

**EFEKTI AKUTNE PRIMENE LOSATRANA, ANTAGONISTA ANGIOTENZIN II TIP 1 RECEPTORA, NA HEMODINAMIKU I PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA U MODELU MALIGNNE HIPERTENZIJE PACOVA\*****THE EFFECTS OF ACUTE ADMINISTRATION OF LOSARTAN, ANGIOTENSIN II TYPE-1 RECEPTOR ANTAGONIST, ON HEMODYNAMICS AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN MALIGNANT HYPERTENSIVE RATS**

Natalija Bogunović, Zoran Miloradović, Đurđica Jovović, Nevena Mihailović-Stanojević, Milan Ivanov, Una Jovana Vajić, Danijela Karanović, Jelica Grujić-Milanović\*\*

*Maligna hipertenzija predstavlja posebno težak oblik hipertenzije čija patogeneza nije u potpunosti razjašnjena. Cilj naše studije bio je ispitivanje uloge Angiotenzina II (Ang II) u regulaciji hemodinamskih i parametara oksidativnog stresa u modelu maligne hipertenzije. Mužjaci odraslih pacova su podeljeni u tri grupe: normotenzivne Wistar pacove, kontrolne hipertenzivne (SHR) i losartanom tretirane hipertenzivne pacove (SHR+LOS). Kontrolna i SHR grupa su primile po jednu bolus dozu fiziološkog rastvora, dok je SHR+LOS grupa primila losartan, receptorni blokator Ang II. Nakon toga su mereni krvni pritisak, minutni volumen srca (MV), karotidni protok krvi (KPK) i određivani odgovarajući otpori: ukupni periferni otpor (UPO) i karotidni vaskularni otpor (KVO). Parametri oksidativnog stresa: aktivnost katalaze (CAT), aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i marker lipidne peroksidacije (TBARS) su određivani iz uzoraka krvi. Tretman losartanom je značajno snizio vrednost krvnog pritiska. Nije došlo do značajnih promena vrednosti MV ni KPK, ali je tretman losartanom doveo do smanjenja UPO i KVO. U ovoj grupi je uočena tendencija povećanja aktivnosti SOD ka vrednostima normotenzivnih životinja, ali nije bilo promena u vrednostima CAT i TBARS. Naši rezultati pokazuju*

\* Rad primljen za štampu 23.12.2015.

\*\* Natalija Bogunović, master biol.; dr sc. biol. Zoran Miloradović, naučni savetnik; dr sc. med. Đurđica Jovović, naučni savetnik; dr sc. biol. Nevena Mihailović-Stanojević, naučni savetnik; dr sc. biol., Milan Ivanov, naučni saradnik; Una Jovana Vajić, dipl. ing. tehnol., istraživač saradnik; Danijela Karanović, dipl. biol., istraživač saradnik; dr sc. biol. Jelica Grujić-Milanović\*, viši naučni saradnik; Grupa za Kardiovaskularna Istraživanja, Laboratorija za Eksperimentalnu Hipertenziju, Institut za Medicinska Istraživanja Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

*da jednokratna aplikacija losartana ima snažan hipotenzivni efekat i da Ang II igra značajnu ulogu u mehanizmima maligne hipertenzije, delimično preko antioksidativnog delovanja.*

*Ključne reči: losartan, maligna hipertenzija, hemodinamika, oksidativni stres*

#### **Uvod / Introduction**

Esencijalna hipertenzija je heterogen poremećaj, okarakterisan dugoročno povišenim sistolnim arterijskim pritiskom (SAP) iznad 140 mmHg i dijastolnim arterijskim pritiskom (DAP) višim od 90 mmHg (Vikrant i Tiwari, 2011). Sindrom maligne hipertenzije predstavlja naročito težak oblik hipertenzije (SAP>200; DAP>130 mmHg) (Bender i sar., 2010). Zbog oštećenja organa, kao što su lezije na bubrezima i krvnim sudovima, prisutna je visoka stopa smrtnosti u ranim fazama ove bolesti, što otežava postavljanje dijagnoze i razvoj adekvatne terapije. Često fatalan ishod je moguć već tokom prve godine, ukoliko se bolest ne leči (Ahmed i sar., 2014).

Pacovi sa urođenom hipertenzijom (engl. spontaneously hypertensive rats-SHR) se odlikuju sličnim progresivnim tokom hipertenzije i prehipertenzivnom fazom kao i pacijenti, zbog čega predstavljaju dobre modele za studije visokog krvnog pritiska (Doggrell i Brown, 1998). Životinje sa malignom hipertenzijom mogu biti selekcionisane u sukcesivnim generacijama SHR radi proučavanja ovog patološkog stanja (Okamoto i sar., 1991).

Renin-angiotezin sistem (RAS) igra značajnu ulogu u brojnim poremećajima, uključujući hipertenziju. Renin oslobođen iz oštećenih bubrega dovodi do povećanog lučenja Angiotezina II (AngII), a samim tim i aldosterona, što uzrokuje značajan porast krvnog pritiska i pojavu maligne hipertenzije (Laragh, 2001). Pojačana stimulacija efektornih receptora za AngII tipa 1 (AT1 receptori), posledica je povišene aktivnosti RAS i povišenog nivoa AngII (Xu i sar., 2009). Losartan, nepeptidni antagonist AT1 receptora, specifično deluje vezujući se za preglomerularne i postglomerularne arteriole, što je praćeno sniženjem pritiska u glomerulu (Xu i sar., 2009).

Brojne studije su pokazale da oksidativni stres igra značajnu ulogu u patogenezi različitih kardiovaskularnih komplikacija izazvanih hipertenzijom (Lassègue i Clempus, 2003). AngII, vezivanjem za AT1 receptore stimuliše različite signalne puteve i promovise formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, eng.). Esencijalna hipertenzija je često povezana sa povišenim stepenom lipidne peroksidacije i promenama u oksidativnom statusu, implicirajući time da oksidativni stres igra značajnu ulogu i u patogenezi esecijalne hipertenzije (Russo i sar., 1998). Cilj naše studije je bio ispitivanje uloge AngII u regulaciji hemodinamskih i parametara oksidativnog stresa u eksperimentalnoj malignoj hipertenziji.

## **Materijal i metode rada / *Material and methods***

U eksperimentu su korišćeni odrasli pacovi Wistar i SHR sojeva, muškog pola, prosečne telesne mase oko 300 g, odgajani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Životinje su hranjene standardnom hranom za laboratorijske životinje (Veterinarski zavod, Subotica, Srbija). Korišćene su samo jedinke sa dijastolnim pritiskom višim od 130 mmHg, što se smatra graničnom vrednošću za malignu hipertenziju (Bender i sar., 2010). Svi eksperimenti na životinjama su izvođeni u saglasnosti sa Zakonom o dobrobiti životinja ("Sl. glasnik RS", br. 41/2009) i odobrenjem Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (Broj: 323-07-02450/2014-05). Eksperimenti su izvođeni nad životinjama u totalnoj anesteziji. Anestetik, natrijum-pentobarbital (Nembutal) je davan intraperitonealno u dozi od 35 mg/kg telesne mase.

## **Eksperimentalne grupe i dizajn / *Experimental groups and design***

Životinje su bile podeljene u tri eksperimentalne grupe: Prvu grupu normotenzivni pacovi soja Wistar (Wistar, n=7). Druga grupa kontrolni spontano hipertenzivni pacovi SHR (SHR, n=8), treća SHR tretirani losartanom (SHR + LOS, n=8). Pacovi Wistar i SHR grupe su jednokratno primili dozu od 0,2 ml fiziološkog rastvora u bolusu, dok su životinje SHR+LOS grupe primile na isti način dozu losartana (30 mg/kg t.m.) rastvorenog u 0,2 ml fiziološkog rastvora.

## **Hemodinamska merenja / *Haemodynamic measurements***

Sistolni, dijastolni i srednji arterijski pritisak (SAP, DAP i MAP) su mereni kanuliranjem leve femoralne arterije PE-50 kateterom (Clay-Adams Parsippany, NY, USA) i povezani sa uređajem za registraciju hemodinamskih signala (9800TCR Cardiomax III-TCR, Columbus, OH, USA). Merenja su vršena pre davanja bolusa, kao i u 15., 30. i 60. minutu nakon aplikacije.

Karotidni protok krvi (KPK) meren je pomoću ultrazvučne sonde dijametra 1mm (1RB), postavljene oko desne karotidne arterije povezane sa registratorom protoka (Transonic T106 Small Animal Flowmeter, Transonic Sistem Inc., Ithaca, USA). Karotidni vaskularni otpor (KVO) računat je kao količnik srednjeg arterijskog pritiska i karotidnog protoka izražen u mmHg min kg/ml.

Minutni volumen srca (MV) je meren metodom termodilucije. Kanulirana je jugularna vena polietilenskim kateterom PE-50, zatim je ubačen termo senzor u levu karotidnu arteriju i povezan sa Cardiomax III uređajem. Drugi termosenzor, povezan sa istim uređajem, je ubačen u posudu sa hladnim fiziološkim rastvorom. Kroz kateter plasiran u jugularnoj veni, naglo je ubrizgano 0,2 ml hladnog fiziološkog rastvora. Na osnovu promene temperature krvi životinje u jedinici vremena izračunat je MV, koji je zatim izražen u ml/min/kg. Ukupni periferni otpor (UPO) računat je na osnovu odnosa MAP i MV i izražen u mmHg min kg/ml.

### **Biohemijski parametri / *Biochemical parameters***

Nakon hemodinamskih studija, uzorci krvi su uzeti za biohemijsku analizu uz korišćenje Litijum-heparin (Li-heparin, Sigma, USA) kao antikoagulanta. Uzorci krvi su centrifugirani (Ultra centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R), na 4000 obrtaja, na 4°C, tokom 20 min, nakon čega su eritrociti izdvojeni, a uzorci plazme sakupljeni. Istaloženi eritrociti su resuspendovani, a potom centrifugirani još tri puta sa ponovnim odlivanjem supernatanta.

Marker lipidne peroksidacije u plazmi, TBARS (engl. Thiobarbituric acid reactive substances), određivan je upotrebom 2-tiobarbituric kiseline (2,6-dihidropirimidin-2-tiol, TBA). Pomoću koeficijenta ekstinkcije  $156000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , a na osnovu izmerenih vrednosti, izračunat je nivo TBARS i izražen u nmol po mililitru plazme (Ohkawa i sar., 1979).

Koncentracija hemoglobina (Hb) je određivana metodom Drabkina (Drapkin i Austin, 1935). Za spektrofotometrijske analize plazme i eritrocita, korišćen je Ultrospec 3300 pro UV/Visible spectrophotometer, Amersham Biosciences Corp., USA.

Aktivnost superoksid dismutase (SOD) u eritrocitima, određivana je indirektnom metodom (Misra i Fridovich, 1972) koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma c i prikazana je u jedinicama SOD aktivnosti po g hemoglobina (U/g Hg).

Aktivnost katalaze (CAT) u eritrocitima je određena po Beutlerovoj proceduri (Beutler, 1982). Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  u prisustvu katalaze na 230 nm. Aktivnost enzima je izražena u jedinici po gramu hemoglobina (U/g Hb).

### **Statistička analiza / *Statistical analysis***

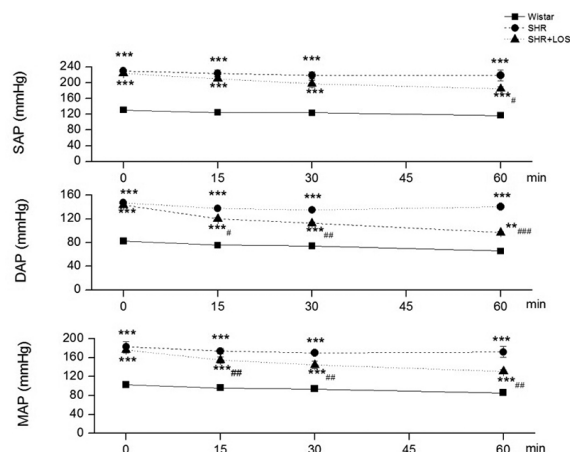
Rezultati našeg eksperimenta su grafički prikazani kao srednja vrednost datog parametra sa standardnom greškom srednje vrednosti. Za obradu rezultata je korišćena jednostepena analiza varijanse (ANOVA). U slučaju da je ANOVA pokazala statistički značajnu razliku, za određivanje stepena značajnosti korišćen je Fišerov test najmanje značajne razlike (LSD, least significant difference, eng.) sa stepenima značajnosti  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Svi dobijeni rezultati su obrađivani upotrebom STATISTICA 10.0 računarskog softvera.

## **Rezultati / *Results***

### **Hemodinamska merenja / *Haemodynamic measurements***

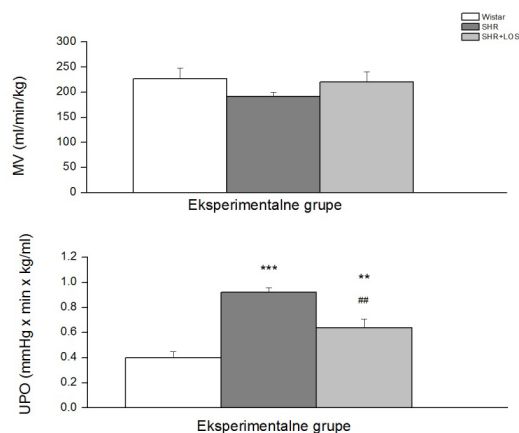
SAP, DAP i MAP su značajno smanjeni u losartanom tretiranoj grupi. Pad pritiska je bio uočljiv već u 15. minutu, a trend pada se nastavio do kraja praćenja (Grafikon 1). Nije zabeležena značajna promena u vrednostima MV kod

eksperimentalnih grupa. UPO je bio značajno povećan kod SHR u odnosu na Wistar grupu. Tretman losartanom je doveo do značajnog smanjenja vrednosti UPO u poređenju sa kontrolnom SHR grupom (Grafikon 2). Nije bilo značajnih promena u vrednostima KPK među eksperimentalnim grupama, dok je tretman losartanom snizio KVO u poređenju sa kontrolnom SHR grupom (Grafikon 3).



**Grafikon 1.** Sistolni (SAP), diastolni (DAP) i srednji (MAP) arterijski pritisak kod eksperimentalnih grupa. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Wistar; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.01$ – vs. netretirani SHR; Wistar-normotenzivni pacovi; SHR-spontano hipertenzivni pacovi; SHR+LOS- spontano hipertenzivni pacovi tretirani losartanom /

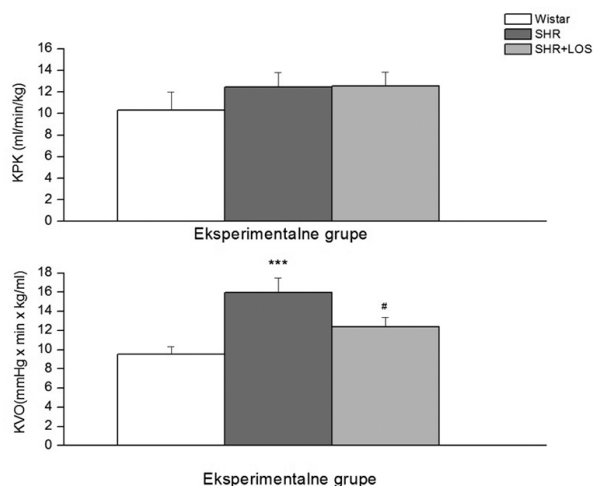
**Graph 1.** Systolic (SAP), diastolic (DAP) and mean (MAP) arterial blood pressure in experimental groups. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Wistar; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.01$ – vs. untreated SHR; Wistar-normotensive rats; SHR-spontaneously hypertensive rats; SHR+LOS- spontaneously hypertensive rats treated with losartan



**Grafikon 2.** Minutni volumen (MV) i ukupni periferni vaskularni otpor (UPO) kod eksperimentalnih grupa. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Wistar; ##  $p < 0.01$  vs. netretirani SHR.

Wistar-normotenzivni pacovi; SHR-spontano hipertenzivni pacovi; SHR+LOS- spontano hipertenzivni pacovi tretirani losartanom /

**Graph 2.** Cardiac output (CO) and total peripheral vascular resistance (TPR) in experimental groups. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Wistar; ##  $p < 0.01$  vs. untreated SHR. Wistar-normotensive rats; SHR- spontaneously hypertensive rats; SHR+LOS- spontaneously hypertensive rats treated with losartan

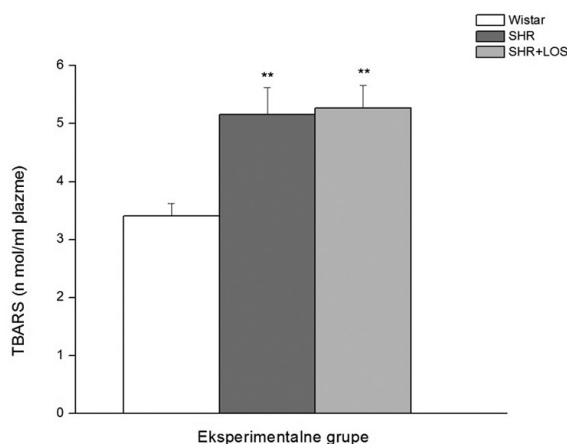


**Grafikon 3.** Protok krvi kroz karotidnu arteriju (KP) i karotidni vaskularni otpor (KVO) kod eksperimentalnih grupa \*\*  $p < 0.01$  vs. Wistar, #  $p < 0.05$  vs. netretirani SHR. Wistar-normotenzivni pacovi; SHR-spontano hipertenzivni pacovi; SHR+LOS- spontano hipertenzivni pacovi tretirani losartanom /

**Graph 3.** Blood flow through carotid artery (CBF) and carotid vascular resistance (CVR) in experimental groups. \*\*  $p < 0.01$  vs. Wistar, #  $p < 0.05$  vs. . untreated SHR. Wistar-normotensive rats; SHR- spontaneously hypertensive rats; SHR+LOS- spontaneously hypertensive rats treated with losartan

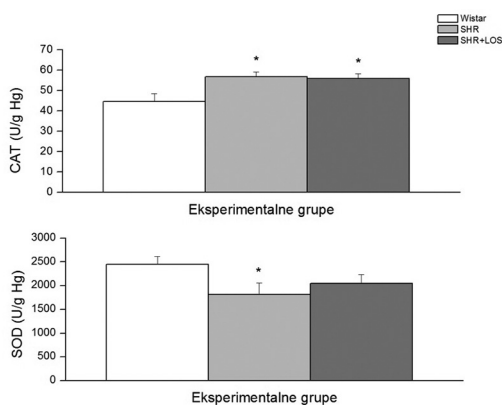
### Biohemijski parametri / Biochemical parameters

Vrednosti TBARS-a u plazmi su bile karakteristično povećane u obe hipertenzivne grupe pacova u poređenju sa Wistar grupom (Grafikon 4), a tretman losartanom nije doveo do promena u odnosu na kontrolnu grupu hipertenzivnih pacova. Postojala je povećana aktivnosti CAT u hipertenzivnim grupama (Grafikon 5). Aktivnost SOD je bila značajno niža kod hipertenzivne grupe pacova, dok je losartan pokazao tendenciju povećanja aktivnosti ovog enzima, približavajući je vrednostima normotenzivne kontrole.



**Grafikon 4.** Nivo TBARS u plazmi kod eksperimentalnih grupa. \*\* $p < 0.01$  vs. Wistar. Wistar-normotenzivni pacovi; SHR-spontano hipertenzivni pacovi; SHR+LOS- spontano hipertenzivni pacovi tretirani losartanom

**Graph 4.** TBARS level in plasma in experimental groups. \*\* $p < 0.01$  vs. Wistar. Wistar- normotensive rats; SHR- spontaneously hypertensive rats; SHR+LOS- spontaneously hypertensive rats treated with losartan



**Grafikon 5.** Aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutase (SOD) kod eksperimentalnih grupa. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar. Wistar-normotenzivni pacovi; SHR-spontano hipertenzivni pacovi; SHR+LOS- spontano hipertenzivni pacovi tretirani losartanom

**Graph 5.** Catalase activity (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in experimental groups.. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar. Wistar- normotensive rats; SHR- spontaneously hypertensive rats; SHR+LOS- spontaneously hypertensive rats treated with losartan

## Diskusija / Discussion

Rezultati naše studije pokazuju značajno povišen SAP, MAP i DAP u obe hipertenzivne grupe, u poređenju sa normotenzivnom kontrolom, što je u skladu

sa literaturnim podacima o eksperimentalnoj malignoj hipertenziji (Okamoto i Aoki, 1963). Akutna aplikacija losartana, selektivnog blokatora AT1 receptora, utiče na hemodinamske i biohemijske parametre kod pacova sa malignom hipertenzijom. Merenja pokazuju značajno smanjenje MAP već 15 minuta nakon aplikacije losartana. Tendencija pada pritiska održava se sledećih 45 minuta, tako da na kraju studije, MAP u grupi tretiranoj losartanom je opao za 40 mmHg od svoje inicijalne vrednosti. Slične rezultate dobio je Nunez-a (Nunez i sar., 1997) kod SHR primenom iste doze losartana u hroničnom tretmanu tokom 12 nedelja došlo je do smanjenja pritiska za 30 mmHg. Početne vrednosti SAP u našoj studiji iznosile su preko 230 mmHg, a posle sat vremena nakon aplikacije opao je za 45 mmHg pa nas dobijeno sniženje navodi na zaključak da AngII ima značajnu ulogu u akutnoj regulaciji SAP i u slučajevima maligne hipertenzije.

Pre administracije losartana, DAP u obe hipertenzivne grupe je bio viši od 130 mmHg, što potvrđuje stanje maligne hipertenzije (Bender i sar., 2010). Vrednost DAP počela je da opada već u 15. minutu nakon primene losartana, i nastavila da opada do kraja prvog sata, što nas navodi na zaključak da AngII igra značajnu ulogu u regulaciji DAP u ovoj formi eksperimentalne maligne hipertenzije. Naš rezultat korelira sa rezultatima kliničke studije Rompa (Rump i sar., 2006) u kojoj je losartan u kombinaciji sa hidrohlorotiazidom (100 mg/hidrohlorotiazida 25 mg) doveo do smanjenja DAP za 16.5 mmHg kod pacijenata sa umerenom hipertenzijom. Rezultati drugih istraživača (Naidoo i sar., 1999) pokazuju da kod pacijenta sa esencijalnom hipertenzijom, posle 12 nedelja tretmana losartanom (100 mg/hidrohlorotiazida 25 mg), DAP je smanjen za 13.7 mmHg, odnosno vraćena je vrednosti pritiska u domen normotenzivnih pacijenata (Naidoo i sar., 1999). Smatramo da naši rezultati, potkrepljeni prethodnim studijama ukazuju na značajnu ulogu AngII u regulaciji DAP, što bi moglo biti od značaja u terapiji dijastolne disfunkcije srčanog mišića.

Humanu esencijalnu hipertenziju karakteriše povišen MAP, ali normalan MV (Mulvany i Halpern, 1977) što rezultuje povišenim UPO. U našoj studiji, MV nije bio značajno različit kod SHR+LOS grupe u odnosu na hipertenzivnu kontrolu. Na osnovu studije Fitzpatricka (Fitzpatrick i sar., 1992), koja tvrdi da losartanom indukovana blokada AT1 receptora ne rezultuje promenom MV, i naših rezultata, možemo pretpostaviti da AngII igra malu ulogu u regulaciji MV u ovom modelu maligne hipertenzije. Takođe, naši rezultati su u skladu sa kliničkom studijom rađenom na pacijentima sa hroničnom esencijalnom hipertenzijom (Frohlich i sar., 1967), u kojoj je zabeleženo povećanje UPO bez obzira na niske vrednosti MV.

Pokazano je da jednogodišnji tretman losartanom (Park i sar., 2000) smanjuje pritisak unutar krvnih sudova, snižava vaskularni otpor i ublažava povećanje rezistentnosti subkutanih arterija kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom. Takođe, istraživanje (Ruzicka i sar., 1994) sprovedeno na pacovima tretiranim losartanom je pokazalo da hronična primena losartana tokom nekoliko nedelja dovodi do smanjenja UPO. Na osnovu ovih studija, a i u skladu sa našim rezultatima, možemo zaključiti da blokada AT1 receptora ima pozitivan efekat na redukciju otpora krvnih sudova u eksperimentalnoj malignoj hipertenziji.



Oksidativni stres je direktno povezan sa progresijom kardiovaskularnih oboljenja. Naime, angiotenzin II aktivacijom enzima NAD(P)H oksidaze direktno povećava produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (RVK), a kao signalni molekuli, nishodno deluju na brojne druge signalne puteve u kardiovaskularnom sistemu (Hitomi i sar., 2007). U našem modelu maligne hipertenzije, oksidativni stres, praćen preko indeksa lipidne peroksidacije, povišen je kod SHR pacova u odnosu na normotenzivnu kontrolu, a nepromenjen je kod hipertenzivnih životinja nakon akutne primene losartana u dozi od 30 mg/kg. Yao i saradnici (Yao i sar., 2007) su u hipertenzivnom modelu, pokazali da dvonedeljna blokada AT1 receptora (losartanom, u dozi od 10 mg/kg) kod SHR-SP pacova snižava nivo lipidne peroksidacije u poređenju sa netretiranim grupama. U studiji (Polizio i sar., 2009) sprovedenoj na Wistar pacovima kod kojih je hipertenzija indukovana ligacijom abdominalne aorte, takođe je pokazano značajno smanjenje vrednosti TBARS nakon 8 dana tretmana losartanom. Izostanak antioksidativnog odgovora u našem modelu mogao bi se pripisati delimično akutnoj prirodi eksperimenta, a takođe i mogućim mehanizmima koji u malignoj hipertenziji povećavaju nivo RVK nezavisno od Ang II.

Kao posledica oksidativnog stresa u našoj studiji, aktivnost CAT u eritrocitima je povišena u obe hipertenzivne grupe u poređenju sa normotenzivnom kontrolom, što je konzistentno sa nalazima prethodnih studija (Kitts i sar., 1998). U studiji Polizia i Pena (Polizio i Pena, 2005) losartan (10 mg/kg) je davan SHR tokom dve nedelje, zapažena je redukovana aktivnost CAT u moždanom tkivu, dok u tkivu jetre i bubrega nije došlo do promene njene aktivnosti. S druge strane, tretman losartanom 16 nedelja je doveo do neznatnog pada aktivnosti CAT kod Sprague-Dawley pacova (Khaper i Singal, 2001). U skladu sa ovim rezultatima, možemo pretpostaviti da aktivnost CAT ima tendenciju smanjenja nakon blokade AT1 receptora, ali da mera efekta, kao i tkivna specifičnost ostaju nedovoljno razjašnjene. Naši rezultati su pokazali da je aktivnost CAT bila povišena u malignoj hipertenziji, ali i da tretman losartanom nije uticao na njenu aktivnost, što bi moglo doprineti povišenoj lipidnoj peroksidaciji kod ove dve grupe životinja.

Aktivnost SOD kod hipertenzivne grupe u našoj studiji je bila snižena u odnosu na Wistar grupu, što je u skladu sa rezultatima Itoa (Ito i sar., 1995), koji je pokazao da je aktivnost SOD niža kod starijih SHR sa hipertrofijom srca u poređenju sa Wistar pacovima istog uzrasta. Nakon akutnog tretmana losartanom, aktivnost SOD se u našem modelu maligne hipertenzije povećala, pokazujući tendenciju da dostigne nivo normotenzivne kontrole.

U uslovima hronične primene losartana de Cavanagh i saradnici (de Cavanagh i sar., 2006), su ispitivali povezanost hipertenzije, oksidativnog stresa i mitohondrijalnih oštećenja SHR i Wistar pacova, pokazavši da losartan značajno povećava aktivnosti mitohondrijalne SOD, što posledično dovodi do snižavanja koncentracije peroksida. Uzevši u obzir ozbiljnost kliničke slike maligne hipertenzije, možemo pretpostaviti da akutna doza losartana u našem

eksperimentalnom dizajnu nije dovoljna da bi se značajno promenila aktivnost SOD, CAT i posledično, oksidativni status.

#### Zaključak / Conclusion

Celokupno posmatrano, naši rezultati pokazuju da jednokratna aplikacija losartana, blokatora AT1 receptora, ostvaruje povoljan efekat na krvni pritisak i vaskularni otpor, snižavajući njihove vrednosti ka vrednostima normotenzivnih životinja. Blokada vezivanja AngII za receptore nije ostvarila značajne efekte na MV i KPK, ali je znatno snizila vaskularne otpore, kako ukupni tako i karotidni. Pored ovih jasnih hemodinamskih poboljšanja, možemo pretpostaviti da AngII ostvaruje određeni efekat i na parametre oksidativnog stresa, ali i da bi taj efekat trebalo detaljnije ispitati u studiji sa hroničnom aplikacijom. Na osnovu svega iznesenog možemo zaključiti da AngII igra značajnu ulogu u sindromu maligne hipertenzije, koju bi trebalo podrobnije ispitati zbog potencijalnih terapijskih primena.

#### ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rezultati rada su deo naučno-istraživačkih projekata u oblasti osnovnih istraživanja, evidencioni broj: OI 175096, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

*The results of this work are a part of the scientific research projects in the field of basic research, register number: OI 175096, financed by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia*

#### Literatura / References

1. Ahmed LA, Shehata NI, Abdelkader NF, Khattab MM. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity through Alleviation of Mitochondrial Dysfunction in Mice. Plos One 2014; 9 (12). DOI:10.1371/journal.pone.0115983
2. Bender J, Russell K, Rosenfeld L, Chaudry S. Oxford American Handbook of Cardiology. 1 ed. USA: Oxford University Press; 2010.
3. Beutler E. Catalasa. In: Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods. Beutler, editor. New York: Grune and Stratton; 1982.
4. de Cavanagh EM, Toblli JE, Ferder L, Piotrkowski B, Stella I, Inserra F. Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. Am J Physiol Regulatory, integrative and comparative physiology 2006;290(6):R1616-25.
5. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. Cardiovascular Res 1998;39(1):89-105.
6. Drabkin DL, Austin J.H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. Journal of Biological Chemistry 1935;112(1):51-65.
7. Fitzpatrick MA, Rademaker MT, Charles CJ, Yandle TG, Espiner EA, Ikram H. Angiotensin II receptor antagonism in ovine heart failure: acute hemodynamic, hormonal, and renal effects. Am J Physiol 1992;263(1 Pt 2):H250-6.

8. Frohlich ED, Urych M, Tarazi RC, Dustan HP, Page IH. A hemodynamic comparison of essential and renovascular hypertension. Cardiac output and total peripheral resistance: supine and tilted patients. *Circulation* 1967;35(2):289-97.
9. Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol*. 2007 Jul;22(4):311-5.
10. Ito H, Torii M, Suzuki T. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1995;17(5):803-16.
11. Khaper N, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(5):1461-6.
12. Kitts DD, Yuan YV, Godin DV. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76(2):202-9.
13. Laragh J. Laragh's lessons in pathophysiology and clinical pearls for treating hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14(9):837-54.
14. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-97. Review
15. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(10):3170-5.
16. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977;41(1):19-26.
17. Naidoo DP, Sareli P, Marin F, Aroca-Martinez G, Maritz FJ, Jardim PC, et al. Increased efficacy and tolerability with losartan plus hydrochlorothiazide in patients with uncontrolled hypertension and therapy-related symptoms receiving two monotherapies. *Adv Ther* 1999;16(5):187-99.
18. Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension* 1997;29(1):519-24.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-8.
20. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.
21. Okamoto K, Ohta Y, Morita N, Shiokawa H, Chikugo T, Hamada Y. Therapy and prevention of hypertension of M-SHRSP. *Clin Exp Hypertens Part A, Theory and practice*. 1991;13(5):1033-42.
22. Park JB, Intengan HD, Schiffrin EL. Reduction of resistance artery stiffness by treatment with the AT(1)-receptor antagonist losartan in essential hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000;1(1):40-5.
23. Polizio AH, Balestrasse KB, Gornalusse GG, Gorzalczany SB, Santa-Cruz DM, Yannarelli GG, et al. Losartan exerts renoprotection through NAD(P)H oxidase downregulation in a renovascular model of hypertension. *Regul Pept* 2009;156(1-3):28-33.
24. Polizio AH, Pena C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul Pept* 2005;128(1):1-5.
25. Rump LC, Ambrosioni E, Burnier M, Horl W, Rabelink AJ. Initial combination therapy with olmesartan/hydrochlorothiazide in moderate-to-severe hypertension. *J Hum Hypertens* 2006;20(4):299-301.
26. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998;16(9):1267-71.
27. Ruzicka M, Yuan B, Leenen FH. Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation* 1994;90(1):484-91.
28. Vikrant S, Tiwari S. Essential Hypertension – Pathogenesis and Pathophysiology. *Journal Indian Academy Clinical Medicine* 2011; 2[3], 140-161.

29. Xu F, Mao C, Hu Y, Rui C, Xu Z, Zhang L. Cardiovascular effects of losartan and its relevant clinical application. *Curr Med Chem* 2009;16(29):3841-57.
30. Xu F, Mao C, Liu Y, Wu L, Xu Z, Zhang L. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. *Curr Med Chem* 2009;16(28):3701-15.
31. Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res* 2007;30(11):1119-28.

**ENGLISH**

**THE EFFECTS OF ACUTE ADMINISTRATION OF LOSARTAN, ANGIOTENSIN II TYPE-1 RECEPTOR ANTAGONIST, ON HEMODYNAMICS AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN MALIGNANT HYPERTENSIVE RATS**

**Natalija Bogunović, Zoran Miloradović, Đurđica Jovović, Nevena Mihailović-Stanojević, Milan Ivanov, Una Jovana Vajić, Danijela Karanović, Jelica Grujić-Milanović**

Malignant hypertension is a severe form of hypertension which pathogenesis is not fully elucidated. The aim of our study was to investigate the role of Angiotensin II on hemodynamic and oxidative stress parameters in model of malignant hypertension by using losartan. Adult males were divided into three groups: normotensive Wister rats, control SHR and losartan treated SHR. Control and SHR group received a single bolus dosage of saline, while the SHR + LOS group received a losartan. Blood pressure, cardiac output, both total peripheral and carotid vascular resistance and carotid blood flow were measured. CAT, SOD and TBARS were determined in the blood samples. The treatment significantly decreased the blood pressure. There was no significant change in cardiac output or carotid blood flow, but treatment resulted in diminishment of vascular resistances, both total peripheral and carotid. There was a tendency to restore the values of SOD activity towards those of the normotensive group, but there were no change in CAT and TBARS levels. Taken together, our results show that a single application of losartan has a strong hypotensive effect. Angiotensin II seems to have a significant role in the malignant hypertension syndrome and it partially affects oxidative stress parameters.

Key words: losartan, malignant hypertension, hemodynamics, oxidative stress

**РУССКИЙ**

**ЭФФЕКТЫ АКУТОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛОЗАРТАНА, АНТАГОНИСТА АНГИОТЕНЗИНА II ТИПА 1 РЕЦЕПТОРА НА ГЕМОДИНАМИКУ И ПАРАМЕТРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У КРЫС**

**Наталья Богунович, Зоран Милорадович, Джурджица Йовович, Невена Михайлович-Станоевич, Милан Иванов, Уна Йована Вайич, Даниела Каранович, Елица Груич-Миланович**

Введение: Злокачественная артериальная гипертензия представляет собой особо тяжелую форму гипертензии, чей патогенез полностью неясен. Цель нашей работы состояла в исследовании роли ангиотензина II (Ang II) в регулировании

гемодинамических показателей окислительного стресса в модели злокачественной артериальной гипертензии. Материал и методы: Взрослые самцы крыс были поделены на три группы: нормотензивные крысы Wistar, контрольные гипертензивные (SHR) и принимающие лозартан гипертензивные крысы (SHR+LOS). Контрольная группа и группа SHR приняли по одной болюсной дозе физиологического раствора, а группа SHR+LOS приняла лозартан, рецепторный блокатор Ang II. После этого у них измерено кровяное давление, минутный объем сердца (МОС), каротидный кровоток (ККТ) и определено соответствующее сопротивление: общее периферическое сопротивление сосудов (ОПСС) и каротидное сопротивление сосудов (КСС). Показатели окислительного стресса: CAT, SOD и TBARS определены на основании образцов крови. Результаты: Применение лозартана значительно снизило значение кровяного давления. Значительного изменения показателей МОС и ККТ не произошло, но применение лозартана привело к уменьшению ОПСС и КСС. В данной группе замечена тенденция увеличения активности SOD до показателей нормотензивных животных, однако изменение показателей CAT и TBARS не наблюдалось. Дискуссия и заключение: Наши результаты показывают, что однократное применение лозартана имеет сильный гипотензивный эффект и что Ang II играет важную роль в механизмах злокачественной артериальной гипертензии, частично посредством антиокислительного воздействия.

Ключевые слова: лозартан, злокачественная артериальная гипертензия, гемодинамика, окислительный стресс.

