

Utjecaj kratkotrajnog velikog unosa soli na serumsku razinu proupalnih i protuupalnih citokina u zdravih mladih ispitanika

Janić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:751095>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Janić

**UTJECAJ KRATKOTRAJNOG
VELIKOG UNOSA SOLI NA SERUMSKU
RAZINU PROUPALNIH I
PROTUUPALNIH CITOKINA U
ZDRAVIH MLADIH ISPITANIKA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Janić

**UTJECAJ KRATKOTRAJNOG
VELIKOG UNOSA SOLI NA SERUMSKU
RAZINU PROUPALNIH I
PROTUUPALNIH CITOKINA U
ZDRAVIH MLADIH ISPITANIKA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ana Stupin

Rad ima 33 lista, 4 tablice i 3 slike.

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Ani Stupin na vremenu i trudu koji je uložila tijekom izrade ovoga rada.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali tijekom pohađanja studija te omogućili pohađanje istog.

Hvala mojim kolegama Rebeki, Ivani, Marini i Karlu na svim lijepim trenucima i podršci tijekom studiranja.

Hvala mojoj dragoj prijateljici Ivoni koja mi je pomogla u teškim trenucima tijekom studiranja i uvijek pružala bezuvjetnu podršku.

Hvala i svima Vama koji su tijekom moga studija na bili koji način pridonijeli završetku moga studija.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 4 |
| 1.1. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav | 4 |
| 1.2. Renin-angiotenzin sustav | 6 |
| 1.3. Endotelna funkcija | 6 |
| 1.4. Upala i citokini | 7 |
| 2. HIPOTEZA | 9 |
| 3. CILJEVI | 10 |
| 4. ISPITANICI I METODE | 11 |
| 4.1. Ustroj studije | 11 |
| 4.2. Ispitanici | 11 |
| 4.3. Metode | 11 |
| 4.4. Statističke metode | 14 |
| 5. REZULTATI | 15 |
| 5.1. Klinička obilježja ispitanika | 15 |
| 5.2. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika | 16 |
| 5.3. Proupalni citokini | 17 |
| 5.4. Protuupalni citokini | 18 |
| 6. RASPRAVA | 19 |
| 7. ZAKLJUČAK | 23 |
| 8. SAŽETAK | 24 |
| 9. SUMMARY | 25 |
| 10. POPIS LITERATURE | 26 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 29 |

POPIS KRATICA

8-izo-PGF 2α – 8-izo prostaglandin F2 alfa

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim

AchID – acetilkolin inducirana dilatacija

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CD4 – stanični diferencijacijski antigen 4 (engl. *cluster difference 4*)

COX – ciklooksigenaza

CRASH – Hrvatska akcija o soli i zdravlju (engl. *Croatian action on salt and health*)

CYP450 – citokrom P450

DASH – (engl. *Dietary approaches to stop hypertension*)

DBP – dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*)

DCF-DA – (engl. *dichlorodihydrofluorescein diacetate*)

ELISA – (engl. *enzyme-linked immunoassay*)

FMD – protokom posredovana vazodilatacija (engl. *flow-mediated dilatation*)

FRAP – (engl. *ferric-reducing ability of plasma*)

HR – puls (engl. *heart rate*)

HS – visok udio soli (engl. *high salt*)

ICAM – (engl. *intercellular adhesion molecule*)

IFN- γ – interferon gama

IL – interleukin

LAP – leukocitna alkalna fosfataza

LDF – Laser-Doppler fotometrija

LFA-1 – limfocitni antigen 1

LS – niski udio soli (engl. *low salt*)

MAC-1 – (engl. *membrane attack complex type 1*)

MAP – srednji arterijski tlak

NO – dušikov monoksid

PGI₂ – izvedeni vazodilatator prostaciklin

PORH – postokluzivna reaktivna hiperemija (engl. *post-occlusive reactive hyperemia*)

RAS – renin-angiotenzin sustav

ROS – reaktivni metaboliti kisika (engl. *reactive oxygen species*)

SBP – sistolički arterijski tlak

SDF – čimbenik stromalnih stanica

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TH17 – (engl. *T helper*)

TNF- α – tumor nekrotski faktor alfa

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

VLA-4 – vrlo kasni antigen 4

WASH – Svjetska akcija o soli i zdravlju (engl. *World Action on Salt and Health*)

WHR – omjer struk-bokovi (engl. *waist to hip ratio*)

1. UVOD

U današnjem svijetu, gdje je užurbani način života neizbježan, javlja se problem nezdravih prehrambenih navika. Manjak vremena za spravljanje hrane dovodi do posezanja za već gotovim jelima, koja su puna raznih aditiva i kuhinjske soli. Tijekom povijesti unos kuhinjske soli se postupno povećavao, te je nagli porast doživio početkom konzumiranja gotove prerađene hrane. Zbog toga današnji prosjek dnevnog unosa soli iznosi od 9 do 12 grama na dan. Suprotno tomu, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) smatra da je optimalan unos kuhinjske soli 5 grama na dan (1).

Nedvojbeno korelacija prevelikog unosa kuhinjske soli i razvoja (i progresije) arterijske hipertenzije, te svrstavanje povećanog unosa kuhinjske soli među rizične čimbenike za razvoj kardiovaskularnih bolesti, doprinijelo je razvoju svijesti o prekomjernom unosu soli u većini razvijenih dijelova svijeta. Nastali su brojni nacionalni programi za smanjenje dnevnog unosa soli. Kako bi utjecali na smanjenje korištenja soli, brojne zemlje su razvile nacionalne kampanje, koje utječu na podizanje svijesti građana i na proizvođače da u proizvodnji reduciraju udio soli. Nacionalne kampanje i programi imali su veliki utjecaj, te su postali temelj izrade globalnog programa. Zbog toga 2005. godine stvoren je *World Action on Salt and Health (WASH)* čija je glavna zadaća i cilj promicanje smanjenja unosa soli na svjetskoj razini (1).

U Republici Hrvatskoj, prema podacima iz 2008. godine, prosjek dnevnog unosa soli iznosi 11,6 grama. U okviru prosječnog unosa soli, dnevni udio koji unose žene je 10,2 grama, dok muškarci unose čak 13,3 grama (2). S obzirom da je to dvostruko veći unos od preporučenog, Republika Hrvatska se također uključila u program smanjenja unosa kuhinjske soli. Stoga je stvoren *Croatian action on salt and health (CRASH)*. Program je prihvaćen 2006. godine tijekom trajanja Prvog hrvatskog kongresa o hipertenziji (3). Vlada Republike Hrvatske donijela je u rujnu 2014. godine Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa soli u Republici Hrvatskoj (3). Kao glavni cilj ovaj plan imao je smanjenje unosa soli u hrani za 4 % godišnje na razini opće populacije Republike Hrvatske (3). On bi se implementirao od 2015. godine do 2019. godine. Prema planu, do 2019. godine, unos soli bio bi smanjen sa 11,6 na 9,3 grama dnevno. Ovakva promjena bi utjecala na sniženje prevalencije arterijske hipertenzije i drugih kardiovaskularnih bolesti u Republici Hrvatskoj (4).

1.1. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav

Općeprihvaćena je povezanost između povećanog unosa kuhinjske soli i arterijske hipertenzije (5). Isto tako, poznato je da je hipertenzija jedna od najčešćih kardiovaskularnih bolesti. Prema istraživanjima, dokazano je da se smanjenjem dnevnog unosa kuhinjske soli smanjuje i krvni tlak. Samim time se smanjuje rizik za razvoj i progresiju kardiovaskularnih bolesti. Kroz meta analizu studija o povezanosti krvnog tlaka i soli, pokazano je da smanjenje od 6 grama soli dnevno smanjuje broj srčanih udara kod hipertenzivnih osoba za 14 % (6). Također, smanjuju se i bolesti koronarnih arterija za 9 %, te se kod normotenzivnih osoba smanjuje incidencija srčanih udara za 6 %, a bolesti koronarnih arterija za 4 % (6). Iako se najčešće prekomjeren unos soli povezuje s promjenama arterijskog tlaka, prema novim istraživanjima pokazano je kako i tijekom kratkog razdoblja unos prevelike količine kuhinjske soli može prouzrokovati oštećenja vaskularne aktivnosti i dovesti do razvoja disfunkcije endotela, koja su nezavisna od promjena arterijskog tlaka. Pionirska studija koja je dovela do spoznaja o učincima kuhinjske soli na vaskularnu funkciju, a koji su neovisni o promjenama arterijskog tlaka, studija je Weinbergera i suradnika. Oni su pokazali da pojedinci čija je vaskularna funkcija osjetljiva na sol, a pritom nisu razvili hipertenziju imaju veću smrtnost od onih pojedinaca koji su otporni na sol (7). Od tada, brojne su funkcionalne vaskularne studije pokazale da čak i kratkotrajan (sedam dana) prekomjeren unos soli uzrokuje oštećenje endotelne funkcije u makrocirkulaciji (protokom posredovana vazodilatacija brahijalne arterije, engl. *Flow-mediated dilation*, FMD) i mikrocirkulaciji (odgovor periferne mikrocirkulacije na vaskularnu okluziju i iontoforezu acetilkolina mjereno laser Dopplerom, engl. *laser Doppler-flowmetry*, LDF) čak i kod zdravih pojedinaca na koja ne utječu promjene arterijskoga tlaka (8, 9). Predloženi mehanizmi koji posreduju takvo oštećenje endotela uslijed prekomjernog unosa soli su: inhibicija renin-angiotenzinskog sustava, povećana razina oksidativnog stresa, promjene aktivnosti autonomnog živčanog sustava, upala i endotelno-leukocitna interakcija, promjene endotelnog glikokaliksa, retencija tekućine i pohranjivanje osmotski neaktivnog natrija u organizmu.

1.2. Renin-angiotenzin sustav

Renin-angiotenzin sustav (RAS) središnji je element koji kontrolira arterijski tlak, ravnotežu soli i vode u tijelu. Njegovu aktivnost kontrolira proteza renin, oslobađajući se u cirkulaciju iz jukstaglomerularnih stanica bubrega. Kako bi se renin otpustio, važni su brojni stimulusi koji taj proces kontroliraju kao što je unos soli. Veliki unos soli inhibira lučenje renina i smanjuje njegovu koncentraciju u plazmi, dok ga smanjenje unosa soli stimulira (10). RAS svoje učinke pokazuje kroz efektorsku molekulu angiotenzin II. Renin, nakon opuštanja, aktivira angiotenzinogen kojeg cijepa u angiotenzin I. Takva neaktivna forma pomoću angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) se pretvara u aktivnu formu, odnosno angiotenzin II (11). Također, uz angiotenzin II, iznimno važna efektorska molekula RAS-a je aldosteron. Njegovu sintezu i lučenje regulira angiotenzin II. Učinci angiotenzina II su prvenstveno vazokonstrikcija, inhibicija lučenja renina, povišenje krvnog tlaka, sinteza aldosterona, pojačanje srčane kontraktilnosti te reapsorpcija natrija u tubulima bubrega, dok su učinci aldosterona reapsorpcija natrija, lučenje magnezija i kalija te retencija vode (11, 12). Tijekom raznih istraživanja na ljudima i životinjama pokazano je da veliki unos soli suprimira aktivnost RAS-a (10). Iako se sa razvojem kardiovaskularnih bolesti (osobito arterijske hipertenzije) obično povezuje povećana aktivnost RAS-a, upravo su studije primarno na animalnim modelima o učinku soli na vaskularnu funkciju doprinijele spoznaji da normalna aktivnost RAS-a (ni smanjena ni povećana) ima važnu ulogu u održavanju vaskularne reaktivnosti uz održavanje homeostaze soli u organizmu (11). Povećan unos soli uzrokuje inhibiciju RAS-a pa samim time i supresiju angiotenzina II koja može imati negativan utjecaj na endotelnu funkciju. Supresija angiotenzina II oštećuje vazodilataciju periferne mikrocirkulacije kod normotenzivnih ispitanika koja je ovisna o endotelu. Takvo stanje dovodi do povećanja razine oksidativnog stresa te do smanjenja antioksidativnog kapaciteta (13, 14). Ta funkcionalna vaskularna istraživanja su pokazala direktnu povezanost između nastale oksidativne neravnoteže i razvoja endotelne disfunkcije.

1.3. Endotelna funkcija

Endotel je važan organ koji oblaže čitavu unutrašnjost kardiovaskularnog sustava. Najznačajnije uloge endotela su inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, kontrola vaskularnog tonusa, moduliranje propusnosti vaskularne stijenke i regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica. On kroz svoje djelovanje kao enzimatske

barijere, vrši kontrolu izlučivanja citokina te stvaranja i ekspresije adhezijskih molekula (15). Endotel regulira krvni protok tako što otpušta različite relaksirajuće tvari kao što su: dušikov oksid (NO), različiti metaboliti citokroma P450 (CYP450) te o ciklooksigenazama (COX-1, COX-2) ovisan vazodilatator prostaciklin (PGI₂). Također, endotel je zaslužan za sintezu različitih vazokonstriksijskih čimbenika kao što su: prostaglandin F_{2α}, endotelin 1 i tromboksan (15). Endotelna disfunkcija je stanje poremećene funkcije endotela koju karakterizira neadekvatna aktivacija endotela. U tome stanju dolazi do povećane produkcije vazokonstriksijskih čimbenika ili smanjenja produkcije relaksacijskih čimbenika. Kroz vaskularna istraživanja koja su provedena do danas, pokazano je da je jedan od uzroka nastanka endotelne disfunkcije oksidativna neravnoteža, koja se, između ostalog, javlja i kroz prekomjerman unos soli u organizam. Direktno funkcionalan dokaz da oksidacijska neravnoteža ima središnju ulogu u razvoju mikrovaskularne disfunkcije endotela zbog prekomjernog unosa soli u organizam je istraživanje u kojem se utvrđivao utjecaj unosa antioksidativnih tvari uz prekomjerman unos soli na endotelnu funkciju u zdravih pojedinaca. To istraživanje je dokazalo da unos antioksidativnih vitamina (vitamin C i vitamin E) uz prekomjerman unos soli sprječava nastanak endotelne disfunkcije u zdravih pojedinaca (16).

1.4. Upala i citokini

Poremećaj endotela pored promijenjenog vazoaktivnog odgovora uključuje i povećanje aktivacije endotela, disfunkcionalni izvanstanični matriks te infiltraciju monocita i neutrofila što prouzrokuje oksidativni stres i razvoj upale (15). To potvrđuju dosadašnja istraživanja u kojima je pokazano da prekomjerman unos soli povećava endotelnu adheziju leukocita koja je posredovana kisikovim radikalima (17). Citokini su mali proteini koje stanice oslobađaju i koji imaju važnu ulogu u interakciji i komunikaciji između stanica. Citokin je opće ime, stoga raspoznavamo: limfokine (citokini koje stvaraju limfociti), monokine (citokini koje stvaraju monociti), kemokine (citokini s kemotaktičkim djelovanjem) i interleukine (citokini koje stvara jedan leukocit i djeluju na druge leukocite) (18). Citokine stvaraju mnoge stanične populacije, ali najčešće su to pomoćne T stanice i makrofazi. Proupalni citokini nastaju uglavnom od aktiviranih makrofaga i oni sudjeluju u regulaciji upalnih reakcija, a njihovi predstavnici su: interferon gama (IFN- γ), tumor-nekrotirajući faktor α (TNF- α), interleukin 17A (IL-17A), interleukin 23 (IL-23), interleukin 6 (IL-6) i interleukin 9 (IL-9). Suprotno njima, protuupalni citokini su niz imunoregulacijskih molekula koje kontroliraju proupalni odgovor citokina, a njihovi predstavnici su: interleukin 22 (IL-22), interleukin 21 (IL-21) i

interleukin 10 (IL-10) (18). Upalni podražaj u obliku lučenja citokina i kemokina može uzrokovati aktivaciju endotela koja predstavlja rani događaj u započinjanju adhezije monocita i drugih leukocita na endotel prije njihove infiltracije i ekstravazacije na mjesto ozljede (19). Pokazano je da promjene količine soli u prehrani mogu imati značajan utjecaj na krvne stanice. Istraživanje na štakorima kod kojih je inducirana hipertenzija uzrokovana solju, pokazalo je značajno povećanje ukupnog broja leukocita - limfocita, neutrofila, monocita i CD4 stanica (20). Humana istraživanja također su potvrdila da promjene količine soli u prehrani mogu imati značajan utjecaj na krvne stanice (kao što su monociti i limfociti) i na in vivo lučenje proupalnih/protuupalnih citokina u koje ubrajamo IL-6, IL-23 i IL-10, te oni dovode do prekomjernog imunološkog odgovora u zdravih ispitanika (21). Za izlučivanje proupalnih i protuupalnih citokina, uz pomoćne T stanice (Th17), odgovorne su i regulacijske T (Treg) stanice. Istraživanje je pokazalo kako prehrana sa velikim udjelom soli također utječe na omjer Th17/Treg stanica koje posljedično utječu na razvoj upale i oštećenje ciljanih organa (22). Dokazano je da dijeta s velikim udjelom soli inhibira supresivnu funkciju Treg stanica. Prekomjeran unos soli ne utječe na razvoj i diferencijaciju Treg stanica, ali utječe na njihovu in vitro i in vivo funkciju (23). Aktivirani endotel ima sposobnost komuniciranja s krvnim leukocitima što je karakterizirano povećanom ekspresijom staničnih adhezivnih molekula (npr. ICAM-1 i VCAM-1) i povećanim lučenjem kemokina (npr. LAP, SDF-1) i proupalnih citokina (npr. IL-6 i TNF- α) (18). Napredovanjem upale, koja je posredovana endotelnom disfunkcijom, dolazi do oslobađanja različitih vaskularnih čimbenika rasta (VEGF-A i VEGF-D) koji u određenim okolnostima mogu djelovati kao angiogeni posrednici koji promiču nastanak i razvoj te nestabilnost aterosklerotskog plaka. Dokazano je da prekomjeran unos soli uz poremećaj endotelne funkcije dovodi i do otvrdnuća arterija, koje također pogoduje razvoju kardiovaskularnih bolesti (24).

Prema raznim istraživanjima, pokazano je da postoji povezanost između povećanog unosa kuhinjske soli u organizam i promjena imunološkog sustava, no postoji daljnja potreba za potvrdom konačnog učinka kratkotrajnog prekomjernog unosa kuhinjske soli na lučenje proupalnih i protuupalnih citokina te na aktivaciju endotela u zdravoj normotenzivnoj populaciji. Razumijevanje interakcije prekomjernog unosa soli i lučenja medijatora imunološkog odgovora te posljedične aktivacije endotela u budućnosti bi mogle imati veliki značaj u smanjivanju rizika od razvoja, s prekomjernim unosom soli povezane, endotelne disfunkcije, i posljedičnog razvoja kardiovaskularnih bolesti.

2. HIPOTEZA

Sedam dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovat će povišenje serumske razine proupalnih, te smanjenje serumske razine protuupalnih citokina u zdravih mladih ispitanika.

3. CILJEVI

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak kratkotrajne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na serumsku razinu proupalnih (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-9) i protuupalnih (imunomodulatornih) citokina (IL-10, IL-21, IL-22) u zdravih mladih ispitanika oba spola, korištenjem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testova te metode temeljene na tehnologiji LuminexxMAP (engl. *multi-analyte profiling*).

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Ustroj istraživanja je nerandomizirani kontrolirani klinički pokus. U istraživanju je sudjelovalo 24 mladih zdravih ispitanika. Svaki ispitanik je ispunio pisani informirani pristanak. Studija, protokol i procedura su postavljeni u skladu sa standardima najnovije verzije Helsinške deklaracije te su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/15-08/08; Broj: 2158-61-07-15-68). Ovo istraživanje je sastavnica istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2016-06-8744).

4.2. Ispitanici

Sudionici ovoga istraživanja bili su 24 zdrava mlada ispitanika, od čega 12 žena i 12 muškaraca, u dobi od 18 do 30 godina života. Isključni kriteriji za sudjelovanje u istraživanju bili su: hipertenzija ili hipotenzija, hiperlipidemija, šećerna bolest, koronarna bolest, cerebrovaskularne bolesti, bolesti perifernih krvnih žila ili bubrežno oštećenje. Osim toga, isključni kriterij bila je pretilost (indeks tjelesne mase $> 30 \text{ kg/m}^2$). Ispitanici nisu smjeli konzumirati lijekove koji bi mogli utjecati na endotelnu funkciju. Žene koje su bile uključene u istraživanje bile su u različitim fazama menstrualnog ciklusa (randomizirano) kako bi se eliminirao utjecaj spolnih hormona na endotelnu funkciju.

4.3. Metode

Protokol studije trajao je 14 dana. Kroz to razdoblje, ispitanici su dva puta dolazili u Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta Osijek. Prvi posjet ispitanika je bio nakon prvih sedam dana protokola (dijeta s niskim udjelom soli), a drugi posjet nakon sedam dana kada su ispitanici bili na dijeti s visokim udjelom soli (HS). Prvih sedam dana ispitanici su bili podvrgnuti dijeti s niskim udjelom kuhinjske soli (LS) te su dnevno unosili oko 3,5 grama kuhinjske soli prema DASH planu prehrane (25). Tih sedam dana dijeta s niskim udjelom soli služio je kao tzv. „period ispiranja“. Ispitanici su tijekom drugih sedam dana bili podvrgnuti dijeti s visokim udjelom soli (HS). Dijeta s visokim udjelom soli se sastojala od dnevnoga unosa oko 14 grama kuhinjske soli, odnosno ispitanici su unosili 3,5 grama soli dnevno prema DASH-u putem hrane, a ostatak je bio nadomješten u obliku praha soli u iznosu od 11,7 grama dnevno. Tijekom svakog posjeta laboratoriju

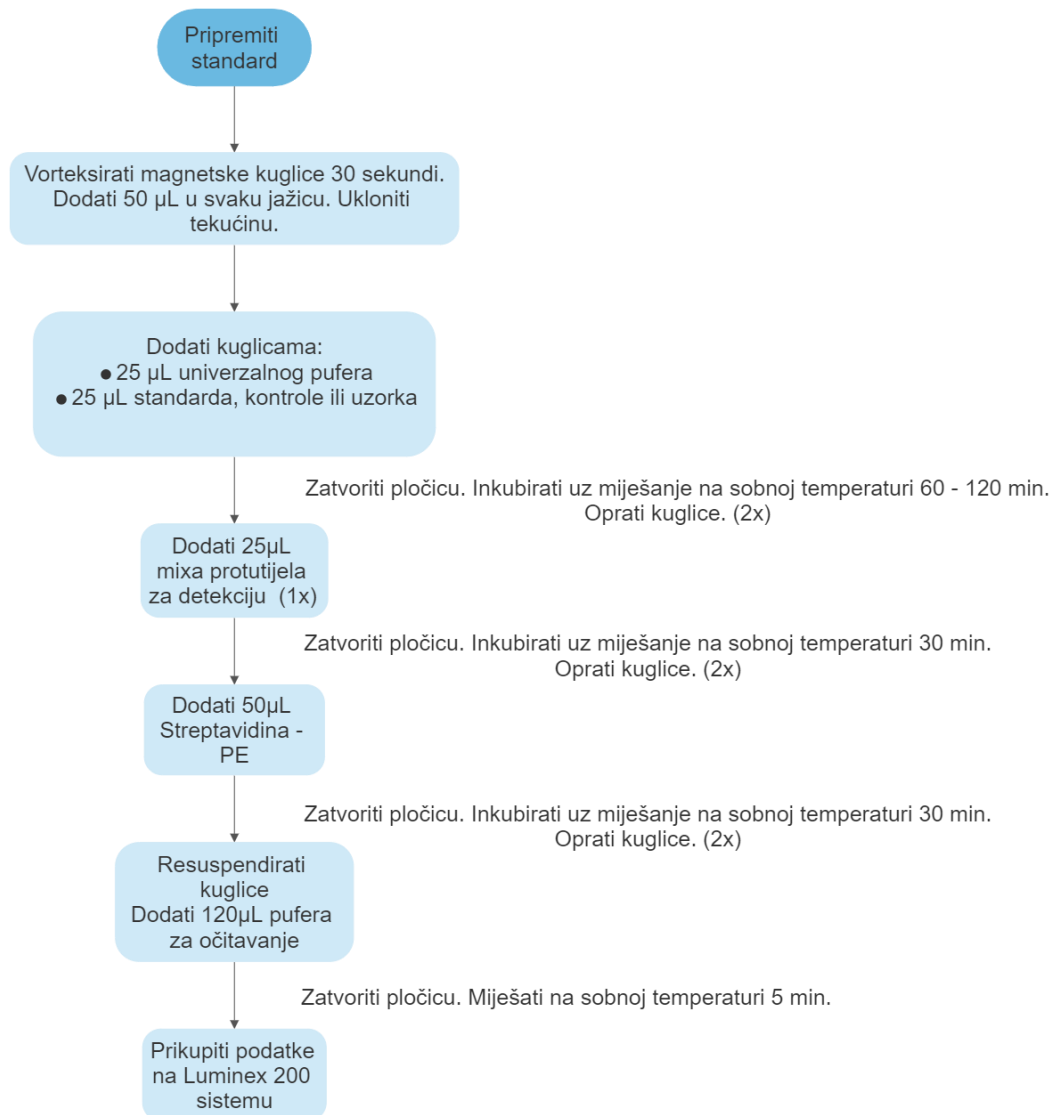
ispitanici su bili podvrgnuti mjerenjima koja su uključivala: određivanje indeksa tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) i omjera struka i bokova (WHR, engl. *waist-to-hip ratio*), mjerenje arterijskog tlaka i pulsa, uzimanje uzorka 24-satnog urina radi kontrole pridržavanja protokola dijete, koji su ispitanici dan prije posjete prikupili prema zadanim uputama, te im je uzet uzorak venske krvi za određivanje serumske razine proupalnih i protuupalnih citokina.

U uzorcima 24-satnog urina mjerila se koncentracija natrija, kalija, ureje, kreatinina, proteina i albumina. Iz podataka o 24-satnoj natrijurezi odgovarajućom formulom izračunat je dnevni unos kuhinjske soli u gramima [1 g kuhinjske soli soli (NaCl) = 393,4 mg; Na = 17,1 mmol Na]. Analize 24-satnog urina učinjene su u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Osijek.

Iz skupljenih uzoraka venske krvi izmjerila se serumska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina korištenjem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testova te metode temeljene na tehnologiji LuminexMAP (engl. *multi-analyte profiling*). Postupak pripreme uzoraka i protokol za ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testove prikazani su na slici 1 i 2. Invitrogen ProcartaPlex Multiplex imunološki testovi se temeljene na tehnologiji LuminexMAP koja omogućava istodobnu kvantifikaciju i detekciju većeg broja proteina u jednom uzorku seruma. Karakteristika navedene metode je kombinacija efikasnosti višestruke kvantifikacije i preciznosti, osjetljivosti, ponovljivosti i jednostavnosti ELISA (engl. *the enzyme-linked immunosorbent assay*) testa. Navedenim se testovima i metodom u uzorcima seruma izmjerila koncentracija sljedećih proupalnih citokina: INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A i IL-9 te protuupalnih i imunomodulatornih citokina: IL-10, IL-21 i IL-22. Postupci mjerenja serumske razine proupalnih i protuupalnih citokina proveli su se na Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek (Slika 3.).



Slika 1. Postupak pripreme uzoraka. Izvor: fotografirala autorica rada.



Slika 2. Protokol ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testa. Izvor: izradila autorica rada.



Slika 3. Postupak mjerenja serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina korištenjem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testova te metode temeljene na tehnologiji LuminexMAP (engl. multi-analyte profiling) .Izvor: fotografirala autorica rada.

4.1. Statističke metode

Svi rezultati opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Normalnost raspodjele varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli mjerenih prije i poslije zadanog protokola (HS dijete) uspoređivani su pomoću t-testa za zavisne uzorke (engl. *paired t-test*). Kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenio se Wilcoxonov test sume rangova (engl. *Wilcoxon rank-sum test*). Razina statističke značajnosti bila je postavljena na $\text{Alpha} = 0,05$. Za statističku analizu koristio se program SigmaPlot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

5. REZULTATI

5.1. Klinička obilježja ispitanika

Sudionici istraživanja bili su 24 mlada ispitanika (12 muškaraca i 12 žena) s prosječnom dobi od 21 godine. Podatci o kliničkim obilježjima ispitanika prije i nakon dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta) prikazani su u Tablici 1. Dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta) izazvala je značajno povećanje BMI-a, dok se WHR nije statistički značajno promijenio. Dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta) nije uzrokovala statističke značajne promjene u vrijednostima pulsa i arterijskog krvnog tlaka.

Tablica 1. Klinička obilježja ispitanika

| Obilježje (mjerna jedinica) | aritmetička sredina (standardna devijacija) | |
|---------------------------------|---|-----------------|
| | LS dijeta | HS dijeta |
| BMI (kg/m²) * | 24,35 (3,50) | 24,65 (3,61) ** |
| WHR † | 0,82 (0,06) | 0,82 (0,05) |
| SBP (mmHg) ‡ | 115,79 (10,53) | 117 (13,20) |
| DBP (mmHg) § | 75,25 (8,27) | 74,79 (6,52) |
| MAP (mmHg) | 88,76 (6,85) | 88,86 (7,13) |
| HR (otkucaja u min) ¶ | 86,38 (13,61) | 83,17 (9,74) |

* indeks tjelesne mase; † omjer struk-bokovi; ‡ sistolički krvni tlak; § dijastolički krvni tlak; || prosječni arterijski tlak; ¶ puls; ** p < 0,05 prije i poslije dijete

5.2. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika

Nakon dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta) vrijednost natrija u 24-satnom urinu statistički se značajno povećala, što je u skladu s povećanjem izračunatog dnevnog unosa kuhinjske soli. Statistički značajan porast 24-satne natrijureze nakon HS dijete potvrdio je da su se ispitanici pridržavali zadanog protokola istraživanja. Volumen 24-satnog urina, koeficijent kreatinina, urea, proteini, albumini i kalij nisu bili statistički značajno promijenjeni nakon dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta) (Tablica 2).

Tablica 2. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu kod ispitanika prije (LS) i poslije (HS) dijete s velikim udjelom kuhinjske soli

| obilježje (mjerna jedinica) | aritmetička sredina (standardna devijacija) | |
|---------------------------------------|---|-------------------|
| | LS dijeta | HS dijeta |
| Volumen 24h urina (mL) | 1596,88 (752,11) | 1678,26 (739,91) |
| Koeficijent kreatinina | 153,08 (61,24) | 157,43 (51,31) |
| Proteini (mg/dU) | 369,48 (1306,98) | 418,95 (1507,47) |
| Albumini (mg/dU) | 271,28 (1247,15) | 272,36 (1245,52) |
| Urea (mmol/dU) | 286,55 (239,99) | 250,93 (107,31) |
| Natrij (mmol/dU) | 89,69 (51,86) | 241,57 (122,33) * |
| Kalij (mmol/dU) | 40,90 (16,84) | 49,44 (23,04) |
| Unos soli NaCl u 24h urinu | 5,24 (3,03) | 14,12 (7,15) * |

* $p < 0,05$ prije i poslije dijete

5.3. Proupalni citokini

U tablici 3. su prikazane serumske koncentracije proupalnih citokina prije i nakon dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta). Serumska koncentracija IFN- γ , IL-17A i IL-9 se statistički značajno povećala nakon HS dijete. Serumske koncentracije ostalih mjenjenih proupalnih citokina (IL-23, IL-6, TNF- α) statistički značajno se nisu promijenile nakon dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta).

Tablica 3. Serumska koncentracija proupalnih citokina kod ispitanika prije (LS) i poslije (HS) dijete s velikim udjelom kuhinjske soli

| interleukin (mjerna jedinica) | aritmetička sredina (standardna devijacija) | |
|--|---|----------------|
| | LS dijeta | HS dijeta |
| IFN-γ (pg/mL) | 1,97 (3,02) | 3,34 (3,89) * |
| IL-17A (pg/mL) | 4,63 (7,18) | 7,97 (12,49) * |
| IL-23 (pg/mL) | 0,05 (0,02) | 0,05 (0,02) |
| IL-6 (pg/mL) | 2,39 (1,07) | 3,00 (1,43) |
| IL-9 (pg/mL) | 0,77 (2,35) | 1,82 (3,28)* |
| TNF-α (pg/mL) | 7,55 (12,27) | 14,49 (16,24) |

* $p < 0,05$ prije i poslije dijete

5.4. Protuupalni citokini

Serumske koncentracije protuupalnih citokina prije i nakon dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta) prikazane su u Tablici 4. Serumska koncentracija IL-10 se statistički značajno povećala nakon dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta). Serumske koncentracije IL-21 i IL-22 statistički značajno se nisu promijenile nakon dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijete).

Tablica 4. Serumska koncentracija protuupalnih citokina kod ispitanika prije (LS) i poslije (HS) dijete s velikim udjelom kuhinjske soli

| interleukin (mjerna jedinica) | aritmetička sredina (standardna devijacija) | |
|----------------------------------|---|-----------------|
| | LS dijeta | HS dijeta |
| IL-10 (pg/mL) | 0,57 (0,43) | 2,06 (2,71) * |
| IL-21 (pg/mL) | 168,20 (210,48) | 281,59 (296,80) |
| IL-22 (pg/mL) | 4,35 (10,32) | 5,57 (11,75) |

* $p < 0,05$ prije i poslije dijete

6. RASPRAVA

U istraživanju je sudjelovalo 24 mlada zdrava ispitanika koji su tijekom sedam dana bili podvrgnuti dijete s velikim udjelom soli (HS dijeta, engl. *high-salt*). Kroz tih tjedan dana ispitanici su konzumirali oko 14 grama kuhinjske soli na dan kako bi se ispitaio utjecaj kratkotrajnog velikog unosa soli na imunološki sustav, točnije na razinu proupalnih i protuupalnih citokina u zdravih mladih ispitanika. Najvažniji rezultati ovog istraživanja su da je sedam dana dijete s velikim udjelom soli dovelo do značajnog povećanja serumske koncentracije proupalnih citokina IFN- γ , IL-17A i IL-9. Zanimljivo, dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli također je uzrokovala i značajno povećanje serumske koncentracije protuupalnog citokina IL-10.

Dosadašnje velike kliničke studije nedvojbeno su pokazale da smanjenje unosa kuhinjske soli pridonosi smanjenju krvnog tlaka i incidencije oboljenja od hipertenzije (26, 27). S druge strane, hipertenzija se najčešće povezuje sa velikim (prekomjernim) unosom kuhinjske soli, no novija istraživanja su pokazala da čak i kratkotrajan veliki unos soli u organizam može uzrokovati oštećenje vaskularne funkcije i nastanak disfunkcije endotela koji ne ovisi o promjenama krvnog tlaka. Dokazano je da kratkoročna dijeta s velikim unosom soli (samo jedan obrok s velikim udjelom soli ili sedam dana prehrane s velikim udjelom soli) smanjuje protokom posredovanu dilataciju (engl. flow mediated dilation, FMD) brahijalne arterije, neovisno o promjenama arterijskog tlaka u zdravih ispitanika (8). Što se tiče mikrocirkulacije, istraživanja su pokazala da je vaskularna reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (9), stimulaciju acetilkolinom (ACh) (13) i lokalno zagrijavanje (28) (metoda mjerenja protoka laser Dopplerom, LDF) smanjena nakon sedmodnevne dijete s velikim udjelom soli kod zdravih osoba u odsutnosti promjena arterijskog tlaka, sastava tijela i tjelesnih tekućina (13).

U kontroli arterijskog tlaka i ravnoteži soli i vode u tijelu najvažniju ulogu ima renin-angiotenzin sustav (RAS). On uz pomoć svoje efektorske molekule, angiotenzina II, utječe na vazokonstrikciju, reapsorpciju natrija te sintezu aldosterona (11). DuPont i suradnici su pokazali da visoki unos soli suprimira angiotenzin II, što za posljedicu ima oštećenje o endotelu ovisne vazodilatacije periferne mikrocirkulacije u normotenzivnih ispitanika (14). Barić i suradnici su pokazali da sedam dana prekomjernog unosa soli u zdravih pojedinaca očekivano suprimira aktivnost RAS sustava (smanjena plazmatska aktivnost renina i

koncentracija aldosterona), ali i da postoji pozitivna korelacija između supresije RAS sustava i oštećenja mikrovaskularne endotelne funkcije zbog povećanog unosa soli u organizam (13).

Daljnje rasvjetljavanje potencijalnih mehanizama kojima prekomjeran unos soli uzrokuje endotelnu disfunkciju koja ne ovisi o promjenama krvnog tlaka u zdravih pojedinaca rezultiralo je studijama koje su pokazale da sedam dana HS dijeta dovodi do povećanja oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativnog kapaciteta. Greaney i suradnici su pokazali da je lokalna mikrodijaliza vitamina C, koji se smatra nespecifičnim hvatačem reaktivnih spojeva kisika (engl. *reactive oxygen species, ROS*), dovela do potpunog oporavka NO-ovisne arteriolarne dilatacije prilikom lokalnog zagrijavanja kože podlaktice u zdravih pojedinaca na HS dijeti (29). Nedavna studija Barić i suradnika po prvi je puta pokazala da sedmodnevna HS dijeta za posljedicu ima smanjenje antioksidativnog kapaciteta (FRAP i koncentracije katalaze u serumu) i porast oksidativnog stresa (TBARS, koncentracija 8-izo-PGF2 α u serumu, DCF-DA u leukocitima iz periferne krvi) neovisno o promjeni arterijskoga tlaka u zdravih osoba (16). U istoj studiji, pojačana antioksidativna obrana dodavanjem vitamina C i vitamina E tijekom sedmodnevnog HS opterećenja obrnula je promjene u oksidativnom statusu i prevenirala oštećenje mikrovaskularne reaktivnosti (PORH i AChID) koji su bili uzrokovani HS dijetom (16).

Uz oksidacijsku neravnotežu, poremećaj endotelne funkcije se povezuje i s aktivacijom imunološkog sustava. U svojoj longitudinalnoj studiji, Buqin Yi i suradnici su pokazali da su ispitanici na dijeti s velikim udjelom soli (HS dijeta) imali veći broj monocita nego ispitanici na dijeti s niskim udjelom soli (LS dijeta) (21). Također, u toj istoj studiji pokazano je kako smanjen unos soli dovodi do smanjene proizvodnje proupalnih citokina (IL-6 i IL-23) i pojačane proizvodnje protuupalnog citokina (IL-10) (21), što se slaže s rezultatima ovoga istraživanja. Matthias i suradnici su u svojoj studiji pokazali da veliki unos soli potiče razvoj protuupalnih Th17 stanica koje proizvode IL-21, ali se njihov razvoj inhibira visokim vrijednostima proupalnih citokina koji rastu zbog velikog unosa soli, odnosno zaključili su da visok unos soli smanjuje broj Th17 stanica, a posljedično tome i vrijednosti IL-21 (30). U svojoj su studiji Jing Ye i suradnici pokazali da, iako spada u protuupalne citokine, vrijednosti IL-22 su povećane kod hipertenzivnih bolesnika (31). Vrijednosti IL-21 i IL-22 nakon dijeta s velikim udjelom soli (HS dijeta) kod ispitanika ovog istraživanja nisu bile statistički značajno promijenjene.

Tijekom upale, leukociti komuniciraju pomoću citokina s aktiviranim endotelnim stanicama, a ta komunikacija je moguća zbog adhezijskih molekula prisutnih na površini leukocita koje se

nazivaju integrini (30, 31). Ključni integrini koji sudjeluju u tim interakcijama su LFA-1, MAC-1 i VLA-4 (32). Mihalj i suradnici u svojoj komparativnoj studiji su ispitali utjecaj kratkotrajne dijeta s velikim udjelom soli na promjenu leukocitne ekspresije integrina VLA-4, LFA-1 i MAC-1 kod zdravih ljudi i Sprague-Dawley štakora (32). Grupa štakora koja je bila na dijeti s visokim udjelom soli (aHS grupa) imala je povećanu učestalost granulocita i smanjenu učestalost limfocita, dok je kod ljudi nakon dijeta s visokim udjelom soli (HS) došlo do smanjene učestalosti intermedijarnih monocita i povećane učestalosti klasičnih monocita (32). Ekspresija CD11b i CD11a integrina kod ljudi nakon dijeta s visokim udjelom soli je bila smanjena, a kod aHS grupe štakora je bila povećana, dok je ekspresija CD49d bila smanjena i kod ljudi i kod štakora (32). Mihalj i suradnici su dokazali da kratkotrajan velik unos soli može promijeniti status aktivacije leukocita i kod ljudi i kod štakora te potiče vaskularnu upalu niskog stupnja (32). Ti rezultati idu u prilog rezultatima ovoga istraživanja, jer je veliki unos soli uzrokovao promjene u serumskim razinama citokina, koji zajedno sa leukocitima i integrinima sudjeluju u upalnom odgovoru.

Chamarthi i suradnici su pokazali povezanost između suprimirane RAS aktivnosti i povećane koncentracije IL-6 nakon dijeta s velikim udjelom soli (33). Studija na eksperimentalnim životinjama Jianga i suradnika je pokazala da povećan unos soli u miševa dovodi do povećanja koncentracije TNF- α (34). U ovome istraživanju postojala je tendencija povećanja serumske koncentracije i IL-6 i TNF- α nakon dijeta s velikim udjelom soli (HS dijeta) iako to povećanje nije doseglo razinu statističke značajnosti. Zanimljivo je da su u svom preglednom radu o stečenoj imunosti u hipertenziji, Micolajczyk i Guziko pisali da upravo proupalni citokini poput IL-17, IFN- γ i TNF- α imaju štetan učinak u patogenezi hipertenzije, dok uloga protuupalnog IL-10 ima zaštitnu ulogu (35), što je u kontekstu rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Razumijevanje učinaka opterećenja solju na imunološki odgovor odnosno razinu sustavne upale u zdravih osoba bi se mogao iskoristiti u dizajnu novih terapijskih pristupa arterijskoj hipertenziji, te bubrežnim i ostalim kardiovaskularnim bolestima. Naime, važnost razumijevanja mehanizama nastanka endotelne disfunkcije i razvoja upale uzrokovane prekomjernim unosom soli neupitno je povezanosa razvojem upalnih i kardiovaskularnih bolesti. Castellon i Bogdanova su u svome istraživanju utvrdili da upala i endotelna disfunkcija (uzrokovana oksidativnim stresom i RAS neravnotežom) dovode do kroničnih upalnih bolesti, koje zajedno sa tradicionalnim čimbenicima rizika dovode do razvoja kardiovaskularnih bolesti (36). Tome u prilog ide i istraživanje u kojem su Versari i suradnici

prikazali endotelnu funkciju kao metu i ciljnu točku djelovanja u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i razvoja oštećenja ciljanih organa (37).

Sažeto rečeno, rezultati ovoga istraživanja su pokazali da sedmodnevan povećan unos kuhinjske soli uzrokuje povećanje serumske koncentracije proupalnih citokina IFN- γ , IL-17A i IL-9, ali i protuupalnog citokina IL-10. S obzirom na ulogu citokina u razvoju upalnog odgovora, ti rezultati idu u prilog važnosti uloge razine sustavne upale u već ranije dokazanom razvoju disfunkcije endotela povezane s prekomjernim udjelom soli u zdravih pojedinaca. Rasvjetljavanje uloge upalnog odgovora u razvoju disfunkcije endotela zbog prekomjernog unosa soli u organizam može doprinijeti prevenciji nastanka, ali i liječenju kardiovaskularnih bolesti.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Sedam dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) uzrokovala je povećanje serumske koncentracije proupalnih citokina IFN- γ , IL-19A i IL-9.

- Sedam dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) uzrokovala je povećanje serumske koncentracije protuupalnog citokina IL-10.

- Sedam dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) nije uzrokovala značajnu promjenu u serumskoj koncentraciji proupalnih citokina TNF- α , IL-6, IL-23.

- Sedam dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) nije uzrokovala značajnu promjenu u serumskoj koncentraciji proupalnih citokina IL-21 i IL-22.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja bio je ispitati učinak kratkotrajne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na serumsku razinu proupalnih (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-9) i protuupalnih (imunomodulatornih) citokina (IL-10, IL-21, IL-22) u zdravih mladih ispitanika oba spola korištenjem Procarta PlexMultiplex Immunoassay testova te metode temeljene na tehnologiji LuminexxMAP (engl. *multi-analyte profiling*).

Ustroj studije: Nerandomizirani kontrolirani klinički pokus.

Ispitanici i metode: U istraživanju je sudjelovalo 24 mladih zdravih ispitanika (12 žena i 12 muškaraca) starosne dobi 18 - 30 godina. 14 dana su ispitanici bili uključeni u dijetni protokol koji je obuhvaćao 7 dana dijeta s malim udjelom soli (LS) (~ 3,5 g soli/dan) i 7 dana dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) (~ 14 g soli/dan). Iz skupljenih uzoraka venske krvi mjerila se serumska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina korištenjem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testova te metode temeljene na tehnologiji LuminexxMAP (engl. *multi – analyte profiling*).

Rezultati: Sedam dana dijeta s velikim udjelom soli uzrokovalo je povećanje serumske koncentracije proupalnih citokina IFN- γ , IL-17A, IL-9, i protuupalnog citokina IL-10 u usporedbi s mjerenjem prije HS dijeta (LS). Serumsku koncentraciju proupalnih citokina TNF- α , IL-6 i IL-23, kao i protuupalnih citokina IL-21 i IL-22 nije se značajno promijenila nakon 7 dana HS dijeta u usporedbi s mjerenjem prije HS dijeta (LS).

Zaključak: Sedmodnevan povećan unos kuhinjske soli uzrokuje povećanje serumske koncentracije proupalnih citokina IFN- γ , IL-17A i IL-9, ali i protuupalnog citokina IL-10 kod zdravih mladih ispitanika neovisno o promjenama arterijskog krvnog tlaka.

Ključne riječi: velik unos soli, endotel, upala, citokini

9. SUMMARY

The effect of short-term high-salt diet on serum concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy individuals

Study aim: The aim of this study was to examine the effect of short-term diet with high salt content (HS) on serum levels of pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-9) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-21, IL-22) in healthy young subjects of both sexes, using ProcartaPlex Multiplex Immunoassay tests and methods based on LuminexMAP (multi-analyte profiling) technology.

Structure of the study: Non-randomized controlled clinical trial

Participants and methods: The study involved 24 young healthy subjects (12 women and 12 men), aged 18 - 30 years. For 14 days, subjects were included in a dietary protocol, which included a 7-day low-salt diet (LS) (~ 3.5 g salt / day) and a 7-day high-salt (HS) diet (~ 14 g salt/day). Serum concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines were measured from collected venous blood samples using ProcartaPlex Multiplex Immunoassay tests and methods based on LuminexMAP (multi-analyte profiling) technology.

Results: The seven-day HS diet significantly increased serum level of proinflammatory cytokines IFN- γ , IL-17A, IL-9, and anti-inflammatory cytokine IL-10 compared to the measurement before HS diet (LS). Serum level of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-23, and anti-inflammatory cytokine IL-21 and IL-22 was not significantly changed following 7-day HS diet compared to the measurement before HS diet (LS).

Conclusion: One week of a high-salt diet caused a significant increase in serum levels of proinflammatory (IFN- γ , IL-17A, IL-9) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in healthy individuals, independently of blood pressure changes.

Keywords: high-salt diet, endothelium, inflammation, cytokines

10. POPIS LITERATURE

1. He FJ, Jenner KH, MacGregor GA. WASH—World Action on Salt and Health. *Kidney Int.* 2010;78(8):745–53.
2. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. *Hrvat Časopis Za Prehrambenu Tehnol Biotehnol Nutr.* 2011;6(3–4):141–7.
3. Jelaković B, Kaić-Rak A, Miličić D, Premužić V, Skupnjak B, Reiner Ž. Manje soli – više zdravlja. Hrvatska inicijativa za smanjenje nosa kuhinjske soli (CRASH). *Liječnički Vijesn.* 2009;131:87–92.
4. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa soli. zdravlje.gov.hr. Dostupno na adresi: <https://zdravstvo.gov.hr/programi-i-projekti/nacionalni-programi-projekti-i-strategije/ostali-programi/strateski-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-soli-3045/3045>. Datum pristupa: 19. 05. 2021
5. Boegehold MA. The Effect of High Salt Intake on Endothelial Function: Reduced Vascular Nitric Oxide in the Absence of Hypertension. *J Vasc Res.* 2013;50(6):458–67.
6. He FJ, MacGregor GA. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens.* 2002;16(11):761–70.
7. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens Greenwich Conn.* 2002;4(4):274–6.
8. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian J-T, Wang E, i sur. Short term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016;34(4):676–84.
9. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, i sur. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol.* 2015;593(24):5313–24.
10. Schweda F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflugers Arch.* 2015;467(3):565–76.
11. Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):1–11.
12. Unger T, Stoppelhaar M. Rationale for double renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *Am J Cardiol.* 2007;100(3A):25J–31J.
13. Barić L, Drenjančević I, Matic A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, i sur. Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44(4):835–47.

14. DuPont JJ, Greaney JL, Wenner MM, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Farquhar WB, i sur. High Dietary Sodium Intake Impairs Endothelium-Dependent Dilation in Healthy Salt-Resistant Humans. *J Hypertens*. 2013;31(3):530–6.
15. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn*. 2012;44((1-4)):135–46.
16. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, i sur. Enhanced Antioxidative Defense by Vitamins C and E Consumption Prevents 7-Day High-Salt Diet-Induced Microvascular Endothelial Function Impairment in Young Healthy Individuals. *J Clin Med*. 2020;9(3). Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141509/>. Datum pristupa: 04. 05. 2021.
17. Wild J, Soehnlein O, Dietel B, Urschel K, Garlichs CD, Cicha I. Rubbing salt into wounded endothelium: sodium potentiates proatherogenic effects of TNF- α under non-uniform shear stress. *Thromb Haemost*. 2014;112(1):183–95.
18. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37.
19. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A, i sur. Salt Intake and Immunity. *Hypertension*. 2018;72(1):19–23.
20. Awobajo FO, Okafor AE, Adebayo HO. The immune system cell populations were increased in salt-induced hypertensive rats without an increase in the serum testosterone level (Short communication). *Physiol Int*. 2018;105(2):110–5.
21. Yi B, Titze J, Rykova M, Feurecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2015;166(1):103–10.
22. Luo T, Ji W, Yuan F, Guo Z, Li Y, Dong Y, i sur. Th17/Treg Imbalance Induced by Dietary Salt Variation Indicates Inflammation of Target Organs in Humans. *Sci Rep*. 2016;6. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926124/>. Datum pristupa: 23. 05. 2021.
23. Luo Y, Xue Y, Wang J, Dang J, Fang Q, Huang G, i sur. Negligible Effect of Sodium Chloride on the Development and Function of TGF- β -Induced CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *Cell Rep*. 2019;26(7):1869-1879.e3.
24. Edwards DG, Farquhar WB. Vascular Effects of Dietary Salt. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(1):8–13.
25. DASH Eating Plan | NHLBI, NIH. Dostupno na adresi: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/dash-eating-plan>. Datum pristupa: 01. 06. 2021.
26. Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P, Parati G. Sodium Intake and Hypertension. *Nutrients*. 2019;11(9). Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6770596/>. Datum pristupa: 03. 06. 2021.

27. He FJ, Tan M, Ma Y, MacGregor GA. Salt Reduction to Prevent Hypertension and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(6):632–47.
28. Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: role of oxidative stress. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3515835/>. Datum pristupa: 16. 06. 2021.
29. Greaney JL, DuPont JJ, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Edwards DG, Farquhar WB. Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: role of oxidative stress. *J Physiol.* 2012;590(21):5519–28.
30. Matthias J, Heink S, Picard F, Zeiträg J, Kolz A, Chao Y-Y, et al. Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *J Clin Invest.* 2020;130(9):4587–600.
31. Ye J, Ji Q, Liu J, Liu L, Huang Y, Shi Y, et al. Interleukin 22 Promotes Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in Angiotensin II–Treated Mice. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(10):e005875.
32. Mihalj M, Matic A, Mihaljević Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:6715275.
33. Chamarthi B, Williams GH, Ricchiuti V, Srikumar N, Hopkins PN, Luther JM, i sur. Inflammation and Hypertension: The Interplay of Interleukin-6, Dietary Sodium, and the Renin–Angiotensin System in Humans. *Am J Hypertens.* 2011;24(10):1143–8.
34. Jiang E, Chapp AD, Fan Y, Larson RA, Hahka T, Huber MJ, i sur. Expression of Proinflammatory Cytokines Is Upregulated in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 2018;9. Dostupno na adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00104/full>. Datum pristupa: 04. 06. 2021.
35. Mikolajczyk TP, Guzik TJ. Adaptive Immunity in Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2019;21(9):68.
36. Castellon X, Bogdanova V. Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis.* 2016;7(1):81–9.
37. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* 2009;32(suppl 2):S314–21.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ana Janić

Datum i mjesto rođenja: 5. siječanj 1998., Vinkovci

Adresa stanovanja: J.J. Strossmayera 58 A, 32236 Ilok

Kontakt: +385994049941

E-mail: anajanic2662@gmail.com

Obrazovanje:

2004. – 2012.

Osnovna škola Julija Benešića

2012. – 2016.:

Gimnazija u Iloku

Smjer: opća gimnazija

2016. – 2019.:

Sveučilište J. J. Strossmayera, Medicinski fakultet u Osijeku

Smjer: preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2019. – danas

Sveučilište J. J. Strossmayera, Medicinski fakultet u Osijeku

Smjer: diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika