

UČINAK 7-DNEVNE DIJETE S VELIKIM UDJELOM KUHINJSKE SOLI NA UPALNI ODGOVOR I AKTIVACIJU ENDOTELA U ZDRAVIH MLADIH POJEDINACA

Knezović, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:152:021555>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ana Knezović

**UČINAK 7-DNEVNE DIJETE S VELIKIM UDJELOM KUHINJSKE SOLI NA
UPALNI ODGOVOR I AKTIVACIJU ENDOTELA U ZDRAVIH MLADIH
POJEDINACA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

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

Komentorica rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj

Rad ima 95 stranica.

Predgovor radu

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Stupin na poticanju, vođenju, dostupnosti i podršci pri svakom koraku izrade ove disertacije. Bila je mentorica doslovno u svakom smislu te riječi.

Zahvaljujem i komentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj na podršci, komentarima i vođenju osobito na imunološkom području disertacije.

Veliko hvala i prof. dr. sc. Ines Drenjančević, utemeljiteljici osječke „priče o soli“ u koju nas je sve strpljivo uvela te nam potom pružila svu potrebnu podršku u našem znanstvenom radu. Hvala i Nikolini Kolobarić i Petru Šušnjari na stručnoj pomoći i opuštenoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Puno hvala doc. dr. sc. Vlatki Periši, kumi, prijateljici i kolegici koja je bila od velike pomoći pri mom dosadašnjem znanstvenom radu.

Puno hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama koji su me cijelo vrijeme podržavali i ohrabivali da idem dalje.

Najviše hvala mom suprugu Marku i djeci Luciji, Ivanu i Emi koji me svaki dan iznova raduju i daju mi vjetar u leđa.

Ovo je istraživanje financirano iz sredstava projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ.

Istraživački projekt (IP-2016-06-8744): Interakcija renin-angiotenzinskog i adrenergičkog sustava u aktivaciji endotela uzrokovanoj oksidativnim stresom (RAS-AdrenOX).

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Utjecaj velikog unosa soli na renin-angiotenzinski sustav.....	3
1.2. Utjecaj velikog unosa soli na simpatički živčan sustav.....	4
1.3. Utjecaj velikog unosa soli na endotelnu funkciju.....	6
1.4. Utjecaj velikog unosa soli na oksidativnu ravnotežu.....	10
1.5. Utjecaj velikog unosa soli na imunološki odgovor.....	12
1.5.1. Sol i citokini.....	13
1.5.2. Sol i imunološke stanice.....	13
1.5.3. Sol, leukocitna adhezija i endotelna aktivacija.....	19
1.5.4. Kliničke studije - sol i imunološki odgovor.....	21
1.5.5. Sol i infekcije.....	22
2. HIPOTEZA	24
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	25
4. ISPITANICI I METODE	26
4.1. Ustroj studije.....	26
4.2. Ispitanici.....	26
4.3. Metode.....	27
4.3.1. Analiza uzoraka 24h urina.....	28
4.3.2. Antropometrijska mjerenja i mjerenje vrijednosti krvnog tlaka.....	29
4.3.3. Uzorkovanje i analiza uzoraka venske krvi.....	29

4.3.4. Serumska koncentracija proteina pro- i protuupalnih citokina, komponente C3a komplementa, topljivih staničnih adhezijskih molekula i esej endoglina.....	29
4.3.5. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC), krioprezervacija, odmrzavanje i kultivacija.....	30
4.3.6. Ispitivanje frekvencije regulacijskih T limfocita (Treg) i pomoćničkih T limfocita (Th17) i omjera Th17/Treg.....	31
4.3.7. Određivanje serum i glukokortikoid regulirane kinaze 1 (SGK1)	36
4.3.8. Određivanje p38 mitogenom aktivirane protein kinaze.....	36
4.3.9. Određivanje koncentracije proteina - biomarkera oksidativnog stresa i antioksidativne obrane: reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (TBARS), sposobnosti plazme za smanjenje željeza (FRAP) i 8-iso prostaglandina F2 alfa (8-iso-PGF2 α).....	37
4.3.10. Mjerenje o endotelu ovisne reaktivnosti mikrocirkulacije kože.....	38
4.4. Statističke metode.....	39
5. REZULTATI.....	40
5.1. Hemodinamski, antropometrijski i biokemijski pokazatelji.....	40
5.2. Koncentracije serumskih proupalnih i protuupalnih biljega te biljega aktivacije endotela.....	43
5.3. Frekvencije T regulacijskih (Treg) i pomoćničkih T limfocita (Th17) te omjer Th17/Treg.....	45

5.4. Relativna i fosforilirana serum i glukokortikoid regulirana kinaza (SGK1) i p38 mitogen aktivirana protein kinaza (p38MAPK).....	48
5.5. Biljezi oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta.....	49
5.6. O endotelu ovisna mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i iontoforezu acetilkolina (acetilkolinom inducirana dilatacija, AChID)	52
5.7. Povezanost između količine dnevnog unosa soli te biljega upalnog odgovora i aktivacije endotela.....	53
5.8. Povezanost između biljega upalnog odgovora i aktivacije endotela sa promjenom mikrovaskularne reaktivnosti i biljezima oksidativnog stresa ovisno o količini unosa soli u organizam.....	54
6. RASPRAVA.....	55
6.1. Utjecaj soli na ranu upalu.....	55
6.2. Utjecaj soli na aktivaciju endotela.....	61
6.3. Povećani oksidativni stres kod velikog unosa soli i rane upale.....	62
6.4. Oštećena o endotelu ovisna mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i iontoforezu acetilkolina (acetilkolinom inducirana dilatacija, AChID) kod velikog unosa soli.....	63
7. ZAKLJUČCI.....	66
8. SAŽETAK.....	68
9. SUMMARY.....	70

10. LITERATURA.....	72
11. ŽIVOTOPIS.....	90

POPIS KRATICA

20-HETE - 20-hidroksieikosatetraenoična kiselina

8-izo-PGF2 α - 8-iso-prostaglandin F2 α

ACh - acetilkolin

AChID - acetilkolinom inducirana dilatacija

AH - arterijska hipertenzija

AhR - aril hidroksikarbon receptor, jedan od transkripcijskih faktora

ANG II - angiotenzin II

APC - (engl. antigen presentig cells) antigen predočne stanice

AUC - (engl. area under curve) površina ispod krivulje

AŽS - autonomni živčani sustav

BMI - (engl. body mass index) indeks tjelesne mase

CAM - (engl. cell adhesion mollecule) stanična adhezijska molekula

cAMP - ciklički adenzin-monofosfat

CASH - (engl. Consensus Action on Salt and Health)

CCR4 - kemokinski receptor tip 4

CCR5 - kemokinski receptor tip 5

CCR6 - kemokinski receptor tip 6

CCR7 - kemokinski receptor tip 7

CD11a - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 11a

CD11b - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 11b

CD123 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 123

CD28 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 28

CD3- (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 3

CD36 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 36

CD4 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 4

CD49d - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 49d

CD56 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 56

CD66b -(engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 66b

CD8 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 8

CD137 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 137

CD14 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 14

CD16 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 16

CD19 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 19

CD196 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 196

CD20 - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 20

CD235a - (engl. cluster of differentiation) klaster diferencijacije 235a

cGMP- ciklički gvanozin monofosfat

c-Maf – (engl. MusculoAponeurotic Fibrosarcoma) muskuloaponeurotski fibrosarkom faktor transkripcije

COX - ciklooksigenaza

CRASH (engl. Croatia Action on Salt and Health)

CTLA4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) - citotoksični T limfocit vezani antigen 4

CYP450 - citokrom P450

DASH - (engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension) američka inicijativa za smanjenje soli u prehrani

DCF-DA- diklorodihidrofluorescein diacetat

DMSO - dimetil sulfoksid

DOCA - deoksikortikosteron acetat

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

ED - endotelna disfunkcija

EDCF - (engl. endothelial-derived constricting factors) vazokonstriksijski čimbenici porijeklom iz endotela

EDHF - (eng. endothelial-derived hyperpolarizing factors), čimbenici hiperpolarizacije porijeklom iz endotela

EET - epoksiekosatrienoična kiselina

ET-1 - endotelin - 1

FBS - (engl. fetal bovine serum) goveđi fetalni serum

FITC CD3 - (engl. fluorescein isothiocyanate) fluorescein izotiocijanat

FMD - (engl. Flow mediated dilatation) protokom posredovana dilatacija

FOXO1 - (engl. forkhead box protein O1) - FOXO1 protein kodirajući gen

FOXP3 - (engl. forkhead box P3) transkripcijski čimbenik iz porodice *forkhead* koji je izražen na CD4⁺ regulacijskim stanicama

FRAP – (engl. ferric reducing ability of plasma) sposobnost plazme za redukciranje željeza

GM-CSF - (engl. Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor) čimbenik rasta granulocitno-makrofagne loze

GPx - glutation peroksidaza

GPx4 - glutation peroksidaza 4

H₂O₂ - vodikov peroksid

HBSS - (engl. Hank's balanced salt solution) - Hankova balansirana slana otopina

HClO - hipoklorna kiselina

HIF- 1 α - (engl. Hypoxia-inducible factor 1alpha)- hipoksijom inducirani faktor 1 alfa

HRV -(eng. heart rate variability)- varijabilnost otkucaja srca

HS - (engl. high salt) - visoko slana prehrana

hsCRP - (engl. high sensitive C reactive protein) visokosenzitivni C reaktivni protein

ICAM -1 - (engl. intercellular adesion mollecule 1) međustanična adhezijska molekula 1

ICOS - (engl. inducibile T cell costimulator) - inducibilni T stanični kostimulator

IFN - γ - interferon γ

IKzf3 - (engl. IKAROS Family Zinc Finger 3) jedan od transkripcijskih faktora

IL 23 - interleukin 23

IL-10 - interleukin 10

IL-13 - interleukin 13

IL-17A- interleukin 17A

IL-1 β - interleukin 1 β

IL-2 - interleukin 2

IL-21 - interleukin 21

IL22 - interleukin 22

IL-23R - receptor za interleukin 23

IL-4 - interleukin 4

IL-6 - interleukin 6

IL-9 - interleukin 9

KV -kardiovaskularni

LAG 3 - (engl. Lymphocyte activation gene 3 protein)- protein aktivacije limfocita 3

LAP - (engl. latency associated peptide) peptid povezan s latencijom

LDF - (engl. Laser Doppler Flowmetry) -mjerenje protoka laser dopplerom

LFA- (engl. leukocyte function-associated antigen) leukocitni funkcijski antigen

L-NMMA - NG-monometil-L-arginin

LS - (engl. low salt) - niskoslana prehrana

MAP - (engl. mean arterial blood pressure) srednji arterijski tlak

MCP - 1 - monocitni kemotaktični protein

MDA -malonilaldehid

MIP-2 - makrofagni inflamatorni protein 2

MIP-3 α - makrofagni inflamatorni protein 3 alfa

mRNA- glasnička ribonukleinska kiselina

NaCl - natrijev klorid

NFAT5 - nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5

NO - dušikov oksid

NOS - (engl. nitric oxide synthase) dušik - oksid sintaza

NO_x - metaboliti dušičnog oksida

OH - hidroksil

ONOO- - perokisnitrit

p38MAPK - p38 mitogenom aktivirana protein-kinaza

PBL - (engl. peripheral blood leucocytes) leukociti periferne krvi

PBMC - (engl. peripheral blood mononuclear cells) mononuklearne stanice periferne krvi

PGF2 α - prostaglandin F2 alfa

PGI2 - prostaciklin / prostaglandin I2

PORH – post-okluzivna reaktivna hiperemija

PRA - plazmatski renin

PU - (engl. perfusion unit) perfuzijska jedinica

PURE - (engl. Prospective Urban Rural Epidemiology)

RAS - renin - angiotenzin sustav

ROR γ T - (engl. retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma) transkripcijski čimbenik, član porodice receptora retinske kiseline

ROS - (engl. reactive oxygen species) reaktivni oblici kisika

SGK1 - serum i glukokortikoid inducirana kinaza

SOD- superoksid dismutaza

SR - (engl. salt resistant) sol neosjetljivi / rezistentni

SS - (engl. salt sensitivity) - sol osjetljivi

STAT 3 - (engl. Signal transducer and activator of transcription) Pretvarač/transduktor signala i aktivator transkripcije

TBARS - (engl. thiobarbituric acid reactive substances) reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline

T-bet (engl. T-box expressed in T cells) - faktor transkripcije u T box-u

TCR - (engl. T cell receptor) T stanični receptor

TEMPOL - 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil

TGF β - (engl. transforming growth factor beta) transformirajući faktor rasta beta

Th stanice - T pomoćničke stanice

Th17 - T pomoćnički limfociti 17

TNF α - tumor nekrotizirajući faktor alfa

TP- prostanooidni receptor tromboksana A2

Treg - T regulacijski limfociti

TXA2 - tromboksan A2

VCAM-1- (engl. –vascular cell adhesion molecule 1) vaskularna stanična adhezijska molekula 1

VLA-4 - (engl. very late antigen 1) vrlo kasni antigen 1

WASH (engl. World Action on Salt and Health)

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

POPIS TABLICA

Tablica 5.1. Antropometrijska i hemodinamska obilježja nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.....	41
Tablica 5.2. Biokemijska obilježja u serumu nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.....	42
Tablica 5.3. Biokemijska obilježja u 24h urinu nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.....	43
Tablica 5.4. Serumska proteinska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina, C3a komponenta komplementa u odgovoru na 7-dnevnu visokoslanu dijetu u mladih, zdravih pojedinaca.....	44
Tablica 5.5. Serumska koncentracija topljivih staničnih adhezijskih molekula i endoglina u odgovoru na 7-dnevnu visokoslanu dijetu u mladih, zdravih pojedinaca.....	45

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Temeljno načelo vaskularne homeostaze.....	8
Slika 1.2. Diferencijacija CD4+ T stanica.....	14
Slika 1.3. Patogeni i nepatogeni fenotip Th 17 stanica.....	15
Slika 1.4. Utjecaj puta p38MAPK aktiviranog visokoslanim medijem na Th17/Treg.....	18
Slika 4.1. Protokol studije	28
Slika 4.2 Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija od interesa za procjenu regulacijskih T stanica periferne krvi (Treg) protočnom citometrijom.....	34
Slika 4.3. Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija od interesa za procjenu Th17 populacije periferne krvi protočnom citometrijom.....	35
Slika 5.1. Učinci kratkotrajne prehrane s velikim udjelom soli na učestalost perifernih regulatornih T stanica (Treg) u zdravih ,mladih osoba.....	46
Slika 5.2. A i B Učinci kratkotrajne prehrane s velikim udjelom soli na zastupljenost periferne Th17 populacije u zdravih mladih osoba.....	47
Slika 5.3. A i B Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na relativnu količinu ukupne serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) (A), te ukupnu (i) i fosforiliranu (ii) p38 mitogen-aktiviranu proteinsku kinazu (p38MAPK) (B) kod mladih, zdravih ispitanika.....	48
Slika 5.4. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na markere oksidativnog stresa i antioksidativnu obranu kod zdravih osoba.....	50
Slika 5.5. A i B. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli (HS) na mikrovaskularnu reaktivnost kože kod mladih zdravih osoba.....	52

Slika 6.1. Dihotomna, kontekst ovisna sudbina T pomoćničkih stanica kada su izložene

visokoslanim uvjetima.....58

1. UVOD

Povećani unos soli prehranom povezan je s razvojem kardiovaskularnih bolesti, osobito arterijske hipertenzije (AH) (1), koje su vodeći uzrok smrtnosti i glavni uzrok morbiditeta u svijetu, s 3,9 milijuna smrtnih slučajeva u Europi i preko 1,8 milijuna smrtnih slučajeva u Europskoj uniji (2). Studija PURE procjenjuje da je u 2010. godini globalni unos natrija iznosio 3.950 mg dnevno (što je ekvivalent 9,88 g NaCl), što je znatno više od preporučenih količina od 2.300 mg (ekvivalent 5,75 g NaCl) ili manje dnevno u svim objavljenim smjernicama (3) a istovremeno procjene pokazuju da 31,1 % odraslih osoba (1,39 milijardi) u svijetu ima AH (4). Podaci za Hrvatsku iz 2010. navode da prosječan unos soli za odrasle iznosi $13,3 \pm 4,3$ g dnevno ($223,6 \pm 74,0$ mmol Na na 24 h urina) za muškarce i $10,2 \pm 4,2$ g dnevno ($177,3 \pm 69,1$ mmol Na na 24 h urina) za žene (5).

Kako je dokazano da smanjenje unosa soli hranom može značajno smanjiti vrijednosti arterijskog tlaka (6,7) i kardiovaskularne (KV) incidente, a time i troškove zdravstva, smanjenje unosa soli hranom postao je javnozdravstveni cilj. Mnoge države svijeta pokrenule su na nacionalnoj razini inicijative za smanjenje kuhinjske soli u prehrani, te su najbolje rezultate pokazale Finska, Japan, Portugal i Velika Britanija. Program koji je pokrenut u Velikoj Britaniji prije desetak godina (engl. Consensus Action on Salt and Health - CASH) uzor je svima i postupno je do 2005. godine prerastao u svjetski pokret (engl. World Action on Salt and Health - WASH). U SAD-u je predstavljena DASH (engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension) dijeta koja podrazumijeva prehranu bogatu voćem, povrćem i mliječnom hranom s niskim udjelom masti te sa smanjenom količinom zasićenih i ukupnih masti i ukupnim unosom oko 3 g soli dnevno, nakon što je dokazano da može prevenirati nastanak hipertenzije te znatno sniziti povišeni krvni tlak (8). U Hrvatskoj je 2006. godine, na kongresu Hrvatskog društva za hipertenziju, prihvaćena Deklaracija o važnosti započinjanja nacionalne kampanje za smanjenje konzumacije kuhinjske soli, a 2007. godine na kongresu Hrvatskog društva za aterosklerozu predstavljena je Nacionalna kampanja za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli putem prehrane (engl. Croatian Action on Salt and Health - CRASH) čime se Hrvatska pridružila skupini naprednih zemalja koje su prihvatile ciljeve zadane od strane Svjetske zdravstvene organizacije i Ujedinjenih naroda o smanjivanju unosa kuhinjske soli za 30% do 2025. godine. Za sada imamo samo preliminarne podatke o dnevnom unosu soli u Hrvatskoj iz 2019. godine, o kojima je izvijestio prof. Jelaković na 41. Hypertension Highlights kongresu 2020. godine, a koji pokazuju da je prosječni dnevni unos soli smanjen za 1,6 g soli dnevno u posljednjih 12

godina (1,9 g soli dnevno u muškaraca i 1,0 g soli dnevno u žena) te također ukazuju da postoji i dalje potreba za nastavkom napora da se unos soli u Hrvatskoj smanji na vrijednosti bliže onima koje preporučuje WHO (5g soli/dan).

Unatoč velikoj prevalenciji i desetljećima istraživanja, etiologija većine slučajeva hipertenzije još uvijek je nedefinirana. Povezanost unosa soli i KV bolesti (posebno AH) podrazumijeva međudjelovanje nekoliko čimbenika koji uključuju dob, spol, aktivnost renin-angiotenzinskog sustava (RAS), aktivnost simpatičkog živčanog sustava, endotelnu funkciju i oksidativnu ravnotežu (9). Također, poznato je da imunološki sustav ima aktivnu ulogu u nastanku i progresiji AH, te da je unos soli direktno povezan s promjenama imunološkog odgovora (10).

Ranije se smatralo da je osjetljivost krvnog tlaka na sol posljedica odgođenog izlučivanja soli uslijed oštećenja bubrega. A nedavne studije dodale su neke nove spoznaje o patofiziološkim mehanizmima hipertenzije osjetljive na sol i dovele u pitanje klasičan prikaz osjetljivosti na sol. U posljednjim godinama postalo je jasno da velik unos kuhinjske soli utječe na vaskularnu i endotelnu funkciju čak i kada nema promjena arterijskog tlaka (11). Weinberger je jedan od pionira otkrića štetnog učinka velikog unosa soli na čovjeka, čak u izostanku promjena arterijskog tlaka. Tijekom 28 godina je pratio odgovor krvnog tlaka oko 700 ispitanika na povećanje i depleciju soli i volumena i ukazao da je osjetljivost na sol (engl. salt sensitivity - SS), čak i među inicijalno normotenzivnim ispitanicima, povezana s povećanim rizikom od smrti (12). Istraživanje u Japanu na ispitanicima s esencijalnom hipertenzijom je ukazalo da je osjetljivost na sol neovisan kardiovaskularni čimbenik rizika (13). Kada govorimo o SS važno je reći da nažalost, nema univerzalne definicije osjetljivosti na sol i metoda za procjenu osjetljivosti na sol varira od studije do studije. U većini studija osjetljivost na sol definirana je kao akutna promjena srednjeg arterijskog krvnog tlaka (engl. mean arterial blood pressure, MAP) koja odgovara smanjenju ili povećanju unosa natrija. Uglavnom je osjetljivost na sol proizvoljno definirana kao povećanje krvnog tlaka za 10 % ili više tijekom dijete s velikim udjelom soli u odnosu na vrijednosti krvnog tlaka tijekom dijete s malo soli (14). GenSalt istraživačka skupina je pak ukazala da ženski spol, starija dob i veća početna razina arterijskog tlaka povećavaju reakcije arterijskog tlaka (op. a., dakle, osjetljivost na sol) na natrij u prehrani (15).

Mehanizam utjecaja velikog unosa soli na oštećenje ciljnih organa neovisno o arterijskom tlaku još je nejasan. Stoga, da bi se razumjela patofiziološka veza opterećenja solju i hipertenzije (i

drugih KV bolesti) nužno je istražiti rane učinke opterećenja solju na gore spomenute čimbenike: aktivnost renin-angotenzin sustava (RAS) i simpatičkog živčanog sustava, endotelnu funkciju, oksidativnu ravnotežu i imunološki odgovor u zdravih ispitanika.

Obzirom da je utjecaj soli na imunološki sustav relativno novo područje istraživanja koje je u ekspanziji, u uvodu disertacije će saznanja iz tog područja biti opširnije opisana u odnosu na ranija saznanja o učinku soli na homeostazu i regulaciju krvnog tlaka. Iako su u nastavku po sekcijama opisani pojedini mehanizmi koji su potaknuti opterećenjem solju, važno je napomenuti da je njihov međudnos međusobno neodjeljiv te da se oni neminovno isprepliću u toj kompleksnoj kaskadi učinaka soli na organizam.

1.1. Utjecaj velikog unosa soli na renin-angiotenzinski sustav

RAS ima središnju ulogu u kontroli ravnoteže soli i vode u tijelu i regulaciji arterijskog krvnog tlaka. Dok baroreceptorski refleks kratkoročno reagira na sniženi arterijski tlak, RAS je odgovoran za dugotrajnije promjene. Aktivnost RAS-a kontrolira renin, koja se oslobađa iz bubrežnih jukstaglomerularnih stanica u cirkulaciju. Otpuštanje renina regulirano je složenim međusobnim djelovanjem nekoliko lokalno djelujućih hormona ili mehanizama te duljim povratnim petljama od kojih jedna uključuje unos soli. Akutna opterećenja NaCl-om ili dugotrajniji unos soli potiskuju aktivnost renina u plazmi (suprimira RAS), dok ga smanjenje unosa NaCl stimulira.

Sve veći broj dokaza ukazuje na to da kronično potisnuti RAS pa tako i niske razine angiotenzina II (ANG II) u štakora hranjenih HS prehranom imaju štetne učinke koji su gotovo identični onima koji se javljaju uslijed patološki povišenih razina ANG II (16–18). To uključuje oslabljenu vaskularnu relaksaciju u različitim vaskularnim bazenima kao odgovor na brojne endotel ovisne i neovisne vazodilatacijske podražaje, smanjenu bioraspodivnost NO-a, povišenu razinu oksidativnog stresa i smanjeni vaskularni antioksidativni kapacitet(16,19). Važnost fizioloških razina ANG II za održavanje normalne vaskularne funkcije potvrđena je brojnim studijama koje pokazuju da se vaskularna relaksacija kao odgovor na različite vazodilatacijske podražaje nakon HS prehrane obnavlja kontinuiranim intravenskim infuzijama supresorske doze ANG II (20,21). U ranijem istraživanju naše istraživačke skupine, otkrili smo značajnu korelaciju između oslabljene acetilkolinom inducirane dilatacije (AChID) i potisnutog

plazmatskog renina (PRA) i razine aldosterona u serumu nakon HS prehrane u mladih zdravih osoba (22), bez porasta arterijskog tlaka. U istom istraživanju HS prehrana nije dovela do oštećenja endotel neovisne dilatacije. Moguće da supresija RAS-a kao rezultat ishrane s HS ima važnu ulogu u smanjenju AChID-a izravno i/ili putem povećane razine oksidativnog stresa zbog poremećene antioksidacijske obrane (ili nekog drugog mehanizma).

1.2. Utjecaj velikog unosa soli na simpatički živčani sustav

Iako je bitna uloga bubrega utvrđena u patofiziološkoj ulozi ANG II u hipertenziji (23), RAS može pokrenuti i održati stanje simpatičke prekomjerne aktivnosti svojim djelovanjem na središnje neurone u subfornikalnom području prednjeg mozga (24–26). Isto tako, aktivnost simpatikusa predstavlja značajan regulator aktivacije RAS-a, stoga je postalo evidentno da je, kako bi se razjasnio patogeni odnos između HS prehrane i oštećene vaskularne funkcije, potrebno istražiti učinak opterećenja soli na glavne regulacijske sustave, uključujući RAS i aktivnost autonomnog živčanog sustava u zdravih osoba.

Barić i suradnici su već ranije utvrdili da je u normotenzivnih osoba neosjetljivih na sol mikrovaskularna reaktivnost kao odgovor na vaskularnu okluziju nakon sedmodnevne HS dijeta snažno predviđena i antioksidativnim kapacitetom i razinom aktivnosti RAS, a ne samo antioksidativnim kapacitetom (27). Ti rezultati potencirali su ključnu ulogu normalne funkcije RAS-a u održavanju vaskularne homeostaze i ukazali su da bi promjena u RAS-u tijekom prehrane s perturbacijom soli mogla biti uključena u popratne promjene u funkciji endotela (27).

U fiziološkim uvjetima, unos soli je u recipročnom odnosu s aktivacijom RAS-a, koji je također moduliran istodobnim promjenama aktivnosti simpatikusa zbog unosa soli (28,29). U zdravih ljudi veliki unos soli potiskuje norepinefrin i epinefrin u plazmi i urinu. Zanimljivo je da su rezultati studije još iz 1982. godine, prikazali smanjenje razine norepinefrina i epinefrina u plazmi i urinu u normotenzivnih osoba na HS dijeti, ali supresija aktivnosti simpatikusa unosom soli nije opažena u bolesnika s hipertenzijom osjetljivih na sol (30). Mogući mehanizmi koji posreduju interakciju između unosa soli i aktivnosti simpatikusa su kompleksni, a upućuju na to (a) da veliki unos soli u prehrani može potaknuti refleksno smanjenje aktivnosti simpatikusa aktivacijom kardiopulmonalnih receptora kao odgovor na povećanje volumena plazme; (b)

akutno povećanje koncentracije i osmolalnosti natrija u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini može potaknuti povećanje aktivnosti simpatikusa (31,32); (c) bubrežna simpatička aktivnost djeluje kao moderator u odgovoru RAS-a na promjene pri opterećenju soli (aktivacija β 1 adrenoreceptora smještenih u jukstaglomerularne stanice koje proizvode renin stimulira oslobađanje renina) (33,34), ali i (d) da lokalni RAS mozga ima sposobnost modulacije aktivnosti simpatičkog živčanog sustava (SŽS, simpatikus) (35). Sveukupno ovi rezultati podupiru hipotezu o potencijalno promijenjenoj povratnoj petlji između supresije RAS-a zbog opterećenja solju i promijenjene aktivnosti SŽS-a, što posljedično može utjecati na vaskularnu funkciju, glavni efektor u održavanju ukupnog perifernog otpora i krvnog tlaka.

Stupin i suradnici su testirali učinak 7-dnevne HS dijete na aktivnost autonomnog živčanog sustava (AŽS) u mladim zdravim osoba određujući izlučivanje kateholamina u 24-satnom urinu i 5-minutnu varijabilnost otkucaja srca (HRV), te su ispitali da li modulacija aktivnosti simpatikusa (koristeći test mentalnog stresa) nakon 7-dnevne HS dijete utječe na mikrovaskularno oštećenje funkcije endotela uzrokovano HS prehranom u inače zdravih normotenzivnih osoba (36). Rezultati su pokazali da je 7-dnevna HS dijeta značajno smanjila 24-satno izlučivanje kateholamina urinom i smanjila tzv. niskofrekventni (LF, engl. low-frequency) spektar snage 5-minutne HRV (parasimpatička i simpatička aktivacija) što ukazuje da kratkotrajno HS opterećenje dovodi do potisnute aktivnosti SŽS-a, zajedno s oštećenjem mikrovaskularne reaktivnosti. Također, rezultati iste studije pokazali su da test mentalnog stresa i pri LS i HS prehrani nije doveo do značajnih promjena u odgovorima ovisnim o mikrovaskularnom endotelu (nepromijenjeni AChID i nepromijenjena komponenta endotelne aktivnosti u spektralnoj analizi PORH signala), što ukazuje da supresija simpatikusa tijekom HS opterećenja predstavlja fiziološki odgovor povezan sa supresijom RAS zbog HS unosa (36). Sveukupno, ova studija je ukazala da supresija simpatikusa tijekom HS opterećenja predstavlja fiziološki kompenzacijski kardiovaskularni odgovor, a ne izravni patofiziološki mehanizam kojim kratkoročna HS dijeta utječe na mikrovaskularnu funkciju u mladim normotenzivnih osoba (36). Uzimajući ovo u obzir, moguće je da bi promjena sa supresije simpatikusa (koja predstavlja normalan kompenzacijski odgovor) na aktivaciju simpatikusa (koja predstavlja abnormalni odgovor) u uvjetima HS opterećenja mogla predstavljati točku prekretnice koja razlikuje kardiovaskularni odgovor kod neosjetljivih na sol u odnosu na osjetljive na sol u prehrani. Na tragu ove pretpostavke su i rezultati Miyajime i suradnika koji su istraživali simpatički odgovor na višak soli u 54 normotenzivne mlade odrasle osobe sa i bez obiteljske

povijesti hipertenzije. Ispitali su simpatičku aktivnost u mišićima, koncentraciju kateholamina u plazmi i izlučivanje u urinu te ambulantni krvni tlak tijekom niskog unosa soli (4 g NaCl) i visokog (16 g NaCl) unosa soli. Simpatička aktivnost mišića, koncentracija u plazmi i izlučivanje norepinefrina u urinu kod ispitanika neosjetljivih na sol značajno su bili smanjeni kod povišenog unosa soli, dok je koncentracija epinefrina u plazmi bila nepromijenjena, a izlučivanje epinefrina u urinu je smanjeno. Nasuprot tome, izlučivanje epinefrina urinom u ispitanika osjetljivih na sol značajno je bilo povišeno tijekom visokog unosa soli, dok je aktivnost simpatičkog živca u mišićima i izlučivanje norepinefrina urinom ostalo nepromijenjeno unatoč značajnom povećanju krvnog tlaka (ispitanici osjetljivi na sol) (37). Dakle, inhibicija simpatičke aktivnosti tijekom visokog unosa soli nije se dogodila u mladih, odraslih osoba osjetljivih na sol.

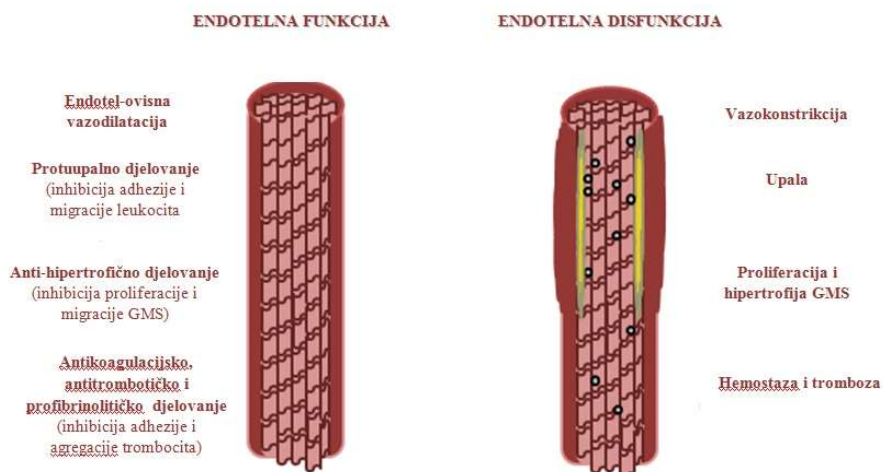
Za napomenuti je još kako novija istraživanja sve više zadiru u neuroimunološku podlogu razvoja hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti općenito. Abboud i suradnici su izradili pregledni rad koji se bavi tom tematikom (uključuje animalne i humane studije te također pregled radova na zdravim ali i ispitanicima s poznatim KV bolestima) i naglašava izražen utjecaj disbalansa funkcije autonomnog živčanog sustava na kardiovaskularni morbiditet i mortalitet koji za posljedicu nema samo hemodinamske učinke već i utjecaj na stanične i strukturne patološke procese kao što je proupalna aktivacija urođenog i adaptivnog imunološkog sustava (38), a u čije mehanizme zadiru i ova disertacija.

1.3. Utjecaj velikog unosa soli na endotelnu funkciju

Endotel je građom jednostavan ali funkcionalno izuzetno dinamičan organ koji oblaže unutarnju stijenku čitavog krvožilnog sustava (39,40). Endotelne stanice imaju sposobnost prepoznavanja i prilagodbe različitim humoralnim, mehaničkim i hemodinamskim podražajima, a neke su od njihovih glavnih funkcija kontroliranje vaskularnog tonusa, inhibiranje agregacije trombocita, upravljanje migracijom leukocita i proliferacijom glatkih mišićnih stanica, te konačno, regulacija transporta kroz stijenku krvnih žila (41,42). Ipak, endotel ima kritičnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa i promjene su vaskularnog protoka u složenoj interakciji s endotelom. Važnost upravo te funkcije endotela vidljiva je i iz činjenice da se izraz "endotelna funkcija" najčešće koristi za opisivanje sposobnosti endotela da otpušta vazoaktivne tvari i na taj način regulira protok u krvnim žilama. Endotel je mjesto sinteze

vazodilatacijskih ali i vazokonstrikcijских čimbenika. Najvažniji su vazodilatacijski čimbenici porijeklom iz endotela dušikov oksid (NO), enzimima ciklooksigenazama (COX-1 i COX-2) sintetiziran prostaciklin (PGI₂) i tzv. čimbenici hiperpolarizacije koji potječu iz endotela (EDHF, engl. endothelial-derived hyperpolarizing factors) (43). Do danas je identificiran velik broj vazodilatacijskih čimbenika koji su nekada bili obuhvaćeni zajedničkim nazivom EDHF, a to su ion kalija (44), metaboliti citokroma P450 (CYP450) kao što je epoksieikosatrienoična kiselina (EETs) (45), zatim lipoksigenaza (46), vodikov peroksid (H₂O₂) (47), ciklički adenzin-monofosfat (cAMP) (48), natriuretski peptid tip C (49), itd. Kao što je spomenuto, uz brojne vazodilatacijske čimbenike, endotel je i mjesto sinteze važnih vazokonstriktora (EDCF, engl. endothelial-derived constricting factors), uključujući endotelin-1 (ET-1), ciklooksigenazama sintetizirani tromboksan (TXA₂) i prostaglandin F₂ alfa (PGF₂α), te 20-hidroksieikosatetraenoična kiselina (20-HETE) sintetizirana putem CYP450-hidroksilaze (43). Navedeno ukazuje na kompleksnost sustava vazoaktivnih tvari koji potječu iz samog endotela što naglašava njihovu neupitnu ulogu u održavanju fiziološke ravnoteže i normalne funkcije krvnih žila. Unatoč danas sve boljem poznavanju endotela kao organa, ipak treba uzeti u obzir da još uvijek postoje brojna otvorena pitanja o njegovoj krajnjoj ulozi u održavanju zdravlja, ali i razvoju bolesti krvožilnog sustava.

Endotelna je disfunkcija (ED) patološko stanje karakterizirano neprikladnom aktivacijom endotela (50). ED obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane mehaničke ozljede endotela pa sve do neprimjerene, perzistentne i globalne endotelne aktivacije važne u razvoju različitih, već klinički manifestnih bolesti. Fenotip je zdravog endotela vazodilatacijski, antikoagulantni i protuupalni, dok je stanje ED karakterizirano vazokonstrikcijским, protrombotičkim i proupalnim fenotipom (51) (slika 1.1.).



Slika 1.1. Temeljno načelo vaskularne homeostaze.

Zdrav endotel iskazuje višestruka svojstva koja se razvojem endotelne disfunkcije redom pretvaraju u svoju negaciju, ali i istodobno regresiraju u slučaju poboljšanja endotelne funkcije. GMS - glatke mišićne stanice.

(Izvor: pribavljeno i prerađeno iz : Čavka A. Doktorski rad: Utjecaj dijete s velikim udjelom soli na mikrovaskularnu reaktivnost u populaciji zdravih mladih žena. Repozitorij Medicinskoga fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2013. uz dozvolu autorice.)

ED je prvi korak (i još uvijek reverzibilni) u razvoju ateroskleroze i KV bolesti (52). Neki od patofizioloških čimbenika koji doprinose razvoju endotelne disfunkcije, a ujedno predstavljaju i važne čimbenike rizika za razvoj i progresiju hipertenzije te drugih kardiovaskularnih bolesti su: povećani oksidativni stres uslijed stvaranja slobodnih kisikovih radikala (ROS, engl. reactive oxygen species), aktiviranje citokina u upalnim procesima, glikozilacija metabolita koja je prisutna kod dijabetesa, hipertenzije, pušenja i procesa starenja, kronična hiperkolesterolemija i/ili povišena koncentracija LDL kolesterola u plazmi te njegovo nakupljanje u stijenci krvnih žila, te kronične sistemske infekcije uzrokovane bakterijama, virusima ili drugim patogenima (53–58). Neki od navedenih patofizioloških mehanizama mogu biti potaknuti upravo prekomjernim unosom soli (59) čime se detaljnije bavi ovaj rad. ED karakterizira smanjenje biorasploživosti vazodilatatora, osobito NO, i/ili povećanje

proizvodnje endotelnih vazokonstriktora (55). Rezultirajuća neravnoteža dovodi do oštećenja vazodilatacije ovisne o endotelu, što je funkcionalna karakteristika endotelne disfunkcije. Studija na normotenzivnim štakorima je pokazala da veliki unos soli povećava proizvodnju NO kod štakora neosjetljivih na sol, ali ne i kod štakora osjetljivih na sol (60). Kao što je očekivano, infuzija N^G-monometil-L-arginin (L-NMMA, inhibitor sinteze NO) značajno je povećala MAP u svim sojevima štakora. U štakora osjetljivih na sol, povećanje MAP-a zbog infuzije L-NMMA bilo je slično na obje razine unosa soli, LS i HS. Međutim, u štakora otpornih na sol, L-NMMA je povećao MAP u većoj mjeri tijekom HS. Ovi rezultati sugeriraju da su štakori neosjetljivi na sol tijekom HS dijete sposobni povećati proizvodnju NO, sprječavajući odgovor krvnog tlaka na HS. Drugim riječima, štakori osjetljivi na sol pokazali su nedostatak u sposobnosti povećavanja proizvodnje NO u odgovoru na visok unos soli (60). Na pitanje zašto štakori osjetljivi na sol nisu u mogućnosti povećati produkciju NO u odgovoru na HS, istraživanje autora Ni i suradnika je utvrdilo da je u tim slučajevima smanjena ekspresija proteina NO sintaze u bubrezima, aorti i srcu te da je čak štoviše taj deficit ekspresije pojačan kod povišenog unosa soli (61).

Zbog činjenice da se većina produkata endotela izlučuje u vaskularnu stijenku i da je NO difuzibilna tvar s poluživotom od nekoliko sekundi, procjena endotelne funkcije pokazala se teškom. Većina kliničkih studija koristila je plazmatsku koncentraciju ili stope izlučivanja endotelnih derivata urinom, kao što su endotelin, metaboliti NO (npr. nitriti i nitrati [NO_x]) i NO stanični medijator, poput cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP). Fujiwara i suradnici su istraživali endotelnu disfunkciju kod ljudi te su primijetili su da je visok unos soli značajno smanjio NO_x u plazmi ispitanika osjetljivih na sol u usporedbi s ispitanicima neosjetljivima na sol. Nadalje, promjene krvnog tlaka tijekom unosa soli bile su obrnuto povezane s promjenom NO_x u plazmi (62). Ove rezultate potvrdili su Cubeddu i suradnici koji su otkrili da je unos velike količine soli uzrokovao smanjenje izlučivanja NO u mokraći samo u pacijenata osjetljivih na sol (63). Uzeto skupa, praćenje biokemijskih markera proizvodnje NO pokazuje da veliki unos soli smanjuje proizvodnju NO u većoj mjeri kod pacijenata osjetljivih na sol. Međutim, važno je napomenuti da su ti biokemijski markeri samo neizravna mjera endotelne funkcije te su zato potrebne in vivo studije sa procjenom odgovora, tj. protoka kroz vaskularne bazene na farmakološke ili mehaničke podražaje radi ekstenzivnijeg uvida u endotelnu (dis)funkciju.

Dokazano je da kratkoročna dijeta s velikim unosom soli (samo jedan obrok s velikim udjelom soli ili 7 dana prehrane s velikim udjelom soli) smanjuje protokom posredovanu dilataciju (engl. flow mediated dilation, FMD) brahijalne arterije, neovisno o promjenama arterijskog tlaka u zdravih ispitanika (59). Potonje navedeno je rezultat istraživanja naše istraživačke skupine u kojem je kao što je navedeno tijekom 7 dana HS dijete došlo do smanjenja FMD brahijalne arterije, dok HS nije poremetila acetilkolinom (ACh) i protokom induciranu dilataciju arteriola (in vitro studija na arteriolama izoliranim iz glutealne potkožne masti u 12 žena) ali je 7-dnevna HS prehrana mehanizme vazodilatacije prebacila na puteve neovisne o NO (59).

Budući da se najranije promjene i oštećenje ciljnih organa u različitim patološkim stanjima javljaju u mikrocirkulaciji, bitno je proučiti promjene protoka krvi posebno u mikrocirkulaciji. Istraživanja su pokazala da je vaskularna reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (7), stimulaciju acetilkolinom (ACh) (22) i lokalno zagrijavanje (64) (metoda mjerenja protoka laser Dopplerom, LDF) smanjena nakon 7-dnevne dijete s velikim udjelom soli kod zdravih osoba, u odsutnosti promjena arterijskog tlaka, sastava tijela i tjelesnih tekućina (22). Navedeno smanjenje vaskularne reaktivnosti u radu Čavka i suradnika bilo je posljedica slabljenja endotelne funkcije nakon akutnog unosa soli u čijem su posredovanju značajnu ulogu imali vazokonstriktorski metaboliti COX enzima, osobito COX-1 (7).

Endotelna disfunkcija također uključuje specifično stanje aktivacije endotela, koje karakterizira proupalno, proliferativno i prokoagulacijsko stanje koje pogoduje svim fazama aterogeneze (65) o čemu će biti više govora u odlomku 1.5.3. *Sol, leukocitna adhezija i endotelna aktivacija.*

1.4. Utjecaj velikog unosa soli na oksidativnu ravnotežu

Dokazano je da je povećan unos soli hranom povezan s oksidativnim stresom i hipertenzivnim oštećenjem ciljnih organa u životinjskim modelima osjetljivim na sol (66). Jedan od potencijalnih mehanizama koji posreduje oštećenje vaskularne i endotelne funkcije uslijed HS prehrane (neovisno o promjeni arterijskoga tlaka) je smanjenje biodostupnosti NO-a i o endotelu ovisne dilatacije zbog povećanja razine oksidativnog stresa (19).

Novije animalne i humane studije su se usredotočile na terapiju na bazi antioksidansa za ublažavanje oksidativnog stresa koji je uključen u patofiziologiju KV bolesti (67). Unatoč

neizvjesnim zdravstvenim dobrobitima, podaci pokazuju da je veliki broj odraslih osoba uzimao ili uzima vitaminske dodatke s antioksidativnim svojstvima (12,7 % i 12,4 % odraslih u SAD -u uzimalo je suplemente vitamina E i C te je tako primjerice, i oko 20% odraslih u Njemačkoj uzimalo dodatke prehrani koji sadrže vitamine C i E) (68–70). Greaney i suradnici su pokazali da je lokalizirana mikrodijaliza vitamina C, koji se smatra nespecifičnim hvatačem reaktivnih spojeva kisika (engl. reactive oxygen species, ROS), dovela do potpunog oporavka NO-ovisne arteriolarne dilatacije prilikom lokalnog zagrijavanja kože podlaktice u zdravih pojedinaca na HS dijete (64). Nedavna studija naše istraživačke skupine po prvi je puta pokazala da 7-dnevna HS dijeta za posljedicu ima smanjenje antioksidativnog kapaciteta (FRAP od engl. Ferric Reducing Antioxidant Power i koncentracije katalaze u serumu) i porast oksidativnog stresa (TBARS od engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances, koncentracije 8-izo-PGF2 α - 8-iso-prostaglandin F2 α u serumu, DCF-DA od engl. Dichlorodihydrofluorescein Diacetate u leukocitima iz periferne krvi) neovisno o promjeni arterijskoga tlaka u zdravih osoba (27). U istoj studiji, pojačana antioksidativna obrana dodavanjem vitamina C i vitamina E tijekom 7-dnevnog HS opterećenja obrnula je promjene u oksidativnom statusu i prevenirala oštećenje mikrovaskularne reaktivnosti (PORH i AChID) koji su bili uzrokovani HS dijetom u zdravih ispitanika a što je u skladu i s ranijim studijama u kojima je dokazan benefit lokalne infuzije vitamina C na vazodilataciju kože podlaktice zabilježene u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću (71), te u drugih KV bolesnika, poput poboljšane FMD brahijalne arterije u bolesnika na hemodijalizi (72). Nadalje, u našoj studiji se FRAP kao biljeg antioksidativnog kapaciteta pokazao statistički naj snažnijim predskazateljem mikrovaskularne o endotelu ovisne vazodilatacije (AChID) u zdravih pojedinaca. Što je još važnije, FRAP i aktivnost RAS-a zajedno su bili puno značajniji predskazatelji mikrovaskularne reaktivnosti u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH), nego FRAP zasebno (27). Ovi rezultati su još jednom naglasili središnju ulogu normalne RAS funkcije u održanju vaskularne homeostaze, te da bi upravo promjene aktivnosti RAS-a tijekom promjena unosa soli u organizam mogle imati ulogu u popratnim promjenama endotelne funkcije.

HS dijeta dovodi do smanjene ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima, koji sami ili zajedno s povećanom aktivnošću prooksidativnih enzima doprinose povećanju razina oksidativnog stresa u pokusnih životinja (19,73,74). Određene studije su izvijestile da in vitro davanje antioksidanasa, kao što je superoksid dismutaza (SOD) ili SOD mimetički TEMPOL, skupljač superoksida, poništava oksidativni stres i obnavlja o endotelu ovisnu dilataciju na

razine izmjerene u životinja na normalnom unosu soli prehranom (19,75). Međutim, mogu postojati razlike među krvnim žilama i između životinja i ljudi u enzimima odgovornim za povećanu proizvodnju ROS-a (76). Kratkoročno HS opterećenje u pokusnih životinja može pridonijeti povećanju ROS-a (npr. razina $O_2\cdot^-$) ometajući aktivnost antioksidativnog obrambenog mehanizma (smanjenje ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima), ili zajedno s istovremenim povećanjem aktivnosti prooksidativnih enzima (17,19,77). HS dijeta može dovesti do smanjene aktivnost SOD-a (i Cu/Zn SOD i mangan-SOD) u cerebralnim žilama (17,77). Međutim, takav učinak nije bio ujednačen s nekim drugim, različitim vaskularnim bazenima (npr. mezenterične arterije, arteriole skeletnih mišića) (76). Rezultati naše ranije studije na Sprague -Dawley štakorima pokazali su da je sedmodnevna HS prehrana povećala razinu oksidativnog stresa ($O_2\cdot^-$ čistač spriječio je oštećenje reaktivnosti srednje cerebralne arterije, bili su povećani TBARS), a iako aktivnost antioksidativnih enzima (katalaza, GPx i SOD) nije promijenjena, mRNA ekspresija iNOS -a i antioksidativnog enzima GPx4 u srednjoj cerebralnoj arteriji je smanjena (19). Povećani ROS može reagirati s drugim staničnim komponentama, poput nukleinskih kiselina, bjelančevina i lipida, pa time mogu promijeniti staničnu biokemiju i fizikalna svojstva (78). Neenzimska peroksidacija nezasićenih masnih kiselina izazvana ROS-om, poput arahidonske kiseline, rezultira stvaranjem bioaktivnih molekula izoprostana, npr. 8-izo-PGF 2α , koji imaju važnu ulogu u modifikaciji agregacije trombocita i vaskularnog tonusa aktivacijom prostanoidnog receptora TXA 2 (TP) (78,79). Već spomenuta studija naše istraživačke skupine je na humanom modelu upravo potvrdila porast proizvodnje 8-izo-PGF 2α izoprostana kod zdravih osoba na HS dijeti, što vjerojatno doprinosi oštećenju mikrovaskularne reaktivnosti (27).

1.5. Utjecaj velikog unosa soli na imunološki odgovor

U ovom odlomku su navedene studije (većina učinjena na modelu eksperimentalnih životinja) koje potvrđuju da unos soli modulira imunološki odgovor, te da reaktivnost koja je uzrokovana solju inducira aktivaciju imunoloških stanica i lučenje citokina te dovodi do vaskularne endotelne disfunkcije, što su redom odlike hipertenzivne kardiovaskularne bolesti.

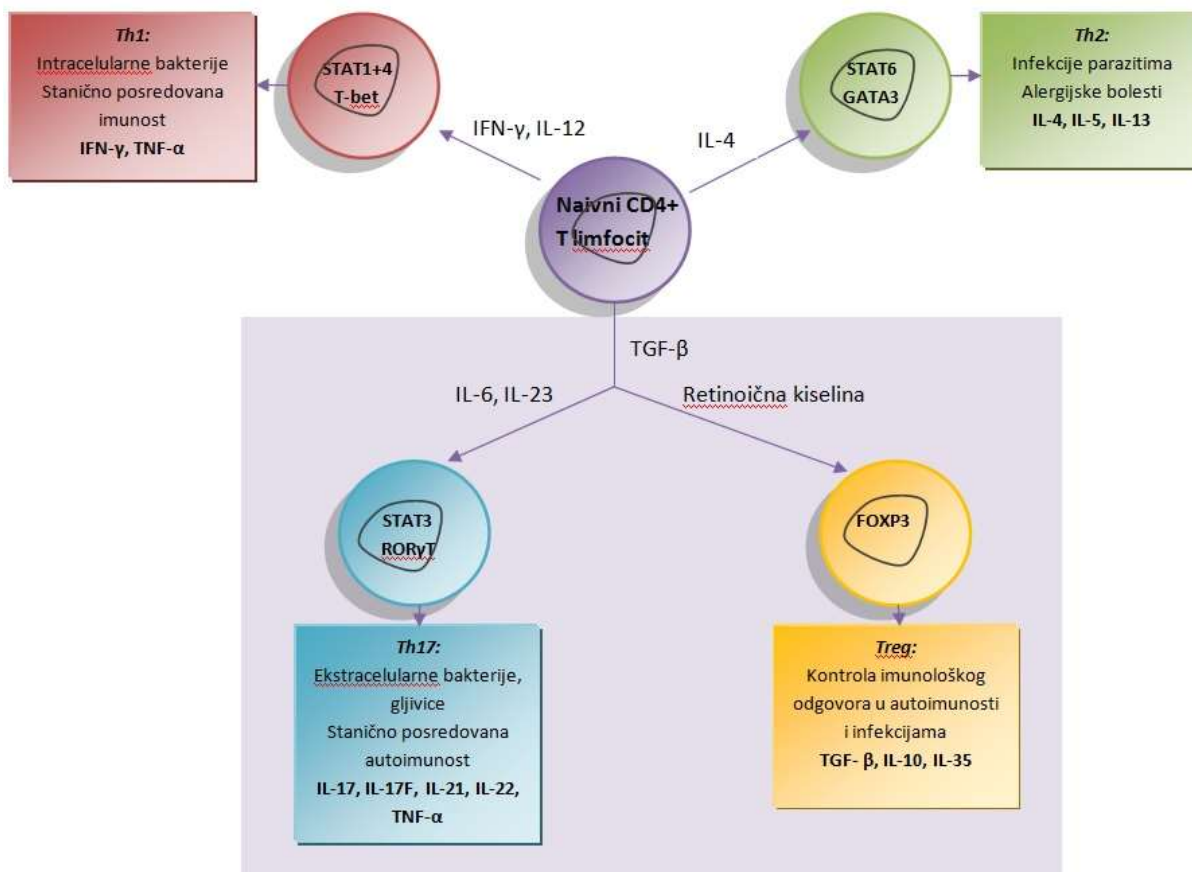
1.5.1. Sol i citokini

Poznato je da je hipertenzija stanje kronične upale, s povišenom razinom upalnih citokina i aktivacijom imunološkog sustava (80–82), a nedavne studije ukazuju na to da sol može izravno utjecati na oslobađanje upalnih citokina. Tako je 10-godišnja prospektivna studija Sesse i suradnika na 400 žena pokazala da je IL-6 najčešće povišen citokin u AH (83). Posebno važan citokin u razvoju KV bolesti (npr. hipertenzije) je IL-17A, koji uglavnom proizvode Th17 stanice. Pokazano je da IL-23 stabilizira i pojačava fenotip Th17 povećanjem ekspresije receptora IL-23 (IL-23R) i osnaživanjem patogenih funkcija Th17 stanica, ali i da potiskuje razvoj T regulacijskih (Treg) stanica (84). U studijama na animalnom modelu Kostyk i sur. su utvrdili da hipernatrijemija i hiperosmolarnost povišuju produkciju MIP-2 (makrofagni inflamatorni protein-2) i TNF α u makrofagima miša (85) dok je skupina japanskih autora (Sakata i sur.) kod subtotalno nefrektomiranih štakora utvrdila da porast u unosu soli povišuje makrofagnu upalu povezanu s povećanom mRNA za IL-6, MCP-1 (monociti kemoataksijski protein), SGK1 (serum i glukokortikoid induciranu kinazu) i NFAT5 (jezgreni čimbenik aktiviranih leukocita) pojačavajući tako upalu i oštećenje ciljnih organa (86).

1.5.2. Sol i imunološke stanice

Ionski sastav tkivnog mikrookoliša predstavlja kritičnu, možda i zanemarenu, odrednicu fizioloških i patoloških tkivno-specifičnih efektorskih odgovora T-stanica (87). Iako unos NaCl hranom može utjecati na lokalne tkivne koncentracije, njegova različita raspodjela u organizmu izlaže cirkulirajuće i rezidentne imunološke stanice različitom mikrookruženju NaCl-a. Tako visoke koncentracije soli ili prehrana s velikim udjelom soli mogu izravno utjecati na imunološke stanice.

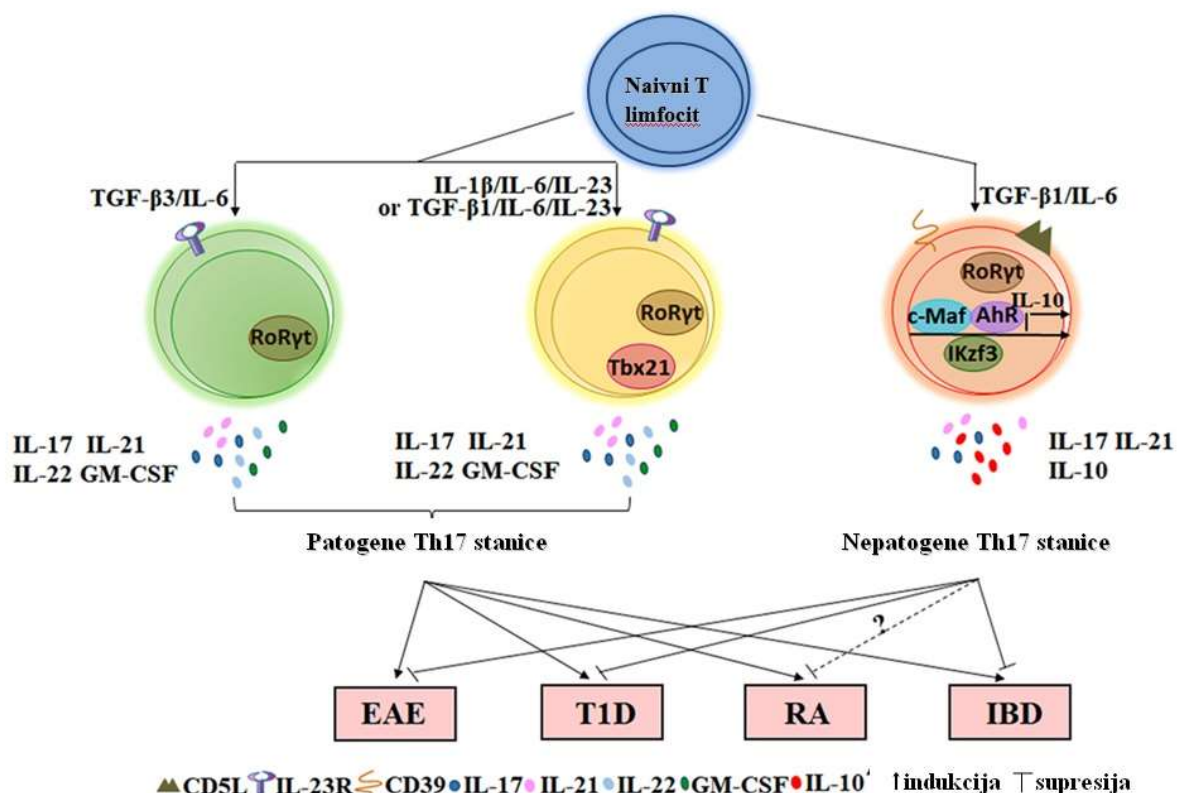
Ljudski imunološki sustav zahtijeva različito usmjerenje/specijalizaciju T stanica u odgovoru na patološki supstrat što za posljedicu ima različite obrasce migracije, kao i stvaranje različitih profila citokina koji onda prilagođavaju odgovore T-stanica usmjerene ka odgovarajućim ciljnim antigenima (88,89) (slika 1.2.)



Slika 1.2. Diferencijacija CD4+ T stanica.

Usmjerenje loze CD4+ T stanica ovisi o citokinskom miljeu koji prati proces aktivacije T-stanica u sekundarnim limfoidnim organima. Različiti podtipovi T-pomoćničkih stanica pokazuju različitu aktivaciju transkripcijskih procesa te ih karakterizira lučenje određenih efektorskih citokina koji im omogućuju zaštitu od različitih klasa patogena i posredovanje u autoimunosti. Ljubičastom sjenom su naglašene dvije loze T stanica, Th17 i Treg koje su u užem fokusu ove doktorske disertacije. IFN- γ - interferon- γ ; IL - interleukin; TGF- β - transformirajući čimbenik rasta STAT1+4 - transduktor signala i aktivator transkripcije 1 i 4; T-bet - faktor transkripcije u T-boxu; STAT6 -transduktor signala i aktivator transkripcije 6; GATA3 - faktor transkripcije koji kodira GATA3 gen; STAT3 - transduktor signala i aktivator transkripcije 3; ROR γ T - transkripcijski čimbenik, član porodice receptora retinske kiseline ; FOXP3 - transkripcijski čimbenik iz porodice *forkhead* (izvor: izradila autorica rada).

Naivne CD4⁺ pomoćničke T (Th) stanice, nakon aktivacije antigen predočnim stanicama (engl. antigen presenting cell, APC), usmjeravaju se u različite vrste efektorskih stanica koje karakterizira njihova proizvodnja različitih profila citokina i imunološka regulatorna funkcija (90). Osim Th1 i Th2 stanica, kao treći podskup efektorskih Th stanica nedavno su opisane i nazvane Th17 stanice. Od njihove identifikacije, Th17 stanice su se pojavile kao ključni supstrat u zaraznim, upalnim, autoimunim i malignim bolestima (91,92). Th 17 stanice pokazuju proupalne ali od nedavno utvrđeno i protuupalne efekte (93,94). Izvanstanični signali i unutarstanični mehanizmi koji upućuju na ovu podvojenost proupalnih i protuupalnih sudbina stanica Th17 i dalje su slabo definirani i gotovo isključivo ograničeni na učinke citokina. Na primjer, IL-1 β je identificiran kao kritični faktor koji određuje patogenost staničnih Th17 stanica inducirajući ekspresiju proupalnih molekula i potiskujući ekspresiju protuupalnih molekula (91). Kod miševa IL-23 usmjerava Th17 stanice na patogenost, dok TGF- β potiče protuupalne odgovore Th17 stanica (95–98) (slika 1.3.).



Slika 1.3. Patogeni i nepatogeni fenotip Th 17 stanica.

Naivne CD4⁺T stanice stimulirane s TGF- β 3/IL-6, IL-1 β /IL-6/IL-23 ili TGF- β 1/IL-6/IL-23 in vitro mogu izlučivati upalne citokine kao što je IL-17, IL-21, IL-22 i GM-CSF i izražavaju

specifični transkripcijski faktor ROR γ T. Takve Th17 stanice igraju važnu ulogu u nastanku autoimunih bolesti i nazivaju se patogenim Th17 stanicama. Međutim, TGF- β 1/IL-6-inducirane Th17 stanice ne samo da eksprimiraju ROR γ T već također eksprimiraju nekoliko transkripcijskih čimbenika povezanih s IL-10 kao što su c-Maf, IKzf3 i AhR. Ovaj tip Th17 stanice izražava nisku razinu ili mu nedostaje IL-23R, ali eksprimira visoku razinu CD5L/AIM i CD39 ektonukleotidaza na membrani. Adoptivni prijenos Th17 stanica induciran TGF- β 1/IL-6 u miševе divljeg tipa ne uzrokuje EAE ili T1D. Osim toga, mali dio Th17 stanica u crijevima sa supresivnom funkcijom također može umanjiti upalne bolesti crijeva putem IL-10 i TGF- β . Međutim, učinak nepatogenih Th17 stanica na reumatoidni artritis zahtijeva daljnja istraživanja na miševima.

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis; T1D - dijabetes tipa 1; RA - reumatoidni artritis; IBD - upalna bolest crijeva; IL- interleukin; TGF- β - transformirajući faktor rasta beta; CD - klaster diferencijacije; ROR γ T - transkripcijski čimbenik, član porodice receptora retinske kiseline; GM-CSF - čimbenik rasta granulocitno-makrofagne loze, Tbx21 - T "box" transkripcijski faktor 21; c-Maf - jedan od transkripcijskih faktora; AhR - aril hidroksikarbon receptor, jedan od transkripcijskih faktora; IKzf3 - (engl. IKAROS Family Zinc Finger 3) jedan od transkripcijskih faktora. (Ova slika ima CC BY 4.0. licencu i pripada autorima Wu X, Tian J Wang S. Originalna slika na:

https://www.frontiersin.org/files/Articles/352276/fimmu-09-01112-HTML/image_m/fimmu-09-01112-g001.jpg. Iz rada: Wu X, Tian J, Wang S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2018 May 28;9:1112.)

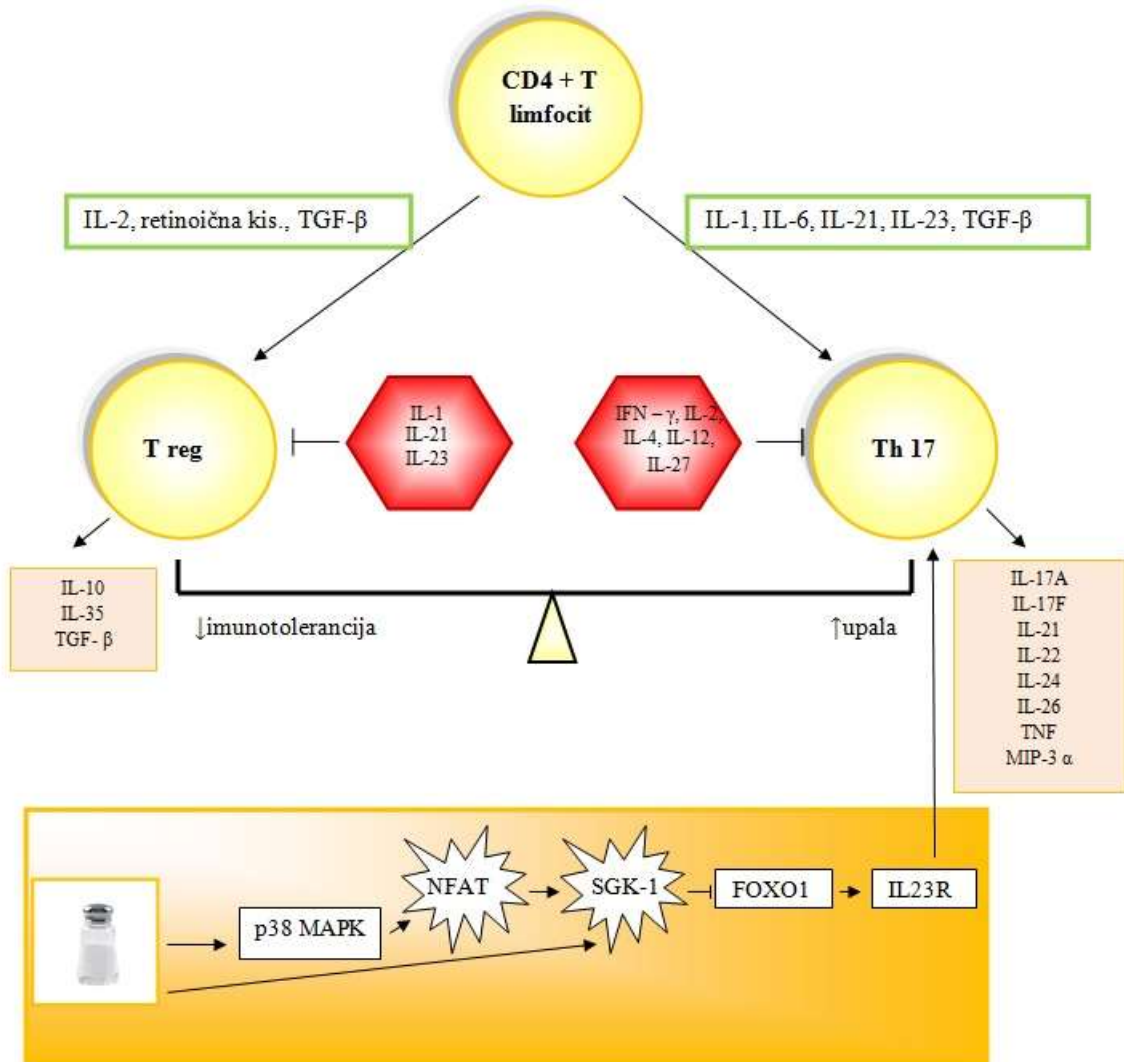
Jedan od aktivatora diferencijacije Th 17 stanica je i visokoslani medij te je tako jedan od najpoznatijih "puteva" induciranih solju polarizacija CD4⁺ T stanica ovisnih o IL-23 prema fenotipu Th17 pomoćničkih stanica (Th17) (99). Molekularni mehanizam kojim NaCl utječe na ljudske efektorske Th17 stanice se pokreće tako da hiperosmotski stres koji inače stanice sisavaca mogu osjetiti putem p38MAPK (mitogenom aktivirane protein kinaze) (100), aktivira nizvodnu kaskadu NFAT5 i SGK1 (101–103) koja inhibira FOXO1 koji je inače represor ekspresije IL-23R. Dakle, povećanom aktivnosti SGK1 dolazi do povećane ekspresije IL-23R te potom dalje do pojačane indukcije i diferencijacije Th17 u patološkom smjeru (slika 1.4.). U fiziološkim uvjetima, SGK1 ima nisku razinu ekspresije, ali se ona značajno povećava pod

utjecajem povišenih mineralokortikoida, glukokortikoida te u hipertoničnom mediju. Kleinewietfeld i sur. su dokazali i da inhibicija p38MAPK, NFAT5 ili SGK1 poništava razvoj stanica Th17 induciranih visokom količinom soli, identificirajući tako put p38MAPK (te tako i NFAT5 i SGK1) kao intracelularni signalni put kojim višak soli pojačava diferencijaciju Th17 (99). Kleinewietfeld je ustvrdio i da Th17 stanice nastale pod utjecajem NaCl pokazuju visoko patogeni i stabilni fenotip karakteriziran povećanim izražajem proupalnih citokina GM-CSF, TNF α i IL-2 (99). Dodatni dokazi koju upućuju na ulogu SGK1 su zaključci rada Norlandera i sur. koji je pokazao da je IL-17A povećao aktivnost kotransportera Na⁺-K⁺-2Cl⁻ u stanicama distalnih zavijenih tubula miša – putem SGK1-ovisnog puta i štoviše, isključivanje SGK1 u CD4⁺ T stanicama rezultiralo je oslabljenim hipertenzivnim odgovorom na ANG II i DOCA (deoksikortikosteron acetat)/sol te oslabljenom upalom u bubregu i krvnim žilama (104).

Ipak dvije novije studije na modelu stanične kulture i animalnim modelima dale su nove rezultate koji sugeriraju da HS prehrana (kratkotrajna i u uvjetima otpornim na sol) ne inducira isključivo Th17 inducirani proupalni odgovor. Matthias i sur. su na staničnim kulturama uzgojenima u uvjetima visoke koncentracija NaCl uočili kontekst-ovisnu, dihotomnu ulogu NaCl u oblikovanju patogenosti stanica Th17. U njihovom je istraživanju u uvjetima visokog NaCl u staničnim kulturama, neočekivano, došlo do indukcije stabilnih, protuupalnih Th17 stanica što je zaključeno nakon povećane ekspresije FOXP3 (engl. forkhead box P3) i IL-17A u odnosu na niskoslanu medij, a protuupalni je fenotip Th17 bio dodatno naglašen povećanim stvaranjem imunosupresivnog TGF- β u visokoslanom mediju. Ista protuupalna aktivacija Th17 potaknuta NaCl-om je potom potvrđena in vivo u eksperimentalnom modelu miša s autoimunim encefalomijelitisom (EAE), koji je pokazao snažno smanjenje simptoma bolesti nakon prijenosa T stanica polariziranih u uvjetima visokog NaCl (105). Detaljniji rezultati i zaključci ovih studija bit će ponuđeni u raspravi u svjetlu objašnjenja rezultata naše studije.

Prehrambene namirnice (komponente namirnica) koje dovode do povišenja krvnog tlaka su postale sve veći predmet interesa te su tako mnoge istraživačke skupine počele obraćati pozornost i na unos fruktoze (106). Tako je druga studija koja je bacila novo svjetlo na aktivaciju patogenih stanica Th17 i indukciju hipertenzije nakon velikog unosa fruktoze (pokazala je da djeluje kao unos velike količine soli) izvijestila da su imunološki mehanizmi povezani s regulacijom krvnog tlaka prilično različiti između štakora osjetljivih na sol (engl. salt sensitive, SS) i neosjetljivih na sol (engl. salt resistant, SR); npr. SS štakori pokazuju patogeni odgovor nakon visokog unosa fruktoze, dok SR štakori pokazuju zaštitni odgovor.

Točnije, unos visokog udjela fruktoze povećao je razinu serumskog IL-17A i populaciju stanica Th17 samo u SS štakora (ali ne i SR štakora) (107). Zaključak ove studije, o čijim rezultatima će detaljniji navodi biti u raspravi je da unos visoke fruktoze inducira hipertenziju putem imunološke aktivacije patogenih Th17 limfocita u SS, ali ne i SR štakora koji razvijaju "zaštitni odgovor" posredovan IL-10 (107).



Slika 1.4. Utjecaj puta p38MAPK aktiviranog visokoslanim medijem na Th17/Treg.

Hipertonični, visokoslan medij ima dvostruki učinak na recipročni omjer Th17/Treg: izravno inducira kinazu SGK1, koja pojačava fenotip Th17 pomoću IL-23, a također je aktiviran

nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5 (NFAT5), transkripcijski faktor koji inducira SGK1 te dalje nastavlja kaskadu aktivacije i jačanja fenotipa patogenih Th 17 putem IL-23.

p38MAPK- p38 mitogenom aktivirana protein kinaza; Treg - T regulacijski limfociti; Th 17- T pomoćnički limfociti 17; IL- interleukin; TGF- β - transformirajući faktor rasta beta; IFN- γ - interferon gama; TNF- tumor nekrotizirajući faktor; MIP-3 α - makrofagni inflamatorni protein 3 alfa. (Izvor: izradila autorica rada).

Rezultati studija na eksperimentalnim životinjama (in vitro i in vivo) ukazuju da povećan unos soli u organizam dovodi do neravnoteže između stvaranja Th17 i Treg stanica te posljedične upale i oštećenja ciljnih organa (endotelna disfunkcija). Treg imaju središnju ulogu u posredovanju periferne imunološke tolerancije i uključeni su u održavanje tolerancije na vlastite antigene stoga je jasno da je njihova funkcija oštećena u autoimunim bolestima. Treg ekspimiraju CD4, α -podjedinicu IL 2 receptora (CD25) i faktor transkripcije FOXP3 koji je induciran stimulacijom TCR (engl. T cell receptor) različitim citokinskim signalima, te kojeg pratimo kao ključnu odrednicu razvoja i funkcije Treg stanica. Diferencijaciju Treg stanica potiče IL-2, a one onda potiskuju postojeće imunološke odgovore putem izravnih i neizravnih mehanizama koji uključuju izlučivanje citokina TGF- β i IL-10. Uzimajući navedeno u obzir Hernandez i sur. su dokazali da okolišni čimbenik rizika, povećani unos soli, promiče autoimunost inducirajući proupalne reakcije u CD4 efektorskim stanicama i narušavajući funkciju Treg stanica (108). Osim navedenih citokina, SGK1 je važan čimbenik koji recipročno regulira razvoj ravnoteže Th17/Treg tako što potiče razvoj i funkciju Th17 stanica i ima inhibitorne učinke na Treg stanice (109). IL-23R potencira signalizaciju SGK1 tako da SGK1 također igra ključnu ulogu u inhibiciji Treg stanica posredovanoj IL23R i patološkoj aktivaciji Th17 stanica putem fosforilacije transkripcijskog faktora FOXO1/3 u eksperimentalnim modelima (109).

Uz poznate učinke na homeostazu organizma i dosad spomenute učinke na citokine, te Th17 i Treg stanice, promjena unosa soli u organizam modificira i ravnotežu proupalnih i protuupalnih makrofaga. Općeprihvaćen je koncept 2 fenotipa makrofaga: klasični proinflamatorni M1-tip makrofaga koji je induciran s IFN- γ u T-pomoćničkom odgovoru i M2-tip koji je induciran Th2 citokinima (IL-4 i IL-13) s aktivnošću usmjerenom na suzbijanje upale i saniranje tkiva (110). Pored stimulacije M1 makrofaga, dijeta s velikim udjelom soli suprimira protuupalne M2

makrofage mehanizmom koji uključuje smanjenje glikolize i metabolički output mitohondrija. Supresija M2 makrofaga doprinosi proupalnoj imunološkoj neravnoteži potaknutom stimulacijom M1 makrofaga (111).

1.5.3. Sol, leukocitna adhezija i endotelna aktivacija

Endotelna aktivacija je jedna od središnjih karakteristika hipertenzije, a povezana je s prekomjernom ekspresijom adhezijskih molekula leukocita i lokalnom upalom. Stanične adhezijske molekule (engl. cell adhesion molecule - CAM) poput ICAM-1 (endotelni ligand za antigen 1 povezan s funkcijom leukocita [LFA-1 ili α L β 2, integrin]), VCAM-1 (endotelni ligand za vrlo kasni antigen 4 [VLA-4 ili α 4 β 1]) i E-selektin, kao i endoglin (endotelni koreceptor za nekoliko liganda iz obitelji transformirajućih faktora rasta beta) pokazali su se kao važni biljezi endotelne aktivacije koja prethodi adheziji aktiviranih leukocita i inicirajući tako početak nastanka aterosklerotskih lezija (112,113).

Studije na eksperimentalnim životinjama pokazale su da čak i kratkotrajno HS opterećenje uzrokuje porast ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina (endotelne stanične adhezivne molekule), što upućuje na rani razvoj aktivacije endotela te endotelno-leukocitne interakcije, te potencijalno štetno vaskularno djelovanje uslijed kratkotrajnog HS unosa (npr. epizode prejedanja) ako postoje drugi genetski i okolišni čimbenici rizika (114).

Dmitrieva i Burg su istraživali utjecaj visoke koncentracija natrija na kulture humanih endotelnih stanica iz umbilikalnih vena i ukazali su na pojačanu ekspresiju gena za VCAM-1, E-selektin i MCP-1(115). A Wild i sur. su izvijestili da je natrijem induciran porast leukocitne adhezije posredovan ROS-om i endotelnom dušik-oxid sintazom (NOS) (116).

Dostupni podaci o učinku HS prehrane na biljege aktivacije endotela ograničeni su, osobito u zdravih osoba. Zabilježeno je da se razina sE-selektina u plazmi, ali ne i razina sICAM-1 i sVCAM-1 u plazmi povećala u 2 tjedna HS prehrane u pacijenata osjetljivih na sol (117). Nadalje, Tadžić i sur. izvijestili su da u hipertenziji postoji visoka koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1, s niskim razinama sE-selektina, kao markera aktivacije endotelnih stanica (118). Ranija studija naše istraživačke skupine pokazala je da, iako je mikrovaskularna reaktivnost kao odgovor na vaskularnu okluziju bila oslabljena nakon protokola 7-dnevne HS prehrane, HS dijeta nije utjecala na koncentracije serumskih sCAM-a (sICAM-1, sVCAM-1 i E-selektin) kod

mladih zdravih žena (7). Navedena istraživanja jasno pokazuju da su rezultati nekonzistentni te da je i dalje nepoznato utječu li hipertenzija ili prehrana s velikim udjelom soli na serumske koncentracije sCAM-a.

1.5.4. Kliničke studije - sol i imunološki odgovor

Još uvijek je ograničen broj kliničkih studija o ulozi unosa soli u organizam u modificiranju imunološkog odgovora. Na primjer, nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da 14-dnevna HS prehrana značajno povećava noćni sistolički i dijastolički krvni tlak i učestalost Th17 stanica u PBMC-ima (engl. peripheral blood mononuclear cells, mononuklearne stanice periferne krvi) zdravih muškaraca (119). Studija Lua i sur. na 15 zdravih dobrovoljaca izvijestila je o nepromijenjenom ukupnom broju ili postotku B stanica u perifernoj krvi ili podskupova CD3, CD4 ili CD8 T-stanica, ali i o progresivnim promjenama u populacijama Th17 i Treg stanicama (mjereno protočnom citometrijom) tijekom 7-dnevne HS prehrane u zdravih dobrovoljaca; sudionici su bili podvrgnuti trodnevnoj normalnoj prehrani sa soli, zatim 7-dnevnoj HS prehrani (15 g soli/dan), a zatim je slijedila 7-dnevna LS dijeta (5 g soli/dan). Konkretno, HS dijeta je u početku smanjivala broj Th17 pri prelasku s normalne na HS prehranu (3. i 4. dan), a zatim su se postupno povećavale do kraja protokola prehrane (17. dan). Nasuprot tome, broj Treg se povećao 4. dana (pri prelasku s normalne na HS prehranu), a zatim se smanjio tijekom cijelog protokola HS prehrane (10. dan). Omjer Th17/Treg značajno se povećao tijekom HS prehrane (4. - 7. dan), a zatim se postupno smanjivao prema osnovnoj vrijednosti tijekom LS dijeta (11. - 17. dan) (120). Iako je objašnjenje ovih promjena trenutno nepoznato, rezultati u prvom tjednu sukladni su rezultatima studija na eksperimentalnim životinjama. Yi i suradnici proučavali su 6 zdravih ispitanika koji su primali 12, 9 i 6 g NaCl dnevno te su pronašli promjene u fenotipu leukocita iz periferne krvi. Veći broj monocita zabilježen je kod ispitanika koji dok su bili na dijeti s 12 g soli dnevno, dok je manji unos soli povezan sa smanjenom razinom proizvodnje IL-6 i IL-23 i pojačanom proizvodnjom protuupalnog citokina, IL-10 (121). U drugoj studiji, 20 zdravih dobrovoljaca dobivalo je prehranu s velikim udjelom soli (≥ 15 g NaCl/dan; 256 mmol natrija/dan) tijekom 7 dana, nakon čega je uslijedio prelazak na prehranu s malim udjelom soli (≤ 5 g NaCl/dan; 85,5 mmol natrija/dan) 7 dana. Dijeta s velikim udjelom soli rezultirala je aktivacijom CD14 monocita i brzom ekspanzijom CD14 CD16 monocita, uz recipročno smanjenje udjela CD14 CD16 subpopulacije. Te su promjene bile

obrnute nakon prelaska na prehranu s malim udjelom soli (122). Studija naše istraživačke skupine istraživala je učinak sedmodnevne HS prehrane (14,5 g soli dnevno) na (a) učestalost subpopulacija leukocita periferne krvi (PBL) (granulociti, makrofagi i limfociti), (b) dinamiku aktivacije leukocita utvrđivanjem CD11a, CD49d i aktiviranog CD11b integrina, (c) aktivaciju neutrofila utvrđivanjem ekspresije CD66b i (d) raspodjelu subpopulacija monocita (klasične, srednje i neklasične) u perifernoj krvi u zdravih osoba (123). Pokazali smo da je HS prehrana bitno izmijenila fenotip i dinamiku PBL-a, neovisno o promjenama krvnog tlaka. HS dijeta pokazala je povećanu učestalost aktiviranih stanica koje ekspimiraju CD11b, sugerirajući nedavnu aktivaciju PBL-a. Nadalje, HS dijeta smanjila je ekspresiju CD11b(act) integrina na limfocitima i CD11a (dio LFA-1) integrina na granulocitima, što je negativno korelirano s dnevnim unosom soli. Ekspresija CD11a značajno je promijenjena HS prehranom, a učestalost nekih CD11a pozitivnih stanica je smanjena. Pronašli smo i smanjenu ekspresiju CD49d na PBL podskupinama. Učestalost CD66b+CD11b(act)+ dvostruko pozitivnih stanica koja odgovara nedavno aktiviranim granulocitima, povećana je tijekom HS prehrane, a analiza subpopulacija monocita otkrila je značajno smanjenje učestalosti srednjih monocita popraćeno recipročnim povećanjem učestalosti klasičnih monocita (123). U zaključku, rezultati ove studije pružaju dokaze da kratkotrajna visokoslana prehrana može promijeniti status aktivacije leukocita i potaknuti tzv. "low-grade" vaskularnu upalu (123).

1.5.5. Sol i infekcije

U zadnjem odlomku o utjecaju soli na imunološki sustav za napomenuti je i mogući razlog zašto sol uopće modulira imunološki sustav, pretpostavka koja je opisana u preglednom radu Wenzela i suradnika iz 2019. godine (124). Postoje značajni dokazi da lokalni Na⁺ može djelovati kao signal opasnosti pojačavajući proupalnu staničnu funkciju i umanjujući protuupalni imunološki odgovor. Naime, hipertonična mikro-okruženja služe kao zaštitna "tvrđava" od invazije mikroba (124). Jantsch i kolege nedavno su pokazali prethodno zanemarenu posljedicu skladištenja natrija u koži. Uočili su pojačano nakupljanje natrija na mjestu bakterijskih infekcija kože kod ljudi i miševa. Štoviše, otkrili su da je povećanje sadržaja natrija u koži djetom s velikim sadržajem soli potaknulo aktivaciju makrofaga na način ovisan o NFAT5 i potaknulo antimikrobnu obranu kože (125). Još jedno pojačanje antimikrobne obrane inducirano solju nedavno je identificirano u bubrezima. U bubrežnom intersticiju,

gradijent natrija navodi migraciju imunoloških stanica u bubregu tijekom infekcija. Infekcije donjih mokraćnih kanala jedna su od najčešćih bakterijskih infekcija kod ljudi, ali proširenje na bubrege je rijetko. Ova zaštita gornjih mokraćnih putova pripisana je mehaničkim silama, poput protoka urina, koje sprječavaju uspon mikroba u mjehuru. Hipertoničnost bubrežne medule potrebna je za rad bubrega kao organa za koncentriranje urina. Međutim, hipertoničnost također potiče epitelne stanice, na način ovisan o NFAT5, da proizvode kemokine koji lokaliziraju mononuklearne fagocite dobivene iz monocita u medulu (124). Osim toga, moguće je da hipertonično okruženje u bubrežnoj meduli povećava intrinzične baktericidne i neutrofilne kemotaktičke aktivnosti mononuklearnih fagocita za stvaranje antibakterijske obrambene zone (126). Stoga bi temeljna funkcija metabolizma Na^+ u dermalnim i bubrežnim epitelnim površinama mogla biti jačanje njihovih barijernih funkcija (127).

Međutim, mehanizmi koji pokreću lokalno skladištenje soli zahtijevaju daljnje istraživanje. U nedostatku mikrobnih napadača, skladištenje soli događa se s povećanim unosom soli hranom u životinja i ljudi i pojačava se starenjem. U tom kontekstu, unošenje Na^+ moglo bi dovesti do neželjenih posljedica neprikladne proupalne aktivacije imunoloških stanica, što je potkrijepljeno zaključkom da sol pogoršava autoimuni encefalitis i hipertenziju (124).

Kontrola krvnog tlaka i antimikrobna obrana organizma bitni su mehanizmi homeostaze. Infekcija može uzrokovati hipotenziju zbog gubitka tekućine tijekom vrućice, tahipneje i proljeva. Septikemija uzrokuje gubitak vaskularne tekućine povezan s upalom zajedno s vazodilatacijom, što može kulminirati cirkulatornim kolapsom. Stoga je rizik od hipotenzije povezan s upalom mogao pogodovati odabiru mehanizama koji povezuju nakupljanje natrija i upalu s porastom krvnog tlaka i otpornošću na daljnje prodore mikroba za kratkoročne koristi za preživljavanje. Takva evolucijska sila može objasniti zašto važni antimikrobni efektori mogu imati izravne hipertenzivne učinke promičući vazokonstrikciju ili zadržavanje natrija (128).

2. HIPOTEZA

Tjedan dana dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovat će aktivaciju upalnog odgovora koja je povezana s posljedičnim oštećenjem mikrovaskularne endotelne funkcije u populaciji zdravih, mladih pojedinaca.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dva specifična cilja ovog istraživanja su:

1. Odrediti učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS dijeta) na razinu sustavne upale i ravnotežu Th17 i Treg limfocita u zdravih mladih ispitanika oba spola.
2. Ispitati povezanost upalnog odgovora uslijed 7-dnevne HS dijeta sa ranije dokazanim funkcionalnim oštećenjem mikrovaskularne reaktivnosti i povećanom razinom oksidativnog stresa u zdravih mladih ispitanika oba spola.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

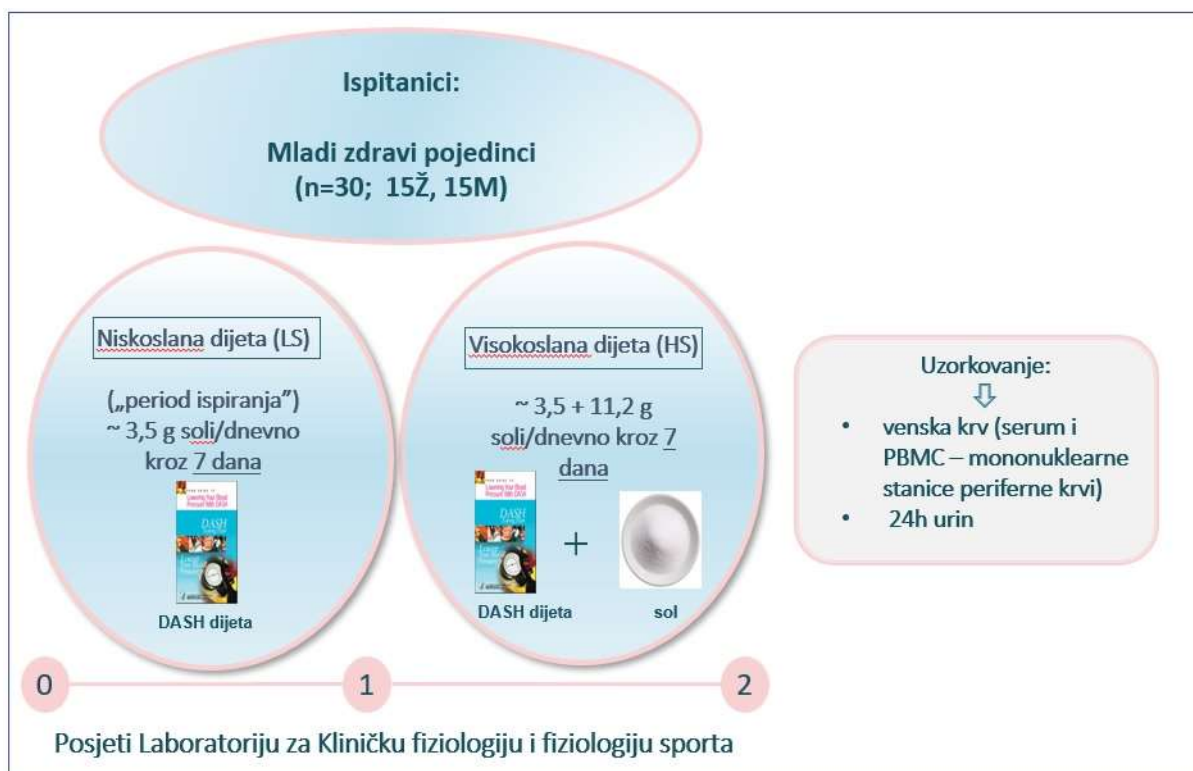
Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani pokus, u kojemu su svi ispitanici bili podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja.

4.2. Ispitanici

Ispitanici su mladi, zdravi pojedinci, koji su regrutirani putem oglasa na Medicinskom fakultetu u Osijeku. U studiju je uključeno 30 ispitanika oba spola u dobi od 18 do 29 godina. Isključni kriteriji za ulazak u studiju su bili: pušenje, trudnoća, uzimanje oralnih kontraceptiva, značajna promjena tjelesne mase unazad godinu dana, hipertenzija ili hipotenzija, koronarna bolest, šećerna bolest, hiperlipidemija, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila, alergijske/atopijske bolesti, recentni (<1 mjesec) infekti, uzimanje antibiotika te nesteroidnih protuupalnih lijekova unazad mjesec dana, uzimanje bilo kakvih lijekova koji mogu imati utjecaj na endotel. Ispitanice su pristupale protokolu studije u različitim fazama menstrualnog ciklusa kako bi se eliminirao učinak fluktuacije spolnih hormona tijekom menstrualnog ciklusa na endotelnu funkciju (129). Svaki ispitanik je detaljno obaviješten o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja. Također, svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja. Protokol je studije u skladu sa standardima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobren od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-52). Studija je provedena u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta, te Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek. Ova studija je dio istraživačkog projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost HRZZ IP-2016-06-8744 pod nazivom „Interakcija renin-angiotenzinskog i adrenergičkog sustava u aktivaciji endotela uzrokovanoj oksidativnim stresom“.

4.3. Metode

Protokol studije je trajao 14 dana (slika 4.1.), a intervencija u studiji je bila perturbacija u unosu soli hranom u organizam. Prvih 7 dana svi su ispitanici bili na dijetetskom režimu s niskim udjelom soli (engl. "low salt" - LS) prema DASH planu prehrane s ciljem postizanja unosa soli od 3,75 g soli dnevno (DASH plan prehrane, US Department of Health and Human Services, 2006.) , što se smatralo periodom "ispiranja" (8). Sljedećih 7 dana svi su ispitanici bili na visokoslanjoj (engl. "high salt" -HS) dijeti, što je podrazumijevalo unos približno 14,7 g soli na dan - 3,75 g soli dnevno u prehrani (DASH dijeta) uz dodatak dodatnih 11,2 g soli dnevno u obliku praha (zrna) soli (komercijalno dostupna jodirana kuhinjska morska sol). Ispitanici su dobivenu količinu soli uzimali raspoređeno tijekom dana, otopljeni u tekućini, jogurtu i sl. Tijekom studije svi su ispitanici imali tri posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta: 1. posjet prilikom ulaska u studijski protokol (kada su detaljno obaviješteni o protokolu istraživanja, potpisali su informirani pristanak te su dobili upute za LS dijetu, HS dijetu i prikupljanje 24-satnog urina kao i posudu za prikupljanje urina), 2. posjet nakon 7 dana LS dijete i 3. posjet nakon 7 dana HS dijete što je ukupno 90 studijskih posjeta od kojih je 60 posjeta uključivalo mjerenja - svaki ispitanik imao je dva ponovljena mjerenja svih u nastavku opisanih postupaka i parametara; prvo mjerenje nakon 7-dnevne LS dijete (LS stanje) i drugo mjerenje nakon 7-dnevne HS dijete (HS stanje). Tijekom cijelog protokola istraživanja sudionici nisu imali ograničenja u konzumaciji vode. Svi studijski posjeti i sva mjerenja su izvršena ujutro, nakon noćnog gladovanja. Prikupljanje podataka obavljeno je u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju, Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.



Slika 4.1. Protokol studije.

n - broj; Ž - žene; M - muškarci; DASH - engl. Dietary Approaches to Stop Hypertension, dijetetski režim prema američkoj inicijativi za smanjenje unosa soli hranom; PBMC - engl. peripheral blood mononuclear cells, mononuklearne stanice periferne krvi.

(izvor: izradila autorica rada)

4.3.1. Analiza uzoraka 24h urina

Za procjenu usklađenosti s danim prehranbenim protokolima (LS i HS) svaki ispitanik je prikupio urin tijekom posljednja 24 sata LS i HS stanja prema danim uputama. Cjelovitost prikupljanja 24h urina određena je automatskim programom u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek, koji prema zadanoj formuli računa tzv. koeficijent kreatinina iz vrijednosti kreatinina u urinu, tjelesne mase i volumena 24h urina. U uzorcima 24-satnog urina analizirani su natrij, kalij, koeficijent kreatinina, albumini, proteini i koncentracija uree. Iz 24-satne natrijureze odgovarajućom formulom smo izračunali dnevni unos kuhinjske soli u gramima [1 g sol (NaCl) = 393.4 mg Na = 17.1 mmol Na] koji smo kasnije

koristili za provjeru pridržavanja LS/HS dijete. Analiza uzoraka 24h urina je izvršena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska.

4.3.2. Antropometrijska mjerenja i mjerenje vrijednosti krvnog tlaka

Ispitanicima je izmjerena visina (m) i tjelesna masa (kg) kako bi se izračunao indeks tjelesne mase (engl. body mass index, BMI). Također, izmjeren je opseg struka i bokova kako bi se izračunao omjer struka i bokova (engl. waist to hip ratio, WHR). Prilikom svakog studijskog posjeta, nakon 15 minuta odmora u sjedećem položaju, arterijski tlak je mjereno automatskim oscilometrijskim sfigmomanometrom (OMRON M3, OMRON Healthcare Inc., Osaka, Japan). Medijan tri uzastopna mjerenja uzet je kao konačna vrijednost krvnog tlaka (mmHg). Iz sistoličkih i dijastoličkih vrijednosti arterijskog tlaka je izračunat srednji arterijski tlak (MAP) te je neosjetljivost na sol definirana kao promjena $MAP \leq 10$ mmHg određena na LS u odnosu na HS dijete. Sudionici su klasificirani kao osjetljivi na sol ili neosjetljivi na sol nakon što su završili cijeli protokol. Svi ispitanici su bili neosjetljivi na sol i sve opažene promjene nakon HS prehrane navedene u ovom radu mogu se smatrati neovisnima o arterijskom tlaku.

4.3.3. Uzorkovanje i analiza uzoraka venske krvi

Uzorak venske krvi uzet je svakom ispitaniku u studijskoj posjeti nakon LS te nakon HS dijete. U uzorcima krvi odmah su analizirani kompletna krvna slika, elektroliti (natrij, kalij, kalcij), urea, kreatinin i visokoosjetljivi C reaktivni protein (hsCRP) standardnim laboratorijskim metodama i operativnim protokolima u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska.

4.3.4. Serumska koncentracija proteina pro- i protuupalnih citokina, komponente C3a komplementa, topljivih staničnih adhezijskih molekula i esej endoglina

Za ovaj skup eksperimenata, serum su odvojeni iz uzoraka venske krvi te pohranjeni na -80 °C do analize. Koncentracije proteina u serumu: a) proupalnih citokina: interferon gama (IFN- γ), interleukina 6 (IL-6), tumor nekrotizirajućeg faktora α (TNF- α), interleukina 9 (IL-9), interleukina 23 (IL-23) i interleukina 17A (IL-17A); b) protuupalnih (i imunomodulatornih)

citokina: interleukina 10 (IL-10), interleukina 21 (IL-21), interleukina 22 (IL-22) i transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β 1); c) komponenta komplekta C3a; d) topljive stanične adhezijske molekule: topljiva međustanična adhezijska molekula 1 (sICAM-1), topljiva vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (sVCAM-1) i E-selektin (CD62E); i e) endoglin su izmjereni pomoću Invitrogen Procarta Plex antitijela, reagensa i pločice za „multipleks“ kvantitativno određivanje razine proteina uporabom instrument platforme Luminex 200 prema protokolu opisanom u prethodnom radu naše istraživačke grupe (130). Pokusi su izvršeni u Laboratoriju za imunološku i alergološku dijagnostiku KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska.

4.3.5. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC), krioprezervacija, odmrzavanje i kultivacija

Uzorci venske krvi prikupljeni su u 10 mL vacutainer epruvete koje sadrže EDTA i obrađeni su unutar tri sata od prikupljanja. Ohlađeni reagensi i puferi korišteni u izolaciji zagrijani su na sobnu temperaturu (~ 20-25 °C) prije izolacije. Sakupljena puna krv razrijeđena je s prethodno pripremljenom 1x fiziološkom otopinom s fosfatnim puferom (PBS) u omjeru 1:1 i pažljivo nanosena na medij za centrifugiranje Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) bez miješanja slojeva. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 25 minuta na 800 G, na sobnoj temperaturi (Rotina 380, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka). Sloj koji je sadržavao mononuklearne stanice sakupljen je i dvaput ispran s 1× PBS. Broj stanica određen je bojenjem stanica s 0,4 % tripan plavom otopinom (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) te korištenjem Bürker-Türk komorice za brojanje i svjetlosnog mikroskopa. Protokol dostupan na <https://www.cptp.inserm.fr/wp-content/uploads/2018/01/PBMC-isolation-and-cryopreservation.pdf> (datum pristupa 20. lipnja 2019.).

PBMC su uzgajane u mediju RPMI-1640 s L-glutaminom (Sigma-Aldrich), dopunjenim dodatkom fetalnog goveđeg seruma (10 %) (Fetal Bovine Serum, FBS; Sigma-Aldrich) i antibiotika penicilin-streptomocina (1 %) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka). Suspenzije stanica pohranjene su u pločama s 24 jažice i stavljene u inkubator (Shel Lab, CO₂ Series, Sheldon production Inc, Cornelius, OR, USA) pod sljedećim uvjetima: ~37 °C, 5 % CO₂, > 80 % razina vlažnosti 24 h prije daljnjeg postupka.

U svrhu krioprezervacije koristili smo dimetil-sulfoksid (DMSO; Supelco, Merck KGaA) i FBS u omjeru 1:9, a za dodatnu krioprotekciju stanica prilikom zamrzavanja kriotubice su bile uronjene u izopropilni alkohol tijekom najmanje 24 sata na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mr. Frosty; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Odmrzavanje uzoraka je provedeno u RPMI-1640 mediju (kojemu su dodani prethodno navedeni FBS i antibiotici) koji je prethodno zagrijan na $\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije dodavanja medija, kriotubice koje sadrže stanice pažljivo su umočene u vodenu kupelj ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) na otprilike 1 min, a zatim prebačene u veće epruvete. Prethodno zagrijani medij je pipetiran na stanice kapanjem kako bi se izbjegao osmotski šok, a uzorci su centrifugirani. Nakon dva dodatna koraka ispiranja, stanice su resuspendirane u svježem mediju, prebačene u ploče s 24 jažice i držane u inkubatoru 24 h ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , $> 80\%$ vlažnost).

Analize za ocjenu vijabilnosti stanica i isključenje moguće pristranosti uzrokovane nespecifičnim bojenjem mrtvih/umirućih stanica u našim uzorcima uključivale su (a) bojenje stanica s 0,4 % tripan plavom otopinom i brojanje živih stanica u Bürker-Türk komorici pod svjetlosnim mikroskopom i (b) bojenje stanica bojom koja se može fiksirati (FVD) eFluor™ 780 (eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a koja se može detektirati na protočnom citometru nakon ekscitacije crvenim laserom od 633 nm. Uzorci uključeni u završnu analizu i izračune imali su vijabilnost stanica od $\geq 80\%$.

4.3.6. Ispitivanje frekvencije regulacijskih T limfocita (Treg) i pomoćničkih T limfocita (Th17) i omjera Th17/Treg

Metoda protočne citometrije korištena je za imunofenotipizaciju regulacijskih T limfocita (Treg) i pomoćničkih T limfocita (Th17), što je naša istraživačka skupina prakticirala i u ranijem istraživanju (131).

Imunomagnetsko sortiranje. Nakon odmrzavanja uzoraka PBMC-a i podešavanja broja stanica na $1,2 \times 10^7$, CD4^+ T stanice su odvojene korištenjem metode negativne magnetske selekcije putem komercijalno dostupnih magnetskih kuglica (MagneSort™ Human CD4^+ T stanica, komplet za obogaćivanje; Invitrogen od Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), te slijedeći protokol koji je dao proizvođač (datum pristupa 11. svibnja 2020.; Protokol dostupan na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/8804-6811.pdf>). Navedeni set

sadrži protutijela usmjerena na slijedeće humane antigene: CD8, CD11b, CD14; CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, CD235a, $\gamma\delta$ TCR pomoću kojih se postiže minimalna čistoća od 85 % CD4 T limfocita (131). Za aktivaciju su pripremljene negativno odabrane stanice.

Aktivacija CD4+ T limfocita. Kako bi se aktivirale CD4+ T stanice i potaknula proizvodnja citokina, magnetski sortirane stanice su kratko (4 sata) stimulirane s forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) i ionomicinom. Aktivacija CD4 T stanica provedena je u pločama s 24 jažice (4 sata, ~37 °C, 5 % CO₂, > 80 % razina vlažnosti) s komercijalno dostupnim koktelom za stimulaciju stanica (500×; eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u konačnoj koncentraciji od 2 μ L/mL (datum pristupa 12. svibnja 2020.; puni protokol dostupan na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/00-4970.pdf>).

Kalcijev klorid (CaCl₂) dodan je stimulacijskom mediju da izazove dugotrajnu intracelularnu kalcijevu signalizaciju koja bi izazvala stanični odgovor (konačna koncentracija od 5 μ L/mL).

Kako bi se spriječilo lučenje citokina i omogućila procjena stanica koje proizvode IL-17 protočnom citometrijom (intracelularno bojenje IL-17, detaljan protokol naveden kasnije u odjelju), otopina Brefeldina A (1000×; eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, SAD) korištena je kao inhibitor transporta proteina u Golgijev aparat s rezultirajućim nakupljanjem proteina u endoplazmatskom retikulumu (datum pristupa 12. svibnja 2020.; konačna koncentracija 3 μ L/mL; dostupno na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/00-4506.pdf>).

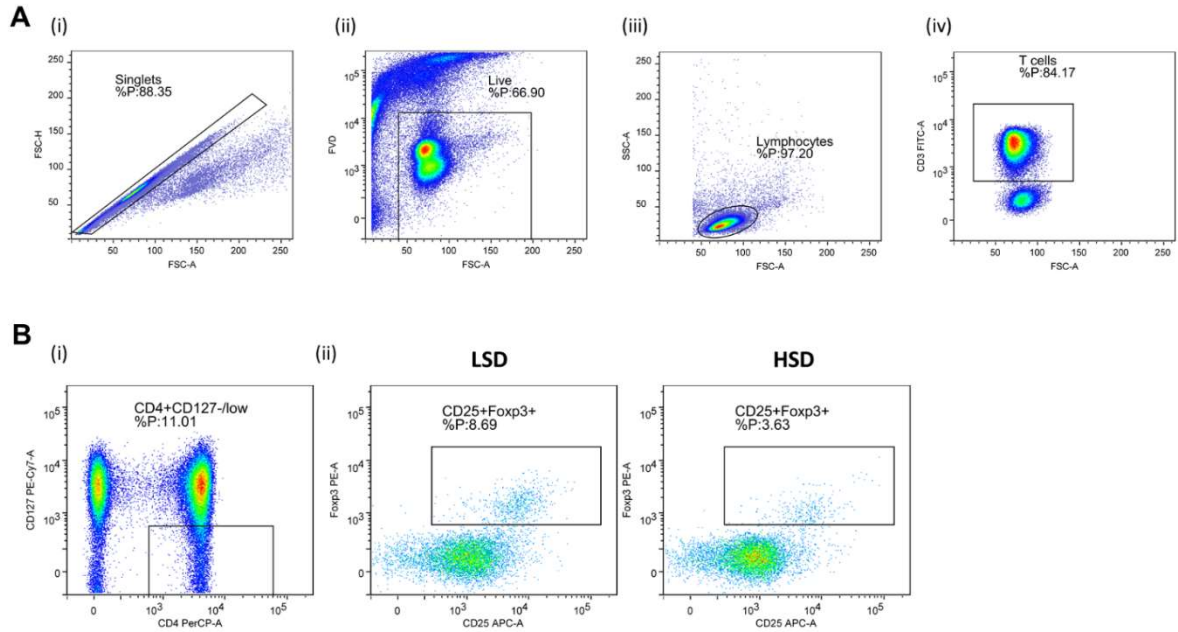
Koktel za stimulaciju stanica, Brefeldin A i CaCl₂ dodani su zajedno i u isto vrijeme u staničnu suspenziju. Nakon završetka četverosatne inkubacije, dodano je 200 μ L 0,1 M EDTA i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se zaustavila reakcija.

Protočna citometrija. Kao što je navedeno, metodom protočne citometrije određene su učestalosti CD4+FOXP3+ regulatornih T limfocita i CD4+IL-17A+ T pomoćnih limfocita među izoliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi. Protokoli za pripremu uzoraka i bojanje za intracelularne antigene za protočnu citometriju bili su modificirane verzije preporučenih protokola (datum pristupa 13. svibnja 2020.; dostupno na www.thermofisher.com). Za intracelularno bojenje korišten je puferski set za bojanje FOXP3 faktora transkripcije (eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Ukratko, prije bojenja površine stanice, fiksacije/permeabilizacije i

intracelularnog/nuklearnog bojenja, mrtve stanice su nepovratno obilježene prethodno spomenutim FVD-om (aminoreaktivna fiksirana boja za vijabilnost), a hvatanje nespecifičnih antitijela Fc receptorima blokirano je dodatkom ljudskog reagensa za blokiranje Fc (BD Pharmigen™, BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, provedeno je bojenje odgovarajućom smjesom antitijela ovisno o podskupu stanica od interesa. Uz pažljivu pripremu uzoraka i optimizaciju protokola bojanja, u naše su eksperimente uključene standardne preporučene kontrole za protočnu citometriju, a to su: jednobojne, fluorescencija minus jedan (engl. fluorescence minus one, FMO), neobojene i negativne kontrole kako bi se pouzdano razlikovale pozitivne stanice od pozadinskog/negativnog bojenja i nespecifičnih učinaka.

Matrica kompenzacije fluorescencije za analizu višebojne protočne citometrije izračunata je korištenjem BDTM CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particle Set (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD). Mjerenja obojenih uzoraka provedena su citometrom BD FACSCanto II (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD). Analiza i vizualizacija podataka provedena je pomoću softvera FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone, Australija).

Regulacijski T limfociti (Treg). Za bojenje površine stanica korištena je sljedeća mješavina antitijela: CD3 FITC (klon: OKT3, eBioscience™, Affymetrix od Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD), CD4 PerCP-eFluor™ 710 (klon: SK3, eBioscience™), CDy177 (klon: eBioRDR5, eBioscience™), CD25 APC (klon: BC96, eBioscience™); dok je FOXP3 PE (klon: 235A/E7, eBioscience™) protutijelo korišteno za intracelularnu detekciju intracelularnog antigena. Reprezentativna strategija "postavljanja prozora" korištena za analizu podataka prikazana je na slici 4.2.



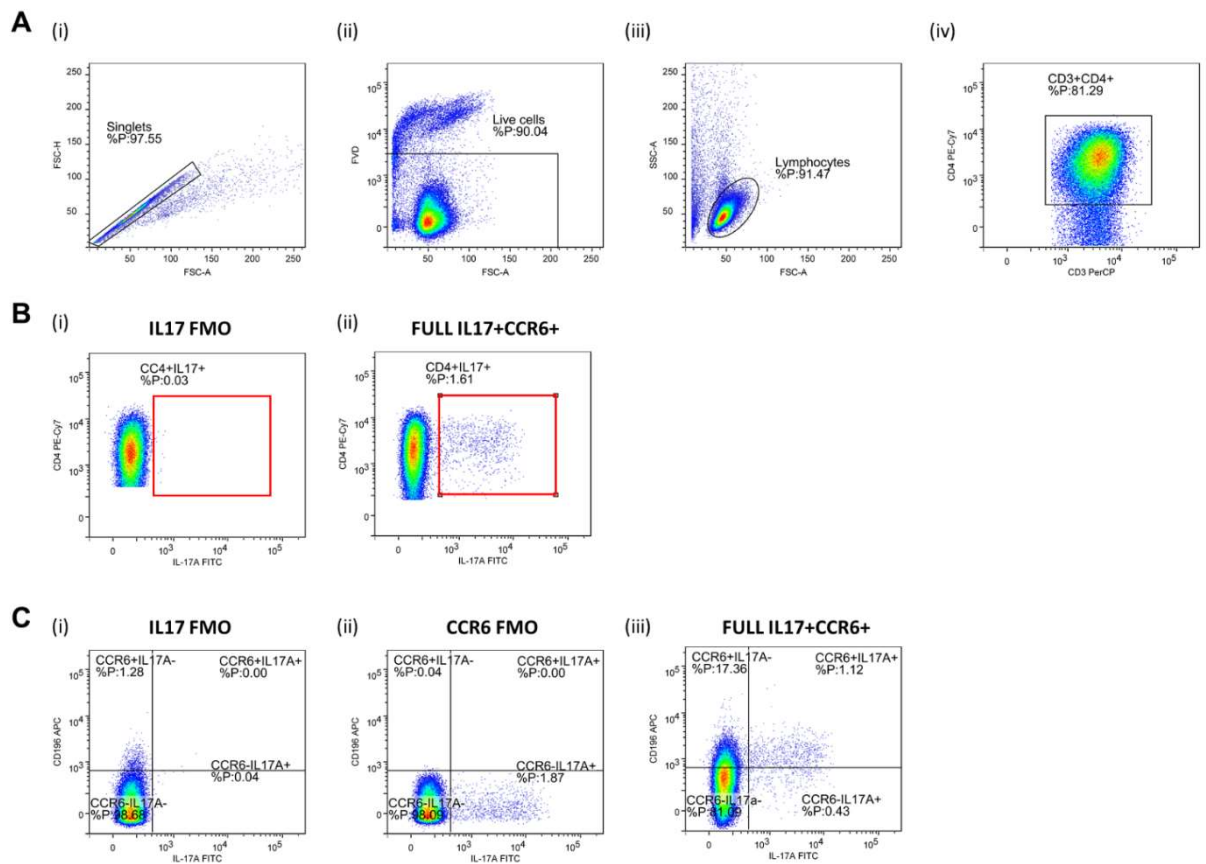
Slika 4.2. Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija od interesa za procjenu regulacijskih T stanica periferne krvi (Treg) protočnom citometrijom.

Panel A prikazuje reprezentativne točkaste grafikone koji ilustriraju strategiju "postavljanja prozora", uključujući izuzeće dvostrukih stanica na temelju površine i širine signala koji potječe od pravocrnog raspršenja svjetlosti (engl. forward scatter area, FSC-A) u odnosu na analizu širine raspršenja (engl. Forward scatter width) (A-i), uključenje živih stanica (negativne na fiksabilnu boju za vijabilnost) (A-ii), definiranje populacije limfocita (A-iii) i definiranje populacije CD3⁺ T stanica (A-iv). Zatim su analizirane ukupne CD25⁺FOXP3⁺ T stanice koje eksprimiraju CD4⁺CD127^{low} nisku populaciju (Panel B). B-i prikazuje reprezentativnu strategiju „postavljanja prozora“, B-ii reprezentativne uzorke iz LS i HS protokola.

LSD- (engl. low salt diet), niskoslana dijeta; HSD (engl. high salt diet), visokoslana dijeta. Za analizu podataka i ilustraciju korišten je softver FlowLogic.

Pomoćnički T limfociti (Th17). Za detekciju antigena stanične površine korištena je sljedeća mješavina antitijela: CD3 PerCP-eFluor™ 710 (klon: SK7, eBioscience™, Affymetrix od Thermo Fisher Scientific, CA, SAD), CD4 PE-Cy7 (klon: SK3, eBioscience™), CD196 APC (klon: R6H1, eBioscience™), dok je IL-17A FITC (klon: eBio64DEC17, eBioscience™)

antitijelo dodano za detekciju intracelularnog antigena. Reprezentativna strategija "postavljanja prozora" korištena za analizu podataka prikazana je na slici 4.3.



Slika 4.3. Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija od interesa za procjenu Th17 populacije periferne krvi protočnom citometrijom.

Panel A prikazuje reprezentativne točkaste grafikone koji ilustriraju strategiju "postavljanja prozora", uključujući izuzeće dvostrukih stanica na temelju površine i širine signala koji potječe od pravocrnog raspršenja svjetlosti (engl. forward scatter area, FSC-A) u odnosu na analizu širine raspršenja (engl. Forward scatter width) (A-i), uključivanje živih stanica (negativne na fiksabilnu boju za vijabilnost) (A-ii), definiranje populacije limfocita (A-iii) i definiranje populacije CD3+CD4+ T pomoćničkih stanica (A-iv). T pomoćničke stanice su naknadno analizirane na ekspresiju IL-17A i CD196/CCR6. Prvo su analizirane ukupne T pomoćničke stanice koje izlučuju IL-17 (Panel B) pri čemu je prozor na IL-17+ T stanicama definiran korištenjem kontrole florescencije minus jedan (engl. florescence minus one, FMO) za IL-17 antitijelo (B-i). Reprezentativni uzorak koji pokazuje relativne frekvencije perifernih CD4+IL-17+ T pomoćnih stanica u zdravih mladih osoba prikazan je na B-ii. Populacija T pomoćničkih

stanica koje luče IL-17 dodatno je analizirana na ekspresiju CD196/CCR6 (panel C), stoga su identificirane dvije subpopulacije - CD4+CD196+IL17+ koja odgovara Th17 stanicama i CD4+CD196-IL17+ koja odgovara ne-Th17 stanicama, tj. drugim T pomoćničkim subpopulacijama sa sposobnošću izlučivanja IL-17. FMO kontrole za antitijela sa specifičnostima za IL17 i CCR6 korištene su za "postavljanje prozora" (C-i i C-ii). Na C-iii su prikazane FMO kontrole pomoću kojih je određena granica između pozitivnih i negativnih stanica. Za analizu podataka i ilustraciju korišten je softver FlowLogic.

4.3.7. Određivanje serum i glukokortikoid regulirane kinaze 1 (SGK1)

Relativna količina ukupne serumom i glukokortikoid regulirane kinaze 1 (SGK1) u kultiviranim stanicama izmjerena je komercijalno dostupnim kompletom za ELISA-u (LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, SAD) na kompaktnom čitaču apsorpcije za mikroploče s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC). Nakon odmrzavanja i provjere održivosti (bojenje stanica s 0,4 % tripan plavom otopinom), PBMC su izbrojani i stavljeni u medij za kulturu (RPMI-1640 nadopunjen s 10 % FBS i 1 % antibiotikom penicilin-streptomocina). Prije dodavanja stanica, ploče s 96 jažica su obložene sa 100 µL ljepljive otopine poli-L-lizina (0,1 % u H₂O) i inkubirane 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, 20-30000 stanica je posađeno u svaku jažicu u 200 µL medija kulture i ploče su inkubirane preko noći (~37 °C, 5 % CO₂, > 80 % vlažnost). Zatim su slijedili koraci protokola analize koji su navedeni u korisničkom priručniku kompleta. Nakon završetka protokola analize, ploče su odmah očitane na 450 nm pomoću čitača mikroploča (dostupno na <https://www.lsbio.com/elisakits/mouse-human-rat-phospho-sgk1-sgk-ser422-cell-based-fosforilacija-elisa-elisa-kit-ls-fl1101/1101>).

4.3.8. Određivanje p38 mitogenom aktivirane protein kinaze

Relativna količina ukupne i fosforilirane humane protein kinaze aktivirane p38 mitogenom (p38MAPK) izmjerena je iz staničnih lizata korištenjem komercijalno dostupnog InstantOne ELISA kompleta (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Prethodno pohranjeni PBMC su odmrznuti i obojeni 0,4 % tripan plavom otopinom (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) kako bi se izbrojile vijabilne stanice u Bürker-Türk komori pod svjetlosnim mikroskopom. Broj vijabilnih stanica je podešen na odgovarajuću gustoću od

približno 25 000 stanica po jažici. Stanice su resuspendirane u Hankovoj balansiranoj slanoj otopini (HBSS) koja sadrži 5 % fetalnog goveđeg seruma (FBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i lizirane s 20 % konačnog volumena Lysis Mixa koji se nalazi u kompletu. Nakon koraka protokola analize, apsorbancija uzoraka je izmjerena na 450 nm na kompaktnom čitaču apsorbancije za mikroploče s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD).

4.3.9. Određivanje koncentracije proteina - biomarkera oksidativnog stresa i antioksidativne obrane: reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS), sposobnosti plazme za smanjenje željeza (FRAP) i 8-iso prostaglandina F2 alfa (8-iso-PGF2 α)

Kao biljege oksidativnog stresa mjerili smo TBARS (engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances) i 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2a), a kao biljeg antioksidativnog kapaciteta određen je FRAP (engl. ferric reducing ability of plasma).

Uzorci venske krvi za određivanje TBARS i FRAP pomoću spektrofotometrije prikupljeni su nakon LS i HS dijetnog protokola u epruvetama s antikoagulansom, brzo zamrznutim u tekućem dušiku i pohranjeni u hladnjaku na -80 °C do izvođenja pokusa.

TBARS, kojim se procjenjuju produkti peroksidacije lipida, predstavlja mjeru razine oksidativnog stresa. Budući da je metoda nespecifična, jer se druge tvari vežu na tiobarbiturnu kiselinu (uključujući proteine), uzorku venske krvi je dodana trikloroetena kiselina za taloženje proteina, a nakon toga je za daljnje mjerenje korišten supernatant. Apsorbancija uzorka izmjerena je nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLEN na 572 i 532 nm s malondialdehidom (MDA) korištenim kao standardom (μ M MDA) (132). Za mjerenje antioksidativnog kapaciteta uzoraka krvi korištena je FRAP metoda. Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) reducira se u Fe²⁺-TPTZ u prisutnosti antioksidansa i dolazi do pojave plave obojanosti. Apsorbancija uzorka izmjerena je nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLEN na 593 nm sa standardom (mM/L Trolox) (133). Kemikalije korištene za određivanje oksidativnog stresa bile su tiobarbiturna kiselina (TBA; Sigma-Aldrich, DE, SAD), trikloroetena kiselina (TCA; Panreac, Europa) i 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP; Sigma-Aldrich) i za FRAP analizu Trolox (Sigma-Aldrich), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ; Sigma-Aldrich), željezov(III) klorid heksahidrat (FeCl₃.6H₂O; Sigma-Aldrich) i natrijev acetat trihidrat (Kemika, Hrvatska).

Koncentracija proteina 8-iso-PGF2 α (izoprostana proizveden neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline u membranskim fosfolipidima) u serumu mjerena je korištenjem komercijalno dostupnog ELISA kita (MyBioSource, MBS700957, San Diego, CA, SAD).

4.3.10. Mjerenje o endotelu ovisne reaktivnosti mikrocirkulacije kože

Reaktivnost mikrocirkulacije kože mjerena je u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH, post-okluzivna reaktivna hiperemija) i iontoforezu acetilkolina (ACh) (endotel-ovisna vazodilatacija).

Za procjenu mikrovaskularne reaktivnosti u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH) i iontoforezu ACh koristili smo metodu Laser Doppler flowmetry (LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK). LDF mjerenja su izvršena u prostoriji kontrolirane sobne temperature ($23,5 \pm 0,5$ ° C) nakon 30 minuta aklimatizacije. Sonda LDF je pričvršćena na kožu volarne strane podlaktice, 13-15 cm od zapešća, na istom mjestu prilikom svakog mjerenja. PORH test je proveden nakon 5-minutnog bazalnog mjerenja, okluzijom brahijalne arterije induciranom napuhavanjem pneumatske manžete na nadlaktici na 30-50 mmHg iznad sistoličkog arterijskog tlaka. Mjerenje protoka učinjeno je prije, tijekom i nakon oslobađanja 1-minutne okluzije. Protok krvi u mikrocirkulaciji izražava se u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama (PU) i veličina protoka se određuje softverom koji računa površinu ispod krivulje (AUC) tijekom bazalnog protoka, okluzije i reperfuzije. Konačan rezultat se izražava kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na bazalni protok (porast R-O %). Postupci LDF za mjerenje PORH učinjeni su prema prethodno opisanim protokolima naše istraživačke skupine (7,134).

Iontoforeza je neinvazivna metoda za transdermalni unos nabijenih čestica izvana primijenjenom strujom malog napona. Nabijene čestice se nanose na kožu putem iontoforetske elektrode koja se učvršćuje na kožu na mjestu gdje se nalazi i sonda LDF-a. Nakon bazalnog mjerenja protoka kroz 5 minuta, transdermalno se iontoforezom unesu pozitivno nabijeni ACh (1 %) primjenom anodne struje (7 pulseva direktne struje jačine 0.1 mA kroz 30 s s pauzom od 30 s između pojedinih pulseva). Protokol iontoforetske primjene nabijenih čestica prilagođen je na način da se postigne plato maksimalnog LDF odgovora za apliciranu nabijenu česticu (22,135). Veličina protoka krvi u mikrocirkulaciji u ovom se testu također izražava u PU i

određuje se programskim računanjem AUC tijekom bazalnog protoka i tijekom primjene ACh. Rezultat se izražava kao povećanje protoka krvi nakon primjene ACh u odnosu na bazalni protok.

4.4. Statističke metode

Rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Broj ispitanika potreban kako bi se pokazao statistički značajan učinak izračunat je na temelju preliminarnih rezultata dobivenih na 10 ispitanika. Kako bi se pokazala očekivana razlika u promjeni mjerenih biljega upale prije i poslije HS dijete uz $\alpha=0,05$ te jakost statističke analize 80 % za t-test za zavisne uzorke (engl. paired t-test), izračunali smo da je potreban je uzorak od 12 ispitanika. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli određen je Kolmogorov-Smirnovim testom normalnosti. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli između mjerenja prije i poslije HS dijete (LS vs. HS mjerenje) testirane su t-testom za zavisne uzorke (engl. paired t-test), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Wilcoxonovim testom sume rangova. Povezanost (korelacija) između mikrovaskularne reaktivnosti (PORH i iontoforeza ACh) i odgovarajućih varijabli (biljega upale, unos soli, biljezi oksidativnog stresa) ispitali smo Pearsonovim ili Spearmanovim korelacijskim testovima (ovisno o normalnosti distribucije podataka). Dvostrani $P \leq 0,05$ smatran je statistički značajnim. Za statističku analizu koristili smo statistički program SigmaPlot (verzija 11.2, SYSTAT Software, Chicago, SAD).

5. REZULTATI

Svi ispitanici bili su mladi, normalne tjelesne težine, normotenzivni, imali su urednu bubrežnu funkciju kao i urednu kompletnu krvnu sliku, serumske elektrolite i nisu imali aktivni upalni proces (normalna vrijednost hsCRP). Svi su oni završili dvotjedni protokol perturbacije unosa soli putem prehrane; 7 dana LS dijete (razdoblje „ispiranja“) nakon čega je slijedilo 7 dana HS dijete. Značajno povećanje 24-satnog izlučivanja natrija urinom, kao i povećanje dnevnog unosa soli tijekom HS prehrane u usporedbi s LS periodom, potvrdili su da su sudionici uzimali sol u skladu s danim smjernicama za LS i HS prehranu.

5.1. Hemodinamski, antropometrijski i biokemijski pokazatelji

Kao što je i ranije objavljeno, 7-dnevna HS dijeta nije značajno promijenila BMI i WHR ispitanika u usporedbi s LS (tablica 5.1.). Štoviše, sistolički krvni tlak, dijastolički tlak i prosječni arterijski tlak (MAP) ostali su nepromijenjeni nakon HS prehrane u usporedbi s LS (tablica 5.1.). Stoga, budući da velike promjene u izračunatom dnevnom unosu soli i 24-satnom izlučivanju natrija tijekom unosa HS nisu bile popraćene popratnim promjenama razine arterijskog tlaka, svi sudionici se mogu okarakterizirati kao neosjetljivi na sol, a sve uočene promjene nakon HS ishrane zabilježene u ovom radu mogu se smatrati neovisnim o promjeni tlaka.

Tablica 5.1. Antropometrijska i hemodinamska obilježja nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.

Obilježje	LS	HS
N (Ž/M)	30 (15/15)	
Dob (godine)	21 [19-23]	
<i>Antropometrijska obilježja</i>		
BMI (kg/m ²)	24,3 [22,14-25,91]	24,03 [22,46-25,91]
WHR	0,83 [0,76-0,87]	0,82 [0,77-0,84]
<i>Hemodinamska obilježja</i>		
SBP (mmHg)	116 (11)	116 (13)
DBP (mmHg)	75 [70-80]	73 [71-78]
MAP (mmHg)	88 (7)	88 (6)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (za normalnu distribuciju varijabli) ili kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

LS- eng. low salt, niskoslana dijeta; HS- eng. high-salt, visokoslana dijeta; N- eng. number, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; BMI- eng.body mass index, indeks tjelesne mase; WHR- eng. waist-to-hip ratio, omjer struk-bokovi; SBP- eng.systolic blood pressure, sistolički krvni tlak; DBP- eng.diastolic blood pressure, dijastolički krvni tlak; MAP- eng. mean arterial pressure, srednji arterijski tlak.

* $P \leq 0,05$ LS vs. HS (t-test za zavisne uzorke, Wilcoxonov test sume rangova).

HS dijeta značajno je povećala koncentraciju natrija i kalija u serumu te se koncentracija kalcija u serumu smanjila u usporedbi s LS dijetnim uvjetima, no sve su vrijednosti ipak bile unutar normalnog referentnog raspona (Na 137-146 mmol/L, K 3,9-5,1 mmol/L, Ca 2,14-2,53 mmol/L). Nije bilo značajne razlike u kompletnoj krvnoj slici, serumskoj ureji, kreatininu i hsCRP nakon HS dijete u usporedbi s LS (tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Biokemijska obilježja u serumu nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.

Obilježje	LS	HS
<i>Serumska biokemijska obilježja</i>		
leukociti ($\times 10^{-9}/L$)	6,2 [5,5-7,4]	6,0 [5,2-7,3]
eritrociti ($\times 10^{-12}/L$)	5,02 (0,55)	4,89 (0,55)
hemoglobin (g/L)	145,3 (15,7)	142,0 (15,7)
hematokrit (%)	42,2 (4,4)	41,4 (4,3)
trombociti ($\times 10^{-9}/L$)	242,3 (38,4)	229,1 (42,3)
urea (mmol/L)	4,3 (1,1)	4,4 (0,9)
kreatinin ($\mu\text{mol}/L$)	76,7 (12,6)	71,1 (9,4)
natrij (mmol/L)	138,0 [137,0-139,0]	140,0 [139,0-141,0] *
kalij (mmol/L)	4,0 [3,9-4,2]	4,1 [4,0-4,3] *
kalcij (mmol/L)	2,48 (0,07)	2,43 (0,10) *
hsCRP (mg/L)	0,55 [0,32-1,13]	0,56 [0,34-0,80]

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) (za normalnu distribuciju varijabli) ili kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high salt, visokoslana dijeta; hsCRP-engl. high-sensitivity C reactive protein, visokoosjetljivi C reaktivni protein.

* $P \leq 0,05$ LS vs. HS (t-test za zavisne uzorke, Wilcoxonov test sume rangova).

Nije bilo značajne razlike u ukupnom volumenu 24-satnog urina, koeficijentu kreatinina, uree, proteina, albumina i izlučivanju kalija nakon HS prehrane u odnosu na LS (tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Biokemijska obilježja u 24h urinu nakon 7 dana LS i 7 dana HS prehrane u zdravih, mladih ispitanika.

Obilježje	LS	HS
<i>Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu</i>		
24h volumen urina (ml)	1573 (760)	1645 (740)
24h koeficijent kreatinina ($\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{kg}$)	153,5 (62,6)	157,0 (52,5)
urea u 24h urinu (mmol/dU)	234,3 (132,1)	238,5 (100,6)
proteini u 24h urinu (mg/dU)	91,5 [50,0-107,8]	81,0 [66,0 - 107,5]
albumini u 24h urinu (mg/dU)	5,3 [2,5-9,4]	5,6 [4,0-8,0]
natrij u 24h urinu (mmol/dU)	66,0 [46,0-114,8]	211,5 [162,5-336,0] *
kalij u 24h urinu (mmol/dU)	40,5 (17,1)	48,8 (23,3)
izračunati unos soli (g/day)	3,9 [2,7-6,7]	12,4 [9,5-19,6] *

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) (za normalnu distribuciju varijabli) ili kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

LS -engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta

* $P \leq 0,05$ LS vs. HS (t-test za zavisne uzorke, Wilcoxonov test sume rangova).

5.2. Koncentracije serumskih proupalnih i protuupalnih biljega te biljega aktivacije endotela

Proupalni citokini: koncentracija proteina u serumu IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A značajno se povećala, dok je koncentracija IL-6 i IL-23 ostala nepromijenjena nakon 7-dnevne HS prehrane u odnosu na LS (tablica 5.4.).

Protuupalni citokini: koncentracija proteina u serumu IL-10 i TGF- β 1 značajno se povećala, dok je koncentracija IL-21 i IL-22 ostala nepromijenjena nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS. 7-dnevna HS dijeta nije inducirala značajnu promjenu koncentracije proteina u serumu komponente komplementa C3a, topljivih staničnih adhezijskih molekula (sICAM-1, sVCAM-1 i E-selektin) i endoglina u usporedbi s LS dijetom (tablica 5.5.).

Tablica 5.4. Serumaska proteinska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina, C3a komponenta komplemента u odgovoru na 7-dnevnu visokoslana dijetu u mladih, zdravih pojedinaca

Obilježje (pg/mL)	LS	HS
N (Ž/M)	30 (15/15)	
<i>Proupalni citokini</i>		
IFN- γ	1,26 [0,76-1,58]	1,80 [1,31-4,85] *
TNF- α	7,55 (12,27)	14,49 (16,23) *
IL-6	2,24 [1,35-3,18]	2,82 [1,93-3,53]
IL-9	0,09 [0,05-0,23]	0,19 [0,11-3,49] *
IL-17A	1,52 [0,89-4,67]	2,02 [1,56-12,2] *
IL-23	0,05 (0,02)	0,05 (0,02)
<i>Protuupalni (imunomodulatorni)</i>		
IL-10	0,44 [0,27-0,66]	0,68 [0,44-3,60] *
IL-21	168,2 (210,5)	281,6 (296,8)
IL-22	1,39 [1,10-2,18]	1,88 [1,29-3,21]
TGF- β 1	36,6 (33,0)	49,7 (31,6) *
<i>C3a komponenta komplemента</i>	202,3 (159,4)	204,5 (178,0)

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) (za normalnu distribuciju varijabli) ili kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta; N- engl. number, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; IFN- γ - interferon gama; TNF- α - tumor nekrotizirajući faktor alfa; IL-6- interleukin 6; IL-9- interleukin 9; IL-17A- interleukin 17A; IL-23- interleukin 23; IL-10- interleukin 10; IL-21; interleukin 21; IL-22- interleukin 22; TGF- β 1- transformirajući čimbenik rasta beta.

* $P \leq 0,05$ LS vs. HS (t-test za zavisne uzorke, Wilcoxonov test sume rangova).

Tablica 5.5. Serumska koncentracija topljivih staničnih adhezijskih molekula i endoglina u odgovoru na 7-dnevnu visokoslana dijetu u mladih, zdravih pojedinaca

Obilježje (pg/mL)	LS	HS
N (Ž/M)	30 (15/15)	
<i>Topljive stanične adhezijske molekule</i>		
sICAM-1	1108 [444-1623]	968 [537-1558]
sVCAM-1	3342 [2195-4808]	3230 [2524-4024]
E-selektin	132,4 (47,5)	130,5 (39,3)
<i>Endoglin</i>	1753 [1118-2679]	1709 [1337-2599]

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) (za normalnu distribuciju varijabli) ili kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

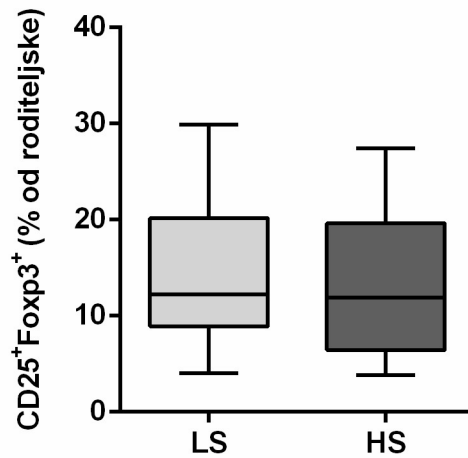
LS-eng. low salt, niskoslana dijeta; HS- eng. high-salt, visokoslana dijeta; N- eng. number, broj ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; sICAM-1- topljive intercelularne adhezijske molekule 1; sVCAM-1- topljive vaskularne stanične adhezijske molekule 1.

* $P \leq 0,05$ LS vs. HS (t-test za zavisne uzorke, Wilcoxonov test sume rangova).

5.3. Frekvencije T regulacijskih (Treg) i pomoćničkih T limfocita (Th17) te omjer Th17/Treg

7-dnevna HS prehrana rezultirala je nepromijenjenom učestalošću limfocita periferne krvi koji ekspimiraju CD25/FOXP3 (Treg) unutar subpopulacije CD4+ CD127+ (CD25+ FOXP3+ % od roditeljske populacije, LS $14,54 \pm 7,76$ u odnosu na HS $13,49 \pm 7,53$, $P = 0,288$) (slika 5.1.).

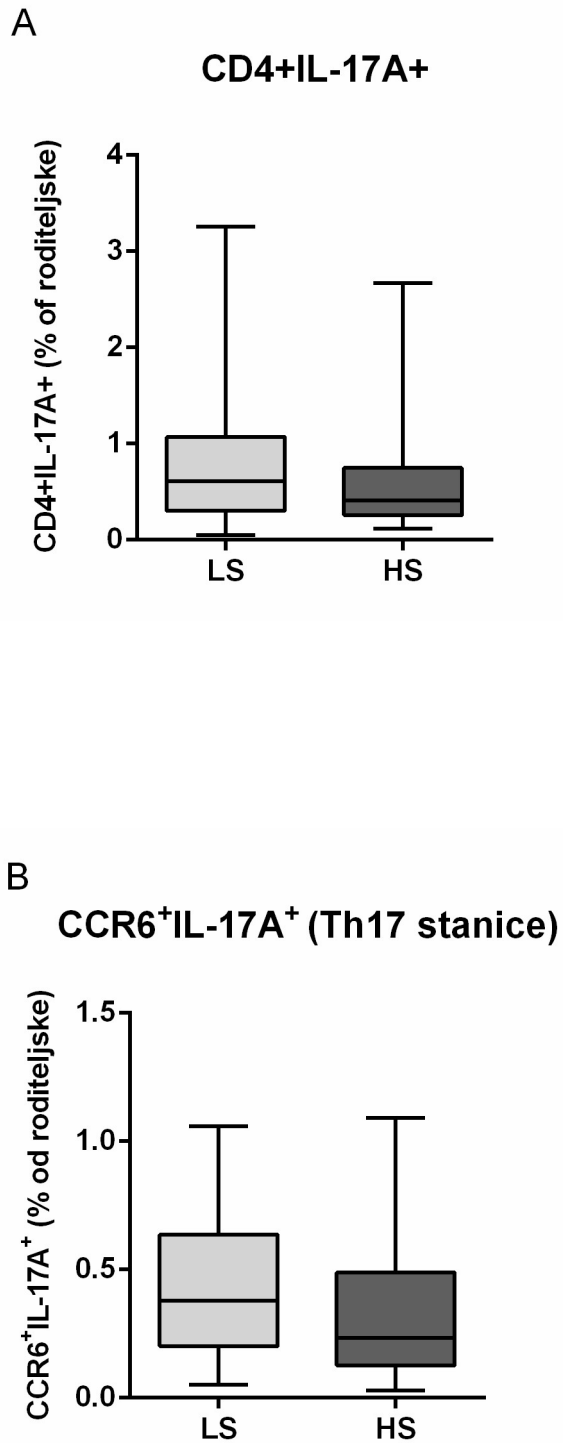
CD25⁺FOXP3⁺ (Treg stanice)



Slika 5.1. Učinci kratkotrajne prehrane s velikim udjelom soli na učestalost perifernih regulatornih T stanica (Treg) u zdravih mladih osoba.

Treg - T regulacijske stanice; LS - niskoslana dijeta; HS - visokoslana dijeta. Relativne frekvencije perifernih Treg stanica prikazane su kao dijagrami kutija i brkova min do max vrijednosti (engl. box-and-whisker plots); t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test sume rangova, LS naspram HS; $P \leq 0,05$ smatrano je značajnim.

Učestalost ukupnih perifernih T pomoćnih stanica koje luče IL-17 nije se značajno promijenila nakon 7-dnevne HS dijeta ($CD4^+ IL-17A^+$ % roditeljskog, LS $0,80 \pm 0,73$ naspram HS $0,59 \pm 0,53$, $P = 0,173$) (slika 5.2. A). Ove su stanice dodatno imunofenotipizirane i, na temelju njihove ekspresije CCR6, podijeljene na Th17 ($CCR6+IL-17^+$) i ne-Th17 ($CCR6-IL-17^+$) T pomoćničke stanice, pri čemu potonje uglavnom odgovaraju Th1 i TH2 stanicama koje luče IL-17. 7-dnevna HS prehrana nije inducirala značajnu promjenu u učestalosti Th17 stanica u usporedbi s uvjetima LS ishrane ($CCR^+ IL-17A^+$ % roditeljskog, LS $0,43 \pm 0,28$ vs HS $0,33 \pm 0,28$, $P = 0,256$) (slika 5.2. B). Iz ovih je rezultata vidljivo da je omjer Th17/Treg također ostao nepromijenjen nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS uvjetima u zdravih osoba otpornih na sol (Th17/Treg LS $0,039 \pm 0,036$ u odnosu na HS $0,031 \pm 0,030$, $P = 0,347$).



Slika 5.2. A i B. Učinci kratkotrajne prehrane s velikim udjelom soli na zastupljenost periferne Th17 populacije u zdravih mladih osoba.

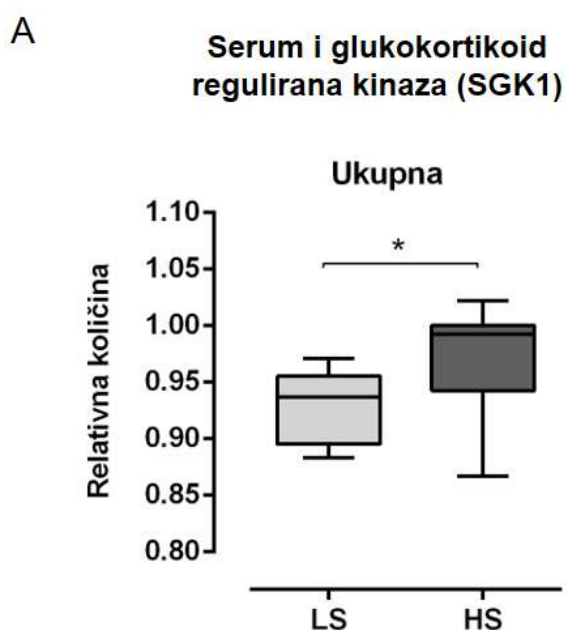
Relativne frekvencije perifernih T pomoćnih (CD3+CD4+) stanica koje luče ukupni IL-17 prikazane su na slici A, dok su relativne frekvencije CCR6+IL17+ T stanica koje odgovaraju

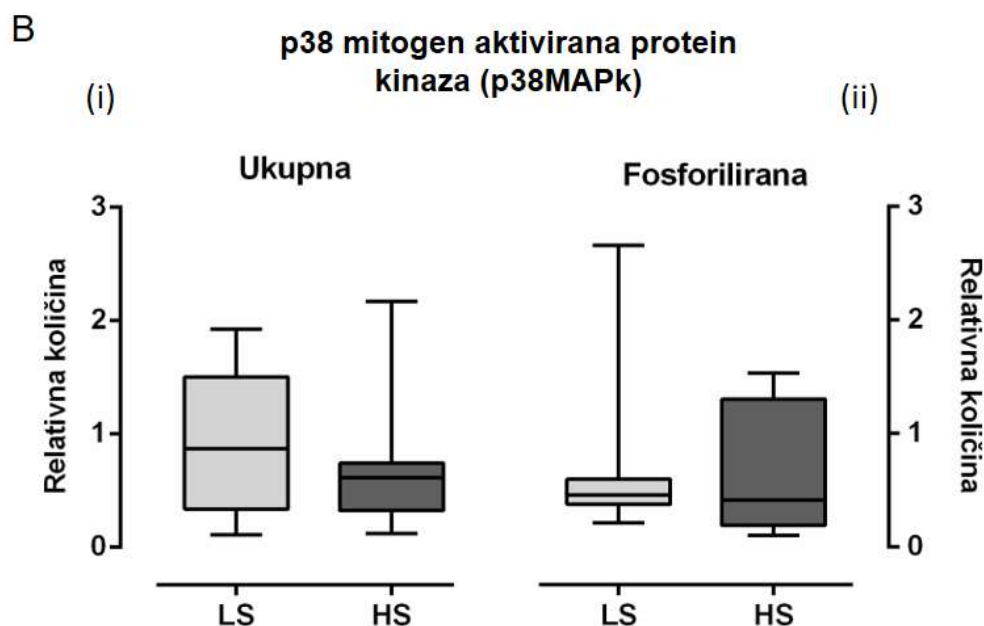
Th17 stanicama prikazane na slici B. Podaci su prikazani dijagrami kutija i brkova min do max vrijednosti (engl. box-and-whisker plots).

LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta. T-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test sume rangova, LS naspram HS; $P \leq 0,05$ smatralo se značajnim.

5.4. Relativna i fosforilirana serum i glukokortikoid regulirana kinaza (SGK1) i p38 mitogen aktivirana protein kinaza (p38MAPK)

Relativna količina ukupne SGK1 značajno se povećala (ukupna SGK1 LS $0,928 \pm 0,031$ u odnosu na HS $0,975 \pm 0,044$, $P < 0,001$), dok se relativna količina fosforilirane SGK1 značajno smanjila nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS (fosforilirana SGK1 LS $0,972 \pm 0,022$ vs HS $0,941 \pm 0,017$, $P < 0,001$), (slika 5.3. A). Relativna količina i ukupne (ukupna p38MAPK LS $0,887 \pm 0,611$ u odnosu na HS $0,660 \pm 0,549$, $P = 0,243$) i fosforilirane p38MAPK (fosforilirana p38MAPK LS $0,651 \pm 0,677$ u odnosu na HS $0,639 \pm 0,528$, $P = 0,947$) nije značajno promijenjen nakon 7-dnevne HS prehrane u usporedbi s LS uvjetima, (slika 5.3. B).





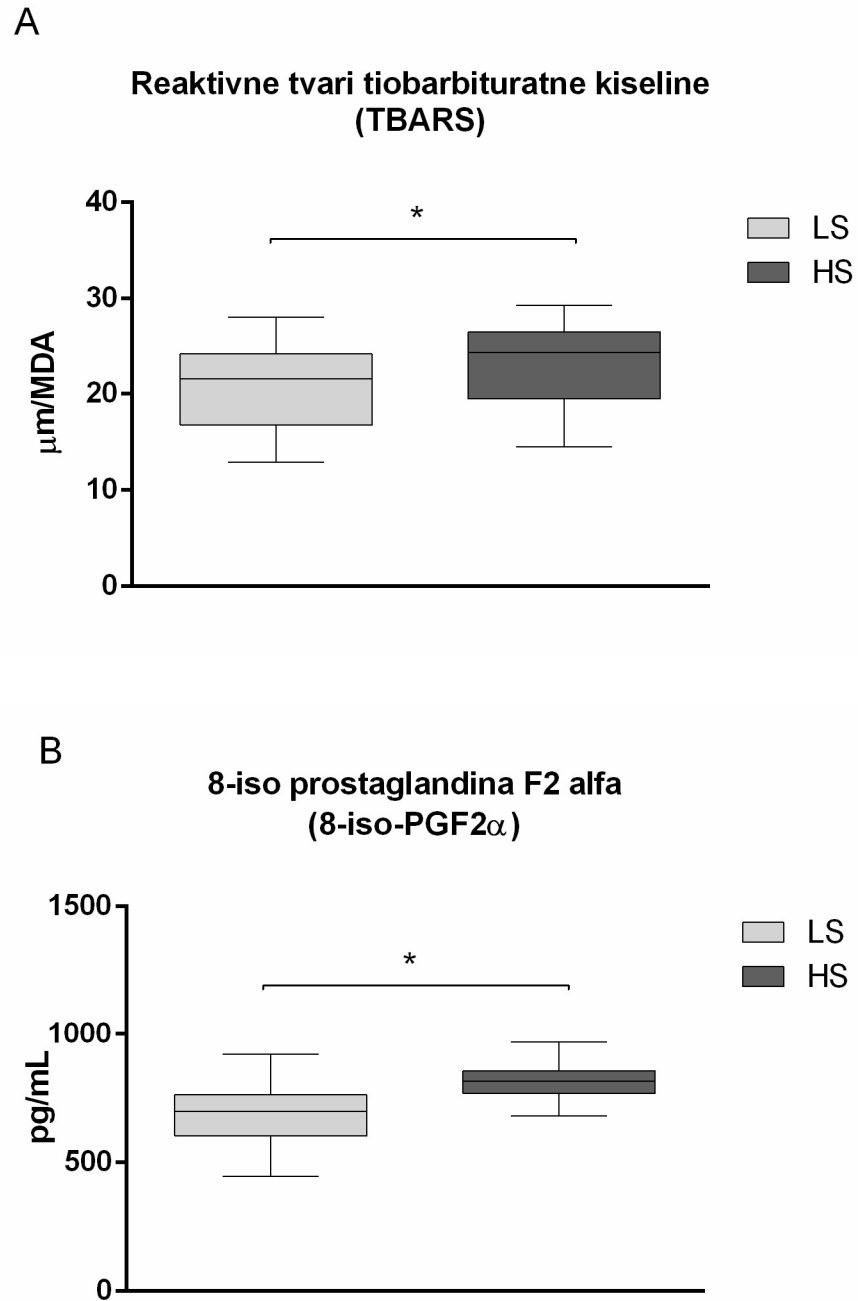
Slika 5.3. A i B. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na relativnu količinu ukupne serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) (A), te ukupnu (i) i fosforiliranu (ii) p38 mitogen-aktiviranu proteinsku kinazu (p38MAPK) (B) kod mladih, zdravih ispitanika.

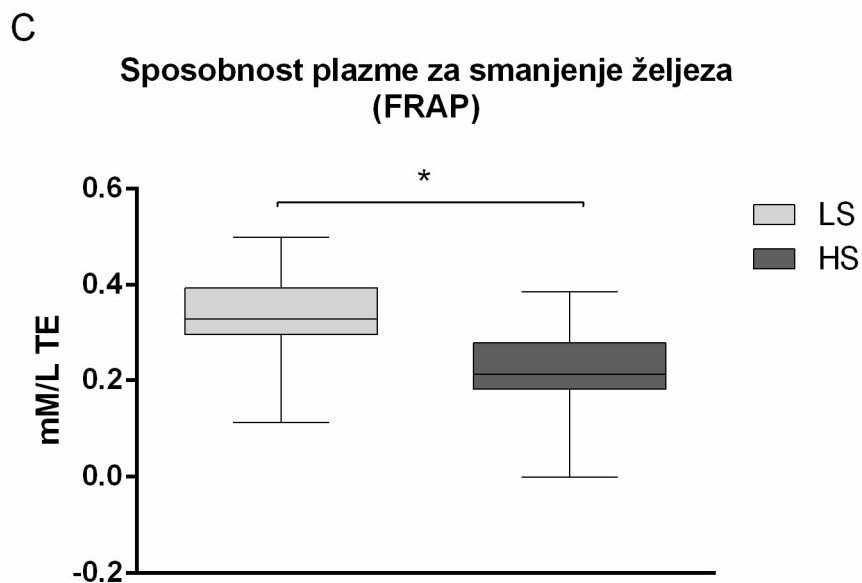
LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta. T-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test sume rangova, LS naspram HS. Podaci su prikazani dijagrami kutija i brkova min do max vrijednosti (engl. box-and-whisker plots). * $P \leq 0,05$ smatralo se značajnim.

5.5. Biljezi oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta

Sedmodnevna HS dijeta značajno je povećala razine TBARS (markera peroksidacije lipida) nakon HS prehrane u usporedbi s uvjetima LS prehrane (TBARS $\mu\text{M}/\text{MDA}$ LS $20,48 \pm 4,38$ vs. HS $22,83 \pm 4,53$; $P < 0,001$) (slika 5.4. A). Slično, koncentracije proteina 8-iso-PGF 2α (marker oksidativnog stresa) u serumu bile su značajno više nakon HS dijeta u usporedbi s uvjetima LS (8-iso-PGF 2α pg/mL LS $692,5 \pm 112,3$ vs. HS $813,7 \pm 78,7$; $P < 0,001$) (slika 5.4.

B). Sedmodnevna HS dijeta značajno je smanjila razine FRAP (marker antioksidativne obrane) (FRAP mM/; LS $0,33 \pm 0,09$ u odnosu na HS $0,22 \pm 0,09$; $P < 0,001$) nakon HS dijeta u usporedbi sa stanjem nakon LS dijeta. (slika 5.4.C).





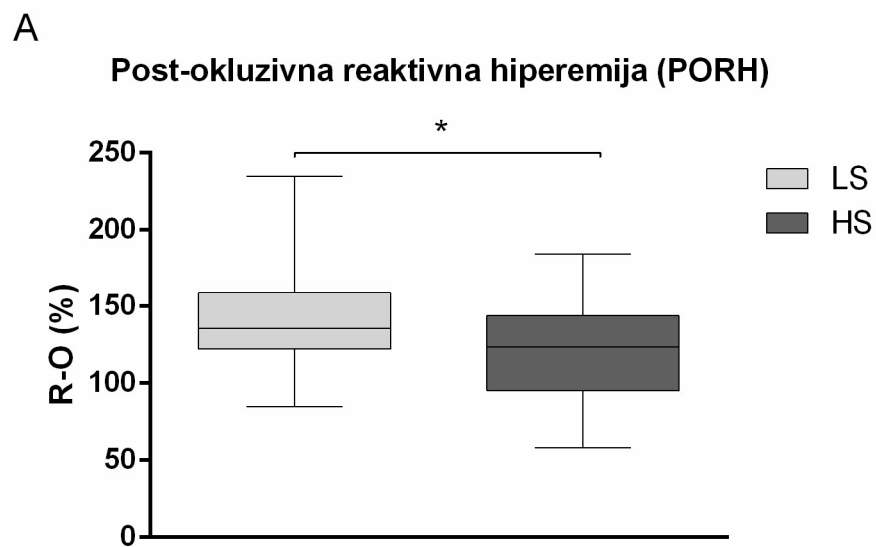
Slika 5.4. A, B i C. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na markere oksidativnog stresa i antioksidativnu obranu kod zdravih osoba.

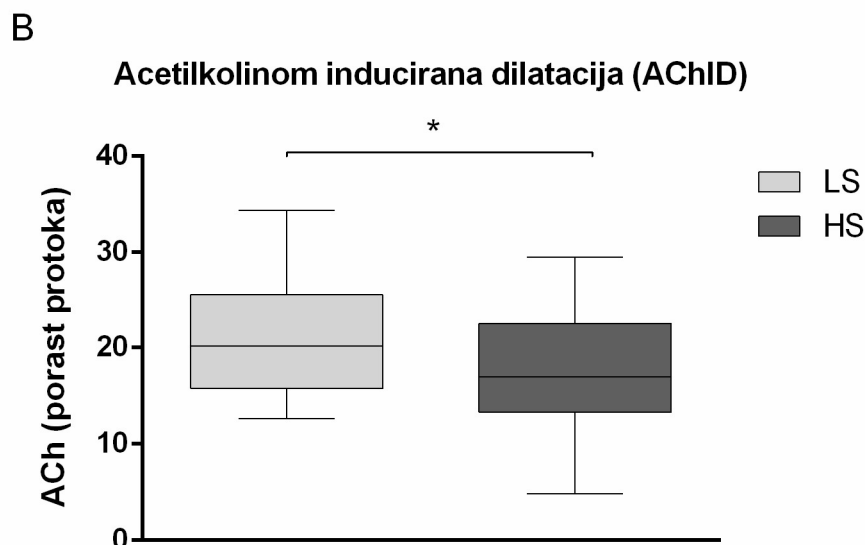
(A) TBARS (engl. thiobarbituric acid reactive substances), (B) 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α), (C) FRAP (engl. ferric reducing ability of plasma).

LS-engl. low salt, niskoslana dijeta; HS- engl. high-salt, visokoslana dijeta. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. * $P \leq 0,05$ razlika između LS prehrane i HS prehrane (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test sume rangova)). Podaci su prikazani dijagrami kutija i brkova min do max vrijednosti (engl. box-and-whisker plots).

5.6. O endotelu ovisna mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i iontoforezu acetilkolina (acetilkolinom inducirana dilatacija, AChID)

U usporedbi sa LS dijetom, 7-dnevna HS dijeta značajno je smanjila i PORH (PORH R-O % LS $143,6 \pm 35,3$ naspram HS $123,4 \pm 33,4$; $P = 0,003$) (slika 5.5. A) i dilataciju izazvanu ACh (AChID) (povećanje protoka AChID-a u uvjetima LS $21,5 \pm 6,2$ naspram HS uvjeta $17,6 \pm 6,4$; $P < 0,001$) (slika 5.5.B) u mikrocirkulaciji kože podlaktice.





Slika 5.5. A i B. Učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli (HS) na mikrovaskularnu reaktivnost kože kod mladih zdravih osoba.

(A) Postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH) i (B) Dilatacija izazvana acetilkolinom (AChID). Mjerenje PORH-a izražava se kao razlika između postotka promjene veličine protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O %). AChID se izražava kao povećanje protoka nakon primjene ACh u usporedbi s niskim početnim vrijednostima. Podaci su prikazani kao prosjek \pm SD. LS - nisko slana dijeta; HS - visokoslana dijeta; R-O % - promjena mikrovaskularnog protoka krvi između reperfuzije i okluzije (u odnosu na početnu vrijednost); AChID - acetilkolinom inducirana dilatacija; * $P \leq 0,05$, LS dijeta naspram HS dijeta (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test sume rangova). Podaci su prikazani dijagrami kutija i brkova min do max vrijednosti (engl. box-and-whisker plots).

5.7. Povezanost između količine dnevnog unosa soli te biljega upalnog odgovora i aktivacije endotela

Postojala je umjerena pozitivna korelacija između 24-satne natrijуреze urina i IFN- γ (Spearman $r = 0,393$, $P = 0,047$), te između 24-satne natrijуреze urina i IL-9 (Spearman $r = 0,445$, $P = 0,023$). Relativna količina fosforilirane p38MAPK snažno je pozitivno korelirala s relativnom količinom ukupne p38MAPK (Spearman $r = 0,682$, $P < 0,001$). Postojala je jaka/umjerena pozitivna korelacija između relativne količine fosforilirane p38MAPK i

sVCAM-1 (Spearman $r = 0,621$, $P = 0,003$), te razine endoglina (Spearman $r = 0,456$, $P = 0,043$). Postojala je umjerena pozitivna korelacija između učestalosti Th17 stanica i razine IL-23 (Spearman $r = 0,422$, $P = 0,032$).

5.8. Povezanost između biljega upalnog odgovora i aktivacije endotela sa promjenom mikrovaskularne reaktivnosti i biljezima oksidativnog stresa ovisno o količini unosa soli u organizam

Postojala je umjerena pozitivna korelacija između PORH-a i IL-10 (Spearman $r = 0,397$, $P = 0,044$). AChID je umjereno negativno korelirao samo sa 24-satnom natrijuzom (Spearman $r = -0,304$, $P = 0,043$). Postojala je umjerena / snažna negativna korelacija između TBARS-a i frekvencije Treg stanica (Spearman $r = -0,424$, $P = 0,008$). FRAP je snažno negativno korelirao samo sa 24-satnom natrijuzom (Spearman $r = -0,558$, $P < 0,001$).

6. RASPRAVA

Ovim radom je pokazano da 7-dnevna HS prehrana u zdravih osoba neosjetljivih na sol potiče proupalni odgovor karakteriziran povećanjem serumskih razina IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A, ali da također dovodi do porasta razine protuupalnih faktora IL-10 i TGF- β 1. Povećanje razine IL-17A u serumu (i trend povećanja razine IL-21 i IL-22), te povećanje relativne količine totalne SGK1 u PBMC-ima, podupiru hipotezu o početnoj aktivaciji Th17 stanica kao odgovor na HS dijetu. Zanimljivo je da HS dijeta izaziva i popratni protuupalni odgovor potencijalno posredovan aktivacijom Treg stanica, karakteriziran povećanjem koncentracije IL-10 i TGF- β u serumu.

Također, potvrđena je ranija spoznaja o povećanju oksidativnog stresa i smanjenju antioksidativnog kapaciteta, kao i o oslabljenoj o endotelu ovisnoj dilataciji u mikrocirkulaciji uslijed HS dijeta u zdravih pojedinaca. Novina su rezultati koji ukazuju na pozitivnu povezanost između odgovora mikrocirkulacije na vaskularnu okluziju (PORH) i razine protuupalnog citokina IL-10, kao i oni koji su pokazali da promjena razine oksidativnog stresa (uslijed velikog unosa kuhinjske soli u organizam) može utjecati na imunološke regulacijske mehanizme i to potencijalno putem učinka na Treg stanice.

6.1. Utjecaj soli na ranu upalu

Studije na eksperimentalnim životinjskim modelima dosljedno pokazuju da unos HS stimulira proizvodnju nekoliko citokina za koje je poznato da potiču upalu i oštećenje organa. Međutim, podaci iz kliničkih studija na zdravim dobrovoljcima su oskudni. Rezultati istraživanja iz ove disertacije pokazuju povećanje proupalnih citokina (IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A) i ukupne razine SGK1 nakon HS prehrane, što je slično prethodno opisanim zaključcima kod životinja. Na primjer, HS prehrana izazvala je povećanje razine IL-6 u bubrezima Dahl štakora osjetljivih na sol, što je bilo povezano s razvojem visokog tlaka i oštećenjem organa (136). HS dijeta i hiperosmolarnost povećali su proizvodnju TNF- α u makrofagima miša, a povećali su izražaj mRNA za IL-6 i SGK1 u nefrektomiranih štakora (86). Miševi hranjeni HS dijetom imali su značajno veći IFN- γ u usporedbi s miševima hranjenim normalno slanom hranom (108). Naši rezultati pokazuju da je, osim što je HS dijeta značajno povećala razinu proupalnih citokina u serumu (TNF- α , IFN- γ , IL-9 i IL-17A), postojala i umjerena pozitivna korelacija između unosa

soli i IFN- γ , kao i između unosa soli i razine IL-9, što ukazuje na povezanost između visokog unosa soli i aktivacije proupalnog odgovora.

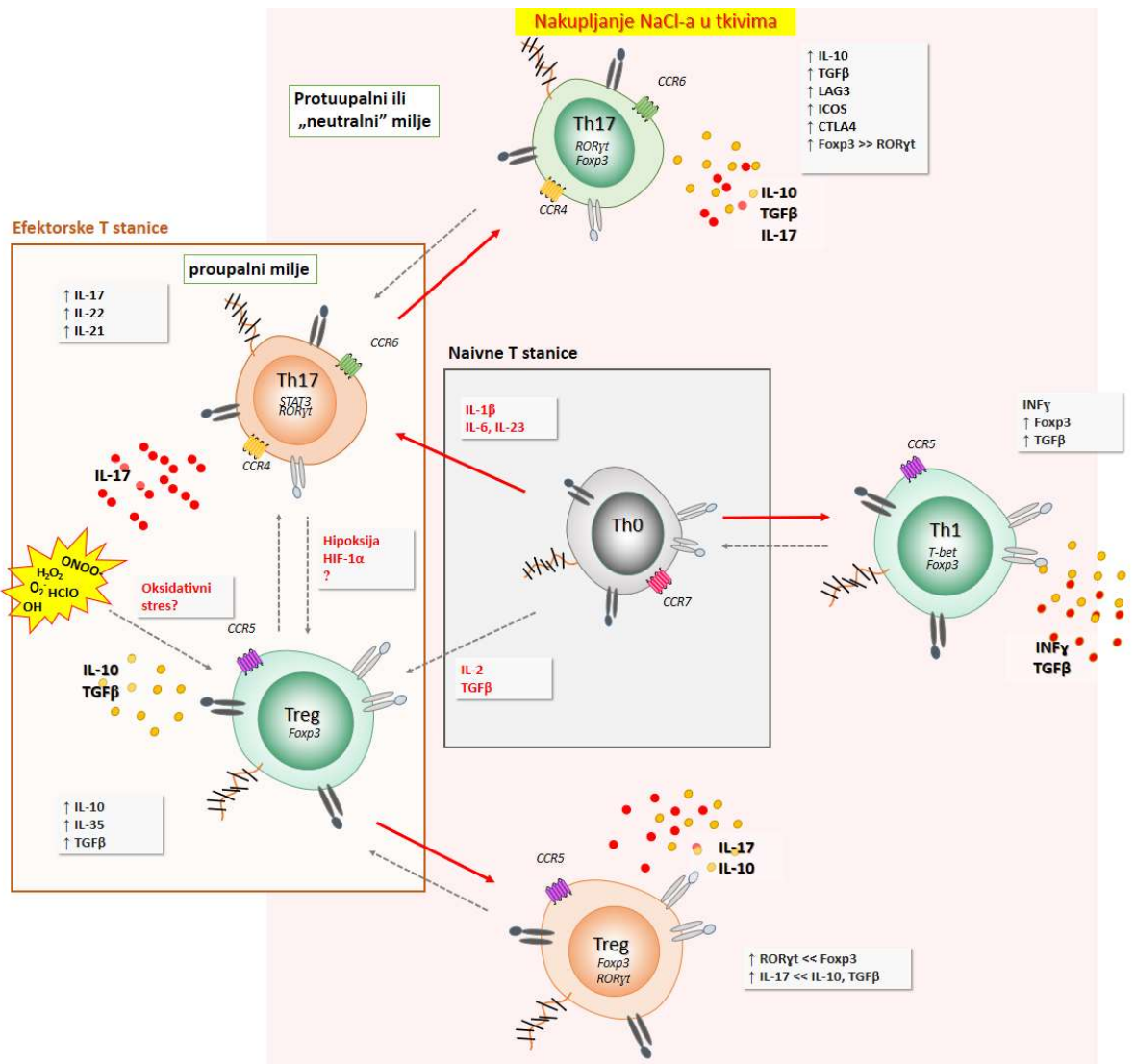
Zanimljivo je da su KV bolesti, uključujući hipertenziju, nedavno okarakterizirane neravnotežom između Th17 i Treg stanica (120). Štoviše, prekomjerman unos/izloženost soli pokazao se kao novi i snažan pokretač diferencijacije Th17 stanica i autoimunosti (87,137,138). Posebno važan citokin u razvoju KV bolesti je IL-17A, koji uglavnom proizvode Th17 stanice. Pokazalo se da IL-23 stabilizira i pojačava fenotip Th17 povećanjem ekspresije IL-23 receptora (IL-23R) što rezultira patogenošću Th17 stanica, ali također potiskuje razvoj Treg stanica (84,109,139). S druge strane, Treg stanice (FOXP3+), s TGF- β kao kritičnim regulatorom njegovog razvoja i funkcije, i njihovim ključnim produktom protuupalnim citokinom IL-10, uključene su u imunološku toleranciju i homeostazu (140,141). U ovoj studiji, 7-dnevna HS dijeta rezultirala je povećanom razinom IL-17A što ukazuje na aktivaciju Th17 stanica, kao i umjerenom pozitivnom korelacijom između razine IL-23 u serumu i učestalosti Th17 stanica, potvrđujući tako osovinu IL-23/Th17 stanice kao dio puta aktivacije Th17 stanica. Zanimljivo je da se TGF- β značajno povećao s HS dijetom u ovoj studiji, što sugerira da bi mogao biti ključni igrač u istovremenoj aktivaciji protuupalnog kraka aktivacije Th17/Treg u odgovoru na HS dijetu.

Daljnja podrška ovoj hipotezi je nalaz značajno povećane razine SGK1 nakon HS dijete. SGK1 je kritičan čimbenik koji recipročno regulira razvoj Th17/Treg ravnoteže (109). SGK1 je važan u diferencijaciji Th17 stanica reguliranjem ekspresije IL-23R (84), ali je također SGK1 negativan regulator razvoja i funkcije Treg (npr. gubitak SGK1 u Treg stanicama rezultira njihovom povećanom supresornom funkcijom) (109). Ekspresiju SGK1 kontroliraju različiti podražaji uključujući citokine, hipotonični medij i glukokortikoidi koji također induciraju ekspresiju SGK1 putem p38MAPK-ovisnog puta (142). Dokazano je da stanice sisavaca mogu osjetiti hiperosmotski stres putem p38MAPK puta i da potom "nizvodna" kaskada aktivira NFAT5 i SGK1 (101,143); štoviše, prekomjerna aktivnost SGK1 stimulirana unosom soli renalnim zadržavanjem NaCl može dovesti do razvoja i progresije arterijske hipertenzije (144). Također, oksidativni stres se pokazao kao najsnažniji specifični stres koji aktivira p38MAPK (145). Dobro je poznato da HS dijeta značajno povećava vaskularni oksidativni stres (27). Ako sagledamo sve skupa, sadašnji rezultati podupiru važnu ulogu SGK1 u regulaciji imunoloških odgovora uslijed opterećenja HS.

Iako rezultati studija na pokusnim životinjama upućuju na neravnotežu Th17/Treg funkcije uzrokovanu povećanim unosom soli u upali i konačnom oštećenju organa (84,108,146), postoji ograničen broj kliničkih studija koje istražuju ovaj problem. Na primjer, Th17 generacija inducirana HS prehranom povećala je ozbiljnost eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa što ukazuje na potencijalnu kliničku važnost unosa soli u autoimunoj bolesti povezanoj s Th17 (99). Naši rezultati podupiru proupalni odgovor zbog 7-dnevnog opterećenja HS-a karakteriziran povećanjem razine proupalnih citokina i umjerenom pozitivnom korelacijom između njih i unosa soli, vjerojatno zbog aktivacije Th17 stanica. Iako se učestalost Th17 stanica nije značajno promijenila nakon HS dijeta, značajno povećanje razine IL-17A u serumu i ukupnog SGK1 u PBMC-ima ukazuje na aktivaciju Th17 stanica. Nedavno objavljena pilot studija pokazala je da 14-dnevna HS prehrana značajno povećava i noćni sistolički i dijastolički tlak i učestalost Th17 stanica u PBMC-ima zdravih muškaraca dobrovoljaca (119). S druge strane, presječna studija iz 2018. godine pokazala je da stupanj unosa soli ($LS \leq 5$ g soli/dan naspram $HS \geq 5$ g soli/dan) nije značajno povezan s razinom i funkcijom najmanje dvije podskupine Treg stanica i udjelom Th17 limfocita u PBMC-ima zdravih ispitanika (147), što je slično našim rezultatima. Luo i sur. promatrali su udio Th17, Treg i njihov omjer tijekom normalnog unosa soli, HS dijeta i potom LS dijeta u zdravih pojedinaca te se zamijetili progresivne promjene Th17 i Treg stanica karakterizirane značajnim porastom Th17/Treg omjera tijekom HS dijeta i smanjenje istog omjera tijekom LS dijeta (120). Važno je napomenuti dinamiku ovih rezultata, broj Treg stanica se u početku povećao, ali se zatim smanjio tijekom HS prehrane, što ukazuje na vremenski čimbenik u procesu orkestracije imunološkog odgovora potaknutog HS dijetom (120). U našoj studiji, ispitanici su imali obrnuti redoslijed dijeta – LS dijetu pratila je HS dijeta, ali rezultati su prilično konzistentni s Luo-ovim rezultatima – frekvencija Treg stanica u ovoj studiji pokazala je opadajući trend (iako nije statistički značajan) tijekom HS prehrane. Trenutačno, objašnjenje za ovu dinamiku još ne postoji.

Iako HS dijeta izaziva proupalni odgovor, postoje novi dokazi koji upućuju na to da HS dijeta (kratkotrajna i kod ispitanika neosjetljivih na sol) može imati suprotne učinke. Kao što je napomenuto u uvodu, s jedne strane, izlaganje kultura T stanica uvjetima s velikim udjelom NaCl snažno je povećalo ekspresiju IL-17A i IL-22 u memorijskim T stanicama (što su poznati "potpisi" Th17 stanica), ali je iznenađujuće da se također povećao izražaj FOXP3 (eng. forkhead box P3), IL-10 i TGF- β te se smanjila koekspresija IFN- γ , što ukazuje i na protuupalni

fenotip Th17 stanica (105). Ova studija Matthias i suradnika navodi da su promjene u Th17 stanicama u uvjetima s velikim udjelom NaCl posredovane putem p38MAPK koji uključuje SGK1, te da je visoka razina NaCl pojačala ekspresiju IL-17A također u Treg stanicama što bi moglo poništiti ukupnu protuupalnu funkciju Treg stanica (105). Pri tome je NaCl imao protuupalne učinke ovisne o dozi na Th17 stanice, dok je povećana proizvodnja IL-17A dosegla plato samo malim povećanjem izvanstaničnog NaCl. Također je primjećeno smanjenje proinflammatorne koekspresije IFN- γ u klonovima T stanica koje proizvode IL-17A. Kasnijim restimulacijama Th17 stanica u niskoslanom mediju zabilježeno je da protuupalni učinak NaCl na fenotip Th17 stanica (mjereno povećanom ekspresijom FOXP3) traje dugoročno, čak i nakon ponovnog ulaska u mikrookruženje s niskim sadržajem NaCl, poput krvi. Diferencijacija humanih Th17 stanica zahtijeva prisutnost nekoliko polarizirajućih citokina, uključujući IL-6 i IL-1 β , za koje je prethodno pokazano da upućuju na patogenost T stanica (148). Stoga su, Matthias i suradnici s druge strane, testirali učinak visokih koncentracija NaCl na efektorske Th17 stanice u prisutnosti pojedinačnih proupalnih citokina, kao i njihovih kombinacija. IL-6 i IL-1 β potisnuli su ekspresiju FOXP3, izostala je NaCl-inducirana pojačana proizvodnja IL-17A, a potisnuto je i autokrino lučenje TGF- β . Dakle, poništen je NaCl-inducirani protuupalni odgovor i došlo je do indukcije proupalnog fenotipa Th17 stanica (105). Time je dokazano da je NaCl odgovoran i za promicanje patogenosti na mišjim i ljudskim Th17 stanicama, ako se stimulacija T stanica dogodila u proinflammatornom i TGF- β -niskom okruženju (105). Uzimajući sve u obzir, ovi rezultati su po prvi put otkrili kontekstualnu dihotomnu ulogu HS u oblikovanju patogenosti Th17 stanica i ukazali na dominantnu ulogu proupalnih citokina u odnosu na potencijalne protuupalne učinke koje NaCl izravno vrši na efektorske T stanice (105) što se također može reflektirati i rezultatima naše studije. Dakle, sve bi to potencijalno moglo objasniti barem dio rezultata dobivenih u ovoj studiji; tj. pored očekivanog odgovora posredovanog proupalnim Th17 stanicama i povećanja razine proupalnih citokina zbog unosa HS, postoji i HS-induciran protuupalni učinak koji uključuje mehanizme (protuupalne TH17 stanice ili neke druge) koje tek treba istražiti i razjasniti u daljnjim kliničkim studijama (slika 6.1.).



Slika 6.1. Dihotomna, kontekst ovisna sudbina T pomoćničkih stanica kada su izložene visokoslanim uvjetima.

Naivne stanice izložene hiperosmotskom i proupalnom okruženju pod utjecajem Th17 polarizirajućih citokina dobivaju pojačanu funkciju Th17. Ovaj učinak je također opažen među ostalim subpopulacijama T pomoćničkih stanica (tj. Th1 subpopulacija). Zanimljivo je da ako Th17 stanice nemaju proupalni milje tijekom aktivacije u okruženju s velikim sadržajem NaCl (i ponovne aktivacije na području pokrenutih imunoloških odgovora protiv određenih patogena ili (auto)antigena) one stječu protuupalni fenotip i funkciju koju karakteriziraju pojačana ekspresija IL-10, TGFβ, FOXP3, CTLA-4, ICOS i LAG3.

NaCl- natrijev klorid; IL-1β - interleukin 1 beta; IL- 2- interleukin 2; IL-6- interleukin 6; IL-10- interleukin 10, IL-17 - interleukin 17, IL-21 - interleukin 21, IL-22 - interleukin 22, IL-23

-interleukin 23; IL-35 - interleukin 35; TGF β - transformirajući faktor rasta beta, LAG 3 - protein aktivacije limfocita 3, ICOS- inducibilni T stanični kostimulator, CTLA4- citotoksični T limfocit vezani antigen 4, FOXP3- transkripcijski čimbenik FOXP3 (engl. forkhead box p3), ROR γ T- transkripcijski čimbenik ROR γ T (engl. retinoic acid-related orphan receptor (ROR)- γ t), HIF-1 α - hipoksijom inducirani faktor 1 alfa, Th17 - T pomoćničke stanice, STAT 3 - pretvarač signala i aktivator transkripcije 3, Treg - T regulacijski limfociti; ONOO $^-$ - perokisnitrit; H₂O₂ - vodikov peroksid; O₂ - kisk; HClO - hipoklorna kiselina, OH - hidroksil, Th0 - naivni T limfocit; Th1 - T pomoćnički limfocit 1; T bet - faktor transkripcije u T box-u; IFN - γ - interferon gama; CCR4 - kemokinski receptor tip 4; CCR5 kemokinski receptor tip 5; CCR6 - kemokinski receptor tip 6; CCR7 - kemokinski receptor tip 7.

(izvor slike: autorica izradila sama uz superviziju komentorice izv. prof. dr. sc. Martine Mihalj).

Osim toga, u uvodu ove disertacije je spomenuta i druga studija koja je bacila novo svjetlo na aktivaciju patogenih stanica Th17 i indukciju hipertenzije, ovaj puta nakon velikog unosa fruktoze. Lee i suradnici su na temelju svojih rezultata zaključili da su imunološki mehanizmi povezani s regulacijom krvnog tlaka prilično različiti između štakora osjetljivih na sol (salt sensitive SS) i otpornih na sol (salt resistant SR). Tako se kod SS štakora dogodio patogeni odgovor nakon visokog unosa fruktoze, dok su SR štakori pokazali zaštitni odgovor. Što se dogodilo? Unos visokog udjela fruktoze povećao je razinu serumskog IL-17A i populaciju stanica Th17 samo u SS štakora (ali ne i SR štakora) (107), potom pojačanu ekspresiju mRNA i proteina ukupne i fosforilirane razine SGK1 također samo u SS štakora (ne u SR štakora) na isti način kao i unos HS-a, iako su osnovne (prije opterećenja fruktozom) serumske razine IL-10 i populacija T reg stanica bile veće u SR u usporedbi sa SS štakorima (107). Prema tome, veliki unos fruktoze (djelujući kroz slične mehanizme kao i unos velike količine soli) različito utječe na štakore SS i SR, na način da kod štakora SS inducira hipertenziju povećanjem stanica Th17 koje luče proupalni citokin IL-17A i aktivira os IL-23R-SGK1, ali čini se da su SR štakori zaštićeni proizvodnjom velike količine protuupalnog citokina IL-10, koji luče Treg stanice (107). Zanimljivo, smatramo da su ti rezultati vrlo konzistentni s rezultatima naše studije, što sugerira da bi se aktivacija protuupalnih odgovora posredovanih Treg stanicama (koji su označeni značajnim porastom IL-10 nakon HS dijete) uslijed kratkotrajnog unosa HS-a mogla

suprotstaviti proupalnoj funkciji Th17 i djelovati kao zaštitni mehanizam od povećanja krvnog tlaka i aktivacije endotela kod zdravih osoba neosjetljivih na sol, barem do određene točke.

6.2. Utjecaj soli na aktivaciju endotela

Stanične adhezijske molekule, kao što je ICAM-1-endotelni ligand za antigen 1 povezan s funkcijom leukocita (LFA-1 ili α L β 2, integrin), VCAM-1-endotelni ligand za vrlo kasni antigen 4 (VLA-4 ili α 4 β 1) i E-selektin, kao i endoglin (koji je endotelni ko-receptor za nekoliko liganada iz obitelji transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β)) pokazali su se kao važni markeri endotelne aktivacije koja prethodi adheziji aktiviranih leukocita i iniciranju aterosklerotskih lezija (112,113,117). Dostupni podaci o učinku HS prehrane na markere endotelne aktivacije su ograničeni, osobito u zdravih osoba. Na primjer, razine sE-selektina u plazmi, ali ne i sICAM-1 i sVCAM-1, povećale su se s 2 tjedna HS dijeta kod pacijenata osjetljivih na sol (118). Nadalje, Tadžić i sur. izvijestili su da kod hipertenzije postoji visoka koncentracija sICAM-1 i sVCAM-1, s niskim razinama sE-selektina, kao markera aktivacije endotelnih stanica. Ranije istraživanje naše istraživačke grupe pokazalo je da iako je mikrovaskularna reaktivnost kao odgovor na vaskularnu okluziju bila oslabljena nakon 7-dnevne HS dijeta, HS dijeta nije utjecala na koncentracije sCAM-a u serumu (sICAM-1, sVCAM-1 i E-selektin) kod mladih zdravih žena (7). Iako se serumske razine sCAM-a i endoglina nisu promijenile s HS dijetom u našim rezultatima iznesenim u ovoj disertaciji, TGF- β (ligand za endoglin) je povećan i postojala je jaka/umjerena pozitivna korelacija između relativne količine fosforilirane p38MAPK i razine endoglina, što je također ranije opisano u hipoksiji koja inducira ekspresiju endoglina aktivacijom p38MAPK u mikrovaskularnim endotelnim stanicama mozga miša (149), a što ukazuje na važnu ulogu p38MAPK i njezine osi (koja uključuje SGK1) u procesu aktivacije endotela (npr. endoglina) kao odgovoru na različite stresne podražaje (hipoksija, opterećenje velikim udjelom soli). Naši rezultati su dodatno potkrijepljeni činjenicom da TGF- β inducira diferencijaciju CD4⁺ T-stanica u Th17 stanice i T-regulatorne stanice, kontrolirajući tako imunološki sustav (150). Ipak, leži li u pozadini dobivenih rezultata trajanje HS opterećenja, količina uzete soli, zdravstveno stanje, dob, status rezistencije na sol ili aktivacija zaštitnog protuupalnog odgovora pored upale niskog stupnja nakon HS opterećenja kod zdravih osoba, ostaje da se razjasni.

6.3. Povećani oksidativni stres kod velikog unosa soli i rane upale

ROS je povezan s pojačanim odgovorom, apoptozom i aktivacijom T stanica (151,152). Podrijetlo unutarstaničnog ROS-a u limfocitima dolazi iz najmanje dva izvora - egzogeni ROS proizveden iz dendritičnih stanica i fagocita te intracelularno proizveden ROS tijekom različitih staničnih procesa, uključujući i T staničnim receptorima posredovana aktivacija T stanica. Dok egzogeni ROS može dovesti do nastanka oksidativnog stresa, endogeno proizvedeni ROS prvenstveno djeluju kao signalne molekule koje promoviraju ili aktivaciju ili apoptozu T stanica (151). U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između ROS-a i antioksidansa, a ometanje te ravnoteže može dovesti do pojačanog ili oslabljenog odgovora T-stanica što dovodi do razvoja raznih patoloških pojava. Oksidativna oštećenja se pojavljuju kada unutarstanična razina ROS-a premaši antioksidativni kapacitet stanica. Da kratkoročno opterećenje HS-om u pokusnih životinja može pridonijeti povećanju ROS-a (npr. razina $O_2\cdot^-$) ometajući aktivnost antioksidativnog obrambenog mehanizma (smanjenje ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima), ili zajedno s istovremenim povećanjem aktivnosti prooksidativnih enzima ukazala je i skupina autora u našem laboratoriju ispitujući učinke visokoslane dijeta kod štakora na protoke u srednjim cerebralnim arterijama *in vitro* (19). Povećani oksidativni stres je uzrok poremećene vaskularne reaktivnosti u HS prehrani, uglavnom dovodeći do smanjenja biorasploživosti NO i djelomično utječući na proizvodnju vazoaktivnih metabolita arahidonske kiseline (76,153–155).

Ranije studije i na životinjama i na ljudima (zdravi i kardiovaskularni bolesnici) opetovano su pokazivale središnju ulogu povećane razine oksidativnog stresa u patofiziološkom mehanizmu uslijed unosa HS koji rezultira poremećenom funkcijom endotela (64,155). To potvrđuju rezultati eksperimenata koji su izravno mjerili biomarkere razine oksidativnog stresa i antioksidativne obrane (npr. proizvodnja $O_2\cdot^-$, antioksidativni enzimi, TBARS, FRAP, 8-iso-PGF 2α , unutarstanični oksidativni stres itd.) nakon HS prehrane, kao i studije koje su dale funkcionalne dokaze. To su eksperimenti koji su pokazali da povećanje antioksidativnog kapaciteta tijekom punjenja HS (npr. suplementacija antioksidativnim vitaminima C i E) sprječava razvoj endotelne disfunkcije uzrokovane unosom HS (27). Ova studija je potvrdila da 7-dnevno HS opterećenje rezultira povećanom peroksidacijom lipida i posljedičnom proizvodnjom 8-iso-PGF 2α izoprostana (proizvoda neenzimske ROS-inducirane peroksidacije arahidonske kiseline), kao i smanjenom antioksidativnom obranom (smanjenje FRAP te, negativna korelacija FRAP i 24h natrijureze potvrđuje slabljenje antioksidativnog kapaciteta

pod utjecajem visokoslane dijete) kod zdravih osoba. Nadalje, u ovoj studiji smo ustanovili umjerenu/snažnu negativnu korelaciju između TBARS kao markera oksidativnog stresa i Treg stanica koje svojom aktivacijom stvaraju protuupalni citokin IL-10. Od ranije je poznato da oksidativni stres može utjecati na smanjivanje produkcije protuupalnih citokina poput IL-10, što pogoduje razvoju upalnih procesa (156). Štoviše, pojačana produkcija ROS, inducirana različitim stimulusima, je usko povezana s opsegom upale (157). Također, slobodni radikali stimuliraju metaboličke puteve koji vode do aktivacije transkripcijskog faktora $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) koji potom povećava ekspresiju proupalnih citokina (158).

Dakle novost koju su iznjedrili rezultati ove disertacije je i postojanje negativne povezanosti između peroksidacije lipida i frekvencije perifernih Treg stanica nakon HS prehrane, što sugerira da promjene u oksidativnoj ravnoteži nakon HS prehrane mogu promijeniti imunološke regulacijske mehanizme, vjerojatno one posredovane Treg stanicama.

6.4. Oštećena o endotelu ovisna mikrovaskularna reaktivnost kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i iontoforezu acetilkolina (acetilkolinom inducirana dilatacija, AChID) kod velikog unosa soli

Na tragu studije Barić i suradnika (27) na koju su već referirani naši podaci, a koja je također ukazala i da je HS dijetom oslabljena endotel ovisna (PORH i AChID) mikrovaskularna vazodilatacija u koži podlaktice zdravih osoba također povezana s povećanim oksidativnim stresom i smanjenim kapacitetom antioksidativne obrane, neovisno o promjeni krvnog tlaka, možemo promatrati i rezultate ove studije.

Osim važnosti oštećenja provodnosti žila u etiopatogenezi kardiovaskularnih bolesti (59,159–162), oštećenje mikrovaskularne funkcije također može dovesti do oštećenja krajnjih organa i zatajenja kardiovaskularnog sustava (kao što je neliječena maligna hipertenzija, moždani udar i sepsa) (163). Prethodni rezultati su pokazali da vazokonstriktorni metaboliti enzima ciklooksigenaze (COX), posebno COX-1, imaju značajnu ulogu u razvoju poremećene mikrovaskularne reaktivnosti kao odgovora na vaskularnu okluziju u zdravih osoba na HS dijeti (7). Nadalje, također je ukazano da vazodilatacija arteriola izoliranih iz glutealne potkožne masti kao odgovor na ACh i dilatacija izazvana protokom (in vitro) nakon 7-dnevne HS dijete

više nisu ovisni o NO, ali da su vazodilatatorni medijatori COX i citokroma P450 sudjelovali u ovoj vazodilataciji (59).

Rezultati ove studije su pokazali da periferna mikrovaskularna endotelno ovisna vazodilatacija, opada kao odgovor na 7-dnevnu HS dijetu u mladih zdravih osoba oba spola neosjetljivih na sol. U skladu s time su i ranije studija učinjene u našem laboratoriju autora Stupin, Barić i suradnika (22,36) kao i ranija studija Greanyja i suradnika koja pokazuje da 7-dnevni unos HS smanjuje perifernu o endotelu ovisnu mikrovaskularnu funkciju (mjereno kao smanjen protok eritrocita tijekom lokalne vazodilatacije uzrokovane zagrijavanjem pomoću LDF) neovisno o krvnom tlaku u normotenzivnih odraslih osoba (64). 7-dnevni unos HS povećava razinu oksidativnog stresa i smanjuje antioksidativni kapacitet u zdravih mladih pojedinaca što je izravno povezano s nastalom mikrovaskularnom endotelnom disfunkcijom. Naime, izravna mikrodijaliza vitamina C (hvatač ROS-a) u kožu, dovodi do oporavka o NO-u ovisne dilatacije mikrocirkulacije kože u odgovoru na lokalno zagrijavanje nakon 7-dnevne HS dijetete. Slično tome, nadomjestak vitamina C i vitamina E tijekom 7-dnevne HS dijetete sprječava oštećenje mikrovaskularnog endotelnog odgovora na vaskularnu okluziju i na iontoforezu acetilkolina u zdravih normotenzivnih pojedinaca. Štoviše, analiza višestruke regresije pokazala je da je antioksidativni kapacitet najsnažniji prediktor AChID-a, dok je PORH snažno povezan i sa antioksidativnim kapacitetom (FRAP-om) i aktivnošću renin-angiotenzin sustava.

Ova studija je pokazala postojanje pozitivne povezanosti protuupalnog citokina IL-10 i endotelnog odgovora mikrocirkulacije na vaskularnu okluziju (PORH) u zdravih pojedinaca, ali i pozitivne povezanosti p38MAPK koja posreduje aktivaciju Th17 stanica i razvoj rane upale uslijed prekomjernog unosa soli u organizam i biljega aktivacija endotela (sVCAM-1, endoglin) koji potencijalno ukazuje na važnost povoljnog protuupalnog miljea u očuvanju endotelne funkcije mikrocirkulacije, odnosno da razvoj rane vaskularne upale doprinosi aktivaciji endotela i u konačnici razvoju endotelne disfunkcije. Ovi rezultati su korak dalje u razumijevanju veze između oksidativnog stresa i vaskularne upale uslijed prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam, što u konačnici dovodi do endotelne disfunkcije koja je u osnovi svih kardiometaboličkih bolesti.

Zaključno, povećane razine proupalnih citokina (TNF- α , IFN- γ , IL-9 i IL-17A), ali i protuupalnih citokina (TGF- β 1 i IL-10) nakon HS dijete, ukazuju da HS dijeta izaziva rani proupalni odgovor, ali također inducira i protuupalne odgovore u mladim normotenzivnih osoba neosjetljivih na sol. To je potkrijepljeno pozitivnom korelacijom između unosa soli i razine proupalnih citokina u ovoj populaciji. Pozitivna korelacija između razine IL-23 i učestalosti Th17 stanica, kao i povećane razine IL-17A i SGK1 u uvjetima HS opterećenja, podržavaju ulogu osi IL-23/SGK1/Th17stanica/IL-17A u imunološkom odgovoru prilikom HS opterećenja u zdravih osoba. Pozitivna korelacija između relativne količine fosforilirane p38MAPK i markera endotelne aktivacije (sVCAM-1, endoglin) ukazuje na potencijalnu ulogu osi p38MAPK u rezultirajućoj aktivaciji endotela uslijed unosa HS. Sveukupno uzeto, kratkoročna HS dijeta potiče upalu niskog stupnja karakteriziranu ranom aktivacijom Th17 stanica. Dodatno, postoji zaštitni protuupalni odgovor Treg stanica na opterećenje HS (moguće putem TGF- β puta), koji može zaštititi osobe neosjetljive na sol od izraženije endotelne aktivacije i disfunkcije. Postoji mogućnost da oksidativni stres mijenja imunološke regulacijske mehanizme djelovanjem na Treg stanice, što još treba dalje istražiti.

7. ZAKLJUČCI

- mjereni hemodinamski parametri (arterijski tlak i puls) nisu se promijenili u odnosu na izmjerene vrijednosti prije 7-dnevne viskokoslane dijeta. → Svi sudionici se mogu okarakterizirati kao neosjetljivi na sol, a sve uočene promjene nakon HS prehrane navedene u ovom radu mogu smatrati neovisnim o krvnom tlaku.
- 7-dnevna HS prehrana značajno je povećala razinu proupalnih citokina u serumu IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A, ali ne i IL-6 i IL-23 u zdravih osoba neovisno o promjenama krvnog tlaka.
- 7-dnevna HS prehrana u zdravih osoba otpornih na sol potiče upalu karakteriziranu povećanjem serumske razine IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A, ali također rezultira i istovremenim, nasuprotnim porastom protuupalnog nivoa IL-10 i TGF- β 1.
- povećanje razine IL-17A u serumu (i trend povećanja razine IL-21 i IL-22) sugerira (barem) početnu aktivaciju Th17 stanica kao odgovor na HS dijetu, ali također i protuupalni odgovor potencijalno posredovan aktivacijom Treg stanica karakteriziranog povećanjem razine IL-10 i TGF- β u serumu.
- Pozitivna korelacija između razine IL-23 i učestalosti Th17 stanica, kao i povećane razine IL-17A i SGK1 u uvjetima HS opterećenja, podržavaju ulogu osi IL-23/SGK1/Th17stanica/IL-17A u imunološkom odgovoru kod opterećenja HS u zdravih osoba.
- Pozitivna korelacija između relativne količine fosforilirane p38MAPK i markera endotelne aktivacije (sVCAM-1, endoglin) ukazuje na potencijalnu ulogu osi p38MAPK u rezultirajućoj aktivaciji endotela uslijed unosa HS.
- 7-dnevna HS prehrana dovela je do porasta oksidativnog stresa i smanjenja antioksidativnog kapaciteta mjereno značajnim porastom biljega oksidativnog stresa (TBARS i 8-iso-PGF2 α) i smanjenjem razine biljega antioksidativnog kapaciteta (značajno smanjenje FRAP).
- 7-dnevna HS prehrana je umanjila o endotelu ovisnu dilataciju (PORH i AChID) mjerenu u mikrocirkulaciji kože podlaktice, što je potvrda ranijih objavljenih eksperimenata.

- negativna korelacija između TBARS kao markera oksidativnog stresa i Treg stanica kao markera protuupalnog odgovora karakteriziranog produkcijom IL-10, sugerira modulatornu ulogu oksidativnog stresa u upali induciranoj HS prehranom (vjerojatno posredovanu Treg stanicama).
- pozitivna korelacija između IL-10 i endotel ovisne dilatacije u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH) ukazuje na važnost održavanja povoljnog protuupalnog miljea u očuvanju mikrovaskularne endotelne funkcije.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli (HS) na razinu upale i ravnotežu Th17 i Treg limfocita u zdravih mladih ispitanika, te ispitati povezanost upalnog odgovora uslijed 7-dnevne HS dijeta sa ranije dokazanim funkcionalnim oštećenjem mikrovaskularne reaktivnosti i povećanom razinom oksidativnog stresa.

Nacrt studije: Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani pokus, u kojemu su svi ispitanici podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja.

Ispitanici i metode: U studiji je sudjelovalo 30 mladih, zdravih ispitanika koji su 7 dana bili na dijeti s malim udjelom kuhinjske soli (LS, ~3,5 g soli/dan), a nakon toga 7 dana na HS dijeti (~14.7 g soli/dan). Prije i poslije 7-dnevne HS dijeta izmjereni su: a) serumski proupalni i protuupalni citokini; b) biljezi aktivacije endotela (sICAM-1, sVCAM-1, E-selektin, endoglin); c) frekvencija Th17 i Treg stanica; d) razina enzima uključenih u diferencijaciju Th17 i Treg stanica (SGK1 i p38MAPK); e) biljezi oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta (TBARS, 8-iso-PGF2 α , FRAP); i f) mikrovaskularna reaktivnost u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH) i iontoforezu acetilkolina (AChID) metodom laser Doppler flowmetry (LDF).

Rezultati: HS dijeta značajno je povećala serumsku razinu proupalnih citokina IFN- γ , TNF- α , IL-9 i IL-17A, ali i protuupalnih citokina IL-10 i TGF- β 1. Relativna količina SGK1 značajno se povećala nakon HS dijeta. HS dijeta značajno je povećala TBARS i 8-iso-PGF2 α , a snizila FRAP. PORH i AChID bili su značajno sniženi nakon HS dijeta. Povećana razina oksidativnog stresa nakon HS prehrane bila je negativno povezana s frekvencijom Treg stanica, dok je postojala pozitivna povezanosti između IL-10 i PORH-a.

Zaključak: Povećane razine proupalnih, ali i protuupalnih citokina nakon HS, ukazuju da HS dijeta izaziva rani proupalni odgovor, ali također i protuupalni odgovor posredovan Treg stanicama u mladih osoba neosjetljivih na sol. Dobiveni rezultati podržavaju ulogu osi IL-23/SGK1/Th17stanica/IL-17A u imunološkom odgovoru prilikom HS opterećenja u zdravih osoba. HS prehrana je dovela do povećanja biljega oksidativnog stresa te smanjenja antioksidativnog kapaciteta i smanjenja o endotelu ovisne dilatacije u mikrocirkulaciji kože. Postoji mogućnost da oksidativni stres mijenja imunološke regulacijske mehanizme djelovanjem na Treg stanice, te da je povoljan protuupalni milje važan za održavanje normalne endotelne funkcije.

Ključne riječi: citokini; dijeta s velikim unosom soli; endotel; regulacijski T limfociti; stanične adhezijske molekule; Th17 stanice; upala.

9. SUMMARY

"Inflammatory Response and Endothelial Activation Following 7-Day High-Salt Diet in Young Healthy Individuals"

Objectives: To determine the effects of a 7-day diet with high salt (HS) on the level of inflammation and balance of Th17 and Treg lymphocytes in healthy young subjects, and to examine the association of inflammatory response due to a 7-day HS with previously proven functional impairment of microvascular reactivity and increased oxidative stress.

Study design: The study was designed as a non-randomized controlled trial, in which all subjects underwent the same experimental protocol with multiple repeated measurements.

Participants and methods: The study involved 30 young, healthy subjects who were put on a low salt diet for 7 days (LS, ~ 3.5 g salt/day) and after that all subjects were on a HS diet (~ 14.7 g salt/day) for a period of 7 days. Before and after the 7-day HS diet, the following were measured: a) serum proinflammatory and antiinflammatory cytokines; b) markers of endothelial activation (sICAM-1, sVCAM-1, E-selectin, endoglin); c) frequency of Th17 and Treg cells; d) levels of enzymes involved in the differentiation of Th17 and Treg cells (SGK1 and p38MAPK); e) markers of oxidative stress and antioxidant capacity (TBARS, 8-iso-PGF2 α , FRAP); and f) microvascular reactivity in response to vascular occlusion (PORH) and acetylcholine iontophoresis (AChID) by laser Doppler flowmetry (LDF).

Results: The HS diet significantly increased serum levels of proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-9, and IL-17A, but also of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β 1. The relative amount of SGK1 increased significantly after the HS diet. The HS diet significantly increased TBARS and 8-iso-PGF2 α , and decreased FRAP. PORH and AChID were significantly reduced after the HS diet. Increased levels of oxidative stress after HS diet were negatively associated with Treg cell frequency, while there was a positive association between IL-10 and PORH.

Conclusion: Increased levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after HS indicate that the HS diet elicits an early proinflammatory response, but also an anti-inflammatory response mediated by Treg cells in salt resistant young individuals. The obtained results support the role of the IL-23/SGK1/Th17cell/IL-17A axis in the immune response during HS loading in healthy individuals. HS diet has led to an increase in the markers of

oxidative stress and a decrease in antioxidant capacity and a decrease in endothelium-dependent dilatation in the skin microcirculation. There is a possibility that oxidative stress alters immune regulatory mechanisms by acting on Treg cells, and that a favorable anti-inflammatory milieu is important for maintaining normal endothelial function.

Key words: Cell Adhesion Molecules; Cytokines; Endothelium; High-Salt Diet; Inflammation; Oxidative Stress; Regulatory T-Lymphocytes; Th17 Cells.

10. LITERATURA

1. O'Donnell M, Mentz A, Rangarajan S, McQueen MJ, Wang X, Liu L, et al. Urinary Sodium and Potassium Excretion, Mortality, and Cardiovascular Events. *New England Journal of Medicine*. 2014 Aug; 371:612-623.. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European heart journal*. 2016;37(42):3232–45.
3. Powles J, Fahimi S, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Ezzati M, et al. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ Open*. 2013 Dec 23;3(12):e003733.
4. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nature Reviews Nephrology*. 2020 Apr 5;16(4):223-237
5. Premuzic V, Erceg I, Jovanovic A, Reiner Z, Jelakovic B. Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2010;6:21.
6. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *The New England journal of medicine*. 2001 Jan 4;344(1):3–10.
7. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, et al. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *The Journal of Physiology*. 2015 Dec 15;593(24):5313-24.
8. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *The New England journal of medicine*. 1997 Apr 17;336(16):1117–24.
9. Imaizumi Y, Eguchi K, Murakami T, Arakawa K, Tsuchihashi T, Kario K. High Salt Intake Is Independently Associated With Hypertensive Target Organ Damage. *The Journal of Clinical Hypertension [Internet]*. 2016 Apr;18(4):315-21.

10. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A, et al. Salt Intake and Immunity. *Hypertension*. 2018 Jul ;72(1):19–23.
11. Elliott P, Stamler J, Nichols R, Dyer AR, Stamler R, Kesteloot H, et al. Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. *BMJ*. 1996 May 18;312(7041):1249-53.
12. Weinberger MH. Salt Sensitivity Is Associated With an Increased Mortality in Both Normal and Hypertensive Humans. *The Journal of Clinical Hypertension*. 2002 Jul-Aug;4(4):274-6.
13. Morimoto A, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, et al. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *The Lancet*. 1997 Dec 13;350(9093):1734-7.
14. Choi HY, Park HC, Ha SK. Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction. *Electrolytes & Blood Pressure*. 2015 Jun;13(1):7-16.
15. He J, Gu D, Chen J, Jaquish CE, Rao DC, Hixson JE, et al. Gender difference in blood pressure responses to dietary sodium intervention in the GenSalt study. *Journal of hypertension*. 2009 Jan;27(1):48–54.
16. Durand MJ, Moreno C, Greene AS, Lombard JH. Impaired relaxation of cerebral arteries in the absence of elevated salt intake in normotensive congenic rats carrying the Dahl salt-sensitive renin gene. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010 Dec;299(6):H1865-74.
17. 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. *American journal of hypertension*. 2013 Jun;26(6):739–47.
18. Priestley JRC, Buelow MW, McEwen ST, Weinberg BD, Delaney M, Balus SF, et al. Reduced angiotensin II levels cause generalized vascular dysfunction via oxidant stress in hamster cheek pouch arterioles. *Microvascular research*. 2013 Sep;89:134–45.
19. 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. *The Journal of Physiology*. 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
20. Weber DS, Lombard JH. Elevated salt intake impairs dilation of rat skeletal muscle resistance arteries via ANG II suppression. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000 Feb;278(2):H500-6.
 21. Zhu J, Drenjancevic-Peric I, McEwen S, Friesema J, Schulta D, Yu M, et al. Role of superoxide and angiotensin II suppression in salt-induced changes in endothelial Ca²⁺ signaling and NO production in rat aorta. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006 Aug;291(2):H929-38.
 22. 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 and Blood Pressure Research*. 2019;44(4):835-847.
 23. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Nov 21;103(47):17985–90.
 24. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews Neuroscience*. 2006 May;7(5):335–46.
 25. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma R v, Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circulation research*. 2004 Jul 23;95(2):210–6.
 26. Abboud FM. The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: The wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010 Jun;298(6):R1449-67.
 27. 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. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Mar 20;9(3):843.
28. Schweda F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015 Mar;467(3):565–76.
 29. Stupin A, Drenjancevic I, Rasic L, Cosic A, Stupin M. A Cross-Talk Between Renin-Angiotensin and Adrenergic System in Cardiovascular Health and Disease. *Southeastern European Medical Journal*. 2017;1:90–107.
 30. Campese VM, Romoff MS, Levitan D, Saglikes Y, Friedler RM, Massry SG. Abnormal relationship between sodium intake and sympathetic nervous system activity in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Kidney international*. 1982 Feb;21(2):371–8.
 31. Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2005 May-Jun;32(5–6):426–32.
 32. O'Donoghue TL, Qi Y, Brooks VL. Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2006 Oct;48(4):658–63.
 33. Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PBL, Svenningsen P, Bie P, et al. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2013 Jan;465(1):25–37.
 34. Aldehni F, Tang T, Madsen K, Plattner M, Schreiber A, Friis UG, et al. Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2011 Mar;57(3):460–8.
 35. Adams JM, McCarthy JJ, Stocker SD. Excess dietary salt alters angiotensinergic regulation of neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2008 Nov;52(5):932–7.
 36. 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.
37. Miyajima E, Yamada Y. Reduced sympathetic inhibition in salt-sensitive Japanese young adults. *American journal of hypertension*. 1999 Dec;12(12 Pt 1-2):1195–200.
 38. Abboud FM, Harwani SC, Chapleau MW. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2012 Apr;59(4):755-62.
 39. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. In: Born VRG, Schwartz CJ, editors. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*. Stuttgart: Schattauer; 1997. p. 1–26.
 40. Ruzic A, Miletic B, Nola AI, Persic V, Razov Radas M, Vcev A. Endotelna disfunkcija u “enigmatskoj slagalici” kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas*. 2009;6:2–15.
 41. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Progress in cardiovascular diseases*. 39(4):287–324.
 42. Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine*. 1990 Jul 5;323(1):27–36.
 43. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):546–9.
 44. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998 Nov;396(6708):269–72.
 45. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2007 Mar;49(3):590–6.
 46. Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K⁽⁺⁾ channels. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001 Jul;281(1):R246-53.

47. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2003 Nov;81(11):1013–28.
48. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circulation research*. 2002 Apr 19;90(7):800–6.
49. Wei CM, Hu SL, Miller VM, Burnett JC. Vascular Actions of C-Type Natriuretic Peptide in Isolated Porcine Coronary Arteries and Coronary Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994 Nov;205(1):765–71.
50. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Annals of medicine*. 2000 Jul;32(5):293–304.
51. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science (New York, NY)*. 1991 Feb 15;251(4995):788–91.
52. Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annual review of medicine*. 1993;44:395–418.
53. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003 Feb 1;23(2):168–75.
54. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000 May;902:230–9; discussion 239-40.
55. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III12-19.
56. Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO, Knoke JD, Ridker PM, Fronck A. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation*. 2006 Jun 6;113(22):2623–9.

57. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
58. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *The New England journal of medicine*. 1976 Aug 12;295(7):369-77.
59. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian J-T, Wang E, et al. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *Journal of Hypertension*. 2016 Apr;34(4):676-84.
60. Chen PY, Sanders PW. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Nov;88(5):1559-67.
61. Ni Z, Oveisi F, Vaziri ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):552-7.
62. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension : modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation*. 2000 Feb 29;101(8):856-61.
63. Cubeddu LX, Alfieri AB, Hoffmann IS, Jimenez E, Roa CM, Cubeddu R, et al. Nitric oxide and salt sensitivity. *American journal of hypertension*. 2000 Sep;13(9):973-9.
64. 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. *The Journal of physiology*. 2012 Nov 1;590(21):5519-28.
65. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999 Sep;34(3):631-8.
66. Kushiro T, Fujita H, Hisaki R, Asai T, Ichiyama I, Kitahara Y, et al. Oxidative stress in the Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension (New York, NY : 1993)*. 2005 Jan;27(1):9-15.
67. Rosenbaugh EG, Savalia KK, Manickam DS, Zimmerman MC. Antioxidant-based therapies for angiotensin II-associated cardiovascular diseases. *American journal of*

- physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2013 Jun 1;304(11):R917-28.
68. Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *American journal of epidemiology*. 2004 Aug 15;160(4):339–49.
 69. Beitz R, Mensink GBM, Fischer B, Thamm M. Vitamins--dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. *European journal of clinical nutrition*. 2002 Jun;56(6):539–45.
 70. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*. 2008 Nov 12;300(18):2123–33.
 71. Dupont JJ, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG. Ascorbic acid or L-arginine improves cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2011 Dec;111(6):1561–7.
 72. Ghiadoni L, Cupisti A, Huang Y, Mattei P, Cardinal H, Favilla S, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. *Journal of nephrology*. 2004 Jul-Aug;17(4):512-9.
 73. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Comprehensive Physiology*. 2015 Dec 15;6(1):215–54.
 74. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S, et al. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2018;315(3):H718–30.
 75. Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007 Apr;292(4):R1550-6.
 76. Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. *Journal of vascular research*. 39(1):41–50.

77. McEwen ST, Schmidt JR, Somberg L, Cruz L de la, Lombard JH. Time-course and mechanisms of restored vascular relaxation by reduced salt intake and angiotensin II infusion in rats fed a high-salt diet. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2009 Apr;16(3):220–34.
78. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A₂ receptor activation. *British journal of pharmacology*. 2014 Jul;171(13):3115–31.
79. Benndorf RA, Schwedhelm E, Gnann A, Taheri R, Kom G, Didié M, et al. Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A₂ receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circulation research*. 2008 Oct 24;103(9):1037–46.
80. Sesso HD, Jiménez MC, Wang L, Ridker PM, Buring JE, Gaziano JM. Plasma Inflammatory Markers and the Risk of Developing Hypertension in Men. *Journal of the American Heart Association*. 2015 Sep 21;4(9): e001802.
81. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*. 2005 Feb 9;19(2):149–54.
82. Pruijm M, Vollenweider P, Mooser V, Paccaud F, Preisig M, Waeber G, et al. Inflammatory markers and blood pressure: sex differences and the effect of fat mass in the CoLaus Study. *Journal of Human Hypertension*. 2013 Mar 12;27(3):169–75.
83. Sesso HD, Wang L, Buring JE, Ridker PM, Gaziano JM. Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2007 Feb;49(2):304–10.
84. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):513–7.

85. Kostyk AG, Dahl KM, Wynes MW, Whittaker LA, Weiss DJ, Loi R, et al. Regulation of chemokine expression by NaCl occurs independently of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in macrophages. *The American journal of pathology*. 2006 Jul;169(1):12-20.
86. Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Tomita T, et al. Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice. *Laboratory Investigation*. 2017 Apr 6;97(4):432-446.
87. Müller DN, Wilck N, Haase S, Kleinewietfeld M, Linker RA. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology*. 2019 Apr;19(4):243-254.
88. Zielinski CE, Corti D, Mele F, Pinto D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunological reviews*. 2011 Mar;240(1):40–51.
89. Turner J-E, Paust H-J, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney international*. 2010 Jun;77(12):1070–5.
90. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis research*. 2000;2(3):179–88.
91. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012 Apr 26;484(7395):514–8.
92. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485–517.
93. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature reviews Immunology*. 2017 Sep;17(9):535–44.
94. Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *European journal of immunology*. 2012 Sep;42(9):2215–20.

95. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005 Jan 17;201(2):233–40.
96. Wu X, Tian J, Wang S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2018 May 28;9:1112.
97. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology*. 2007 Dec;8(12):1390–7.
98. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology*. 2012 Oct;13(10):991–9.
99. Kleiweiefeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):518-22.
100. Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, et al. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Aug 18;275(33):25262–72.
101. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity*. 2001 Jul;15(1):47–58.
102. Chen S, Grigsby CL, Law CS, Ni X, Nekrep N, Olsen K, et al. Tonicity-dependent induction of Sgk1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;119(6):1647–58.
103. Lang F, Stournaras C, Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular membrane biology*. 2014 Feb;31(1):29–36.

104. Norlander AE, Saleh MA, Pandey AK, Itani HA, Wu J, Xiao L, et al. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. *JCI insight*. 2017 Jul 6;2(13):e92801.
105. Matthias J, Heink S, Picard F, Zeiträg J, Kolz A, Chao Y-Y, et al. Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Sep 1;130(9):4587-4600.
106. Taskinen, Packard, Borén. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2019 Aug 22;11(9):1987.
107. Lee E, Kim N, Kang J, Yoon S, Lee H-A, Jung H, et al. Activated pathogenic Th17 lymphocytes induce hypertension following high-fructose intake in Dahl salt-sensitive (SS) but not Dahl salt-resistant (SR) rats. *Disease Models & Mechanisms*. 2020 May 27;13(5):dmm044107.
108. Hernandez AL, Kitz A, Wu C, Lowther DE, Rodriguez DM, Vudattu N, et al. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 Nov 2;125(11):4212-22.
109. Wu C, Chen Z, Xiao S, Thalhamer T, Madi A, Han T, et al. SGK1 Governs the Reciprocal Development of Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Reports*. 2018 Jan 16;22(3):653-665.
110. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology*. 2003 Jan;3(1):23–35.
111. Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, Rintisch C, Schroeder A, Neuhofer W, et al. High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2015 Nov 2;125(11):4223–38.
112. Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In vivo (Athens, Greece)*. 21(5):757–69.
113. Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annual review of immunology*. 2009;27:339–62.

114. Takahashi H, Nakagawa S, Wu Y, Kawabata Y, Numabe A, Yanagi Y, et al. A high-salt diet enhances leukocyte adhesion in association with kidney injury in young Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2017;40(11):912–20.
115. Dmitrieva NI, Burg MB. Secretion of von Willebrand factor by endothelial cells links sodium to hypercoagulability and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Apr 29;111(17):6485-90.
116. Wild J, Soehnlein O, Dietel B, Urschel K, Garlich CD, Cicha I. Rubbing salt into wounded endothelium: sodium potentiates proatherogenic effects of TNF- α under non-uniform shear stress. *Thrombosis and haemostasis*. 2014 Jul 3;112(1):183–95.
117. 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: influence of dietary sodium load and depletion. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1998 Nov;32(5):862–8.
118. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The Effects of Arterial Blood Pressure Reduction on Endocan and Soluble Endothelial Cell Adhesion Molecules (CAMs) and CAMs Ligands Expression in Hypertensive Patients on Calcium Channel Blocker Therapy. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2013;37(2–3):103–15.
119. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomaeus H, et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature*. 2017 Nov 15;551(7682):585–9.
120. Luo T, JWj, YF et al. Th17/Treg Imbalance Induced by Dietary Salt Variation Indicates Inflammation of Target Organs in Humans. *Nature*. 2016 Jun 29;6:26767.
121. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, et al. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Translational Research*. 2015 Jul;166(1):103-10.
122. Zhou X, Zhang L, Ji W-J, Yuan F, Guo Z-Z, Pang B, et al. 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 Apr 4;8(4):e60332.
123. Mihalj M, Matic A, Mihaljevic Z, Barić L, Stupin A, Drenjančević I. Short-Term High-NaCl Dietary Intake Changes Leukocyte Expression of VLA-4, LFA-1, and Mac-1 Integrins in Both Healthy Humans and Sprague-Dawley Rats: A Comparative Study. *Mediators of Inflammation*. 2019 Sep 17;2019:6715275.
 124. Wenzel UO, Bode M, Kurts C, Ehmke H. Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. 2019 Jun 15;176(12): 1853–1863.
 125. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell metabolism*. 2015 Mar 3;21(3):493-501.
 126. Berry MR, Mathews RJ, Ferdinand JR, Jing C, Loudon KW, Wlodek E, et al. Renal Sodium Gradient Orchestrates a Dynamic Antibacterial Defense Zone. *Cell*. 2017 Aug 24;170(5):860-874.
 127. Schatz V, Neubert P, Schröder A, Binger K, Gebhard M, Müller DN, et al. Elementary immunology: Na⁺ as a regulator of immunity. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2017;32(2):201–10.
 128. Wenzel U, Turner JE, Krebs C, Kurts C, Harrison DG, Ehmke H. Immune Mechanisms in Arterial Hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016 Mar;27(3):677–86.
 129. Williams JS, Dunford EC, MacDonald MJ. Impact of the menstrual cycle on peripheral vascular function in premenopausal women: systematic review and meta-analysis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2020;319(6):H1327–37.
 130. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljevic Z, et al. Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals-Clinical Trial. *International journal of molecular sciences*. 2020 Jun 10;21(11):4149.

131. Kolobarić N, Drenjančević I, Matic A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults-A Randomised Study. *Nutrients*. 2021 May 28;13(6):1851.
132. Oakes KD, van der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*. 2003 May 29;63(4):447-63.
133. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996 Jul;239(1):70-6.
134. Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH, et al. Effects of AT1 receptor blockade on plasma thromboxane A2 (TXA2) level and skin microcirculation in young healthy women on low salt diet. *Kidney & blood pressure research*. 2013;37(4-5):432-42.
135. Stupin M, Stupin A, Rasic L, Cosic A, Kolar L, Seric V, et al. Acute exhaustive rowing exercise reduces skin microvascular dilator function in young adult rowing athletes. *European journal of applied physiology*. 2018 Feb;118(2):461-474.
136. Hashmat S, Rudemiller N, Lund H, Abais-Battad JM, van Why S, Mattson DL. Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016 Sep 1;311(3):F555-61.
137. Sharif K, Amital H, Shoenfeld Y. The role of dietary sodium in autoimmune diseases: The salty truth. *Autoimmunity Reviews*. 2018 Nov;17(11):1069-1073.
138. Matthias J, Maul J, Noster R, Meinel H, Chao Y-Y, Gerstenberg H, et al. Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Science translational medicine*. 2019 Feb 20;11(480):eaau0683.
139. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology*. 2007 Sep;8(9):967-74.

140. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
141. Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *European journal of immunology*. 2008 Apr;38(4):912-5.
142. Leong MLL, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Feb 21;278(8):5871-82.
143. Lang F, Stournaras C, Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular Membrane Biology*. 2014 Feb 14;31(1):29-36.
144. Lang F, Böhmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological Significance of the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms. *Physiological Reviews*. 2006 Oct;86(4):1151-78.
145. Son Y, Cheong Y-K, Kim N-H, Chung H-T, Kang DG, Pae H-O. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of Signal Transduction*. 2011 Feb 6;2011:792639.
146. Mehrotra P, Patel JB, Ivancic CM, Collett JA, Basile DP. Th-17 cell activation in response to high salt following acute kidney injury is associated with progressive fibrosis and attenuated by AT-1R antagonism. *Kidney International*. 2015 Oct;88(4):776-84.
147. Vitales-Noyola M, Layseca-Espinosa E, Baranda L, Abud-Mendoza C, Niño-Moreno P, Monsiváis-Urenda A, et al. Analysis of Sodium Chloride Intake and Treg/Th17 Lymphocytes in Healthy Individuals and Patients with Rheumatoid Arthritis or Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunology Research*. 2018 Jul 9;2018:1–11.
148. Acosta-Rodriguez E v, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of

- interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology*. 2007 Sep;8(9):942-9.
149. Zhu Y, Sun Y, Xie L, Jin K, Sheibani N, Greenberg DA. Hypoxic Induction of Endoglin via Mitogen-Activated Protein Kinases in Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells. *Stroke*. 2003 Oct;34(10):2483–8.
 150. Schoonderwoerd MJA, Goumans M-JTH, Hawinkels LJAC. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*. 2020 Feb 12;10(2):289.
 151. Belikov A v, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *Journal of biomedical science*. 2015 Oct 15;22:85.
 152. Cemerski S, Cantagrel A, van Meerwijk JPM, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2002 May 31;277(22):19585–93.
 153. Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomic SS.13BN rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005 Jul;289(1):H188-95.
 154. 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 (Dallas, Tex : 1979)*. 2005 Apr;45(4):687–91.
 155. Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000 Jul;279(1):H7–14.
 156. Feng Z, Hu W, Marnett LJ, Tang M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation research*. 2006 Oct 10;601(1–2):125–36.
 157. Amir O, Paz H, Rogowski O, Barshai M, Sagiv M, Shnizer S, et al. Serum oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic systolic heart failure patients. *Clinical cardiology*. 2009 Apr;32(4):199–203.

158. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Apr 28;275(17):12633–8.
159. DuPont JJ, Greaney JL, Wenner MM, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Farquhar WB, et al. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *Journal of hypertension*. 2013 Mar;31(3):530–6.
160. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2008 Jun;51(6):1525–30.
161. Lennon-Edwards S, Ramick MG, Matthews EL, Brian MS, Farquhar WB, Edwards DG. Salt loading has a more deleterious effect on flow-mediated dilation in salt-resistant men than women. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2014 Sep;24(9):990–5.
162. Dishy V, Sofowora GG, Imamura H, Nishimi Y, Xie H-G, Wood AJ, et al. Nitric oxide production decreases after salt loading but is not related to blood pressure changes or nitric oxide-mediated vascular responses. *Journal of hypertension*. 2003 Jan;21(1):153–7.
163. Roustit M, Cracowski J-L. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2012 Jan;19(1):47–64.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ana Knezović (r. Blažević)

Adresa: Psunjska 80, Osijek

Tel: +385 98 188 44 29

E-mail: anaknezovic.os@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 19. 3. 1985.

Obrazovanje:

1999.-2003. Opća gimnazija A.G.Matoša u Đakovu

2003.-2009. Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Područje: Doktor medicine

2009.-2022.: Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“, Medicinski fakultet u Osijeku

2015.: Poslijediplomski stručni studij „Opća interna medicina“

Zaposlenje:

- rujan 2009. - rujan 2010.: Klinički bolnički centar Osijek, pripravnički staž
- listopad 2010. - prosinac 2010.: Dom zdravlja Osijek, doktor medicine u ambulanti medicine rada

- prosinac 2010. - veljača 2012.: Dom zdravlja Osijek, doktor medicine, nositelj tima u ambulanti obiteljske medicine
- veljača 2012. - veljača 2019.: Dom zdravlja Đakovo, specijalizant opće interne medicine
- veljača 2019. - danas: Dom zdravlja Osječko-baranjske županije, specijalist opće interne medicine u Internističkoj ambulanti

Osobne vještine i kompetencije:

Strani jezici: Engleski (stupanj C1) i talijanski jezik (stupanj B2)

Vozačka dozvola: B kategorije

Poznavanje računalnih/informatički programa: Microsoft Office (Word, Excel, Power Point), Photoshop, Medicus

Tehničke vještine i kompetencije:

Kliničke metode: ergometrija, KMAT (kontinuirano mjerenje arterijskog tlaka), 24h holter EKG-a

Stipendije:

- Stipendija Osječko-baranjske županije tijekom studiranja na Medicinskom fakultetu Osijek
- Potpora za školarinu Osječko-baranjske županije tijekom Poslijediplomskog studija Biomedicina i zdravstvo

Znanstvena i stručna djelatnost:

Objavljeni znanstveni radovi:

1. 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.
2. Periša V, Zibar L, Knezović A, Periša I, Sinčić-Petričević J, Aurer I. Prognostic nutritional index as a predictor of prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Wien Klin Wochenschr*. 2017 Jun;129(11-12):411-419.
3. Periša V, Zibar L, Sinčić-Petričević J, Knezović A, Periša I, Barbić J. Red blood cell distribution width as a simple negative prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study. *Croat Med J*. 2015 Aug;56(4):334-43.
4. Periša V, Knezović A, Zibar L, Sinčić-Petričević J, Mjeda D, Periša I, Aurer I. Comparison of the Prognostic Impact of Neutrophil/Lymphocyte Ratio, Platelet/Lymphocyte Ratio, and Glasgow Prognostic Score in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Shiraz E Med. J*, 17 (2016), 7-8; 1-8 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
5. Periša V, Rajc J, Sinčić-Petričević J, Knezović A, Lončar B. Difuzni B velikostanični limfom s dvostrukom koekspresijom c-myc i bcl-2 proteina kao primarni obostrani limfom nadbubrežnih žlijezda: prikaz slučaja. *Liječ.vjesn* 2017;139: Suppl 2.62

Kongresna priopćenja, sažetci i poster:

1. Knezović A et al. Imunološki odgovori i endotelna aktivacija nakon 7-dnevne visokoslane dijeta u zdravih, mladih pojedinaca.// 3. Dan mladih istraživača, Hrvatska, Osijek, 2021. (oralna prezentacija, sažetak u Knjizi sažetaka)
2. Mihaljević Z, Knezović A, Šušnjara P, Mihalj M, Drenjančević I, Stupin A. Systemic Pro-Inflammatory Cytokines' Level Following 7-Day High-Salt Diet in Healthy Young Individuals.// XII ISIN Conference on Immunonutrition July 14–16, 2021 (Online): Abstracts in Annals of Nutrition and Metabolism. (Sažetak u online zborniku)
3. Knezović A, Periša V, Zibar L, Sinčić-Petričević J. Prognostic value of the Red Cell Distribution Width in Patients with Classic Hodgkin lymphoma.// 22nd Congress of the European Hematology Association Madrid, Spain, 2017. (sažetak, Abstract book)
4. Periša V, Zibar L, Knezović A et al. The prognostic nutritional index as a predictor of prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma. //21st Congress of European Hematology Association, Copenhagen, Denmark 2016. (sažetak, Abstract book)
5. Periša V, Zibar L, Sinčić-Petričević J, Marković M, Knezović A. Širina distribucije eritrocita u bolesnika s difuznim B velikostaničnim limfomom. //Liječ vjes.2014;136 Suppl 1:73. (kongresni sažetak, 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Rovinj 2014.)
6. Periša V, Sinčić-Petričević J, Zibar L, Knezović A. Kombinacija lijekova perindopril/amlodipin uzrok lijekom inducirane trombotičke trombocitopenične purpure.// Liječ vjes.2014;136 Suppl 1:79. (sažetak i poster, 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Rovinj 2014.)
7. Knezović A, Periša V. Odakle krenuti? Raspolažemo li uopće temeljnim znanjem o prehrani? //2.Međunarodni kongres nutricionista, Varaždin 2014. (poster i sažetak u zborniku, međunarodni kongres)
8. Čuljak V, Knezović A, Sinčić-Petričević J, Ladenhauser T, Marković M, Kojić B, Marijanović M, Maričić L. Liječenje difuznih B velikostaničnih limfoma-iskustva KBC

Osijek. //Liječ vjes.2012;133 Suppl 3:14. (kongresni sažetak i poster, 7. Hrvatski internistički kongres)

9. Knezović A. Primjena transkutane električne neurostimulacije u ordinaciji obiteljske medicine.// XIX. Kongres obiteljske medicine, Dubrovnik 2012. (oralna prezentacija i sažetak objavljen u zborniku)

Pasivno sudjelovanje na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim

kongresima:

1. XVIII. kongres obiteljske medicine – Rizici za zdravlje i mala kirurgija. 19. - 21. svibnja 2011. Osijek.
2. 7. hrvatski ehokardiografski skup s međunarodnim sudjelovanjem. 23. - 25. svibnja 2013. Dubrovnik. <http://croecho2013.kardio.hr/>
3. 12. Osječki urološki dani – 5. Osječki nefrološki dani. Svibanj 2017. Osijek.
4. Hypertension Masterclass. Svibanj 2017. Solaris.
5. Hypertension Masterclass. Listopad 2018. Poreč.
6. 13. kongres Hrvatskoga kardiološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem. 10. - 13. prosinca 2020. i 21. - 24. siječnja 2021. Virtualni kongres.
7. 25. dani internista Slavonije i Baranje. 5.- 6. ožujka 2021. Virtualni skup.
8. 11. hrvatski dvogodišnji ehokardiografski kongres s međunarodnim sudjelovanjem. 6. – 8. svibnja 2021. Virtualni kongres.
9. 26. dani internista Slavonije i Baranje. 4.-5. ožujka 2022. Osijek.