

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Terezija Domaćinović**

**MJERENJE UČINKA DIJETE S  
VISOKIM UDJELOM SOLI NA  
AKTIVNOST  
MONOCITA/NEUTROFILA NA  
TEMELJU IZRAŽAJA ADHEZIVNE  
MOLEKULE CD11a METODOM  
PROTOČNE CITOMETRIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Terezija Domaćinović**

**MJERENJE UČINKA DIJETE S  
VISOKIM UDJELOM SOLI NA  
AKTIVNOST  
MONOCITA/NEUTROFILA NA  
TEMELJU IZRAŽAJA ADHEZIVNE  
MOLEKULE CD11a METODOM  
PROTOČNE CITOMETRIJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek, Odsjeku za fiziologiju i imunologiju.

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

Rad ima 21 list, 4 tablice i 1 sliku.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Sol i prekomjeren unos soli .....	1
1.2. Endotel.....	1
1.3. Upalne stanice .....	2
1.4. Leukocit-endotel interakcija .....	3
1.5. Značajnost istraživanja .....	4
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ.....	6
4. ISPITANICI I METODE .....	7
4.1. Ustroj studije .....	7
4.2. Ispitanici .....	7
4.3. Metoda.....	7
4.3.1. Protokol dijete .....	7
4.3.2. Obrada uzoraka.....	8
4.3.3. Protočna citometrija.....	9
4.4. Statistička metoda.....	9
5. REZULTATI.....	10
6. RASPRAVA .....	14
7. ZAKLJUČAK .....	16
8. SAŽETAK.....	17
9.SUMMARY .....	18
10. LITERATURA.....	19
11. ŽIVOTOPIS .....	21

## 1. Uvod

### 1.1. Sol i prekomjieran unos soli

Sol (NaCl) je namirnica koja je sastavni dio ljudskog života. Njezina uloga u prošlosti bila je raznolika. Služila je za konzerviranje hrane, kao lijek, za poboljšavanje okusa hrane itd. Danas je ona prvenstveno prehrambena namirnica koja je glavni izvor natrijevih i kloridnih iona. Natrijevi, a i kloridni ioni važni su za održavanje normalnog krvnog tlaka, prenošenje živčanih impulsa te održavanje acidobazne ravnoteže. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji preporučeni dnevni unos soli za odrasle osobe iznosi oko 5 grama dnevno, a za djecu te su koncentracije još i niže (1, 2). U Hrvatskoj dnevni unos soli prosječno iznosi oko 11,6 grama, što je dva puta više od preporučene koncentracije (1). Iako sol svakodnevno unosimo putem začinjavanja hrane, najveći stvarni izvor soli su tzv. skrivene soli. Skrивene soli su soli koje se unose putem gotove i polugotove hrane kao što su primjerice pekarski proizvodi, grickalice, kukuruzne pahuljice, gotovi umaci, majoneza i suhomesnati proizvodi (1). Iako je sol potrebna za normalno funkcioniranje organizma, njezine prevelike koncentracije povezane su s razvitkom brojnih patoloških stanja. Opće je poznata činjenica da je povećan unos soli jedan od glavnih čimbenika rizika za nastanak povećanog krvnog tlaka (arterijske hipertenzije), koji za posljedicu može imati razvoj različitih kardiovaskularnih bolesti, koje su vodeći zdravstveni problem današnjice (3). Osim toga, pojedina istraživanja pokazuju povezanost između povećanog unosa soli i razvitka karcinom želuca (4). Svakodnevni povećani unos soli može doprinijeti razvitku edema, ali i težeg oštećenja bubrega (5). Povećana koncentracija natrija zbog povećanog unosa soli dovodi do gubitka kalcija, a to će dovesti do povećanja rizika od stvaranja bubrežnih kamenaca i razvitka osteoporoze (4). Sve veći broj istraživanja ukazuje na jedan od osnovnih poremećaja, čiji razvitak pospješuje svakodnevni povećani unos soli, a to je endotelna disfunkcija (3).

### 1.2. Endotel

Prije nego je došlo do pravih spoznaja vezano uz razumijevanje endotela, on se smatrao ovojnicom vaskularnog sustava bez neke značajne funkcije, osim što omogućuje selektivnu propusnost za vodu i elektrolite (6). Danas znamo da je endotel aktivni organ koji ima brojne

funkcije u ljudskom organizmu. Sveukupni endotel teži oko jednog kilograma, a čini ga oko  $6 \times 10^{13}$  stanica (7). Neke su od njegovih najvažnijih funkcija kontrola vaskularnog tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica i oblikovanje propusnosti vaskularne stijenke (7). Utjecajem različitih štetnih čimbenika može doći do oštećenja endotela, odnosno nastanka stanja poznatog kao endotelna disfunkcija. Štetni čimbenici koji dovode do endotelne disfunkcije su raznoliki, a uključuju pušenje, unos velike količine soli svakodnevnom prehranom, hiperkolesterolemiju, povećanu razinu oksidativnog stresa, dijabetes, povišenu koncentraciju plazmatskih oksidiranih lipoproteina, bakterijske i virusne infekcije itd. (7). Nastankom oštećenja endotela i razvojem endotelne disfunkcije pokreću se brojni patološki procesi u našem organizmu. Primjerice oštećenje endotela povećava rizik od razvoja ateroskleroze, arterijske hipertenzije te drugih kardiovaskularnih bolesti (7, 8). Endotelna disfunkcija također dovodi do promjena u funkciji i reaktivnosti krvnih žila, promjena u morfologiji (npr. promjeru) krvnih žila, povećane infiltracije leukocita u intimu krvnih žila i posljedičnih vaskularnih upala (7, 8).

### 1.3. Upalne stanice

Imunosni sustav za razliku od većine drugih organskih sustava nije lokaliziran nego se nalazi duž cijelog tijela (9). On je ključni dio organizma jer omogućuje obranu od virusa, parazita, bakterija ili vlastitih stanica. Glavni su dijelovi imunskog sustava organi i stanice. Organe svrstavamo u dvije skupine, koje čine primarni organi (timus i koštana srž) i sekundarni organi (slezena, limfni čvorovi, limforetikularno tkivo). Primarni organi imunskog sustava imaju ulogu u razvoju i održavanju imunskog sustava, a sekundarni organi služe kao utočište objema populacijama limfocita (9). Sve stanice koje sudjeluju u imunskim reakcijama nastaju iz pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica kroz dva diferencijalna puta (9). Jedan od diferencijalnih putova iz kojeg nastaju limfociti je limfopoeza, dok se drugi put naziva mijelopoeza te iz njega nastaju granulociti, monociti/makrofagi, dendritičke stanice i različite posredničke stanice (10). Stanice koje su ključne u imunskim reakcijama možemo podijeliti u tri skupine: limfocite, fagocite i posredničke stanice. U skupinu limfocita svrstavamo tri populacije: limfocite B, limfocite T i stanice NK. Limfociti B nositelji su humoralne imunosti, dok razlikujemo dvije skupine limfocita T – izvršne i regulacijske (11). Regulacijski limfociti T potiču imunsku reakciju nakon doticaja s antigenom, dok su izvršni limfociti T glavni posrednici stanične imunosti te posreduju u odbacivanju transplantata i tumora, ubijanju

vlastitih stanica i sl. (9, 11). Stanice NK sudjeluju u specifičnoj, ali i nespecifičnoj imunosti. Druga ključna skupina stanica imunskog sustava su fagociti te u njih svrstavamo monocite, neutrofile i eozinofile. Ove stanice prerađuju antigene i predočuju ih limfocitima. Monociti u krvi borave otprilike četiri dana, a nakon toga odlaze u tkiva gdje postaju tkivni makrofagi, za razliku od neutrofila koji se odmah u krvi nalaze u svom zreom obliku (9). Eozinofili su stanice čija je uloga najznačajnija u obrani od većih parazita te u alergijskim reakcijama (12). U skupinu posredničkih stanica svrstavamo mastocite, bazofile i trombocite. Ove se stanice uključuju u već pokrenutu imunsku reakciju lučenjem različitih bioloških tvari koje pojačavaju imunoreakciju.

#### 1.4. Endotelno-leukocitna interakcija

Kolektivni naziv za membranske proteine koji omogućuju interakciju između leukocitnih i endotelnih stanica je stanične adhezivne molekule. Glavne skupine koje svrstavamo u stanične adhezivne molekule, a bitne su u interakciji između leukocita i endotelnih stanica su selektin, imunoglobulini genske superfamilije i integrini (13). Selektin je protein koji je uključen isključivo u interakciju između leukocita i endotelnih stanica (14). Postoje tri člana koja pripadaju skupini selektina, a to su E-selektin, koji je izražen na endotelnim stanicama, P-selektin, koji je izražen na trombocitima, i L-selektin, koji je izražen na leukocitima (14). E-selektin posreduje kod adhezije monocita i neutrofila na endotelne stanice, dok L-selektin posreduje kod vezivanja leukocita i aktiviranih stanica endotela tijekom upale (14). Imunoglobulini genske superfamilije najbrojnija su skupina površinskih molekula koje se nalaze na leukocitima, u iznosu preko 50 % (13). Najznačajnije molekule su unutarstanične adhezivne molekule -1 (ICAM-1) i -2 (ICAM-2) te vaskularne stanične adhezivne molekule -1 (VCAM-1), koje se nalaze na endotelnim stanicama (13, 15). Ove molekule služe kao ligandi za stanične adhezivne molekule LFA-1(CD11a) i VLA-4( $\alpha 1\beta 4$ ) (13, 15). Iz skupine integrina,  $\beta 2$  integrini prisutni su isključivo na površini leukocita (14). U tu skupinu svrstavamo CD11a, koji je izražen na monocitima, neutrofilima i leukocitima. CD11b izražen je na mijeloidnim stanicama, a CD11c na makrofagima i dendritičkim stanicama (16). Iz skupine  $\beta 1$  integrina najznačajnija je molekula  $\alpha 1\beta 4$  (VLA-4), koja je odgovorna za adheziju leukocita za aktivirane endotelne stanice tako što se veže za endotelne stanične površinske proteine (VCAM-1) (14). Proces interakcije između leukocita i endotela odvija se u tri koraka, koja uključuju kotrljanje, čvrsto prianjanje i krajnju migraciju leukocita (13). U stanju mirovanja ne postoji interakcija

između leukocitnih i endotelnih stanica. Na leukocitnim stanicama u stanju mirovanja prisutna su vezna mjesta za selektin, dok na samim endotelnim stanicama nisu prisutni selektini (13). U slučaju upale ili oštećenja dolazi do povećanja broja adhezivnih molekula integrina, selektina i imunoglobulina genske superfamilije pod utjecajem citokina (13). Kako bi došlo do interakcije između endotelnih stanica i leukocita, leukociti se moraju pomaknuti iz središnjeg toka krvi prema stijenci krvne žile (13). Nakon što se leukociti približe stijenci krvne žile, a endotel se aktivira, započinje prvi korak interakcije, kotrljanje. Aktivacijom endotelnih stanica dolazi do ekspresije selektina, koji potom međudjeluje s ligandima koji se nalaze na leukocitima, slabim adhezivnim interakcijama, što se onda očituje kao kotrljanje leukocita (13). Nakon toga dolazi do vezivanja leukocitnih integrina s glikoproteinima iz imunoglobulinske genske superfamilije kao što su ICAM-1 i VCAM-1, a to rezultira čvrstim prijanjanjem (13). Potom stanice migriraju dijapadezom prema izvoru upale, stvaranjem keomtskih signala, jer sama adhezija između stanica nije dovoljna da potakne njihovu migraciju (13). Leukocitna migracija važan je korak u procesu upale, koji započinje kretanjem prema endotelnom čvorištu. Transendotelna migracija posredovana je molekulama iz imunoglobulinske genske superfamilije, npr. trombocitna endotelna adhezijska molekula (PECAM-1). Tijekom procesa migracije stanica polagano stvara nove adhezivne veze na prednjem dijelu stanice, dok se adhezivna interakcija smanjuje na stražnjem dijelu stanice i na taj način polagano migrira na ciljno mjesto (13).

### **1.5. Značajnost istraživanja**

Poznato je da je sol osnovna sastavnica ljudske prehrane koja služi kao glavni izvor natrijevih i kloridnih iona, ali isto je tako poznato da unos prevelike količine soli može dovesti do poticaja za razvoj patoloških stanja. Upravo je zato sol jedna od čestih tema istraživanja. Unos soli u organizam sve je veći, dva puta više nego je organizmu potrebno za normalno funkcioniranje, a da pri tome nismo u potpunosti svjesni svih štetnih učinaka koje taj povećani unos ima (1, 2). Dosadašnja istraživanja (na životinjama i ljudima) pokazala su da svakodnevni povećani unos kuhinjske soli dovodi do nastanka endotelne disfunkcije i poremećene vaskularne reaktivnosti različitih vaskularnih slivova, ali nije poznato kakav utjecaj prekomjeren unos kuhinjske ima na promjene u imunološkom sustavu i upalni odgovor.



## 2. Hipoteza

Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli uzrokovat će promjenu distribucije i aktivnosti monocita/neutrofila iz periferne krvi u populaciji zdravih mladih žena.

### 3. Cilj

Cilj je ovoga istraživanja izmjeriti učinak dijeta s visokim udjelom soli na aktivnost monocita/neutrofila iz periferne krvi na temelju određivanja izražaja adhezivne molekule CD11a metodom protočne citometrije u populaciji zdravih mladih žena.

## **4. Ispitanici i metode**

### **4.1. Ustroj studije**

Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani klinički pokus. Studija je uključivala 15 zdravih mladih žena kojima je uzorak uzet prije i nakon dijetnog razdoblja te su na taj način uzorci sami sebi kontrola. Ukupno je bilo 45 posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta te je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju obrađeno 45 uzoraka.

### **4.2. Ispitanici**

Ispitanici su pronađeni putem oglasa na Medicinskom fakultetu Osijek. Kriterij za uključenje i sudjelovanje u studiji bio je da osobe ne smiju patiti od sljedećih bolesti: hipotenzije, hipertenzije, cerebrovaskularnih bolesti, koronarnih bolesti, hiperlipidemije, šećerne bolesti, bubrežnih oštećenja te bolesti perifernih krvnih žila. Ako je osoba imala neku od navedenih bolesti, nije mogla sudjelovati u studiji. Osobe koje uzimaju lijekove koji utječu na endotel također nisu mogle pristupiti studiji. Sve osobe koje su ispunile navedene kriterije detaljno su obaviještene o procedurama i protokolima ovog istraživanja te su potpisale informirani pristanak.

### **4.3. Metoda**

#### **4.3.1. Protokol dijete**

Protokol studije trajao je 15 dana. Svi su ispitanici tijekom trajanja studije tri puta posjetili Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta Osijek. Prvi posjet laboratoriju ispitanici su obavili prilikom samog pristupanja studiji. Prvi tjedan studije svi su ispitanici bili na dijeti s niskim udjelom soli, koji je predstavljao tzv. „razdoblje ispiranja“, tijekom kojeg su dnevno unosili oko 2,3 grama soli svakodnevnom prehranom. Po

završetku prvog tjedna ispitanici su drugi puta posjetili laboratorij. Drugi tjedan studije svi su ispitanici bili na dijeti s visokim udjelom soli. Tijekom tog tjedna dnevni unos soli iznosio je 14 grama soli dnevno. Kako bi se postiglo da svi ispitanici unose približno jednake količine soli tijekom tog drugog tjedna dijeta, ispitanici su prehranom unosili oko 2,3 grama soli, dok su ostatak od 11,7 grama unosili u obliku praha soli.

Prilikom svakog studijskog posjeta ispitanicima je izmjeren arterijski tlak i puls te su određivani indeks tjelesne mase (*engl. body mass index, BMI*) i omjer struk – bokovi (*engl. waist – hip ratio, WHR*). Mjerenja arterijskog tlaka i pulsa provedena su na početku svakog posjeta, nakon 15 minuta, u sjedećem položaju. Za mjerenje arterijskog tlaka korišten je poluautomatski oscilometar (OMRON, Osaka, Japan). Za konačnu vrijednost arterijskog tlaka i pulsa uzet je prosjek triju ponovljenih mjerenja.

#### 4.3.2. Obrada uzoraka

Ispitanicima je prilikom svake posjete laboratoriju uzet uzorak venske krvi i uzorak iz 24-satnog prikupljenog urina (kontrola pridržavanja dijetnog protokola).

Uzorak venske krvi sakupljen je epruvetu koja sadrži 6 – 10 % 0,5 M EDTA. Kako bi se spriječio gubitak stanica, uzorak je odmah analiziran. Uzorku se dodaje miks protutijela CD45-PerCP (*clone: MEM-28, EXBIO*), CD14 FITC (*clone: 61D3, eBioscience*), CD11a/LFA-1 PE-Cy7 (*clone: H1111, eBioscience*) i CD16 APC (*clone: eBioCB16, eBioscience*). Nakon dodavanja protutijela i PBS-a, uzorci se lagano vorteksiraju te potom inkubiraju 20 minuta u mraku. Potom je potrebno lizirati eritrocite pomoću otopine BD Lysing Solution. Nakon dodavanja otopine BD Lysing Solution, uzorci se ponovno vorteksiraju i potom ostavljaju 10 minuta na 37 °C. Nakon toga slijedi ponovno centrifugiranje i otklanjanje supernatanta vakuum-pumpom te ispiranje PBS-om. Potom su se biotinizirana antitijela označila streptavidinom PE Cy7 (*BD Bioscience*) te su ostavljena na sobnoj temperaturi 30 minuta u mraku, a nakon 30 minuta ponovo su isprana. Poslije posljednjeg ciklusa ispiranja, stanice su se fiksirale 1% formaldehidom. Nakon navedene pripreme, uzorci su provedeni kroz uređaj za protočnu citometriju i analizirani pomoću softvera FlowLogic.

Uzorci 24-satnog urina analizirani su na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek (natrij, kalij, urea, koeficijent kreatinina).

### 4.3.3. Protočna citometrija

Protočna citometrija metoda je koja omogućuje brzu analizu stanica te paralelno mjerenje i analizu više fizikalnih karakteristika jedne stanice. Ova metoda omogućuje detekciju, analizu ili razdvajanje različitih vrsta stanica na temelju fenotipa (veličina, granuliranost) ili funkcionalnog stanja (žive/mrtve). Glavne sastavnice citometra su protočna sastavnica (tekućina – *sheat, clean, shoutdown*), optička sastavnica (laseri, leće i optički filteri) i elektronička sastavnica (signal, računalo). Načelo rada ove metode je protok kroz snop laserskih zraka svake stanice odvojeno te se nakon toga mjeri i proučava emitirana fluorescencija i raspršenje svjetlosti svake stanice (17).

### 4.4. Statistička metoda

Svi dobiveni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Svi parametri mjereni prije i nakon održanoga protokola, odnosno nakon dijete s niskim udjelom soli i nakon dijete s visokim udjelom soli, usporedili su se pomoću t-testa za zavisne uzorke. Ako varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenio se Wilcoxonov test sume rangova. Statistička značajnost namještena je na  $P < 0,05$ . Za statističku analizu koristio se program SigmaPlot (inačica 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, SAD).

## 5. Rezultati

Tablica 1. prikazuje dob i antropometrijske varijable 15 mladih žena prije i nakon dijete s visokim udjelom soli. Tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije uzrokovalo značajne promjene indeksa tjelesne mase i omjera struk – bokovi u zdravih mladih žena.

Tablica 1. Antropometrijske varijable ispitanika

	prije HS-a	poslije HS-a	P
<b>Broj ispitanika</b>	15		
<b>Dob</b> (godine)	20 ± 2		
<b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> )	22,2 ± 3,9	22,3 ± 4,1	0,32
<b>WHR</b>	0,73 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,28

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

HS – prehrana s visokim udjelom soli; BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struk – bokovi

t-testa za zavisne uzorke

Tablica 2. prikazuje arterijski tlak i puls prije i nakon dijete s visokim udjelom soli. Vrijednosti sistoličkog, dijastoličkog i srednjeg arterijskog tlaka te pulsa nisu se značajno promijenile nakon dijete s visokim udjelom soli.

Tablica 2. Arterijski tlak i puls (prije i nakon protokola)

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

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

SBP – sistolički arterijski tlak; DBP – dijastolički arterijski tlak; MAP – srednji arterijski tlak; HR – puls

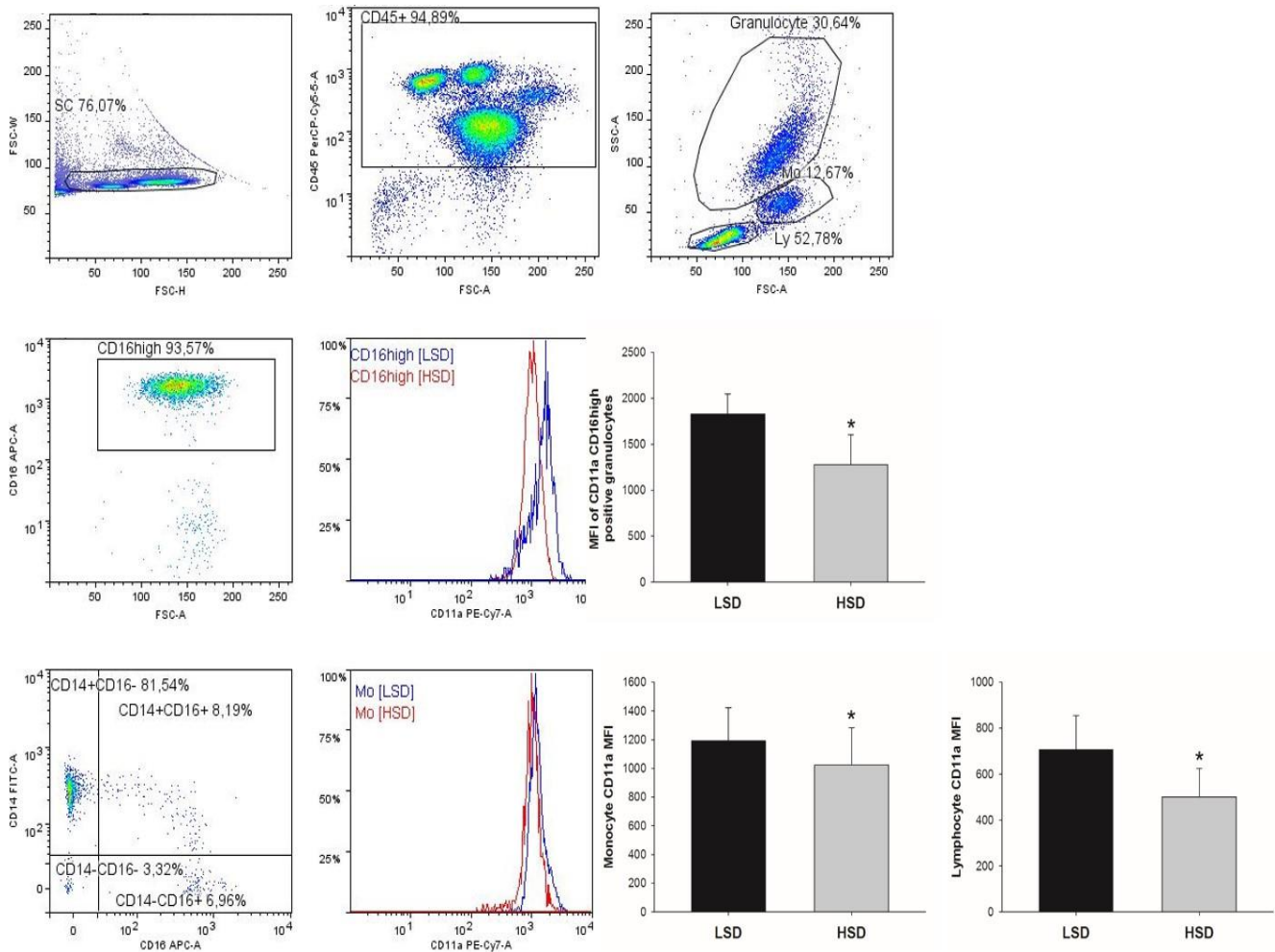
t-testa za zavisne uzorke

Tablica 3. prikazuje biokemijska obilježja mjerena u uzorcima 24-satnog urina. Dijeta s visokim udjelom soli očekivano je uzrokovala značajno povećanje 24-satne natrijуреze te izračunati dnevni unos soli što ukazuje na to da su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola. Volumen 24-satnog urina te ostala mjerena obilježja (kalij, urea, kofeicijent kreatinina) nisu se značajno promijenili nakon dijete s visokim udjelom soli.

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24-satnom urinu ispitanika

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

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



Slika 1. Ekspresija CD11a (prije i nakon protokola)

Slika 1. prikazuje ekspresiju adhezivne molekule CD11a na granulocitima, monocitima i limfocitima periferne krvi prije i nakon dijetnog protokola. Dijeta s visokim udjelom soli značajno je smanjila broj monocita (dijeta s niskim udjelom soli  $1191 \pm 232$  vs. dijeta s visokim udjelom soli  $1024 \pm 260$ ,  $P = 0,02$ ), granulocita (dijeta s niskim udjelom soli  $1834 \pm 214$  vs. dijeta s visokim udjelom soli  $1280 \pm 323$ ,  $P < 0,001$ ) i limfocita (dijeta s niskim udjelom soli  $705 \pm 148$  vs. dijeta s visokim udjelom soli  $501 \pm 124$ ,  $P < 0,001$ ) periferne krvi koji ekspimiraju CD11a u zdravih mladih žena. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD), korišten je t-testa za zavisne uzorke.



Tablica 4. prikazuje medijan ekspresije CD11a na subpopulacijama monocita periferne krvi ispitanika. Dijeta s visokim udjelom soli značajno je smanjila broj sve tri subpopulacije monocita koji ekspimiraju CD11a u zdravih mladih žena.

Tablica 4. Medijan ekspresije CD11a na subpopulacijama monocita periferne krvi ispitanika

Populacija monocita	prije HS-a	poslije HS-a	P
<b>CD14 + CD16 -</b> ( <i>classical</i> ), MFI	1183,07 ± 191,34	1036,55 ± 242,13	0,04
<b>CD14 + CD16 +</b> ( <i>intermediate</i> ), MFI	1636,19 ± 317,92	1457,77 ± 350,02	0,02
<b>CD14 - CD16 +</b> ( <i>non-classical</i> ), MFI	1574,08 ± 473,29	1221,32 ± 396,97	0,01

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

MFI – medijan fluorescentne jakosti

t-testa za zavisne uzorke

## 6. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja doprinijeli su novim spoznajama o utjecaju kratkotrajne (tjedan dana) dijete s visokim udjelom soli na distribuciju i aktivnost monocita/neutrofila iz periferne krvi u populaciji zdravih mladih žena.

Iako je poznato da dugotrajni povećani unos soli dovodi do povećanog krvnog tlaka (arterijske hipertenzije) kao posljedice oštećenja endotela (7), sve veći broj istraživanja ukazuje na činjenicu da čak i kratkotrajan unos hrane s visokim udjelom soli može dovesti do razvoja endotelne disfunkcije i to neovisno o promjenama arterijskoga tlaka. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su te spoznaje jer tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije dovelo do značajnih promjena vrijednosti arterijskoga tlaka u zdravih mladih žena. Također, tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije dovelo do značajnih promjena indeksa tjelesne mase i omjera struk – bokovi, što je u skladu s ranijim istraživanjima ove istraživačke skupine (3).

Kako bi se kontroliralo pridržavanje zadanih dijetnih protokola, ispitanici su nakon odgovarajućih protokola prikupljali 24-satni urin. Mjerenje 24-satne natrijureze najpouzdanija je metoda za procjenu dnevnog unosa soli u organizam. Statistički značajno povećanje 24-satne natrijureze te izračunatog dnevnog unosa soli u organizam u naših ispitanika potvrdili su da je protokol studije proveden konzistentno te da su se ispitanici pridržavali zadanih dijetnih protokola.

Kako je danas poznato, čak i kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli može dovesti do promjena endotelne funkcije i u odsutnosti promjena arterijskoga tlaka. Dobro je poznato da uz promjenu vazoaktivnog odgovora, poremećaj endotela uključuje i povećanje endotelne aktivacije i infiltraciju monocita/neutrofila, što dovodi do razvoja upale. Ranije studije i ove istraživačke skupine pokazale su da tjedan dana dijete s visokim udjelom soli smanjuje vaskularnu reaktivnost u odgovoru na različite stimuluse (vaskularna okluzija, acetilkolin) u različitim vaskularnim sustavima (makrocirkulacija i mikrocirkulacija) u populaciji zdravih mladih ljudi. Iako je u posljednjih nekoliko godina objavljeno nekoliko istraživanja u kojima se pokušalo objasniti kako visok unos soli utječe na upalni odgovor, još uvijek nema jednoznačnog zaključka. Stoga je važan rezultat ove studije to da je tjedan dana dijete s visokim udjelom soli uzrokovalo značajno smanjenje CD16 + granulocita, monocita i limfocita koji eksprimiraju CD11a molekulu u odnosu na tjedan dijete s niskim udjelom soli. Također se može

uočiti da je došlo do značajnog smanjenja broja sve tri subpopulacije monocita koje ekspimiraju CD11a u zdravih mladih žena nakon dijete s visokim udjelom soli, u usporedbi s tjednom kada su bile na dijeti s niskim udjelom soli. Ovi rezultati ukazuju na to da visok unos soli svakodnevnom prehranom može utjecati na normalno funkcioniranje imunološkog sustava te dobiveni rezultati potvrđuju našu hipotezu da će uslijed povećanja unosa soli u organizam doći do promjene aktivnosti monocita i promjene njihove distribucije. Pretpostavka je da se broj monocita/neutrofila koji ekspimiraju CD11a molekulu (tzv. aktiviranih stanica) u perifernoj krvi smanjio zbog njihove interakcije s endotelom (ICAM-1), ali tek u budućim istraživanjima predstoji otkriti što je točan uzrok takvog smanjenja monocita/neutrofila koji ekspimiraju CD11a nakon dijete s visokim udjelom soli.

## 7. Zaključak

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- tjedan dana dijete s visokim udjelom soli uzrokovalo je značajno smanjenje CD16 + granulocita, monocita i limfocita koji ekspimiraju CD11a molekulu u odnosu na tjedan dijete s niskim udjelom soli
- tjedan dana dijete s visokim udjelom soli uzrokovalo je značajno smanjenje subpopulacija monocita („klasični“, „neklasični“, „intermedijarni“) koji ekspimiraju CD11a molekulu u odnosu na tjedan dijete s niskim udjelom soli
- tjedan dana dijete s visokim udjelom soli nije značajno promijenilo vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa
- značajno povećana ekskrecija natrija u 24-satnom urinu nakon dijete s visokim udjelom soli potvrdila je da su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola.

## 8. Sažetak

**Cilj istraživanja:** Cilj ovoga istraživanja bio je izmjeriti učinak dijete s visokim udjelom soli na aktivnost monocita/neutrofila iz periferne krvi na temelju određivanja izražaja adhezivne molekule CD11a metodom protočne citometrije u populaciji zdravih mladih žena.

**Nacrt studije:** nerandomizirani kontrolirani klinički pokus.

**Ispitanici i metode:** Studija je obuhvatila 15 mladih zdravih žena, koje su izabrane na temelju njihovog zdravstvenog stanja. Ispitanici su prošli kroz dvije faze protokola. Prva faza je faza ispiranja u kojoj se unose smanjene količine soli (oko 2,3 g), dok su se u drugoj fazi protokola unosile povećane koncentracije soli (oko 14 g). Poslije svake faze protokola uzet je uzorak krvi i 24-satnog urina. Aktivnost monocita/neutrofila iz periferne krvi određen je na temelju izražaja adhezivne molekule CD11a metodom protočne citometrije.

**Rezultati:** Antropometrijske varijable (indeks tjelesne mase i omjer struk – bokovi) kao i puls i arterijski tlak nisu se značajno promijenili nakon dijete s visokim udjelom soli. Značajno povećanje 24-satne natrijureze i izračunatog dnevnog unosa soli potvrdili su da su se ispitanici pridržavali zadanog protokola. Dijeta s visokim udjelom soli značajno je smanjila broj monocita (ukupno i sve tri subpopulacije), CD16 + granulocita i limfocita periferne krvi koji eksprimiraju CD11a u zdravih mladih žena.

**Zaključak:** Mogući razlog smanjenja broja monocita/neutrofila koji eksprimiraju CD11a molekulu (tzv. aktiviranih stanica) u perifernoj krvi nakon dijete s visokim udjelom soli može biti njihova interakcija s endotelom (ICAM-1), ali to tek treba rasvijetliti i potvrditi u budućim istraživanjima.

**Ključne riječi:** CD11a, endotel, dijeta s visokim udjelom soli, monociti

## 9. Summary

Measurement of high salt diet effect on activity of monocytes / neutrophils based on the expression of CD11a adhesion molecule using flow cytometry method

**Objective:** The aim of this study was to measure the effect of a high-salt diet on the activity of monocytes / neutrophils from peripheral blood by determining the expression of CD11a adhesion molecule using flow cytometry in the population of healthy young women.

**Study design:** non-randomized controlled clinical trial.

**Participants and methods:** The study included 15 healthy young women who were selected based on their health status. The participants went through two phases of the protocol. The first phase included rinsing and intake of lower salt quantities (about 2.3g) while the second phase included intake of higher salt concentrations (about 14g). Blood sample and 24h urine were taken after each protocol phase. Activity of monocytes/neutrophils from peripheral blood was determined based on the expression of CD11a adhesion molecule using flow cytometry method.

**Results:** Anthropometric variables (body mass index and waist-hip ratio) as well as pulse and arterial pressure did not change significantly after the high-salt diet. A significant increase in 24-hour natriuresis and calculated daily salt intake indicated that participants adhered to the required protocol. High-salt diet significantly reduced the number of monocytes (total and in all three subpopulations), CD16 + granulocytes and lymphocytes in peripheral blood which express CD11a in healthy young women.

**Conclusion:** Possible cause of decrease in the number of monocytes / neutrophils that express CD11a molecule (so-called activated cells) in peripheral blood after a high-salt diet may be their interaction with endothelium (ICAM-1), but this needs to be clarified and confirmed in the future studies.

**Key words:** CD11a, endothelium, high-salt diet, monocytes

## 10. Literatura

1. Marija Vezilić, dipl. ing. Sol u hrani. Dostupno na: <http://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/hrana-i-zdravlje/888>. Datum pristupa: 21.7.2018.
2. MacGregor GA, de Wardener HE. Salt, Diet and Health. Cambridge University Press. 1998;81:173-174.
3. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawaki M, Bian J-T, Wang E i sur. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016.;34(4):676-84.
4. Health Risks and Disease Related to Salt and Sodium. Dostupno na stranici: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/salt-and-sodium/sodium-health-risks-and-disease/>. Datum pristupa: 21.7.2018.
5. Farquhar WB, Edwards DG, Jurkovitz CT, Weintraub WS. Dietary Sodium and Health: More Than Just Blood Pressure. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65(10): 1042–1050.
6. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G i sur. The Vascular Endothelium and Human Diseases. 2013.;9(10):1057-1069.
7. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M, i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn.* 2012; 44(1-4): 135-146.
8. Hadi HAR, Carr CS, Suwaidi JA. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005; 1(3): 183–198.
9. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjic D. *Iumonologija.* 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
10. Hillman RS, Ault KA, Leporrier M, Rinder HM. *Hematology in Clinical Practice.* 5. izd. New York: McGraw-Hill Education-Europe; 2010.
11. Tan A. What's the Difference? B-cells and T-cells <https://www.cancercenter.com/discussions/blog/whats-the-difference-b-cells-and-t-cells/> Datum pristupa: 25.7.2018.

12. Berry J, Levy AS. What Are White Blood Cells?  
<https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=160&ContentID=35>. Datum pristupa: 25.7.2018.
13. Golias CH, Tsoutsi E, Matziridis A, Makridis P, Batistatou A, Charalabopoulos K. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In vivo*.2007;21:757-770.
14. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*. 1995;9(10):866-73.
15. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med (Berl)*. 1996;74(1):13-33.
16. M.Amin Arnaout. Biology and structure of leukocyte  $\beta$  2 integrins and their role in inflammation. Dostupno na stranici:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5054827/>. Datum pristupa:12.7.2018.
17. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1221-9.



## 11. Životopis

### Osobni podatci

Ime i prezime: Terezija Domaćinović

Datum rođenja: 12. ožujka 1996.

Adresa: Ante Starčevića 44, 31220 Višnjevac (Hrvatska)

Tel.: +38591/1572-107

e-pošta: terezijadomacinovic@gmail.com

### Obrazovanje

2011. – 2015. Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, smjer: prirodoslovna gimnazija

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku