

# ULOGA DUŠIKOVOG OKSIDA U MIKRO- I MAKROVASKULARNOM ODGOVORU NA 7-DNEVNO OPTEREĆENJE KUHINJSKOM SOLI U ZDRAVIH POJEDINACA

---

Tolj, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:351592>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Tolj

**ULOGA DUŠIKOVOG OKSIDA U MIKRO- I MAKROVASKULARNOM  
ODGOVORU NA 7-DNEVNO OPTEREĆENJE KUHINJSKOM SOLI U ZDRAVIH  
POJEDINACA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Tolj

**ULOGA DUŠIKOVOG OKSIDA U MIKRO- I MAKROVASKULARNOM  
ODGOVORU NA 7-DNEVNO OPTEREĆENJE KUHINJSKOM SOLI U ZDRAVIH  
POJEDINACA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Stupin

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

Rad ima 82 stranice.

*Predgovor radu:*

*Najveće hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Stupin i mentoru doc. dr. sc. Marku Stupinu.*

*Hvala im što su mi baš svaki korak ovog puta olakšali, pomogli, poticali me i bili dostupni u svakom trenutku pri izradi ove disertacije. Bili su mentorica i mentor u punom smislu te riječi, ne samo na profesionalnoj već i ljudskoj razini.*

*Hvala im i što su me uveli u svijet znanosti i pokazali mi kako on nije uvijek težak i nužno nedostupan.*

*Veliko hvala i prof. dr. sc. Ines Drenjančević koja je započela sva istraživanja o soli i time omogućila mnogim drugima daljnja znanstvena usavršavanja.*

*Hvala kolegama i prijateljima Vlasti Oršić Frič i Draženu Mlinareviću na podršci i pomoći u našem zajedničkom putu od prvog dana poslijediplomskog studija.*

*I na kraju, hvala prijateljima i obitelji, posebno sestri na velikoj podršci i poticaju pri ostvarivanju ovog cilja.*

Ovo je istraživanje financirano iz sredstava projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ u okviru projekta #IP-2016-06-8744: Interakcija renin-angiotenzinskog i adrenergičkog sustava u endotelnoj aktivaciji izazvanoj oksidativnim stresom (RAS-AdrenOX) i Institucionalni istraživački projekt Medicinskog fakulteta Osijek #IP -23-MEFOS-2023 (voditelj: Ana Stupin)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Endotel i endotelna funkcija .....	1
1.2. Endotelna disfunkcija .....	1
1.3. Prekomjerni unos kuhinjske soli kao javnozdravstveni problem .....	4
1.4. Utjecaj velikog unosa kuhinjske soli na vaskularnu i endotelnu funkciju.....	5
1.5. Specifična uloga dušikovog oksida u endotelnoj disfunkciji uzrokovanoj prekomjernim unosom kuhinjske soli .....	12
1.6. Dušikov oksid i sintaze dušikovog oksida .....	13
1.7. Molekularne osnove endotelne disfunkcije kod vaskularnih bolesti: inaktivacija bioaktivnog dušika i odvajanje endotelne sintaze dušikovog oksida .....	15
1.8. Neosmotsko vanbubrežno skladištenje natrija.....	18
2. HIPOTEZA .....	24
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	25
4. ISPITANICI I METODE.....	26
4.1. Ustroj studije.....	26
4.2. Ispitanici.....	26
4.3. Metode .....	27
4.3.1. Tjelesna težina, sastav tijela i status tjelesnih tekućina .....	28
4.3.2. Uzorkovanje i analiza venske krvi i 24-satnog urina.....	29
4.3.3. Sistemski hemodinamski i arterijski krvni tlak.....	30
4.3.4. Mjerenje dušikvim oksidom posredovane endotelne vazodilatacije mikrocirkulacije kože .....	31
4.3.5. Mjerenje protokom posredovane vazodilatacije (engl. flow mediated dilation, FMD) brahijalne arterije .....	32

4.3.6. Određivanje serumskih koncentracija dušikovog oksida (NO), endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), neuronske sintaze dušikovog oksida (nNOS), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i vaskularnog endotelnog faktora rasta C (VEGF-C)	.33
4.4. Statističke metode	34
5. REZULTATI	35
5.1. Arterijski krvni tlak i sistemska hemodinamika	38
5.2. Mikro- i makrovaskularna endotelna vazodilatacija ovisna o NO	40
5.3. Serumaska koncentracija dušikovog oksida, tri izoforme sintaze dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta C	43
5.4. Korelacije	46
6. RASPRAVA	48
7. ZAKLJUČCI	58
8. SAŽETAK	59
9. SUMMARY	61
10. LITERATURA	63
11. ŽIVOTOPIS	80

## POPIS KRATICA

20-HETE	20-hidroksieikosatetraenoična kiselina
8-izo-PGF2 $\alpha$	8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$
ACh	Acetilkolin (engl. <i>acetylcholine</i> )
AChID	Acetilkolinom inducirana dilatacija (engl. <i>acetylcholine induced dilatation</i> )
ADMA	Asimetrični dimetilarginin
AH	Arterijska hipertenzija
ANG II	Angiotenzin II
ANS	Autonomni živčani sustav
AT1	Angiotenzinski receptor tip 1
AUC	Površina ispod krivulje (engl. <i>area under curve</i> )
BH2	Dihidropterin
BH4	(6R-)5,6,7,8-tetrahidro L-biopterin
BMI	Indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
BSA	Tjelesna površina (engl. <i>body surface area</i> )
CAM	Stanična adhezijska molekula (engl. <i>cell adhesion molecule</i> )
cAMP	Ciklički adenzin-monofosfat
CASH	Konsenzus akcije o soli i zdravlju (engl. <i>Consensus Action on Salt and Health</i> )
CD 11	Klaster diferencijacije 11 (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CD 18	Klaster diferencijacije 18 (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cGMP	Ciklički gvanozin monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CI	Srčani indeks (engl. <i>cardiac index</i> )
CNS	Središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> )



CO	Minutni volumen srca (engl. <i>cardiac output</i> )
COX	Ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i> )
COX-1	Ciklooksigenaza 1 (engl. <i>cyclooxygenase 1</i> )
CRASH	Hrvatska akcija o soli i zdravlju (engl. <i>Croatia Action on Salt and Health</i> )
Cu/Zn SOD	Bakar cink superoksid dismutaza
CYP450	Citokrom P450
DASH	Američka inicijativa za smanjenje unosa kuhinjske soli hranom (engl. <i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i> )
DBP	Dijastolički arterijski tlak (engl. <i>diastolic blood pressure</i> )
DHFR	Dihidrofolat reduktaza
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
DOCA	Deoksikortikosteron acetat
ECW%	Izvanstanična voda (engl. <i>extracellular water</i> )
ED	Endotelna disfunkcija
EDCF	Vazokonstriksijski čimbenici porijeklom iz endotela (engl. <i>endothelial-derived constricting factors</i> )
EDHF	Čimbenici hiperpolarizacije porijeklom iz endotela (engl. <i>endothelial-derived hyperpolarizing factors</i> )
EET	Epoksiekosatrienoična kiselina (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acids</i> )
ELISA	Enzimski imunosorbentni test (engl. <i>enzyme - linked immunosorbent assay</i> )
eNOS	Endotelna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ET-1	Endotelin - 1
FAD	Flavin adenin dinukleotid
Fat%	Masa masti, postotak (engl. <i>fat mass</i> )

FFM%	Udio mase bez masti (engl. <i>fat free mass</i> )
FMD	Protokom posredovana dilatacija (engl. <i>Flow mediated dilatation</i> )
FMN	Flavin mononukleotid
FRAP	Sposobnost plazme da reducira željezo (engl. <i>ferric reducing antioxidant power assay</i> )
GAG	Glikozaminoglikani
GMP	Gvanozin monofosfat (engl. <i>guanosine monophosphate</i> )
GTP	Gvanozin trifosfat (engl. <i>guanosine triphosphate</i> )
GTP CH1	Gvanozin trifosfat ciklohidrolaza 1 (engl. <i>guanosine triphosphate cyclohydrolase 1</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodikov peroksid (engl. <i>hydrogen peroxide</i> )
HF	Srčano zatajenje (engl. <i>heart failure</i> )
HR	Broj srčanih otkucaja (engl. <i>heart rate</i> )
HRP	Peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HRV	Varijabilnost srčanih otkucaja (engl. <i>heart rate variability</i> )
HS	Visoko slana prehrana (engl. <i>high salt</i> )
hsCRP	Visokosenzitivni C reaktivni protein (engl. <i>high sensitive C reactive protein</i> )
ICG	Impendancijska kardiografija (engl. <i>impedance cardiography</i> )
ICW	Unutarstanična voda (engl. <i>intracellular water</i> )
IF	Volumen intersticijske tekućine (engl. <i>interstitial fluid volume</i> )
IL-9	Interleukin 9
IL-10	Interleukin 10
IL-17A	Interleukin 17A
IL-21	Interleukin 21

IL22	Interleukin 22
INF- $\gamma$	Interferon-gama (engl. <i>interferon-gamma</i> )
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
LD	Laser Doppler
LDF	Laser doppler floumetar (engl. <i>laser doppler flowmetar</i> )
LF	Niskomasna prehrana (engl. <i>low fat</i> )
L- NAME	L-nitroarginin metil ester
L-NMMA	N <sup>G</sup> -metil-L-arginin acetatna sol (engl. <i>N<sup>G</sup>-Methyl-L-arginine acetate salt</i> )
LTH	Lokalna toplinska hiperemija
LS	Niskoslana prehrana (engl. <i>low salt</i> )
MABP	Srednji arterijski tlak (engl. <i>mean arterial blood pressure</i> )
MMP-9	Matrična metaloproteinaza 9
MnSOD	Manganova superoksid dismutaza
MPO	Mijeloperoksidaza (engl. <i>myeloperoxidase</i> )
MST	Mentalni stres test
NaCl	Natrijev klorid
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
nNOS	Neuralna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>neural nitric oxide synthase</i> )
NO	Dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
NOS	Sintaza dušikovog oksida (engl. <i>nitric oxide synthase</i> )
NTG	Nitroglicerin
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoksidni ion

ONOO <sup>-</sup>	Perokisnitrit
PBMC	Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PF	Volumen plazme (engl. <i>plasma volume</i> )
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 alfa
PGI2	Prostaglandin I2
PORH	Postokluzivna reaktivna hiperemija (engl. <i>postocclusive reactive hyperemia</i> )
PRA	Plazmatska aktivnost renina (engl. <i>plasma renin activity</i> )
PURE	Prospektivna urbana ruralna epidemiologija (engl. <i>Prospective Urban Rural Epidemiology</i> )
PWV	Brzina pulsnog vala (engl. <i>pulse wave velocity</i> )
RAS	Renin - angiotenzin sustav
RH-PAT	Periferna arterijska tonometrija
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SBP	Sistolički arterijski tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i> )
sCAM	Topljive stanične ahezijske molekule (eng. <i>soluble cell adhesion molecules</i> )
SGK1	Serum i glukokortikoid inducirana kinaza 1
SMTc	S-metil-L-tiocitrulin
SNPID	Dilatacija inducirana natrijevim nitroprusidom
SOD	Superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i> )
SR	Sol rezistentni (engl. <i>salt resistant</i> )
SS	Sol osjetljivi (engl. <i>salt sensitivity</i> )
SV	Udarni volumen (eng. <i>stroke volume</i> )

SVRI	Indeks sistemskog vaskularnog otpora (eng. <i>systemic vascular resistance index</i> )
TACI	Indeks ukupne arterijske popustljivosti (eng. <i>total arterial compliance index</i> )
TBARS	Reaktivne tvari s tiobarbiturnom kiselinom (eng. <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TBW%	Ukupna tjelesna voda (eng. <i>total body water</i> )
TGF $\beta$	Transformirajući faktor rasta beta (eng. <i>transforming growth factor beta</i> )
Th stanice	T pomoćničke stanice
Th17	T pomoćnički limfociti 17
TNF- $\alpha$	Tumorski faktor nekroze $\alpha$ (eng. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
Ton EBP	Pojačivač vezivanja proteina koji reagira na toničnost (eng. <i>enhancer of tonicity-responsive protein binding</i> )
TXA2	Tromboksan A2
VEGF-C	Vaskularni endotelni čimbenik rasta C (eng. <i>vascular endothelial growth factor C</i> )
VEGFR- 2	Receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 2 (eng. <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )
VEGFR- 3	Receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 2 (eng. <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )
WASH	Svjetska akcija soli i zdravlja (eng. <i>World Action on Salt and Health</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World health organization</i> )
WHR	Omjer struk-bokovi (eng. <i>waist to hip ratio</i> )

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 5.1.</b> Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na tjelesnu masu, sastav tijela i status tjelesnih tekućina u zdravih, mladih ispitanika .....	35
<b>Tablica 5.2.</b> Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumske biokemijske parametre u zdravih, mladih ispitanika.....	36
<b>Tablica 5.3.</b> Biokemijski parametri u 24-satnom urinu nakon 7-dnevne dijeta sa smanjenim udjelom kuhinjske soli i nakon 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli u zdravih, mladih ispitanika.....	37
<b>Tablica 5.4.</b> Hemodinamski odgovor nakon 7-dnevne dijeta s velikim unosom kuhinjske soli u zdravih, mladih ispitanika.....	38
<b>Tablica 5.5.</b> Učinci 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku razinu dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta C (VEGF-C) u mladih, zdravih ispitanika.....	43
<b>Tablica 5.6.</b> Korelacija između 24-satnog izlučivanja natrija / serumske koncentracije NO i endotelnog vaskularnog odgovora / serumske koncentracije NOS izoformi.....	47

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.1.</b> Potencijalni mehanizmi kojima kardiovaskularni i aterosklerotski čimbenici rizika dovode do eNOS odvajanja i endotelne disfunkcije.....	17
<b>Slika 1.2.</b> Potencijalni mehanizmi reverzibilnog, neosmotskog skladištenja i oslobađanja natrija u kožnom intersticiju.....	22
<b>Slika 4.1.</b> Protokol studije.....	28
<b>Slika 4.2.</b> Periferni mikrovaskularni odgovor na lokalno toplinsko zagrijavanje (LTH).....	32
<b>Slika 5.1.</b> Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom soli na 24-satno izlučivanje natrija urinom i srednji arterijski tlak (MAP) kod zdravih pojedinaca.....	39
<b>Slika 5.2.</b> Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom soli (HS) na indeks sistemskog vaskularnog otpora kod zdravih pojedinaca.....	40
<b>Slika 5.3.</b> Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom soli (HS) na dušikovim oksidom posredovanu mikrovaskularnu vazodilataciju kod zdravih pojedinaca.....	41
<b>Slika 5.4.</b> A i B: Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom soli (HS) na makrovaskularnu endotel ovisnu (A) i endotel neovisnu (B) vazodilataciju kod zdravih pojedinaca.....	42
<b>Slika 5.5.</b> A, B i C: Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom soli (HS) na serumsku razinu endotelne (eNOS) (A), neuronske (nNOS) (B) i inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) (C) kod zdravih pojedinaca.....	44

## 1. UVOD

### 1.1. Endotel i endotelna funkcija

Endotel je nominalno jednostavan, no funkcionalno iznimno dinamičan organ koji oblaže unutrašnju površinu cijelog krvožilnog sustava (1). U vaskulaturi postoji oko  $10^{14}$  endotelnih stanica ključnih u zaštiti od nastanka ateroskleroze i tromboze (2).

Endotelne stanice mogu prepoznati i prilagoditi se različitim podražajima (primjerice humoralnim, mehaničkim i hemodinamskim). Neke od najvažnijih funkcija endotela su kontrola vaskularnog tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, proliferacija glatkih mišićnih stanica i modulacija svega što prolazi kroz vaskularnu stijenku (3,4). Sam pojam "endotelna funkcija" uobičajeno se koristi za opisivanje sposobnosti endotela da oslobodi vazoaktivne tvari i tako regulira vaskularni protok krvi. Vazodilatatorni kapacitet endotela posredovan je dušikovim oksidom (NO), metabolitima enzima ciklooksigenaza (COX-1, -2) kao što je prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), i tzv. endotelnim čimbenicima hiperpolarizacije (engl. *endothelium derived hyperpolarizing factors*, EDHF) (5). Do danas je definiran veliki broj EDHF-ova uključujući kalijev ion, metabolite citokroma P450 (CYP450) kao što su epoksieikozatrienska kiselina (EETs) i lipoksigenaza, vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ciklički adenozin monofosfat (cAMP) itd. (6–9). Endotel je isto tako i mjesto sinteze važnih endotelnih čimbenika vazokonstrikcije (engl. *endothelium derived constricting factor*, EDCF), uključujući endotelin-1 (ET-1), metabolite COX-1, -2 kao što su tromboksan (TXA<sub>2</sub>) i prostaglandin F<sub>2</sub>alpha (PGF<sub>2</sub>α), kao i 20-hidroksieikozatetraensku kiselinu (20-HETE) izvedenu iz CYP450-hidroksilaze (9–11).

### 1.2. Endotelna disfunkcija

Endotelna disfunkcija (ED) je prekursor i najraniji uočljiv ishod kardiovaskularnih bolesti, a karakterizirana je neodgovarajućom aktivacijom endotela (12). Ta neprimjerena aktivacija endotela (13) može se očitovati kao čitav spektar patofizioloških stanja u rasponu od lokalizirane mehaničke ozljede pa do trajne, globalne endotelne aktivacije važne za razvoj različitih klinički manifestiranih bolesti (13).

Sam pojam disfunkcija endotela se obično odnosi na smanjenu proizvodnju i/ili bioraspoloživost vazodilatatora NO i/ili neravnotežu u doprinosu endotelnih vazodilatacijskih



i vazokonstriksijskih metabolita što sve zajedno rezultira oštećenim mehanizmima vaskularne relaksacije (14). Patofiziološke posljedice razvoja endotelne disfunkcije su: 1) abnormalna vaskularna reaktivnost i vaskularni spazam (paradoksalna vazokonstrikcija na acetilkolin); 2) povećana propusnost endotela za makromolekule (lipoproteine) s posljedičnom deformacijom endotelnih stanica i patološkim stvaranjem međustaničnih pukotina; 3) povećana ekspresija topljivih staničnih adhezijskih molekula (sCAMs); 4) regrutiranje i nakupljanje monocita/makrofaga u intimi krvnih žila; 5) smanjena regeneracija endotelnih stanica i povećana proliferacija i migracija glatkih mišićnih stanica; i 6) poremećaj hemostatske ravnoteže karakteriziran ekspresijom prokoagulantnih molekula, stvaranjem trombina, agregacijom i adhezijom trombocita te zadržavanjem fibrina (15 – 18).

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća razvijen je niz metodoloških pristupa za procjenu i mjerenje endotelne (pato)fiziološke funkcije, uključujući raznolike biokemijske/metaboličke metode, funkcionalne/vaskularne metode (mjerenje protoka ili arteriografska mjerenja vaskularne funkcije), te metode za procjenu strukture endotela (19, 20). Najčešće korišteni biokemijski/metabolički biljezi funkcije endotela su: NO i njegovi metaboliti, sCAMs, biljezi koagulabilnosti, biljezi oksidativnog stresa, kemokini, mikročestice, endotelne progenitorne stanice, citokini, asimetrični dimetilarginin (ADMA), visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hsCRP), mijeloperoksidaza (MPO), itd.

Najčešće korištene znanstveno-istraživačke, ali i dijagnostičke metode za procjenu endotelne funkcije velikih krvnih žila su: protokom posredovana vazodilatacija (FMD, engl. flow mediated dilation) brahijalne arterije koja predstavlja neinvazivni zlatni standard za procjenu makrovaskularne funkcije endotela i predviđanje budućih kardiovaskularnih događaja, venska okluzivna pletizmografija podlaktice, debljina kompleksa intima-media karotidne arterije, procjena brzine pulsno vala, koronarna angiografija, a za procjenu mikrovaskularne endotelne funkcije najčešće se koristi metoda mjerenja protoka tehnikom laser Dopplera mikrocirkulacije kože u odgovoru na različite podražaje (vaskularnu okluziju, iontoforezu acetilkolina, lokalno zagrijavanje itd.) (19 – 21). Zbog svoje lake dostupnosti koža predstavlja prikladno mjesto za proučavanje periferne mikrocirkulacije, što je i predloženo kao biljeg sistemske mikrovaskularne funkcije u raznim bolestima (21). U posljednjih 30-ak godina se mikrovaskularna funkcija kože koristila u istraživanjima vaskularnih mehanizama različitih bolesti uključujući arterijsku hipertenziju (22, 23), pretilost (24), šećernu bolest (25, 26), starenje, bubrežne bolesti (27) itd.

Laserska Doppler (LD) tehnika temelji se na procjeni veličine protoka u kožnoj mikrocirkulaciji pomoću refleksije laserske zrake od eritrocita u mikrocirkulaciji i njezinoj promjeni valne duljine (Dopplerov efekt) (28). Prva razvijena tehnika bila je laserska Doppler floumetrija (LDF) koja mjeri protok krvi u jednoj točki i stoga u malom volumenu, ali s visokom frekvencijom uzorkovanja. Glavno ograničenje ove tehnike je njezina prostorna varijabilnost, zbog regionalne heterogenosti kožne perfuzije i mjerenje protoka krvi u jednoj točki (29). Kasnije je razvijen laserski Doppler prikaz koji daje dvodimenzionalnu sliku mikrovaskularne perfuzije kože koristeći isti princip kao LDF. Budući da ova metoda procjenjuje protok na puno većoj površini od LDF-a, uspjela je smanjiti prostornu varijabilnost, ali je puno sporija od LDF-a, zbog čega je navedenom metodom teško zabilježiti brze promjene u krvnom protoku (30). Obje se tehnike uobičajeno koriste za procjenu odgovora mikrovaskularne reaktivnosti na različite podražaje kao što je prethodno opisano. Za procjenu specifično dušikovim oksidom posredovane o endotelu ovisne vazodilatacije kožne mikrocirkulacije u istraživanjima se uobičajeno koristi periferni mikrovaskularni odgovor na lokalno toplinsko zagrijavanje (engl. local thermal hyperemia, LTH) kože pomoću mjerenja protoka laser Dopplerom (LDF) koji je podrobnije opisan u dijelu Metode (4.3.4.).

Dilatacija posredovana protokom brahijalne arterije (FMD) najčešće je korištena neinvazivna in vivo metoda za neizravnu procjenu endotelne funkcije provodnih krvnih žila koju su uveli Celermajer i suradnici (31). Navedena metoda pruža informacije o sposobnosti endotela da odgovori na određeni podražaj, u ovom slučaju na vaskularnu okluziju (reaktivna hiperemija). Kod izvođenje ove metode postavlja se arterijska okluzijska manžeta na podlakticu, ona se potom napuše kako bi se zaustavio anterogradni protok krvi i stvorila ishemija. Posljedično će distalno od okluzije u otporničkim arterijama doći do vazodilatacije a kada je tlakomjer ispuhan javlja se reaktivna hiperemija u brahijalnoj arteriji. Metoda uključuje ultrazvučno snimanje u mirovanju (osnovno snimanje) i tijekom reaktivne hiperemije. FMD se izražava kao postotak razlike između dva provedena mjerenja (32). Točan mehanizam posredovanja FMD tijekom reaktivne hiperemije nije u potpunosti razjašnjen, smatra se kako je glavni medijator smicanje, izazvano dušikovim oksidom (33, 34) , ali i drugi vazodilatacijski faktori podrijetlom iz endotela mogu doprinijeti navedenom odgovoru (35). Periferna endotelna funkcija procijenjena FMD-om korelira s vaskularnom funkcijom koronarne arterije (36). Osim toga, oštećena FMD jedna je od ranih manifestacija vaskularne bolesti i može biti važan pokazatelj endotelne ozljede. Podrobniji opis FMD korišten u ovom istraživanju, kao i odgovor na nitroglicerol

(NTG) koji je korišten za određivanje vazodilatacije neovisne o endotelu, opisani su u dijelu Metode (4.3.5.).

### **1.3. Prekomjerni unos kuhinjske soli kao javnozdravstveni problem**

Povećani unos kuhinjske soli hranom, povezan je i s nastankom i progresijom arterijske hipertenzije (AH) (37) kao i nastankom različitih manifestnih kardiovaskularnih bolesti (37). Iz tog razloga je globalno gledajući povećani unos kuhinjske soli glavni preventibilni uzrok morbiditeta i mortaliteta (38). Istraživanje provedeno u Republici Hrvatskoj 2008. godine (engl. Croatian Action on Salt and Health (CRASH)) pokazalo je da je prosječni dnevni unos kuhinjske soli bio 11,6 grama soli dnevno (13,3 grama/dnevno za muškarce i 10,2 grama/dnevno za žene), što je više nego dvostruko od preporučenog unosa prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) (5 g soli/dan) (39). Studija PURE procijenila je kako je u 2010. godini globalni unos natrija iznosio 3,950 mg dnevno (što je ekvivalent 9,88 g NaCl), što je znatno više od preporučenih količina od 2,300 mg (ekvivalent 5,75 g NaCl) (40). Potaknuti rezultatima CRASH istraživanja, Hrvatski Zavod za javno zdravstvo i Ministarstvo zdravlja izradili su strateški plan za smanjenje unosa kuhinjske soli s ciljem smanjenja dnevnog unosa soli za 4% svake godine, od 11,6 grama dnevno u 2015. godini na 9,3 grama dnevno u 2019. godini (41). I mnoge druge države pokrenule su nacionalne inicijative za smanjenje unosa kuhinjske soli hranom, a najbolje rezultate pokazale su Finska, Japan, Portugal i Velika Britanija. Program koji je inicijalno započeo u Velikoj Britaniji (engl. Consensus Action on Salt and Health - CASH) uzor je svima i postao je do 2005. godine međunarodno prepoznati i priznati pokret (engl. World Action on Salt and Health - WASH). U SAD-u je predstavljena i prihvaćena DASH (engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension) dijeta koja se bazira na prehrani bogatoj povrćem, voćem i mliječnom hranom s niskim udjelom masti te sukladno tome sa smanjenom količinom zasićenih i ukupnih masti i u konačnici ukupnim unosom oko 3 g kuhinjske soli dnevno, nakon što je dokazano da može prevenirati nastanak arterijske hipertenzije te sniziti povišeni arterijski tlak (42).

Podaci o dnevnom unosu kuhinjske soli u Hrvatskoj iz 2019. godine pokazali su kako se prosječni dnevni unos soli smanjio za 1,6 g soli dnevno u posljednjih 12 godina (1,9 grama soli dnevno kod muškaraca i 1,0 gram soli dnevno kod žena) što ukazuje na potrebu za nastavkom napora s intencijom da se dnevni unos soli u Hrvatskoj približi vrijednostima koje preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija (43). Rezultati dobiveni u Hrvatskoj su u skladu s onima

dobivenima i u drugim Europskim i zapadnim zemljama, što je još jednom pokazalo koliki je prekomjerni unos kuhinjske soli problem na svjetskoj i populacijskoj razini. Intencija Svjetske zdravstvene organizacije i Ujedinjenih naroda je smanjiti unos kuhinjske soli za 30% do 2025. godine (43).

#### **1.4. Utjecaj velikog unosa kuhinjske soli na vaskularnu i endotelnu funkciju**

Brojne epidemiološke i intervencijske studije pokazale su nedvojbenu povezanost između dnevnog unosa kuhinjske soli i razvoja i progresije arterijske hipertenzije (38). Međutim, prekomjeran dnevni unos kuhinjske soli ne predstavlja velik javnozdravstveni problem samo zbog jasne veze s arterijskom hipertenzijom, već zato što je postalo jasno kako utječe na vaskularnu i endotelnu funkciju čak i u odsutnosti promjena arterijskog tlaka (12, 44, 45) i sastava tijela ili tjelesnih tekućina (46 – 49). Jedna od pionirskih studija koja je pridonijela ovim saznanjima bila je 30-godišnja studija Wienbergera i suradnika kojom je pokazano da osobe osjetljive na sol koje nisu razvile arterijsku hipertenziju imaju višu stopu smrtnosti od osoba rezistentnih na sol. Sve više dokaza kako je disfunkcija endotela čest rezultat povećanog unosa kuhinjske soli posebno su značajni, budući da je endotelna disfunkcija označena kao prekursor i najraniji uočljivi ishod kardiovaskularnih bolesti i konačnog mortaliteta (50).

Prvotno su studije koje su nastojale istražiti učinak prekomjernog unosa kuhinjske soli na vaskularnu i endotelnu funkciju koristile animalne modele, i to najčešće glodavce (osobito štakore). Prva je studija na animalnom modelu, koja je pokazala da prekomjeran unos kuhinjske soli dovodi do nastanka endotelne disfunkcije neovisno o promjenama arterijskoga tlaka, objavljena 1987. godine (51). Otada sve veći broj dokaza ukazuje da prekomjeran unos kuhinjske soli uzrokuje endotelnu disfunkciju i to u različitim vaskularnim slivovima, ali i da je takav učinak puno varijabilniji u velikim provodnim (studije na aorti) nego u manjim krvnim žilama (otporničke žile, mikrocirkulacija) (52 – 54). Studije su na otporničkim arterijama (skeletni mišić, mezenterij, mozak) pokazale kako velik dnevni unos kuhinjske soli (prehrana s udjelom NaCl-a između 4 % i 8 % u trajanju od 3 dana do 8 tjedana) rezultira oslabljenom vazodilatacijom ovisnom o endotelu, koja nastaje zbog izrazito smanjene biorasploživosti NO-a i nije ovisna o povećanju arterijskoga tlaka (52, 53, 55). Smatra se da tako smanjena biorasploživost NO-a nastaje kao rezultat smanjene proizvodnje NO-a, povećane razgradnje NO-a i/ili kombinacijom ova dva procesa. Što se tiče drugih puteva koji bi potencijalno mogli

biti uključeni u o endotelu ovisnu dilataciju nakon prekomjernog unosa kuhinjske soli, rezultati su većine studija pokazali da kod štakora hranjenih hranom s velikim udjelom kuhinjske soli ne dolazi do povećanja aktivnosti EDHF-a ili bilo kojeg drugog vazodilatatora kako bi se nadoknadila smanjena biorasplošivost NO. Ipak, rezultati studija nisu u potpunosti jednoznačni. Tako je nekoliko studija pokazalo da kod Sprague-Dawley i Dahl sol osjetljivih štakora koji su dobivali hranu s velikim udjelom kuhinjske soli (8 % NaCl tijekom 4 tjedna) dolazi do aktivacije alternativnih vazodilatacijskih putova (npr. posredovanih EDHF-ovima) kako bi se kompenzirao gubitak funkcije NO-a u otporničkim krvnim žilama (56, 57). S druge strane, neke studije su prikazale potpuno oprečne rezultate, druge su čak izvijestile da prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (6 % NaCl tijekom 8 tjedana) inducira porast otpuštanja EDCF-a, što posljedično doprinosi oslabljenoj vazorelaksaciji ovisnoj o endotelu u aortama spontano hipertenzivnih štakora (58). Postoje brojni dokazi koji ukazuju na to da povećana razina oksidativnog stresa ima središnju ulogu u oštećenju o endotelu ovisne vazodilatacije kod štakora koji su hranjeni hranom s velikim udjelom kuhinjske soli (59). Konkretno, pokazano je da povećana razina superoksidnog iona ( $O_2^-$ ) ima važnu ulogu u smanjenju biorasplošivosti NO-a zbog oksidacije NO-a i stvaranja peroksinitrita ( $ONOO^-$ ) (60), ili njegovog utjecaja na aktivnosti enzima koji stvara endotelni NO, endotelne NO sintetaze (eNOS-a) (61). Za sada je identificirano nekoliko potencijalnih izvora  $O_2^-$  u vaskularnoj stijenci (npr. NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza, COX, CYP450 enzimi itd.), a zabilježeno je i da u različitim vrstama (npr. animalne i humane studije) postoje značajne razlike u enzimima odgovornim za povećanje  $O_2^-$  u krvnim žilama uslijed opterećenja kuhinjskom solju (62). Osim povećanog stvaranja ROS-a, povećanoj razini oksidativnog stresa uslijed prekomjernog unosa kuhinjske soli može doprinijeti i oštećenje obrambenih antioksidativnih mehanizama (samostalno ili u kombinaciji s povećanim ROS-om) (63). Tako je kod životinja hranjenih hranom s velikim udjelom kuhinjske soli pokazana smanjena ekspresija bakar-cinkove izoforme enzima superoksid dismutase (Cu/Zn SOD), kao i manganove izoforme SOD-a (MnSOD) (64, 65). Brojni eksperimentalni dokazi proizašli iz istraživanja na eksperimentalnim životinjama hranjenih hranom s velikim udjelom kuhinjske soli (većinom štakori) ukazuju na to da kronična supresija aktivnosti renin-angiotenzinskog sustava (RAS) i posljedično niska razina angiotenzina II (Ang II) (fiziološki odgovor na povećani unos kuhinjske soli) imaju važnu ulogu u povećavaju razine oksidativnog stresa i posljedičnog štetnog učinka na vaskularnu/endotelnu funkciju, koja je gotovo identična učincima koji se javljaju kod patološki povišene razine Ang II (npr. arterijska hipertenzija) (63, 64, 66). Važnost normalnog funkcioniranja RAS-a i održavanja fiziološke razine Ang II u očuvanju normalne vaskularne funkcije, potkrijepljena je brojnim

istraživanjima koja su pokazala da je vaskularna relaksacija u odgovoru na različite vazodilatacijske podražaje nakon prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli bila obnovljena kontinuiranom infuzijom subpresorskih doza Ang II. Iako su istraživanja na animalnim modelima uložila veliki napor u rasvjetljavanje potencijalne veze između prekomjernog unosa kuhinjske soli, supresije RAS-a, povećanog oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije, mehanizmi kojima do toga dolazi, kao i sistemski odgovor organizma na prekomjeran unos kuhinjske soli, još uvijek nisu u potpunosti jasni.

Ispočetka, prva su klinička istraživanja koja su nastojala istražiti učinak prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam na vaskularnu/endotelnu funkciju u ljudi bila učinjena na populaciji pacijenata oboljelih od arterijske hipertenzije i zbog toga rezultati istih nisu mogli odvojiti učinak povećanog unosa kuhinjske soli od učinka samog povećanog arterijskog tlaka na endotelnu funkciju. Stoga je, po uzoru na dizajn studija na animalnim modelima, trebalo započeti istraživati učinak prekomjernog unosa kuhinjske soli na vaskularnu funkciju u zdravih, normotenzivnih pojedinaca. U usporedbi sa studijama na animalnim modelima, velika je prednost funkcionalnih vaskularnih studija koje se provode na ljudima, ta što se one provode *in vivo* (za razliku od dominantno *in vitro* modela proučavanja vaskularne funkcije na životinjama), i time pružaju izvrsnu osnovu za ispitivanje vaskularne reaktivnosti u realnim uvjetima uz prisutnu aktivnost svih potencijalnih regulatornih sustava (npr. RAS, adrenergički sustav itd). Nadalje, za razliku od studija na animalnim modelima, istraživanja na ljudima dozvoljavaju koncept unakrsnih istraživanja, u kojemu se vaskularna funkcija može procijeniti prije i poslije prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli kod svakog ispitanika. U velikoj većini studija na zdravim pojedincima, prehrana je s velikim udjelom kuhinjske soli podrazumijevala unos od 250 do 400 mmol Na<sup>+</sup>/dan (14,6 do 23,4 g NaCl/dan), te je protokol takve prehrane sa velikim unosom soli trajao od 5 do 7 dana. Prve su studije na zdravim pojedincima donijele oprečne rezultate. Studija autora Steina i suradnika (1995.) provedena na sedam zdravih muškaraca, pokazala je da prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (250 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 4 tjedna) nije utjecala na veličinu protoka krvi u podlaktici nakon primjene metakolina, a primjena natrijevog nitroprusida značajno je povećala protok (67). Na temelju dobivenih rezultata, autori su zaključili da gore opisani protokol sa povećanim unosom kuhinjske soli dovodi do smanjenog stvaranja i otpuštanja endotelnog NO-a. Autori Dishy i suradnici su izvijestili kako je prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (400 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 6 dana) u dvadeset i pet normotenzivnih ispitanika dovela do smanjene proizvodnje NO-a i u pojedinaca osjetljivih i neosjetljivih na kuhinjsku sol (dakle, neovisno o promjenama arterijskog tlaka), ali

nije imala utjecaj na vaskularnu reaktivnost krvnih žila podlaktice u odgovoru na mentalni stres test, za koju se inače smatra da je posredovana upravo NO-om (68). Prva studija koja je pokazala funkcionalno oslabljenu o endotelu ovisnu vazodilataciju (mjerjenje protoka krvi u podlaktici nakon infuzije acetilkolina metodom venske okluzivne pletizmografije) uslijed prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (200 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 5 dana) jest istraživanje Tzemosi i suradnika na populaciji šesnaest zdravih muškaraca (69). U navedenoj studiji je primjena L-NAME-a (inhibitora NOS-a) nakon prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli, smanjila protok krvi u podlaktice za 35 %, što ukazuje na to da je uslijed velikog unosa kuhinjske soli došlo do smanjenja biorasploživosti NO-a. Međutim, s obzirom na to da je u toj studiji prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli dovela do malog, ali značajnog povećanja arterijskog tlaka, učinak opterećenja solju na endotelnu funkciju i oslobađanje NO-a nije se mogao potpuno odvojiti od učinka povišenog arterijskog tlaka. Autori Eisenach i suradnici su pokazali kako prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (400 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 5 dana) nije značajno utjecala na vazodilatacijski odgovor krvnih žila podlaktice na acetilkolin (ACh) (venska okluzijska pletizmografija) kod zdravih osoba oba spola, a NO komponenta ACh posredovane vazodilatacije je nakon dijete s velikim udjelom kuhinjske soli bila smanjena samo kod muškaraca, ali ne i kod žena (70). Dickinson i suradnici su pokazali kako samo jedan obrok bogat solju (65 mmol Na<sup>+</sup>) dovodi do postprandijalnog oštećenja protokom posredovane vazodilatacije brahijalne arterije (FMD), ali ne i reaktivne hiperemije mjerene metodom periferne arterijske tonometrije (RH-PAT, mikrovaskularna funkcija) kod šesnaest zdravih osoba (71). Ipak, nekoliko je kasnijih studija (uglavnom objavljenih od strane dviju istraživačkih skupina) pokazalo jasan štetan učinak prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam na endotelnu funkciju u zdravih pojedinaca, koji je neovisan o promjenama arterijskoga tlaka. Štoviše, istraživači su u nekim od navedenih studija nastojali napraviti korak naprijed u rasvjetljavanju barem dijela mehanizama odgovornih za promjene endotelne funkcije uslijed prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam. Greaney i suradnici su pokazali kako prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (350 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 7 dana) uzrokuje oštećenje mikrovaskularne reaktivnosti u koži podlaktice mjereno tehnikom LDF, a koja se očitovala kao smanjenje protoka krvi tijekom lokalne vazodilatacije izazvane zagrijavanjem kože (smatra se NO-ovisnom vazodilatacijom) u dvanaest normotenzivnih odraslih pojedinaca, u odsutnosti promjena arterijskog tlaka (46). U istoj su studiji autori pokazali kako lokalna aplikacija askorbinske kiseline (vitamin C) ublažava ili u potpunosti poništava oštećenja mikrovaskularne funkcije uzrokovane prekomjernim unosom kuhinjske soli, te su tako ukazali na važnu ulogu oksidativnog stresa u navedenom oštećenju mikrovaskularne funkcije. Nakon

toga, ista je istraživačka skupina proširila svoje istraživanje na makrocirkulaciju, te pokazala kako prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (300 do 350 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 7 dana) smanjuje FMD brahijalne arterije u četrnaest zdravih pojedinaca, također neovisno o promjenama arterijskoga tlaka (72). Nadalje, godinu dana nakon te studije, autori su ponovili isti dizajn istraživanja (300 do 350 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 7 dana) kako bi ispitali utječe li prekomjeran unos kuhinjske soli u organizam različito na endotelnu funkciju u muškaraca i žena (30 ispitanika, 14 žena, 16 muškaraca) (73). Pokazali su kako prekomjeran unos kuhinjske soli dovodi do smanjenja FMD-a brahijalne arterije i kod muškaraca i žena, ali da je ipak to smanjenje bilo izraženije u muškaraca, što pokazuje da muškarci imaju krvne žile osjetljivije na prekomjeran unos kuhinjske soli u organizam u usporedbi sa ženama (73). Istraživačka skupina Edwardsa i Farquhara proširila je svoje sljedeće istraživanje na zdrave pojedince osjetljive na sol. Tada su objavili da je prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (300 mmol Na<sup>+</sup>/dan tijekom 7 dana) uzrokovala gotovo jednako, značajno smanjenje FMD-a brahijalne arterije i kod zdravih pojedinaca osjetljivih i onih neosjetljivih na sol, time podupirući tezu da prekomjeran unos kuhinjske soli ima štetan učinak na vaskularnu (endotelnu) funkciju neovisno o promjenama arterijskog tlaka (74).

S druge strane, druga se istraživačka skupina usredotočila na istraživanje učinka prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam na mikrovaskularnu funkciju u populaciji zdravih pojedinaca. Oni su u svom prvom istraživanju pokazali kako je 7 dana blokade angiotenzinskih receptora tip 1 (AT1 receptora) kod zdravih pojedinaca koji su bili na dijeti s malim udjelom kuhinjske soli uzrokovalo značajno povećanje koncentracije stabilnog metabolita tromboksana (TXA<sub>2</sub>) u plazmi, time pokazujući da supresija RAS-a i proizvodnja vazokonstriktornih metabolita arahidonske kiseline mogu imati važnu ulogu u regulaciji vaskularne funkcije tijekom prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam (75). Kasnije su pokazali kako 7-dnevna prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli (250 mmol Na<sup>+</sup>/dan) smanjuje post-okluzivnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji kože podlaktice (mjerenu LDF-om) i povećava plazmatsku koncentraciju TXA<sub>2</sub>, ukazujući na to da vazokonstriktorski metaboliti COX enzima, posebno COX-1, imaju značajnu ulogu u razvoju oštećenja endotelne funkcije nakon kratkotrajnog prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam (47). U svojoj su trećoj studiji, Čavka i suradnici izvijestili da nakon 7 dana prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (250 mmol Na<sup>+</sup>/dan) vazodilatacija arteriola izoliranih iz glutealnog potkožnog masnog tkiva u odgovoru na ACh ili promjenu protoka, više nije bila posredovana NO-om, već su je posredovali drugi vazodilatacijski metaboliti porijeklom iz COX-a i CYP450-a (48). Sukladno



ranijskim istraživanjima, u istoj je studiji i ova istraživačka skupina pokazala da 7 dana prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli značajno smanjuje FMD brahijalne arterije u zdravih žena, neovisno o promjenama arterijskoga tlaka (48). U daljnjim je pokusima pokazano kako 7-dnevna dijeta s velikim unosom kuhinjske soli inhibira RAS aktivnost (fiziološki očekivani odgovor) i narušava perifernu mikrovaskularnu reaktivnost, utječući na endotel ovisnu dilataciju (acetilkolinom inducirana dilatacija, AChID), ali ne i na endotelu neovisnu vazodilataciju (dilatacija inducirana natrijevim nitroprusidom, SNPID) kod mladih zdravih osoba. Promjene su bile neovisne o arterijskom tlaku, promjenama sastava tijela ili zadržavanju tekućine, već su bile posljedice jedinstvenog učinka velikog unosa kuhinjske soli na endotelnu funkciju (49). U sljedećem koraku testirana je specifična uloga oksidativnog stresa u 7-dnevnim, velikim unosom kuhinjske soli induciranim, promjenama mikrovaskularne endotelne funkcije mjereći nekoliko biljega oksidativnog stresa i antioksidativne obrane (npr. tvari koje reagiraju na tiobarbiturnu kiselinu (TBARS), sposobnost plazme za redukciju željeza (FRAP), unutarstanična proizvodnja ROS-a, 8-izo prostaglandin F2 (8-izo-PGF2a), antioksidativni enzimi) te mjereći hoće li oralni dodatak nespecifičnog ROS „čistača“ (vitamin C i vitamin E) tijekom 7-dnevnog opterećenje solju promijeniti oksidativni status i tako potencijalno spriječiti oštećenje mikrovaskularne endotelne funkcije kod inače zdravih normotenzivnih pojedinaca. To je istraživanje prvenstveno pokazalo kako je 7 - dnevna dijeta s velikim unosom kuhinjske soli dovela do smanjenja antioksidativnog kapaciteta i povećanja oksidativnog stresa neovisno o arterijskom tlaku kod mladih zdravih osoba. Štoviše, poboljšana antioksidativna obrana primjenom vitamina C i vitamina E tijekom 7 dana prehrane s povećanim unosom kuhinjske soli poništila je ove promjene oksidativnog statusa i spriječila oštećenje periferne mikrovaskularne endotelne funkcije koje je primijećeno kod povećanog unosa kuhinjske soli. Stoga je ova studija dala ključne rezultate o ulozi oksidativne ravnoteže u održavanju normalne funkcije vaskularnog endotela tijekom opterećenja solju, neovisno o vrijednostima arterijskog tlaka. Isto tako ova je studija pokazala kako 7 - dnevna dijeta sa povećanim unosom kuhinjske soli nije uzrokovala promjene u koncentraciji proteina u serumu matične metaloproteinaze 9 (MMP-9) (marker remodeliranja izvanstaničnog matriksa), što sugerira kako funkcionalne vaskularne promjene, očitovane kao oslabljena reaktivnost mikrovaskularnog endotela, nastaju ranije od potencijalnog strukturnog preoblikovanja krvnih žila (76). Nadalje, posebno je testirana i uloga promjena u ravnoteži autonomnog živčanog sustava (ANS) na oštećenu mikrovaskularnu endotelnu funkciju tijekom 7 - dnevnog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli, i to procjenom 24 - satnog izlučivanja kateholamina urinom i 5-minutne varijabilnosti srčanih otkucaja (HRV) te ispitivanjem hoće li modulacija aktivnosti autonomnog

živčanog sustava (testom mentalnog stresa) nakon 7 - dnevne dijete s velikim unosom kuhinjske soli utjecati na oštećenje funkcije mikrovaskularnog endotela uzrokovano kod inače zdravih normotenzivnih pojedinaca. Studija je pokazala kako 7 - dnevna dijeta s velikim unosom kuhinjske soli značajno smanjuje 24 - satno izlučivanje kateholamina u urinu i nisko-frekventni spektar (LF) 5 - minutne varijabilnosti srčanih otkucaja (kao i omjer nisko- i visoko-frekventnog spektra (LF/HF omjer)), što ukazuje da kratkotrajno opterećenje velikim unosom kuhinjske soli rezultira supresijom aktivnosti simpatičkog živčanog sustava (SNS) zajedno s oštećenjem mikrovaskularne reaktivnosti. Izlaganje mentalnom stresu (MST) nije izazvalo značajne promjene u endotel-ovisnom mikrovaskularnom odgovoru (nepromijenjeni AChID i nepromijenjena komponenta endotelne aktivnosti u spektralnoj analizi PORH signala) niti u uvjetima s povećanim, a niti smanjenim unosom kuhinjske soli, što ukazuje da supresija SNS-a tijekom opterećenja povećanim unosom kuhinjske soli predstavlja fiziološki odgovor povezan sa supresijom RAS-a zbog povećanog unosa kuhinjske soli, a ne izravni patofiziološki mehanizam kojim prehrana s povećanim unosom kuhinjske soli utječe na endotelnu mikrovaskularnu funkciju kod mladih zdravih osoba (77). Konačno, navedena istraživačka skupina je ispitala učinak na upalu i endotelno-leukocitnu interakciju u uvjetima kratkotrajnog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli. Pokazano je kako je 7 - dnevna prehrana s velikim unosom kuhinjske soli značajno promijenila fenotip i dinamiku leukocita periferne krvi kod zdravih mladih ljudi neovisno o promjenama arterijskog tlaka. Osim toga, 7 - dnevna prehrana s povećanim unosom kuhinjske soli kod zdravih osoba rezistentnih na sol, potiče proupalni odgovor koji je karakteriziran povećanjem serumskih razina interferona gama (IFN- $\gamma$ ), tumorskog faktora nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina 9 (IL-9) i interleukina 17-A (IL-17A), ali isto tako rezultira i porastom protuupalnog interleukina 10 (IL-10) i transformirajućeg faktora rasta beta 1 (TGF- $\beta$ 1). Porast serumske razine IL-17A (i trend povećanja serumske razine interleukina 21 (IL-21) i interleukina 22 (IL-22)) kao i povećanje relativne količine ukupne serum i glukokortikoid inducirane kinaze (SGK1) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) podupire hipotezu o početnoj aktivaciji IL-17 lučćih Th17 stanica kao odgovor na prehranu sa povećanim unosom kuhinjske soli. Zanimljivo je kako prehrana s povećanim unosom kuhinjske soli izaziva popratni protuupalni odgovor koji je potencijalno posredovan aktivacijom Treg stanica i karakteriziran povećanjem serumske koncentracije IL-10 i TGF- $\beta$ . Također, ovo istraživanje je pokazalo kako oksidativni stres mijenja imunološke regulacijske mehanizme zbog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli potencijalno preko učinaka na Treg stanice (78). Promatrajući sve zajedno, navedeni rezultati sugeriraju kako 7 - dnevno opterećenje velikim unosom kuhinjske soli kod zdravih

pojedinaca utječe na endotel-ovisnu mikrovaskularnu, ali ne i na endotel-neovisnu vazodilataciju, kako povećava oksidativni stres i smanjuje antioksidativnu obranu, pokreće upalu niskog stupnja, ali isto tako uravnotežuje protuupalni odgovor. Opterećenje solju rezultira očuvanom fiziološkom inhibicijom aktivnosti RAS-a i ANS-a, nepromijenjenom vaskularnom glatkom mišićnom ovisnom dilatacijom, endotelnom (upalnom) aktivacijom ili strukturalnim vaskularnim preoblikovanjem. Ukratko rečeno, rezultati dosadašnjih istraživanja o učinku opterećenja kuhinjskom soli na vaskularnu funkciju kod zdravih pojedinaca ukazuju na to kako oksidativna neravnoteža ima ključnu ulogu u oštećenju endotelne mikrovaskularne funkcije izazvane velikim unosom kuhinjske soli kod zdravih pojedinaca što je isto neovisno o promjenama arterijskog tlaka.

### **1.5. Specifična uloga dušikovog oksida u endotelnoj disfunkciji uzrokovanoj prekomjernim unosom kuhinjske soli**

Dosadašnje studije i na animalnim i humanim modelima pokazale su kako prekomjerman unos kuhinjske soli uzrokuje oštećenje endotelne vaskularne funkcije i na razini mikro- i makrocirkulacije, a kao glavni potencijalni mehanizmi koji posreduju takvo oštećenje identificirani su inhibicija RAS-a, povećana razina oksidativnog stresa te aktivacija endotela, endotelno-leukocitna interakcija i modulacija upalnog odgovora (59). Ipak, specifična uloga pojedinih endotelnih vazoaktivnih metabolita u navedenom oštećenju, još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.

Prema navedenome, studije na animalnim modelima pokazale su kako smanjena bioraspoloživost glavnog endotelnog čimbenika vazodilatacije NO-a ima važnu ulogu u nastanku endotelne funkcije uslijed prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam. Smatra se da tako smanjena bioraspoloživost NO-a nastaje kao rezultat smanjene proizvodnje NO-a, povećane razgradnje NO-a i/ili kombinacije ova dva procesa (4). Postoje brojni dokazi koji ukazuju na to da povećana razina oksidativnog stresa ima središnju ulogu u oštećenju o endotelu ovisne vazodilatacije kod štakora koji su hranjeni hranom s velikim udjelom kuhinjske soli (59). Konkretno, pokazano je da povećana razina superoksidnog iona ( $O_2^-$ ) ima važnu ulogu u smanjenju bioraspoloživosti NO-a zbog oksidacije NO-a i stvaranja peroksinitrita ( $ONOO^-$ ) (60), ili njegovog utjecaja na aktivnosti enzima koji stvara endotelni NO, endotelne NO sintetaze (eNOS-a) (61). Svega nekoliko studija je nastojalo istražiti ovaj učinak na humanom modelu; Greaney i suradnici su kako je već objašnjeno pokazali da 7 dana prehrane s velikim

udjelom kuhinjske soli uzrokuje oštećenje mikrovaskularne reaktivnosti u koži podlaktice u odgovoru na lokalno zagrijavanje kože (smatra se NO-ovisnom vazodilatacijom) u dvanaest normotenzivnih odraslih pojedinaca, u odsutnosti promjena arterijskog tlaka, kao i da lokalna aplikacija askorbinske kiseline (vitamin C) ublažava ili u potpunosti poništava oštećenja mikrovaskularne funkcije uzrokovane prekomjernim unosom kuhinjske soli (46). Ta studija je ukazala na važnu ulogu oksidativnog stresa u NO-om posredovanom endotelnom mikrovaskularnom odgovoru uslijed povećanog unosa kuhinjske soli i na humanom modelu. Čavka i suradnici su kako je već i spomenuto pokazali da nakon 7 dana prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli vazodilatacija arteriola izoliranih iz glutealnog potkožnog masnog tkiva u odgovoru na ACh ili promjenu protoka, više nije bila posredovana NO-om, već su je posredovali drugi vazodilatacijski metaboliti porijeklom iz COX-a i CYP450-a (48). Nekoliko je ranijih istraživanjima pokazalo da 7 dana prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli značajno smanjuje FMD brahijalne arterije kod zdravih pojedinaca, neovisno o promjenama arterijskoga tlaka.

Usprkos svemu, ipak još uvijek nedostaju studije koje bi istražile konkretan učinak kratkotrajnog velikog unosa kuhinjske soli specifično na NO i njime posredovanu endotel-ovisnu dilataciju i u mikro i u makrocirkulaciji, koristeći egzaktne biokemijska mjerenja bioraspoloživosti NO-a te aktivnosti enzima uključenih u njegovu sintezu, kao i funkcionalna mjerenja endotelne (i konkretno o NO-u) ovisne dilatacije u vaskularnim slivovima različitog kalibra u populaciji zdravih ljudi.

### **1.6. Dušikov oksid i sintaze dušikovog oksida**

Dušikov oksid je najmanja poznata signalna molekula, a proizvode ga tri izoforme sintaze dušikovog oksida (NOS, engl. nitric oxide synthase): endotelna (eNOS), neuronska (nNOS) i inducibilna (iNOS) (79). Sve tri izoforme enzima NOS-a imaju regulatornu funkciju u kardiovaskularnom sustavu (79). Zajedničko im je to da sve koriste L-arginin kao supstrat, molekularni kisik i reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao kosupstrate, te flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN) i (6R-)5,6,7,8-tetrahidro L-biopterin (BH4) kao kofaktore (80,81). NO kojeg stvara NOS može djelovati na brojne enzime i proteine (79).

Najvažnija izoforma NOS-a je eNOS koja održava krvne žile proširenima, kontrolira arterijski tlak i uz to ima brojne druge vazoprotektivne i antiaterosklerotske učinke (79). Najvažniji

fiziološki signalizirajući put stimuliran vaskularnim NO-om je aktivacija topljive gvanilil ciklaze i stvaranje cikličkog GMP koji djeluje na glatki mišić i dovodi do vazodilatacije (82–85). NO koji se otpušta prema lumenu u vaskulaturi snažan je inhibitor agregacije i adhezije trombocita. Može spriječiti i prianjanje leukocita na stijenku žile ili ometanjem sposobnosti adhezijske molekule leukocita CD11/CD18 za stvaranje adhezivne veze s endotelnom stanicom površinski ili inhibicijom ekspresije CD11/CD18 na leukocitima. Prianjanje eritrocita je rani događaj u razvoju ateroskleroze i tako NO štiti od početka aterogeneze. Nadalje, dokazano je kako NO inhibira sintezu DNA, mitogenezu i proliferaciju glatkih mišićnih stanica. Inhibicija agregacije trombocita i adhezije štiti glatku muskulaturu od izlaganja faktorima rasta trombocita. Stoga NO sprječava i kasnije stadije aterogeneze a to su stvaranje fibroznih plakova (86). ENOS je ključan i za funkciju endotelnih progenitorskih stanica koje su uključene u vaskularni popravak (87, 88). On je najizraženiji u endotelnim stanicama, iako mu je izoenzim otkriven i u srčanim miocitima, trombocitima, određenim neuronima, sinciotrofoblastu placente i u tubularnim stanicama bubrega (86, 89). U krvnim žilama je eNOS dominantna izoforma NOS-a i odgovoran je za većinu proizvedenog NO (90, 91). ENOS sintetizira NO na pulsirajući način, tako da se aktivnost eNOSa značajno poveća kada raste unutarstanična razina kalcija (79). Međutim, eNOS se može aktivirati i podražajima u kojima ne postoji trajno povišenje unutarstaničnog kalcija, ali i dalje postoji dugotrajno oslobađanje NO. Najbolje istraženi takav poticaj je smično naprezanje tekućine. Ova aktivacija je posredovana fosforilacijom enzima (92, 93).

Neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS) konstitutivno je izražena u središnjim i perifernim neuronima, kao i u nekim drugim stanicama (epitelnim stanicama raznih organa npr. makuli desni bubrega, stanicama gušteračinih otočića, vaskularnim glatkim mišićima) (86, 94). Njezine funkcije uključuju sinaptičku plastičnost u središnjem živčanom sustavu (modulacija fizioloških funkcija kao što su učenje, pamćenje i neurogeneza), središnju regulaciju arterijskog tlaka (95 – 97), opuštanje glatke mišićne muskulature i vazodilataciju putem perifernih nitrengičkih živaca. Konvencionalna predodžba kako je eNOS uglavnom odgovoran za regulaciju vaskularnog tonusa na periferiji dovedena je u pitanje istraživanjem na ljudima sa S metil L tiocitrulinom (SMTC), selektivnim inhibitorom nNOS-a. SMTC smanjuje bazalni protok krvi u ljudskoj podlaktici i u koronarnoj cirkulaciji. Ovaj učinak može biti poništen L-argininom. Zanimljivo je kako SMTC ne utječe na klasičnu vazodilataciju posredovanu eNOS-om kao odgovor na acetilkolin, tvar P, ili smično naprezanje tekućine. Ovi podaci su koherentni sa shvaćanjem da nNOS igra važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, neovisno o učincima

nNOS-a u centralnom živčanom sustavu (CNS-u). Prema tome, eNOS i nNOS mogu imati različite uloge u fiziološkoj regulaciji ljudskog mikrovaskularnog tonusa in vivo (98). Glatke mišićne stanice krvnih žila također izražavaju niske razine nNOS-a za koje se pokazalo da održavaju određeni stupanj vazodilatacije naročito kada dominantni eNOS postane disfunkcionalan (90).

Inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS) obično nije izražena u stanicama, ali ekspresija joj može biti izazvana bakterijskim lipopolisaharidima, citokinima i drugim posrednicima. Iako je prvenstveno identificirana u makrofagima, ekspresija enzima može se potaknuti u bilo kojoj stanici ili tkivu pod uvjetom da su identificirani odgovarajući agensi za indukciju (86, 89). Kada je induciran u makrofagima, iNOS proizvodi velike količine NO-a koji predstavlja glavni citotoksični princip te stanice u odgovoru na parazitske mikroorganizme i određene tumorske stanice (99). Isto tako i neimune stanice mogu biti potaknute citokinima na oslobađanje velikih količina NO-a i tako utjecati na susjedne stanice. Visoke razine dušikovog oksida koje proizvode aktivirani makrofagi (a vjerojatno i neutrofil i druge stanice), ne samo da mogu biti toksične za parazite ili tumorske stanice, već ako su otpuštene na krivom mjestu mogu oštetiti i zdravu stanicu. In vivo oštećenje stanica i tkiva može biti povezano sa samim NO radikalom ili njegovom interakcijom sa superoksidom, što dovodi do stvaranja peroksinitrita (ONOO-) (79).

### **1.7. Molekularne osnove endotelne disfunkcije kod vaskularnih bolesti: inaktivacija bioaktivnog dušika i odvajanje endotelne sintaze dušikovog oksida**

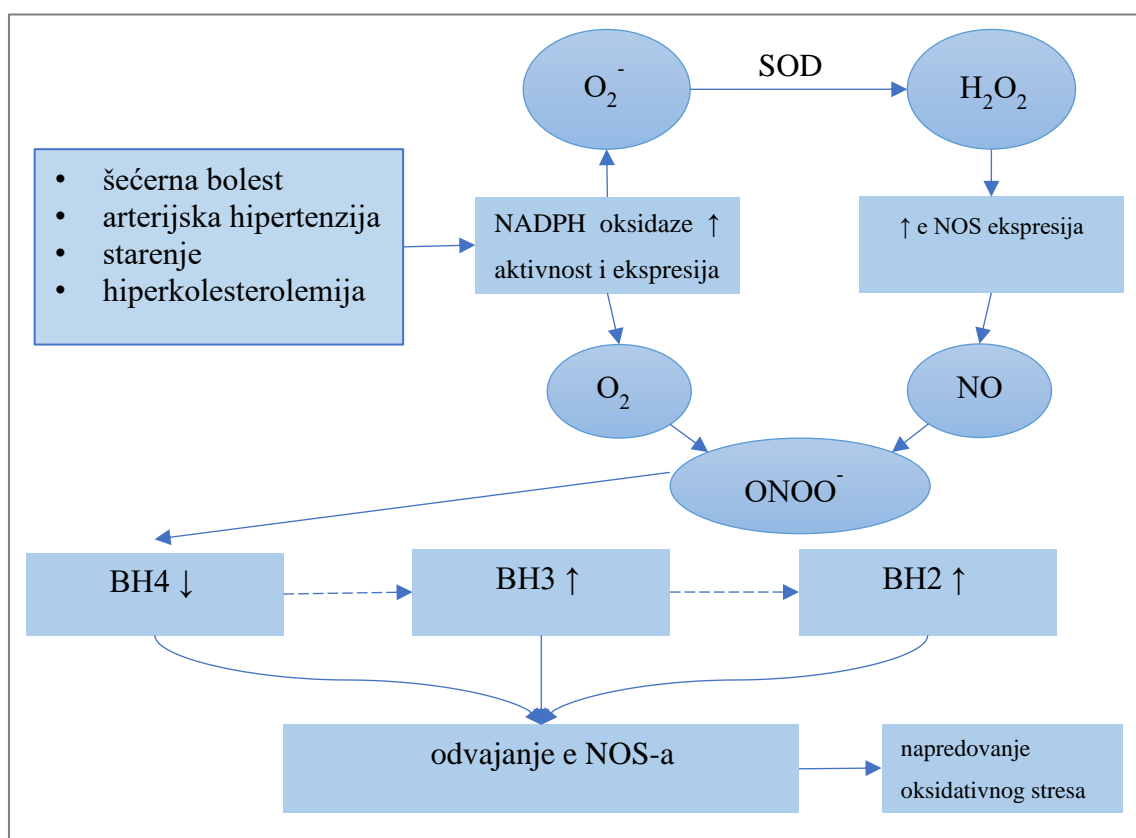
Pojedinci s kardiovaskularnim čimbenicima rizika (kao što su, na primjer, hipertenzija, hiperkolesterolemija, dijabetes melitus, pušenje cigareta), kao i oni s vaskularnim bolestima imaju disfunkciju endotela odnosno smanjenu bioraspoloživost NO koja je rezultat smanjene proizvodnje NO i/ili pojačane inaktivacije NO superoksidom (59, 62), kako je već i prethodno spomenuto. Endotelna disfunkcija doista može biti posljedica smanjenje eNOS ekspresije. Međutim, nekoliko studija je pokazalo kako su kardiovaskularni čimbenici rizika povezani s povećanom ekspresijom eNOS-a prije nego sa smanjenom ekspresijom eNOS-a (100). Povećana ekspresija eNOS-a u vaskularnim bolestima vjerojatno je posljedica prekomjerne proizvodnje  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  koji je dismutirani produkt  $O_2$  može povećati ekspresiju eNOS-a putem transkripcijskih i posttranskripcijskih mehanizama (101). No tako stvoreni eNOS je nevezan i taj mehanizam kompenzacije je uzaludan (79, 102). Ova transformacija eNOS-a iz

zaštitnog enzima u onog koji doprinosi/sudjeluje u oksidativnom stresu zapažena je u nekoliko in vitro modela, u životinjskim modelima kardiovaskularnih bolesti i kod pacijenata s kardiovaskularnim rizičnim faktorima (2).

Oksidativni stres pretvara eNOS od enzima koji proizvodi NO do enzima koji stvara superoksid. Taj se proces naziva, kao što je ranije spomenuto, eNOS odvajanje (103). Mehanizmi uključeni u odvajanje eNOS-a uključuju oksidaciju kritičnog NOS kofaktora BH4 (koji je inače jedan od najpotentnijih prirodnih reducirajućih agenata), smanjenje L-arginina i nakupljanje endogenog inhibitora NOS-a asimetričnog dimetilarginina (ADMA). Nekoliko godina nakon tih mehanizama predložena je i S-glutationilacija eNOS-a kao još jedan mehanizam koji dovodi do odvajanja eNOS-a. Nedostatak BH4 je najizgledniji kako će uzrokovati odvajanje eNOS-a u aterosklerozi i vaskularnim bolestima (79). BH4 se biosintetizira iz gvanozin trifosfata (GTP) s djelovanjem GTP ciklohidrolaze i (GTPCH1) kao enzim koji ograničava brzinu. Pod povezanim uvjetima s oksidativnim stresom, superoksid može umjereno i po oksinitritu snažno oksidirati BH4 u dihidropterin (BH2), što dovodi do nedostatka BH4. BH2 se može svesti natrag na BH4 enzimom dihidrofolat reduktazom (DHFR) (104). Dakle, nedostatak BH4 može biti uzrokovan pojačanom BH4 oksidacijom uslijed oksidativnog stresa, smanjenom de novo sintezom zbog niže regulacije/inhibicije GTPCH1 ili smanjenim recikliranjem iz BH2 zbog smanjene regulacije od DHFR (103).

Kardiovaskularni čimbenici rizika i krvožilne bolesti su isto tako povezani s povećanom proizvodnjom slobodnih kisikovih radikala (79). Postoji nekoliko enzimskih sustava koji potencijalno mogu proizvoditi slobodne kisikove radikale u stijenci krvnih žila. Tu pripadaju NADPH oksidaze (koje su od primarne važnosti za stvaranje slobodnih kisikovih radikala), ksantin oksidaza, enzimi mitohondrijskog respiratornog lanca i nevezani/odvojeni eNOS (79, 105). NADPH oksidaze su aktivirane u životinjskim modelima hipertenzije, dijabetesa, sjedilačkog načina života, i općenito kod pacijenata s faktorima rizika povezanima s kardiovaskularnim bolestima. Nekoliko izoformi superoksida koje proizvodi NADPH oksidaza postoji u krvožilju. Oni su izraženi u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama, kao i u adventiciji (79). Kardiovaskularni čimbenici rizika povećavaju ekspresiju i/ili aktivnost NADPH oksidaze u vaskularnom zidu, čime se potiče proizvodnja reaktivnih spojeva kisika i opet se započinje biokemijski ciklus u kojemu se eNOS transformira iz zaštitnog enzima u onog koji doprinosi i sudjeluje u oksidativnom stresu (79).

Pojednostavljeno rečeno, u mnogim krvožilnim bolestima, NADPH oksidaze i eNOS su usporedno regulirani. Njihovi se produkti ( $O_2^-$  i NO) brzo rekombiniraju u  $ONOO^-$ . Ovo oksidira  $BH_4$ , esencijalni kofaktor eNOS-a, i/ili uzrokuje oksidativno oštećenje cink-tiolatnog klastera eNOS-a. Stoga je redukcija  $O_2$  putem eNOS-a odvojena od stvaranja NO, a funkcionalni NOS se pretvara u nefunkcionalni enzim koji stvara  $O_2^-$  koji pridonosi vaskularnom oksidativnom stresu. Tako pojačana ekspresija eNOS-a zapravo pogoršava i stimulira daljnji oksidativni stres (103) slika (1.1.).



**Slika 1.1. Potencijalni mehanizmi kojima kardiovaskularni i aterosklerotski čimbenici rizika dovode do e NOS odvajanja i endotelne disfunkcije.**

U prisustvu čimbenika rizika NADPH oksidaze i eNOS su usporedno regulirani. Produkti  $O_2^-$  i NO rekombiniraju u  $ONOO^-$ . To oksidira  $BH_4$ , i/ili uzrokuje oksidativno oštećenje klastera eNOS-a. Redukcija  $O_2^-$  putem eNOS-a odvojena je od stvaranja NO, funkcionalni NOS se pretvara u nefunkcionalni enzim koji stvara  $O_2^-$  koji pridonosi oksidativnom stresu.



$O_2^-$  superoksidni ion; SOD- superoksid dismutaza;  $H_2O_2$  - vodikov peroksid; NADPH-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; e NOS- endotelna sintaza dušikovog oksida; NO- dušikov oksid; ONOO<sup>-</sup> peroksinitrit; BH<sub>4</sub>- (6R-)5,6,7,8-tetrahidro L-biopterin, BH<sub>3</sub>-trihidropterin; BH<sub>2</sub>- dihidropterin

(izvor: izradila autorica rada prema: Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. Br J Pharmacol. 2011 Sep;164(2):213–23.)

### **1.8. Neosmotsko vanbubrežno skladištenje natrija**

Teorija ravnoteže izvanstaničnih tjelesnih tekućina usko je povezana s metabolizmom natrija. Od ranije je prihvaćeno mišljenje da će s promjenama u unosu soli bubrežna eliminacija natrija spriječiti bilo kakvu promjenu sadržaja i koncentracije intersticijskog natrija. Opće prihvaćena hipoteza je kako se izvanstanična tekućina lako uravnotežuje, što rezultira konstantnom koncentracijom elektrolita u intersticijskom prostoru između stanica (106). Promjene u koncentraciji natrija promijenile bi osmotski tlak i dovele do pomaka tekućine i time promijenile i same stanice. Prihvaćena teorija u fiziologiji elektrolita i tekućine je kako će regulatorni sustavi, ako je ikako moguće, spriječiti bilo kakvu promjenu sadržaja i koncentracije natrija u intersticiju. Tri su eksplicitna pravila koja definiraju okvir za fiziološka, patofiziološka i klinička istraživanja poremećaja ravnoteže soli i vode. Prva pretpostavka sugerira kako je nakupljanje natrija u tijelu gotovo u potpunosti izvanstanično i kako dovodi od odgovarajućeg zadržavanja tekućine (107). Druga pretpostavka kaže kako će bilo kakvo akumuliranje ili gubitak natrija biti strogo spriječeno nizom regulatornih mehanizama i da će tako održavati natrij u tijelu konstantnim, tj. unutar uskih granica (107). Treća pretpostavka je kako stanje ravnoteže održavaju bubrezi koji luče sol i vodu različitim mehanizmima (108). Proučavanje metabolizma soli i vode postala je „molekularno-bubrežna stvar“ koja se fokusira na mehanizme reapsorpcije natrija (ionski kanali, transporter i njihova regulacija) koji se nalaze u epitelnim stanicama bubrežnih tubula. Ipak, noviji dokazi sugeriraju kako su trenutni pogledi na mehanizam natrija pretjerano pojednostavljeni (107).

Trenutno razumijevanje homeostaze soli kod ljudi proizlazi iz niza studija provedenih u 20. stoljeću, a koje su trajale jedan ili dva tjedna i koje su proučavale što će se dogoditi nakon nagle promjene u unosu soli (109). Udžbenici kažu kako se u normalnim uvjetima kod zdravih

pojedinaца stabilno stanje između unosa soli i ekskrecije natrija urinom postiže unutar nekoliko dana. Autori udžbenika kažu: „ako se unos hranom naglo poveća nakon dijete s niskim unosom natrija samo polovica se izluči prvog dana a ostatak se zadržava povećavajući zalihe natrija“. Ovo stanje podiže osmolalnost plazme, potičući i žeđ i lučenje antidiuretskog hormona. Povećanje unosa vode i bubrežna reapsorpcija vode dovode do retencije vode rezultirajući povećanjem efektivnog cirkulirajućeg volumena i tjelesne mase. Nakon 3 do 4 dana postiže se novo stanje ravnoteže u kojemu bubrežno izlučivanje natrija odgovara unosu. Isti, samo obrnuti slijed se događa ako se smanji unos natrija (110). Prema postojećim znanjima, neravnoteža između unosa i bubrežnog lučenja neizbježno će dovesti do retencije tekućine (teorija ravnoteže). Stoga se sadržaj natrija u tijelu održava unutar vrlo uske granice (teorija ravnoteže).

2014. godine Titze i suradnici su svojim pokusom pod nazivom “Stimulirani let na Mars”, saželi i objasnili istraživanja o homeostazi vode i soli koja nisu bila u skladu s dotadašnjim općeprihvaćenim znanjima (111). U navedenom pokusu, zdravi pojedinci su bili zatvoreni u strogo kontroliranom okruženju u dvije neovisne studije u trajanju od 105 i 520 dana, što je omogućilo dvije vrlo duge studije o ravnoteži natrija u ljudi. Pojedinci su bili hranjeni sa strogo definiranom količinom natrija, a prikupljena je svaka kap urina. Tako ustrojena studija omogućila je jedinstven i detaljan profil dugoročne ravnoteže natrija u ljudi. Takozvani “lažni svemirci” nisu imali poremećenu „steady state“ teoriju. Pojeli su gotovo 15 kilograma soli tijekom studije a izlučili 90 - 95 % soli urinom. Oporavak natrija u ovoj studiji je bio izvrstan. No za razliku od onoga što nas uči udžbenik, stabilno stanje nije postignuto unutar par sati i 24-satno izlučivanje natrija rijetko se podudaralo s unosom natrija toga dana. Ispitanici su ritmički akumulirali i otpuštali tjelesni natrij neovisno o dnevnom unosu soli, što je vjerojatno regulirano neuro-endokrino ritmičkim mehanizmima. Endogene tjedne ili mjesečno ritmičke komponente metabolizma natrija nisu još ušle u kliničko istraživanje, vjerojatno zato što naše kliničko znanje proizlazi iz kratkoročnih eksperimenata. U realnome životu dovoljno je teško nagovoriti zdrave ispitanike i pacijente na jednokratno skupljanje 24 - satnog urina i nije za očekivati kako bi netko to činio tjednima. To promatranje o kojemu su izvijestili Titze i suradnici, ukazuje na ritmičko otpuštanje i skladištenje natrija koje rezultira značajnom varijabilnošću sadržaja natrija u tijelu, kao i na potvrdu teorije da natrij može biti pohranjen u tijelu, a bez odgovarajućeg zadržavanja tekućine. Pojednostavljeno rečeno, to je bila prva dugoročna studija koja ne podupire ideju kako zadržavanje natrija neizbježno dovodi do zadržavanja volumena (prije spomenuta pretpostavka 1) te, kako koncentraciju natrija treba držati unutar vrlo uske granice (prije spomenuta pretpostavka 2). Nasuprot tome, ovo poprilično kontroverzno

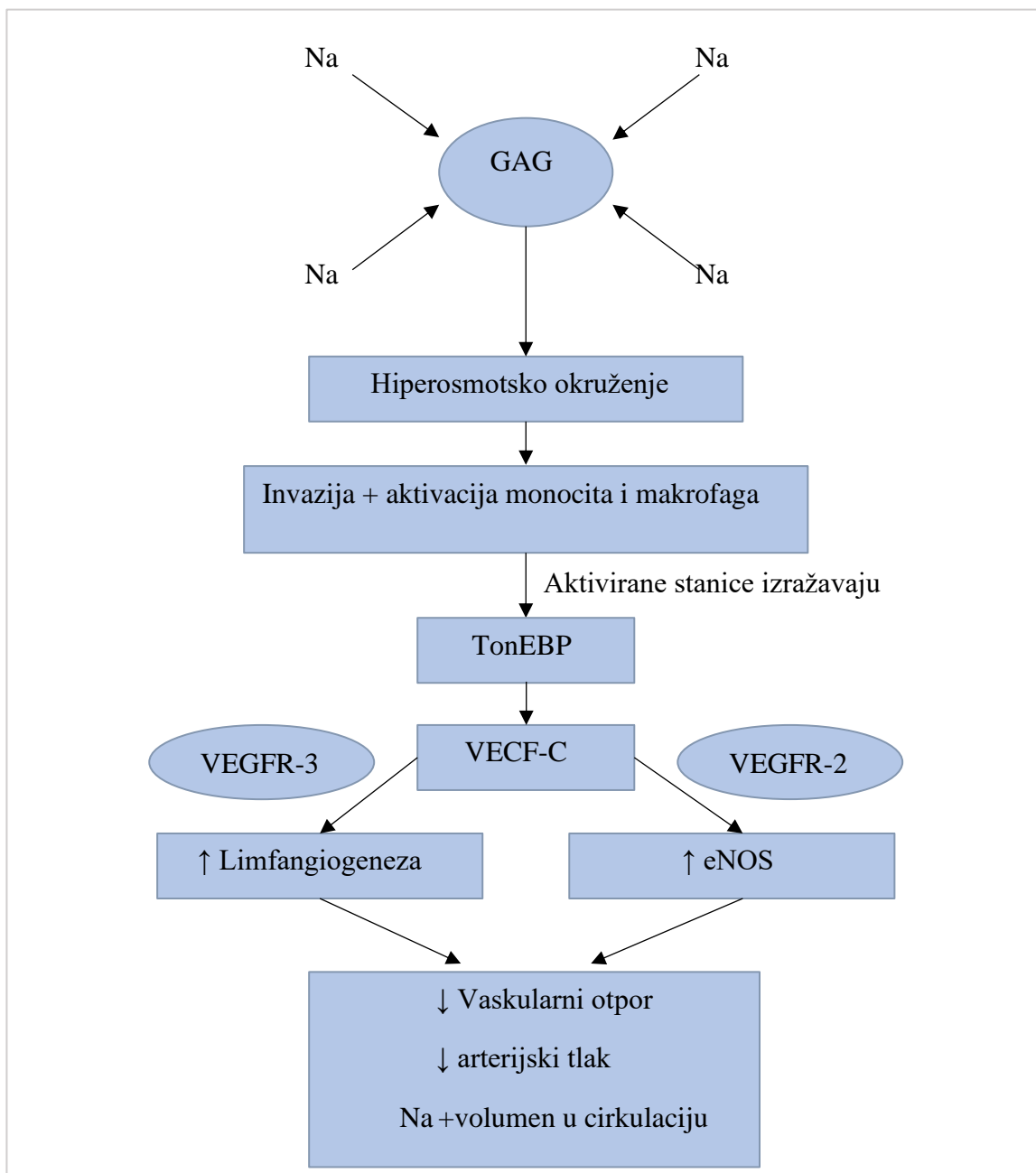
istraživanje ravnoteže natrija (112) sugeriralo je kako je natrij pohranjen u tijelu. Stoga sljedeće logično i očito pitanje glasi: gdje je sol (107)?

Kemijska istraživanja laboratorijskih životinja kao i neinvazivne kvantitativne studije Na<sup>+</sup> MRI (Na<sup>+</sup> MRI) na pacijentima, pokazale su kako je velika količina natrija pohranjena u mišićima i koži, a bez odgovarajućeg zadržavanja vode (113 – 116). Nadalje, jako dugo istraživanje ravnoteže natrija kod ljudi ukazuje na prisutnost unutrašnjih regulacijskih mehanizama koji stvaraju i reguliraju tjednu i mjesečnu ritmičnost skladištenja natrija, a neovisno o unosu kuhinjske soli (112). Animalne studije sugeriraju kako je tekućina u kožnom intersticiju hipertonična u usporedbi s plazmom i kako intersticijski osmotski stres inducira lokalne ekstrarenalne imunološke stanice i limfno-kapilarni mehanizam za čišćenje elektrolita i održavanje unutrašnjeg okruženja (117).

U skladu s gore opisanom teorijom, te s obzirom na rezultate studija koje su pokazale da velik unos soli hranom neće nužno uzrokovati povećanje volumena izvanstanične tekućine kod ljudi (118), kao i da se hipertenzija uzrokovana soli može razviti kod štakora osjetljivih na sol i bez povećanja volumena tjelesnih tekućina (119), unatrag posljednjih nekoliko godina razvijen je koncept reverzibilnog, neosmotskog skladištenja natrija na tkivnoj razini. To je koncept vanbubrežnog odnosno tkivnog taloženja natrija (120). Pokazalo se kako je glavni rezervoar inaktivnog natrija potkožni intersticij, ali da i kost, hrskavice i skeletni mišići imaju sličnu funkciju. Veliki negativno nabijeni polimeri, glikozaminoglikani (GAG), predloženi su kao baza za tkivno vezanje i pohranu natrija, a kapacitet vezanja im ovisi o količini, stupnju polimerizacije i gustoći naboja (120). Osim razvijanja samog koncepta neosmotskog tkivnog taloženja natrija (120), Titze i njegova istraživačka skupina identificirali su glavne elemente regulatorne kaskade reverzibilnog skladištenja natrija u kožni intersticij na sljedeći način: negativno nabijeni GAG vežu natrij i u neposrednom okruženju stvaraju hiperosmotsko okruženje. Povećanjem tonusa tkiva inducira se invazija i aktivacija monocita/makrofaga. Te aktivirane stanice izražavaju pojačivač vezivanja proteina koji reagira na toničnost (TonEBP) koji potom stimulira lučenje vaskularnog endotelnog faktora rasta C (VEGF-C). VEGF-C, preko receptora VEGFR-3, potiče limfangiogenezu i kapacitet samog limfnog sustava da se prilagodi, kao i vrati u cirkulaciju natrij i volumen koji su oslobođeni i pušteni u intersticij. Osim toga, postoje indicije da VEGF-C pojačava ekspresiju i aktivnost eNOS-a, što dovodi do smanjenja vaskularnog otpora i sprječava porast krvnog tlaka (121, 122). Taloženje osmotski inaktivnog natrija povezano je s esencijalnom hipertenzijom i autoimunim bolestima te je tako nastala ideja da je arterijski tlak reguliran u koži (13) (slika 1.2.). Učinkovitost ovakvog

puferskog sustava pokazana je na životinjskim modelima (117, 122), a pretpostavlja se kako sličan mehanizam natrij-pufer djeluje i kod ljudi, iako isti još uvijek nisu u potpunosti ispitani (123).

Oskudan broj dosadašnjih istraživanja vezanih uz koncept neosmotskog taloženja natrija na humanom modelu pokazala su da se skladištenje natrija u koži povećava sa starenjem te da je to povećanje ovisno o dobi, povezano sa smanjenim razinama VEGF-C u cirkulaciji (124). Prva klinička studija rađena s ciljem da ispita ovaj koncept je bila na pacijentima koji su išli na kronični program hemodijalize. U njoj je dokazano kako dijalizni pacijenti s višim razinama VEGF-C imaju bolje uklanjanje  $\text{Na}^+$  tijekom svake pojedinačne dijalize. Nadalje, dvije unakrsne studije ispitivale su utjecaj modulacije unosa soli u organizam na serumsku razinu VEGF-C kod pacijenta s kroničnom bubrežnom bolesti (bez dijabetesa, ali s proteinurijom) i kod zdravih pojedinaca te su pokazale da je razina VEGF-C kod pacijenata s kroničnom bubrežnom bolesti bila viša kod onih na dijeti s velikim udjelom soli dok je postojala tendencija povećanja razine VEGF-C kod i kod zdravih ispitanika na dijeti s velikim udjelom soli, ali koja nije dosegla razinu statističke značajnosti (123). Druga studija je pokazala da inhibicija signalnog puta VEGF-C sa sunitinibom kod onkoloških pacijenata povećava vrijednost arterijskog tlaka (125). Zanimljivo je kako je ovo otkriće potvrđeno i na životinjskim modelima demonstrirajući da inhibicija angiogeneze izaziva nakupljanje soli u intersticiju i hipertenziju osjetljivu na sol (126). Do sada je učinkovitost ovog puferskog sustava dokazana samo na životinjskim modelima, ali ne i kod zdravih pojedinaca kratkoročno opterećenih prekomjernim unosom kuhinjske soli.



**Slika 1.2. Potencijalni mehanizmi reverzibilnog, neosmotskog skladištenja i oslobađanja natrija u kožnom intersticiju.**

Veliki negativno nabijeni GAG-ovi vežu Na i stvaraju hiperosmotsko okruženje. Ono inducira invaziju i aktivaciju monocita i makrofaga. Tako aktivirane stanice izražavaju TonEBP koji stimulira lučenje VEGF-C. On (preko VEGFR-3) potiče limfangiogenezu, odnosno kapacitet limfnog sustava za prihvaćanje i odvodnju suviška Na (i volumena) nakupljenih u intersticiju natrag u cirkulaciju. Postoje i indicije da VEGF-C (preko VEGFR-2) pojačava ekspresiju i eNOS-a što dovodi do smanjenja vaskularnog otpora i sprječava porast arterijskog tlaka.

eNOS- endotelna sintaza dušikovog oksida; GAG-glikozaminoglikani, Na<sup>+</sup> natrij; Ton EBP- pojačivač vezanja proteina koji reagira na toničnost; VEGF-C- vaskularni endotelni čimbenik rasta C; VEGFR 3 - receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 3; VEGFR 2- receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta 3.

(izvor: izradila autorica rada prema: Sulyok, E.; Farkas, B.; Nagy, B.; Várnagy, Á.; Kovács, K.; Bódis, J. Tissue Sodium Accumulation: Pathophysiology and Clinical Implications. *Antioxidants* 2022, 11, 750. <https://doi.org/10.3390/antiox11040750>; originalno iz: Machnik, A.; Neuhofer, W.; Jantsch, J.; Dahlmann, A.; Tammela, T.; Machura, K.; Park, J.K.; Beck, F.X.; Müller, D.N.; Derer, W.; et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanisms. *Nat. Med.* 2009, 15, 545–552.

## **2. HIPOTEZA**

Tjedan dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovat će poremećaj dušikvim oksidom posredovane o endotelu ovisne vazodilatacije mikro- i makrocirkulacije zdravih pojedinaca, neovisno o promjenama arterijskog tlaka.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je odrediti učinak 7-dnevne dijete s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta) na specifičnu ulogu dušikovog oksida u mikro- i makrovaskularnom odgovoru na 7-dnevno opterećenje s kuhinjskom soli u zdravih pojedinaca, mjerenjem dušikovim oksidom (NO) posredovane o endotelu ovisne vazodilatacije mikro- i makrocirkulacije, serumske razine NO-a, te proteinske razine tri izoforme enzima sintaze dušikovog oksida (engl. nitric oxide synthase, NOS) koji su uključeni u proizvodnju NO-a.

Drugi cilj je ispitati koncept neosmotskog skladištenja natrija u koži koji u kratkotrajnom opterećenju kuhinjskom soli osovinom TonEBP/VEGF-C potiče limfangiogenezu ali i izražaj/aktivnost eNOS-a, te na taj način smanjuje vaskularni otpor i arterijski tlak.



## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je koncipirana po principu nerandomiziranog kontroliranog pokusa u kojemu su svi ispitanici podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s dva ponovljena mjerenja.

### 4.2. Ispitanici

Ispitanici su bili mladi zdravi pojedinci regrutirani putem oglasa na Medicinskom fakultetu u Osijeku. U studiju je bilo uključeno ukupno 46 ispitanika oba spola (24 mlade zdrave žene i 22 mlada zdrava muškarca), a u dobi od 18 do 29 godina. Svaki ispitanik tijekom studije je imao dva mjerenja što je ukupno 92 studijska posjeta.

Isključni kriteriji za ulazak u studiju su bili:

- pušenje,
- trudnoća,
- uzimanje oralnih kontraceptiva,
- značajna promjena tjelesne mase unatrag godinu dana,
- hipertenzija ili hipotenzija,
- koronarna bolest,
- šećerna bolest,
- hiperlipidemija,
- bubrežno oštećenje,
- cerebrovaskularne bolesti iliboolesti perifernih krvnih žila,
- alergijske/atopijske bolesti,
- recentni (<1 mj) infekti,
- uzimanje antibiotika te nesteroidnih protuupalnih lijekova unatrag mjesec dana,
- uzimanje bilo kakvih lijekova koji mogu imati utjecaj na endotel.

Svaki ispitanik je detaljno bio obaviješten o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja.

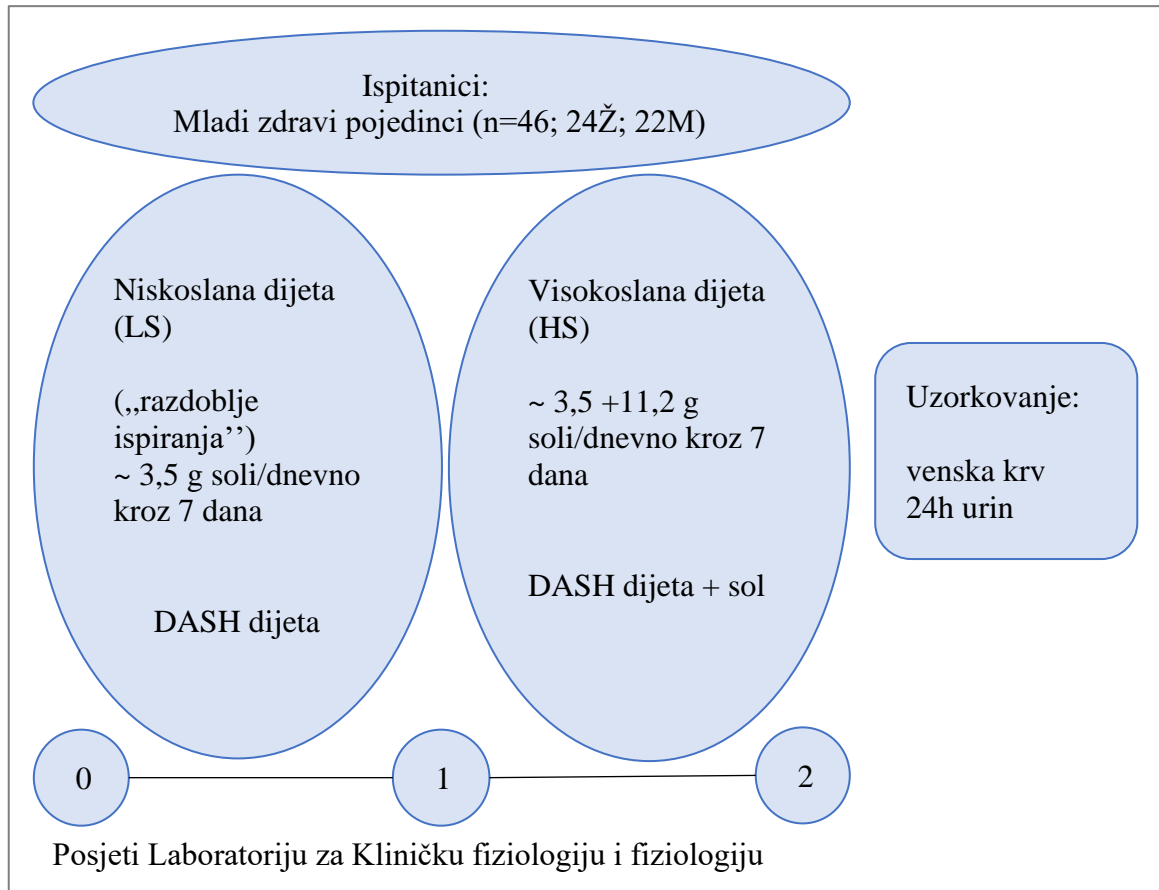
U istraživanju je ispitana sol-osjetljivost ispitanika. Sol osjetljivi ispitanici su definirani kao oni sa porastom srednjeg arterijskog tlaka za više od 5mmHg u odgovoru/odnosu na dijetu sa smanjenim ili povećanim unosom soli te su navedeni bili isključeni iz istraživanja.

Svaki ispitanik je potpisao i informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja. Protokol je studije u skladu sa standardima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobren od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-52). Studija je bila provedena u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta, te Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek. Ovo istraživanje također je dio kliničkog ispitivanja koje istražuje učinke prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli prehrane na funkciju mikrovaskularnog endotela kod zdravih osoba, koje je registrirano na ClinicalTrials.gov (ID NCT02727426 Dijetalna sol i mikrovaskularna funkcija).

### 4.3. Metode

Studija je trajala 2 tjedna, odnosno 14 dana (slika 4.1.). Tijekom tog vremenskog perioda svi ispitanici su imali tri posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta. Prvi posjet je bio prilikom ulaska u studijski protokol, drugi nakon 7 dana dijetete s malim udjelom kuhinjske soli (engl. "low salt" LS) (tzv. period ispiranja - "wash-out period") i treći posjet je bio nakon 7 dana dijetete s velikim udjelom kuhinjske soli (engl. "high salt" HS). Tijekom studije svi su ispitanici prvih 7 dana bili na LS dijeti, koja podrazumijeva unos oko 3,5 g kuhinjske soli dnevno prema DASH eating planu (US Department of Health and Human Services, 2006). Nakon toga, idućih 7 dana svi ispitanici su bili na HS dijeti koja podrazumijeva unos oko 14,7 g kuhinjske soli dnevno. Kako bi svi ispitanici uzimali približno jednaku količinu kuhinjske soli, oni su i dalje hranom unosili oko 3,5 g soli dok je ostatak soli bio nadomješten u obliku praha soli - 11,2 g dnevno. Ispitanici su dobivenu količinu soli uzimali raspoređeno tijekom dana, otopljenu u tekućini (soku), jogurtu i sl. Tijekom cijelog protokola istraživanja nisu imali ograničenja u konzumaciji vode. Svi studijski posjeti i sva mjerenja bili su izvođeni ujutro natašte.

Tijekom prvog studijskog posjeta ispitanici su bili detaljno obavješteni o protokolu istraživanja, potpisali su informirani pristanak te dobili upute za LS dijetu, HS dijetu i prikupljanje 24-satnog urina. Prikupljanje podataka obavljeno je u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.



**Slika 4.1. Protokol studije**

n - broj; Ž - žene; M - muškarci; DASH - engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension, dijetetski režim američke inicijative za smanjenje unosa kuhinjske soli hranom;

(Izvor: pribavljeno i prerađeno iz : Knezović A. Doktorski rad: Učinak 7-dnevne dijetete s velikim udjelom kuhinjske soli na upalni odgovor i aktivaciju endotela u zdravih mladih pojedinaca. Repozitorij Medicinskoga fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2022. uz dozvolu autorice.)

#### 4.3.1. Tjelesna težina, sastav tijela i status tjelesnih tekućina

Za procjenu indeksa tjelesne mase (engl. body mass index, BMI), sudionicima je mjerena tjelesna visina izražena u centimetrima i tjelesna masa izražena u kilogramima. Kao jedini najbolji pojedinačni pretkazatelj individualnih i višestrukih kardiovaskularnih čimbenika rizika ispitanicima je izmjerena opseg struka izražen u centimetrima.

Sastav tijela i status tjelesnih tekućina ispitanika procijenjeni su pomoću 4-terminalnog neinvazivnog analizatora impedancije (Maltron Bioscan 920-II, Maltron International Ltd., Rayleigh, Essex, U.K.). Osim gore navedenih antropometrijskih mjerenja u neinvazivni analizator impedancije unešeni su i podaci o dobi i spolu ispitanika.

Izvorni softver proizvođača pomoću empirijski izvedenih formula generira podatke o udjelu mase bez masti (eng. fat free mass, FFM%), mase masti (eng. fat, Fat%), ukupne tjelesne vode (eng. total body water, TBW%), izvanstanične vode (eng. extracellular water, ECW%), unutarstanične vode (eng. intracellular water, ICW), volumena plazme (eng. plasma fluid, PF), volumena intersticijske tekućine (eng. interstitial fluid, IF) i tjelesne gustoće (eng. body density, kg/L).

Sva mjerenja su rađena ujutro, natašte, u ležećem položaju a nakon što je ispitanik prethodno 10 minuta mirno ležao na ravnoj, neprovodnoj površini, malo razdvojenih ruku i nogu. Prije postavljanja elektroda, mjesta na koja će se iste postaviti očišćena su alkoholom. Elektrode (Maltron International Ltd 20 Sirdar Road, Rayleigh, Essex SS6 7XF UK) su postavljene na dorzalnom dijelu desne ruke i desnog stopala. Na ruci su bile postavljene proksimalno od metakarpofalangealnog zgloba i medijalno između distalne izbočine radijusa i ulne. Na stopalu su postavljene proksimalno na metatarzalnofalangealni zglob, odnosno medijalno između medijalne i lateralne strane maleola gležnja (127). Korištene su po 4 samoljepljive elektrode, odnosno po dvije na ruci i dvije na nozi kako je prethodno opisano. Prije samog testiranja analizator je kalibriran prema uputama proizvođača. Sva su ispitivanja bila provedena na sobnoj temperaturi između 23 i 25 stupnjeva Celzijusa sa postotkom relativne vlage između 50-60 %.

### **4.3.2. Uzorkovanje i analiza venske krvi i 24-satnog urina**

Uzorak venske krvi i uzorak 24-satnog urina uzeti su od svakog sudionika i tijekom prehrane s velikim unosom kuhinjske soli i tijekom prehrane s malenim unosom kuhinjske soli. Ispitanici su urin prikupljali tijekom posljednja 24 sata LS i HS dijete, odnosno prije i poslije HS dijete. Jedan dio uzoraka seruma odmah je analiziran u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek na elektrolite (Na, K, Ca), ureu i kreatinin te visokoosjetljivi C reaktivni protein (eng. high sensitive CRP, hsCRP) primjenom standardiziranih laboratorijskih protokola i postupaka. Ostali dio uzoraka seruma odvojen je od venske krvi, alikvotiran i pohranjen u hladnjaku na -80 °C do izvođenja daljnjih eksperimenata.

Cjelovitost prikupljanja 24h urina određena je automatskim laboratorijskim programom koji prema zadanoj formuli izračunava koeficijent kreatinina iz vrijednosti kreatinina u mokraći, tjelesne mase i volumena 24-satnog urina. U 24-satnom urinu analizirano je izlučivanje natrija, kalija, uree, kreatinina, proteina i albumina. Procijenjeni dnevni unos soli u gramima izračunat je iz 24-satnog izlučivanja natrija pomoću odgovarajuće formule [1-g soli (NaCl) = 393,4 mg Na = 17,1 mmol Na]. Taj unos soli smo kasnije koristili za provjeru pridržavanja dijete. Analiza uzoraka 24h urina je izvršena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska.

#### **4.3.3. Sistemska hemodinamska i arterijska krvna tlaka**

Sistemska hemodinamska mjerenja kontinuirano su praćena kod svakog ispitanika tijekom 15 minuta dok su se odmarali u ležećem položaju. U tom vremenskom razdoblju obavljena su najmanje tri mjerenja arterijskog krvnog tlaka i brzine pulsog vala. Konačni rezultat ovih mjerenja bila je prosječna vrijednost svih izmjerenih parametara u navedenom vremenskom razdoblju od 15 minuta.

Sistemska hemodinamika procijenjena je pomoću uređaja za impedancijsku kardiografiju (ICG) (CardioScreen 2000 Professional, medis. Medizinische Messtechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka), što je neinvazivna tehnologija koja mjeri ukupnu električnu vodljivost prsnog koša i njezine promjene u vremenu za kontinuiranu obradu određenog broja kardiodinamskih parametara. ICG se izvodi/mjeri pomoću četiri električna senzora pričvršćena na pacijentov vrat i prsni koš a koji omogućuju detekciju promjena impedancije uzrokovanih protokom krvi i promjenom volumena tekućine u prsnom košu. Također su zabilježene promjene električnog potencijala prsnog koša koje daju signal sličan elektrokardiogramu s nestandardnim odvodom. Sljedeći hemodinamski parametri izmjereni su izravno, izračunato ili u odnosu na tjelesnu površinu (BSA) korištenjem originalnog softvera: broj srčanih otkucaja (eng. heart rate, HR), udarni volumen (eng. stroke volume, SV), minutni volumen srca (eng. cardiac output, CO), srčani indeks (eng. cardiac index, CI), indeks sistemskog vaskularnog otpora (eng. systemic vascular resistance index, SVRI) i indeks ukupne arterijske popustljivosti (eng. total arterial compliance index, TACI).

Dodatno, korištenjem istog ICG uređaja i odgovarajuće manžete za nadlakticu izvršeno je oscilometrijsko mjerenje arterijskog tlaka što je omogućilo ponovljeno mjerenje vrijednosti

sistoličkog (eng. systolic blood pressure, SBP), dijastoličkog (eng. diastolic blood pressure, DBT) i srednjeg arterijskog krvnog tlaka (eng. mean arterial blood pressure, MABP).

#### **4.3.4. Mjerenje dušikovim oksidom posredovane endotelne vazodilatacije mikrocirkulacije kože**

Za procjenu specifično dušikovim oksidom posredovane o endotelu ovisne vazodilatacije mikrocirkulacije kože korišten je periferni mikrovaskularni odgovor na lokalno toplinsko zagrijavanje (LTH) pomoću mjerenja protoka laser Dopplerom (LDF) (30). Poznato je kako lokalno zagrijavanje kože proizvodi dvofazni porast krvotoka kože; brzo početno povećanje unutar prvih 90-120 s od početka zagrijavanja, nakon čega slijedi produljeni porast protoka krvi koji doseže plato nakon 20-30 minuta zagrijavanja. Čini se kako je početni vrhunac uglavnom rezultat refleksa aksona lokalnog osjetnog živca dok je faza platoa pretežno posredovana endotelnim čimbenicima, točnije dušikovim oksidom (NO) (60-70% odgovora na plato) (128). Mjerenje LDF-a učinjeno je pri svakom studijskom posjetu u prostoriji s kontroliranom temperaturom (srednja  $\pm$  SD temperatura =  $23,5 \pm 0,5$  C). Laser Doppler sonda bila je pričvršćena na kožu volarne podlaktice, 13-15 cm od zapešća, na isto mjesto pri svakom studijskom posjetu. Kožni mikrovaskularni protok mjeren je tijekom 5 minuta osnovne linije pomoću laserskog doppler monitora (moorVMS-LDF, Moor instruments, Aminster, UK). Nakon osnovnih mjerenja, lokalna temperatura je povećana s osnovne razine na  $42^{\circ}\text{C}$  brzinom od  $0,1^{\circ}\text{C s}^{-1}$  i ostala je na  $42^{\circ}\text{C}$  tijekom trajanja protokola grijanja, koristeći regulator kožnog grijača (moorVMS-HEAT, Moor instrumenti, Aminster, UK). Protok krvi mjeren je tijekom cijelog LTH protokola, sve dok protok krvi nije dosegao stabilan plato (30-45 minuta nakon početka zagrijavanja). Mikrocirkulacijski protok krvi izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama i određen softverom koji izračunava površinu ispod krivulje (AUC) tijekom osnovnog protoka i stabilnog platoa zagrijavanja. Rezultat je izražen kao povećanje protoka tijekom zagrijavanja u usporedbi s osnovnim mikrovaskularnim protokom.



**Slika 4.2. Periferni mikrovaskularni odgovor na lokalno toplinsko zagrijavanje (LTH).**

Mikrovaskularni protok krvi u određenom vremenu izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama i određen programom izračunavajući površinu ispod krivulje (AUC) tijekom bazalnog protoka i lokalnog zagrijavanja kože podlaktice na 42 °C (AUC je označen kao osjenčani dio). S obzirom da protok nikad nije nula, čak i kad nema perfuzije, vrijednosti protoka izražene su kao kvocijent standardnog komparatora osnovnog protoka. Konačni rezultat je izražen kao promjena protoka tijekom postizanja stabilnog platoa u odgovoru na lokalno zagrijavanje, u odnosu na početnu vrijednost. Izvor: originalni zapis mjerenja iz Laboratorija za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta, Zavoda za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### **4.3.5. Mjerenje protokom posredovane vazodilatacije (engl. flow mediated dilation, FMD) brahijalne arterije**

Dilatacija posredovana protokom brahijalne arterije (FMD) tehnika je koja se obično koristi u kliničkim istraživanjima za mjerenje arterijske funkcije in vivo kao postotna dilatacija brahijalne arterije nakon razdoblja okluzije podlaktice (31). FMD predstavlja trenutni zlatni standard koji kvantificira arterijsku vazodilataciju ovisnu o NO (31). Snimanje brahijalne arterije u ovom istraživanju izvedeno je u uzdužnoj ravnini na približno 5 cm proksimalno od antekubitalne jame desne ruke, abducirane približno 80° od tijela, sa supiniranom podlakticom. Vaskularna linearna ultrazvučna sonda (Vivid™ iq, GE Health Care, Chicago, IL, SAD) postavljena je pod kutom insonacije od 60° za vizualizaciju prednjeg i stražnjeg sučelja lumena i intime, za mjerenje promjera ili središnje brzine protoka (pulsni Doppler). Nakon početne

vrijednosti izvršena su Doppler očitavanja brzine protoka. Manžeta za krvni tlak postavljena je na podlakticu, distalno od antekubitalne jame snimljene ruke i napuhana na 60 mmHg iznad osnovnog SBP-a tijekom 5 minuta. Zatim je kontinuirano snimana brahijalna arterija nakon otpuštanja manžete za BP (32). Odgovor na nitroglicerina (NTG) korišten je za određivanje vazodilatacije neovisne o endotelu (129). Jedan sublingvalni NTG sprej (0,4 mg) primijenjen je nakon dobivanja osnovnog brahijalnog promjera, a snimanje brahijalne arterije i mjerenja ponovljeni su za 5 minuta (129). Slike su digitalno snimljene pomoću Brachial Imagery (Medical Imaging Applications, Iowa City, IA, SAD) i analizirane kao što je prethodno opisano (48). FMD i odgovor na NTG izračunati su pomoću prosjeka s najvećim srednjim vrijednostima dobivenim nakon otpuštanja okluzije podlaktice ili primjene NTG.

#### **4.3.6. Određivanje serumskih koncentracija dušikovog oksida (NO), endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), neuronske sintaze dušikovog oksida (nNOS), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i vaskularnog endotelnog faktora rasta C (VEGF-C)**

Svim ispitanicima bio je uzet uzorak venske krvi. Koncentracija NO-a, eNOS-a, nNOS-a, iNOS-a i VEGF-C određene su iz seruma ELISA metodom (eng. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) u duplikatu u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Kvantifikacija NO-a, eNOS-a, nNOS-a, iNOS-a i VEGF-C vršene su tvorničkim kitom Human NO ELISA kit (MyBioSource, Cusabio Technology LLC, NO Microplate Assay Kit, Houston, Texas, United States), Human eNOS ELISA kit (MyBioSource, Cusabio Technology LLC, Nitric Oxide Microplate Assay Kit, Houston, Texas, United States), Human nNOS ELISA kit (MyBioSource, Cusabio Technology LLC, Nitric Oxide Microplate Assay Kit, Houston, Texas, United States), Human iNOS ELISA kit (MyBioSource, Cusabio Technology LLC, Nitric Oxide Microplate Assay Kit, Houston, Texas, United States), Human VEGFC ELISA kit (Abnova Ltd, Human VEGFC ELISA kit Milton, Cambridge, UK) prema uputama proizvođača. Korišteni kitovi su samo za istraživačke svrhe.

Korištena metoda je ELISA metoda uz kompetitivnu inhibiciju. Specifična antitijela vezana su na dno testnih jamica te je u njih dodan standard (koji je poslije služio za izradu kalibracijske krivulje) i uzorak. Dodan je također i prvi detekcijski reagens koji je zapravo biotinom obilježen antigen. Analit od interesa i biotinom obilježen antigen kompetitivno se vežu za imobilizirana antitijela. Nakon inkubacije nevezani se konjugat ispirao Wash bufferom. Sljedeći je korak bio



dodavanje enzima hrenovske peroksidaze (engl. Horseradish Peroxidase, HRP) koja je konjugirana avidinom. Poslije inkubacije bio je dodan supstrat HRP-a, kromogen. Testna smjesa promijenila je boju u plavu katalitičkom aktivnosti peroksidaze te se naposljetku dodala otopina koja zaustavlja reakciju dodatkom i koja je promijenila boju u standardima i testnim jamicama u žuto. Što je koncentracija analita u uzorku veća, inhibicija vezanog obilježenog antigena i antitijela je jača i posljedično je slabiji intenzitet žute boje. Konačni intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji ispitivanog analita u uzorku. Inkubacija se odvila u inkubatoru (NUVE EN 300) pri 37°C i u mraku. Mjerenje intenziteta obojenja, odnosno apsorbance, rađeno je pomoću spektrofotometra (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) uzorka uz korištenje kalibracijske krivulje iz pet točaka (pet različitih razrjeđenja poznatih koncentracija), a koncentracija uzorka je proporcionalna intenzitetu obojenja, odnosno apsorbance uzorka.

#### **4.4. Statističke metode**

Rezultati su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za podatke s normalnom distribucijom, dok su podaci koji nemaju normalnu distribuciju prikazani medijanom i ukupnim rasponom. Normalnost distribucije numeričkih varijabli određena je Kolmogorov-Smirnovljevim testom normalnosti. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i nakon HS dijete (LS vs. HS stanje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (upareni t-test), a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxonovim rangom test zbroja. Povezanost (korelacija) između odgovarajućih varijabli određena je Pearsonovim ili Spearmanovim korelacijskim testom, ovisno o normalnosti distribucije podataka. Dvostrani  $P < 0,050$  smatran je statistički značajnim. Za statističku analizu korišten je statistički program SigmaPlot (SYSTAT Software verzija 11.2, Chicago, SAD).

## 5. REZULTATI

Četrdeset i šest zdravih, mršavih normotenzivnih pojedinaca oba spola u dobi između 18 i 24 godine završilo je dvotjedni dijetalni protokol promijenjenog/povećenog unosa soli. Protokol je uključivao 7 dana LS dijetete, što je predstavljalo razdoblje ispiranja za normalizaciju dnevnog unosa soli svih sudionika, nakon čega je slijedila 7-dnevna HS dijeta.

U Tablici 5.1. opisani su učinci 7-dnevne dijetete s velikim udjelom soli na indeks tjelesne mase, opseg struka, te sastav tijela i tjelesnih tekućina u zdravih, mladih ispitanika. 7-dnevna HS dijeta nije izazvala značajnu promjenu u indeksu tjelesne mase ispitanika ili opsegu struka ispitanika u usporedbi s uvjetima LS dijetete. Također, 7-dnevna HS dijeta nije izazvala značajnu promjenu u sastavu tijela i tjelesnih tekućina. Za istaknuti je da je volumen intersticijske tekućine ostao potpuno nepromijenjen nakon 7-dnevne HS dijetete u usporedbi sa stanjem kakvo je bilo nakon LS dijetete.

**Tablica 5.1. Učinak 7-dnevne dijetete s velikim udjelom soli na tjelesnu masu, sastav tijela i status tjelesnih tekućina u zdravih, mladih ispitanika.**

Parametar	LS	HS	p
N (Ž/M)	46 (24/22)		
Dob (godine)	21 [18-24]		
<b>Status težine</b>			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,1 [17,8-29,9]	23,1 [17,8-29,9]	0,11
Opseg struka (cm)	77,8 (9,4)	77,6 (9,3)	0,68
<b>Sastav tijela i tjelesnih tekućina</b>			
Masa bez masti (%)	82,0 (5,7)	82,3 (5,4)	0,70
Masno tkivo (%)	18,0 (5,7)	17,7 (5,4)	0,70
Ukupna voda u tijelu (%)	61,4 (6,3)	61,4 (4,9)	0,47
Izvanstanična voda (%)	42,9 (1,4)	42,8 (1,2)	0,85
Unutarstanična voda (%)	57,1 (1,4)	57,2 (1,2)	0,85
ECW/ICW	0,75 (0,04)	0,75 (0,04)	0,80
Plazmatska tekućina (L)	3,8 (0,8)	3,8 (0,9)	0,93
Intersticijska tekućina (L)	13,4 (2,8)	13,4 (3,2)	0,93
Gustoća tijela (kg/L)	1,06 (0,01)	1,06 (0,01)	>0,99

Za normalnu distribuciju varijabli rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili kao medijan [ukupni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. LS-engl. low salt; HS - engl. high-salt.; p - p vrijednost; N - engl. number, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; BMI - eng. body mass index, indeks tjelesne mase; ECW- eng. extracellular water, izvanstanična tekućina; ICW - eng. intracellular water, unutarstanična tekućina. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i nakon HS dijetete (LS vs. HS stanje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (upareni t-test), a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxonovim rangom test zbroja.

U Tablici 5.2. opisani su učinci 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na serumske biokemijske parametre u zdravih, mladih ispitanika. Također u Tablici 5.2 naznačen je referentni raspon za mjerene biokemijske parametre. Kao što je vidljivo iz LS stupca Tablice 5.2., svi su ispitanici imali normalnu bubrežnu funkciju, elektrolite u serumu i svi su bili bez aktivnog upalnog procesa u trenutku ulaska u protokol ispitivanja. Sedmodnevna HS dijeta nije utjecala na bubrežnu funkciju (urea i kreatinin), natrij i kalij u serumu, kao ni na razinu hsCRP u usporedbi s uvjetima LS dijeta. HS dijeta značajno je smanjila koncentraciju kalcija u serumu, u usporedbi s LS uvjetima no ipak vrijednosti i pri LS i HS uvjetima prehrane bile su unutar normalnog referentnog raspona (Ca: 2,14-2,53 mmol/L).

**Tablica 5.2. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na serumske biokemijske parametre u zdravih, mladih ispitanika.**

Parametar	LS	HS	Referentni interval	p vrijednost
N (Ž/M)	46 (24/22)			
<i>Serumski biokemijski parametri</i>				
urea (mmol/L)	5,2 (1,4)	5,5 (1,3)	2,8 - 8,3	0,26
kreatinin (μmol/L)	78,3 (12,7)	76,9 (12,3)	64 - 104	0,32
natrij (mmol/L)	139,0 (12,7)	138,9 (12,3)	137 - 146	0,77
kalij (mmol/L)	4,3 (0,4)	4,2 (0,2)	3,9 - 5,1	0,89
kalcij (mmol/L)	2,46 (0,08)	2,43 (0,07*)	2,14 - 2,53	0,002
hsCRP (mg/L)	0,84 [0,20-4,09]	0,64 [0,12-1,70]	< 5, 00	0,06

Za normalnu distribuciju varijabli rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili kao medijan [ukupni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta; N - engl. number, broj ispitanika; Ž - žene; M- muškarci; hsCRP- visokoosjetljivi C reaktivni protein. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i nakon HS dijeta (LS vs. HS stanje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (upareni t-test), a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxonovim rangom test zbroja. (upareni t-test; \*p < 0,05; LS vs. HS)

U Tablici 5.3. opisani su učinci 7-dnevne dijete s velikim udjelom soli na biokemijske parametre mjerene u uzorku 24-satnog urina u zdravih, mladih ispitanika. Također u Tablici 5.3. naznačen je referentni raspon za mjerene biokemijske parametre. Značajno povećanje 24-satnog izlučivanja natrija kao i izračunatog dnevnog unosa soli potvrdilo je kako su se sudionici pridržavali zadanog prehranbenog protokola s velikim unosom kuhinjske soli. 24-satni volumen urina značajno se povećao nakon 7-dnevne HS dijete u uporedbi s LS dijetom. Sedmodnevna HS dijeta nije značajno utjecala na koeficijent kreatinina, ureu kao i izlučivanje kalija u 24-satnom urinu, u usporedbi s LS dijetom. Također, HS dijeta nije uzrokovala značajne promjene u 24-satnoj proteinuriji i albuminuriji u zdravih, mladih ispitanika u usporedbi s uvjetima nakon LS dijete.

**Tablica 5.3. Biokemijski parametri u 24-satnom urinu nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.**

Parametar	LS	HS	Referentni interval	p vrijednost
N (Ž/M)	46 (24/22)			
<i>Biokemijski parametri u 24satnom urinu</i>				
24h volumen urina (ml)	1560 (714)	1826 (723*)		0,02
24h koeficijent kreatinina (μmol/24h/kg)	182 (45)	191 (50)	94 - 253	0,37
urea u 24h urinu (mmol/dU)	333 (122)	364 (140)	200 - 350	0,29
proteini u 24h urinu (mg/dU)	88 [23-298]	108 [27 -183]	< 150	0,30
albumini u 24h urinu (mg/dU)	9,83 (10,88)	9,17 (8,18)	< 30,0	0,79
natrij u 24h urinu (mmol/dU)	118 (42)	267 (82 *)	40,0 - 220,0	<0,001
kalij u 24h urinu (mmol/dU)	50,4 [11,5-121,2]	58,7 [22,7-132,6]	25,0 - 125,0	0,09
izračunati unos soli (g/dan)	6,7 (2,6)	15,6 (4,8 *)		<0,001

Za normalnu distribuciju varijabli rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili kao medijan [ukupni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta; N- engl. number, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i nakon HS dijete (LS vs. HS stanje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (upareni t-test), a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxonovim rangom test zbroja. (upareni t-test; p\* < 0,05; LS vs. HS) .

### 5.1. Arterijski krvni tlak i sistemska hemodinamika

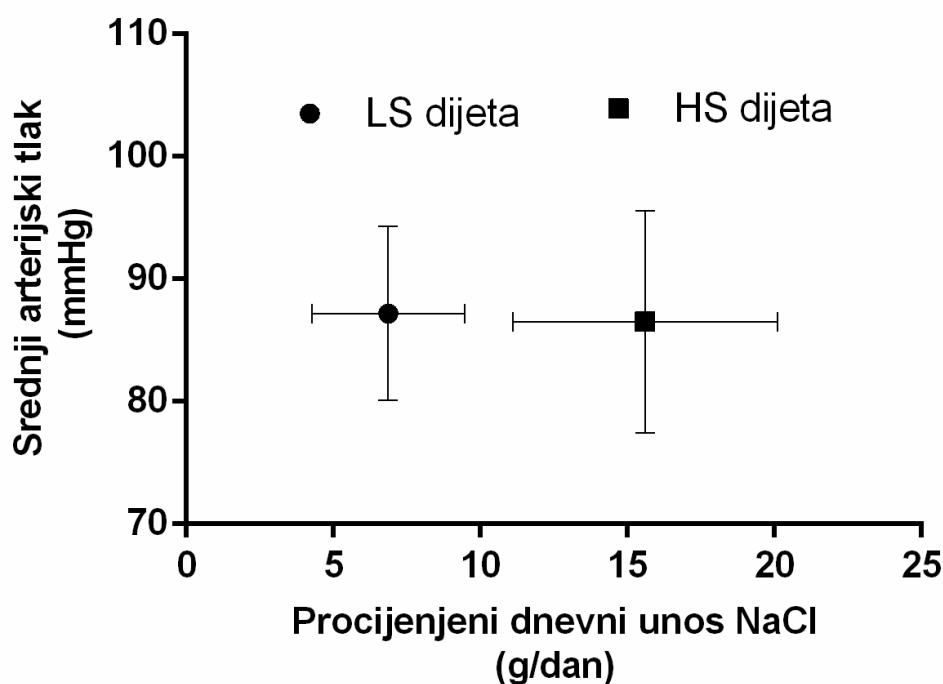
Promjene arterijskog tlaka i sistemski hemodinamski odgovor na 7-dnevnu HS dijetu u zdravih, mladih ispitanika prikazani su u Tablici 5.4.

**Tablica 5.4. Hemodinamski odgovor nakon 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih spitanika.**

Parametar	LS	HS	p vrijednost
N (Ž/M)	46 (24/22)		
<i>Hemodinamski parametri</i>			
Sistolički arterijski tlak (mmHg)	115 (10)	115 (12)	0,85
Dijastolički arterijski tlak (mmHg)	74 (8)	72 (10)	0,24
Prosječni arterijski tlak (mmHg)	87 (7)	86 (9)	0,33
Broj srčanih otkucaja (otkucaji/min)	74 (13)	73 (9)	0,50
Udarni volumen (mL)	96,7 (26,7)	93,0 (17,0)	0,42
Srčani minutni volumen (L/min)	6,96 (1,30)	6,72 (1,12)	0,39
Srčani indeks (L/min/m <sup>2</sup> )	3,86 (0,54)	3,71 (0,48)	0,32
Indeks sistemskog vaskularnog otpora (dyn.s.cm-5 m <sup>2</sup> )	1639 (297)	1754 (318)	0,31
Indeks ukupne arterijske popustljivosti (ml/m <sup>2</sup> /mmHg)	1,087 (0,269)	1,056 (0,193)	0,61

Za normalnu distribuciju varijabli rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili kao medijan [ukupni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta; N- engl. number of participants, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; (upareni t-test; P < 0,05; LS vs. HS). Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i nakon HS dijetu (LS vs. HS stanje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (upareni t-test), a u slučaju odstupanja od normalne distribucije Wilcoxonovim rangom test zbroja.

Kao što je i prethodno objavljeno, 7-dnevna HS dijeta nije izazvala značajne promjene u SBP, DBP i MAP u usporedbi sa stanjem nakon LS dijeta. Budući da značajno povećanje dnevnog unosa soli, a time i 24-satnog izlučivanja natrija, nije bilo popraćeno promjenama razine arterijskog tlaka sve uočene promjene koje su se dogodile u odgovoru na HS dijetu mogu se smatrati neovisnima o arterijskom tlaku (Slika 5.1.).

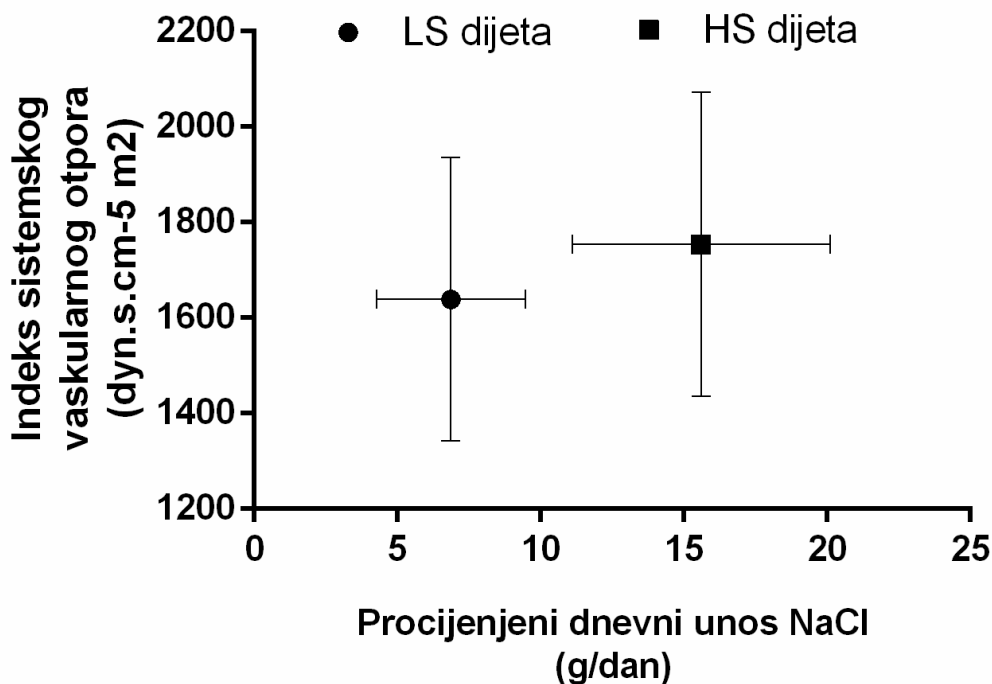


**Slika 5.1. Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na 24-satno izlučivanje natrija urinom i srednji arterijski tlak (MAP).**

Usprkos značajnom povećanju 24-satnog izlučivanja natrija urinom tijekom 7-dnevne HS prehrane MAP se nije promijenio, potvrđujući kako su ispitanici sol-rezistentni. Rezultati su izraženi kao srednja aritmetička sredina (standardna devijacija).

Što se tiče sistemskog hemodinamskog odgovora na 7-dnevno opterećenje soli, iz Tablice 5.4. vidljivo je da se broj srčanih otkucaja u jednoj minuti nije značajno promijenio nakon HS dijeta u usporedbi s uvjetima LS. Također, 7-dnevna dijeta s velikim udjelom soli nije značajno utjecala na udarni volumen, srčani minutni volumen, srčani indeks i ukupni indeks arterijske popustljivosti u usporedbi s LS uvjetima. Za istaknuti je i da indeks sistemskog vaskularnog

otpora nije bio značajno promijenjen nakon 7-dnevne dijete s velikim udjelom soli u usporedbi s uvjetima nakon LS dijete, što je prikazano na Slici 5.2.

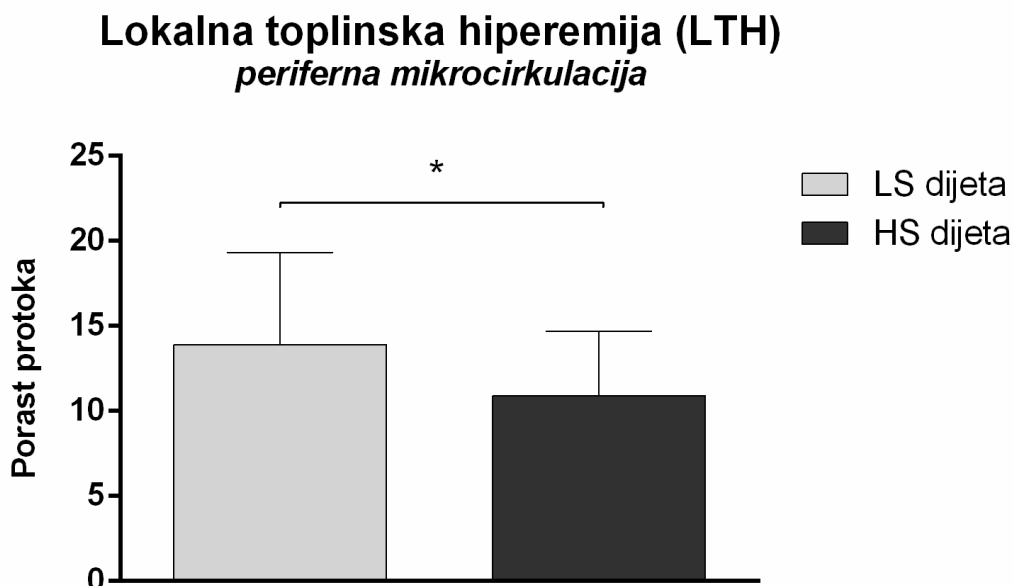


**Slika 5.2. Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na indeks sistemskog vaskularnog otpora kod zdravih pojedinaca.**

Indeks sistemskog vaskularnog otpora nije se značajno promijenio nakon HS dijete u usporedbi s LS uvjetima. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija).

### 5.2. Mikro- i makrovaskularna endotelna vazodilatacija ovisna o NO

Mikrovaskularna o dušikovom oksidu ovisna endotelna vazodilatacija procijenjena mikrovaskularnom lokalnom toplinskom hiperemijom kože podlaktice značajno je smanjena nakon 7-dnevne HS dijete u usporedbi s LS uvjetima (povećanje protoka LTH LS 13,9 (5,4) naspram HS 10,9 (3,8), upareni t-test,  $p = 0,009$ ) (Slika 5.3.).



**Slika 5.3. Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na dušikovim oksidom posredovanu mikrovaskularnu vazodilataciju kod zdravih pojedinaca.**

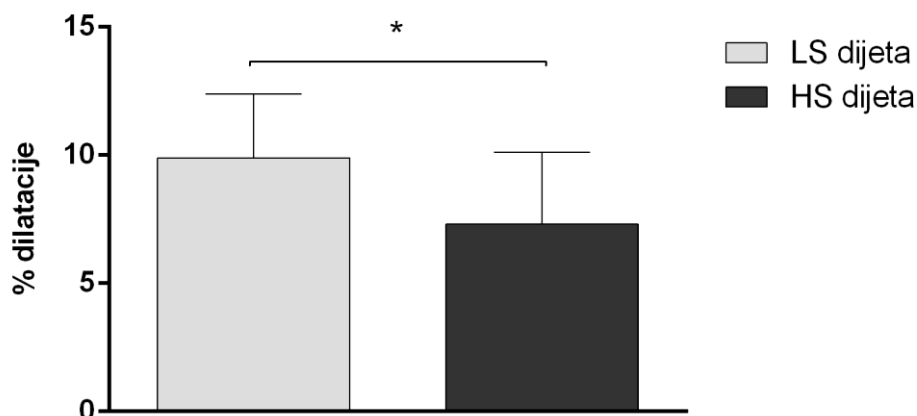
Lokalna toplinska hiperemija (LTH) mikrocirkulacije kože podlaktice izmjerena tehnikom laser Dopplera (LDF) značajno se smanjila nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca. LS dijeta- dijeta s malim udjelom kuhinjske soli; HS dijeta- dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija).  $p^* = 0,009$ , LS vs. HS (upareni t-test za zavisne uzorke).

Nadalje, o dušikovom oksidu ovisna makrovaskularna endotelna vazodilatacija procijenjena ultrazvučnim mjerenjem protokom posredovanom dilatacijom brahijalne arterije značajno je smanjena nakon 7-dnevne HS dijeta u usporedbi s LS uvjetima (FMD % dilatacije LS 9,9 (2,5) naspram HS 7,3 (2,8),  $p < 0,001$ ) (Slika 5.4. A). S druge strane, makrovaskularna dilatacija neovisna o endotelu procijenjena NTG posredovanom dilatacijom brahijalne arterije ostala je nepromijenjena nakon 7-dnevne HS dijeta u usporedbi s LS (NTG posredovana dilatacija % dilatacije LS 13,0 (4,6) naspram HS 12,1 (4,4), upareni t-test,  $p = 0,157$ ) (Slika 5.4. B).



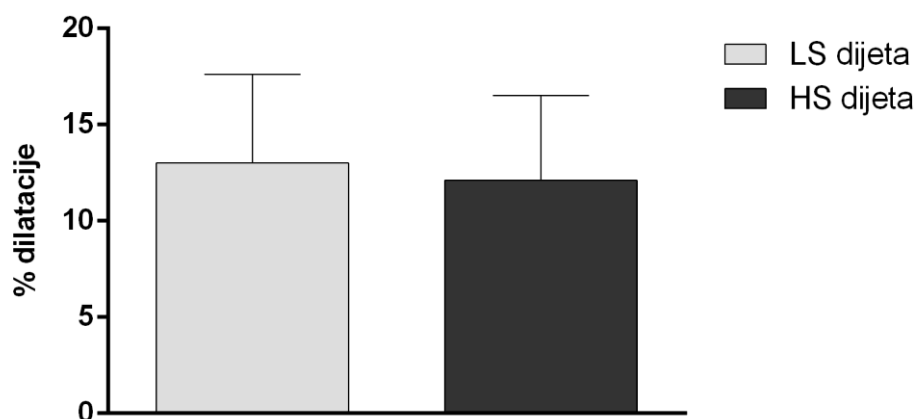
A

**Protokom posredovana dilatacija (FMD)  
brahijalna arterija**



B

**Nitroglicerinom (NTG) posredovana dilatacija  
brahijalna arterija**



**Slika 5.4. Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na makrovaskularnu endotel ovisnu (A) i endotel neovisnu (B) vazodilataciju kod zdravih pojedinaca.**

(A) Protokom posredovana vazodilatacija (FMD) brahijalne arterije značajno se smanjila nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca (upareni t-test;  $p < 0,001$ , LS vs. HS).

(B) Nitroglicerinom (NTG) posredovana dilatacija brahijalne arterije ostaje nepromijenjena nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca (upareni t-test;  $p = 0,157$ ; LS vs. HS). LS dijeta- dijeta s malim udjelom kuhinjske soli; HS dijeta- dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli. Rezultati su izraženi kao srednja aritmetička sredina (standardna devijacija).

### 5.3. Serumska koncentracija dušikovog oksida, tri izoforme sintaze dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta C

Učinci 7-dnevne HS dijetete na serumsku koncentraciju dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta C u serumu prikazani su u Tablici 5. Serumska koncentracija NO-a kao i VEGF-C ostala je nepromijenjena nakon 7-dnevne HS dijetete u usporedbi s LS uvjetima.

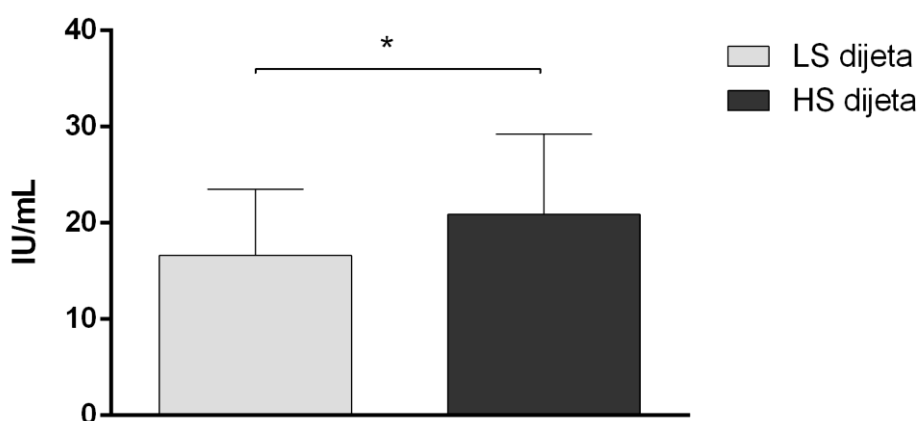
**Tablica 5.5. Učinci 7-dnevne dijetete s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku razinu dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta C (VEGF-C) u mladih, zdravih ispitanika.**

Parametar	LS	HS	p
N (M/M)	46 (24/22)		
<i>Serumska koncentracija dušikov oksida</i>			
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	39,5 (8,3)	39,5 (11,0)	0,99
<i>Serumska koncentracija VEGF-C</i>			
VEGF-C (IU/mL)	2,93 (0,90)	2,78 (0,69)	0,41

Za normalnu distribuciju varijabli rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili kao medijan [ukupni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta; p- p vrijednost; N- engl. number of participants, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; NO- dušikov oksid; VEGF-C-eng. vaskularni endotelni faktor rasta C. (upareni t-test;  $p < 0,05$ ; LS vs. HS)

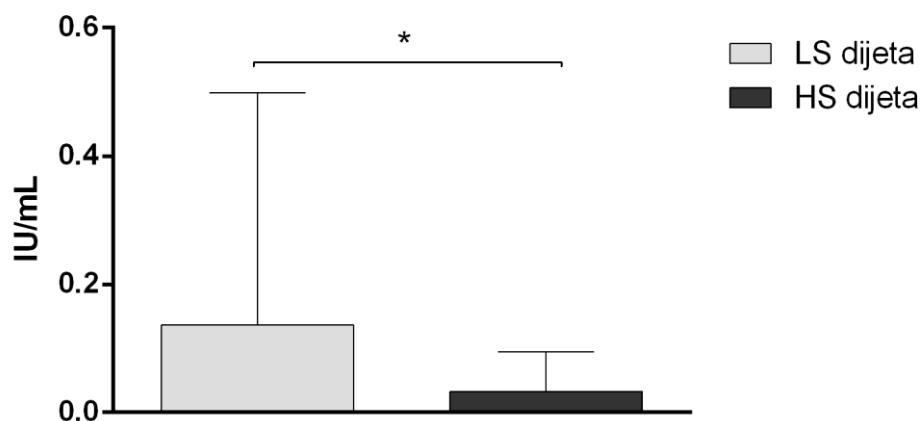
Učinci 7-dnevne HS dijeta na serumsku koncentraciju tri izoforme sintaze dušikovog oksida (NOS) prikazane su na Slici 5.5. Serumska koncentracija eNOS-a značajno se povećala nakon 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli (eNOS IU/mL LS 16,6 (6,9) naspram HS 20,9 (8,3), upareni t-test,  $p = 0,039$ ) (Slika 5A), Serumska koncentracija nNOS-a značajno se smanjila nakon HS dijeta u usporedbi s LS uvjetima kod zdravih, mladih osoba (nNOS IU/mL LS 0,136 (0,363) naspram HS 0,033 (0,062) ,  $p = 0,030$ ) (Slika 5 B). Serumska koncentracija iNOS-a u serumu ostala je nepromijenjena nakon 7-dnevne HS dijeta u usporedbi s LS (iNOS IU/mL LS 3,20 (1,35) naspram HS 3,75 (1,69), upareni t-test,  $p = 0,150$ ) (Slika 5C).

A  
**Endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS)**  
*serumska koncentracija*



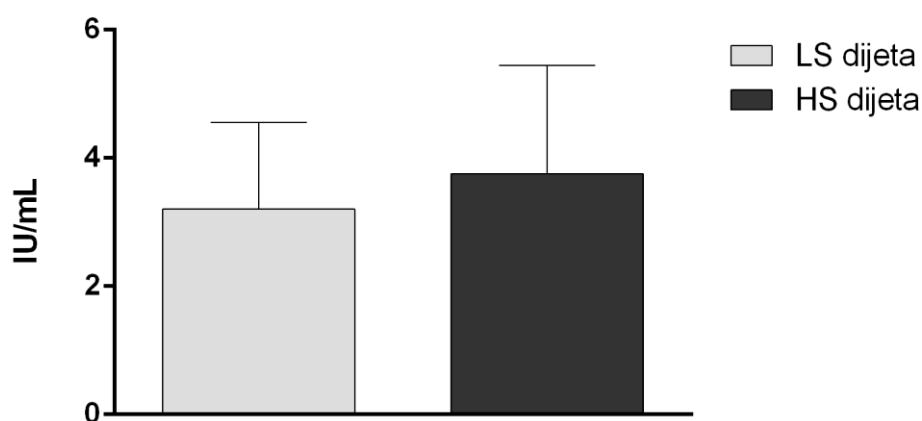
B

**Neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS)**  
*serumska koncentracija*



C

**Inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS)**  
*serumska koncentracija*



**Slika 5.5. Utjecaj sedmodnevne prehrane s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na serumsku razinu endotelne (eNOS) (A), neuronske (nNOS) (B) i inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) (C) u zdravih pojedinaca.**

(A) Serumska razina eNOS-a značajno je porasla nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca (upareni t-test;  $p = 0,039$ ; LS vs. HS).

(B) Serumska razina nNOS-a značajno se smanjila nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca (upareni t-test;  $p = 0,030$ ; LS vs. HS).

(C) Serumska razina seruma iNOS-A ostala je nepromijenjena nakon HS prehrane u usporedbi s LS prehranom kod zdravih pojedinaca (upareni t-test;  $p = 0,15$ ; LS vs. HS).

LS dijeta- dijeta s malim udjelom kuhinjske soli; HS dijeta- dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina (standardna devijacija).

#### 5.4. Korelacije

Povezanost (korelacije) između 24-satnog izlučivanja natrija i endotelnog vaskularnog odgovora te serumske koncentracije NOS izoformi prikazana je u Tablici 5.6. Postojala je slaba negativna korelacija između 24-satnog izlučivanja natrija i LTH odgovora mikrocirkulacije kože (Pearsonov korelacijski test,  $r = -0,254$ ,  $p = 0,05$ ), kao i umjerena negativna korelacija između 24-satnog izlučivanja natrija i FMD brahijalne arterije (Pearsonov korelacijski test,  $r = -0,322$ ,  $p = 0,02$ ).

Također je postojala umjerena negativna korelacija između 24-satnog izlučivanja natrija i razine nNOS u serumu (Spearmanov korelacijski test,  $r = -0,483$ ,  $p = 0,002$ ), dok 24-satno izlučivanje natrija nije bilo povezano s koncentracijom eNOS ili iNOS u serumu.

Povezanost (korelacije) između serumske koncentracije NO-a i i endotelnog vaskularnog odgovora te serumske koncentracije NOS izoformi također je prikazana u Tablici 5.6.

Zanimljivo je kako je koncentracija NO u serumu umjereno pozitivno korelirala s LTH odgovorom mikrocirkulacije kože (Spearmanov korelacijski test,  $r = 0,555$ ,  $p = 0,02$ ). Nije bilo značajne povezanosti između serumske koncentracije NO-a i FMD-a brahijalne arterije, kao ni između serumske koncentracije NO-a i serumske koncentracije sve tri izoforme NOS-a.

**Tablica 5.6. Povezanost (korelacija) između 24-satnog izlučivanja natrija / serumske koncentracije NO i endotelnog vaskularnog odgovora / serumske koncentracije NOS izoformi.**

		24-satno izlučivanje natrija (mmol/dU)	NO koncentracija u serumu ( $\mu\text{mol/L}$ )
LTH (povećanje protoka)	r	-0,254	0,56
	p	0,05	0,02*
FMD (% dilatacije)	r	-0,322	-0,268
	p	0,02*	0,28
eNOS (IU/mL)	r	0,071	-0,128
	p	0,66	0,65
nNOS (IU/mL)	r	-0,483	-0,166
	p	0,002*	0,56
iNOS (IU/mL)	r	0,199	0,267
	p	0,22	0,35

r- koeficijent korelacije; p- p vrijednost; NO- dušikov oksid; NOS- sintaza dušikovog oksida; LTH- lokalna toplinska hiperemija; FMD- protokom posredovana dilatacija; eNOS- endotelna sintaza dušikovog oksida; nNOS- neuralna sintaza dušikovog oksida; iNOS- inducibilna sintaza dušikovog oksida. (Pearsonov ili Spearmanov korelacijski test (ovisno o normalnosti distribucije podataka);  $p^* < 0,05$ ).

Razine SVRI i VEGF-C u serumu nisu pokazale značajnu međusobnu povezanost niti pojedinačnu povezanost s 24-satnim izlučivanjem natrija, serumskom razinom izoformi NOS ili funkcionalnim pokazateljima o endotelnu ovisne vazodilatacije u mikro i makrocirkulaciji.

## 6. RASPRAVA

Glavni zaključak ovog istraživanja je kako 7-dnevna dijeta s velikim unosom kuhinjske soli u zdravih pojedinaca izaziva oštećenje dušikovim oksidom posredovane endotelne vazodilatacije kako u perifernoj mikrocirkulaciji tako i u provodnim arterijama (brahijalna arterija) zdravih pojedinaca neovisno o promjenama arterijskog tlaka. Štoviše, 24 - satno izlučivanje natrija bilo je negativno povezano i s lokalnom mikrovaskularnom LTH i s FMD brahijalne arterije što je još jednom potvrdilo ovaj funkcionalni endotelni odgovor na veliki unos kuhinjske soli kod zdravih normotenzivnih pojedinaca.

Iako 7 - dnevno opterećenje velikim unosom kuhinjske soli nije izazvalo značajne promjene u serumskoj koncentraciji NO postoji pozitivna korelacija između razine NO u serumu i LTH odgovora kožne mikrocirkulacije što zapravo potvrđuje snažnu ovisnost mikrovaskularnog odgovora na ovaj podražaj o glavnom endotelnom vazodilatatoru, samom NO.

Zanimljivo je kako se serumska razina eNOS-a značajno povećala dok se razina n NOS-a smanjila nakon dijeta s velikim unosom kuhinjske soli što što ukazuje na složenu prilagodbu glavnih izoformi enzima koji stvaraju NO na povećani unos kuhinjske soli kod zdravih pojedinaca. Što se tiče neizravne procjene koncepta dodatnog neosmotskog skladištenja natrija u koži provedenog u ovoj studiji nismo uspjeli dokazati značajan utjecaj 7-dnevnog opterećenja kuhinjskom soli na potencijalne determinante takvog koncepta posebno na serumsku razinu VEGF - C, volumen međustanične tekućine te sistemski vaskularni indeks otpora kod zdravih pojedinaca. Sadašnji rezultati dovode do zaključka da barem takva kratkotrajna modulacija kuhinjske soli u prehrani ne izaziva značajne promjene na predloženoj osi koja putem VEGF-C i stimulacije limfangiogeneze (i potencijalno eNOS-a) smanjuje vaskularni otpor i posljedično arterijski tlak u smislu velikog unosa kuhinjske soli.

Studije na životinjskim modelima dosljedno nam pokazuju kako prehrana s povećanim unosom soli može dovesti do široko rasprostranjene endotelne disfunkcije u različitim vaskularnim slivovima (većina studija provedena je na štakorima). Ono što je pokazano je kako je takav učinak varijabilniji u velikim vodljivim žilama (studije na aorti dale su različite rezultate) nego u manjim krvnim žilama (rezistentnim arterijama) (52 – 54). Studije na rezistentnim arterijama (skeletnih mišića, cerebralnih, mezenteričnih) pokazale su kako prehrana sa povećanim unosom soli (sadržaj NaCl između 4 % i 8 % po težini u trajanju od 3 dana do 8 tjedana) dovodi do oslabljene vazodilatacije ovisne o endotelu koju karakterizira duboko smanjenje bioraspoloživosti dušikovog oksida. Taj učinak je neovisan o bilo kakvom povećanju

arterijskog tlaka (55, 59, 130). Sve je više dokaza koji upućuju na to da povećana razina oksidativnog stresa igra središnju ulogu u oštećenju vazodilatacije ovisne o endotelu kod štakora hranjenih velikim unosom soli (59). Pokazano je kako povećana razina superoksidnog iona ( $O_2^-$ ) ima važnu ulogu u smanjenju biorasploživosti NO zbog njegove oksidacije s NO i stvaranja  $ONOO^-$ , odnosno utjecaja na aktivnost eNOS (60).

Osim kliničkih ispitivanja koja su imala namjeru ispitati učinak povećanog unosa kuhinjske soli u prehrani na vaskularnu/endotelnu funkciju kod hipertenzivnih bolesnika, postojala je i potreba da se istraživanja provedena na životinjskim modelima prenesu na populaciju zdravih, normotenzivnih pojedinaca. Kasni hiperemični plato do kojeg dolazi nakon lokalnog zagrijavanja kože mjeren laser Dopplerskim floumetrijom (LDF) ovisi uglavnom o endotelnom NO (21) i upravo zato služi kao izvrstan model za procjenu vazodilatacije ovisne o mikrovaskularnom endotelu, posredovane NO-om. Također, opće je poznato da procjena FMD-a brahijalne arterije predstavlja aktualni zlatni standard za procjenu makrovaskularne endotelne funkcije, koji je prema zaključku većine studija dominantno posredovan upravo NO-om (31). Ovo istraživanje je po prvi put istovremeno procijenilo specifičnu o NO ovisnu endotelnu vazodilataciju u perifernoj mikro- i makrocirkulaciji u četrdeset i šest mladih zdravih pojedinaca te je pokazalo ravnomjerno oslabljen o NO-u ovisan endotelni odgovor u mikrocirkulaciji kože i brahijalnoj arteriji, koji je neovisan o promjena arterijskog tlaka.

Prva studija koja je pokazala funkcionalno poremećenu mikrovaskularnu o endotelu ovisnu vazodilataciju nakon dijete sa velikim unosom kuhinjske soli u šesnaest zdravih muškaraca, pokazala je kako primjena L-NAME (NOS inhibitora) smanjuje protok krvi u podlaktici nakon prehrane sa povećanim unosom kuhinjske soli za 35 %, što ukazuje na smanjenje biorasploživosti NO ovisno o soli (69). Međutim, budući da je prehrana sa povećanim unosom kuhinjske soli u toj studiji dovela do malog ali značajnog povećanja arterijskog tlaka učinak opterećenja solju na funkciju endotela i oslobađanje dušikovog oksida nije se mogao potpuno odvojiti od njegovog učinka na arterijski tlak (69).

Naši raniji rezultati pokazali su kako 7 - dnevna dijeta sa povećanim unosom kuhinjske soli smanjuje postokluzijski protok krvi u mikrocirkulaciji kože podlaktice i povećava razinu  $TXA_2$  u serumu, što ukazuje da vazokonstriktorski metaboliti enzima COX, posebno COX - 1, imaju značajnu ulogu u razvoju oštećene endotelne funkcije nakon akutnog opterećenja soli u ljudi (47). Isto tako pokazano je kako vazodilatacija arteriola izoliranih iz glutealnog potkožnog masnog tkiva na ACh i dilatacija izazvana protokom nakon 7 - dnevne dijete sa velikim unosom



kuhinjske soli (250 mmol Na<sup>+</sup> / dan) u zdravih žena više ne ovise o dušikovom oksidu već o COX i CYP450 vazodilatatorima koji su u ovoj vazodilataciji posrednici (48).

Rezultati ove studije u skladu su sa studijom koju su proveli Greaney i sur. koji su objavili da je 7 - dnevni veliki unos kuhinjske soli smanjio protok crvenih krvnih stanica tijekom lokalnog zagrijavanja mikrocirkulacije podlaktice u 12 normotenzivnih odraslih osoba, također u odsutnosti promjena arterijskog tlaka (46). Nekoliko je studija pokazalo kako se FMD brahijalne arterije smanjuje kao odgovor na unos kuhinjske soli u prehrani kod muškaraca i žena, kao i kod odraslih osoba osjetljivih i rezistentnih na sol, podupirući tezu da opterećenje solju ima negativan učinak na vaskularnu (endotelnu) funkciju neovisno o promjenama arterijskog tlaka (48, 72 – 74). Ovaj štetni učinak o NO ovisne vazodilatacije brahijalne arterije koja se smatra zlatnim standardom za procjenu funkcije endotela potvrđen je rezultatima ovog istraživanja koje je provedeno na većem uzorku zdravih osoba oba spola. Promatrajući sve zajedno postoje snažni dokazi kako 7 - dnevna dijeta sa velikim unosom kuhinjske soli kod zdravih pojedinaca izaziva funkcionalno vaskularno oštećenje utječući na njegov endotel, a posebno na endotelni odgovor ovisan o njegovom glavnom vazodilatatoru, NO. Međutim točan mehanizam kojim dolazi do smanjenja biorasploživosti NO tijekom prehrane sa velikim unosom kuhinjske soli kod zdravih pojedinaca tek treba razjasniti.

Dušikov oksid proizvode tri različite izoforme enzima sintaze dušikovog oksida a koje se nazivaju eNOS, nNOS i iNOS (79). Sve izoforme NOS-a koriste kao što je već opisano L-arginin kao supstrat, molekularni kisik i reducirani NADPH kao ko-supstrate te FAD, FMN i BH4 kao kofaktore (79). Funkcionalni NOS prenosi elektrone od NADPH, preko flavina FAD i FMN u domeni karboksi terminalne reduktaze, do hema u amino terminalnoj domeni oksigenaze. Domena oksigenaze također veže esencijalni kofaktor BH4, molekularni kisik i supstrat L-arginin (80, 81). Na mjestu hema elektroni se koriste za redukciju i aktivaciju O<sub>2</sub> i oksidaciju L arginina u L citrulin i dušikov oksid. Sekvence smještene blizu cisteinskog liganda hema su isto vjerovatno uključene u vezanje L arginin i BH4 (131).

Za sintezu dušikovog oksida enzim sintaze dušikovog oksida mora proći kroz dva koraka. U prvom koraku NOS hidroksilira L arginin u N hidroksi L arginin (koji ostaje velikim dijelom vezan za enzim). U drugom koraku sintaza dušikovog oksida oksidira N hidroksi L arginin u L citrulin i NO (132, 133). ENOS se uglavnom nalazi u endotelnim stanicama i homeostatski je regulator brojnih bitnih kardiovaskularnih funkcija kao što su npr. vazodilatacija, inhibicija agregacije i adhezije trombocita, inhibicija adhezije leukocita i vaskularne upale, kontrola

proliferacije vaskularnih glatkih mišića, stimulacija angiogeneze i aktivacija endotelних progenitorskih stanica (79). U kontekstu regulacije krvožilnog protoka važno je naglasiti kako dušikov oksid izveden iz eNOS-a širi sve vrste krvnih žila stimulirajući topljivu gvanilil ciklazu i povećavajući ciklički GMP u glatkim mišićnim stanicama a ima i kritičnu ulogu u adaptivnom vaskularnom remodeliranju kod kroničnih promjena u protoku krvi (134). nNOS je konstitutivno izražen u specifičnim neuronima mozga no posljednjih godina sve veći broj istraživanja potvrdio je njegov značaj na periferiji gdje su mnoga glatka mišićna tkiva inervirana nitrergičkim živcima koja sadrže nNOS i tako stvaraju dušikov oksid (83). Tradicionalno mišljenje kako je eNOS uglavnom odgovorna za regulaciju vaskularnog tonusa na periferiji dovedeno je u pitanje istraživanjem na ljudima koje je pokazalo kako nNOS igra važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa neovisno o njegovim učincima u CNS-u. Konkretno, selektivna primjena inhibitora nNOS SMTC pokazala je smanjenje bazalnog protoka krvi u ljudskoj podlaktici i u koronarnoj cirkulaciji bez utjecaja na klasičnu vazodilataciju posredovanu eNOS-om kao odgovor na acetilkolin, tvar P ili vaskularni smični stres (98). iNOS se obično ne izražava u stanicama ali njegovu ekspresiju mogu potaknuti različiti podražaji kao što su bakterijski lipopolisaharidi, citokini i drugi agensi (npr. u makrofagima, tumorskim stanicama, hepatocitima itd.) (79). Studije su pokazale kako visoke razine dušikovitog oksida koje proizvodi iNOS u aktiviranim makrofagima (vjerojatno i neutrofilima i drugim stanicama) mogu biti toksične ne samo za neželjene mikrobe, parazite ili tumorske stanice već i za zdrave stanice (79, 99). Primjerice utvrđeno je kako prekomjerna proizvodnja dušikovitog oksida posredovana iNOS-om ima ključnu ulogu u septičkom šoku (135).

Trajna endotelna disfunkcija zajednički je nazivnik kardiovaskularnih čimbenika rizika i kardiovaskularnih bolesti koje se očituju kao nesposobnost endotela da proizvede odgovarajuće količine bioaktivnog dušikovitog oksida kao i da proizvede vazodilataciju posredovanu dušikovitom oksidom. Smanjena bioraspoloživost dušikovitog oksida u kardiovaskularnim bolestima uglavnom se pripisuje povećanom oksidativnom stresu. Kardiovaskularni čimbenici rizika povećavaju ekspresiju i/ili aktivnost NADPH oksidaze (NOX) u vaskularnom zidu čime se potiče proizvodnja reaktivnih spojeva kisika (ROS) (2). U animalnim modelima hipertenzije (infuzije angiotenzina II (136)), u spontano hipertenzivnih štakora (137), modela sa dijabetesom (138)) dokazani su modeli aktivacije NOX. I eksperimentalna hiperkolesterolemija povezana je s aktivacijom NOX (139). Navedeno rezultira povećanom razgradnjom NO njegovom reakcijom s  $O_2^-$ , ali i pretvorbom eNOS-a iz enzima koji proizvodi NO u enzim koji stvara  $O_2^-$

a taj proces je poznat kao eNOS odvajanje (79). Odvajanje eNOS-a implicira različite mehanizme uključujući oksidaciju kofaktora BH<sub>4</sub>, smanjenje L-arginina, nakupljanje endogenih metilarginina, S-glutationilaciju eNOS-a itd (79,103). Odvajanje NOS-a je opisano kod pacijenata sa endotelnom disfunkcijom koja je posljedica hiperkolesterolemije (140), dijabetesa (141), esencijalne hipertenzije (34), kod kroničnih pušača (142), te kod pacijenata liječenih nitroglicerinom (143). Navedeni rezultati navode na postavljanje pitanja koji su to patofiziološki mehanizmi/mehanizam koji dovode do odvajanja NOS-a kod vaskularne bolesti. Rastući broj dokaza govori u prilog tome kako vaskularni NOX ima ključnu ulogu u fenomenu odvajanja eNOS-a u ljudi (2). Iako se na prvi pogled očekuje kako bi disfunkcija endotela u raznim kardiovaskularnim bolestima mogla biti posljedica smanjene ekspresije eNOS-a nekoliko je studija pokazalo kako su čimbenici kardiovaskularnog rizika povezani s povećanjem a ne smanjenjem ekspresije eNOS-a (100). Dokazano je kako produkt dismutacije O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može povećati ekspresiju eNOS-a putem transkripcijskih i posttranskripcijskih mehanizama (101). Jedna od studija je pokazala da kratkotrajna izloženost endotelnih stanica goveđe aorte (BAEC) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-u, ali ne i O<sub>2</sub><sup>-</sup> ili hidroksilnom radikalu, uzrokuje trajno povećanje ekspresije eNOS mRNA i funkcionalnog proteina (144). Nadalje, ovaj učinak je bio posredovan i povećanjem brzine transkripcije gena eNOS i povećanjem stabilnosti eNOS poruke nakon njenog formiranja (144). Proizvodnja O<sub>2</sub><sup>-</sup> u vaskularnim stanicama povećana je u različitim patofiziološkim stanjima, uključujući hipertenziju, hiperkolesterolemiju i dijabetes. Ovo povećanje proizvodnje O<sub>2</sub><sup>-</sup> odgovorno je za smanjenje bioaktivnosti, a time i blagotvornog djelovanja NO<sup>•</sup> u navedenim patološkim stanjima. Budući da je O<sub>2</sub><sup>-</sup> prethodnik drugih reaktivnih kisikovih spojeva, uključujući H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vjerojatno je da ovaj odgovor povećane ekspresije eNOS-a predstavlja važan kompenzacijski mehanizam. Doista, u nekoliko patoloških stanja, uključujući ranu hiperkolesterolemiju, hipertenziju i dijabetes, ekspresija eNOS-a je povećana. Stoga je zanimljivo nagađati da je povećanje oksidativnog stresa (osobito H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u ovim bolestima uzrok povećanja ekspresije eNOS-a (101).

Stoga se čini kako u kontekstu povećanog oksidativnog stresa (također prikazanog zbog 7-dnevnog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli kod zdravih pojedinaca (76) dolazi do ubrzane razgradnje perifernog NO pri čemu NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup> reagiraju stvarajući ONOO<sup>-</sup> koji zauzvrat smanjuje razinu BH<sub>4</sub> i dovodi do odvajanja eNOS-a i disfunkcionalne proizvodnje enzima O<sub>2</sub><sup>-</sup> (79). Peroksinitrit može oksidirati BH<sub>4</sub> do biološki neaktivnog BH<sub>3</sub> radikala koji može biti neproporcionalan kinonoidu 6,7-[8H]-H<sub>2</sub>-biopterin (145, 146). Pokazalo se kako je proizvodnja NO putem eNOS-a usko povezana s unutarstaničnom koncentracijom BH<sub>4</sub> (147, 148) i razine

BH4 su smanjene u mnogim modelima kardiovaskularnih bolesti (149 - 152) i kod bolesnika s disfunkcijom endotela (140, 141, 153).

Dakle, prema dostupnim dokazima čini se da smanjena proizvodnja NO-a nije rezultat smanjene razine proteina eNOS. Dapače, ekspresija eNOS-a je čak (kompenzatorno) povećana kod vaskularne bolesti. No taj mehanizam kompenzacije je često uzaludan zato što je aktivnost eNOS inhibirana ili je enzim eNOS nevezan (79, 102). Takav začarani krug i transformacija eNOS-a iz zaštitnog enzima u onaj koji doprinosi oksidativnom stresu primijećeni su u nekoliko in vitro modela, u životinjskim modelima kardiovaskularnih bolesti i kod pacijenata s kardiovaskularnim čimbenicima rizika (79). Usprkos tome oskudni su dokazi o učinku opterećenja velikim unosom kuhinjske soli na razinu dušikovog oksida kao i ekspresiju/aktivnost/razinu izoformi NOS-a. Primjerice, izloženost natriju uzrokovala je značajno smanjenje aktivnosti eNOS-a na način ovisan o dozi u endotelnim stanicama goveđe aorte, čime se objašnjava smanjenje stvaranja endotelnog NO izazvano solju (144).

Dahl sol osjetljivi štakori hranjeni dijetom sa velikim unosom soli pokazali su značajno smanjenje iNOS proteina u bubrezima, srcu i aorti, dok je smanjena ekspresija eNOS-a pronađena samo u bubrezima i aorti, ali ne i u srcu (53). Veliki unos soli doveo je do povećane proizvodnje  $O_2^-$  i smanjene biorasploživosti NO u aorti štakora (154). Dokazano je kako je nevezani eNOS glavni izvor  $O_2^-$  u arteriolama mišića spinotrapeza miševa hranjenih hranom s velikim udjelom kuhinjske soli (155). Naša ranija studija na štakorima Sprague-Dawley izloženima 7-dnevnoj dijeti sa velikim unosom kuhinjske soli pokazala je reduciranu protokom induciranu dilataciju srednjih cerebralnih arterija koja je obnovljena mimetikom SOD, i smanjenu ekspresiju gena iNOS, ali ne i eNOS u izoliranoj cerebralnoj krvnoj žili (63).

Koliko je poznato ovo je prva studija na zdravim pojedincima kojom je pokazana povećana serumska razina eNOS-a, snižena serumska razina nNOS-a i smanjena vazodilatacija posredovana dušikvim oksidom nakon 7-dnevne dijete sa velikim unosom kuhinjske soli. To je s ranijim demonstracijama povišenog oksidativnog stresa kod pojedinaca „pod stresom od soli“ u skladu s gore opisanim saznanjima o smanjenoj biorasploživosti NO i eNOS odvajanju kod pojedinaca s velikim kardiovaskularnim rizikom. Što se tiče nepromijenjenih serumskih razina, razine NO unatoč očito oslabljenom vaskularnom odgovoru posredovanom NO u mikro i makrocirkulaciji, kao i promijenjene razine eNOS-a i nNOS-a u serumu mogu se potencijalno objasniti metodološkim izazovima u mjerenju NO, kao i u izvještajima da u mnogim slučajevima status NO u krvi ne odražava točno odgovarajući status NO u tkivima od interesa

(156). S druge strane potencijalni razlog nepromijenjene serumske razine NO je očuvanje njegovog stvaranja koje utječe na bazalni protok (na to nam ukazuje još uvijek nepromijenjeni ukupni periferni vaskularni otpor zbog opterećenja velikim unosom soli), i neadekvatan odgovor posredovan NO tijekom izazova koji zahtijeva brzi odgovor vaskulature i visoku razinu reaktivnosti na dani podražaj. Iako postoje ograničene indikacije da stanice glatkih mišića krvnih žila također izražavaju niske razine nNOS-a za koje se pokazalo da održavaju određeni stupanj vazodilatacije osobito kada dominantni eNOS postane disfunkcionalan (90), nalaz značajno smanjene serumske razine nNOS-a u smislu povećane (nevezane) razine eNOS-a zbog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli otvara intrigantno područje istraživanja specifičnih uloga eNOS-a i nNOS-a u fiziološkoj regulaciji ljudskog vaskularnog tonusa in vivo.

Opće prihvaćeno mišljenje kako su glavni čimbenici povišenja arterijskog tlaka neučinkovito izlučivanje natrija bubrežima i naknadna ekspanzija izvanstaničnog volumena dovedeno je u pitanje u posljednjih nekoliko godina zbog sve većeg broja izvješća koja pokazuju disocijaciju homeostaze natrija i volumena. Primjerice, opetovano je pokazano kako veliki unos kuhinjske soli hranom možda neće uzrokovati ekspanziju izvanstaničnog volumena kod ljudi (118) (što smo također primijetili u našoj ranijoj i sadašnjoj studiji (49), baš kao što se hipertenzija izazvana solju može razviti u štakora osjetljivih na sol, a bez širenja tjelesnih tekućina (119). Stoga je kao temeljni mehanizam uveden koncept reverzibilnog, neosmotskog skladištenja natrija na razini tkiva (120, 122). Glavni elementi takve regulatorne kaskade reverzibilnog skladištenja natrija u kožnom intersticiju su kao što je već spomenuto veliki negativno nabijeni polimeri GAG-ovi koji vežu natrij i stvaraju hipertoničnost (120). Hipertoničnost će naknadno inducirati invaziju monocita/makrofaga i aktivaciju koja izražava TonEBP koji stimulira izlučivanje VEGF-C (121). VEGF-C povećanjem limfangiogeneze povećava kapacitet limfnog sustava da vrati nakupljeni natrij i volumen iz intersticija natrag u cirkulaciju.

Štoviše, predloženo je kako VEGF-C pojačava ekspresiju i aktivnost eNOS-a što dovodi do smanjenja vaskularnog otpora i arterijskog tlaka (121). Učinkovitost takvog puferskog sustava potkrijepljena je studijama na životinjskim modelima. U Dahl sol osjetljivih štakora kapacitet intersticija za vezanje osmotski inaktivnog natrija manji je nego u kontrolnih; stoga je njegova puferska funkcija smanjena, a prekomjerni unos natrija rezultira povećanjem volumena i razvojem ili pogoršanjem arterijske hipertenzije (55, 122). S obzirom na ova opažanja delecijom TonEBP gena u mononuklearnim fagocitima smanjuje se ekspresija mRNA i proteina VEGF-C što dovodi do smanjenja „mreže“ limfnih kapilara, klirensa intersticijskog

klorida i razvoja hipertenzije osjetljive na sol (121). Do sada je ograničen broj studija povezanih s konceptom neosmotskog taloženja natrija u ljudskom modelu pokazao kako se skladištenje natrija u koži povećava sa starenjem i da je, ovisno o dobi, povezano sa smanjenim razinama VEGF-C u cirkulaciji (124). Jedna presječna studija ispitala je utjecaj modulacije unosa soli na serumsku razinu VEGF-C u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću (bez dijabetesa, s proteinurijom) i kod zdravih osoba, te je pokazala da je razina VEGF-C u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću bila veća u onih na dijeti s velikim udjelom soli, dok je postojala tendencija povećanja razine VEGF-C kao i u zdravih ispitanika na dijeti s velikim udjelom soli, ali to nije doseglo razinu statističke značajnosti (123). Drugo istraživanje pokazalo je kako inhibicija VEGF-C signalnog puta kod onkoloških pacijenata povećava vrijednosti arterijskog tlaka (125). Zanimljivo je kako je ovo otkriće potvrđeno na životinjskim modelima pokazujući da inhibicija angiogeneze uzrokuje nakupljanje soli u intersticiju i hipertenziju osjetljivu na sol (125, 126).

Koncept puferske funkcije natrija u kožnom intersticiju od ranije je dobro poznat, atraktivan i cijenjen (slika 1.2.) (157). Usprkos tome ostaje nekoliko pitanja na koja treba pronaći odgovor. (a) Negativno nabijeni klorid također je pohranjen u kožnom intersticiju u količini koja je ekvivalentna natriju (126) i najvjerojatnije je istovremeno otpušten; ipak, biokemijska osnova i mehanizmi reverzibilnog skladištenja klorida su neistraženi. (b) Značajan dio dipolnih molekula vode u kožnom intersticiju ograničen je kretanjem električno nabijenih makromolekula. Razumno je pretpostaviti da kada se količina, struktura i gustoća naboja makromolekula mijenjaju da se mijenja i vezanje natrija i vode. Stoga, ne samo natrij bez vode već zajedničko vezanje/otpuštanje natrija i vode može zadovoljiti stvarnu potrebu regulacije volumena (157). (c) Natrijem aktivirani monociti/makrofagi rezultiraju ne samo ekspresijom TonEBP-a i VEGF-C-a već i oslobađanjem reaktivnih spojeva kisika (ROS) i upalnih citokina koji mogu ograničiti proizvodnju/dostupnost dušikovog oksida (121). (d) Regulacija izgradnje i razgradnje intersticijskih makromolekula kao niti temeljni mehanizmi reverzibilnog vezanja i skladištenja natrija nisu otkriveni. Najvjerojatnije je kako, analogno renomedularnom intersticiju, ove složene procese kontroliraju vazoaktivni hormoni uključeni u klasičnu regulaciju volumena i osmotsku regulaciju (158 – 161).

Osim ovih neodgovorenih pitanja svakako zabrinjava i činjenica kako su Rossitto i suradnici nedavno osporili čitav koncept neosmotskog skladištenja natrija u kožnom intersticiju. Ovi su autori prezentirali uvjerljive dokaze kako višak natrija u tkivu nije hipertoničan; stoga je biomedicinski stres, a ne osmotski stres zbog nakupljanja edema odgovoran za aktivaciju limfogenetske signalne kaskade (162). Uzimajući u obzir sva ta razmatranja, pomak paradigme

s klasičnog modela s dva odjeljka na nedavno razvijen model s tri odjeljka homeostaze natrija i volumena treba dodatno potkrijepiti (163).

Naša studija težila je testirati ovaj koncept procjenom nekoliko elemenata predložene regulatorne kaskade, posebno procjenom promjena u volumenu izvanstanične vode i intersticijske tekućine, serumske razine VEGF-C i indeksa sistemskog vaskularnog otpora nakon 7 - dnevne dijeta sa velikim unosom soli u zdravih pojedinaca. Budući da nismo primijetili nikakve značajne promjene u udjelu izvanstanične vode, volumenu intersticijske tekućine, razine VEGF-C u serumu i indeksa sistemskog vaskularnog otpora u zdravih osoba naši rezultati nisu podržali predloženi koncept barem ne u ovim uvjetima 7 - dnevnog opterećenje soli u mladih zdravih osoba. Ipak koncept puferskog sustava natrija u kožnom intersticiju ostaje za istraživanje u daljnjim studijama na zdravim pojedincima koja uključuju uvjete duljeg razdoblja opterećenja solju ili korištenjem različitih metodoloških pristupa.

Zaključno, ova studija pokazala je kako sedmodnevna prehrana sa velikim unosom soli narušava dušikovim oksidom posredovanu endotelnu vazodilataciju i u mikrocirkulaciji i u makrocirkulaciji mladih zdravih normotenzivnih pojedinaca oba spola, neovisno o promjenama arterijskog tlaka. To je dodatno potvrdila slaba do umjereno negativna povezanost između 24 - satnog izlučivanja natrija i dušikovim oksidom posredovanih vaskularnih odgovora (LTH i FMD).

Takvo funkcionalno endotelno vaskularno oštećenje uslijed opterećenja velikim unosom kuhinjske soli popraćeno je povećanim eNOS-om i smanjenim nNOS-om, ali i nepromijenjenim razinama NO i iNOS-a podržavajući ranija izvješća o smanjenoj bioraspoloživosti NO i eNOS odvajanju u pojedinaca s velikim kardiovaskularnim rizikom. Nepromijenjene serumske razine NO usprkos evidentno narušenom dušikovim oksidom posredovanom vaskularnom odgovoru mogu se objasniti metodološkim izazovima u mjerenju NO ili tezom da status NO u krvi ne može točno odražavati njegov odgovarajući status u tkivima (156). Štoviše, nepromijenjen ukupni vaskularni periferni otpor zbog opterećenja velikim unosom kuhinjske soli potencijalno sugerira da takve rane faze endotelne aktivacije/disfunkcije mogu biti okarakterizirane očuvanim bazalnim protokom NO odgovora, ali NO utječe na odgovore u smislu određenog vaskularnog izazova (podražaja), što bi trebalo biti istražen u daljnjim studijama. Nadalje, disocijacija između eNOS i nNOS serumskog odgovora na 7-dnevnu dijetu sa povećanim unosom kuhinjske soli otvara novo istraživačko pitanje o specifičnim ulogama eNOS-a i nNOS-a u fiziološkoj regulaciji ljudskog vaskularnog tonusa in

vivo. Rezultati nepromijenjenog udjela izvanstanične vode, volumena intersticijske tekućine, serumske razine VEGF-C i indeksa sistemskog vaskularnog otpora kod zdravih pojedinaca ne idu u skladu s predloženim konceptom neosmotskog skladištenja natrija na razini tkiva, barem ne u uvjetima tako kratkog (7 - dnevnog) opterećenja soli kod zdravih mladih pojedinaca.



## 7. ZAKLJUČCI

- sedmodnevna prehrana sa velikim unosom kuhinjske soli nije uzrokovala značajne promjene arterijskog krvnog tlaka u zdravih, mladih ispitanika, stoga se sve promjene izmjerene u odgovoru na veliki unos kuhinjske soli mogu smatrati neovisnim o arterijskom tlaku.
- sedmodnevna prehrana sa velikim unosom kuhinjske soli narušava dušikovim oksidom posredovanu endotelnu vazodilataciju i u mikrocirkulaciji i u vodljivim arterijama mladih zdravih normotenzivnih pojedinaca oba spola, neovisno o promjenama arterijskog tlaka.
- funkcionalno endotelno vaskularno oštećenje uslijed opterećenja velikim unosom kuhinjske soli popraćeno je povećanim serumskim razinama eNOS-a i smanjenim nNOS-a, ali i nepromijenjenim razinama NO i iNOS-a.
- rezultati nepromijenjenog udjela izvanstanične tekućine, volumena intersticijske tekućine, serumske razine VEGF-C i indeksa sistemskog vaskularnog otpora kod zdravih pojedinaca ne idu u skladu s predloženim konceptom neosmotskog skladištenja natrija na razini tkiva, barem ne u uvjetima tako kratkog (7-dnevnog) opterećenja kuhinjskom soli kod zdravih mladih pojedinaca.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** odrediti učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na specifičnu ulogu dušikovog oksida (NO) u mikro- i makrovaskularnom odgovoru na 7-dnevno opterećenje kuhinjskom soli u zdravih pojedinaca. Dodatni cilj je ispitati koncept neosmotskog skladištenja natrija u koži tijekom 7-dnevne HS dijeta u zdravih pojedinaca.

**Nacrt studije:** studija je koncipirana kao nerandomizirani kontrolirani pokus u kojemu su svi ispitanici podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja.

**Ispitanici i metode:** u istraživanju je sudjelovalo 46 mladih zdravih osoba oba spola. Prvih 7 dana su bili na dijeti sa malim unosom soli (LS) (3,5 g soli/dan), potom na dijeti s velikim unosom soli (HS) (~14,7 g soli/dan). NO-om posredovana o endotelu ovisna vazodilatacija mikrocirkulacije procijenjena je mjerenjem lokalne toplinske hiperemije kože (LTH), a u makrocirkulaciji mjerenjem protokom posredovane dilatacije (FMD) brahijalne arterije. Prije i poslije HS dijeta svim ispitanicima je izmjeren status tjelesnih tekućina, sistemska hemodinamika, arterijski krvni tlak, te serumske koncentracije NO, tri izoforme enzima NOS (eNOS, nNOS i iNOS) te vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C).

**Rezultati:** rezultati 24-satnog izlučivanja natrija urinom potvrdili su kako su se svi sudionici pridržavali protokola prehrane. 7-dnevna HS dijeta značajno je smanjila mikrovaskularnu LTH i FMD brahijalne arterije u usporedbi sa LS dijetom. Koncentracija eNOS-a u serumu je značajno porasla, nNOS-a se značajno smanjila, dok su iNOS i NO ostali nepromijenjeni nakon HS u usporedbi s LS dijetom. Koncentracija VEGF-C u serumu, volumen intersticijske tekućine kao i indeks sistemskog vaskularnog otpora (SVRI) ostali su nepromijenjeni nakon HS dijeta u usporedbi s LS dijetom.

**Zaključak:** 7-dnevna prehrana sa velikim unosom soli izaziva oštećenje o NO-u ovisne endotelne vazodilatacije u mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji zdravih pojedinaca neovisno o promjenama arterijskog tlaka. Disocijacija u odgovoru eNOS-a (povećanje serumske razine) i nNOS-a (smanjenje serumske razine) na prehranu s velikim unosom kuhinjske soli ukazuje na složenu prilagodbu glavnih izoformi enzima koji stvaraju NO na unos HS kod zdravih pojedinaca. Rezultati o razini VEGF-C u serumu, volumenu intersticijske tekućine i SVRI kao odgovor na 7-dnevnu HS dijetu nisu uspjeli podržati koncept neosmotskog skladištenja natrija u koži, barem u smislu takve kratkoročne prehrabene modulacije soli kod zdravih osoba.

**Ključne riječi:** dijeta sa velikim unosom kuhinjske soli; dušikov oksid; endotel; makrocirkulacija; mikrocirkulacija; sintaza dušikovog oksida; vaskularni endotelni faktor rasta.

## 9. SUMMARY

### **"The role of nitric oxide in the micro- and macrovascular response to 7-day load of table salt in healthy individuals"**

**Objectives:** to investigate the effect of a 7 - day high-salt (HS) diet on the specific role of nitric oxide (NO) in the micro- and macrovascular response to a 7 - day salt load in healthy individuals. An additional goal is to examine the concept of non-osmotic sodium storage in the skin during 7 - day HS loadin in healthy individuals.

**Study design:** the study was designed as a non-randomized controlled trial in which all subjects were subjected to the same experimental protocol with multiple repeated measurements.

**Participants and methods:** 46 young healthy people of both sexes participated in the research. For the first 7 days, they were on a low-salt diet (LS) (3.5 g salt/day), then on a high-salt diet (HS) (~14.7 g salt/day). Endothelial nitric oxide-mediated vasodilatation in the microcirculation was assessed by measuring local thermal skin hyperemia (LTH) using laser Doppler flowmetry (LDF), and in the macrocirculation by measuring the flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery using ultrasound before HS and after the HS diet. Body fluid status was assessed using a 4 - terminal noninvasive impedance analyzer, while systemic hemodynamics and arterial blood pressure were measured using impedance cardiography (ICG). Concentrations of NO, three NOS enzyme isoforms (eNOS, iNOS and nNOS) and VEGF-C were measured before and after the HS diet.

**Results:** the results of 24 - hour urinary sodium excretion confirmed that all participants adhered to the dietary protocol. The 7 - day HS diet significantly reduced cutaneous microvascular LTH and brachial artery FMD compared to the LS diet, independent of arterial blood pressure or changes in body fluid status. Serum eNOS concentration increased significantly, nNOS significantly decreased, while iNOS and NO remained unchanged after HS compared to LS diet. Serum VEGF-C concentration, interstitial fluid volume as well as SVRI remained unchanged after the HS diet compared to the LS diet.

**Conclusion:** a 7 - day diet with increased salt intake causes an impairment of nitric oxide-dependent endothelial vasodilation in the microcirculation and macrocirculation of healthy individuals, independent of changes in arterial pressure. The dissociation in the response of eNOS (increase in serum level) and nNOS (decrease in serum level) to a diet with increased table salt intake indicates a complex adaptation of the main isoforms of NO-generating enzymes

to HS intake in healthy individuals. Results on serum VEGF-C level, interstitial fluid volume, and SVRI in response to a 7 - day HS diet failed to support the concept of non-osmotic sodium storage in the skin, at least in terms of such short-term dietary salt modulation in healthy subjects.

**Key words:** diet with a high intake of table salt; nitrogen oxide; endothelium; macrocirculation; microcirculation; nitric oxide synthase; vascular endothelial growth factor.

**10. LITERATURA**

1. Drenckhahn D. The endothelial contractile cytoskeleton. Born VRG, Schwartz CJ, ur Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities Stuttgart: Schattauer. 1997;1–26.
2. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006 Apr 4;113(13):1708–14.
3. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39(4):287–324.
4. Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990 Jul 5;323(1):27–36.
5. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):546–9.
6. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998 Nov 19;396(6708):269–72.
7. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*. 2007 Mar;49(3):590–6.
8. Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K<sup>(+)</sup> channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Jul;281(1):R246-53.
9. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003 Nov;81(11):1013–28.
10. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic Modulation of Interendothelial Gap Junctional Communication by 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid. *Circ Res*. 2002 Apr 19;90(7):800–6.

11. Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JC. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov 30;205(1):765–71.
12. Bragulat E, de la Sierra A. Salt intake, endothelial dysfunction, and salt-sensitive hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2002;4(1):41–6.
13. Hofmeister LH, Perisic S, Titze J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arch*. 2015 Mar;467(3):551–8.
14. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med*. 2000 Jul;32(5):293–304.
15. Ewenstein MG. Vascular biology of von Willebrand factor. Born VRG, Schwartz CJ, *ur Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities* Stuttgart: Schattauer. 1997;107–22.
16. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):168–75.
17. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:230–9; discussion 239–40.
18. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III12–19.
19. Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13122.
20. Drenjancevic I, Jukic I, Stupin A, Cosic A, Stupin M, Selthofer-Relatic K. The Markers of Endothelial Activation. In: *Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges*. InTech; 2018.
21. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*. 2012 Jan;19(1):47–64.

22. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Apr;33(4):998–1001.
23. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. *Hypertension*. 2006 Dec;48(6):1012–7.
24. Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaute E, Safar ME, et al. Impaired Tissue Perfusion. *Circulation*. 2008 Aug 26;118(9):968–76.
25. Chang CH, Tsai RK, Wu WC, Kuo SL, Yu HS. Use of dynamic capillaroscopy for studying cutaneous microcirculation in patients with diabetes mellitus. *Microvasc Res*. 1997 Mar;53(2):121–7.
26. Yamamoto-Suganuma R, Aso Y. Relationship between post-occlusive forearm skin reactive hyperaemia and vascular disease in patients with Type 2 diabetes--a novel index for detecting micro- and macrovascular dysfunction using laser Doppler flowmetry. *Diabet Med*. 2009 Jan;26(1):83–8.
27. Kruger A, Stewart J, Sahityani R, O’Riordan E, Thompson C, Adler S, et al. Laser Doppler flowmetry detection of endothelial dysfunction in end-stage renal disease patients: correlation with cardiovascular risk. *Kidney Int*. 2006 Jul;70(1):157–64.
28. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature*. 1975 Mar 6;254(5495):56–8.
29. Roustit M, Blaise S, Millet C, Cracowski JL. Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res*. 2010 Mar;79(2):102–8.
30. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Sep;27(9):503–8.
31. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111–5.



32. Alley H, Owens CD, Gasper WJ, Grenon SM. Ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery in clinical research. *J Vis Exp*. 2014 Oct 22;(92):e52070.
33. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1314–9.
34. Higashi Y. Assessment of endothelial function. History, methodological aspects, and clinical perspectives. *Int Heart J*. 2015;56(2):125–34.
35. Parker BA, Tschakovsky ME, Augeri AL, Polk DM, Thompson PD, Kiernan FJ. Heterogenous vasodilator pathways underlie flow-mediated dilation in men and women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Sep;301(3):H1118-26.
36. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998 Dec 15;82(12):1535–9, A7-8.
37. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016 Nov 7;37(42):3232–45.
38. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018 Sep 1;39(33):3021–104.
39. Jelaković B, Kaić-Rak A, Milčić D, Premuzić V, Skupnjak B, Reiner Z. [Less salt--more health. Croatian action on salt and health (CRASH)]. *Lijec Vjesn*. 2009;131(3–4):87–92.
40. Powles J, Fahimi S, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Ezzati M, et al. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ Open*. 2013 Dec 23;3(12):e003733.
41. Jelakovic B., Reiner Z. Croatian national programme for reduction of excessive salt intake. *Lijec Vjesn*. 2014;136:304–6.

42. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997 Apr 17;336(16):1117–24.
43. Jelakovic B. Salt Intake in Croatia—EHUH 2 Report. 41st Symposium Hypertension Highlights in 2020. Zagreb; 2020.
44. 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.
45. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2002;4(4):274–6.
46. 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 Nov 1;590(21):5519–28.
47. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, et al. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol.* 2015 Dec 15;593(24):5313–24.
48. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian JT, Wang E, et al. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016 Apr;34(4):676–84.
49. Barić L, Drenjančević I, Matić A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, et al. 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.
50. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2002;4(4):274–6.
51. Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987 Feb;9(2):157–63.
52. Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt enhances glomerular endothelial nitric oxide synthase through TGF-beta1. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1):F18-24.

53. Ni Z, Oveisi F, Vaziri ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):552–7.
54. Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens*. 2001 Feb;14(2):155–63.
55. Durand MJ, Moreno C, Greene AS, Lombard JH. Impaired relaxation of cerebral arteries in the absence of elevated salt intake in normotensive congenic rats carrying the Dahl salt-sensitive renin gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Dec;299(6):H1865-74.
56. Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol*. 2002 Aug 15;543(Pt 1):255–60.
57. Goto K, Kansui Y, Oniki H, Ohtsubo T, Matsumura K, Kitazono T. Upregulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor compensates for the loss of nitric oxide in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2012 Aug;35(8):849–54.
58. Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M. Excessive salt or cholesterol intake alters the balance among endothelium-derived factors released from renal arteries in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999 Oct;34(4):533–9.
59. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Compr Physiol*. 2015 Dec 15;6(1):215–54.
60. Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J. The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res*. 1999 Oct;44(1):47–59.
61. Zhu J, Drenjancevic-Peric I, McEwen S, Friesema J, Schulta D, Yu M, et al. Role of superoxide and angiotensin II suppression in salt-induced changes in endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling and NO production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Aug;291(2):H929-38.

62. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Nov;287(5):R1014-30.
63. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, et al. 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 Sep 1;594(17):4917–31.
64. Durand MJ, Lombard JH. Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase expression. *Am J Hypertens*. 2013 Jun;26(6):739–47.
65. McEwen ST, Schmidt JR, Somberg L, Cruz L de la, Lombard JH. Time-course and mechanisms of restored vascular relaxation by reduced salt intake and angiotensin II infusion in rats fed a high-salt diet. *Microcirculation*. 2009 Apr;16(3):220–34.
66. Durand MJ, Lombard JH. Introgression of the Brown Norway renin allele onto the Dahl salt-sensitive genetic background increases Cu/Zn SOD expression in cerebral arteries. *Am J Hypertens*. 2011 May;24(5):563–8.
67. Stein CM, Nelson R, Brown M, Wood M, Wood AJ. Dietary sodium intake modulates vasodilation mediated by nitroprusside but not by methacholine in the human forearm. *Hypertension*. 1995 Jun;25(6):1220–3.
68. Dishy V, Sofowora GG, Imamura H, Nishimi Y, Xie HG, Wood AJ, et al. Nitric oxide production decreases after salt loading but is not related to blood pressure changes or nitric oxide-mediated vascular responses. *J Hypertens*. 2003 Jan;21(1):153–7.
69. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension*. 2008 Jun;51(6):1525–30.
70. Eisenach JH, Gullixson LR, Kost SL, Joyner MJ, Turner ST, Nicholson WT. Sex differences in salt sensitivity to nitric oxide dependent vasodilation in healthy young adults. *J Appl Physiol (1985)*. 2012 Mar;112(6):1049–53.
71. Dickinson KM, Clifton PM, Keogh JB. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2011 Mar;93(3):500–5.

72. DuPont JJ, Greaney JL, Wenner MM, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Farquhar WB, et al. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *J Hypertens*. 2013 Mar;31(3):530–6.
73. Lennon-Edwards S, Ramick MG, Matthews EL, Brian MS, Farquhar WB, Edwards DG. Salt loading has a more deleterious effect on flow-mediated dilation in salt-resistant men than women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Sep;24(9):990–5.
74. Matthews EL, Brian MS, Ramick MG, Lennon-Edwards S, Edwards DG, Farquhar WB. High dietary sodium reduces brachial artery flow-mediated dilation in humans with salt-sensitive and salt-resistant blood pressure. *J Appl Physiol (1985)*. 2015 Jun 15;118(12):1510–5.
75. Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH, et al. Effects of AT1 receptor blockade on plasma thromboxane A2 (TXA2) level and skin microcirculation in young healthy women on low salt diet. *Kidney Blood Press Res*. 2013;37(4–5):432–42.
76. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, et al. 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 Mar 20;9(3).
77. Stupin A, Drenjančević I, Šušnjara P, Debeljak Ž, Kolobarić N, Jukić I, et al. Is There Association between Altered Adrenergic System Activity and Microvascular Endothelial Dysfunction Induced by a 7-Day High Salt Intake in Young Healthy Individuals. *Nutrients*. 2021 May 20;13(5):1731.
78. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, Mihaljević Z, Šušnjara P, Jukić I, et al. Role of Oxidative Stress in Vascular Low-Grade Inflammation Initiation Due to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals. *Antioxidants*. 2022 Feb 23;11(3):444.
79. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829–37, 837a–837d.
80. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 1998 Mar 27;279(5359):2121–6.

81. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 Aug 1;357(Pt 3):593–615.
82. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature.* 306(5939):174–6.
83. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res.* 1986 Apr;58(4):531–8.
84. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki J V, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984;6 Suppl 2:S336-43.
85. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991 Feb;14(2):60–7.
86. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994 Jun;23(6 Pt 2):1121–31.
87. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003 Nov;9(11):1370–6.
88. Sasaki K ichiro, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14537–41.
89. Mayer B, Forstermann U. Handbook of experimental pharmacology-Nitric Oxide. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. . In 2000. p. 71–91.
90. Schwarz PM, Kleinert H, Förstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Nov;19(11):2584–90.

91. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):244–54.
92. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999 Jun 10;399(6736):597–601.
93. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Jan;284(1):R1-12.
94. Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 2009 Jun;20(4):223–30.
95. Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, et al. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Jul;262(1):343–7.
96. Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, et al. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res.* 1992 Mar;70(3):607–11.
97. el Karib AO, Sheng J, Betz AL, Malvin RL. The central effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N omega-nitro-L-arginine) on blood pressure and plasma renin. *Clin Exp Hypertens.* 1993 Sep;15(5):819–32.
98. Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2009 Nov;19(8):256–62.
99. Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 1991 Feb;3(1):65–70.
100. Li H, Wallerath T, Münzel T, Förstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide.* 2002 Nov;7(3):149–64.

101. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res.* 2000 Feb 18;86(3):347–54.
102. Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des.* 2009;15(27):3133–45.
103. Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep;164(2):213–23.
104. Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jun 1;50(11):1639–46.
105. Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox Mechanisms in Blood Vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Feb;25(2):274–8.
106. Bernard C. Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. Paris: Bailliére. ; 1859.
107. Titze J. Sodium balance is not just a renal affair. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 Mar;23(2):101–5.
108. Smith HW. The story of our internal environment. From fish to philosopher. Boston: Little Brown; 1953.
109. Walser M. Phenomenological analysis of renal regulation of sodium and potassium balance. *Kidney Int.* 1985 Jun;27(6):837–41.
110. Rose BD. Regulation of water and electrolyte balance. In: 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1994. p. 235–60.
111. Rakova N, Jüttner K, Dahlmann A, Schröder A, Linz P, Kopp C, et al. Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na(+) balance. *Cell Metab.* 2013 Jan 8;17(1):125–31.
112. Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, et al. Spooky sodium balance. *Kidney Int.* 2014 Apr;85(4):759–67.



113. Inglese M, Madelin G, Oesingmann N, Babb JS, Wu W, Stoeckel B, et al. Brain tissue sodium concentration in multiple sclerosis: a sodium imaging study at 3 tesla. *Brain*. 2010 Mar;133(Pt 3):847–57.
114. Kopp C, Linz P, Hammon M, Schöfl C, Grauer M, Eckardt KU, et al. Seeing the sodium in a patient with hypernatremia. *Kidney Int*. 2012 Dec;82(12):1343–4.
115. Kopp C, Linz P, Wachsmuth L, Dahlmann A, Horbach T, Schöfl C, et al. <sup>23</sup>Na magnetic resonance imaging of tissue sodium. *Hypertension*. 2012 Jan;59(1):167–72.
116. Kopp C, Linz P, Dahlmann A, Hammon M, Jantsch J, Müller DN, et al. <sup>23</sup>Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*. 2013 Mar;61(3):635–40.
117. Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen T V, et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest*. 2013 Jul;123(7):2803–15.
118. Heer M, Baisch F, Kropp J, Gerzer R, Drummer C. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Apr;278(4):F585-95.
119. Qi N, Rapp JP, Brand PH, Metting PJ, Britton SL. Body fluid expansion is not essential for salt-induced hypertension in SS/Jr rats. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5):R1392-400.
120. Titze J, Shakibaei M, Schafflhuber M, Schulze-Tanzil G, Porst M, Schwind KH, et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na<sup>+</sup> storage in the skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul;287(1):H203-8.
121. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med*. 2009 May;15(5):545–52.
122. Titze J, Krause H, Hecht H, Dietsch P, Rittweger J, Lang R, et al. Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jul;283(1):F134-41.

123. Slagman MCJ, Kwakernaak AJ, Yazdani S, Laverman GD, van den Born J, Titze J, et al. Vascular endothelial growth factor C levels are modulated by dietary salt intake in proteinuric chronic kidney disease patients and in healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Mar;27(3):978–82.
124. Dahlmann A, Dörfelt K, Eicher F, Linz P, Kopp C, Mössinger I, et al. Magnetic resonance-determined sodium removal from tissue stores in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2015 Feb;87(2):434–41.
125. Soria JC, DeBraud F, Bahleda R, Adamo B, Andre F, Dientsmann R, et al. Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol*. 2014 Nov;25(11):2244–51.
126. Lankhorst S, Severs D, Markó L, Rakova N, Titze J, Müller DN, et al. Salt Sensitivity of Angiogenesis Inhibition-Induced Blood Pressure Rise: Role of Interstitial Sodium Accumulation? *Hypertension*. 2017 May;69(5):919–26.
127. Bandyopadhyay A, Chatterjee (nee Karmakar) S, Jana S, Dey SK. Assessment of body water spaces & mineral content in trained athletes of different sports using bioelectrical impedance analysis. *Balt J Health Phys Act*. 2018 Jun 30;10(2):43–54.
128. Minson CT, Berry LT, Joyner MJ. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol (1985)*. 2001 Oct;91(4):1619–26.
129. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, et al. Nitroglycerine-induced vasodilation for assessment of vascular function: a comparison with flow-mediated vasodilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jun;33(6):1401–8.
130. Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Skeletal muscle arteriolar reactivity in SS.BN13 consomic rats and Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2003 May;41(5):1012–5.
131. Nishimura JS, Martasek P, McMillan K, Salerno J, Liu Q, Gross SS, et al. Modular structure of neuronal nitric oxide synthase: localization of the arginine binding site and modulation by pterin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 May 16;210(2):288–94.

132. Noble MA, Munro AW, Rivers SL, Robledo L, Daff SN, Yellowlees LJ, et al. Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 1999 Dec 14;38(50):16413–8.
133. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14533–6.
134. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986 Jun;237(3):893–900.
135. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 1995 May 19;81(4):641–50.
136. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916–23.
137. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jun 20;47(12):2536–44.
138. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001 Feb 2;88(2):E14–22.
139. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999 Apr 20;99(15):2027–33.
140. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1;99(1):41–6.

141. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000 Nov;43(11):1435–8.
142. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000 Feb 4;86(2):E36-41.
143. Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SE, Al-Hesayen A, Kelly S, et al. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1119–23.
144. Li J, White J, Guo L, Zhao X, Wang J, Smart EJ, et al. Salt inactivates endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *J Nutr*. 2009 Mar;139(3):447–51.
145. Werner ER, Gorren ACF, Heller R, Werner-Felmayer G, Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Dec;228(11):1291–302.
146. Heller R, Werner-Felmayer G, Werner ER. Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006 Feb 11;62(S1):21–8.
147. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schmidt K, et al. Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem*. 1993 Jan 25;268(3):1842–6.
148. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2236–43.
149. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub>- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*. 1999 Dec;48(12):2437–45.

150. Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1044–8.
151. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1282–8.
152. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1201–9.
153. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, et al. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens*. 2002 Apr;15(4 Pt 1):326–32.
154. Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Feb;286(2):H575–83.
155. Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Apr;292(4):R1550–6.
156. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med*. 2006 Sep 1;41(5):691–701.
157. Sulyok E, Farkas B, Nagy B, Várnagy Á, Kovács K, Bódis J. Tissue Sodium Accumulation: Pathophysiology and Clinical Implications. *Antioxidants*. 2022 Apr 9;11(4):750.
158. Sulyok E, Nyúl Z. Hyaluronan-related limited concentration by the immature kidney. *Med Hypotheses*. 2005;65(6):1058–61.
159. Rügheimer L, Johnsson C, Maric C, Hansell P. Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Jun;193(2):191–8.

160. Stridh S, Palm F, Hansell P. Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Jun;302(11):R1235-49.
161. Stridh S, Palm F, Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Friederich-Persson M, Hansell P. Hyaluronan Production by Renomedullary Interstitial Cells: Influence of Endothelin, Angiotensin II and Vasopressin. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 13;18(12).
162. Rossitto G, Mary S, Chen JY, Boder P, Chew KS, Neves KB, et al. Tissue sodium excess is not hypertonic and reflects extracellular volume expansion. *Nat Commun*. 2020 Aug 24;11(1):4222.
163. Selvarajah V, Connolly K, McEniery C, Wilkinson I. Skin Sodium and Hypertension: a Paradigm Shift? *Curr Hypertens Rep*. 2018 Nov 13;20(11):94.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

**Ime i prezime:** Ivana Tolj

**Adresa:** Lastovska 52, Osijek

**Tel:** +385 98 175 44 44

**E-mail:** ivanatolj5@gmail.com

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum rođenja:** 18. 5. 1986.

### **Obrazovanje:**

2019.: Poslijediplomski stručni studij „Nefrologija“, Medicinski fakultet Zagreb

2019.: Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije Ultrazvuk abdomena, Medicinski fakultet Zagreb

2016.: Poslijediplomski stručni studij „Internistička onkologija“, Medicinski fakultet Zagreb

2012.- danas: Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek

2011.-2012.: Pučko otvoreno učilište u Osijeku, položen pismeni i usmeni ispit poznavanja engleskog jezika razina C1

2005.-2011.: Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku  
Područje: Doktor medicine

2001.-2005.: Prirodoslovno-matematička gimnazija, Osijek

### **Zaposlenje:**

2022.-danas: specijalist internističke onkologije, specijalist nefrologije, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Osijek

2.11.2022.: položen specijalistički ispit iz Nefrologije, KBC Zagreb

2020. - danas: naslovni asistent; Katedra za internu medicinu i povijest medicine, Medicinski fakultet u Osijeku

1./2019.-2022.: specijalizant nefrologije, KBC Osijek

13.11.2018.: položen specijalistički ispit iz Internističke onkologije, KBC Zagreb

2013.-2018.: specijalizant Internističke onkologije, KBC Osijek i KBC Zagreb

2011.-2012.: doktor medicine, liječnički pripravnički staž, KBC Osijek, Osijek

### **Znanstvena i stručna djelatnost:**

#### **Objavljeni znanstveni radovi:**

1. Pojatić, Đ., Nikić, D., **Tolj, I.**, Pezerović D., Šantić, A., Degmečić, D.; Alexithymia, Phosphorus Levels, and Sleep Disorders in Patients on Hemodialysis; Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(11), 3218
2. Basic-Jukic, N., Racki, S., **Tolj, I.**, Aleckovic, M., Babovic, B., Juric, I., Furic-Cunko, V., Katalinic, L., Mihaljevic, D., Vujic, S., Mesic, E., Jelakovic, B., Kastelan, Z.; Hospitalization and death after recovery from acute COVID-19 among renal transplant recipients; Clinical Transplantation, 2022, 36(4), e14572
3. Pojatić, Đ., **Tolj, I.**, Pezerović, D., Degmečić, D.; Systematic review of alexithymia in the population of hemodialysis patients; Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(13), 2862
4. Tišma, Marina, Žnidaršič-Plazl, Polona; Šelo, Gordana; **Tolj, Ivana**; Šperanda, Marcela; Bucić-Kojić, Ana; Planinić, Mirel; Trametes versicolor in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities; Bioresource Technology, 2021, 330, 124997
5. Pojatić, Đ., Pezerović, D., **Tolj, I.**, Degmečić, D.; The differences in biochemical reactants in the acute phase/stage and sleep quality considering the type of vascular access in patients on hemodialysis; Acta Clinica Croatica, 2021, 60, pp. 31–38



**Kongresna priopćenja, sažetci i poster:**

12./2022. Prvi kongres hrvatskog društva za bubreg s međunarodnim sudjelovanjem. Prikaz slučaja na temu: postoji li veza između IgA nefropatije i atipičnog Hemolitičko uremijskog sindroma, Zagreb.

3./2022. 26. Dani Internista Slavonije i Baranje; Predavač na temu: Kontinuirane metode liječenja akutnog oštećenja bubrega.

2./2020.: Zajednički simpozij Hrvatskog društva za Internističku onkologiju i Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora; Predavač na temu: mehanizam djelovanja i toksičnost inhibitora tirozin kinaze. Arterijska hipertenzija, trebamo li se uopće bojati?, Zagreb.

10./2019.: Hrvatska transplantacijska škola, Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora; Apstrakt i prikaz slučaja; tema: Prikaz slučaja bolesnika s bubrežnim presatkom i obostranim perzistirajućim plućnim infiltratima u ranom poslijetransplantacijskom periodu, Dubrovnik.

10./2019.: Hrvatska transplantacijska škola, Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora; Apstrakt i prikaz slučaja; tema: Akutna HIV infekcija kao diferencijalna dijagnoza nejasnog febrilnog stanja u transplantiranog bolesnika, Dubrovnik.

5./2019.: 6. osječki nefrološki dani; Predavač na temu: maligne bolesti u imunosuprimiranih bolesnika, Osijek.

6./2018.: 14. Centralni Europski Onkološki kongres; Apstrakt i prikaz slučaja, Opatija.

10./2016.: Simpozij i godišnji sastanak Hrvatskog društva za Internističku onkologiju; Apstrakt i prikaz slučaja, Trakošćan.