

# UTJECAJ UNOSA KUHINJSKE SOLI NA VASKULARNU FUNKCIJU TRUDNICE U TREĆEM TROMJESEČJU TRUDNOĆE

---

Vulin, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:463861>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Martina Vulin

UTJECAJ UNOSA KUHINJSKE SOLI NA VASKULARNU FUNKCIJU TRUDNICE U  
TREĆEM TROMJESEČJU TRUDNOĆE

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Martina Vulin

UTJECAJ UNOSA KUHINJSKE SOLI NA VASKULARNU FUNKCIJU TRUDNICE U  
TREĆEM TROMJESEČJU TRUDNOĆE

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

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

Komentor rada: doc. prim. dr. sc. Andrijana Muller, dr. med.

Rad ima 103 stranice.

.

## *Zahvala*

*Želim izraziti zahvalnost mentorici prof. dr. sc. Ani Stupin koja me iskustvom i konstruktivnim prijedlozima vodila kroz proces istraživanja i izrade disertacije. Svojom je velikim znanjem, istraživačkim entuzijazmom i kritičkim načinom razmišljanja omogućila da doktorski rad bude uspješan i kvalitetan. Zbog toga joj neizmjereno hvala.*

*Zahvaljujem se i komentorici doc. prim. dr. sc. Andrijani Müller na višegodišnjoj stručnoj suradnji, potpori i trajnom inzistiranju na težnji ka boljem.*

*Također zahvaljujem prof. dr. sc. Ines Drenjančević na ustrajnoj vjeri u mene i poticanju na znanstvenoistraživački rad. Svojom je angažmanom i stručnim autoritetom osnažila ovaj rad te je dala značajan doprinos uspješnoj provedbi istraživanja i izradi disertacije.*

*Veliko hvala na uloženom vremenu i trudu svim mojim suradnicima na istraživanju, djelatnicima Klinike za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek i djelatnicima Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, kao i trudnicama koje su sudjelovale u istraživanju.*

*Posebnu zahvalu dugujem cijeloj svojoj obitelji, roditeljima, suprugu i djeci. Hvala im na apsolutnoj podršci, razumijevanju i ljubavi.*

Ovo je istraživanje financirano iz sredstava Institucijskih znanstveno-istraživačkih projekata Medicinskog fakulteta Osijek IP-10-MEFOS-2021 (voditelj Ana Stupin) i IP-02-MEFOS-2022 (voditelj Ana Stupin).

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Prekomjieran unos soli, javnozdravstveni problem .....	1
1.2. Endotel i endotelna funkcija.....	2
1.3. Endotelna disfunkcija.....	3
1.4. Metode procjene funkcije endotela .....	4
1.5. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav.....	6
1.6. Unos soli i endotel.....	7
1.7. Prilagodbe kardiovaskularnog sustava tijekom trudnoće.....	9
1.7.2. Pad krvnoga tlaka.....	10
1.7.3. Povećanje ukupnog volumena plazme.....	11
1.8. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav u trudnoći .....	11
1.9. Angiogeni čimbenici posteljice.....	14
1.10. Endotelna funkcija u trudnoći .....	15
1.11. Unos soli u trudnoći .....	19
1.12. Sol i posteljica.....	21
1.13. Antenatalno programiranje.....	22
2. HIPOTEZA.....	24
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
4. ISPITANICI I METODE .....	26
4.1. Ustroj istraživanja .....	26
4.2. Ispitanice .....	26
4.3. Metode.....	27
4.3.1. Protokol istraživanja .....	27
4.3.2. Podjela ispitanica u skupine.....	28

4.3.3.	Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica .....	29
4.3.4.	Mjerenje tjelesne težine i visine te sastava tijela i tjelesnih tekućina .....	29
4.3.5.	Mjerenje arterijskog tlaka i pulsa.....	30
4.3.6.	Uzorkovanje i analiza uzoraka 24-satnog urina.....	30
4.3.7.	Uzorkovanje, pohrana i biokemijska analiza uzoraka venske krvi.....	30
4.3.8.	Mjerenje periferne mikrovaskularne reaktivnosti metodom laser-doplerske floumetrije (LDF) .....	31
4.3.9.	Mjerenje reaktivnosti periferne makrocirkulacije ultrazvučnom metodom .....	32
4.3.10.	Doppler ultrazvuk srednje moždane (CMA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI).....	33
4.3.11.	Mjerenje biokemijskih biljega endotelne funkcije.....	33
4.3.12.	Mjerenje biljega oksidativnoga stresa i antioksidativnog kapaciteta.....	33
4.3.13.	Mjerenje aktivnosti renina u plazmi (PRA) i koncentracije aldosterona u serumu .	34
4.3.14.	Mjerenje serumske koncentracije topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljličnog čimbenika rasta (PlGF) .....	35
4.3.15.	Mjerenje koncentracije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice.....	35
4.4.	Statističke metode .....	36
5.	REZULTATI .....	37
5.1.	Opća obilježja ispitanica i ishod trudnoće .....	37
5.2.	Gestacijski prirast tjelesne težine, sastav tijela i tjelesnih tekućina .....	38
5.3.	Biokemijska analiza seruma.....	40
5.4.	Analiza 24-satnog urina .....	40
5.5.	EPIC-Norfolk upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica.....	42
5.6.	Doppler ultrazvuk srednje moždane (MCA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI) .....	42



5.7.	Protokom posredovana dilatacija (FMD) brahijalne arterije .....	43
5.8.	Periferna mikrovaskularna reaktivnost u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH), iontoforezu acetilkolina (IONTO ACh) i natrijevog nitroprusida (IONTO SNP) te lokalno zagrijavanje kože (LTH) .....	44
5.9.	Serumski biljezi endotelne funkcije .....	47
5.10.	Serumski biljezi oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet plazme .....	48
5.11.	Povezanost dnevnog unosa soli i mjerenih funkcijskih i biokemijskih biljega endotelne funkcije u zdravih trudnica.....	50
5.12.	Aktivnost renina u plazmi (PRA) i koncentracija aldosterona u serumu.....	52
5.13.	Serumska koncentracija topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljičnog čimbenika rasta (PlGF) .....	54
5.14.	Koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice .....	55
5.15.	Povezanost dnevnog unosa soli i mjerene fetoplacentne vaskularne funkcije, aktivnosti RAAS-a te angiogenih čimbenika posteljice u zdravih trudnica .....	56
6.	RASPRAVA.....	58
6.1.	Učinak prekomjernog unosa soli u trudnoći na endotelnu funkciju i oksidativni stres ..	59
6.2.	Učinak prekomjernog unosa soli u trudnoći na fetoplacentnu vaskularnu funkciju, aktivnost RAAS-a i angiogene čimbenike posteljice.....	65
7.	ZAKLJUČCI .....	72
8.	SAŽETAK.....	73
9.	SUMMARY .....	75
10.	LITERATURA .....	77
11.	ŽIVOTOPIS.....	100
12.	PRILOZI.....	103

## Popis kratica

8-izo-PGF2 $\alpha$	8-izo-prostaglandin F2alfa
ACE	angiotenzin-konvertirajući enzim
ACh	acetilkolin
AFI	indeks plodove vode (engl. <i>amniotic fluid index</i> )
AGT	angiotenzinogen
ANG	angiotenzin
CIMT	debljina kompleksa intima-medija karotidne arterije (engl. <i>carotid intima-media thickness</i> )
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i> )
CPR	cerebroplacentni omjer (engl. <i>cerebroplacental ratio</i> )
EDHF	endotelni čimbenici hiperpolarizacije (engl. <i>endothelium derived hyperpolarizing factors</i> )
ELISA	enzimska imunoanaliza (engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
Flt-1	Fms-u slična tirozin kinaza (engl. <i>fms-like-tyrosine kinase</i> )
FMD	protokom posredovana vazodilatacija (engl. <i>flow-mediated dilation</i> )
FRAP	sposobnosti redukcije željeza u plazmi (engl. <i>ferric reducing ability of plasma</i> )
GFR	glomerularna filtracija (engl. <i>glomerular filtration rate</i> )
GWG	gestacijski prirast tjelesne težine (engl. <i>gestational weight gain</i> )
HPT	hipertenzivni poremećaji trudnoće
ITM	indeks tjelesne mase
KVB	kardiovaskularna bolest
LDF	laser-doplerska floumetrija (engl. <i>laser Doppler flowmetry</i> )

LTH	lokalna toplinska hiperemija
MAP	srednji arterijski krvni tlak
MCA	srednja moždana arterija (engl. <i>middle cerebral artery</i> )
MMP-9	matriks metaloproteinaze 9
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric-oxide</i> )
NOS	sintaza dušikova oksida
PGI2	prostaciklin
PI	indeks pulsatilnosti (engl. <i>pulsatility index</i> )
PIGF	posteljčni čimbenik rasta (engl. <i>placental growth factor</i> )
PORH	post-okluzivna reaktivna hiperemija
PRA	plazma reninska aktivnost
PWV	brzina pulsnog vala (engl. <i>pulse wave velocity</i> )
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RI	indeks otpora (engl. <i>resistance indeks</i> )
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
sFlt-1	topljivi Flt-1 (engl. <i>soluble fms-like tyrosine kinase 1</i> )
SNP	natrijev nitroprusid
TBARS	reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TXA2	tromboksan
UA	pupčana, umbilikalna arterija (engl. <i>umbilical artery</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## **Popis tablica**

Tablica 5.1. Opća obilježja ispitanica i ishod trudnoće .....	38
Tablica 5.2. Gestacijski prirast tjelesne težine, sastav tijela i tjelesnih tekućina.....	39
Tablica 5.3. Biokemijska analiza seruma.....	40
Tablica 5.4. Analiza 24-satnog urina i procjena dnevnog unosa soli.....	41
Tablica 5.5. Procjena dnevnog unosa soli upitnikom EPIC-Norfolk o učestalosti konzumiranja namirnica.....	42
Tablica 5.6. Doppler ultrazvuk srednje moždane (MCA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI).....	43

## Popis slika

Slika 1.1. Prilagodbe kardiovaskularnog sustava tijekom trudnoće.....	9
Slika 4.1. Sažeti prikaz protokola istraživanja.....	28
Slika 5.1. Vazodilatacija periferne makrocirkulacije ovisna o endotelu u skupini trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) dnevnim unosom soli procijenjena ultrazvučnim mjerenjem protokom posredovane dilatacije (FMD) brahijalne arterije.....	44
Slika 5.2. O endotelu ovisna i neovisna dilatacija periferne mikrocirkulacije u skupini trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) dnevnim unosom soli procijenjena laser-doplerskom floumetrijom (LDF).....	46
Slika 5.3. Serumaska koncentracija dušikova oksida (NO) i endokana u trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....	48
Slika 5.4. Serumski biljezi oksidativnog stresa (TBARS i 8-izo-PGF $2\alpha$ ) u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....	49
Slika 5.5. Redukcijska sposobnost željeza u plazmi (FRAP) kao biljeg antioksidativnog kapaciteta u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....	50
Slika 5.6. Povezanost dnevnog unosa soli i funkcionalnih biljega o endotelu ovisne makrovaskularne i mikrovaskularne reaktivnosti u zdravih trudnica.....	51
Slika 5.7. Povezanost dnevnog unosa soli i reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) te TBARS-a i endotelne vazodilatacije periferne mikrocirkulacije posredovane dušikovim oksidom (NO) .....	52
Slika 5.8. Aktivnost renina u plazmi (PRA) i serumaska koncentracija aldosterona u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....	53
Slika 5.9. Serumaska koncentracija topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljličnog čimbenika rasta (PlGF) te omjer sFlt-1/PlGF u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....	55

Slika 5.10. Koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.....56

## 1. UVOD

### 1.1. Prekomjieran unos soli, javnozdravstveni problem

Natrij je esencijalni nutrijent potreban za normalnu fiziološku funkciju organizma, prijeko potreban za očuvanje ravnoteže tjelesnih tekućina, acidobaznog statusa, prijenos živčanih impulsa i normalne stanične funkcije. Ukupni natrij u tijelu strogo je reguliran međudjelovanjem višestrukih fizioloških mehanizama koje izvanstaničnu koncentraciju natrija održavaju unutar uskog raspona. Unos soli (natrijev klorid) predstavlja glavni izvor natrija za organizam, a unos natrija putem soli čini gotovo 95 % dnevnog unosa, pri čemu se velika većina (> 85 %) izlučuje putem bubrega. U proteklih nekoliko desetljeća dnevnom unosu soli posvećena je posebna pažnja kao potencijalnom rizičnom čimbeniku za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Prekomjerni unos soli danas se smatra globalnim javnozdravstvenim problemom jer ima nepovoljan utjecaj na zdravlje. Postoji pozitivna povezanost između povećanog unosa soli i arterijskog tlaka. Budući da je arterijska hipertenzija na globalnoj razini vodeći rizični čimbenik za KVB, smanjenje unosa soli u populaciji pokazalo se kao jednom od najisplativijih intervencija za prevenciju KVB-a. Osim povezanosti s arterijskom hipertenzijom, prekomjieran unos soli važan je rizični čimbenik za razvoj karcinoma želuca, pretilosti, osteoporoze i bubrežnih bolesti (1). Sve veći broj kliničkih istraživanja pokazuje da prekomjieran unos kuhinjske soli može imati štetan učinak na zdravlje krvnih žila i funkciju endotela, čak i neovisno o promjenama arterijskoga tlaka (2, 3).

Dokazi iz kliničkih studija koji pokazuju da ograničenje unosa soli smanjuje arterijski tlak potaknuli su globalnu akciju za dramatično smanjenje unosa soli u cijeloj populaciji. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) za odrasle preporučuje unos manje od 5 g soli, ekvivalent 2000 mg natrija na dan, što se smatra optimalnim za očuvanje kardiovaskularnog zdravlja (4, 5). Meta-analize randomiziranih kontroliranih studija pokazale su linearno smanjenje kardiovaskularnih bolesti kada se dnevni unos natrija smanji s 4100 mg na 2300 mg, tj. s 10,25 g na 5,75 g soli (6). Na temelju prikupljenih podataka te na ponovljenim, neovisnim znanstvenim pregledima provedenim u više institucija, uključujući Nacionalnu akademiju znanosti, inženjerstva i medicine (NASEM) Sjedinjenih Američkih Država, utvrđena je razina unosa natrija za smanjenje rizika od kroničnih bolesti (engl. *Chronic Disease Risk Reduction (CDRR)*) za odrasle od 19 godina i starije, te je postavljena na 2300 mg dnevno. Dakle, referentni unos natrija (DRI)

trebao bi se postaviti na ili ispod CDRR-a jer se očekuje da će unos iznad 2300 mg dnevno povećati rizik pojave kardiovaskularnih bolesti.

Unatoč javnozdravstvenim kampanjama, razlike između stvarnog i preporučenog unosa soli učestale su, a istraživanja pokazuju da je u svijetu, za odrasle, prosječan dnevni unos soli 10,78 g dnevno, ekvivalent 4310 mg natrija, što je dvostruko u odnosu na navedene preporuke (1, 7–10). Rezultati istraživanja provedenih u Hrvatskoj odgovaraju rezultatima globalno provedenih studija; prosječan dnevni unos soli u Hrvatskoj 2008. godine bio je 11,6 g soli (4640 mg natrija) (11), a javnozdravstveni naponi rezultirali su sniženjem dnevnog unosa soli za 1,6 g u proteklih 12 godina te je prema rezultatima iz 2019. godine unos soli u Hrvatskoj smanjen na 10,0 g dnevno (12), što jasno ukazuje na potrebu za daljnjim naporima da se dnevni unos soli u Hrvatskoj spusti bliže preporučenoj razini.

Molekularni mehanizmi putem kojih sol izaziva promjene koje dovode do hipertenzije nisu još u potpunosti razjašnjeni. Nadalje, sposobnost soli da mijenja krvni tlak razlikuje se među pojedincima i naziva se osjetljivošću na sol.

## 1.2. Endotel i endotelna funkcija

Ključnu ulogu u održanju vaskularnog tonusa i urednoj vaskularnoj funkciji ima vaskularni endotel, tanak sloj stanica koje oblažu unutrašnjost krvožilnog sustava. Endotel predstavlja barijeru između krvi i tkiva te posjeduje endokrinu funkciju, kontrolira vaskularni tonus, inhibira agregaciju trombocita, utječe na migraciju leukocita i proliferaciju glatkih mišićnih stanica (13, 14). Pojam endotelne funkcije uvriježeno označava sposobnost endotela da se dilatira normalno te tako regulira vaskularni tonus i protok krvi. Endotelne stanice kontroliraju vaskularni tonus, a time i protok krvi, sintetizirajući i otpuštajući vazoaktivne čimbenike, vazodilatacijske i vazokonstriksijske, među njima dušikov oksid (engl. *nitric oxide*, NO), metabolite arahidonske kiseline preko puteva ciklooksigenaze (COX-1, -2) kao što je prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), tromboksan (TXA<sub>2</sub>) i prostaglandin F<sub>2</sub>alfa (PGF<sub>2</sub>α), tzv. endotelne čimbenike hiperpolarizacije (engl. *endothelium derived hyperpolarizing factors*, EDHF) kao što su metaboliti puta citokroma P450 (CYP450), vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i ciklički adenzin monofosfat (cAMP), reaktivne vrste



kisika (ROS) i tako dalje. Dodatno, endotelni ektoenzimi potrebni su u stvaranju vazoaktivnih hormona kao što je angiotenzin II (15).

Proizvodnja NO-a u endotelnim stanicama smatra se najvažnijim vazodilatacijskim mehanizmom odgovornim za očuvanje pravilne vazomotorne funkcije (16). Slobodni radikal NO jest topljivi plin koji se kontinuirano sintetizira iz aminokiseline L-arginina u endotelnim stanicama pomoću konstitutivnog enzima sintaze dušikova oksida (NOS) ovisnog o kalciju i kalmodulinu. Ta tvar ima širok raspon bioloških svojstava koja održavaju vaskularnu homeostazu, uključujući modulaciju tonusa vaskularne dilatacije, regulaciju lokalnog rasta stanica i zaštitu krvnih žila od štetnog djelovanja trombocita i stanica koje cirkuliraju u krvi, igrajući tako ključnu ulogu u normalnoj funkciji endotela (17). NO se sintetizira pomoću tri različite izoforme enzima NOS-a, koje se nazivaju endotelni NOS (eNOS), neuronski NOS (nNOS) i inducibilni NOS (iNOS) (18). Prevladavajuća izoforma NOS-a u vaskulaturi, eNOS, odgovoran je za većinu NO-a proizvedenog u tom tkivu. Vaskularni NO dilatira sve vrste krvnih žila stimulirajući topivu gvanilil ciklazu i povećavajući ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) u stanicama glatkih mišića. NO koji se oslobađa prema vaskularnom lumeni snažan je inhibitor agregacije i adhezije trombocita te može inhibirati adheziju leukocita na stijenku krvnih žila (19). Sve veći broj stanja, uključujući ona koja se obično smatraju rizičnim čimbenicima za razvoj ateroskleroze, kao što su arterijska hipertenzija, hiperkolesterolemija, pušenje, dijabetes i zatajenje srca, povezan je sa smanjenom biodostupnošću NO-a u vaskularnoj stijenci, bilo zbog oslabljene sinteze ili prekomjerne oksidativne razgradnje (17). Danas se smanjenje biodostupnosti NO-a smatra središnjim mehanizmom u patogenezi endotelne disfunkcije.

### **1.3. Endotelna disfunkcija**

Endotelna disfunkcija predstavlja stanje poremećene funkcije endotela koje je ključno u patogenezi kardiovaskularnih poremećaja, a očituje se poremećajem vaskularnog tonusa i oksidativne ravnoteže te pojačanim upalnim reakcijama unutar stijenke krvnih žila (20, 21).

Funkcionalna značajka endotelne disfunkcije, poremećena vazodilatacija ovisna o endotelu, posljedica je smanjene biorasploživosti vazodilatatora, posebice NO-a, a povećane dostupnosti čimbenika kontrakcije koji potječu iz endotela. S druge strane endotelna disfunkcija, osim što

označava poremećenu vazodilataciju ovisnu o endotelu, također uključuje specifično stanje „endotelne aktivacije“, koje se očituje proupalnim, proliferativnim i prokoagulacijskim miljeom koji pogoduje razvoju KVB-a. Endotelna disfunkcija povezana je s većinom rizičnih čimbenika odgovornih za razvoj brojnih kardiovaskularnih poremećaja, uključujući dijabetes, hipertenziju, aterosklerozu, starenje i zatajenje srca (22). Mnogi od tih rizičnih čimbenika, uključujući hiperlipidemiju, hipertenziju, dijabetes i pušenje, povezani su s prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta ili povećanim oksidativnim stresom (23, 24). Reagirajući s NO-om, reaktivne kisikove vrste mogu smanjiti vaskularnu bioraspodjeljivost NO-a i potaknuti oštećenje stanica. Stoga, povećani oksidativni stres smatra se glavnim mehanizmom uključenim u patogenezu endotelne disfunkcije i može poslužiti kao zajednički patogeni mehanizam učinka rizičnih čimbenika na endotel (20).

#### **1.4. Metode procjene funkcije endotela**

Danas su dostupni raznovrsni biljezi koji se koriste za procjenu funkcije endotela: biokemijski, strukturalni i funkcijski. Najčešće korišteni biokemijski biljezi za procjenu endotelne funkcije jesu NO i njegovi metaboliti, drugi vazodilatacijski i vazokonstriksijski metaboliti porijeklom iz endotela (prostaglandini, tromboksan, endotelin 1), endotelne adhezijske molekule, citokini, C-reaktivni protein, biljezi oksidativnog stresa, asimetrični dimetilarginin (ADMA), endokan, endoglin, mijeloperoksidaza (MPO), matriks metaloproteinaze itd. (25).

Za strukturalnu procjenu endotelne funkcije najčešće se koristi ultrazvučno mjerenje debljine intima-medija karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*, CIMT), te određivanje brzine pulsnog vala (engl. *pulse wave velocity*, PWV) između karotidne i radijalne ili karotidne i femoralne arterije (25). PWV je jednostavna, neinvazivna i reproducibilna metoda koja se koristi kao referentna tehnika za procjenu krutosti aorte te ima prediktivnu vrijednost za buduće kardiovaskularne događaje.

Danas je dostupan niz metodoloških pristupa za procjenu i mjerenje (pato)fiziološke funkcije endotela, a neke od metoda našle su svoje mjesto i u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Različite funkcionalne metode pružaju uvid u vaskularnu/endotelnu funkciju različitih vaskularnih slivova te krvnih žila različitog kalibra (provodne krvne žile, mikrocirkulacija).

U funkcijskoj procjeni endotela velikih krvnih žila najčešće se koristi protokom posredovana vazodilatacija (engl. *flow-mediated dilation*, FMD) brahijalne arterije, koja danas predstavlja neinvazivni zlatni standard za procjenu makrovaskularne funkcije endotela i predviđanje budućih kardiovaskularnih događaja. Ta metoda pruža bitne informacije o sposobnosti endotela da odgovori na određeni podražaj (reaktivna hiperemija). Metoda uključuje ultrazvučno snimanje arterija u dva stanja, u mirovanju (osnovno) i tijekom reaktivne hiperemije nakon 5 minuta arterijske okluzije, a FMD se izražava kao % promjene između tih dvaju izmjerenih promjera. Točan mehanizam posredovanja FMD-a tijekom reaktivne hiperemije nije u potpunosti razjašnjen; smatra se da je upravo endotelni NO glavni medijator u dilataciji žile induciranoj vaskularnim protokom, ali kojoj mogu pridonijeti i drugi vazodilatatori porijeklom iz endotela. Istraživanja su pokazala da funkcija perifernog endotela procijenjena FMD-om brahijalne arterije korelira s vaskularnom funkcijom koronarnih arterija (26). Osim toga pokazano je da je smanjen/oštećen FMD brahijalne arterije jedna od najranijih manifestacija kardiovaskularnih bolesti te je važan pokazatelj razvoja endotelne disfunkcije (27).

Za procjenu mikrovaskularne endotelne funkcije najčešće se koristi metoda mjerenja protoka tehnikom laser-dopplerske floumetrije (engl. *laser Doppler flowmetry*, LDF) kože u odgovoru na različite podražaje: vaskularnu okluziju, iontoforezu acetilkolina, i lokalno zagrijavanje (25,28). Laser-dopplerska floumetrija temelji se na procjeni veličine protoka u mikrocirkulaciji kože pomoću refleksije laserske zrake od eritrocita u mikrocirkulaciji i promjene njegove valne duljine (Dopplerov efekt) (29). Računalni program određuje veličinu protoka koji predstavlja indeks perfuzije kože (fluks), a rezultati se obično izražavaju u proizvoljnim jedinicama (perfuzijske jedinice, PU). Post-okluzivna reaktivna hiperemija (PORH) odnosi se na povećanje (mikro)vaskularnog protoka krvi uslijed prolazne kratkotrajne vaskularne okluzije, a predstavlja test koji se često koristi za procjenu mikrovaskularne reaktivnosti ovisne o endotelu. Iontoforeza je metoda za neinvazivno transdermalno davanje nabijenih molekula pomoću električne struje niske jakosti. Iontoforeza acetilkolina (ACh) i natrijevog nitroprusida (SNP) uobičajeno se koriste za procjenu vazodilatacije mikrocirkulacije kože ovisne o endotelu i neovisne o endotelu (30). Što se tiče dilatacije ovisne o endotelu, studije su pokazale da je dilatacija izazvana ACh-om pretežno posredovana metabolitima ciklooksigenaze (iako su rezultati još uvijek proturječni) (31, 32), dok NO samo dijelom doprinosi toj dilataciji (33). Lokalna toplinska hiperemija (LTH) predstavlja mikrovaskularni odgovor kože na lokalno zagrijavanje, a koji je dominantno posredovan

endotelnim NO-om. Naime LTH se odlikuje početnim povećanjem protoka (unutar prvih 5 minuta) koji ovisi o osjetnim živcima te postojanim vazodilacijskim platoon (otprilike 30 minuta nakon početka zagrijavanja) koji uglavnom ovisi o endotelnom NO-u (34).

### 1.5. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (RAAS) hormonski je sustav koji regulira arterijski tlak, ravnotežu tekućine i elektrolita te sistemski vaskularni otpor. Klasično, RAAS se sastoji od angiotenzinogena (AGT), renina, angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE), angiotenzina, i dva receptora za angiotenzin (AT1 i AT2 receptora). Danas je poznato da RAAS čine i druge komponente, od kojih se najznačajnijima čine angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) i angiotenzin (1-7) (Ang-(1-7)) (35). Uz „cirkulirajući RAAS“, komponente RAAS-a sintetiziraju se i u drugim tkivima – mozgu, srcu, jajniku, posteljici („tkivni RAAS“).

Enzim renin sintetiziraju i oslobađaju jukstaglomerularne stanice aferentnih bubrežnih arteriola kao odgovor na nizak arterijski tlak i nizak cirkulirajući natrijev klorid. Oslobođanje renina djelomično je posredovano prostaglandinima koje proizvode stanice macule dense bubrega (36). Renin enzimatski pretvara AGT, koji se stvara u jetri, u angiotenzin I (ANG I) koji nije biološki aktivan te se pod utjecajem angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE), proizvedenog u endotelu pluća, cijepa u biološki aktivnu molekulu angiotenzin II (ANG II). Daljnjom pretvorbom ANG II, pod utjecajem ACE2, stvara se Ang-(1-7).

ANG II svoj učinak ostvaruje uz pomoć dvije glavne vrste receptora: ANG II tip 1 receptor (AT1R) i ANG II tip 2 receptor (AT2R), a svoje klasične učinke izaziva vezanjem na AT1R. Interakcije između ANG II i AT1R-a stimuliraju vazokonstrikciju, aktivaciju simpatičkog živčanog sustava i stimulaciju otpuštanja aldosterona iz kore nadbubrežne žlijezde, zadržavanje natrija te podizanje arterijskog tlak (37). Jedna od najznačajnijih posljedica aktivacije AT1R-a, posebice na kardiovaskularni sustav, jest proizvodnja i otpuštanje reaktivnih kisikovih spojeva, te su učinci viška ANG II i pojačane aktivacije AT1R-a povezani s upalom, fibrozom i endotelnom disfunkcijom (38). ANG II se može vezati i za AT2R te izazvati učinke suprotne ANG II/AT1R putu; vazodilataciju, inhibiciju staničnog rasta, poticanje apoptoze, (39). Ang-(1-7) vezanjem na Mas receptor (MasR) ostvaruje vazodilacijski i ostale učinke suprotne učincima ANG II/AT1R

puta (40,41). Smatra se da ACE2 ima ulogu balansiranja vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih učinaka RAAS-a (41) te važnu ulogu u prevenciji ateroskleroze zbog protektivne uloge Ang-(1-7)/MasR puta na kardiovaskularni sustav (35, 42).

### 1.6. Unos soli i endotel

Sve veći broj opservacijskih i intervencijskih kliničkih studija ukazuje na činjenicu da prekomjerman unos soli utječe na vaskularnu endotelnu funkciju i neovisno o promjenama arterijskoga tlaka (43). Pionirska studija u tom području jest 30-godišnja prospektivna studija Weinbergera i suradnika koja je pokazala da su osobe osjetljive na sol (engl. *Salt sensitive*), koje nisu razvile hipertenziju, imale višu stopu smrtnosti u usporedbi s pojedincima koji su bili neosjetljivi na sol (engl. *Salt resistant*) (44).

Otada, velik je broj studija na eksperimentalnim animalnim modelima, ali i zdravim ljudima pokazao da prekomjerman unos soli može oslabiti vaskularnu endotelnu funkciju na razini mikrocirkulacije i makrocirkulacije, potencijalno supresijom aktivnosti RAAS-a, povećanom razinom oksidativnog stresa i aktivacijom endotela, koja rezultira endotelno-leukocitnom interakcijom te modulacijom upalnog odgovora u inače zdravih ljudi (43). Studije su opetovano pokazale da 7-dnevna dijeta s velikim udjelom soli inhibira aktivnost RAAS-a (fiziološki očekivani odgovor) i smanjuje perifernu mikrovaskularnu reaktivnost utječući na o endotelu ovisnu (dilatacija izazvana acetilkolinom, AChID), ali ne i na o endotelu neovisnu vazodilataciju (dilatacija izazvana natrijevim nitroprusidom, SNPID) kod mladih zdravih osoba. Pokazane promjene dogodile su se neovisno o promjeni arterijskog tlaka, te promjenama sastava tijela ili zadržavanju tekućine, već su bile posljedice jedinstvenog učinka prekomjernog unosa soli na endotelnu funkciju (45–47).

Jedan od temeljnih mehanizma koji posreduje te promjene uključuje proizvodnju vazokonstriksijskih metabolita porijeklom iz endotela (npr. metaboliti arahidonske kiseline proizvedeni putem ciklooksigenaze). Tako je primjerice pokazano da čak i kratkotrajna izloženost dijete s velikim udjelom soli izaziva povećanje serumske koncentracije tromboksana (TXA<sub>2</sub>), vazokonstriktora koji potječe od enzima ciklooksigenaze (COX-1 i -2), ali također da promjena u

koncentraciji drugih vazokonstriktorskih metabolita enzima ciklooksigenaze (osobito COX-1) može imati važnu ulogu u razvoju mikrovaskularne disfunkcije u zdravih osoba (46).

Osim povećane proizvodnje ili osjetljivosti na vazokonstriktorske metabolite porijeklom iz endotela, smanjena bioraspoloživost glavnog endotelno-čimbenika vazodilatacije, NO-a, ima ključnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije uslijed prekomjernog unosa soli. Nadalje je pokazano da je smanjenje bioraspoloživosti NO-a povezano s povišenom razinom oksidativnog stresa ključan patofiziološki korak u razvoju endotelne disfunkcije. Konkretno, povećana razina superoksidnog iona ( $O_2^{\bullet-}$ ) reagira s NO-om i rezultira stvaranjem peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>) (43), i/ili može utjecati na aktivnost enzima koji stvara endotelni NO, tj. eNOS (48). Tako je jedno istraživanje pokazalo da 7 dana dijeta s velikim udjelom soli uzrokuje oštećenje mikrovaskularne reaktivnosti kože podlaktice u odgovoru na lokalno zagrijavanje kože u normotenzivnih odraslih osoba neovisno o promjeni arterijskog tlaka, ali i da lokalna primjena askorbinske kiseline ublažava ili poništava oštećenje mikrovaskularne funkcije (49). Nadalje drugo istraživanje pokazalo je da nakon 7 dana dijeta s velikim udjelom soli vazodilatacija arteriola izoliranih iz glutealnog potkožnog masnog tkiva u odgovoru na acetilkolin (ACh) ili promjene protoka više nije bila posredovana pretežno NO-om, već drugim vazodilatacijskim metabolitima porijeklom iz puta ciklooksigenaza i citokroma P450 (CYP450) (50). Ista je istraživačka skupina pokazala da prekomjeran unos soli u zdravih pojedinaca rezultira smanjenjem antioksidativnog kapaciteta i povećanjem razine oksidativnog stresa te da poboljšanje antioksidativne obrane dodatkom vitamina C i E tijekom visoko-slane dijeta može prevenirati oštećenje mikrovaskularne endotelne funkcije (51). Time je izravno potvrđena važnost oksidativnog stresa u razvoju endotelne funkcije uzrokovane prekomjernim unosom soli u zdravih normotenzivnih pojedinaca. Kratkotrajno opterećenje soli u zdravih pojedinaca ne uzrokuje promjene u biljezima remodeliranja izvanstaničnog matriksa kao što su matriks metaloproteinaze, što ukazuje da se funkcionalne vaskularne promjene, koje se očituju kao oslabljena reaktivnost mikrovaskularnog i makrovaskularnog endotela, javljaju ranije nego potencijalno strukturno preoblikovanje krvnih žila (51).

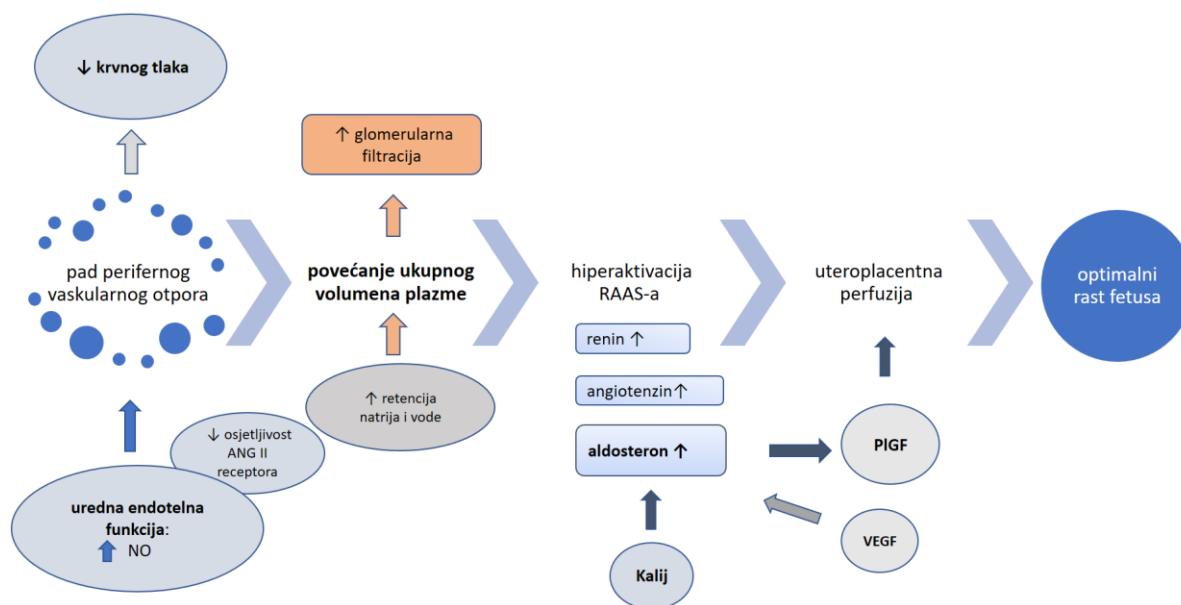
Brojni eksperimentalni dokazi proizašli iz istraživanja na eksperimentalnim životinjama hranjenima hranom s velikim udjelom soli (većinom štakori) ukazuju na to da kronična supresija aktivnosti RAAS-a i posljedično niska razina ANG II (fiziološki odgovor na povećani unos soli) imaju važnu ulogu u povećavaju 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) (52–54). 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 soli bila obnovljena kontinuiranom infuzijom supresorskih doza ANG II. Ipak potencijalni učinak inhibicije RAAS-a u nastanku oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije kao odgovora na velik unos soli u zdravih pojedinaca još uvijek nije dovoljno istražen.

### **1.7. Prilagodbe kardiovaskularnog sustava tijekom trudnoće**

Majčin kardiovaskularni sustav tijekom trudnoće prolazi značajne fiziološke prilagodbe kako bi se zadovoljile povećane metaboličke potrebe majke i fetusa i osigurao optimalan fetalni rast i razvoj (slika 1.1). Neodgovarajuće hemodinamske promjene mogu rezultirati maternalnim ili fetalnim morbiditetom, a izostanak maternalne prilagodbe tim fiziološkim promjenama može razotkriti predležću, do tada nepoznatu, kardiovaskularnu bolest.

Najznačajnije prilagodbe kardiovaskularnog sustava u trudnoći odnose se na smanjenje perifernog vaskularnog otpora i krvnoga tlaka, povećanje volumena plazme i srčanog minutnog volumena te pojačanu aktivnost renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (55–58).



**Slika 1.1. Prilagodbe kardiovaskularnog sustava tijekom trudnoće.** Izvor: izradila autorica rada

### 1.7.1. Pad perifernog vaskularnog otpora

Smanjenje perifernog vaskularnog otpora i sistemska vazodilatacija započinju oko 5. tjedna trudnoće i prethode placenciji i potpunom razvoju uteroplacentne cirkulacije. Tijekom trudnoće periferni vaskularni otpor prosječno je snižen za 35 – 40 % u odnosu na stanje prije trudnoće; značajno je smanjen u prvom tromjesečju trudnoće, na najnižoj je razini tijekom drugog tromjesečja, a u trećem tromjesečju trudnoće zadržava se na platou ili blago raste (58, 59). Pad perifernog vaskularnog otpora u velikoj je mjeri reguliran djelovanjem hormona, osobito estrogena, progesterona i relaksina (60–62), a posredovan je povećanom proizvodnjom vazodilatatora u endotelnim stanicama, dominantno NO-a te prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) i urednom endotelnom funkcijom. Padu perifernog vaskularnog otpora značajno doprinosi smanjen vaskularni odgovor na snažni vazokonstriktor ANG II (58, 61, 63).

### 1.7.2. Pad krvnoga tlaka

Izravna posljedica smanjenja perifernog vaskularnog otpora jest povećanje srčanog minutnog volumena i pad arterijskog tlaka. Pad arterijskog krvnog tlaka, sistoličkog (SBP), dijastoličkog



(DBP) i srednjeg arterijskog krvnog tlaka (MAP) nastupa između 6. i 8. tjedna trudnoće, a najniže razine doseže tijekom drugog tromjesečja trudnoće. Pad vrijednosti DBP-a i MAP-a tijekom trudnoće izraženiji je u odnosu na pad vrijednosti SBP-a (58, 59). Pokazalo se da je smanjeni pad arterijskog tlaka u drugom tromjesečju trudnoće povezan s visokom osjetljivošću na sol (64).

### **1.7.3. Povećanje ukupnog volumena plazme**

Volumen plazme značajno se povećava prvih tjedana nakon začeća i raste progresivno tijekom trudnoće, a prosječno ukupno naraste 45 % u odnosu na razinu prije trudnoće (65, 66). Povećanje ukupnog volumena plazme tijekom trudnoće posljedica je pojačane bubrežne retencije natrija i vode, a ovisi o normalnoj adaptivnoj endotelnoj i vaskularnoj funkciji (63, 67). Ukupni volumen plazme i rast fetusa izravno su povezani te se smanjeni volumen plazme povezuje s preeklampsijom, fetalnim zastojem rasta i drugim patološkim stanjima u trudnoći (68). Uz povećanje volumena plazme, i proizvodnja crvenih krvnih stanica povećana je eritropoezom do 40 %, no volumen plazme povećava se proporcionalno više od mase crvenih krvnih stanica, što rezultira „fiziološkom anemijom“ zbog hemodilucije (58).

Povećanje volumena plazme povezano je s povećanjem bubrežne funkcije tijekom trudnoće; glomerularna filtracija (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) povećana je za 50 – 85 %, a efektivni renalni protok plazme (engl. *effective renal plasma flow*, ERPF) za 40 – 65 % u odnosu na stanje prije trudnoće (60, 61, 69). Pokazano je da je u preeklampsiji bubrežna funkcija smanjena (61,70).

### **1.8. Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav u trudnoći**

Tijekom trudnoće RAAS je ključan čimbenik u regulaciji arterijskog tlaka i održavanju ravnoteže tekućine i elektrolita te osigurava odgovarajući placentni protok nužan za fetalnu oksigenaciju i rast. Pojačana aktivnost RAAS-a javlja se istodobno s povećanjem volumena plazme između 6. i 8. tjedna trudnoće i postupno raste do 30. tjedna. U serumu trudnica povećana je razina svih komponenata RAAS-a kao rezultat aktivacije centralnog RAAS-a potpomognute lokalnom endokrinom sekrecijom tkivnoga RAAS-a iz posteljice, jajnika i decidue (71). Serumaska koncentracija ACE-a tijekom trudnoće nepromijenjena je u odnosu na stanje prije trudnoće i niža

u odnosu na druge komponente RAAS-a, a enzim je dominantno koncentriran u fetalnoj cirkulaciji, poglavito u endotelnim stanicama, gdje je potreban zbog kontinuirane angiogeneze (72).

Tijekom normalne trudnoće RAAS se aktivira povećanjem proizvodnje estrogena i padom sistemskog vaskularnog otpora uzrokovanim otpuštanjem relaksina iz jajnika; raste proizvodnja renina u maternalnom bubregu i posteljici te AGT u maternalnoj i fetalnoj jetri (41,73). Povećana proizvodnja AGT-a i plazma reninske aktivnosti (PRA) za posljedicu imaju povećanje koncentracije ANG I i povećanu proizvodnju ANG II koja uslijedi unatoč smanjenoj serumskoj aktivnosti ACE-a (74,75). U maternalnoj cirkulaciji prisutan je enzim kimaza, serinska proteaza slična kimotripsinu, porijekla viloznog sinciotrofoblasta, koja stvara ANG II iz ANG I. U velikim količinama nalazi se u mastocitima, koži, srcu i arterijama te u najvećoj mjeri doprinosi proizvodnji ANG II u navedenim tkivima (74).

Povećanje koncentracije estrogena tijekom trudnoće izravno utječe na pojačanu ekspresiju ACE2, što za posljedicu ima povećanu maternalnu plazmatsku koncentraciju Ang-(1-7). Navedena stimulacija ACE2/Ang-(1-7) puta tijekom trudnoće nužna je kako bi se pružila ravnoteža povećanoj aktivnosti ACE/ANG II puta te doprinosi hemodinamskim prilagodbama majke i placentaciji (75). Smatra se da je ACE2-om posredovana pretvorba ANG II u Ang-(1-7) jedan od ključnih čimbenika koji reguliraju fiziološke učinke ANG II tijekom trudnoće (76).

Visoke razine cirkulirajućeg ANG II doprinose placentaciji svojim učinkom na invaziju trofoblasta i remodeliranje spiralnih arterija (77), no unatoč visokim koncentracijama u serumu, normotenzivne trudnice gotovo su neosjetljive na njegov vazokonstriksijski učinak; pretpostavlja se zbog visoke koncentracije progesterona i prostaciklina koji mogu umanjiti osjetljivost na ANG II (78–80). Nadalje smanjenoj vaskularnoj osjetljivosti na ANG II doprinosi inaktivacija AT1R posredovana reaktivnim kisikovim spojevima (81). Uloga AT2R u trudnoći nije rasvijetljena, poznato je da je visoko eksprimiran u fetalnom bubregu, a njegova ekspresija smanjuje se tijekom neonatalnog razdoblja. U odraslom bubregu AT2 je mnogo manje zastupljen od AT1 (71).

Povećana proizvodnja aldosterona izravno stimulira bubrežnu retenciju vode i natrija kako bi se povećao volumen plazme. U mnogim se tkivima aldosteron ponaša kao čimbenik rasta, tako i u trudnoći te, osim izravnim utjecajem na volumen plazme, pogoduje optimalnom razvoju posteljice i fetusa stimulirajući proangiogene čimbenike, vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i posteljični čimbenik rasta (engl. *placental growth factor*, PlGF)

(82, 83). Koncentracija aldosterona u plazmi proporcionalna je s porođajnom masom djeteta i masom posteljice, dok je urinarni aldosteron identificiran kao neovisan prediktor porođajne mase i mase posteljice (84, 85).

Tijekom trudnoće koncentracija aldosterona progresivno raste i korelira s koncentracijom estrogena, a porast njegove koncentracije tijekom trudnoće značajno je viši od porasta koncentracije renina zbog dodatnog, snažnog utjecaja vanjskih čimbenika na njegovu sintezu; VEGF na proizvodnju aldosterona ima snažniji utjecaj od ANG II, a izravni učinak na njegovu sintezu u nadbubrežnoj žlijezdi ima i kalij ( $K^+$ ) (82, 86). Istodobno, progesteron inhibira kaliurezu, osiguravajući konstantnu serumsku razinu kalija tijekom trudnoće (87).

Poznato je da žene koje razviju preeklampsiju, hipertenzivni poremećaj trudnoće, imaju smanjen ukupni volumen plazme, snižene razine svih komponenata RAAS-a te smanjenu glomerularnu filtraciju (65, 88). U odnosu na normotenzivne trudnice, kod njih je snižena plazma reninska aktivnost, koncentracija angiotenzina, aldosterona i Ang-(1-7), dok je koncentracija ACE-a i kimaze u serumu trudnica s preeklampsijom povišena (41, 89). Fetalni zastoj rasta, glavno obilježje insuficijencije posteljice, povezan je s povišenom koncentracijom ACE-a u serumu i ANG II u krvi pupkovine (90). Nadalje kod trudnica s preeklampsijom *up*-reguliran je AT1R te su u serumu prisutna autoantitijela usmjerena na AT1R (AT1-AA). Navedena autoantitijela usmjerena su protiv endotelnih stanica i uzrokuju aktivaciju endotela s posljedičnom vazokonstrikcijom, hipertenzijom i povećanom koagulacijom (91–93). AT1-AA se kod žena koje poslije razviju preeklampsiju mogu pojaviti puno prije pojave kliničkih znakova bolesti. U prisustvu kliničkih znakova preeklampsije > 95 % žena ima navedena antitijela, a njihova koncentracija korelira s težinom bolesti (94). U preeklampsiji AT1R pokazuju rezistenciju na inaktivaciju ROS-om, koja je prisutna u normalnoj trudnoći, stoga receptori ostaju aktivni i ispoljavaju pretjeran odgovor na ANG II (78, 81).

Nedvojbeno je da RAAS ima značajnu ulogu u preeklampsiji, no s obzirom na kompleksnu i nedovoljno rasvijetljenu etiologiju preeklampsije, prema današnjim spoznajama, i dalje ostaje nepoznato je li disregulacija RAAS-a preduvjet za razvoj preeklampsije ili posljedica stanja.

### 1.9. Angiogeni čimbenici posteljice

U ranom embrionalnom razvoju trofoblast invadira uterine spiralne arterije decidue i miometrija, čime fetalne stanice zamjenjuju endotelni sloj spiralnih arterija, pretvarajući ih u žile velikog kapaciteta koje dopuštaju povećanje protoka krvi u maternici. Stvaranje novih krvnih žila, angiogeneza, regulirana je glikoproteinima iz obitelji čimbenika rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF): VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i posteljični čimbenik rasta (engl. *placental growth factor*, PlGF). VEGF aktivira angiogenezu vezanjem na receptore VEGF-1 (fms-u slična tirozin kinaza; engl. *fms-like-tyrosine kinase*, Flt-1) i VEGFR-2 (kinazni insercijski receptor domene, KDR) (95). U užem smislu, kada se govori o VEGF-u, najčešće se to odnosi na VEGF-A koji vezanjem za VEGF-1 receptor (fms-u slična tirozin kinaza 1, Flt-1) i VEGFR-2 receptor (kinazni insercijski receptor domene, KDR) potiče angiogenezu, vaskularnu propusnost, migraciju stanica i ekspresiju gena te doprinosi vaskularnoj homeostazi stimulacijom vaskularnih endotelnih stanica (96). Ključne molekule koje reguliraju rane posteljične vaskularne promjene jesu VEGF-A i PlGF, a učinak ostvaruju djelovanjem na Flt-1 i KDR (97). Uz navedene receptore, u posteljici je izražena spojena varijanta Flt-1, topljivi Flt-1 (engl. *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1)), koji posjeduje antiangiogeni učinak (98). Vežanjem VEGF-a i PlGF-a na sFlt-1 antagonizira se njihov učinak, što za posljedicu ima vazokonstrikciju i endotelnu disfunkciju (98, 99).

Angiogeneza je stimulirana hipoksijom koja pojačava ekspresiju nekoliko gena, uključujući VEGF i sintazu dušikovog oksida (NOS), a stvaranje novih krvnih žila tijekom trudnoće pod snažnim je utjecajem hormona, među ostalim estrogena, progesterona, (posteljičnog) hormona rasta te svih komponenata RAAS-a (100). Aldosteron, stimulirajući ekspresiju proangiogenih čimbenika VEGF-a i PlGF-a, u velikoj mjeri doprinosi optimalnom razvoju posteljice i fetusa (101).

Slično rastu tumora, za proces razvoja posteljice potrebna je ravnoteža proangiogenih i antiangiogenih čimbenika, prvenstveno PlGF-a i sFlt-1, a disbalans njihovih serumskih koncentracija tijekom trudnoće povezan je s manjkavom posteljičnom angiogenezom, neodgovarajućim preoblikovanjem majčinih spiralnih arterija i nedovoljnom perfuzijom posteljice, što je dio patofizioloških mehanizama različitih sindroma i bolesti, među ostalima preeklampsije, fetalnog zastoja rasta, masivnog periviloznog taloženja fibrina, pa čak i fetalne smrti (102, 103).

Molekularno obilježje preeklampsije, koju odlikuje generalizirana endotelna disfunkcija u usporedbi s normalnim trudnoćama jest smanjena plazmatska koncentracija angiogenih čimbenika, slobodnog VEGF-a i PlGF-a, zajedno s povećanjem cirkulirajućih razina antiangiogenih markera, sFlt-1 i topljivog endoglina (sEng) koji se u maternalnoj cirkulaciji mogu naći tjednima prije pojave kliničkih simptoma bolesti (104). Smanjena razina VEGF-a i PlGF-a za posljedicu ima nepravilno remodeliranje spiralnih arterija. Čimbenici koji reguliraju ekspresiju sFlt-1 nisu do kraja rasvijetljeni, no do sada je pokazano da utjecaj imaju hipoksija, oksidativni stres i inflamacija. Smatra se da ključnu ulogu u razvoju ED-a u preeklampsiji ima oksidativni stres poticanjem povećane produkcije cirkulirajućih antiangiogenih čimbenika, što u kombinaciji s poremećenom signalizacijom i sniženom serumskom koncentracijom VEGF-a i PlGF-a, koji stimuliraju angiogenezu u uvjetima hipoksije i inflamacije, uzrokuje disbalans proangiogenih i antiangiogenih posteljinih čimbenika (99).

#### **1.10. Endotelna funkcija u trudnoći**

Uredna endotelna funkcija neophodna je u trudnoći kako bi se osigurao pad vaskularnog otpora u svrhu prilagodbe kardiovaskularnog sustava trudnice. Pad vaskularnog otpora javlja se u cijelom tijelu, no do njegovog izrazitog pada dolazi u uterinim arterijama, što omogućuje dopremu većeg dijela minutnog volumena srca u uteroplacentnu jedinicu, prema fetusu. Smatra se da je protok krvi u maternici tijekom trudnoće od 30 do 50 puta veći u usporedbi sa stanjem izvan trudnoće (105, 106). Pad vaskularnog otpora velikim se dijelom odnosi na remodeliranje spiralnih arterija, no padu značajno doprinose i distribucijske žile povećanjem promjera te promjenama u tonusu i povećanim vazodilatacijskim kapacitetom. Mehanizmi nužni za navedene prilagodbe nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da su posljedica povećane dostupnosti i vaskularne osjetljivosti na NO, relaksirajućeg čimbenika podrijetla endotela i smanjenog vaskularnog odgovora na konstriktore ANG II i noradrenalin (107).

Angiogeneza uterinih arterija odvija se primarno u prvom dijelu trudnoće; do trećeg tromjesečja arhitektura krvnih žila maternice razvijena je i svako daljnje povećanje protoka krvi ovisi o vazodilataciji postojećih krvnih žila (108), stoga je povećana proizvodnja vazodilatatora u endotelnim stanicama nužna za održavanje zdrave trudnoće. U vaskularnim prilagodbama značajno sudjeluju hormoni progesteron i estrogen koji stimuliraju proizvodnju NO-a, a njihove se

koncentracije u serumu tijekom trudnoće kontinuirano povećavaju (105, 109, 110). Uobičajeni mehanizam aktivacije većine vazodilatatora je povećanje koncentracije unutarstaničnog kalcija (108).

Slobodni radikal NO, endogeni opuštajući čimbenik iz endotela, smatra se najznačajnijim vazodilatacijskim čimbenikom u trudnoći. Proizvodnja NO-a u endotelu je katalizirana enzimom endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS) za proizvodnju iz L-arginina. Uloga NO-a u regulaciji vaskularnog tonusa je da, kao topljivi plin koji difundira od endotela do glatkih mišića krvnih žila, potiče proizvodnju cGMP-a, što u konačnici rezultira opuštanjem glatkih mišića. Koncentracija NO-a raste s gestacijskom dobi, što potvrđuje njegovu važnu ulogu u kardiovaskularnim promjenama normalne trudnoće (111). VEGF je jedan od čimbenika koji stimuliraju eNOS te tim putem doprinosi placentalnoj cirkulaciji, gdje endotelno otpuštanje NO-a širi fetoplacentni vaskularni sloj, osiguravajući feto-maternalnu razmjenu (112, 113). Optimalno VEGF signaliziranje neophodno je za urednu endotelnu funkciju i svako odstupanje od toga, povećanje ili smanjenje slobodnog VEGF-a može uzrokovati promjene u endotelnoj funkciji.

Prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ) je snažan vazodilatator porijekla endotela, dobiven metabolizmom arahidonske kiseline posredovanim enzimom COX-1. Utjecaj prostaciklina na vaskularni tonus mjeri se omjerom tromboksana i prostaciklina ( $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ );  $\text{TXA}_2$  djeluje kao vazokonstriktor na vaskularni glatki mišić, dok  $\text{PGI}_2$  djeluje kao vazodilatator. I  $\text{TXA}_2$  i  $\text{PGI}_2$  imaju vrlo kratak poluživot, a s obzirom na to da je učinak  $\text{PGI}_2$  usko povezan s metabolitima  $\text{TXA}_2$ , oba se moraju istodobno mjeriti i usporediti u svrhu procjene učinka  $\text{PGI}_2$  na tonus glatkih mišića (108).  $\text{PGI}_2$  igra važnu ulogu u odgovoru vazodilatatora tijekom trudnoće, a razine metabolita  $\text{PGI}_2$  u trudnoći povišene su u odnosu na stanje izvan trudnoće. Nadalje tijekom trudnoće pojačana je regulacija enzima ciklooksigenaze (pretežno COX-1 u endotelnim stanicama), čime se povećava kapacitet za proizvodnju  $\text{PGI}_2$  (114).

EDHF, hiperpolarizirajući čimbenik porijekla endotela, smatra se trećim glavnim vazodilatatorom porijekla endotelnih stanica u trudnoći. EDHF nije jedan čimbenik, već spektar odgovora koji inače nisu posredovani ni NO-om ni  $\text{PGI}_2$ , ali ipak rezultiraju opuštanjem glatkih mišića (115). Do danas je definiran veliki broj EDHF-a, uključujući kalijev ion, metabolite citokroma P450 (CYP450) kao što su epoksieikozatrienska kiselina (EETs) i lipoksigenaza, vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ciklički adenzin monofosfat (cAMP) itd. (116).

U pozadini opsežnog preoblikovanja uteroplacentne vaskulature tijekom trudnoće nalaze se brojne endokrine promjene. Estrogen i progesteron imaju značajne učinke na majčinu vaskulaturu, posebno na uterine arterije. S promjenom serumskih koncentracija tih hormona tijekom trudnoće, mijenjaju se i njihovi učinci na krvožilnu funkciju majke.

Estrogen, najznačajniji hormonski regulator vaskularnog tonusa tijekom trudnoće, ima niz važnih učinaka na vaskularne prilagodbe; tijekom decidualizacije pomaže u angiogenezi na mjestu implantacije, a u kasnijoj fazi trudnoće potiče gotovo isključivo vazodilataciju, stimulirajući proizvodnju vazodilatatora. Regulacijom estrogenskog receptora, ER $\alpha$  i ER $\beta$ , estrogen izravno promiče ekspresiju eNOS-a i COX-1 u endotelnim stanicama, pa tako i proizvodnju NO-a i PGI $_2$  i vazodilatacijski kapacitet (117). Nadalje estrogen pospješuje proizvodnju VEGF-a u endotelnim stanicama i tako dodatno potiče proizvodnju NO-a i, neizravno, vaskularno remodeliranje (118). Napredovanjem trudnoće nužno je da se estrogensko poticanje angiogeneze pretvori u poticanje vazodilatacije jer napredovanjem trudnoće fetus i posteljica svojim povećanim zahtjevima izazivaju veliki porast uteroplacentnog protoka te je nužna značajna vazodilatacija u svrhu zadovoljenja njihovih rastućih potreba. Razine estrogena značajno rastu sredinom trudnoće (109). Odmicanjem trudnoće daljnje povećanje proizvodnje NO-a sve je više povezano s promjenama u signalizaciji unutarstaničnog kalcija neovisnima o estrogenu (119).

Razine progesterona rastu tijekom trudnoće, a pred kraj trudnoće naglo se prekida proizvodnja progesterona kako bi uslijedio porođaj (109). Progesteron pospješuje proizvodnju vazodilatatora stimulacijom eNOS-a, a time i proizvodnjom NO, kao i povećanom ekspresijom aktivnosti COX-1, koja regulira proizvodnju PGI $_2$  (120).

Tijekom trudnoće endotelna funkcija iscrpno je proučavana u HPT-u i fetalnom zastoju rasta, sindromima insuficijencije posteljice izazvanima patološkom prilagodbom posteljice i/ili majčinom vaskularnom ranjivošću, karakteriziranim endotelnom disfunkcijom. Povećani vaskularni otpor vidljiv tijekom HPT-a i fetalnog zastoja rasta povezan je sa smanjenom proizvodnjom NO-a ili smanjenim odgovorom na NO u glatkim vaskularnim mišićima, što ukazuje na temeljni endotelni problem (121). Poremećena endotelna funkcija posljedica je proizvodnje upalnih i citotoksičnih čimbenika od strane ishemične posteljice i rezultira sustavnim oksidativnim stresom i promijenjenom bioraspoloživošću NO-a te je odgovorna za promijenjenu vaskularnu reaktivnost, aktivaciju koagulacijske kaskade i gubitak vaskularnog integriteta (107, 121).

Dobro je poznata patogeneza generalizirane endotelne disfunkcije u preeklampsiji podijeljena u dvije faze. Prva je faza slaba invazija trofoblasta u spiralne arterije tijekom procesa placentacije, što uzrokuje neuspjeh u transformaciji arterija posteljice iz žila visokog otpora u žile niskog otpora i rezultira lokalnom ishemijom, reperfuzijskim oštećenjem i oksidativnim stresom. Lokalno oštećenje aktivira drugu fazu u kojoj poremećena proizvodnja angiogenih i antiangiogenih čimbenika (PlGF, sFlt-1) rezultira sustavnom upalom, endotelnom aktivacijom, sustavnim oksidativnim stresom i promijenjenom proizvodnjom endotelnog NO-a (99). Kada se aktivacija i disfunkcija vaskularnog endotela dogodi na razini jetre, bubrega, mozga i posteljice javlja se klinička slika preeklampsije (122). Endotelna disfunkcija na razini bubrega odražava se albuminurijom ili smanjenom brzinom glomerularne filtracije (70), a povećana albuminurija značajka je i hipertenzije osjetljive na sol (123).

Uz navedene biokemijske biljege endotelne funkcije, podatci o ranim promjenama u funkciji endotela i krutosti arterija mogu pružiti korisne informacije o rizicima za majku i fetus tijekom trudnoće ili poslije u životu. Pokazano je da je tijekom uredne trudnoće, u usporedbi s netrudnim ženama, značajno povećan FMD, vazodilatacija brahijalne arterije ovisna o endotelu raste tijekom rane trudnoće i doseže vrhunac u trećem tromjesečju, nakon čega slijedi plato ili pad prema razinama izvan trudnoće ili nakon porođaja (107, 124–126). Manji broj istraživanja nije našao promjene u FMD-u tijekom normalne trudnoće (127) ili je FMD tijekom istraživanja bio smanjen (128).

Tijekom uredne trudnoće povećava se i endotel-ovisna (ACh) i endotel-neovisna (SNP) mikrovaskularna reaktivnost, što ukazuje na povećani vazodilatacijski kapacitet kako u makrocirkulaciji tako i u mikrocirkulaciji (67). Isto tako pokazano je da je opći maternalni vazodilatacijski kapacitet izravno povezan s fetalnim rastom, a da procjena FMD-a brahijalne arterije u trudnica odražava cirkulaciju u uteroplacentnoj jedinici (129). Tijekom normalne trudnoće karotidno-femoralni PWV, koji se koristi u svrhu strukturalnu procjenu endotelne funkcije, smanjen je (67).

U trudnica s preeklampsijom, ali i onima koje će je tek razviti, u usporedbi s normotenzivnim trudnicama, oštećene su i FMD brahijalne arterije i mikrovaskularna vazodilatacija ovisna o endotelu (130–132). Nadalje u istoj populaciji makrovaskularna funkcija, mjerena FMD-om brahijalne arterije, značajno je snižena i nakon porođaja; poboljšava se u prvih nekoliko tjedana



nakon porođaja, ali ostaje snižena čak i 3 godine nakon porođaja u usporedbi s razinama izmjerenim kod zdravih kontrolnih žena koje su rodile (132). Žene koje su razvile preeklampsiju u ranoj fazi trudnoće ili one s rekurentnom preeklampsijom imaju izraženiju endotelnu disfunkciju nakon trudnoće mjerenu FMD-om, što ukazuje na povezanost endotelne disfunkcije s težinom bolesti (70).

### 1.11. Unos soli u trudnoći

Tijekom trudnoće sol je ključna za niz fizioloških promjena, uključujući kardiovaskularne prilagodbe, rast posteljice i fetusa i uteroplacentno imunološko okruženje (86). Općenito gotovo dvije trećine ukupnog unosa soli porijekla je iz kupovne hrane u koju se sol dodaje tijekom procesuiranja u svrhu konzervacije, a tek nešto više od 10 % soli unosi se dodavanjem soli tijekom kuhanja, što ukazuje na otežanu mogućnost kontroliranog unosa soli unatoč javnozdravstvenim preporukama (133). Dodatno, problemu otežane kontrole unosa soli tijekom trudnoće doprinose rezultati istraživanja koji pokazuju da se sklonost unosu slane hrane značajno povećava tijekom trudnoće, vrhunac doseže tijekom trećeg tromjesečja, a da u odnosu na netrudnu populaciju iste dobi trudnice češće konzumiraju sol (134).

Unos soli tijekom trudnoće utječe na rast i razvoj posteljice i fetusa te razvoj bolesti u odrasloj dobi. Poznato je da optimalni unos soli rezultira većom masom posteljice i povećanim uterinim protokom krvi, dok je fetalna masa niža u trudnica koje su izložene niskom unosu soli (135). Značajno ograničavanje unosa soli kod trudnica povezano je s poremećajem razvoja bubrega kod novorođenčeta (136). S druge strane izloženost fetusa prekomjernom unosu soli tijekom trudnoće rizični je čimbenik za razvoj kardiovaskularnih i drugih oboljenja u odrasloj dobi (137–139).

U općoj populaciji prekomjerni unos soli jedan je od ključnih rizičnih čimbenika za razvoj arterijske hipertenzije i KVB-a, a visoki arterijski tlak i drugi kardiovaskularni rizični čimbenici prije trudnoće povezani su s rizikom od gestacijske hipertenzije i preeklampsije. Hipertenzivni poremećaji u trudnoći značajan su rizični čimbenik za kardiovaskularno zdravlje i nakon trudnoće, a potomci koji su *in utero* bili izloženi HPT-u vjerojatnije će tijekom života razviti kardiovaskularne, renalne, endokrine, gastrointestinalne, neurokognitivne i imunološke poremećaje (140).

Arterijska hipertenzija u trudnoći može biti kronična (nastala prije trudnoće ili dijagnosticirana prije 20. tjedna trudnoće) ili novonastala (preeklampsija ili gestacijska hipertenzija) (141). Trudnice s kroničnom hipertenzijom mogu tijekom trudnoće razviti preeklampsiju superponiranu na kroničnu arterijsku hipertenziju, a izložene su i riziku od kratkotrajnih postpartalnih komplikacija, kao što su plućni edem i zatajenje bubrega (142). Preeklampsija se klinički dijagnosticira u prisustvu kronične ili *de novo* hipertenzije (sistolički tlak  $\geq 140$  mmHg, dijastolički tlak  $\geq 90$  mmHg) koja se razvija nakon 20. tjedna trudnoće uz superponiranu proteinuriju i/ili znakove oštećenja maternalnih organa, bubrega, jetre, središnjeg živčanog sustava i/ili fetusa (141).

Istraživanja su pokazala da je unos više od 6 g soli na dan povezan s povećanim rizikom za razvoj preeklampsije i HPT-a uopće (84) te da trudnice s dnevnim unosom soli većim od 8,8 g imaju 54 % veći rizik od gestacijske hipertenzije i 20 % veći rizik od preeklampsije u odnosu na trudnice s niskim unosom soli ( $< 7,0$  g soli na dan) (143). Nadalje visok unos natrija, uz istovremeni nizak unos kalija može suprimirati RAAS, što izravno povećava rizik za HPT, a neizravno, suzbijanjem proizvodnje aldosterona i smanjenom ekspresijom VEGF-a i PlGF-a, oštećuje fetoplacentni razvoj (64,85,101).

HPT su vodeći uzrok maternalnog, fetalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta te se javljaju u 5 – 10 % ukupnog broja trudnoća, od čega se sama preeklampsija javlja u 3 – 5 % slučajeva (144,145). Novija istraživanja ukazuju da je pojavnost HPT-a značajno viša, pretpostavlja se da se javljaju u više od 15 %, a preeklampsija u više od 7 % trudnoća (146). Žene s poviješću preeklampsije imaju 3 puta veći rizik od arterijske hipertenzije i 2 puta veći rizik od ishemijske bolesti srca i moždanog udara tijekom života u usporedbi s drugim ženama (147).

Fiziološki, tijekom prilagodbe kardiovaskularnog sustava na trudnoću, vrijednosti arterijskog tlaka dosežu najnižu razinu tijekom drugog tromjesečja trudnoće, a smanjeni pad arterijskog tlaka u drugom tromjesečju povezan je s visokom osjetljivošću na sol; pokazano je da takve trudnice imaju obiteljsku povijest hipertenzije, pretilosti u ranoj trudnoći i značajan gestacijski prirast tjelesne težine (148). Navedeni poremećaji mogu biti rani biljeg razvoja HPT-a, poremećaja razvoja posteljice (uključujući preeklampsiju i fetalni zastoj rasta) i prijevremenog porođaja (149). Žene s poviješću teške preeklampsije u predmenopauzi pokazuju znakove osjetljivosti na sol (150).

Inoue i sur. 2016. godine istraživali su izlučivanje soli urinom i perinatalni ishod u odnosu na krvni tlak mjereno u kućnim uvjetima; obuhvaćeno je 184 trudnice, uključujući 14 s HPT-om. Istraživanje

je pokazalo da prosječno izlučivanje soli mokraćom nije značajno povezano s razvojem HPT-a, ali su povišeni sistolički i dijastolički krvni tlak mjereni u kućnim uvjetima određeni kao značajni prediktori navedenih hipertenzivnih poremećaja. Zaključili su da je malo vjerojatno da je urinarna ekskrecija urina izmjerena kod ispitanica, a koja je odgovarala unosu 5 – 13 g soli dnevno, povezana sa štetnim ishodima za majku i dijete (151). Njemačko istraživanje iz 2021. godine tijekom kojeg su promatrane trudnice s preeklampsijom pokazalo je su da su serumske razine natrija u majki s nepovoljnim perinatalnim ishodom niže nego u žena koje su imale povoljan perinatalni ishod u trudnoćama kompliciranim preeklampsijom, te je niska razina natrija utvrđena kao rizični čimbenik za kraće trajanje takve trudnoće (152). Drugo istraživanje, provedeno u Japanu iste godine, pokazalo je da i niži i viši unos soli prije trudnoće jednako povećavaju rizik za razvoj HPT-a kompliciranih fetalnim zastojem rasta u normotenzivnih žena (153). Do sada nema dostupnih značajnih podataka o istraživanju utjecaja soli na endotelnu funkciju u trudnoći.

U konačnici, unos soli tijekom trudnoće smatra se važnim okolišnim čimbenikom, a pokazano je da je restrikcija unosa soli u trudnoći povezana sa značajno manjim unosom makronutrijenata i minerala (154, 155). Uzimajući navedeno u obzir, aktualne smjernice stručnih društava u većini slučajeva ne preporučuju smanjenje unosa soli tijekom trudnoće u svrhu prevencije HPT-a, nego savjetuju izbjegavanje pretjeranog unosa soli kao zdravu prehrambenu naviku (156–158). Danas su istraživanja usmjerena na određivanje optimalne razine dnevnog unosa soli tijekom trudnoće te, isto tako, na kratkotrajni utjecaj unosa soli na trudnicu i fetus, ali i dalekosežne posljedice suboptimalnog unosa soli koje se kod majke očituju u trudnoći ili nakon nje te kod djeteta nakon rođenja ili u odrasloj dobi. Striktno ograničavanje unosa soli savjetuje se samo trudnicama s kroničnom (preegzistentnom) arterijskom hipertenzijom i normotenzivnim trudnicama koje pokazuju osjetljivost na sol, što se odnosi na pretilu trudnice ili one koje su prethodno razvile metabolički poremećaj (159, 160).

### **1.12. Sol i posteljica**

Posteljica, organ osjetljiv na sol, regulira ravnotežu natrija te može funkcionirati kao ekstrarenalni regulator krvnoga tlaka tijekom trudnoće. Aldosteron je bitan regulator placentalnog, ali i fetalnog, rasta, a njegov nedostatak tijekom trudnoće može kompenzirati natrij (86).

Posteljica uredne trudnoće sadrži visoke razine negativno nabijenih glikozamnioglikana i proteoglikana, koji vežu i reverzibilno pohranjuju višak natrija bez istodobnog zadržavanja vode (86, 161). Pohranjeni natrij stvara hipertoničnost koja inducira invaziju i aktivaciju makrofaga. Aktivirani makrofagi otpuštaju TonEBP i VEGF-C, što dovodi do limfangiogeneze i ekspresije eNOS-a te posljedično oslobađanja NO-a. Smatra se da taj rezervoar natrija može ublažiti višak natrija i održati nizak vaskularni otpor i odgovarajuću uteroplacentnu perfuziju. Kapacitet vezanja natrija ovisi o brojnosti proteoglikana i glikozaminoglikana (162).

Tijekom preeklampsije ekspresija niza placentalnih proteoglikana smanjena je te je kapacitet tog sustava značajno smanjen i ne može zadovoljiti stvarne potrebe za natrijem i volumenom uteroplacentalne cirkulacije (163). Dodatnim unosom soli može se osigurati ponovno uspostavljanje normalnog volumena plazme kako bi se nadoknadio nizak aldosteron tipičan za preeklampsiju; navedeno je u skladu s rezultatima davnog intervencijskog istraživanja učinka dodatnog unosa soli kod trudnica s preeklampsijom kojim je postignuto snižavanje krvnoga tlaka, smanjenja učestalosti edema, antepartalnog krvarenja i drugih komplikacija bolesti (164).

### **1.13. Antenatalno programiranje**

Glavni regulator soli i tekućine u organizmu je RAAS, stoga je pretjerani ili nedovoljni unos soli tijekom trudnoće u najvećoj mjeri povezan s alteracijama maternalnog, fetalnog ili posteljičnog RAAS-a te negativno utječe na kardiovaskularno zdravlje fetusa i majke, kratkoročno i dugoročno. Kratkotrajni ili dugotrajni prekidi dostatne dopreme krvi, kisika ili hranjivih tvari fetusu mogu promijeniti fetalni rast i razvoj organa te uzrokovati abnormalne strukture i funkcije tkiva. Odgovarajuća fetalna perfuzija zahtijeva majčino kardiovaskularno zdravlje i zdravlje posteljice.

Izloženost fetusa prekomjernom unosu soli tijekom trudnoće rizični je čimbenik za razvoj kardiovaskularnih i drugih oboljenja u odrasloj dobi kod potomka (137–139). RAAS ima glavnu ulogu u razvoju bubrega fetusa, stoga je nedovoljan unos soli tijekom trudnoće povezan s poremećajem razvoja bubrega kod novorođenčeta (136), a upotreba inhibitora RAAS-a za liječenje hipertenzije majke tijekom trudnoće kontraindicirana je zbog visokog rizika od fetalnih urođenih mana, uključujući agenezu bubrega, tubularnu disgenezu, zatajenje bubrega i fetalnu smrt (165).

HPT imaju klinički utjecaj na zdravlje potomaka ne samo u perinatalnom razdoblju već i tijekom djetinjstva i adolescencije. Takvi će potomci vjerojatnije tijekom života razviti kardiovaskularne, renalne, endokrine, gastrointestinalne, neurokognitivne i imunološke poremećaje, a HPT također mogu utjecati na fetalno programiranje, odnosno na neurohormonsku prilagodbu (promjene u RAAS-u, hipotalamičko-hipofiznoj osovini (HPA)), imunološki sustav, angiogenezu i razvoj fetalnih organa (140). Te promjene mogu imati ulogu u budućem razvoju bolesti kod ljudi koji su *in utero* bili izloženi HPT-u. Klinička istraživanja pokazuju da potomci koji su tijekom trudnoće bili izloženi preeklampsiji u adolescenciji imaju povišene vrijednosti aldosterona, dok istraživanja na životinjama pokazuju da antenatalna primjena deksametazona povećava krvni tlak, razinu renalnog renina i ekspresiju ACE-a u adolescenciji (76).

Promjene RAAS-a u antenatalnom razdoblju mogu dovesti do razvoja hipertenzije u žena i njihovih potomaka tijekom trudnoće, odmah nakon rođenja ili u odrasloj dobi. Žene koje su tijekom trudnoće imale preeklampsiju imaju povećan rizik od razvoja hipertenzije, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti u ranijoj dobi poslije porođaja, a rizik se povećava s težinom, paritetom i ponavljanjem HPT-a (144, 145). Tri tjedna nakon porođaja žene koje su imale preeklampsiju pokazuju znakove hipertenzije povezane s osjetljivošću na sol (engl. *salt-sensitive hypertension*) te imaju značajno lošiju glomerularnu filtraciju i nižu ejekcijску frakciju lijevoga srca (146, 147, 166).

## 2. HIPOTEZA

Prekomjerni unos soli tijekom trudnoće negativno je povezan sa sistemskom mikrovaskularnom i makrovaskularnom vazodilatacijom ovisnom o endotelu te fetoplacentnom vaskularnom funkcijom, a potencijalno posredovan povišenom razinom oksidativnog stresa u zdravih trudnica u zadnjem tromjesečju trudnoće.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni je cilj ove studije istražiti povezanost prekomjernog unosa kuhinjske soli tijekom trećeg tromjesečja trudnoće sa sistemskom mikrovaskularnom i makrovaskularnom reaktivnosti te fetoplacentnom vaskularnom funkcijom.

Drugi je cilj ispitati ulogu oksidativnog stresa u potencijalnom oštećenju vaskularne funkcije uzrokovane prekomjernim unosom soli u zdravih trudnica u trećem tromjesečju trudnoće.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj istraživanja

Ovo istraživanje ustrojeno je kao presječna opservacijska studija (engl. *cross-sectional study*) u kojoj su svim ispitanicima uzeti podatci, uzorkovanja i izvršena mjerenja u dvije vremenske točke. Dizajn studije slijedio je preporuke STROBE-a za jačanje izvješćivanja o opservacijskim studijama u epidemiologiji (<https://www.strobe-statement.org/>).

### 4.2. Ispitanice

U istraživanje je bilo uključeno 65 zdravih trudnica između 37. i 40. tjedna trudnoće. Trudnice su regrutirane između lipnja 2021. i lipnja 2022. godine tijekom redovitih posjeta liječniku u Klinici za ginekologiju i opstetriciju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek. Studija je uz regrutacijski posjet uključivala drugi studijski posjet koji je bio zakazan 2 – 7 dana nakon regrutacije, ovisno o trajanju gestacije. Drugi studijski posjet održan je u Klinici za ginekologiju KBC-a Osijek te Zavodu za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska. Prikupljanje podataka i uzorkovanje ispitanica dovršeno je u terminu porođaja u Klinici za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek.

Isključni kriteriji za sudjelovanje u navedenoj studiji bili su: pušenje, hipertenzija prije začeća, hipertenzija tijekom trudnoće, trombofilija, uporaba heparina niske molekularne težine, koronarna bolest srca, bubrežna bolest, dijabetes prije začeća, gestacijski dijabetes, bolesti perifernih arterija i kronična vaskularna bolest, prisutnost bilo koje druge bolesti prije začeća i tijekom trudnoće koje utječu na vaskularnu i endotelnu funkciju, višepodna trudnoća, poremećaji u razvoju fetusa, znakovi upalne bolesti majke ili fetusa.

Sve ispitanice bile su detaljno obaviještene o svim protokolima i procedurama istraživanja. Također svaka ispitanica potpisala je informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja. Svi protokoli i postupci ovog istraživanja ustrojeni su u skladu sa standardima postavljenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije. Istraživanje je provedeno u Klinici za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek, u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta te Laboratoriju za kliničku



i molekularnu imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska (R1/6414/2021), kao i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska (Cl: 602 -04/21-08/07; broj: 2158-61-07-21-10). Ovo je istraživanje prijavljeno i registrirano kao kliničko ispitivanje na ClinicalTrials.gov (ID NCT05048225 Dietary Salt During Pregnancy and Maternal Vascular Function).

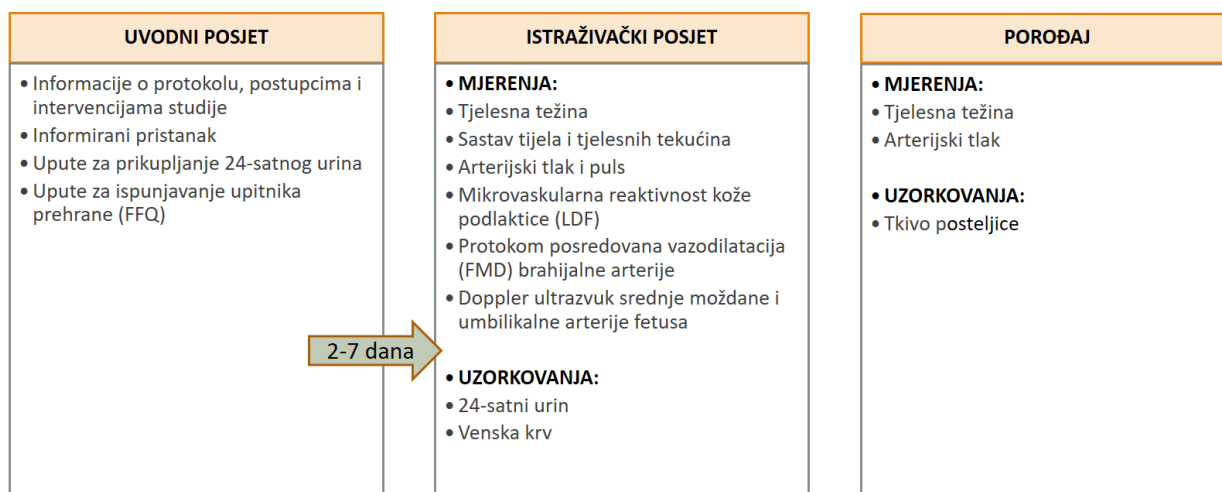
### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Protokol istraživanja

Prilikom prvog (regrutacijskog) posjeta ispitanice su detaljno informirane o protokolu, postupcima i intervencijama koje ovo istraživanje uključuje te su dale svoj informirani pristanak za sudjelovanje. Dobile su detaljne upute za prikupljanje 24-satnog urina i ispunjavanje upitnika prehrane.

Drugi posjet zakazan je 2 do 7 dana nakon regrutacijskog posjeta, ovisno o trajanju trudnoće. Tijekom drugog posjeta, koji je uvijek bio organiziran u jutarnjim satima nakon noćnog posta, u Klinici za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek od ispitanica je uzet uzorak prikupljenog 24-satnog urina, uzet je uzorak venske krvi te su učinjena sljedeća mjerenja: izmjerena je tjelesna težina i visina; prikupljeni su podatci o prekonceptcijskoj tjelesnoj težini (iz trudničke knjižice) za izračun indeksa tjelesne mase (ITM – engl. *body mass index*, BMI) te je učinjen ultrazvučni pregled trudnice transabdominalnom sondom. U Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta Osijek neinvazivno je izmjeren sastav tijela i tjelesnih tekućina metodom bioimpedancije (otpora) kože; izmjereni su arterijski tlak i puls (prosjeak tri uzastopna mjerenja); neinvazivno je mjerena mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice metodom laser-doplerska floumetrije (LDF) u odgovoru na vaskularnu okluziju, iontoforezu acetilkolina i natrijevog nitroprusida te zagrijavanje kože; neinvazivno je mjerena protokom posredovana vazodilatacija (FMD) brahijalne arterije u odgovoru na vaskularnu okluziju metodom ultrazvuka. Laboratorijska mjerenja u uzorcima 24-satnog urina i venske krvi obavljena su odmah nakon uzorkovanja, a dio seruma pohranjen je na -80 °C za daljnja mjerenja.

Neposredno prije porođaja, nakon primitka u Kliniku za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek, svakoj ispitanici izmjereni su tjelesna težina i arterijski tlak. Nakon porođaja uzet je uzorak tkiva posteljice koji je pohranjen u RNA lateru na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do trenutka daljnje obrade i analize. Također, nakon porođaja od svake ispitanice uzeti su podatci o gestacijskoj dobi, porođajnoj težini i dužini, načinu porođaja i Apgar-indeksu (167).



Slika 4.1. Sažeti prikaz protokola istraživanja. Izvor: izradila autorica rada

#### 4.3.2. Podjela ispitanica u skupine

Ovisno o procijenjenom dnevnom unosu soli, iz 24-satne natrijуреze, a uvažavajući smjernice Svjetske zdravstvene organizacije i Nacionalne akademije znanosti, inženjerstva i medicine (NASEM) Sjedinjenih Američkih Država (5, 6), ispitanice su podijeljene u tri skupine. U skupinu s normalnim unosom soli (NS) svrstane su trudnice čiji je procijenjeni dnevni unos natrija bio < 2300 mmol (< 5,75 g soli/dan), u skupinu s velikim unosom (HS) soli svrstane su trudnice čiji je procijenjeni dnevni unos natrija bio između 2300 i 4100 mmol (5,75 – 10,25 g soli/dan), a u skupinu s vrlo velikim unosom (VHS) soli svrstane su ispitanice čiji je procijenjeni dnevni unos natrija bio > 4100 mmol (> 10,25 g soli/dan).

### 4.3.3. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica

Sve ispitanice ispunile su javno dostupan upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica, EPIC-Norfolk (engl. *food frequency questionnaire*, FFQ) ([https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a\\_front.pdf](https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a_front.pdf)) (preuzet 5. svibnja 2021.) te su prikupljeni podatci o prosječnom unosu namirnica tijekom protekle godine. EPIC-Norfolk FFQ preuzet je s mrežne stranice, preveden na hrvatski jezik, međukulturalno prenesen i validiran.

Upitnik se sastoji od dvaju dijelova. Prvi dio sastoji se od popisa različitih vrsta namirnica u 130 redaka kojem je svakom pridružena veličina porcije. Od ispitanica je zatraženo da za svaki redak odaberu odgovarajuću učestalost potrošnje prema zadanih devet kategorija učestalosti. Popis namirnica blago je modificiran tako što su nazivi robnih marki prilagođeni onima dostupnima na hrvatskom tržištu. Drugi dio upitnika sadrži daljnja pitanja koja djelomično traže detaljnije informacije koje se povezuju s vrstama namirnica u prvom djelu. Podatci dobiveni EPIC-Norfolk FFQ-om unijeti su u proračunsku tablicu prema priloženim uputama i obrađeni pomoću FFQ EPIC alata za Analizu (FETA) (<https://www.epic-norfolk.org.uk/for-researchers/ffq/>) (preuzet 5. svibnja 2021.)). FETA nudi besplatno dostupne, samostalne alate za obradu podataka prikupljenih upitnikom. Rezultat navedene obrade prikaz je prosječnog dnevnog unosa 46 vrsta hranjivih tvari i 14 osnovnih skupina hrane. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica prikazan je u prilogima, Prilog 1.

### 4.3.4. Mjerenje tjelesne težine i visine te sastava tijela i tjelesnih tekućina

Svim ispitanicama izmjerena je tjelesna težina i visina te je iz podatka težine (kg) podijeljene s kvadratom visine ( $m^2$ ) izračunat indeks tjelesne mase, ITM. Prema podatcima o tjelesnoj težini ispitanice prije trudnoće i težini izmjerenoj prilikom drugog studijskog posjeta i prijema u bolnicu radi porođaja izračunat je gestacijski prirast tjelesne težine (engl. *gestational weight gain*, GWG).

Za mjerenje sastava tijela i statusa tjelesnih tekućina korišten je neinvazivni 4-terminalni prijenosni analizator impedancije (Maltron Bioscan 920-II, Maltron International Ltd., Rayleigh, Essex, U.K.). Empirijski izvedene formule (originalni softver proizvođača) korištene su za izračun bazalnog metabolizma (RMR kcal), udjela nemasnog tkiva (FFM %), udjela masnog tkiva (Fat %),

udjela ukupne tjelesne tekućine (TBW %), izvanstanične tekućine (ECW %), unutarstanične tekućine (ICW %), volumena plazme (PF), intersticijske tekućine (IF) i tjelesne gustoće (kg/L).

### 4.3.5. Mjerenje arterijskog tlaka i pulsa

Mjerenje arterijskog tlaka i pulsa provedeno je nakon 15 minuta mirovanja u sjedećem položaju pomoću automatiziranog oscilometrijskog tlakomjera (OMRON M3, OMRON Healthcare Inc., Osaka, Japan). Konačna vrijednost arterijskog tlaka (BP) izražena je kao prosjek triju uzastopnih mjerenja na istoj ruci.

### 4.3.6. Uzorkovanje i analiza uzoraka 24-satnog urina

Cjelovitost prikupljanja 24-satnog urina određena je automatskim programom u laboratoriju koji prema zadanoj formuli računa tzv. koeficijent kreatinina iz vrijednosti kreatinina u urinu, tjelesne težine i volumena 24-satnog urina. U uzorcima 24-satnog urina izmjereni su natrij, kalij, ureja, koeficijent kreatinina te koncentracija proteina i albumina. Molarno izlučivanje natrija u uzorcima 24-satnog urina korišteno je za procjenu dnevnog unosa kuhinjske soli u gramima (g) pomoću odgovarajuće formule [1g soli (NaCl) = 393,4 mg Na = 17,1 mmol Na]. Isto tako pomoću odgovarajuće formule na temelju molarnog izlučivanja kalija u uzorcima 24-satnog urina procijenjen je dnevni unos kalija u miligramima (mg) [1 mmol = 39,1 mg kalija].

### 4.3.7. Uzorkovanje, pohrana i biokemijska analiza uzoraka venske krvi

Uzimanje uzoraka venske krvi obavljeno je prema preporukama EFLM-COLABIOCLI. Krv je sakupljana u epruvete bez koagulansa i epruvete koje sadrže EDTA. U jednom dijelu uzoraka venske krvi (seruma) odmah je standardnim laboratorijskim postupcima izmjerena koncentracija elektrolita (natrij, kalij), uree i kreatinina. Uzorci su analizirani u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek.

Drugi dio uzoraka venske krvi centrifugiran je (10 minuta na 3600 okretaja u minuti), izdvojeni uzorci seruma ili plazme alikvotirani su te pohranjeni u zamrzivaču na -80 °C do daljnje analize.

Uzorci su pohranjeni u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

#### **4.3.8. Mjerenje periferne mikrovaskularne reaktivnosti metodom laser-doplerske floumetrije (LDF)**

Za procjenu periferne mikrovaskularne reaktivnosti u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH), iontoforezu acetilkolina (IONTO ACh) i natrijevog nitroprusida (IONTO SNP) te lokalno zagrijavanje kože (engl. *local thermal hyperemia*, LTH) korištena je laser-doplerska floumetrija (LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK). LDF mjerenja provedena su u prostoriji kontrolirane sobne temperature ( $23,5 \pm 0,5$  °C) nakon 30 minuta aklimatizacije. Sonde LDF-a pričvršćene su na kožu volarne strane podlaktice ispitanica. Protok krvi u mikrocirkulaciji izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama (PU) i veličina protoka određena je računalnim programom koji računa površinu ispod krivulje (AUC).

PORH-test proveden je nakon 5-minutnog bazalnog mjerenja, okluzijom brahijalne arterije induciranom napuhavanjem pneumatske manžete na nadlaktici na 30 – 50 mmHg iznad sistoličkog arterijskog tlaka. Mjerenje protoka vršeno je prije, tijekom i nakon oslobađanja 1-minutne okluzije. Konačan rezultat PORH-a izražen je kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na bazalni protok (porast R-O %).

Iontoforeza je neinvazivna metoda za transdermalni unos nabijenih čestica izvana primjenom struje malog napona. Nabijene čestice unose se u kožu putem iontoforetske elektrode koja se učvršćuje na kožu na mjestu gdje se nalazi i sonda LDF-a. Nakon bazalnog mjerenja protoka u trajanju od 5 minuta, na jednom mjestu volarne strane podlaktice transdermalno je iontoforezom unesen pozitivno nabijeni ACh (1 %) primjenom anodne struje (7 pulsova direktne struje jačine 0,1 mA tijekom 30 s, sa stankom od 30 s između pojedinih pulsova). Negativno nabijen SNP (1 %) primijenjen je na drugom mjestu volarne strane podlaktice pomoću tri impulsa od 0,1 mA negativne struje tijekom 30 s, nakon čega su slijedila četiri impulsa od 0,2 mA tijekom 30 s, s 90 s stanke između svake doze. Pulsni iontoforetski protokoli prilagođeni su za postizanje stabilnog platoa maksimalnog LDF odgovora. Mikrocirkulacijski protok krvi određen je računalnim programom koji izračunava AUC tijekom osnovnog protoka i tijekom stabilnog platoa nakon primjene ACh-a

ili SNP-a. Konačan rezultat izražen je kao povećanje protoka krvi nakon primjene ACh-a ili SNP-a u odnosu na bazalni protok (povećanje protoka krvi ACh-om ili SNP-om).

Lokalna termalna hiperemija (LTH) koja odgovara najvećem mogućem vazodilatacijskom kapacitetu krvnih žila postignuta je lokalnim zagrijavanjem kože na temperaturu 42 °C, odgovarajućim grijačem s implementiranom laserskom sondom. Mikrocirkulacijski protok krvi i u tom je testu određen računalnim programom koji izračunava AUC tijekom osnovnog protoka i postizanja stabilnog platoa porasta protoka uslijed lokalnog zagrijavanja (pojavljuje se 30 – 45 min od početka lokalnog zagrijavanja). Konačan rezultat izražen je kao povećanje protoka krvi nakon lokalnog zagrijavanja u odnosu na bazalni protok (povećanje protoka krvi LTH-om).

#### **4.3.9. Mjerenje reaktivnosti periferne makrocirkulacije ultrazvučnom metodom**

Za neinvazivno mjerenje protokom posredovane vazodilatacije (engl. *flow mediated dilation*, FMD) brahijalne arterije u odgovoru na vaskularnu okluziju korišten je ultrazvuk i odgovarajuća vaskularna sonda (GE Healthcare Vivid iQ R2). Snimanje brahijalne arterije izvedeno je u uzdužnoj ravnini, približno 5 cm proksimalno od antekubitalne jame na desnoj ruci abduciranoj otprilike 80 ° od tijela sa supiniranom podlakticom. Ultrazvučna sonda (11 MHz) postavljena je pod kutom od 60 ° za vizualizaciju prednjeg i stražnjeg sučelja lumena i intime, u svrhu mjerenja promjera ili brzine središnjeg protoka (pulsni Doppler). Nakon bazalnog mjerenja promjera izvršeno je Doppler očitavanja brzine protoka. Manžeta za krvni tlak postavljena je na podlakticu, distalno od antekubitalne jame snimane ruke, i napuhana do 60 mmHg iznad osnovnog SBP-a tijekom 5 minuta. Nakon otpuštanja manžete, brahijalna arterija snimana je u vremenskim točkama odmah nakon otpuštanja manžete, te 30 s, 1 minutu i 2 minute nakon otpuštanja manžete. Dobiveni snimci analizirani su specijaliziranim računalnim programom Brachial Analyzer for Research v.6 (Medical Imaging Applications, SAD). Neinvazivna mjerenja u mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji provedena su u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta u Osijeku.

#### 4.3.10. Doppler ultrazvuk srednje moždane (CMA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI)

Svim ispitanicama učinjen je ultrazvučni pregled uređajem s Dopplerom u boji i s transabdominalnom sondom frekvencije 2 – 6 MHz te najvećom mogućom izlaznom energijom uređaja ispod dopuštene granice za upotrebu u fetalnoj medicini (Voluson S8, GE Medical Systems, Zipf, Austria). Učinjeno je standardno biometrijsko mjerenje fetusa (biparijetalni promjer, opseg abdomena, duljina femura) i mjerenje količine plodove vode određivanjem indeksa plodove vode (engl. *amniotic fluid index*, AFI) (168). Izmjeren je protok krvi u srednjoj moždanoj arteriji (engl. *middle cerebral artery*, MCA) i pupčanoj arteriji (engl. *umbilical artery*, UA) fetusa te su izmjereni indeks pulsabilnosti (engl. *pulsatility*, PI) i otpora (engl. *resistance*, RI). Izračunat je cerebroplacentni omjer (engl. *cerebroplacental ratio*, CPR) indeksa pulsabilnosti i indeksa otpora, PI MCA/PI UA i RI MCA/RI UA. Za procjenu fetoplacentne cirkulacije korišten je Pourcelotov indeks otpora (169). Ultrazvučni pregled trudnice učinjen je u Klinici za ginekologiju i opstetriciju KBC-a Osijek.

#### 4.3.11. Mjerenje biokemijskih biljega endotelne funkcije

Iz pohranjenih uzoraka seruma određene su serumske koncentracije glavnog endotelnog vazodilatatora NO-a (Nitric Oxide Microplate Assay Kit, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) te endokana (Human Endocan ELISA Kit, MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA) koji predstavlja biljeg aktivacije endotelnih stanica i za koji se zna da ima važnu ulogu u interakciji endotela i leukocita. Serumske koncentracije NO-a i endokana mjerene su pomoću komercijalno dostupnog pribora za enzimsku imunoanalizu (ELISA) na kompaktnom čitaču apsorbancije za mikropločice s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD). Mjerenja su obavljena prema uputama proizvođača.

#### 4.3.12. Mjerenje biljega oksidativnoga stresa i antioksidativnog kapaciteta

Serumska koncentracija 8-izo-prostaglandina F2 alfa (8-izo-PGF<sub>2</sub>α), izoprostana proizvedenog neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline u membranskim fosfolipidima, pokazatelja

oksidativnog stresa, procijenjena je pomoću komercijalno dostupnog ELISA kompleta (Human 8-iso-PGF2 $\alpha$  ELISA kit, MyBioSource Inc., San Diego, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

Kao izravni pokazatelj oksidativnog stresa korištena je i spektrofotometrijska metoda stvaranja reaktivnih supstanci tiobarbiturine kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) za mjerenje produkata peroksidacije lipida s malondialdehidom (MDA) kao standardom. Antioksidativni kapacitet uzoraka krvi mjereno je spektrofotometrijskom metodom analize sposobnosti redukcije željeza u plazmi (engl. *ferric reducing ability of plasma*, FRAP), koja se temelji na redukciji Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) u Fe<sup>2+</sup>-TPTZ u prisutnosti antioksidansa, s Troloxom kao standardom (mM/L Trolox). Apsorbancija uzoraka mjerena je nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLIN. Postupci mjerenja TBARS-a i FRAP-a napravljeni su prema opisanim protokolima (51, 170) u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

#### **4.3.13. Mjerenje aktivnosti renina u plazmi (PRA) i koncentracije aldosterona u serumu**

Kvantitativno određivanje angiotenzina-I u plazmi ispitanica provedeno je upotrebom komercijalno dostupnog izravnog enzimskog imunološkog testa (IBL International, Hamburg, Njemačka). Plazma reninska aktivnost (PRA) izražena je kao masa proizvedenog angiotenzina-I po volumenu ljudske plazme u jedinici vremena (ng/mLh). Vrijednosti apsorpcije izmjerene su na 450 nm kompaktnom čitaču apsorpcije za mikropločice s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD).

Koncentracija aldosterona u serumu izmjerena je komercijalno dostupnim priborom za enzimsku imunoanalizu (MyBiosource, CA, SAD, Aldosteron kat. br. MSV495048) na kompaktnom čitaču apsorpcije za mikropločice s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

Analize su provedene u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.



#### **4.3.14. Mjerenje serumske koncentracije topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljicnog čimbenika rasta (PlGF)**

Serumske koncentracije angiogenih čimbenika, topljive fms-u slična tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljicnog čimbenika rasta (PlGF), izmjerene su kvantitativnom elektrokemiluminescentnom imunoanalizom (ECLIA) pomoću analizatora Elecsys Cobas e411 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Analizator automatski izračunava koncentraciju analita svakog uzorka u pg/mL na temelju kalibracijske krivulje koju instrument posebno generira kalibracijom u dvije točke i glavnom krivuljom. Analiza je provedena na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek.

#### **4.3.15. Mjerenje koncentracije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice**

U vrijeme porođaja uzeti su uzorci tkiva posteljice veličine 3 × 3 cm, stavljeni u otopinu RNAlater (RNAlater<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) i pohranjeni na -80 °C do daljnjih istraživanja.

Za procjenu vaskularnih promjena u tkivu posteljice u uzorcima tkiva posteljice izmjerena je koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (engl. *vascular endothelial growth factor C*, VEGF-C), proteina koji potiče rast krvnih žila i regulira njihovu propusnost te koncentracija matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9), enzima koji aktivno sudjeluje u remodeliranju krvnih žila razgradnjom matriksa, testom za izravnu enzimsku imunoanalizu (ELISA). Koncentracije MMP-9 i VEGF-C u tkivu posteljice mjerene su pomoću komercijalno dostupnih ELISA kompleta (Human MMP-9 ELISA kit, MMP-9 kat. br. BMS2016-2, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, SAD; Humani VEGF -C ELISA kit, VEGFC kat. br. abx153469, Abxexa LCC, Huston, TX, SAD). Najprije je uklonjen višak krvi, zatim je 6 g posteljice homogenizirano u fosfatnom puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) pomoću homogenizatora tkiva na ledu, a stanična suspenzija obrađena je pomoću sonikatora. Homogenati su centrifugirani na 1000xg 5 minuta i skupljen je supernatant, iz kojeg je određena koncentracija MMP-9 i VEGF-C korištenjem kompaktnog čitača apsorbancije za mikropločice s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD).

Analize su provedene u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

### 4.4. Statističke metode

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Veličina uzorka potrebna da se pokaže statistički značajna razlika izračunata je na temelju preliminarnih podataka prikupljenih od 16 ispitanica. Za otkrivanje razlika u primarnim ishodima prijavljenim u ovom istraživanju (LDF LTH, FMD) s razinom značajnosti od 0,05 i statističkom snagom od 80 % za jednosmjerni ANOVA-test, potrebna veličina uzorka bila je 9 – 11 ispitanica po skupini. Sva su mjerenja uspješno izvršena na svim ispitanicama, a u statističku analizu uključeno je ukupno 65 ispitanika. Normalnost distribucije numeričkih varijabli određena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom normalnosti. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli među skupinama testirane su jednosmjernim ANOVA-testom za nezavisne uzorke, a u slučaju odstupanja od normalne distribucije, jednosmjernim ANOVA Ranks-testom. Za utvrđivanje značajnih razlika među skupinama korišten je odgovarajući post hoc test. Povezanost (korelacija) među odgovarajućim varijablama određena je Pearsonovim ili Spearmanovim korelacijskim testom, ovisno o normalnosti distribucije podataka. Dvostrani  $p \leq 0,050$  smatran je statistički značajnim. Za statističku analizu korišten je statistički program SigmaPlot (SYSTAT Software verzija 11.2, Chicago, IL, USA).

## 5. REZULTATI

Ovisno o procijenjenom dnevnom unosu soli, na temelju uzoraka 24-satne natrijureze ispitanice su podijeljene u tri skupine. Skupinu s normalnim unosom soli (NS) činile su ispitanice čiji je procijenjeni dnevni unos soli bio  $< 5,75$  g ( $N = 12$ ; dnevni unos soli  $4,59 \pm 0,76$  g), skupinu s velikim unosom (HS) soli činile su ispitanice čiji je procijenjeni dnevni unos soli bio  $5,75 - 10,25$  g ( $N = 36$ ; dnevni unos soli  $7,66 \pm 1,35$  g), dok su skupinu s vrlo velikim unosom soli (VHS) činile ispitanice čiji je procijenjeni dnevni unos soli bio  $> 10,25$  g ( $N = 17$ ; dnevni unos soli  $11,78 \pm 1,25$  g).

### 5.1. Opća obilježja ispitanica i ishod trudnoće

U tablici 5.1 prikazane su opća obilježja ispitanica uključujući vrijednosti arterijskog tlaka, gestacijsku dob prilikom testiranja i porođaja te ishod trudnoće.

Nije bilo statistički značajne razlike u dobi ispitanica među skupinama, kao ni razlike u vrijednostima sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg arterijskog tlaka te srčanoj frekvenciji. Sve ispitanice imale su normalan sistolički ( $< 140$  mmHg) i dijastolički ( $< 90$  mmHg) arterijski tlak.

Gestacijska dob, porođajna masa i porođajna težina djeteta nisu se razlikovale među NS, HS i VHS skupinama. Udio carskih rezova kojim je dovršena trudnoća nije se razlikovao među ispitivanim skupinama. Nije bilo statistički značajne razlike u procijenjenom Apgar-indeksu među ispitivanim skupinama.

**Tablica 5.1. Opća obilježja ispitanica i ishod trudnoće**

Skupina	NS	HS	VHS	<i>P</i>
N	12	36	17	
Dob (godine)	28,6 (4,9)	29,3 (4,8)	30,5 (3,4)	0,504
SBP (mmHg)	109 (8)	112 (10)	111 (10)	0,623
DBP (mmHg)	75 (6)	76 (7)	72 (5)	0,177
MAP (mmHg)	86 (6)	88 (7)	85 (5)	0,350
Frekvencija srca (/min)				
GD testiranje (tjedni)	37,9 (0,9)	37,9 (1,0)	37,8 (0,6)	0,739
GD porođaj (tjedni)	40,0 (0,9)	39,8 (0,9)	40,1 (0,7)	0,536
Porođajna masa (g)	3724 (467)	3451 (526)	3732 (515)	0,136
Porođajna dužina (cm)	51, 6 (2, 1)	50,3 (2,2)	51,7 (1, 6)	0,066
Carski rez (%)	33,3	33,3	23,5	0,724
Apgar indeks	9,9 (0,3)	10,0 (0,0)	10,0 (0,0)	0,115

NS – normalni unos soli; HS – veliki unos soli; VHS – vrlo veliki unos soli; N – broj ispitanica; SBP – sistolički arterijski tlak; DBP – dijastolički arterijski tlak; MAP – srednji arterijski tlak; GD – gestacijska dob.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD).

## 5.2. Gestacijski prirast tjelesne težine, sastav tijela i tjelesnih tekućina

U tablici 5.2 prikazan je gestacijski prirast tjelesne težine te sastav tijela i tjelesnih tekućina ispitanica. ITM prije trudnoće nije se razlikovao među ispitivanim skupinama. Također nije bilo razlike u gestacijskom prirastu tjelesne težine među NS, HS i VHS skupinama trudnica. Među ispitivanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike u udjelu masnog i nemasnog tkiva, kao ni u ukupnoj količini tjelesne tekućine te distribuciji tjelesne tekućine među pojedinim odjeljcima tjelesnih tekućina.

**Tablica 5.2. Gestacijski prirast tjelesne težine, sastav tijela i tjelesnih tekućina**

Skupina	NS	HS	VHS	P
N	12	36	17	
<i>Status težine</i>				
ITM prije trudnoće (kg/m <sup>2</sup> )	23,9 (3,1)	23,8 (4,9)	23,6 (3,5)	0,701
GWG testiranje (kg)	16,3 (5,6)	14,6 (6,2)	16,1 (4,7)	0,577
GWG porođaj (kg)	16,9 (5,8)	15,6 (6,2)	17,6 (4,8)	0,487
<i>Sastav tijela i tjelesnih tekućina</i>				
RMR (kcal)	2136 (94)	2119 (102)	2150 (73)	0,538
FFM (%)	67,3 (6,2)	68,2 (8,0)	70,2 (6,5)	0,551
Fat (%)	32,7 (6,2)	31,8 (8,0)	29,8 (6,5)	0,551
TBW (%)	52,6 (5,4)	53,2 (6,5)	55,5 (5,7)	0,367
ECW (%)	45,8 (1,8)	44,9 (2,0)	44,9 (1,3)	0,309
ICW (%)	54,2 (1,8)	55,1 (2,0)	55,1 (1,3)	0,309
ECW/ICW	0,85 (0,06)	0,82 (0,07)	0,82 (0,05)	0,291
PF (L)	4,12 (0,39)	3,99 (0,67)	4,20 (0,49)	0,467
IF (L)	14,4 (1,37)	13,96 (2,36)	14,70 (1,72)	0,467
BD (kg/L)	1,03 (0,01)	1,03 (0,02)	1,03 (0,02)	0,57

NS – normalni unos soli; HS – veliki unos soli; VHS – vrlo velik unos soli; N – broj ispitanica; ITM – indeks tjelesne mase; GWG – gestacijski prirast tjelesne težine; RMR – stopa metabolizma u mirovanju; FFM – masa bez masti; Fat – masno tkivo; TBW – ukupna tekućina u tijelu; ECW – izvanstanična tekućina; ICW – unutarstanična tekućina; PF – plazmatska tekućina; IF – intersticijska tekućina; BD – gustoća tijela

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD).

Statistička analiza: One Way ANOVA Test / One Way ANOVA on Ranks test

### 5.3. Biokemijska analiza seruma

Standardni biokemijski parametri mjereni u uzorcima seruma prikazani su u tablici 5.3. Svi mjereni parametri bili su unutar referentnog raspona. Nije bilo razlike u koncentraciji glukoze natašte među skupinama. Također koncentracija ureje i kreatinina u serumu, kao i proteina i albumina nisu se značajno razlikovale među NS, HS i VHS skupinama. Koncentracija serumskih elektrolita (natrija, kalija i kalcija), kao i koncentracija željeza i transferina nije se značajno razlikovala među skupinama.

**Tablica 5.3. Biokemijska analiza seruma**

Skupina	NS	HS	VHS	<i>P</i>
N	12	36	17	
Glukoza (mmol/L)	4,7 (1,0)	4,7 (0,9)	4,6 (1,1)	0,902
Urea (mmol/L)	3,1 (0,6)	3,0 (0,7)	2,9 (0,7)	0,616
Kreatinin (mmol/L)	53,3 (6,5)	51,6 (6,3)	50,9 (7,6)	0,637
Urati (mmol/L)	256 (87)	276 (64)	248 (47)	0,293
Proteini (g/L)	63 (3)	64 (3)	63 (3)	0,581
Albumini (g/L)	35 (2)	35 (2)	35 (2)	0,9
Natrij (mmol/L)	136,9 (1,6)	136,4 (1,8)	136,8 (1,9)	0,523
Kalij (mmol/L)	4,0 (0,2)	4,1 (0,2)	4,1 (0,2)	0,474
Kalcij (mmol/L)	2,3 (0,1)	2,3 (0,1)	2,3 (0,1)	0,711
Željezo (μmol/L)	14,5 (5,7)	15,4 (8,8)	16,6 (10,5)	0,813
Transferin (g/L)	0,4 (0,6)	4,2 (0,6)	4,4 (0,4)	0,366

NS – normalni unos soli; HS – veliki unos soli; VHS – vrlo veliki unos soli; N – broj ispitanica.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD).

Statistička analiza: One Way ANOVA Test / One Way ANOVA on Ranks test.

### 5.4. Analiza 24-satnog urina

Analiza 24-satnog urina i procjena dnevnog unosa soli na temelju 24-satne natrijureze prikazana je u tablici 5.4. Klirens endogenog kreatinina u 24-satnom urinu i izlučivanje proteina bili su značajno viši i u skupinama HS i VHS u usporedbi sa skupinom NS, što ukazuje na povećanu bubrežnu

filtraciju kod ispitanica koje su imale visoki unos soli u usporedbi s onima koje su imale normalan unos soli. Izlučivanje albumina bilo je također veće u skupinama HS i VHS u odnosu na skupinu NS, ali razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti. Skupine HS i VHS također su imale veće izlučivanje kalija u usporedbi sa skupinom NS, dok se 24-satno izlučivanje kalija nije statistički značajno razlikovalo između skupina HS i VHS. Nadalje, molarni omjer Na/K bio je statistički značajno viši u skupini VHS usporedbi sa skupinom NS, kao i u skupini VHS u usporedbi sa skupinom HS.

**Tablica 5.4. Analiza 24-satnog urina i procjena dnevnog unosa soli**

Skupina	NS	HS	VHS	<i>P</i>
N	12	36	17	
Klirens kreatinina				
( $\mu\text{mol}/24 \text{ h/kg}$ )	86,4 (26,9)	120,9 (34,2) *	128,0 (26,1) †	0,002
Proteini (mg/dU)	154,5 (87,9)	198,7 (52,4) *	246,1 (94,7) †	0,003
Albumini (mg/dU)	6,4 (5,1)	11,9 (13,4)	11,4 (9,1)	0,118
Natrij (mmol/dU)	78,5 (12,9)	131,0 (23,1) *	201,5 (21,5) † ‡	<0,001
Kalij (mmol/dU)	36,8 (12,8)	56,2 (19,0) *	65,5 (21,0) †	<0,001
Procijenjeni dnevni unos natrija				
(mg/dan)	1804 (297)	3012 (530) *	4632 (493) † ‡	<0,001
Procijenjeni dnevni unos soli (g/dan)				
	4,59 (0,76)	7,66 (1,35) *	11,78 (1,25) † ‡	<0,001
Procijenjeni dnevni unos kalija (mg/dan)				
	1440 (502)	2197 (741) *	2561 (823) † ‡	<0,001
Omjer Na/K				
	2,28 (0,57)	2,55 (0,79)	3,38 (1,1) † ‡	0,001

NS – normalni unos soli; HS – veliki unos soli; VHS – vrlo veliki unos soli; N – broj ispitanica,

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD),

Statistička analiza: One Way ANOVA Test / One Way ANOVA on Ranks test,

Post hoc test: \*  $P < 0,05$  NS vs. HS, †  $p < 0,05$  NS vs. VHS; ‡  $P < 0,05$  HS vs. VHS

### 5.5. EPIC-Norfolk upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica

Rezultati upitnika EPIC-Norfolk o učestalosti konzumiranja namirnica prikazani su u tablici 5.5. Od ukupno dobivenog prosječnog dnevnog unosa 46 vrsta hranjivih tvari, za potrebe ovog istraživanja izdvojeni su (samo)procijenjeni dnevni unosi natrija i kalija. Iako je procijenjeni dnevni unos natrija bio najveći u skupini VHS, nije bilo statistički značajne razlike u unosu natrija među trima skupinama ispitanica. Slično tome nije bilo statistički značajne razlike među skupinama ni u dnevnom unosu kalija procijenjenom upitnikom o učestalosti konzumiranja namirnica.

**Tablica 5.5. Procjena dnevnog unosa soli EPIC-Norfolk upitnikom o učestalosti konzumiranja namirnica**

Skupina	NS	HS	VHS	<i>P</i>
N	12	36	17	
Natrij (mg/dan)	2925 (812)	2911 (1100)	3292 (947)	0,604
Sol (g/dan)	7,31 (2,03)	7,28 (2,75)	8,23 (2,37)	0,604
Kalij (mg/dan)	3504 (813)	3377 (948)	3376 (1044)	0,922

NS – normalni unos soli; HS – veliki unos soli; VHS – vrlo veliki unos soli; N – broj ispitanica.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD).

Statistička analiza: One Way ANOVA Test / One Way ANOVA on Ranks test.

### 5.6. Doppler ultrazvuk srednje moždane (MCA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI)

Dopplerski indeksi (PI i RI) umbilikalne i srednje moždane arterije fetusa, kao i cerebroplacentni omjer (CPR) obaju indeksa prikazani su u tablici 5.6. Indeks pulsabilnosti (PI) fetalne MCA bio je značajno smanjen u HS i VHS skupinama u usporedbi s NS skupinom. Nije bilo značajne razlike u PI UA-u, kao ni CPR(PI)-u među ispitivanim skupinama. Nadalje indeksi otpora (RI) u fetalnom MCA-u i UA-u, kao i CPR(RI) nisu se značajno razlikovali među ispitivanim skupinama. Indeks plodove vode bio je značajno povećan u skupini VHS u usporedbi sa skupinom HS.



**Tablica 5.6. Doppler ultrazvuk srednje moždane (MCA) i umbilikalne (UA) arterije fetusa, indeks plodove vode (AFI)**

Skupina	NS	HS	VHS	P
N	12	36	17	
PI MCA	1,66 (0,42)	1,41 (0,27) *	1,45 (0,25) †	0,043
PI UA	0,84 (0,13)	0,82 (0,18)	0,76 (0,15)	0,359
CPR-PI	2,03 (0,67)	1,78 (0,37)	1,95 (0,33)	0,15
RI MCA	0,76 (0,04)	0,73 (0,06)	0,074 (0,06)	0,297
RI UA	0,55 (0,06)	0,54 (0,05)	0,52 (0,06)	0,289
CPR-RI	1,40 (0,18)	1,36 (0,14)	1,44 (0,16)	0,227
AFI	14,6 (4,2)	12,4 (2,7)	14,5 (2,5) ‡	0,021

NS – normalni unos soli; HS– veliki unos soli; VHS – vrlo veliki unos soli; N – broj ispitanica; PI – indeks pulsatilnosti; RI – indeks otpora; MCA – srednja moždana arterija; UA – umbilikalna arterija; CPR – cerebroplacentni omjer; AFI – indeks plodove vode.

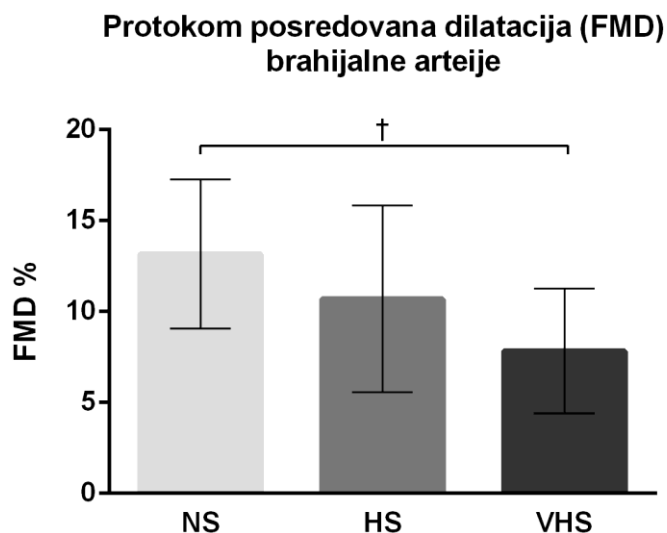
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD).

Statistička analiza: One Way ANOVA Test / One Way ANOVA on Ranks test.

Post hoc test: \*  $P < 0,05$  NS vs. HS, †  $p < 0,05$  NS vs. VHS; ‡  $P < 0,05$  HS vs. VHS

### 5.7. Protokom posredovana dilatacija (FMD) brahijalne arterije

Dilatacija periferne makrocirkulacije ispitanica ovisna o endotelu, dominantno posredovana NO-om, prikazana je na slici 5.1. Protokom posredovana vazodilatacija (FMD) brahijalne arterije bila je značajno snižena u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS, dok se FMD u skupini HS nije značajno razlikovao od skupina NS i VHS.



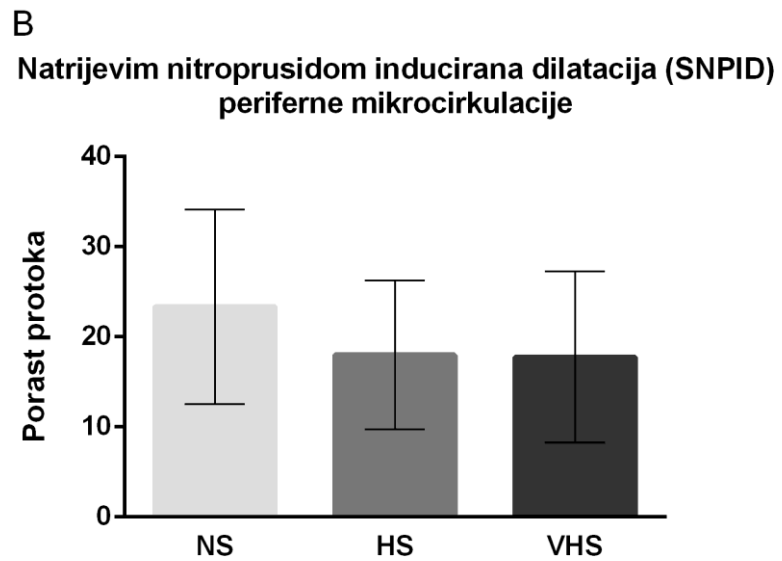
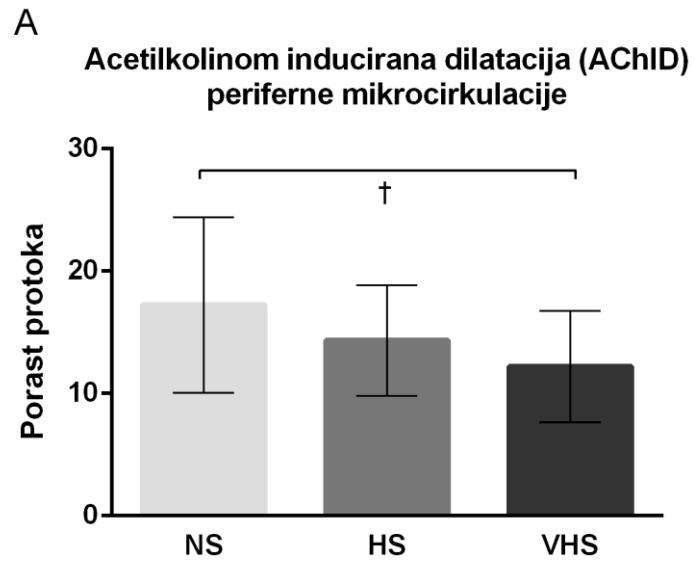
**Slika 5.1. Vazodilatacija periferne makrocirkulacije ovisna o endotelu u skupini trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) dnevnim unosom soli procijenjena ultrazvučnim mjerenjem protokom posredovane dilatacija (FMD) brahijalne arterije.**

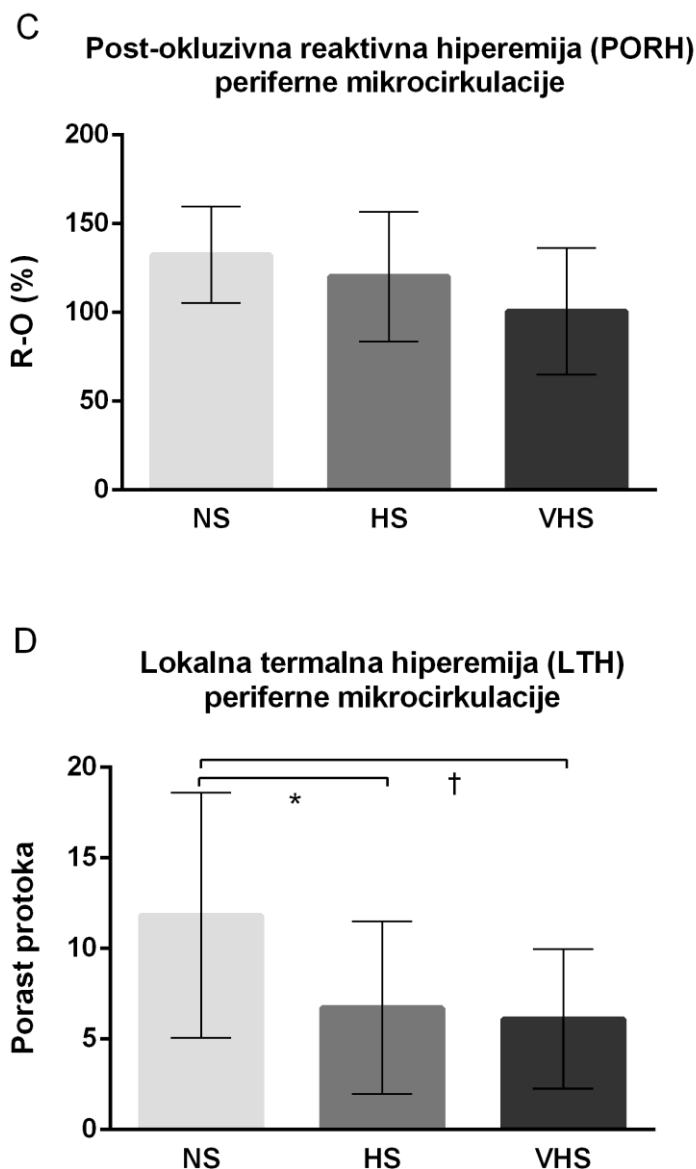
FMD brahijalne arterije značajno je smanjen u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Statistička analiza: jednosmjerni ANOVA Ranks test,  $P = 0,010$ . Post hoc test: †  $P < 0,05$  NS u odnosu na VHS.

### **5.8. Periferna mikrovaskularna reaktivnost u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH), iontoforezu acetilkolina (IONTO ACh) i natrijevog nitroprusida (IONTO SNP) te lokalno zagrijavanje kože (LTH)**

Mikrovaskularna vazodilatacija ovisna o endotelu procijenjena dilatacijom induciranom ACh-om (AChID) bila je značajno niža u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Istovremeno se AChID u HS skupini nije značajno razlikovao u usporedbi sa skupinama NS i VHS (slika 5.2 A). Između ispitivanih skupina nije primijećena značajna razlika u vazodilataciji neovisnoj o endotelu procijenjenoj dilatacijom induciranom SNP-om (SNPID) (slika 5.2 B). Iako je PORH imao tendenciju smanjenja s većim unosom soli, razlika u PORH-u između skupina HS i NS, kao i skupina HS i VHS nije dosegla razinu statističke značajnosti (slika 5.2 C). Odgovor LTH periferne mikrocirkulacije, kao funkcionalni biljeg endotelne funkcije dominantno ovisan o NO-u, značajno je smanjen u skupini HS u usporedbi sa skupinom NS, kao i u skupini VHS u usporedbi

sa skupinom NS (slika 5.2 D). Mikrovaskularni LTH u skupini HS nije se značajno razlikovao u odnosu na skupinu VHS.



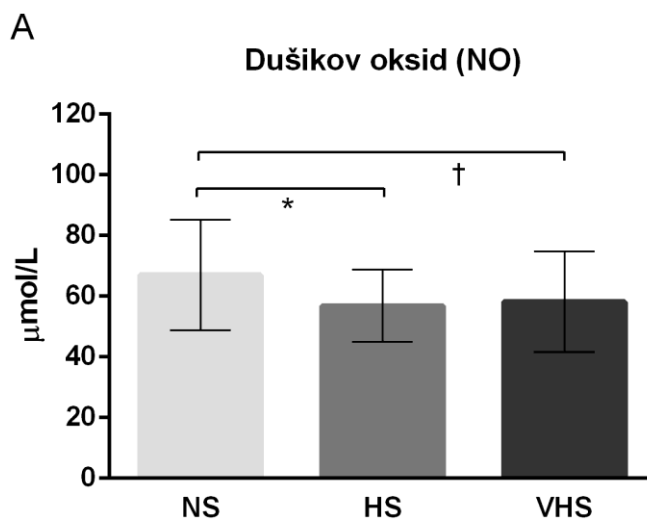


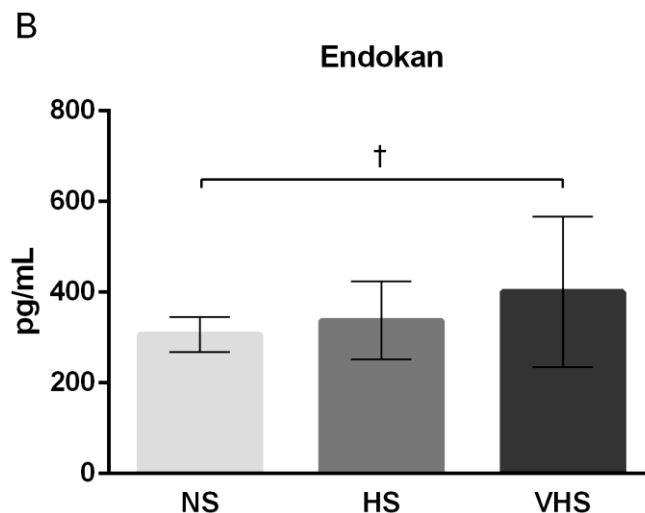
**Slika 5.2. Dilatacija periferne mikrocirkulacije ovisna i neovisna o endotelu u skupini trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) dnevnim unosom soli procijenjena laser-doplerskom floumetrijom (LDF).**

(A) Dilatacija inducirana acetilkolinom, (B) Dilatacija inducirana natrijevim nitroprusidom (SNPID), (C) Post-okluzivna reaktivna hiperemija (PORH), (D) Lokalna toplinska hiperemija (LTH). AChID, SNPID i LTH izraženi su kao povećanje protoka nakon zadanih podražaja u odnosu na osnovnu vrijednost. PORH je izražen kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O %). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test. Post hoc test: \*  $P < 0,05$  NS vs HS; †  $P < 0,05$  NS u odnosu na VHS.

### 5.9. Serumski biljezi endotelne funkcije

Mjereni biokemijski biljezi endotelne funkcije u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) dnevnim unosom soli prikazani su na slici 5.3. Koncentracija NO-a u serumu bila je značajno smanjena u skupini HS u usporedbi sa skupinom NS, kao i u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS (slika 5.3 A). Koncentracija NO-a u serumu u skupini HS nije se značajno razlikovala u usporedbi sa skupinom VHS (slika 5.3 A). Koncentracija endokana u serumu značajno je povišena u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS (slika 5.3 B), dok se endokan u skupini HS nije značajno razlikovao u usporedbi sa skupinama NS i VHS (slika 5.3 B).





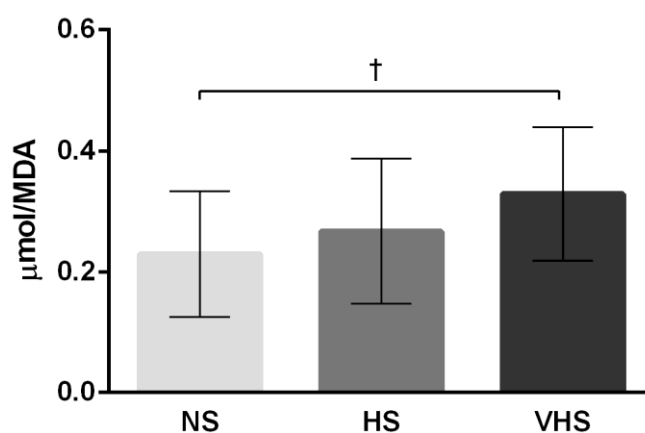
**Slika 5.3. Serumska koncentracija dušikovog oksida (NO) i endokana u trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

(A) Koncentracija dušikovog oksida (NO) u serumu, (B) Koncentracija endokana u serumu. Koncentracija NO-a u serumu značajno je smanjena u skupini HS u usporedbi sa skupinom NS, kao i u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS,  $P = 0,016$  (A). Koncentracija endokana u serumu bila je značajno smanjena u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS,  $P = 0,049$  (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test. Post hoc test: \*  $P < 0,05$  NS vs. HS; †  $P < 0,05$  NS u odnosu na VHS.

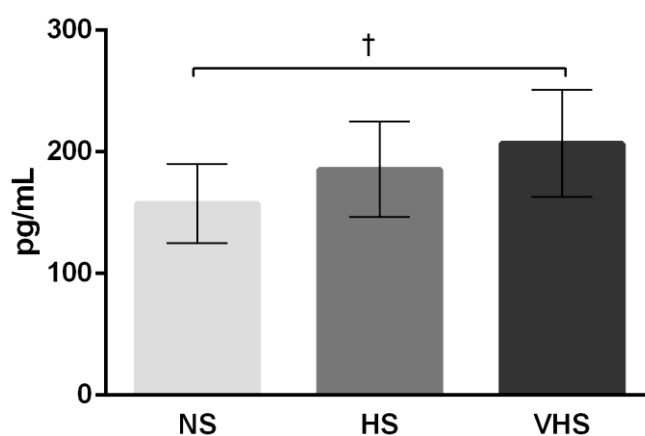
#### 5.10. Serumski biljezi oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet plazme

Mjerenje dvaju serumskih biljega oksidativnog stresa, reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) (slika 5.4 A) i serumske koncentracije 8-izo-PGF2 $\alpha$  (slika 5.4 B) pokazalo je značajno povišenu razinu oksidativnog stresa u skupini VHS u odnosu na skupinu NS. Iako je oksidativni stres imao tendenciju povećanja s većim unosom soli, razlika u TBARS i 8-izo-PGF2 $\alpha$  u skupini HS u usporedbi sa skupinama NS i VHS nije dosegla razinu statističke značajnosti (slike 5.4 A i 5.4 B).

**A**      **Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS)**



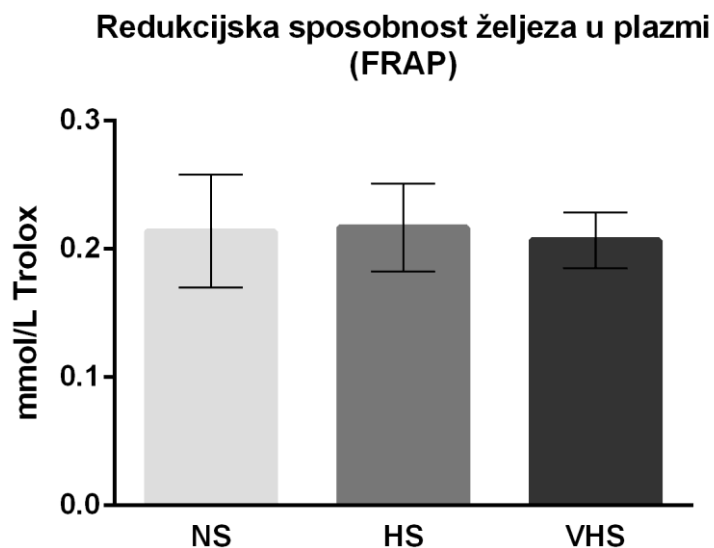
**B**      **8-izo-prostaglandin F2 $\alpha$  (8-izo-PGF2 $\alpha$ )**



**Slika 5.4. Serumski biljezi oksidativnog stresa (TBARS i 8-izo-PGF2 $\alpha$ ) u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

(A) Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS), (B) 8-izo-prostaglandin F2 $\alpha$  (8-izo-PGF2 $\alpha$ ). TBARS (A) i 8-izo-PGF2 $\alpha$  (B) značajno su povećani u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Iako je oksidativni stres imao tendenciju povećanja s većim unosom soli, razlika u TBARS i 8-izo-PGF2 $\alpha$  u HS skupini u usporedbi sa skupinama NS i VHS nije dosegla razinu statističke značajnosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test. Post hoc test: † P < 0,05 NS u odnosu na skupinu VHS.

Istovremeno antioksidativni kapacitet, mjereno redukcijom sposobnošću željeza u plazmi (FRAP), nije pokazao značajnu razliku među trima ispitivanim skupinama trudnica (slika 5.5).



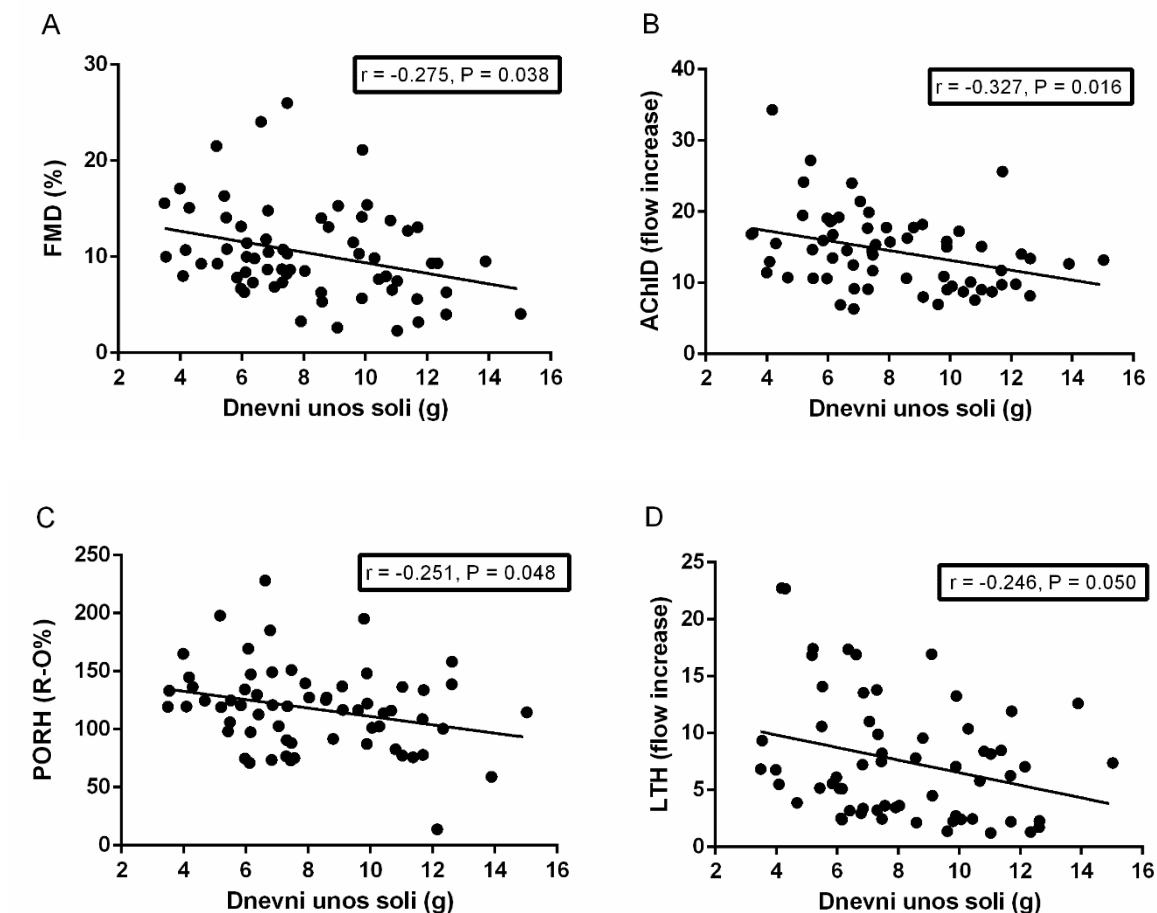
**Slika 5.5. Redukcijska sposobnost željeza u plazmi (FRAP) kao biljeg antioksidativnog kapaciteta u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

Mjerenje FRAP-a nije pokazalo značajnu razliku trima ispitivanim skupinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test.

### **5.11. Povezanost dnevnog unosa soli i mjerenih funkcijskih i biokemijskih biljega endotelne funkcije u zdravih trudnica**

Dnevni unos soli pokazao je slabu negativnu korelaciju s PORH-om ( $r = -0,251$ ,  $P = 0,048$ ), LTH-om ( $r = -0,246$ ,  $P = 0,050$ ) i FMD-om ( $r = -0,275$ ,  $P = 0,038$ ) te umjerenu negativnu korelaciju s AChID-om ( $r = -0,327$ ,  $P = 0,016$ ). Također postoji umjerena pozitivna korelacija između dnevnog unosa soli i TBARS-a ( $r = 0,324$ ,  $P = 0,041$ ). Povezanost dnevnog unosa soli i FMD-a, AChID-a, PORH-a te LTH-a prikazana je na slici 5.6.



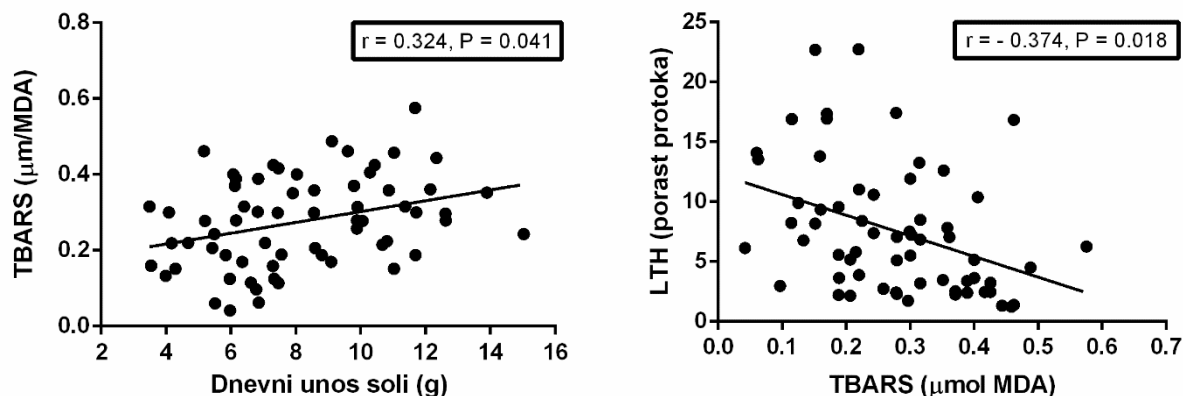


**Slika 5.6. Povezanost dnevnog unosa soli i funkcionalnih biljega mikrovaskularne i makrovaskularne reaktivnosti ovisne o endotelu u zdravih trudnica.**

Dnevni unos soli pokazao je slabu negativnu korelaciju s FMD-om (A), PORH-om (C) i LTH-om (D) te umjerenu negativnu korelaciju s AChID-om (B). Rezultati su izraženi kao pojedinačne podatkovne točke.

Statistička analiza: Pearsonov ili Spearmanov korelacijski test (ovisno o normalnosti distribucije podataka).  $r$  – koeficijent korelacije, \*  $P < 0,05$ .

Serumska koncentracija 8-izo-PGF $2\alpha$  pokazala je samo slabu negativnu korelaciju s AChID-om ( $r = -0,121$ ,  $P = 0,350$ ) i LTH-om ( $r = -0,212$ ,  $P = 0,127$ ). TBARS je umjereno negativno korelirao s LTH-om ( $r = -0,374$ ,  $P = 0,018$ ), a u slaboj je negativnoj korelaciji s PORH-om ( $r = -0,191$ ,  $P = 0,216$ ) i AChID-om ( $r = -0,263$ ,  $P = 0,131$ ). Uočena je umjerena pozitivna korelacija između FRAP-a i AChID-a ( $r = 0,346$ ,  $P = 0,045$ ). Povezanost dnevnog unosa soli i TBARS-a, te TBARS-a i LTH-a prikazana je na slici 5.7.



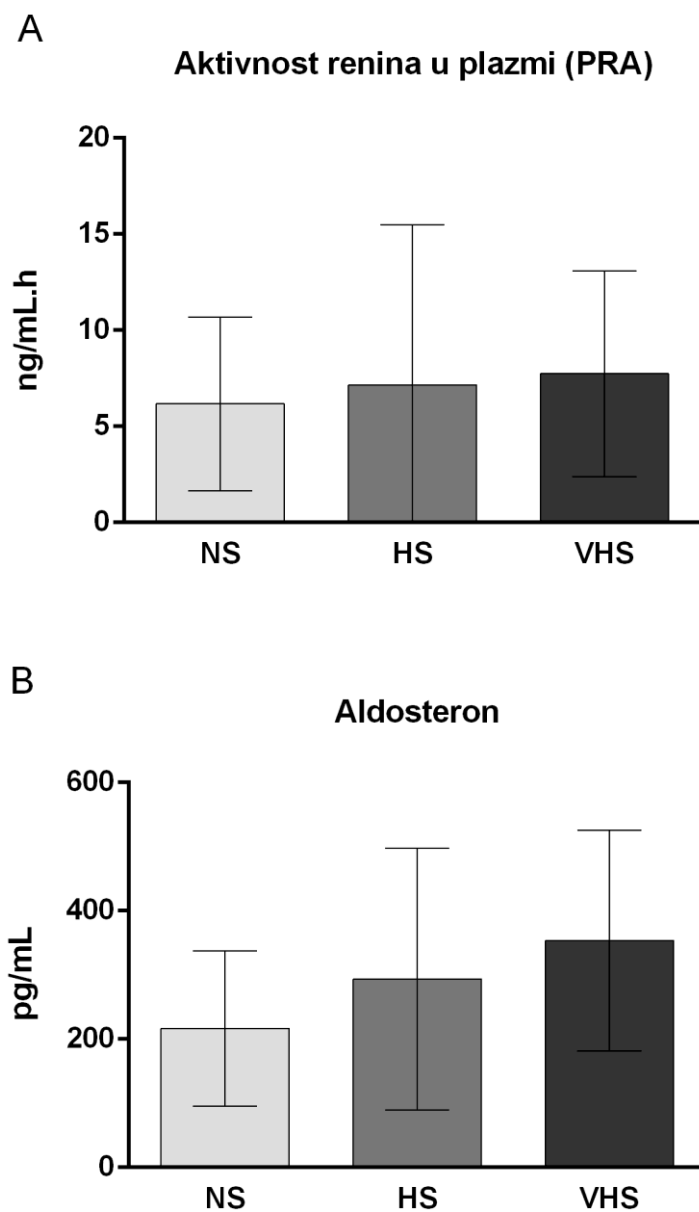
**Slika 5.7. Povezanost dnevnog unosa soli i reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) te TBARS-a i endotelne vazodilatacije periferne mikrocirkulacije posredovane dušikovim oksidom (NO).**

Uočena je umjerena pozitivna korelacija između dnevnog unosa soli i TBARS-a (A) te umjerena negativna povezanost TBARS-a i lokalne termalne hiperemije (LTH) i periferne mikrocirkulacije (B).

Statistička analiza: Pearsonov ili Spearmanov korelacijski test (ovisno o normalnosti distribucije podataka).  $r$  – koeficijent korelacije, \*  $P < 0,05$ .

### 5.12. Aktivnost renina u plazmi (PRA) i koncentracija aldosterona u serumu

Nije uočena statistički značajna razlike u PRA-u među ispitivanim skupinama trudnica (slika 5.8 A). Iako je koncentracija aldosterona u serumu imala tendenciju porasta s većim unosom soli, razlika u serumskoj koncentraciji aldosterona između skupina HS i NS, kao i skupina HS i VHS nije dosegla razinu statističke značajnosti (slika 5.8 B).



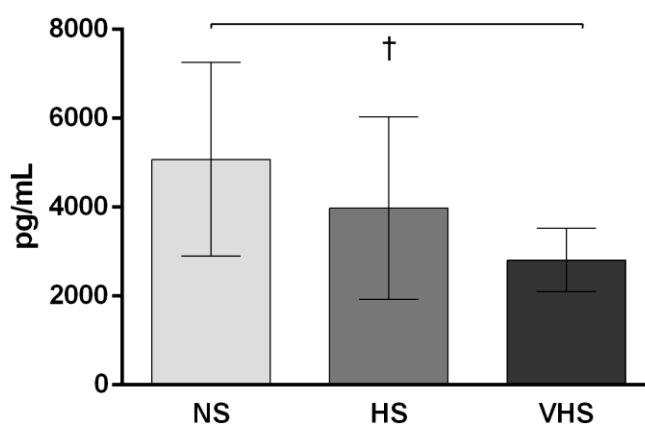
**Slika 5.8. Aktivnost renina u plazmi (PRA) i serumska koncentracija aldosterona u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

Nije bilo statistički značajne razlike u PRA-u (A) i serumskoj koncentraciji aldosterona (B) među ispitivanim skupinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test.

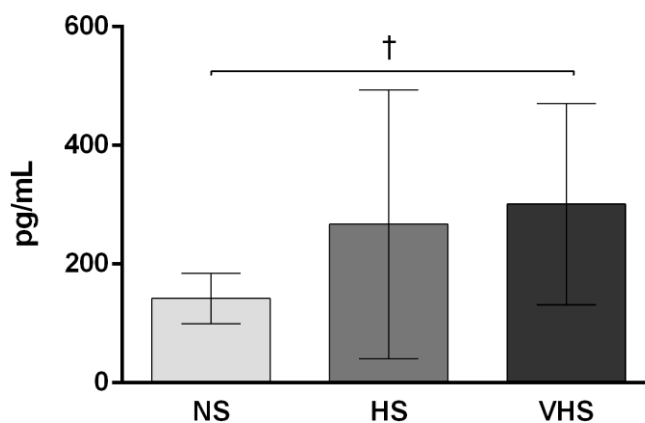
### 5.13. Serumska koncentracija topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljičnog čimbenika rasta (PlGF)

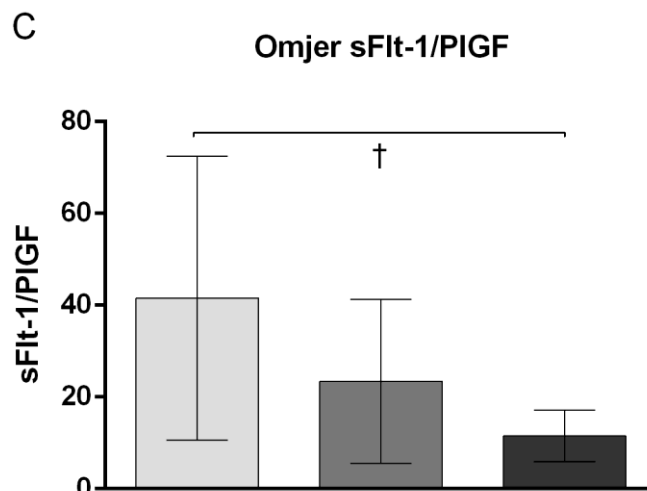
Serumska koncentracija sFlt-1 bila je značajno snižena u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Nije bilo značajne razlike u serumskoj koncentraciji sFlt-1 između skupina HS i NS, kao ni između skupina HS i VHS (slika 5.9 A). S druge strane serumska koncentracija PlGF-a bila je značajno povećana u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Nije bilo značajne razlike u serumskoj koncentraciji PlGF-a između skupina HS i NS, kao ni između skupina HS i VHS (slika 5.9 B). Omjer sFLT-1/PlGF značajno je smanjen u skupini VHS u odnosu na skupinu NS, dok razlika između skupina NS i HS, kao ni skupina HS i VHS nije uočena (slika 5.9 C).

A  
Topljiva fms-u slična tirozin kinaza-1 (sFlt-1)



B  
Posteljični čimbenik rasta (PlGF)



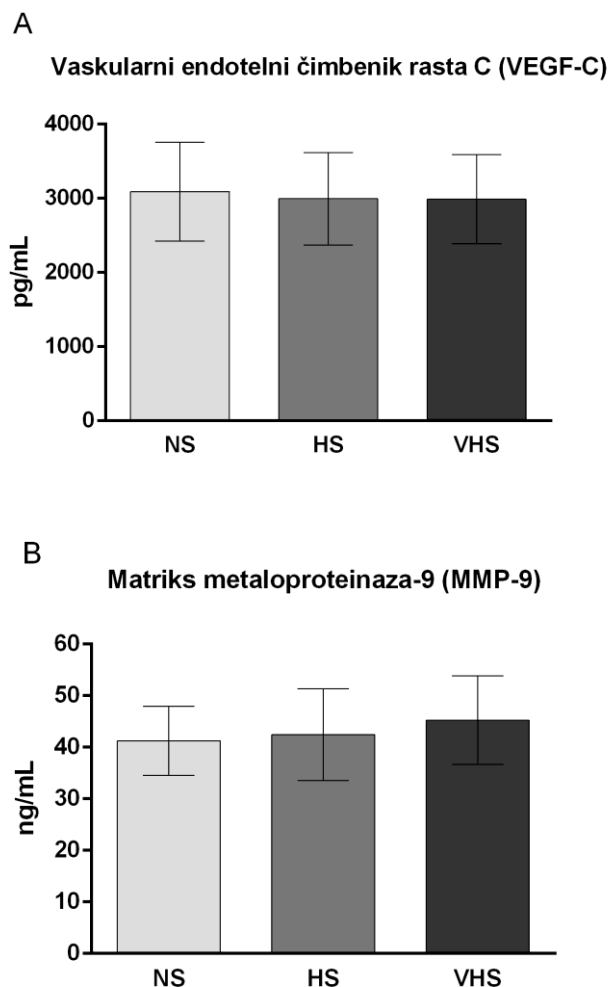


**Slika 5.9. Serumska koncentracija topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljičnog čimbenika rasta (PlGF) te omjer sFlt-1/PlGF u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

Koncentracija sFlt-1 bila je značajno snižena, a PlGF-a značajno povišena u skupini VHS skupini u usporedbi sa skupinom NS. Posljedično, značajno je bio snižen i omjer sFlt-1/PlGF u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test. Post hoc test: †  $P < 0,05$  NS u odnosu na VHS.

#### **5.14. Koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice**

Koncentracija VEGF-C-a u tkivu posteljice nije se značajno razlikovala među ispitivanim skupinama ( $P = 0,424$ ) (slika 5.10 A). Također nije bilo značajne razlike u koncentraciji MMP-9 u tkivu placente među skupinama NS, HS i VHS ( $P = 0,924$ ) (slika 5.10 B).



**Slika 5.10. Koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice u skupini zdravih trudnica s normalnim (NS), velikim (HS) i vrlo velikim (VHS) unosom soli.**

Koncentracija VEGF-C-a (A) i MMP-9 u tkivu posteljice nije se značajno razlikovala među ispitivanim skupinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Jednosmjerni ANOVA test / Jednosmjerni ANOVA Ranks test.

### **5.15. Povezanost dnevnog unosa soli i mjerene fetoplacentne vaskularne funkcije, aktivnosti RAAS-a te angiogenih čimbenika posteljice u zdravih trudnica**

Nije bilo značajne korelacije između dnevnog unosa soli i ultrazvučnih Dopplerskih indeksa (PI i RI) umbilikalne i srednje moždane arterije, kao ni cerebroplacentnog omjera PI-a i RI-a.

Uočena je slaba pozitivna korelacija između unosa soli i koncentracije aldosterona u serumu ( $r = 0,241$ ,  $P = 0,059$ ), aldosteron je značajno umjereno pozitivno korelirao s procijenjenim dnevnim unosom kalija ( $r = 0,321$ ,  $P = 0,011$ ). Također je uočena umjerena negativna korelacija između unosa soli i koncentracije sFlt-1 u serumu ( $r = -0,305$ ,  $P = 0,080$ ), a značajna umjerena pozitivna korelacija između unosa soli i koncentracije PlGF-a u serumu ( $r = 0,484$ ,  $P = 0,005$ ).

Iako nije bilo korelacije između unosa soli i koncentracije VEGF-C-a u posteljici ( $r = 0,011$ ,  $P = 0,947$ ), unos soli slabo je pozitivno korelirao s koncentracijom MMP-9 u posteljici ( $r = 0,267$ ,  $P = 0,036$ ). Slično, postojala je slaba pozitivna korelacija između unosa soli i indeksa plodove vode (AFI) ( $r = 0,207$ ,  $P = 0,097$ ).

## 6. RASPRAVA

Glavni rezultat ovog istraživanja je da je velik unos soli hranom povezan s oslabljenom maternalnom vazodilatacijom ovisnom o endotelu (dominantno posredovanom NO-om; npr. mikrovaskularni LTH i makrovaskularni FMD) u perifernoj mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji u zdravih trudnica, neovisno o gestacijskom prirastu tjelesne težine, sastavu tijela i tjelesnih tekućina ili arterijskom tlaku trudnice. Osim toga taj oslabljeni vazodilatacijski odgovor ovisan o endotelu, povezan s velikim unosom soli, popraćen je smanjenom koncentracijom NO-a i povećanom koncentracijom endokana u serumu, kao i višom razinom oksidativnog stresa. Zapažanja da su najrelevantnije statistički značajne razlike pronađene između skupina NS i HS i/ili VHS, ali ne i između skupina HS i VHS u skladu su s rezultatima ranijih istraživanja, prema kojima se unos soli manji od 5,75 g dnevno (< 2300 mmol natrija dnevno) preporučuje za smanjenje kardiovaskularnog rizika u općoj populaciji.

Nadalje, ovo istraživanje pokazalo je da je velik unos soli hranom tijekom trudnoće povezan i sa smanjenim indeksom pulsatilnosti (PI) MCA-a fetusa, ali i s višom aktivnošću RAAS-a, značajno smanjenim omjerom sFlt-1/PlGF i nepromijenjenim koncentracijama VEGF-C-a i MMP-a u posteljici zdravih trudnica, neovisno o gestacijskom prirastu tjelesne težine i arterijskom tlaku majke. Smanjenje fetalnog PI MCA-a s velikim unosom soli može biti znak početne insuficijencije posteljice, naglašavajući važnost odgovarajućeg unosa soli tijekom trudnoće za održavanje fetoplacentne, ali i vaskularne (endotelne) funkcije majke. Otkriće da je dnevni unos kalija, ali ne i soli, snažno povezan s razinama aldosterona u serumu naglašava važnost unosa kalija u kombinaciji s velikim unosom soli, osobito jer je visoka razina aldosterona u serumu značajno povezana s povoljnijim, nižim omjerom sFlt-1/PlGF. Ukazuju li povećane koncentracije aldosterona i PlGF-a, kao i povoljniji omjer sFlt-1/PlGF i nepromijenjene koncentracije VEGF-a i MMP-9 u posteljici na zaštitni učinak unosa kalija u kombinaciji s visokim udjelom soli ili aktivaciju drugog kompenzacijskog mehanizma (npr. antioksidativne obrane) usmjerenog na očuvanje funkcije posteljice i samog ishoda trudnoće, predstavlja intrigantno pitanje koje bi trebalo istražiti u budućim istraživanjima.



### 6.1. Učinak prekomjernog unosa soli u trudnoći na endotelnu funkciju i oksidativni stres

Budući da je prekomjerni unos soli jasno povezan s povećanim kardiovaskularnim rizikom, smanjenje unosa soli hranom predloženo je kao najučinkovitija i najisplativija strategija za očuvanje i poboljšanje kardiovaskularnog zdravlja u općoj populaciji. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) kontinuirano preporučuje dnevni unos soli manji od 5 grama za opću populaciju (5). Ipak prosječni unos soli hranom u svijetu dvostruko je veći od preporučene količine (9, 10), a globalni podatci odražavaju i stanje u Hrvatskoj. Rezultati našeg nedavnog istraživanja pokazali su da je prosječni dnevni unos soli u zdravih trudnica bio između 7,5 i 8,2 g soli na dan (analiza 24-satnog urina: 8,2 g soli/dan, FFQ: 7,5 mg Na/dan) (171), što je bilo ispod hrvatskog prosjeka (prema podacima za 2019. godinu prosječni dnevni unos soli kod žena bio je 9,2 g) (12), ali ipak više od preporuka Svjetske zdravstvene organizacije. Osim jasne povezanosti između prekomjernog unosa soli i arterijske hipertenzije, u proteklih nekoliko desetljeća i eksperimentalne studije na životinjama i kliničke studije pokazale su da prekomjerni unos soli utječe na funkciju vaskularnog endotela, čak i u odsutnosti promjena arterijskog tlaka ili im prethodi (43, 45, 50), što ukazuje na to da je poremećena funkcija endotela jedna od najranijih posljedica prekomjernog unosa soli, a koja dovodi do povećanog kardiovaskularnih rizika i KVB-a.

Što se tiče procjene dnevnog unosa soli, predložena precizna metoda jest višekratno prikupljanje 24-satnog urina tijekom nekoliko dana, ali istraživanja ukazuju na nisku prihvaćenost metode, posebno u velikim populacijskim epidemiološkim studijama. Unos soli obično se procjenjuje iz upitnika o učestalosti konzumiranja namirnica (FFQ) ili iz slučajnog uzorka urina. Unos soli koji se procjenjuje FFQ-om često je podcijenjen i rezultira varijabilnošću u prijavljenim količinama unosa soli. Uzimajući u obzir zamke navedenih metoda, u nedavnom istraživanju naše studijske grupe, za procjenu dnevnog unosa soli koristili smo obje, FFQ i analizu jednokratno prikupljenog 24-satnog urina. Ovisno o načinu određivanja, procijenjeni dnevni unos soli u zdravih trudnica pokazuje određene razlike. Iako je prosječni unos soli procijenjen analizom 24-satnog urina bio sličan unosu soli procijenjenom FFQ-om za sve sudionice (24-satna analiza urina: 8,2 g soli na dan, FFQ: 7,5 g soli na dan), postojala je niska korelacija između tih vrijednosti ( $r = 0,168$ ,  $P = 0,200$ ). To je u skladu s rezultatom sustavnog pregleda 18 prijavljenih studija koji je utvrdio slabo slaganje između procjene natrija FFQ-om i 24-satnim izlučivanjem urina; naprimjer, prijavljene korelacije općenito su bile niske za istraživanja koja su uspoređivala 24-satni urin s rezultatima

FFQ-a (171). Stoga smo u ovom istraživanju dali prednost 24-satnoj natrijurezi za procjenu dnevnog unosa soli u usporedbi s FFQ-om. Istovremeno smo bili svjesni da se jednodnevno, a ne višednevno, prikupljanje 24-satnog urina može smatrati ograničenjem istraživanja.

Suvremene smjernice za prehranu trudnica usmjerene su na dodavanje mikronutrijenata i optimalni gestacijski prirast tjelesne težine, a zbog nedostatka kliničkih ispitivanja još uvijek nema konsenzusa o dodavanju antioksidansa, kao ni o optimalnom unosu natrija tijekom trudnoće. Štoviše ne postoje specifične prehrane preporuke za prevenciju HPT-a kod trudnica niti je poznato u kojoj mjeri prehrane preporuke za opću populaciju mogu koristiti i trudnicama. Intervencijska istraživanja na zdravim pojedincima obaju spolova opetovano su izvijestila da je 7-dnevno opterećenje solju (14 do 20 g soli/dan), neovisno o promjenama tjelesne tekućine ili arterijskog tlaka, značajno oslabilo mikrovaskularnu funkciju kože ovisnu o endotelu, naprimjer, periferni mikrovaskularni PORH, vazodilataciju izazvanu ACh-om ili LTH procijenjen pomoću LDF-a, kao i FMD brahijalne arterije, pokazatelj makrovaskularne reaktivnosti (45, 46, 50, 172).

S druge strane do ovog istraživanja nema objavljenih rezultata koji se odnose na učinke visokoslane prehrane na vaskularnu reaktivnost u inače zdravih trudnica. Stoga je bilo potrebno istražiti slijedi li mikrovaskularni i makrovaskularni endotelni odgovor na unos natrija hranom isti obrazac u zdravih trudnica kao i u mladih zdravih žena koje nisu trudne te mogu li se i tijekom trudnoće primijeniti dostupne opće preporuke za unos soli. Koliko znamo, ovo je istraživanje prvo koje pokazuje smanjenje mikrovaskularne i makrovaskularne vazodilatacije ovisne o endotelu (dominantno posredovane NO-om) u trudnica koje su konzumirale više od 5,75 grama, i od 10,25 grama soli dnevno, u usporedbi s onima koje su konzumirale manje od 5,75 grama soli dnevno, što ukazuje na sličan odgovor endotela na unos soli tijekom trudnoće kao i u općoj populaciji. Štoviše u ovom istraživanju periferna mikrovaskularna dilatacija neovisna o endotelu (dilatacija inducirana SNP-om) nije se razlikovala među ispitivanim skupinama, što je u skladu s nalazima prethodnih istraživanja na zdravim netrudnim ženama (51).

Ovo je važno otkriće, s obzirom na to da se pokazalo da FMD brahijalne arterije tijekom trudnoće odražava protok krvi u uteroplacentnoj jedinici (129), a FMD brahijalne arterije, kao i vazodilatacija ovisna o endotelu u mikrocirkulaciji oslabljeni su u žena s preeklampsijom u usporedbi s normotenzivnim trudnicama (130, 173–175). Uzeti zajedno, rezultati ovog istraživanja

ukazuju na predispoziciju za povećane kardiovaskularne rizike kod trudnica koje konzumiraju visokoslanu hranu.

Ovo istraživanje pokazuje da su, osim značajno većeg izlučivanja natrija i kalija u 24-satnom urinu, značajno povećani klirens endogenog kreatinina i izlučivanje proteina u skupinama HS i VHS u usporedbi sa skupinom NS. Tijekom trudnoće brzina glomerularne filtracije (GFR) normalno se povećava za 40 – 65 % (60). U netrudnih hipertenzivnih bolesnika unos prekomjerne soli povezan je s visokim GFR-om ( $> 135$  ml/min) (176). Međutim istraživanja na inače zdravim odraslim osobama izvijestila su o nedosljednim rezultatima, npr. da je prekomjerni unos soli utjecao (177, 178), ali isto tako i da nije utjecao (179, 180) na GFR. Iako su 24-satni klirens endogenog kreatinina, kao i izlučivanje proteina i albumina bili unutar referentnih vrijednosti u skupinama trudnica NS, HS i VHS, uočeno povećanje klirensa kreatinina u skupinama HS i VHS u našoj kohorti može sugerirati da je opterećenje solju povezano s povećanjem perfuzijskog tlaka bubrega tijekom zdrave trudnoće. Ako se uzme u obzir da je glomerularna hiperfiltracija snažan i neovisan prediktor kardiovaskularnih događaja, osobito u osoba s hipertenzijom, rezultati ovog istraživanja mogu sugerirati da bi bubrežna vaskulatura zdravih trudnica mogla biti osjetljivija na unos soli hranom nego bubrežna vaskulatura u netrudnoj populaciji, s obzirom na to da hiperfiltracija nije uočena u ranijim istraživanjima kod zdravih osoba na visokoslanjoj dijeti (46, 51, 172).

Nadalje povećana bubrežna filtracija u trudnica s visokim i vrlo visokim unosom soli, kao i oslabljena vazodilatacija ovisna o endotelu na sistemskoj mikrovaskularnoj i makrovaskularnoj razini mogu pokazati štetne učinke visokoslane prehrane u trudnoći. Tijekom normalne trudnoće mikrovaskularna i makrovaskularna reaktivnost povećane su u usporedbi sa stanjem izvan trudnoće, što ukazuje na veći ukupni vazodilatacijski kapacitet ovisan o normalnoj adaptivnoj endotelnoj i vaskularnoj funkciji (125, 126, 129). Naprimjer, longitudinalno istraživanje vaskularne funkcije tijekom normalne trudnoće pokazalo je povećani FMD brahijalne arterije, povećani AChID kože procijenjen LDF-om, kao i smanjenu brzinu karotidno-femoralnog pulsog vala (PWV) u trudnica u usporedbi s netrudnim ženama, što ukazuje na poboljšanu endotelnu funkciju kao prilagodbu vaskularnog sustava na normalnu trudnoću (67). Usto sposobnost majčine vaskularne dilatacije bila je pozitivno povezana s optimalnim rastom fetusa (129). Oštećenje endotelne funkcije tijekom trudnoće smatra se kritičnim ranim događajem u hipertenzivnim poremećajima trudnoće (HPT), osobito u preeklampsiji, ali i drugim patološkim poremećajima u

trudnoći, uključujući fetalni zastoj rasta (181), a endotelna disfunkcija u preeklampsiji prisutna je čak i prije kliničkih znakova bolesti (99).

Međutim postoji kontroverza oko mogućeg ograničenja unosa soli u trudnoći, s obzirom na to da su dostupnost soli i vode tijekom trudnoće ključni čimbenici za povećanje volumena plazme. Unos soli utječe na uteroplacentarnu perfuziju i rast fetusa. Optimalan unos soli hranom rezultira većom težinom posteljice i povećanim protokom krvi u maternici (135). S druge strane nedovoljan unos soli tijekom trudnoće rezultira intrauterinim zastojem u rastu i manjom porođajnom težinom djeteta (136). Prema teoriji „fetalnog programiranja“, izloženost nedovoljnom, ali i prekomjernom majčinom unosu soli tijekom trudnoće smatra se rizičnim čimbenikom za buduće kardiovaskularne i bubrežne bolesti potomaka u njihovoj odrasloj dobi (137–139, 182). S druge strane ograničeni broj kliničkih istraživanja pokazuje da je količina unosa soli tijekom trudnoće pozitivno povezana s rizikom od razvoja HPT-a, vodećeg uzroka smrtnosti i morbiditeta majke, fetusa i novorođenčadi (84, 85, 143). Naprimjer, longitudinalno kohortno istraživanje koje je uključivalo više od 550 trudnica pokazalo je da je velik unos soli hranom, > 6 g/dan, povezan s razvojem preeklampsije (84). Arvizu i sur. prikupili su podatke upitnikom o učestalosti konzumiranja namirnica (FFQ) više od 66 500 trudnica istražujući ulogu prehrane na razvoj HPT-a i zaključili da su trudnice s dnevnim unosom soli većim od 8,8 g na dan imale 54 % veći rizik od gestacijske hipertenzije i 20 % veći rizik od preeklampsije od žena s niskim unosom soli (< 7,0 g soli na dan) (143). Dakle dostupni podatci pružaju dokaze o povezanosti između velikog unosa soli tijekom trudnoće i HPT-a, kao što ukazuju i na činjenicu da endotelna disfunkcija predstavlja rani događaj u razvoju navedenih poremećaja. Ipak razjašnjenje učinaka unosa soli hranom na endotelnu funkciju tijekom normalne trudnoće moglo bi predstavljati kariku koja nedostaje u razumijevanju razvoja patofizioloških stanja.

Ovo je istraživanje prvi put pružilo funkcionalne podatke o istovremenom smanjenju vazodilatacije ovisne o endotelu u mikrovaskulaturi i makrovaskulaturi zbog visokog unosa soli tijekom trudnoće, što odražava oslabljeni vazodilatacijski kapacitet neophodan za zdravu trudnoću, kao i prilagodbu bubrega na povećano opterećenje solju. Pronašli smo samo jedan pregledni članak sustava Cochrane o dvije studije koje su procjenjivale savjete o ograničavanju unosa soli u prehrani (npr. unos 1170 mg i 2925 mg soli na dan) za sprječavanje preeklampsije, ali prema rezultatima, oba su pokusa bila premala da bi pružila pouzdane informacije o učincima ograničavanja unosa soli tijekom normalne trudnoće (183). Stoga, kada se uzme u obzir da se restrikcija soli u prehrani

tijekom trudnoće još uvijek ne preporučuje jasno za prevenciju HPT-a, rezultati ovog istraživanja mogu doprinijeti razumijevanju slijedi li odgovor endotela na unos soli isti obrazac u trudnica i u žena koje nisu trudne te trebaju li se iste prehrambene smjernice vezane za dnevni unos soli primjenjivati i tijekom trudnoće.

Eksperimentalna istraživanja na životinjama jasno su pokazala da povećani oksidativni stres predstavlja ključni mehanizam u razvoju endotelne disfunkcije u visokoslanom prehrani. Dodatno se pokazalo da oksidativni disbalans ima ključnu ulogu u oštećenju endotelne mikrovaskularne funkcije izazvane visokoslanom prehranom i kod zdravih pojedinaca. Naprimjer, Greaney i sur. izvijestili su da lokalna primjena askorbinske kiseline (vitamin C) ublažava ili poništava oštećenje funkcije mikrovaskularnog endotela (LTH procijenjen LDF-om) uzrokovano visokoslanom prehranom u normotenzivnih odraslih osoba (49). Ranija studija naše istraživačke skupine pokazala je da je 7-dnevna visokoslana dijeta dovela do smanjenja antioksidativnog kapaciteta i povećanja oksidativnog stresa neovisno o vrijednostima krvnoga tlaka kod zdravih pojedinaca (51). Sadašnje istraživanje također je pokazalo značajno višu razinu serumskih biomarkera oksidativnog stresa, TBARS-a i 8-izo-PGF $2\alpha$ , u vrlovisokoslanim (VHS) uvjetima, kao i umjerenu pozitivnu korelaciju između unosa soli i TBARS-a. To je u skladu s podacima kod netrudnih ispitanica (51) i ukazuje da endotelna disfunkcija tijekom trudnoće izazvana visokoslanom dijetom može biti posredovana oksidativnim stresom.

Endotelna disfunkcija tijekom trudnoće, koju odlikuju promijenjena bioraspoloživost NO-a i prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) smatra se glavnim uzrokom preeklampsije (121, 184). Naprimjer, žene s preeklampsijom pokazuju povećane razine biljega oksidativnog stresa u plazmi (npr. TBARS između ostalih), a ukupni je antioksidativni status majke kod preeklampsije smanjen (185). U ovom istraživanju ukupna razina antioksidativnog kapaciteta u serumu, mjerena FRAP-om, bila je slična između dijetalnih skupina NS i HS. Nedavna studija o neuravnoteženoj redoks homeostazi u preeklampsiji izvijestila je o stimulaciji antioksidativnog peroksiredoksin-tioredoxin sustava limfocita i monocita u preeklampsiji, što ukazuje na važnu zaštitnu ulogu tog antioksidativnog sustava protiv oksidativnog stresa koji se razvija tijekom te bolesti (186). Povišeni oksidativni stres, ali nepromijenjen antioksidativni kapacitet kod trudnica koje jedu više od 5,75 grama soli dnevno, opažen u ovom istraživanju, potencijalno bi mogao biti povezan s kompenzacijskim zaštitnim antioksidativnim odgovorom na visoki unos soli. Postojala je umjerena pozitivna korelacija između FRAP-a i vazodilatacije ovisne o mikrovaskularnom

endotelu, posebno AChID-a. To je u skladu s rezultatima našeg ranijeg istraživanja u kojemu je višestruka linearna regresijska analiza pokazala da je FRAP parametar koji naj snažnije predviđa vrijednost AChID-a u zdravih osoba (51). Osim toga slaba do umjerena negativna korelacija između TBARS-a i mikrovaskularne vazodilatacije ovisne o endotelu (PORH, AChID, LTH), kao i umjerena pozitivna korelacija između dnevnog unosa soli i TBARS-a još jednom sugeriraju da bi povećani oksidativni stres mogao predstavljati potencijalnu vezu između visokog unosa soli i oštećenja endotela.

Ravnoteža između NO-a i stvaranja ROS-a ključna je za urednu funkciju endotela i održavanje vaskularnog tonusa (187). U ovom istraživanju koncentracija NO-a u serumu značajno je smanjena u skupinama HS i VHS u usporedbi sa skupinom NS, što je u skladu s funkcijskim vaskularnim rezultatima. S druge strane dostupni rezultati o bioraspoloživosti NO-a u trudnoći nedosljedni su i još nije poznato je li cirkulirajuća koncentracija NO-a viša, niža ili nepromijenjena tijekom trudnoće komplicirane preeklampsijom u usporedbi s normotenzivnom trudnoćom (188, 189). Moguće objašnjenje za to moglo bi biti kratko vrijeme poluraspada molekule NO-a i njezin istovremeni autokrini i parakrini način djelovanja. Osim toga dostupni ELISA setovi obično određuju serumski sastav NO-a mjerenjem njegovih metabolita (npr. nitrata i nitrita), koji ne odražavaju točno stvaranje NO-a ili signaliziranje NO-a na vaskularnoj razini (190). Stoga bi se to moglo smatrati ograničenjem ovoga istraživanja.

Iako endokan predstavlja snažan biomarker endotelne funkcije, učinci unosa soli na koncentraciju endokana u serumu još nisu utvrđeni. U ovom istraživanju koncentracija endokana u serumu bila je značajno viša u zdravih trudnica u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Ranije je pokazano da trudnice s preeklampsijom imaju značajno više razine endokana i više prosječne koncentracije TNF- $\alpha$  u usporedbi sa zdravim trudnicama (191). Nadalje endokan je bio visoko eksprimiran u fetalnim i majčinih endotelnim stanicama u slučaju hipertenzije tijekom trudnoće, a njegova ekspresija bila je povezana s niskom porođajnom masom djeteta i prijevremenim porođajem (192). S druge strane neka druga istraživanja nisu pokazala značajne razlike u serumskim koncentracijama endokana među ženama koje nisu trudne, normalnim trudnicama i ženama s preeklampsijom, što ukazuje da endokan možda i nije uključen u patogenezu preeklampsije (193–195).

Uzevši sve u obzir, moguće je zaključiti da je oslabljena sistemska vazodilatacija povezana s povećanim oksidativnim stresom zbog visokog unosa soli hranom, čak i kod trudnica. Je li

povećana bubrežna filtracija kompenzacijski odgovor na visoki unos soli tijekom trudnoće (196) ili je rani pokazatelj oštećenja bubrega ne može se utvrditi na temelju dostupnih podataka. Također nepromijenjeni ishod trudnoće u skupinama HS i VHS unatoč oslabljenoj vazodilataciji ovisnoj o endotelu (i povećanoj bubrežnoj filtraciji) trudnica potencijalno ukazuje na prisutnost zaštitnih kompenzacijskih mehanizama (npr. regulacija antioksidativne obrane) koji bi mogli predstavljati ključ za sprječavanje daljnjeg vaskularnog oštećenja ili razvoj HPT-a.

## **6.2. Učinak prekomjernog unosa soli u trudnoći na fetoplacentnu vaskularnu funkciju, aktivnost RAAS-a i angiogene čimbenike posteljice**

Kao što je navedeno, poznato je da prekomjerman unos soli nije samo glavni rizični čimbenik za razvoj i progresiju hipertenzije već također utječe na vaskularnu i endotelnu funkciju, čak i u odsutnosti promjena arterijskog tlaka (43). Našim istraživanjem pokazali smo da je endotelna funkcija u mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji oštećena velikim unosom soli tijekom normalne trudnoće, a Iacobeus i sur. pokazali su da endotelna funkcija u makrocirkulaciji, mjerena FMD-om brahijalne arterije, koji se smatra zlatnim standardom u procjeni makrovaskularne endotelne funkcije, odražava cirkulaciju u uteroplacentnoj jedinici (129). Sadašnje istraživanje pokazalo je smanjeni PI u srednjoj moždanoj arteriji (MCA) fetusa u trudnica koje konzumiraju više od 10,25 g soli dnevno i moguće je da bi to mogao biti znak početne uteroplacentne insuficijencije, što naglašava važnost odgovarajućeg unosa soli tijekom trudnoće za održavanje uteroplacentne funkcije, kao i vaskularne (endotelne) funkcije majke. Ipak važno je naglasiti da je cerebroplacentni omjer (CPR), prediktor nepovoljnog ishoda trudnoće (197), ostao nepromijenjen u svim našim promatranim skupinama, što pripisujemo tendenciji smanjenja indeksa pulsatilnosti i indeksa otpora (RI) u umbilikalnoj arteriji (UA) s povećanjem unosa soli u organizam. CPR (PI i RI) u svim našim ispitivanim skupinama bio je sličan, približno 2,0, a uzimajući u obzir prag abnormalnog CPR-a  $< 1$  (198) taj nalaz našeg istraživanja prihvatili smo kao potvrdu zadovoljavajućeg stanja fetusa i u visokoslanim uvjetima, što je u konačnici i potvrđeno urednim ishodom trudnoće (gestacijska dob kod porođaja, porođajna masa, Apgar-indeks) u svim ispitivanim skupinama trudnica. Ipak medijatore pojačanog protoka krvi u umbilikalnoj arteriji, što se ogleda u padu otpora u umbilikalnoj arteriji (RI UA), potencijalnog zaštitnog mehanizma fetusa u uvjetima visokog unosa soli, potrebno je dalje istražiti.

Važan je nalaz ovoga istraživanja da plazma reninska aktivnost (PRA) i koncentracija aldosterona nisu bile statistički značajno različite među ispitivanim skupinama, ali je postojala umjereno pozitivna korelacija između unosa natrija i koncentracije aldosterona u serumu. Nekoliko istraživanja pokazalo je da su visoke razine aldosterona (199) i povećani unos natrija povezani s boljim ishodom trudnoće i nižim krvnim tlakom (82, 200), no nejasno je je li za to prvenstveno odgovoran natrij ili aldosteron. Istraživanje Gennari-Moser i sur. pokazalo je da trudnoća uključuje inverznu osjetljivost na sol u usporedbi sa stanjem izvan trudnoće; u određenoj mjeri i u određenim skupinama povećani unos soli tijekom trudnoće ima pozitivan učinak i na arterijski tlak i na ishod trudnoće te je povezan s nižim razinama arterijskog tlaka (82). Potrebno je dakle razjasniti do koje je razine unosa natrija prisutna ta inverzna osjetljivost na sol, jer je također poznato da prekomjerni unos natrija, posebno u kombinaciji s niskim unosom kalija tijekom trudnoće, može potisnuti aldosteron uzrokujući lošiji uteroplacentni razvoj (84, 86). Iz navedenog istraživanja nejasno je koja je granica velikog unosa natrija (soli) do koje postoje takvi „pozitivni“ učinci soli na koncentraciju aldosterona, jer i sami autori navode da je u trudnoći, za razliku od stanja izvan trudnoće, potreban mnogo veći unos natrija za suzbijanje lučenja aldosterona, koji je jasno povezan s komplikacijama u trudnoći kao što su HPT i lošiji ishod same trudnoće. Također u navedenom istraživanju Gennari-Moser i suradnika nema podataka o unosu kalija u ispitanica, a kao ograničenje istraživanja navedena je i činjenica da je unos soli u trudnica promijenjen samo s normalnog na visoki unos soli kako bi se izbjeglo smanjenje uteroplacentne perfuzije djetom s niskim unosom soli (82). Naime neka istraživanja pokazala su da smanjenje unosa natrija tijekom trudnoće može čak predstavljati rizik od nepovoljnog ishoda trudnoće, kako za majke tako i za njihovo potomstvo (183). Ipak, treba naglasiti da su navedena opažanja zabilježena kod ekstremno niskog unosa soli < 1,15 g/dan (Na < 460 mmol/dan). Ipak te su informacije relevantne u svrhu izrade i usvajanja smjernica nadležnih tijela i radnih skupina o primjerenom unosu natrija i soli tijekom trudnoće.

Sljedeći važan nalaz ovog istraživanja jest da su unatoč visokom (> 5,75 g soli) ili čak vrlo visokom (> 10,25 g soli) dnevnom unosu soli, koji je dokazano povezan s povišenim krvnim tlakom, sve sudionice ostale normotenzivne, krvnoga tlaka ispod 140/90 mmHg. Unatoč tome nezanemariv rizik za razvoj hipertenzivnih poremećaja trudnoće, ali i opći kardiovaskularni rizik povezan s velikim unosom soli ostaje, a prethodno pokazana mikrovaskularna i makrovaskularna endotelna disfunkcija u skupinama HS i VHS pokazuje da je taj rizik prisutan kod naših ispitanica. Ranija



istraživanja pokazuju da trudnice s dnevnim unosom soli većim od 8,8 g imaju 54 % veći rizik od gestacijske hipertenzije i 20 % veći rizik od preeklampsije u usporedbi s trudnicama s niskim dnevnim unosom soli (< 7,0 g), a unos više od 6 g soli dnevno pozitivno je povezan s rizikom od razvoja preeklampsije (84, 143). Uz navedeno treba postojati svijest i o kardiovaskularnom riziku stečenom tijekom trudnoće; žene s poviješću preeklampsije imaju 3 puta veći rizik od arterijske hipertenzije i 2 puta veći rizik od koronarne bolesti srca i moždanog udara tijekom života u usporedbi s drugim ženama (146, 147).

S jedne strane retencija natrija tijekom trudnoće fiziološka je i neophodna za povećanje volumena plazme, ali s druge strane prekomjerni unos natrija uz istovremeni nizak unos kalija može potisnuti aktivnost RAAS-a i time neizravno oštetiti uteroplacentni razvoj supresijom proizvodnje aldosterona i time smanjenim izražajem VEGF-a i PlGF-a (85, 101). Ta činjenica ima poseban značaj s obzirom na to da je visoka razina aldosterona u serumu značajno povezana s nižim, povoljnijim, omjerom angiogenih čimbenika, sFlt-1 i PlGF-a. Razvoj posteljice, a posljedično i fetalni rast, zahtijeva ravnotežu proangiogenih i antiangiogenih čimbenika, dok je disbalans njihovih koncentracija u serumu tijekom trudnoće povezan s manjkavom posteljičnom angiogenezom, neodgovarajućom pregradnjom majčinih spiralnih arterija i nedovoljnom posteljičnom perfuzijom koji sudjeluju u patofiziološkim mehanizmima raznih sindroma i bolesti tijekom trudnoće, uključujući preeklampsiju, fetalni zastoj rasta, masivno perivilozno taloženje fibrina, pa čak i fetalnu smrt (102, 103). Ovim istraživanjem utvrdili smo porast serumske koncentracije PlGF-a, proangiogenog čimbenika, u slanim i visokoslanim uvjetima uz istovremeni pad koncentracije antiangiogenog čimbenika sFlt-1 u tim dvjema skupinama. Povećanje koncentracije PlGF-a može se objasniti dokazanim pozitivnim učinkom aldosterona na stimulaciju proangiogenih čimbenika (82, 83). No za antiangiogeni sFlt-1, koji smo tijekom našeg istraživanja pronašli u nižim serumskim koncentracijama u trudnica visokoslanih skupina, dosadašnja istraživanja pokazala su da je, isto kao i visoki unos soli, povezan sa stanjima povišenog oksidativnog stresa (185, 201). Moguće objašnjenje za taj, naizgled, paradoks potencijalno bismo mogli pronaći u sposobnosti posteljice da reverzibilno skladišti višak natrija bez istovremenog zadržavanja vode (161, 162). Dokazano je da nakupljeni natrij u posteljici stvara hipertoničnost koja inducira invaziju i aktivaciju makrofaga koji tada otpuštaju TonEBP i VEGF-C, što dovodi do limfangiogeneze i pojačane ekspresije eNOS (163). Tako posteljica, kroz povećanu proizvodnju NO-a, za koju je poznato da sprječava hipertenziju tijekom trudnoće i uzrokuje smanjenje

cirkulirajućih razina sFlt-1 u plazmi, u visokoslanim uvjetima održava nizak vaskularni otpor, pritom održavajući uteroplacentnu perfuziju (86, 202). Slijedom navedenoga možemo pretpostaviti da je povišena razina oksidativnog stresa povezana s visokim unosom soli koji smo izmjerili u ispitanica visokoslanih skupina odlika sistemske cirkulacije, te da je lokalno, u tkivu posteljice oksidativni stres izražen u mnogo manjoj mjeri. Uočene nepromijenjene koncentracije VEGF-a i MMP-9 u posteljičnom tkivu trudnica u skupinama HS i VHS u odnosu na skupinu NS idu u prilog navedenom. Pokazano je da je povećanje MMP-2 i MMP-9 povezano je s vazodilatacijom, placencijom i širenjem maternice tijekom normalne trudnoće, a ekspresija, tj. aktivnost MMP-a može se promijeniti tijekom komplikacija trudnoće (203). Smanjene vaskularne koncentracije MMP-2 i MMP-9 mogu dovesti do smanjene vazodilatacije, povećane vazokonstrikcije, hipertenzivne trudnoće i preeklampsije. Abnormalna ekspresija MMP-a, među ostalim, može dovesti do smanjene majčinske tolerancije, apoptoze invazivnih stanica trofoblasta, neodgovarajućeg preoblikovanja spiralnih arterija i smanjenog perfuzijskog tlaka maternice (engl. *reduced uterine perfusion pressure*, RUPP); pokazano je da to stanje uzrokuje neravnotežu između antiangiogenih čimbenika sFlt-1 i topljivog endoglina te proangiogenih VEGF-a i PlGF-a (204). Slijedom navedenog, nepromijenjene koncentracije VEGF i MMP-9 mogu biti posljedica nekog, još nerazjašnjenog zaštitnog antioksidativnog mehanizma u tkivu posteljice, povezanim sa sposobnošću tkiva da „deponira“ natrij.

Stanice trofoblasta, koji je stimuliran proangiogenim čimbenicima PlGF-om i VEGF-om, primarni su proizvođači sFlt-1 koji ulazi u cirkulaciju majke tijekom trudnoće. Pokazano je da pretjerana ekspresija VEGF-a također uzrokuje vaskularne defekte posteljice i gubitak fetusa, što ukazuje da je ograničavanje razine VEGF-a ključno za razvoj posteljice i fetalno preživljenje. sFlt-1 igra bitnu zaštitnu ulogu u normalnoj trudnoći te je porast koncentracije sFlt-1 u preeklampsiji regulatorni odgovor za zaštitu posteljice i fetusa od toksičnosti VEGF-a; utvrđeno je da povišena ekspresija VEGF-a pojačava proizvodnju sFlt-1 (205, 206). Rezultat našeg istraživanja koji pokazuje da su koncentracije MMP-9 i VEGF-a u visokoslanim uvjetima, koji odlikuje povišena razina sistemskog oksidativnog stresa, nepromijenjene u odnosu na uvjete normalnog unosa soli mogao bi još jednom ukazivati na nižu razinu oksidativnog stresa izraženu lokalno u posteljici u visokoslanim uvjetima. Taj podatak isto tako podcrtava važnost soli kao bitnog okolišnog čimbenika koji posreduje u regulaciji mnogostrukih procesa u organizmu te ukazuje na nužnost preciznijeg utvrđivanja donje i gornje granice optimalnog unosa soli tijekom trudnoće.

Sa sposobnošću posteljice da reverzibilno pohranjuje višak natrija bez istodobnog zadržavanja vode te tako ublaži višak natrija moguće je povezati i pojavu hiponatrijemije koja se javlja u više od trećine trudnica s preeklampsijom, a češće u onih s težim simptomima bolesti. Unatoč povećanom riziku za preeklampsiju uslijed visokog unosa soli, razina natrija u serumu velikog broja trudnica s preeklampsijom niža je od one normotenzivnih trudnica i trudnica s drugim oblicima HPT-a (207–209). Istraživanja pokazuju da je u navedenim slučajevima razina serumskog natrija obrnuto proporcionalna težini kliničke slike preeklampsije (152, 210), što naglašava različitost patofizioloških mehanizama koji sudjeluju u razvoju hipertenzivnih poremećaja trudnoće, posebno preeklampsije, a govori u prilog povijesnim istraživanjima kojima je pokazano da se unosom dodatne soli kod trudnica s preeklampsijom postiže snižavanje krvnoga tlaka, smanjenje učestalosti edema, antepartalnog krvarenja i drugih komplikacija bolesti (164). Ipak mehanizmi kojima dodavanje soli u preeklampsiji snižava krvni tlak i utječe na druge značajke bolesti još uvijek nisu utvrđeni.

Angiogeneza tijekom trudnoće posredovana je hormonima; estrogenom, progesteronom, posteljničnim hormonom rasta i komponentama RAAS-a od kojih aldosteron, stimulirajući ekspresiju proangiogenih čimbenika VEGF-a i PlGF-a, najznačajnije doprinosi optimalnom razvoju posteljice i rastu fetusa (83, 100, 101). Tijekom trudnoće serumska koncentracija aldosterona progresivno raste i pozitivno je povezana s koncentracijom estrogena, a taj je porast značajno veći od porasta koncentracije ostalih komponenata RAAS-a zbog snažnog utjecaja vanjskih čimbenika na sintezu aldosterona. Među njima ističe se kalij svojim izravnim poticanjem sinteze aldosterona u nadbubrežnoj žlijezdi (86). Navedenom pogoduje djelovanje progesterona koji inhibira kalijurezu i tako, osiguravajući konstantnu dostupnost kalija, doprinosi optimalnom razvoju i funkciji posteljice (87). S obzirom na to, važan je nalaz našeg istraživanja da je povećani unos natrija u promatranim skupinama HS i VHS bio popraćen paralelnim povećanjem unosa kalija te tako potencijalno pridonio nepromijenjenom i povoljnom perinatalnom ishodu trudnoće u visokoslanim skupinama ispitanica.

Uz navedene povoljne učinke kalija na sintezu aldosterona i uteroplacentnu jedinicu (211, 212), potrebno je razmotriti i druge učinke unosa kalija na organizam. Visok unos natrija s niskim unosom kalija u prehrani povezan je s povećanjem krvnog tlaka i kardiovaskularnim rizikom općenito. Posljednjih godina uveden je omjer natrija i kalija (Na/K) kao pouzdaniji indeks za procjenu kardiovaskularnog rizika i smrtnosti povezane s kardiovaskularnim oboljenjima nego

unos natrija ili kalija pojedinačno (213). Na temelju preporuka Svjetske zdravstvene organizacije za unos manje od 2000 mg natrija na dan i više od 3510 mg kalija na dan (5), vjeruje se da je omjer  $\text{Na/K} \leq 1,0$  optimalan za očuvanje zdravlja kardiovaskularnog sustava. Uzimajući u obzir nisku usklađenost opće populacije s prehrambenim smjernicama za unos natrija i kalija, kao i rezultate višestrukih istraživanja koji pokazuju da omjeri natrija i kalija između 1,0 i 2,0 također smanjuju rizik od KVB-a,  $\text{Na/K}$  omjer  $\leq 2,0$  predložen je kao suboptimalan cilj (214). Promatrajući naše ispitivane skupine, unatoč povećanju unosa kalija koje je pratilo povećanje unosa natrija u skupinama ispitanica HS i VHS, uočili smo povećanje omjera  $\text{Na/K}$  u skupinama HS i VHS, što jasno pokazuje da stopa povećanja unosa kalija nije u dovoljnoj mjeri pratila stopu povećanja unosa natrija. Navedeno govori u prilog povećanju općeg kardiovaskularnog rizika s povećanim unosom soli u trudnica jednako kao i u općoj populaciji. Uzimajući u obzir nepromijenjen perinatalni ishod u skupinama ispitanica HS i VHS u odnosu na skupinu NS jedno od potencijalnih tumačenja rezultata dobivenih ovim istraživanjem jest da se među našim ispitanicama unos kalija hranom u visokoslanim skupinama povećao dovoljno da zadovolji povećane potrebe za proizvodnjom aldosterona i očuvanjem povoljnih uvjeta u uteroplacentnoj jedinici, što i jest primarni cilj organizma trudnice tijekom trudnoće, ali da istodobno povećanje tog unosa nije bilo dovoljno da smanji opći kardiovaskularni rizik za samu trudnicu. Tome u prilog svakako govori dokazana endotelna disfunkcija u skupinama HS i VHS, jasni biljeg povećanog kardiovaskularnog rizika. Za dodati je da su se kod ispitanica molarne vrijednosti omjera natrija i kalija kretale u rasponu od najmanje 1,11 do najviše 5,24, što ukazuje na lošu činjenicu da niti jedna od 65 ispitanih trudnica nije imala omjer natrija i kalija koji bi zadovoljio preporuke WHO-a.

Zaključno, ovo je prvo istraživanje koje je funkcionalno procijenilo utječe li količina dnevnog unosa soli na vazodilataciju ovisnu o endotelu (prvenstveno dilataciju posredovanu NO-om) u perifernoj mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji zdravih trudnica. Snaga ove studije leži u tome što je endotelna funkcija istovremeno ispitana dobro utvrđenim metodama, a dnevni unos soli procijenjen je 24-satnim izlučivanjem natrija urinom. Dobiveni podatci o oslabljenoj funkciji mikrovaskularnog i makrovaskularnog endotela u trudnica s dnevnim unosom soli većim od 5,75 grama i 10,25 grama u usporedbi s onima s dnevnim unosom manjim od 5,75 g soli, potvrđuju isti obrazac oštećenja endotelne funkcije zbog opterećenja visokim unosom soli koji je pokazan kod zdravih žena koje nisu trudne. Štoviše, značajno povećana razina oksidativnog stresa u trudnica s vrlo visokim unosom soli (VHS) ukazuje na važnu ulogu oksidativnog disbalansa u oštećenju

endotelne funkcije, što je ranije pokazano u općoj zdravoj populaciji. Važno je naglasiti da je, usprkos oslabljenoj funkciji endotela, u žena koje su imale visokoslanu (HS) prehranu ishod trudnoće (gestacijska dob, porođajna masa, Apgar-indeks) bio sličan onom u žena s normalnim dnevnim unosom soli, što bi se potencijalno moglo objasniti aktivacijom nekih, još uvijek neutvrđenih kompenzacijskih mehanizama. Kada se uzme u obzir da FMD brahijalne arterije odražava protok krvi u uteroplacentalnoj jedinici, nalaz oslabljenog FMD-a zbog visokog unosa soli otvara daljnje istraživačko pitanje potencijalnog učinka povećanog unosa soli na uteroplacentnu funkciju tijekom normalne trudnoće. Ukazuju li povećane koncentracije aldosterona i PIGF-a, kao i povoljniji omjer sFlt-1/PIGF i nepromijenjene koncentracije VEGF-a i MMP-9 u posteljici na protektivni učinak unosa kalija u kombinaciji s visokim udjelom soli ili aktivaciju drugog kompenzacijskog mehanizam usmjerenog na očuvanje funkcije posteljice i samog ishoda trudnoće predstoji istražiti u daljnjim istraživanjima.

## 7. ZAKLJUČCI

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

- velik unos soli hranom povezan je s oslabljenom maternalnom makrovaskularnom i mikrovaskularnom vazodilatacijom ovisnom o endotelu u zdravih trudnica te povećanim sistemskim oksidativnim stresom majke
- oslabljena maternalna makrovaskularna i mikrovaskularna vazodilatacija uslijed velikog unosa soli događa se neovisno o gestacijskom prirastu tjelesne težine, sastavu tijela i tjelesnih tekućina ili arterijskom tlaku trudnice
- oslabljeni vazodilatacijski odgovor ovisan o endotelu povezan s velikim unosom soli popraćen je smanjenom koncentracijom dušikovog oksida i povećanom koncentracijom endokana u serumu
- velik unos soli hranom tijekom trudnoće povezan je s povišenom koncentracijom aldosterona te značajno smanjenim omjerom topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 i posteljiničnog čimbenika rasta što može ukazivati na aktivaciju kompenzacijskih mehanizama, kao što je smanjeni lokalni oksidativni stres u posteljici
- koncentracije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C i matriks metaloproteinaze 9 u tkivu posteljice nisu se razlikovale među skupinama zdravih trudnica s normalnim, velikim i vrlo velikim unosom soli
- velik visoki unos soli hranom tijekom trudnoće povezan je sa smanjenim indeksom pulsatilnosti srednje moždane arterije fetusa što može ukazivati na početnu insuficijenciju posteljice u uvjetima vrlo visokog unosa soli
- velik unos soli hranom nije imao značajan utjecaj na ishod trudnoće (gestacijska dob, porođajna masa djeteta, Apgar-indeks)

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj unosa soli hranom tijekom normalne trudnoće na maternalnu mikrovaskularnu i makrovaskularnu reaktivnost ovisnu o endotelu, razinu oksidativnog stresa, indekse fetoplacentne vaskularne funkcije, aktivnost renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava, ravnotežu placentnih proangiogenih i antiangiogenih čimbenika te biljege pregradnje posteljice.

**Nacrt studije:** Ovo istraživanje ustrojeno je kao presječna opservacijska studija u kojoj su svim ispitanicima uzeti podaci, uzorkovanja i izvršena mjerenja u dvije vremenske točke.

**Ispitanici i metode:** Na temelju 24-satne natrijureze trudnice (37 – 40 tjedana trudnoće) podijeljene su u tri skupine: normalni unos soli (NS; < 5,75 g/dan, N = 12), velik unos soli (HS; 5,75 – 10,25 g/dan, N = 36) i vrlo velik unos soli (VHS; > 10,25 g/dan, N = 17). Svim ispitanicama izmjerena je mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju, lokalno zagrijavanje (LTH) i iontoforezu acetilkolina (AChID), kao i protokom posredovana dilatacija (FMD) brahijalne arterije. Izmjereni su sljedeći biljezi endotelne funkcije i oksidativnog stresa: serumska koncentracija dušikovog oksida (NO), endokana, 8-izo-prostaglandina F<sub>2a</sub> (8-izo-PGF<sub>2a</sub>), reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) i sposobnost redukcije željeza u plazmi. Izmjereni su ultrazvučni pokazatelji fetoplacentne funkcije, aktivnost renina u plazmi, koncentracija aldosterona, topljive fms-u slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1) i posteljičnog čimbenika rasta (PlGF) u serumu te koncentracija vaskularnog endotelnog čimbenika rasta C (VEGF-C) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u tkivu posteljice.

**Rezultati:** FMD brahijalne arterije, mikrovaskularni AChID i LTH značajno su smanjeni u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS, a i LTH u skupini NS u usporedbi sa skupinom HS. NO je bio značajno smanjen u skupinama HS i VHS u usporedbi sa skupinom NS. Endokan, 8-izo-PGF<sub>2a</sub> i TBARS bili su značajno povećani u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Indeks pulsatilnosti fetalne srednje cerebralne arterije (MCA) bio je značajno smanjen u skupinama HS i VHS u usporedbi sa skupinom NS. Koncentracija aldosterona pokazala je tendenciju porasta s unosom soli, a omjer sFlt-1/PlGF bio je značajno smanjen u skupini VHS u usporedbi sa skupinom NS. Koncentracija VEGF-C i MMP-9 nije se razlikovala među skupinama.

**Zaključak:** Velik unos soli hranom povezan je sa smanjenom vazodilatacijom ovisnom o endotelu posredovanom NO-om u perifernoj mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji zdravih trudnica te povećanim oksidativnim stresom. Nadalje velik unos soli povezan je sa smanjenom pulsatilnošću fetalne MCA, ali i povišenom koncentracijom aldosterona, smanjenim (povoljnijim) omjerom sFlt-1/PlGF i nepromijenjenim biljezima pregradnje posteljice.

**Ključne riječi:** sol, endotel, vaskularna funkcija, trudnoća, aldosteron, placentni čimbenik rasta, vaskularni-endotelni čimbenik rasta



## 9. SUMMARY

**Title:** The effects of salt intake on vascular function in pregnant women in the third trimester of pregnancy

**Objectives:** The aim of the study was to investigate the effects of dietary salt intake during normal pregnancy on maternal endothelium-dependent micro- and macrovascular reactivity, degree of oxidative stress, indices of fetoplacental vascular function, activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), balance of placental pro- and antiangiogenic factors, and biomarkers of placental remodeling.

**Study design:** This study was designed as a cross-sectional observational study in which data, samples and measurements were taken from all respondents at two time points.

**Participants and Methods:** Based on 24-hour natriuresis, pregnant women (37–40 weeks gestation) were divided into three groups: normal salt intake (NS; <5.75 g/day, N=12), high salt intake (HS; 5.75 – 10.25 g/day N=36), and very high salt intake (VHS; >10.25 g/day, N=17). In all subjects, microvascular reactivity of the forearm skin was measured in response to vascular occlusion, local heating (LTH) and acetylcholine iontophoresis (AChID), as well as flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery. The following biomarkers of endothelial function and oxidative stress were measured: serum concentrations of nitric oxide (NO), endocan, 8-iso-prostaglandin F2a (8-iso-PGF2a), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the ferric reducing ability of plasma. Ultrasound indices of fetoplacental function, plasma renin activity, aldosterone concentration, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF) were measured in serum, and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration were measured in placental tissue.

**Results:** Brachial artery FMD, microvascular AChID and LTH were significantly reduced in the VHS group compared to the NS group, and LTH was also significantly reduced in the NS group compared to the HS group. NO was significantly reduced in both the HS and VHS groups compared to the NS group. Endocan, 8-iso-PGF2a and TBARS were significantly increased in the VHS group compared to the NS group. Fetal middle cerebral artery (MCA) pulsatility index was significantly reduced in the HS and VHS groups compared to the NS group. Aldosterone concentration showed a tendency to increase with salt intake, and the sFlt-1/PlGF ratio was significantly reduced in the

VHS group compared to the NS group. The concentration of VEGF-C and MMP-9 did not differ between the observed groups.

**Conclusions:** High dietary salt intake is associated with reduced endothelium-dependent NO-mediated vasodilatation in the peripheral microcirculation and macrocirculation of healthy pregnant women and increased oxidative stress. Furthermore, high salt intake is associated with decreased fetal MCA pulsatility, but also with increased aldosterone concentration, decreased (more favorable) sFlt-1/PlGF ratio and unchanged markers of placental remodeling.

**Keywords:** salt, endothelium, vascular function, pregnancy, aldosterone, placental growth factor, vascular-endothelial growth factor

**10. LITERATURA**

1. World Health Organization. WHO. Sodium Reduction-Fact Sheets. Available from: [who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction](http://who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction). Accessed on Jan 15, 2024. 2023. Sodium Reduction-Fact Sheets.
2. Dickinson KM, Clifton PM, Keogh JB. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Mar 1;93(3):500–5.
3. 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.
4. Campbell NR, Khalsa T, Lackland DT, Niebylski ML, Nilsson PM, Redburn KA, et al. High Blood Pressure 2016: Why Prevention and Control Are Urgent and Important. The World Hypertension League, International Society of Hypertension, World Stroke Organization, International Diabetes Foundation, International Council of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, International Society of Nephrology. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2016 Aug 17;18(8):714–7.
5. World Health Organization. WHO Guideline: Sodium Intake for Adults and Children. 2012.
6. Stallings VA, Harrison M, Oria M, editors. *Dietary Reference Intakes for Sodium and Potassium*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2019.
7. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol*. 2009 Jun 1;38(3):791–813.
8. Drewnowski A, Rehm CD, Maillot M, Mendoza A, Monsivais P. The feasibility of meeting the WHO guidelines for sodium and potassium: a cross-national comparison study. *BMJ Open*. 2015 Mar 20;5(3):e006625–e006625.
9. European Commission. Survey on Member States' implementation of the EU salt reduction framework. 2014.

10. 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;3(12):e003733.
11. 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.
12. Jelakovic B. Salt Intake In Croatia - EHUH 2; 41st Symposium Hypertension Highlights in 2020. In 2020.
13. Epstein FH, Vane JR, Änggård EE, Botting RM. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. *New England Journal of Medicine*. 1990 Jul 5;323(1):27–36.
14. Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 7;20(18):4411.
15. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010 Dec 23;4(1):302–12.
16. Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*. 2014 Apr 2;35(14):888–94.
17. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris Nikolaos Papageorgiou C, Stefanadis C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Jan 1;10(1):4–18.
18. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr 1;33(7):829–37.
19. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*. 2006 Apr 4;113(13):1708–14.
20. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb;23(2):168–75.
21. Boulanger CM. Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Apr;36(4).

22. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS. Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front Pharmacol.* 2020 Jan 21;10.
23. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840–4.
24. Tomasian D. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):426–35.
25. 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.
26. 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;82(12):1535–9.
27. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Heart.* 1995 Sep 1;74(3):247–53.
28. ROUSTIT M, CRACOWSKI J. Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods. *Microcirculation.* 2012 Jan 21;19(1):47–64.
29. STERN MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature.* 1975 Mar;254(5495):56–8.
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. Durand S, Tartas M, Bouyé P, Koitka A, Saumet JL, Abraham P. Prostaglandins participate in the late phase of the vascular response to acetylcholine iontophoresis in humans. *J Physiol.* 2004 Dec 10;561(3):811–9.

32. Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, Kenney WL. Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin. *J Physiol*. 2005 Mar 8;563(3):965–73.
33. Noon JP, Walker BR, Hand MF, Webb DJ. Studies with iontophoretic administration of drugs to human dermal vessels in vivo: cholinergic vasodilatation is mediated by dilator prostanoids rather than nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol*. 1998 Jun 4;45(6):545–50.
34. Minson CT, Berry LT, Joyner MJ. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol*. 2001 Oct 1;91(4):1619–26.
35. Wu CH, Mohammadmoradi S, Chen JZ, Sawada H, Daugherty A, Lu HS. Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jul;38(7).
36. Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1996 Sep 1;271(3):F659–69.
37. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1627–738.
38. Nickenig G, Harrison DG. The AT<sub>1</sub>-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis. *Circulation*. 2002 Jan 22;105(3):393–6.
39. Mishra JS, Gopalakrishnan K, Kumar S. Pregnancy upregulates angiotensin type 2 receptor expression and increases blood flow in uterine arteries of rats†. *Biol Reprod*. 2018 Nov 1;99(5):1091–9.
40. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 1997 Sep;30(3):535–41.
41. Tamanna S, Clifton VL, Rae K, van Helden DF, Lumbers ER, Pringle KG. Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in Pregnancy: Preeclampsia and Small for Gestational Age. *Front Physiol*. 2020 Sep 30;11.

42. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):505–53.
43. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2015. p. 215–54.
44. Weinberger MH. Salt Sensitivity Is Associated With an Increased Mortality in Both Normal and Hypertensive Humans. *The Journal of Clinical Hypertension.* 2002 Jul 31;4(4):274–6.
45. 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.
46. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, et al. The role of cyclooxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol.* 2015 Dec 15;593(24):5313–24.
47. 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.
48. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315–424.
49. 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;590(21):5519–28.
50. 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.
51. 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):843.
52. 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 16;594(17):4917–31.
53. 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 1;24(5):563–8.
54. 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 1;26(6):739–47.
55. Meah VL, Cockcroft JR, Backx K, Shave R, Stöhr EJ. Cardiac output and related haemodynamics during pregnancy: a series of meta-analyses. *Heart.* 2016 Apr 1;102(7):518–26.
56. Metcalfe J, Ueland K. Maternal cardiovascular adjustments to pregnancy. *Prog Cardiovasc Dis.* 1974 Jan;16(4):363–74.
57. Pritchard JA. Changes in the Blood Volume During Pregnancy and Delivery. *Anesthesiology.* 1965 Jul 1;26(4):393–9.
58. Sanghavi M, Rutherford JD. Cardiovascular Physiology of Pregnancy. *Circulation.* 2014 Sep 16;130(12):1003–8.
59. Mahendru AA, Everett TR, Wilkinson IB, Lees CC, McEniery CM. A longitudinal study of maternal cardiovascular function from preconception to the postpartum period. *J Hypertens.* 2014 Apr;32(4):849–56.
60. Conrad KP. Mechanisms of Renal Vasodilation and Hyperfiltration During Pregnancy. *J Soc Gynecol Investig.* 2004 Oct 28;11(7):438–48.



61. Conrad KP, Davison JM. The renal circulation in normal pregnancy and preeclampsia: is there a place for relaxin? *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014 May 15;306(10):F1121–35.
62. Fisher C, MacLean M, Morecroft I, Seed A, Johnston F, Hillier C, et al. Is the Pregnancy Hormone Relaxin Also a Vasodilator Peptide Secreted by the Heart? *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):292–5.
63. West CA, Sasser JM, Baylis C. The enigma of continual plasma volume expansion in pregnancy: critical role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2016 Dec 1;311(6):F1125–34.
64. Asayama K, Imai Y. The impact of salt intake during and after pregnancy. *Hypertension Research*. 2018 Jan 19;41(1):1–5.
65. Gibson HM. PLASMA VOLUME AND GLOMERULAR FILTRATION RATE IN PREGNANCY AND THEIR RELATION TO DIFFERENCES IN FETAL GROWTH. *BJOG*. 1973 Dec;80(12):1067–74.
66. Hibbard JU, Shroff SG, Cunningham FG. Cardiovascular Alterations in Normal and Preeclamptic Pregnancy. In: *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. Elsevier; 2015. p. 291–313.
67. Iacobaeus C, Andolf E, Thorsell M, Bremme K, Jörneskog G, Östlund E, et al. Longitudinal study of vascular structure and function during normal pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2017 Jan;49(1):46–53.
68. Vricella LK. Emerging understanding and measurement of plasma volume expansion in pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2017 Dec;106:1620S-1625S.
69. Odutayo A, Hladunewich M. Obstetric Nephrology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Dec;7(12):2073–80.
70. Lopes van Balen VA, Gansewinkel TAG, Haas S, Spaan JJ, Ghossein-Doha C, Kuijk SMJ, et al. Maternal kidney function during pregnancy: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2019 Sep 6;54(3):297–307.

71. Irani RA, Xia Y. The Functional Role of the Renin–Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia. *Placenta*. 2008 Sep;29(9):763–71.
72. Pringle KG, Tadros MA, Callister RJ, Lumbers ER. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: Roles in trophoblast invasion and angiogenesis? *Placenta*. 2011 Dec;32(12):956–62.
73. Cunningham FG (editor). *Williams Obstetrics*. 24th ed. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Hoffman BL, Casey BM, et al., editors. New York: McGraw-Hill; 2014. 58–62 p.
74. Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014 Jan 15;306(2):R91–101.
75. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in Normal and Preeclamptic Pregnancy. *Endocrine*. 2002;18(3):239–46.
76. Alexander BT, South AM, August P, Bertagnolli M, Ferranti EP, Grobe JL, et al. Appraising the Preclinical Evidence of the Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Antenatal Programming of Maternal and Offspring Cardiovascular Health Across the Life Course: Moving the Field Forward: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2023 May;80(5).
77. Hering L, Herse F, Geusens N, Verlohren S, Wenzel K, Staff AC, et al. Effects of Circulating and Local Uteroplacental Angiotensin II in Rat Pregnancy. *Hypertension*. 2010 Aug;56(2):311–8.
78. AbdAlla S, Abdel-Baset A, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Mesangial AT<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> Receptor Heterodimers Contribute to Angiotensin II Hyperresponsiveness in Experimental Hypertension. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2005;26(2–3):185–92.
79. ASSALI NS, WESTERSTEN A. Regional Flow-Pressure Relationship in Response to Angiotensin in the Intact Dog and Sheep. *Circ Res*. 1961 Jan;9(1):189–93.

80. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A Study of Angiotensin II Pressor Response throughout Primigravid Pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*. 1973 Nov 1;52(11):2682–9.
81. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1003–9.
82. Gennari-Moser C, Escher G, Kramer S, Dick B, Eisele N, Baumann M, et al. Normotensive Blood Pressure in Pregnancy. *Hypertension*. 2014 Feb;63(2):362–8.
83. Mistry HD, Klossner R, Kallol S, Lüthi MP, Moser R, Schneider H, et al. Effects of aldosterone on the human placenta: Insights from placental perfusion studies. *Placenta*. 2022 Jun;123:32–40.
84. Birukov A, Andersen LB, Herse F, Rakova N, Kitlen G, Kyhl HB, et al. Aldosterone, Salt, and Potassium Intakes as Predictors of Pregnancy Outcome, Including Preeclampsia. *Hypertension*. 2019 Aug;74(2):391–8.
85. Nielsen LH, Ovesen P, Hansen MR, Brantlov S, Jespersen B, Bie P, et al. Changes in the renin-angiotensin-aldosterone system in response to dietary salt intake in normal and hypertensive pregnancy. A randomized trial. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2016 Nov;10(11):881-890.e4.
86. Scaife PJ, Mohaupt MG. Salt, aldosterone and extrarenal Na<sup>+</sup> - sensitive responses in pregnancy. *Placenta*. 2017 Aug;56:53–8.
87. Tkachenko O, Shchekochikhin D, W. Schrier R. Hormones and Hemodynamics in Pregnancy. *Int J Endocrinol Metab*. 2014 Apr 1;12(2).
88. Lindheimer MD, August P. Aldosterone, maternal volume status and healthy pregnancies: a cycle of differing views. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 Jun 1;24(6):1712–4.
89. Wang Y, Gu Y, Alexander JS, Lewis DF. Histone deacetylase inhibition disturbs the balance between ACE and chymase expression in endothelial cells: a potential mechanism of chymase activation in preeclampsia. *Hypertension Research*. 2019 Feb 5;42(2):155–64.

90. Kingdom JCP, McQueen J, Connell JMC, Whittle MJ. Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *BJOG*. 1993 May 19;100(5):476–82.
91. Aggarwal S, Makris A, Hennessy A. Linking the old and new — do angiotensin II type 1 receptor antibodies provide the missing link in the pathophysiology of preeclampsia? *Hypertens Pregnancy*. 2015 Jul 3;34(3):369–82.
92. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and Biochemical Evidence of Endothelial Cell Dysfunction in the Pregnancy Syndrome Preeclampsia. *Am J Hypertens*. 1991 Aug;4(8):700–8.
93. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *Journal of Clinical Investigation*. 1999 Apr 1;103(7):945–52.
94. Siddiqui AH, Irani RA, Blackwell SC, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibody Is Highly Prevalent in Preeclampsia. *Hypertension*. 2010 Feb;55(2):386–93.
95. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005;6(2):209.
96. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*. 2007 Aug;130(4):691–703.
97. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. *Placenta*. 2004 Feb;25(2–3):103–13.
98. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the Pathophysiological Implications and Clinical Role of Angiogenic Factors in Pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2015;37(2):81–92.
99. Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic Factors. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 30;20(17):4246.

100. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009 Oct;89(4):1177–215.
101. Gennari-Moser C, Khankin E V., Schüller S, Escher G, Frey BM, Portmann CB, et al. Regulation of Placental Growth by Aldosterone and Cortisol. *Endocrinology.* 2011 Jan 1;152(1):263–71.
102. Romero R, Jung E, Chaiworapongsa T, Erez O, Gudicha DW, Kim YM, et al. Toward a new taxonomy of obstetrical disease: improved performance of maternal blood biomarkers for the great obstetrical syndromes when classified according to placental pathology. *Am J Obstet Gynecol.* 2022 Oct;227(4):615.e1-615.e25.
103. Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio placentae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):313–27.
104. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011 Jan;31(1):33–46.
105. Bird IM, Zhang L, Magness RR. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2003 Feb 1;284(2):R245–58.
106. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 1997 Feb 1;272(2):R441–63.
107. Lopes van Balen VA, van Gansewinkel TAG, de Haas S, van Kuijk SMJ, van Drongelen J, Ghossein-Doha C, et al. Physiological adaptation of endothelial function to pregnancy: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2017 Dec 4;50(6):697–708.
108. Boeldt DS, Bird IM. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *Journal of Endocrinology.* 2017 Jan;232(1):R27–44.
109. O’Leary P, Boyne P, Flett P, Beilby J, James I. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. *Clin Chem.* 1991 May;37(5):667–72.

110. Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and fetal-placental arterial beds. *Pharmacol Ther.* 1995 Jan;65(2):215–39.
111. Choi JW, Im MW, Pai SH. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(3):257–63.
112. Bhavina K, Radhika J, Pandian SS. VEGF and eNOS Expression in Umbilical Cord from Pregnancy Complicated by Hypertensive Disorder with Different Severity. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–6.
113. Mannaerts D, Faes E, Gielis J, Van Craenenbroeck E, Cos P, Spaanderman M, et al. Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018 Dec 27;18(1):60.
114. Magness RR, Shideman CR, Habermehl DA, Sullivan JA, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. V. Effects of ovariectomy, the ovarian cycle, and pregnancy on prostacyclin synthase expression☆. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000 Mar;60(4–6):103–18.
115. Morton JS, Davidge ST. Arterial Endothelium-derived Hyperpolarization. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013 Mar;61(3):197–203.
116. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension.* 2007 Mar;49(3):590–6.
117. Chen D bao, Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane Estrogen Receptor-Dependent Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Mediates Acute Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Estrogen in Uterine Artery Endothelial Cells. *Endocrinology.* 2004 Jan 1;145(1):113–25.
118. Kazi AA, Koos RD. Estrogen-Induced Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ , Vascular Endothelial Growth Factor Expression, and Edema in the Uterus Are Mediated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Endocrinology.* 2007 May 1;148(5):2363–74.

119. Yi FX, Magness RR, Bird IM. Simultaneous imaging of  $[Ca^{2+}]_i$  and intracellular NO production in freshly isolated uterine artery endothelial cells: effects of ovarian cycle and pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005 Jan;288(1):R140–8.
120. Hermenegildo C, Oviedo PJ, García-Martínez MC, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A. Progestogens stimulate prostacyclin production by human endothelial cells. *Human Reproduction*. 2005 Jun 1;20(6):1554–61.
121. SÁñchez-Aranguren LC, Prada CE, Riañ±o-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol*. 2014 Oct 10;5.
122. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008 Jan;75(1):1–8.
123. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Giuliani E, De Siati L, Cicogna S, et al. Clustering of Endothelial Markers of Vascular Damage in Human Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension*. 1998 Nov;32(5):862–8.
124. FABER-SWENSSON AP, O'CALLAGHAN SPM, WALTERS WAW. Endothelial cell function enhancement in a late normal human pregnancy. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2004 Dec 6;44(6):525–9.
125. Dørup I, Skajaa K, Sørensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1999 Mar 1;276(3):H821–5.
126. Savvidou MD, Kametas NA, Donald AE, Nicolaides KH. Non-invasive assessment of endothelial function in normal pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* [Internet]. 2000 Jun;15(6):502–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-0705.2000.00131.x>
127. Miyague AH, Martins WP, Machado JSR, Palei AC, Amaral LM, Teixeira DM, et al. Maternal Flow-Mediated Dilation and Nitrite Concentration During Third Trimester of Pregnancy and Postpartum Period. *Hypertens Pregnancy*. 2013 Aug 19;32(3):225–34.

128. Quinton AE, Cook CM, Peek MJ. A Longitudinal Study Using Ultrasound to Assess Flow-Mediated Dilatation in Normal Human Pregnancy. *Hypertens Pregnancy*. 2007 Jan 7;26(3):273–81.
129. Iacobaeus C, Kahan T, Jörneskog G, Bremme K, Thorsell M, Andolf E. Fetal growth is associated with first-trimester maternal vascular function. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2016 Oct;48(4):483–90.
130. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *The Lancet*. 2003 May;361(9368):1511–7.
131. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *The Lancet*. 2010 Aug;376(9741):631–44.
132. Weissgerber TL, Milic NM, Milin-Lazovic JS, Garovic VD. Impaired Flow-Mediated Dilation Before, During, and After Preeclampsia. *Hypertension*. 2016 Feb;67(2):415–23.
133. Harnack LJ, Cogswell ME, Shikany JM, Gardner CD, Gillespie C, Loria CM, et al. Sources of Sodium in US Adults From 3 Geographic Regions. *Circulation*. 2017 May 9;135(19):1775–83.
134. Seo Y, Jeong YS, Koo K, Yang JI, Park YK. Maternal nutrition intervention focused on the adjustment of salt and sugar intake can improve pregnancy outcomes. *Food Sci Nutr*. 2020 Jul 10;8(7):3900–11.
135. Leandro SM, Furukawa LNS, Shimizu MHM, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, et al. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin–angiotensin system. *Physiol Behav*. 2008 Sep;95(1–2):145–51.
136. Sakuyama H, Katoh M, Wakabayashi H, Zulli A, Kruzliak P, Uehara Y. Influence of gestational salt restriction in fetal growth and in development of diseases in adulthood. *J Biomed Sci*. 2016 Dec 20;23(1):12.



137. Kwon EJ, Kim YJ. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci.* 2017;60(6):506.
138. Piecha G, Koleganova N, Ritz E, Muller A, Fedorova O V., Bagrov AY, et al. High salt intake causes adverse fetal programming--vascular effects beyond blood pressure. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2012 Sep 1;27(9):3464–76.
139. Rodríguez-Rodríguez P, Ramiro-Cortijo D, Reyes-Hernández CG, López de Pablo AL, González MC, Arribas SM. Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Front Physiol.* 2018 May 23;9.
140. Kanata M, Liazou E, Chainoglou A, Kotsis V, Stabouli S. Clinical outcomes of hypertensive disorders in pregnancy in the offspring during perinatal period, childhood, and adolescence. *J Hum Hypertens.* 2021 Dec 13;35(12):1063–73.
141. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, Karumanchi SA, McCarthy FP, Saito S, et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension.* 2018 Jul;72(1):24–43.
142. Sibai B. Diagnosis and Management of Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology.* 2003 Jul;102(1):181–92.
143. Arvizu M, Bjerregaard AA, Madsen MT, Granström C, Halldorsson TI, Olsen SF, et al. Sodium Intake During Pregnancy, but Not Other Diet Recommendations Aimed at Preventing Cardiovascular Disease, Is Positively Related to Risk of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *J Nutr.* 2019 Jan;150(1):159–66.
144. Chappell LC, Cluver CA, Kingdom J, Tong S. Pre-eclampsia. *The Lancet.* 2021 Jul;398(10297):341–54.
145. Umesawa M, Kobashi G. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: prevalence, risk factors, predictors and prognosis. *Hypertension Research.* 2017 Mar 29;40(3):213–20.
146. Garovic VD, White WM, Vaughan L, Saiki M, Parashuram S, Garcia-Valencia O, et al. Incidence and Long-Term Outcomes of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *J Am Coll Cardiol.* 2020 May;75(18):2323–34.

147. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007 Nov 10;335(7627):974.
148. Salles GF, Schlüssel MM, Farias DR, Franco-Sena AB, Rebelo F, Lacerda EMA, et al. Blood Pressure in Healthy Pregnancy and Factors Associated With No Mid-Trimester Blood Pressure Drop: A Prospective Cohort Study. *Am J Hypertens*. 2015 May 1;28(5):680–9.
149. Macdonald-Wallis C, Tilling K, Fraser A, Nelson SM, Lawlor DA. Associations of Blood Pressure Change in Pregnancy With Fetal Growth and Gestational Age at Delivery. *Hypertension*. 2014 Jul;64(1):36–44.
150. Martillotti G, Ditisheim A, Burnier M, Wagner G, Boulvain M, Irion O, et al. Increased Salt Sensitivity of Ambulatory Blood Pressure in Women With a History of Severe Preeclampsia. *Hypertension*. 2013 Oct;62(4):802–8.
151. Inoue M, Tsuchihashi T, Hasuo Y, Ogawa M, Tominaga M, Arakawa K, et al. Salt Intake, Home Blood Pressure, and Perinatal Outcome in Pregnant Women. *Circulation Journal*. 2016;80(10):2165–72.
152. Antonia Dröge L, Eidmann J, Aigner A, Frank L, Perschel FH, Henrich W, et al. Relevance of maternal sodium level for preeclampsia-associated adverse pregnancy outcomes. *Pregnancy Hypertens*. 2021 Aug;25:110–5.
153. Kyojuka H, Fukusda T, Murata T, Yamaguchi A, Kanno A, Yasuda S, et al. Impact of preconception sodium intake on hypertensive disorders of pregnancy: The Japan Environment and Children’s study. *Pregnancy Hypertens*. 2021 Mar;23:66–72.
154. van Buul B, Steegers E, Jongsma H, Rijpkema A, Eskes T, Thomas C, et al. Dietary sodium restriction in the prophylaxis of hypertensive disorders of pregnancy: effects on the intake of other nutrients. *Am J Clin Nutr*. 1995 Jul;62(1):49–57.
155. van der Maten GD. Low sodium diet in pregnancy: effects on maternal nutritional status. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1995 Jul;61(1):63–4.

156. Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2014 Apr;4(2):105–45.
157. Task Force on Hypertension in Pregnancy. The American College of Obstetricians and Gynecologists. *Hypertension in Pregnancy*. *Obstetrics & Gynecology*. 2013 Nov;122(5):1122–31.
158. World Health Organisation. WHO recommendations for Prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. 2011.
159. Chen J, Gu D, Huang J, Rao DC, Jaquish CE, Hixson JE, et al. Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *The Lancet*. 2009 Mar;373(9666):829–35.
160. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health commissioned by the NI for H and CE (NICE). *Hypertension in Pregnancy: The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy*. 2010.
161. Achur RN, Valiyaveetil M, Alkhalil A, Ockenhouse CF, Gowda DC. Characterization of Proteoglycans of Human Placenta and Identification of Unique Chondroitin Sulfate Proteoglycans of the Intervillous Spaces That Mediate the Adherence of Plasmodium falciparum-infected Erythrocytes to the Placenta. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Dec;275(51):40344–56.
162. Chui A, Murthi P, Brennecke SP, Ignjatovic V, Monagle PT, Said JM. The Expression of Placental Proteoglycans in Pre-Eclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 2012;73(4):277–84.
163. 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.
164. Robinson M. SALT IN PREGNANCY. *The Lancet*. 1958 Jan;271(7013):178–81.
165. Bateman BT, Paterno E, Desai RJ, Seely EW, Mogun H, Dejene SZ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and the Risk of Congenital Malformations. *Obstetrics & Gynecology*. 2017 Jan;129(1):174–84.

166. Paauw ND, Joles JA, Spradley FT, Bakrania B, Zsengeller ZK, Franx A, et al. Exposure to placental ischemia impairs postpartum maternal renal and cardiac function in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2017 May 1;312(5):R664–70.
167. Committee Opinion No. 644. *Obstetrics & Gynecology*. 2015 Oct;126(4):e52–5.
168. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2011 Jan 7;37(1):116–26.
169. Arbeille P, Patat F, Tranquart F, Body G, Berson M, Roncin A, et al. [Doppler examination of the umbilical and cerebral arterial circulation of the fetus]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1987;16(1):45–51.
170. 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.
171. Vulin M, Magušić L, Metzger AM, Muller A, Drenjančević I, Jukić I, et al. Sodium-to-Potassium Ratio as an Indicator of Diet Quality in Healthy Pregnant Women. *Nutrients*. 2022 Dec 1;14(23).
172. Tolj I, Stupin A, Drenjančević I, Šušnjara P, Perić L, Stupin M. The Role of Nitric Oxide in the Micro- and Macrovascular Response to a 7-Day High-Salt Diet in Healthy Individuals. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 12;24(8):7157.
173. Adali E, Kurdoglu M, Adali F, Cim N, Yildizhan R, Kulusari A. The relationship between brachial artery flow-mediated dilatation, high sensitivity C-reactive protein, and uterine artery doppler velocimetry in women with pre-eclampsia. *Journal of Clinical Ultrasound*. 2011 May;39(4):191–7.
174. Yinon Y, Kingdom JCP, Odutayo A, Moineddin R, Drewlo S, Lai V, et al. Vascular Dysfunction in Women With a History of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Circulation*. 2010 Nov 2;122(18):1846–53.

175. Yoshida A, Nakao S, Kobayashi M, Kobayashi H. Flow-Mediated Vasodilation and Plasma Fibronectin Levels in Preeclampsia. *Hypertension*. 2000 Sep;36(3):400–4.
176. Rossitto G, Maiolino G, Lerco S, Ceolotto G, Blackburn G, Mary S, et al. High sodium intake, glomerular hyperfiltration, and protein catabolism in patients with essential hypertension. *Cardiovasc Res*. 2021 Apr 23;117(5):1372–81.
177. Schmidlin O, Forman A, Tanaka M, Sebastian A, Morris RC. NaCl-Induced Renal Vasoconstriction in Salt-Sensitive African Americans. *Hypertension*. 1999 Feb;33(2):633–9.
178. Wenstedt EFE, Verberk SGS, Kroon J, Neele AE, Baardman J, Claessen N, et al. Salt increases monocyte CCR2 expression and inflammatory responses in humans. *JCI Insight*. 2019 Nov 1;4(21).
179. Burnier M, Rutschmann B, Nussberger J, Versaggi J, Shahinfar S, Waeber B, et al. Salt-dependent renal effects of an angiotensin II antagonist in healthy subjects. *Hypertension*. 1993 Sep;22(3):339–47.
180. Krikken JA, Lely AT, Bakker SJL, Navis G. The effect of a shift in sodium intake on renal hemodynamics is determined by body mass index in healthy young men. *Kidney Int*. 2007 Feb;71(3):260–5.
181. Formanowicz D, Malińska A, Nowicki M, Kowalska K, Gruca-Stryjak K, Bręborowicz G, et al. Preeclampsia with Intrauterine Growth Restriction Generates Morphological Changes in Endothelial Cells Associated with Mitochondrial Swelling—An In Vitro Study. *J Clin Med*. 2019 Nov 15;8(11):1994.
182. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Müller A, Weckbach M, et al. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2011 Aug;301(2):F344–54.
183. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S. Altered dietary salt for preventing pre-eclampsia, and its complications. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2005 Oct 19;
184. Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 2;16(3):4600–14.

185. Chiarello DI, Abad C, Rojas D, Toledo F, Vázquez CM, Mate A, et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020 Feb;1866(2):165354.
186. Alasztics B, Kovács ÁF, Pállinger É, Szabó-Taylor KÉ, Szabó G, Molvarec A, et al. Upregulation of exofacial peroxiredoxin-thioredoxin system of lymphocytes and monocytes in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2023 Mar;31:54–9.
187. McElwain CJ, Tuboly E, McCarthy FP, McCarthy CM. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Pre-eclampsia and Gestational Diabetes Mellitus: Windows Into Future Cardiometabolic Health? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 11;11.
188. Aggarwal PK, Jain V, Jha V. Endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertension Research*. 2010 May 26;33(5):473–7.
189. Zawiejska A, Wender-Ozegowska E, Iciek R, Brazert J. Concentrations of endothelial nitric oxide synthase, angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor and placental growth factor in maternal blood and maternal metabolic status in pregnancy complicated by hypertensive disorders. *J Hum Hypertens*. 2014 Nov 4;28(11):670–6.
190. Leipziger J, Praetorius H. Renal Autocrine and Paracrine Signaling: A Story of Self-protection. *Physiol Rev*. 2020 Jul 1;100(3):1229–89.
191. Cakmak M, Yilmaz H, Bağlar E, Darcin T, Inan O, Aktas A, et al. Serum levels of endocan correlate with the presence and severity of pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2016 Feb 17;38(2):137–42.
192. Chew BS, Ghazali R, Othman H, Ismail NAM, Othman AS, Laim NMST, et al. Endocan expression in placenta of women with hypertension. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2019 Feb 10;45(2):345–51.
193. Lopes AC dos S, Martins SR, Dusse LMS, Pinheiro M de B, Alpoim PN. Are Endocan Plasma Levels Altered in Preeclampsia? *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*. 2021 Mar 15;43(03):232–4.

194. Szpera-Goździewicz A, Kosicka K, Goździewicz T, Krzyścin M, Wirstlein P, Siemiątkowska A, et al. Serum endocan concentration and its correlation with severity of hypertensive disorders in pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2020 Jul 17;33(14):2313–9.
195. Wang HZ, Jin Y, Wang P, Han C, Wang ZP, Dong MY. Alteration of serum endocan in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2017;44(3):419–22.
196. Gumus II, Uz E, Bavbek N, Kargili A, Yanik B, Turgut FH, et al. Does glomerular hyperfiltration in pregnancy damage the kidney in women with more parities? *Int Urol Nephrol*. 2009 Dec 4;41(4):927–32.
197. DeVore GR. The importance of the cerebroplacental ratio in the evaluation of fetal well-being in SGA and AGA fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Jul;213(1):5–15.
198. Ebbing C, Rasmussen S, Kiserud T. Middle cerebral artery blood flow velocities and pulsatility index and the cerebroplacental pulsatility ratio: longitudinal reference ranges and terms for serial measurements. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2007 Sep 24;30(3):287–96.
199. Escher G, Cristiano M, Causevic M, Baumann M, Frey FJ, Surbek D, et al. High aldosterone-to-renin variants of CYP11B2 and pregnancy outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 Jun 1;24(6):1870–5.
200. Eisele N, Klossner R, Escher G, Rudloff S, Larionov A, Theilig F, et al. Physiological and Molecular Responses to Altered Sodium Intake in Rat Pregnancy. *J Am Heart Assoc*. 2018 Aug 7;7(15).
201. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004 Oct 10;122(4):369–82.
202. Gonçalves-Rizzi VH, Possomato-Vieira JS, Sales Graça TU, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sodium nitrite attenuates hypertension-in-pregnancy and blunts increases in soluble fms-like tyrosine kinase-1 and in vascular endothelial growth factor. *Nitric Oxide*. 2016 Jul;57:71–8.

203. Ren Z, Cui N, Zhu M, Khalil RA. Placental growth factor reverses decreased vascular and uteroplacental MMP-2 and MMP-9 and increased MMP-1 and MMP-7 and collagen types I and IV in hypertensive pregnancy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018 Jul 1;315(1):H33–47.
204. Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. In 2017. p. 87–165.
205. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, et al. A Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Is Produced by the Human Placenta and Released into the Maternal Circulation. *Biol Reprod*. 1998 Dec 1;59(6):1540–8.
206. Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, Khalil RA. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jun;89(3):370–85.
207. Owusu Darkwa E, Djagbletey R, Antwi-Boasiako C, Aryee G, Sottie D, Akowuah A. Serum sodium and potassium levels in preeclampsia: A case-control study in a large tertiary hospital in Ghana. *Cogent Med*. 2017 Jan 1;4(1):1376898.
208. Remer C, Hagai amsalem, Sompolinsky Y. 562: Hyponatremia among preeclampsia patients - feature of severity. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Jan;222(1):S361.
209. Xodo S, Cecchini F, Celante L, Novak A, Rossetti E, Baccarini G, et al. Preeclampsia and low sodium: A retrospective cohort analysis and literature review. *Pregnancy Hypertens*. 2021 Mar;23:169–73.
210. Montebello A, Thake J, Vella S, Vassallo J. Pre-eclampsia complicated by severe hyponatraemia. *BMJ Case Rep*. 2020 Dec 31;13(12):e237827.
211. ESCHER G, MOHAUPT M. Role of aldosterone availability in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007 Apr;28(2):245–54.
212. Todkar A, Di Chiara M, Loffing-Cueni D, Bettoni C, Mohaupt M, Loffing J, et al. Aldosterone deficiency adversely affects pregnancy outcome in mice. *Pflugers Arch*. 2012 Oct 2;464(4):331–43.



213. Iwahori T, Miura K, Ueshima H. Time to Consider Use of the Sodium-to-Potassium Ratio for Practical Sodium Reduction and Potassium Increase. *Nutrients*. 2017 Jul 5;9(7):700.
214. Cook NR. Joint Effects of Sodium and Potassium Intake on Subsequent Cardiovascular Disease. *Arch Intern Med*. 2009 Jan 12;169(1):32.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Opći podatci:**

Martina Vulin

Datum rođenja: 01.11.1979.

Adresa: Ulica J. Gojkovića 27, Osijek

[martina.vulin@gmail.com](mailto:martina.vulin@gmail.com)

### **Radno iskustvo:**

Od 2020. liječnik subspecijalist Fetalne medicine i opstetricije KBC Osijek

Od 2018. naslovni suradnik asistent na katedri za Ginekologiju i opstetriciju MEFOS

Od 2016. liječnik specijalist Ginekologije i opstetricije KBC Osijek

2010. – 2016. liječnik specijalizant, Klinika za ginekologiju i opstetriciju KBC osijek

2006. – 2009. medicinski stručni suradnik, farmaceutska tvrtka Schering AG, Bayer d.o.o.

2004. – 2006. liječnik pripravnik, Dom zdravlja Osijek

### **Obrazovanje:**

2018. – 2020. Subspecijalizacija iz fetalne medicine i opstetricije, KBC Osijek; Uži specijalist iz fetalne medicine i opstetricije

Od 2017. Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet u Osijeku

2010. – 2016. Specijalizacija iz ginekologije i opstetricije, KBC Osijek; Specijalist iz ginekologije i opstetricije

1998. –2004. Medicinski fakultet u Osijeku; Doktor medicine

1994. – 1998. Opća gimnazija, Osijek

**Članstva:**

Hrvatsko društvo za perinatalnu medicinu

Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatska liječnička komora

**Objavljeni znanstveni radovi:**

1. Vulin M, Muller A, Drenjančević I, Šušnjara P, Mihaljević Z, Stupin A. High dietary salt intake attenuates nitric oxide mediated endothelium-dependent vasodilation and increases oxidative stress in pregnancy. *J Hypertens*. 2024 Jan 15. doi: 10.1097/HJH.0000000000003645. Epub ahead of print. PMID: 38230612.

2. Vulin M, Magušić L, Metzger AM, Muller A, Drenjančević I, Jukić I, Šijanović S, Lukić M, Stanojević L, Davidović Cvetko E, Stupin A. Sodium-to-Potassium Ratio as an Indicator of Diet Quality in Healthy Pregnant Women. *Nutrients*. 2022 Nov 27;14(23):5052. doi: 10.3390/nu14235052. PMID: 36501082; PMCID: PMC9737568.

3. Müller A, Horvat V, Vulin M, Mandić S, Šerić V, Vidosavljević D. The soluble fms-like tyrosin kinase-1 (sFLT-1) to placental growth factor (PlGF) ratio as a possible indicator for the severity of preeclampsia - single institution experience. *Med Glas (Zenica)*. 2019 Feb 1;16(1):53-59. doi: 10.17392/994-19. PMID: 30680983.

Aktivni sudionik na većem broju domaćih i međunarodnih znanstvenim skupova u obliku posterskih prezentacija ili usmenih priopćenja.

**Projekti:**

2016. Suradnik-istraživač na znanstveno-istraživačkom projektu Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta J.J. Strossmayera, “Pretilost u trudnoći kao rizični čimbenik za razvoj metaboličkog sindroma majke i djeteta” VIF2016-MEFOS-22 (voditelj prof.dr.sc. Marija Heffer)

2016/2017 Suradnik – istraživač na projektu Correlation between placental vascularization indicis and cFlt-1/PlGF ratio in preeclampsia screening. Projekt Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, Science and Technology (RECOOP HST Association): Bohdan Malaniak CSMC- RECOOP Young Scientists Research Grants 2016.

2021. Suradnik – istraživač na institucijskom znanstveno-istraživačkom projektu Medicinskog fakulteta Osijek IP-10-MEFOS-2021 (voditelj Ana Stupin)

2022. Suradnik – istraživač na institucijskom znanstveno-istraživačkom projektu Medicinskog fakulteta Osijek IP-02-MEFOS-2022 (voditelj Ana Stupin).

**12. PRILOZI**

Prilog 1. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (engl. food frequency questionnaire, FFQ)  
EPIC-Norfolk ([https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a\\_front.pdf](https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a_front.pdf)) (preuzet 5. svibnja 2021.)

Prilog 1. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (engl. food frequency questionnaire, FFQ)  
 EPIC-Norfolk ([https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a\\_front.pdf](https://www.epicnorfolk.org.uk/wp-content/uploads/2020/11/CAMB-PQ-6-1205a_front.pdf)) (preuzet 5. svibnja 2021.)

## UPITNIK O UČESTALOSTI UPORABE NAMIRNICA CAMB/PQ/6/1205

U ovom upitniku se traže neki podaci o Vama, osobito o onome što jedete. Vaši odgovori će biti povjerljivi i koristit će se samo u svrhu ovog istraživanja. Molimo odgovorite na svako pitanje. Ako niste sigurni kako odgovoriti na neko pitanje, molimo ne ostavljajte polja prazna, već odgovorite najbolje što možete.

### 1. VAŠA ISHRANA TIJEKOM PROŠLE GODINE

Za svaku namirnicu prikazana je količina, bilo „srednja porcija“ ili uobičajena jedinica mjere u kućanstvu poput kriške ili žličice. Molimo stavite kvačicu (✓) u odgovarajuće polje kako biste označili koliko ste često, u prosjeku, konzumirali točno navedenu količinu svake namirnice tijekom prošle godine.

#### PRIMJERI:

Za bijeli kruh količina je jedna kriška, te ako ste jeli 4 ili 5 kriška dnevno, stavite kvačicu u stupac na čijem vrhu piše „4-5 dnevno“.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE								
KRUH I SLANA PECIVA (jedna kriška ili komad)	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno
Bijeli kruh i kifle								✓	

Za pomfrit je količina „srednja porcija“, te ukoliko ste konzumirali porciju pomfrita dva puta tjedno, trebali biste staviti kvačicu u stupac na čijem vrhu piše „2-4 tjedno“.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE										
KRUMPIR, RIŽA I TJESTENINA (srednja porcija)	Nijednom ili manje od jednom mjesečno		1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno	
Pomfrit					✓						

Za svo sezonsko voće poput jagode i malina trebali biste procijeniti svoju prosječnu potrošnju tog voća tijekom sezone, te ukoliko ste jeli jagode ili maline oko jednom tjedno tijekom sezone, stavite kvačicu u stupac na čijem vrhu piše „jednom tjedno“.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE									
VOĆE (1 komad ili srednja porcija)	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno	
Jagode, maline, kivi				✓						

Molimo procijenite svoju prosječnu upotrebu namirnica najbolje što možete i odgovorite na svako pitanje – ne ostavljajte nijedan red prazan.

MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE									
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno	
<b>MESO I RIBA (srednja porcija)</b>										
Govedina: pečena, odrezak, mljevena, gulaš ili složenac										
Pljeskavice od govedine										
Svinjetina: pečena, kotleti, paprikaš ili odresci										
Janjetina: pečena, kotleti ili paprikaš										
Piletina ili druga perad npr. puretina										
Slanina										
Šunka										
Konzervirana govedina ili svinjetina (šunka), mesni naresci										
Kobasice i salame										
Slane pite npr. s mesom, svinjetinom, kobasice/hrenovke u tijestu										
Jetrica, jetrena pašteta										
Panirana riba, poput tradicionalne britanske ribe s pomfritom										
Riblju štapići/fileti, slane torte/pite s ribom										
Ostala bijela riba, svježa ili zamrznuta, npr. bakalar, koljак, list, velika ploča										
Plava riba, svježa ili konzervirana, npr. skuša, usoljena dimljena harina, tuna, losos, srdela, harina										
Školjke i rakovi, npr. kozice, dagnje										
Riblja ikra, kavijar										

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.

MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE									
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno	
<b>KRUH I SLANA PECIVA (1 kriška ili komad)</b>										
Bijeli kruh i kifle										
Crni kruh i kifle										
Integralni kruh i kifle										
Krekeri s vrhnjem, keksi sa sirom										
Dvopek										
<b>ŽITARICE (jedna zdjela ili tanjur)</b>										
Zobena/Ovsena kaša										
Uobičajene žitarice za doručak, poput kukuruznih, pahuljica, musale itd.										
<b>KRUMPIR, RIŽA I TJESTENINE (srednja porcija)</b>										
Kuhani, pire, instant ili krumpir pečeni u ljusci										
Pomfrit										
Pečeni krumpir										
Salata od krumpira										
Bijela riža										
Integralna riža										
Bijela ili zelena tjestenina, npr. špageti, makaroni, rezanci										
Integralna tjestenina										
Lazanje, musaka										
Pica										

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.

MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE								
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno
<b>MLIEČNI PROIZVODI I MASTI</b>									
Niskomasno kiselo vrhnje (žlica)									
Punomasno kiselo vrhnje, domaći kajmak (žlica)									
Niskomasni jogurt, niskomasni krem sir (pakiranje od 125g)									
Punomasni ili grčki jogurt (pakiranje od 125g)									
Mliečni deserti (pakiranje, od 125g)									
Sir, npr: cheddar, brie, edamer (srednja porcija)									
Slatki sir, niskomasni mekani/mladi sir (srednja porcija)									
Jaja kao kuhana, pržena, kajgana itd. (jedno)									
Quiche = slana pita sa sirom i jajima/razne slane pite									
Niskokalorično, niskomasno vrhnje za salatu (žlica)									
Vrhnje za salatu, majonez (žlica)									
French dressing=klasičan preljev za salatu (Ulje i ocat) (žlica)									
Ostali preljevi za salate (žlica)									
<b>Sljedeće s kruhom ili povrćem</b>									
Maslac (žličica)									
Tvrđi/Stolni margarin za kolače, npr: Zvijezda, (žličica)									
Polinezasićeni margarin (u kutiji), npr: Zvijezda, suncokretov (žličica)									
Ostale vrste margarina za mazanje, mliečni namazi (u kutiji), npr: Omega1, ABC sir (žličica)									
Niskomasni namazi (u kutiji), (žličica)									

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.

MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE								
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno
<b>SLATKIŠI I GRICKALICE (srednja porcija)</b>									
Slatki keksi, čokoladni, npr: čajni kolutići (1 kom.)									
Slatki keksi, obični, npr: s kokosom, đumbirom (1 kom.)									
Kolači, npr: voćni, s biskvitom, domaći									
Kolači, npr: voćni, s biskvitom, gotovi/kupovni									
Slatko pecivo i tijesto, npr: pogačice, uštipci, domaće									
Slatko pecivo i tijesto, npr: kroasani, krafne, gotovo									
Voćne pite, tortice, domaće									
Voćne pite, tortice, gotove									
Puding, domaći									
Puding, gotov									
Mliečne kreme, npr: mlieko s rižom, krema od jaja (za krem-pite), trifle=voćni kolač sa sladoledom									
Sladoled sa/bez preljeva, Čokolade, praline									
Čokoladice, npr: Mars, Crunchie									
Bomboni, karamele, bomboni s metvicom, Šećer dodati čaju, kavi, žitaricama (žličica)									
Čips ili dr. grickalice, npr: Flipsi									
Kikiriki ili dr. jezgričavi plodovi									
<b>JUHE, UMACI I NAMAZI</b>									
Juha s povrćem (zdiela)									
Juha s mesom (zdiela)									
Umaci, npr: bešamel, umak sa sirom, umak od pečenke (žlica)									
Kečap (žlica)									
Pikantni gusti umaci od voća i povrća (žlica)									
Ostali slani namazi (žlica)									
Džem, marmelada, med (žličica)									
Maslac od kikirikija (žličica)									

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.



MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE								
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno
<b>PIĆA</b>									
Čaj (šalice)									
Kava, instant ili mljevena (šalice)									
Kava bez kofeina (šalice)									
Bjelilo za kavu (mljeveno u prahu koje se dodaje u kavu) (žličica)									
Kakao, topla čokolada (šalice)									
Instant napitci na bazi slada, npr. (šalice)									
Vino (čšaša)									
Pivo, lako/svijetlo pivo=lager ili jabukovača (rakija)/jabukovo vino/sok=cider (0,33l)									
Vino, šeri, vermut, liker (čšaša)									
Alkoholna pića, npr. džin, vinjak, viski, votka (1 čšaša)									
Niskokalorična ili dijetna gazirana bezalkoholna pića (čšaša)									
Ostala (ne)gazirana bezalkoholna pića, npr. Coca cola, limunada (čšaša)									
Čisti voćni sok (100%) npr. od naranče ili jabuke (čšaša)									
Voćni sok ili sirup (čšaša)									
<b>VOĆE</b> Za sezonsko voće označeno *, molimo procijenite svoj prosječni unos tijekom sezone.									
Jabuke (1 komad)									
Kruške (1 komad)									
Naranče, mandarine (1 komad)									
Grejfrut (gola)									
Banane (1 komad)									
Grožđe (srednja porcija)									
Dinja (1 kriška)									
*Breskve, šljive, marelice (1 komad)									
*Jagode, maline, kivi (srednja porcija)									
Konzervirano voće (srednja porcija)									
Suho voće, npr. grožđice, šljive (srednja porcija)									

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.

MOLIMO STAVITE KVAČICU (v) U SVAKI RED.

NAMIRNICE I KOLIČINA	PROSJEČNA UPORABA PROŠLE GODINE								
	Nijednom ili manje od jednom mjesečno	1-3 mjesečno	Jednom tjedno	2-4 tjedno	5-6 tjedno	Jednom dnevno	2-3 dnevno	4-5 dnevno	6 ili više dnevno
<b>POVRĆE</b>									
Svježe, smrznuto ili konzervirano (srednja porcija)									
Mrkva									
Špinat									
Brokoli, kelj									
Prokulica									
Kupus									
Grašak									
Mahunje, bob, grah									
Buče, tikvice									
Cvjetača									
Paštrnak, repa									
Poriluk									
Crni luk									
Češnjak									
Gljive									
Slatka paprika									
Klice mahunarki									
Zelena salata, krastavac, celer									
Potočarka									
Raičica									
Kukuruz šećerac									
Cikla									
Kupus salata									
Avokado									
Konzervirani grah u umaku od raičice									
Suha leća, mahunarka									
Tofu (sir od soje), soja, sojine ljuskice, vegetarijanska piletina									

MOLIMO PROVJERITE JESTE LI STAVILI KVAČICU (v) U SVAKI RED.

**VAŠA ISHRANA TIJEKOM PROŠLE GODINE, nastavak**

2. Postoje li još neke (nenavedene) namirnice koje ste konzumirali više od jednom tjedno? Da Ne

Ukoliko postoje, molimo navedite ih u tabeli ispod.

Namirnica	Uobičajena veličina porcije	Koliko puta ste je konzumirali tjedno

3. Koju vrstu mlijeka ste najčešće konzumirali? Izaberite samo 1 odgovor.

Punomasno  Djelomično obrano  Obrano  Mlijeko s dodatim vitaminima  U prahu  Sojino

Neko drugo, navedite koje: \_\_\_\_\_  Nijedno.

4. Koliko ste mlijeka dnevno pili, uključujući i mlijeko u čaju, kavi, žitaricama itd.?

Ništa  Oko 1,5 dl  Oko 3dl  Oko 4 dl  Oko 0,5l  više od 0,5l

5. Da li ste obično jeli žitarice za doručak (ne računajući slatku zobenu kašu i slične gotove obroke/čokolino? pomenute prije)? Da Ne

Ako jeste, koju ste vrstu i marku žitarica, uključujući musli, obično jeli? Navedite 1 ili 2 vrste najčešće korištenih.

Marka/Proizvođač npr. Fun&Fit	Vrsta npr. kukuruzne pahuljice

6. Kakve masnoće ste najčešće koristili za prženje, pečenje u pećnici, na roštilju itd.? Izaberite samo 1 odgovor.

Maslac  Biljna mast (čvrsta)  Svinjska mast/mast od pečenja  Margarin  Biljno ulje  Nikakve

Ako ste koristili biljno ulje, molimo navedite vrstu npr. kukuruzno, suncokretovo. \_\_\_\_\_

7. Kakve masnoće ste najčešće koristili za pečenje kolača i sl.? Izaberite samo 1 odgovor.

Maslac  Biljna mast (čvrsta)  Svinjska mast/mast od pečenja  Margarin  Biljno ulje  Nikakve

Ako ste koristili margarin, molimo navedite vrstu npr. Zvijezda, Omegol. \_\_\_\_\_

8. Koliko često ste jeli hranu koja je bila pržena kod kuće?

Svakodnevno  1-3 puta tjedno  4-6 puta tjedno  Manje od jednom tjedno  Nikada

9. Koliko često ste jeli hranu koja je bila pržena van kuće?

Svakodnevno  1-3 puta tjedno  4-6 puta tjedno  Manje od jednom tjedno  Nikada

10. Šta ste radili s vidljivom masnoćom na mesu?

Pojeli većinu  Pojeli što manje  Pojeli dio  Niste jeli meso

11. Koliko često ste jeli meso pečeno u pećnici ili na roštilju? \_\_\_\_\_ puta tjedno

12. Koliko dobro pečeno je bilo meso koje ste konzumirali iz pećnice ili sa roštilja?

Bež pečeno/tamno braon  Polu-pečeno/krvavo  Srednje pečeno  Niste jeli meso

13. Koliko često ste dodavali sol u hranu tijekom kuhanja?

Uvijek  Rijetko  Obično  Nikada  Ponekad

14. Koliko često ste dodavali sol u bilo koju serviranu hranu?

Uvijek  Rijetko  Obično  Nikada  Ponekad

15. Jeste li redovito koristili zamjenu za sol? Da Ne

Ako jeste, koju? \_\_\_\_\_

