Određivanje razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta metodom spektrofotometrije u mladih ispitanika na dijeti s visokim udjelom soli

Vrbanić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:385394

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Ivan Vrbanić

ODREĐIVANJE RAZINE OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA METODOM SPEKTROFOTOMETRIJE U MLADIH ISPITANIKA NA DIJETI S VISOKIM UDJELOM SOLI

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Ivan Vrbanić

ODREĐIVANJE RAZINE OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA METODOM SPEKTROFOTOMETRIJE U MLADIH ISPITANIKA NA DIJETI S VISOKIM UDJELOM SOLI

Završni rad

Osijek, 2018.

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

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Ana Stupin, dr. med.

Rad ima 23 stranice, 0 slika, 4 tablice.

SADRŽAJ

1. **UVOD**.....1

1.1. Prehrana bogata kuhinjskom soli i njezin utjecaj na kardiovaskularno zdravlje.....1

1.2. Sol i endotelna funkcija.....1

1.3. Oksidativni stres.....2

1.4. Antioksidativni sustav.....3

1.4.1. Enzimski antioksidansi.....4

1.4.2. Neenzimski antioksidansi.....4

1.5. Metode za procjenu oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta.....5

1.5.1. Sposobnost reduciranja željeza u plazmi i reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline……...6

2. **HIPOTEZA**.....7

3. **CILJ ISTRAŽIVANJA**.....8

4. **MATERIJALI I METODE**.....9

4.1. Ustroj studije.....9

4.2. Ispitanici.....9

4.3. Metode.....9

4.4. Statističke metode.....11

5. **REZULTATI**.....12

6. **RASPRAVA**.....16

7. **ZAKLJUČAK**.....18

8. **SAŽETAK**.....19

9. **SUMMARY**.....20

10. **LITERATURA**.....21

11. **ŽIVOTOPIS**.....23

POPIS KRATICA

BMI – indeks tjelesne mase

Cu-Zn SOD – bakar cink superoksid-dismutaza

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

GPx – glutation-peroksidaza

HS – dijeta s visokim udjelom soli

MDA – malondialdehid

NOX – NADPH oksidaza

RNS - dušikovi slobodni radikali (engl. Reactive Nitrogen Species)

ROS - kisikovi slobodni radikali (engl. Reactive Oxygen Species)

SOD – superoksid-dismutaza

TBA – tiobarbiturna kiselina

TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. Thiobarbituric acid reactive supstances)

TCA – trikloroctena kiselina

TPTZ – željezo-2,4,6,tripiridil-s-triazina

WHR – omjer struk-bokovi

1. UVOD

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

Glavni je izvor iona natrija za ljudski organizam kuhinjska sol (NaCl) (1). Od samog nastanka ljudske civilizacije kuhinjska se sol koristila u različite svrhe: imala je važnu ulogu u svakodnevnoj prehrani u očuvanju namirnica (kao konzervans), ali se koristila i kao lijek. U liječenju se koristila kao laksativ, zatim u zaštiti protiv infekcija te kod zadebljanja kože. Izumom hladnjaka i zamrzivača smanjila se potreba dodavanja soli hrani kao konzervansa, ali ipak u posljednjih nekoliko desetljeća potrošnja i unos soli u organizam i dalje su izuzetno visoki, posebice u sveprisutnoj prerađenoj hrani (1). Tako najveće koncentracije soli (veću od preporučene) najčešće nalazimo u gotovoj hrani kao što su kruh i pekarski proizvodi, gotove juhe, pizze, gotova jela pa zbog toga treba posebno obratiti pozornost na prehranu. Smatra se da je količina soli koju ljudi unose hranom mnogo veća od one koja je organizmu zapravo potrebna te da je jedan od glavni čimbenika rizika za nastanak i razvoj kardiovaskularnih bolesti koje su vodeći uzročnik smrtnosti u razvijenim zemljama svijeta. Hrvatska se nalazi na trećem mjestu u Europi po količini dnevnog unosa soli. Prosječan je dnevni unos soli u odrasloj populaciji Hrvatske 13,3 ± 4,3 g na dan za muškarce i 10,2 ± 4,2 g na dan za žene, veći je u ruralnim nego u urbanim sredinama te je veći u muškaraca nego u žena. Poražavajuća je činjenica da se nalazimo pri samom vrhu smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti te je zbog toga pokrenuta nacionalna aktivnost smanjenja soli u prehrani („Croatian Action on Salt and Health – CRASH") kako bi se pobudila svijest o tom rastućem problemu (2). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) preporučena doza soli koju bi ljudi na dnevnoj bazi trebali unositi iznosi pet grama.

1.2. Sol i endotelna funkcija

Kuhinjska sol sudjeluje u normalnom radu ljudskog tijela te je važna u fiziološkim procesima kao što je prijenos živčanih impulsa, regulacija krvnog tlaka te održavanje pH u krvi. Prekomjerni unos soli hranom potiskuje djelovanje renin-angiotenzinskog sustava (RAS) koji ima važnu ulogu u regulaciji arterijskoga tlaka, a sve je evidentnije i da je usko povezan s funkcijom endotela. Naime, opće je poznato da visok unos soli u organizam predstavlja važan čimbenik rizika za nastanak, razvoj i progresiju hipertenzije koja je sve

zastupljeniji problem u razvijenom svijetu (3). Ipak, u posljednjih nekoliko desetljeća dokazano je da endotel ne predstavlja samo fizičku barijeru između tkiva i krvi, već je aktivni organ koji sudjeluje u održanju homeostaze unutar organizma. Danas se zna da povećana koncentracija soli u prehrani predstavlja važan čimbenik rizika koji pridonosi smanjenju endotelne funkcije (4), čak i u odsutnosti promjena arterijskoga tlaka. Smanjenje endotelne funkcije i posljedični razvoj endotelne disfunkcije ovisit će o količini soli koja se konzumira te o dugotrajnosti dijete. Brojna su istraživanja (animalna i humana) već potvrdila da kratkotrajan prekomjeran unos soli u organizam dovodi do poremećene vaskularne reaktivnosti i nastanka endotelne disfunkcije u različitim vaskularnim slivovima – i u velikim provodnim i otporničkim krvnim žilama kao i u mikrocirkulaciji. Studije na animalnom modelu donijele su više saznanja o mogućim mehanizmima kojima visok unos soli dovodi do takvog oštećenja, uključujući inhibiciju RAS-a, povećanje oksidativnog stresa (5) kao i razvoja vaskularne upale te endotel-leukociten interakcije. Animalne studije dokazale su da angiotenzin II (ANG II) predstavlja glavnu poveznicu između visokog unosa soli i disfunkcije endotela. Štoviše, istraživanja su pokazala da sniženje razine ANG II (pod utjecajem visokog unosa soli u organizam) dovodi do povećanja oksidativnog stresa (5). Također, stanje povećanog oksidativnog stresa dovodi i do prekomjernoga pobuđivanja imunološkog sustava što može dovesti do endotelno-leukocitne interakcije i nastanka i upale, a koja u konačnici dovodi i/ili pospješuje nastanak i razvoj endotelne disfunkcije. Ipak, vrijeme i mehanizmi kojim će prekomjeran unos soli dovesti do nastanka endotelne disfunkcije te posljedično poremećene vaskularne reaktivnosti još uvijek nije rasvijetljen u humanim studijama.

1.3. Oksidativni stres

Oksidativni se stres definira kao stanje u kojem postoji pomak ravnoteže između staničnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija i to u smjeru oksidacije (6). Oksidativni je stres složen proces, a njegov utjecaj na organizam ovisi o vrsti oksidansa, o sastavu i djelovanju različitih antioksidansa, o sposobnosti oporavka sustava te o mjestu i intenzitetu njihovih stvaranja. U stanju povišenog oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnh radikala koje stanice biološkog sustava zadužene za razgradnju ne mogu razgraditi. Slobodne radikale možemo podijeliti u dvije skupine: endogeni i egzogeni slobodni radikali. Skupini endogenih slobodnih radikala pripadaju slobodni radikali koji su se otpustili prilikom fizičkog napora, nagle promjene tjelesne temperature ili prilikom stresa. Dvije velike skupine

endogenih slobodnih radikala čine kisikovi slobodni radikali (reactive oxygen species - ROS) i dušikovi slobodni radikali (reactive nitrogen species – RNS). Egzogeni slobodni radikali mogu se unijeti hranom, npr. pojedinim pesticidima, lijekovima i vodom. ROS su sveprisutni derivati kisika koji se u normalnim uvjetima stvaraju u svim biološkim sustavima, važni su posrednici rasta stanica, prianjanja, diferencijacije, starenja i apoptoze. Ujedno imaju i ulogu kao drugi glasnici unutar stanica te imaju određenu ulogu u zaštiti stanica domaćina koja uključuje uklanjanje patogena (7). U ROS se ubrajaju superoksid, vodikov peroksid, „singlet“ kisik, ozon i organski peroksidi, dok će u patološkom postojati različiti izvori ROS-a. Dakle, ROS nastaje u svim normalnim uvjetima aerobnog metabolizma unutar stanica te će se osloboditi svakom reakcijom koja uključuje kisik. ROS se u normalnim uvjetima iz stanica uklanja antioksidativnim mehanizmima. U patološkim stanjima prekomjernog stvaranja ROS-a ili narušenih antioksidativnih mehanizama dolazi do njihova nakupljanja i nastanka stanja koje se naziva oksidativni stres (7). ROS se ubrajaju u visoko reaktivne molekule zbog nesparenog elektrona, odnosno slobodne valencije. U visokim koncentracijama ROS dovodi do oštećenja staničnih struktura (čak i apoptoze) te kao rezultat nastaje pomak u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa (7).

1.4. Antioksidativni sustav

Antioksidansi se mogu sintetizirati u stanicama, ali najčešće se u organizam unose hranom ili u obliku vitaminskih i sličnih suplemenata. Proces suzbijanja štetnih učinaka slobodnih radikala i oksidativnog stresa odvija se u stanici. Općenito antioksidativni mehanizam dijeli se na enzimski i neenzimski. U enzimski antioksidativni sustav ubrajaju se enzimski antioksidansi kao što su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza i glutation-peroksidaza. Enzimski mehanizam predstavlja primarnu crtu antioksidativne zaštite te uklanja slobodne radikale. S druge strane, neenzimski antioksidativni sustav predstavlja sekundarnu crtu zaštite. U njega se svrstavaju askorbinska kiselina (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) te određeni metali u tragovima. Antioksidativni su mehanizmi nužni u održavanju redoks ravnoteže unutar stanica te imaju glavnu ulogu u uklanjanju ROS-a.

1.4.1. Enzimski antioksidansi

Enzimski antioksidativni mehanizam obuhvaća enzime čija je funkcija uklanjanje slobodnih radikala iz svih stanica. Superoksid-dismutaze (SOD) enzimi su koji kataliziraju reakciju pretvorbe superoksidnog aniona u vodikov peroksid (7). U stanju oksidativnog stresa bitna su dva tipa tog enzima: bakar-cink superoksid-dismutaze (Cu-Zn SOD) i mangan superoksid-dismutaze (MnSOD). Cu-Zn SOD enzim je koji ima dvije izoforme: SOD1 ili unutarstanični oblik koji je smješten unutar matriksa mitohondrija i izvanstanični EC-SOD ili SO3 oblik. Odgovor stanice na oksidativni stres javit će se u obliku povećanja koncentracije izoformi SOD-a. Dokazano je da aktivnost SOD1 i SOD3 raste do odrasle dobi, dok su u određenim staničnim organelima inaktivni. Povećana aktivnost SOD1 često je povezana s prekomjernom sintezom mRNA, a povećanje ROS-a u arterijama za odgovor će imati povećanje SOD3 (7). Mangan superoksid-dismutazu (MnSOD ili SOD2) moguće je pronaći u tetramernom ili dimernom obliku ovisno o organizmu u kojem je smješten. SOD2 ima funkciju kao odgovor tijela na ishemiju, dok pojedine bolesti mogu sniziti njegovu razinu ili povećati aktivnost kao odgovor na pojavu ROS-a. U stanju oksidativnog stresa najveću aktivnost pokazuje Cu-Zn SOD, a najmanju aktivnost ima izvanstanični EC-SOD.

Važnu ulogu u antioksidativnom mehanizmu ima i glutation-peroksidaza (GPx) koji može biti u obliku koji je ovisan i neovisan o selenu. U sisavaca je otkriveno ukupno četiri tipa GPx-a, a funkcija im je smanjenje razine vodikova peroksida. Glutation je bitan u održavanju ravnoteže unutar organizma zbog toga što mu je jedna od glavnih funkcija vraćanje vitamina važnih za organizam u aktivan oblik. Djelovanjem GPx-a povećava se prianjanje krvnih stanica na endotel, a odsutnost aktivnosti određenog tipa GPx-a može dovesti do smanjenja protoka krvnih žila (7). Još je jedan bitan antioksidativni enzim katalaza koja se može pronaći u jetri, srcu i mišićima. Katalaza sadrži Fe^{3+} u svojem aktivnom mjestu te je građen od četiriju podjedinica. Predstavlja bitnu ulogu u uklanjanju H_2O_2 tako što ga pretvara u kisik i vodu (7).

1.4.2. Neenzimski antioksidansi

Važnu ulogu u obrani organizma od štetnih djelovanja oksidativnog stresa imaju i neenzimski antioksidansi. Uloga je vitamina C kao antioksidansa konverzija slobodnih radikala vitamina E, kočimbenika u biosintezi kolagena, te ima bitnu ulogu u liječenju skorbuta. Vitamin E pak služi kao aktivator apoptoze pojedinih stanica (8). Zbog nedostatka posljednjeg enzima u biosintetskom stvaranju vitamina C, potrebna je oralna konzumacija da

bi ga se nadomjestilo. Vitamin C pripada skupini vitamina topivih u vodi, a može se pronaći u pojedinom voću i povrću te se zbog jake antioksidativne funkcije upotrebljava u liječenju ishemija srca i Parkinsonove bolesti. Pojedine animalne studije dokazale su da vitamin C doprinosi razvitku proteina koji imaju ulogu u kontrakciji mišića srca (9,10). Bitan je čimbenik u zaštiti membranskih komponenti vitamin E. Kao antioksidans pripada grupi antioksidansa topivih u mastima (10,11). Količin vitamina E usko korelira s antioksidativnim kapacitetom vitamina C. Nemogućnost apsorbiranja vitamina E javlja se u pojedinih bolesti zbog kojih su smanjene razine unutar organizma (12). Glutation (GSH) ima važnu ulogu u uklanjanju H_20_2 te je sučimbenik glutation peroksidaze. Sudjeluje u interakciji s antiapoptotskim i proapoptotskim proteinima pomoću čega štiti stanicu od apoptoze (8). U reakciji redukcije molekularnog kisika sudjeluje NADPH oksidaza (NOX) koja je enzimski kompleks te služi kao donor elektrona čime dolazi do stvaranja ROS-a. Razlikuje se ukupno pet podtipova NOX enzima koji su zastupljeni u značajnoj količini unutar pojedinih organa (13). NOX enzimi stvaraju prihvatljivu koncentraciju ROS-a u fiziološkim uvjetima koja je potrebna u normalnoj signalizaciji stanice. NOX4 enzim u stanju oksidativnog stresa može prouzročiti smanjenje krvnog tlaka te ujedno dovesti do plućnih oboljenja (7).

1.5. Metode procjene oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Poznato je da pojava oksidativnog stresa usko korelira s pojavom i razvojem različitih patoloških stanja, međutim razina oksidativnog stresa još uvijek nije rutinski parametar koji se određuje pri dijagnozi bolesti. Najveći problem u tome predstavljaju nestandardizirane metode mjerenja. Uvid u utjecaj oksidativnog stresa može se dobiti mjerenjem razine ROS-a, enzimskih komponenti te ispitivanjem oštećenja na staničnim komponentama. Jedna od tehnika koja se koristi za procjenu razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta jest spektrofotometrija. Spektrofotometrijom moguće je ispitati i oštećenja prouzrokovana lipidnom peroksidacijom te odrediti oštećenja unutar baza nukleinskih kiselina koja su nastala djelovanjem oksidativnog stresa. Uzorak za tu tehniku jest venska krv. Jedna od metoda koja se koristi za mjerenje oksidativnog stresa, a temelji se na spektrofotometriji jest mjerenje koncentracije tiobarbituratskih reaktivnih spojeva (TBARS), dok s druge strane za mjerenje antioksidativnog kapaciteta određuje se sposobnost reduciranja željeza u plazmi (FRAP) (14).

1.5.1. Sposobnost reduciranja željeza u plazmi i reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline

Kratak poluživotni vijek kisikovih reaktivnih vrsta te nestabilnost i reaktivnost predstavljaju značajan problem u otkrivanju radikala. Ozljede te *in vivo* oštećenja interpretiraju se TBARS metodom. Metoda se zasniva na reakcijskim svojstvima tiobarbiturne kiseline. I nterakcijom slobodnih radikala sa staničnim komponentama uslijedit će reakcija lipidne peroksidacije gdje će jedan od krajnjih produkata – malondialdehid (MDA) reagirati s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). TBARS test može otkriti razinu lipoperoksidacijskih aldehida, ali zbog raznih supstituenata unutar plazme može doći do interferencije te se smanjiti učinkovitost TBARS testa pa je zbog toga razina specifičnosti testa niska (15).

Za mjerenje razine antioksidativnog kapaciteta plazme koristi se FRAP metoda. Pri smanjenoj razini pH unutar plazme doći će do redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt (16). FRAP metoda odvija se pri pH = 3,6 da bi se zadržala topivost željeza (16). FRAP test naziva se i jednostavni test zbog jeftine opreme i reagensa za provođenje ispitivanja te obojenje usko korelira s količinom željeza u ispitivanom uzorku.

Spektrofotometrijsko mjerenje određivanja oksidativnog stresa (TBARS) zasniva se mjerenjem na valnoj duljini od 572 nm i 532 nm, a apsorbancijsko mjerenje (FRAP) na 593 nm daje uvid u razinu antioksidativnog statusa. Apsorbancijske vrijednosti zatim se uspoređuju sa standardnom krivuljom, a na učinkovitost obaju testova utječe razina pH ispitivanoga uzorka (15,16).

2. HIPOTEZA

Dijeta s visokim udjelom kuhinjske soli u razdoblju od tjedan dana dovest će do povećanja razine oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativnog kapaciteta u zdravih mladih ispitanika.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja odrediti utjecaj dijete s visokim udjelom soli u trajanju od tjedan dana na stvaranje reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) kao mjere oksidativnog stresa i na sposobnost reduciranja željeza u plazmi (FRAP) kao mjere antioksidativnog kapaciteta metodom spektrofotometrije u zdravih mladih pojedinaca.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao nerandomizirani kontrolirani klinički pokus. Mjerenja će se obaviti prije i poslije dijetnog protokola. Ova je studija dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2016-06-8744) i odobrilo ju je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/15-08/08, ur. broj: 2158-61-07-15-68).

4.2. Ispitanici

Analizirani su uzorci 20 ispitanika koji su regrutirani putem oglasa na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Studija uključuje deset mladih zdravih žena i deset mladih zdravih muškaraca. Provedeno je ukupno 60 posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LKFFS), a svih je 60 uzoraka obrađeno u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju. Isključni su kriteriji za sudjelovanje: kardiovaskularna oboljenja, šećerna bolest, bubrežno oštećenje, hiperlipidemija te oralna konzumacija pojedinih lijekova koji mogu naštetiti funkciji endotela. Prije samog početka istraživanja ispitanici su detaljno obaviješteni o svakom koraku istraživanja te su potpisali informirani pristanak.

4.3. Metode

Istraživanje je trajalo 15 dana, svi su ispitanici tri puta posjetili Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LKFFS). Prvi posjet bio je prilikom ulaska u studijski protokol, drugi posjet nakon tjedan dana dijete s niskim udjelom soli (LS), a treći posjet nakon tjedan dana dijete s visokim udjelom soli (HS). Prvih tjedan dana studije svi su ispitanici unosili jednaku količinu kuhinjske soli, oko 2,3 g dnevno, dok su drugi tjedan unosili 14 g soli dnevno. U drugom tjednu količina soli koju su uzimali iznosila je 2,3 g dnevno, dok se ostatak od 11,7 g nadomjestio u obliku praha soli.

Pri svakom studijskom posjetu ispitanicima su bili izmjereni arterijski tlak i puls te su određivani indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI) i omjer struk-bokovi (engl. waist-hip ratio, WHR). Mjerenja arterijskog tlaka i pulsa učinjena su na početku svakog posjeta, nakon 15 minuta u sjedećem položaju. Za mjerenje arterijskog tlaka upotrijebljen je poluautomatski oscilometar (OMRON, Osaka, Japan). Za konačnu vrijednost arterijskog tlaka i pulsa uzet je prosjek triju ponavljanih mjerenja.

Ispitanicima je pri svakom posjetu uzet uzorak venske krvi za spektrofotometrijska mjerenja. Uzorak krvi uzet je nakon 30 minuta odmaranja u ležećem položaju. Prije uzorkovanja potrebno je prethodno dezinficirati mjesto uboda pomoću 70 % etanola kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka, a time i neželjene interferencije prilikom spektrofotometrijskog mjerenja. Pri uzorkovanju se koristi podveza kako bi s omogućila vidljivost vena te su uzeti uzorci seruma u epruvetu s crvenim čepom, tj. vacutainer. Vacutainer je plastična cjevčica s vakuumom koja omogućuje jednostavno uzorkovanje te prilikom transporta onemogućuje promjene atmosferskih uvjeta koji mogu naštetiti uzorku. Unutrašnjost vacutainera obložena je gelom kako bi se ubrzalo zgrušavanje krvi. Epruveta s ljubičastim čepom služi za uzimanje plazme. Unutar epruvete prisutan je antikoagulans EDTA. Prilikom uzorkovanja više od polovice epruvete bilo je popunjeno zbog toga što bi u epruvetama s nedovoljnom količinom uzorka došlo do prekomjernog razrjeđivanja uzorka te je takav uzorak neadekvatan. U vremenu od dva sata nakon uzorkovanja epruvete s crvenim čepom podvrgnute su postupku centrifugiranja. Centrifugiranje se provodi 15 minuta na 5000 rpm da bi se dobio uzorak u kojem su stanice odvojene od seruma koji su se daljnjim postupcima obrađivali da bi se dobili traženi analiti.

Uz uzorkovanje krvi ispitanici su prikupljali i 24-satni urin u kojem se određivala koncentracija Na, K, uree i koeficijenta kreatinina kako bi se kontroliralo pridržavanje zadanog dijetnog protokola. Ispitanici su bili informirani o pravilnom prikupljanju i skladištenju urina jer neodgovarajuće uzorkovanje i skladištenje može dovesti do razmnožavanja mikroba unutar urina što će narušiti krajnju koncentraciju ispitivanih analita.

Za mjerenje biljega oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta koristila se spektrofotometrijska metoda. Metoda mjerenja reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline naziva se TBARS metoda. TBARS metodom mjeri se proizvodnja produkata lipidne peroksidacije u uzorcima seruma. Zbog vezanja i drugih tvari na tiobarbituratnu kiselinu, specifičnost je toga testa mala pa se zbog toga u ispitivani uzorak dodavao određeni volumen trikloroctene kiseline koja je omogućila taloženje proteina. Otpipetirano je 500 µL uzorka i 1mL TCA u falconicu od 15 mL. Uzorak je centrifugiran pet minuta na 5000 okretaja pri temperaturi od 4 °C. Nakon taloženja proteina otpipetirano je 750 µL supernatanta i dodalo se 750 µL TBA u falconicu od 15 mL. Uzorak se zatim kuhao 10 minuta na 100 °C u vodenoj kupelji te je nakon toga ohlađen na ledu. Uređaj pomoću kojega se mjerila apsorbancija ispitivanog uzorka naziva se nanofotometar P300 UV/VIS, IMPLEN. Mjerenje na nanofotometru provodilo se na valnoj duljini od 572 nm i 532 nm te je očitan blank. Kao

blank u TBARS metodi koristio se TBA. Dvostruko mjerenje provodilo se kako bi se oduzele apsorbancijske vrijednosti te dobio apsorbancijski maksimum kompleksa TBA : MDA. Dobiveni rezultati u TBARS metodi uspoređeni su sa standardnom krivuljom gdje se kao standard koristio malondialdehid (uM MDA) (Oakes et al. 2003).

Za mjerenje antioksidativnog kapaciteta plazme koristila se metoda mjerenja sposobnosti reduciranja željeza u plazmi - FRAP metoda (engl. Ferric Reducing Ability of Plasma). Fe^{3+}-TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin) u prisutnosti antioksidansa reducirao se u Fe^{2+}-TPTZ čime se smanjivalo plavičasto obojenje. Određivan je pH acetatnog pufera koji treba iznositi 3,6. Otpipetirano je 1,125 mL reagensa u osam kiveta. Unutar četiri minute bilo je potrebno dodati 37,5 µL uzorka u kivete i to u razmaku od 30 sekundi u svaku epruvetu. Nakon što su istekle četiri minute izmjerila se apsorbancija prvog uzorka te nakon 30 sekundi izmjerena je apsorbancija svakog sljedećeg uzorka. Apsorbancija uzorka mjerila se na 593 nm pomoću nanofotometra P300 UV/VIS IMPLEN s mMTroloksom kao standardom (BENZIE et al. 1996).

4.4 Statističke metode

Rezultati istraživanja iskazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Dobiveni rezultati nakon razdoblja ispiranja i dijete s visokim udjelom soli uspoređivali su se t-testom za zavisne uzorke (engl. paired t-test). Pomoću Wilcoxonova testa sume rangova (engl. Wilcoxon rank-sum test) analizirane su varijable kojima raspodjela nije unutar normalnih intervala. Za statističku analizu rezultata koristila se SigmaPlot (inačica 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA.), a statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 20 zdravih mladih ispitanika koji su bili na dijeti s visokim udjelom soli u razdoblju od tjedan dana. Od ukupnog broja ispitanika, 10 (50 %) je žena i 10 (50 %) muškaraca. Središnja je dob ispitanica 20 ± 2, a ispitanika 20 ± 1.

Tablica 1. prikazuje podatke o dobi ispitivanih žena i muškaraca te podatke o antropometrijskim obilježjima ispitanika prije i nakon prehrane s visokim udjelom soli. Mjerena antropometrijska obilježja su BMI (indeks tjelesne mase) i WHR (omjer struk-bokovi) kod kojih nije bilo značajne promjene prije i nakon HS dijete. Rezultati unutar svake tablice izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika

Spol	žene			muškarci		
	prije HS-a	poslije HS-a	P	prije HS-a	poslije HS-a	P
Broj ispitanika	10			10		
Dob (godine)	20 ± 2			20 ± 1		
BMI (kg/m^2)	22,2 ± 3,6	22,3 ± 3,9	0,43	25,2 ± 4,7	25,4 ± 4,7	0,08
WHR	0,72 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,31	0,79 ± 0,06	0,79 ± 0,05	0,16

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).

HS – prehrana s visokim udjelom soli; BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struk-bokovi; P vrijednost – vjerojatnost (engl. probability)

t-test za zavisne uzorke

Tablica 2. prikazuje promjene arterijskog tlaka i pulsa prije i nakon HS dijete. Vrijednosti sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg tlaka te pulsa nisu bile značajno promijenjene nakon zadanog visokodijetnog protokola.

Tablica 2. Promijene arterijskog tlaka i pulsa u ispitanika

Spol	Žene			muškarci		
	prije HS-a	poslije HS-a	P	prije HS-a	poslije HS-a	P
SPB (mmHg)	110 ± 7	111 ± 9	0,21	126 ± 5	127 ± 6	0,36
DBP (mmHg)	75 ± 7	74 ± 8	0,80	78 ± 7	77 ± 4	0,49
MAP (mmHg)	86 ± 6	87 ± 8	0,59	94 ± 6	94 ± 3	0,78
HR (otkucaja u min)	80 ± 15	77 ± 11	0,71	75 ± 11	73 ± 11	0,70

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).

SBP – sistolički arterijski tlak; DBP – dijastolički arterijski tlak; MAP – srednji arterijski tlak; HR – puls; HS – prehrana s visokim udjelom soli; P vrijednost – vjerojatnost (engl. probability)

t-test za zavisne uzorke

Nakon HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu bila je statistički značajno povećana kao i izračunat dnevni unos natrija što je potvrdilo da su se ispitanici pridržavali dijetnog protokola. Ostali obilježja u 24-satnom urinu nisu bili značajno promijenjeni nakon provedenog protokola (Tablica 3.).

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24 h urinu ispitanika

Spol	žene			muškarci		
	prije HS-a	poslije HS-a	P	prije HS-a	poslije HS-a	P
Volumen 24 h urina (mL)	1282 ± 555	1368 ± 637	0,51	1198 ± 621	1370 ± 621	0,28
Natrij u 24 h urinu (mmol/Du)	88,1 ± 38,8	210 ± 70,5*	0,001	113,1 ± 55,6	264,6 ± 102,2 *	< 0,001
Izračunat unos NaCl (g/dan)	5,1 ± 2,3	12,2 ± 4,1*	0,001	6,6 ± 3,2	15,5 ± 5,9*	< 0,001
Kalij u 24 h urinu (mmol/dU)	37,8 ± 13,9	41,7 ± 24,1	0,25	52,2 ± 24,9	65,8 ± 26,6	0,13
Urea u 24 h urinu (mmol/dU)	198,7 ± 69,5	223,6 ± 110,7	0,37	334 ± 108,9	434,2 ± 245,9	0,25
Koeficijent kreatinina u 24 h urinu (µmol/24h/ kg)	152,4 ± 36,2	140 ± 48,7	0,52	171 ± 51,8	195 ± 84,9	0,42

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).
*P < 0,05 prije vs. poslije HS dijete; HS – prehrana s visokim udjelom soli; P vrijednost – vjerojatnost (engl. probability)
t-test za zavisne uzorke

Tablica 4. prikazuje vrijednosti oksidativnog stresa mjerenih TBARS metodom te vrijednosti antioksidativnog kapaciteta mjerenih FRAP metodom. Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli doveo je do statistički značajnog povišenja razine oksidativnog stresa u mladih žena, a u muškaraca je postojala tendencija porasta, ali bez statističke značajnosti. Nadalje, tjedan dana dijete s visokim udjelom soli doveo je do statistički značajnog smanjenja

antioksidativnogkapaciteta u zdravih žena, dok je u muškaraca postojala tendencija sniženja bez statističke značajnosti.

Tablica 4. Antioksidativni kapacitet (FRAP) i oksidativni stres (TBARS) u ispitanika.

			P			P
Spol	žene			muškarci		
Broj ispitanika	10			10		
	prije HS-a	poslije HS-a		prije HS-a	poslije HS-a	
FRAP (mM/L TE)	0,62 ± 0,36	0,56 ± 0,35*	0,05	0,47 ± 0,09	0,44 ± 0,05	0,47
TBARS (µm/MDA)	0,53 ± 0,10*	0,61 ± 0,11	0,04	0,53 ± 0,21	0,63 ± 0,26	0,19

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).
HS – prehrana s visokim udjelom soli; FRAP – sposobnost reduciranja željeza u plazmi; TBARS – reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline; P vrijednost – vjerojatnost (engl. probability); * P < 0,05 prije vs. poslije HS dijete
t-test za zavisne uzorke

6. RASPRAVA

Kuhinjska sol ili natrijev klorid spoj je koji je potreban ljudskom organizmu u točno određenim količinama. Preporučena doza soli koju bi ljudi na dnevnoj bazi trebali unositi u organizam iznosi pet grama. Količina soli koja se svakodnevno unosi u organizam gotovo je dvostruko veća od preporučenih vrijednosti u gotovo svim razvijenim dijelovima svijeta. Prekomjeran unos soli predstavlja glavni čimbenik rizika za nastanak i razvoj kardiovaskularnih bolesti. U razvijenim zemljama svijeta kardiovaskularna oboljenja jedna su od vodećih uzročnika smrtnosti. Prekomjeran unos soli prepoznat je kao rizični čimbenik za razvoj mnogih kroničnih bolesti kao što su arterijska hipertenzija, cerebrovaskularni incident, osteoporoza i sl. (17). U posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su potvrdila da prekomjeran unos soli može dovesti do razvoja endotelne disfunkcije koja se očituje kao poremećena vaskularna reaktivnost i to u odsutnosti promjena arterijskoga tlaka. Iako još uvijek nisu u potpunosti rasvijetljeni mehanizmi kojima sol uzrokuje endotelnu disfunkciju u odsutnosti promjena arterijskoga tlaka, nedavna istraživanja na animalnom modelu pokazuju da povišena razina oksidativnog stresa ima važnu ulogu u tom patofiziološkom algoritmu.

Do stanja povišenog oksidativnog stresa dolazi zbog prekomjernog stvaranja ROS-a i/ili zbog smanjenja razine antioksidansa što će dovesti do prekomjerne osjetljivosti tijela na djelovanje ROS-a (18). Da bi tijelo suzbilo patogeno djelovanje ROS-a, ono stvara antioksidativni obrambeni sustav koji se može podijeliti na enzimski i neenzimski mehanizam. Smanjena aktivnost antioksidativnih enzima najčešće je povezana s težim zdravstvenim oboljenjima i pretilošću te su pojedine studije dokazale da povećana koncentracija ROS-a koja dovodi do oksidativnog stresa predstavlja glavni mehanizam koji dovodi do poremećaja u metabolizmu (17).

Dijagnoza oksidativnog stresa zasniva se na određivanju razine lipidne peroksidacije otkrivanjem prisutne količine tiobarbituratne kiseline pomoću TBARS metode, dok se dijagnoza antioksidativnog kapaciteta zasniva na količini kojom je željezo sposobno reducirati se u plazmi pomoću FRAP metode. Obje metode zasnivaju se na spektrofotometrijskim mjerenjima. Klinička dijagnostika oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta minimalno je invazivna te je metoda jednostavna za izvedbu. Preduvjet je točne dijagnoze pravilno uzet, pohranjen i pripremljen uzorak za analizu. Prije samoga uzorkovanja za analizu potrebno je ispitanike pravilno informirati o istraživanju i čimbenicima koji mogu narušiti krajnji rezultat analize.

Cilj ovog istraživanja bilo je odrediti dovodi li dijeta s povećanim udjelom soli do pojave povećane razine oksidativnog stresa i/ili smanjenja antioksidativnog kapaciteta u populaciji zdravih mladih ljudi i u odsutnosti promjena arterijskog tlaka. Glavni je rezultat ovog istraživanja potvrdio da je tjedan dana dijete s visokim udjelom soli dovelo do značajnog povećanja razine oksidativnog stresa (mjerenog TBARS metodom) kao i do smanjenja antioksidativnog kapaciteta (mjerenog FRAP metodom) neovisno o promjenama arterijskoga tlaka u zdravih žena, a da je ista tendencija postojala u zdravih mladih muškaraca (iako bez statističke značajnosti). Također, u ispitanika nije bilo značajne promjene u tjelesnoj težini i u omjeru struk-bokovi nakon dijete s visokim udjelom soli. Analiza uzoraka 24-satnog urina pokazala je da su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola. Treba naglasiti da je ovo istraživanje provedeno na još uvijek maloj skupini zdravih mladih ispitanika te zbog toga treba ostaviti otvorenu mogućnost da promjene budu značajnije s povećanjem broja ispitanika.

Uzimajući u obzir sve navedeno, može se reći kako tjedan dana dijete s visokim udjelom soli dovodi do povećanja razine oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativnog kapaciteta u zdravih mladih ispitanika. Upravo promjene u oksidativnom stresu mogu biti jedan od mogućih mehanizama koji u konačnici dovode do nastanka endotelne disfunkcije uslijed prekomjernog unosa soli u organizam, a koji su neovisni o promjenama krvnog tlaka.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Tjedan dana dijete s visokim udjelom kuhinjske soli doveo je do značajnog povećanja razine oksidativnog stresa (mjerenog TBARS metodom) u zdravih mladih žena te tendencije njegova povećanja u zdravih mladih muškaraca.

- Tjedan dana dijete s visokim udjelom kuhinjske soli doveo je do značajnog smanjenja antioksidativnog kapaciteta (mjerenog FRAP metodom) u zdravih mladih žena te tendencije njegova smanjenja u zdravih mladih muškaraca.

- Nakon dijete s visokim udjelom soli nije bilo značajne promjene indeksa tjelesne mase i omjera struk-bokovi u ispitanika obaju spolova.

- Promjene razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta uslijed dijete s visokim udjelom soli dogodile su se neovisno o promjenama arterijskoga tlaka u ispitanika obaju spolova.

- Analiza 24-satnog urina potvrdila je da su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj dijete s visokim udjelom soli u trajanju od tjedan dana na stvaranje reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) kao mjere oksidativnog stresa i na sposobnost reduciranja željeza u plazmi (FRAP) kao mjere antioksidativnog kapaciteta metodom spektrofotometrije u zdravih mladih pojedinaca.

Ustroj studije: Studija je nerandomizirani kontrolirani klinički pokus – ispitanicima su sva mjerenja napravljena prije i poslije zadanog dijetnog protokola te su sami sebi bili kontrola.

Materijali i metode: U istraživanju je sudjelovalo 10 mladih zdravih žena i 10 mladih zdravih muškaraca koji su tri puta posjetili Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta. Prvi posjet bio je prilikom ulaska u studijski protokol, drugi posjet nakon tjedan dana dijete s niskim udjelom soli (LS), a treći posjet nakon tjedan dana dijete s visokim udjelom soli (HS). Prilikom svakog posjeta uzet je uzorak krvi i 24-satnog urina. Spektofotometrijskom TBARS metodom određena je razina oksidativnog stresa, a FRAP je metodom određen antioksidativni kapacitet.

Rezultati: Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli doveo je do značajnog povećanja razine oksidativnog stresa (mjerenog TBARS metodom) kao i do smanjenja antioksidativnog kapaciteta (mjerenog FRAP metodom) neovisno o promjenama arterijskoga tlaka u zdravih mladih žena, a postojala je tendencija istih promjena u zdravih mladih muškaraca.

Zaključak: Kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli dovodi do povećanja oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativnog kapaciteta u zdravih mladih ispitanika neovisno o promjenama arterijskoga tlaka.

Ključne riječi: antioksidativni kapacitet; FRAP; oksidativni stres; TBARS; visok unos soli

9. SUMMARY

Measurement of oxidative stress level and antioxidant capacity in young healthy individuals on high-salt diet using spectrophotometry method

Objectives: The aim of this study was to determine the effect of high-salt diet, over a week period, on the production of reactive substances thiobarbituric acid (TBARS) as oxidative stress measures and ability to reduce plasma iron (FRAP) as measures of antioxidant capacity by spectrophotometry in healthy young individuals.

Study design: Non-randomized controlled clinical trial; all measurements were made on the respondents before and after the given diet protocol, and they served as a control group.

Material and methods: The study included 10 young healthy women and 10 young healthy men who had visited the Laboratory for Clinical Physiology and Sports Physiology three times. The first visit was during entering a protocol, a second visit was after a week on a low-salt diet (LS) and the third one happend after a week on a high-salt diet. A sample of blood and 24-hours urine was taken from all respondents during each visit. The spectrophotometric TBARS method determines the level of oxidative stress while the FRAP method has determined the antioxidant capacity.

Results: A week on a high-salt diet, resulted with a significant increase of oxidative stress (measured by the TBARS method) as well as reduction of antioxidative capacity (measured by the FRAP method), regardless of changes in arterial pressure in healthy young women. Futhermore, there was a tendency of the same changes in healthy young men.

Conclusion: A short-term diet with high-salt content leads to an increase of oxidative stress and a reduction of antioxidant capacity in healthy young respondents, regardless of changes in the arterial pressure.

Key words: antioxidant capacity; FRAP; high-salt diet; TBARS; oxidative stress

10. LITERATURA

1. MacGregor GA, de Wardener HE. Salt, Diet and Health. Cambridge University Press. 1998;81:173-174.
2. Jelakovic B, Vrdoljak A, Pecin I, Buzjak V, Karanovic S, Ivkovic V. Less salt more health. Croatian Action on Salt and Health (CRASH). J Hypertens Res. 2016;2(2):61-68.
3. Čavka A, Čosić A, Jukić I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA i sur. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. The Journal of Physiology.2015;593:5313-5324.
4. 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. Physiology2012;590:5519-5528.
5. Boegehold MA, Drenjančević I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. Comprehensive Physiology. 2016;6;215-254.
6. Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015;461:441-444.
7. Incalza MA , D'Oria R , Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. 2018;1-19.
8. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 2012;5(1): 9-19.
9. Shang T, Liu Z, Liu CJ. Antioxidant Vitamin C attenuates experimental abdominal aortic aneurysm development in an elastase-induced rat model. Journal of Surgical Research. 2014;188:316-325.
10. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. dopunjeno izmijenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada: 2018.
11. Niki E, Traber MG. A History of Vitamin E. Annals of Nutrition & Metabolism. 2012;61:207-212.
12. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
13. Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-β-mediated fibrotic responses. Redox biology. 2014;2:267-272.

14. Katalinić V, Salamunić I, Pažanin S, Mulić R, Milišić M, Ropac D. The Antioxidant Power and Level of Lipid Peroxidation Products in the Sera of Apparently Healthy Adult Males. 2007;1:165-171.
15. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and peroxides in human plasma. Original Contribution. 2001;31:331-335.
16. Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power“: The FRAP Assay. Analitycal biochemistry. 1996;239:70-76.
17. Hutcheson R, Rocic P. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. Experimental Diabetes Research. 2012:9. doi: 10.1155/2012/271028.
18. Doshii SB, Agarwal a. The role of oxidative stress in menopause. Journal of Midlife Health. 2013;4:140-146.

11. ŽIVOTOPIS

Ivan Vrbanić

Datum i mjesto rođenja: 10. siječnja 1996., Muhlacker

Adresa stanovanja: Franje Jungerta 33, 31 221 Josipovac, Republika Hrvatska

e-pošta: ivan.vrbanic1996@gmail.com

Obrazovanje:

- rujan 2010. – lipanj 2014. : Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića Osijek
- rujan 2014. – danas: preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku