

Određivanje koncentracije 8-iso-prostaglandina F2a metodom ELISA u uzorcima seruma zdravih ispitanika na dijete s velikim udjelom soli

Katuša, Lorena

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:152:589121>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Lorena Katuša

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
8-ISO-PROSTAGLANDINA F_{2α}
METODOM ELISA U UZORCIMA
SERUMA ZDRAVIH 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**

Lorena Katuša

**ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE
8-ISO-PROSTAGLANDINA F2 α
METODOM ELISA U UZORCIMA
SERUMA ZDRAVIH 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 27 listova, 3 tablice i 6 slika

Zahvala

Želim se zahvaliti mentorici doc.dr.sc. Ani Stupin na predanoj pomoći i strpljenu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također se želim zahvaliti članovima komisije prof. dr. sc. Ines Drenjančević i doc.dr.sc. Aniti Matić.

Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima i braći na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali kroz cijelo moje školovanje, koji su vjerovali u mene kad i sama nisam i bili moji najglasniji navijači.

Također se zahvaljujem svim prijateljima koji su ovo životno razdoblje učinili lakšim i ljepšim.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Prekomjeren unos soli i arterijska hipertenzija	1
1.2. Utjecaj soli na patofiziologiju kardiovaskularnih bolesti	1
1.3. 8-iso-prostaglandin F2 α	5
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ	8
4. ISPITANICI I METODE	9
1.4. Ustroj studije	9
1.5. Ispitanici	9
1.6. Metode.....	10
1.7. Statističke metode	12
5. REZULTATI	14
6. RASPRAVA.....	17
7. ZAKLJUČAK.....	21
8. SAŽETAK.....	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS.....	28

POPIS KRATICA

8-iso-PGF₂ α — 8-iso-prostaglandin F₂ α

AŽS —autonomni živčani sustav

BMI— indeks tjelesne mase (engl. *bodymass indeks*)

COX —ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*)

COX-1 —ciklooksigenaza-1 (engl. *cyclooxygenase-1*)

COX-2 —ciklooksigenaza-2 (engl. *cyclooxygenase-2*)

DASH —Pristup prehrani za sprječavanje hipertenzije
(engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*)

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

DNA — deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

ELISA —metoda enzimumunokemijska analiza (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*)

eNOS—endotelna sintetaza dušikovog oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)

HR— puls (engl. *heart rate*)

HRP —enzim hrenovske peroksidaze (engl. *Horseradish Peroxidase*)

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

HRZZ —Hrvatska zaklada za znanost

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*)

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

RAS —reninangiotenzinski sustav

ROS —slobodni kisikovi radikali

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

SZO —Svjetska zdravstvena organizacija

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

Slika 1. Shema aktivacije RAS-a	3
Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje metabolita arahidonske kiseline	6
Slika 3. Priprema uzoraka i materijala za kvantifikaciju 8-iso-PGF2 α	10
Slika 4. Pipetiranje uzoraka i reagensa na testnu ploču prema uputama proizvođača.....	11
Slika 5. Spektrofotometar korišten za mjerenje intenziteta obojenja	12
Slika 6. Integralna programska podrška za izračun standardne krivulje i izračun apsorbance uzoraka na testnoj pločici	12
Slika 7. Utjecaj kratkotrajne (7-dnevne) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju 8-iso-prostaglandina F2 α (8-iso-PGF2 α) u zdravih mladih žena i muškaraca. .	16

POPIS TABLICA

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika.....14

Tablica 2. Hemodinamska obilježja ispitanika.....14

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24h urinu ispitanika.....15

1. UVOD

1.1. Prekomjieran unos soli i arterijska hipertenzija

Kardiovaskularne bolesti uzrokuju najveću stopu smrtnosti u svijetu, a među njima najznačajnija je arterijska hipertenzija, odnosno povišen krvni tlak (1). Na hipertenziju upućuje stalno povišen tlak iznad 140 mm/Hg sistolički te iznad 90 mm/Hg dijastolički (2). Brojni čimbenici poput pretilosti, sjedilačkog načina života, genske predispozicije i starenja uzrokuju hipertenziju, a ključan je među njima, na kojeg možemo utjecati, visok unos soli (3 - 4).

Unos soli u organizam u današnje vrijeme višestruko je veći od potrebnog, s prosječnim dnevnim unosom od 9 do 12 grama. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) dnevni unos kuhinjske soli trebao bi iznositi manje od 2 grama natrija odnosno do 5 grama kuhinjske soli na dan (5). Prema istraživanjima provedenim u Republici Hrvatskoj, prosječan dnevni unos soli iznosio je 11,6 grama, što je dvostruko više nego preporučeno, pri čemu žene prosječno konzumiraju 10,2 grama, a muškarci 13,3 grama dnevno (6 - 7).

Tako dijeta bogata solju predstavlja vodeći problem u razvijenim zemljama jer uzrokuje nastanak i progresiju arterijske hipertenzije, ali također uzrokuje oštećenje vaskularne i endotelne funkcije i kod normotenzivnih ispitanika čime predstavlja veliki javnozdravstveni problem (4, 8). WASH-pokret (engl. *World Action on Salt and Health Movement*, WASH) osnovan 2005. godine za cilj ima promicanje smanjenja količine unosa soli u svijetu (9). Kako bi se populaciji približile smjernice za prehranu sa smanjenim udjelom soli izdane su DASH-preporuke (engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*, DASH) (10). Cilj je smanjiti unos soli i posljedično smanjiti prevalenciju arterijske hipertenzije.

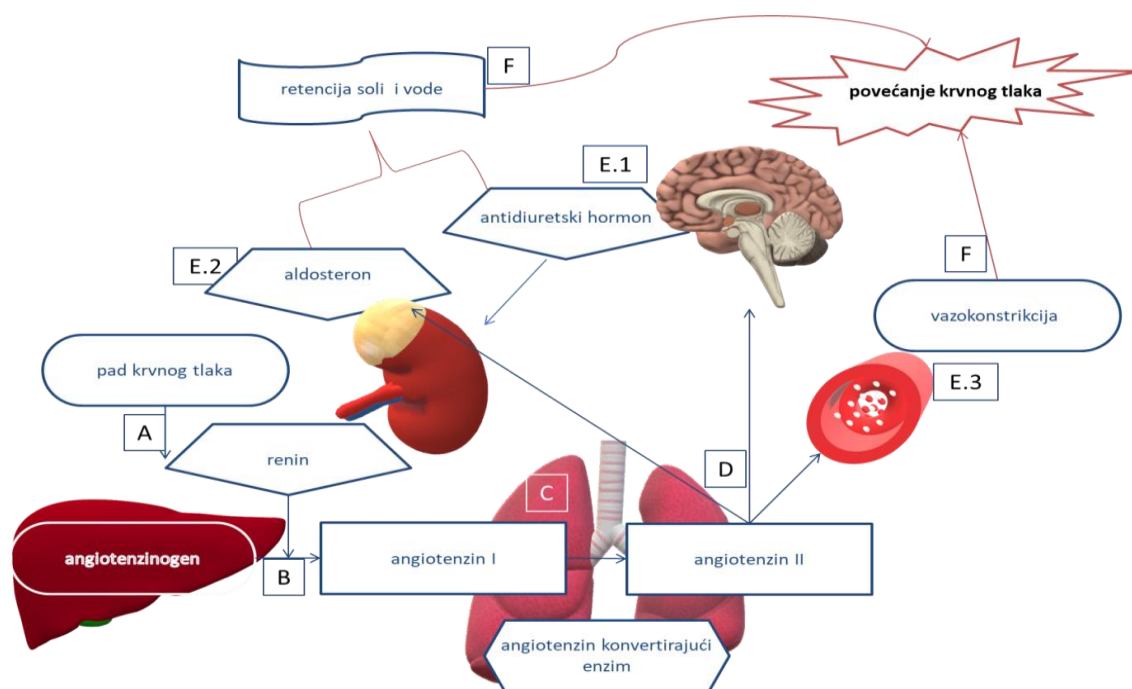
1.2. Utjecaj soli na patofiziologiju kardiovaskularnih bolesti

Istraživanja koja su se bavila proučavanjem mehanizma utjecaja soli na razvoj kardiovaskularnih bolesti pogotovo hipertenzije u najvećem su broju provedena na animalnim modelima. Osim animalnih studija, rađena su istraživanja na humanim modelima. Nekolicina

je onih koji su se bavili utjecajem kratkotrajnih visokih količina soli na mlade normotenzivne ispitanike. Te su studije pokazale da kratkotrajna visoko slana dijeta dovodi do endotelne disfunkcije na makrocirkularnoj, ali i mikrocirkularnoj razini neovisno o povišenju krvnog tlaka (2, 11). Humani modeli daju bolji *in vivo* uvid na djelovanje soli na organizam, ali neinvazivnost metoda predstavlja svojevrsnu prepreku za opsežnija istraživanja (12).

Iako su brojna istraživanja pokazala neupitnu povezanost prekomjernog unosa kuhinjske soli i nastanka vaskularne odnosno endotelne disfunkcije, nije u potpunosti objašnjen mehanizam nastanka. Predloženi su izgledni patofiziološki putovi nastanka uključujući autonomni živčani sustav (AŽS), renin-angiotenzinski sustav (RAS) i endotelno-leukocitna interakcija (2, 13).

Endotel ima funkciju kontrole vaskularnog tonusa, inhibicije agregacije trombocita te propusnosti vaskularne stjenke, a samim time regulira krvni protok (14). Zdrav endotel krvnih žila osnovna je pretpostavka za kardiovaskularno zdravlje (15). Ukoliko dođe do razvoja endotelne disfunkcije smanjuje se produkcija i/ili biodostupnost vazodilatatora dušikovog oksida (NO) i/ili postoji neravnoteža između endotel-ovisnih vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih metabolita arahidonske kiseline (15). Takvo stanje dovodi do nerazmjera raspoloživosti NO-a i aktivnosti vazokonstriksijskih čimbenika, a samim time i do povećanog rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Kako bi organizam očuvao bioravnotežu, aktivira se RAS (15).



Slika 1. Shema aktivacije RAS-a
(izradila autorica)

A) pad krvnog tlaka u bubrezima aktivira lučenje renina; **B)** renin u jetri konvertira angiotenzinogen u agiotenzin I; **C)** u plućima angiotenzin konvertirajući enzim konvertira angiotenzin I u angiotenzin II; **D)** angiotenzin II djeluje na krvne žile, nadbubrežnu žlijezdu i hipofizu; **E.1)** potiče lučenje antidiuretskog hormona iz hipofize; **E.2)** djeluje na lučenje aldosterona iz nadbubrežne žlijezde; **E.3)** direktno povećava krvni tlak djelujući vazokonstriktorno na krvne žile; **F)** retencija soli i vode te vazokonstrikcija dovodi do povećanja krvnog tlaka.

Uloga RAS-aje regulacija ravnoteže elektrolita naročito natrija i kalija te s tim povezanog volumena tjelesnih tekućina (2). Konačni produkt jest angiotenzin II koji je odgovoran za većinu učinaka tog sustava: vazokonstrikciju venula i arteriola, lučenje antidiuretskog hormona iz hipofize, aldosterona iz nadbubrežne žlijezde koji u konačnici imaju za posljedicu porast sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka (2).

Kao što je poznato, arterijski krvni tlak i ekskreciju natrija regulira upravo RAS. Dijeta bogata solju, odnosno, velika koncentracija natrija u krvi suprimira stvaranje angiotenzina II. U odsustvu bubrežne bolesti ili sličnih oštećenja organizam tim mehanizmom regulira ekskreciju natrija urinom. Međutim, velike količine cirkulirajućeg angotenzina II kod

poremećaja RAS-a dovode do oksidativnog stresa koji vodi u endotelnu disfunkciju i upalu (15). Logika bi nalagala da smanjena koncentracija angiotenzina II dovodi do povećane ekskrecije natrija čime bi se uspostavio normalan krvni tlak. Međutim, danas istraživači izvještavaju kako kronična, kontinuirana ishrana bogata solju, odnosno, kronično niska koncentracija angiotenzina II dovodi do oksidativnog stresa i vaskularne disfunkcije koje opet dovode do pojave hipertenzije i posljedično drugih kardiovaskularnih stanja i bolesti (15).

Dakle, oksidativni stres ima važnu (ako ne i ključnu) ulogu u nastanku endotelne disfunkcije. Oksidativni stres definira se kao stanje poremećenog odnosa proizvedenih slobodnih kisikovih radikala (engl. *reactiveoxygenspecies*, ROS) i antioksidansa, kao njihovih pandana. Suvišak ROS-a igra važnu ulogu u upalnom odgovoru, rastu stanica, apoptozi i izmjeni vaskularnog odgovora kao i u oksidaciji kolesterola niske gustoće što se povezuje s ranim razvojem ateroskleroze (17). Salinitet krvi dovodi do osmolitičkog i ionskog stresa koji dovodi do proizvodnje ROS-a (17). Proizvodnja ROS-a u endotelu krvnih žila povećana je u svim stanjima koja dovode do arterosklerotskih promjena kardiovaskularnih bolesti kao što su hipertenzija, dijabetes i dislipidemija (17).

Istraživanja provedena na animalnim modelima (osobito štakorima) pokazala su da kratkotrajna HS dijeta smanjuje ekspresiju i aktivnost antioksidativnih enzima, što samostalno ili u kombinaciji s povećanom aktivnosti prooksidativnih enzima rezultira nastankom oksidativnog stresa (18).

Slobodni radikali su kemijske vrste s nesparenim elektronom u vanjskoj orbitali, izrazito nestabilni i reaktivni (19). Kako bi sparili svoj slobodni elektron, slobodni radikali stupaju u reakciju s biološkim molekulama poput proteina, lipida, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina uzrokujući njihovo oštećenje (19). ROS uključuje sve nestabilne metabolite molekularnog kisika (O_2) koji imaju višu reaktivnost nego O_2 , poput superoksid radikala ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilnog radikala (HO^{\bullet}) i ne-radikalnih molekula kao što je vodikov peroksid (H_2O_2) (15, 19). Ti su metaboliti generirani kao nusprodukti normalnog aerobnog metabolizma, ali njihova se razina povećava pod stresom što dokazuje da je osnovni zdravstveni rizik (19). Upravo zbog tih svojstava, ako je u stanicama došlo do oksidativnog stresa, odnosno neuravnotežene neutralizacije ROS-a, nastaju mutacije, poremećaj građe aminokiselina i membrana, hidroksilacija DNA (engl. *deoxyribonucleicacid*, DNA), pojačana je apoptoza stanica, što sve može dovesti do kroničnih kardiovaskularnih bolesti kao što su

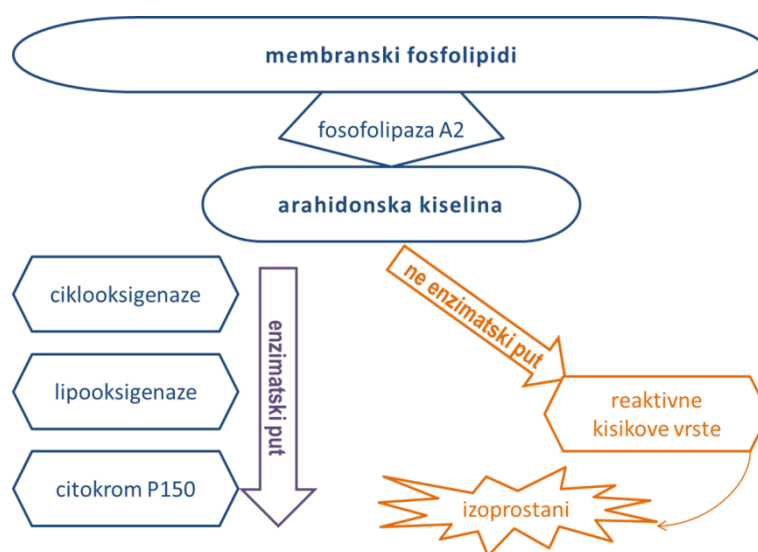
ateroskleroza te kardiomiopatija, ali i do neurodegenerativnih bolesti (Huntingtonova, Alzheimerova i Parkinsonova bolest) (19). U organizmu su najzastupljeniji slobodni radikali reaktivni kisikovi spojevi. Oni su povezani s enzimima koji proizvode vazoaktivne metabolite, na način da promjene produkciju COX (engl. *cyclooxygenase*, COX) enzima u smjeru vazokonstriktora ili na način da smanjuju biodostupnost NO-a (15). ROS dovodi do pojačane lipidne peroksidacije i smanjenja dostupnosti endotelne sintetaze dušikovog oksida (engl. *endothelialnitricoxidesynthases*, eNOS) pa i produkcije NO-a što ukupno dovodi do endotelne disfunkcije i do razvoja hipertenzije. Sve veći broj studija na animalnim modelima pokazuje kako je inhibicija RAS-a uzrokovana prekomjernim unosom soli važna spona u posljedičnom povišenju razine oksidativnog stresa i nastanku endotelne disfunkcije (19 - 20).

1.3. 8-iso-prostaglandin F2 α

Arahidonska kiselina je polinezasićena masna kiselina koja je sastavni dio staničnih membrana. Njen esterificirani oblik u slobodnu međustaničnu tekućinu odvajaju fosfolipaze s naglaskom na fosfolipazu A2 (21). Daljnji metabolizam igra važnu ulogu u pravilnom funkcioniranju vaskularnog i imunskog sustava, promoviranju i razrješavanju upalnih stanja i alergija, ali i drugih životno važnih funkcija (21). Slobodna arahidonska kiselina može krenuti različitim enzimatskim kaskadama uključujući put ciklooksigenaza, lipooksigenaza, citokrom p450 ili anandaminski put (21). Put ciklooksigenaza uključuje ciklooksigenazu-1 (engl. *cyclooxygenase-1*, COX-1) i ciklooksigenazu-2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2), koje arahidonsku kiselinu dalje transformiraju u različite prostaglandine (22). Izomeri prostaglandina prisutni su kod ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (15). Neinvazivna istraživanja provedena na zdravim pojedincima istraživala su utjecaj visoko slane dijeta upravo na derivate COX-a gdje je pokazano kako odstupanje u regulaciji poglavito COX-1 enzima dovodi do mikrovaskularne endotelne disfunkcije uslijed sedmodnevne dijeta s velikim udjelom soli (18, 22).

Osim navedenih enzimatskih putova, arahidonska kiselina može krenuti i neenzimatskim putem djelovanjem ROS-a (22). Neenzimatskim putem djelovanjem ROS-a proizvode se isoprostani. Isoprostani su prostaglandinu slični spojevi koji nastaju peroksidacijom arahidonske kiseline slobodnim radikalima. Jedan od tih izoprostana je 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α) - potentan vazokonstriktor i stanični biomarker oksidativnog stresa (22). Ima važnu ulogu u ženskom reproduktivnom sustavu (ovulacija i kontrakcija maternice), miokardijalnoj disfunkciji te kontrakciji arterija (22). Koncentracija 8-

iso-PGF2 α raste u akutnoj i kroničnoj upali, koji nastaju iz oksidativnog metabolizma arahidonske kiseline inducirajući ekspresiju određenih upalnih citokina koji povećavaju produkciju ROS-a (18, 22 - 23). Na animalnim modelima, poglavito štakorima, kratkotrajna visoko slana dijeta dovodi do promjene u vazokonstrikciji i vazodilataciji djelujući na mikrocirkulaciju (24), što se povezuje s povećanom koncentracijom vazokonstriktora uključujući 8-iso-PGF2 α (25).



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje metabolita arahidonske kiseline
(izradila autorica)

Budući da se u novije vrijeme sve više uočava uloga prostaglandina u procesima upale i oksidativnog stresa, sve se više istražuje njihova funkcija te je njihovo mjerenje jedno od uobičajenih metoda za procjenu oksidativnog stresa kako u animalnim tako i u humanim istraživanjima. Ipak, daljnja istraživanja su nužna za bolje razumijevanje utjecaja prehrane s velikim udjelom soli na stvaranje 8-iso-PGF2 α te njegovog posljedičnog utjecaja na razvoj endotelne disfunkcije u odsustvu povišenog krvnog tlaka te potencijalno na njegove prediktorske vrijednosti u smislu biljega oksidativnog stresa.

2. HIPOTEZA

Tjedan dana dijete s velikim udjelom kuhinjske soli povećat će koncentraciju 8-iso-prostaglandina F₂α (kao jednog od indikatora povećane razine oksidativnog stresa) u serumu zdravih mladih ispitanika obaju spolova.

3. CILJ

Cilj je ovog istraživanja odrediti učinak kratkotrajne dijeta s velikim udjelom soli na koncentraciju 8-iso-prostaglandina F_{2α} u uzorcima seruma metodom ELISA u zdravih mladih pojedinaca.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao nerandomizirani klinički pokus u kojem su svi ispitanici bili podvrgnuti istom protokolu te su sami sebi bili kontrola (26). U istraživanju je sudjelovalo 20 zdravih mladih ispitanika obaju spolova (ukupno 60 posjeta Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta i obrada 60 uzoraka u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju).

Promatranaje studija dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-2016-06-8744) i odobrilo ju je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/15-08/08, Broj: 2158-61-07-15-68).

4.2. Ispitanici

U studiji je sudjelovalo 20 zdravih mladih pojedinaca obaju spolova koji su bili regrutirani putem oglasa na Medicinskom fakultetu Osijek. Isključni kriteriji za sudjelovanje u istraživanju bili su hipertenzija ili hipotenzija, koronarna bolest, šećerna bolest, hiperlipidemija, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila. Isključni kriteriji su također bili uzimanje oralnih kontraceptiva, antihipertenziva, protuupalnih nesteroidnih lijekova, steroida ili lijekova koji su mogli imati utjecaj na endotel. Svi su ispitanici bili detaljno informirani o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja. Također, svaki je ispitanik morao potpisati informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja.

Svi su ispitanici prvo bili sedam dana na dijeti s malim udjelom kuhinjske soli (engl. *lowsalt*, LS) koja je podrazumijevala unos oko 3,5 grama kuhinjske soli dnevno (DASH-dijeta) te predstavlja tzv. period ispiranja. Potom su ispitanici sedam dana bili na dijeti s velikim udjelom kuhinjske soli (engl. *highsalt*, HS). Hranom su i dalje unosili oko 3,5 grama soli, dok su ostatak od 11,7 grama kuhinjske soli nadomjestili u obliku praha soli (ukupno oko 14 grama soli dnevno) (10). Tijekom studije imali su ukupno tri posjeta

4. Ispitanici i metode

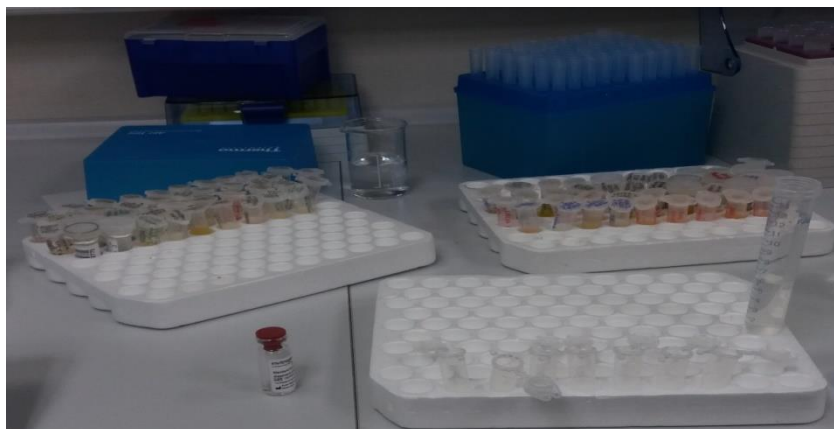
Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta (LFKKS), prije i poslije opisanih dijetnih protokola.

4.3. Metode

Pri svakom posjetu ispitanicima je bio izmjeren arterijski tlak, indeks tjelesne mase (engl. *bodymassindex*, BMI), omjer opsega struka i bokova (engl. *waist-to-hip ratio*, WHR) te su uzeti uzorci prikupljenog 24-satnog urina te uzorak venske krvi.

Nakon 15 minuta mirovanja u sjedećem položaju, mjerio se arterijski tlak pri početku svakog dolaska u LFKKS. Prosjek triju uzastopnih mjerenja automatskim oscilometrom (OMRON, Osaka, Japan) uzet je kao konačna vrijednost mjerenja. Uporabom empirijski izvedenih formula izračunat je BMI. Iz uzorka 24-satnog urina mjerena su sljedeća biokemijska obilježja: natrij, kalij, urea i koeficijent kreatinina. Dnevni unos kuhinjske soli u gramima izračunat je iz vrijednosti 24-satne natrijureze. Tim mjerenjem potvrđivalo se pridržavanje dijetnog protokola svih ispitanika.

Svim je ispitanicima bio uzet uzorak venske krvi. Koncentracija 8-iso-PGF₂ α određivala se iz seruma ELISA metodom (eng. *enzyme-linkedimmunosorbentassay*, ELISA) u duplikatu u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju. Kvantifikacija 8-iso-PGF₂ α vršena je tvorničkim kitom Human 8-iso-prostaglandin F₂ α ELISA kit (MyBioSource, San Diego, California, United States) prema uputama proizvođača. Korišteni kit samo je za istraživačke svrhe, ne i za kvantifikaciju u svrhu dijagnostike.



Slika 3. Priprema uzoraka i materijala za kvantifikaciju 8-iso-PGF₂ α
(fotografirala autorica)

4. Ispitanici i metode

Korištena ELISA metoda je ELISA metoda uz kompetitivnu inhibiciju. Specifična antitijela vezana su na dno testnih jamica te se u njih dodaju standard i uzorak. Dodaje se također prvi detekcijski reagens koji je zapravo biotinom obilježen antigen. Analit od interesa i biotinom obilježen antigen kompetitivno se vezuju za imobilizirana antitijela. Nakon inkubacije nevezani se konjugat ispiru.



Slika 4. Pipetiranje uzoraka i reagensa na testnu ploču prema uputama proizvođača (fotografirala autorica)

Sljedeći je korak dodavanje enzima hrenovske peroksidaze (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) koja je konjugirana avidinom. Poslije inkubacije dodaje se supstrat HRP-a, kromogen. Testna smjesa mijenja boju u plavu katalitičkom aktivnosti peroksidaze te dodatkom kiseline testna jamica mijenja boju u žutu. Što je koncentracija analita u uzorku veća, inhibicija vezanog obilježenog antigena i antitijela je jača i posljedično je slabiji intenzitet žute boje. Naposljetku se dodaje otopina koja zaustavlja reakciju. Konačni intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji ispitivanog analita u uzorku, u ovom slučaju 8-iso-PGF 2α . Inkubacija se odvijala uz miješanje automatskim instrumentom VIBROMIX 40 (Tehtnica Železniki, Železniki, Slovenia).

Mjerenje intenziteta obojenja, odnosno apsorbance, rađeno je pomoću spektrofotometra uz korištenje standardne krivulje (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California).

4. Ispitanici i metode



Slika 5. Spektrofotometar korišten za mjerenje intenziteta obojenja
(fotografirala autorica)



Slika 6. Integralna programska podrška za izračun standardne krivulje i izračun apsorbance
uzoraka na testnoj pločici
(fotografirala autorica)

4.4. Statističke metode

4. Ispitanici i metode

Svi rezultati prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Obilježja mjerena prije održanoga HS protokola i nakon njega (nakon perioda ispiranja i poslije HS dijete) uspoređivani su t-testom 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, SystatSoftware, Inc, Chicago, USA).

5. REZULTATI

U ovom istraživanju korišteni su uzorci dobiveni od 20 mladih zdravih ispitanika obaju spolova od kojih je bilo 10 žena i 10 muškaraca. Njihova srednja dob bila je 20 godina uz standardnu devijaciju 1. Antropometrijska obilježja ispitanika mjerena prije i poslije protokola prikazana su u Tablici 1. Tjedan dana HS dijete nije doveo do statistički značajne promjene BMI-a i WHR-a u zdravih mladih ispitanika obaju spolova, što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Antropometrijska obilježja ispitanika

Obilježje*	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	Žene		Muškarci	
	Prije HS†	Poslije HS†	Prije HS†	Poslije HS†
BMI (kg/m ²)	22,8 (2,3)	22,6 (2,4)	23,1 (2,8)	23,4 (2,9)
WHR	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

Promjene hemodinamskih obilježja mjerenih prije i nakon protokola prikazane su u Tablici 2. Prije provedenog HS protokola i nakon njega nije došlo do statistički značajne razlike u vrijednostima arterijskog tlaka i pulsa u zdravih mladih ispitanika obaju spolova.

Tablica 2. Hemodinamska obilježja ispitanika

Obilježje*	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	Žene		Muškarci	
	Prije HS†	Poslije HS†	Prije HS†	Poslije HS†
SBP (mmHg)	111 (6)	112 (9)	123 (9)	124 (6)
DBP (mmHg)	74 (6)	74 (9)	77 (7)	74 (8)
MAP (mmHg)	86 (6)	87 (8)	92 (7)	91 (7)
HR (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

Tjedan dana HS dijete uzrokovao je statistički značajno povećanje 24h natrijureze, a time i izračunatog dnevnog unosa soli u zdravih mladih ispitanika obaju spolova. Mjerenjem ekskrecije natrija i izračunom dnevnog unosa natrija u uzorku 24-satnog urina potvrđeno je da su se ispitanici pridržavali dijetnog protokola (Tablica 3.). Tjedan dana HS dijete nije uzrokovao statistički značajnu promjenu drugih obilježja mjerenih iz 24h urina: volumena 24 h urina, kalija, uree i koeficijenta kreatinina.

Tablica 3. Biokemijska obilježja u 24h urinu ispitanika

Obilježje	Aritmetička sredina (standardna devijacija)			
	Žene		Muškarci	
	Prije HS*	Poslije HS*	Prije HS*	Poslije HS*
Volumen 24h urina	1415 (556)	1460 (712)	1400 (668)	1411 (523)
Natrij u 24h urinu (mmol/Du)	79,1 (27,3)	211,6 (71,1) [†]	102,4 (44,2)	284,5 (108,4) [‡]
Izračunat unos	4,6 (1,6)	12,4 (4,2) [§]	6,0 (2,6)	16,6 (6,3)
Kalij u 24h urinu	34,9 (13,7)	40,4 (29,6)	49,0 (19,9)	62,9 (27,4)
Urea u 24h urinu	174,8 (51,5)	209,4 (128,8)	353,9 (102,6)	446,44 (281,1)
Koeficijent kreatinina u 24h urinu	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

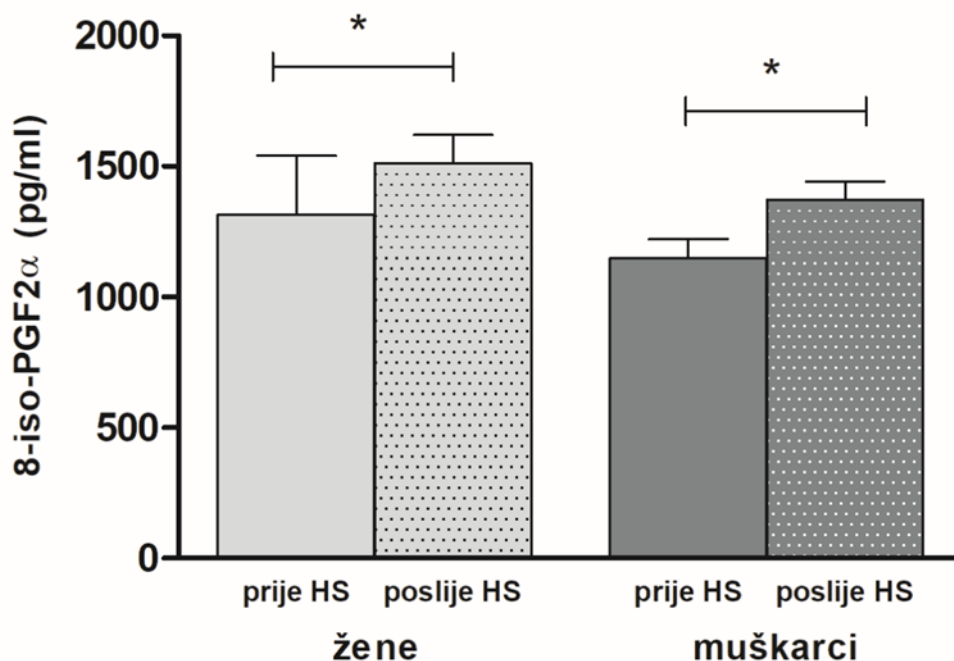
† t-test za zavisne uzorke, $p < 0,001$

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

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

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

Na Slici 6. prikazan je utjecaj sedmodnevne dijete s visokim udjelom soli na serumsku koncentraciju 8-iso-PGF2 α u populaciji mladih zdravih žena i muškaraca. Tjedan dana HS dijete uzrokovao je statistički značajno povećanje serumske koncentracije 8-iso-PGF2 α u zdravih mladih ispitanika obaju spolova.



Slika 7. Utjecaj kratkotrajne (7-dnevne) dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli na serumsku koncentraciju 8-iso-prostaglandina F2 α (8-iso-PGF2 α) u zdravih mladih žena i muškaraca. Stupići označuju aritmetičku sredinu, a horizontalne crte standardnu devijaciju serumske koncentracije 8-iso-PGF2 α u promatranim skupinama.

*p žene p=0,020; muškarci p<0,001.

8-iso-PGF2 α – 8-isoprostaglandin F2 α ; HS – prehrana s visokim udjelom soli.

6. RASPRAVA

Sedmodnevna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovala je statistički značajno povećanje serumske koncentracije 8-iso-PGF 2α u zdravih mladih ispitanika obaju spolova neovisno o promjenama arterijskog krvnog tlaka. Rezultat ukazuje na važnost povišene razine oksidativnog stresa u patofiziološkom algoritmu nastanka endotelne disfunkcije uslijed povećanog unosa soli u organizam.

Kao i brojna druga istraživanja, ova istraživačka skupina u svojim ranijim istraživanjima pokazala je da kratkotrajna dijeta s velikim udjelom soli negativno utječe na vaskularnu i endotelnu funkciju u zdravih mladih ispitanika. Međutim, nisu do kraja ispitani učinci kuhinjske soli na potencijalne mehanizme i s tim povezane biomarkere koji posreduju takav učinak (27 - 28). Kako je 8-iso-PGF 2α metabolit koji se koristi kao marker oksidativnog stresa, a između ostalog je i potentan vazokonstriktor i na taj način utječe na posljedične promjene endotela (22), nužno je bilo izmjeriti njegovu koncentraciju ovisno o promjenama količina unosa soli u organizam. Naime, studije na animalnim modelima pokazale su da oksidativni stres ima ključnu ulogu u nastanku endotelne disfunkcije uslijed velikog unosa soli u organizam. Ipak, humana istraživanja još uvijek nisu daleko odmaknula u istraživanju i rasvjetljavanju mehanizama koji posreduju takve promjene, a među kojima je i oksidativni stres.

Povećan unos soli u organizam u općoj populaciji problem je kojeg su brojna istraživanja istaknula kao preteču razvoja teških kardiovaskularnih bolesti. Isto tako, sve se više ističe da smanjenje unosa soli na razinu od preporučenih 5 grama po danu ima pozitivan učinak na zdravlje (2). Bitno je za istaknuti da sistolički arterijski tlak, dijastolički arterijski tlak, srednji arterijski tlak i puls koji su mjereni u ovom istraživanju nisu bili statistički značajno primijenjeni nakon HS dijete. Ti su nalazi u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala kako sedmodnevna dijeta bogata solju ne uzrokuje promjenu hemodinamskih obilježja (11, 29), konkretno arterijskoga tlaka. Takav nalaz govori u prilog tomu da velik unos soli u organizam može imati štetan učinak na vaskularnu i endotelnu funkciju neovisno o promjenama arterijskoga tlaka. Ti su rezultati bitni, jer su do sada hipertenzivni pacijenti bili u fokusu proučavanja utjecaja prehrane bogate solju, dok su

normotenzivni zdravi pojedinci, a time i učinci soli na organizam koji su neovisni od promjena arterijskoga tlaka proučavani u manjoj mjeri (11, 29).

Prema dostupnim podacima i našim saznanjima, znanstvenici još uvijek nisu uspjeli točno utvrditi vrijeme za koje bi dijeta s visokim udjelom soli dovela do endotelne disfunkcije u mjeri u kojoj bi ona utjecala na povišenje krvnog tlaka kod zdravih osoba (31). Istraživanja koja su se bavila utjecajem soli na endotel tijekom 7 odnosno 14 dana (27, 31) su gotovo sva jednoznačno pokazala da velik unos soli u tom periodu ne uzrokuje značajno povećanje krvnog tlaka. Takvi su rezultati bitni kako bi se mogli razlučiti stvarni učinci velikog unosa soli na vaskularnu funkciju od onih koji su uzrokovani povišenjem arterijskog tlaka (dokumentirani u brojnim istraživanjima na populaciji hipertenzivnih pacijenata).

Kako bi se izbjegla svojevrsna pristranost i pogreške mjerenja, svi su ispitanici prije primjenjivanja sedmodnevne visoko slane dijetete bili na niskoj slanoj dijeti sedam dana. Naime, ovo istraživanje je pokazalo kako je prosječan unos soli prije ulaska u studiju za žene iznosio $7,7 \pm 3,1$ grama, dok je kod muškaraca iznosio 8 ± 3 grama. Ti su nalazi u skladu s prije iznesenim podacima u zemlji i svijetu gdje je pokazano kako muškarci unose više kuhinjske soli u organizam u odnosu na žene (32, 28). Dakle, LS dijetni protokol značio je unos ograničene, smanjene, količine soli za sve ispitanike prema DASH-planu prehrane (10). Sedmodnevni period bio je zapravo period ispiranja soli iz organizma kako bi se količina soli dovela na preporučenih 5 grama po danu. Nakon tog perioda mjerena je koncentracija serumskog 8-iso-PGF 2α čija se vrijednost uspoređivala s koncentracijom mjerenom poslije HS protokola. Nakon perioda ispiranja, ispitanici su prema HS protokolu sedam dana bili na dijeti koja je pretpostavljala prosječan unos 14 grama soli dnevno.

Zlatni standard za određivanje prosječnog unosa soli u organizam je metoda mjerenja ekskrecije natrija u 24-satnom urinu i izračun dnevnog unosa natrija te je ona korištena kako bi se potvrdilo pridržavanje protokola svih ispitanika. U ovom istraživanju potvrđeno je kako su se svi ispitanici pridržavali svih uputa jer su oba obilježja bila statistički značajno povećana ($p < 0,05$). Druga mjerena obilježja u 24-satnom urinu nisu bila statistički značajno promijenjena uslijed sedmodnevne HS dijetete.

Kratkotrajna dijeta bogata solju u promatranom istraživanju nije dovela do promjene indeksa tjelesne mase kao niti promjene omjera struka i bokova, što je u skladu s rezultatima

prijašnjih istraživanja te istraživačke skupine (11, 28). U nedavnoj je studiji pokazano da tjedan dana HS dijete nije uzrokovalo značajno promjenu BMI-a, WHR-a, niti sastava tijela i tjelesnih tekućina.

Ova istraživačka skupina vršila je pokuse mjerenja reaktivnosti mikrocirkulacije kože kod osoba koje su se hranile prehranom bogatom solju. Pokazano je kako, za oba spola, HS prehrana dovodi do pogoršanja mikrovaskularne reaktivnosti neovisno o spolu (32, 28). Nadalje, istraživanja provedena također na zdravim mladim ispitanicima pokazala su kako muškarci imaju različit odgovor HS dijete na endotelnu produkciju NO-a u odnosu na žene (28). Kao što je poznato, smanjena biodostupnost NO-a dovodi do vaskularne disfunkcije mehanizmom smanjene vaskularne relaksacije (33). Teoretski, nastanak endotelne disfunkcije naročito je posredovan smanjenom biodostupnošću NO-a pa se dolazi do zaključka kako postoji razlika u patofiziologiji među spolovima (15).

Ova istraživačka skupina također je pokazala kako HS dijeta kod zdravih mladih žena negativno utječe na mikrovaskularnu funkciju preko vazokonstriktorskih metabolita COX enzima (32, 31). Međutim, izoprostani su entiteti koji se proizvode neenzimatskim putem djelovanjem ROS-a (22). Proučavani 8-iso-PGF2 α snažan je vazokonstriktor i stanični biomarker oksidativnog stresa koji dodatno potencira produkciju ROS-a inducirajući ekspresiju pojedinih citokina. Tako se stvara mehanizam koji dodatno utječe i perpeturira povoljno okruženje za nastanak endotelne disfunkcije. Kako je pokazano, koncentracija 8-iso-PGF2 α raste u kroničnoj upali. Oksidativni stres snažno se povezuje s nastankom endotelne disfunkcije, a na animalnim modelima (34) pokazano je kako kratkotrajna HS dijeta dovodi do promjene mikrocirkulacije i povezuje se s povećanom koncentracijom prostaglandina uključujući 8-iso-PGF2 α (35). Ti rezultati po prvi puta pokazuju utjecaj HS dijete na mjerljive biljege oksidativnog stresa, odnosno na povećanje serumskog 8-iso-PGF2 α nakon tjedan dana HS dijete u zdravih ispitanika, što je tek jedan djelić slagalice rasvjetljavanja uloge oksidativnog stresa u nastanku endotelne disfunkcije uzrokovane HS dijetom.

Opće prihvaćena činjenica je da unos velikih količina kuhinjske soli štetno utječe na zdravlje. Velikim unosom soli povećava se rizik za razvoj hipertenzije i drugih kardiovaskularnih bolesti. Sve veći broj istraživanja ističe da čak i kratkotrajan velik unos soli dovodi do oštećenja tkiva, naročito endotela, na svim vaskularnim razinama – i u makrocirkulaciji i u mikrocirkulaciji. Ova je istraživačka skupina u prijašnjim istraživanjima

pokazala kako sedmodnevna dijeta dovodi do funkcionalnih promjena endotela. Ovo istraživanje je bilo jedan korak dalje u cilju rasvjetljavanja uloge povećanog oksidativnog stresa u patofiziološkom algoritmu razvoja endotelne funkcije uslijed velikog unosa soli u organizam. Rezultati su istraživanja po prvi puta pokazali da 7-dnevna dijeta s velikim udjelom soli dovodi do povećanja serumske koncentracije 8-iso-PGF 2α (vazokonstriktor i biljeg oksidativnog stresa) u populaciji mladih zdravih ispitanika, čime je pokazano kako prehrana s velikom količinom soli dovodi do povećanja oksidativnog stresa koje posljedično može uzrokovati oštećenja endotela i vaskularne reaktivnosti, neovisno o promjenama arterijskoga tlaka.

7. ZAKLJUČAK

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

- Kod ispitanika obaju spolova kratkotrajna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli nije dovela do promjene indeksa tjelesne mase niti omjera struk-bokovi
- Mjereni hemodinamski parametri nakon 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli (arterijski tlak i puls) nisu bili promijenjeni u odnosu na mjerene vrijednosti prije sedmodnevne visokoslane dijeta
- Značajnim porastom 24-satne natrij urezei izračunatog dnevnog unosa soli u organizam utvrđeno je kako su se ispitanici pridržavali zadanog dijetnog protokola
- Sedmodnevna dijeta s velikim udjelom kuhinjske soli uzrokovala je statistički značajno povećanje serumske koncentracije 8-iso-prostaglandina F_{2α}, mjenog ELISA metodom, što ukazuje na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku endotelne disfunkcije uslijed velikog unosa soli u organizam.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učinak 7-dnevne dijeta s velikim udjelom soli na koncentraciju 8-iso-prostaglandina F_{2α} u uzorcima seruma metodom ELISA u zdravih mladih pojedinaca.

Nacrt studije: Nerandomizirani kontrolirani klinički pokus.

Ispitanici i metode: U studiju je bilo uključeno 20 mladih zdravih normotenzivnih osoba obaju spolova. Ispitanici su prvo bili 7 dana na dijeti s malim udjelom soli (LS dijeta), a potom 7 dana na dijeti s velikim udjelom soli (HS dijeta). Prije i poslije HS dijeta svim je ispitanicima mjeren indeks tjelesne mase (BMI), omjer struk-bokovi (WHR), arterijski tlak i puls te analiziran 24-satni urin. U uzorku venske krvi određena je koncentracija serumskog 8-iso-PGF_{2α} metodom ELISA.

Rezultati: BMI i WHR nisu bili statistički značajno promijenjeni kao niti arterijski tlak i puls prije i nakon HS protokola. Značajno povećana 24h natrijureza nakon HS dijeta potvrdila je pridržavanje ispitanika. Sedam dana HS dijeta uzrokovalo je statistički značajno povećanje serumske koncentracije 8-iso-PGF_{2α}.

Zaključak: Sedam dana HS dijeta uzrokovalo je značajno povećanje serumske koncentracije 8-iso-PGF_{2α} u zdravih mladih ispitanika, što ukazuje na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku endotelne disfunkcije uslijed velikog unosa soli u organizam.

Ključne riječi: kuhinjska sol, reninangiotenzin sustav, oksidativni stres, arahidonska kiselina, 8-iso-prostaglandin F_{2α}

9. SUMMARY

Measurement of 8-iso-prostaglandin F2 α in serum of healthy individuals on high-salt diet using ELISA method

Objectives: The aim of the present study was to determine the effect of a 7-day high-salt diet on the concentration of 8-iso-prostaglandin F2 α in serum samples by ELISA method in healthy young individuals.

Study design: Non-randomized controlled trial.

Participants and methods: The study included 20 young healthy normotensive individuals of both sexes. The subjects were first on a low salt diet (LS diet) for 7 days and then on a high salt diet (HS diet) for 7 days. Before and after HS diet, body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR), arterial blood pressure and heart rate were measured in all participants, and the analysis of 24-hour urine was conducted. Serum concentration of 8-iso-PGF2 α was determined by ELISA method.

Results: BMI and WHR were not statistically significantly altered as well as arterial pressure and pulse before and after the HS protocol. Significantly increased 24 h natriuresis after the HS protocol confirmed participants' compliance of the protocol ($p < 0.05$). High salt diet caused a statistically significant increase of 8-iso PGF2 α serum concentrations.

Conclusion: A 7-day HS diet caused a significant increase in 8-iso-PGF2 α serum concentrations in healthy young subjects, suggesting a potential role of oxidative stress in the onset of endothelial dysfunction due to high salt intake.

Keywords: salt, renin angiotensin system, oxidative stress, arachidonic acid, 8-iso-prostaglandin F2 α

10. LITERATURA

1. Adeyi O, Smith O, Robles S. Public policy and the challenge of chronic non communicable diseases. Washington DC: The World Bank. 2007. Dostupno na adresi: <http://siteresources.worldbank.org/INTPH/Resources/PublicPolicyandNCDsWorldBank2007FullReport.pdf>. Datum pristupa: 12. 6.2019.
2. Drenjančević Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High salt diet and hypertension: Focus on the renin angiotensinsystem. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):1-11.
3. 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.
4. 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. Datum pristupa: 12. 6.2019.
5. 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. Datum pristupa: 10. 6.2019.
6. 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):14-17. Dostupno na adresi: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf%3A1252>. Datum pristupa: 10. 6.2019.
7. 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. 6.2019.
8. Fuster V, Kelly BB, ur. Institute of Medicine (US) Committee on Preventingthe 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 AcademiesPress (US); 2010:2.
9. He FJ, Jenner KH, Macgregor GA. WASH World Action on Salt and Health. *Kidney Int.* 2010;78(8):745-53.

10. 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.
11. 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.
12. 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 adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:920105>. Datum pristupa: 8. 6.2019.
13. Farquhar WB, Edwards DG, Jurkowitz CT, Weintraub WS. Dietary Sodium and Health: More Than Just Blood Pressure. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(10):1042-1050.
14. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium – Gate keeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109.
15. Boegehold MA, Drenjancevic I, Lombard JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Compr Physiol*. 2015;6(1):215-54.
16. Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Renin Angiotensin System. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2019;1. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>. Datum pristupa: 8. 6.2019.
17. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19:42.
18. 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.
19. Loperena R, Harrison DG. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. *Med Clin North Am*. 2017;101(1):169–193.
20. Suzuki H, Swee A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995;25:1083–1089.
21. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J AdvRes*. 2018;11:23–32.
22. Drenjančević I., Jukić I., Mihaljević Z., Čosić A., Kibel A. The metabolites of arachidonic acid in microvascular function. In: Lenasi H., editor. *Microcirculation Revisited – From Molecules to Clinical Practice*. InTech; 2016.

23. Human Metabolome Database. Metabocard for 8-Isoprostaglandin F2a(HMDB0005083). 2019. Dostupno na adresi: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0005083>. Datum pristupa: 13. 6.2019.
24. Drenjancevic-Peric I, Frisbee JC, Lombard JH. Skeletal muscle arteriolar reactivity in SS.BN13 consomic rats and Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2003;41(5):1012-5.
25. Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:575-83.
26. 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.
27. 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.
28. 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: 5. 8.2019.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
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. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. Endothelial Dysfunction in Salt Sensitive Essential Hypertension. *Hypertension*. 2001; 37:444-448.
34. 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.

35. 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.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i Prezime: Lorena Katuša

Datum rođenja: 7. prosinca 1995. godine Wiesbaden, Njemačka

Adresa: Splitska 65A, 23 210 Biograd na Moru

E-mail: kusalorena@gmail.com

Obrazovanje:

2002. - 2010. - Osnovna škola Biograd

2010. - 2014. - Opća gimnazija, Srednja škola Biograd

2014. - 2017. - Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku