

# Određivanje koncentracije matriks metaloproteinaze-9 u uzorcima seruma metodom ELISA u mladim ispitanika na dijete s velikim udjelom soli

---

Gašpar, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:152:142686>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska**

**dijagnostika**

**Ivana Gašpar**

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE  
MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 U  
UZORCIMA SERUMA METODOM  
ELISA U MLADIH ISPITANIKA NA  
DIJETI S VELIKIM UDJELOM SOLI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ivana Gašpar**

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE  
MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 U  
UZORCIMA SERUMA METODOM  
ELISA U MLADIH ISPITANIKA NA  
DIJETI S VELIKIM UDJELOM SOLI**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku

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

Rad ima 33 lista, 5 tablica i 9 slika.

*Velika hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Ani Stupin, dr. med., na svesrdnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala dr. sc. Aniti Ćosić na pomoći pri laboratorijskom dijelu izrade rada i svim članovima Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta Osijek.*

*Najveća hvala mojoj obitelji i dragim prijateljima, koji su uvijek tu uza me.*

***Rad posvećujem mami i tati.***

## SADRŽAJ

|      |                                 |    |
|------|---------------------------------|----|
| 1.   | UVOD .....                      | 1  |
| 1.1. | Povijest soli i čovjeka .....   | 1  |
| 1.2. | Sol i hipertenzija .....        | 2  |
| 1.3. | Ekstracelularni matriks .....   | 4  |
| 1.4. | Matriks metaloproteinaza 9..... | 5  |
| 2.   | HIPOTEZA .....                  | 8  |
| 3.   | CILJ .....                      | 9  |
| 4.   | ISPITANICI I METODE .....       | 10 |
| 4.1. | Ustroj studije.....             | 10 |
| 4.2. | Ispitanici.....                 | 10 |
| 4.3. | Metode .....                    | 10 |
| 4.4. | Statističke metode .....        | 14 |
| 5.   | REZULTATI.....                  | 15 |
| 6.   | RASPRAVA .....                  | 18 |
| 7.   | ZAKLJUČAK.....                  | 23 |
| 8.   | SAŽETAK.....                    | 24 |
| 9.   | SUMMARY .....                   | 25 |
| 10.  | LITERATURA.....                 | 26 |
| 11.  | ŽIVOTOPIS.....                  | 32 |

## POPIS KRATICA

AŽS – autonomni živčani sustav

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*)

COX – ciklooksigenaza (engl. *cyclo-oxygenase*)

COX-1 – ciklooksigenaza-1 (engl. *cyclo-oxygenase-1*)

DASH – Pristup prehrani za sprječavanje hipertenzije

(engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*)

DBP – dijastolički arterijski tlak (engl. *diastolic blood pressure*)

ECM – ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix*)

ELISA metoda – enzimimunokemijska analiza (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

HR – puls (engl. *heart rate*)

HS – dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli, visoko-slana (engl. *high salt*)

HRZZ – Hrvatska zaklada za znanost

ICAM-1 – intracelularna adhezijska molekula-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*)

LKFFS – Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta

LS – dijeta s malim udjelom kuhinjske soli, nisko-slana (engl. *low salt*)

MAP – srednji arterijski tlak (engl. *median arterial pressure*)

MMP – matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinase*)

NO – dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

pro-MMP-9 – proenzim matriks metaloproteinaze 9

(engl. *proenzyme matrix metalloproteinase 9*)

RAS – renin-angiotenzinski sustav

ROS – slobodni kisikovi radikali

SBP – sistolički arterijski tlak (engl. *systolic blood pressure*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TIMP – inhibitori metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*)

WASH – Svjetska inicijativa za smanjenje unosa kuhinjske soli

(engl. *World Action on Salt and Health Movement*)

WHR – omjer struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*)

## POPIS SLIKA

|  |    |
|--|----|
| <b>Slika 1.</b> Grafički prikaz raspodjele izvora soli u prehrani .....  | 1  |
| <b>Slika 2.</b> Shematski prikaz aktivacije MMP-9 .....  | 6  |
| <b>Slika 3.</b> Test pločica s imobiliziranim specifičnim protutijelima.....   | 11 |
| <b>Slika 4.</b> Inkubacija i miješanje uzorka na imobilizirano specifično protutijelo.....   | 12 |
| <b>Slika 5.</b> Test-pločica u koji je dodan uzorak i sekundarno protutijelo .....   | 12 |
| <b>Slika 6.</b> Dodavanje kromogena u testne jažice .....  | 13 |
| <b>Slika 7.</b> Test-pločica specifičnog obojenja pripremljena za očitavanje .....   | 13 |
| <b>Slika 8.</b> Spektrofotometrijski mjerač apsorbance s ladicom za test pločicu.....  | 14 |
| <b>Slika 9.</b> Utjecaj kratkotrajne (sedmodnevne) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju MMP-9 u zdravih mladih žena i muškaraca. .... | 17 |



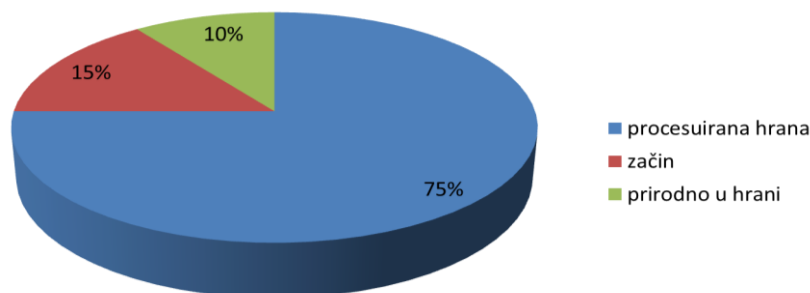
## **POPIS TABLICA**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablica 1.</b> Značajniji fiziološki i patološki procesi u kojima sudjeluju MMP..... | 5  |
| <b>Tablica 2.</b> Fiziološki i patološki procesi u kojima je sudjeluje MMP-9 .....      | 6  |
| <b>Tablica 3.</b> Antropometrijski parametri ispitanika .....                           | 15 |
| <b>Tablica 4.</b> Hemodinamski parametri ispitanika .....                               | 15 |
| <b>Tablica 5.</b> Biokemijski parametri u 24h urinu ispitanika .....                    | 16 |

## 1. UVOD

### 1.1. Povijest soli i čovjeka

Kuhinjska sol (NaCl) važan je mineralni mikronutrijent za ljudski organizam i ima važnu ulogu u funkcioniranju živčanoga i lokomotornoga sustava kao i u autoregulaciji sastava i količine tjelesnih tekućina te hemodinamike tijela. U ljudskoj se prehrani pojavljuje još u doba zajednica skupljača lovaca što se nastavlja na period pojave agrikulture i nastanka modernih civilizacija kao sastavni dio hrane (1). Prerada soli se prvi put pojavljuje na području istočne Europe, ali i Dalekog istoka gdje se prokuhavaju prirodni mineralni izvori kako bi se dobila sol koja se koristila kao konzervans (2). U nadolazećim stoljećima sol je postala jedna od skupljih i cjenjenijih sirovina jer je služila upravo kako bi se hrana mogla sačuvati od truljenja i kako bi društvo moglo prosperirati na području gdje živi sjedilačkim načinom života (3). Sve veća konzumacija hrane konzervirane u soli dovela je i do porasta procijenjenog unosa soli u organizam s manje od 1 grama po danu na 5 grama po danu (1 - 3). Kako je društvo prosperiralo i hranilo se solju konzerviranom hranom, tako je rastao i dnevni unos soli. Najveći unos soli u razvijenom svijetu bio je u razdoblju prije izuma hladnjaka i razvoja prehrambene tehnologije, kada se unos kretao oko 10 grama po danu (4). Primarno se nakon razvoja takvih tehnologija unos soli smanjuje. Međutim, sol se počela koristiti i kao začim te medij da se u prehranu uvedu drugi mikronutrijenti potrebni za normalno funkcioniranje organizma. Najpoznatiji primjer je jod (I) koji se dodaje kao aditiv od početka 20. stoljeća kako bi se spriječile bolesti povezane s nedostatkom joda. Osim toga, procesuirana hrana i povećanje unosa mesa i mlijeka, koji imaju veći udjel soli, dovelo je do ponovnog porasta unosa soli u organizam, na razinu na kojoj je bila u 19. stoljeću (5). Više od 75 % soli koje danas prosječna osoba unosi u organizam, unosi preko procesuirane hrane (Slika 1.) (6).



**Slika 1.** Raspodjela izvora soli u prehrani  
(prilagođeno po tekstu reference 6.)

## 1.2. Sol i hipertenzija

Iako je potrebna za normalno funkcioniranje organizma, prekomjeren unos soli dovodi do ozbiljnih patoloških stanja. Osim kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti prekomjeren unos soli povezan je s razvojem karcinom želuca, edema i progresivnih težih oštećenja bubrega (7 - 8). Povećana koncentracija ubrzava agregaciju trombocita čime se povećava rizik za smanjenu oksigenaciju tkiva uslijed začepljenja krvnih žila (9). Povećana koncentracija soli, odnosno natrija, dovodi do gubitka drugih elektrolita, primjerice kalcija čija ekskrecija iz organizma može dovesti do stvaranja bubrežnih kamenaca, a manjak u organizmu do razvoja osteoporoze (8).

Istraživanja pokazuju kako se danas dnevni unos soli kreće od 9 do 12 grama soli, dok Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporuča dnevni unos manji od 5 grama soli, odnosno 2 grama natrija (Na) na dan (10 - 11). Istraživanja provedena širom svijeta pokazala su pozitivnu korelaciju između smanjenja unosa soli i smanjenja krvnog tlaka (12 - 14). Iz tog je razloga na globalnoj razini 2005. godine osnovan pokret (engl. *World Action on Salt and Health Movement*, WASH) s ciljem promicanja smanjenja količine unosa soli. Donesena je i preporuka prehrane u svrhu smanjenja unosa soli i prevalencije visokog krvnog tlaka (engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*, DASH) (15 - 16). Osim globalnih pokreta, brojne su zemlje pokrenule javnozdravstvene nacionalne kampanje kako bi educirale građane i nametnule proizvođačima hrane smanjenje udjela soli u prerađenoj hrani (16 - 17). U Republici Hrvatskoj provedeno je istraživanje u kojem rezultati pokazuju kako je prosječan unos soli u razini 11,6 grama, dvostruko više od preporučenoga. Iz tih istraživanja proizlazi da žene konzumiraju prosječno 10,2 grama, a muškarci 13,3 grama dnevno (18 - 19). Od ulaska u Europsku uniju Republika Hrvatska donijela je strategiju smanjenja udjela soli u prehrani kojom se kroz edukaciju i suradnju s gospodarstvenicima želi utjecati na smanjenje prevalencije hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (20).

Poznato je kako je povećan unos soli glavni čimbenik rizika razvoja povećanog arterijskog krvnog tlaka koji je glavni komorbitetni čimbenik razvoja kardiovaskularnih bolesti. Kardiovaskularne bolesti ozbiljan su javnozdravstveni problem razvijenoga svijeta, vodeći su uzrok smrti (31 % svih smrti) i vodeći uzrok invaliditeta (21 - 22). Jedna od najčešćih bolesti kardiovaskularnoga sustava je arterijska hipertenzija koja se definira kao stanje povišenog sistoličkog (> 140 mm/Hg) i dijastoličkog tlaka (> 90 mm/Hg) (14). Važni

rizični čimbenici za razvoj esencijalne arterijske hipertenzije uključuju dob, genetsku predispoziciju, pretilost, sjedilački način života, dijabetes i drugi (23). Uz navedene čimbenike rizika, nikako se ne smije izostaviti visok unos kuhinjske soli u organizam, za koji su brojna epidemiološka i klinička istraživanja pokazala da ima bitan učinak na razvoj i progresiju arterijske hipertenzije (24). Iako još uvijek nisu razjašnjeni mehanizmi kojima prehrana s velikim udjelom kuhinjske soli utječe na razvoj arterijske hipertenzije, pokazalo se da u navedenom patofiziološkom algoritmu ključnu ulogu ima renin-angiotenzinski sustav (RAS), autonomni živčani sustav (AŽS) i endotel (8, 14).

RAS regulira ravnotežu elektrolita (poglavito natrija), volumen tjelesnih tekućina i posljedično arterijski tlak, a normalna funkcija RAS-a održava integritet strukture krvnih žila kao i njihove funkcije (vaskularne reaktivnosti). Nadalje, kod dijela hipertenzivnih ispitanika, istraživanja su pokazala kako mutacije gena koji kodiraju dijelove RAS-a posljedično dovode do kvantitativne ili kvalitativne promjene u regulaciji koje kontrolira RAS (14). Istraživanja su pokazala kako postoje i interindividualne razlike odgovorne za povišen unos soli među pojedincima u populaciji, a proizlaze iz genske podloge i definiraju se kao osjetljivost na sol.

Osjetljivost na sol većina istraživača definira kao akutnu promjenu krvnog tlaka 10 % i više od bazalne vrijednosti u odnosu na fluktuacije unosa soli, bilo da se radi o smanjenom ili povišenom unosu soli. Uočeno je da se takve promjene događaju i među hipertenzivnim, ali i normotenzivnim kohortama. Pojedinci neosjetljivi na sol izlučuju iz organizma suvišak soli bez porasta krvnog tlaka, dok je kod pojedinaca osjetljivih na sol krvni tlak poraste (10). Deduktivno se zaključuje kako osjetljivost na sol povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih poremećaja i povećava mortalitet kod normotenzivnih i hipertenzivnih pojedinaca (25).

Kako AŽS-e kontrolira RAS sustav, promjene u koncentraciji natrijeva klorida u likvoru dovode do promjene podražaja neurona i posljedično povećane aktivnosti AŽS-a (26). Takva pretpostavka testirana je u fiziološkim i patološkim stanjima te je uočena čak i u normotenzivnih mladih pojedinaca (27).

Arterijska hipertenzija strukturno, mehanički i funkcionalno mijenja strukturu krvnih žila. Vaskularne modifikacije odgovor su na povećani krvni tlak i protok krvi koji stresno djeluje na endotel, a karakterizira ih depozit kolagena i razgradnja elastina. Promjene u

vaskularnoj funkciji i razvoj endotelne disfunkcije sve se više istražuju upravo kod populacija koje nemaju povišeni krvni tlak čiji mehanizmi nastanka još nisu razjašnjeni, a najnovija istraživanja pokazuju kako i kratkotrajno uzimanje velikih količina soli može dovesti do ovih promjena – neovisno o promjenama krvnog tlaka (22, 28 - 29). Visoka koncentracija soli, osim što dovodi do aktivacije endotela, potiče i hipertrofiju srčanih mioblasta i stanica glatkog mišićja krvnih žila (14).

Najveći broj navedenih istraživanja učinjen je na eksperimentalnim životinjama (primarno štakorima). Još uvijek je ograničen broj istraživanja koja su ispitivala utjecaj kratkotrajne dijete s velikim udjelom soli na vaskularnu i endotelnu funkciju u zdravih (normotenzivnih) ispitanika. Ipak, istraživanja koja su provedena, poprilično konzistentno ukazuju na činjenicu da i kratkotrajna dijeta s velikim udjelom soli (7 dana) dovodi do oštećenja vaskularne endotelne funkcije kako u makrocirkulaciji, tako i u mikrocirkulaciji (14, 28). Štoviše, nedavne studije počele su istraživati i mehanizme koji posreduju navedeni učinak što nije jednostavno obzirom na neinvazivnost metoda dostupnih u humanim istraživanjima. Dosada je pokazano da visok unos soli dovodi do inhibicije RAS-a i povišenja razine oksidativnog stresa koji onda mogu djelovati na nastanak endotelne funkcije koja nastaje neovisno o promjenama sastava tijela i retencije fluida (kao što je neovisna o promjenama arterijskoga tlaka) (14, 22, 30).

### 1.3. Ekstracelularni matriks

Ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) glavna je acelularna komponenta vezivnog tkiva koja okružuje stjenku krvnih žila – endotel, a sastoji se od kolagena i elastina te proteoglikana i fibronektina kao strukturnih elemenata (31). Svi strukturni elementi su u stalnom procesu sinteze i razgradnje, a glavni regulatorni sustavi su matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) i inhibitori metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) (23, 31). Još uvijek nije ispitano na koji način kratkotrajan unos velike količine soli unos utječe na ECM krvnih žila. Naime, pretpostavlja se da dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli u kombinaciji s neravnotežom između vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih čimbenika, poremećajem RAS-a, aktivacijom upalnih procesa i povećanim oksidativnim stresom može dovesti do fibroze arterijske stjenke i taloženja ECM koji u konačnici amplificiraju smanjenje elastičnosti vaskulature (32).

#### 1.4. Matriks metaloproteinaza 9

Obitelj MMP-a su proteaze ovisne o cinku koje sudjeluju u brojnim fiziološkim i patološkim procesima remodeliranjem ECM-a (Tablica 1.) (33).

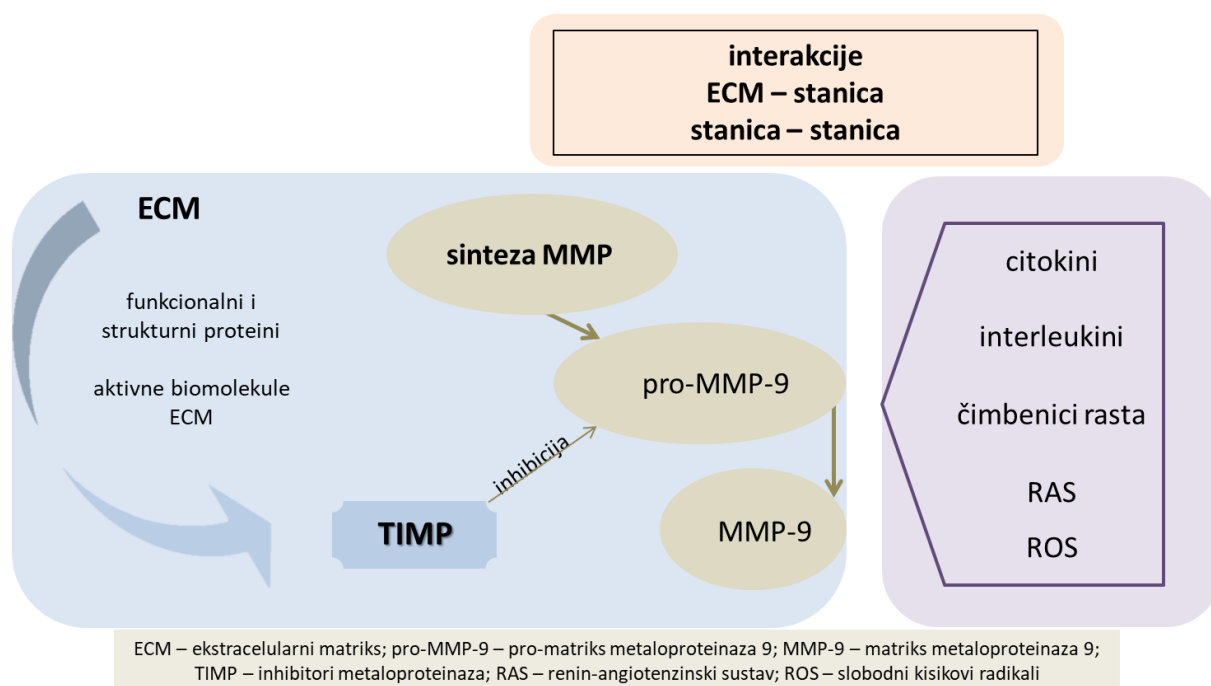
**Tablica 1.** Značajniji fiziološki i patološki procesi u kojima sudjeluju MMP  
(prilagođeno po tekstu reference 34.)

| Fiziološki procesi      | Patološki procesi  |
|-------------------------|--------------------|
| Apoptoza                | Upalne bolesti     |
| Ovulacija               | Autoimune bolesti  |
| Upala                   | Ciroza jetre       |
| Angiogeneza             | Tumori i metastaze |
| Razvoj ploda u trudnoći | Artritis           |
| Imuni odgovor           | Hipertenzija       |
| Remodeliranje kosti     | Ateroskleroza      |

Opisano je više od 28 vrsta MMP-a ovisno o njihovoj strukturi i glavnome supstratu na koji djeluju (34 - 35). MMP se iz stanica luče u ECM u inaktivnom obliku kao proenzimi (pro-MMP) uz iznimku MMP-a vezanih za staničnu membranu te se na taj način sprječava da MMP-i razgrađuju stanične komponente. Međutim, neki od MMP-a vezani su uz proteine ECM-a kako bi bili brži u slučaju podražaja. Svi MMP-ovi dijele 40 % strukture, a strukture se ugrubo mogu podijeliti na N-terminalni peptid, katalitičku domenu i C-terminalnu domenu. Didaktička klasifikacija MMP-a dijeli ih na kolagenaze, želatinaze, stromelisine, membrana-povezane MMP-ove, makrofazne elastaze i druge. Klasifikacijskoj skupini želatinaza pripadaju MMP-2 i MMP-9 (36).

MMP-9 je MMP koju kodiraju geni na 20q11.2-q13.1 lokusu. Brojne stanice luče MMP-9 uključujući neutrofile, makrofage i fibroblaste (36 - 37). Aktivacijom pomoću cisteinskog prekidača (engl. *cysteine switch*) otkriva se cink kao vezno mjesto supstrata. Aktiviraju ih RAS-i, slobodni kisikovi radikali (ROS), proinflamatorni citokini i interleukini te čimbenici rasta, a koji su svi povišeni u arterijskoj hipertenziji (Slika 2.) (23). Nadalje, molekule drugih MMP aktiviraju MMP-9, predloženo prema kaskadnom modelu slično

aktivaciji koagulacijskih faktora (36). Kontrolni mehanizmi MMP-9 uključuju sve 4 podskupine TIMP-a, s naglasnom na TIMP-1 (33).



**Slika 2.** Shematski prikaz aktivacije MMP-9  
(prilagođeno po tekstu reference 23.)

MMP-9 je najistraživanija MMP koja se povezuje s fiziološkim i patološkim procesima uključujući upalu i fibrozu kardiovaskularnog sustava, ali i druga upalna stanja, autoimune bolesti, neurodegenerativne bolesti, dijabetes i maligne procese (Tablica 2.) (36, 38).

**Tablica 2.** Fiziološki i patološki procesi u kojima sudjeluje MMP-9  
(prilagođeno po shemi reference 36.)

| MMP-9* u fiziološkim procesima        | MMP-9* u patološkim procesima      |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| Relaksacija glatkog mišićja           | Ateroskleroza                      |
| Angiogeneza                           | Infarkt miokarda i moždani infarkt |
| Razvoj embrija                        | Vaskularizacija tumora             |
| Proliferacija stanica glatkog mišićja | Aneurizme                          |
| Migracija stanica glatkog mišićja     | Hipertenzija                       |

\*MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

Funkcija MMP-9 zapravo je remodulacija tkiva degradacijom ECM-a i aktivacijom citokina i kemokina. Glavni substrati su mu kolagen (poglavito kolagen IV), želatin, elastin, fibronektin i plasminogen (36). Aktivirane MMP-e stvaraju mikrookruženje u ECM-u koje je proinflamatorno te okolno tkivo potiče na sekreciju, migraciju i proliferaciju stanica što dovodi do zadebljanja stjenke krvne žile i progresije neelastičnosti (23). Povećana neelastičnost utvrđena je i kod normotenzivnih pojedinaca (39). Na životinjskim modelima dokazano je kako se aktivnost MMP-9 povećava kod razvoja arterijske hipertenzije (36). Također je na životinjskim modelima dokazano da smanjena koncentracija ili, u slučaju knock-out životinja, nepostojanje MMP-9 vodi smanjenju rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (40 - 43). Što se tiče istraživanja provedenih na ljudima, hipertenzivni pacijenti pokazuju više razine serumskog MMP-9. Neki istraživači izvještavaju o povećanim koncentracijama MMP-9 i TIMP-1 i kod normotenzivnih pacijenata te se kod takvih osoba rizik za razvoj hipertenzije povećava dvostruko (44). Istraživana je i povezanost genskih polimorfizama koji kodiraju MMP-9 i određenih SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) varijanti koje povećavaju transkripcijsku aktivnost te je nađena pozitivna korelacija određenih polimorfizama i ozbiljnosti kliničke slike koronarne ateroskleroze i infarkta miokarda (45). Aktivnost MMP-9 povećana je čak i u ranoj fazi razvoja hipertenzije (33, 46). Još uvijek nije utvrđeno dovodi li kratkotrajna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli, uz oštećenje endotelne funkcije neovisne o porastu arterijskoga tlaka, i do porasta serumske razine MMP-9 (kao indikatora integriteta i aktivacije endotela) kod zdravih ispitanika obaju spolova.



## **2. HIPOTEZA**

Kratkotrajna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovat će povećanje serumske koncentracije MMP-9 u zdravih mladih ispitanika obaju spolova neovisno o promjenama arterijskoga tlaka.

### **3. CILJ**

Cilj ovog istraživanja biti će odrediti učinak kratkotrajne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju MMP-9 metodom ELISA.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Ova je studija dizajnirana kao nerandomizirani kontrolirani klinički pokus u kojemu su analize uzoraka ispitanika vršene prije i nakon protokola te su sami sebi bili kontrola (47). Ova je studija dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2016-06-8744) i odobrena je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/15-08/08, Broj: 2158-61-07-15-68).

### 4.2. Ispitanici

Ispitanici su bili zdravi mladi dobrovoljci koji su bili regrutirani na Medicinskom fakultetu Osijek. Odabrano je 20 osoba obaju spolova. Kriteriji isključenja za sudjelovanje u ovoj studiji bili su koronarna bolest, hipotenzija ili hipertenzija, dijabetes, bubrežno oštećenje, hiperlipidemija, bolesti perifernih krvnih žila ili cerebrovaskularne bolesti te korištenje lijekova koji bi mogli imati utjecaja na endotel. Svi su ispitanici bili detaljno obaviješteni o svim procedurama i protokolima ove studije. Nadalje, svaki je ispitanik potpisao informirani pristanak prije uključivanja u istraživanje i ulaska u protokol.

Svi su ispitanici tri puta posjetili Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LKFFS). Prvi posjet bio je prilikom ulasku u studiju. Ispitanici su nakon prvog posjeta isprva bili 7 dana na dijeti s malim udjelom kuhinjske soli (engl. *low salt*, LS), potom 7 dana na dijeti s velikim udjelom kuhinjske soli (engl. *high salt*, HS). Prema DASH planu prehrane, koji je dan ispitanicima, LS dijeta služila je kao „period ispiranja“ a podrazumijevala je unos oko 2,3 grama kuhinjske soli dnevno. HS dijeta je, uz DASH plan prehrane, podrazumijevala dodatan unos 11.7 grama kuhinjske soli u prahu, čime je ukupni dnevni unos iznosio oko 14 grama kuhinjske soli (15).

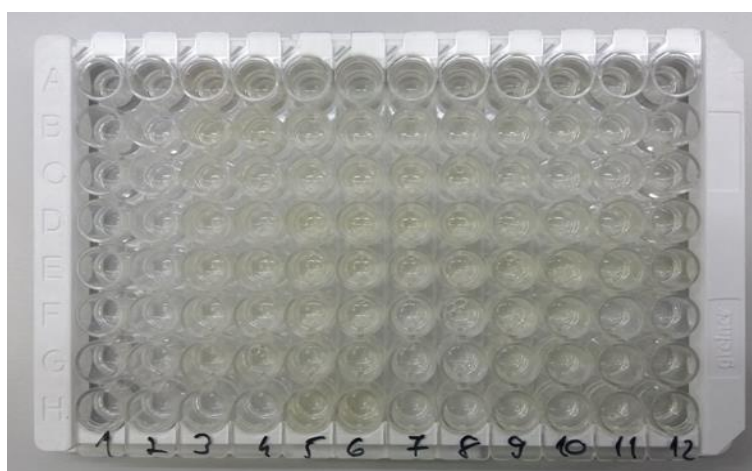
### 4.3. Metode

Prilikom svakog studijskog posjeta LKFFS-u, ispitanicima je bilo izmjeren arterijski tlak, omjer struka i bokova (engl. *waist-hip ratio*, WHR) i indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI), te uzet uzorak 24-satnog urina i uzorak pune venske krvi.

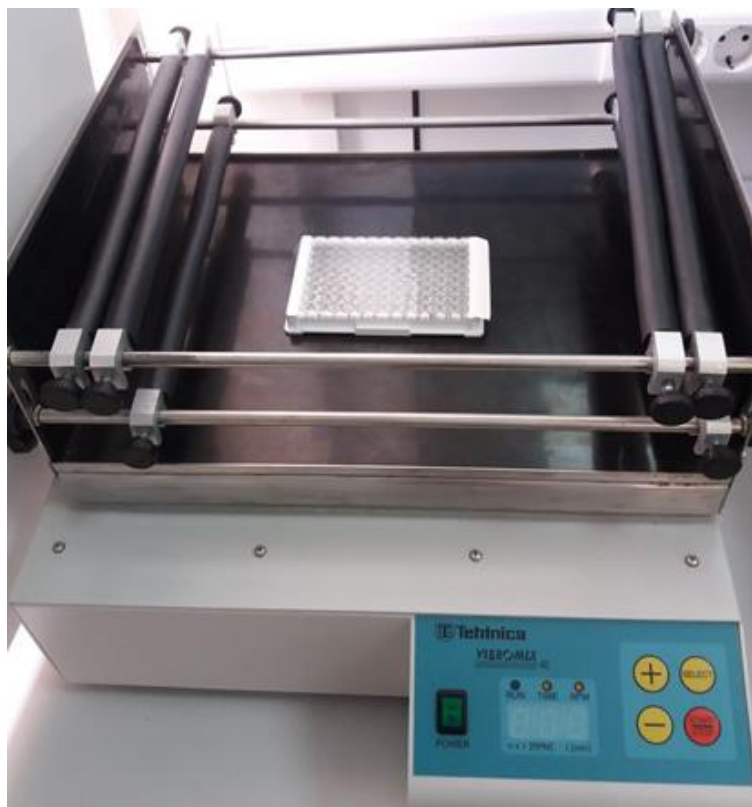
Arterijski tlak mjerio se nakon 15 minuta u sjedećem položaju na početku svakog posjeta laboratoriju. Kao konačna vrijednost tlaka uzet je prosjek 3 uzastopna mjerenja poluautomatskim oscilometrom (OMRON, Osaka, Japan). BMI i WHR izračunati su uporabom empirijski izvedenih formula. Uzorak 24-satnog urina prikupljan je radi kontrole pridržavanja dijetnog protokola mjerenjem biokemijskih obilježja: urea, koeficijent kreatinina, natrij i kalij. Iz vrijednosti 24-satne natrijуреze izračunat je dnevni unos kuhinjske soli u gramima. Napose je uzet uzorak pune venske krvi iz kojeg se određivala koncentracija MMP-9.

U Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju određivala se koncentracija MMP-9 iz seruma u duplikatu ELISA metodom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Za kvantifikaciju MMP-9 korišten je Human MMP-9 ELISA kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) prema uputama proizvođača (engl. *package insert*); LOT 149148023. Ovaj kit koristi se samo u istraživačke svrhe, ne za dijagnostičku kvantifikaciju.

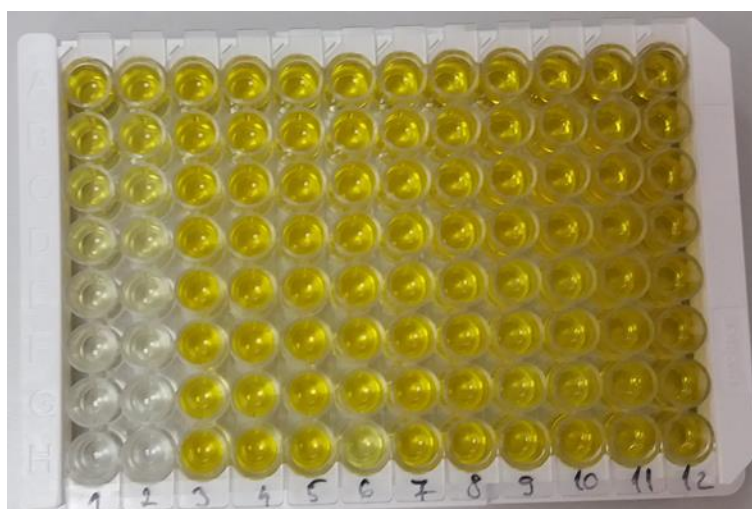
Izvedba metode klasična je sendvič ELISA metoda. Jažice testne pločice obložene su imobiliziranim specifičnim protutijelima na koje se dodaju uzorci i kontrole (Slika 3. i 5.). Uzorci se inkubiraju uz miješanje kako bi se pospješilo vezanje uzoraka s imobiliziranim primarnim protutijelima. Miješanje se vršilo automatski (VIBROMIX 40, Tehnica Železniki, Železniki, Slovenia) (Slika 4.). Na vezane komplekse veže se sekundarno protutijelo koje uz dodatak kromogenog supstrata mijenja boju (Slika 6. i 7.).



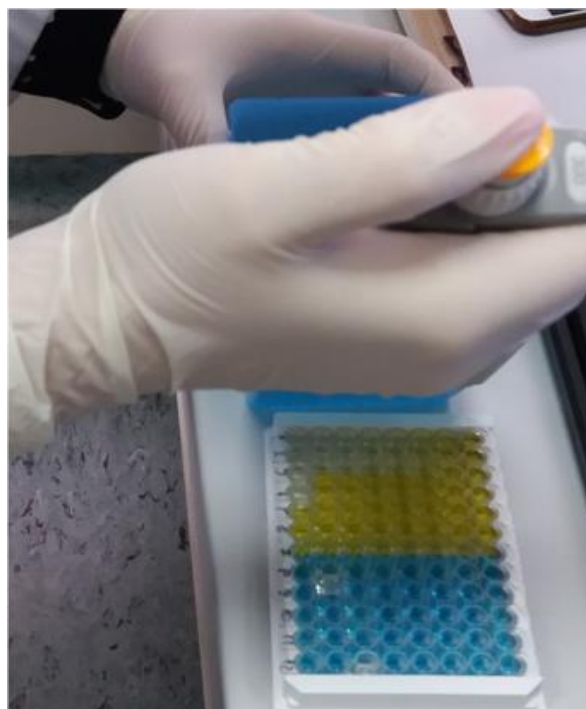
**Slika 3.** Test-pločica s imobiliziranim specifičnim protutijelima  
(fotografirala autorica)



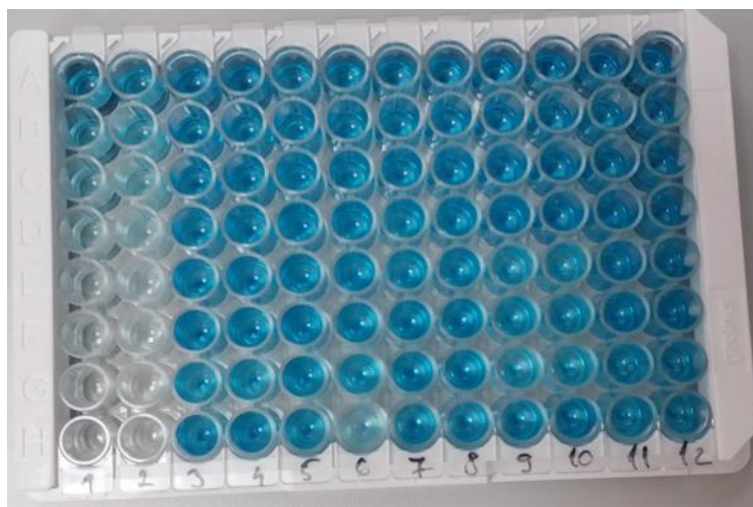
**Slika 4.** Inkubacija i miješanje uzorka na imobilizirano specifično protutijelo  
(fotografirala autorica)



**Slika 5.** Test-pločica u koji je dodan uzorak i sekundarno protutijelo  
(fotografirala autorica)

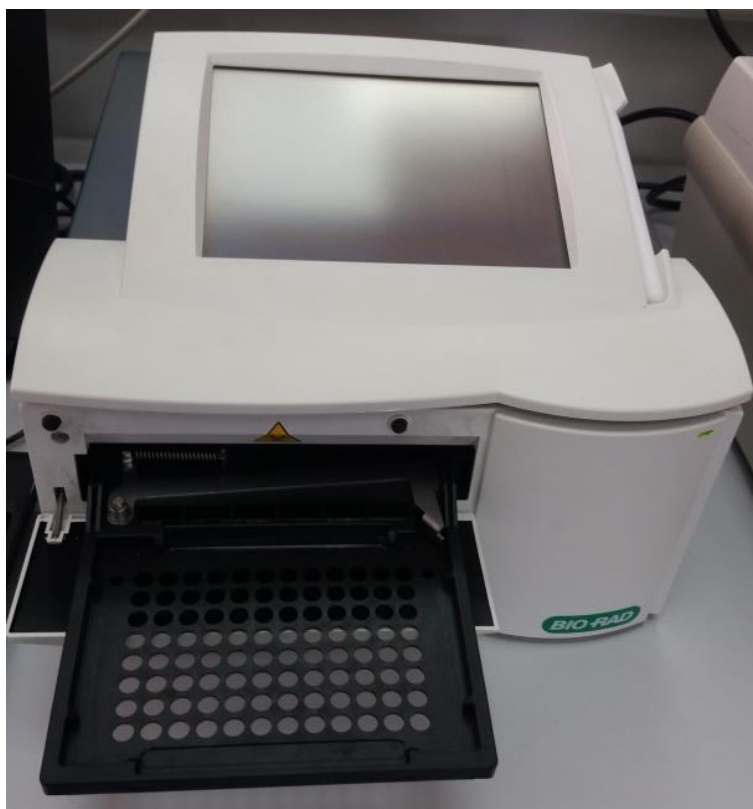


**Slika 6.** Dodavanje kromogena u testne jažice  
(fotografirala autorica)



**Slika 7.** Test pločica specifičnog obojenja pripremljena za očitavanje  
(fotografirala autorica)

Kvantifikacija se vrši mjerenjem apsorbance obojenja koja je direktno proporcionalna količini mjenenog analita u uzorku. U istraživanju se za mjerenje koristio samostojeći analizator (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) (Slika 8.).



**Slika 8.** Spektrofotometrijski mjerač apsorbance s ladicom za test-pločicu  
(fotografirala autorica)

#### **4.4. Statističke metode**

Svi su rezultati prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Obilježja mjerena prije održanoga HS protokola i nakon njega (nakon perioda ispiranja i poslije HS dijete) uspoređivani su pomoću t-testa za zavisne uzorke. Kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenio se Wilcoxonov test za zavisne uzorke. Statistička značajnost podešena je na  $P < 0.05$ . Za statističku analizu koristio se SigmaPlot (version 11.2, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

## 5. REZULTATI

U istraživanju je sudjelovalo 20 zdravih mladih ispitanika obaju spolova, 10 žena i 10 muškaraca srednje dobi od 20 godina uz standardnu devijaciju 1. U Tablici 3. prikazana su antropometrijska obilježja ispitanika prije i nakon protokola. Prikazuje se i kako nakon protokola nije došlo do statistički značajne promjene BMI-a i WHR-a.

**Tablica 3.** Antropometrijska obilježja ispitanika

| Obilježje*                      | Aritmetička sredina (standardna devijacija) |             |             |             |
|---------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|
|                                 | Žene  |             | Muškarci    |             |
|                                 | Prije HS†                                   | Poslije HS† | Prije HS†   | Poslije HS† |
| <b>BMI</b> (kg/m <sup>2</sup> ) | 22,8 (2,3)                                  | 22,6 (2,4)  | 23,1 (2,8)  | 23,4 (2,9)  |
| <b>WHR</b>                      | 0,72 (0,03)                                 | 0,71 (0,02) | 0,79 (0,04) | 0,79 (0,03) |

\* BMI – indeks tjelesne mase; WHR – omjer struka i bokova

† HS – prehrana s visokim udjelom soli

U Tablici 4. prikazane su promjene hemodinamskih obilježja prije i nakon HS djeteta. Vrijednosti arterijskog tlaka i pulsa, prije i nakon provedenog protokola, nisu bile značajno promijenjene.

**Tablica 4.** Hemodinamska obilježja ispitanika

| Obilježje*                    | Aritmetička sredina (standardna devijacija) |             |           |             |
|-------------------------------|---|-------------|-----------|-------------|
|                               | Žene  |             | Muškarci  |             |
|                               | Prije HS†                                   | Poslije HS† | Prije HS† | Poslije HS† |
| <b>SBP</b> (mmHg)             | 111 (6)                                     | 112 (9)     | 123 (9)   | 124 (6)     |
| <b>DBP</b> (mmHg)             | 74 (6)                                      | 74 (9)      | 77 (7)    | 74 (8)      |
| <b>MAP</b> (mmHg)             | 86 (6)                                      | 87 (8)      | 92 (7)    | 91 (7)      |
| <b>HR</b> (otkucaja u minuti) | 75 (13)                                     | 78 (11)     | 73 (11)   | 71 (10)     |

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

† HS – prehrana s visokim udjelom soli



Potvrđeno je da su se ispitanici pridržavali dijetnog protokola mjerenjem ekskrecije natrija u 24-satnom urinu i izračunom dnevnog unosa natrija koji su bili statistički značajno povećani. Druga mjerena obilježja u 24-satnom urinu pokazali su tendenciju rasta vrijednosti nakon provedenog protokola, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Biokemijska obilježja u 24h urinu ispitanika

| Obilježje   | Aritmetička sredina (standardna devijacija) |                           |               |                            |
|---|---|---------------------------|---------------|----------------------------|
|   | Žene  |                           | Muškarci      |                            |
|   | Prije HS*                                   | Poslije HS*               | Prije HS*     | Poslije HS*                |
| <b>Volumen 24h urina</b> (mL)                           | 1415 (556)                                  | 1460 (712)                | 1400 (668)    | 1411 (523)                 |
| <b>Natrij u 24h urinu</b><br>(mmol/Du)                  | 79,1 (27,3)                                 | 211,6 (71,1) <sup>†</sup> | 102,4 (44,2)  | 284,5 (108,4) <sup>‡</sup> |
| <b>Izračunat unos NaCl</b> (g/dan)                      | 4,6 (1,6)                                   | 12,4 (4,2) <sup>§</sup>   | 6,0 (2,6)     | 16,6 (6,3) <sup>  </sup>   |
| <b>Kalij u 24h urinu</b> (mmol/dU)                      | 34,9 (13,7)                                 | 40,4 (29,6)               | 49,0 (19,9)   | 62,9 (27,4)                |
| <b>Urea u 24h urinu</b> (mmol/dU)                       | 174,8 (51,5)                                | 209,4 (128,8)             | 353,9 (102,6) | 446,44 (281,1)             |
| <b>Koeficijent kreatinina u 24h urinu</b> (μmol/24h/kg) | 141,1 (30,3)                                | 127,3 (55,4)              | 203,4 (43,7)  | 228,1 (81,9)               |

\* HS – prehrana s visokim udjelom soli; NaCl – natrijev klorid

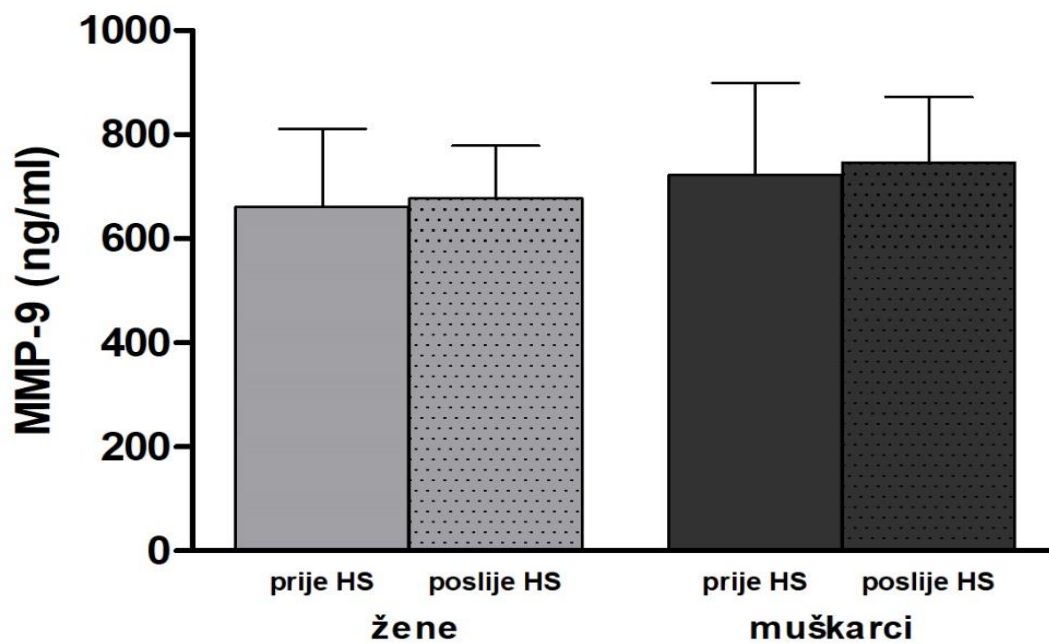
† t-test za zavisne uzorke,  $p < 0,001$

‡ t-test za zavisne uzorke,  $p < 0,001$

§ t-test za zavisne uzorke,  $p < 0,001$

|| t-test za zavisne uzorke,  $p < 0,001$

Slika 9. prikazuje utjecaj kratkotrajne (sedmodnevne) HS dijetne na serumsku koncentraciju MMP-9 u zdravih mladih žena i muškaraca. Iako postoji tendencija porasta serumske koncentracije MMP-9 nakon sedmodnevne HS dijetne (u usporedbi s vrijednosti nakon perioda ispiranja) i u zdravih mladih žena i muškaraca, navedene promjene nisu bile statistički značajne.



**Slika 9.** Utjecaj kratkotrajne (sedmodnevne) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju MMP-9 u zdravih mladih žena i muškaraca.

Stupići označuju aritmetičku sredinu, a horizontalne crte standardnu devijaciju serumske koncentracije MMP-9 u promatranim skupinama. MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9;

HS – prehrana s visokim udjelom soli.

## 6. RASPRAVA

Kratkotrajna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli nije uzrokovala statistički značajno povećanje serumske koncentracije MMP-9 u zdravih mladih ispitanika obaju spolova neovisno o promjenama arterijskoga tlaka.

Visoke koncentracije MMP-9 definitivno su prisutne kod hipertenzivnih pacijenata. Čak i u ranoj fazi razvoja hipertenzije, ali i kod patofiziologije razvoja esencijalne hipertenzije, dokazane su visoke koncentracije MMP-9 koji se pokazao kao jedan od glavnih kontributora u endotelnoj disfunkciji (43, 46). Također, Papandopoulos i suradnici pokazali su na populaciji starijih, granično normotenzivnih pojedinaca, kako je krvni tlak u gornjoj granici referentnog intervala u pozitivnoj korelaciji s povećanom koncentracijom MMP-9, ali i TIMP (33). Endotelna disfunkcija pogoršava i multiplicira štetne mehaničke učinke krvnog tlaka na krvne žile, povećava stres i proizvodnju upalnih stanica i proupalnih molekula dovodeći do ozbiljnih akutnih stanja povezanih s hipertenzijom u kojima je MMP-9 povećan (43). Halade i suradnici predlažu MMP-9 kao proksimalni biomarker srčane pregradnje i distalni biomarker upale krvožilnog sustava ističući potrebu za daljnjim istraživanjima (38). Sekhon i suradnici izvještavaju kako MMP-9 i njegovi inhibitori imaju ulogu u širokom spektru kardiovaskularnih bolesti: destabilizaciji arterosklerotskog plaka, pregradnji arterija, formiranju aneurizama i zatajenja srca (34). Brojna su istraživanja pokazala kako hipertenzivni pacijenti imaju visoke koncentracije MMP-9, što je nadalje u pozitivnoj korelaciji s ovapnjivanjem aorte (43). Nadalje, Yasmin i suradnici utvrdili su korelaciju koncentracija MMP-9 i ovapnjivanja aorte ne samo kod pacijenata sa sistoličkom hipertenzijom već i kod zdravih mladih ispitanika (48). Kompenzatorni mehanizmi hipertrofije srca i krvnih žila posredovani visokim koncentracijama MMP-9 dokazani su primarno na hipertenzivnim štakorima (49).

Prethodni radovi nisu utvrđivali dovodi li prehrana bogata solju do porasta serumske koncentracije MMP-9 kod zdravih mladih normotenzivnih ispitanika obaju spolova pri čemu MMP-9 služi kao indikator integriteta i aktivacije endotela.

Naša istraživačka skupina i drugi istraživači pokazali su kako kratkotrajna dijeta bogata solju negativno utječe na endotelnu funkciju, no bilo je nužno ispitati utječe li na strukturu endotela i njene markere (50 - 51). Kako je MMP-9 jedan od ključnih čimbenika

remodulacije i upalnih procesa endotela krvnih žila te je s obzirom na nalaze drugih istraživača koji su izvještavali kako kratkotrajna HS dijeta dovodi do oštećenja dilatacije ovisne o endotelu (51) bilo uputno istražiti i kako će se ponašati njegova koncentracija ovisno o promjeni količine unosa soli.

Dosadašnja istraživanja o utjecaju prehrane bogate soli na endotel krvnih žila neovisno o hemodinamskim promjenama, većinom su rađena na hipertenzivnim pacijentima, dok se manji broj radio na normotenzivnim zdravim osobama (22, 52 - 53).

Mjerena hemodinamska obilježja u ovom istraživanju (sistolički arterijski tlak, dijastolički arterijski tlak, srednji arterijski tlak i puls) nisu bili statistički značajno promijenjeni što je u skladu s prijašnjim istraživanjima te potvrđuje da kratkotrajna HS dijeta ne uzrokuje promjenu hemodinamskih obilježja (22, 52 - 54). Naši su nalazi u skladu s dosadašnjim preporukama smanjenja unosa soli u organizam više no s prije navedenim teorijama osjetljivih i neosjetljivih pojedinaca. U ovom istraživanju nad 20 zdravih mladih normotenzivnih ispitanika obaju spolova pokazalo je kako sedmodnevna HS dijeta ne dovodi do povećanja indeksa tjelesne mase ni povećanja omjera struka i bokova, što su pokazala i prijašnja istraživanja ove istraživačke skupine (22, 51).

Manji broj studija proučavao je utjecaj HS dijete na mikrocirkulaciju. Primjerice, Greaney i suradnici istraživali su upravo mikrocirkulaciju gdje je nađeno kako kratkotrajna HS dijeta smanjuje protok bez učinka na krvni tlak kod normotenzivnih osoba obaju spolova (55). Kako su i druga istraživanja pokazala, nedvojben je štetan utjecaj soli na endotel i mikrocirkulaciju, u osoba s razvijenom kliničkom slikom kardiovaskularnih bolesti, ali i kod mladih zdravih osoba (22, 50, 53). Istraživanja mikrocirkulacije ključna su kockica u mozaiku slike kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti jer endotelna disfunkcija prethodi razvoju kardiovaskularnih komplikacija (56).

Prekomjerman unos soli prepoznat je problem obzirom da su brojna istraživanja pokazala kako dovodi do brojnih zdravstvenih problema te da smanjenje unosa soli na preporučene razine djeluje pozitivno na zdravlje (14 - 15, 39). Najveći broj istraživanja koja su istraživala utjecaj visokog udjela soli u prehrani i kardiovaskularnih bolesti, pokazala su korelaciju prekomjernog unosa soli i arterijske hipertenzije (4). Kako arterijska hipertenzija mijenja i mikrovaskularnu funkciju te potiče strukturne promjene ECM-a nužno je istražiti

kako HS dijeta utječe na razvoj endotelne disfunkcije kako funkcionalni tako i strukturni aspekt pregradnje endotela.

Prema našim saznanjima istraživanja još nisu točno utvrdila vremenski period konzumacije povišenih količina soli koji bi doveo do značajne endotelne disfunkcije te izazvao povišenje krvnog tlaka u zdravih mladih pojedinaca obaju spolova (57). Neki istraživači dokazivali su utjecaj prehrane bogate solju na endotelnu funkciju čak i nakon samo 3 ili 5 dana HS dijete, ali i u određenim uvjetima i unutar 2 sata nakon obroka bogatog solju (37). Međutim, većina ih se bazirala na vremenskom periodu od 7 ili 14 dana (50, 58).

Dosadašnji nalazi ove istraživačke skupine pokazuju kako je prosječan unos soli žena prije dijetnog protokola iznosio  $7,7 \pm 3,1$  grama dnevno, a muškaraca  $8 \pm 3$  grama dnevno čime je potvrđeno kako muškarci unose više soli u odnosu na žene (32, 51). Za vrijeme LS dijetnog protokola ovog istraživanja ispitanici su unosili smanjenu količinu soli koja je služila kao period ispiranja kako bi rezultati istraživanja bili prikladno obrađeni. Vrijednosti koncentracije MMP-9 poslije LS protokola služe u komparaciji koncentracije poslije HS protokola. Nadalje, za vrijeme HS protokola unosili su oko 14 grama soli dnevno, količinu nešto veću od prosječnog unosa soli u Republici Hrvatskoj (18 - 19). Međutim, u interpretaciji u obzir treba uzeti činjenicu da prosječan unos soli raste s dobi (5, 23) te da je prosječan unos soli u populaciji Republike Hrvatske računat u populaciji srednje dobi za oba spola (18).

Za procjenu dnevnog unosa soli u organizam korištena je najpouzdanija metoda mjerenja ekskrecije natrija u 24-satnom urinu. Potvrđeno je konzistentno pridržavanje dijetnoga protokola mjerenjem ekskrecije natrija u 24-satnom urinu i izračunom dnevnog unosa natrija koji su bili statistički značajno povećani ( $p < 0,05$ ). Tendenciju porasta vrijednosti nakon provedenog protokola imali su i drugi mjereni parametri u 24-satnom urinu, ali bez statističke značajnosti.

Naša istraživačka skupina izvela je pokuse reaktivnosti mikrocirkulacije kože zasebno za oba spola. Usporedbom je zaključeno kako nema razlike između spolova, odnosno da prehrana bogata soli kod oba spola dovodi do pogoršanja mikrocirkulacije kože (32, 51). Slična istraživanja provedena nad zdravim mladim ispitanicima obaju spolova pokazala su izvjesnu razliku odgovora muškaraca u slučaju endotelne produkcije NO (engl. *nitric oxide*, NO) kao odgovor na prekomjeren unos soli (51). Smanjena biodostupnost NO dovodi do

redukcije vaskularne relaksacije posljedično vaskularne funkcije (28, 35). A kako je biodostupnost NO predloženo glavni put nastanka (37), ovakav nalaz govori u prilog postojanju stanovite razlike u patofiziologiji endotelne disfunkcije među spolovima.

Istraživanja naše istraživačke skupine pokazala su i kako HS dijeta dovodi i do smanjenja broja proupalnih CD16<sup>+</sup> granulocita, monocita i limfocita koji eksprimiraju CD11a i istraživane subpopulacije monocita (59), a koje sve luče MMP-9. Nije istražen razlog smanjenja broja monocita/neutrofila, ali se pretpostavlja da je razlog njihova interakcija s endotelom, konkretno s ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) (59).

Biljeg endotelne aktivacije ICAM-1, uz ostale adhezivne molekule, koje luče endotelne stanice, na ovaj način produljuje upalni odgovor endotela što dovodi do depozita ECM-a i rasta veziva (35). Tako upalni odgovor traje duži period vremena te se može reći kako u našem istraživanju koncentracija MMP-9 nije statistički značajno povećana jer je HS dijeta bila prekratka ili je količina soli bila premala za zadano vrijeme. Istraživanja poprilično nekonzistentno izvještavaju o utjecaju hipertenzije ili prehrane bogate soli na serumske koncentracije biljega endotelne aktivacije. Potrebno je ulaganje novih napora u otkrivanju novih, osjetljivijih biljega endotelne aktivacije koji bi pomogli u procjeni razvoja endotelne aktivacije i oštećenja. Pretpostavlja se kako kratkotrajna HS dijeta ne utječe na visoke serumske koncentracije, moguće zbog male doze ili kratkoće primjene soli (57) te da je vjerojatnije da visoki krvni tlak utječe na povećanje njihove koncentracije (32). Osim biljega endotelne aktivacije u aktivaciji MMP-9 sudjeluju i brojne druge adhezijske molekule povezane s upalom uključujući i ciklooksigenaze (engl. *cyclo-oxygenase*, COX) (35). Naša istraživačka skupina pokazala je na kohorti mladih zdravih žena kako dijeta bogata solju negativno utječe na mikrovaskularnu, endotelnu funkciju preko vazokonstriktorskih metabolita COX enzima, poglavito molekula COX-1 porijekla (engl. *cyclo-oxygenase*, COX-1) (32, 58). Sve upalne molekule, poglavito citokini mogu biti substrati za aktiviranog MMP-9, što je jedan od mogućih mehanizama regulacije citokina (14, 35) čime moduliraju leukocitni odgovor i aktivaciju granula neutrofila (38, 43).

Dosadašnja istraživanja koja su proučavala razliku utjecaja soli na kardiovaskularni sustav bazirala su se mehanizmima nastanka poremećaja krvnog tlaka i makrocirkulaciju dok se nekolicina bavila utjecajem velikih količina soli na mikrocirkulaciju i endotel, neovisno o krvnom tlaku (52). Nadalje, pretežno su se bavila specifičnim kohortama normotenzivnih zdravih osoba, osobama osjetljivim na sol ili osobama neosjetljivim na sol. Rezultati tih

istraživanja potrebno je interpretirati u skladu s tim (52 - 53). Naša ispitivana kohorta nije klasificirana po tom modelu te je možemo podrazumijevati miješanom skupinom, odnosno ne možemo uspoređivati po ovom ključu.

Naposljetku, nedvojbena je šteta od konzumacije velike količine soli na zdravlje ljudi. Osim rizika za razvoj hipertenzije dovodi do brojnih kardiovaskularnih bolesti i oštećenja tkiva poglavito endotela, na razini makro, ali i mikrocirkulacije. U prijašnjim istraživanjima ove istraživačke skupine pokazano je kako kratkotrajna dijeta dovodi do funkcionalnih promjena endotela. Međutim, kratkotrajna (sedmodnevna) dijeta bogata solju u ovom istraživanju nije dovela do povećanja koncentracije serumskog MMP-9 čime je pokazano kako ovakva kratkotrajna HS dijeta ne dovodi do strukturnih promjena.

Zaključno, važno je naglasiti kako sva znanstvena istraživanja govore u prilog važnosti pridržavanja smjernica o prehrani u smislu smanjenja unosa soli svih pojedinaca općenito, i to je jednostavna i jeftina javnozdravstvena primarna prevencija nastanka kardiovaskularnih, ali i drugih stanja. Na prvom mjestu jest smanjenje dnevnog unosa soli u organizam.

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Kratkotrajna (sedmodnevna) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli nije dovela do promjene indeksa tjelesne mase ni omjera struk-bokovi za ispitanike oba spola.
- Mjereni hemodinamski parametri: sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak te puls nisu bili promijenjeni u odnosu na vrijednosti prije visokoslane dijetae.
- Mjerenjem ekskrecije natrija u 24-satnom urinu i izračunom dnevnog unosa natrija potvrđeno je kako su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola.
- Vrijednosti drugih mjerenih parametara u 24-satnom urinu pokazale su tendenciju rasta, međutim, bez statističke značajnosti.
- Kratkotrajna (sedmodnevna) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli nema statistički značajan učinak na povišenje serumske koncentracije MMP-9 mjerene ELISA metodom.



## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učinak kratkotrajne dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju MMP-9 metodom ELISA.

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

**Ispitanici i metode:** Studijom je obuhvaćeno 20 ispitanika, mladih zdravih normotenzivnih osoba oba spola. Ispitanici su podvrgnuti dijetnom protokolu te su 7 dana proveli na niskoslanjoj dijeti, potom 7 dana na visokoslanjoj dijeti. Prije i poslije dijetnog protokola određeni su BMI, WHR, hemodinamski parametri, analizirani uzorci venske krvi i 24-satnog urina te određena koncentracija serumske MMP-9 ELISA metodom.

**Rezultati:** Promjene u 24-satnom urinu potvrdile su pridržavanje protokola ( $p < 0,05$ ). HS prehrana nije statistički značajno povećala koncentraciju MMP-9 u serumu mjerenu ELISA metodom. Nije bilo značajne promjene antropometrijskih parametara BMI-a i WHR-a prije i nakon HS dijeta. Nije bilo značajne promjene hemodinamskih parametara prije i nakon protokola.

**Zaključak:** Sedmodnevna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli nema statistički značajan učinak na povišenje serumske koncentracije MMP-9.

**Ključne riječi:** kuhinjska sol, mikrocirkulacija, vaskularna pregradnja, ekstracelularni matriks, matriks metaloproteinaza 9

## 9. SUMMARY

### **Measurement of matrix metalloproteinase-9 concentration in serum of young healthy individuals on high-salt diet by ELISA method**

**Objectives:** The aim of the study was to investigate the effect of a short-term high salt diet on the concentration of MMP-9 in serum by ELISA method.

**Study design.** Non-randomized controlled trial.

**Participants and methods:** The study included 20 young healthy normotensive people, including both sexes. Subjects underwent a diet study consisting of 7 days of low salt diet and 7 days of high salt diet. Before and after the dietary protocol, anthropometric parameters BMI, WHR and hemodynamic parameters were determined; venous blood, 24-hour urine samples and serum concentration of MMP-9 were analyzed as well.

**Results:** Changes in 24h urinary sodium confirmed compliance with the protocol ( $p < 0,05$ ). High salt diet did not cause a statistically significant increase of MMP-9 serum concentration measured by ELISA method. There was not any significant change in BMI and WHR before and after the high salt diet. There was not any significant change in hemodynamic parameters before and after the protocol.

**Conclusion:** 7-days high salt loading did not statistically significant increased concentration of MMP-9 in serum.

**Key words:** sodium chloride, microcirculation, vascular remodeling, extracellular matrix, matrix metalloproteinase-9

**10. LITERATURA**

1. MacGregor GA, de Wardener HE. Salt, Diet and Health: Neptune's Poisoned Chalice; The origin of High Blood Pressure. 1. izd. Cambridge: Cambridge University Press; 1998. str. 233.
2. Kurlansky M. Salt: A World History. 1. izd. New York: Penguin Books; 2002. str. 18-19.
3. Roberts WC. High salt intake, its origins, its economic impact, and its effect on blood pressure. *Am J Cardiol.* 2001;88(1):1338-1346.
4. Stamler J. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ.* 1988;297(6644):319-28.
5. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol.* 2009;38(3):791-813.
6. Ha SK. Dietary salt intake and hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12(1):7-18.
7. Harvard school of public health. Health Risks and Disease Related to Salt and Sodium. Dostupno na adresi: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/salt-and-sodium/sodium-health-risks-and-disease/>. Datum pristupa: 10.12.2018.
8. 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.
9. de Wardener H, MacGregor G. Harmful effects of dietary salt in addition to hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002;16(4):213–23.
10. Choi HY, Park HC, Ha SK. Salt sensitivity and hypertension: A paradigm shift from kidney malfunction to vascular endothelial dysfunction. *Electrolyte Blood Press.* 2015;13(1):7–16.
11. World Health Organization. Guideline: Sodium intake for adults and children. 2012. Dostupno na adresi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf?ua=1&ua=1). Datum pristupa: 10.12.2018.
12. World Health Organization. Effect of reduced sodium intake on blood pressure, renal function, blood lipids and other potential adverse effects. 2012. Dostupno na adresi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79325/1/9789241504911\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79325/1/9789241504911_eng.pdf). Datum pristupa: 12.12.2018.

13. World Health Organization. Effects of reduced sodium intake on cardiovascular disease, coronary heart disease and stroke. 2012. Dostupno na adresi:  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79322/1/9789241504904\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79322/1/9789241504904_eng.pdf).  
Datum pristupa: 12.12.2018.
14. Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: Focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):1–11.
15. Kwan MWM, Wong MCS, Wang HHX, Liu KQL, Lee CLS, Yan BPY i sur. Compliance with the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet: A systematic review. *PLoS One.* 2013;8(10):4–11.
16. He FJ, Jenner KH, Macgregor GA. WASH — World Action on Salt and Health. *Kidney Int.* 2010;78(8):745–53.
17. He FJ, Macgregor GA. Reducing Population Salt Intake — Time for Global Action. *J Clin Hypertens.* 2015;17(1):10–3.
18. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. *Hrvat časopis za prehrambenu Tehnol Biotehnol i Nutr.* 2011;6(3–4):141–7. Dostupno na adresi: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf%3A1252>. Datum pristupa: 10.02.2019.
19. Premuzic V, Erceg I, Jovanovic A, Reiner Z, Jelakovic B. Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo.* 2010;6:21. Dostupno na adresi:  
<http://hcjz.hr/index.php/hcjz/article/view/794/760>. Datum pristupa: 10.02.2019.
20. Vlada Republike Hrvatske. Strateški Plan Za Smanjenje Prekomjernog Unosa Kuhinjske Soli U Republici Hrvatskoj 2015. – 2019. 2015. Dostupno na adresi:  
<https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019..pdf>. Datum pristupa: 10.02.2019.
21. Adeyi O, Smith O, Robles S. Public policy and the challenge of chronic noncommunicable diseases. Washington DC: The World Bank. 2007. Dostupno na adresi:  
<http://siteresources.worldbank.org/INTPH/Resources/PublicPolicyandNCDsWorldBank2007FullReport.pdf>. Datum pristupa 12.02.2019.
22. 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.

23. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol*. 2016;32(5):659-68.
24. Fuster V, Kelly BB, ur. Institute of Medicine (US) Committee on Preventing the Global Epidemic of Cardiovascular Disease: Meeting the Challenges in Developing Countries; Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health. Washington (DC): National Academies Press (US); 2010. 2.
25. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2002;4(4):274-6.
26. Kinsman BJ, Simmonds SS, Browning KN, Stocker SD. Organum Vasculosum of the Lamina Terminalis Detects NaCl to Elevate Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure. *Hypertension*. 2017;69(1):163–70.
27. Stupin A, Drenjancevic I, Rasic L, Cosic A, Stupin M. A Cross-Talk between the Renin-Angiotensin and Adrenergic Systems in Cardiovascular Health and Disease. *Southeast Eur Med J*. 2017;1(1):90–107.
28. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. *Hypertension*. 2001; 37:444-448.
29. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Giuliani E, De Sisti L, Cicogna S i sur. Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertensive: influence of dietary sodium load and depletion. *Hypertension*. 1998;32:862-868.
30. Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high salt diet on oxidant enzyme activity in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol*. 2002;282:395-402.
31. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
32. Cavka A, Cosic A, Jukic I i sur. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol*. 2015;593(24):5313-24.
33. Papadopoulos D, Makris, T, Krespi G, Poulakou M, Papazachou G i sur. Changes in metalloproteinases in healthy normotensive patients with high-normal blood pressure. *Eur cytokine netw*. 2005;16(3):211-4.
34. Sekhon BS. Matrix metalloproteinases – an overview. *Res Rep Biol*. 2010;1:1-20.
35. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(6):539-52.
36. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M i sur. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. 2010;17(31):3751-68.

37. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Compr Physiol*. 2015;6(1):215-54.
38. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Therap*. 2013;139:32–40.
39. Avolio AP, Clyde KM, Beard TC, Cooke HM, Ho KK, O'Rourke MF. Improved arterial distensibility in normotensive subjects on a low salt diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1986;6(2):166–9.
40. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol*. 2016;594(17):4917–31.
41. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH. Reduced angiotensin II and oxidative stress contribute to impaired vasodilation in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *Hypertension*. 2005;45(4):687–91.
42. Durand MJ, Lombard JH. Low-dose angiotensin II infusion restores vascular function in cerebral arteries of high salt-fed rats by increasing copper/zinc superoxide dimutase expression. *Am J Hypertens*. 2013;26(6):739–47.
43. Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, Westin-Eriksson A, Wennbo H, Herslof M i sur. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2006;71(3):586-95.
44. Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Matrix Metalloproteases in Arterial Hypertension and their Trend after Antihypertensive Treatment. *Kidney Blood Press Res*. 2017;42:347-357.
45. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
46. Friese RS, Rao F, Khandrika S i sur. Matrix metalloproteinases: discrete elevations in essential hypertension and hypertensive end-stage renal disease. *Clin Exp Hypertens*. 2009;31(7):521-33.
47. McKee M, Britton A, Black N, McPherson K, Sanderson C, Bain C. Methods in health services research. Interpreting the evidence: choosing between randomised and non-randomised studies. *BMJ*. 1999;319(7205):312–5.
48. Yasmin, McEniery CM, Wallace S i sur. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372–378.

49. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 46: 298–306, 2000.
50. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse Cardiovascular Effects of Acute Salt Loading in Young Normotensive Individuals. *Hypertension*. 2008;(51):1525-1530.
51. Alispahić E. Utjecaj kratkotrajne dijeta s visokim udjelom soli na sastav tijela i vaskularnu reaktivnost u mikrocirkulacije kože u zdravih mladih muškaraca [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet; 2017. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:362060>. Datum pristupa: 08.03.2019.
52. Dupont JJ, Greaney JL, Wenner MM, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Farquhar WB i sur. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *J Hypertens*. 2013;31(3):530–6.
53. Liu F-Q, Mu J-J, Liu Z-Q, Shi D-C, Huang Q, Yuan Z-Y i sur. Endothelial dysfunction in normotensive salt-sensitive subjects. *J Hum Hypertens*. 2012;26(4):247–52.
54. Ishii M, Sugimoto T, Atarashi K, Igari T, Uehara Y i sur. Effects of high salt intake on hemodynamic responses to isometric exercise in normotensive subjects and in patients with essential hypertension. *Jpn Circ J*. 1983 Oct;47(10):1248-54.
55. Greaney JL, DuPont JJ, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Edwards DG, Farquhar WB. Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: role of oxidative stress. *J Physiol*. 2012;590(21):5519–28.
56. Lenasi H. *Microcirculation Revisited - From Molecules to Clinical Practice*. 1. izd. Rijeka: InTech; 2016.
57. Stupin A. Utjecaj dijeta s visokim udjelom soli na mikrovaskularnu reaktivnost u populaciji zdravih mladih žena [Disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet; 2013. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:920105>. Datum pristupa: 08.03.2019.
58. Starmans-Kool MJ, Stanton AV, Xu YY, McGThom CA, Parker KH, Hughes AD. High dietary salt intake increases carotid blood pressure and wave reflection in normotensive healthy young men. *J Appl Physiol* 2011; 110:468-471.

59. Domaćinović T. Mjerenje učinka dijete s visokim udjelom soli na aktivnost monocita/neutrofila na temelju izražaja adhezivne molekule CD11a metodom protočne citometrije [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet; 2018. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:064134>. Datum pristupa: 08.03.2019.



## 11. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime Ivana Gašpar  
 Akademska titula univ. bacc. med. lab. diagn.  
 Datum rođenja 27. lipnja 1995. u Splitu  
 Državljanstvo Hrvatsko  
 Adresa Put stare Duće 15, 21310 Omiš  
 Web adresa gaspar.ivana00@gmail.com

### Školovanje

2002. - 2010. Osnovna škola „Josip Pupačić” – Omiš  
 2010. - 2014. Srednja škola „Jure Kaštelan” – Omiš; Opća gimnazija  
 2014. - 2017. Preddiplomski sveučilišni studij  
 Medicinsko laboratorijska dijagnostika;  
 Odjel zdravstvenih studija Sveučilište u Splitu

### Osobne vještine i kompetencije

|                     |                                 |         |
|---------------------|---------------------------------|---------|
| Strani jezik        | Engleski                        | Tečno   |
| Strani jezik        | Talijanski                      | Osnovno |
| Korištenje računala | Microsoft office paket          |         |
|                     | SPSS program                    |         |
|                     | Synesis knjigovodstveni program |         |
| Vozačka dozvola     | B kategorija                    |         |

### Dodatni podaci

#### Kvalifikacijski rad:

- **Završni rad**

„Ispitivanje razlike u koncentraciji hormona prolaktina između dvije metode - postoji li razlika“. 2014. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu

**Sudjelovanje na kongresima:**

- **02. – 05. 06. 2016.** – Kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost s međunarodnim sudjelovanjem  
A. Barać, I. Gašpar, A. Jurić, M. Lovrić - usmeno izlaganje  
*„Učinkovitost laboratorijskih testova u dijagnozi neonatalne sepsse“*
- **06. 05. 2017.** – Simpozij personalizirana medicina
- **24. 04. 2018.** – Dan studenata Medicinskog fakulteta Osijek - DAMEO
- **10. – 11.05.2018.** – 4th International Cholnoky Symposium  
Gašpar I., Barać A. - usmeno izlaganje  
*„Ferokinetics – Diagnostic value of laboratory tests“*
- **07. – 09.06.2018.** – Kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost s međunarodnim sudjelovanjem  
Gašpar I. - poster prezentacija  
*„Mogućost uspoređivanja laboratorijskih rezultata u praćenju koncentracije prolaktina u serumu pacijenata“*
- **07. – 08.02.2019.** - Osječki studentski kongres OSCON  
Međunarodni kongres translacijske medicine studenata i mladih liječnika
- **08. – 13.04.2019.** – Festival znanosti 2019. Osijek  
Jurić A, Gašpar I, Barać A, Banović V. - poster prezentacija  
*„Koje je boje vaš urin?“*
- **17. – 22.06.2019.** – 11. ISABS (International Society for Applied Biological Sciences) konferencija Split  
Gašpar I, Jurić A, Barać A, Banović V, Lovrić M, Miškulin I. - poster prezentacija  
*„Do we know what is personalised medicine?“*

**Nagrade i priznanja**

- Nagrada i priznanje za izniman angažman u izvannastavnim aktivnostima 2017. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu.

**Volonterski rad**

- Udruga izviđača Omiš – Omiš