

Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u leukocitima periferne krvi u mladih zdravih ispitanika na dijeti s visokim udjelom soli

Miotić, Ana

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:152:103711>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Ana Miotić

**STVARANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH
SPOJEVA U LEUKOCITIMA
PERIFERNE KRVI 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**

Ana Miotić

**STVARANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH
SPOJEVA U LEUKOCITIMA
PERIFERNE KRVI 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

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

Rad ima 21 list, 4 tablice i 0 slika.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, prije svega, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ani Stupin, dr. med. na pruženoj pomoći, strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovog rada.

Hvala Vam na svemu!

Zahvaljujem Nikolini Bilić-Dujmušić, mag. prot. nat. et amb. koja je svojim savjetima olakšala pisanje rada.

Neizmjereno hvala mojim roditeljima. Bez vas i vaše bezuvjetne potpore, u punom smislu te riječi, ovaj bi put bio mnogo teži i trnovitiji.

Hvala mojem bratu. Ti si moja snaga.

Hvala ostaloj obitelji na velikoj potpori ovih godina kao i svim mojim prijateljima koji su uvijek bili uz mene, u padu i uspjehu.

„Labor omnia vincit!“

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1.Štetni učinci povećanog unosa soli hranom.....	1
1.2.Razvoj endotelne disfunkcije.....	2
1.3.Oksidativni stres	2
1.3.1. Povećano stvaranje ROS-a.....	3
1.3.2. Antioksidansi – enzimski i neenzimski mehanizmi.....	4
1.4.Metode za izravno mjerenje redoks stanja stanica	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	7
4. MATERIJAL I METODE.....	8
4.1.Ustroj studije	8
4.2.Ispitanici	8
4.3.Metode.....	8
4.3.1. Protočna citometrija	9
4.4.Statističke metode	10
5. REZULTATI	11
5.1.Opći podatci o dobi ispitanika, izmjerenim vrijednostima struka i indeksu tjelesne mase.....	11
5.2.Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa prije i poslije protokola	12
5.3.Izmjerena obilježja 24-satnog urina	12
5.4.Vrijednosti diklorodihidrofluorescein diacetata sa i bez stimulacije forbol-12-miristat-13-acetatom prije i poslije dijeta s visokim udjelom soli	13
6. RASPRAVA	14
7. ZAKLJUČCI	16
8. SAŽETAK.....	17
9. SUMMARY.....	18
10. LITERATURA	19
11. ŽIVOTOPIS.....	21

Popis kratica

ANG II – angiotenzin II (*engl. angiotensin II*)

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

DASH – The Dietary Approaches to Stop Hypertension

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

DCFH-DA – diklorodihidrofluorescein diacetat (*engl. diclorodihydrofluorescein diacetate*)

GP – glutation-peroksidaza (*engl. glutathione peroxidase*)

GSH – glutation (*engl. glutathione*)

HR – puls (*engl. heart rate*)

HS – visokoslana dijeta (*engl. high-salt diet*)

LKFFS – Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (*engl. Laboratory for Clinical Physiology and Physiology of Sport*)

LS – niskoslana dijeta (*engl. low-salt diet*)

MAP – srednji arterijski tlak (*engl. mean arterial pressure*)

MFI – medijan intenziteta fluorescencije (*engl. median fluorescence intensity*)

MnSOD – manganova superoksid-dismutaza (*engl. manganese superoxide dismutase*)

MOS – blagi oksidativni stres (*engl. mild oxidative stress*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*)

NO – dušikov oksid (*engl. nitrogen oxide*)

P – vjerojatnost (*engl. probability*)

PMA – forbol-12 miristat-13-acetat (*engl. phorbol-12 myristate-13-acetate*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (*engl. reactive oxygen species*)

SBP – sistolički arterijski tlak (*engl. systolic blood pressure*)

SOD – superoksid dismutaza (*engl. superoxide dismutase*)

SOS – jaki oksidativni stres (*engl. strong oxidative stress*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization*)

TOS – umjereni oksidativni stres (*engl. temperate oxidative stress*)

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

Popis tablica

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika (11. stranica)

Tablica 2. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa u ispitanika (12. stranica)

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika (12. stranica)

Tablica 4. Diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) u monocitima periferne krvi ispitanika (13. stranica)

1. UVOD

1.1. Štetni učinci povećanog unosa soli hranom

Kuhinjska sol, koja se uglavnom sastoji od natrijeva klorida, ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima u čovjekovu organizmu. U umjerenim je količinama neophodna i važna za zdravlje ljudi, održava krvni tlak te pomaže u radu živčanog sustava. Maksimalan dnevni unos soli koji se preporučuje, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO, engl. World Health Organization, WHO) iznosi 5 g/dan (1). U Hrvatskoj se prosjek unosa soli penje na 11,6 g/dan (1). Takav prosjek upućuje na loše prehrambene navike koje su često uzrok različitim zdravstvenim problemima. Najveći dio kuhinjske soli unosimo u organizam, a da nismo toga ni svjesni, putem gotove i polugotove hrane. Osviještenost da gotovo svaka namirnica koju unosimo u organizam u svojem prirodnom sastavu već sadrži određenu količinu soli te da ju nema potrebe dosoljavati, moglo bi biti dio rješenja tog velikog problema. Problem prekomjernog unosa soli izražen je u gotovo svim dijelovima svijeta. Svjedočimo kako prehrana može na različite načine izravno utjecati na razvoj kardiovaskularnih bolesti, a zna se da je povećan unos soli usko vezan uz nastanak i razvoj endotelne disfunkcije, poremećene vaskularne reaktivnosti te arterijske hipertenzije (2). Hipertenzija predstavlja povišene vrijednosti krvnog tlaka, a povišenim vrijednostima smatraju se sve one veće od 140/90 mmHg (1). Tako neliječena bolest uvelike doprinosi nastanku bolesti miokarda, angine pectoris, moždanog udara, ateroskleroze ili oštećenju bubrega. Također, kod kroničnih bolesnika arterijske hipertenzije konstantan visoki krvni tlak dovodi do oštećenja stijenke arterija pa je česta pojava aneurizme, aterosklerotskih plakova ili ugrušaka. Arterijska hipertenzija danas je jedan od glavnih uzroka smrti unatoč tomu što bolest može trajati godinama i to bez vidljivih simptoma. Upravo zbog takvog spleta okolnosti s opravdanim je razlogom dobila odrednicu „tihi ubojica“ (3). Jedno je istraživanje potvrdilo činjenicu da bi se smanjeni unos kuhinjske soli na preporučenih 5 g/dan na globalnoj razini spriječio oko 2,5 milijuna smrti u svijetu (1). Opće je prihvaćeno da povećana konzumacija soli, osim za nastanak i razvoj arterijske hipertenzije, povećava mogućnost dobivanja, a u konačnici i uzrokuje cijeli niz različitih kardiovaskularnih, bubrežnih, cerebrovaskularnih i raznih drugih bolesti. Taj problem prekomjernog unosa, kao i svih posljedica prouzrokovanih povećanim unosom soli, potaknulo je brojna znanstvena istraživanja koja su pokazala da promjene u unosu soli značajno mijenjaju vaskularnu reaktivnost i time štete pojedincu. Štoviše, štetni učinci povećanog unosa soli hranom na

vaskularnu funkciju nisu primijećeni samo u osoba s povišenim krvnim tlakom, već se javljaju i kod normotenzivnih osoba (4).

1.2. Razvoj endotelne disfunkcije

Vaskularni endotel ima vrlo važnu ulogu u regulaciji i propuštanju makromolekula i svih ostalih stanica iz krvi do ciljnog tkiva (5). U zdravom organizmu fiziološki reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species, ROS) održavaju normalnu funkciju endotela i vaskularnu reaktivnost. Poremećena vaskularna reaktivnost dominantno je uzrokovana poremećajem endotela (razvoj endotelne disfunkcije) koji prethodi raznim patološkim stanjima, odnosno kardiovaskularnim bolestima. U takvoj patofiziološkoj kaskadi endotel prolazi kroz mnoge funkcionalne i strukturne promjene, gubi zaštitnu ulogu, povećava se propusnost endotela krvnih žila, poprima proaterosklerotsku strukturu te se pospješuje prijanjanje leukocita. Takva disfunkcija endotela pogodna je za razvoj aterosklerotskog plaka (6). Kao potvrda tomu brojne studije na hipertenzivnim pacijentima upućuju na to da povećana plazma reninska aktivnost i razina angiotenzina II (engl. angiotensin, ANG II) uzrokuju povećanje oksidativnog stresa i smanjenje endotelne funkcije (7). Ipak, vrlo je važno napomenuti kako humane studije (osobito na zdravim, normotenzivnim pojedincima) još uvijek nisu dovoljno precizne i ne daju nam dovoljno informacija o mehanizmima koji dovode do endotelne disfunkcije i ostalih kardiovaskularnih bolesti (2).

1.3. Oksidativni stres

Doktor Helmut Sies, poznat kao Redox Pioneer, bavio se istraživanjem redoks stanja stanica te je prije 30 godina uveo prvu definiciju oksidativnog stresa. Istražujući karotenoide i flavonoide došao je do vrijednih saznanja o nutritivnim strategijama u borbi protiv raka, starenja i kardiovaskularnih bolesti (8). Njegova pionirska definicija zadržala se sve do danas, no kako bi se upotpunila, osmišljeno je nekoliko predložaka. Tako se danas oksidativni stres može klasificirati u tri kategorije: blagi oksidativni stres (engl. mild oxidative stress, MOS), umjereni oksidativni stres (engl. temperate oxidative stress, TOS) te jaki oksidativni stres (engl. strong oxidative stress, SOS) (9). Unatoč tomu prisutnost oksidativnog stresa normalna je pojava u tijelu čovjeka. Na oksidativni stres možemo gledati kao na pomak ravnoteže između oksidansa i antioksidansa (10). Gubitak normalne funkcije endotela karakteriziran je

smanjenjem razine dušikova oksida (engl. nitrogen oxide, NO), a ujedno je to uzrok povećanja oksidativnog stresa, odnosno razine reaktivnih kisikovih radikala (2). ROS stvaraju svi živi organizmi te su u fiziološkim koncentracijama rezultat normalnog djelovanja staničnog metabolizma. U svojim fiziološki niskim koncentracijama ROS ima vrlo važnu ulogu za rast stanica, diferencijaciju, starenje i apoptozu stanica. Reaktivne slobodne radikale čine vodikov peroksid, superoksid, organski peroksid, hipoklorna kiselina, hidroperoksilni radikal, hidroksilni radikal koji je i najreaktivniji, zatim ozon te singletni kisik. Do pojave oksidativnog stresa dolazi ako se poremete odnosi između ROS-a i antioksidansa, tj. ako ti čimbenici odstupaju od svojih referentnih vrijednosti. Oksidativni stres zapravo upućuje na ozljedu koja je uzrokovana povećanim stvaranjem ROS-a i/ili smanjenom rezervom antioksidansa. Mitohondrij posjeduje antioksidativni sustav koji je u fiziološkim uvjetima ispunjen antioksidansima, najviše manganovom superoksid-dismutazom (engl. manganese superoxide dismutase, MnSOD), no u patološkim uvjetima ujedno je i glavni izvor reaktivnih vrsta kisika (11). Ubrajamo ih u visoko reaktivne molekule zbog toga što imaju nesparene elektrone, odnosno imaju slobodne valencije. U uvjetima homeostaze (fiziološke ravnoteže), ROS uklanjaju i razgrađuju stanični antioksidansi. Upravo prekomjerno povećanje razine oksidativnog stresa dovodi do povećanog lučenja protuupalnih citokina. Posljedično dolazi do pobuđivanja imunološkog sustava koji će djelovati na aktivaciju endotela krvnih žila, infiltraciju leukocita te nastanku ateroskleroze. Postojeći dokazi i studije podupiru tvrdnje da oksidativni stres može imati vrlo važnu ulogu u vaskularnim i kardiološkim bolestima te da bi antioksidativna terapija mogla biti korisna u borbi protiv tih patoloških stanja (12).

1.3.1. Povećano stvaranje ROS-a

U stanjima povećanog oksidativnog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivima. Povećane koncentracije ROS-a u organizmu najčešće su prouzročene smanjenom mitohondrijskom redukcijom molekularnog kisika, sekrecijom ROS-a leukocitima, endotelnom disfunkcijom, autooksidacijom kateholamina, ali i izloženošću organizma onečišćenom zraku ili radijaciji (12). Prehrana, dim, određene terapije i lijekovi te zračenja iz okoline ili prirode pripadaju egzogenim izvorima radikala, a u endogenim izvorima pripadaju stres, imunološke obrane, povrijeđene, upale, ali i velika fizička opterećenja. Konačna je posljedica takvog pomaka ravnoteže oštećenje DNA, proteina i lipidne stanične membrane. U konačnici, šteta koju načine ROS ima velik utjecaj na pojavu kardiovaskularnih, ali i drugih bolesti poput degenerativnih bolesti, degradacije imunološkog sustava, katarakte, dijabetesa i

mnogih drugih. Velike koncentracije ROS-a, bez adekvatne i pravovremene terapije, mogu uzrokovati stanične ozljede te smrt (4).

1.3.2. Antioksidansi – enzimski i neenzimski mehanizmi

Svi aerobni organizmi imaju antioksidativni sustav kako bi se zaštitili od povišenih koncentracija ROS-a. Sustav uključuje enzimске i neenzimске antioksidanse kojima je zadaća blokirati štetne učinke ROS-a. To su male molekule koje su sposobne izbaciti slobodne radikale. Nastaju u stanici ili ih se u organizam unosi putem hrane. Tim mehanizmom antioksidansi prihvate ili daju elektron, a sve to u svrhu inhibicije djelovanja ROS-a. U antioksidativnim, enzimski kataliziranim, reakcijama dolazi do pretvorbe ROS-a u stabilnije, manje reaktivne molekule, najčešće kisik i vodu. Enzimi koji su sposobni provesti takvu vrstu reakcije jesu: glutathion-peroksidaza (engl. glutathione peroxidase, GP), superoksid-dismutaza (engl. superoxide dismutase, SOD) ili katalaza. Nasuprot tomu postoje i neenzimski mehanizmi koji brane organizam od štetnog djelovanja ROS-a. U tu vrstu obrane ubrajaju se vitamini (vitamin E koji čuva staničnu membranu ili askorbinska kiselina, odnosno vitamin C koji uklanja hidroksilne i superoksidne radikale te polifenoli i flavonoidi), reducirani koenzim nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen, NADPH), glutathion (engl. glutathione, GSH) ili neki metali poput selena (13). Brojni čimbenici određuju aktivnost antioksidansa, a ističu se: oksidativni potencijal, dostupnost, brzina odvijanja reakcije sa slobodnim radikalom te stabilnost (14).

1.4. Metode za izravno mjerenje redoks stanja stanica

Budući da stanice tijekom normalnog aerobnog metabolizma stalno stvaraju ROS, utvrđivanje njihove precizne uloge zahtijeva sposobnost preciznog mjerenja ROS-a i oksidativne štete koju uzrokuju. U skladu s time danas postoje mnoge metode za mjerenje produkcije slobodnih radikala u stanicama. Najučinkovitije metode koriste fluorescentne i kemiluminiscentne probe. 2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (engl. 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) jedna je od najčešće upotrebljivanih proba za izravno mjerenje redoks stanja stanica. Uporaba navedene probe vrlo je jednostavna te je osjetljiva na promjene redoks stanja u stanicama (15). DCFH-DA koristi se u sprezi s protočnom citometrijom. Protočnom citometrijom istodobno je moguće mjeriti i analizirati

više fizičkih svojstava određenih čestica (u ovom slučaju ROS-a), tj. ona daje mogućnost istodobne analize fizičkih (zrnatost i veličina) i imunoloških parametara (biljega) pojedinačnih stanica. Čestice se označavaju jednom ili više fluorescentnih boja te se kreću u struji tekućine jedna iza druge, a pritom ih presijeca laserska zraka svjetlosti. Stanice raspršuju upadnu svjetlost i emitiraju apsorbiranu svjetlost u obliku fluorescencije (16). Dakle, protočnim citometrom omogućena je analiza ili razdvajanje različitih vrsta stanica temeljem njihova fenotipa ili funkcionalnog stanja. Glavne su sastavnice koje čine protočni citometar: protočna, optička i elektronička sastavnica. Višespecijalizirani protočni citometri pružaju još veću mogućnost analize. Primjena je protočnog citometra učestala i nezamisliv je rad bez njega. Najčešće se primjenjuje kod hematološke dijagnostike, imunofenotipizacije, otkrivanja autoimunih poremećaja, zatim prije i poslije transplantacije, kod analize tumorskih stanica, raznih zaraznih bolesti te mnogih drugih stanja. Sve te mogućnosti protočnog citometra odredile su ga neprocjenjivim alatom kod brojnih primjena (17). Glavna je prednost te metode u tome što unutarstanična razina ROS-a može otkriti stanicu po stanicu što uvelike doprinosi učinkovitosti same metode.

2. HIPOTEZA

Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli povećat će stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u leukocitima izoliranim iz uzorka periferne krvi u zdravih žena.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovoga istraživanja ispitati utjecaj kratkotrajne dijeta s visokim udjelom soli na stvaranje slobodnih kisikovih spojeva u leukocitima izoliranim iz periferne krvi zdravih mladih žena uporabom fluorescentne boje DCFH-DA (2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetat) koja se koristi za otkrivanje unutarstaničnog vodikova peroksida i peroksinitrita te provođenje mjerenja DCFH-DA u leukocitima periferne krvi metodom protočne citometrije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Ova je studija nerandomizirani kontrolirani klinički pokus u kojem su ispitanicima bila napravljena mjerenja prije i poslije specifičnog dijetnog protokola te su sami sebi bili kontrola. U istraživanju je sudjelovalo 15 mladih zdravih žena (ukupno 45 posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LKFFS) i obrada 45 uzoraka u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju). Studija je 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

U studiju je bilo uključeno 15 zdravih mladih žena koje su se prijavile putem oglasa na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Isključni kriteriji za ulazak u studiju bili su: hipertenzija ili hipotenzija, koronarna bolest, šećerna bolest, hiperlipidemija, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila. Još je jedan od isključnih kriterija bio uzimanje lijekova koji mogu imati utjecaj na endotel. Svi ispitanici bili su obaviješteni o svim protokolima i procedurama koji su bili nužni u ovom istraživanju te su prije ulaska u protokol morali potpisati informirani pristanak.

4.3. Metode

Cjelokupan protokol studije trajao je 15 dana. Za vrijeme studije svi su ispitanici imali tri posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (1. posjet prilikom ulaska u protokol, 2. posjet nakon sedam dana niskoslane dijeta (engl. low-salt diet, LS) (tzv. vrijeme ispiranja), 3. posjet nakon sedam dana visokoslane dijeta (engl. high-salt diet, HS)). Tijekom prvih tjedan dana studije svi su ispitanici jeli hranu s niskim udjelom soli (LS dijeta) što je podrazumijevalo maksimalan dnevni unos soli oko 2,3 g (DASH (engl. The Dietary Approaches to Stop Hypertension) eating plan; US Department of Health and Human Services, 2006). Nakon prvog tjedna na LS dijeti ispitanici su bili tjedan dana na HS dijeti koja je zahtijevala povećan unos soli u organizam, točnije oko 14 g soli dnevno. Kako bi svi ispitanici uzimali približno jednaku količinu soli, i dalje su hranom unosili oko 2,3 g soli, a

ostatak je soli bio nadomješten u obliku praha soli – 11,7 g dnevno. Pri svakom studijskom posjetu ispitanicima je bio izmjeren arterijski tlak i puls te su određivani indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI) i omjer struka, odnosno bokova (engl. waist-hip ratio, WHR). Mjerenja arterijskog tlaka i pulsa provedena 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. Također, pri svakom studijskom posjetu ispitanicima je bio uzet uzorak venske krvi (za protočnu citometriju) te je uz uzorak krvi bio prikupljen i uzorak 24-satnog urina (za kontrolu pridržavanja zadanog dijetnog protokola). Stvaranje ROS-a u leukocitima izoliranim iz uzorka periferne krvi određivalo se metodom protočne citometrije. DCFH-DA standardno je korištena permeabilna proba za otkrivanje unutarstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva (unutarstaničnog H_2O_2 i peroksinitrita). Venski uzorci pune krvi bili su prikupljeni u epruvete koje sadrže 0,5 M EDTA. 200 μ l pune krvi inkubiralo se s 5 mmol/L DCFH-DA (Biomol, Hg, Njemačka) kroz 30 minuta na 4 °C u mraku, eritrociti su se lizirali, potom isprali i na kraju su se stanice analizirale na protočnom citometru (FACS Canto II, BD). Nakon protočne citometrije, stanice su bile stimulirane sa 100 nmol/L forbol-12-miristat-13-acetatom (engl. phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) (Calbiochem, Njemačka) te su analizirane po drugi put. Pri svakom je mjerenju bilo analizirano minimalno 10 000 ciljnih stanica. Uz primjenu 20-mW lasera za pobudu fluorescencije DCFH-DA koristila se valna duljina od 488 nm te se zabilježila zelena fluorescencija (DCFH-DA) uz 530/30 filtar. Podatci su izraženi kao medijan intenziteta fluorescencije (engl. median fluorescence intensity, MFI).

4.3.1. Protočna citometrija

Takva optička tehnologija, koja je temeljena na laseru te u stvarnom vremenu, s lakoćom analizira fizička i fluorescentna svojstva svih stanica koje su prisutne u suspenziji, ima prednost nad svim drugim tehnikama koje ne mogu ispitivati veliki broj stanica u sekundama i istovremeno dobivati podatke o prisutnosti različitih subpopulacija stanica te o fenotipskim promjenama unutar tih stanica (18). Svaka priprema uzoraka zahtijevala je nekoliko faza inkubacije, centrifugiranja te ispiranja. Stanice su obilježavane fluorokromima. Fluorokrome pobuđuje svjetlost jedne valne duljine (ekscitacija svjetlosti), a emitiraju svjetlost veće valne duljine (emisija svjetlosti). Potom detektori hvataju emitiranu svjetlost, a računalo prima digitalni signal. Najčešće su upotrijebljene boje u protočnoj citometriji: FITC, ACP, PE, PerCP. Iako postoje mnoge metode za mjerenje produkcije slobodnih radikala u

stanicama, odabrana metoda u ovom istraživanju bila je metoda koja se koristi kemiluminiscentnim i fluorescentnim probama koje propuštaju stanice. DCFH-DA proba u sprezi s protočnom citometrijom upotrebljavana je metoda kroz cijeli protokol. Takva je vrsta metode vrlo jeftina, jednostavna za uporabu te izuzetno osjetljiva na promjene redoks stanja stanica.

4.4. Statističke metode

Svi dobiveni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. Obilježja mjerena prije i nakon održanog protokola (nakon ispiranja i poslije HS dijete) uspoređivana su pomoću t-testa za zavisne uzorke (engl. paired t-test). Kada obilježja nisu bila normalno raspodijeljena, primijenio se Wilcoxonov test sume rangova (engl. Wilcoxon rank-sum test). Statistička je značajnost bila prilagođena na $P < 0,05$. Za statističku se analizu koristio SigmaPlot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

5. REZULTATI

U studiji je sudjelovalo 15 zdravih mladih ispitanica ženskog spola (srednja dob 20, standardna devijacija 2). Svakoj ispitanici uzet je uzorak venske krvi te uzorak 24-satnog urina. Također, ispitanice su bile podvrgnute mjerenju struka (engl. waist-hip ratio, WHR) te se svakoj izračunao indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI).

5.1. Opći podatci o dobi ispitanika, izmjerenim vrijednostima struka i indeksu tjelesne mase

Tablica 1. prikazuje podatke o dobi i ostalim obilježjima ispitanika prije i nakon protokola. Nakon protokola nije došlo do značajne promjene BMI-ja i WHR-a.

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika

	prije HS-a	poslije HS-a	P
n	15	15	
dob (godine)	20 ± 2	20 ± 2	
BMI (kg/m ²)	22,2 ± 3,9	22,3 ± 4,1	0,32
WHR	0,73 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,28

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

n – broj ispitanika; HS – prehrana s visokim udjelom soli; BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struk-bokovi; P vrijednost – vjerojatnost
t-test za zavisne uzorke

5.2. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa prije i poslije protokola

Tablica 2. prikazuje promjene arterijskog tlaka i pulsa prije i nakon HS dijete. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa nisu bile značajno promijenjene prije i nakon provedenog protokola.

Tablica 2. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa u ispitanika

	prije HS-a	poslije HS-a	P
SBP (mmHg)	107 ± 9	109 ± 10	0,14
DBP (mmHg)	72 ± 8	72 ± 8	0,85
MAP (mmHg)	84 ± 8	84 ± 8	0,61
HR (otkucaja u min)	78 ± 14	75 ± 11	0,63

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

t-test za zavisne uzorke

5.3. Izmjerena obilježja 24-satnog urina

Tablica 3. dokazuje da je nakon HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu bila statistički značajno povećana kao i izračunat dnevni unos natrija što je potvrdilo da su se ispitanici pridržavali dijetnog protokola. Ostala obilježja u 24-satnom urinu nisu bila značajno promijenjena nakon provedenog protokola.

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika

	prije HS-a	poslije HS-a	P
Volumen 24 h urina (mL)	1340 ± 569	1319 ± 646	0,90
Natrij u 24 h urinu (mmol/dU)	79,4 ± 28,6	213 ± 74	< 0,001
Izračunat unos NaCl (g/dan)	4,6 ± 1,7	12,5 ± 4,3	< 0,001
Kalij u 24 h urinu (mmol/dU)	36,8 ± 14,5	41,4 ± 26,1	0,38
Urea u 24 h urinu (mmol/dU)	187,7 ± 65,2	222,9 ± 119,1	0,17
Koeficijent kreatinina u 24 h urinu (μmol/24h/kg)	142,2 ± 31,2	133,1 ± 50,1	0,33

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

HS – prehrana s visokim udjelom soli; P vrijednost – vjerojatnost

t-test za zavisne uzorke

5.4. Vrijednosti diklorodihidrofluorescein diacetata sa i bez stimulacije forbol-12-miristat-13-acetatom prije i poslije dijeta s visokim udjelom soli

Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli značajno je povećao bazalnu proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala (vodikova peroksida i peroksinitrita) (DCFH-DA) u monocitima periferne krvi zdravih mladih žena u usporedbi s mjerenjima prije dijeta (protočna citometrija). PMA stimulacija značajno je povećala produkciju ROS-a u monocitima periferne krvi prije i poslije dijeta s visokim udjelom soli u zdravih mladih žena (Tablica 4.).

Tablica 4. Diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) u monocitima periferne krvi ispitanika

		DCFH-DA (MFI)	DCFH-DA + PMA (MFI)	P
žene (n = 15)	prije HS dijeta	4,35 ± 1,04	4,75 ± 1,78	0,02
	poslije HS dijeta	5,07 ± 1,27	5,62 ± 1,42	0,01
	P	0,04	0,05	

n – broj ispitanika; HS dijeta – dijeta s visokim udjelom soli; DCFH-DA – diklorodihidrofluorescein diacetat; PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate; MFI – medijan intenziteta fluorescence; P vrijednost – vjerojatnost t-test za zavisne uzorke

6. RASPRAVA

Prikazana studija ispitala je utjecaj HS dijeta na ljudski organizam, odnosno ispitala je utječe li tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli na poremećaj unutarstaničnog ROS-a. Prethodna su istraživanja pokazala da povećanim unosom soli dolazi do smanjene regulacije vaskularnih antioksidativnih gena što u konačnici dovodi do povećane razine oksidativnog stresa u krvnim žilama, a povećana pojava oksidativnog stresa u leukocitima upućuje na pojavu upalnih stanja (19).

U studiji je sudjelovalo 15 mladih zdravih žena prosječne dobi 20 godina (standardne devijacije 2). Svaki je ispitanik dobio potrebne informacije o slijeđenju protokola. Nakon tjedna s povećanim unosom soli kod ispitanika nisu bila zabilježena veća odstupanja BMI-ja i WHR-a. Također, vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa nisu se značajno mijenjale što je u skladu i s ranijim istraživanjima. Analiza uzoraka 24-satnog urina pokazala je da je nakon HS dijeta ekskrecija natrija u 24-satnom urinu bila značajno povećana kao i izračunat dnevni unos natrija što je zapravo bio dokaz da su se svi ispitanici pridržavali protokola.

Mnoge studije jasno upućuju na povezanost između unosa soli i hipertenzije (20). Ipak, osjetljivost na promjene kod povećanog unosa soli u mladih zdravih pojedinaca ostaju nedovoljno definirane (5). Bez obzira na to, preporučuje se niži unos soli cijeloj populaciji, ne samo pojedincima osjetljivim na povišen unos soli (21). Danas se zna da čak i kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli dovodi do poremećene vaskularne reaktivnosti (u različitim vaskularnim slivovima) uslijed štetnog djelovanja soli na funkciju endotela, a takve su promjene neovisne o promjenama arterijskog tlaka. Ipak, točni mehanizmi kojima prekomjeren unos soli dovodi do nastanka endotelne disfunkcije još uvijek nije u potpunosti razriješen. Za razliku od brojnih istraživanja provedenih na životinjama, koja upućuju na to da prekomjeren unos soli u organizam (u trajanju od svega tri dana) uzrokuje povećanu razinu oksidativnog stresa i endotelnu disfunkciju, postoji svega nekoliko humanih studija koje se bave tim problemom. Dakle, moguću vezu između prekomjernog unosa soli, oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije u mladih zdravih ljudi tek predstoji razjasniti.

Rezultati su ovog istraživanja pokazali da su mjerena obilježja unutarstaničnog ROS-a - DCFH-DA (MFI) i DCFH-DA + PMA (MFI) značajno porasli poslije tjedan dana HS dijeta u zdravih mladih žena. Takvi rezultati upućuju na činjenicu da je sedam dana dijeta s visokim udjelom soli povećalo bazalnu proizvodnju unutarstaničnog ROS-a, točnije vodikova peroksida i peroksinitrita u monocitima periferne krvi u zdravih mladih žena.

Stimulacija stanica PMA-om (forbol 12-miristat 13-acetatom) pozitivnom je reakcijom (porast unutarstaničnog ROS-a) i prije i poslije zadanog dijetnog protokola potvrdila da su stanice bile dobro uzorkovane i pripremljene.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da tjedan dana dijete s visokim udjelom soli dovodi do povećanja unutarstaničnog ROS-a u monocitima periferne krvi zdravih mladih žena. Upravo promjene razine oksidativnog stresa mogu biti jedan od mogućih mehanizama koji sudjeluje u patofiziološkom algoritmu nastanka endotelne disfunkcije uslijed prekomjernog unosa soli u organizam što tek treba potvrditi u budućim istraživanjima.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Prehrana s visokim udjelom soli (HS diet) nije značajno promijenila vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa.
- 2) Nakon HS dijeta značajno povećana ekskrecija natrija u 24-satnom urinu potvrdila je da su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola.
- 3) Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli značajno je povećao unutarstaničnu produkciju ROS-a (vodikova peroksida i peroksinitrita) u monocitima periferne krvi u zdravih mladih žena.
- 4) Stimulacija forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA), koja je značajno povećala produkciju ROS-a u monocitima periferne krvi i prije i poslije dijeta s visokim udjelom soli u zdravih mladih žena, potvrdila je da su stanice bile dobro uzorkovane i pripremljene te da su pokusi na protočnom citometru adekvatno provedeni.

8. SAŽETAK

CILJ: Cilj je istraživanja bio ispitati utjecaj kratkotrajne dijeta s visokim udjelom soli na stvaranje ROS-a u leukocitima izoliranim iz periferne krvi zdravih mladih žena, uporabom fluorescentne boje DCFH-DA te provođenjem mjerenja DCFH-DA u leukocitima periferne krvi metodom protočne citometrije.

USTROJ STUDIJE: Cijela je studija nerandomizirani kontrolirani klinički pokus. Sva su mjerenja na ispitanicima provedena prije i poslije zadanog dijetnog protokola te su sama sebi bili kontrola.

MATERIJAL I METODE: U studiju je bilo uključeno 15 mladih zdravih žena. U prvih tjedan dana studije svi su ispitanici jeli hranu s niskim udjelom soli s maksimalnim unosom soli oko 2,3 g dnevno. Nakon prvog tjedna na LS dijeti ispitanici su bili tjedan dana na HS dijeti koja je obuhvaćala unos od 14 g soli dnevno. Ispitanicima je prilikom svakog studijskog posjeta bio uzet uzorak venske krvi (za protočnu citometriju) te je prikupljen uzorak 24-satnog urina (za kontrolu pridržavanja dijetnog protokola).

REZULTATI: Studija upućuje na to da vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa nisu bile značajno promijenjene prije i nakon provedenog protokola. Nakon HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu bila je statistički značajno povećana. Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli znatno je povećao bazalnu proizvodnju ROS-a u monocitima periferne krvi mladih zdravih žena u usporedbi s mjerenjima prije dijeta. PMA stimulacija značajno je povećala produkciju ROS-a u monocitima periferne krvi prije i poslije dijeta s visokim udjelom soli u mladih zdravih žena.

ZAKLJUČAK: Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli uzrokovao je povećano stvaranje unutarstaničnog ROS-a u monocitima periferne krvi, u odsutnosti značajnih promjena arterijskoga tlaka.

KLJUČNE RIJEČI: DCFH-DA; niskosolana dijeta; oksidativni stres; protočna citometrija; visokosolana dijeta

9. SUMMARY

Peripheral blood leukocytes' reactive oxygen species production in young healthy individuals on high-salt diet

OBJECTIVES: The aim of the study was to investigate the effect of a short-term high-salt diet on the formation of reactive oxygen speacies in leukocytes, isolated from the peripheral blood of healthy young women by the use of DCFH-DA fluorescence dye and then measurements of a DCFH-DA in peripheral blood leukocytes by the flow cytometry.

STUDY DESIGN: The whole study is a non-randomized controlled clinical trial. All measurements on respondents were made before and after the dietary protocol and they served as a control group.

MATERIAL AND METHODS: The study included 15 healthy young women. During the study, all respondents visited the LKFFS three times. In the first week of the study, all respondents ate low-salt food with a maximum salt intake of about 2.3 grams per day. After the first week of LS diet, the respondents were on a week-long HS diet that included salt intake about 14 grams daily. During each visit a sample of venous blood (for flow cytometry) and a 24-hour urine sample (for controlling abidance of the given diet protocol) was taken from all respondents.

RESULTS: The study shows that the values of arterial pressure and pulse were not significantly altered before and after the protocol. After HS diet protocol, sodium excretion in 24-hour urine sample was statistically significantly increased. A week on HS diet significantly increased basal production of ROS in peripheral blood monocytes of healthy young women compared to the measurements before the HS diet. PMA stimulation increased ROS production significantly in peripheral blood monocytes before and after the HS diet in healthy young women.

CONCLUSION: Food with a high-salt content often lead to an increased production of reactive oxygen species in cells, while blood presure and pulse rates are not significantly altered. However, stimulation with PMA also leads to increased ROS products, either before or after the HS diet.

KEY WORDS: DCFH-DA; flow cytometry; high-salt diet; low-salt diet; oxidative stress

10. LITERATURA

1. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 2011;6(3-4):141-147.
2. Boegehold MA, Drenjančević I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Comprehensive Physiology*. 2016;6:215-254.
3. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*. 3. izd.: Zagreb:Naklada Ljevak d.o.o.; 2004.
4. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(4):C719-741.
5. Čavka A, Ćosić A, Jukić I, Jelaković 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;5313-5324.
6. Hadi HA, Carr CS, Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183-198.
7. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1954-1962.
8. Jones DP, Radi R. Redox Pioneer: Professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(18):2459-2468.
9. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-175.
10. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.
11. Jin K, Vaziri ND. Salt-sensitive hypertension in mitochondrial superoxide dismutase deficiency is associated with intra-renal oxidative stress and inflammation. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(3):445-452.
12. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-673.
13. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.

14. Crisostomo AG, Moreno RB, Navaratman S, Wilkinson JA, Bisby RH. Generation of superoxide and singlet oxygen from alpha-tocopherolquinone and analogues. *Free Radi cRes*. 2007;41(6):730-737.
15. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. 2010;594:57-72.
16. Luo J, Li N, Robinson PJ, Shi R. Detection of reactive oxygen species by flow cytometry after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;120(1):105-112.
17. Piyasena ME, Graves SW. The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab Chip*. 2014;14(6):1044-1059.
18. Pockley AG, Foulds GA, Oughton JA, Kerkvliet NI, Multhoff G. Immune Cell Phenotyping Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Toxicol*. 2015;66:18.8.1-34.
19. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016;594(17):4917-31.
20. De la Sierra A, Giner V, Bragulat E, Coca A. Lack of correlation between two methods for the assessment of salt sensitivity in essential hypertension. *J Hum hy Hypetens*. 2002;16(4):255-60.
21. Appel LJ, Champagne CM, Harsha DW, Cooper LS, Obarzanek E, Elmer PJ i sur. Effect of comprehensive lifestyle modification on blood pressure control: main results of the PREMIER clinical trial. *JAMA*. 2003;289(16):2083-93.

11. ŽIVOTOPIS

Ana Miotić

Opći podatci

Datum i mjesto rođenja: 27. lipnja 1995., Koprivnica

Adresa stanovanja: Matije Gupca 3, 48 314 Koprivnički Ivanec, Hrvatska

e-pošta: ana.miotic.kc.hr@gmail.com

matični broj/JMBAG: 814169/0236216348

Obrazovanje

- rujan 2002. – lipanj 2006.: Osnovna škola „Braća Radić“, Koprivnički Ivanec
- rujan 2006. – lipanj 2010.: Osnovna škola „Braća Radić“, Koprivnica
- rujan 2010. – lipanj 2014.: Gimnazija „Fran Galović“, Koprivnica
- rujan 2014. – danas: preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku