

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Marina Milković

**POVEZANOST UNOSA SOLI HRANOM I
RAZINE SUPEROKSID DISMUTAZE U
KRVI LJUDI**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren na: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za fiziologiju i imunologiju.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Neposredni voditelj: dr. sc. Anita Čosić mag. ing. proc.

Rad ima 26 listova i 4 slike.

Zahvale:

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. koja mi je pomogla svojim savjetima i iskustvom te uvelike pridonijela stvaranju ovoga rada.

Zahvaljujem dr. sc. Aniti Ćosić mag. ing. proc. na trudu, strpljenju i pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada i korisnim savjetima vezanim za pisanje istog.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je tijekom cijelog školovanja bila bezuvjetna podrška i najveći oslonac.

Također, zahvaljujem svim prijateljima što su uvijek bili uz mene te Nikolini, Marini i Jeleni što su ostavile nezaboravan trag tijekom zajedničkog studiranja u Osijeku.

Sadržaj

POPIS KRATICA:	II
1. UVOD	1
1.1. Unos soli	1
1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav i razvoj kardiovaskularnih bolesti.....	1
1.2.1. Epidemiologija i patofiziološke osnove kardiovaskularnih bolesti.....	1
1.2.2. Utjecaj unosa kuhinjske soli na endotelnu funkciju i reaktivnost krvnih žila.....	2
1.3. Oksidativni stres	3
1.3.1. ROS	4
1.4. Superoksid dismutaza (SOD)	5
1.4.1. Unos kuhinjske soli i uzroci povećanja oksidativnog stresa	6
2. HIPOTEZA.....	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
4. MATERIJALI I METODE.....	9
4.1. Ispitanici	9
4.2. Materijali i metode.....	9
4.3. Statističke metode.....	10
6. RASPRAVA.....	14
7. ZAKLJUČAK.....	16
8. SAŽETAK.....	17
9. SUMMARY	18
10. LITERATURA:.....	19
11. ŽIVOTOPIS.....	21

POPIS KRATICA:

SZO – svjetska zdravstvena organizacija

ROS – engl. *reactive oxygen species*

TXB2 – tromboxan

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim

COX 1,2 – ciklooksigenaza

ROOH – hiperoksid

O₂-• – superoksidni anion

HO• – hidroksilni radikal

H₂O₂ – vodikov peroksid

O₂ – singletni kisik

HOCl – hiploklorna kiselina

O₃ – ozon

SOD – superoksid dismutaza

NOS – NO sintaza

TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

NaCl – natrijev klorid

MCA – središnja moždana arterija

GPx4 – glutation peroksidaza

NO – dušikov oksid

1.UVOD

1.1.Unos soli

Kuhinjska je sol vrlo važan rizični čimbenik za razvoj hipertenzije i pridonosi povećanju ukupnog kardiovaskularnog rizika (1). Danas se zbog učestalog i prekomjernog korištenja smatra rizičnom namirnicom jer se na taj način unosi previše natrija u organizam. U pravoj je količini natrij potreban našem organizmu. On stimulira rad bubrega i omogućava dobru probavu, potiče znojenje i energiju, održava kiselo-bazičnu ravnotežu i sudjeluje u stvaranju električnih impulsa koji aktiviraju živčane i mišićne stanice (2). Dnevna potreba ljudskog organizma za soli iznosi 5 – 6 grama na dan, ali nažalost ta se granica često prelazi. Istraživanja su pokazala da prosječni dnevni unos kuhinjske soli u Hrvatskoj iznosi 11,6 grama (žene 10,2 grama, muškarci 13,3 grama), što je više nego dvostruko od preporučenog dnevnog unosa (3, 4). Svjetska zdravstvena organizacija objavila je rezultate koji govore da su bolesti kao što su arterijska hipertenzija, dijabetes, debljina te srčane, plućne i bubrežne bolesti odgovorne za 86 % preuranjenih smrtnih slučajeva u Europi, a sam prekomjeran unos soli neposredni je i/ili posredni rizični čimbenik za pojavu istih. Prema istraživanjima SZO-a iz 2006. godine kada bi se unos soli sveo na preporučene vrijednosti, spriječilo bi se oko 2,5 milijuna smrti godišnje na svijetu (3).

1.2. Utjecaj soli na kardiovaskularni sustav i razvoj kardiovaskularnih bolesti

1.2.1. Epidemiologija i patofiziološke osnove kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularne su bolesti vodeći uzrok smrtnosti u svijetu s hipertenzijom koja je vodeći rizični čimbenik (5). U svijetu od njih oboljeva 600 milijuna ljudi i procjenjuje se da će do 2025. godine 29 % ljudske populacije patiti od hipertenzije (1). Brojnim dosadašnjim istraživanjima dokazano je da dijeta s visokim udjelom soli rezultira značajnim porastom arterijskog tlaka i takve promjene dovode se u izravnu vezu s porastom ROS-a (5). Isto tako, studije su pokazale da i angiotenzin II potiče stvaranje oksidativnog stresa u središnjem živčanom sustavu i endotelinom stanicama stimulacijom aktivacije NAD(P)H oksidaze i ciklooksigenaze (COX-1,2), što rezultira porastom krvnog tlaka i razvojem hipertenzije (6).

Osnovna promjena u podlozi kardiovaskularnih bolesti jest ateroskleroza, koju karakterizira upala i proliferacija stanica u stjenci krvnih žila, što rezultira postupnim sužavanjem arterija. (1). Ateroskleroza je najčešći patološki proces nakon koronarne bolesti srca te predstavlja stanje povišenog oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije (5).

1.2.2. Utjecaj unosa kuhinjske soli na endotelnu funkciju i reaktivnost krvnih žila

Sve krvne žile s unutrašnje strane obavijene su tankim slojem zvanim endotel. Njegove su najznačajnije funkcije: kontrola vaskularnoga tonusa, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i moduliranje propusnosti vaskularne stijenke (7). Endotelne stanice imaju sposobnost autokrinog, endokrinog i parakrinog lučenja te sposobnost popravka raznih mehaničkih i kemijskih oštećenja krvnih žila. Međutim, kada izgube kontrolu, na reparacijskim mehanizmima dolazi do funkcionalnih i strukturnih promjena endotela te on gubi svoju zaštitnu ulogu i poprima proateroskleroznu strukturu (8). Tu se radi o endotelnoj disfunkciji koju se može opisati kao stanje oštećenoga endotela, odnosno njegove poremećene funkcije. Takav poremećaj endotela uključuje niz patofizioloških stanja, od početne lokalizirane mehaničke ozljede žilne intime do neprimjerene, perzistentne, globalne endotelne aktivacije važne za razvoj brojnih klinički očitovanih patoloških stanja (7). U pojedinim dosadašnjim istraživanjima dokazano je kako će kratkotrajno unošenje veće količine soli smanjiti endotelnu funkciju (9) i protok u krvnim žilama no ne utječe na krvni tlak te kako tjelovježba neće smanjiti eliminaciju soli u tijelu. Jednako tako dokazano je da povećan unos soli povećava razinu natrija i koncentraciju TXB₂ u plazmi, pri tom razina kalija ostaje ista, dok je izmjerena manja koncentracija aldosterona i aktivnost renina u plazmi, na što je veliki utjecaj imalo djelovanje ciklooksigenaze (COX1 i COX2) (10). No u slučaju uzimanja male količine soli koncentracija TXB₂ u plazmi smanjena je zbog djelovanja AT1 inhibitor receptora, a aktivnost renina u plazmi te koncentracija aldosterona značajno je povećana (11). Kada postoji neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog obrambenog mehanizma dolazi do nastajanja oksidativnog stresa, koji tada predstavlja mehanizam ozljeda mnogih vrsta bolesti. Poznato je kako je vaskularni endotel mjesto razvoja kardiovaskularnih bolesti te djelovanja rizičnih kardiovaskularnih čimbenika. S obzirom na to da u aktivaciji endotela, razvoju hipertenzije i ateroskleroze oksidativni stres ima važnu ulogu, dovest će do progresije strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja (1).

Brojna istraživanja na animalnim modelima hipertenzije i modela infuzije angiotenzina II pokazala su znatno povišenu produkciju ROS-a u stijenkama krvnih žila kao i njihov učinak na razvoj hipertenzije. No ipak studije o učinku supresije angiotenzina II (farmakološkom primjenom ACE inhibitora ili povećanim unosom soli) pokazale su oštećenje funkcija mikrocirkulacije i povećanu produkciju ROS-a, što za posljedicu ima oštećenje antioksidativnih mehanizama (smanjen izražaj superoksid dismutaze u endotelnim stanicama) (1). Brojni su dokazi koji pokazuju kako povećani oksidativni stres u stijenci krvnih žila dovodi do aktivacije endotela i razvoja upale, što dugoročno rezultira aterogenim procesima i razvojem kardiovaskularnih bolesti.

1.3. Oksidativni stres

Kisik je neophodan svakom živom biću za preživljavanje, ali ako njegova koncentracija u tkivima i organima postane veća od normalne, postaje toksičan. S jedne strane kisik je nužan za život, ali jednako tako oštećuje procesom biološkog hrđanja (oksidacije). Procesu oksidacije podložne su sve stanice (12). Oksidativni stres nastaje kada je narušena ravnoteža u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije (5). Također, oksidativni stres može se definirati i kao stanje u kojem oksidacijski procesi prevladaju antioksidativne sposobnosti stanica tkiva. Tijekom aerobne respiracije stanice u oksidativnom stresu dolazi do oštećenja stanice koje je izazvano slobodnim radikalima (13). U uravnoteženim uvjetima slobodni radikali razgrađeni su staničnim antioksidansima, uz pomoć enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaze i glutacion peroksidaze ili neenzimatski uz pomoć glutaciona. Najdjelotvorniji način prevencije oštećenja naših stanica i razvoja oksidativnog stresa jest zaustaviti nastanak i neutralizirati uzročnike oksidacije, a to su slobodne nesparene kisikove čestice (engl. *reactive oxygen species*; ROS) (14). Oksidativni stres rizični je čimbenik broj jedan za naše zdravlje jer dovodi do višestrukih posljedica, od ubrzanog procesa starenja organizma (preuranjeno starenje stanica), nastanka raznih kroničnih i malignih bolesti do izazivanja smrti stanica. Povećanom riziku od razvoja oksidativnog stresa izložene su sve osobe čiji organizam ne može vlastitim mehanizmom prilagodbe povećati stvaranje antioksidansa i održati ravnotežu kao i one osobe kod kojih je potreba za antioksidansima povećana (12). Nastanku oksidativnog stresa najviše su podložne starije osobe, osobe koje boluju od nekih kroničnih bolesti kao što su reumatske bolesti, Alzheimerova bolest, šećerna bolest, maligne bolesti, moždani i srčani infarkt, ulcerozni kolitis, Crohnova bolest,

Parkinsonova bolest, mišićne distrofije i žene koje uzimaju hormonsku nadomjesnu terapiju i/ili oralne kontraceptive. U stanjima u kojima je povećana potrošnja kisika, kao na primjer tijekom povećanih napora i fizičkog opterećenja kod sportaša, javlja se povećana potreba za antioksidansima (12). Za dijagnostiku oksidativnog stresa laboratorijskim analizama uzoraka krvi može se izmjeriti visina oksidativnog stresa, odnosno razina slobodnih radikala (ROS) u tijelu kao i sposobnost organizma da se protiv njih obrani. U svijetu su takvi testovi uobičajeni i koriste se rutinski svakih šest mjeseci s ciljem otkrivanja oksidativnog stresa i kontrole učinkovitosti uzimanja antioksidansa. U Hrvatskoj je najpoznatiji d-ROMs (engl. *Reactive Oxygen Metabolites*) test. To je spektrofotometrijski test pomoću kojeg se mjeri visina oksidativnog stresa mjerenjem koncentracije hidroperoksida (ROOH) u krvi (12).

1.3.1. ROS

Poznato je da oštećenje stanice nastaje zbog slobodnih radikala koji se stvaraju tijekom aerobne respiracije stanice u stanju oksidativnog stresa. Slobodni su radikali molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nespareni elektroni slobodnih radikala uzrokuju njihovo davanje ili uzimanje elektrona drugim molekulama i na taj način čine ih izrazito nestabilnima i visoko reaktivnima, pri čemu reagiraju s organskim ili neorganskim spojevima (14). Prilikom prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika ili smanjene sposobnosti pojedinih stanica da ih razgrade, dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala, njihovog nakupljanja u stanici te oštećenja stanica i tkiva (1).

„Reaktivni kisikovi spojevi predstavljaju skupinu vrlo reaktivnih spojeva koji ne obuhvaćaju samo kisikove radikale poput superoksidnog aniona (O_2^-) i hidroksilnog radikala ($HO\cdot$), već i druge reaktivne spojeve kisika kao što suvodikov peroksid (H_2O_2), reaktivni (singlet) kisik (1O_2), hipoklornu kiselinu ($HOCl$) te ozon (O_3) koji također uzrokuju oksidacijsko oštećenje staničnih struktura.“ (14)

ROS se u organizmu stvaraju tijekom fizioloških i patoloških metaboličkih procesa tijekom redukcije i ekscitacije samog kisika (14). Nastajanje male količine ROS-a ima pozitivan utjecaj na organizam, sudjeluje u proliferaciji te ima obrambenu ulogu. S druge strane velike koncentracije mogu značajno dovesti do razvoja mnogih bolesti kao što su ateroskleroza, šećerne bolesti, razne infektivne bolesti itd. Pojedina istraživanja pokazuju kako ROS djeluju

na reproduktivni sustav muškaraca. Dokazano je da su nezreli dijelovi spermija imali znatno veću koncentraciju ROS-a u odnosu na uredan i zreli dio spermija (15).

Stoga je najbitnija točno regulirana proizvodnja ROS-a, kako bi se omogućila homeostaza i popravak oštećenja tkiva.

1.4. Superoksid dismutaza (SOD)

U normalnim uvjetima stanice imaju obrambeni sustav kako bi spriječile štetno djelovanje ROS-a. To su antioksidansi koji predstavljaju male molekule koje svojim djelovanjem mogu inhibirati stvaranje ROS-a i povećati endogeni antioksidativni kapacitet. Obrana organizma temelji se na djelovanju antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze i katalaze (1). Superoksid dismutaza (SOD) primarni je antioksidativni enzim u mitohondriju koji katalizira pretvorbu superoksida u kisik i vodikov peroksid (5). SOD su bjelančevine koje kao kofaktor sadrže cink, mangan, željezo, bakar ili nikal. Svojim obrambenim mehanizmom, koji uključuje katalizu reakcije dismutacije superoksida, SOD štiti stanice od slobodnih radikala: $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Na taj način umjesto vrlo toksičnog HO* radikala nastaju vodikov peroksid i kisik. Među enzimima SOD ima najveći pretvorbeni broj i time je naglašena izuzetna biološka važnost dismutacije (16).

„Poznato je pet različitih izoformi SOD enzima, od kojih su tri strukturno tipične. Kod sisavaca su prisutna tri oblika superoksid dismutaze. SOD1 smješten je u citoplazmi, SOD2 u mitohondrijima, a SOD3 u izvanstaničnom prostoru. SOD1 je dimer sastavljen od dviju jedinica ukupne mase 32 kDa (1 dalton = masa jednog atoma vodika), dok su SOD2 i SOD3 tetrameri ukupne mase 89 kDa i 135 kDa. SOD1 i SOD3 sadrže Cu i Zn, dok SOD2 ima Mn na aktivnom mjestu. Aktivno mjesto Mn-SOD sadrži tri bočna histidinska lanca, aspartatni lanac i molekulu vode, ovisno o oksidacijskom broju Mn.“ (16)

Pokusom na miševima može se prikazati fiziološka važnost SOD-a. Zbog izuzetno jakog oksidativnog stresa miš kojemu nedostaje enzim SOD2 uginut će za nekoliko dana nakon okota, a miš kojemu nedostaje SOD1 razvit će niz patoloških stanja kao što su rak jetre, gubitak mišićne mase, ubrzano starenje. Miš kojemu nedostaje SOD3 neće imati nikakve negativne zdravstvene posljedice. Tim pokusom pokazuje se važnost prisutnosti enzima SOD1 u sprječavanju brojnih neuroloških i ostalih oboljenja, ali najbitnije je dokazivanje prisutnosti

enzima SOD2 i njegove glavne uloge u neutralizaciji nastanka oksidativnog stresa i njegovih posljedica (16).

1.4.1. Unos kuhinjske soli i uzroci povećanja oksidativnog stresa

Oksidativni stres predstavlja stanje u kojemu je povećana razina reaktivnih kisikovih radikala. Njegov utjecaj na organizam ovisi o vrsti oksidansa, mjestu i intenzitetu stvaranja, sastavu i djelovanju različitih antioksidansa. Poznato je da je odgovoran za razvoj i održavanje arterijske hipertenzije. Istraživanja arterijske hipertenzije na životinjama kod kojih je prisutna snižena razina angiotenzina II ukazuju na znatno povišenu produkciju ROS-a u stijenkama krvnih žila. Također, zbog povećanog unosa soli dolazi do supresije angiotenzina II, koja oštećuje funkciju krvnih žila povećanom proizvodnjom ROS-a (17).

Ćosić i suradnici pokazali su: „Tjedan dana visokog unosa soli značajno smanjuje izražaj GPx4, antioksidativnog enzima i iNOS-a, povećava lipidnu peroksidaciju (mjerenu TBARS-om), dovodi do značajnog porasta produkcije ROS-a u limfocitima iz perifernih organa, s tendencijom porasta oksidativnog stresa u leukocitima iz krvi.“ (17)

Unosom povećane količine soli povećava se razina bazalnog unutarstaničnog ROS-a u limfocitima koji su izolirani iz mezenteričnih limfnih čvorova i slezene te unutarstanična proizvodnja ROS-a u perifernim limfnim čvorovima nakon PMA stimulacije. Istovremeno neće doći do bitne promjene arterijskog tlaka, što ukazuje da NaCl narušava oksidativnu ravnotežu te izaziva poremećaj funkcije krvnih žila neovisno o arterijskom tlaku i prije njegovih promjena (17). U istraživanju koje je pokušalo utvrditi bazični odgovor i razjasniti mehanizme protokom posredovane dilatacije (FID) te izražaj antioksidativnih gena, gena uključenih u dilatacijske putove središnje moždane arterije (MCA) te ulogu oksidativnog stresa u MCA kod *Sprague-Dawley* štakora na visokoslanjoj dijeti pokazalo je da unos soli remeti vaskularnu reaktivnost na FID. Ti podatci prvi puta pokazuju da su mehanizmi FID-a različiti kod unosa niske i visoke koncentracije soli. Niski izražaj GPx4, povećana proizvodnja superoksida u leukocitima, sa smanjenim izražajem iNOS-a uzrokuju nastanak oksidativnog stresa i smanjuju biološku raspoloživost NO, čime se poremećuje FID kod visokoslane skupine (18).

2. HIPOTEZA

Kratkotrajni povećani unos kuhinjske soli hranom dovest će do promjene koncentracije superoksid dismutaze (SOD) u krvi.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja otkriti postoji li povezanost količine hranom unesene soli i koncentracije superoksid dismutaze u plazmi.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Ispitanice su u ovom istraživanju mlade zdrave žene, regrutirane putem oglasa na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Isključni kriteriji za ulazak u studiju bili su: hipertenzija ili hipotenzija, koronarna bolest, šećerna bolest, hiperlipidemija, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila. Isključni kriteriji također su bili: uzimanje oralnih kontraceptiva ili lijekova koji mogu imati utjecaj na endotel. Sve ispitanice detaljno su informirane o istraživanju i potpisale su informirani pristanak.

4.2. Materijali i metode

Za sve mjerene parametre koristit će se standardni laboratorijski testovi, uključivo ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) upitnik za određivanje SOD-a.

Tehnike koje se baziraju na reakciji antigen-antitijelo mogu se podijeliti u dvije kategorije: neizravne i izravne. Moderne imunološke metode nastale su zbog želje da se otkriju i kvantificiraju složene biološke molekule, jer su kemijske i fizikalne analitičke metode ili neprikladne ili nisu dostupne. Imunološke metode razvile su se kako bi se olakšalo proučavanje imunologije, posebno u antigen-antitijelo interakcijama. Imunoenzimskim ELISA testom određuje se prisutnost i količina antigena. Reakcija ELISA temelji se na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Tom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka. Postoji više vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: neizravna, „sendvič“, konkurentna te nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča.

Uvođenju ELISA metode u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. Sama metodologija ELISA tehnika uključuje imobilizaciju jedne ili dviju komponenti, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. Mjerenje predstavlja drugu veliku

prepreku koja je s obzirom na metodologiju riješena na način da se jedna komponenta, odnosno detektor antitijelo, obilježi enzimom. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili pak oni razvijaju specifične testove za vlastite primjene. Konačni odabir ovisi o opremi u laboratoriju.

U ovom istraživanju korišten je komercijalni kit za određivanje humanog Cu/Zn SOD1. Prilikom izvođenja sendvič ELISA metode bili su potrebni: mikrotitarska pločica premazana antitijelima na humani Cu/Zn SOD, HRP-konjugat anti-humanu Cu/ZnSOD, standard otopina, fiziološka otopina puferirana fosfatom (PBS), diluirani pufer (PBS + BSA), pufer za ispiranje, supstrat, stop otopina. Na početku mikrotitarske pločice prvo se nanose standardi i kontrole, a potom je potrebno 26 uzoraka seruma razrijediti s PBS otopinom u omjeru 10 μ l + 190 μ l PBS. Nakon toga pločica se inkubira sat vremena te se ispiru prikladnim puferom, a zatim se dodaje supstrat koji će dati vidljivo obojenje. Nakon 10 minuta rezultati se očitavaju na BIO-RAD PR 3100 TSC uređaju.

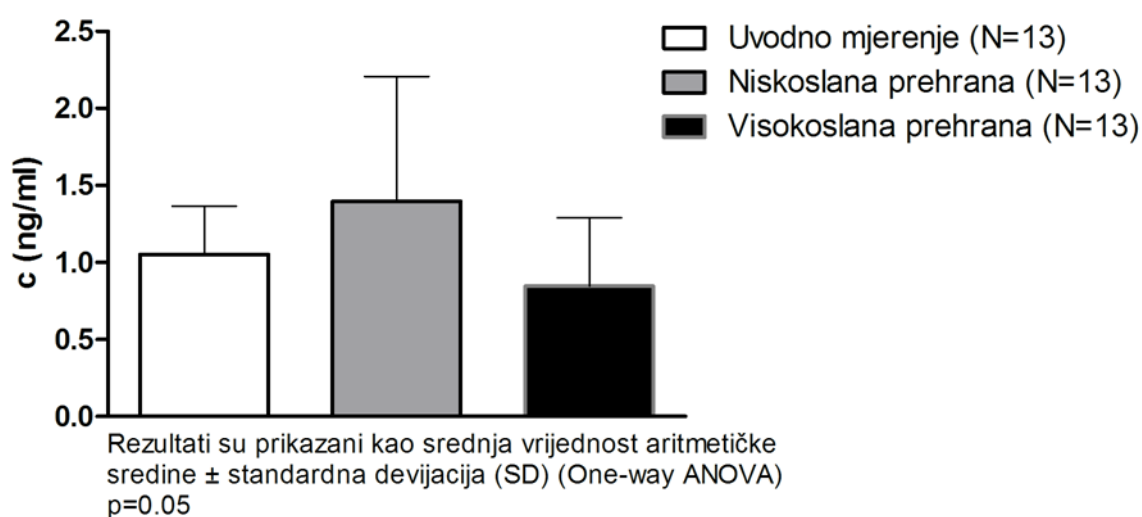
4.3. Statističke metode

Za statističku analizu koristio se statistički program SigmaPlot (verzija 11.2, SYSTAT Software, Chicago, SAD). Svi podatci prikazani su kao aritmetička sredina (\pm SD), gdje se $p \leq 0,05$ smatra značajnim. Za usporedbu rezultata serumske koncentracije Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima upotrijebljen je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke One-Way ANOVA ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidakov ili Kruskal-Wallisov test. Za utvrđivanje međusobne razlike između dvaju dijetnih protokola kod normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina koristio se Studentov t-test. Veličina uzorka određuje se pomoću G*power testa, a normalnost distribucije pomoću odgovarajućih statističkih testova. Za $\alpha = 0,05$ uz snagu testa od 0,80 te umjerenu veličinu učinka od 0,5, potrebno je minimalno 13 ispitanika po grupi.

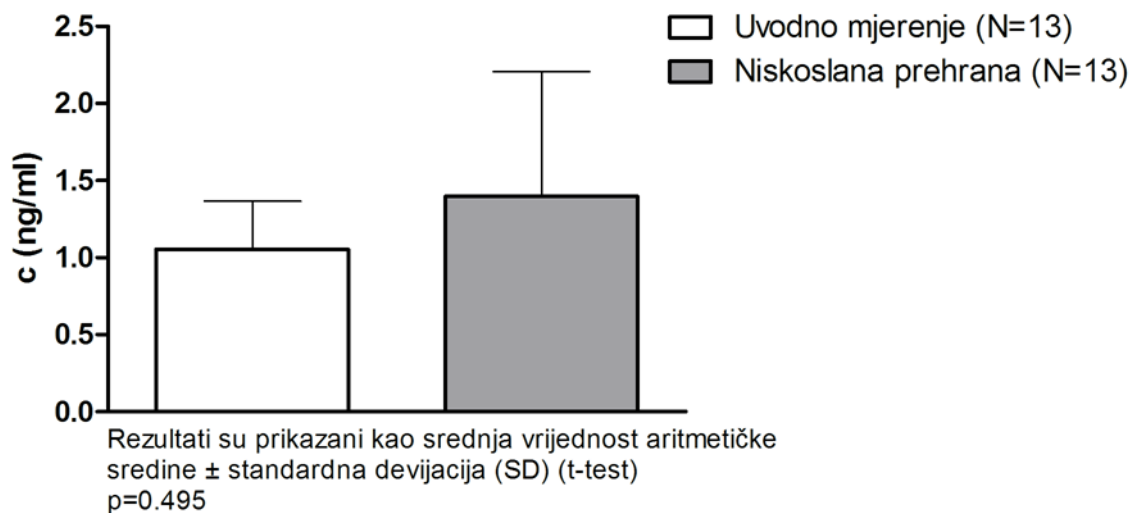
5. REZULTATI

Ovo istraživanje predstavlja nerandomizirani kontrolirani pokus u kojem su sve ispitanice bile podvrgnute istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja. Protokol se sastojao od triju mjerenja: uvodno, nakon niskoslane te visokoslane prehrane na uzorcima 26 mladih zdravih žena regrutiranih oglasom. Prema rezultatima koji su prikazani na Slici 1., ako uspoređujemo sve tri skupine zajedno, nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina. Kod usporedbe (t-testom) između uvodnog mjerenja te niskoslane ili visokoslane prehrane (Slika 2. i 3.) nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$), dok je značajna razlika utvrđena prilikom usporedbe serumske koncentracije Cu/Zn SOD-a između niskoslane i visokoslane skupine ($p < 0,05$) (Slika 4.). Najniža razina SOD-a izmjerena je nakon visokoslane dijeta. To nam pokazuje kako je dijeta s visokim unosom soli dovela do smanjene koncentracije SOD-a, što upućuje na prisutnost oksidativnog stresa, a samim time i na povećanu koncentraciju ROS čestica kojih ima u suvišku.

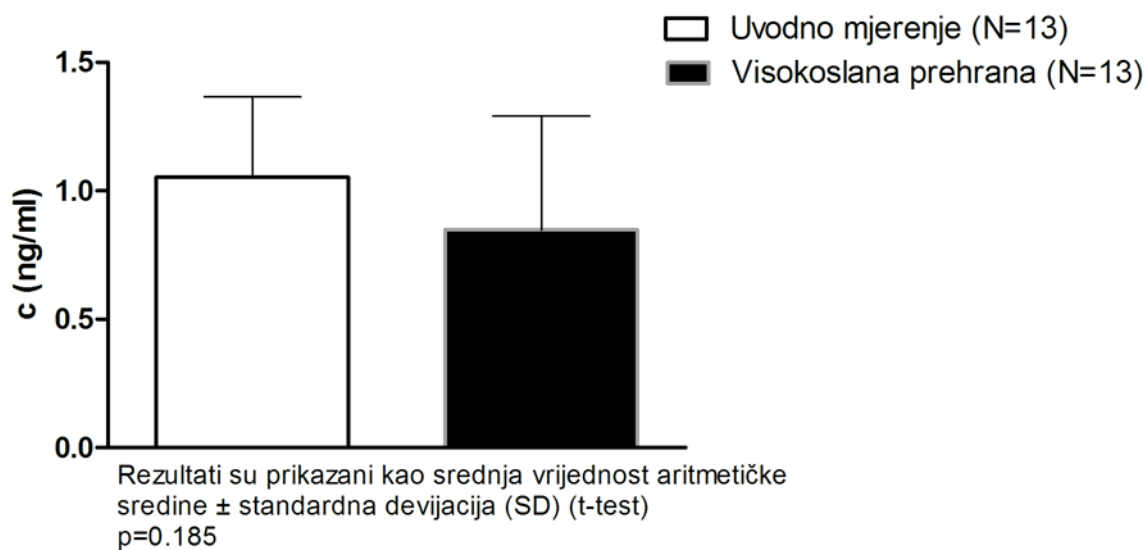
Rezultati su prikazani pomoću grafova koji su napravljeni u programu SigmaPlot (verzija 11.2, SYSTAT Software, Chicago, SAD).



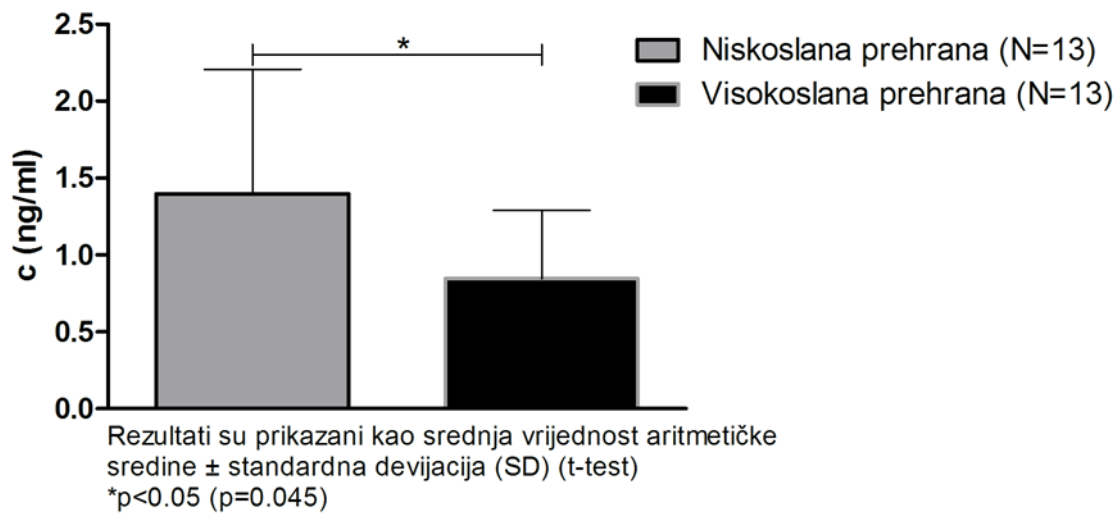
Slika 1. Usporedba serumske koncentracije Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima u svim ispitivanim skupinama



Slika 2. Razlika u serumskoj koncentraciji Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima između uvodnog mjerenja i nakon niskoslane prehrane



Slika 3. Usporedba serumske koncentracije Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima između uvodnog mjerenja i nakon visokoslane prehrane



Slika 4. Razlika u izmjerenoj serumskoj koncentraciji Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima nakon niskoslane i visokoslane prehrane

6. RASPRAVA

Brojna dosadašnja istraživanja na animalnim i humanim modelima donijela su nedvojbene dokaze o nepovoljnim i štetnim učincima na organizam ako dođe do povećanog unosa soli hranom. Velike doze soli dovode do oštećenja mikrocirkulacije i do povišenih razina ROS-a.

Poznato je da oštećenje stanice nastaje zbog slobodnih radikala koji se stvaraju tijekom aerobne respiracije stanice u stanju oksidativnog stresa (14). Prilikom prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika ili smanjene sposobnosti pojedinih stanica da ih razgradi dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala, njihovog nakupljanja u stanici te oštećenja stanica i tkiva (1). Radi se o stanju oksidativnog stresa kada je narušena ravnoteža u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama (5).

U normalnim, uravnoteženim uvjetima stanice imaju obrambeni sustav kako bi mogle spriječiti štetno djelovanje ROS-a. Glavnu ulogu imaju antioksidansi koji predstavljaju male molekule koje svojim djelovanjem mogu inhibirati stvaranje ROS-a. Obrana organizma temelji se na djelovanju antioksidativnih enzima superoksid dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze i katalaze (1). Superoksid dismutaza primarni je antioksidativni enzim u mitohondriju koji katalizira pretvorbu superoksida u kisik i vodikov peroksid (5).

U pojedinim dosadašnjim istraživanjima dokazano je kako će kratkotrajno unošenje veće količine soli smanjiti endotelnu funkciju, što će dovesti do razvoja upale. Također je dokazano kako povećan unos soli povećava razinu natrija i koncentraciju TXB_2 u plazmi, razina kalija ostaje ista, dok je izmjerena manja koncentracija aldosterona i aktivnost renina u plazmi (10). No u slučaju uzimanja male količine soli koncentracija TXB_2 u plazmi smanjena je zbog djelovanja AT1 inhibitor receptora, a aktivnost renina u plazmi te koncentracija aldosterona značajno je povećana (11).

Kada postoji neravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog obrambenog mehanizma dolazi do nastajanja oksidativnog stresa koji tada predstavlja mehanizam ozljeda mnogih vrsta bolesti. Upravo to dokazano je u ovom istraživanju. Uz pomoć imunoenzimskog ELISA testa kojim se određuje prisutnost i količina antigena određena je koncentracija SOD-a. Na uzorcima zdravnih žena mlađe životne skupine nakon provedena 2 mjerjenja: uvodnog na početku istraživanja i nakon niskoslane prehrane rezultati

su pokazali kako nema značajne statističke razlike među njima u koncentraciji SOD-a. Međutim, kada se uspoređuju rezultati mjerenja nakon niskoslane i visokoslane prehrane, pokazuju kako je nakon visokoslane prehrane koncentracija SOD-a smanjena. Upravo tim dobivenim rezultatom potvrđene su gore spomenute činjenice koje kažu da će zbog kratkotrajnog unosa veće količine soli doći do stanja oksidativnog stresa koji prati poremećaj u ravnoteži reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativnog obrambenog mehanizma. Sama neravnoteža nastaje zbog smanjene koncentracije SOD-a kojeg nema u tolikoj količini koliko i stvorenih ROS čestica kako bi ih antioksidativni enzimi (SOD) mogli neutralizirati.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provednog istraživanja možemo zaključiti:

- Visoki unos soli značajno snižava serumsku koncentraciju Cu/Zn SOD antioksidativnog enzima u odnosu na niskoslanu prehranu.
- Značajno niže razine antioksidativnog enzima kod soli potvrđuju povećani oksidativni stres prilikom konzumiranja visokoslane prehrane.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je ovog istraživanja otkriti postoji li povezanost količine hranom unesene soli i koncentracije superoksid dismutaze u plazmi.

Materijali i metode: U ovo istraživanje bilo je uključeno 26 mladih zdravih žena, regrutiranih oglasom na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Za sve mjerene parametre koristio se standardni imunoenzimski test ELISA. U ovom istraživanju korišten je komercijalni paket za određivanje humanog Cu/Zn SOD1.

Rezultati: Napravljena su tri mjerenja: uvodno, nakon niskoslane te visokoslane prehrane. Prema rezultatima koji su dobiveni nakon uvodnog mjerenja i nakon niskoslane prehrane nije dokazana značajna statistička razlika, što upućuje na to da žene mlađe dobne skupine koje su sudjelovale u ovom istraživanju svakodnevno nisu unosile sol u prekomjernim količinama. S druge strane postoji značajna statistička razlika između niskoslanog i visokoslanog mjerenja. Najniža razina SOD-a izmjerena je nakon visokoslane dijeta. Rezultati pokazuju da je dijeta s visokim unosom soli dovela do smanjene koncentracije SOD-a, što upućuje na prisutnost oksidativnog stresa, a samim time i na povećanu koncentraciju ROS čestica kojih ima u suvišku.

Zaključak: Kratkotrajnim povećanim unosom kuhinjske soli hranom dolazi do sniženja koncentracije superoksid dismutaze u krvi, što za posljedicu ima stvaranje oksidativnog stresa u organizmu.

Ključne riječi: natrijev klorid, superoksid dismutaza, slobodne kisikove čestice, endotel, oksidativni stres

9. SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to inspect whether there is a correlation between the amount of salt intake and the superoxide dismutase concentration in the plasma.

Materials and Methods: This study included 26 young healthy women, recruited by advertisement at the Faculty of Medicine in Osijek. For all measured parameters, the standardized ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test was used. In this study, a commercial assay for human Cu/Zn SOD1 was used.

Results: Three measures were performed: prior to diets, after the low salt and the high salt diet. According to the results obtained after the introductory measure and after the low salt diet, statistically significant difference has not been demonstrated, indicating that women in younger age group who participated in this study have not taken the salt in excessive amounts on a daily basis. On the other hand, there is a significant statistical difference between the low and the high salt diet measurements. The lowest level of SOD was measured after the high salt intake diet. The results indicate that the high salt intake diet has led to reduced SOD concentrations.

Conclusion: The short-term increased intake of salty food results in a reduction of superoxide dismutase concentration in blood, resulting in oxidative stress in the body.

Keywords: sodium chloride, superoxide dismutase, reactive oxygen species, endothelium, oxidative stress

10. LITERATURA:

1. Planinac J.(2015) Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi Sprague Dawley štakora. Završni rad. Medicinski fakultet Osijek
2. Sol: važna zrnca s kojima treba oprezno, <http://www.adiva.hr/sol-vazna-zrnca-s-kojima-treba-oprezno.aspx>
3. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015.-2019., <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019..pdf>
4. Jelaković B, Vrdoljak A, Pećin, Buzjak V, Karanović S, Ivković V, i sur. Less salt - more health. Croatian Action on Salt and Health (CRASH). Journal of hypertension research. 2 (2016) , 2; 61-68
5. Souiden Y, Mallouli H, Meskhi S, Chaabouni Y, Rebai A, Chèour F, i sur. MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. 2016, 49:22
6. Čavka A, Ćosić A, Jukić I, Jelaković B, Lombard H. J, Philips, i sur. The role of cyclooxygenase-1 in high-salt diet-inudced microvascular dysfunction in humans. 2015, 1-12
7. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika; Pregledni članak; Med Vjesnik 2012; 44(1-4): 135-146
8. Viridis A, Duranti E, Taddei S: Oxidative stress and vascular damage in hypertension: Role of Angiotensin II. 2011
9. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH: Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet; Hypertension. 2005 Apr;45(4):687-91. Epub 2005 Feb 14.
10. Čavka A, Jukić I, Ali M, Goslawski M, Bian J-T, Wang E, i sur. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. 2016

11. Čavka A, Ćosić A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard J, i sur. Effects of AT1 receptor blockade plasma thromboxane A2 (TXA2) level and skin microcirculation in young healthy women on low salt diet. 2013
12. Oksidativni stres – kisik nam daje život, ali nas i ubija,
<http://poliklinikasvecnjak.com/oksidativni-stres/>
13. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8.
14. Kolenc D.(2010) Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga [The coexpression of 4-hydroxynonenal and prominin-1 in glial tumors of the brain]. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu.
15. Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa.
16. Šmuc T.(2009) Kiselo-bazna svojstva Mn(III) meso-tetrakis((N-butil)piridin-2-il) porfirina u vodenom mediju. Farmaceutsko-biokemijski fakultet
17. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. 2017
18. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S, i sur. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short- term high salt diet. // *The Journal of Physiology*. 594 (2016) , 17; 4917-4931

11. ŽIVOTOPIS

Marina Milković

Datum i mjesto rođenja: 23. ožujka 1994., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Prva Gupčeva 26, Sesvete 10360, Hrvatska

E- adresa: milkovicmarina94@gmail.com

Obrazovanje:

2015. – 2017.: Medicinski fakultet u Osijeku – diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2012. – 2015.: Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2008. – 2012.: Opća gimnazija Sesvete