 mg Na). Preporučeni dnevni unos soli s obzirom na godine: djeca u dobi 1-3godine trebala bi unositi 2g soli odnosno 0,8g natrija, u dobi 4-6 godina preporučena doza je 3 g soli ili 1,2 g natrija, djeci do 10 godina preporučuje se 5g soli (2,0g natrija), a za odrasle je ta doza do 6 g soli što bi bilo 2,5 g natrija (6). Prekomjeran unos soli ima štetne učinke za cijeli organizam, od kojih su zasad poznati samo neki. Dokazano je da je unos visoke koncentracije soli glavni uzročnik povećanja krvog tlaka,

te shodno tome i glavni uzročnik kardiovaskularnih bolesti(7). Također, povećani unos soli izravno povećava rizik od moždanog udara, hipertrofije lijevog ventrikula i bubrežnih bolesti, povezan je i s prekomjernom težinom, bubrežnim kamencima i osteoporozom (8).

2. HIPOTEZA

Povećan unos soli uzrokovat će povećanu ekspresiju HIF-1alfa transkripcijskog čimbenika.

3.CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi promjene izražajnosti proteina HIF-1 alfa u krvnim žilama štakora, nakon unosa hrane s visokim udjelom soli u usporedbi sa stanjem prije dijete, pomoću molekularne metode Western blot.

4.MATERIJALI I METODE

Ekspresija HIF-1alfa transkripcijskog čimbenika bit će određena korištenjem Western blot metode za određivanje izražajnosti proteina 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 koristit će se krvne žile mozga dvaju životinja.

4.1.EKSPERIMENTALNI ŽIVOTINJSKI MODEL

Korišteni su Sprague-Dawley (SD) muški štakori u dobi od 12 tjedana starosti. Štakori su bili podijeljeni u dvije skupine:skupina 1 (KONTROLA)- zdravi netretirani štakori hranjeni standardnom hranom za male laboratorijske životinje (udio soli 0,4%);skupina 2-(HSD) štakori hranjeni hranom s visokim udjelom soli(4 %) tijekom 7 dana. Korištena je certificirana standardna hrana za laboratorijske životinje proizvođača Mucedola (Mucedola, Italija).

Svi štakori, podijeljeni u skupine prema opisu, uzgojeni su u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku. U starosti od 8 tjedana, bili su prebačeni iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe radi adaptacije na novi prostor kako bi se smanjio stres zbog premještanja. Štakorima iz 2. skupine po navršetku 11 tjedana starosti, standardna hrana (0,4%NaCl, Mucedola, Italija) je zamijenjena hranom s visokim udjelom soli (4%) i njome su bili hranjeni kroz 7 dana. Štakori su izvagani, zatim anestezirani kombinacijom ketamina 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), te ostavljeni kratko vrijeme kako bi započelo djelovanje anestetika. Nakon što je anestetik počeo djelovati, štakori su postavljeni na minijaturnu giljotinu gdje su žrtvovani. Uslijedilo je uzorkovanje krvnih žila mozga pomoću mini pincete i škarica te nekoliko igala kako bi se mozak bolje fiksirao u Petrijevoj zdjelici čije dno je prekriveno voskom i koja je prethodno napunjena hladnom fiziološkom slanom otopinom. Krvne žile mozga su 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 usitnjeni do praha u tekućem dušiku, nakon toga izvagani te dodatno homogenizirani pomoću mehaničkog homogenizatora na 4°C da bi se izbjegla denaturacija proteina u homogenizacijskom puferu te kako bi se stvorila tekuća suspenzija tkiva za centrifugiranje. Dodano je 1ml homogenizacijskog pufera na 100mg usitnjenog tkiva krvnih žila mozga. Homogenizacijski pufer sastojao se od 1 mM EDTA, 10mM Tris, 0,4% SDS, i koktela

inhibitora proteaza (0,4 µl/100µl). Dodan Triton-X, u koncentraciji 0,062% u kojoj ne interferira s Bradfordom, a koncentracija SDS-a se smanjila na 0,1%, da bi određivanje proteina po Bradfordu bilo pravilnije. Koktel inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5ml dH_2O) se također koristila kako bi se spriječila razgradnja proteina. Centrifugranje se odvijalo 30 minuta na 17000 g, 4°C. U svrhu stabilizacije samog transkripcijskog čimbenika HIF-1 alfa, u homogenizacijski pufer dodan je i 1 mmol kobaltovog klorida. Supernatanti su alikvotirani te pohranjeni na -80°C do korištenja.

4.2.ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA BRADFORD METODOM

Dobiveni supernatant podvrgnut je mjerenju koncentracije proteina Bradford metodom u svakom pojedinom uzorku. Korišteni su standardi otopine BSA poznatih koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 i 1,4 mg/ml. Priređene su po dvije replike svakog standarda, a kao slijepa proba koristio se homogenizacijski pufer istog sastava kao i pufer u kojem su homogenizirani uzorci. Intezitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom proporcionalan je koncentraciji proteina, a mjeren je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm.

Stock otopina BSA je pripremljena otapanjem 100 mg BSA (*bovine serum albumin*) u 10 ml destilirane vode (10 mg/ml). Pripremljena Stock otopina BSA pohranjena je na -20°C u alikvotima od 1 ml. Nakon odmrzavanja, korištena je za pripremu standarda. Korišten je gotovi Bradfordov reagens.. Standardna krivulja napravljena je uz pomoć standarda BSA poznate koncentracije kako bi se odredila koncentracija nepoznatih uzoraka, pomoću mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 595 nm. Uzorci krvnih žila mozga iz dvaju životinja iste skupine štakora, zajedno su homogenizirane tako da je svaki od krvnih žila mozga tvorio tzv. „pool“ proteina kako bi ukupna količina proteina bila dovoljna za provođenje Western blot analize. Priređeni su standardi koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 i 1,4 mg/ml koji su naneseni na mikrotitarsku pločicu, za usporedbu njihove apsorbancije s apsorbancijom nepoznatih uzoraka. Svi standardi su pripremljeni u replikama. Nulta proba korištena je kao kontrola za poravnavanje spektrofotometra na vrijednost apsorbancije 0.Volumen uzorka nepoznate koncentracije, koji se nanosi na mikrotitarsku pločicu, također je bilo potrebno prilagoditi tako da se izmjerena apsorbancija nalazi unutar intervala koji je izmjeren za uzorke BSA poznate koncentracije, korištene za izradu baždarne krivulje. Nakon pripreme standarda, u ostale jažice dodan je ekstrakt proteina nepoznate koncentracije u različitim volumenima (slika 2.).

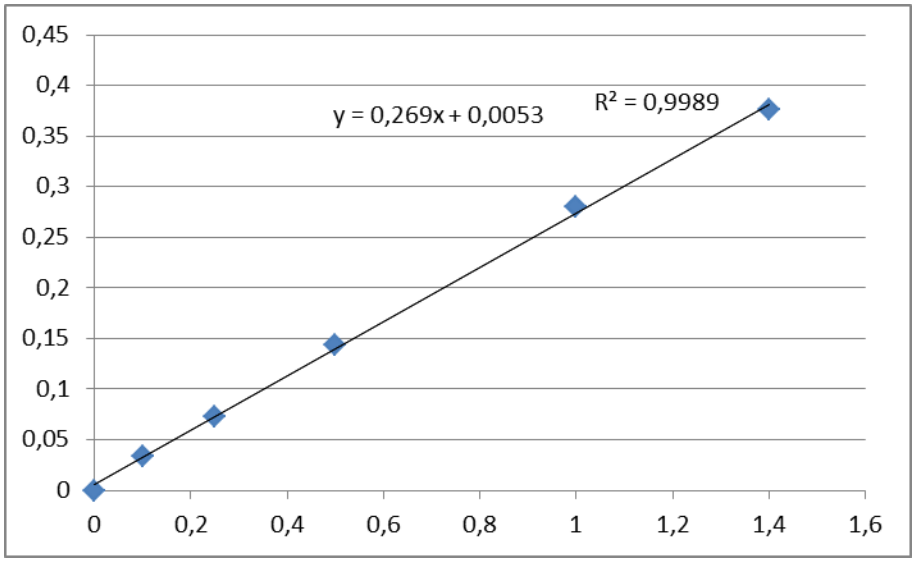


Slika 2. Mikrotitarska pločica za mjerenje koncentracije proteina Bradford metodom.

Neposredno prije mjerenja apsorbancije, u svaku jažicu dodano je 250µl Bradfordovog reagensa dok je u zadnje četiri jažice dodan čisti reagens. Do reakcije dolazi vrlo brzo pa se unutar 10 minuta, od dodavanja reagensa, mjeri apsorbancija. Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitarskih pločica (slika 3.) na valnoj duljini 595 nm.



Slika 3. Mikrotitarski čitač



Slika 4. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije i apsorbancije

4.3. WESTERN BLOT

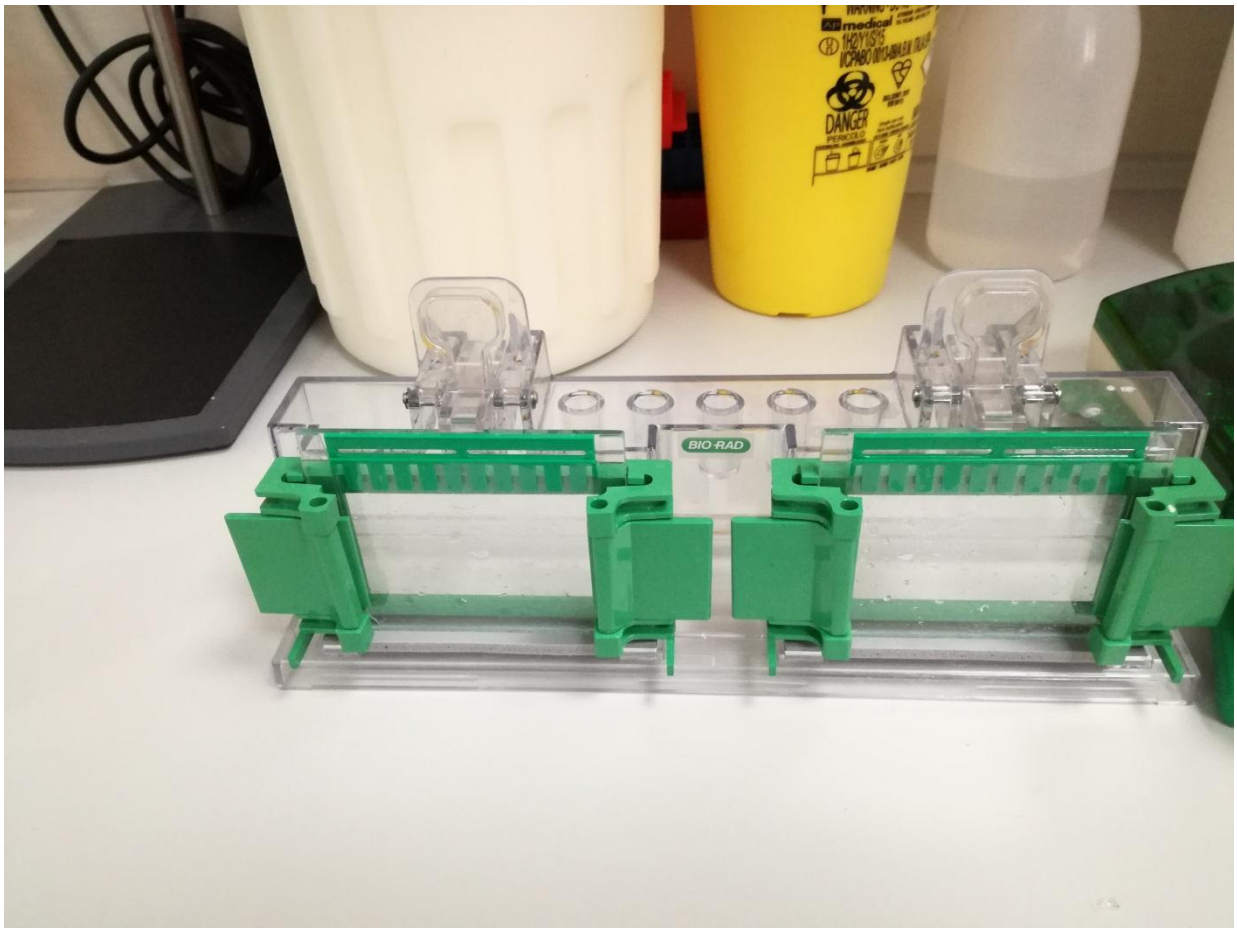
Western blot je metoda razdvajanja proteina djelovanjem električnog polja na temelju njihove molekulske mase. Određena masa ukupnih staničnih proteina (denaturiranih ili u nativnoj konformaciji) nanosi se na poliakrilamid gel na kojem se pod utjecajem struje određenog napona razdvajaju tako da proteini manje mase putuju brže, a veće mase sporije. Tako razdvojeni proteini s gela se prebacuju na membranu pod utjecajem električne struje određene jakosti na kojoj se fiksiraju. Proteini od interesa ili njihova modifikacija, konačno se detektiraju vezanjem specifičnih antitijela koja uz dodatak supstrata emitiraju svjetlost (kemiluminiscencija), a ti signali se registriraju uz pomoć digitalne kamere ili na rengenskom filmu (RTG).

Uzorci su pripremljeni tako da su najprije žile mozga usitnjene u tekućem dušiku, nakon toga prebačene u eppendorf tubicu, tkivo je izvagano i dodan je homogenizacijski pufer u omjeru 1ml pufera na 100mg tkiva. Uzorci su zatim centrifugirani na 17000g 30 min i supernatant je alikvotiran i čuvan na -80 do analize. Jedan alikvot je iskorišten za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu koristeći BSA kao standard. Uzorci su prije nanošenja na gel prokuhani s Laemmli puferom u omjeru 1:1.

Nakon pripremljenih otopina za donji i gornji poliakrilamidni gel, stakla su složena i postavljena na postolje za izlijevanje gelova(slika 5.) Prvo se pripremi 10%-tni donji gel (gel za razdvajanje) koji odgovara veličini proteina te se izlijeva do razine ispod donjeg ruba češljića za jažice koji nam služi kao granica do koje se izlijeva donji gel. Gel se nadsvodi izopropanolom da se blokira kontakt sa zrakom koji bi spriječio polimerizaciju. Za vrijeme polimeriziranja donjeg gela, koje traje oko 45min, pripremljen je 4%-tni gornji gel (gel za sabijanje), potom se on izlijeva i polimerizira oko 1-1.5h. Nakon polimerizacije, sustav za elektroforezu postavljen je u kadicu koja je napunjena prethodno pripreljenim puferom (10x Stock, pH 8.3). Pufer mora prekrivati jažice, češljić se pažljivo uklanja, a jažice se dobro ispiru puferom za elektroforezu kako bi se uklonio nepolimerizirani akrilamid. Nakon toga počinje se nanositi uzorak zajedno s puferom za nanošenje uzoraka na gel, oko 5 do 10 µl po jažici. Elektroforeza je provođena na 100V, oko 3h, na 4 °C.

Prethodno pripremljen pufer za prijenos proteina na membranu potrebno je ohladiti na 4 °C, namočiti spužvice zajedno s filter papirima i PVDF membranom koja je prethodno aktivirana metanolom. Nakon što je elektroforeza završila, stakla su izvađena, gornji gel

uklonjen, a donji gel s proteinima se pažljivo prenosi u posudu s hladnim puferom za prijenos. Na bijeli šupljikavi okvir postavljena je spužvica, filter papir, te PVDF membrana. Na PVDF membranu položen je donji gel, filter papir i spužvica te je cijela struktura pričvršćena crnim šupljikavim okvirom. Preko svakog sloja potrebno je prijeći valjkom radi uklanjanja mjehurica zraka. Transfer se provodio 2h na 200 mA, 4°C. Po završetku, membrana se bojila u Amido-BlueBlack boji nekoliko sekundi, a potom je odmah prebačena u otopinu za odbojavanje.



Slika 5. Postavljanje sustava za polimeriziranje gelova za elektroforezu

4.3.1. BLOKIRANJE MEMBRANE I INKUBACIJA S PROTUTIJELIMA

Nakon odbojavanja, membrana je isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu 2x po 15 min. Nakon ispiranja, membrana je blokirana u 4%-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu s dodatkom 1% BSA, 2h na sobnoj temperaturi tresilica. Blokiranje reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Ukoliko se membrana previše blokira, može doći do redukcije signala, a ukoliko se premalo blokira, dolazi do jakog pozadinskog obojenja. Po završetku blokiranja, membrana je inkubirana primarnim

protutijelima u otopini za primarna protutijela (3%). Stavlja se 2 ml otopine po membrani, a inkubacijski pufer za primarna protutijela sastoji se od bezmasnog mlijeka u prahu i TBST-a. Membrana se inkubirala u primarnim protutijelima preko noći na 4 °C na rotary shakeru, a zatim i na sobnoj temperaturi 2h. Membrana je isprana u TBST-u 4x po 15 min. Korišteno je zečje protu-štakorsko HIF-1α protutijelo u razrjeđenju 1:1000 (Thermo Scientific)

Nakon toga membrana je inkubirana sekundarnim protutijelima koja se otapaju u otopini za sekundarna protutijela, a inkubacija traje 2h na sobnoj temperaturi na rotary shakeru. Korišteno je kozje protu-zečje sekundarno protutijelo HRP (eng.horse radish peroxidase), obilježeno u razrjeđenju 1:10000. Tijekom inkubacije sa sekundarnim kozjim protutijelima usmjerenim na Fc fragment mišjih protutijela, dodana su i streptaktinska protutijela za detekciju *Strep-Tag* aminokiselinske sekvence koju sadrže proteini poznate molekulske mase, konjugirana s peroksidazom iz hrena kako bi se i proteinski standard prenio na film i detektirao, na isti način, kao i traženi proteini. Nakon inkubacije membrana je isprana 4x po 15 min u TBST puferu.

4.3.2. KEMILUMINISCENCIJSKA DETEKCIJA

Nakon ispiranja, membrana je lagano obrisana i na nju je primijenjen kemiluminiscenscijski reagens te je inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi. Supstrat s kojim će reagirati peroksidaza iz hrena (HRP), pripremi se miješanjem komponenti A (luminol) i komponente B u omjeru 100:1.

U prisutnosti vodikovog peroksida, HRP katalizira oksidaciju cikličkog diacilhidrazida kao što je luminol. Pritom se stvara aktivirani intermedijarni reakcijski produkt, radikal luminola (endoperoksid) koji se vraća u primarno stanje (3-aminoftalatni ion) tako što emitira svjetlost. Jako pojačanje emisije svjetlosti proizvodi se 4-jodofenolom koji služi kao medijator prijenosa elektrona. Nakon inkubacije, uklonjen je višak kemiluminiscencijskog reagensa, membrana je stavljena između dvije folije da se ne posuši, a mjehurići zraka su istisnuti. Membrane su postavljene u kazetu, učvršćene, te je u potpunom mraku u kazetu stavljen radiološki film. Membrane su snimljene na Odjelu za radiologiju, u Kliničkoj bolnici, Osijek. Ekspozicija je trajala 15 s, 30 s, 1 min i 5 min.

4.3.3. ISPIRANJE VEZANIH PROTUTIJELA S MEMBRANE

Po završetku ekspozicije, membrana je dvaput isprana 2x 5 min u TBST puferu te je čuvana na 4 °C.Membrana se može upotrijebiti za detekciju nekog drugog proteina s novim protutijelom. Ako novi protein, čiju ekspresiju želimo provjeriti, nije u istom rangu kDa kao

prethodni, nije potrebno uklanjati protutijela niti ponovno blokirati membranu, već se direktno može staviti na inkubaciju u željenom protutijelu. Međutim, kada su istraživani proteini u blizu po rangovima kDa, tada se membrana tretira s puferom za skidanje protutijela kako bi se uklonila sva vezana protutijela, 2-5 minuta, te ispere 10 minuta u TBST puferu.

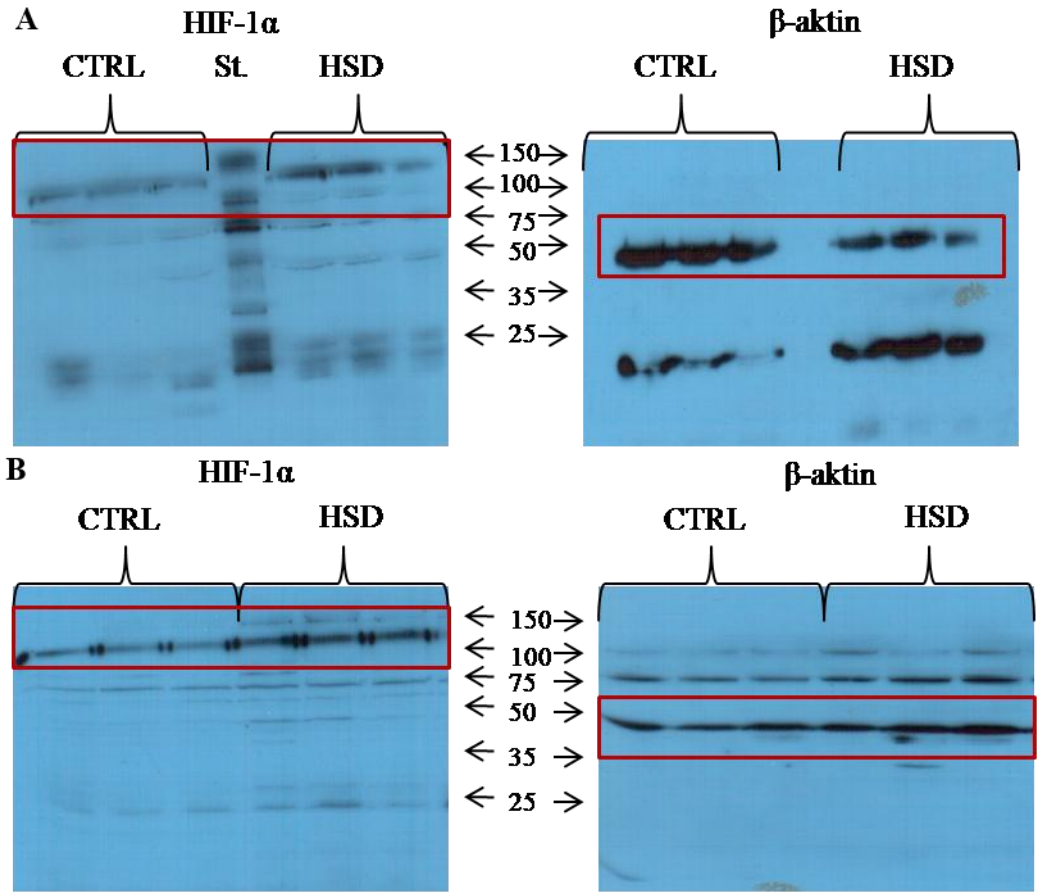
Za kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju, određena je i koncentracija β-aktina (42 kDa). Beta aktin je jedan od visoko konzerviranih proteina u eukariotskim stanicama i zato se koristi kao kontrola u Western blot metodi. Korišteno je mišje protu-štakorsko β-aktin primarno protutijelo u razrjeđenju 1:1000 te sekundarno kozje protu-mišje protutijelu u razrjeđenju 1:10000.

4.4. STATISTIČKA ANALIZA

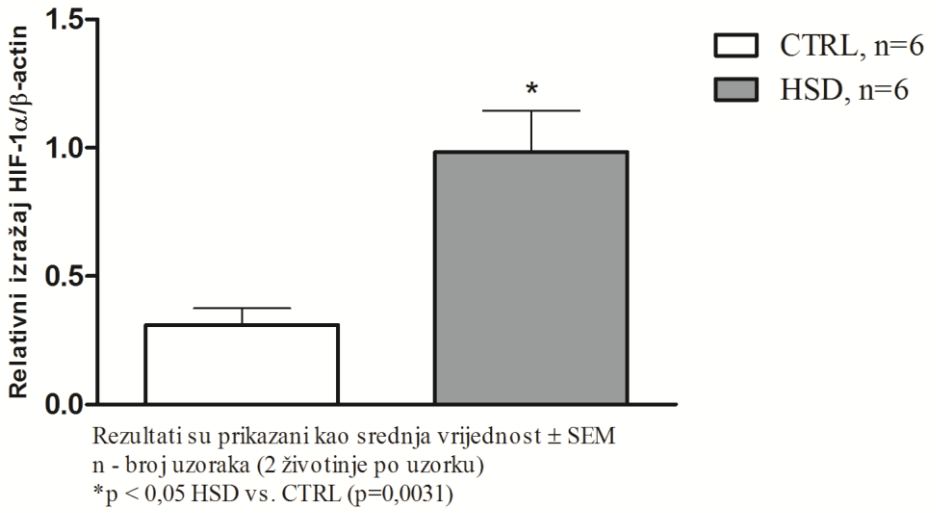
Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost± srednja vrijednost pogreške (eng. Mean±SEM). Utvrđivanje međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli, između dviju nezavisnih grupa, koristio se Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitney U test. Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA) i GraphPadInstat i GraphPadPrism, verzija 5.00 za Windows, GrafPad Software (San Diego, CA, USA).

5. REZULTATI

Dobiveni rezultati prikazuju povećan izražaj HIF-1α u HSD skupini u usporedbi s CTRL skupinom.



Slika 6. Izražaj HIF-1α i β-aktina u uzorcima 1-3 (A) i 4-6 (B) krvnih žila mozga uz ekspoziciju od 1 minute. Slike su napravljene na RTG filmovima na Odjelu za dijagnostičku I interventnu radiologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek koristeći metodu kemiluminiscencije. Ciljani protein su bili HIF-1α veličine 130kDa i β-aktin veličine oko 45kDa.



Slika 7. Relativni izražaj HIF-1α u uzorcima krvnih žila mozga zdravih životinja na standardnoj prehrani (CTRL) i životinja koje su kroz 7 dana jele hranu s povišenim udjelom natrijevog klorida (HSD). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. n predstavlja broj uzoraka, pri čemu su jedan uzorak činile krvne žile mozga dvaju životinja

6. RASPRAVA

Natrijev klorid namirnica je potrebna za optimalno funkcioniranje organizma. Kao što manjak unosa dovodi do teških posljedica, također je poznat niz poremećaja prouzrokovan pretjeranim unosom iste. Jedna od učestalijih poznatih posljedica prekomjernog unosa kuhinjske soli je i hipertenzija koja dovodi do endotelne disfunkcije, međutim, do sada, signalni put samog tog događaja je nepoznat. Smatra se da u tom stanju veliku ulogu igra transkripcijski čimbenik HIF-1 alfa koji reagira na razna stanja kada organizam nije u homeostazi, te na svaki oksidacijski stres. Prijašnja istraživanja pokazala su da prekomjerni unos kuhinjske soli uzrokuje povećanje oksidativnog stresa što posljedično može utjecati i na izražaj HIF-1α (11-15). Stoga je svrha ovog završnog rada bila, odrediti utjecaj kratkotrajnog unosa visokih koncentracija kuhinjske soli na izražaj HIF-1 alfa transkripcijskog faktora u uzorcima krvnih žila mozga, ali i uhodati metodu za određivanje istog. Utvrđen je odgovarajući protokol za Western blot, uz optimalan način izolacije proteina, optimalno vrijeme i uvjete elektroforeze, prijenos proteina na PVDF membranu i vrijeme i način blokiranja iste, također utvrđena su i razrjeđenja primarnih i sekundarnih protutijela u svrhu detekcije HIF-1 alfa proteina, kako je opisano u metodama. Taj protokol može se koristiti i u svrhu istraživanja nekih drugih proteina. U našem istraživanju dobiven je rezultat koji je omogućio analizu razlike ekspresije HIF-1 alfa proteina između dvije skupine Sprague Dawley (SD) štakora. Proteinske pruge dobivene na RTG filmovima metodom kemiluminiscencije, govore u prilog uspješnog eksperimentalnog rada s obzirom da su dobro vidljive pruge β-aktina (45 kDa)koji nam je služio kao kontrola s obzirom na svoju visoku konzerviranost u stanicama. Također, vidljivo je da je ciljani protein HIF-1 alfa (130 kDa) izraženiji kod skupine štakora na kojima je bila primijenjena hrana za životinje (proizvođač: Mucedola, Italija) s povišenim udjelom soli 4% natrijevog klorida,nego kod druge skupine štakora koji su bili na standardnoj hrani istog proizvođača sa 0,4% natrijevog klorida. Statističkom analizom napravljenom pomoću studentovog t-testa, s obzirom da je dobivena pravilna raspodjela rezultata, dobiven je p=0,0031 koji nam ukazuje na statistički značajnu razliku između naših dviju skupina štakora.Nema puno podataka o izražaju i ulozi HIF-lα i njegovih ciljanih gena pri visokim koncentracijama soli u krvnim žilama. Prethodne studije koje povezuju utjecaj visokih koncentracija soli i transkripcijskog faktora HIF-1α, temelje se na promjenama koje se odnose na utjecaj soli na modifikaciju HIF-lα u bubrezima. Li sa suradnicima prikazao je značajno povećan izražaj u bubrežnoj arteriji i dokazao da su razine HIF-lα značajno povećane visokim unosom soli (16). Pretpostavlja se da je regulacija gena posredovana HIF-1α u bubrezima, važan molekularni adaptivni mehanizam kao odgovor na

visok unos soli i ima ključnu ulogu u održavanju razine natrija. Prema našem znanju, nitko nikada nije istraživao ekspresiju tih gena u središnjem modelu cerebralne arterije u uvjetima akutne koncentracije visoke soli. Nekim nedavnim istraživanjima, kojima je proučavan oksidativni stres na žilama mozga štakora iste vrste, nije uočeno povećanje izražajaHIF-1 alfa mRNAuslijed povećanja unosa soli u trajanju od tjedan dana te je pretpostavljeno da spomenuti protein reagira tek nakon dužeg izlaganja visokoslanoj dijeti (17). Razlike u izražaju mRNA i proteina mogu proizaći iz kratkog poluživota mRNA molekula, ali i dužeg životnog vijeka, posttranslacijskih modifikacija i stabilizacije proteina. Također, na staničnom modelu Hep3B pokazano je da izražaj mRNA ne prati povećanje u izražaju proteina tijekom izlaganja hipoksičnim uvjetima (18). Uzimajući u obzir dobivene rezultate, hipoteza ovog rada je potvrđena te je dokazano da povećanje unosa soli dovodi do povećanog izražaja transkripcijskog čimbenika HIF-1 alfa u krvnim žilama. Rezultati ovog istraživanja mogu se koristiti za daljnje istraživanje same endotelne disfunkcije, prouzrokovane prekomjernim unosom natrijeva klorida.

7. ZAKLJUČAK

Dijeta s visokim udjelom soli tijekom 7 dana dovodi do značajnog povećanja u izražaju HIF-1α u moždanim krvnim žilama Sprague-Dawley štakora.

8. SAŽETAK

Ključne riječi: visoko slana dijeta, Western blot, HIF-1 alfa

Cilj: Pomoću odgovarajućeg Western blot protokola, utvrditi razliku u ekspresiji ciljanog proteina HIF-1 alfa u krvnim žilama mozga, između skupine Sprague Dawley štakora na standardnoj dijeti i onih kojima smo povisili udio soli u prehrani.

Materijali i metode: Zdravi muški SD štakori starosti 11 tjedana hranjeni su standardnom hranom (0,4% NaCl, CTRL grupa) ili hranom s 4% NaCl (HSD grupa) kroz tjedan dana. U uzorcima krvnih žila mozga western blot metodom, određen je izražaj HIF-1α proteina u uzorcima krvnih žila mozga.

Rezultati: Izražaj HIF-1α proteina statistički je značajno povećan (p=0,0031) u HSD skupini u odnosu na CTRL.

Zaključak: Visoki unos soli uzrokuje povećanje izražaja HIF-1α proteina u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora.

9. SUMMARY

THE SHORT-TERM SALT DIET'S EFFECT ON THE FEATURE OF THE HIF1-ALFA IN THE BLOOD VESSELS OF RATS

Key words: high salt diet, Western blot, HIF-1 alpha

Aim: To determine the difference in the feature of the target HIF-1 alpha protein in the brain blood vessels between the group of Sprague Dawley rats on the standard diet and those to which we increased the salt portion in the diet, using the appropriate Western blot protocol.

Materials and Methods: Healthy male SD rats, 11 weeks of age, have been fed with standard food (0.4% NaCl, CTRL group) or food with 4% NaCl (HSD group) for a week. The feature of the HIF-1α protein in brain blood vessel samples has been determined by the usage of the Western blot method.

Results: The feature of the HIF-1α protein has statistically been significantly increased ($p = 0.0031$) in the HSD group compared to the CTRL.

Conclusion: High salt intake causes the increased feature of the HIF-1α protein in the brain blood vessels of Sprague-Dawley rats.

10. LITERATURA

1. World Heart Federation. Stroke and hypertension. Dostupno na adresi: http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/hypertension/
Datum pristupa: 08.05.2017.

2. Cell Metabolism. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Dostupno na stranici: http://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(06)00060-X?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS155041310600060X%3Fshowall%3Dtrue
Datum pristupa: 08.05.2017.

3. Plos One. Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 Alpha) Is Induced during Reperfusion after Renal Ischemia and Is Critical for Proximal Tubule Cell Survival. Dostupno na stranici: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033258
Datum pristupa: 08.05.2017.

4. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici, Patofiziologija. 7. izd., Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

5. Salt Institute. The dangers of a low salt diet. Dostupno na adresi: http://www.saltinstitute.org/2015/09/18/the-dangers-of-a-low-salt-diet/
Datum pristupa: 09.05.2017.

6. Reiner Ž, Pećin I, Stupnjak B. Nacionalni program smanjenja konzumiranja soli u Hrvatskoj. Dostupno na stranici: http://www.amzh.hr/pdf/kvz2008/03%20Reiner%20-%20Nacionalni%20program%20smanjenja%20unosa%20soli%20u%20Hrvatskoj.pdf
Datum pristupa: 09.05.2017.

7. Yuan Ma, Feng J. He, Graham A. MacGregor. High Salt IntakeIndependent Risk Factor for Obesity? Dostupno na stranici: http://hyper.ahajournals.org/content/hypertensionaha/early/2015/08/03/HYPERTENSIONAHA.115.05948.full.pdf
Datum pristupa: 09.05.2017.

8. ScienceDirect. Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. Dostupno na stranici: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033062009001273
Datum pristupa: 08.05.2017.

9. Uniprot. HIF1A – Hypoxia-inducible factor 1-alpha – Homo sapiens (Human) – HIF1A gene & protein. Dostupno na adresi: http://www.uniprot.org/uniprot/Q16665 Datum pristupa: 08.05.2017.

10. Lombard JH, Frisbee JC, Roman RJ, Falck JR. 2004. Evaluation of Cytochrome P450-4A ω Hydroxylase and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid as an O2 Sensing Mechanism in the Microcirculation. Methods in Enzymology, Oxygen Sensing 381: pp. 140-165.

11. Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Novak, Sanja; Vuković, Rosemary; Drenjančević, Ines.Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short- term high salt diet. // The Journal of Physiology. 594 (2016) , 17; 4917-4931

12. Drenjancevic-Peric I & Lombard JH (2005). Reduced Angiotensin II and Oxidative Stress Contribute to Impaired Vasodilation in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. Hypertension. 45:687-691.

13. Durand MJ, Lombard JH (2013). Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase expression. Am J Hypertens. 26(6):739-747.

14. Lenda DM & Boegehold MA (2002). Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. J Vasc Res. 39:41–50.

15.Verma S, Anderson TJ (2002). Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. Circulation 105:546-549.

16. Li N, Chen L, Yi F, Xia M, Li PL.Salt-Sensitive Hypertension Induced by Decoy of Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha in the Renal Medulla. Circ Res. 2008;102:1101–8.

17. Ćosić, Anita. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora. (disertacija) Dostupno na stranici: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:300285
Datum pristupa: 06.09.2017.

18. Wenger RH1, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. Kidney Int. 1997 Feb;51(2):560-3.

11. ŽIVOTOPIS

KARLA GRGIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 30. lipanj 1995. godine, Osijek

Kontakt:

- karla.karliic@gmail.com

Obrazovanje:

- 2010.-2014. Prirodoslovno-matematička gimnazija Osijek
- 2014.-2017. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku