

Utjecaj dijete s visokim udjelom soli na distribuciju subpopulacija monocita u perifernoj krvi zdravih mladih žena

Repinc, Mirela

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:907790>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-10-17**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mirela Repinc

**UTJECAJ DIJETE S VISOKIM
UDJELOM SOLI NA DISTRIBUCIJU
SUBPOPULACIJA MONOCITA U
PERIFERNOJ KRVI ZDRAVIH MLADIH
ŽENA**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mirela Repinc

**UTJECAJ DIJETE S VISOKIM
UDJELOM SOLI NA DISTRIBUCIJU
SUBPOPULACIJA MONOCITA U
PERIFERNOJ KRVI ZDRAVIH MLADIH
ŽENA**

Završni rad

Osijek, 2018.

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

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

Rad ima 20 listova, 3 tablice i 1 sliku.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Učinak soli na zdravlje krvnih žila	1
1.2. Važnost endotela i nastanak endotelne disfunkcije	2
1.3. Monociti i subpopulacija monocita u perifernoj krvi	3
1.4. Protočna citometrija.....	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	7
4. ISPITANICI I METODE	8
4.1. Ustroj studije.....	8
4.2. Ispitanici	8
4.3. Metode	8
4.4. Statističke metode.....	9
5. REZULTATI	10
5.1. Antropometrijska obilježja ispitanika.....	10
5.2. Vrijednosti krvnog tlaka i pulsa ispitanika	10
5.3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika	11
5.4. Distribucija „klasičnih“, „neklasičnih“ i „srednjih“ monocita u perifernoj krvi prije i nakon visokoslane dijeta.....	12
6. RASPRAVA	13
7. ZAKLJUČAK	15
8. SAŽETAK	16
9. SUMMARY	17
10. LITERATURA	18
11. ŽIVOTOPIS	20

1. UVOD

1.1. Učinak soli na zdravlje krvnih žila

Veliku pozornost i značaj kako u kliničkom, tako i u znanstvenoistraživačkom radu ima utjecaj prehrane s visokim udjelom kuhinjske soli na ljudsko zdravlje. Unos soli je nadmašio dnevne potrebe našeg organizma u svim razvijenim zemljama te u onima u razvoju (1). Naime, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje dnevni unos soli do 5 g/dan, no današnji je prosjek unosa soli u gotovo svim razvijenim zemljama svijeta oko 12 g/dan što predstavlja veliki globalni problem. Poznato je da povećan unos kuhinjske soli u organizam predstavlja čimbenik rizika za nastanak i razvoj kardiovaskularnih (i drugih) bolesti kao što su: ateroskleroza, hipertenzija, dislipidemija, bubrežno zatajenje i dr. Kardiovaskularne su bolesti važan javnozdravstveni problem diljem svijeta (2). Prema podacima europske statistike, kardiovaskularne su bolesti vodeći uzrok smrti i odgovorne su za 4,3 milijuna smrti godišnje što čini 42 % smrti u zemljama Europske unije (2).

Poremećaj endotela prethodi kardiovaskularnim bolestima (3). Brojna su istraživanja pokazala da čak i kratkotrajan visok unos soli prehranom ima nepovoljan utjecaj na endotelnu funkciju neovisno o promjenama arterijskog krvnog tlaka te je usko povezan s oslabljenom funkcijom krvnih žila kao i povećanim kardiovaskularnim rizikom. Mnoga su istraživanja na životinjama pokazala da promjene u unosu soli značajno mijenjaju vaskularnu reaktivnost na različite fiziološke podražaje i povezane su sa smanjenom funkcijom endotela (3). Također, te su studije pokazale da unos povećane količine soli u organizam dovodi do smanjenja koncentracije angiotenzina II (ANG II) u plazmi za koju je utvrđeno da dovodi do povećanja oksidativnog stresa i oštećenja vaskularne reaktivnosti. Osim toga, brojna novija istraživanja naglašavaju negativan učinak povećanog oksidativnog stresa na mehanizme dilatacije i pojavu endotelne disfunkcije (4). Povećan oksidativni stres dovodi do smanjenja o endotelu ovisne vazodilatacije krvnih žila smanjujući biorasploživost glavnog endotelnog vazodilatatora – dušikova oksida (NO) što posljedično dovodi do narušene vaskularne reaktivnosti. Ipak, učinci i mehanizmi akutnog opterećenja soli na funkciju endotela kod mladih zdravih osoba još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Kako je jedno od glavnih obilježja endotelne funkcije leukocitno-endotelna interakcija, odnosno aktivacija i upala endotela, tek predstoji razjasniti vezu između povećanog unosa soli u organizam i nastanka upale/aktivacije endotela te njihove uloge u patofiziološkoj kaskadi razvoja endotelne disfunkcije.

1.2. Važnost endotela i nastanak endotelne disfunkcije

Endotelne stanice oblažu stijenke cijelog krvožilnog sustava. Endotel je svojom strukturom jednostavan, ali raspodjelom gotovo sveprisutan organ, prosječne težine otprilike jedan kilogram (5). Endotelne stanice posjeduju bitne mehaničke, metaboličke i sintetske funkcije (6) uključujući: održavanje vaskularne homeostaze, kontrolu vaskularnog tonusa, inhibiciju agregacije trombocita, modulaciju migracije leukocita, regulaciju proliferacije glatkih mišićnih stanica te oblikovanje propusnosti vaskularne stijenke. Endotel djeluje kao moćna enzimatska barijera, uspješno regulira tonus i proliferacijski status arterijske mišićnice, kontrolira izlučivanje citokina te stvaranje i ekspresiju adhezijskih molekula (5). One prepoznaju humoralne, mehaničke i hemodinamičke događaje te se na njih prilagođavaju akutnim i kroničnim promjenama (6). U svrhu održavanja homeostaze endotelne stanice sintetiziraju i oslobađaju brojne vazoaktivne tvari kao što su: dušikov oksid (NO), prostaciklin (PGI_2) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik (EDHF), koji u konačnici dovode do relaksacije glatkih mišićnih stanica i vazodilatacije, te tvari koje uzrokuju vazokonstrikciju kao što su: tromboksan A_2 , angiotenzin II i druge. Stimulacija endotela u fiziološkim uvjetima potiče sintezu i oslobađanje NO-a koji se sintetizira uz pomoć NO sintaze iz L-arginina. NO je važan vazodilatator te ima brojne funkcije: štiti kardiovaskularni sustav time što opušta glatke mišićne stanice, inhibira adheziju leukocita te adheziju i agregaciju trombocita na endotelne stanice krvnih žila. Prostaciklin je glavni vazodilatatorni metabolit arahidonske kiseline koji aktivira receptore glatkih mišića i dovodi do relaksacije arterija. Prostaciklin ima važnu ulogu u smanjenju rizika nastanka tromboze, remodeliranju vaskularnog glatkog mišićja i vazodilataciji. Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF) su molekule koje dovode do hiperpolarizacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila i posljedične vazodilatacije te se smatra da predstavljaju kompenzatorni mehanizam endotel-ovisne vazodilatacije u stanjima kad je smanjena biodostupnost NO-a. Danas je poznato više molekula ili posrednika koji djeluju kao EDHF u različitim vrstama i tkivima: K^+ , metaboliti citokroma P450 (kao što je EETs, eng. Epoxyeicosatertranoic acids), produkti lipooksigenaze, vodikov peroksid (H_2O_2), ciklični adenzin monofosfat (cAMP), natriuretski peptid tip C itd.

Kao što je već navedeno, danas se zna da poremećaj endotela prethodi nastanku i razvoju kardiovaskularnih bolesti. Endotelna disfunkcija predstavlja promijenjeno funkcioniranje endotela koje je karakterizirano smanjenom vazodilatacijom, proupalnim stanjima i protrombotičkim svojstvima (7). Endotelna disfunkcija je stanje gubitka normalne funkcije endotela u kojem dolazi do funkcionalnih i strukturnih promjena zbog kojih endotel

gubi svoju zaštitnu ulogu. Disfunkcija endotela započinje povećanjem njegove permeabilnosti: mehaničke promjene nastaju redistribucijom proteinskih molekula u mikrofilamentima, a posljedične kontrakcije i deformiranje endotelnih stanica dovode do prekida bliskih staničnih kontakata s nastankom patoloških pukotina nakon čega slijedi pozitivnom povratnom spregom poticana kaskada upalnog odgovora (6). Endotel različitim mehanizmima prilagodbe nastoji kompenzirati mehanička i kemijska oštećenja žilnih stijenki (6).

1.3. Monociti i subpopulacija monocita u perifernoj krvi

Poznato je da razvoj endotelne disfunkcije osim promijenjenog vazoaktivnog odgovora i povećane razine oksidativnog stresa uključuje i povećanu endotelnu aktivaciju te njegovu infiltraciju leukocitima (monocita/neutrofila) što u konačnici dovodi do narušavanja imunološke homeostaze i nastanka vaskularne upale. Studije na miševima su pokazale da NaCl ima ulogu u modulaciji imunološkog sustava (8). Ipak, još uvijek nije razjašnjeno kakve promjene imunološkog sustava i upalnog odgovora uzrokuje kratkotrajan unos velike količine kuhinjske soli u organizam jer samo je mali broj istraživanja (kako na animalnom modelu tako i humanih studija) ispitivao taj problem. Štoviše, većina je provedenih humanih studija ispitivala utjecaj visokog unosa soli na pomagačke T limfocite 17 (Th17) (koji imaju proinflamatorni učinak) i aktivaciju regulatornih T-stanica (Treg) (koje imaju protuupalni učinak), a čiji su rezultati ukazali da neravnoteža u funkciji Th17/Treg izazvana visokim unosom soli može imati važnu ulogu u razvoju vaskularne upale i konačnog oštećenja organa (odnosno nastanak disfunkcije endotela). S druge strane, opće je prihvaćeno da je infiltracija leukocita (monocita/makrofaga) lokalno na mjesto upale pojedinog organa sastavni dio upalnog odgovora. Prema tome, interakcija leukocita s vaskularnim endotelnim stanicama predložena je kao drugi potencijalni mehanizam koji posreduje imunološki odgovor krvnih žila na čak i kratkotrajan visok unos soli u organizam.

Monociti su vrsta leukocita koja sazrijeva u koštanoj srži, a potom dospijevaju u krvotok gdje se zadržavaju oko 1 do 3 dana te zatim prelaze u tkivo i diferenciraju se u tkivne makrofage. Kao prekursori makrofaga i dendritičnih stanica djeluju kao fagocitne stanice koje predstavljaju urođen imunitet te čine prvu crtu imunološke obrane. Monociti povećavaju proliferativnu aktivnost koštane srži kao odgovor na upalne podražaje što dovodi do monocitoze, kliničkog stanja koje odražava povećan broj cirkulirajućih monocita (9). Upalni monociti odlaze na mjesta upale, proizvode upalne citokine i pridonose lokalnoj i sistemskejoj

upalnoj reakciji (9). Kao odgovor na promjene u okolišu monociti se mogu diferencirati u M1 upalne i M2 protuupalne makrofage tijekom rane upale. Monociti su stanična populacija u krvi s funkcionalnom heterogenosti (10). Dijele se na tri različite subpopulacije: „klasične” monocite koji su fagociti koji ne pojačavaju dodatno upalni odgovor; „neklasične” monocite koji su stanice s 'upalnim' karakteristikama i sposobnošću prezentiranja stranih antigena te „srednje” monocite koji su monociti koji prikazuju obilježja i klasičnih i neklasičnih monocita te imaju sposobnost fagocitoze i pojačavanja upalne reakcije. Nedavne su studije pokazale da dinamika pojedinih subpopulacija monocita može biti značajan prediktorni čimbenik budućih nepovoljnih kardiovaskularnih incidenata. Još uvijek nije do kraja ispitan utjecaj visokog unosa soli u organizam na raspodjelu i dinamiku subpopulacija monocita. U literaturi smo našli samo dvije humane studije o utjecaju dijete s visokim udjelom soli na distribuciju populacije/subpopulacija monocita. Studija Zhou i dr. iz 2013. godine izvijestila je (po prvi put) da je ukupan broj monocita ostao konstantan tijekom unosa hrane s visokim udjelom soli (15 grama dnevno tijekom sedam dana), ali da se populacija srednjih monocita (CD14 ++ CD16 +) brzo povećala četvrtog dana dijete s visokim udjelom soli što je bilo praćeno uzajamnim smanjenjem udjela klasičnih i neklasičnih monocita u zdravih ispitanika. Taj se odnos normalizirao tijekom ostatka trajanja dijete s visokim udjelom soli te je cijeli proces bio neovisan o promjenama razine arterijskoga krvnog tlaka. Yi i dr. (2015.) ispitali su utjecaj dugotrajne (50 dana) dijete s visokim udjelom soli na distribuciju monocita u populaciji zdravih ispitanika te su pokazali značajno veći broj monocita u usporedbi s ispitanicima koji su bili na dijeti s niskim udjelom soli što je u konačnici pokazalo da promjena unosa soli u organizam može dovesti do značajnih promjena u imunološkom sustavu zdravih pojedinaca (9).

1.4. Protočna citometrija

Protočna citometrija je suvremena analitička metoda visoke osjetljivosti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu stanica. Za razliku od klasičnih analitičkih metoda koje ispituju jedno svojstvo, protočna citometrija ima višeparametarski pristup i istovremeno mjeri fizičke (veličina i zrnatost) i imunološke (biljezi) parametre svake pojedinačne stanice. Tehnike protočne citometrije postaju sve važnije u suvremenoj kliničkoj medicini ponajviše zahvaljujući činjenici da ona omogućuje objektivnu, osjetljivu, brzu i točnu analizu relativno velikog broja staničnih svojstava (11). Ova se metoda najčešće koristi u imunologiji i hematologiji, no svoju je primjenu našla i u drugim granama medicine kao što su: patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina. Glavna područja primjene protočne citometrije

uključuju fenotipske i funkcionalne analize krvnih stanica. Protočni citometar se sastoji od triju međusobno povezanih sustava: protočnog, optičkog i elektronskog (12). Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja predstavlja nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje stanicama iz stanične suspenzije pojedinačan prolaz kroz sustav uske kapilare i dolazak do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Lasersko svjetlo obasjava stanice, a stupanj raspršenja svjetlosti pokazatelj je fizičkih osobina stanica: veličine (raspršena svjetlost pod malim kutom $0,5 - 10^\circ$ – FSC engl. forward scatter)) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom – SSC engl. side scatter)). Stanice se obilježavaju slobodnim ili za monoklonsko protutijelo vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) i na taj način se otkrivaju membranski i citoplazmatski biljezi. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti koja se mjeri uz pomoć detektora protočnog citometra. Svjetlosni se signali pretvaraju u digitalne signale koji služe za analizu putem računala. Prilikom definicije staničnih populacija koristi se citogram veličine i zrnatosti stanica (FSC \times SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Prednosti su moderne protočne citometrije: velika brzina mjernog signala, stanice prije analize nije potrebno prethodno fizički razdvojiti te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala).

2. HIPOTEZA

Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli uzrokovat će promjenu distribucije subpopulacija monocita („klasični“, „neklasični“ i „srednji“) periferne krvi u populaciji zdravih mladih žena.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja ispitati utjecaj kratkotrajne dijeta s visokim udjelom soli na distribuciju subpopulacija monocita – „klasičnih“, „neklasičnih“ i „srednjih“ monocita temeljem razine izražaja CD14 i CD16 molekula na leukocitima iz venske krvi (metodom protočne citometrije) u zdravih mladih žena.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani klinički pokus. Ispitanicima su provedena mjerenja prije i nakon specifičnog dijetnog protokola te su sami sebi bili kontrola. U istraživanje je uključeno 15 mladih zdravih žena (ukupno 45 posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta i obrada 45 uzoraka u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju). Ova je studija dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2016-06-8744) i odobrilo ju je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (klasa: 602-04/15-08/08, ur. broj: 2158-61-07-15-68).

4.2. Ispitanici

U studiju je uključeno 15 zdravih mladih žena koje su regrutirane putem oglasa na Medicinskome fakultetu u Osijeku. Isključni su kriteriji za sudjelovanje u studiji: prisutnost bolesti uključujući hipertenziju ili hipotenziju, koronarnu bolest, šećernu bolest, hiperlipidemiju, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila kao i uzimanje lijekova koji mogu imati utjecaj na endotel. Svi su ispitanici detaljno obaviješteni o protokolima i procedurama istraživanja te su prije ulaska u protokol morali potpisati informirani pristanak.

4.3. Metode

Protokol je istraživanja trajao 15 dana. Tijekom tih 15 dana ispitanici su imali tri posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LKFFS). Prvi je posjet bio pri ulasku u studiju, drugi je posjet bio nakon tjedan dana dijetete s niskim udjelom soli (LS), koji je zapravo bio tzv. „razdoblje ispiranja“, te treći posjet nakon tjedan dana dijetete s visokim udjelom soli (HS). Ispitanici su tijekom trajanja studije jeli hranu s niskim udjelom soli (bili su na LS dijeti) što podrazumijeva unos oko 2,3 g kuhinjske soli dnevno (DASH eating plan; US Department of Health and Human Services, 2006). Nakon prvog tjedna na takvom dijetnom protokolu svi su ispitanici bili tjedan dana na HS dijeti koja podrazumijeva unos oko 14 g soli dnevno. Kako bi svi ispitanici uzimali približno jednaku količinu soli, ispitanici su i tijekom drugog tjedna protokola hranom unosili oko 2,3 g soli, dok je ostatak soli bio nadomješten u obliku praha soli – 11,7 g dnevno. Tijekom svakog studijskog posjeta ispitanicima su uzeti uzorci venske krvi (za protočnu citometriju) te je uzet uzorak

prikupljenog 24-satnog urina (za kontrolu pridržavanja zadanog dijetnog protokola). Također, ispitanicima su izmjereni indeks tjelesne mase (BMI, eng. Body mass indeks) i omjer struk – bokovi te su izmjerene vrijednosti arterijskoga tlaka i pulsa.

Mjerenja arterijskog tlaka i pulsa provedena su na početku svakog posjeta, nakon 15 minuta u sjedećem položaju. Za mjerenje arterijskog tlaka korišten je poluautomatski oscilometar (OMRON, Osaka, Japan). Za konačnu vrijednost arterijskog tlaka i pulsa uzet je prosjek triju ponavljanih mjerenja.

„Klasični”, „neklasični” i „srednji” monociti odredili su se temeljem razine izražaja CD14 i CD16 molekula na leukocitima iz venske krvi na FACS Canto II protočnom citometru (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i primjenom Flowlogic softvera (Inivai Technologies, Australija). Uzorci su krvi pripremljeni i analizirani neposredno nakon prikupljanja, bez zamrzavanja, kako bi se spriječio gubitak stanica zbog zamrzavanja i odgađanja vremena analize. Uzorci periferne krvi prikupljeni su u epruvete koje su sadržavale 6 – 10 % 0.5 M EDTA. Stanice su obojene i inkubirane smjesom protutijela uključujući CD45-PerCP (clone: MEM-28, EXBIO), CD14 FITC (clone: 61D3, eBioscience), CD66b PE-Cy7 (clone: G10F5, eBioscience) i CD16 APC (clone: eBioCB16, eBioscience). Eritrociti su lizirani pomoću BD Lysing Solution 10 x koncentrata tijekom 10 min. na 37 °C i isprani. Biotinilirano protutijelo obilježeno je streptavidinom PE Cy7 (BD Bioscience) na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta u mraku i isprano. Nakon posljednjeg procesa pranja stanice su fiksirane 1 %-tnim formaldehidom. Najmanje je 10000 stanica prikupljeno pomoću BD FACS Canto II citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i analizirano pomoću FlowLogic softvera (Inivai Technologies, Menton, Australija).

4.4. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Svi parametri mjereni prije i nakon održanoga protokola (nakon „razdoblja ispiranja“ i poslije HS dijete) uspoređeni su pomoću t-testa za zavisne uzorke (eng. paired t-test), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele primijenio se Wilcoxonov test sume rangova (engl. Wilcoxon rank-sum test). Statistička značajnost podešena je na $P < 0,05$. Za statističku analizu korišten je program SigmaPlot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

5. REZULTATI

5.1. Antropometrijska obilježja ispitanika

Tablica 1. prikazuje podatke o dobi i antropometrijskim obilježjima 15 zdravih mladih žena prije i nakon protokola. Nakon tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije došlo do značajne promjene BMI-ja i WHR-a.

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika

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

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

N – broj ispitanika; HS – prehrana s visokim udjelom soli; LS – prehrana s niskim udjelom soli; BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struk – bokovi

t-test za zavisne uzorke.

5.2. Vrijednosti krvnog tlaka i pulsa ispitanika

Tablica 2. prikazuje promjene krvnog tlaka i pulsa prije i nakon HS dijete. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa nisu značajno promijenjene nakon provedenog HS protokola u usporedbi s mjerenjem prije HS-a.

Tablica 2. Vrijednosti krvnog tlaka i pulsa ispitanika

	prije HS-a (LS-a)	poslije HS-a	P
SBP (mmHg)	107 ± 9	109 ± 10	0,13
DBP (mmHg)	72 ± 8	72 ± 8	0,85
MAP (mmHg)	84 ± 8	84 ± 8	0,61
HR (otkucaja u min.)	78 ± 14	75 ± 11	0,63

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

HS – prehrana s visokim udjelom soli; LS – prehrana s niskim udjelom soli; SBP – sistolički arterijski tlak; DBP – dijastolički arterijski tlak; MAP – srednji arterijski tlak; HR – puls

t-test za zavisne uzorke.

5.3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika

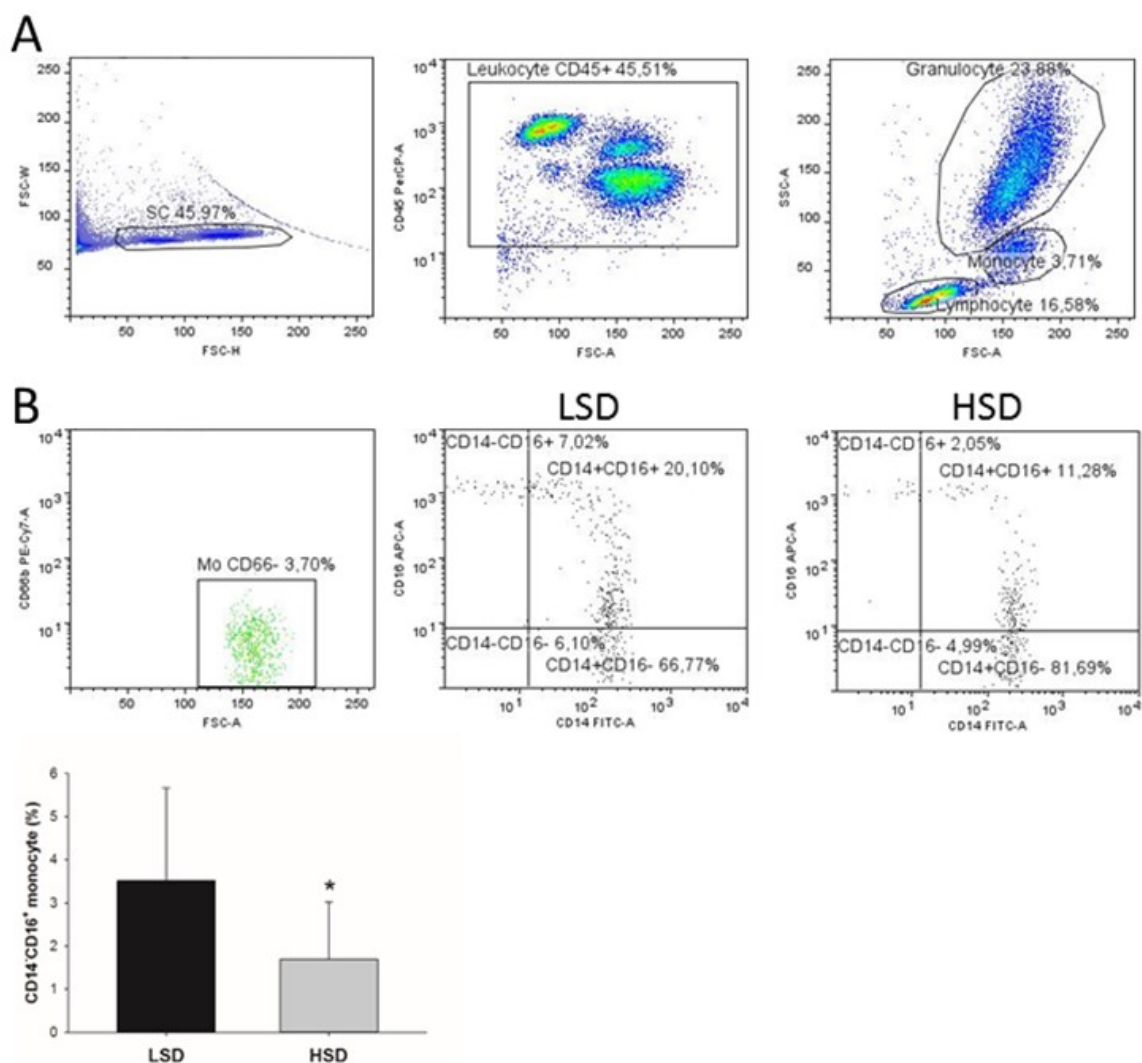
Nakon HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu je statistički značajno povećana kao i izračunat dnevni unos natrija što je potvrdilo da su se ispitanici pridržavali dijetnog protokola. Ostala mjerena obilježja u 24-satnom urinu nisu značajno promijenjena nakon provedenog protokola (Tablica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

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika

	prije HS-a (LS-a)	poslije HS-a	P
Volumen 24h urina (mL)	1340 ± 569	1319 ± 646	0,90
Natrij u 24h urinu (mmol/dU)	79,4 ± 28,6	213 ± 74	< 0,001
Izračunat unos NaCl (g/dan)	4,6 ± 1,7	12,5 ± 4,3	< 0,001
Kalij u 24h urinu (mmol/dU)	36,8 ± 14,5	41,4 ± 26,1	0,37
Urea u 24h urinu (mmol/dU)	187,7 ± 65,2	222,9 ± 119,1	0,17
Koeficijent kreatinina u 24h urinu (μmol/24h/kg)	142,2 ± 31,2	133,1 ± 50,1	0,33

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD).
t-test za zavisne uzorke.

5.4. Distribucija „klasičnih“, „neklasičnih“ i „srednjih“ monocita u perifernoj krvi prije i nakon visokoslane dijetе



Slika 1. Distribucija „klasičnih“, „neklasičnih“ i „srednjih“ monocita u perifernoj krvi prije i nakon HS dijetе protočnom citometrijom

Distribucija CD14 + CD16 ++ (neklasičnih) monocita iz periferne krvi značajno je smanjena nakon HS dijetе ($P = 0,04$) u usporedbi s mjerenjem nakon LS dijetе. Distribucija CD14 ++ CD16 + (srednjih monocita) monocita (CD14 ++ CD16 + monociti % LS dijetа $12,5 \pm 7,6$ vs. HS dijetа $10,3 \pm 5,8$, $P = 0,37$) kao i CD14 ++ CD16 – (klasičnih) monocita iz periferne krvi nije značajno promijenjena nakon protokola HS dijetе u usporedbi s LS dijetom (CD14 ++ CD16 – monociti % LS dijetа $67,7 \pm 23,4$ vs. HS dijetа $79,4 \pm 6,2$, $P = 0,06$). Svi parametri prije i nakon protokola uspoređeni su pomoću t-testa za zavisne uzorke (Slika 1.).

6. RASPRAVA

Provedena studija prikazuje utjecaj dijete s visokim udjelom soli u trajanju od tjedan dana na distribuciju subpopulacija monocita u perifernoj krvi zdravih mladih žena.

Spoznaje su ovog istraživanja: a) Antropometrijska se obilježja ne mijenjaju značajno tijekom sedam dana HS dijete (Tablica 1.). b) Vrijednosti krvnog tlaka i pulsa nisu značajno promijenjene prije i nakon provedenog protokola (Tablica 2.). c) Nakon HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu statistički je značajno povećana kao i izračunat dnevni unos natrija (Tablica 3.). d) Distribucija CD14 + CD16 ++ (neklasičnih) monocita iz periferne krvi značajno je smanjena nakon HS dijete ($P = 0,041$) u usporedbi s mjerenjem nakon LS dijete (Skila 1.). Distribucija CD14 ++ CD16 + (srednjih monocita) monocita (CD14 ++ CD16 + monociti % LS dijeta $12,5 \pm 7,6$ vs. HS dijeta $10,3 \pm 5,8$, $P = 0,37$) kao i CD14 ++ CD16 – (klasičnih) monocita iz periferne krvi nije značajno promijenjena nakon protokola HS dijete u usporedbi s LS dijetom (CD14 ++ CD16 – monociti % LS dijeta $67,7 \pm 23,4$ vs. HS dijeta $79,4 \pm 6,2$, $P = 0,06$).

Poznato je da povećan unos soli prehranom potiče osjećaj žeđi, a posljedično tomu dolazi do povećanog unosa vode u organizam te volumena ekstracelularne tekućine što bi u konačnici moglo rezultirati povećanjem tjelesne mase. Rezultati provedenog istraživanja o kratkotrajnom utjecaju HS dijete tijekom sedam dana u zdravih pojedinaca pokazali su da se vrijednosti BMI-ja i WHR-a ne mijenjaju značajno nakon zadanog dijetnog protokola.

Dosadašnja istraživanja opisuju na različite načine povezanost visokog unosa soli i promjene krvnog tlaka ovisno o modelu te o trajanju visokoslane dijete (14). Brojne studije na ljudima i životinjama pokazale su kako 3 – 7 dana visokoslane dijete ne mijenja značajno vrijednost krvnog tlaka (15). Prema rezultatima našeg istraživanja, vrijednosti sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg krvnog tlaka te pulsa tijekom i nakon provedenog protokola (sedam dana HS prehrane) ne mijenjaju se značajno (Tablica 2.) što je u skladu s rezultatima prethodnih studija.

Renin-angiotenzin sustav (RAS) glavni je homeostatski sustav koji kontrolira volumen tjelesnih tekućina, ravnotežu elektrolita, krvni tlak kao i endokrinu funkciju povezanu s kardiovaskularnom kontrolom te je presudan za održavanje vaskularne reaktivnosti (16). Ključan je čimbenik u nastanku esencijalne hipertenzije tijekom dugotrajne visokoslane

dijete. Nakon sedam dana HS dijetnog protokola ekskrecija natrija u 24-satnom urinu statistički je značajno povećana, kao i dnevni unos natrija, u usporedbi s tjednom kada su ispitanici konzumirali niske koncentracije soli (Tablica 3.). Ti su rezultati pokazali da je protokol studije proveden konzistentno te da su se ispitanici pridržavali zadanih dijetnih protokola.

Nedavne su studije pokazale kako visok unos soli prehranom može utjecati na normalno funkcioniranje imunološkog sustava te da HS dijeta može potaknuti aktivaciju leukocita, no to ovisi o vremenu trajanja eksperimenta i o količini unesene soli. Provedeno istraživanje o distribuciji „klasičnih“, „neklasičnih“ i „srednjih“ monocita druga je studija koja ispituje utjecaj akutnog unosa visokih koncentracija soli na distribuciju subpopulaciju monocita periferne krvi u populaciji zdravih mladih žena. U ovom istraživanju dobiveni rezultati potvrđuju našu hipotezu o promjeni distribucije subpopulacija monocita. Uspoređujući dobivene rezultate ovoga istraživanja s rezultatima studije koja je po prvi put ispitala utjecaj akutnog unosa soli (15 grama dnevno tijekom sedam dana) na distribuciju populacije/subpopulacija monocita, autora Zhou i suradnika iz 2013. godine, može se zaključiti da rezultati tih dviju humanih studija nisu u potpunosti isti. Naši su rezultati pokazali da je distribucija neklasičnih monocita značajno smanjena nakon tjedan dana visokoslane prehrane, no distribucija srednjih i klasičnih monocita nije značajno promijenjena za razliku od studije autora Zhou i sur. koja je izvijestila da je ukupan broj monocita ostao konstantan tijekom unosa hrane s visokim udjelom soli, ali da se populacija srednjih monocita povećala četvrtog dana HS dijete što je bilo praćeno značajnim smanjenjem udjela klasičnih i neklasičnih monocita u zdravih ispitanika, no taj se odnos normalizirao tijekom ostatka trajanja dijete s visokim udjelom soli. Studija o akutnom opterećenju visokim koncentracijama soli nije dovela do značajnog povećanja broja monocita u perifernoj krvi zdravih ispitanika za razliku od studija koje su ispitivale utjecaj dugotrajne dijete s visokim udjelom soli na distribuciju monocita koja je pokazala promjene u imunološkom statusu te značajno veći broj monocita.

Tek u budućim istraživanjima predstoji rasvijetliti zbog čega dolazi do smanjenja populacije neklasičnih monocita nakon tjedan dana dijete s visokim udjelom soli te kakav mogući učinak ima takva promjena na nastanak endotelno-leukocitne interakcije i endotelne disfunkcije.

7. ZAKLJUČAK

- Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli doveo je do značajnog smanjenja populacije CD14 + CD16 ++ (neklasičnih) monocita iz periferne krvi u zdravih mladih žena.
- Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije značajno utjecao na distribuciju CD14 ++ CD16 + (srednjih) i CD14 ++ CD16 – (klasičnih) monocita iz periferne krvi u zdravih mladih žena.
- Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije doveo do značajnih promjena arterijskoga tlaka u zdravih mladih žena.
- U budućim istraživanjima predstoji rasvijetliti zbog čega dolazi do smanjenja populacije neklasičnih monocita nakon tjedan dana dijete s visokim udjelom soli te kakav mogući učinak ima takva promjena na nastanak endotelno-leukocitne interakcije i endotelne disfunkcije.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj je ove studije bio ispitati utjecaj kratkotrajne dijeta s visokim udjelom soli na distribuciju subpopulacija monocita – „klasičnih”, „neklasičnih” i „srednjih” monocita temeljem razine izražaja CD14 i CD16 molekula na leukocitima iz venske krvi (metodom protočne citometrije) u zdravih mladih žena.

USTROJ STUDIJE: Nerandomizirani kontrolirani klinički pokus.

ISPITANICI I METODE: Studijom je obuhvaćeno 15 ispitanika, mladih zdravih žena. Sedam dana bili su na niskoslanjoj dijeti (~ 2,3 g soli/dan) te nakon toga sedam dana na visokoslanjoj dijeti (~ 14 g soli/dan). Prije i poslije dijetnog protokola određeni su indeks tjelesne mase (BMI), omjer struk – bokovi (WHR), arterijski tlak, puls, biokemijska obilježja u 24-satnom urinu te distribucija subpopulacija monocita u perifernoj krvi.

REZULTATI: Nije bilo značajne promjene BMI-ja i WHR-a prije i nakon HS dijeta. Promjene u 24-satnom urinu potvrdile su pridržavanje dijetnog protokola. Nije bilo značajne promjene krvnog tlaka i pulsa prije i nakon HS protokola. HS prehrana uzrokovala je značajno smanjenje populacije CD14 + CD16 ++ (neklasičnih) monocita. Tjedan dana dijeta s visokim udjelom soli nije značajno utjecao na distribuciju CD14 ++ CD16 + (srednjih) i CD14 ++ CD16 – (klasičnih) monocita iz periferne krvi u zdravih mladih žena.

ZAKLJUČAK: Jedan tjedan prehrane s visokim udjelom soli doveo je do značajnog smanjenja populacije CD14 + CD16 ++ (neklasičnih) monocita u odsutnosti promjena krvnog tlaka u zdravih mladih žena.

KLJUČNE RIJEČI: endotel; subpopulacija monocita; visok unos soli.

9. SUMMARY**THE EFFECT OF HIGH SALT DIET ON PERIPHERAL BLOOD MONOCYTE SUBPOPULATIONS DISTRIBUTION IN YOUNG HEALTHY WOMEN**

OBJECTIVE OF THE STUDY: The goal of the study is to investigate the effect of a short-term high salt diet on the distribution of monocyte subpopulations - classical, non-classical and intermedium monocytes based on the expression of CD14 and CD16 molecules on venous blood leukocytes in cytometry flow patterns in healthy young women.

ORGANIZATION OF THE STUDY: Nonrandomized controlled clinical experiment.

MATERIALS AND METHODS: The study included 15 respondents, young healthy women. For 7 days they were on a low salted diet (~ 2.3 g salt / day) followed by 7 days on high salted diet (~ 14 g salt / day). Before and after the protocol, body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), blood pressure, heart rate, biochemical parameters in 24-hour urine, and distribution of monocyte subpopulations in peripheral blood were determined.

RESULTS: There was no significant change in BMI, WHR before and after the HS diet. Increased 24-hour urine sodium excretion have confirmed compliance to the study protocol. There was no significant change in blood pressure and heart rate before and after the protocol. HS diet has caused a significant reduction in the population of CD14 + CD16 ++ (non-classical) monocytes. HS diet did not significantly affect distribution of CD14 ++ CD16 + (intermedium) and CD14 ++ CD16 – (classical) monocytes from peripheral blood in healthy young women.

CONCLUSION: One week of high salt diet resulted in a significant reduction in CD14 + CD16 ++ (non-classical) monocytes, in the absence of changes in blood pressure in healthy young women.

KEY WORDS: endothelium; subpopulation of monocytes; high salt intake.

10. LITERATURA

1. Premužić V, Erceg I, Jovanović A, Reiner Ž, Jelaković B. Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2010;6:1-2.
2. Kralj V, Sekulić K, Šekerija M. Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj. *Hrvatski zavod za javno zdravstvo*. 2013;1;1-54.
3. Čavka A, Čosis A, Jukić I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, i sur. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol*. 2015;593.24:5313-5324.
4. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994;74:416-421.
5. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, i sur. Endotelna funkcija-funkcionalni pokazatelji kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn* 2012;44(1-4):135-146.
6. Ružić A, Miletić B, Iskra Nola A, Peršić V, Ražov Radas M, Včev A. Endotelna disfunkcija u "enigmatskoj slagalici" kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas*. 2009;6(1):2-15.
7. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction Canadian Institutes of Health Research Multidisciplinary Research Group on Hypertension and Hypertension Clinic, Clinical Research Institute of Montréal, Montréal, Québec, Canada. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1983-1992.
8. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effect of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res*. 2017;166(1):103-110.
9. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory disease. *BioMed*. 2014;2:1-9.
10. Zhou X, Zhang L, Ji WJ, Yuan F, Guo ZZ, Pang B, i sur. Variation in Dietary Salt Intake Induces Coordinated Dynamics of Monocyte Subsets and Monocyte-Platelet

- Aggregates in Humans: Implications in End Organ Inflammation. *Plos One*. 2013;8:1-12.
11. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatr Croat*. 2006;50:176-182.
 12. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. 2nded. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988.
 13. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94:1298-1303.
 14. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse Cardiovascular Effects of Acute Salt Loading in Young Normotensive Individuals. *Hypertension* 2008;51:1525-1530.
 15. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2002;4(4):274-6.
 16. Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney & blood pressure research*. 2011;34:1-11.

11. ŽIVOTOPIS

Mirela Repinc

Datum i mjesto rođenja: 5. svibnja 1989., Virovitica

Adresa stanovanja: Ulica Svetog Trojstva 107, 33406 Lukač, Hrvatska

e-pošta: mirela_repinc@hotmail.com

Obrazovanje:

- rujanj 2004. – lipanj 2008.: Tehnička škola Virovitica; smjer: medicinska sestra – tehničar
- srpanj 2009. – veljača 2013.: Stručni studij sestrinstva, Medicinski fakultet Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- srpanj 2015. – danas: Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku