

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Krajina

**UČINCI DIJETE SA SMANJENIM UNOSOM KUHINJSKE SOLI NA  
TH17-POSREDOVANU UPALU I VASKULARNU REAKTIVNOST  
MIKROCIRKULACIJE KOŽE KOD OBOLJELIH OD VULGARNE PSORIJAZE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Krajina

**UČINCI DIJETE SA SMANJENIM UNOSOM KUHINJSKE SOLI NA  
TH17-POSREDOVANU UPALU I VASKULARNU REAKTIVNOST  
MIKROCIRKULACIJE KOŽE KOD OBOLJELIH OD VULGARNE PSORIJAZE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Komentorica rada: izv. prof. dr. sc. Ana Stupin, dr. med.

Rad ima 126 stranica.

## Predgovor

*Suscipe, Domine, universam meam libertatem.  
Accipe memoriam, intellectum, atque voluntatem omnem.*

*Quidquid habeo vel possideo mihi largitus es; id tibi totum restituo,  
ac tuae prorsus voluntati trado gubernandum.*

*Amorem tui solum cum gratia tua mihi dones, et dives sum satis,  
nec aliud quidquam ultra posco.*

sv. Ignacije Lojolski

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Martini Mihalj, koja me prijateljski vodila kroz istraživanje i izradu disertacije. Prema rječniku stranih riječi mentor je pouzdan savjetnik ili vodič.

Martina je bila mentor u pravom smislu te riječi.

Hvala i prof. dr. sc. Ani Stupin, komentorici ovog rada, koja je svojom pomoću, budnim okom za detalje i konstruktivnim kritikama pomogla da se ovaj rad ostvari u ovom obliku.

Hvala prof. dr. sc. Ines Drenjančević što je omogućila da pri njezinoj katedri radim istraživanje i što je potaknula intenziviranje istraživanja u vrijeme kada je polako zastajalo.

Hvala prof. dr. sc. Mariju Štefaniću, koji je svojim virtuoznim vještinama u (bio)statistici pomogao u vizualizaciji i interpretiraciji rezultata.

Hvala dr. sc. Nikolini Kolobarić na velikoj pomoći u laboratorijskom dijelu istraživanja i što me strpljivo uvodila u laboratorijske vještine. Također, hvala i doc. dr. sc. Petru Šušnjari, doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević i doc. dr. sc. Mirjani Suver-Stević.

Veliko hvala mojim kolegicama na Zavodu za dermatologiju i venerologiju, doc. dr. sc. Veri Plužarić, doc. dr. sc. Maji Tolušić Levak, Tatjani Matijević, Maji Kožul te predstojnici Zavoda Mariji Šoli i glavnoj sestri Zavoda Božici Kurtović, na nesebičnoj pomoći i suradnji.

Hvala mom prijatelju Jakovu Miliću, koji me već 13 godina potiče na znanstveni rad i koji me naučio veliki dio onoga što danas znam. Hvala mu što je, u znanosti i životu, uvijek bio tu za mene. Hvala i mojoj kumi Luciji Kolar, koja je spremno uskakala i bila mi tehnička podrška.

Engleski izraz kaže: *last, but not least*.

Posebno hvala mojoj obitelji, mužu Vinku, mojoj djeci, majci, ocu, svekrvi na nesebičnoj podršci, potpori i motivaciji. Bez njih ova disertacija ne bi bila ni moguća.

## Sadržaj

1.	UVOD.....	1
1.1	Psorijaza.....	1
1.1.1	Psorijaza kao klinički entitet.....	1
1.1.2	Epidemiološka obilježja psorijaze .....	1
1.1.3	Etiopatogeneza vulgarne psorijaze .....	2
1.1.4	Imunopatogeneza psorijaze.....	2
1.2	Psorijaza i komorbiditeti.....	6
1.2.1	Kardiovaskularne bolesti i psorijaza .....	6
1.3	Utjecaj psorijaze kao kronične upalne bolesti na makro-/mikrovaskularnu funkciju .....	7
1.3.1	Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija .....	7
1.3.2	Utjecaj psorijaze na vaskularnu i endotelnu funkciju .....	9
1.4	Utjecaj unosa kuhinjske soli na tijek upalnih bolesti.....	11
1.4.1	Unos soli u populaciji RH.....	11
1.4.2	Učinak unosa soli kroz prehranu na imunološku funkciju .....	12
1.4.3	Učinak unosa soli kroz prehranu na kardiovaskularni sustav i mikrocirkulaciju.....	16
1.4.4	Soli i psorijaza.....	17
2.	HIPOTEZA.....	19
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	20
4.	ISPITANICI I METODE.....	21
4.1	Ustroj studije.....	21
4.2	Ispitanici.....	21
4.3	Protokol istraživanja .....	22
4.4	Određivanje antropometrijskih mjera .....	24
4.5	Procjena težine psorijaze .....	24
4.5.1	Indeks proširenosti i težine psorijaze, PASI .....	24
4.5.2	Dermatološki indeks kvalitete života, DLQI .....	25
4.6	Uzorkovanje krvi .....	26

4.7	Uzorkovanje 24-satnog urina.....	26
4.8	Mjerenje hematoloških i biokemijskih parametara iz pune krvi, seruma i 24-satnog urina.....	26
4.9	Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMC).....	27
4.9.1	Izolacija PBMC iz pune krvi .....	27
4.9.2	Kultivacija PBMC.....	28
4.9.3	Postupak krioprezervacije i odmrzavanja PBMC stanica.....	28
4.9.4	Određivanje vijabilnosti stanica.....	28
4.9.5	Postupak negativne magnetske selekcije komercijalnim kitom .....	29
4.9.6	Aktivacija CD4+ T limfocita stimulacijom pomoću PMA-ionomicina	30
4.10	Protočna citometrija.....	30
4.10.1	Izrada kompenzacijskih matrica za analizu uzoraka.....	31
4.10.2	Određivanje vijabilnosti stanica u uzorku .....	32
4.10.3	Blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (blok Fc fragmenata)...	32
4.10.4	Imunofenotipizacija PBMC stanica i analiza frekvencije Th17 i Treg stanica... ..	33
4.11	Luminex metoda za određivanje citokina iz seruma i supernatanta .....	36
4.11.1	Priprema supernatanta iz PBMC staničnih kultura tretiranih PMA-ionomicinom .....	36
4.11.2	Multiplex i simplex kvantifikacija proinflamatornih i antiinflamatornih citokina te kemokina u uzorcima supernatanta i seruma .....	36
4.12	Kvantitativna „sendvič“ ELISA za mjerenje SGK1 u staničnim lizatima iz kultura PBMC stanica tretiranih PMA-ionomicinom.....	37
4.13	Kvantitativna ELISA za mjerenje koncentracija prouparnih citokina iz seruma .....	37
4.14	Mjerenje arterijskog tlaka .....	38
4.15	Izračun Framinghamskog zbroja rizika .....	38
4.16	Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože.....	38
4.17	Statističke metode .....	40
5.	REZULTATI .....	42

5.1	Učinak niskoslane dijete na antropometrijska mjerena .....	45
5.2	Učinak niskoslane dijete na krvnu sliku i osnovne biokemijske parametre u krvi i 24-satnom urinu kod osoba koje boluju od psorijaze .....	46
5.3	Učinak niskoslane dijete na težinu psorijaze i utjecaju na kvalitetu života osoba koje boluju od psorijaze.....	51
5.4	Utjecaj niskoslane dijete na hemodinamska mjerena .....	54
5.5	Učinak niskoslane dijete na koncentraciju citokina u serumu i supernatantu ..	61
5.6	Učinak niskoslane dijete na frekvencije Th17 i Treg stanica kod osoba koje boluju od psorijaze.....	65
5.7	Učinak niskoslane dijete na SGK1 kinazu i njezinu ulogu u transdiferencijaciji .....	67
6.	RASPRAVA .....	79
6.1	Niskoslani dijetni protokol.....	79
6.2	Učinak niskoslane dijete na antropometrijska mjerena .....	80
6.3	Učinak niskoslane dijete na krvnu sliku i osnovne biokemijske parametre u krvi kod osoba koje boluju od psorijaze.....	81
6.4	Učinak niskoslane dijete na težinu psorijaze i utjecaj na kvalitetu života osoba koje boluju od psorijaze.....	82
6.5	Utjecaj niskoslane dijete na hemodinamska mjerena .....	83
6.5.1	Izbor metodologije u istraživanju vaskularne reaktivnosti u istraživanju.....	83
6.5.2	Utjecaj niskoslane dijete na mjerena arterijskog tlaka i otkucaje srca u minuti.....	84
6.5.3	Oporavak o endotelu ovisne endotelne funkcije u mikrocirkulaciji kože osoba koje boluju od psorijaze nakon 2-tjedne niskoslane dijete .....	86
6.6	Učinak niskoslane dijete na koncentraciju citokina u serumu i supernatantu ..	90
6.7	Učinak niskoslane dijete na frekvencije Th17 i Treg stanica kod osoba koje boluju od psorijaze.....	91
6.8	Učinak niskoslane dijete na SGK1 kinazu i njezinu ulogu u transdiferencijaciji .....	91

7.	ZAKLJUČCI .....	94
8.	SAŽETAK .....	95
9.	SUMMARY.....	96
10.	LITERATURA .....	97
11.	ŽIVOTOPIS.....	119
12.	PRILOZI.....	126

## Kratice

18-FDG PET /CT – 18F-fluorodeoksiglukoza pozitronskom emisijskom tomografijom kompjutoriziranom tomografijom

ACT-1 – aktin 1

AD – atopijski dermatitis

ADAMTSL5 - domena slična dezintegrinu i metaloproteazi koja sadrži motiv sličan trombospondinu tipa 5

AMPs – antimikrobni peptidi (engl. *antimicrobial peptides*)

AP-1 – aktivatorski protein 1 (engl. *activator protein 1*)

ApoE – apolipoprotein E

AUC – područje ispod krivulje (engl. *area under the curve*)

B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti

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

BSA – govedji serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

BSA – skala površine tijela zahvaćenom promjenama (engl. *body surface area*)

Ca – kalcij

CAMs – stanične adhezijske molekule (engl. *cell adhesion molecules*)

CCR6 – C-C kemokinskog receptora tip 6 (engl. *C-C chemokine receptor type 6*)

CD – klaster diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

CRP – C-reaktivni protein

C/EBP – (engl. *CCAAT/enhancer binding protein*)

cIMT - mjerjenjem debljine intime-medije karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*)

CTLA4 – protein 4 povezan s citotoksičnim T limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

CVI – cerebrovaskularni inzult

CTACK – kemokini koji privlače T limfocite u kožu (engl. *cutaneous T cell-attracting chemokine*)

DAMP – molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage associated molecular patterns*)

DASH – američka inicijativa za sprječavanje hipertenzije promjenom prehrabnenih navika (engl. *The Dietary Approaches to Stopping Hypertension*)

DBP – dijastolički krvni tlak (engl. *dyastolic blood pressure*)

DKS – diferencijalna krvna slika

DLQI – dermatološki indeks kvalitete života (engl. *Dermatology Life Quality Index*)

DMSO – dimetil sulfoksid

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

ED – endotelna disfunkcija

ELISA – enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)

Fc – (engl. *Fragment, crystallizable*)

FC – omjer izražaja (engl. *fold change*)

FMD – protokom posredovana dilatacija (engl. *flow mediated dilation*)

FoxP3 –transkripcijski čimbenik FoxP3 (engl. *Forkhead box protein P3*)

FRS – Framinghamova ocjena rizika (engl. *Framingham risk score*)

FVD – Fiksabilna boja za vijabilnost stanica (engl. *Fixable Viability Dye*)

GSK 3 $\beta$  – kinaza 3 $\beta$  glikogen sintaze

GWAS – cjelogenomska asocijacijska studija (engl. *genome-wide association study*)

hBD – humani  $\beta$ -defenzin

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*)

HLA – ljudski leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)

hsCRP – C-reaktivni protein visoke osjetljivosti (engl. *high sensitivity C-reactive protein*)

HSDB – banka podataka o opasnim tvarima (engl. *Hazardous Substances Data Bank*)

HUVEC – endotelne stanice ljudske pupčane vene (engl. *human umbilical vein endothelial cells*)

ICAM-1 – međustanična adhezijske molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*)

ICAM-3 – međustanična adhezijske molekula 3 (engl. *intercellular adhesion molecule 3*)

ICOS – inducibilni kostimulator T limfocita (engl. *inducible T cell co-stimulator*)

IFN $\gamma$  – interferon  $\gamma$

IKK – I-kapa kinaza

IL – interleukin

ILCs – urođene limfoidne stanice (engl. *innate lymphoid cells*)

IM – infarkt miokarda

IQR – interkvartilni raspon

K – kalij

KKS – kompletna krvna slika

K<sub>2</sub>EDTA – dikalijetilendiamintetraoctena kiselina

LAG3 – gen za aktivaciju limfocita 3 (engl. *Lymphocyte-activation gene 3*)

LDF - laserske Dopplerove protokometrije (engl. *laser Doppler flowmetry*)  
LDF – laser Doppler (engl. *Laser Doppler flowmetry*)  
LDL - lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)  
LL-37 – humani katelicidinski antimikrobnii protein LL-37  
MACE – veliki kardiovaskularni događaji (engl. *major adverse cardiovascular events*)  
MAP – srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*)  
MAIT – (engl. *mucosal associated invariant T cells*)  
MAPK – Mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen activated protein kinase*)  
MCP-1 – monocitni kemotaktični protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*)  
mDC – mijeloidna dendritična stanica (engl. *myeloid dendritic cell*)  
MIP-3 $\beta$ - inflamatorni protein makrofaga (engl. *macrophage inflammatory protein*)  
MHC – glavni kompleks *histokompatibilnosti* (engl. *major histocompatibility complex*)  
Na – natrij  
NaCl – natrijev klorid  
NFAT5 – nuklearni faktor aktiviranih T limfocita (engl. *nuclear factor of activated T-cells*)  
NF- κB – nuklearni faktor κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)  
NK stanice – prirodnobilačke stanice (engl. *natural killer cells*)  
NK T stanice – (engl. *natural killer T cells*)  
NO – dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)  
NS – niskoslana  
NSD – niskoslana dijeta  
PASI – indeks proširenosti i težine psorijaze (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*)  
PASI50 – 50 % smanjenje u indeksu proširenosti i težine psorijaze  
PAT – periferna arterijska tonometrija (engl. *peripheral arterial tonometry*)  
PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)  
PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. *Phosphate – buffered saline*)  
PU – perfuzijske jedinice (engl. *perfusion units*)  
pDC – plazmatoidna dentritična stanica (engl. *plasmacytoid dendritic cell*)  
PMA – forbol – 12 – miristat – 13 – acetat (engl. *phorbol – 12 – myristate –13 – acetate*)  
PRR – receptori za molekularne obrasce (engl. *pattern recognition receptors*)  
PWV – brzina pulsog vala (engl. *pulse wave velocity*)  
RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)  
RNaza – ribonukleaza  
RNS – reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*)

ROR $\gamma$ t – retinoičnim receptorom povezani nuklearni receptor  $\gamma$  (engl. *Retinoic – acid – receptor – related orphan nuclear receptor gamma*)

ROS – slobodni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SBP – sistolički krvni tlak

SNP – natrijev nitroprusid

S100 – protein koji veže kalcij S100

sCAMs – topljive stanične adhezijske molekule (engl. *soluble cell adhesion molecules*)

SDI – sociodemografski indeks

SGK1 – kinaza 1 regulirana serumom i glukokortikoidima (engl. *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*)

SOD – superoksid dismutaza

SZO – svjetska zdravstvena organizacija

TAK1 – kinaza 1 aktivirana TGF-beta

TCR – T stanični receptor (engl. *T cell receptor*)

Tem – efektorska memorijska T stanica

Th – pomoćnički T limfociti (engl. *T Helper Cells*)

TLR – (engl. *toll-like receptor*)

TNF- $\alpha$  – faktor tumorske nekroze  $\alpha$

Treg – regulatorni T limfociti (engl. *regulatory T cells*)

TT – tjelesna težina

VCAM-1 – vaskularna stanična adhezijska molekula 1, engl. *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF-C – faktor rasta vaskularnog endotela C (engl. *vascular endothelial growth factor C*)

VS – visokoslana dijeta

$\gamma\delta$ T – gama delta T stanice

## **Popis tablica**

Tablica 5.1. Karakteristike ispitanika, njihove životne navike i komorbiditeti.....	44
Tablica 5.2. Osnovna i antropometrijska obilježja ispitanika prije i poslije provođenja dvotjedne niskoslane dijete.....	46
Tablica 5.3. Hematološki parametri iz pune krvi prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.....	47
Tablica 5.4. Biokemijski parametri iz seruma prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.....	48
Tablica 5.5. Biokemijski parametri u uzorku 24-satnog urina prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.....	49
Tablica 5.6. Hemodinamska mjerena ispitanika prije i poslije LS dijete te jednokratna procjena kardiovaskularnog rizika pomoću Framinghamovog kalkulatora kardiovaskularnog rizika.....	55
Tablica 5.7. Koncentracija prouparnih i protuupalnih citokina u serumu ispitanika prije i nakon dvotjedne niskoslane dijete mjerene ELISA metodom.....	62
Tablica 5.8. Koncentracija prouparnih i protuupalnih citokina u serumu ispitanika prije i nakon dvotjedne niskoslane dijete mjerene Luminex metodom.....	63
Tablica 5.9. Koncentracija prouparnih i protuupalnih citokina u supernatantu prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete .....	64
Tablica 5.10. Linearni model, univarijantni i multivarijantni za serumom i glukokortikoidima reguliranu kinazu 1 (SGK1).....	71
Tablica 5.11. Sastav staničnih populacija i izražaj SGK1, slobodni unos (RD) i NS dijeta ...	73
Tablica 5.12. Sastav staničnih populacija na LS dijeti i izražaj SGK1 na slobodnom unosu (B) i LS dijeti (Spearman rang-korelacijske).....	76

## **Popis slika**

Slika 1.1. Imunopatogeneza psorijaze.....	5
Slika 1.2. Patogeneza endotelne disfunkcije kod oboljelih od psorijaze povezana je s upalom i oksidativnim stresom .....	10
Slika 1.3. Regulacija skladištenja NaCl u koži.....	14
Slika 4.1. Shematski prikaz protokola istraživanja. ....	23
Slika 4.2 Izračun indeksa proširenosti i težine psorijaze (PASI). ....	25
Slika 4.3. BD FACSCanto II citometar.....	31
Slika 4.4. Prikaz reprezentativne strategije određivanja frekvencije Th17 populacije u perifernoj krvi metodom protočne citometrije.....	33
Slika 4.5. Prikaz reprezentativne strategije određivanja frekvencije Treg populacije u perifernoj krvi metodom protočne citometrije.....	35
Slika 4.6 Uredaj Luminex 100/200, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA. ....	37
Slika 5.1. CONSORT dijagram tijeka istraživanja.....	42
Slika 5.2. Histogram frekvencija za trajanje psorijaze ispitanika. ....	45
Slika 5.3. Parne komparacije i promjene u tjelesnoj težini, opsegu struka i indeksu tjelesne mase između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon niskoslane dijete. ....	45
Slika 5.4. Parne komparacije analize kalkuliranog 24-satnog unosa natrija te analize 24-satne natriureze između regularne dijete i nakon 14-dnevne niskoslane dijete. ....	50
Slika 5.5. Utjecaj 24-satne natriureze na inicijalnom mjerenu na promjenu u 24-satnoj natriurezi prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete.....	51
Slika 5.6. Promjena klinički procijenjene težine psorijaze pomoću PASI i DLQI vrijednosti između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete. ....	52
Slika 5.7. Prediktori promjene PASI vrijednosti. ....	53
Slika 5.8. Parne komparacije za sistolički i srednji arterijski tlak između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete. ....	54
Slika 5.9. Parne komparacije i promjena protoka mjerena laser Doppler floumetrijom kao odgovor na četiri podražaja (okluziju tijekom 1 minute, iontoforezu natrijevim nitroprusidom, iontoforezu acetilkolinom te na lokalno zagrijavanje kože) na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete. ....	56
Slika 5.10. Prediktori konačne vrijednosti acetilkolin-inducirane dilatacije na mjerenu nakon 14-dnevne niskoslane dijete.....	58
Slika 5.11. Prediktori promjene acetilkolin-inducirane dilatacije (AChID) između baznih vrijednosti na regularnoj dijeti i vrijednosti nakon 14-dnevne niskoslane dijete. ...	60

Slika 5.12. Vrijednosti IL-23 u serumu (mjereno ELISA metodom) i TGF- $\beta$ u serumu (mjereno Luminex metodom) prije i poslije provođenja dvotjedne NS dijete.....	62
Slika 5.13. Promjena u frekvenciji Th17 i Treg stanica između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete.....	66
Slika 5.14. Vrijednosti SGK-1 kinaze u uzorcima staničnog lizata prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete.....	67
Slika 5.15. Korelacije rangova, bazalni koeficijent kreatinina [KEK (B), mL/min].....	68
Slika 5.16. Korelacije 24-satne natriureze i razine serumom i glukokortikoidima reguliranom kinazom 1 (SGK1). ....	69
Slika 5.17. Serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1 (SGK1) u ovisnosti o rezidualnoj natriurezi na LS dijeti.....	69
Slika 5.18. Marginalni efekti (generalni linearni model), omjer izražaja serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1). ....	70
Slika 5.19. Korelacije serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) i staničnih populacija na regularnoj dijeti i nakon dvotjedne niskoslane dijete. ....	74
Slika 5.20. Korelacija rangova i marginalni efekti između serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) i frekvencije CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+/high}$ stanica (% od CD127 $^{low}$ CD25 $^{+}$ ).....	75
Slika 5.21. Stanične frekvencije na 14-dnevnoj NS dijeti vs. inicijalni izražaj SGK1 (uobičajena dijeta, B; korelacije rangova). ....	77

## 1. UVOD

### 1.1 Psorijaza

#### 1.1.1 Psorijaza kao klinički entitet

Psorijaza je kronična, recidivirajuća, imunološki posredovana upalna bolest kože. Karakteristične promjene kože u psorijazi su oštroograničeni, suhi, eritematozni plakovi s adherentnim srebrnim ljsuskama koji mogu biti lokalizirani ili široko rasprostranjeni na tijelu. Patohistološkom analizom kožnih promjena uočavaju se hiperkeratoza (zadebljanje rožnatog sloja epidermisa), parakeratoza (prisutnost jezgara u stanicama rožnatog sloja), akantoza epidermisa (zadebljanje radi stanične proliferacije u trnastom sloju epidermisa), vijugave i proširene žile te upalni infiltrat sastavljen pretežno od limfocita (1–3). Posljednjih desetljeća postalo je jasno kako psorijaza nije samo bolest koja je ograničena na kožu, nego je u svojoj biti sustavna bolest. Naime, 20 – 30 % osoba oboljelih od psorijaze već ima ili će razviti psorijatični artritis. Osim toga, u bolesnika s umjerenom do teškom psorijazom postoji povećan relativni rizik za metabolički sindrom i aterosklerotsku kardiovaskularnu bolest (1). Psorijaza također značajno smanjuje kvalitetu života oboljelih i predstavlja veliko socioekonomsko opterećenje za oboljele osobe i zdravstveni sustav (4).

#### 1.1.2 Epidemiološka obilježja psorijaze

Psorijaza je bolest koja ima relativno visoku incidenciju i prevalenciju diljem svijeta. Značajne su razlike u incidenciji i prevalenciji prema geografskom položaju i socioekonomskom statusu pojedinih zemalja (5) te je učestalost psorijaze veća u sjevernoameričkim i zapadnoeuropskim zemljama, u kojima žive populacije s visokim sociodemografskim indeksom (SDI). Tako je prema studiji Globalnog opterećenja bolestima (engl. *Global Burden of Disease study*) iz 2019. godine, prosječna dobno standardizirana prevalencija iznosila je 503,6 / 100 000 stanovnika, u rasponu od 300,8 / 100 000 u zemljama s niskim SDI do 1072,2 / 100 000 u zemljama s visokim SDI, dok su najviše stope prevalencije pronađene u razvijenim zapadnoeuropskim zemljama (npr. 2503,8 / 100 000 u Francuskoj) (6). Prema posljednjim epidemiološkim podatcima psorijaze u RH koji datiraju iz relativno davne 1989. godine prevalencija je iznosila 1,6 % (7). Epidemiološki podaci iz istočne Hrvatske, gdje je i ovo istraživanje provedeno, govore u prilog prevalenciji od 0,97 % (8).

Prevalencija psorijaze u stvarnosti mogla bi biti i veća jer neki oblici psorijaze, kao što su psorijaza noktiju i psorijatični artritis, često ostaju neprepoznati (9).

### 1.1.3 Etiopatogeneza vulgarne psorijaze

Psorijaza je bolest s poligenskom podlogom u kojoj različiti čimbenici iz okoline, kao što su trauma, infekcije, lijekovi i drugi čimbenici, mogu izazvati manifestnu bolest kod predisponiranih pojedinaca (10). Naime, samo se dio patogeneze bolesti može izravno povezati s genima i lokusima identificiranim u cjelogenomskim asocijacijskim studijama (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) (11). Ta činjenica naglašava važnost okolišnih i epigenetskih čimbenika u ranom razvoju klinički manifestne bolesti, kao i u održavanju bolesti. Epidemiološke studije povezale su traumu, psihološki stres, pušenje, alkohol, infekcije (*Streptococcus spp.*), pretilost i pojedine lijekove (kao što su nesteroidni protuupalni lijekovi i litij) s pojavom bolesti (10,12–14).

### 1.1.4 Imunopatogeneza psorijaze

Psorijaza je autoimuna bolest i možemo ju smatrati modelom TNF- $\alpha$  – IL-23 – Th17 posredovane upale (15,16). Istraživanja zadnjih desetljeća pomogla su u rasvjetljavanju imunopatogeneze psorijaze, pa je danas jasno kako je riječ o međusobno isprepletenim mehanizmima urođene i stečene imunosti. Dok u pustuloznoj psorijazi prevladava aktivacija urođenog imunološkog sustava, što rezultira izbijanjem samoodržive upale i nakupljanjem leukocita, osobito neutrofila, u tkivu (16–18), u slučaju vulgarne psorijaze imunopatogeneza ima drukčiji tijek. Kod vulgarne psorijaze početna aktivacija urođene imunosti dovodi do prekida imunološke tolerancije i do održavanja autoimunosti. To vidimo po aktivaciji pomoćničkih CD4+ T limfocita (engl. *T helper cells*, Th) 1 i Th17 te nakupljanjem oligoklonalnih T limfocita koji secerniraju IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), kao i citokina koji se izlučuju iz Th17 stanica u koži koja je zahvaćena psorijatičnim promjenama (19,20). Početni se imunološki događaji u psorijazi pokreću kao odgovor na endogene signalne molekule koje luče keratinociti prilikom odgovora na stres, infekciju ili ozljedu. Njih nazivamo molekularnim obrascima povezanim s ozljedom (engl. *damage associated molecular patterns*, DAMP). DAMP-ovi imaju sposobnost aktivirati receptore za molekularne obrasce (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) prisutne na većini urođenih stanica, poput dendritičnih stanica i makrofaga, nakon čega slijedi aktivacija T limfocita i sekrecija kanoničkih citokina koji optimiziraju i usmjeravaju imunološki odgovor ovisno o vrsti nokse. Tako u psorijazi dolazi do lučenja IL-23 koji usmjerava autoreaktivne limfocite na proliferaciju i diferencijaciju u smjeru Th17 imunološkog odgovora. Najviše istraživani među tim signalnim molekulama su

antimikrobnii peptidi (engl. *antimicrobial peptides*, AMP) LL-37 (C-terminalni fragment humanog katelicidina), humani  $\beta$ -defensin (hBD) i protein S100 (21,22). Ovi antimikrobnii peptidi, zajedno s drugim izlučenim citokinima i kemokinima, potiču aktivaciju dendritičkih stanica u koži, koje zauzvrat imaju nasljednu sposobnost prezentacije autoantigena naivnim autoantigen-specifičnim Th stanicama u regionalnom drenažnom limfnom čvoru. Prilikom prezentacije dolazi do aktivacije takvih naivnih autoantigen-specifičnih Th stanica i do njihove klonalne ekspanzije. Aktivirane Th1 i Th17 stanice poprimaju svojstva specifična za udomljavanje u koži, zbog kojih migriraju u kožu, gdje onda luče IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-17 i druge citokine i kemokine koji dovode do prekomjerne proliferacije i nedovoljnog sazrijevanja keratinocita i kemotaksiju drugih imunoloških stanica kao što su neutrofili, što dovodi do samoodržavanja upale. Nadalje, nedavni je napredak u imunobiologiji doveo do oktrića rezidentnih stanica u tkivima i novootkrivenih podvrsta urođenih limfoidnih stanica (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs) i limfoidnih stanica sličnih urođenima (engl. *innate like lymphoid cells*), čija se uloga u inicijaciji i održavanju upale u psorijazi još uvijek istražuje. Naime, čini se da aktivacija urođenih limfoidnih stanica 3, invarijantnih NK T stanica i  $\gamma\delta$ T stanica ovisna o IL-23 poput Th17 limfocita, a suprotno tome neovisna o signalizaciji posredovanoj T-staničnim receptorom (engl. *T cell receptor*, TCR) te predstavlja dodatni rezervoar IL-17, koji je važan citokin u patogenezi kronične vulgarne psorijaze (23,24).

Kako je već naglašeno, početna je faza psorijaze usko povezana s otpuštanjem AMP-a, koji se također nazivaju i alarmini. Značajno su više razine ekspresije LL-37, hBD, S100-proteina, lipokalina 2 i ribonukleaze (RNaze) 7 nađene u psorijatičnim plakovima u usporedbi s kožom zdravih donora (25,26). Najistaknutija uloga u odgovoru urođene imunosti i autoantigen-specifičnim T-stanicama pripisana je antimikrobnom peptidu LL-37. LL-37 otpuštaju keratinociti i on stvara komplekse sa vlastitim genetskim materijalom, koje zatim preuzimaju dendritične stanice. Aktivacija plazmacitoidnih dendritičnih stanica (pDC) posredovana je preko LL-37-DNA i LL-37-RNA-kompleksa vezanjem na *toll-like* receptor (TLR) 9 odnosno TLR7, što rezultira otpuštanjem interferona tipa I (26).

Interferoni tipa I usmjeravaju sazrijevanje mijeloidnih dendritičnih stanica (mDC). Postoji i dodatni izravni LL-37 RNA-inducirani put aktivacije mDC preko TLR8. Zreli mDC migriraju u regionalne limfne čvorove i izlučuju faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukin (IL)-12/23, čime potiču diferencijaciju Th1 i Th17 stanica (12,27). Sličan urođeni imunološki odgovor zabilježen je za ljudski beta defensin (HBD) 2 i HBD4 (28). Osim toga, LL-37 ima izravne učinke na keratinocite i imunološke stanice u psorijazi, čime podupire aktivnu ulogu keratinocita u upalnoj kaskadi otpuštanjem IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  citokina, kemokina i interferona

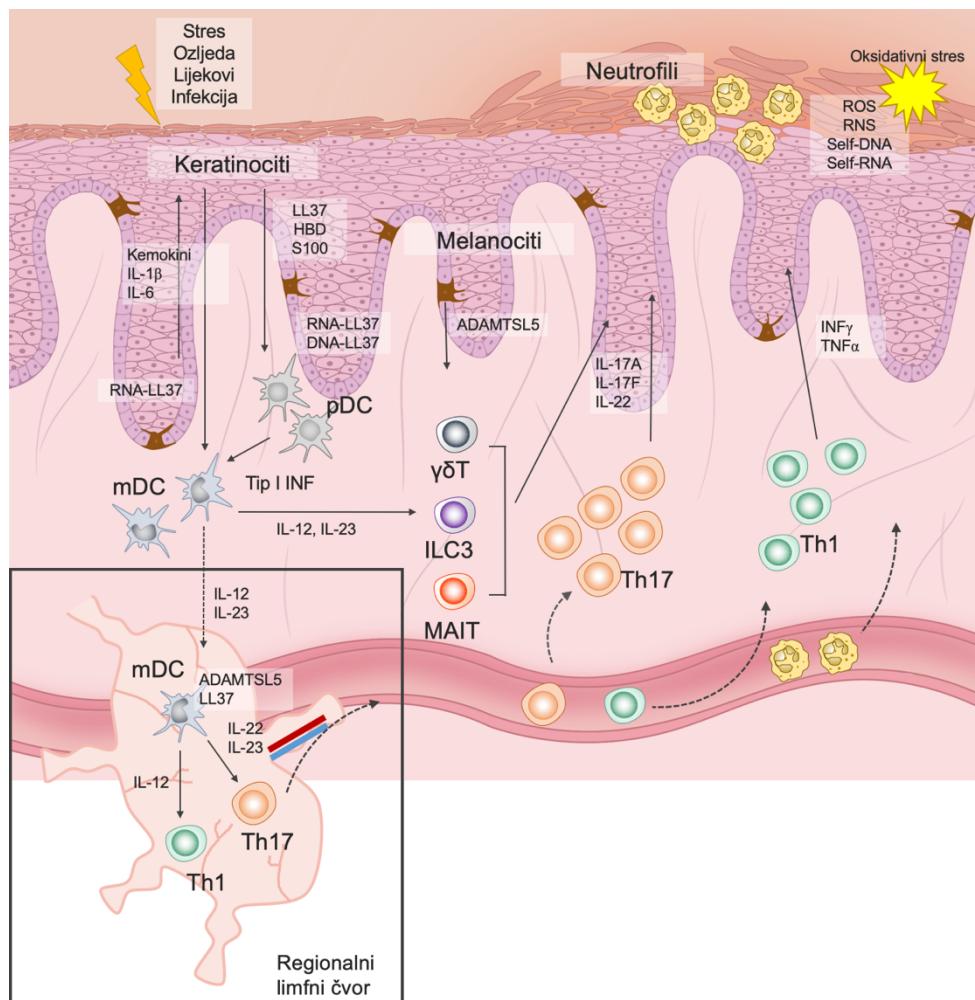
tipa I (29). Supresija apoptoze i poboljšanje funkcije epidermalne barijere u keratinocitima također se pripisuju LL-37 (30).

Psorijaza ima jasnu genetsku pozadinu s dokazanim nasljednim rizikom od oboljevanja unutar obitelji. Ukoliko je jedan blizanac obolio od psorijaze, rizik za razvoj psorijaze kod drugog blizanca je 2 do 3 puta veći u slučaju da se radi o jednojajčanim blizancima nego kod dvojajčnih blizanaca (31). Među stotinama lokusa i gena povezanih s psorijazom, PSORS1 najistaknutiji je lokus identificiran na kromosomu 6p21, u regiji koja kodira humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*; HLA)-C\*06:02 (32). Ova alelna varijanta HLA-C kodira molekulu MHC klase 1 koja je važna za intracelularnu prezentaciju antiga i imunološki nadzor, a najvjerojatnije je uključena u prezentaciju autoantiga poput LL-37, proteina povezanog s melanocitima ADAMTSL5 (domena slična dezintegrinu i metaloproteazi koja sadrži motiv sličan trombospondinu tipa 5) i ljudskog keratina 17 (33).

S druge strane, CD4+ i/ili CD8+ T stanice periferne krvi specifične za LL-37 identificirane su u dvije trećine bolesnika s umjereno teškom do teškom plak psorijazom (34). Nakon stimulacije s LL-37, T-stanice periferne krvi proizvele su IFN- $\gamma$ , IL-21, IL-22 i IL-17 te su pridobile fenotip efektorske stanice i fenotipske karakteristike za udomljavanje u koži. Ekspanzija T-stanica specifičnih za LL-37 pozitivno je korelirala s težinom bolesti i bila je ograničena na određene HLA haplotipove, uključujući HLA-DR alele DR1, DR4, DR11 i HLA-Cw6\*02. Ova otkrića, zajedno s najranijim izvješćima o oligoklonalnoj ekspanziji T-stanica u psorijatičnim lezijama, nedvosmisleno ukazuju da postoji autoimuna komponenta bolesti (35–37).

Konačno, stanični i molekularni mehanizmi specifični za psorijazu izravno su povezani s upalnim putem TNF- $\alpha$  – IL-23 – Th17 (15). Porodica citokina IL-17 sastoji se od šest članova (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F), pri čemu su IL-17A i IL-17F prvenstveno povezani s klinički relevantnim signaliziranjem u psorijaze. IL-17A i IL-17F su različito potentni, ali djeluju putem istog receptora (38). Biološki učinci IL-17A veći su od onih koje ima IL-17F, dok heterodimer IL-17A / IL-17F ima srednji učinak. Vezanje IL-17A na njegov receptorski kompleks, sastavljen od dvije podjedinice IL-17RA i jedne podjedinice IL-17RC, dovodi do regrutiranja ACT1 (aktin) adapterskog proteina i nizvodne aktivacije niza unutarstaničnih kinaza, uključujući I-kapa B kinazu (IKK), p38 mitogenom aktiviranu protein kinazu (p38 MAPK), kinazu regulirana izvanstaničnim signalom (ERK), kinazu 1 aktivirana transformirajućim faktorom rasta  $\beta$  (TAK1) i kinaza 3 $\beta$  glikogen sintaze (GSK-3 $\beta$ ) (39). Ove kinaze angažiraju transkripcijske faktore kao što su nuklearni faktor  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-  $\kappa$ B), aktivatorski protein 1 (AP-1) i C/EBP (engl. *CCAAT/enhancer binding protein*) za proizvodnju prouplnih citokina, kemokina

i antimikrobnih peptida. Ilustracija imunoloških događaja povezanih s psorijazom dana je na Slici 1.1.



**Slika 1.1. Imunopatogeneza psorijaze.**

Kao odgovor na stres, infekciju ili ozljedu, keratinociti izlučuju antimikrobne peptide (LL-37, S100, humani  $\beta$ -defensin), citokine i kemokine koji potiču aktivaciju dendritičnih stanica, koje zauzvrat imaju naslijednu sposobnost predstavljanja autoantigena naivnim autoantigen-specifičnim Th stanicama u limfnim čvorovima u koje se drenira limfa iz tkiva. Aktivirane Th1 i Th17 stanice klonalno se ekspandiraju, dobivaju specifična svojstva za udomljavanje u kožu i akumuliraju se prvenstveno u epidermisu, gdje nastavljaju otpuštati velike količine IFN- $\gamma$ , IL-17 i drugih citokina. Rezidentne stanice tkiva i nove podskupine urođenih limfoidnih stanica i limfoidnih stanica sličnih urođenima (engl. *innate-like lymphoid cells*) predstavljaju dodatni rezervoar IL-17. Kemokini i citokini koje oslobođaju keratinociti i Th limfociti privlače neutrofile u kožu, gdje pridonose upali i oksidativnom stresu. ILC3, urođena limfoidna stanica 3 (engl. *innate lymphoid cell 3*); MAIT, invarijantna T stanica povezana sa sluznicom (engl. *mucosal-associated invariant T cell*); pDC, plazmacitoidna dendritična stanica (engl. *plasmacytoid dendritic cell*); mDC, mijeloidna dendritična stanica (engl. *myeloid dendritic cell*); Treg, regulatorna T stanica; Th, T pomoćna stanica; INF, interferon; LL37, antimikrobi katelicidin peptid LL37; HBD,

---

humanı beta defensin; S100, protein koji veže kalcij S100; IL, interleukin; ADAMTSL5, domena slična dezintegrinu i metaloproteazi koja sadrži motiv sličan trombospondinu tipa 1 5;  $\gamma\delta$ T, gama delta T stanice. Autorska slika mentorice. Prethodno objavljena u Krajina I, Stupin A, Šola M, Mihalj M. Oxidative Stress Induced by High Salt Diet—Possible Implications for Development and Clinical Manifestation of Cutaneous Inflammation and Endothelial Dysfunction in Psoriasis vulgaris. *Antioxidants*. 2022;11:1269.

---

## 1.2 Psorijaza i komorbiditeti

U posljednjim je desetljećima postalo jasno kako psorijaza, kao sustavna upalna bolest, može biti popraćena različitim sustavnim komorbiditetima. Najčešće bolesti koje prate psorijazu su psorijatični artritis, kardiovaskularne i cerebrovaskulanre bolesti, hiperlipidemija, hipertenzija, pretilost, dijabetes i psihijatrijski poremećaji poput depresije i anksioznosti (40,41).

### 1.2.1 Kardiovaskularne bolesti i psorijaza

Među svim navedenim komorbiditetima, kardiovaskularne su bolesti posebno važne, zato što pridonose višim stopama smrtnosti osoba oboljelih od psorijaze u usporedbi s kontrolnom skupinom (42–45). Učestalost tzv. velikih kardiovaskularnih događaja (engl. *major adverse cardiovascular events*, MACE), u koje ubrajamo infarkt miokarda (IM), cerebrovaskularni inzult (CVI) i smrt od kardiovaskularnih događaja, povećana je u bolesnika sa psorijazom u odnosu na opću populaciju. Incidencija MACE korelira s trajanjem i kliničkom težinom bolesti, procijenjenim indeksom proširenosti i težine psorijaze (engl. *psoriasis area and severity indeks*, PASI), površinom tijela zahvaćenim promjenama (engl. *body surface area*, BSA) i potrebama za sustavnom terapijom ili fototerapijom psorijaze (46–55). Prema prethodno objavljenim podatcima, očekivana životna dob osoba koje boluju od teške psorijaze značajno je smanjena (žene: -4,4 godine; muškarci -3,5 godina) (45).

Također, kardiovaskularne su bolesti najčešći pojedinačni uzrok smrti u tih osoba (43). Nadalje, postojanje kardiovaskularnih bolesti u bolesnika sa psorijazom povezana je i s pojačanim korištenjem zdravstvene skrbi, kao i višim troškovima zdravstvene skrbi zbog liječenja ovih stanja (40), što predstavlja i značajan javnozdravstveni teret. Iako prema podatcima iz brojnih studija osobe oboljele od psorijaze imaju i veći teret tzv. tradicionalnih kardiovaskularnih čimbenika rizika, kao što su pušenje cigareta, pretilost, povišeni krvni tlak, inzulinska rezistencija ili dijabetes mellitus tipa II i hiperlipidemija (56–58), većina istraživanja govori u prilog tome da psorijaza predstavlja neovisni čimbenik kardiovaskularnog rizika.

Framinghamova ocjena rizika (engl. *Framingham risk score*, FRS) alat je kojim se pomoću podataka o tradicionalnim čimbenicima kardiovaskularnog rizika procjenjuje 10-godišnji rizik

za klinički manifestnu kardiovaskularnu bolest i MACE (59). Čak se i kod mladih bolesnika s psorijazom, koji su imali nisku FRS ocjenu, mjerjenjem krvožilne upale pomoću 18F-fluorodeoksiglukoza pozitronskom emisijskom tomografijom kompjutoriziranim tomografijom (18-FDG PET/CT) pokazalo kako je krvožilna upala povećana te da je jačina upale povezana s duljim trajanjem bolesti. K tome, ranije je već dokazano kako upala krvnih žila mjerena 18-FDG PET/CT-om ima prognostičku vrijednost za buduće kardiovaskularne događaje (51,60–62). Stoga se čini da produljena izloženost sustavnoj upali u psorijazi može pridonijeti povećanom kardiovaskularnom riziku u bolesnika s psorijazom (63). Nadalje, treba napomenuti da psorijaza povećava rizik i za razvoj tradicionalnih čimbenika kardiovaskularnog rizika. Na primjer, psorijaza povećava učestalost i dijabetesa i dislipidemije, što sugerira da ova autoimuna bolest također može pridonijeti povećanom ukupnom kardiovaskularnom riziku utječući na učestalost tradicionalnih čimbenika rizika (64).

### **1.3 Utjecaj psorijaze kao kronične upalne bolesti na makro-/mikrovaskularnu funkciju**

#### **1.3.1 Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija**

Endotel, koji se sastoji od jednoga sloja endotelnih stanica, čini unutrašnji sloj krvnih žila i limfnoga sustava te je u izravnom dodiru sa stanicama i tvarima koje cirkuliraju krvlju i limfom. Zbog rasprostranjenosti krvnih žila, od većih arterija i vena sve do kapilara, endotel je posvuda prisutan u čovjekovom tijelu. Broj endotelnih stanica iznosi otprilike  $1 \text{ do } 6 \times 10^{13}$  te se tako procjenjuje kako je ukupna površina endotela u tijelu između 3000 i 6000  $\text{m}^2$  (65,66). Sve do 70-ih godina prošloga stoljeća znanstvenici su smatrali endotel jednostavnom difuzijskom barijerom, kako stanice i tvari iz krvi ne bi slobodno prodirale u okolna tkiva. Međutim, napredak znanosti i brojna istraživanja o ulozi endotela u zadnjih 50-ak godina, doveli su do toga da danas znamo kako endotel ima brojne uloge: kontrolira protok krvi, sprječava agregaciju trombocita, regulira proliferaciju glatkih mišićnih stanica krvnih žila, regulira permeabilnost stjenke krvnih žila, kao i migraciju leukocita i drugih imunoloških stanica, uz brojne druge funkcije.

Vrlo je važna spoznaja da endotelne stanice kontroliraju tonus glatkih mišića u tunici mediji krvnih žila koja se nalazi ispod basalne membrane na koju priliježe endotel. Regulaciju krvožilnog tonusa ostvaruju preko različitih relaksirajućih i kontrahirajućih metabolita i izravnim učinkom na glatkomišićne stanice (67,68).

Endotelna disfunkcija (ED) rani je znak kardiovaskularnih bolesti, koji obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane ozljede do neprikladne, trajne,

globalne aktivacije endotela. ED karakterizirana je vazokonstričkim, protrombotičkim i proupatnim fenotipom (69,70), a obično se odnosi na smanjenu proizvodnju i/ili bioraspoloživost vazodilatatora dušikovog oksida (engl. *nitric oxide*, NO), kao na i neravnotežu u relativnom doprinosu relaksirajućih i kontrahirajućih metabolita izvedenih iz endotela, što dovodi do poremećaja mehanizama vaskularne relaksacije (71).

Osim oštećenja endotel-ovisne vazodilatacije, patofiziološke posljedice razvoja endotelne disfunkcije su:

- (1) abnormalna reaktivnost i spazam krvnih žila;
- (2) povećana permeabilnost endotela krvnih žila za makromolekule;
- (3) povećana ekspresija topljivih molekula stanične adhezije (engl. *soluble cell adhesion molecules*, sCAMs);
- (4) regрутiranje i nakupljanje monocita/makrofaga u intimi krvnih žila;
- (5) smanjena sposobnost regeneracije endotelnih stanica te povećana proliferacija/migracija stanica mišićnog sloja krvnih žila;
- (6) poremećaj hemostaze (72–74).

Patofiziološki čimbenici za koje je poznato da pridonose razvoju ED su: povećani oksidativni stres zbog stvaranja slobodnih kisikovih radikala (engl. *radical oxygen species*, ROS), aktivacija citokina u upalnim procesima, glikozilacija metabolita uključenih u dijabetes, starenje, pušenje i hipertenzija, kronična hipercolesterolemija i/ili povišena koncentracija lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) u plazmi i njegovo nakupljanje u stijenci krvnih žila, kao i kronična sustavna infekcija bakterijama, virusima ili drugim patogenima (72–77). S obzirom da je psorijaza kronična upalna bolest praćena povišenim razinama oksidativnog stresa, ED je očekivana i svakako povezana s visokim kardiovaskularnim rizikom u bolesnika s psorijazom.

Važnost endotelne disfunkcije također leži u činjenici da je to stanje koje se može kvantificirati te odražava rano i, još uvijek, reverzibilno oštećenje vaskularne homeostaze (78), koje prethodi stvaranju aterosklerotskih plakova. ED pridonosi progresiji stvaranja plakova i tako dovodi do pojave kardiovaskularnih događaja (78–82). U endotelnoj disfunkciji možemo uočiti gubitak antitrombotičkih svojstava endotela, uz pojačanu regulaciju adhezijskih molekula, poput VCAM-1 (vaskularna stanična adhezijska molekula 1, engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) i ICAM-1 (međustanična adhezijska molekula 1, engl. *intercellular adhesion molecule 1*), koje omogućuju adheziju leukocita, tj. podržavaju novačenje monocita na vaskularnu stijenu, koje se potom dalje diferenciraju u pjenaste stanice nakon nakupljanja modificiranih lipoproteina,

što je ključni korak u procesu aterogeneze (81,83–88). U jednoj prospективnoj kohortnoj studiji, protoci mjereni protokom posredovanom dilatacijom (engl. *flow mediated dilation*, FMD), negativno su korelirali s kardiovaskularnim dogadjajima neovisno o drugim, tradicionalnim KV čimbenicima rizika (89). Te spoznaje naglašavaju potencijalnu prognostičku vrijednost endotelne disfunkcije. Zbog činjenice da je endotelna disfunkcija reverzibilna, mogla bi biti obećavajući i vrijedan terapijski cilj u primarnoj prevenciji budućih velikih kardiovaskularnih događaja u bolesnika s psorijazom (72).

### 1.3.2 Utjecaj psorijaze na vaskularnu i endotelnu funkciju

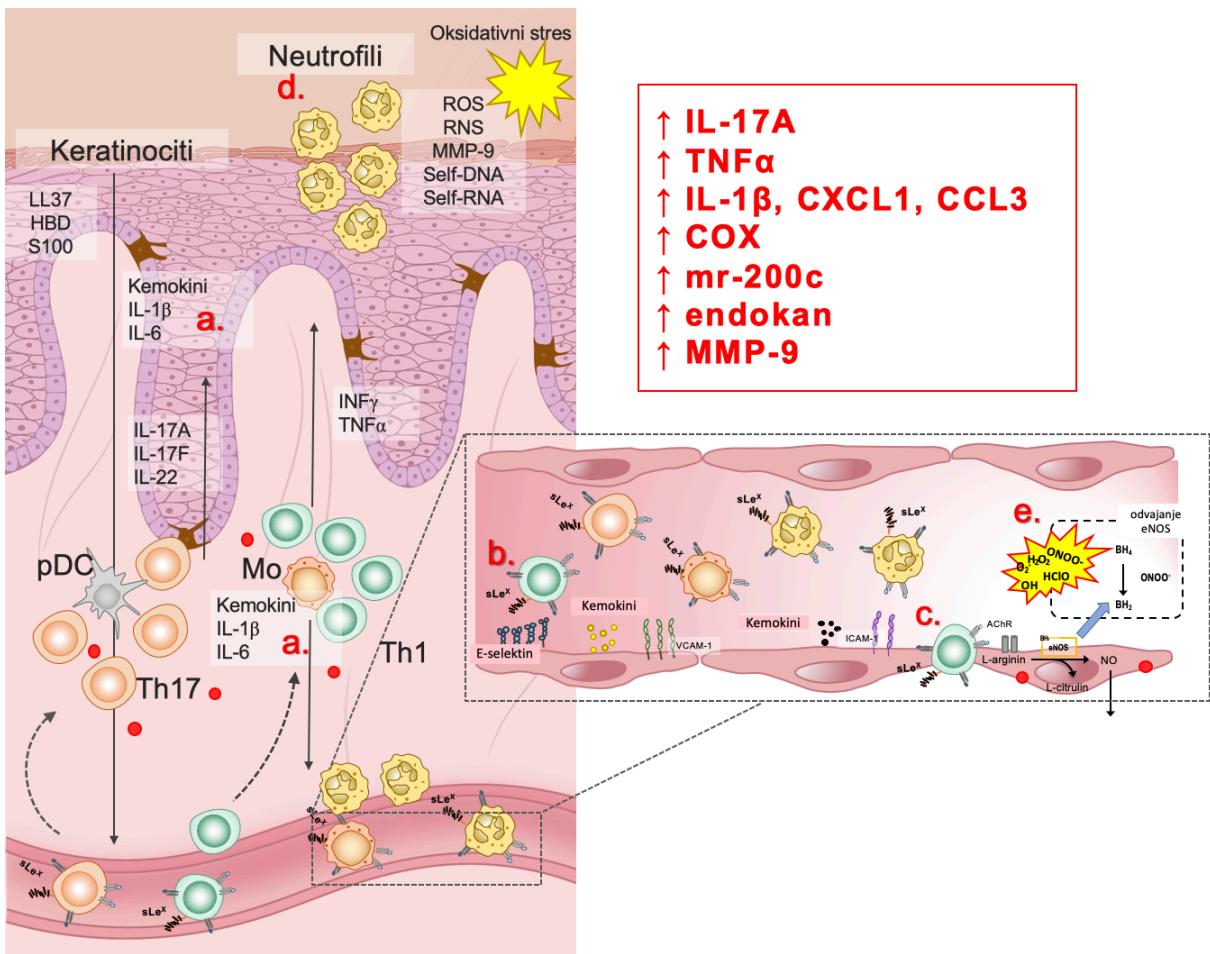
Tijekom posljednjih 40 godina, podatci iz većine provedenih studija o endotelnoj funkciji u psorijazi ukazuju na oštećenu makrovaskularnu endotelnu funkciju u bolesnika s psorijazom. U tim je studijama korištena raznolika metodologija, od FMD brahjalne arterije (90–94), koja se najčešće koristila, preko brzine pulsog vala (engl. *pulse wave velocity*, PWV), periferne arterijske tonometrije (engl. *peripheral arterial tonometry*, PAT) (95), mjerena debљina intime-medije karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*, cIMT) (96), pa do razine krutosti aorte (engl. *arterial stiffness*) (95). Samo u nekoliko studija s bolesnicima oboljelim od psorijaze nije pronađena poremećena makrovaskularna reaktivnost (97). Nadalje, u nekoliko je studija pronađeno da je makrovaskularna endotelna disfunkcija u bolesnika s psorijazom izravno povezana s aktivnošću psorijatične bolesti, koja je bila procijenjena s PASI, opsegom upale (mjerenim visokoosjetljivim C-reaktivnim proteinom, hsCRP) i općim kardiovaskularnim rizikom takvih bolesnika.

Iznenađujuće, vrlo je malo podataka o funkciji mikrovaskularnog endotela u bolesnika s psorijazom, posebice podataka o kožnoj mikrocirkulaciji, čije oštećenje može igrati važnu ulogu u patofiziologiji kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti, osobito u bolesti koja specifično zahvaća kožu (98), kao što je slučaj u psorijazi. Jedno je istraživanje izvjestilo o oštećenju mikrovaskularne endotelne funkcije kože u bolesnika s psorijazom, procijenjenim mjeranjem indeksa protoka krvi u koži tijekom lokalnog zagrijavanja (na 42 °C) pomoću laser Doppler floumetrije (engl. *laser Doppler flowmetry*, LDF) (99). Osim toga, ista je studija izvjestila kako nije došlo do poboljšanja mikrovaskularne dilatacije ovisnoj o NO nakon mikrodijalize antioksidansa L-askorbata, što sugerira da se poremećena vazodilatacija ovisna o endotelu kod psorijaze dogodila neovisno o povećanom oksidativnom stresu.

Dakle, podaci dostupni do danas (i molekularni i funkcionalni) pružaju dokaze o značajno oslabljenoj funkciji makrovaskularnog endotela u bolesnika s psorijazom, vjerojatno izazvanom modulacijom upalnih odgovora (uključujući TNF- $\alpha$ , IL-17A) i povećanim razinama

oksidativnog stresa. Međutim, neistražena endotelna funkcija u mikrocirkulaciji (osobito kutanoj), kao i preciznija procjena uloge oksidativnog stresa u patogenezi endotelne disfunkcije u bolesnika s psorijazom, otvaraju nove puteve za buduća istraživanja.

Ilustracija patogenetskih mehanizama ED u psorijazi prikazana je na Slici 1.2.



**Slika 1.2. Patogeneza endotelne disfunkcije kod oboljelih od psorijaze povezana je s upalom i oksidativnim stresom.**

Kao odgovor na hiperslano mikrookruženje, keratinociti i limfociti (a) luče proučalne citokine (tj. interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) i kemokine, što dovodi do endotelne aktivacije koju karakterizira pojačana ekspresija molekula stanične adhezije (CAMs) (b). Kao odgovor na kemokine i interakcije s CAMs, periferni leukociti transmigriraju kroz stijenu krvnih žila do mjesta upale (c). Neutrofile su dominantna vrsta stanica u leukocitnom infiltratu psorijazne kože, odgovorni za stvaranje reaktivnih vrsta kisika (ROS) i dušika (RNS) (d). Dodatni mehanizam oksidativnog stresa tijekom povećanog unosa soli hranom uključuje supresiju RAS-a i odvajanje eNOS-a (e). LL-37, katelicidin antimikrobnii peptid LL-37; HBD, humani beta defensin; S100, protein koji veže kalcij S100; IL, interleukin; ROS, reaktivne vrste kisika; RNS, reaktivne vrste dušika; MMP-9, matrična metaloproteinaza 9; self-DNA, vlastita dezoksiribonukleinska kiselina; self-RNA, vlastita ribonukleinska kiselina; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora  $\alpha$ ; pDC, plazmacitoidna dendritična stanica; Th17, T pomoćničke stanice 17; Th1,

T pomoćničke stanice 1; sLex, Sialyl Lewis X; CXCL1, C-X-C motiv kemokin ligand 1; CCL3, C-C motiv kemokin ligand 3; COX, ciklooksigenaza; mr-200c, mikroRNA-200c; endokan, specifična molekula endotelne stanice-1; ICAM-1, međustanična adhezijska molekula 1; VCAM-1, molekula adhezije vaskularnih stanica 1; AChR, acetilkolinski receptor; eNOS, endotelna sintaza dušikovog oksida; NO, dušikov oksid; BH4, tetrahidrobiopterin; ONOO, peroksinitrit; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vodikov peroksid; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoksid; OH, hidroksid; HClO, hipoklorna kiselina. Autorska slika mentorice. Prethodno objavljena u Krajina I, Stupin A, Šola M, Mihalj M. Oxidative Stress Induced by High Salt Diet—Possible Implications for Development and Clinical Manifestation of Cutaneous Inflammation and Endothelial Dysfunction in Psoriasis vulgaris. *Antioxidants*. 2022;11:1269.

## 1.4 Utjecaj unosa kuhinjske soli na tijek upalnih bolesti

### 1.4.1 Unos soli u populaciji RH

Natrij (Na) je esencijalni mineral koji je neophodan za homeostazu na staničnoj razini, kao i za brojne fiziološke funkcije organizma (100). U čovjekovoj je prehrani primarno zastavljen u obliku kuhinjske soli, tj. natrijevog klorida. U slučaju natrija se, kao i inače u medicini, istinitom pokazala Paracelsusova izreka da „samo doza čini otrov“. Naime, premda je za zdravlje organizma neophodan, postaje štetan za čovjekovo zdravlje, pa čak i potencijalno fatalan kada se konzumira u previsokoj dozi. Prema Banci podataka o opasnim tvarima (engl. *Hazardous Substances Data Bank*, HSDB), procijenjena smrtonosna doza natrijevog klorida je otprilike 0,75 do 3 g/kg tjelesne mase (101). 1 gram soli sadržava 393,4 mg natrija (102). Kako su se u posljednjim desetljećima nizala istraživanja o utjecaju soli, postalo je gotovo dogmatski prihvaćeno da je sol važan čimbenik rizika za razvoj hipertenzije te da podupire njezinu progresiju, kao i različite kardiovaskularne komplikacije. To je i potvrđeno u brojnim meta-analizama.

U sklopu strategije za prevenciju i kontrolu kroničnih nezaraznih bolesti, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) izdala je preporuke da bi se unos soli trebao držati ispod 5 g soli dnevno (što odgovara 2000 mg Na) (103). Suvremenim prehrambenim navikama unosi se dvostruko više soli nego što je preporučeno.

Kako su prehrambene navike različite diljem svijeta, dnevni unos natrija varira od samo 200 mg u populaciji Yanomami Indijanaca u Brazilu do čak 10 300 mg u populaciji stanovnika sjevernih dijelova Japana (104).

Prehrana Hrvata nije iznimka u trendu previsokog unosa soli. Naime, u istraživanju prosječnog dnevног unosa soli među odraslim osobama u Republici Hrvatskoj, muškarci su unosili

$13,3 \pm 4,3$  g soli dnevno ( $223,6 \pm 74,0$  mmol Na / 24h urin), dok su žene unosile  $10,2 \pm 4,2$  g soli dnevno ( $177,3 \pm 69,1$  mmol Na / 24h urin) (105).

#### 1.4.2 Učinak unosa soli kroz prehranu na imunološku funkciju

Povećani unos soli hranom dovodi do disregulacije imunološkog sustava promicanjem diferencijacije CD4+ stanica u Th17 stanice te stoga podržava razvoj i održavanje upale u autoimunim bolestima (106–109). Naivni CD4+ T limfociti imaju nasljednu sposobnost prilagodbe procesa sazrijevanja nakon susreta s antigenom u odnosu na njihovu promjenjivu okolinu i prirodu antigenskog izazova. Njihova ogromna plastičnost ogleda se u rastućoj obitelji Th podskupova, uključujući Th1, Th2, TfH, Th17, Th9 i Th22 itd. (110). Klasični signali za aktivaciju i diferencijaciju T-stanica uključuju prepoznavanje kompleksa peptid – MHC (glavni kompleks histokompatibilnosti, engl. *major histocompatibility complex*) od strane komplementarnog T-staničnog receptora, uključivanje kostimulacijskih receptora i signalizaciju citokinima. Polarizirajući citokini i njihova nizvodna signalizacija prepoznati su kao glavna sila koja tjeri T limfocite prema njihovoj odgovarajućoj podskupini. Tip 3 imunološkog odgovora odnosi se na imunološke odgovore posredovane stanicama koje proizvode citokine iz obitelji IL-17, koji se u prvom redu izlučuju tijekom infekcija piogenim izvanstaničnim bakterijama na epitelnim barijerama (kao što je npr. slučaj u infekcijama bakterijama soja *Staphylococcus aureus*), dok iznimno u slučaju aberantne inicijacije takvi imunološki odgovori mogu dovesti do autoimunosti (111). Najbolja potvrda središnje uloge ovih citokina u upalnom procesu psorijaze jest postizanje čiste ili gotovo čiste kože (bez bolesti) kod osoba oboljelih od psorijaze nakon primanja biološke terapije inhibitorima IL-17 ili IL-23 (112).

Nadalje, nedavne studije pružile su dokaze o različitim sudbinama T-stanica nakon aktivacije kada su se lokalni uvjeti povezani s citokinskim miljeom promijenili. Na primjer, prisutnost prouparnih citokina IL-6, samih ili u kombinaciji s IL-1 $\beta$ , može potaknuti transdiferencijaciju FOXP3+ (Forkhead box P3 protein) regulatornih T-stanica u Th17 ili Treg/Th17 stanice (113). Na taj način regulatorne T-stanice gube svoju sposobnost održavanja periferne tolerancije i ograničavanja imunoloških odgovora te dobivaju prouparne efektorske funkcije (113).

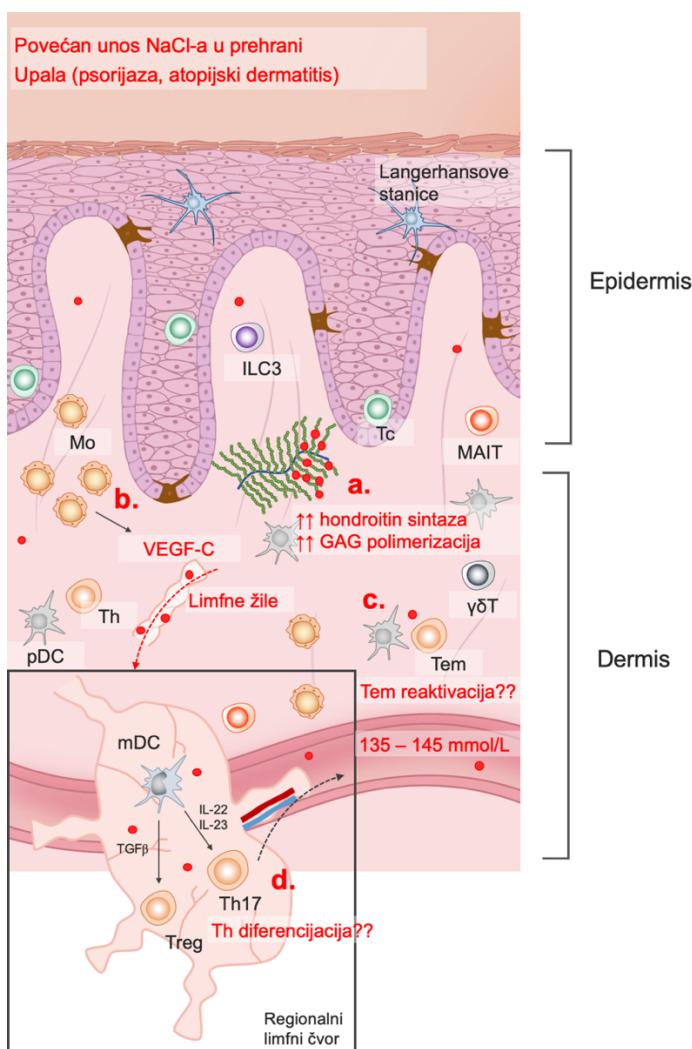
Osim klasičnih signala, sve više dokaza sugerira da okolišni čimbenici i metaboličke promjene u okolnom mikrookruženju također mogu potaknuti (trans)diferencijaciju i prilagodbu T-stanica tijekom upale i imunološkog sensinga. Ti vanjski signali uključuju vitamine (114,115), razinu kisika (116), slobodne kisikove i dušikove radikale (117), lokalne metabolite iz stanica domaćina i komenzalnih te patogenih mikroorganizama (118) i, nedavno ubrojen,

natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) (119).

Naime, dokazano je kako je medij s visokom koncentracijom soli jedan od načina indukcije polarizacije pomoćničkih ( $\text{CD}4^+$ ) limfocita putem IL-23 prema Th17 staničnom fenotipu (120). Naime, na molekularnoj razini, stanice osjećaju hiperosmotski stres u visokoslanom okruženju pomoću p38MAPK, što dovodi do nizvodne aktivacije NFAT5 (nuklearni faktor aktiviranih T-stanica 5, engl. *nuclear factor of activated T cells 5*) i SGK1 (serumom i glukokortikoidima inducirane kinaze 1, engl. *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*) kaskade, čime se utišava FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*) (121–124). FOXO1 transkripcijski je čimbenik koji svojom aktivnošću negativno regulira razvoj Th17 stanica direktnom represijom ekspresije retinoičnim receptorom povezanim nuklearnim receptorom  $\gamma$  (engl. *retinoid-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*, ROR $\gamma$ t) i IL-23R. Dakle, pojačanom aktivnošću SGK1 dolazi do utišavanja FOXO1, više razine ekspresije IL-23R te diferencijacije prema Th17 stanicama (125). Ekspresija SGK1 u normalnim je uvjetima niska, ali se povećava u slučaju povišene razine mineralo- i glukokortikoida, kao i u mediju s visokom koncentracijom soli. Inhibicijom p38MAPK, NFAT5 i SGK1 poništen je učinak visokih koncentracija soli na diferencijaciju prema Th17 limfocitima. Na taj je način ovaj put identificiran kao važan intracelularni signalni put kojim sol dovodi do diferencijacije prema Th17 stanicama (120). Također je važno za napomenuti kako je Kleinewietfeld sa sur. primijetio da Th17 stanice polarizirane pod učinkom visoke koncentracije soli imaju visoko patogeni fenotip, koji je karakteriziran pojačanom ekspresijom proučalnih citokina, među koje se ubraja i TNF- $\alpha$  (120). Važno je za napomenuti kako naivne i memorijske T-stanice recirkuliraju između sekundarnih limfoidnih organa i mjesta upale te pritom mijenjaju mikrookoliš. Slijede dokazi koji podupiru važnu ulogu tkivnog  $\text{NaCl}$  u oblikovanju i ograničavanju Th17 imunoloških odgovora.

Dugo se pretpostavljalo da koncentracije  $\text{NaCl}$  u tjelesnim tekućinama i tkivima strogo reguliraju bubrezi i endokrini sustav. Koncentracija natrija u serumu životinja i ljudi u različitim fiziološkim i patološkim stanjima održava se unutar uskog raspona (126,127). Međutim, to ne vrijedi za tkiva u kojima precizno mjerjenje koncentracije natrija donedavno nije bilo moguće. U tkivima  $\text{NaCl}$  brzo disocira na pozitivno nabijene natrijeve ione ( $\text{Na}^+$ ) i negativno nabijene kloridne ione ( $\text{Cl}^-$ ). Slobodni  $\text{Na}^+$  ioni zatim brzo uspostavljaju nekovalentne veze s negativno nabijenim makromolekulama tkiva, kao što su glikozaminoglikani (GAG) i hijaluronska kiselina, čime se onemogućuje određivanje njihove točne koncentracije u tkivu (119). Napredne tehnike uključujući analizu neutronske aktivacije i magnetsku rezonanciju natrijem ( $^{23}\text{Na}$ ), iznijele su na vidjelo činjenicu da se sadržaj natrija u tkivu dinamički prilagođava prehrambenim promjenama u unosu soli i pokazuje varijabilni sadržaj natrija u tkivu ovisno o vrsti tkiva, spolu, dobi i upalnom statusu (128–130).

Tkivo posebno osjetljivo na prehrambene promjene u unosu natrija je koža (129). Upalna stanja kože kao što su atopijski dermatitis (AD), psorijaza i bakterijske infekcije daju dodatne potencijalne uzroke/mehanizme za nakupljanje natrija u koži (131–133). Zanimljivo je da je povećan broj transkriptova hondroitin sintaze pronađen u koži nakon nakupljanja NaCl u prehrani, što sugerira da opseg polimerizacije lanca glikozaminoglikana može regulirati sadržaj natrija u koži i drugim tkivima (134). Također postoje dokazi o dodatnom regulacijskom mehanizmu putem modulacije protoka limfe. Naime, makrofazi su sposobni osjetiti promjenjive koncentracije  $\text{Na}^+$  i proizvesti faktor rasta vaskularnog endotela C (engl. *vascular endothelial growth factor C*, VEGF-C) što dovodi do hiperplazije/limfangiogeneze limfnih kapilara i povećanog čišćenja soli iz kožnih skladišta (135).



Slika 1.3. Regulacija skladištenja NaCl u koži.

Koncentracija NaCl (crvene točkice) u serumu održava se unutar uskog raspona (135–145 mmol / L) čak i pri različitim razinama unosa soli hranom i u različitim patološkim stanjima. Noviji podatci ukazuju na to da se sadržaj NaCl u koži značajno mijenja kao odgovor na opterećenje hranom i na upalu. Povećana GAG polimerizacija (a) omogućuje skladištenje  $\text{Na}^+$ , dok neo(limfo)angiogeneza, koja je izazvana s VEGF-C,

omogućuje uklanjanje NaCl iz kože (b). Koža je važan dio imunološkog sustava u kojemu su prisutne stanice za imunološki nadzor. Povećani sadržaj Na<sup>+</sup> utječe na reaktivaciju Tem (c) u koži, kao i na diferencijaciju naivnih Th limfocita u regionalnim limfnim čvorovima (d). Mo, monociti; ILC3, urođena limfoidna stanica 3; Tc, citotoksična T stanica; MAIT, invarijantna T stanica povezana sa sluznicom; pDC, plazmacitoidna dendritična stanica; mDC, mijeloidna dendritična stanica; Treg, regulatorna T stanica; Th, T pomoćnička stanica; Tem, efektorska memorijska T stanica; GAG, glikozaminoglikani; VEGF-C, vaskularni endotelni faktor rasta C; IL, interleukin; TGFβ, transformirajući faktor rasta beta; γδT, gama delta ( $\gamma\delta$ ) T stanice.

Autorska slika mentorice. Prethodno objavljena u Krajina I, Stupin A, Šola M, Mihalj M. Oxidative Stress Induced by High Salt Diet—Possible Implications for Development and Clinical Manifestation of Cutaneous Inflammation and Endothelial Dysfunction in Psoriasis vulgaris. *Antioxidants*. 2022;11:1269.

U slučaju psorijaze, prototipa TNFα – Th17 modela bolesti, nedavni podaci pokazali su povećano zadržavanje natrija i vode u lezionalnoj i nelezionalnoj koži, ali samo u bolesnika s umjerenim do teškim oblikom bolesti (PASI > 5), ali ne i kod onih s blagim oblikom (PASI < 5). Akumulacija natrija u korelaciji je s težinom bolesti i učestalošću γδ T stanica koje izlučuju IL-17 u perifernoj krvi (131). U skladu s prethodnim izvješćima, autori iste studije izvjestili su o povećanom stvaranju IL-17A iz naivnih CD4<sup>+</sup> T stanica koje su primarno pod Th17-polarizirajućim citokinima i visokim koncentracijama NaCl. Pionirske studije učinaka indukcije ionskom soli na diferencijaciju Th17 stanica također su pokazale povećane patogene efektorske funkcije Th stanica pod utjecajem visokog NaCl (120,136).

Naime, adaptivni prijenos naivnih CD4<sup>+</sup> T stanica diferenciranih pod Th17-polarizirajućim citokinima i povećanom koncentracijom NaCl rezultirao je pogoršanjem simptoma bolesti mišjeg kolitisa i eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa. Kasniji eksperimenti su pokazali da imunomodulatorni učinci NaCl nisu primijećeni samo na naivnim T pomoćničkim stanicama, već da povećane koncentracije NaCl utječu i na efektorske memorijske T stanice na isti način, čak i u odsutnosti Th17-polarizirajućih čimbenika (137). Zanimljivo, kada su ljudske efektorske Th17 stanice ponovno stimulirane ex-vivo u uvjetima hipertoničnog NaCl-a, u odsutnosti proučalnih citokina, dobile su protuupalni fenotip karakteriziran pojačanom ekspresijom transkriptata Foxp3, transformirajućeg faktora rasta β (engl. *transforming growth factor β*, TGF-β), IL10, gena za aktivaciju limfocita 3 (engl. *lymphocyte-activation gene 3*, LAG3), inducibilnog T-staničnog kostimulatora (engl. *inducible T Cell Costimulator*, ICOS) i protein 4 povezan s citotoksičnim T limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*, CTLA4) (137).

Farmakološka blokada p38 signalizacije ukinula je NaCl-induciranu pojačanu ekspresiju IL-17A i FOXP3 u efektorskim Th17 stanicama. Radi toga može se zaključiti da su promatrani

učinci vjerojatno posredovani kroz aktivaciju puta p38MAPK i njegovih nizvodnih ciljeva NFAT5 i SGK1 (138). Međutim, ako su iste stanice bile diferencirane u proinflamatornom citokinskom okolišu, prvenstveno u prisutnosti IL-1 $\beta$  i / ili IL-6, njihov Th17 stanični potpis, kao karakteriziran ekspresijom ROR- $\gamma$ t, IL-22 i C-C kemokinskog receptora tip 6 (engl. *C-C chemokine receptor type 6*, CCR6), bio je sačuvan (137). Nadalje, čini se da učinak nije bio jednak u slučaju svih efektorskih Th17 stanica. Čini se kako to ovisi o citokinskom okolišu tijekom prvog susreta s antigenom.

Na primjer, specifični Th17 odgovor na *C. albicans* ovisi o prisutnosti IL-1 $\beta$ . Takve efektorske stanice reagiraju na hipertonične NaCl uvjete pojačavanjem proupatnih efektorskih funkcija povezanih s Th17 stanicama (137).

Učinci mikrookruženja tkiva s visokom koncentracijom NaCl-a na Th17 stanice mogu biti različiti – i proupatni i protuupalni. Također, ovise o kontekstu, prvenstveno o prisutnosti proupatnih citokina poput IL-1 $\beta$  i IL-6. Ova otkrića imaju moguće implikacije za terapijske strategije u liječenju kroničnih autoimunih bolesti. Ciljano ukidanje signalnog puta IL-1 pomoću agenasa za blokiranje IL-1 ili IL-1R moglo bi inducirati protuupalne Th17 odgovore u tkivnom mikrookruženju s visokim sadržajem NaCl. S druge strane, smanjen unos soli mogao bi smanjiti akumulaciju NaCl-a u tkivima i tako promovirati protuupalne Th17 efektorske funkcije u osoba oboljelih od psorijaze i drugih autoimunih bolesti.

#### **1.4.3 Učinak unosa soli kroz prehranu na kardiovaskularni sustav i mikrocirkulaciju**

Endotelna je disfunkcija reverzibilno stanje promijenjenog odgovora endotela na mehaničke ili biokemijske utjecaje, za koje je poznato da prethodi procesu stvaranja aterosklerotskog plaka (79–81). Aktivacija endotelnih stanica patofiziološki je usko povezana s endotelnom disfunkcijom te je karakterizirana pojačanom ekspresijom međustaničnih, vaskularnih i leukocitnih adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E- selektin) (81,83–85).

Poznato je da se endotelna disfunkcija javlja kod normotenzivnih i hipertenzivnih osoba koje su osjetljive na sol, tj. reagiraju povišenjem krvnog tlaka na povećani unos soli hranom (139,140). Međutim, primjećeno je da kratkotrajni visok unos soli u prehrani može rezultirati oštećenjem endotelne funkcije neovisno o utjecaju na vrijednosti krvnog tlaka i osjetljivost na sol te osobe kao i da oksidativni stres potencijalno igra važnu ulogu u pojavi endotelne disfunkcije u uvjetima visokog natrija (141,142).

Sve je veći broj dokaza *in vitro* studija te studija na životnjama i ljudima koji upućuju na to da visok unos soli u prehrani utječe na endotelnu funkciju neovisno o povišenju krvnog tlaka. Na

primjer, smanjenje endotel-ovisne vazodilatacije na acetilkolin uočen je u normotenzivnih štakora koji su bili na visokoslanoj (VS) dijeti, u usporedbi sa štakorima na niskoslanoj (NS) dijeti, što ukazuje na to da smanjena bioraspoloživost endogenog NO dovodi do smanjene vaskularne dilatacije. Ovo je dodatno potkrijepljeno nalazom očuvane vaskularne reakcije nakon dodatka NO donora natrij nitroprusida (SNP). Zanimljivo je da je ovaj učinak prehrane s visokim unosom soli poništen u prisutnosti čistača slobodnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), superoksid dismutaze (SOD), kao i SOD mimetika Tempola, koji je karakteriziran većom propusnošću membrane nego sam SOD, i katalaze (143,144).

Stoga se čini da bi visok unos soli prehranom mogao uzrokovati poremećaj redoks ravnoteže i povećati proizvodnju ROS-a (141,142). Premda oksidativni stres uzrokovani visokoslanom prehranom primarno utječe na vaskularnu homeostazu kroz smanjenje bioraspoloživosti NO, on također može preko učinka na nukleinske kiseline, proteine i lipide dovesti do promjene u drugim biokemijskim i fizičkim procesima (145).

U *in vitro* studiji na bifurkacijskoj protočnoj staničnoj kulturi s HUVEC (endotelne stanice ljudske pupčane vene, engl. *human umbilical vein endothelial cells*), koja oponaša arterijsku bifurkaciju, pokazalo se da uvjeti visoke koncentracije natrija uvelike povećavaju osjetljivost endotelnih stanica na učinke TNF- $\alpha$  u uvjetima nejednolikih smicajnih sila i da je ovaj učinak natrija ovisan o koncentraciji. Stoga je inkubacija s povećanim koncentracijama natrija *in vitro* izazvala i povećanu ekspresiju VCAM-1 i E-selektina i dovela do veće adhezije monocita na endotelne stanice u modelu s nejednolikim smičnim silama (146).

Međutim, ova endotelna aktivacija pod učinkom TNF- $\alpha$  koja je dodatno povećana povišenom koncentracijom natrija, bila je spriječena uvjetima laminarnog protoka i čak obrnuta u uvjetima statičkog protoka, što znači da ove promjene u endotelu izazvane natrijem ovise o obrascu sila smicanja (146,147). Osim toga, učinak visoke koncentracije natrija na aktivaciju endotela pod neu jednačenim smičnim naprezanjem spriječen je u odsutnosti TNF- $\alpha$  (146). Ova bi otkrića mogla biti od posebnog interesa u kontekstu bolesti kao što je psorijaza, kod kojih je ekspresija TNF- $\alpha$  pojačana. Naime, natrij pojačava proaterogeni učinak TNF- $\alpha$  na staničnu adheziju u bifurkaciji karotidnih arterija (tj. u područjima arterija koja su obično sklona aterosklerozi) u miševa s nedostatkom apolipoproteina E (ApoE) koji su hranjeni prema visokoslanom dijetnom protokolu, u usporedbi s onima koji su hranjeni uobičajenim količinama soli (146).

#### 1.4.4 Sol i psorijaza

Razina natrija u serumu regulirana je tako da se održava na oko 140 mmol / L (148). Višak natrija može se ili izlučiti iz tijela ili akumulirati u tjelesnim tkivima kao što je koža

(131,133,149–151). Kako je već ranije spomenuto, u nedavnoj studiji koju su proveli Maifeld i sur., pokazano je da pacijenti s PASI > 5 imaju veći sadržaj natrija, kako u lezionalnoj, tako i u nelezionalnoj koži, u usporedbi s pacijentima s blažom kliničkom slikom psorijaze i zdravim kontrolnim ispitanicima (131). Međutim, u ovoj studiji nije se ispitivao unos natrija hranom, tako da utjecaj unosa hranom na nakupljanje natrija u koži pacijenata s psorijazom tek treba razjasniti (152). Budući da je poznato da visokoslani uvjeti pomiču diferencijaciju CD4+ stanica prema Th17 stanicama (106–109), ometaju Treg stanice (153) i također dovode do povećanja proizvodnje ROS-a, smanjenje unosa soli moglo bi imati terapeutski značaj u kontekstu psorijaze i povezanih kardiovaskularnih komorbiditeta, uključujući oštećenje endotelne funkcije (141,142), smanjenjem upale i oksidativnog stresa (152).

Budući da niskoslana dijeta može dovesti do oporavka endotelne mikrovaskularne funkcije i kod normotenzivnih i kod hipertenzivnih osoba (154,155), isti se učinak može očekivati u bolesnika s psorijazom s utvrđenom endotelnom disfunkcijom (90,91,96,96,99,156,157). Na primjer, *in vitro* studija koju su proveli Wild i sur., pokazala je da je učinak TNF- $\alpha$  na aktivaciju endotelnih stanica pod neujednačenim smičnim silama povećan u visokoslanim uvjetima i da taj učinak ovisi o koncentracijama natrija (146). Ovo daje uvid u potencijal smanjenog unosa natrija hranom zato što natrij utječe na jedan od ključnih mehanizama kojima je mikrovaskularna funkcija poremećena u bolesnika s psorijazom. Budući da TNF- $\alpha$  igra ulogu u imunopatogenezi psorijaze i stoga je povišen u bolesnika s psorijazom (158), promjena u prehrambenim navikama ovih bolesnika mogla bi učiniti veću razliku u oporavku endotelne funkcije kod osoba oboljelih od psorijaze nego u zdravih pojedinaca. Sve ovo dovodi do pretpostavke da bi LS dijeta mogla koristiti pacijentima s psorijazom.

Unos smanjene količine kuhinjske soli mogao bi dovesti do oporavka endotelne disfunkcije, što je prvi, ali još uvijek reverzibilni korak u procesu aterogeneze (72). To bi dalje moglo dovesti do smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti, koji je prisutan kod bolesnika s psorijazom neovisno o drugim, tradicionalnim, kardiovaskularnim čimbenicima rizika, i moglo bi smanjiti morbiditet, mortalitet i javnozdravstvene troškove povezane s kardiovaskularnim komorbiditetom u bolesnika s psorijazom. Doista bi bilo od velike vrijednosti dodatno ispitati učinak NS prehrane na funkciju endotela u bolesnika s psorijazom *in vivo*.

## 2. HIPOTEZA

Smanjeni unos kuhinjske soli u prehrani u obliku dvotjedne niskoslane dijete dovodi do promjene u ravnoteži Th17 i regulatornih T (Treg) limfocita te dovodi do smanjenja upale i poboljšanja vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože oboljelih od vulgarne psorijaze.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti učinak dvotjedne dijete s niskim unosom soli na ravnotežu Th17 i Treg limfocita kao i ulogu SGK1 kinaze u njihovoj (trans)diferencijaciji kod oboljelih od vulgarne psorijaze te utvrditi učinak niskoslane dijete na vaskularnu reaktivnost u mikrocirkulaciji kože te udio endotel-ovisnih i endotel-neovisnih čimbenika u vazodilataciji u osoba oboljelih od vulgarne psorijaze.

Specifični su ciljevi ove studije bili sljedeći:

1. Odrediti udjele Th17 i Treg limfocita.
2. Odrediti izražaj SGK1 kinaze u staničnom lizatu PBMC stanica.
3. Odrediti serumsku razinu proučalnih i protuupalnih citokina.
4. Odrediti protoke u mikrocirkulaciji kože pomoću LDF metode, kao i udio endotel-ovisnih i endotel-neovisnih čimbenika vazodilatacije.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1 Ustroj studije

Ovo je istraživanje prospektivna kohortna studija s jednom, nerandomiziranom skupinom ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze, u kojoj su svi ispitanici dodijeljeni istom studijskom protokolu.

### 4.2 Ispitanici

U istraživanje je uključeno 28 ispitanika oboljelih od kronične plak psorijaze s klinički procijenjenom težinom bolesti PASI  $\geq 5$  u trenutku uključenja u studiju. Svi su ispitanici dodijeljeni istoj intervenciji. Ispitanici su prilikom uključivanja u istraživanje upućeni kako se trebaju kroz 14 dana pridržavati dijete s niskim unosom kuhinjske soli (unos soli  $< 3,75 \text{ g / dan}$ ). Ispitanici su regrutirani kao pacijenti Zavoda za dermatologiju i venerologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svi su ispitanici punoljetne osobe s razvijenom kliničkom slikom kronične plak psorijaze, koja je patohistološki potvrđena.

Isključni kriteriji bili su:

- dob  $< 18$  godina,
- postojanje drugih imunološki posredovanih bolesti (uz iznimku autoimunih bolesti štitnjače i psorijatičnog artritisa – osobe s tim komorbiditetima bile su uključene),
- maligne bolesti,
- trenutne zarazne bolesti,
- alergijske reakcije unutar 6 tjedana prije početka istraživanja.

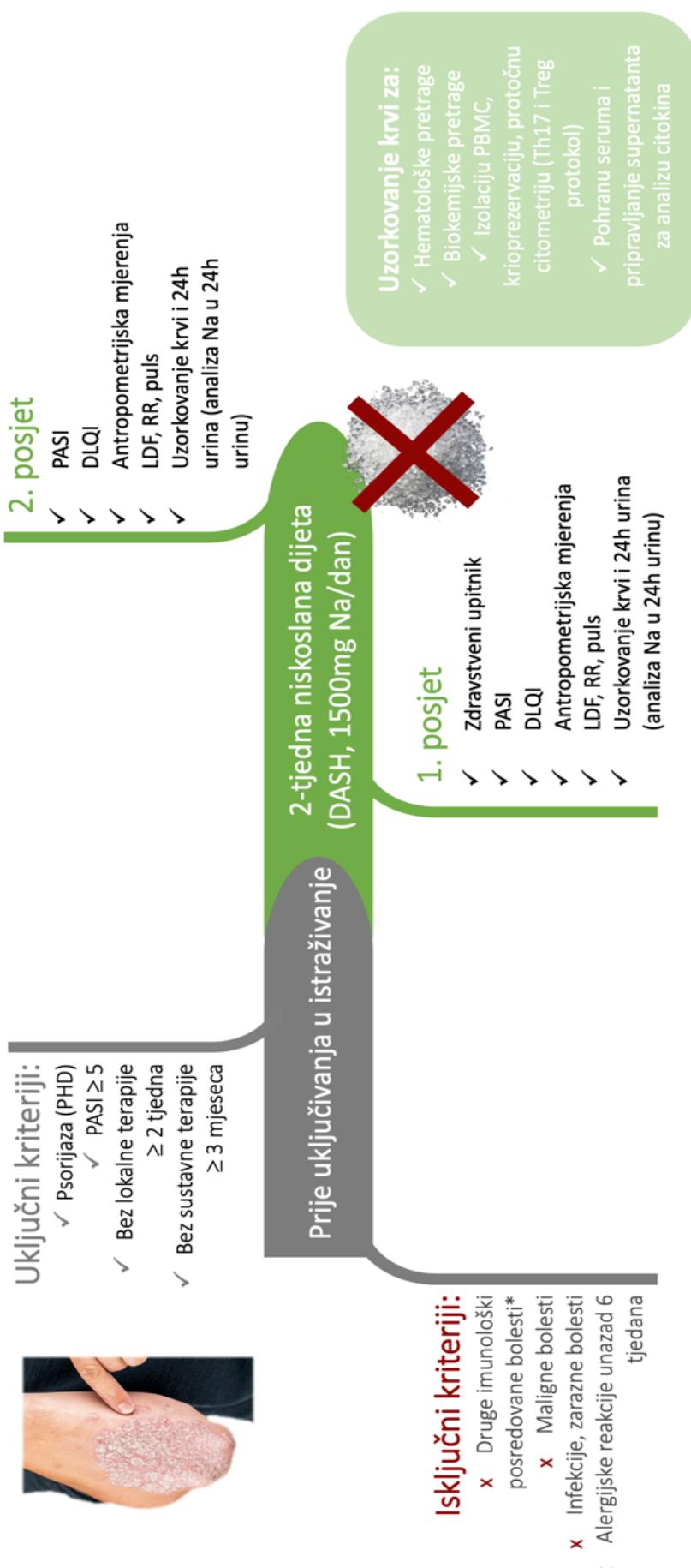
Ispitanici nisu koristili lokalnu terapiju kortikosteroidima najmanje 2 tjedna prije uključivanja u studiju, kao i 2 tjedna tijekom istraživanja. Također, ispitanici nisu koristili ni sustavnu terapiju lijekovima s utjecajem na psorijazu (metotreksat, retinoide, ciklosporin, sustavne kortikosteroide, apremilast) ili biološku terapiju najmanje 3 mjeseca prije i 2 tjedna tijekom istraživanja. Svakom je ispitaniku prilikom uključivanja u studiju dodijeljena oznaka koja ukazuje na studiju, redni broj uključenog ispitanika te redni broj mjerena za tog ispitanika. Svaki je ispitanik prilikom uključivanja u studiju potpisao informirani pristanak. Protokol je ovog istraživanja u skladu sa standardima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije te je dobio odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa:

602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-153 i Klasa: 602-04/23-08/03, Broj: 2158-61-46-23-41), kao i odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Broj: R2-13170/2020). Istraživanje je provedeno na Zavodu za dermatologiju i venerologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, u Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku te u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku i u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Također, provedeno je i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek te Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek. Istraživanje je registrirano na Clinicaltrials.gov (ID: NCT0589264, pod nazivom “*Low-Salt Diet Effect on Th17-Mediated Inflammation and Vascular Reactivity in Psoriasis*”).

Ova studija sufinancirana je Institucijskim znanstveno-istraživačkim projektima Medicinskog fakulteta Osijek: IP2-MEFOS-2020 (PI Martina Mihalj) pod nazivom „Učinci dijete sa smanjenim unosom kuhinjske soli na Th17-posredovanu upalu i vaskularnu reaktivnost kod oboljelih od vulgarne psorijaze“ i P16-MEFOS-2023 (PI Martina Mihalj) pod nazivom „Uloga sustavne uprale u razvoju metaboličkog sindroma i vaskularne endotelne disfunkcije kod pacijenata oboljelih od vulgarne psorijaze“.

#### 4.3 Protokol istraživanja

Svi uključeni ispitanici (N=28) dodijeljeni su istom istraživačkom protokolu te su prilikom dva posjeta vremenskom razmaku od 14 dana učinjena dva mjerena, prije i nakon provođenja dijete s niskim unosom soli. Po uključenju ispitanika u studiju, ispitanici su držali dijetu s niskim udjelom kuhinjske soli, s unosom natrija 1500 mg dnevno (3,75 g soli) (DASH diet, U.S. Department of Health and Human Services, 2006) u razdoblju od 14 dana od uključenja u studiju. Prilikom oba posjeta procijenjena je težina kliničke slike psorijaze (pomoću PASI), ispunjen je upitnik o utjecaju psorijaze na kvalitetu života u proteklom tjednu (DLQI), učinjena su antropometrijska i hemodinamska mjerena, uzeti su uzorci krvi za hematološke i biokemijske pretrage, za izolaciju mononuklearnih stanica periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC te pohranu seruma za naknadnu analizu citokina. Također je prilikom oba posjeta mјeren protok u mikrocirkulaciji kože pomoću LDF metode. Na Slici 4.1. shematski je prikazan protokol istraživanja.



Slika 4.1. Shematski prikaz protokola istraživanja.

PHD – dokazana patohistološkom dijagnostikom; PASI – indeks proširenosti i težine psorijaze; DLQI – dermatološki indeks kvalitete života; LDF – laser Doppler floumetrija, RR – arterijski tlak; Na –natrij; 24-h – 24-satni. Ilustracija autorice disertacije.

#### 4.4 Određivanje antropometrijskih mjera

Ispitanicima se antropometrijskim mjerjenjima izmjerila tjelesna visina, masa, opseg struka i opseg bokova. Opseg struka izmјeren je na sredini između donjeg ruba posljednjeg palpabilnog rebra i gornjeg ruba Cristae ilicae zdjelice. Opseg bokova mјeren je oko najšireg dijela stražnjice. Pri oba mjerjenja mjerna je traka bila paralelna s podom.

Na temelju podataka o visini i masi izračunat je indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI), jednostavan indeks koji se uobičajeno koristi za grubu procjenu uhranjenosti odraslih osoba. Vrijednost BMI-a omjer je tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) te je izračunat pomoću standardne formule:

$$BMI = \frac{\text{tjelesna težina (kg)}}{\text{tjelesna visina (m)}^2}$$

Na temelju mjera opsega struka i bokova izračunao se omjer opsega struka i bokova (engl. *waist-to-hip ratio*, WHR). WHR jednostavna je metoda koja se najčešće koristi za ocjenu raspodjele masnog tkiva na pojedinim dijelovima tijela i procjenu centripetalne debljine. Za računanje WHR korištena je standardna formula:

$$WHR = \frac{\text{opseg struka (cm)}}{\text{opseg bokova (cm)}}$$

#### 4.5 Procjena težine psorijaze

Težinu vulgarne psorijaze određena je primjenom indeksa proširenosti i težine psorijaze (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*, PASI) te dermatološkim indeksom kvalitete života (engl. *Dermatological Quality of Life Index*, DLQI).

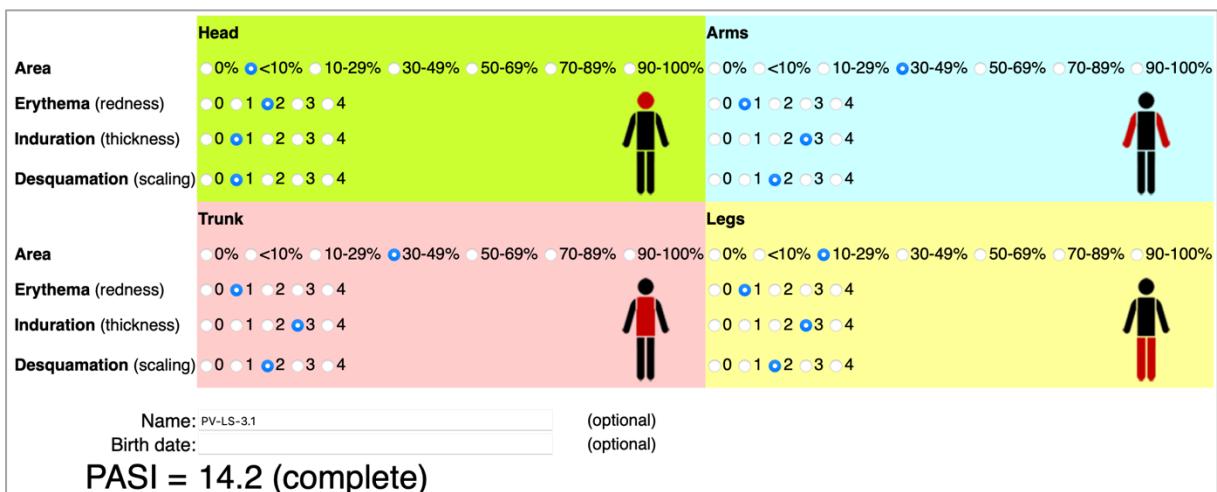
##### 4.5.1 Indeks proširenosti i težine psorijaze, PASI

Zbroj PASI određuje površinu zahvaćene kože psorijatičnim promjenama, a zbroj eritema, debljine plaka i deskvamacije pojedine regije množi se s numeričkom vrijednosti tjelesne regije i s postotkom raširenosti lezija na određenoj regiji. Vrijednosti PASI zbroja mogu biti od 0 do 72, pri čemu zbroj 72 označava najtežu kliničku manifestaciju bolesti. Prilikom računanja PASI zbroja, koristio se kalkulator dostupan na stranici: <http://pasi.corti.li>.

Kako je uređeno europskim konsenzusom, za procjenu težine bolesti pomoću PASI zbroja korištena je sljedeća razdioba:

PASI  $\leq$  10 – blaga psorijaza;

PASI  $>$  10 – srednje teška i teška psorijaza (159).



**Slika 4.2 Izračun indeksa proširenosti i težine psorijaze (PASI).**

Procjena težine psorijatične bolesti ispitanika u određenom trenutku na temelju induracije, eritema i ljuštanja. Head, glava; arms, ruke; trunk, trup; legs, noge; erythema, eritem; induration, induracija; desquamation, deskvamacija, PASI, indeks proširenosti i težine psorijaze.

Preuzeto sa stranice: <http://pasi.corti.li>, uz dopuštenje vlasnika internetske stranice.

#### 4.5.2 Dermatološki indeks kvalitete života, DLQI

Za procjenu utjecaja psorijaze na kvalitetu života ispitanika, korišten je široko primjenjivani upitnik Dermatološki indeks kvalitete života (engl. *Dermatology Life Quality Index*, DLQI). Upitnik se sastoji od 10 pitanja koja se odnose na subjektivnu simptomatologiju bolesti u ispitanika (svrbež, osjetljivost, bol i peckanje), osjećaj neugode i upadljivosti, utjecaj bolesti na svakodnevne aktivnosti, odabir odjeće, učenje, funkcioniranje na poslu i učenju, problematiku u društvenim odnosima, utjecaj bolesti na spolni život te poteškoće vezanima uz liječenje bolesti. Vrijednosti DLQI skale mogu biti u rasponu od 0 do 30.

#### **4.6 Uzorkovanje krvi**

Uzorci venske krvi uzeti su prilikom uključivanja u studiju te 14. dan nakon uključivanja u studiju venepunkcijom kubitalne vene. Krv je uzorkovana u 3 vrste epruveta: epruvete s dikalij-etilaminodioctenom kiselinom ( $K_2$ EDTA; BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK) za analizu mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC) te kompletну krvnu sliku; epruvete s trinatrijevim citratom za analizu fibrinogena (BD Vacutainer, Dickinson and Company, Plymouth, UK), epruvete obložene silicijem za biokemijsku analizu seruma te pohranu seruma radi kasnije analize citokina (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK)

#### **4.7 Uzorkovanje 24-satnog urina**

Kako bi se dokazalo da su ispitanici provodili NS dijetu, prikupljeni su 24-satni uzorci urina prema pravilima struke, tako da su prvi dan prikupljanja prvi jutarnji urin odbacili, potom prilikom svakog idućeg mokrenja urin prikupljali u čistu bocu za skupljanje te su prvi jutarnji urin drugog dana prikupljanja pridružili uzorku. Ispitanici su urin prikupljali dan prije i ujutro na dan studijskih posjeta, ponajprije radi analiziranja 24-satnog izlučivanja natrija bubrežima, kako bi se posredno preko primjerene formule procijenio unos natrija na regularnoj dijeti i na niskoslanoj dijeti.

#### **4.8 Mjerenje hematoloških i biokemijskih parametara iz pune krvi, seruma i 24-satnog urina**

U roku 30 minuta od venepunkcije uzorci su bili transportirani u Zavod za kliničku i laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek, gdje su se odredile iz uzorka pune krvi kompletna i diferencijalna krvna slika (KKS, DKS) te biokemijski parametri iz seruma (glukoza, urea, kreatinin, urati, hsCRP, ukupni kolesterol, trigliceridi, lipoprotein visoke gustoće [HDL, engl. *high density lipoprotein*], lipoprotein niske gustoće [LDL, engl. *low density lipoprotein*], natrij [Na], kalij [K], kalcij [Ca], folna kiselina, vitamin B12, aktivnost fibrinogena) koristeći standardne laboratorijske metode i protokole Zavoda za kliničku i laboratorijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Nadalje, iz uzorka 24-satnog urina analizirali su se: koeficijent kreatinina, albumin, urea, Na, K. Dnevni unos soli na temelju 24-satnog izlučivanja natrija urinom izračunat je pomoću odgovarajuće formule (1 gram soli ( $NaCl$ ) = 393,4 mg Na = 17,1 mmol Na).

## 4.9 Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells, PBMC*)

### 4.9.1 Izolacija PBMC iz pune krvi

Uzorci venske krvi prikupljeni su u epruvetama volumena 10 mL koje sadrže dikalijetilendiamintetraoctenu kiselinu (K<sub>2</sub>EDTA) (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK). Uzorci su obrađeni unutar 3 sata od venepunkcije. Reagensi i puferi koji su se koristili u protokolu, bili su prethodno ohlađeni i čuvani u hladnjaku, a onda su zagrijani na sobnu temperaturu (otprilike 20 – 25 °C) prije početka izolacijskog protokola. Otprilike 16 mL pune krvi razrijeđeno je prethodno pripremljenom fiziološkom otopinom s dodatkom fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) u omjeru 1 : 1 u cilindričnoj epruveti za centrifugu s konusnom bazom volumena 50 mL. Nadalje, tako razrijeđen uzorak s PBS-om pažljivo je nanesen na ~16 mL (volumen ovisan o volumenu uzorka) Ficoll-Paque® PLUS gradacijskog medija za centrifugiranje, gustoće 1,077 ± 0,001 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska), bez miješanja slojeva. Uzorci su u epruvetama za centrifugiranje centrifugirani 25 min pri relativnoj centrifugalnoj sili (engl. *relative centrifugal force*, RCF) 800 G s isključenim centrifugalnim kočnicama, na sobnoj temperaturi (Rotina 380, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka). Nakon što se centrifuga potpuno zaustavila, epruvete su izvađene i postavljene na stalak. Mononuklearne stanice periferne krvi vide se nakon centrifugiranja uzorka kao mutni, bjelasti prsten koji razdvaja slojeve žute plazme s trombocitima, a nalazi se na površini i bezbojnog Ficoll-Paque® PLUS medija, ispod kojega se još nalaze u crvenom sloju granulociti i eritrociti. Potom se prikupi sloj PBMC-a, i dva puta ispere s 1 × PBS (centrifuga 10 min, RCF 800G s uključenim centrifugalnim kočnicama). Supernatant je potom odbačen te su stanice resuspendirane u 5 mL 1 × PBS otopine. Potom se, kako bi se odredila vijabilnost stanica, 50 µL suspenzije PBMC stanica obojala s 100 µL 0,4 % otopinom triptan plave boje (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) (160). Tako pripravljen uzorak nanesen je Bürker-Türk komoriku/hemocitometar te su izbrojane mrtve (plavo obojene) stanice te žive (neobojene) stanice. Broj živih stanica izračunat je potom prema formuli:  $\frac{N}{4} \cdot 3 = x \cdot 10^4$  stanica/cm<sup>3</sup>, pri čemu N označava ukupan broj izbrojanih stanica, dok broj 4 u nazivniku označava broj komorica u kojima su se stanice brojale, dok je broj 3 s kojim se množi faktor razrjeđenja.

#### **4.9.2 Kultivacija PBMC**

PBMC kultivirane su u RPMI-1640 mediju s L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i penicilin-streptomicin antibiotika (1 %) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka). Tako pripravljene suspenzije stanica pohranjene su u pločama za kulturu stanica s 24 jažice u inkubatoru (Shel Lab, CO<sub>2</sub> Series, Sheldon manufacturing Inc, OR, SAD) u uvjetima s temperaturom 37 °C, vlažnosti zraka > 80 % i 5 % CO<sub>2</sub> na 24 sata prije dalnjih postupaka.

#### **4.9.3 Postupak krioprezervacije i odmrzavanja PBMC stanica**

Dimetil sulfoksid (DMSO; Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) s FSB u omjeru 1 : 9 korišten je za krioprezervaciju. Za veću uspješnost ovog postupka kriotubice su bile uronjene u izopropilni alkohol (Gram-mol, Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) u Mr. Frosty spremniku za zamrzavanje (Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) te na -80 °C pohranjene na najmanje 24 sata u zamrzivaču.

Kod postupka odmrzavanja kriotubice s uzorkom uronjene su u vodenu kupelj ugrijanu na 37 °C, samo do odvajanja uzorka od stijenke kriotubice, što je otprilike 1 minutu, kako ne bi došlo do toksičnog djelovanja DMSO na stanice. Potom je uzorak prebačen u epruvete za centrifugu volumena 15 mL te je polako pipetom dodavan medij za kulturu stanica RPMI-1640 obogaćen FBS-om i antibioticima koji je prethodno zagrijan na 37 °C. Tako pripravljen uzorak je centrifugiran (5 min, 1500 RPMI, pri sobnoj temperaturi) te je nakon završetka centrifugiranja odbačen supernatant. Potom je dodano 5mL medija te su stanice nakon resuspenzije ponovno centrifugirane (5 min, 1500 RPMI, pri sobnoj temperaturi), a supernatant je ponovno odbačen po završetku centrifugiranja. U uzorak je dodano 1,5 mL medija te je uzorak resuspendiran i prebačen u ploče s 24 jažice i pohranjen u inkubator tijekom 24 sata (~ 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, > 80 % vlažnosti zraka).

#### **4.9.4 Određivanje vijabilnosti stanica**

Kako bi se izbjegla mogućnost sustavne pogreške zbog nespecifičnog bojanja mrtvih ili umirućih stanica te kako bi se odredila vijabilnost stanica, uzorci su bojani 0,4 % triptan plavom otopinom te su žive stanice izbrojane u Bürger-Türkovoj komorici/hemocitometru pod svjetlosnim mikroskopom. Stanice su također bojane bojom koja se može fiksirati (engl. *Fixable Viability Dye*, FVD) eFluorTM 780 (eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, SAD), koju je nakon ekscitacije moguće detektirati pomoću protočne citometrije s 633 nm crvenim laserom. Uzorci uključeni u završnu analizu i izračune imali su vijabilnost stanica od  $\geq 80\%$ .

#### 4.9.5 Postupak negativne magnetske selekcije komercijalnim kitom

Nakon što je uzorak odmrznut, a broj stanica podešen na  $1,2 \times 10^7$ , tehnikom negativne magnetske selekcije odvojene su CD4+ stanice. Negativna magnetska selekcija izvršena je komercijalno dostupnim kitom (MagniSortTM Human CD4+ T cell, Enrichment kit; Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), s upotrebom smjese biotiniliranih protutijela te magnetskih kuglica obloženih streptavidinom, prema proizvođačevom protokolu (protokol dostupan na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/8804-6811.pdf>, datum pristupa: 13. 06. 2024).

Potom su uzorci prebačeni u polistirenske epruvete s okruglim dnom volumena 5 mL (12 x 75 mm; BD Falcon, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD), dva puta isprane s 1 x PBS (centrifugirane 5 min, 800 G) te su potom stanice resuspendirane u 200  $\mu$ L 1 x PBS / 3 % FBS / 10 mM EDTA. Potom je dodano 40  $\mu$ L smjese protutijela (engl. *Enrichment Antibody Cocktail*) te je uzorak pomiješan pulsnom tehnikom na vorteksu (IKA® Vortex GENIUS 3) pet puta i potom inkubiran na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Po završetku inkubacije, dodano je 4 mL 1 x PBS / 10 mM EDTA. Potom je uzorak u epruvetama centrifugiran (800 G/ 5 min) te je nakon centrifugiranja supernatant odbačen i 200  $\mu$ L 1 x PBS / 3 % i FBS / 10 mM EDTA uz 40  $\mu$ L MagniSort kuglica, koji su prije dodavanja resuspendirani, dodani su u uzorak te pomiješani pulsnom tehnikom na vorteksu 5 puta i ostavljeni na inkubaciji (5 minuta, na sobnoj temperaturi).

Nakon inkubacije dodan je 1 x PBS / 10 mM EDTA do volumena od 2,5 mL i stanice su resuspendirane. Epruvete su, jedna po jedna, umetnute u MagniSort magnet (eBioscience, Affymetrix tvrtke Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, SAD) sve dok dno cijevi nije dotaklo radnu površinu kroz rupu magneta i inkubirane su na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon inkubacije, magnet koji je sadržavao epruvetu je podignut i supernatant je izliven u novu epruvetu od 5 mL jednim kontinuiranim pokretom bez miješanja, kako se ne bi smanjila čistoća stanica. Epruvete koje sadržavaju vezane stanice uklonjene su iz magneta i odbačene. Negativno odabrane stanice nakon ovog postupka su spremne za aktivaciju.

#### 4.9.6 Aktivacija CD4+ T limfocita stimulacijom pomoću PMA-ionomicina

Kako bi se aktivirale CD4+ T stanice i potaknula proizvodnja citokina, magnetski sortirane stanice kratko su (tijekom 4 sata) stimulirane forbol-12-miristat-13-acetatom (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) i ionomicinom. Aktivacija CD4 T-stanica provedena je u pločama s 24 udubljenja/jažice (tijekom 4 sata, ~ 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> > 80 % razina vlažnosti zraka) s komercijalno dostupnom mješavinom za stimulaciju stanica (Cell Stimulation Cocktail 500×; eBioscienceTM, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u konačnoj koncentraciji od 2 µL/mL (potpuni protokol dostupan na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/00-4970.pdf>, Datum pristupa: 13. 06. 2024.).

Kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>) dodan je u stimulacijski medij kako bi se izazvala dugotrajna intracelularna signalizacija kalcija koja bi izazvala stanični odgovor (konačna koncentracija 5 µL/mL).

Brefeldin A otopina (1000×; eBioscienceTM, Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u konačnoj koncentraciji od 3 µL/mL, korištena je kao inhibitor transporta proteina do Golgijevog aparata s posljedičnom akumulacijom proteina u endoplazmatskom retikulumu, kako bi se spriječilo izlučivanje citokina i omogućila procjena stanica koje proizvode IL-17 protočnom citometrijom (s prethodnim intracelularnim bojenjem IL-17) (dostupno na <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/00-4506.pdf>, Datum pristupa: 13. 06. 2024.)

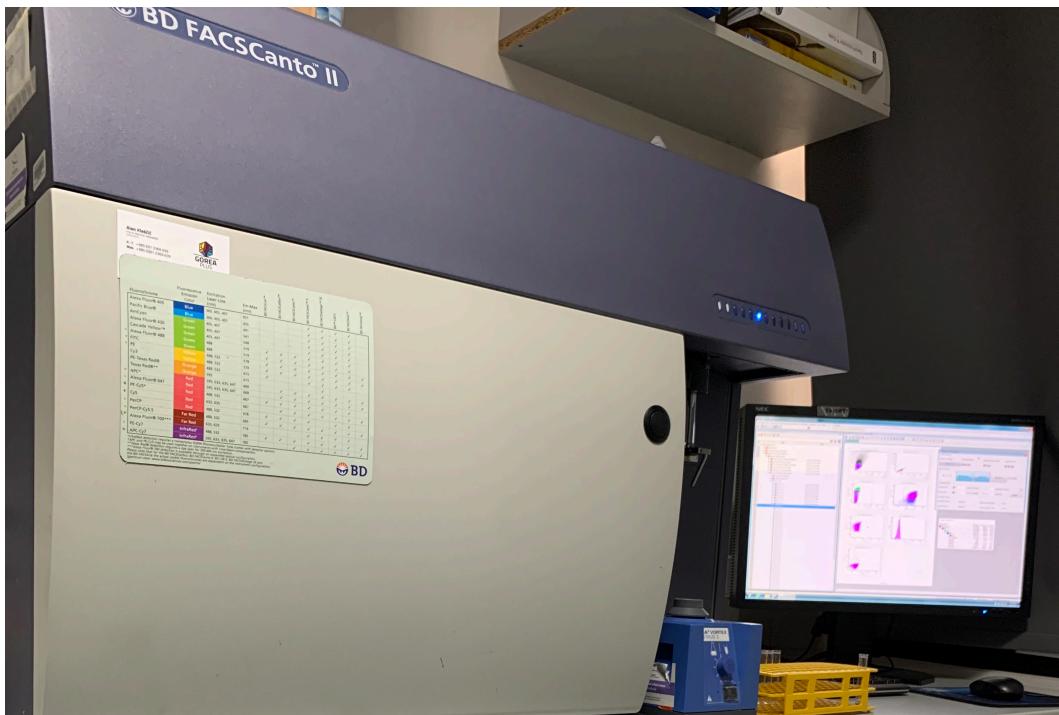
Koktel za stimulaciju stanica, Brefeldin A i CaCl<sub>2</sub> dodani su istovremeno u suspenziju stanica. Nakon završetka četverosatne inkubacije, dodano je 200 µL 0,1 M EDTA i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se reakcija zaustavila.

#### 4.10 Protočna citometrija

Protočna citometrija korištena je za analizu frekvencije CD4+Foxp3+ regulatornih T limfocita i CD4+IL-17A+ T pomoćnih limfocita među PBMC. Kako bi se uzorci pripremili, slijedio se preporučeni protokol (dostupan na [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) uz modifikacije, koji je u tom modificiranom obliku više puta korišten u našem laboratoriju (153,161).

Mjerenje frekvencije Th17 i Treg stanica iz prikladno pripremljenih uzoraka provedeno je na BD FACSCanto II citometru (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD) (Slika 4.3.), koji je opremljen plavim argonskim 488 nm i crvenim HeNe 633 nm laserima. Analiza i

vizualizacija podataka izvedena je softverom FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone, Australija) uz odgovarajuću licencu.



**Slika 4.3. BD FACSCanto II citometar.**

---

BD FACSCanto II citometar (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD) korišten je za analizu frekvencija Th17 i Treg stanica iz prikladno pripremljenih uzoraka.

---

#### 4.10.1 Izrada kompenzacijskih matrica za analizu uzorka

Prije analize uzorka na protočnom citometru izrađene su kompenzacijске matrice, kako bi se omogućila adekvatna analiza uzorka. Naime, kako je u provedenim protokolima korišteno više fluorofora te je pri tome neizbjježno spektralno preklapanje između pojedinih fluorofora, adekvatna analiza bila bi bez kompenzacijskih matrica nemoguća. Prije početka pokusa na uzorcima ispitanika, analizirali su se uzorci koji su bili pripravljeni kao jednobojne kontrole (engl. *single stained controls*, SS), fluorescencija minus jedan (engl. *fluorescence minus one*, FMO) kontrole te negativne kontrole, koje nam otkrivaju razinu spektralnog preklapanja i pozadinskog bojenja te se matematičkim izračunima u programu ti učinci eliminiraju. Svi kontrolni uzorci pripremljeni su prema istom protokolu kao i uzorci ispitanika koji su se nakon toga analizirali. Budući da su se u istraživanju u sklopu ove doktorske disertacije koristila dva

protokola, za analizu frekvencija Th17 stanica i Treg stanica, izrađene su i dvije kompenzacijске matrice, svaka za svoj odgovarajući protokol. Kompenzacijске matrice izračunate su korištenjem kompenzacijskih kuglica (BD<sup>TM</sup> CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particle Set, BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD).

#### 4.10.2 Određivanje vijabilnosti stanica u uzorku

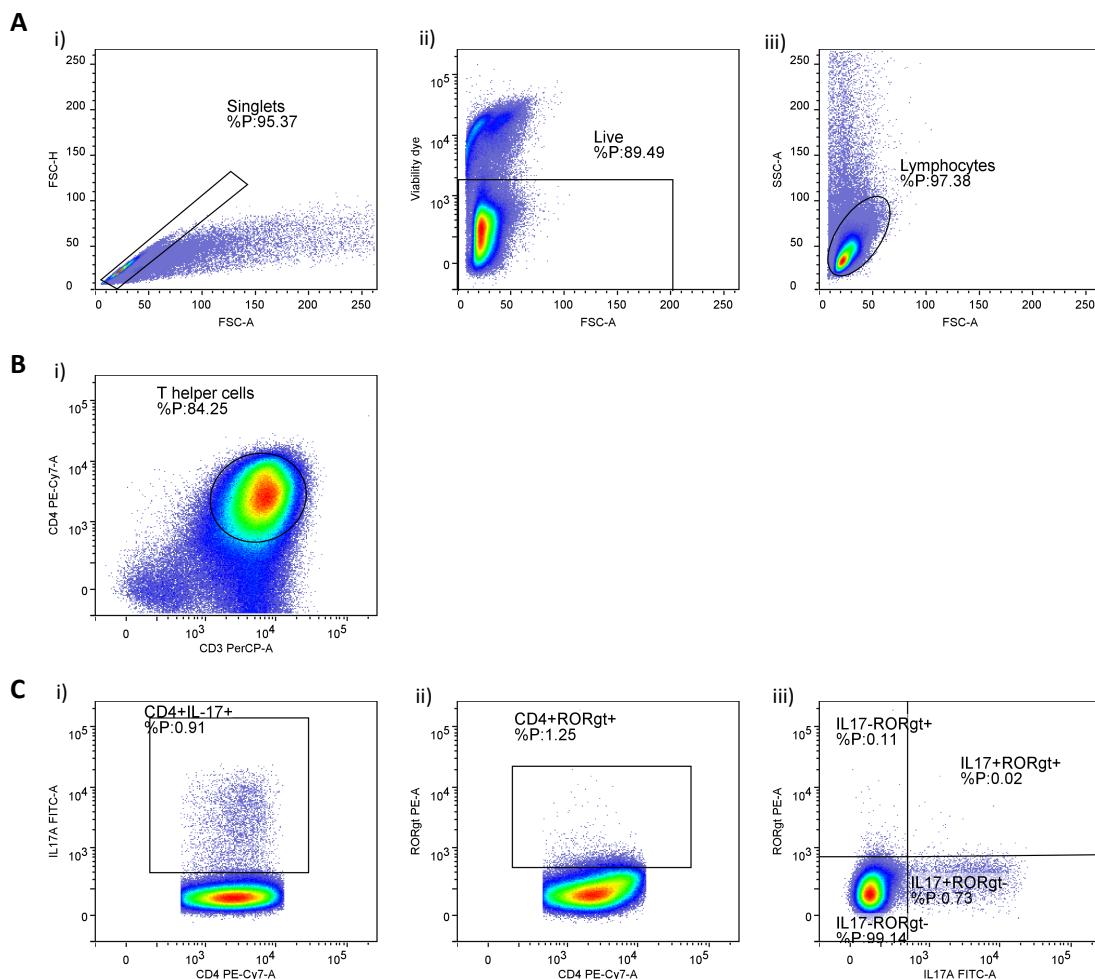
Priprema uzorka uključivala je označavanje mrtvih stanica. Mrtve i oštećene stanice bile su isključene iz daljnje analize pomoću komercijalnog kita za određivanje viabilnosti stanica, dodavanjem 0,5 µL aminoreaktivne fiksabilne boje (Fixable Viability Dye (FVD) eFluor<sup>TM</sup> 780; eBioscience<sup>TM</sup>, Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), koja se može detektirati na protočnom citometru nakon ekscitacije crvenim laserom valne duljine 633 nm, u 900 µL PBS-a, uz inkubaciju u trajanju od 30 minuta na + 4 °C. Na živim, neoštećenim stanicama ova se boja veže samo na amine na površini stanice. Međutim, kako je stanična membrana stanica koje su oštećene ili mrtve permeabilnija, boja u takve stanice ulazi te se, osim za slobodne amine koji nalaze na površini stanice, veže i intracelularno, zbog čega takve oštećene i mrtve stanice emitiraju višestruko jači fluorescentni signal. Potom se dodavanjem 2 mL PBS-a te se uzorak nakon miješanja na vorteksu centrifugirao (800 G, 5 minuta), nakon čega se odbacio supernatant.

#### 4.10.3 Blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela (blok Fc fragmenata)

Nadalje, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela i nastanak lažno pozitivnih rezultata na protočnoj citometriji, dodano je 5 µL reagens za blokiranje ljudskog Fc fragmenta (engl. *Fragment, crystallizable*) (BD Pharmigen<sup>TM</sup> Human BD Fc Block<sup>TM</sup>, BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) uz 95 µL PBS-a u uzorak. Nakon što su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 8 minuta, dodana je u uzorak odgovarajuća mješavina protutijela (ovisno o tome je li se bojio uzorak za detekciju Treg ili Th17 stanica) uz PBS do ukupnog volumena 50 µL. Tako pripravljen uzorak s mješavinom protutijela inkubirao se u mraku tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorak se 2 x isprao PBS-om, kako je opisano na kraju prethodnog odlomka.

#### 4.10.4 Imunofenotipizacija PBMC stanica i analiza frekvencije Th17 i Treg stanica

Kako bi se odredila frekvencija Th17 limfocita, CD4+ T limfociti aktivirani su PMA-ionomicinom te su se koristila protutijela obilježena fluorokromima za intracelularne antigene ROR $\gamma$ t PE (klon: AFKJS-9, eBioscience<sup>TM</sup>), IL-17A FITC (klon: eBio64DEC17, eBioscience<sup>TM</sup>) te protutijela obilježena fluorokromima za ekstracelularne antigene CD3 PerCP-eFluorTM 710 (klon: SK7, eBioscience<sup>TM</sup>, Affymetrix by Thermo Fisher Scientific, CA, SAD), CD4 PE-Cy7 (klon: SK3, eBioscience<sup>TM</sup>), CD196 APC (klon: R6H1, eBioscience<sup>TM</sup>). Reprezentativne strategije određivanja frekvencije Th17 limfocita prikazane su na Slici 4.4.



**Slika 4.4. Prikaz reprezentativne strategije određivanja frekvencije Th17 populacije u perifernoj krvi metodom protočne citometrije.**

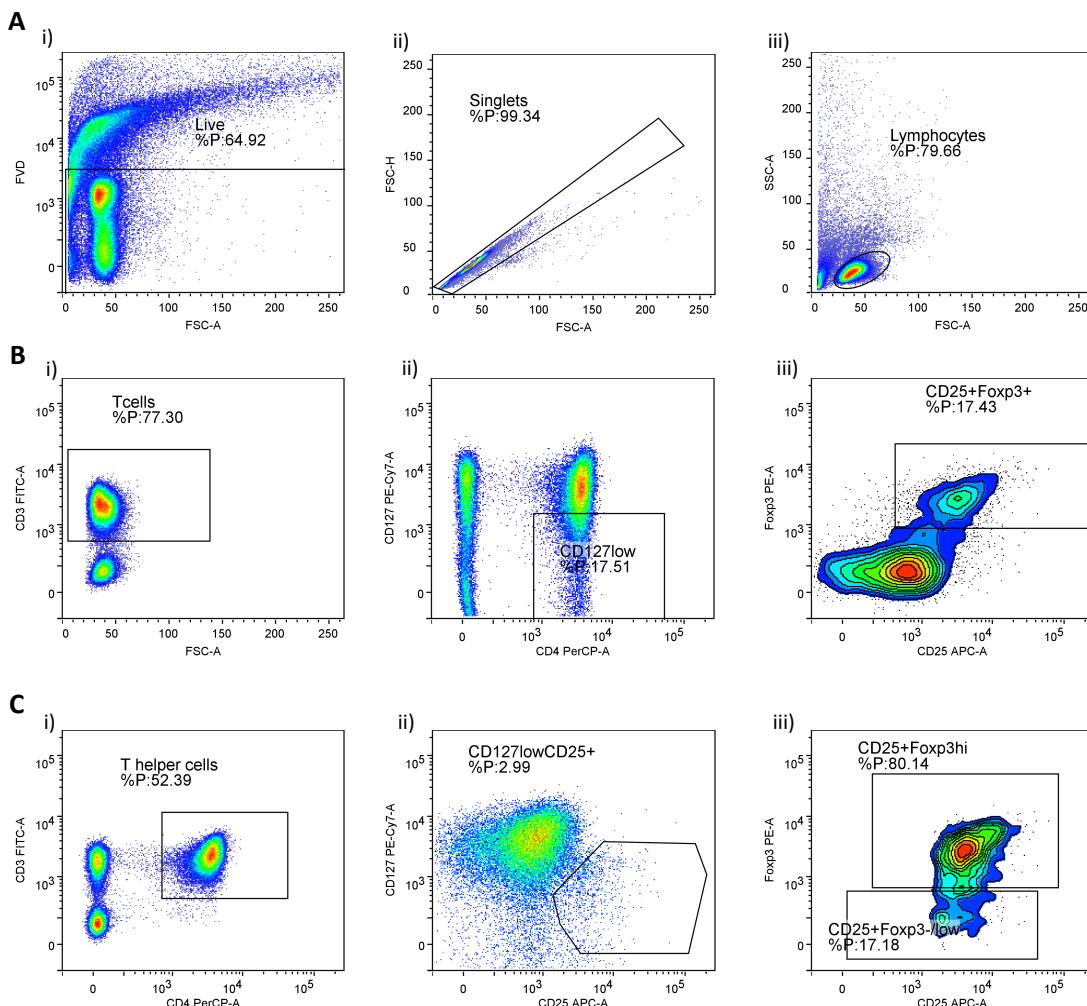
Prvotno su izdvojene jednostrukе stanice (tzv. *singlets*) (Ai) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrtnog raspršenja svjetlosti (engl. *forward scatter area*, FSC-A; engl. *forward scatter height*, FSC-H) te

---

potom žive stanice (FVD negativna populacija) (**Aii**). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju pravocrtnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (FSC-A; *side scatter area*, SSC-A) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (**Aiii**). Na temelju prisutnosti glikoproteina CD3 i CD4 definirana je populacija pomoćničkih T limfocita (**B**). Nadalje su na temelju izražaja IL-17, i ROR $\gamma$ T transkripcijskog čimbenika određene frekvencije ukupnih pomoćničkih stanica koje luče IL-17 (**Ci i Ciii**), kao i Th17 linije pomoćničkih T limfocita (**Cii i Ciii**). FVD – fiksabilna boja za vijabilnost (engl. *fixable viability dye*); FITC – fluoresceinski izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*); PE-Cy7 – fikoeritrin cijanin 7 (engl. *phycoerythrin coupled with cyanine dye* (Cy7); PerCP – peridin klorofil (engl. *peridinin chlorophyll protein*). Za analizu podataka i ilustraciju korišten je softver FlowLogic.

---

Da bi se odredila frekvencija Treg stanica, za detekciju intracelularnog transkripcijskog faktora FOXP3 korišten je puferski set za bojenje (eBioscienceTM, Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) s FOXP3 PE protutijelom (klon: 235A/E7, eBioscienceTM). protutijelom. Za bojanje površinskih antigena na stanicama, korištena su u ovoj mješavini protutijela: CD3 FITC (klon: OKT3, eBioscienceTM, Affymetrix od Thermo Fisher Scientific, Kalifornija, SAD), CD4 PerCP-eFluorTM 710 (klon: SK3, eBioscienceTM), CDy177 (klon: eBioRDR5, eBioscienceTM), CD25 APC (klon: BC96, eBioscienceTM). Reprezentativne strategije određivanja frekvencije Treg stanica prikazane su na Slici 4.5.



**Slika 4.5. Prikaz reprezentativne strategije određivanja frekvencije Treg populacije u perifernoj krvi metodom protočne citometrije.**

Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni koji ilustriraju strategiju „postavljanja prozora“, uključujući izuzeće mrtvih stanica (pozitivne na fiksabilnu boju za vijabilnost stanica, FVD) (A- i) i dvostrukih stanica na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrtnog raspršenja svjetlosti (engl. *forward scatter area*, FSC-A; engl. *forward scatter height*, FSC-H) (A-ii). U sljedećem koraku definirana je populacija limfocita na temelju pravocrtnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (FSC-A; engl. *side scatter area*, SSC-A) koje daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica (Aiii). Paneli B i C prikazuju komplementarne načine određivanje udjela regulatornih stanica. U prvoj varijanti najprije su pomoću CD3 biljega definirani T limfociti (Bi), potom CD127 slabo pozitivni/negativni pomoćnički T limfociti (Bii) te naponsljetku CD25 i FOXP3 pozitivni regulatorni T limfociti (Treg; Biii). U alternativnoj varijanti su na temelju CD3 i CD4 biljega najprije izdvojeni pomoćnički T limfociti (Ci), potom CD25 pozitivni i CD127 negativni pomoćnički limfociti (Cii) te naponsljetku stanice koje uz CD25 biljeg izražavaju i FOXP3, a odgovaraju Treg stanicama (Ciii). FVD – Fiksabilna boja za vijabilnost stanica (engl. *Fixable Viability Dye*; *live* – žive stanice; *singlets* – jednostrukne stanice; FITC – fluoresceinski izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*); PE-Cy7 – fikoeritrin cijanin 7 (engl. *phycoerythrin coupled with cyanine dye* (Cy7); PerCP – peridin klorofil (engl. *peridinin chlorophyll protein*); APC – alofikocijanin (engl. *allophycocyanin*). Za analizu podataka i ilustraciju korišten je softver FlowLogic.

## **4.11 Luminex metoda za određivanje citokina iz seruma i supernatanta**

### **4.11.1 Priprema supernatanta iz PBMC staničnih kultura tretiranih PMA-ionomicinom**

Zamrznute PBMC su odmrznute te su preko noći ostavljene u mediju za kulturu stanica ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ,  $> 80\%$  razina vlažnosti). Potom je broj stanica bio podešen na 200 000 stanica po 200  $\mu\text{L}$  medija za stimulaciju stanica. Aktivacija PBMC stanica provedena je uz pomoć medija za stimulaciju koji se sastojao od medija za kulturu stanica RPMI-1640 s dodatkom PMA-ionomicina i  $\text{CaCl}_2$ , kako je opisano u odjeljku 4.9.6. Aktivacija CD4 stanica. Aktivacija CD4+ T limfocita provedena je u pločama s 24 jažice (inkubacija tijekom 4 h,  $\sim 37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ,  $> 80\%$  razina vlažnosti zraka). Nakon razdoblja inkubacije od 4 sata, prikupljen je supernatant te je pohranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$  do analize.

### **4.11.2 Multiplex i simplex kvantifikacija proinflamatornih i antiinflamatornih citokina te kemokina u uzorcima supernatanta i seruma**

Koncentracije proučalnih i protuupalnih citokina i kemokina (TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-17A (CTLA-8), IL-2, IL4, IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$ , CTACK, IL-18, IL-23, MIP-3 $\beta$  i VEGF-A) mjereni su korištenjem tri kompleta reagensa s magnetskim zrcicima (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija) i platforme Luminex 200 (Luminex Corp., Austin, TX, SAD).

Za analizu su korišteni kitovi koji su sadržavali reagense, protutijela obilježena magnetnim kuglicama i ploče: Human HS ProcartaPlex Mix&Match 10-plex (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija) za određivanje koncentracija IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, IL-17A (CTLA-8), IL-2, IL4, IL-6, IL-8 (CXCL8), TNF- $\alpha$ ; Human HS ProcartaPlex Mix&Match 5-plex (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija) za određivanje koncentracija CTACK (CCL27), IL-18, IL-23, MIP-3 $\beta$ , VEGF-A; te ProcartaPlex Human TGF beta 1 simplex (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija) za analizu koncentracije TGF- $\beta$ 1. Pri tome su se pratili protokoli proizvođača koji su bili sadržani uz pojedine kitove. Nadalje, uz uzorce ispitanika analizirali su se i standardi, tj. ispitivani analiti koji su od strane proizvođača pripremljeni u poznatim koncentracijama te 6 serijskih četverostrukih razrjeđenja.

Analiza podataka provedena je pomoću besplatnog softvera ProcartaPlex Analyst (eBioscience, Affymetrix by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i izražena je kao koncentracija

u pikogramima po mililitru. Mjerenja su obavljena u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska.

Uzorci su bili analizirani na uređaju Luminex 100/200 (Slika 4.6.), Luminex Corporation, Austin, Texas, USA. Rezultati su očitavani u softwareu Luminex xPonent, version 4.3.



**Slika 4.6 Uredaj Luminex 100/200, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA.**

#### **4.12 Kvantitativna „sendvič“ ELISA za mjerjenje SGK1 u staničnim lizatima iz kultura PBMC stanica tretiranih PMA-ionomicinom**

Kvantitativno određivanje humane kinaze 1 regulirane serumom i glukokortikoidima (engl. *Serum and glucocorticoid – regulated kinase 1*; SGK 1) u uzorcima staničnog lizata provedeno je korištenjem komercijalno dostupnog kvantitativnog sendvič ELISA kita (MyBioSource, Inc., SD, SAD). Stanični lizati za analizu pripremljeni su od PMA-ionomicinom stimuliranih PBMC stanica ispitanika prema uputama za suspenzijske stanice od proizvođača. Stanice su isprane nekoliko puta u 1 x PBS i centrifugirane na 1000 G (2 – 8 °C, 5 minuta) (mikrocentrifuga Centric200R, Domel, Železniki, Slovenija). Pripremanje uzorka uključivalo je dva ciklusa smrzavanja i odmrzavanja kako bi se razbile stanične membrane. Pripremljeni uzorci bili su odmah analizirani. Mjerenja su provedena na čitaču apsorbancije za mikropločice s 96 jažice (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD).

#### **4.13 Kvantitativna ELISA za mjerjenje koncentracija proučalnih citokina iz seruma**

Za mjerenje koncentracije IL-6, IL-23, IL-17A i TNF- $\alpha$  citokina korišteni su komercijalno dostupni ELISA kitovi: Human IL-6 ELISA Kit (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija), Human IL-23 ELISA Kit (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč,

Austrija), Human IL-17A High Sensitivity ELISA Kit (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija), Human TNF- $\alpha$  High Sensitivity ELISA Kit (Invitrogen tvrtke Thermo Fisher Scientific, Beč, Austrija). Uzorci, koji su bili smrznuti na -80 °C, odmrznuti su te potom pripremljeni prema uputama proizvođača. Pripremljeni uzorci bili su odmah analizirani. Mjerenja su provedena na čitaču apsorbancije za mikropločice s 96 jažice (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD).

#### **4.14 Mjerenje arterijskog tlaka**

Prilikom prvog i drugog studijskog posjeta kod ispitanika se arterijski tlak mjerio automatskim oscilometrijskim sfigmomanometrom (OMRON M3, OMRON Healthcare Inc., Osaka, Japan). Vrijednost arterijskog tlaka je izračunata kao medijan tri uzastopna mjerenja tlaka (mmHg). Iz sistoličkih (engl. *systolic blood pressure*, SBP) i dijastoličkih (engl. *diastolic blood pressure*, DBP) vrijednosti krvnog tlaka, izračunat je srednji arterijski tlak (engl. *mean arterial pressure*, MAP), koji predstavlja prosječni arterijski tlak tijekom jednog srčanog ciklusa, prema formuli:

$$MAP = \frac{(2 \cdot DBP) + SBP}{3} \text{ mmHg}$$

#### **4.15 Izračun Framinghamskog zbroja rizika**

Podaci o dobi, spolu, statusu pušenja, ukupnom kolesterolu, HDL kolesterolu, SBP te dosadašnjem liječenju antihipertenzivima korišteni su za izračun Framinghamskog zbroja rizika. Izračun je kalkuliran pomoću online kalkulatora dostupnim na [www.mdcalc.com](http://www.mdcalc.com).

#### **4.16 Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože**

Tehnika laser Dopplera floumetrije (engl. *Laser Doppler flowmetry*, LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK) korištena je za mjerenje protoka krvi i reaktivnosti krvnih žila u kožnoj mikrocirkulaciji, kao odgovor na četiri podražaja. Protoci i mikrovaskularna reaktivnost mjereni su na zdravoj, psorijatičnim plakovima nezahvaćenoj koži volarnog dijela obje podlaktice, 13 - 15 cm udaljenom od ručnoga zgloba, pri čemu su prilikom oba studijska posjeta mjerna mjesta bila jednaka. Mikrovaskularna reaktivnost određena je mjeranjem promjena u protoku kao odgovor na četiri različita podražaja – vaskularnu okluziju, iontoporezu acetilkolina (ACh), iontoporezu natrijevog nitroprusida (SNP) i lokalno zagrijavanje (42 °C) kože, tijekom oba posjeta Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju, nasumičnim redoslijedom. Mjerenja LDF tehnikom provedena su u toploj prostoriji (srednja vrijednost  $\pm$  SD temperature =  $23.5 \pm 0.5$  °C). Prije početka mjerenja, ispitanici su sjedili nekoliko minuta

radi aklimatizacije, kako bi se izbjegao eventualni utjecaj vanjske temperature na protok krvi u mikrocirkulaciji kože. Ispitanici su tijekom mjerena ležali na leđima i mirovali te im je laserska sonda bila prikladno pozicionirana kao što je prethodno opisano. Prosječna je vrijednost bazalnog protoka krvi bila između 5 i 10 PU. Određivanje mikrovaskularne reaktivnosti pri odgovoru na vaskularnu okluziju, tzv. post-okluzivna reaktivna hiperemija (engl. *post-occlusion reactive hyperaemia*, PORH) neinvazivni je test koji mjeri promjene protoka krvi prije i nakon jednominutne okluzije krvotoka manšetom na nadlaktičnoj razini. Naime, nakon petominutnog bazalnoga mjerena, napuhivanjem manšete izazvana je okluzija krvotoka kroz ruku. Pri tome se manšeta, koja je bila postavljena na nadlakticu, napuhivala iznad vrijednosti SBP ispitanika ( $\approx \text{SBP}_{\text{ispitanika}} + 30 - 50 \text{ mmHg}$ ) tijekom 1 minute. Protok krvi mjerio se tijekom bazalnog mjerena, tijekom okluzije manšetom, kao i prilikom reperfuzije, tj. hiperemije koja fiziološki nastupa nakon okluzije. Promjene u protoku krvi biti izražene u arbitarnim mjernim jedinicama – perfuzijskim jedinicama (engl. *perfusion units*, PU). Relativna promjena protoka krvi prilikom reaktivne hiperemije, iskazuje se kao površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) tijekom bazalnoga protoka, okluzije i reperfuzije, koja se izračuva pomoću računalnog programa. Konačni je rezultat izražen kao razlika između postotaka promjene protoka krvi tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na bazalne vrijednosti protoka krvi ( $\Delta R-O \%$ ). Iontoforeza je neinvazivni proces transdermalnog unosa nabijenih čestica izvana primijenjenim gradijentom struje niskog napona na koži. Nabijene čestice unose se u kožu pomoću iontoforetske elektrode koja se pričvršćuje uz kožu uz sondu LDF-a. Nakon 5 minuta bazalnog mjerena protoka, iontoforezom su se transdermalno unijeli pozitivno nabijeni ACh (1 %) primjenom anodne struje (7 pulsova direktnе struje jakosti 0,1 mA kroz 30 s, s pauzom od 30 s između pojedinih pulsova) i negativno nabijeni SNP (1 %) uz pomoć tri impulsa od 0,1 mA negativne struje tijekom 30 s, nakon čega slijede četiri impulsa od 0,2 mA tijekom 30 s, s 90 s između svake doze. Takvi pulsni iontoforetski protokoli primjenjuju se radi postizanja stabilnog platoa maksimalnog LDF odgovora. Mikrocirkulacijski odgovor na ACh i SNP izračunava se kalkulacijom AUC-a razlike tijekom bazalnog protoka krvi i nakon iontoforetske primjene ACh ili SNP u računalnom programu, a konačni je rezultat izražen kao povećanje protoka krvi nakon primjene ACh ili SNP u odnosu na bazalni protok krvi (povećanje protoka krvi ACh ili SNP). Nadalje, lokalna termalna hiperemija (LTH) četvrti je stimulus na kojega je mjerena odgovor krvnih žila.

Nakon bazalnog mjerena, lokalna temperatura je povećana s osnovne razine na 42 °C brzinom od 0,1 °C/s i ostala je na 42 °C tijekom trajanja protokola grijanja, pomoću regulatora kožnog grijajuća (moorVMS-HEAT, Moor Instruments, Axminster, UK). Protok krvi mjerena je tijekom cijelog LTH protokola, sve dok protok krvi nije dosegnuo stabilan plato (30 – 45 minuta nakon

početka zagrijavanja). Mikrocirkulacijski protok krvi i na ovaj stimulus određen je računalnim programom koji izračunava AUC tijekom bazalnog protoka i prilikom postizanja stabilnog platoa povećanog protoka krvi uzrokovanih lokalnim zagrijavanjem (stabilni plato očekivan je 30 do 45 min od trenutka kada je lokalno zagrijavanje počelo). Rezultat je izražen kao povećanje protoka tijekom zagrijavanja u usporedbi s osnovnim mikrovaskularnim protokom. LTH maksimalni je vazodilatatori kapacitet krvnih žila na stimulus lokalnog zagrijavanja kože na temperaturu od 42 °C, koji se koristi za procjenu specifično NO-posredovane vazodilatacije mikrocirkulacije kože ovisne o endotelu, budući da je 60 – 70 % odgovora na platu zagrijavanja ovisno o NO.

Testovi post-okluzivne reaktivne hiperemije, iontoforeze ACh i lokalne termalne hiperemije smatraju se direktnim biljezima endotelne mikrovaskularne funkcije. Također, istraživanja su pokazala kako je plato maksimalne toplinske vazodilatacije izravno ovisan o NO, najvažnijem vazodilatatoru porijekлом iz endotela. S druge strane, test iontoforezom SNP-a pokazatelj je vazodilatacije u mikrocirkulaciji kože neovisne o endotelu.

#### 4.17 Statističke metode

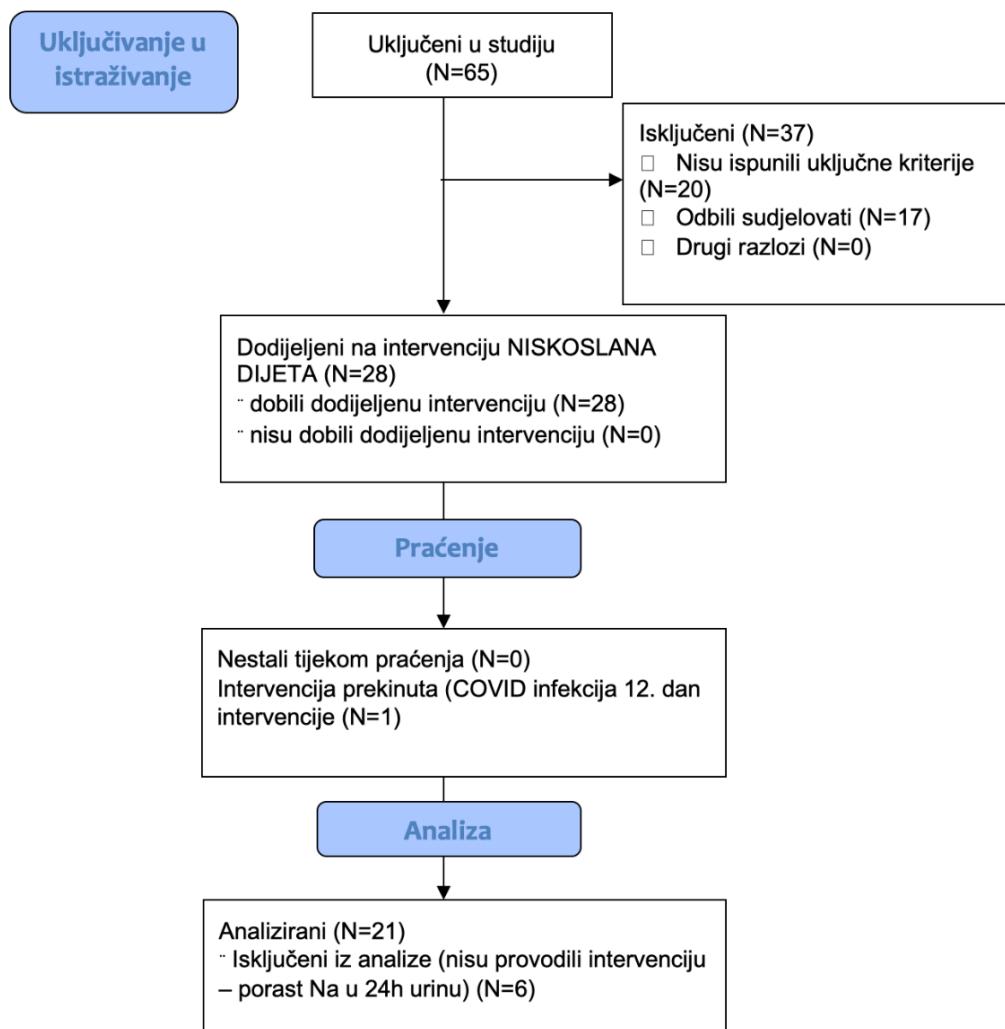
Normalnost distribucije omjernih varijabli testirana je Sharipo-Wilkovim testom, a homogenost varijanci Levenovim testom. Kontinuirani (brojčani) podatci prikazani su aritmetičkom sredinom i (standardnom devijacijom) za varijable s normalnom distribucijom ili medijanom s [interkvartilnim rasponom] (IQR, engl. *interquartile range*) za varijable koje ne prate normalnu distribuciju. Za razliku od medijana, korištena je Hodges-Lehmann procjena (*DescTools* paket 0.99.52, repozitorij <https://aakinshin.net/posts/hodges-lehmann-sen-shift-ci/>, CC BY-NC-SA 4.0 licenca). Kategoriski podatci sažeti su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Za parnu usporedbu (ponavljana mjerena, omjerna ljestvica), korišteni su parametrijski t-test parnih uzoraka te neparametrijski Wilcoxonov test sume rangova, ovisno o kontekstu. Povezanost (korelacija) između kontinuiranih varijabli procijenjena je Pearsonovim ili Spearmanovim korelacijskim testom, ovisno o normalnosti distribucije i linearnosti podataka. Neparametrijske parcijalne korelacije testirane su analizom PS (engl. *probability-scale*) reziduala (*PResiduals* 1.0-1) (162,163). Za tako identificirani skup dva ili više potencijalnih prediktora, raščlamba prediktivne vrijednosti (relativnog doprinosa i značaja) pojedinih kovarijata učinjena je Shapley regresijom, odnosno upotrebot SHAP (*SHapley Additive exPlanations*) metode (*xgboost* v1.7.7.1, *shapviz* 0.9.3). Time je postignuta dekompozicija multivarijatnog modela na SHAP vrijednosti, čija je prednost (uz dobre teorijske temelje) agnostički pristup učenju i razumna učinkovitost u zasićenom modelu s neovisnim ili blago koreliranim prediktorima (164).

Iznimno, generalni linearni model (GLM, *lme4 1.1-34* knjižnica) korišten je za log-transformirane omjerne varijable nakon provedene dijagnostike, uključujući procjenu inflacije varijance, inspekciiju kvantilnih (*q-q*) krivulja, inspekciiju linearnosti te kontrolu normalnosti i homogenosti reziduala (*performance 0.11.0* paket). Za grafički prikaz marginalnih učinaka u GLM (aditivni model, bez interakcija) korištene su *marginalEffects 0.17.0*, *sjPlot 2.8.15* i *jtools 2.2.2* knjižnice. Analiza tablica kontingencije učinjena je  $\chi^2$  ili egzaktnim Fisherovim testom. Ukoliko nije drugačije naznačeno, dvostrani  $P < 0,05$  predstavlja prag značajnosti, bez korekcije za broj testova.

Za statističku analizu i grafički prikaz korišten je program R 4.3.2 GUI 1.80 Big Sur ARM build (8281) ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) u RStudio sučelju (v 2023.12.1+402, RStudio Inc., Boston, MA, SAD) s paketom *fBasics*, Microsoft PowerPoint for Mac v16.19. Za analizu i grafički prikaz podataka korišteni su dodatni R paketi: *ggstatsplot 0.12.3.9000*, *ggbpabr 0.6.0*, *corrplot 0.9.2*, *cowplot 1.1.1*, *Hmisc 5.1-1*, *RColorBrewer v1.1-3*, *igraph 1.5.1*, *ggraph 2.1.0*, *reshape2 1.4.4*, *scales 1.3.0*, *tidyverse 2.0.0*, *shiny 1.7.5.1*, *magrittr 2.0.3* i *stats 4.3.1*. Kodovi potrebni za reprodukciju slika i rezultata dostupni su na opravdan zahtjev.

## 5. REZULTATI

CONSORT dijagram za transparentno izvješćivanje o ispitivanjima prikazan je na Slici 5.1. 28 osoba oba spola koje bolju od psorijaze dodijeljene su istom studijskom protokolu u kojem je intervencija bila dvotjedna niskoslana dijeti s unosom soli 3,75 g/dan (što je ekvivalentno 1500 mg natrija dnevno) (DASH diet, U.S. Department of Health and Human Services, 2006). Jedan je ispitanik isključen iz studije zbog COVID infekcije tijekom razdoblja intervencijske dijete, dok je 6 ispitanika isključeno iz analize podataka radi nedostatnog provođenja niskoslane dijete, što je dokazano nalazom 24-satne natrijureze. Uključivanje ispitanika provodilo se u razdoblju od 25. 10. 2021. do 10. 03. 2023. godine. Drugi posjet u studijskom protokolu za svakog je ispitanika bio 14 dana nakon prvog posjeta.



**Slika 5.1. CONSORT dijagram tijeka istraživanja.**

Grafički opisano regрутiranje studija: uključivanje, intervencija, praćenje, analiza podataka (izvor: izradila autorica disertacije).

U Tablici 5.1. prikazani su podatci iz upitnika o karakteristikama, životnim navikama i zdravstvenom stanju ispitanika. Treba istaknuti da je 5 ispitanika (25 %) bolovalo od psorijatičnog artritisa. Osim toga, 8 je ispitanika (38,09 %) imalo arterijsku hipertenziju. Većina je ispitanika ranije provodila lokalnu kortikosteroidnu terapiju za psorijazu, dok su samo 3 ispitanika (14,3 %) bila u tijeku svoje bolesti liječena sustavnim lijekovima, jednako je toliko liječeno fototerapijom te su svi ispitanici bili naivni za biološke lijekove.

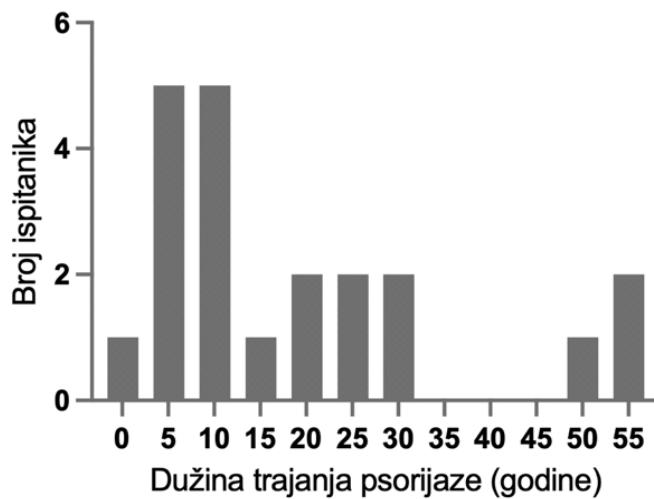
Na regularnoj dijeti nema znakova raslojavanja ni grupiranja (UMAP), što potvrđuje ispunjenost dva važna uvjeta: slučajno uzorkovanje i uniformni, homogeni uzorak ispitanika.

**Tablica 5.1. Karakteristike ispitanika, njihove životne navike i komorbiditeti.**

<b>Karakteristike ispitanika</b>	<b>N (god) / (%)</b>
N (Ž/M)	21 (12/9)
Dob (godine)	46,7 (15,7)
Trajanje psorijaze	12 [7 – 26]
<b>Životne navike</b>	
Pušači	5 (23,8 %)
Bivši pušači	7 (33,3 %)
- Godine pušenja	13,8 (8,5)
- Godine nepušenja	19,7 (12,9)
Redovito pijenje alkoholnih pića	3 (14,2 %)
<b>Komorbiditeti</b>	
- Psorijatični artritis	5 (25 %)
- Arterijska hipertenzija	8 (38,09 %)
- Terapija antihipertenzivima	8 (38,09%)
- Preboljeli AIM	1 (5 %)
- Hiperlipidemija	11 (52 %)
- Diabetes mellitus tip II	1 (5 %)
<b>Dosadašnje liječenje psorijaze</b>	
Lokalna terapija kortikosteroidima	18 (85,7 %)
Liječenje sustavnim lijekovima za psorijazu*	3 (14,3 %)
- Metotreksat	1 (5 %)
- Acitretin	1 (5 %)
- Leflunomid	1 (5 %)
Liječenje fototerapijom*	3 (14,29 %)
Liječenje biološkom terapijom*	0 (0 %)

Podatci su izraženi kao apsolutni broj ispitanika s određenom karakteristikom te kao postotak (%) od ukupnog broja analiziranih ispitanika. Rezultati numeričkih varijabli izraženi su kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) za normalnu distribuciju varijabli ili kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. N- broj, engl. *number*; Ž – žene; M – muškarci; AIM- akutni infarkt miokarda.

Histogram frekvencija za trajanje psorijaze ispitanika prikazan je na Slici 5.2.

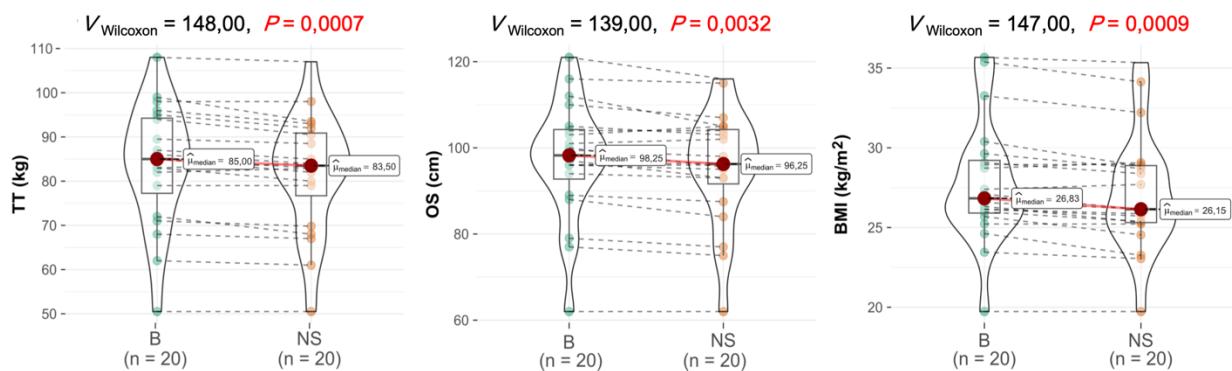


Slika 5.2. Histogram frekvencija za trajanje psorijaze ispitanika.

Medijan Framinghamskog zbroja kardiovaskularnog rizika (FRS) pri inicijalnom studijskom posjetu iznosi 1,1 [0,1 – 4].

### 5.1 Učinak niskoslane dijete na antropometrijska mjerena

Značajno su se smanjili indeks tjelesne mase, tjelesna težina i opseg struka nakon dvotjedne niskoslane dijete. NS dijeta nije dovela do značajne promjene u opsegu bokova ili omjeru stuka i bokova u odnosu na inicijalno mjerjenje na regularnoj dijeti ispitanika (Slika 5.3., Tablica 5.2.).



Slika 5.3. Parne komparacije i promjene u tjelesnoj težini, opsegu struka i indeksu tjelesne mase između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon niskoslane dijete.

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za tjelesnu težinu, opseg struka i indeks tjelesne mase. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan

pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika. n = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerenje na regularnoj dijeti; V Wilcoxon – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; TT – tjelesna težina; OS – opseg struka; BMI – indeks tjelesne mase.

**Tablica 5.2. Osnovna i antropometrijska obilježja ispitanika prije i poslije provođenja dvotjedne niskoslane dijete.**

	Bazalno mjerenje	Nakon 2 tjedna	p
	RD	NSD	vrijednost
N (Ž/M)		20 (12/9)	
Dob (godine)		46,7 (15,7)	
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	26,6 [25,7 – 29,1]	26,1 [25,2 – 28,8]	< 0,001*
TT (kg)	85 [72 – 94]	83,5 [76,7 – 90,9]	< 0,001*
OS (cm)	97 [89 – 104]	96,3 [91,6 – 104]	0,003*
OB (cm)	106 [104 – 110]	107 [102 – 108]	0,145
WHR	0,91 [0,72 – 1,07]	0,915 [0,72 – 1,03]	0,147

Rezultati su izraženi kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. NSD – niskoslana dijeta, eng. *low salt diet*; RD – regularna dijeta; N – broj ispitanika, engl. *number*; Ž – žene; M – muškarci; BMI – indeks tjelesne mase, engl. *body mass index*; TT – tjelesna težina; OS – opseg struka; OB – opseg bokova; WHR – omjer struka i bokova, engl. *waist-to-hip ratio*.

\*  $P \leq 0,05$  NSD vs. RD (Wilcoxonov test sume rangova).

## 5.2 Učinak niskoslane dijete na krvnu sliku i osnovne biokemijske parametre u krvi i 24-satnom urinu kod osoba koje boluju od psorijaze

Nalazom leukocita i diferencijalne krvne slike, vidi se kako ispitanici nisu pri uključivanju u studiju bolevali od akutnih infektivnih bolesti. Nije bilo značajne promjene količine krvnih stanica sve tri loze nakon NS dijete (Tablica 5.3).

**Tablica 5.3. Hematološki parametri iz pune krvi prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.**

Laboratorijski parametri	Bazalno mjerjenje	Nakon 2 tjedna NSD	Ref. interval	p
<b>RD</b>				
<b>Kompletna krvna slika</b>				
- eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4,88 (0,39)	4,89 (0,41)	3,86 – 5,08	0,771
- leukociti ( $\times 10^9/L$ )	7 (1,75)	6,67 (1,75)	3,4 – 9,7	0,215
- trombociti ( $\times 10^9/L$ )	256 [202 – 288]	235 [203 – 304]	158 – 424	0,955
<b>Diferencijalna krvna slika</b>				
- eozinofili	2 [1 – 2]		0 – 7	
- bazofili	2 [1 – 2]		0 – 1	
- seg. granulociti	59 (8,6)		44 – 72	
- limfociti	29,3 (6,3)		20 – 46	
- monociti	7 [6 – 8]		2 – 12	

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) za normalnu distribuciju varijabli ili kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. RD – regularna dijeta ispitanika; NSD – niskoslana dijeta. \* P ≤ 0,05 NSD vs. RD (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).

Svi su ispitanici imali urednu bubrežnu funkciju te normalnu razinu elektrolita u serumu. Niskoslana dijeta dovela je do povišenja serumskog kreatinina, premda su vrijednosti bile na obje dijete unutar referentnih intervala. Nije bilo statistički značajnog utjecaja na razinu ureje, natrija i kalija u serumu. NS dijeta značajno je povećala koncentraciju kalcija u serumu ispitanika, u usporedbi s bazalnim mjerjenjem pri regularnoj dijeti ispitanika, pri čemu su i jedna i druga vrijednost unutar referentnog raspona. U Tablici 5.4. opisani su učinci dvotjedne dijete s niskim udjelom soli na serumske biokemijske parametre u ispitanika oboljelih od psorijaze te je naznačen referentni interval za izmjerene parametre.

**Tablica 5.4. Biokemijski parametri iz seruma prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.**

<b>Biokemijski parametri</b>	<b>Bazalno mjerjenje</b>	<b>Nakon 2 tjedna</b>	<b>Ref. interval</b>	<b>p</b>
	<b>RD</b>	<b>NSD</b>		
- urea (mmol/L)	5,4 [4,5 – 6,1]	5,1 [4,6 – 5,8]	2,8 – 3,8	0,876
- kreatinin ( $\mu$ mol/L)	71,4 (7,8)	78,4 (12,7)	49 – 90	0,005*
- GUK (mmol/L)	5,3 (0,84)		4,4 – 6,4	
- urati ( $\mu$ mol/L)	300 (68)		134 – 337	
<b>Lipidogram</b>				
- kolesterol (mmol/L)	4,93 (0,75)		< 5	
- trigliceridi (mmol/L)	1,41 (0,7)		< 1,7	
- HDL (mmol/L)	1,45 (0,28)		> 1,2	
- LDL (mmol/L)	3,24 (0,6)		< 1,8	
- HDL/LDL (%)	29 (5,88)		> 20	
<b>Elektroliti</b>				
- natrij (mmol/L)	140 [139 – 140]	139 [138 – 140]	137 – 146	0,415
- kalij (mmol/L)	4,3 [4 – 4,7]	4,3 [4,1 – 4,5]	3,9 – 5,1	0,678
- kalcij (mmol/L)	2,39 [2,35 – 2,42]	2,42 [2,4 – 2,46]	2,14 – 2,53	0,049*
<b>Upalni parametri</b>				
- hsCRP (mg/L)	1,51 [0,8 – 2,7]	1,58 [0,61 – 2,89]	< 5	0,651
<b>Koagulacije</b>				
- aktivnost fibrinogena (g/L)	3,5 (0,72)	3,5 (0,78)	1,8 – 3,5	0,662
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) za normalnu distribuciju varijabli ili kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. RD – regularna dijeta; NSD – niskoslana dijeta; GUK – glukoza u krvi; HDL – lipoproteini visoke gustoće, engl. <i>high density lipoproteins</i> ; LDL – lipoproteini niske gustoće, engl. <i>low density lipoproteins</i> ; hsCRP – visokoosjetljivi C reaktivni protein, engl. <i>high-sensitivity C reactive protein</i> .				
* $P \leq 0,05$ NSD vs. RD (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).				

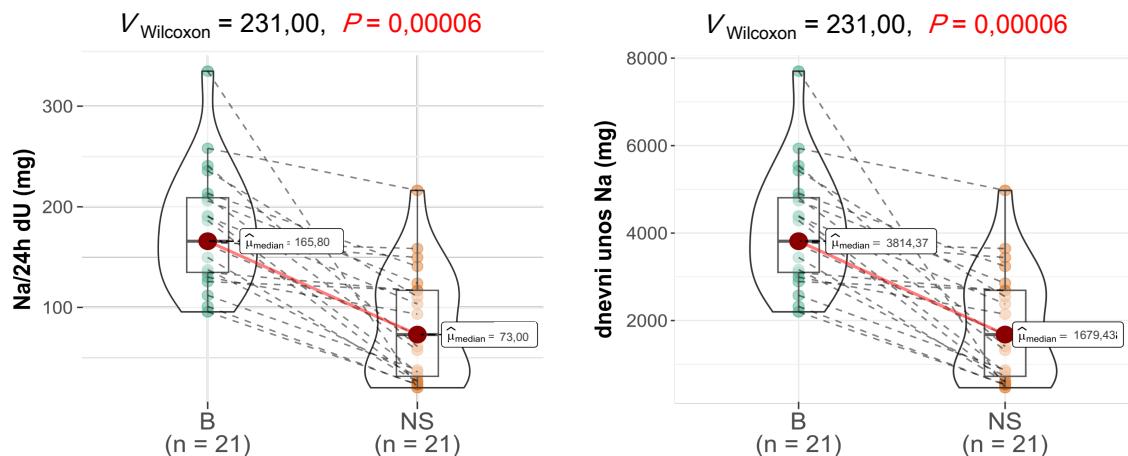
Kako je već prikazano na Slici 5.1., statistički su analizirani podatci od 21 ispitanika koji su se pridržavali niskoslane dijete, što je potvrđeno nalazom 24-satne natrijureze. U Tablici 5.5. i na Slici 5.4. prikazan je utjecaj dijete s niskim unosom soli na promjenu biokemijskih parametara u uzorku 24-satnog urina. 24-satna natriureza smanjila se za više od polovice ( $p < 0,001^*$ ).

Unos natrija tijekom 24 sata, kalkuliran odgovarajućom formulom iz vrijednosti 24-satne natriureze, smanjio se također za više od polovice ( $p < 0,001^*$ ). Nije bilo promjene u drugim analiziranim parametrima u 24-satnom urinu nakon dvotjedne NS dijete.

**Tablica 5.5. Biokemijski parametri u uzorku 24-satnog urina prije i nakon provođenja dvotjedne niskoslane dijete.**

Laboratorijski parametri	Bazalno mjerjenje RD	Nakon 2 tjedna NSD	Ref. interval	p vrijednost
- 24-h koeficijent kreatinina ( $\mu\text{mol}/24/\text{kg}$ )	154 [136 – 171]	134 [130 – 164]	80 – 180	0,313
- albumin u 24-h urinu (mg/dU)	5,6 [3,1 – 9,3]	5,7 [5,5 – 6,9]	< 30	0,838
- urea u 24-h urinu (mmol/dU)	326 [271 – 355]	284 [222,5 – 315,7]	200 – 350	0,455
- natrij u 24-h urinu (mmol/dU)	178,3 (58,6)	83,1 (55,8)	40 – 220	< 0,001*
- kalij u 24-h urinu (mmol/dU)	60,2 (17,1)	58,6 (22,1)	25 – 125	0,639
- Izračunati 24-satni unos natrija (mg/dan)	4101,6 (1348,3)	1912,7 (1282,8)	-	< 0,001*

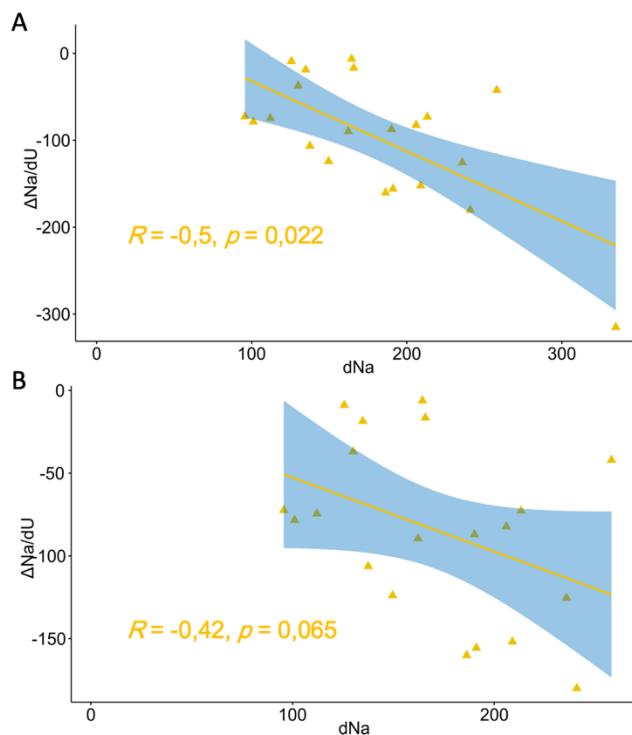
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) za normalnu distribuciju varijabli ili kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. NSD – niskoslane dijeta, engl. *low salt diet*; 24-h – 24-satni. \*  $P \leq 0,05$  NSD vs. RD (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).



**Slika 5.4. Parne komparacije analize kalkuliranog 24-satnog unosa natrija te analize 24-satne natriureze između regularne dijete i nakon 14-dnevne niskoslane dijete.**

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za 24-satnu natriurezu i kalkulirani 24-satni unos natrija. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.  $n$  = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti.  $V_{\text{Wilcoxon}}$  – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; Na – natrij; Na/24h dU – ekskrecija natrija u 24-satnom urinu.

Najmanji otklon (redukcija) u dnevnoj natruirezi zabilježen je u ispitanika s najnižim bazalnim unosom soli, u kojih dodatna dijetalna restrikcija malo utječe na već ionako niski unos natrija (Slika 5.5A). Naprotiv, u ispitanika s višim bazalnim unosom NaCl odgovor na dijetalnu restrikciju je širok: od minimalnog pada natriureze do 90 % smanjenja ekskrecije. Kompletne supresije unosa soli u odgovoru na dijetu je rijetkost (Slika 5.5B). Rezultat je širok raspon preklapanja u dnevnom unosu soli između dvije skupine, osobito između ispitanika s najnižim bazalnim unosom soli i ispitanika s najvišim ostatnim unosom soli na NS dijeti. U takvom kontekstu izolacija učinka kratkoročne promjene unosa soli na ovisne varijable težak je zadatak. Na tom tragu, natriurija niža od najniže vrijednosti na regularnoj dijeti ( $\text{Na}/\text{dU}_{\min} \sim 97$ ) zabilježena je u 12/21 ispitanika na LS dijeti. Ta podskupina, koja nudi jasniji i neometani uvid u zbijanja na istinski niskom unosu soli, smatra se se užom jezgrom NS skupine u pojedinim analizama.



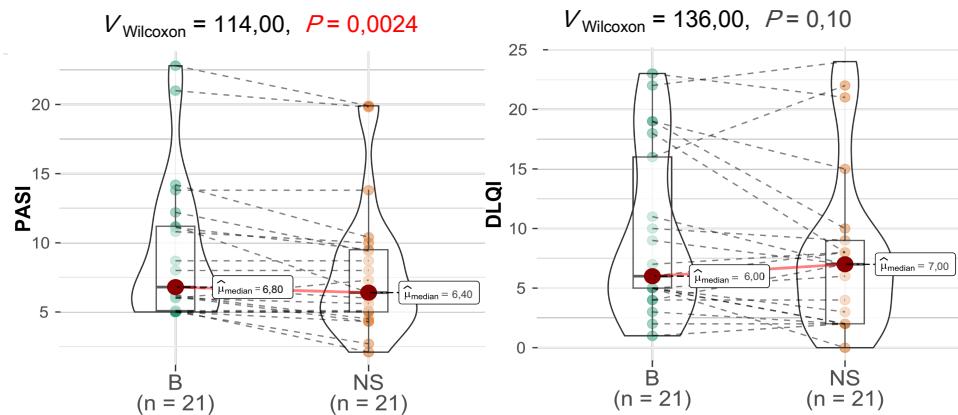
**Slika 5.5. Utjecaj 24-satne natrijureze na inicijalnom mjerenu na promjenu u 24-satnoj natriurezi prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete.**

A. Gornji panel, kompletna kohorta. B. Donji panel, test robustnosti, odstranjena je jedna stršeća vrijednost ( $d\text{Na}_{\max}$ ).

R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacijske. Žuta linija predstavlja regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. dNa – 24-satna natriureza pri inicijalnom mjerenu (mmol/dU);  $\Delta\text{Na}/\text{dU}$  – promjena 24-satne natriureze prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete (mmol/dU).

### 5.3 Učinak niskoslane dijete na težinu psorijaze i utjecaju na kvalitetu života osoba koje boluju od psorijaze

Došlo je do statistički značajnog poboljšanja kliničke slike psorijaze što se vidi iz smanjenja PASI zbroja za 12 % nakon provođenja niskoslane dijete (PASI; RD 6,8 [5,1 -11,2] vs. NSD 6,4 [5 – 9,5], Wilcoxonov test sume rangova,  $p = 0,002$ ); razlika medijana -1,3 (Hodges-Lehmann-Sen procjena, 95 % CI (-3,5, 1) (Slika 5.6.) DLQI vrijednosti prije i nakon NS dijete nisu se značajno razlikovale (Slika 5.6.).

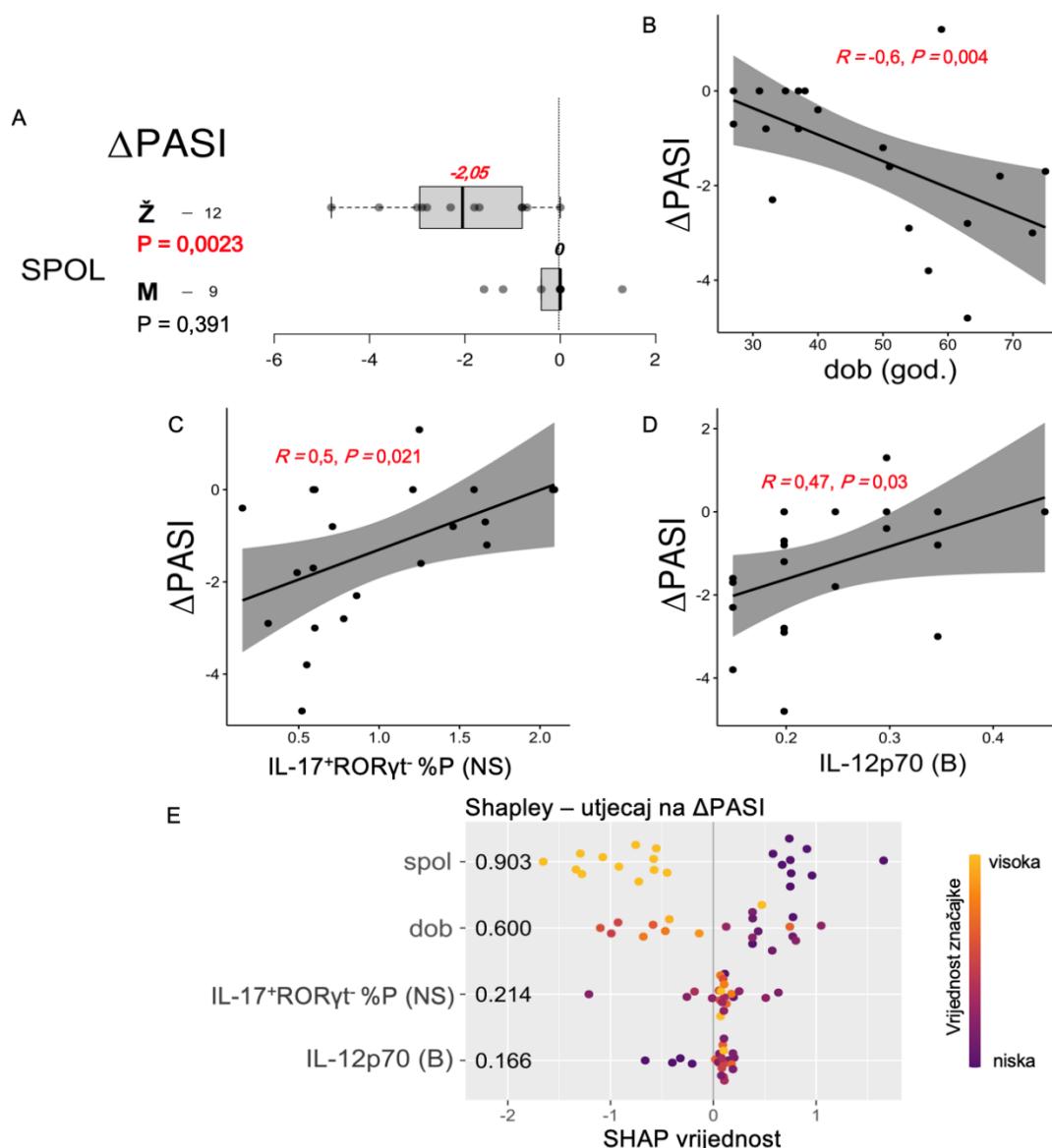


**Slika 5.6. Promjena klinički procijenjene težine psorijaze pomoću PASI i DLQI vrijednosti između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete.**

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za vrijednosti PASI zbroja i DLQI upitnika. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.  $n$  = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim  $P$ -vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerenje na regularnoj dijeti;  $V_{\text{Wilcoxon}}$  – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; PASI – indeks proširenosti i težine psorijaze, engl. *psoriasis area and severity index*; DLQI – dermatološki indeks kvalitete života.

Smanjenje PASI zbroja nakon niskoslane dijete u odnosu na regularnu dijetu osobito je bila vidljiva u žena (PASI žene; RD 6,5 [5,1 – 11,45] vs. NSD 5,55 [4,3 - 9,55], Wilcoxon test sume rangova,  $p = 0,0023$ ), dok kod muških ispitanika nije bilo dokaza za promjenu PASI zbroja nakon NS dijete (PASI muškarci; RD 8 [6 – 11,1] vs. NSD 8 [5,6 – 9,5], Wilcoxon test sume rangova,  $p = 0,391$ ). Također, redukcija PASI zbroja korelirala je s dobi ispitanika ( $\Delta\text{PASI}$  vs. Dob,  $R = -0,6$ ,  $p=0,004$ ), tako da je poboljšanje kliničke slike psorijaze bilo izraženije kod starijih ispitanika, što je grafički prikazano na Slici 5.7. Relativna važnost individualnih prediktora testirana je neparametrijskom Shapley regresijom.

Promjena PASI vrijednosti nije statistički značajno korelirala s razinom 24-satne natrijureze niti kalkuliranim unosom natrija.



Slika 5.7. Prediktori promjene PASI vrijednosti.

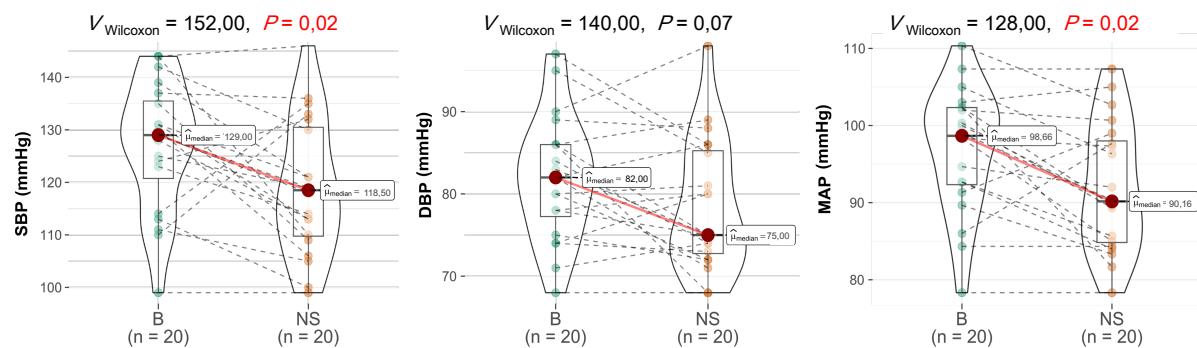
A. Razlike mjerena ( $\Delta$ , NS-B) za PASI vrijednosti za žene i muškarce, kutijasti dijagrami s medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) (engl. *box-and-whisker plots, Tukey-ev prikaz*). Medijan (koji je brojčano označen) je debljom okomitom linijom unutar svakog osjenčanog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). T-linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Stršeće su vrijednosti (engl. *outliers*) prikazane sivim točkama. Točkasta okomita linija prolazi kroz nulu te dijeli pozitivne od negativnih vrijednosti ( $\Delta$ , NS-B). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku. Značajne razlike označene su masnim crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test). B., C, D. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacijske. Crna linija predstavlja regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. E. Prikazane su pripadne Shapleyeve vrijednosti za spol, dob, IL-17<sup>+</sup>RORyt %P (NS), IL-12p70 (B) kao prediktore, padajućim redoslijedom značaja. Boja svake točke na grafikonu predstavlja

vrijednost odgovarajuće kontinuirane varijable, pri čemu žuta (svjetlija boja) označava više vrijednosti, a ljubičasta (tamnija boja) niže vrijednosti (kolorirana vrpca, *viridis inferno* paleta). Iznimka je spol kao kategoriska varijabla, u kojem žuta označava ženski spol, a ljubičasta muški. PASI – indeks proširenosti i težine psorijaze, engl. *psoriasis area and severity indeks*; ΔPASI – promjena indeksa proširenosti i težine psorijaze nakon niskoslane dijete u odnosu na bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; IL-17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ T %P (NS) - IL-17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ T pomoćnički T limfociti (postotak od roditeljske populacije), mjerjenje nakon dvotjedne niskoslane dijete (%); IL-12p70 (B) – vrijednost interleukina 12p70 u serumu, bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti.

Prediktivna vrijednost spola i dobi za promjenu PASI vrijednosti vidljiva i na Slici 5.7E., gdje su grafički prikazane SHAP vrijednosti (engl. *Shapley Additive exPlanations*, Shapleyeva vrijednost) za svakog pojedinog ispitanika (engl. *beeswarm plot*, pčelinji roj). Spol se pokazao najjačim prediktivnim čimbenikom za promjenu PASI vrijednosti nakon niskoslane dijete. Nadalje, promjena u PASI vrijednostima poglavito je bila vidljiva u osoba starije životne dobi. Među prediktivnim faktorima za promjenu PASI vrijednosti nakon niskoslane dijete izdvojile su se još i razine baznih mjerjenja IL-12p70, koje su pozitivno korelirale s kasnjom promjenom PASI ( $\Delta$ PASI vs. IL-12p70 (B);  $R = 0,47$ ,  $p = 0,03$ ). S promjenom PASI pozitivno je korelirao i postotak IL-17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ T stanica od roditeljske populacije.

#### 5.4 Utjecaj niskoslane dijete na hemodinamska mjerena

Nakon 14-dnevne niskoslane dijete došlo je do značajnog pada u vrijednostima sistoličkog i srednjeg arterijskog tlaka, dok nije bilo značajne promjene u vrijednostima dijastoličkog tlaka (Slika 5.8., Tablica 5.6.).



**Slika 5.8. Parne komparacije za sistolički i srednji arterijski tlak između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete.**

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za vrijednosti sistoličkog i srednjeg arterijskog tlaka. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom

(engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.  $n$  = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerenje na regularnoj dijeti; V<sub>Wilcoxon</sub> – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; SBP – sistolički krvni tlak; DBP – dijastolički krvni tlak; MAP – srednji arterijski tlak.

**Tablica 5.6. Hemodinamska mjerenja ispitanika prije i poslije LS dijete te jednokratna procjena kardiovaskularnog rizika pomoću Framinghamovog kalkulatora kardiovaskularnog rizika.**

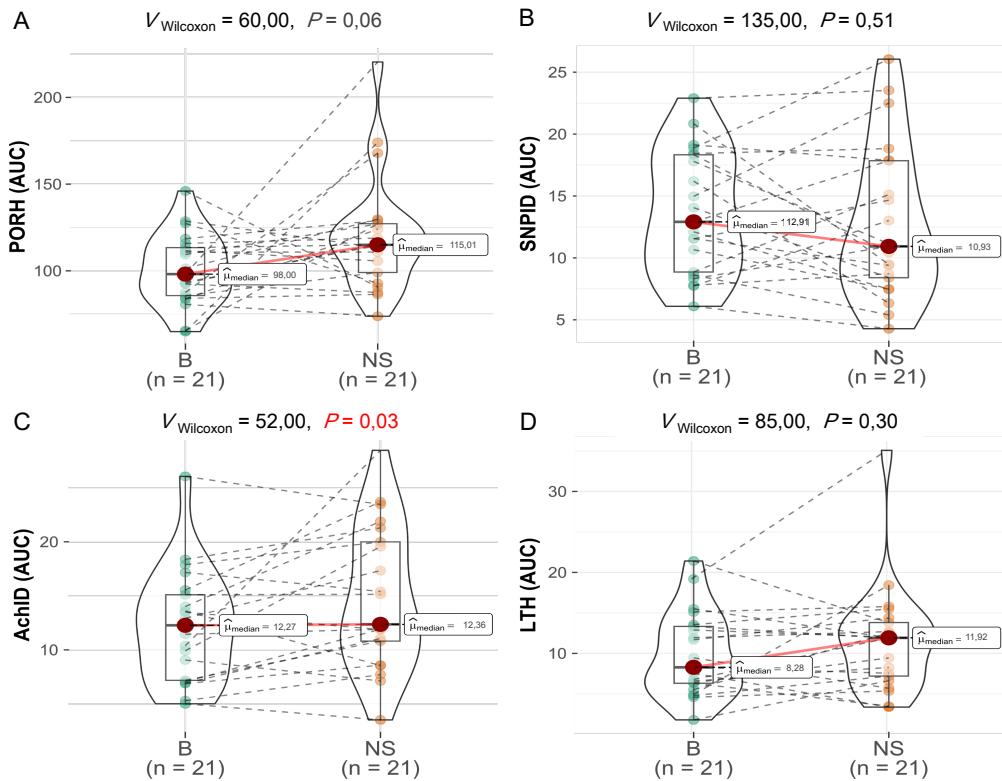
Hemodinamska mjerenja i procjene	Inicijalno mjerenje	Nakon 2 tjedna LS dijete	p vrijednost
KV rizika	(regularna dijeta)		
SBP (mmhg)	129 [117 – 135]	119 [110 – 131]	0,021*
DBP (mmhg)	82 [78 – 86]	75 [72,8 – 85,3]	0,079
MAP (mmhg)	98,3 [92,6 – 102,3]	90 [84,3 – 97,7]	0,0066*
bpm (N)	69 [64 – 83]	75 [67 – 86]	0,177

Rezultati su izraženi kao medijan i interkvartilni raspon (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

LS- niskoslana dijeta, engl. *low salt diet*; SBP- sistolički krvni tlak, engl. *systolic blood pressure*; DBP- dijastolički krvni tlak, engl. *diastolic blood pressure*; MAP- srednji arterijski tlak, engl. *mean arterial pressure*; bpm – otkucaja u minutu, engl. *beats per minute*; N- broj.

\*  $P \leq 0,05$  LS vs. bazno mjerjenje na regularnoj dijeti (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).

Došlo je do značajnog povećanja AChID za 16 % (AChID; RD 12,16 (5,20) vs. NSD 14,84 (6,58), T-test parnih uzoraka,  $p = 0,029$ ), [razlika medijana 2,67 (Hodges-Lehmann-Sen procjena, 95 % CI (-1,62, 6,3)]. Nadalje, vrijednosti PORH, premda su bile u prosjeku za 9 % veće nakon niskoslane dijete, nisu dosegnule granicu statističke značajnosti (PORH 1min delta R.O.; RD 98 [85,69 – 113,38] vs. NSD 115,01 [99,00 – 127,16], Wilcoxon test sume rangova,  $p = 0,056$ ). Također, nije bilo statistički značajne promjene u SNPID niti u promjeni LTH. Utjecaj niskoslane dijete na hemodinamska mjerenja pomoću LDF metode prikazani su na Slici 5.9.

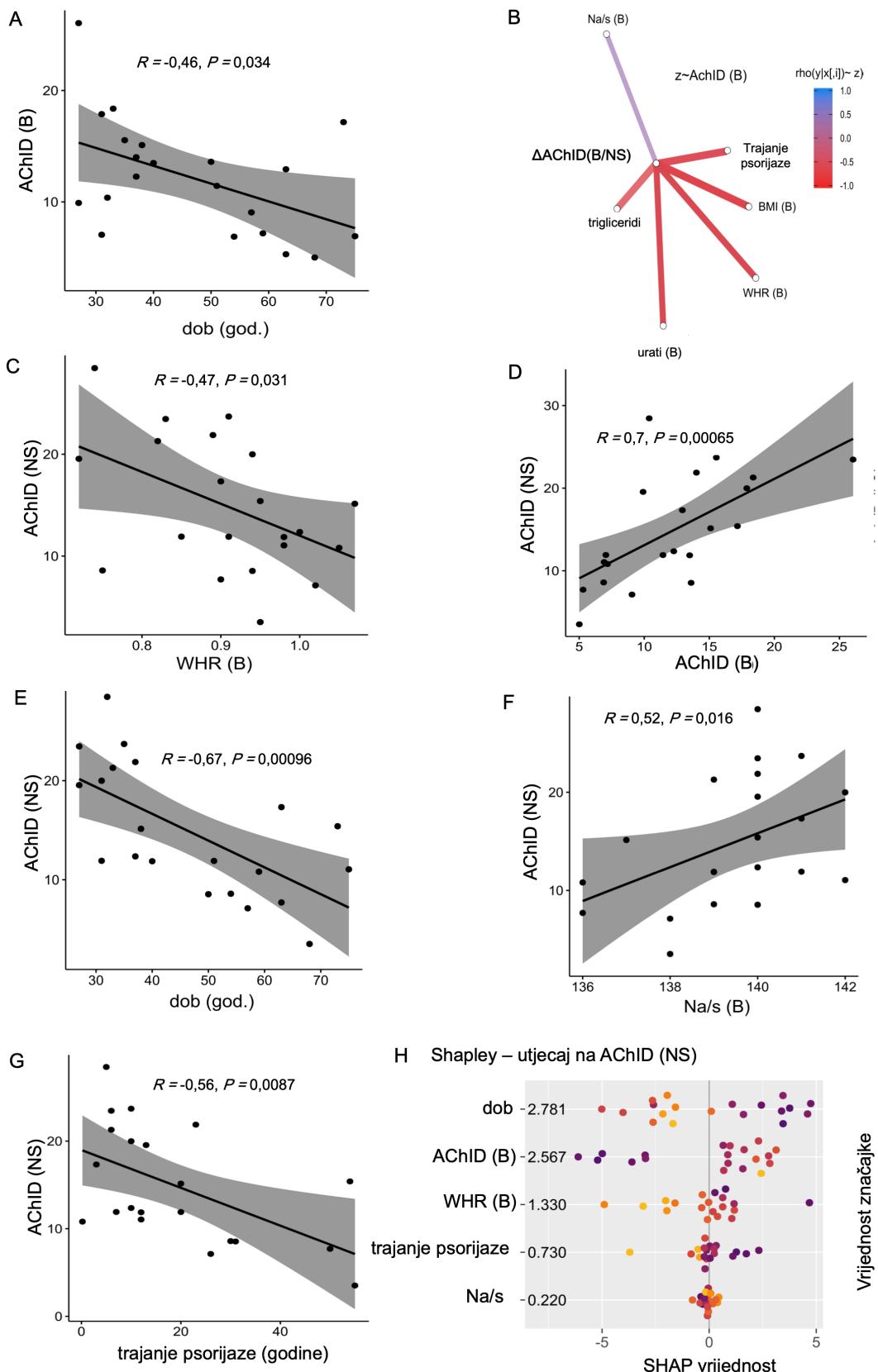


**Slika 5.9. Parne komparacije i promjena protoka mjerene laser Doppler floumetrijom kao odgovor na četiri podražaja (okluziju tijekom 1 minute, iontoforezu natrijevim nitroprusidom, iontoforezu acetilkolinom te na lokalno zagrijavanje kože) na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijetete.**

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za protoke mjerene laser Doppler floumetrijom kao odgovor na četiri podražaja: A. okluziju tijekom 1 minute, B. iontoforezu natrijevim nitroprusidom, C. iontoforezu acetilkolinom te D. lokalno zagrijavanje kože. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano označen) je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.  $n$  = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim  $P$ -vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjereno na regularnoj dijeti; AUC – prostor ispod krivulje, engl. *area under the curve*;  $V_{\text{Wilcoxon}}$  – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; PORH 1min – postokluzivna reaktivna hiperemija nakon 1 minutne okluzije, AUC; SNPID (SNP/B) – natrijevim nitroprusidom inducirana dilatacija (protok nakon iontoforeze natrijevim nitroprusidom / bazalni protok), AUC; AchID (Ach/B) – acetilkolinom inducirana dilatacija (protok nakon iontoforeze acetilkolinom / bazalni protok), AUC; LTH – povećanje protoka nakon lokalnog zagrijavanja kože na  $42^{\circ}\text{C}$ , AUC.

Uočena je negativna korelacija inicijalnog mjerenja AChID s dobi ispitanika ( $R = -0,46$ ,  $p = 0,034$ ) (Slika 5.10.).

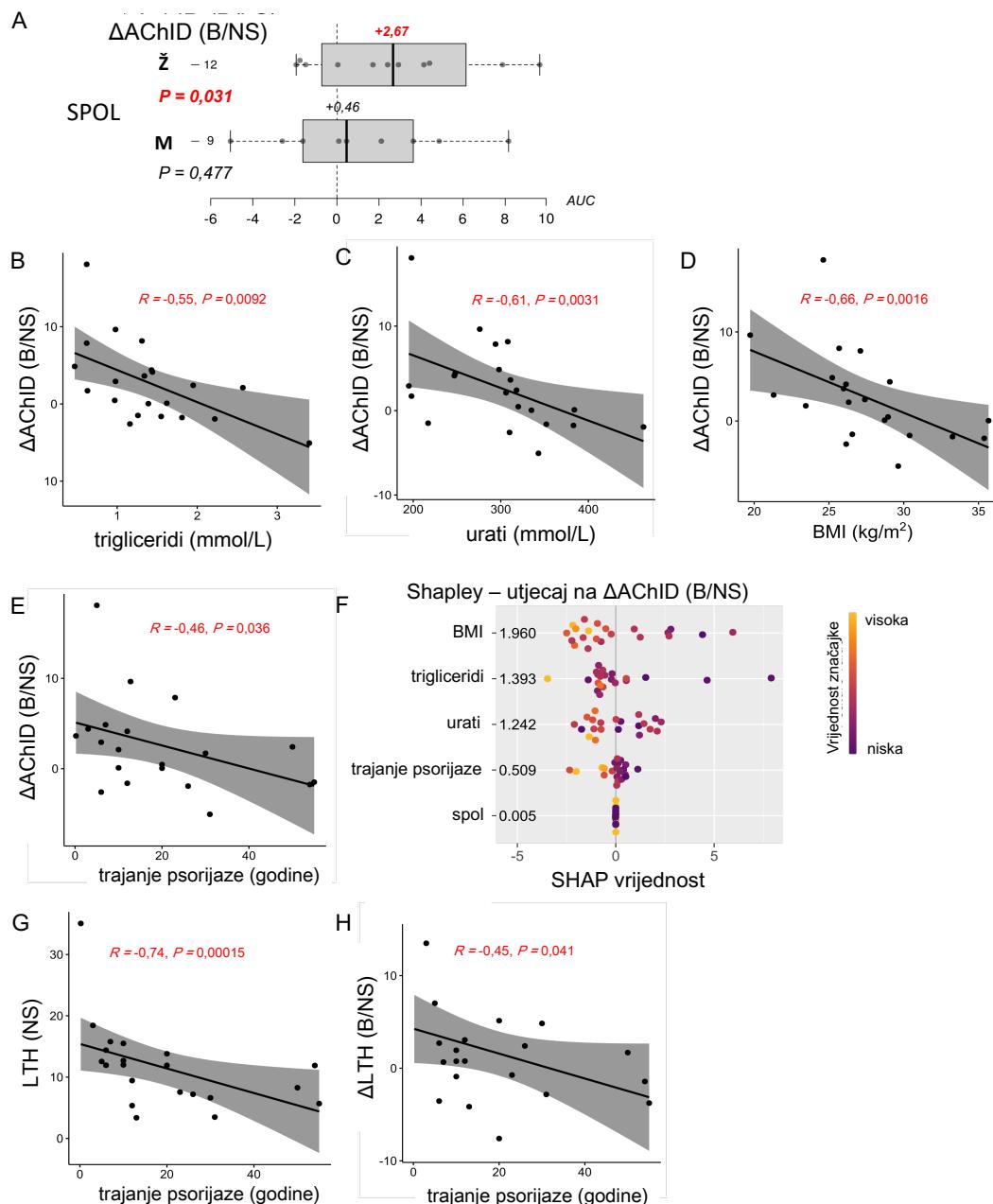
Trajanje psorijaze, dob te omjer struka i bokova negativno su korelirali s AChID vrijednosti nakon NS dijete. Nadalje, vrijednosti AChID pri baznom mjerenu, kao i vrijednost natrija u serumu pozitivno su korelirale s vrijednostima AchID nakon NS dijete (Slika 5.10).



**Slika 5.10. Prediktori konačne vrijednosti acetilkolin-inducirane dilatacije na mjerenuju nakon 14-dnevne niskoslane dijete.**

A, C, D, E, F, G, R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. B. Veličina i smjer promjene u Ach-induciranoj dilataciji nakon NS dijete [ $\Delta$ AchID (B/NS)]. Parcijalne Spearmanove korelaciije, značajne rezidualne poveznice nakon kontrole za početnu vrijednost [ $z$ , AchID (B)]. Obojena okomita vrpca i linije kodiraju parcijalni korelacijski koeficijent (rho). H. Prikazane su pripadne Shapleyeve vrijednosti za dob, AChID (B), WHR (B), trajanje psorijaze i početne vrijednosti natrija u serumu kao prediktore, padajućim redoslijedom značaja. Boja svake točke na grafikonu predstavlja vrijednost odgovarajuće kontinuirane varijable, pri čemu žuta (svjetlija boja) označava više vrijednosti, a ljubičasta (tamnija boja) niže vrijednosti (kolorirana vrpca, *viridis inferno* paleta). SHAP vrijednost – Shapleyeva vrijednost; AChID (B) – Dilatacija izazvana acetilkolinom (protok nakon acetilkolinske iontoforeze / bazalni protok) bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti, AUC; WHR (B) – Omjer struka i bokova (bazalno mjerjenje na redugarnoj dijeti); AChID (LS) – Dilatacija izazvana acetilkolinom (protok nakon acetilkolinske iontoforeze / bazalni protok) mjerjenje nakon dijete s niskim unosom soli, AUC;  $\Delta$ AChID (B/NS) – promjena u dilataciji izazvanoj acetilkolinom prije i nakon dijete s niskim unosom soli, AUC; BMI – indeks tjelesne mase, kg/m<sup>2</sup>; Na/s – natrij u serumu, mmol/L.

Ženski se spol ispoljio kao važan prediktivni čimbenik i za promjenu AChID nakon dvotjedne NS dijete u odnosu na bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti. Tako je kod žena promjena AChID nakon niskoslane dijete u odnosu na regularnu dijetu bila statistički značajna ( $\Delta$ AChID (B/NS) u žena; RD 10 [6,91 – 14,29] vs. NSD 15,27 [8,37 – 19,98],  $p = 0,027$ ), dok u muških ispitanika nije bilo značajne promjene AChID ( $\Delta$ AChID (B/NS) u muškaraca; RD 13,49 [11,44 – 15,54] vs. NSD 11,91 [11,87 – 19,99],  $p = 0,496$ ), što je vidljivo i na Slici 5.11. Vrijednosti BMI na prvom mjerenu negativno su korelirale s promjenom acetilkolin-inducirane dilatacije (BMI vs.  $\Delta$ AChID (B/NS),  $R = -0,66$ ,  $p = 0,0016$ ). Nadalje, kao važan negativni prediktor ispoljilo se i trajanje psorijaze, naime trajanje psorijaze negativno je koreliralo s promjenom AChID (trajanje psorijaze vs.  $\Delta$ AChID (B/NS),  $R = -0,46$ ,  $p = 0,036$ ). Pronađena su još dva dodatna prediktora za promjenu AChID, a to su bile vrijednosti triglicerida na inicijalnoj studijskoj posjeti (trigliceridi vs.  $\Delta$ AChID,  $R = -0,55$ ,  $p = 0,0092$ ) i vrijednost urata pri bazalnom mjerenu na regularnoj dijeti (urati vs.  $\Delta$ AChID,  $R = -0,61$ ,  $p = 0,0031$ ) (Slika 5.11.).



**Slika 5.11. Prediktori promjene acetilkolin-inducirane dilatacije (AChID) između baznih vrijednosti na regularnoj dijeti i vrijednosti nakon 14-dnevne niskoslane dijetе.**

A. Razlike mjerena ( $\Delta$ , LS-B) za AChID, kutijasti dijagrami s medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) (engl. *box-and-whisker plots*, *Tukey-ev* prikaz). Medijan (koji je brojčano iskazan) označen je debljom okomitom linijom unutar svakog osjenčanog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). T-linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Stršeće su vrijednosti (engl. *outliers*) prikazane sivim točkama. Svaka točka odgovara jednom ispitaniku. Značajne razlike označene su masnim crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test). B, C, D, E, G, H. R

predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. F. Prikazane su pripadne Shapleyeve vrijednosti za BMI, trigliceride, urate, trajanje psorijaze i spol kao prediktore, padajućim redoslijedom značaja. Boja svake točke na grafikonu predstavlja vrijednost odgovarajuće kontinuirane varijable, pri čemu žuta (svjetlija boja) označava više vrijednosti, a ljubičasta (tamnija boja) niže vrijednosti (kolorirana vrpca, *viridis inferno* paleta). Iznimka je spol kao kategorijska varijabla, u kojem žuta označava ženski spol, a ljubičasta muški.  $\Delta AChID$  (B/NS) – promjena u dilataciji izazvanoj acetilkolinom prije i nakon dijete s niskim unosom soli; Ž – žene; M – muškarci; BMI – indeks tjelesne mase; SHAP vrijednost – Shapleyeva vrijednost; LTH (NS) – lokalna termalna hiperemija nakon dijete s niskim unosom soli;  $\Delta LTH$  (B/NS) – promjena lokalne toplinske hiperemije prije i nakon dijete s niskim unosom soli.

## 5.5 Učinak niskoslane dijete na koncentraciju citokina u serumu i supernatantu

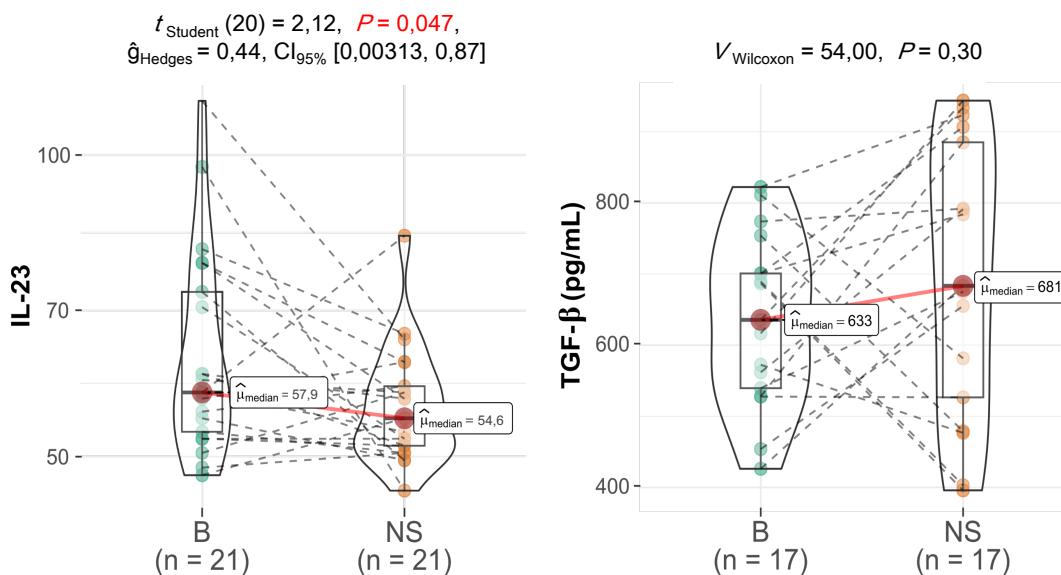
Nadalje, u Tablici 5.7. i 5.8. prikazan je učinak dvotjedne dijete s niskim unosom soli na vrijednosti citokina u serumu psorijatičara, pri čemu je u Tablici 5.7. prikazano mjerjenje pomoću pojedinačnih sendvič ELISA kitova, dok su u Tablici 5.8. rezultati dobiveni multipleks kvantifikacijskom tehnikom (Luminex). U Tablici 5.9. vide se vrijednosti citokina u prikladno pripremljenom supernatantu dobivenog multipleks kvantifikacijskom metodom (Luminex). Dvotjedna je niskoslana dijeta dovela do smanjenja koncentracije IL-23 u serumu ispitanika, kao što je vidljivo u Tablici 5.7. te na Slici 5.12. Premda postoji tendencija povećanju protuupalnih citokina TGF- $\beta$  nakon NS dijete (Slika 5.8. i Slika 5.12.), ono nije bilo statistički značajno tako da nema dovoljno dokaza o takvoj povezanosti.

Na regularnoj dijeti serumski TNF- $\alpha$  negativno je korelirao s natriurezom ( $R = -0,5$ ,  $p = 0,029$ ,  $n = 19$ ). Na NS dijeti serumski TNF- $\alpha$  negativno korelira s udjelom  $CD25^+FOXP3^{hi}$  stanica u  $CD25^+CD127^{lo}$  frakciji ( $R = -0,5$ ,  $p = 0,018$ ), uglavnom na račun porasta udjela  $FOXP3^{-lo}$  stanica ( $R = 0,49$ ,  $p = 0,03$ ). Viši omjer serumskih razina TNF- $\alpha$  nakon i prije 14-dnevne restrikcije unosa soli (omjer izražaja (engl. *fold change*, FC), NS vs. bazalna dijeta); povezan je pak s manjim udjelom  $IL17^+ROR\gamma t^+$  stanica u Th frakciji tijekom dijetalne intervencije ( $R = -0,53$ ,  $p = 0,014$ ).

S izuzetkom poveznice između cirkulirajućeg IL-6 i MAP ( $R = 0,48$ ,  $p = 0,027$ ,  $n = 21$ , regularna dijeta), nije zabilježena korelacija drugih mjerениh kovarijata s razinom ovih citokina. Također, reaktivnost mikrocirkulacije kože nije povezana s razinom 4 serumskih citokina.

**Tablica 5.7. Koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina u serumu ispitanika prije i nakon dvotjedne niskoslane dijete mjerene ELISA metodom.**

Serumska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina	Bazalno mjereno RD	Nakon 2 tjedna NSD	p vrijednost
<b>Proupalni citokini</b>			
IL-23 (pg/mL)	57,95 [52,94 – 73,01]	54,61 [51,26 – 58,79]	0,037*
IL-17A (pg/mL)	1,26 [0,80 – 2,78]	1,38 [0,85 – 2,3]	0,609
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,23 [0,09 – 0,41]	0,22 [0,12 – 0,35]	0,861
<b>Protuupalni citokini</b>			
IL-6 (pg/mL)	4,44 [3,88 – 5,40]	4,68 [3,72 – 5,96]	0,225
Rezultati su izraženi kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane.			
RD – regularna dijeta, NSD – niskoslana dijeta; IL-23 – interleukin 23; IL-17A – interleukin 17A; TNF- $\alpha$ – tumor nekrotizirajući faktor $\alpha$ ; IL-6 – interleukin 6. * P ≤ 0,05 NSD vs. RD (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).			



**Slika 5.12. Vrijednosti IL-23 u serumu (mjereno ELISA metodom) i TGF- $\beta$  u serumu (mjereno Luminex metodom) prije i poslije provođenja dvotjedne NS dijete.**

Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za IL-23 u serumu mjerenoj ELISA metodom i TGF- $\beta$  u serumu mjerenoj Luminex metodom. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1,5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.

n = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; t<sub>Student</sub> – parni t-test, CI<sub>95%</sub> – 95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); g<sub>Hedges</sub> – mjera veličine učinka za razliku između srednjih vrijednosti; V Wilcoxon – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; IL-23 – interleukin 23; TGF-β – transformirajući faktor rasta β; ELISA – Enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

**Tablica 5.8. Koncentracija proučalnih i protuupalnih citokina u serumu ispitanika prije i nakon dvotjedne niskoslane dijete mjerene Luminex metodom.**

Proučalni i protuupalni citokini	Bazalno mjerjenje RD	Nakon 2 tjedna NSD	p
<b>Proučalni citokini</b>			
IFN-γ (pg/mL)	0,4 [0,3 – 0,67]	0,35 [0,3 – 1,18]	0,809
IL-1β (pg/mL)	0,06 [0,03 – 0,09]	0,06 [0,03 – 0,11]	0,349
IL-2 (pg/mL)	0,54 [0,48 – 0,68]	0,54 [0,48 – 0,75]	0,733
IL-8 (pg/mL)	0,17 [0,13 – 0,41]	0,16 [0,15 – 0,24]	0,917
IL-12 (pg/mL)	0,20 [0,20 – 0,30]	0,25 [0,20 – 0,30]	0,275
IL-10 (pg/mL)	0,36 [0,30 – 0,60]	0,26 [0,14 – 0,38]	0,431
<b>Protuupalni citokini</b>			
IL-4 (pg/mL)	1,12 [0,99 – 5,23]	1,24 [0,99 – 5,23]	0,733
TGF-β1 (pg/mL)	633,39 [537,38 – 698,62]	681,25 [524,47 – 883,02]	0,300

Rezultati su izraženi kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. RD – regularna dijeta; NSD – niskoslana dijeta; TNF-α – tumor nekrotizirajući faktor α; IFN-γ – interferon γ; IL-1β – interleukin 1β; IL-2 – interleukin 2; IL-8 – interleukin 8; IL-12 – interleukin 12; IL-4 – interleukin 4; TGF-β1 – transformirajući faktor rasta β1; IL-6 – interleukin 6. \*  $P \leq 0,05$  NSD vs. RD (T-test parnih uzoraka, Wilcoxonov test sume rangova).

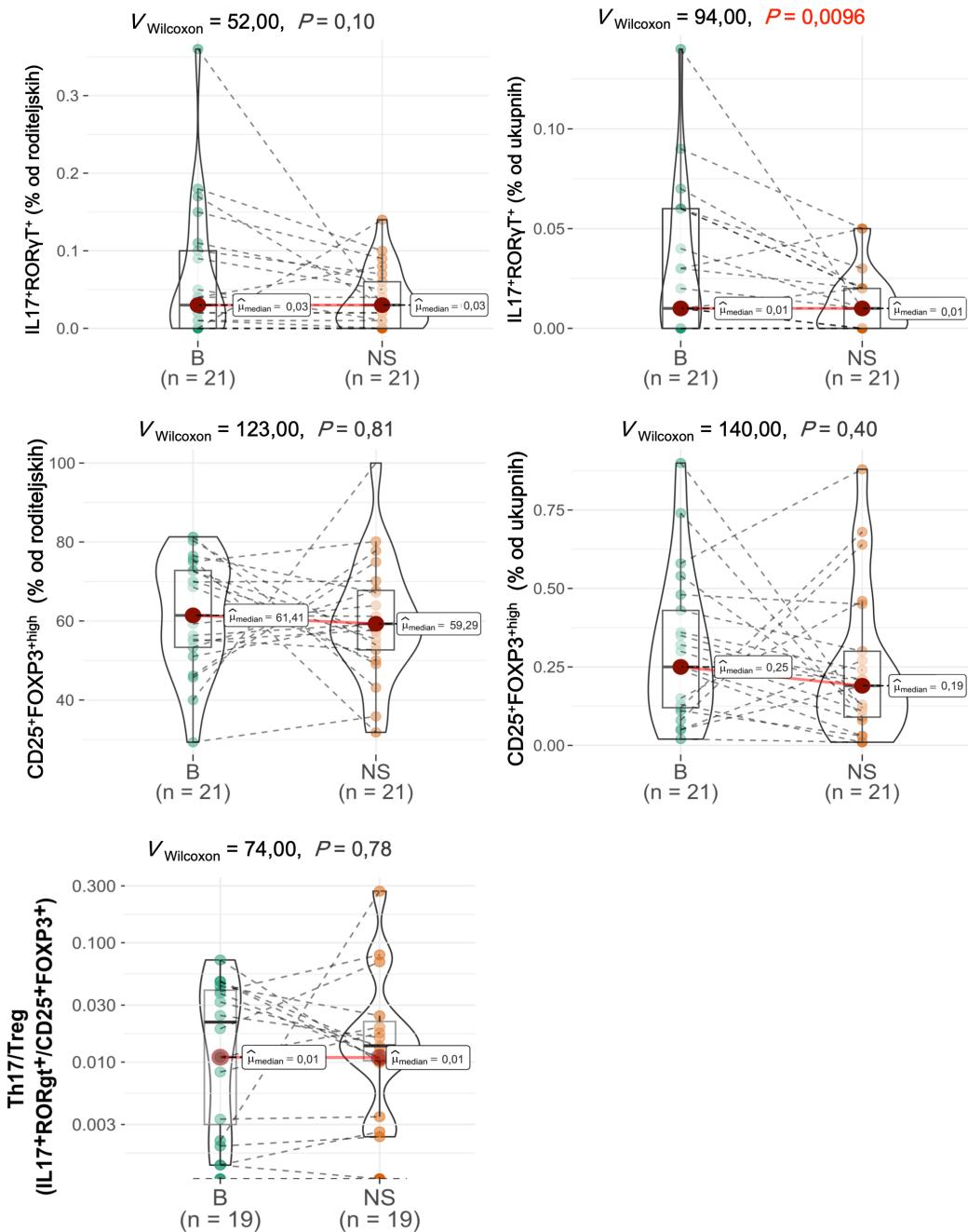
**Tablica 5.9. Koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina u supernatantu prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete.**

Koncentracija citokina u supernatantu	Bazalno mjerjenje RD	Nakon 2 tjedna NSD	p vrijednost
<b>Proupalni citokini</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	803,89 [61,64 – 1517,57]	465,6 [202,2 – 1339,6]	0,641
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	55,6 [1,61 – 91,61]	28,98 [7,92 – 54,90]	0,25
IL-2 (pg/mL)	84 [8,74-140,53]	61,98 [39,04 – 145,14]	0,25
IL-17A (pg/mL)	30,27 [10,15 – 40,56]	11,31 [8,17 – 40,48]	0,125
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	148,8 [16,51 – 301,34]	87,6 [43,39 – 211, 51]	0,426
IL-8 (pg/mL)	66,08 [55,12 – 207,39]	98,83 [32,37 – 149,83]	0,496
IL-10 (pg/mL)	7,41 [0,34 – 17,75]	4,13 [0,21 – 13,41]	0,148
IL-12 (pg/mL)	50,58 [26,89 – 53, 08]	16,8 [9,88 – 40,7]	0,125
IL-23(pg/mL)	269,08 [16,02 – 1397,49]	23,47 [11,04 – 968]	0,3591
MIP-3 $\beta$ (pg/mL)	735,89 [33,76 – 3172,78]	1940,5 [26,8 – 3036,8]	0,712
IL- 18 (pg/mL)	99,37 [8,39 – 611,33]	17,16 [7,45 – 537,60]	0,979
IL-6 (pg/mL)	44,56 [3,77 – 91,81]	25,84 [16,16 – 53,46]	0,570
<b>Protuupalni citokini</b>			
IL-4 (pg/mL)	865,4 [105,3 – 1160,7]	666,3 [436,7 – 1001,9]	0,063
<b>Kemokini</b>			
CTACK (pg/mL)	13,38 [0,95 – 74,08]	1,68 [1,13 – 85,42]	0,712
<b>Faktori rasta</b>			
VEGF-A (pg/mL)	17,08 [4,16 – 55,58]	9,52 [4,27 – 46,97]	0,818
Rezultati su izraženi kao medijan i [interkvartilni raspon] za varijable koje nisu normalno distribuirane. RD – regularna dijeta; NSD – niskoslana dijeta; IFN- $\gamma$ – interferon $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ – interleukin 1 $\beta$ ; IL-2 – interleukin 2; IL-17A – interleukin 17A; TNF- $\alpha$ – tumor nekrotizirajući faktor $\alpha$ ; IL-8 – interleukin 8; IL-10 – interleukin 10; IL-12 – interleukin 12; IL-23 – interleukin 23; MIP3 $\beta$ – inflamatorni protein makrofaga, engl. macrophage inflammatory protein; IL-18 – interleukin 18; IL-4 – interleukin 4; IL-6 – interleukin 6; CTACK – kemokini koji privlače T limfocite u kožu, engl. <i>cutaneous T cell-attracting chemokine</i> ; VEGF-A – faktor rasta vaskularnog endotela A, engl. <i>vascular endothelium growth factor A</i> . * P ≤ 0,05 NSD vs. RD (Wilcoxonov test sume rangova).			

## 5.6 Učinak niskoslane dijete na frekvencije Th17 i Treg stanica kod osoba koje boluju od psorijaze

Frekvencija ukupnih perifernih T pomoćnih stanica koje luče IL-17 nije se značajno promjenila nakon dvotjedne niskoslane dijete ( $CD4^+IL-17A^+$  % roditeljske, RD 1,11 [0,66 – 1,32], vs. NSD 0,95 [0,69 – 1,54], Wilcoxon test sume rangova,  $p = 0,651$ ). Došlo je do statistički značajnog smanjenja udjela Th17 stanica, koje su definirane kao  $IL-17^+ROR\gamma T^+$  stanice od ukupnih ( $IL-17^+ROR\gamma T^+$  od ukupnih, RD 0,01 [0,00 – 0,06], vs. NSD 0,01 [0,00 – 0,02],  $p = 0,009$ ), [razlika medijana -0,018 (Hodges-Lehmann-Sen procjena, 95 % CI (-0,03, 0)].

Nije došlo do značajne promjene Treg stanica definiranih kao  $CD25^+FOXP3^{+high}$  stanice. Nadalje, nije došlo do značajne promjene u omjeru Th17 i Treg stanica (Slika 5.13.).



**Slika 5.13. Promjena u frekvenciji Th17 i Treg stanica između baznih mjerena na regularnoj dijeti i nakon 14-dnevne niskoslane dijete.**

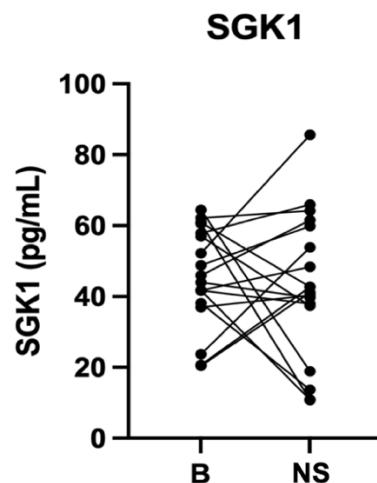
Usporedba distribucija prije i poslije dijetalne intervencije, za pojedine stanične subpopulacije Th17 i Treg stanica. Prikaz je violinski dijagram (dijagram lokalne gustoće točaka), s pridruženim kutijastim dijagramom (engl. *boxplot*). Medijan ( $\mu$ , koji je brojčano iskazan) označen je debljom vodoravnom linijom unutar svakog pravokutnika, čije su granice omeđene prvom (Q1) i trećom kvartilom (Q3). Okomite linije izvan pravokutnika predstavljaju  $1.5 \times \text{IQR}$  (Q3-Q1). Svaka točka odgovara jednom ispitaniku, a isprekidane linije između točaka povezuju dva mjerena istog ispitanika.

n = ukupan broj ispitanika. Značajne razlike (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su crvenim P-vrijednostima (Wilcoxonov parni test sume rangova). NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; V Wilcoxon – zbroj rangova dodijeljenih razlikama s pozitivnim predznakom; IL-17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> (% ukupnih) – pomoćnički T limfociti 17 (% od ukupnih); IL-17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> (% roditeljskih) – pomoćnički T limfociti 17 (% od roditeljskih); CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> (% ukupnih) – regulatorni T limfociti (% od ukupnih); CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> (% roditeljskih) – regulatorni T limfociti (% od roditeljske populacije); Th17/Treg – omjer pomoćničkih T limfocita 17 i regulatornih T limfocita.

## 5.7 Učinak niskoslane dijete na SGK1 kinazu i njezinu ulogu u transdiferencijaciji

Individualni odgovor SGK1 na dijetalnu restrikciju procijenjen je omjerom izražaja nakon (NS) i prije (B) ograničenja unosa soli (FC, SGK1<sub>NS</sub>/SGK1<sub>B</sub>).

Na grupnoj razini, srednji izražaj SGK1 podjednak je na obje dijete (Slika 5.14.), no bez sličnosti među individualnim razinama u korelacijskom testu ( $R = 0,14$ ,  $p = 0,6$ ) (Slika 5.17.)

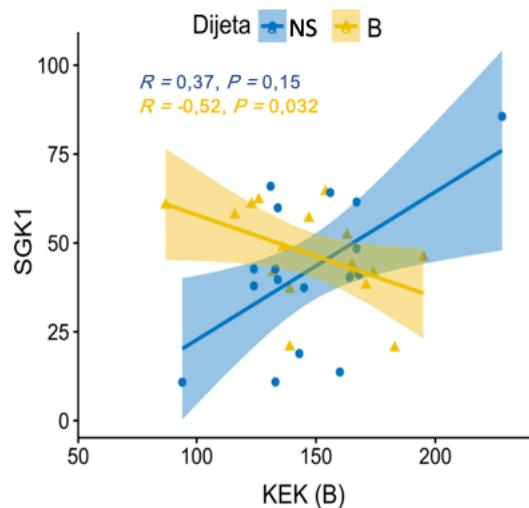


Slika 5.14. Vrijednosti SGK-1 kinaze u uzorcima staničnog lizata prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete.

Rezultati mjerena SGK-1 kinaze u uzorcima staničnog lizata ELISA metodom prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete prikazani su kao promjena koncentracije između bazalnog mjerjenja i poslije dvotjedne niskoslane dijete za svakog pojedinačnog ispitanika. SGK1 - kinaza 1 regulirana serumom i glukokortikoidima; B – bazalno mjerjenje prije 14-dnevne niskoslane dijete. NS – mjerjenje nakon 14-dnevne niskoslane dijete.

U stacionarnim uvjetima (*steady-state*, slobodni unos soli na regularnoj dijeti ispitanika), bazalni izražaj ukupne SGK1 viši je u osoba s lošijom bubrežnom funkcijom (koeficijent kreatininina, Slika 5.15.).

Zabilježene su individualne varijacije u veličini i smjeru odgovora SGK1 na smanjeni unos soli, većinom unutar  $|\log_2\text{FC}| = 1$  raspona (12/17 ispitanika), ali uz veću disperziju, gotovo podjednako u smislu relativnog porasta ( $\log_2\text{FC} > 1$ ,  $n = 1$ ) i pada izražaja na NS dijeti ( $\log_2\text{FC} < -1$ ,  $n = 4$ ). Unutar ukupnog očekivanog budžeta greške za ovakav tip mjerjenja, rezultat upućuje prvenstveno na relativnu stabilnost izražaja SGK1 u većine ispitanika, barem unutar prva dva tjedna razmjerno liberalne NS dijete.



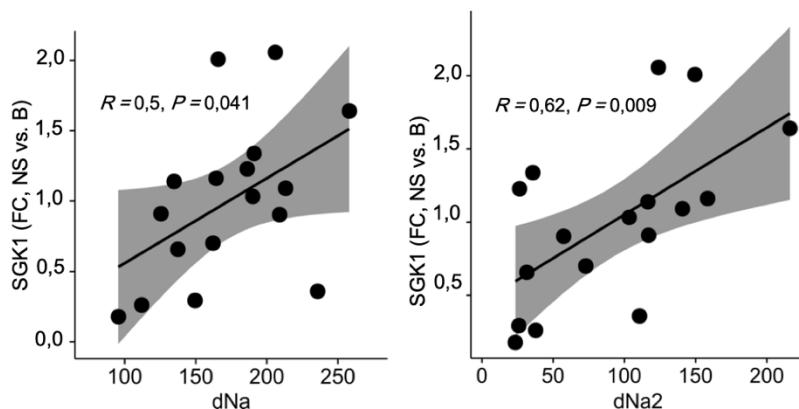
**Slika 5.15. Korelacije rangova, bazalni koeficijent kreatinina [KEK (B), mL/min].**

---

Žuta i plava crta predstavlja regresijski pravac (žuti – na regularnoj dijeti; plavi – na niskoslanoj dijeti, metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; KEK (B)- klirens kreatinina, bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; R – Spearmanov koeficijent korelacije; FC – omjer izražaja (*fold change*); LS – nakon niskoslane dijete; B – bazalno mjerjenje; dNa – dnevna natriureza pri bazalnom mjerjenju, mmol/dU; dNa2 – dnevna natriureza nakon niskoslane dijete, mmol/dU).

---

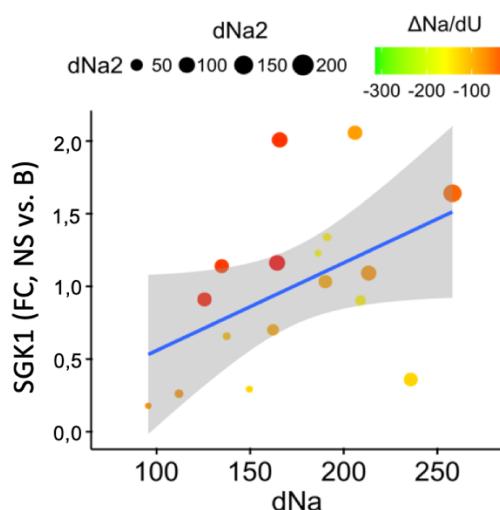
U cijelini, viši omjer izražaja SGK1 (FC, NSD vs. RD) uočen je u ispitanika s višim bazalnim unosom soli, višim rezidualnim unosom soli na NS dijeti (Slika 5.16.) i višom kaliurijom ( $K / dU_{\text{NS}}$ ,  $R = 0,65$ ,  $p = 0,005$ ). U generalnom linearном modelu početna natriureza i postignuti stupanj redukcije unosa neovisno su povezani s odgovorom SGK1 na NS dijetu (Tablica 5.16.), bez jasnog praga učinka (Slika 5.16., Slika 5.17.).



**Slika 5.16. Korelacija 24-satne natriureze i razine serumom i glukokortikoidima reguliranom kinazom 1 (SGK1).**

R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. FC – omjer izražaja (engl. *fold change*); NS – nakon niskoslane dijeti; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; dNa – dnevna natriureza pri bazalnom mjerenu; dNa2 – dnevna natriureza nakon niskoslane dijeti).

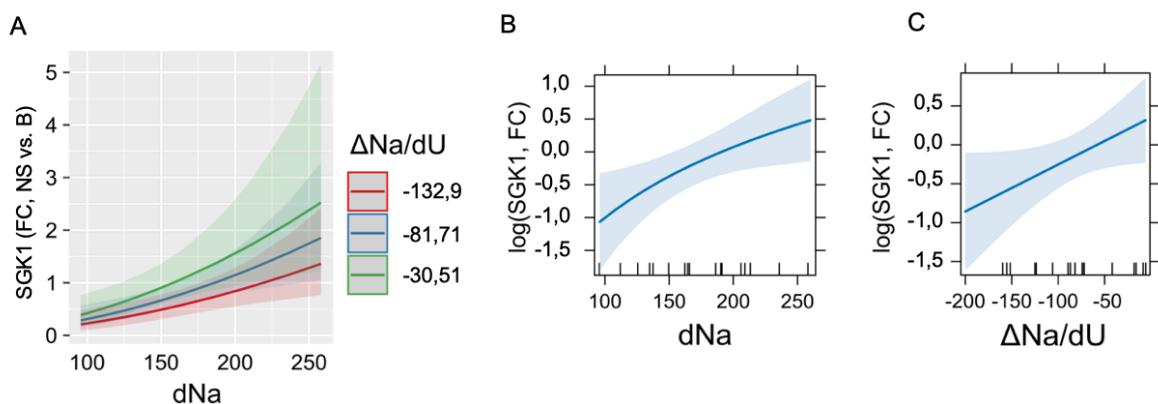
Najviše vrijednosti zabilježene su pritom u ispitanika s visokom bazalnom (početnom) ekskrecijom i najmanjim padom natriureze (redukcijom unosa) na NS dijeti ( $\Delta\text{Na}/\text{dU} = \text{dNa}_2 - \text{dNa}_1$ ; Slika 5.17., Slika 5.18.).



**Slika 5.17. Serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1 (SGK1) u ovisnosti o rezidualnoj natriurezi na LS dijeti.**

Veličina krugova razmjerna je rezidualnoj natriurezi ( $\text{dNa}_2$ ) na LS dijeti (mmol/dU, mjerilo gore lijevo). Promjena 24-satne natriureze prije i poslije niskoslane dijete ogleda se u boji krugova (kolorirana vrpca, mmol/dU, desno gore). Plava crta predstavlja regresijski pravac (metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena

regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; FC - omjer izražaja (*fold change*) ; LS – nakon niskoslane dijete; B – bazalno mjerjenje; dNa – dnevna natriureza pri bazalnom mjerenu; dNa2 – dnevna natriureza nakon niskoslane dijete



**Slika 5.18. Marginalni efekti (generalni linearni model), omjer izražaja serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1).**

Panel A. Različite razine promjene dnevne natriureze (mmol/dU) označene su različitim bojama, čije su reprezentativne vrijednosti naznačene s desne strane prvoga grafa. Sjenčana polja odgovaraju 95 % intervalu pouzdanosti (CI). Panel B. i C. Pseudo-log ordinata. Okomiti usjeci na apsici označavaju pojedinačna mjerena (ispitanike).

SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; FC – omjer izražaja (*fold change*); NS – niskoslana dijeta; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; dNa – dnevna (24-satna) natriureza (mmol/dU);  $\Delta\text{Na}/\text{dU}$  – promjena 24-satne natriureze prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete (mmol/dU).

**Tablica 5.10. Linearni model, univariatni i multivariatni za serumom i glukokortikoidima reguliranu kinazu 1 (SGK1).**

<b>log(SGK1, FC)</b>				
<i>Prediktori</i>	$\beta$	95 % CI	<i>p</i>	<i>df</i>
(Odsječak)	-8,15	-13,84 – -2,46	<b>0,013</b>	15
dNa [log]	1,55	0,44 – 2,66	<b>0,015</b>	15
$R^2_a = 0,289$		$F (1,15) = 7,51, P = 0,015$		
<b>log(SGK1, FC)</b>				
<i>Prediktori</i>	$\beta$	95 % CI	<i>p</i>	<i>df</i>
(Odsječak)	-2,74	-4,44 – -1,04	<b>0,006</b>	15
dNa2 [log]	0,59	0,20 – 0,98	<b>0,01</b>	15
$R^2_a = 0,328$		$F (1,15) = 8,82, P = 0,0096$		
<b>log(SGK1, FC)</b>				
<i>Prediktori</i>	$\beta$	95 % CI	<i>p</i>	<i>df</i>
(Odsječak)	-9,39	-14,61 – -4,17	<b>0,003</b>	14
$\Delta Na/dU$	0,01	0,0006 – 0,012	<b>0,048</b>	14
dNa [log]	1,89	0,85 – 2,93	<b>0,003</b>	14
$R^2_a = 0,429$		$F (2,14) = 7,02, P = 0,0077$		

Multikolinearnost je paralelno testirana i pažljivo isključena. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; FC – omjer izražaja (*fold change*);  $\beta$  regresijski koeficijent, CI – interval pouzdanosti (*confidence interval*), df – broj stupnjeva slobode (*degrees-of-freedom*); dNa – dnevna (24-satna) natriureza, bazalno mjereno na regularnoj dijeti (mmol/dU); dNa2 – dnevna (24-satna) natriureza nakon niskoslane dijete (mmol/dU);  $\Delta Na/dU$  – promjena 24-satne natriureze prije i poslije dvotjedne niskoslane dijete (mmol/dU).

Naprotiv, niži SGK1 omjer nakon NS dijete uočen je poglavito u ispitanika s niskom početnom i post-intervencijskom ekskrecijom NaCl. Među njima, najniži omjer izražaja SGK1 uočen je u ispitanika s najvišim vrijednostima serumskog TNF- $\alpha$  na NS dijeti ( $R = -0,78, p = 0,00007, n = 16$ ).

Analiza podataka u užoj jezgri NS skupine potvrđuje i proširuje ova zapažanja (12 ispitanika kod kojih je natriurija niža od najniže vrijednosti na regularnoj dijeti ( $Na/dU_{min} \sim 97$ )).

U ovoj podskupini mjereni absolutni izražaj SGK1 na 14-dnevnoj NS dijeti razmjeran je ostatnoj natriurezi i dijetalnom unosu NaCl (oba  $R = 0,83$ ,  $p = 0,01$ ), u prilog kontinuiteta povezanosti u najnižem rasponu dijetalnog unosa soli. Slično, absolutni izražaj (količina) SGK1 na NS dijeti inverzno je povezan sa serumskom koncentracijom TNF- $\alpha$  ( $R = -0,76$ ,  $p = 0,028$ ). Jedna od zanimljivosti je i pozitivna povezanost rezidualnog izražaja SKG1 na 14-dnevnoj niskoslanoj dijeti s FRS procjenom 10-godišnjeg rizika za kardiovaskularnu smrt i AIM ( $R = 0,79$ ,  $p = 0,037$ ), unatoč nedostatku povezanosti SGK1 s ulaznim komponentama FRS zbroja.

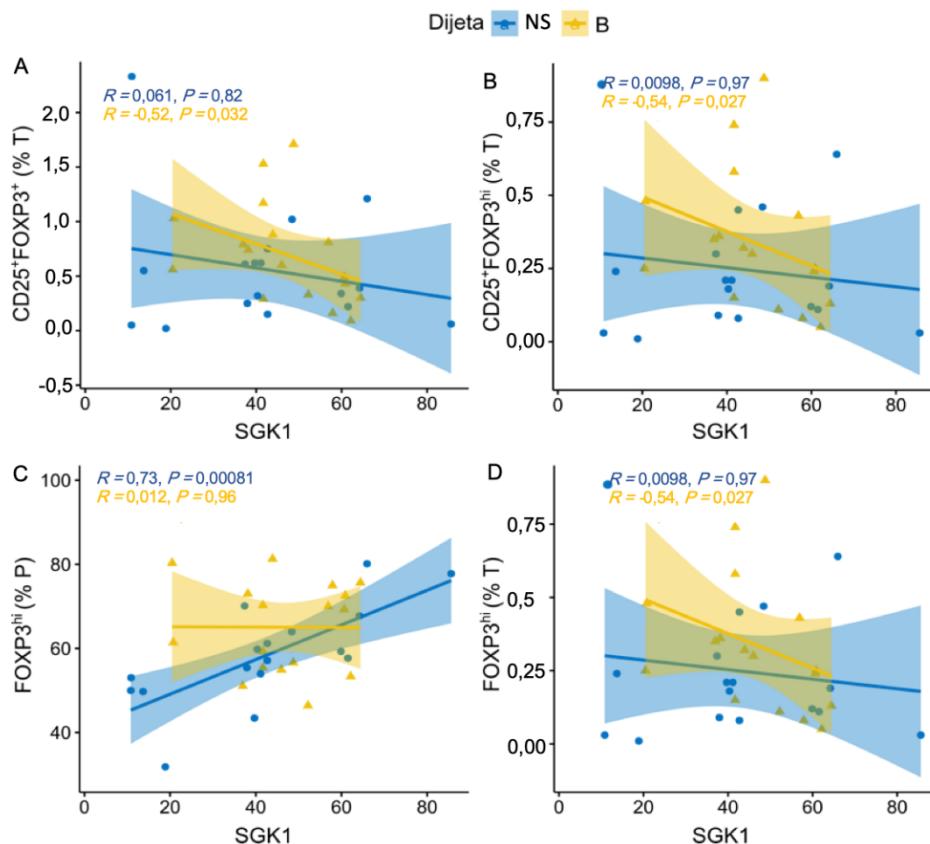
Povezanost staničnih frekvencija s izražajem SGK1 značajno varira između dvije vremenske točke, na regularnom i sniženom unosu soli. Sličnost između dvije dijete zapažena je za Th stanice, sugerirajući povezanost višeg izražaja SGK1 s nižim udjelom pomoćničkih T stanica.

Na redovitoj dijeti dominiraju asocijacije s  $CD25^+FOXP3^{+/high}$  stanicama (Treg): bazalni izražaj SGK1 nominalno je viši u osoba s nižom frekvencijom ukupnih T stanica,  $CD25^+FOXP3^{high}$ ,  $CD25^+FOXP3^+$  i  $CD25^+CD127^{low}$  stanica u cirkulirajućim populacijama (Tablica 5.11., Slika 5.19.). Na kratkoročnoj NS dijeti predvode korelacije s  $ROR\gamma t^+$  T stanicama: absolutni izražaj SGK1 viši je u osoba s višim udjelom  $CD4^+ROR\gamma t^+$  T stanica, osobito  $IL17^+ROR\gamma t^+$ , ali i  $IL17^-ROR\gamma t^+$  klase (Tablica 5.11.). Među ostalim poveznicama izražaj SGK1 na NS dijeti snažno zrcali porast udjela  $CD25^+FOXP3^{high}$  stanica, uz recipročni pad udjela  $CD25^+FOXP3^{-/low}$  stanica prvenstveno u  $CD25^+CD127^{low}$  frakciji (Tablica 5.11., Slika 5.20.), ali ne i među ukupnim pomoćničkim T limfocitima. Oprez je, naravno, nužan u tumačenju NS asocijaciju, jer sustav nakon 14-dnevne dijete moguće još nije postigao novo ravnotežno stanje u svim frakcijama, odražavajući tranzicijska zbivanja.

**Tablica 5.11. Sastav staničnih populacija i izražaj SGK1, slobodni unos (RD) i NS dijeta.**

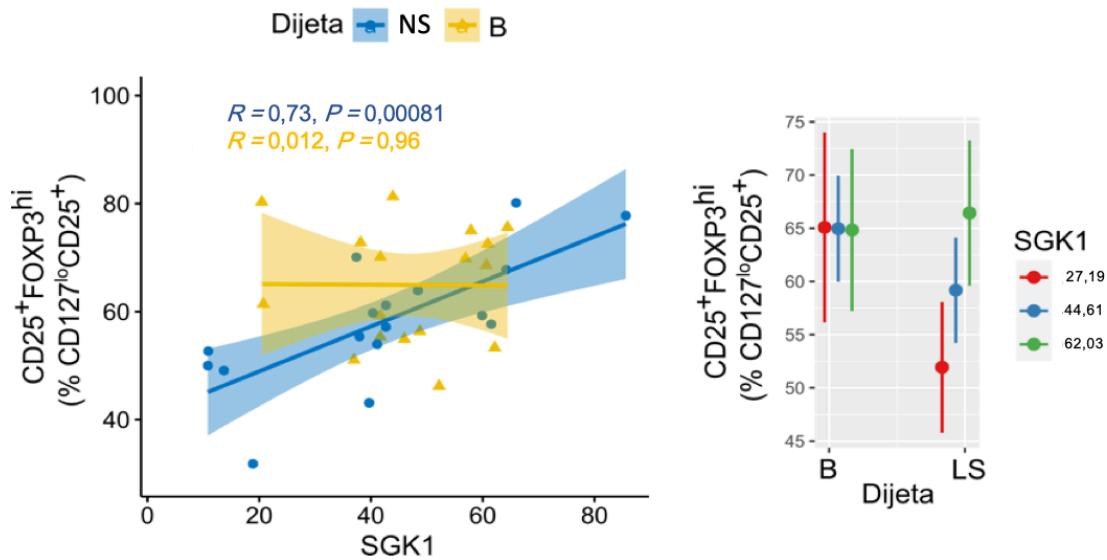
Populacija (RD)- SGK1 (RD)	%	R	p	Populacija (NS)- SGK1 (NS)	%	R	p
ukupne T	T	- 0,51	0,038	pomoćničke T	P (ly)	- 0,5	0,041
pomoćničke T	T (ly)	- 0,53	0,028	CD4 <sup>+</sup> ROR $\gamma$ t <sup>+</sup>	T (T)	0,52	0,033
CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>high</sup>	T (Th)	- 0,54	0,027	IL17 <sup>-</sup> ROR $\gamma$ t <sup>+</sup>	T	0,52	0,034
CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	T (T)	- 0,52	0,032	IL17 <sup>+</sup> ROR $\gamma$ t <sup>+</sup>	T	0,58	0,014
CD127 <sup>low</sup>	T	- 0,52	0,033	CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>high</sup>	P (CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> )	0,73	0,00081
CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup>	T	- 0,51	0,036	CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-/low</sup>	P (CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> )	-0,73	0,00089

SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; RD – regularna dijeta; NS – mjerenje nakon niskoslane dijete; % – postotak; R – Spearmanov koeficijent korelacije; ukupne T – frekvencija ukupnih T limfocita; pomoćničke T – frekvencija pomoćničkih T limfocita; CD – engl. *cluster of differentiation*; IL17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> – Th17 stanice; CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> – Treg limfociti; CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-/low</sup> – nedavno aktivirane Treg.



**Slika 5.19. Korelacije serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) i staničnih populacija na regularnoj dijeti i nakon dvotjedne niskoslane dijete.**

Prikazane su korelacije rangova između SGK1 i staničnih subpopulacija  $CD25^+FOXP3^+$  (% od ukupnih),  $CD25^+FOXP3^{high}$  (% od roditeljskih),  $FOXP3^{high}$  (% od roditeljskih) i  $FOXP3^{high}$  (% od ukupnih). Žuta i plava crta predstavlja regresijski pravac (žuti – na regularnoj dijeti; plavi – na niskoslanoj dijeti, metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitaniku. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; bazalno mjerene na regularnoj dijeti; R – Spearmanov koeficijent korelacijske; FC - omjer izražaja (*fold change*); NS – nakon niskoslane dijete; B – bazalno mjerene na regularnoj dijeti.



**Slika 5.20. Korelacija rangova i marginalni efekti između serumom i glukokortikoidima regulirane kinaze 1 (SGK1) i frekvencije CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+/high</sup> stanica (% od CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup>).**

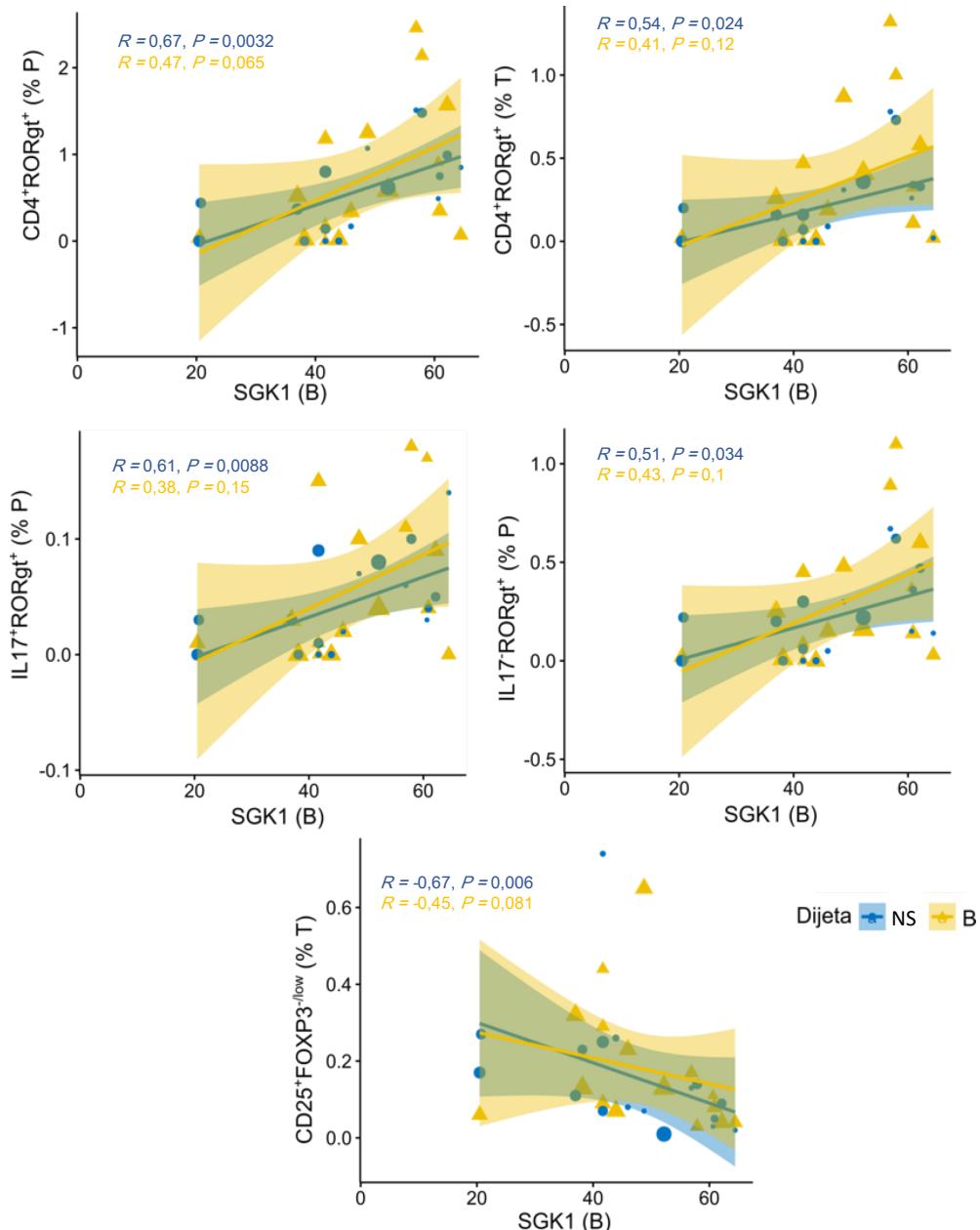
Žuta i plava crta predstavlja regresijski pravac (žuti – na regularnoj dijeti; plavi – na niskoslanoj dijeti, metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom ispitniku. Na desnom grafikonu prikazani su marginalni efekti. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti; R – Spearmanov koeficijent korelacije; FC - omjer izražaja (*fold change*); NS – nakon niskoslane dijetе; B – bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti.

Na tom tragu, većina uočenih staničnih asocijacija na NS dijeti dijeli povezanost s ishodišnom količinom SGK1 na redovitoj dijeti (Tablica 5.12., ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> i CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-/low</sup> frakcije). Drugim riječima, početna količina SGK1 mjerena prije dijetalne restrikcije unosa soli solidan je, ako ne i snažniji, prediktor ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> i CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-/low</sup> staničnih frekvencija na NS dijeti (Slika 5.21.). Za ove klase stanica promjena unosa soli, čini se, prije nego promjena ukupne količine SGK1, vodeća je odrednica kratkoročnog remodeliranja, barem u prvim danima dijetalne restrikcije soli.

**Tablica 5.12. Sastav staničnih populacija na LS dijeti i izražaj SGK1 na slobodnom unosu (B) i LS dijeti (Spearman rang-korelacije).**

Populacija (NS), SGK1 <sub>RD</sub>	%	R	p	Populacija (NS), SGK1 <sub>NS</sub>	%	R	p
<b>CD4<sup>+</sup>ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	T	0,67	0,0032	<b>CD4<sup>+</sup>ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	T (T)	0,52	0,033
<b>IL17<sup>-</sup> ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	P	0,52	0,034	<b>IL17<sup>-</sup> ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	P	0,5	0,039
<b>IL17<sup>+</sup>ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	P	0,61	0,0088	<b>IL17<sup>+</sup>ROR<math>\gamma</math>t<sup>+</sup></b>	T	0,58	0,014
CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>lo</sup>	P (T)	- 0,65	0,0044	CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>hi</sup>	(CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>lo</sup> )	0,73	0,00081
<b>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-lo</sup></b>	T (Th)	- 0,64	0,006	<b>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-lo</sup></b>	(CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>lo</sup> )	- 0,73	0,00089

NS – mjerjenje nakon niskoslane dijete; SGK1<sub>RD</sub> – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1 (bazalno mjerjenje na regularnoj dijeti); SGK1<sub>NS</sub> – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1 (mjerjenje nakon niskoslane dijete); CD – engl. *cluster of differentiation*; IL17<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> – Th17 stanice; CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>high</sup> – Treg limfociti; CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-low</sup> – nedavno aktivirane Treg stanice.



**Slika 5.21. Stanične frekvencije na 14-dnevnoj NS dijeti vs. inicijalni izražaj SGK1 (uobičajena dijeta, B; korelacije rangova).**

Radi lakše usporedbe prevladavajućih trendova prije i nakon dijete, izostavljen je jedan niz stršećih vrijednosti (PV-LS-16, citometrija na uobičajenoj dijeti).

Svi pet grafikona prikazuju korelacije rangova između SGK1 (bazalno mjerjenje) i staničnih subpopulacija  $CD4^+ROR\gamma^+$  (% od roditeljskih),  $CD4^+ROR\gamma^+$  (% od roditeljskih),  $IL-17^+ROR\gamma^+$  (% od roditeljskih),  $IL-17^+ROR\gamma^+$  (% od roditeljskih) i  $CD25^+FOXP3^{-low}$  (% od ukupnih). Žuta i plava crta predstavlja regresijski pravac (žuti – na regularnoj dijeti; plavi – na niskoslanoj dijeti, metoda najmanjih kvadrata). Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti, a svaka točka odgovara jednom

---

ispitaniku. SGK1 – serumom i glukokortikoidima regulirana kinaza 1; R – Spearmanov koeficijent korelacije; B – bazalno mjerjenje; NS – mjerjenje nakon niskoslane dijete; %T – postotak od ukupnih; %P – postotak od roditeljskih.

---

## 6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja govore u prilog tome da je 14-dnevna dijeta s niskim udjelom soli kod osoba koje boluju od psorijaze imala povoljan utjecaj na imunološke čimbenike koji sudjeluju u etiopatogenezi psorijaze, na kliničku sliku psorijaze, kao i na vaskularnu reaktivnost periferne mikrocirkulacije. Naime, došlo je do smanjenja frekvencije Th17 stanica, smanjenja koncentracije IL-23 u serumu te do kliničkog poboljšanja bolesti koje se očituje u smanjenju PASI zbroja. Osim toga, kod ispitanika koji boluju od psorijaze je nakon dvotjedne niskoslane dijete došlo do povećanja protoka na ionoforezu acetilkolinom (AChID) u perifernoj mikrocirkulaciji kože, što govori u prilog poboljšanju vaskularne reaktivnosti na temelju endotel-ovisne vazodilatacije. Povećanje AChID negativno je koreliralo s trajanjem psorijaze. Kako odgovor na zagrijavanje kože (LTH) nije dosegnuo granicu statističke značajnosti, možemo zaključiti da je poboljšanje vaskularne reaktivnosti uzrokovano čimbenicima iz endotela koji nisu NO. Izražaj SGK1 je u većine ispitanika bio razmjerno stabilan unutar dva tjedna razmjerno liberalne NS dijete, a daljnje su analize utvrdile da je u bazalnim uvjetima izražaj bio viši kod pacijenata s lošijom bubrežnom funkcijom.

### 6.1 Niskoslani dijetni protokol

Kako je u uvodu već naglašeno, unos soli prema posljednjim podatcima populacije u Hrvatskoj značajno premašuje preporučeni unos od strane SZO. Naime, prema SZO, unos soli bi trebao biti niži od 5 g soli dnevno (2000 mg Na dnevno). Prema posljednjem istraživanju u Hrvatskoj unos je soli kod muškaraca iznosio 13 (4) g soli (5232 (1692) mg Na) dnevno, a kod žena je bio 10 (4) g soli (4013 (1652) mg Na) dnevno. Do sada nije provedeno epidemiološko istraživanje unosa soli u psorijatičara u RH. U velikoj prospektivnoj kohortnoj studiji UK Biobank iz Ujedinjenog Kraljevstva, recentno objavljenoj u svibnju 2024. godine, uočena je pozitivna povezanost između učestalosti dodavanja soli hrani i rizika od psorijaze. Pozitivna povezanost bila je neovisna o brojnim drugim čimbenicima rizika i mogla bi biti djelomično posredovana pretilošću i upalom (165).

U skladu s tim istraživanjem, ispitanici koji boluju od psorijaze u ovom su istraživanju svojom regularnom dijetom također unosili više soli od preporučenoga u danu (10,2 (3,4) g soli, tj. 4102 (1348) mg Na). Dnevni unos natrija u muških psorijatičara pritom je bio značajno viši nego u žena (unos Na, muškarci 12,3 (3,5) g soli (4942 (1385) mg Na) vs. žene 8,7 (2,37) g soli (3471 (948) mg Na), Student-T test,  $p = 0,009$ ).

Primjena niskoslanog dijetnog protokola do sada je najviše istraživana na kardiovaskularnim bolesnicima, zbog toga što je općeprihvaćeno da je visok unos soli u prehrani važan čimbenik rizika za razvoj i održavanje hipertenzije. Pokazalo se kako je tzv. DASH (engl. *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) dijeta povoljno djelovala na zdravstveno stanje tih bolesnika. DASH dijeta je u ovom istraživanju, kao i u brojnim prethodnim istraživanjima na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, služila kao osnova dijetetske intervencije (166).

Prije uključivanja u studiju veći broj potencijalnih ispitanika odustao je od studije upravo zbog potrebe za provođenjem niskoslane dijete u sklopu istraživačkog protokola. Razlozi za odustajanje prije uključivanja u studiju podudarali su se s već objavljenim preprekama za provođenje niskoslane dijete, a to su nedostatak dosta razine obrazovanja osoba, razina interferencije niskoslane dijete s društvenim i obiteljskim životom i dostupnost, odnosno priuštivost zdravijih i manje slanih prehrabnenih alternativa (167).

U studiji s niskoslanim dijetnim protokolom na osobama koje boluju od srčanog zatajenja pokazalo se kako je adherencija za niskoslanu dijetu veća kod žena te da su žene bolje razumjele što treba poduzeti kako bi se bolje provodila niskoslana dijeta (168). U našem je istraživanju ukupno 6 ispitanika isključeno iz analize radi nepridržavanja niskoslane dijete, od kojih su 5 (83,3 %) bili muškarci, dok je među njima bila samo 1 (16,7 %) žena, čime se potvrđuju prethodno objavljeni podatci. Među ispitnicima koji su imali smanjenje 24-satne natrijureze te su stoga uključeni u statističku analizu nije bilo statistički značajne razlike u provođenju dijete ( $\Delta$  unos Na, za muške ispitanike: -1997 [-2878 – -961,64] vs. za ženske ispitanice: -1751,90 [-3005 – -1455], mg Na, Mann-Whitney test,  $p = 0,754$ ).

## 6.2 Učinak niskoslane dijete na antropometrijska mjerena

U posljednje su vrijeme brojne studije pokazale jaku povezanost između prehrane s visokim udjelom soli i pretilosti, čak i nakon prilagodbe ukupnog unosa kalorija (169,170). Švedska studija na 86 muškaraca otkrila je da visok unos soli pozitivno korelira s tjelesnom težinom i indeksom tjelesne mase, čak i nakon korekcije unosa kalorija (171). U presječnoj studiji sa 184 ispitanika u Ujedinjenom Kraljevstvu, opseg struka i masa tjelesne masti bili su veći kod osoba s povećanim unosom soli (172). U nedavnoj randomiziranoj kontroliranoj studiji u kojoj su ispitanici randomizirano dodijeljeni 2-mjesečnom dijetnom protokolu s niskim unosom soli i dijetnom protokolu s uobičajenim unosom soli koji je bio prilagođen jednakom unosu kalorija, pokazalo se kako je došlo do većeg gubitka tjelesne težine i smanjenja BMI u grupi koja je provodila niskoslanu dijetu (173). Međutim, zaključak studije je kako se smanjenje BMI i tjelesne težine može pripisati smanjenju udjela retenirane tekućine, a ne smanjenju udjela

ukupnog ili viscerarnog masnog tkiva. Nema dovoljno dokaza da niskoslana dijeta dovodi do smanjenja udjela viscerarnog masnog tkiva, budući da nije dosegnuta granica statističke značajnosti od  $p < 0,05$  ( $p = 0,08$ ). Rezultati trenutnog istraživanja u skladu su s prethodno opisanima, tako da svjedočimo smanjenju tjelesne težine (TT, RD 82,9 (13,9) vs. NSD 81,9 (13,3), T test za parne uzorke,  $p < 0,001$ ), indeksa tjelesne mase (BMI, RD 26,6 [25,7 – 29,1] vs. NSD 26,1 [25,2 – 28,8], Wilcoxon test sume rangova,  $p < 0,001$ ) i opsega struka (OS, RD 96,2 (14,3) vs. NSD 95,5 (13,3), T test za parne uzorke,  $p = 0,02$ ) nakon dvotjedne niskoslane dijete u odnosu na inicijalno mjerjenje na regularnoj dijeti. Vrijedno je pri tome naglasiti kako je prilikom pojašnjavanja niskoslane dijete korištene u ovom istraživanju (koja je varijanta DASH dijete) u pismenim uputama, kao i usmeno, ispitanicima pojašnjeno da prilikom ove dijete nije potrebno reducirati kalorijski unos. Prednost ovih rezultata u odnosu na rezultate iz većine dosadašnjih studija s ovom tematikom, koje su bile presječne, jest to što je ovdje riječ o prospективnom kohortnom istraživanju. Doduše, u ovom istraživanju nismo mjerili tjelesni sastav, tako da podatke o smanjenju udjela masti i vode u tijelu nakon niskoslane dijete nismo dobili. Također, kako nije mjerен točan unos kalorija te je on stoga nepoznat, i ne može se sa sigurnošću reći jesu li ispitanici smanjili i unos kalorija.

### 6.3 Učinak niskoslane dijete na krvnu sliku i osnovne biokemijske parametre u krvi kod osoba koje boluju od psorijaze

Postoje dokazi da niskoslana dijeta dovodi do smanjenja broja monocita u diferencijalnoj krvnoj slici (174). U ovom istraživanju diferencijalna krvna slika učinjena je samo u jednom navratu kako bi se isključila subklinička akutna infekcija, ali budući da nije učinjena na drugom mjerenu nakon niskoslane dijete, podatci nažalost nisu dostupni za parnu komparaciju.

U ovoj je studiji niskoslana dijeta dovela do povišenja serumskog kreatinina, premda su u obje dijete vrijednosti bile unutar referentnih intervala

Iako ovaj rezultat na prvi pogled iznenađuje jer se smatra da niskoslana dijeta ima renoprotektivni učinak (175), ovaj je učinak niskoslane dijete već opisan u pojedinim studijama. Primjerice, u jednom randomiziranom istraživanju na osobama koje boluju od kronične bubrežne bolesti, pokazalo se kako niskoslana dijeta dovodi do pada eGFR (procijenjene brzine glomerularne filtracije, engl. *estimated glomerular filtration rate*) te posljedično tome do porasta kreatinina i urata u serumu u odnosu na visokoslanu dijetu (176). Nadalje, niže su bile razine kreatinina u skupini s dodatkom soli u odnosu na skupinu s dodatkom placeba (177). Čini se kako visok unos soli može dovesti, barem kratkoročno, do većeg klirensa kreatinina

(176). Nije bilo statistički značajnog utjecaja na razinu ureje, natrija i kalija u serumu. Većina dostupnih istraživanja u literaturi ne opisuje takav učinak niskoslane dijete.

Sol u prehrani istraživala se i u konceptu osteoporoze, budući da je primijećeno kako viši unos soli u prehrani može inducirati kalciuriju (178). U nedavnom se istraživanju provedenom na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek pokazalo kako je nakon visokoslane dijete došlo do značajnog smanjenja kalcija u serumu (179). Nadalje, ranije je opisano kako je razina kalcija u serumu osoba koje boluju od psorijaze niža u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu nije bilo korelacije s težinom psorijaze (180).

U ovom istraživanju došlo je do značajnog povišenja koncentracije kalcija u serumu nakon dvotjedne niskoslane dijete, u usporedbi s inicijalnim mjeranjem pri regularnoj dijeti ispitanika. I jedna i druga vrijednost bile su unutar referentnog raspona. Kako je razina kalcija u serumu psorijatičara niža, niskoslana dijeta i u tom segmentu može koristiti osobama koje boluju od psorijaze.

U jednoj su metaanalizi analizirani podatci iz ukupno 33 studije s niskoslanom dijetom te nije uočen značajnan učinak niskoslane dijete na razinu proteinurije i albuminurije (181). U ovom je istraživanju analizirana albuminurija te nije bilo značajne promjene u razini albumina u dnevnom urinu što je u skladu s dostupnim podatcima u literaturi.

#### **6.4 Učinak niskoslane dijete na težinu psorijaze i utjecaj na kvalitetu života osoba koje boluju od psorijaze**

Kako je ovo je prvo istraživanje intervencijom niskoslanog dijetnog protokola na osobama koje boluju od psorijaze, sva su saznanja dobivena u ovom istraživanju nova.

PASI i DLQI indikatori su za procjenu težinu psorijaze, pri čemu se s ova dva upitnika mjere različiti aspekti ove bolesti (182). Tako primjerice na vrijednosti dobivene iz DLQI upitnika više utječu psorijatične lezije na posebnim lokalizacijama kao što su lice, vlasti, dlanovi, tabani, nokti i genitalna regija, dok je zbog malog udjela površine ovih regija PASI zbroj manje osjetljiv na postojanje ovih promjena (183).

U većini studija nema korelacije ili postoji tek slaba korelacija između apsolutnih PASI i apsolutnih DLQI vrijednosti (184). Dok je u većini postojećih studija prisutna korelacija između poboljšanja PASI i DLQI vrijednosti nakon terapije (185), u nekim studijama takve korelacije nije bilo. Primjerice, u brazilskoj studiji na 35 ispitanika nije bilo korelacije u promjeni PASI i DLQI vrijednosti prije i poslije 2-mjesečne sustavne terapije (186).

Do sada je proučavan utjecaj dijetnih intervencija na klinički procijenjenu težinu psorijaze. Najviše je istraživana dijeta s niskim unosom kalorija. Najveće takvo istraživanje bila je

randomizirana kontrolirana studija s 303 pretila ispitanika koji boluju od psorijaze te su liječeni sustavnom terapijom, u kojem se ispitivao učinak promjene životnih navika uvođenjem dijete s niskim unosom kalorija i redovitom tjelovježbom. Nakon 20 tjdana došlo je do značajnog smanjenja PASI u skupini s promjenom životnih navika, u odnosu na kontrolnu skupinu (48 % vs. 26 % smanjenje u medijanu PASI,  $p = 0,02$ ) te je značajno veći broj ispitanika u toj skupini dosegnuo PASI50 (50 % vs. 34 %,  $p = 0,006$ ) (187).

U ovom je istraživanju došlo do smanjenja PASI vrijednosti za 12 % nakon samo 2 tjdna niskoslanog dijetnog protokola. Iznenadjuće je pri tome da nije pronađena korelacija između pada PASI vrijednosti i 24-satne natrijureze niti kalkuliranog 24-satnog unosa natrija među ispitanicima čiji su se podatci statistički analizirali. Važno je napomenuti da su svi analizirani ispitanici provodili niskoslanu dijetu što je i dokazano nalazom 24-satne natrijureze. Uspostavilo se da su samostalni prediktori za veće smanjenje PASI u ovoj studiji bili ženski spol i veća životna dob. Štoviše, dok je kod ženskih ispitanika promjena PASI na niskoslanoj dijeti bila statistički značajna, kod muških ispitanika značajne promjene u PASI uopće nije bilo. Promjena PASI korelirala je s dobi ispitanika ( $R = -0,6$ ,  $p = 0,004$ ).

Premda je veća promjena PASI kod žena na prvi pogled neočekivana, potencijalno ima biološkog smisla. Naime, kod žena je prevalencija Th17 posredovanih autoimunih bolesti veća, što je objašnjeno time da estradiol i progesteron povećavaju produkciju IL-17A u Th17 stanicama (188). Kako je u našem istraživanju došlo do pada relativnog udjela Th17 stanica uslijed niskoslane dijete, to se postavlja kao moguć podležeći mehanizam za ovakve rezultate. Potrebno je učiniti dodatna istraživanja da bi se rasvijetlili mehanizmi.

## **6.5 Utjecaj niskoslane dijete na hemodinamska mjerena**

### **6.5.1 Izbor metodologije u istraživanju vaskularne reaktivnosti u istraživanju**

Prethodno je već istaknuto da je većina istraživanja vaskularne reaktivnosti kod osoba koje boluju od psorijaze do sada provedena na provodnim i otporničkim krvnim žilama. Međutim, najranije promjene i oštećenja krvnih žila događaju se zapravo u mikrocirkulaciji. Mikrocirkulacija je splet krvnih žila s unutarnjim promjerom manjim od 100 µm. S većim brojem spoznaja o važnosti mikrocirkulacije razvile su se tijekom godina brojne tehnike procjene protoka u malim krvnim žilama (189). U posljednja je tri desetljeća mikrocirkulacija kože došla u fokus istraživanja, za što postoje dva glavna razloga. Prvi je, naime, taj što veći broj istraživanja govori u prilog tome da endotelna funkcija u mikrocirkulaciji može služiti kao ogledalo sustavne funkcije i disfunkcije krvnih žila i mehanizama koji su u njihovoј podlozi.

Drugi je taj što je zbog vrlo lake dostupnosti kože kao organa i sama mikrocirkulacija kože puno pristupačnija za neinvazivne tehnike ispitivanja mehanizama endotelne funkcije (190–192).

Nadalje, na animalnom modelu reumatoидног artritisa, autoimune bolesti srodne psorijazi, dokazano je da mikrovaskularna endotelna disfunkcija prethodi endotelnoj disfunkciji u velikim krvnim žilama, što potkrepljuje sumnju kako bi mikrovaskularna endotelna disfunkcija mogla biti još raniji pokazatelj kardiovaskularnog rizika u takvim upalnim bolestima (193). S obzirom na to da je do sada samo jedno istraživanje u psorijazi koristilo laser Doppler floumetriju s mjeranjem indeksa protoka krvi u mikrocirkulaciji kože tijekom lokalnog zagrijavanja na 42 °C, zaključujem da je mikrocirkulacija u psorijazi do sada vrlo neistraženo područje (99). Kako je navedena studija došla do zaključka o postojanju endotel-ovisne endotelne disfunkcije, koja je do sada u mnogim studijama ustanovljena kod psorijatičara na provodnim i otporničkim krvnim žilama, metoda LDF-a činila se metodom koja bi mogla u ovom protokolu dati dobar uvid u stanje krvnih žila i utjecaj niskoslane dijete na endotelnu funkciju, uz pristupačnu lokalizaciju. U području istraživanja endotelne disfunkcije u općoj populaciji može se pronaći mnoštvo članaka s korištenjem ove metodologije. Do sada je na zdravim ispitanicima, profesionalnim sportašima i kardiovaskularnim bolesnicima u više navrata LDF metodom ustanovljen učinak kratkotrajne visokoslane dijete na pogoršanje endotel-ovisne endotelne disfunkcije u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta Osijek. Stoga je LDF metoda uhodana te se pokazala reproducibilnom i osjetljivom na promjene koje izaziva unos soli u organizmu (194).

### **6.5.2 Utjecaj niskoslane dijete na mjerjenja arterijskog tlaka i otkucaje srca u minuti**

Već je dugo u medicini poznat koncept kako je visok unos soli u prehrani čimbenik rizika za razvoj hipertenzije. Prije više od 100 godina su, u nedostatku efektivnih antihipertenzivnih lijekova, Ambard i sur. preporučivali vrlo restriktivnu dijetu s niskim unosom soli radi smanjenja vrijednosti krvnog tlaka, koja je u to vrijeme manjka farmakoterapije uspjevala smanjiti razine krvnog tlaka, doduše uz cijenu vrlo netolerabilne dijete (195).

Međunarodno epidemiološko istraživanje INTERSALT, koje je publicirano 1988. godine, bilo je prvo tako veliko istraživanje utjecaja unosa soli (tj. 24-satnom natrijureze iz koje se unos soli može izračunati formulom) na vrijednosti krvnog tlaka. Bilo je to multicentrično istraživanje u kojemu su se prikupljali podaci iz 52 središta u 32 države, s konačno vrlo velikim uzorkom ispitanika jer se u svakom od 52 središta uključilo 100 muškaraca i 100 žena. Rezultati istraživanja govorili su u prilog tome kako je niži unos soli bio nezavisni čimbenik koji je bio povezan s nižim vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka, dok je učinak na vrijednosti

dijastoličkog krvnog tlaka bio slabiji (196). Problem ovoga istraživanja bio je taj što su, nakon što bi se iz analize isključile 4 plemenske populacije s vrlo niskim unosom soli i vrlo niskim vrijednostima tlaka, mnoge korelacije izgubile na značajnosti pa je ovo istraživanje, premda veliko i dobro smišljeno, bilo ipak uzrokom polemika i kontroverzi (197).

Uz mnogobrojne studije koje su ipak govorile u prilog povoljnog utjecaju niskoslane dijete na kardiovaskularni sustav, našle su se i dvije važne negativne studije koje su demantirale povoljan utjecaj niskoslane dijete i čak govorili u prilog štetnosti niskoslane dijete. U jednoj je studiji primjerice preporučeno izbjegavanje vrlo slane hrane te se u samo jednom navratu uzimao uzorak 24-satnog urina radi procjene natrijureze, nakon čega je učinjen *follow-up* posjet 3,8 godina poslije. Uočeno je kako su muškarci, čiji je unos soli pri tom jednokratnom mjerenu bio u najnižoj kvartili, značajno češće oboljevali od infarkta miokarda, što je dovelo autore do zaključka da je nizak unos soli čak i rizični čimbenik za infarkt miokarda (198). Osim što je zanemareno da uzimanje uzorka 24-satne natrijureze u jednom navratu nije bilo reprezentativno za unos soli u razdoblju dužem od 3 godine, nije uočeno ni to da je u tih muškaraca s vrlo niskom ekskrecijom natrija i kreatinin u 24-satnom urinu bio vrlo nizak, što je upućivalo na to da uzorci 24-satnog urina nisu bili primjereni prikupljeni. Radilo se, dakle, o muškarcima koji su već u startu bili manje suradljivi za provođenje zadanih uputa u istraživanju (197).

Na tragu većine istraživanja koja govore u prilog štetnosti soli je i SZO u sklopu svog programa za prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti izdala preporuke za smanjenje unosa soli (103).

Nije iznenađujuće kako je do sada utjecaj unosa soli na razinu krvnog tlaka pomno istraživan. Filippou i sur. nedavno objavili sustavni pregledni članak s metaanalizom podataka iz randomiziranih kliničkih istraživanja o utjecaju DASH dijete na krvni tlak (199). U usporedbi s kontrolnom dijetom, sistolički i dijastolički krvni tlak značajno su se smanjili nakon DASH dijete, neovisno o tome boluju li ispitanici od hipertenzije. Zanimljiv je podatak i to kako je DASH dijeta dovela do većeg smanjenja sistoličnog krvnog tlaka u kliničkim studijama s DASH dijetom s unosom natrija  $> 6$  g soli dnevno ( $2400$  mg Na dnevno) u odnosu na kliničke studije u kojima je dijetetskom intervencijom smanjen unos natrija  $\leq 6$  g soli dnevno ( $\leq 2400$  mg dnevno). Pri tome je veće smanjenje sistoličkog i dijastoličkog tlaka uočeno kod osoba mlađih od 50 godina (199).

Ovo je prvo istraživanje u kojemu se proučava utjecaj unosa soli i niskoslane dijete na hemodinamske parametre osoba koje boluju od psorijaze, koja je i sama po sebi rizični faktor za kardiovaskularne bolesti i razvoj metaboličkog sindroma. Rezultati trenutnog istraživanja dvotjedne niskoslane dijete na ispitanicima koji boluju od psorijaze potvrđuju do sada poznate podatke o utjecaju soli na vrijednosti krvnog tlaka na općoj populaciji. Naime, u ovom je

istraživanju primijećeno smanjenje vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka za 8 %, kao i vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka koje predstavljaju prosječni arterijski tlak tijekom jednog srčanog ciklusa (sistole i dijastole) za 7 %. Vrijednosti dijastoličkog tlaka nisu se značajno smanjile.

### **6.5.3 Oporavak o endotelu ovisne endotelne funkcije u mikrocirkulaciji kože osoba koje boluju od psorijaze nakon 2-tjedne niskoslane dijete**

U brojnim je istraživanjima dokazano kako je endotelna disfunkcija, koja je važan korak u procesu nastanka aterosklerotskog plaka, prisutna u osoba koje boluju od psorijaze (200).

Ovo je prvo istraživanje s intervencijom niskoslanom dijetom kod psorijatičara i proučavanjem njezinog učinka na endotelnu funkciju. Kod zdravih i hipertenzivnih je osoba utjecaj soli na endotelnu funkciju ekstenzivno proučavan.

U ovoj studiji došlo je do značajnog oporavka vaskularne reaktivnosti ovisne o endotelu u obliku povećanja dilatacije od 16 % kao odgovor na acetilkolin (AChID). Zanimljivo je da su vrijednosti AChID-a nakon dvotjedne niskoslane dijete, kao i promjena vrijednosti AChID-a nakon NS dijete negativno korelirale s trajanjem psorijaze, što implicira da je porast vrijednosti AChID-a bio veći kod onih kojima je psorijaza nedavno dijagnosticirana, u usporedbi s onima s produženim tijekom bolesti. Budući da dulje trajanje bolesti sugerira dulje kumulativno trajanje upale niskog stupnja u tijelu, bilo bi vrijedno dodatno istražiti ovaj koncept u vezi reverzibilnosti endotelne funkcije smanjenjem unosa soli.

Porast vrijednosti PORH-a nije bio statistički značajan ( $p = 0,056$ ). Kako je promjena vrijednosti PORH-a bila na samoj granici statističke značajnosti, razumno je razmotriti mogućnost kako bi kod većeg uzorka i promjena u PORH-u mogla dosegnuti statističku značajnost tako da bi veći uzorak ispitanika u budućem istraživanju mogao rasvijetliti ovu dilemu. Periferni mikrovaskularni odgovor na lokalno zagrijavanje korišten je za procjenu specifično NO-posredovane endotelno-ovisne vazodilatacije mikrocirkulacije kože. Poznato je da lokalno zagrijavanje kože proizvodi dvofazni porast krvotoka kože, s brzim početnim povećanjem protoka unutar prvih 90 - 120 s nakon početka zagrijavanja, nakon čega slijedi produljeni porast protoka krvi koji doseže plato nakon 20 - 30 minuta zagrijavanja. Čini se da je početni vrhunac uglavnom rezultat refleksa aksona lokalnog osjetnog živca, dok se je faza platoa pretežno posredovana endotelnim čimbenicima, točnije NO (60 - 70% odgovora na plato) (201).

Dakle, povećanje LTH između dva posjeta nije bilo značajno. Međutim, zbog negativne korelacije trajanja psorijaze s vrijednostima LTH nakon NS dijete i promjenom u LTH između dva studijska posjeta, čini se da je kod bolesnika s psorijazom koji dulje boluju od psorijaze smanjena bioraspoloživost NO nakon NS dijete u usporedbi s onima kojima je bolest nedavnije

dijagnosticirana, što bi moglo biti posljedica dugotrajnih promjena na krvnim žilama uzrokovanih psorijazom. Budući da je došlo do porasta AChID-a i nije bilo statistički značajnog povećanja protoka s LTH na 42°, može se zaključiti kako je oporavak vaskularne funkcije u mikrocirkulaciji kože psorijatičara nakon niskoslane dijete uglavnom posredovan endotel-ovisnim čimbenicima koji nisu NO.

Naime, na hiperemiju induciranoj toplinom utjecaj imaju u prvom redu NO, ali i druge tvari kao što su neurotransmiteri, hiperpolarizirajući faktori porijeklom iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factors*, EDHF) uz vjerojatno još i druge tvari. Zanimljivo je da EDHF nema veliki utjecaj na mikrovaskularnu funkciju u normalnim okolnostima (202), ali u stanjima smanjene bioraspoloživosti NO postaje važan mehanizam (203), što bi mogao biti slučaj u bolesnika s psorijazom, osobito u onih koji su imali dulje trajanje bolesti.

Činjenica da nije bilo promjene u SNPID vrijednostima, ukazuje na to da vaskularna reaktivnost nije oporavljena pomoću endotel-neovisnih mehanizama. U svojoj biti su ova saznanja u skladu i s trenutno dostupnom literaturom, budući da trenutni dokazi o endotelnoj funkciji u psorijazi govore u prilog tome da je riječ o poremećaju endotel ovisne funkcije. Stoga ima smisla da prilikom njezinog oporavka dolazi do oporavka u mehanizmima koji su u prvom redu i bili oštećeni. Učinak kraće dijete s povećanim ili smanjenim unosom soli na vaskularnu reaktivnost već je prokušan koncept te je u mnoštvu radova opisan. Kako je raslo znanje o učinku soli na endotelnu funkciju i vaskularnu reaktivnost, tako su se testirale granice ovog koncepta, pa sada znamo kako čak i samo jedan visokoslan obrok dovodi do pogoršanja endotelne funkcije unutar 30 minuta kod zdravih osoba (204). Nadalje, smanjeni unos soli je i kod normotenzivnih ispitanika doveo do poboljašnja endotel-ovisne vazodilatacije neovisno o promjenama izmijerenog krvnog tlaka u mirovanju. Ovi podatci sugeriraju dodani kardioprotektivni učinak smanjenog unosa soli koji je neovisan o smanjenju krvnog tlaka (155). U našem istraživanju oporavak mikrovaskularne reaktivnosti ne korelira s promjenama vrijednosti arterijskog tlaka prije i nakon niskoslane dijete.

U mnogim je istraživanjima pronađena korelacija između stupnja endotelne disfunkcije i kliničke težine psorijaze procijenjene PASI zbrojem (205,206) ili dužinom trajanja bolesti (207). U ovom istraživanju nije pronađena značajna korelacija stupnja vaskularne reaktivnosti s težinom kliničke slike psorijaze. Kako je već prethodno naglašeno, u ovom je istraživanju promjena AChID i LTH negativno korealirala s trajanjem psorijaze. Rezultati ove studije govore u prilog tome da je za poboljšanje vaskularne reaktivnosti nakon niskoslane dijete važnije koliko dugo osoba boluje od psorijaze nego kolika je klinička težina psorijaze procijenjena PASI zbrojem. Treba naravno uzeti u obzir i narav PASI zbroja, a to je da nam

ovaj indeks govori o kliničkoj težini psorijaze u jednoj vremenskoj točki i da te vrijednosti kod istog pacijenta mogu fluktuirati kroz vrijeme, s obzirom na to da se u slučaju psorijaze radi o kroničnoj, ali intermitentno-recidivirajućoj bolesti. Neke studije u kojima je proučavana veza između kliničkih značajki psorijaze sa endotelnom disfunkcijom takvu povezanost nisu našle (90). Radi procjene utjecaja dugotrajne upalne aktivnosti niske razine na endotelnu funkciju u psorijazi, mnogi su znanstvenici proučavali utjecaj upalnih biomarkera, u prvom redu CRP-a i hsCRP-a. I u ovom segmentu se u postojećoj literaturi nalaze kontradiktorni podatci, tako da je u nekim istraživanjima pronađena korelacija između upalnih parametara, dok u drugima takve povezanosti nije bilo (200). U ovom istraživanju veza između upalnih markera i vaskularne reaktivnosti nije pronađena.

Važnost TNF- $\alpha$  u endotelnoj disfunkciji je dokazana u mnogim istraživajima *in vivo* i *in vitro*. U kontekstu psorijaze, potvrđena je i u randomiziranoj kontroliranoj studiji Holzera i sur. iz 2021. godine, time što je prilikom terapije inhibitorima TNF- $\alpha$  došlo do povećanja protoka mjereno FMD tehnikom, u odnosu na kontrolne skupine s liječene drugim terapijskim opcijama (208). Doduše, i druge su se terapijske intervencije pokazale učinkovitima. U prospективnoj kohortnoj studiji, pokazalo se kako je terapija metotreksatom i ustekinumabom (monoklonalnim anti-IL-12/23 protutijelom) dovela do značajnog smanjenja debljine intimal-medije kod ispitanika, koje je bilo čak i izraženije nego na TNF- $\alpha$  inhibitore (209). Nadalje, uspješnost ustekinumaba potvrđena je i u mađarskoj kohortnoj studiji u kojoj je dokazano kako je nakon 6 mjeseci trajanja terapije došlo do smanjenja debljine intime-medije i oporavka vaskularne funkcije, ali da je taj učinak bio veći u nekalcificiranim arterijama, nego u kalcificiranim (210). Time se ističe važnost rane intervencije primarnom i sekundarnom prevencijom endotelne disfunkcije, koja je još uvijek reverzibilno stanje, prije nego dođe do progresije do aterosklerotskog plaka i njegove kalcifikacije. NS dijeta mogla bi biti od osobitog značaja za prevenciju u kojih liječenje sustavnim lijekovima nije indicirano ili kod kojih postoji kontraindikacija. Rezultate na tom tragu imali su i Jokai i sur. koji su istraživali učinak TNF- $\alpha$  inhibitora, koji su također doveli do oporavka cIMT kod osoba bez vidljive ateroskleroze, dok kod osoba s postojećom aterosklerozom takvog oporavka nije bilo (211). Premda ova istraživanja imaju kliničku vrijednost, ona nam ipak ne rasvjetljavaju mehanizme koji stoje u podlozi tog učinka, budući da nisu mjerene frekvencije Th17 i Treg limfocita, kao ni pro-upalnih i protu-upalnih citokina. Premda *in vitro* istraživanja imaju svoja ograničenja u donošenju zaključaka o onome što se zbiva *in vivo* u ljudskom organizmu, vrijedno je spomenuti istraživanje Wild i sur. Naime, ovi su znanstvenici otkrili da je u prisutnosti visokoslanih uvjeta povećan učinak TNF- $\alpha$  na aktivaciju endotelnih stanica u 3D

bifurkacijskom modelu arterije, pod neujednačenim silama smicanja, uobičajenim arterijskim regijama koje su sklone aterosklerozi *in vivo*. Također, pokazalo se da ovaj proaterogeni učinak TNF- $\alpha$  ovisi o koncentraciji NaCl (146).

Nadalje, kao prediktivni faktor za veći oporavak endotel-ovisne endotelne funkcije kod psorijatičara na niskoslanoj dijeti se ispoljio niži BMI. Naime, postojala je negativna korelacija između vrijednosti BMI i promjene AChID ( $R = -0,66$ ;  $p = 0,0016$ ). Moguće je objašnjenje to što masno tkivo samo po sebi dovodi do proinflamatornog stanja organizma. Naime, masno tkivo promovira sekreciju i otpuštanje pro-upalnih medijatora, kao što su IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , leptina te stimulira monocitni kemotaktični protein 1 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), tako da je time pretilost sama po sebi rizični čimbenik za razvoj endotelne funkcije (212). U literaturi se doduše nalazi i istraživanje na animalnom modelu, u kojem je dugotrajnija niskoslana dijeta u trajanju od 16 tjedana, doveo do toga do smanjenja ekspresije MCP-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Ekspresija je ovih citokina bila je manja za više od 50% u masnom tkivu miševa na NS dijeti u odnosu na štakore na VS dijeti (213). Stoga, postoji mogućnost da bi duže trajanje dijete ipak dodatno poboljšalo endotelnu funkciju i kod osoba s višim BMI te da se u rezultatima ove studije radi o tranzicijskim zbivanjima, budući da se u ovoj studiji istraživao učinak niskoslane dijete koja je provođena samo 2 tjedna.

Nadalje, prediktivni čimbenik za bolji oporavak AChID bio je i ženski spol. U početku su istraživanja endotelne funkcije provođena samo na muškarcima, kako bi se mogli proučiti patofiziološki obrasci bez utjecaja oscilirajućeg hormonskog statusa u žena na krvožilni sustav. Poznato je kako u općoj populaciji postoje razlike u incidenciji, prevalenciji i ishodu kardiovaskularnih bolesti između muškaraca i žena (214).

Nadalje, postojala je negativna korelacija između bazne razine urata u serumu i promjene AchID prije i nakon niskoslane dijete kod bolesnika sa psorijazom ( $R = -0,61$ ;  $p = 0,0031$ ). Inače, čini se da postoji veza između povišene razine urata i psorijaze u zapadnoj Europi (215). Smatra se kako je uzrok tomu vjerojatno brza izmjena stanica i dugotrajna upala prisutna u psorijazi (216). Važno je naglasiti da se visoka razina urata smatra nezavisnim biomarkerom za endotelnu disfunkciju u ljudi (217). U metaanalizi iz 2018. godine je pronađeno i kako terapija allopurinolom dovodi do poboljšanja endotelne funkcije (218). Budući da su u ovom istraživanju psorijatičari s početnom višljom razonm urata imali manje promjene AChID nakon niskoslane dijete, moguće je kako sol kod psorijatičara nije involvirana u mehanizam endotelne disfunkcije uzrokovane hiperuricemijom.

## 6.6 Učinak niskoslane dijete na koncentraciju citokina u serumu i supernatantu

Yi i sur. su 2015. godine objavili istraživanje utjecaja soli u prehrani koje je provedeno 6 zdravih astronauta tijekom 205 dana simulacije svemirske misije. Ispitanici su tako provodili vrlo kontroliranu dijetu s dnevnim dozama od 12 g, 9 g i 6 g soli te ponovnog izlaganja 12 g soli na kraju istraživanja, pri čemu se dijeta sa svakom razinom soli u prehrani provodila kroz 50-ak dana. Nakon kontrolirane niskoslane dijete u toj je studiji uočeno smanjenje produkcije proinflamatornih citokina IL-6, IL-23, IL-17, dok je razina IL-10 bila povećana. Zanimljivo je za napomenuti da se u tom istraživanju nije smanjila frekvencija Th17 stanica, kao glavnog izvora IL-17, ali se smanjila koncentracija IL-17 u plazmi nakon kontrolirane NS dijete (174). U istraživanju na mladim zdravim ispitanicima provedenom u Laboratoriju za kliničku i laboratorijsku imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli (~ 14,7 g soli/dan) dovela je do značajnog povećanja serumske koncentracije proučalnih citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-9 i IL-17A, ali i protuupalnih citokina IL-10 i TGF- $\beta$ 1 u odnosu na razinu izmjerenu nakon dijete s niskim udjelom soli (3,75 g soli) koja joj je prethodila (153). Nasuprot tomu, u dvostruko-slijepom placebo-kontroliranom istraživanju Niiranena i sur. u Finskoj koje je provedeno na 106 ispitanika, u kojem su ispitanici randomizirani na habitualnu i zdravu nordijsku dijetu te potom dodatno na dijetu s uobičajenim udjelom soli (10 mg dnevno) i dijetu sa smanjenim udjelom soli (5 mg dnevno), s *crossoverom* udjela soli u dijeti nakon 12 tjedana. U toj studiji je pokazano kako nije došlo do značajne promjene u frekvenciji Th1, Th2 ili Th17 stanica ovisno o udjelu soli u prehrani. Također, nije došlo ni do promjene u koncentraciji u 45 različitih citokina, kemokina i faktora rasta u tri različite vremenske točke pomoću multipleks analiza. Tako su istraživači zaključili kako klinički relevantne promjene u udjelu soli u prehrani nemaju utjecaja na imunološki odgovor (219).

U ovom istraživanju je pronađena statistički značajna razlika između koncentracije IL-23 u serumu prije i nakon provođenja niskoslane dijete (IL-23, RD 57,95 [52,94 – 73,01] vs. NSD 54,61 [51,26 – 58,79], Wilcoxon test sume rangova,  $p = 0,037$ ). Drugim riječima, NS dijeta kod osoba oboljelih od psorijaze dovodi do smanjenja serumske koncentracije ovog patogenetski važnog citokina, koji se u kontekstu psorijaze često naziva glavnim regulatorom (engl. *master regulator*) (220). Ovo su svakako vrijedni podatci, osobito uvezvi u obzir izvrsnu kliničku učinkovitost inhibitora IL-23 ustekinumaba, guselkumaba, tildrakizumaba i risankizumaba, koji su posljednjih godina zauzeli važno mjesto u liječenju bolesnika s psorijazom, osobito onih s teškom kliničkom slikom (221). Podatci ovog istraživanja Osim toga, nije bilo razlike u drugim mjenjenim citokinima, kemokinima i faktorima rasta pod utjecajem niskoslane dijete.

## 6.7 Učinak niskoslane dijete na frekvencije Th17 i Treg stanica kod osoba koje boluju od psorijaze

U istraživanju niskoslane dijete na ispitanicima s reumatoidnim artritisom (RA) i sistemskim lupus eritematozusom (SLE) proučavao se utjecaj udjela soli u prehrani na frekvenciju Th17 i Treg stanica. Dijeta je provođena tako što je su ispitanici prvo provodili niskoslanu dijetu tijekom 3 tjedna, potom dijetu s normalnim unosom soli (definirana kao niskoslana dijeta kojoj je dodano 5 grama natrija dnevno). U tome je istraživanju došlo do smanjenja frekvencije Th17 stanica (koje su bile definirane kao populacija CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> stanica) te povećanja frekvencije Treg stanica nakon niskoslane dijete (222). Neke studije o prehrambenom utjecaju soli na imunološki sustav zdravih ispitanika također su imale konceptualno slične rezultate. Tako je primjerice u istraživanju Lou i sur. došlo do pomaka omjera Th17/Treg stanica prema Th17 stanicama nakon sedmodnevne visokoslane dijete i do pomaka prema Treg stanicama nakon sedmodnevne niskoslane dijete (223).

U nedavnom istraživanju učinka soli u Laboratoriju za kliničku i molekularnu imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek također se proučavao učinak soli u prehrani na frekvenciju Th17 i Treg stanica. Nije bilo značajne promjene Th17 i Treg stanica nakon 7-dnevne visokoslane dijete u odnosu na niskoslanu dijetu na mladim zdravim ispitanicima. U istoj je studiji međutim pronađena umjerena pozitivna korelacija između IL-23 koncentracije u serumu i frekvencije Th17 stanica, što podupire tezu o IL-23/Th17 putu aktivacije Th17 stanica (153). U ovom istraživanju nije bilo korelacije između Th17 stanica i IL-23 citokina u serumu.

## 6.8 Učinak niskoslane dijete na SGK1 kinazu i njezinu ulogu u transdiferencijaciji

Trenutni dokazi upućuju na to kako je povećani Th17 odgovor u uvjetima s visokim postotkom soli posredovan je aktivacijom p-38 te indukcijom nuklearnog faktora aktiviranih T stanica 5 (engl. *nuclear factor of activated T cells 5*, NFAT5) i serumske glukokortikoidne kinaze-1 (SGK1) (120,224). SGK1 djeluje kao senzor ekstracelularnog gradijenta Na<sup>+</sup> i kao transkripcijski faktor osjetljiv na sol (225) te promovira ekspresiju IL-23R. IL-23/IL-23R interakcija je ključna za diferencijaciju Th17 stanica (226). Istodobno, dokazi sugeriraju da SGK1 također igra ključnu ulogu u inhibiciji Treg stanica koja je posredovana IL-23R, pa se može reći kako SGK1 recipročno regulira razvoj Th17 i Treg stanice. Tako nedostatak SGK1 dovodi do zaštite od autoimunosti te povećava autotoleranciju tako što se promiče razvoj Treg stanica i poboljšava njihovu supresijsku funkciju te smanjuje frekvenciju Th17 stanica (227). U prethodnom istraživanju provedenom u Laboratoriju za kliničku i laboratorijsku imunologiju pronađena je značajna razlika u relativnoj koncentraciji ukupne SGK1 nakon 7-dnevne

visokoslane dijete u odnosu na niskoslanu dijetu. Premda je na grupnoj razini srednji izražaj SGK1 bio podjednak na obje dijete te je kod većine ispitanika izražaj SGK1 bio relativno stabilan, u ovom istraživanju je viši omjer izražaja SGK1 bio prisutan u ispitanika s višim bazalnim unosom soli, višim rezidualnim unosom soli na NS dijeti i višom kaliurijom. Isto tako, niži je omjer SGK1 uočen u ispitanika s niskom početnom i postintervencijskom dnevnom natriurezom. Među tim je ispitanicima, najniži omjer izražaja SGK1 uočen u ispitanika s najvišim vrijednostima serumskog TNF- $\alpha$  na NS dijeti ( $\rho = -0,78$ ,  $p = 0,00007$ ,  $n = 16$ ).

Nedavno objavljeni rezultati jednog *in vitro* istraživanja naglasila su moguću povezanost između TNF- $\alpha$  i SGK1. Naime, u tom je istraživanju nakon inhibicije SGK1 došlo do pojačanog lučenja TNF- $\alpha$  iz humanih monocita stimuliranih s *P. gingivalis* (228). Pretragom literature u bazama podataka nisam pronašla do sada objavljenih podataka sa sličnim podatcima iz humanih istraživanja, tako da ovo istraživanje nudi prve takve podatke.

Uzeto u cjelini, takvi rezultati upućuju na dvojaki zaključak: SGK1 odgovor potrebno je razmatrati kako u kontekstu duljine trajanja dijete, tako i u kontekstu restriktivnosti unosa soli, odnosno doze (strogosti dijete) i učinka.

Unatoč kompromisu u statističkoj snazi, analiza podataka u užoj jezgri NS skupine potvrđuje i proširuje ova zapažanja (12 ispitanika kod kojih je natriurija niža od najniže vrijednosti na regularnoj dijeti ( $Na/dU_{min} \sim 97$ )), tako što je u toj podskupini apsolutni isražaj SGK1 nakon 2-tjedne NS dijetе bio razmjeran ostatnoj natriurezi i dijetalnom unosu NaCl-a ( $R = -0,76$ ,  $p = 0,028$ ).

U ovom je istraživanju na regularnoj dijeti razina SGK1 bila viša u osoba s nižom frekvencijom Treg stanica ( $CD25^+FOXP3^{high}$ ). Među ostalim poveznicama, izražaj SGK1 na NS dijeti snažno zrcali porast udjela Treg ( $CD25^+FOXP3^{high}$ ) stanica. Oprez je, naravno, nužan u tumačenju NS asocijacije, jer sustav nakon 14-dnevne dijetе moguće još nije postigao novo ravnotežno stanje u svim frakcijama, odražavajući tranzicijska zbivanja.

Čini se da je za ove klase stanica promjena unosa soli, prije nego promjena ukupne količine SGK1, vodeća odrednica kratkoročnog remodeliranja frekvencija staničnih populacija, barem u prvim danima dijetalne restrikcije. Među ostalim poveznicama, izražaj SGK1 na LS dijeti snažno zrcali porast udjela  $CD25^+FOXP3^{+/high}$  stanica, uz recipročni pad udjela  $CD25^+FOXP3^{-/low}$  stanica.

Osim navedenih uloga u imunološkom sustavu, SGK1 regulira transport natrijevih iona u bubrezima te je povišena SGK1 jedan od čimbenika rizika za razvoj oštećenja bubrega (229) i sudjeluje u nastanku srčanog remodeliranja i fibroze i doprinosi razvoju srčanog zatajenja i aritmija (230–232). U uvjetima na regularnoj dijeti, ukupna količina SGK1 u staničnim lizatima ispitanika sa psorijazom bila je veća u osoba s lošijom bubrežnom funkcijom. Nadalje, važno

je napomenuti da je u ovom istraživanju pronađena povezanost između Framinghamskog zbroja s procjenom 10-godišnjeg rizika za AIM i kardiovaskularnu smrt ( $R = 0,79$ ,  $p = 0,037$ ) iako nema poveznice SGK1 i ulaznih komponenti iz kojih se FRS računa. Ovi podatci ističu kako je i u ovom istraživanju pronađena poveznica između SGK1 i bolesti bubrega i srca.

## 7. ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje nudi kliničke, funkcionalne i laboratorijske dokaze o povoljnem utjecaju niskog unosa soli prehranom na zdravlje osoba koje boluju od psorijaze.

Glavni su zaključci ovog istraživanja:

- Dvotjedna NS dijeta dovela je do poboljšanja kliničke slike psorijaze mjerene PASI zbrojem. Kao prediktivni čimbenici za veće smanjenje PASI zbroja bili su ženski spol i viša životna dob.
- Dvotjedna NS dijeta dovela je do smanjenja sistoličkog i srednjeg arterijskog tlaka kod osoba koje boluju od psorijaze.
- Dvotjedna NS dijeta dovela do poboljšanja o endotelu ovisne vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože u osoba koje boluju od psorijaze, neovisno o promjeni arterijskog tlaka, a vjerojatno pod utjecajem čimbenika iz endotela, koji nisu NO.
- Dvotjedna NS dijeta dovela je do smanjenja relativne frekvencije Th17 stanica u osoba koje boluju od psorijaze. Nije došlo do značajnog smanjenja Treg stanica. Također, nije se značajno promijenio omjer Th17 i Treg stanica.
- Dvotjedna NS dijeta dovela je do smanjenja koncentracije IL-23 u serumu osoba koje boluju od psorijaze, što podupire važnost utjecaja prehrambenog unosa soli na IL-23/Th17 osovinu.
- Izdrazaj SGK1 bio je relativno stabilan prije i poslije dijetе, što implicira da on nije sudjelovao u promjenama razine citokina i zastupljenosti Th17 stanica u ovoj studiji.

Ovo istraživanje otvara nove vidike u liječenju psorijaze te potencijalno drugih Th17 posredovanih autoimunih bolesti.

Čini se da je takva prehrambena intervencija kod ljudi izvediva, a ovaj pristup predstavlja vrlo atraktivan koncept za komplementarno liječenje osoba koje boluju od psorijaze uz standardnu medicinsku skrb.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti učinak dvotjedne dijete s niskim unosom soli (NS dijete) na ravnotežu Th17 i Treg limfocita te ulogu SGK1 kinaze u njihovoj (trans)diferencijaciji kod oboljelih od vulgarne psorijaze te utvrditi dolazi li do oporavka vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože nakon NS dijete.

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao prospektivna kohortna studija u kojoj su svi ispitanici podvrgnuti istoj intervenciji (NS dijeti) te su bili sami sebi kontrole.

**Ispitanici i metode:** Sudjelovalo je 28 ispitanika koji boluju od kronične plak psorijaze s PASI  $\geq 5$ . Ispitanici su provodili dijetu s niskim unosom soli (NS, ~3,5 g soli/dan). Prije i poslije provođenja NS dijete mjerili su se: a) težina psorijaze s PASI i DLQI; b) frekvencija Th17 i Treg stanica u krvi protočnom citometrijom; c) procjena protoka u mikrocirkulaciji kože u odgovoru na iontoporezu acetilkolinom (ACh) (endotel-ovisna vazodilatacija) i natrijevim nitroprusidom (SNP) (endotel-neovisna vazodilatacija), te na lokalnu hipertermiju (vazodilatacija ovisna o NO) pomoću Laser Doppler floumetrije (LDF); d) biokemijski i upalni parametara iz krvi i 24-satnog urina; e) serumski proinflamatorni i protuupalni citokini pomoću ELISA i Luminex metode; f) SGK1 u staničnim lizatima iz kulture PBMC stanica ELISA metodom. Analizirani su podatci 21 ispitanika koji su se adekvatno pridržavali NS dijete (smanjenje 24-h ekskrecije Na).

**Rezultati:** NS dijeta dovela je do značajnog poboljšanja kliničke slike određene PASI zbrojem, što je bilo izraženije kod osoba ženskoga spola i starijih ispitanika. Vaskularna reaktivnost ovisna o endotelu, procijenjene ACh induciranim dilatacijom (AChID), povećala se za 16 %, neovisno o promjenama krvnog tlaka. Trajanje psorijaze negativno je koreliralo s promjenom AChID i promjenom LTH nakon NS dijete, što sugerira da kumulativno trajanje upale niskog stupnja smanjuje reverzibilnost endotelne funkcije tijekom protokola za prehrambenu redukciju soli. Smanjila se frekvencija Th17 stanica u psorijatičara nakon NS dijete te se smanjila i koncentracija IL-23 u serumu. Razina izražaja SGK1 bila je relativno stabilna prije i poslije NS dijete.

**Zaključak:** Ovo istraživanje pruža dokaze o dodatnoj dobrobiti ranog uvođenja NS prehrane u protokole liječenja bolesnika s umjerenom do teškom psorijazom.

**Registracija studije:** Clinical Trials ID NCT05892640.

**Ključne riječi:** psorijaza; dijeta s niskim unosom soli; Th17 stanice; regulacijski T limfociti, citokini.

## 9. SUMMARY

### **“Effects of Low Salt Dietary Intake on Th17-Mediated Inflammation and Vascular Reactivity of Skin Microcirculation in Patients with Psoriasis”**

**Objectives:** To determine the effect of a two-week diet with low salt intake (LS diet) on the balance of Th17 and Treg lymphocytes and the role of SGK1 kinase in their (trans)differentiation in participants suffering from psoriasis vulgaris, and to examine whether a recovery of vascular reactivity occurs after the LS diet.

**Study design:** The study was designed as a prospective self-controlled cohort study in which all subjects underwent the same intervention (low salt diet).

**Participants and methods:** 28 participants suffering from chronic plaque psoriasis (with PASI score  $\geq$  5) were enrolled in the study. The subjects followed a diet with a low salt intake (LS, ~3.5 g salt/day). Before and after the implementation of the LS diet, the following measurements were made: a) clinical psoriasis severity with PASI and DLQI; b) Th17 and Treg frequencies in blood by flow cytometry; c) flow assessment in skin microcirculation in response to iontophoresis with acetylcholine (ACh) (endothelium-dependent vasodilation), sodium nitroprusside (SNP) (endothelium-independent vasodilation), and to local hyperthermia (NO-dependent vasodilation) using Laser Doppler Flowmetry (LDF); d) biochemical and inflammatory parameters in serum and 24-hour urine samples; e) serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines with ELISA and Luminex assay; f) SGK1 in cell lysates from PBMC cell culture with ELISA. Adherence to the LS diet was tested by sodium excretion in 24-hour urine samples, and data of 21 subjects who adequately adhered to the LS diet were analysed.

**Results:** The LS diet significantly reduced PASI values, which was more pronounced in women and subjects of older age. Endothelium-dependent vascular reactivity assessed through AchID was increased by 16%, independently of blood pressure changes. Psoriasis duration correlated negatively with the change in AchID and the change in LTH after the LS diet, suggesting that the cumulative duration of low-grade inflammation reduces the reversibility of endothelial function during salt-reducing protocols. The frequency of Th17 cells in psoriatic patients decreased after the LS diet, as did IL-23 serum concentrations. The level of SGK1 was relatively stable before and after the NS diet.

**Conclusion:** This study provides evidence for the added benefit of early introduction of the LS diet in the treatment protocols of patients with moderate to severe psoriasis.

**Trial registration:** Clinical Trials ID NCT05892640.

**Keywords:** Psoriasis; low salt diet; Th17 cells; regulatory T lymphocytes, cytokines.

## 10. LITERATURA

1. Van De Kerkhof PCM, Nestle FO. Psoriasis. In: Dermatology. 4th edition. London: Elsevier; 2018. str. 138–60.
2. Hu P, Wang M, Gao H, Zheng A, Li J, Mu D, i sur. The Role of Helper T Cells in Psoriasis. *Front Immunol.* 2021;12:788940.
3. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet Lond Engl.* 2015;386:983–94.
4. Yamazaki F. Psoriasis: Comorbidities. *J Dermatol.* 2021;48:732–40.
5. Damiani G, Bragazzi NL, Karimkhani Aksut C, Wu D, Alicandro G, McGonagle D, i sur. The Global, Regional, and National Burden of Psoriasis: Results and Insights From the Global Burden of Disease 2019 Study. *Front Med.* 2021;8:743180.
6. Salomon JA, Wang H, Freeman MK, Vos T, Flaxman AD, Lopez AD, i sur. Healthy life expectancy for 187 countries, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden Disease Study 2010. *The Lancet.* 2012;380:2144–62.
7. Barisić-Drusko V, Paljan D, Kansky A, Vujsinović S. Prevalence of psoriasis in Croatia. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1989;146:178–9.
8. Barišić-Druško V, Ručević I. Psoriasis vulgaris u istočnoj Hrvatskoj - epidemiologija i “trigger” čimbenici. *Med Vjesn.* 1999;31:131–7.
9. Merola JF, Qureshi A, Husni ME. Underdiagnosed and undertreated psoriasis: Nuances of treating psoriasis affecting the scalp, face, intertriginous areas, genitals, hands, feet, and nails. *Dermatol Ther.* 2018;31:e12589.
10. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009;361:496–509.
11. Dand N, Mahil S, Capon F, Smith C, Simpson M, Barker J. Psoriasis and Genetics. *Acta Derm Venereol.* 2020;100:55–65.
12. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):E1475.
13. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA.* 2020;323(19):1945.

14. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. Lancet Lond Engl. 2021;397:1301–15.
15. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. J Immunol Baltim Md 1950. 2018 Sep 15;201:1605–13.
16. Liang Y, Sarkar MK, Tsoi LC, Gudjonsson JE. Psoriasis: A mixed autoimmune and autoinflammatory disease. Curr Opin Immunol. 2017;49:1–8.
17. Murthy AS, Leslie K. Autoinflammatory Skin Disease: A Review of Concepts and Applications to General Dermatology. Dermatol Basel Switz. 2016;232:534–40.
18. Fanoni D, Venegoni L, Vergani B, Tavecchio S, Cattaneo A, Leone BE, i sur. Evidence for a role of autoinflammation in early-phase psoriasis. Clin Exp Immunol. 2019;198:283–91.
19. Li B, Huang L, Lv P, Li X, Liu G, Chen Y, i sur. The role of Th17 cells in psoriasis. Immunol Res. 2020;68:296–309.
20. Furue K, Ito T, Tsuji G, Kadono T, Nakahara T, Furue M. Autoimmunity and autoimmune co-morbidities in psoriasis. Immunology. 2018;154:21–7.
21. Ma JY, Shao S, Wang G. Antimicrobial peptides: bridging innate and adaptive immunity in the pathogenesis of psoriasis. Chin Med J (Engl). 2020;133:2966–75.
22. Takahashi T, Yamasaki K. Psoriasis and Antimicrobial Peptides. Int J Mol Sci. 2020;21(18):E6791.
23. Polese B, Zhang H, Thurairajah B, King IL. Innate Lymphocytes in Psoriasis. Front Immunol. 2020;11:242.
24. Sato Y, Ogawa E, Okuyama R. Role of Innate Immune Cells in Psoriasis. Int J Mol Sci. 2020;21:E6604.
25. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Othlinghaus N, Brockmeyer NH, Altmeyer P, i sur. Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. Int Arch Allergy Immunol. 2008;147:17–24.

26. Lande R, Chamilos G, Ganguly D, Demaria O, Frasca L, Durr S, i sur. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur J Immunol.* 2015;45:203–13.
27. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, i sur. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med.* 2005;202:135–43.
28. Shelley JR, Davidson DJ, Dorin JR. The Dichotomous Responses Driven by  $\beta$ -Defensins. *Front Immunol.* 2020;11:1176.
29. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, i sur. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol.* 2012;132:135–43.
30. Akiyama T, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Nguyen TT, Ushio H, Fujimura T, i sur. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. *J Innate Immun.* 2014;6:739–53.
31. Mori N, Yoshikawa K, Ohno M. Psoriasis occurring in young monozygotic twins. *J Dermatol.* 1980;7:71–3.
32. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NVC, Jenisch S, i sur. Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis Susceptibility 1 Gene. *Am J Hum Genet.* 2006;78:827–51.
33. Ten Bergen LL, Petrovic A, Aarebrot AK, Appel S. Current knowledge on autoantigens and autoantibodies in psoriasis. *Scand J Immunol.* 2020;92:e12945.
34. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, i sur. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun.* 2014;5:5621.
35. Menssen A, Trommler P, Vollmer S, Schendel D, Albert E, Görtler L, i sur. Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995;155:4078–83.

36. Bour H, Puisieux I, Even J, Kourilsky P, Favrot M, Musette P, i sur. T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response. *Hum Immunol.* 1999;60:665–76.
37. Prinz JC, Vollmer S, Boehncke WH, Menssen A, Laisney I, Trommler P. Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol.* 1999;29:3360–8.
38. Mosca M, Hong J, Hadeler E, Hakimi M, Liao W, Bhutani T. The Role of IL-17 Cytokines in Psoriasis. *ImmunoTargets Ther.* 2021;10:409–18.
39. Liu T, Li S, Ying S, Tang S, Ding Y, Li Y, i sur. The IL-23/IL-17 Pathway in Inflammatory Skin Diseases: From Bench to Bedside. *Front Immunol.* 2020;11. Dostupno na adresi: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.594735>. Datum pristupa: 30. 06. 2024.
40. Feldman SR, Tian H, Gilloteau I, Mollon P, Shu M. Economic burden of comorbidities in psoriasis patients in the United States: Results from a retrospective U.S. database. *BMC Health Serv Res.* 2017;17:337.
41. Aurangabadkar S. Comorbidities in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013;79:10–17.
42. Mehta NN, Azfar RS, Shin DB, Neumann AL, Troxel AB, Gelfand JM. Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. *Eur Heart J.* 2010;31:1000–6.
43. Abuabara K, Azfar RS, Shin DB, Neumann AL, Troxel AB, Gelfand JM. Cause-specific mortality in patients with severe psoriasis: a population-based cohort study in the U.K. *Br J Dermatol.* 2010;163:586–92.
44. Masson W, Rossi E, Galimberti ML, Krauss J, Navarro Estrada J, Galimberti R, i sur. Mortality in patients with psoriasis. A retrospective cohort study. *Med Clin (Barc).* 2017;148:483–8.
45. Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X, i sur. The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol.* 2007;143:1493–9.

46. Bosco E, Hsueh L, McConeghy KW, Gravenstein S, Saade E. Major adverse cardiovascular event definitions used in observational analysis of administrative databases: a systematic review. *BMC Med Res Methodol.* 2021;21:241.
47. Langan SM, Seminara NM, Shin DB, Troxel AB, Kimmel SE, Mehta NN, i sur. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a population-based study in the United Kingdom. *J Invest Dermatol.* 2012;132:556–62.
48. Takeshita J, Wang S, Shin DB, Mehta NN, Kimmel SE, Margolis DJ, i sur. Effect of psoriasis severity on hypertension control a population-based study in the United Kingdom. *JAMA Dermatol.* 2015;151:161-9.
49. Gelfand JM, Neumann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of Myocardial Infarction in Patients With Psoriasis. *JAMA.* 2006;296:1735–41.
50. Gelfand JM, Dommasch ED, Shin DB, Azfar RS, Kurd SK, Wang X, i sur. The risk of stroke in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2411-8.
51. Egeberg A, Skov L, Joshi AA, Mallbris L, Gislason GH, Wu JJ, i sur. The relationship between duration of psoriasis, vascular inflammation, and cardiovascular events. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77:650-656.
52. Herédi E, Végh J, Pogácsás L, Gáspár K, Varga J, Kincse G, i sur. Subclinical cardiovascular disease and it's improvement after long-term TNF- $\alpha$  inhibitor therapy in severe psoriatic patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2016;30:1531–6.
53. Hu SCS, Lan CCE. Psoriasis and cardiovascular comorbidities: Focusing on severe vascular events, cardiovascular risk factors and implications for treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18:2211.
54. Armstrong AW, Harskamp CT, Ledo L, Rogers JH, Armstrong EJ. Coronary Artery Disease in Patients With Psoriasis Referred for Coronary Angiography. *Am J Cardiol.* 2012;109:976–80.
55. Li WQ, Han JL, Manson JE, Rimm EB, Rexrode KM, Curhan GC, i sur. Psoriasis and risk of nonfatal cardiovascular disease in U.S. women: a cohort study: Nonfatal CVD in women with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166:811–8.

56. Kaplan MJ. Cardiometabolic risk in psoriasis: differential effects of biologic agents. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4:1229–35.
57. Azfar RS, Gelfand JM. Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20:416–22.
58. Kremers HM, McEvoy MT, Dann FJ, Gabriel SE. Heart disease in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57:347–54.
59. Jahangiry L, Farhangi MA, Rezaei F. Framingham risk score for estimation of 10-years of cardiovascular diseases risk in patients with metabolic syndrome. *J Health Popul Nutr.* 2017;36:36.
60. Naik HB, Natarajan B, Stansky E, Ahlman MA, Teague H, Salahuddin T, i sur. Severity of Psoriasis Associates With Aortic Vascular Inflammation Detected by FDG PET/CT and Neutrophil Activation in a Prospective Observational Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2667–76.
61. Mehta NN, Yu Y, Saboury B, Foroughi N, Krishnamoorthy P, Raper A, i sur. Systemic and vascular inflammation in patients with moderate to severe psoriasis as measured by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography (FDG-PET/CT): a pilot study. *Arch Dermatol.* 2011;147:1031–9.
62. Mehta NN, Torigian DA, Gelfand JM, Saboury B, Alavi A. Quantification of atherosclerotic plaque activity and vascular inflammation using [18-F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (FDG-PET/CT). *J Vis Exp JoVE.* 2012;(63):e3777.
63. Amin M, Lee EB, Tsai TF, Wu JJ. Psoriasis and Co-morbidity. *Acta Derm Venereol.* 2020 Jan 30;100:adv00033.
64. Szepietowski JC, Pietrzak A, Michalak-Stoma A, Chodorowska G. Lipid disturbances in psoriasis: An update. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:535612.
65. Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4411.
66. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res.* 1980;47:301–11.

67. Feletou M. Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci.* 2008;13:4198.
68. Féletalou M. Endothelium-Dependent Regulation of Vascular Tone. In: The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael, CA, SAD: Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK571147>. Datum pristupa: 30. 06. 2024.
69. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788–91.
70. Ewenstein MG. Vascular biology of von Willebrand factor. In: Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer; 1997. str. 107–22.
71. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002;105(5):546–9.
72. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168–75.
73. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardeña G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Acad Sci.* 2000;902:230–9; 239–40.
74. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation.* 1992;86:III12–19.
75. Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO, Knoke JD, Ridker PM, Froncik A. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation.* 2006;113:2623–9.
76. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868–74.
77. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1976;295:369–77.

78. Poredos P, Poredos AV, Gregoric I. Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*. 2021;72:604–15.
79. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. 2003;42(7).
80. Arida A, Protoporou AD, Kitas GD, Sfikakis PP. Systemic inflammatory response and atherosclerosis: The paradigm of chronic inflammatory rheumatic diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1–27.
81. Liao JK. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. 2013;123(2).
82. Holowatz LA, Kenney WL. Acute localized administration of tetrahydrobiopterin and chronic systemic atorvastatin treatment restore cutaneous microvascular function in hypercholesterolaemic humans. *J Physiol.* 2011;589:4787–97.
83. Bacon PA. Endothelial cell dysfunction in systemic vasculitis: new developments and therapeutic prospects. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(1):49–55.
84. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The effects of arterial blood pressure reduction on endocan and soluble endothelial cell adhesion molecules (CAMs) and CAMs ligands expression in hypertensive patients on Ca-channel blocker therapy. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37:103–15.
85. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998;351:88–92.
86. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:631–8.
87. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med.* 1986 Feb 20;314:488–500.
88. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115–26.
89. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, i sur. Predictive Value of Brachial Flow-Mediated Dilation for Incident Cardiovascular Events in a Population-

- Based Study: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(6):502–9.
90. De Simone C, Di Giorgio A, Sisto T, Carbone A, Ghitti F, Tondi P, i sur. Endothelial dysfunction in psoriasis patients: Cross-sectional case-control study. *Eur J Dermatol*. 2011;21(4):510–4.
  91. Ulusoy RE, Karabudak O, Yokusoglu M, Kilicaslan F, Kirilmaz A, Cebeci BS. Noninvasive assessment of impaired endothelial function in psoriasis. *Rheumatol Int*. 2010;30:479–83.
  92. Usta M, Yurdakul S, Aral H, Turan E, Oner E, Bercik B, i sur. Vascular endothelial function assessed by a noninvasive ultrasound method and serum asymmetric dimethylarginine concentrations in mild-to-moderate plaque-type psoriatic patients. *Clin Biochem*. 2011;44:1080–4.
  93. Karadag AS, Yavuz B, Ertugrul DT, Akin KO, Yalcin AA, Deveci OS, i sur. Is psoriasis a pre-atherosclerotic disease? Increased insulin resistance and impaired endothelial function in patients with psoriasis: Psoriasis and atherosclerosis. *Int J Dermatol*. 2010;49:642–6.
  94. Martyn-Simmons CL, Ranawaka RR, Chowienczyk P, Crook MA, Marber MS, Smith CH, i sur. A prospective case-controlled cohort study of endothelial function in patients with moderate to severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2011;164:26–32.
  95. Yiu KH, Yeung CK, Chan HT, Wong RMY, Tam S, Lam KF, i sur. Increased arterial stiffness in patients with psoriasis is associated with active systemic inflammation: Arterial stiffness in psoriasis patients. *Br J Dermatol*. 2011;164:514-20.
  96. Balci DD, Balci A, Karazincir S, Ucar E, Iyigun U, Yalcin F, i sur. Increased carotid artery intima-media thickness and impaired endothelial function in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:1–6.
  97. Jensen P, Zachariae C, Hansen P, Skov L. Normal Endothelial Function in Patients with Mild-to-Moderate Psoriasis: A Case-control Study. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:516–20.
  98. Cracowski J, Roustit M. Human Skin Microcirculation. U: Terjung R, urednik. Comprehensive Physiology. Wiley; 2020. str. 1105–54. Dostupno na stranici:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c190008>. Datum pristupa:  
30. 06. 2024.

99. Alba BK, Greaney JL, Ferguson SB, Alexander LM. Endothelial function is impaired in the cutaneous microcirculation of adults with psoriasis through reductions in nitric oxide-dependent vasodilation. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2018;314:H343–9.
100. Mente A, O'Donnell M, Yusuf S. Sodium Intake and Health: What Should We Recommend Based on the Current Evidence? *Nutrients*. 2021;13:3232.
101. Dart R.C. Medical Toxicology. Treće izdanje. Philadelphia, SAD: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. str. 1057.
102. Das UN. Molecular biochemical aspects of salt (sodium chloride) in inflammation and immune response with reference to hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):83.
103. WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. World Health Organization (WHO); 2012.
104. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Washington, D.C.: National Academies Press; 2005. Dostupno na adresi: <http://www.nap.edu/catalog/10925>. Datum pristupa: 30. 06. 2024.
105. Premuzic V, Erceg I, Jovanović A, Reiner Ž, Jelaković B. Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvat Časopis Za Javno Zdr*. 2010;6(21).
106. Wilck N, Balogh A, Markó L, Bartolomaeus H, Müller DN. The role of sodium in modulating immune cell function. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15:546–58.
107. Haase S, Wilck N, Kleinewietfeld M, Müller DN, Linker RA. Sodium chloride triggers Th17 mediated autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2019;329:9–13.
108. Sharif K, Amital H, Shoenfeld Y. The role of dietary sodium in autoimmune diseases: The salty truth. *Autoimmun Rev*. 2018;17:1069–73.
109. Balan Y, Packirisamy RM, P S M. High dietary salt intake activates inflammatory cascades via Th17 immune cells: impact on health and diseases. *Arch Med Sci*. 2020;18:459-465.

110. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74:5–17.
111. Rainard P, Cunha P, Martins RP, Gilbert FB, Germon P, Foucras G. Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. *Vet Res*. 2020;51:129.
112. Kamata M, Tada Y. Efficacy and Safety of Biologics for Psoriasis and Psoriatic Arthritis and Their Impact on Comorbidities: A Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21:E1690.
113. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2015;6:639.
114. Skrobot A, Demkow U, Wachowska M. Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1108:13–23.
115. Szymczak I, Pawliczak R. The Active Metabolite of Vitamin D3 as a Potential Immunomodulator. *Scand J Immunol*. 2016;83(2):83–91.
116. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(9):712–21.
117. Mehling R, Schwenck J, Lemberg C, Trautwein C, Zizmare L, Kramer D, i sur. Immunomodulatory role of reactive oxygen species and nitrogen species during T cell-driven neutrophil-enriched acute and chronic cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions. *Theranostics*. 2021;11:470–90.
118. Castro CN, Freitag J, Berod L, Lochner M, Sparwasser T. Microbe-associated immunomodulatory metabolites: Influence on T cell fate and function. *Mol Immunol*. 2015;68:575–84.
119. Zielinski CE. Regulation of T cell responses by ionic salt signals. *Cells*. 2021;10:2365.
120. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, i sur. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH 17 cells. *Nature*. 2013;496:518–22.
121. Bell LM, Leong MLL, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, i sur. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and

- glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:25262–72.
122. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF-κB Families. *Immunity.* 2001;15:47–58.
123. Chen S, Grigsby CL, Law CS, Ni X, Nekrep N, Olsen K, i sur. Tonicity-dependent induction of Sgk1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. *J Clin Invest.* 2009;119:1647–58.
124. Lang F, Stournaras C, Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Mol Membr Biol.* 2014;31:29–36.
125. Cabrera-Ortega AA, Feinberg D, Liang Y, Rossa C, Graves DT. The Role of Forkhead Box 1 (FOXO1) in the Immune System: Dendritic Cells, T Cells, B Cells, and Hematopoietic Stem Cells. *Crit Rev Immunol.* 2017;37:1–13.
126. Toney GM, Vallon V, Stockand JD. Intrinsic control of sodium excretion in the distal nephron by inhibitory purinergic regulation of the epithelial Na(+) channel. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21:52–60.
127. Knepper MA, Kwon TH, Nielsen S. Molecular physiology of water balance. *N Engl J Med.* 2015;372:1349–58.
128. Müller DN, Wilck N, Haase S, Kleinewietfeld M, Linker RA. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:243–54.
129. Wang P, Deger MS, Kang H, Ikizler TA, Titze J, Gore JC. Sex differences in sodium deposition in human muscle and skin. *Magn Reson Imaging.* 2017;36:93–7.
130. Titze J, Rakova N, Kopp C, Dahlmann A, Jantsch J, Luft FC. Balancing wobbles in the body sodium. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2016;31:1078–81.
131. Maifeld A, Wild J, Karlsen TV, Rakova N, Wistorf E, Linz P, i sur. Skin Sodium Accumulates in Psoriasis and Reflects Disease Severity. *J Invest Dermatol.* 2021;

132. Matthias J, Maul J, Noster R, Meisl H, Chao YY, Gerstenberg H, i sur. Sodium chloride is an ionic checkpoint for human TH2 cells and shapes the atopic skin microenvironment. *Sci Transl Med.* 2019;11:eaau0683.
133. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, i sur. Cutaneous Na<sup>+</sup> storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* 2015;21:493–501.
134. Fischereider M, Michalke B, Schmöckel E, Habicht A, Kunisch R, Pavelic I, i sur. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313:F319–25.
135. Machnik A, Neuhöfer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, i sur. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 2009;15:545–52.
136. Wei Y, Lu C, Chen J, Cui G, Wang L, Yu T, Yang Y, i sur. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget.* 2016;8:70–82.
137. Matthias J, Heink S, Picard F, Zeitrag J, Kolz A, Chao YY, i sur. Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *J Clin Invest.* 2020;130:4587–600.
138. Lou Y, Zhang F, Luo Y, Wang L, Huang S, Jin F. Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2016;17:E1307.
139. Bragulat E, De La Sierra A, Antonio T. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. *2001;37:444-8.*
140. Liu FQ, Mu JJ, Liu ZQ, Shi DC, Huang Q, Yuan ZY, i sur. Endothelial dysfunction in normotensive salt-sensitive subjects. *J Hum Hypertens.* 2012;26:247–52.
141. 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;590:5519–28.
142. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, i sur. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-

- induced microvascular endothelial function impairment in young healthy individuals. *J Clin Med.* 2020;9:843.
143. Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H7–14.
144. Boegehold MA. Effect of dietary salt on arteriolar nitric oxide in striated muscle of normotensive rats. *Am J Physiol.* 1993;264:H1810-1816.
145. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: Implications of isoprostane-mediated thromboxane A<sub>2</sub> receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2014;171:3115–31.
146. Wild J, Soehnlein O, Dietel B, Urschel K, Garlichs CD, Cicha I. Rubbing salt into wounded endothelium: Sodium potentiates proatherogenic effects of TNF- $\alpha$  under non-uniform shear stress. *Thromb Haemost.* 2014;112:183–95.
147. Ochi H, Masuda J, Gimbrone MA. Hyperosmotic stimuli inhibit VCAM-1 expression in cultured endothelial cells via effects on interferon regulatory factor-1 expression and activity. *Eur J Immunol.* 2002;32:1821–31.
148. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Petnak T, Ghamrawi R, Thirunavukkarasu S, Chewcharat A, i sur. The prognostic importance of serum sodium levels at hospital discharge and one-year mortality among hospitalized patients. *Int J Clin Pract.* 2020;74:e13581.
149. Szabó G, Magyar Z. Electrolyte concentrations in subcutaneous tissue fluid and lymph. *Lymphology.* 1982;15:174–7.
150. Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, i sur. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest.* 2013;123:2803–15.
151. Suckling RJ, He FJ, Markandu ND, MacGregor GA. Dietary salt influences postprandial plasma sodium concentration and systolic blood pressure. *Kidney Int.* 2012;81:407–11.

152. Mauro TM. Ode to Salt: Commentary on “Skin Sodium Accumulates in Psoriasis and Reflects Disease Severity.” *J Invest Dermatol.* 2022;142:16-17.
153. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, Mihaljević Z, Šušnjara P, Jukić I, i sur. Role of Oxidative Stress in Vascular Low-Grade Inflammation Initiation Due to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals. *Antioxidants.* 2022;11(3):444.
154. Jablonski KL, Racine ML, Geolfos CJ, Gates PE, Chonchol M, McQueen MB, i sur. Dietary Sodium Restriction Reverses Vascular Endothelial Dysfunction in Middle-Aged/Older Adults With Moderately Elevated Systolic Blood Pressure. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:335–43.
155. Dickinson KM, Keogh JB, Clifton PM. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:485–90.
156. Brezinski EA, Follansbee MR, Armstrong EJ, Armstrong AW. Endothelial dysfunction and the effects of TNF inhibitors on the endothelium in psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review. *Curr Pharm Des.* 2014;20:513–28.
157. Boehncke WH. Systemic inflammation and cardiovascular comorbidity in psoriasis patients: Causes and consequences. *Front Immunol.* 2018;9:579.
158. Kyriakou A, Patsatsi A, Vyzantiadis TA, Sotiriadis D. Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40, and IL-17 in plaque psoriasis and their correlation with disease severity. *J Immunol Res.* 2014;2014:467541.
159. Nast A, Smith C, Spuls PI, Avila Valle G, Bata-Csörgö Z, Boonen H, i sur. EuroGuiDerm Guideline on the systemic treatment of Psoriasis vulgaris – Part 1: treatment and monitoring recommendations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34:2461–98.
160. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1304:53–61.
161. Knezović A. Učinak 7-dnevne dijete s velikim udjelom kuhinjske soli na upalni odgovor i aktivaciju endotela u zdravih mlađih pojedinaca. Disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2022. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:021555>. Datum pristupa: 30. 06. 2024.

162. Liu Q, Li C, Wanga V, Shepherd BE. Covariate-adjusted Spearman's Rank Correlation with Probability-scale Residuals. *Biometrics*. 2018;74:595–605.
163. Liu Q, Shepherd B, Li C. PResiduals : An R Package for Residual Analysis Using Probability-Scale Residuals. *J Stat Softw*. 2020;94. Dostupno na adresi: <http://www.jstatsoft.org/v94/i12/>. Datum pristupa: 30. 06. 2024.
164. Štrumbelj E, Koronenko I. An Efficient Explanation of Individual Classifications using Game Theory. *J Mach Learn Res*. 2010;11:1–18.
165. Zhou G, Gan L, Zhao B, Fang F, Liu H, Chen X, i sur. Adding salt to foods and risk of psoriasis: A prospective cohort study. *J Autoimmun*. 2024;147:103259.
166. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, i sur. Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet. *N Engl J Med*. 2001;344(1):3–10.
167. Chan A, Kinsman L, Elmer S, Khanam M. Adherence barriers to a low-salt diet in culturally diverse heart failure adults. *Aust J Adv Nurs*. 2018;36:37–47.
168. Chung ML, Moser DK, Lennie TA, Worrall-Carter L, Bentley B, Trupp R, i sur. Gender Differences in Adherence to the Sodium-Restricted Diet in Patients With Heart Failure. *J Card Fail*. 2006;12:628–34.
169. Larsen SC, Ängquist L, Sørensen TIA, Heitmann BL. 24h Urinary Sodium Excretion and Subsequent Change in Weight, Waist Circumference and Body Composition. Tomé D, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e69689.
170. Song HJ, Cho YG, Lee HJ. Dietary sodium intake and prevalence of overweight in adults. *Metabolism*. 2013;62:703–8.
171. Hulthén L, Aurell M, Klingberg S, Hallenberg E, Lorentzon M, Ohlsson C. Salt intake in young Swedish men. *Public Health Nutr*. 2010;13:601–5.
172. Ma Y, He FJ, MacGregor GA. High Salt Intake: Independent Risk Factor for Obesity? Hypertension. 2015;66:843–9.

173. Kang HJ, Jun DW, Lee SM, Jang EC, Cho YK. Low salt and low calorie diet does not reduce more body fat than same calorie diet: a randomized controlled study. *Oncotarget*. 2018;9:8521–30.
174. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res*. 2015;166:103–10.
175. Humalda JK, Navis G. Dietary sodium restriction: a neglected therapeutic opportunity in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:533–40.
176. Campbell KL, Johnson DW, Bauer JD, Hawley CM, Isbel NM, Stowasser M, i sur. A randomized trial of sodium-restriction on kidney function, fluid volume and adipokines in CKD patients. *BMC Nephrol*. 2014;15:57.
177. He FJ, Marciniak M, Visagie E, Markandu ND, Anand V, Dalton RN, i sur. Effect of Modest Salt Reduction on Blood Pressure, Urinary Albumin, and Pulse Wave Velocity in White, Black, and Asian Mild Hypertensives. *Hypertension*. 2009;54:482–8.
178. Carbone L, Johnson KC, Huang Y, Pettinger M, Thomas F, Cauley J, i sur. Sodium Intake and Osteoporosis. Findings From the Women’s Health Initiative. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:1414–21.
179. Tolj I, Stupin A, Drenjančević I, Šušnjara P, Perić L, Stupin M. The Role of Nitric Oxide in the Micro- and Macrovascular Response to a 7-Day High-Salt Diet in Healthy Individuals. *Int J Mol Sci*. 2023;24:7157.
180. Chaudhari S, Rathi S. Correlation of serum calcium levels with severity of psoriasis. *Int J Res Dermatol*. 2018;4:591.
181. Shi H, Su X, Li C, Guo W, Wang L. Effect of a low-salt diet on chronic kidney disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2022;12:e050843.
182. Drummond MF, Schwartz JS, Jönsson B, Luce BR, Neumann PJ, Siebert U, i sur. Key principles for the improved conduct of health technology assessments for resource allocation decisions. *Int J Technol Assess Health Care*. 2008;24:244–58.

183. Yang J, Hu K, Li X, Hu J, Tan M, Zhang M, i sur. Psoriatic Foot Involvement is the Most Significant Contributor to the Inconsistency Between PASI and DLQI: A Retrospective Study from China. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2023;16:443–51.
184. Augustin M, Krüger K, Radtke MA, Schwippl I, Reich K. Disease Severity, Quality of Life and Health Care in Plaque-Type Psoriasis: A Multicenter Cross-Sectional Study in Germany. *Dermatology.* 2008;216:366–72.
185. Katugampola RP, Lewis VJ, Finlay AY. The Dermatology Life Quality Index: assessing the efficacy of biological therapies for psoriasis. *Br J Dermatol.* 2007;156:945–50.
186. Silva MFPD, Fortes MRP, Miot LDB, Marques SA. Psoriasis: correlation between severity index (PASI) and systemic treatment. *An Bras Dermatol.* 2013;88:760–3.
187. Naldi L, Conti A, Cazzaniga S, Patrizi A, Pazzaglia M, Lanzoni A, i sur. Diet and physical exercise in psoriasis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2014;170:634–42.
188. Fuseini H, Cephus JY, Wu P, Davis JB, Contreras DC, Gandhi VD, i sur. ER $\alpha$  Signaling Increased IL-17A Production in Th17 Cells by Upregulating IL-23R Expression, Mitochondrial Respiration, and Proliferation. *Front Immunol.* 2019;10:2740.
189. Bottino DA, Bouskela E. Non-invasive techniques to access in vivo the skin microcirculation in patients. *Front Med.* 2023;9:1099107.
190. Abularage CJ, Sidawy AN, Aidinian G, Singh N, Weiswasser JM, Arora S. Evaluation of the microcirculation in vascular disease. *J Vasc Surg.* 2005;42:574–81.
191. Holowatz LA, Kenney WL. Local ascorbate administration augments NO- and non-NO-dependent reflex cutaneous vasodilation in hypertensive humans. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1090–6.
192. Lindstedt IH, Edvinsson M, Evinsson L. Reduced responsiveness of cutaneous microcirculation in essential hypertension – A pilot study. *Blood Press.* 2006;15:275–80.
193. Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular Abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship to Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:1203–13.

194. Barić L, Drenjančević I, Matić A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, i sur. Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44:835–47.
195. Ambard L, Beaujard E. Causes de l'hypertension artérielle. *Arch Gen Med.* 1904;1:520–33.
196. Stamler J, Rose G, Stamler R, Elliott P, Dyer A, Marmot M. INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. *Hypertension.* 1989;14:570–7.
197. Beevers DG. The epidemiology of salt and hypertension. *Clin Auton Res.* 2002;12:353–7.
198. Alderman MH, Madhavan S, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Low Urinary Sodium Is Associated With Greater Risk of Myocardial Infarction Among Treated Hypertensive Men. *Hypertension.* 1995;25:1144–52.
199. Filippou CD, Tsiofis CP, Thomopoulos CG, Mihas CC, Dimitriadis KS, Sotiropoulou LI, i sur. Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet and Blood Pressure Reduction in Adults with and without Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Nutr.* 2020;11:1150–60.
200. Krajina I, Stupin A, Šola M, Mihalj M. Oxidative Stress Induced by High Salt Diet—Possible Implications for Development and Clinical Manifestation of Cutaneous Inflammation and Endothelial Dysfunction in Psoriasis vulgaris. *Antioxidants.* 2022;11:1269.
201. Brunt VE, Minson CT. Cutaneous thermal hyperemia: more than skin deep. *J Appl Physiol.* 2011;111:5–7.
202. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1215–25.
203. Félétou M. EDHF-mediated Responses “The Classical Pathway.” In: The Endothelium, Part II. Morgan & Claypool Life Sciences Publishers Series; 2011.
204. Dickinson KM, Clifton PM, Keogh JB. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:500–5.

205. Kim SY, Yang HS, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Evaluation of the Beta Stiffness Index and Carotid Intima-Media Thickness in Asian Patients With Psoriasis. *Angiology*. 2015;66(9):889–95.
206. Antonucci VA, Tengattini V, Balestri R, Patrizi A, Filippini M, Bardazzi F. Intima-media thickness in an Italian psoriatic population: correlation with lipidic serum levels, PASI and BMI. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2014;28:512–5.
207. Gisondi P, Fantin F, Del Giglio M, Valbusa F, Marino F, Zamboni M, i sur. Chronic plaque psoriasis is associated with increased arterial stiffness. *Dermatol Basel Switz*. 2009;218:110–3.
208. Holzer G, Hoke M, Sabeti-Sandor S, Perkmann T, Rauscher A, Strassegger B, i sur. Disparate effects of adalimumab and fumaric acid esters on cardiovascular risk factors in psoriasis patients: results from a prospective, randomized, observer-blinded head-to-head trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2021;35:441–9.
209. Martinez-Lopez A, Blasco-Morente G, Perez-Lopez I, Tercedor-Sanchez J, Arias-Santiago S. Studying the effect of systemic and biological drugs on intima-media thickness in patients suffering from moderate and severe psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2018;32:1492–8.
210. Piros ÉA, Szabó Á, Rencz F, Brodszky V, Szalai K, Galajda N, i sur. Impact of Interleukin-17 Inhibitor Therapy on Arterial Intima-media Thickness among Severe Psoriatic Patients. *Life Basel Switz*. 2021;11:919.
211. Jókai H, Szakonyi J, Kontár O, Marschalkó M, Szalai K, Kárpáti S, i sur. Impact of effective tumor necrosis factor-alfa inhibitor treatment on arterial intima-media thickness in psoriasis: results of a pilot study. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69:523–9.
212. Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Noor SM. Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Biomolecules*. 2020;10:291.
213. Baudrand R, Lian CG, Lian BQ, Ricchiuti V, Yao TM, Li J, i sur. Long-term dietary sodium restriction increases adiponectin expression and ameliorates the proinflammatory adipokine profile in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24:34–41.

214. Huxley VH. Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently. *Adv Physiol Educ.* 2007;31:17–22.
215. Li X, Miao X, Wang H, Wang Y, Li F, Yang Q, i sur. Association of Serum Uric Acid Levels in Psoriasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3676.
216. Isha, Jain VK, Lal H. C-Reactive Protein and Uric Acid Levels in Patients with Psoriasis. *Indian J Clin Biochem.* 2011;26:309–11.
217. Maruhashi T, Hisatome I, Kihara Y, Higashi Y. Hyperuricemia and endothelial function: From molecular background to clinical perspectives. *Atherosclerosis.* 2018;278:226–31.
218. Cicero AFG, Pirro M, Watts GF, Mikhailidis DP, Banach M, Sahebkar A. Effects of Allopurinol on Endothelial Function: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Drugs.* 2018;78:99–109.
219. Niiranen T, Erlund I, Jalkanen S, Jula A, Salmi M. Effects of altered salt intake and diet on cytokines in humans: A 20-week randomized cross-over intervention study. *Eur J Immunol.* 2023;53:2250074.
220. Gooderham MJ, Papp KA, Lynde CW. Shifting the focus – the primary role of IL -23 in psoriasis and other inflammatory disorders. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32:1111–9.
221. Yang K, Oak ASW, Elewski BE. Use of IL-23 Inhibitors for the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. *Am J Clin Dermatol.* 2021;22:173–92.
222. Scrivo R, Massaro L, Barbatì C, Vomero M, Ceccarelli F, Spinelli FR, i sur. The role of dietary sodium intake on the modulation of T helper 17 cells and regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE.* 2017;12:1–14.
223. Luo T, Ji WJ, Yuan F, Guo ZZ, Li YX, Dong Y, i sur. Th17/Treg Imbalance Induced by Dietary Salt Variation Indicates Inflammation of Target Organs in Humans. *Sci Rep.* 2016;6:1–12.

224. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, i sur. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013;496:513–7.
225. Jantsch J, Binger KJ, Müller DN, Titze J. Macrophages in homeostatic immune function. *Front Physiol*. 2014;5:146.
226. Toussirot E, Béreau M, Vauchy C, Saas P. Could sodium chloride be an environmental trigger for immune-mediated diseases? An overview of the experimental and clinical evidence. *Front Physiol*. 2018;9:440.
227. Wu C, Chen Z, Xiao S, Thalhamer T, Madi A, Han T, i sur. SGK1 Governs the Reciprocal Development of Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Rep*. 2018;22:653–65.
228. Han X, Ren J, Lohner H, Yakoumatos L, Liang R, Wang H. SGK1 negatively regulates inflammatory immune responses and protects against alveolar bone loss through modulation of TRAF3 activity. *J Biol Chem*. 2022;298:102036.
229. Sierra-Ramos C, Velazquez-Garcia S, Keskus AG, Vastola-Mascolo A, Rodríguez-Rodríguez AE, Luis-Lima S, i sur. Increased SGK1 activity potentiates mineralocorticoid/ $\text{NaCl}$ -induced kidney injury. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2021;320:F628–43.
230. Wulff P, Vallon V, Huang DY, Völkl H, Yu F, Richter K, i sur. Impaired renal  $\text{Na}^+$  retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest*. 2002;110:1263–8.
231. Boehmer C. Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovasc Res*. 2003;57:1079–84.
232. Han W, Zhang H, Gong X, Guo Y, Yang M, Zhang H, i sur. Association of SGK1 Polymorphisms With Susceptibility to Coronary Heart Disease in Chinese Han Patients With Comorbid Depression. *Front Genet*. 2019;10:921.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Krajina

Elektronička pošta: ivkrajina@mefos.hr

Državljanstvo: hrvatsko

Datum rođenja: 24. 12. 1991.

### **Radno iskustvo:**

18. 10. 2022. – do danas. Medicinski fakultet Osijek. Naslovni asistent na Katedri za fiziologiju i imunologiju.

28. 2. 2018. – do danas. Klinički bolnički centar Osijek. Specijalizant dermatologije i venerologije na Zavodu za dermatologiju i venerologiju.

6. 4. 2017. – 27. 2. 2018. Dom zdravlja Osijek. Doktor medicine.

4. 9. 2016. – 3. 2. 2017. Specijalistička ordinacija obiteljske medicine Marica Raspudić-Brekalo, dr. med., spec. ob. med. Doktor medicine – pripravnik.

### **Školovanje:**

2024. – do danas. Sveučilišni specijalistički studij Dermatologija i venerologija, Medicinski fakultet Zagreb, Sveučilište u Zagrebu.

2018. – do danas. Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.

2010. – 2016. Studij medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.

2006. – 2010. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku.

### **Osobne vještine i kompetencije:**

Materinji jezik: hrvatski jezik.

Strani jezici:

Njemački jezik (C1 razina; Goethe-Zertifikat C1, br. 1655-C1-00041-09)

Engleski jezik (C2 razina; TOEFL Ibt 111/120, br. 0000 0000 2379 1507)

Vozacka dozvola: B kategorija.

Poznavanje računalnih programa: Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)

**Priznanja i nagrade:**

2016. – Rektorova nagrada za iznimian uspjeh na studiju

2015. – Nagrada Lions kluba za najbolje studente

**Nominacije za nagrade:**

Nominacija za nagradu „Borislav Nakić“ Hrvatske akademije medicinskih znanosti za 2022. godinu od strane Znanstveno-nastavnog vijeća Medicinskog fakulteta Osijek.

**Nastava na preddiplomskom i diplomskom studiju:**

2022./2023. – Predmet Imunologija, Studij medicine na njemačkom jeziku, Medicinski fakultet Osijek, 16 NS.

2023./2024. – Predmet Alergologija, Studij medicine na njemačkom jeziku, Medicinski fakultet Osijek, 12,5 NS.

2023./2024. – Predmet Imunologija, Studij medicine na njemačkom jeziku, Medicinski fakultet Osijek, 8 NS.

**Aktivnost u znanstvenim projektima:**

1. Institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog fakulteta Osijek: IP2-MEFOS-2020 (PI Martina Mihalj) pod nazivom „Učinci dijete sa smanjenim unosom kuhinjske soli na Th17-posredovanu upalu i vaskularnu reaktivnost kod oboljelih od vulgarne psorijaze“. Voditeljica projekta Martina Mihalj; suradnica Ivana Krajina.
2. Institucijski znanstveno-istraživački projekt Medicinskog fakulteta Osijek: P16-MEFOS-2023 (PI Martina Mihalj) pod nazivom „Uloga sustavne upale u razvoju metaboličkog sindroma i vaskularne endotelne disfunkcije kod pacijenata oboljelih od vulgarne psorijaze“. Voditeljica projekta Martina Mihalj; suradnica Ivana Krajina.

**Organizacija i sudjelovanje u znanstveno-popularnim događanjima:**

- 2012. – 2016. Članica organizacijskog odbora događanja „Tjedan mozga“ u Osijeku, Sekcije za neuroznanost u Osijeku (organizacija, promidžba i skupljanje donacija)
- Prevođenje znanstveno-popularnih govora na stranici TED.com na hrvatski jezik
- Sudjelovanje:
  1. Tjedan mozga, predavanje „Ja sam čula da je ona njega ustvari“, Osijek, 2011.
  2. Tjedan mozga, predavanje „Čudni su magneti u nama – ništa nas ne privlači kao odbijanje“, Osijek 2012.

3. Tjedan mozga, radionica „Pranje mozga (u formalinu)“, Osijek 2013.
4. Festival znanosti, radionica „Budućnost je u tvojoj glavi“, Osijek, 2013.
5. Festival znanosti, poster prezentacija „Novost u liječenju BRAF V600+ metastatskog melanoma – Vemurafenib“, Osijek, 2015.
6. Tjedan mozga, predavanje „Bazinga! Tko je pravi Sheldon Cooper?“, Osijek, 2016.
7. Festival znanosti, poster prezentacija „Utjecaj farmakoterapije afektivnih poremećaja na kreativnost umjetnika“, Osijek, 2016.
8. Festival znanosti, poster prezentacija „Umjetna inteligencija u prevenciji tumora kože“, Osijek, 2024.

### **Članstva:**

Europska akademija dermatologije i venerologije (engl. *European Academy of Dermatology and Venereology*, EADV), od 2023.

Hrvatsko društvo za bolesti glave i vrata Slavonije i Baranje (HDBGVS), od 2023.

Međunarodno društvo za dermatoskopiju (engl. *International dermoscopy society*, IDS), od 2022.

Hrvatsko dermatovenerološko društvo (HDVD), od 2018.

Hrvatski liječnički zbor (HLZ), od 2018.

Hrvatska liječnička komora (HLK), od 2017.

Hrvatsko katoličko liječničko društvo (HKLD), od 2015.

Hrvatsko društvo za neuroznanost (HDN), od 2013.

### **Publikacije u znanstvenim časopisima:**

1. Krajina I, Stupin A, Šola M, Mihalj M. Oxidative Stress Induced by High Salt Diet—Possible Implications for Development and Clinical Manifestation of Cutaneous Inflammation and Endothelial Dysfunction in Psoriasis vulgaris. *Antioxidants*. 2022, 11, 1269. doi: 10.3390/antiox11071269.
2. Milić Vranješ I, Školka I, Jakab J, Krajina I, Krajina V, Šantić A, Zibar L. Sexual function in hemodialysis and post-renal transplant women in a relationship: a cross-sectional study. *International Urology and Nephrology*. 2022. doi: 10.1007/s11255-021-03095-z.
3. Krajina I, Milić J, Vuković D, Jakić M, Zibar L. Pulmonary Rhodococcus equi infection in a renal transplant patient: case report with review of literature. *Medica Jadertina*, 2021; 51 (3), 283-288.

4. Tolušić Levak M, Plužarić V, Krajina I, Šola M, Tokić S, Delaš Aždajić M, Brajčić H, Muršić I, Šitum M, Mihalj M. Serum Levels of Homocysteine in Young Psoriasis Patients Naïve for Conventional Systemic and Biologic Therapy. RAD CASA – Medical sciences. 2020; 17: 24. doi: 10.21857/mjrl3u7v39.
5. Milić J, Milić Vranješ I, Krajina I, Heffer M, Škrlec I. Circadian Typology and Personality Dimensions of Croatian Students of Health-Related University Majors. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020; 17. doi: 10.3390/ijerph17134794
6. Kuna L\*, Božić I\*, Kizivat T, Bojanic K, Mršo M, Kralj E, Smolić R, Wu GY, Smolić M. Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. Current Drug Metabolism. 2018; 19. doi: 10.2174/1389200219666180523095355 \*equally contributing authors
7. Božić I, Omanović T, Kuna L, Kizivat T, Smolić R, Včev A, Smolić M. Pharmacogenomics: sex differences and application in pediatrics. Southeastern European Medical Journal. 2017;1:108-20. doi: 10.26332/seemedj.v1i1.21
8. Božić I, Milić J, Šijan I. Zrcalni neuroni i njihova potencijalna uloga u psihopatologiji. Gyrus. 2015;3:32-4. doi: 10.17486/gyr.3.1008
9. Šijan I, Milić J, Božić I. Severe epileptic encephalopathies in children: West and Lennox-Gastaut syndromes. Gyrus. 2015;3:92-6. doi:10.17486/gyr.3.1022

#### **Publikacije u stručnim knjigama:**

1. Smolić M, Omanović T, Božić I, Bilić-Ćurčić I, Smolić R, Včev A. Pharmacogenomic Testing in the Era of Patient-Tailored HCV Treatment. U: Smolić M, Včev A, Wu GY, urednici. Update on Hepatitis C. InTech. 2017. Str.173-189. doi: 10.5772/intechopen.70794. Dostupno na adresi: <https://www.intechopen.com/chapters/56954>. Datum pristupa: 30. 06. 2024. .

#### **Sažetci sa skupova - Sažetci u zbornicima i časopisima:**

1. Krajina, Ivana; Štefanić, Mario; Stupin, Ana; Milić, Jakov; Mihalj, Martina. Prediktori utjecaja prehrane s niskim udjelom soli na kliničku težinu i vaskularnu funkciju u bolesnika s psorijazom - praktični vodič za odabir pacijenata // 8. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem - Knjiga sažetaka. Osijek: Hrvatsko dermatovenerološko duštvo HLZ-a, 2024. str. 5-5.

2. Mihalj, Martina; Krajina, Ivana; Štefanić, Mario; Plužarić, Vera; Stupin, Ana; Šola, Marija; Tolušić Levak, Maja; Kožul, Maja. Postoji li dovoljno dokaza za uvođenje prehrane s niskim udjelom soli u protokole liječenja dermatoloških bolesnika s Th17 posredovanim bolestima? // 8. Kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem - Knjiga sažetaka. Osijek: Hrvatsko dermatovenerološko duštvo HLZ-a, 2024. str. 6-6.
3. Krajina, Ivana; Kolobarić, Nikolina; Milić, Jakov; Šola, Marija; Matijević, Tatjana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina. Two-Week Low-Salt Diet Significantly Reduces Serum IL-23 Levels in Psoriasis Patients – Results from a Preliminary Study // RECOOP 19th Bridges in Life Sciences Conference and 9th Sciences and Arts Exhibition. Bratislava: RECOOP, 2024. str. 140-140.
4. Krajina, Ivana; Plužarić, Vera; Tolušić Levak, Maja; Šola, Marija; Matijević, Tatjana; Milić, Jakov; Stupin, Ana; Mihalj, Martina. Exclusive Low-Salt Diet Improves Clinical Outcome of Mild to Moderate Psoriasis as Soon as After a Two- Week Period // EADV Congress 2023. Berlin, Njemačka, 11. 10. 2023. - 14. 10. 2023. 2023: 5266.
5. Mihalj, Martina; Krajina, Ivana; Plužarić, Vera; Tolušić Levak, Maja; Kožul, Maja; Drenjančević, Ines; Kolobarić, Nikolina; Milic, Jakov; Stupin, Ana 2-Week Low-Salt Diet Improves Overall Vascular Reactivity and Endothelium-Dependent Vasodilation in Psoriasis Patients // EADV Congress 2023. Berlin, Njemačka, 11.10.2023-14.10.2023. 2013: P2566.
6. Krajina, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina. Short term low salt diet reduces inflammation in mild to moderate psoriasis vulgaris, as assessed by PASI score // 16th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International participation Osijek, September 28-30, 2023.. Osijek: Medicinski fakultet Osijek, 2023. str. 23-23
7. Krajina Ivana, Matijević Tatjana, Kožul Maja, Vekić Mužević Marina, Ćurić Filip, Kuric Igor. Patch test results from University Hospital Osijek. Book of Abstracts. 2023.
8. Krajina, Ivana; Matijević, Tatjana; Šola, Marija; Mihalj, Martina; Krajina, Vinko; Pavlović, Oliver. Dermatoskopija u dijagnostici Morbus Bowen genitalne regije. // 14. osječki urološki dani (Knjiga sažetaka). Osijek: Centar za edukaciju i rano otkrivanje bolesti novotrovina OBŽ, 2022. str. 1-1
9. Šola, Marija; Perić, Leon; Stupin, Ana; Krajina, Ivana; Muršić, Ivanka; Tolušić Levak, Maja; Plužarić, Vera; Vekić Mužević, Marina; Biljan, Darko; Drenjančević, Ines. Vasodilatation in skin microcirculation of psoriasis patients receiving TNF-alpha-blocking therapy. // 92nd Hungarian Dermatological Society Congress and XVIII. Dermatology-Pharma Exhibition. Debrecen, Mađarska, 28. 11. 2019. - 30. 11. 2019.

10. Plužarić, Vera; Kuric, Igor; Krajina, Ivana; Skerlev, Mihael Tinea stopala uzrokovana Alternaria spp u 10-godišnjeg dječaka // XV. Prosinački simpozij „Poučna iskustva i znanstveni izazovi u dermatološkoj praksi - odabrani slučajevi“ - zbornik radova. Zagreb: / 2018.
11. Krajina, Ivana; Kuric, Igor; Ljubojević Hadžavdić, Suzana; Šola, Marija; Biljan, Darko Aquagenic pruritus associated with polycythemia vera - a case report. // 6. Kongres hrvatskih dermatovenerologa. Pula, Hrvatska, 04. 10. 2018. – 07. 10. 2018. 2018:24.
12. Šola, Marija; Plužarić, Vera; Biljan, Darko; Kovačević, Tatjana; Krajina, Ivana; Kuric, Igor. Differential diagnosis of scalp lesions - are skin scalp lesions often misdiagnosed? // 6. Kongres hrvatskih dermatovenerologa. Pula, Hrvatska, 04. 10. 2018. – 07. 10. 2018. 2018:28.
13. Bojanić, Kristina; Kizivat, Tomislav; Kuna, Lucija; Wagner, Jasenka; Smolić, Robert; Božić, Ivana; Mršo, Margareta; Raguž-Lučić, Nikola; Včev, Aleksandar; Smolić, Martina. Pharmacogenomics of anastrozole could predict interpatient variability in intensity of adverse effects. Program and abstracts: Ninth ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine. 2015:219.
14. Šijan, Ivona; Milić, Jakov; Božić, Ivana; Luketić, Vanja; Heffer, Marija; Kristek, Jozo Body image in operated breast cancer patients: the effect of surgery type and social support // 2nd SaMED - International medical students Congress Sarajevo (Abstract book). Sarajevo: / 2016. str. 161-161.
15. Milić, Jakov; Šijan, Ivona; Božić, Ivana; Zibar, Lada; Ilakovac, Vesna; Heffer, Marija Habits of Medical Students and the Effect on Daytime Sleepiness // Liječnički vjesnik : glasilo Hrvatskog liječničkog zbora. Suplement, 135, 5. 2013. str. 34-34.
16. Milić, Jakov; Božić, Ivana; Šijan, Ivona; Zibar, Lada; Ilakovac, Vesna; Heffer, Marija Study habits and chronotype of students of medicine in Osijek // Book of abstracts: 3rd Student Congress of Neuroscience – Neuri 2013. Rijeka: Fakultetski Odbor Svih Studenata Medicinskog fakulteta u Rijeci (FOSS MedRi), 2013. str. 61-61.
17. Božić, Ivana; Šijan, Ivona; Stanušić, Ivana; Perković, Romana; Ilakovac, Vesna; Heffer, Marija. Potreba za uvođenjem dodatne provjere znanja, uz sadašnju Državnu maturu, za upis na Medicinski fakultet Osijek // 2. studentski kongres neuroznanosti s međunarodnim sudjelovanjem (Zbornik sažetaka). Rijeka: Fakultetski Odbor Svih Studenata Medicinskog fakulteta u Rijeci (FOSS MedRi), 2012. str. 60-60

**Ocjenski radovi - Diplomski radovi:**

Ivana Božić. Farmakogenetički biljeg i individualne razlike u pojavnosti jetrenog oštećenja uzrokovanih anastrozolom. 2016, Medicinski fakultet Osijek.

**Tečajevi trajne edukacije:**

1. Uvod u dermatoskopiju. Klinički bolnički centar Sestre Milosrdnice, Klinika za kožne i spolne bolesti. Centar za edukaciju dermatoskopije. 28. rujna 2018.
2. International Short Course on Dermoscopy. Katedra za dermatologiju, Medicinski fakultet Graz, Austrija. 13. – 17. srpnja 2021.
3. Specijalna područja dermatoskopije. Klinički bolnički centar Sestre Milosrdnice, Klinika za kožne i spolne bolesti. 17. studeni 2023.
4. Introduction to Statistics & Data Analysis in Public Health. Imperial College London (online), Coursera. 2. veljače 2024.

**Ostale aktivnosti:**

- Demonstratorica na:

- Katedri za anatomiju i neuroznanost, Medicinski fakultet Osijek (2012. – 2015.)
- Katedri za farmakologiju, Medicinski fakultet Osijek (2014. – 2015.)
- Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju, Medicinski fakultet Osijek (2014.)

2013. – 2015. – Zamjenica člana Studentskog zbora i Fakultetskog vijeća, Medicinski fakultet Osijek

2015. – Praksa na Odjelu za infektologiju i tropsku medicinu, AKH, Beč, Austrija

2012. – Studentska razmjena, Odjel za kardiologiju, Bolnica sv. Ćirila i Metoda, Skoplje, Makedonija

2014. – 2015. – Volontiranje u Laboratoriju za farmakologiju na Medicinskom fakultetu Osijek

## 12. PRILOZI

1. Prilog 1. Dermatološki indeks kvalitete života (DLQI)
2. Prilog 2. Upute za dvotjednu niskoslanu dijetu (DASH dijetni protokol)

## Prilog 1. Dermatološki indeks kvalitete života (DLQI)

**DERMATOLOŠKI INDEKS KVALITETE ŽIVOTA**

DLQI

Matični broj bolesnika (Bolnički):

Datum:

Rezultat:

Ime:

Dijagnoza:

Adresa:

**Cilj ovog upitnika je odrediti koliko je problem s Vašom kože utjecao na Vaš život TIJEKOM PROTEKLOG TJEDNA. Molimo Vas da označite po jedan kvadratić za svako pitanje.**

1.	Tijekom proteklog tjedna, koliko Vas je koža <b>svrđjela, bila osjetljiva, boljela ili peckala?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
2.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri ste se zbog stanja Vaše kože osjećali <b>neugodno ili upadljivo?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
3.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri Vas je stanje Vaše kože ometalo pri odlaženju u <b>kupovinu ili u održavanju Vašeg doma ili vrta?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
4.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri je stanje Vaše kože utjecalo na <b>odabir odjeće</b> koju ste nosili?	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
5.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri je stanje Vaše kože utjecalo na Vaše <b>društvene ili slobodne aktivnosti?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
6.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri Vam je stanje Vaše kože otežalo bavljenje <b>sportom?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
7.	Tijekom proteklog tjedna, je li Vas stanje Vaše kože <b>sprječavalo u radu ili učenju?</b>	Da Ne	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
	Ako je odgovor "Ne", u kojoj mjeri Vam je tijekom proteklog tjedna stanje Vaše kože bilo problem pri <b>obavljanju posla ili pri učenju?</b>	Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
8.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri Vam je Vaša koža stvarala probleme u odnosu s <b>partnerom ili s nekim od Vaših bliskih prijatelja ili rođaka?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
9.	Tijekom proteklog tjedna, u kojoj mjeri Vam je stanje Vaše kože uzrokovalo neke <b>seksualne poteškoće?</b>	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>
10.	Tijekom proteklog tjedna, koliki problem Vam je predstavljalo <b>lječenje</b> Vaše kože, primjerice tako da Vam je stvaralo nered u kući ili Vam oduzimalo vrijeme?	Vrlo mnogo Mnogo Malo Nimalo	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ne odnosi se na moj slučaj <input type="checkbox"/>

**Molimo Vas da provjerite da li ste odgovorili na SVAKO pitanje. Hvala Vam.**

Prilog 2. Upute za dvotjednu niskoslanu dijetu (DASH dijetni protokol)

## Niskoslana dijeta – upute

Uključili ste se kao ispitanik u istraživanje u sklopu kojega je potrebno kroz idućih 14 dana provoditi niskoslanu dijetu. Slijede upute kako niskoslanu dijetu uspješno provoditi u kućnim uvjetima.

**Dozvoljeni dnevni unos natrija iznosi 1500mg.**

U ovoj dijeti slobodno možete birati namirnice po svojoj želji, samo treba paziti da dnevni unos natrija ne prelazi 1500mg (odnosno da unos soli ne prelazi 3,75g soli). Iako se natrij i sol često shvaćaju kao sinonimi, natrij i sol NISU isto. Natrij je mineral i jedan od kemijskih elemenata koji se nalaze u soli. Natrij je, dakle, jedan od sastojaka soli, dio soli.

Veliku većinu, gotovo 80 % kuhinjske soli koju unosimo, nalazi se skrivena u polugotovoj, gotovoj, konzerviranoj i restoranskoj hrani. Ostalu kuhinjsku sol dodajemo dosoljavanjem pri kuhanju i tijekom obroka, a najmanji dio nalazi se prirodno u hrani.

Stoga, preporučujemo da za vrijeme provođenja ove dijete izbjegavate polugotovu i gotovu hranu, kao i zasoljavanje tijekom i nakon kuhanja. Kako biste pravilno mogli provoditi dijetu pazeci da dnevni unos natrija ne prelazi 1500mg, preporučujemo da čitate deklaraciju proizvoda te u odjeljku o **hranjivim vrijednostima proizvoda** potražite: **sol** (najčešće izražena u gramima, g) ili **natrij** (najčešće izražen u miligramima, mg).

Podatci o hranjivim vrijednostima (sol ili natrij) često su izraženi **prosječnim vrijednostima u 100 grama proizvoda ili prema serviranju (per serving)**. Obratite pozornost na to koliko grama ukupno ima vaš proizvod.

U ovoj se uputi za niskoslanu dijetu preporučuje računati količinu natrija iz proizvoda. U praksi je na deklaraciji o

## NISKOSLANA DIJETA

*U ovoj dijeti  
slobodno  
možete birati  
namirnice po  
svojoj želji,  
jedino treba  
paziti da  
dnevni unos  
natrija ne  
prelazi  
1500mg  
(odnosno da  
unos soli ne  
prelazi 3,75g  
soli).*

hranjivim vrijednostima proizvoda često navedena sol, a ne natrij.

Količinu soli je jednostavno preračunati u količinu natrija, kako biste vrijednosti natrija u miligramima onda mogli zbrajati u svrhu provođenja ove dijete.

Unos soli ili natrija izračunajte ovisno o tome koliko ćete grama ili serviranja nekog proizvoda konzumirati.

Kako biste količinu soli istaknuto na deklaraciji preračunali u natrij, možete to učiniti prema formuli:

$$\{količina soli\}g \times 400 = \{količina natrija\}mg$$

Isto možete, ukoliko preferirate, učiniti i online na linku putem pametnih telefona ili računala:

<https://www.heartfoundation.org.au/health-professional-tools/sodium-and-salt-converter>

### Namirnice koje u sebi imaju veliku količinu natrija:

- **Kruh i pekarski proizvodi:** Kruh je jedan od glavnih izvora natrija u obrocima. Jedna šnita kruha može sadržavati od 100 do 300 mg natrija. Neke vrste kruhova imaju još i više natrija u sebi! Ukoliko uzimate gotove proizvode u trgovinama, pažljivo pročitajte naljepnice i odaberite marku s najmanjim udjelom natrija. Ostala pečena roba, poput krafni, muffina i kolača od mješavina za pečenje, također ima u sebi puno natrija. Prašak za pecivo ima visok udio natrija.
- **Žitarice za doručak:** Količina soli u gotovim žitaricama za doručak jako varira pa je važno pažljivo čitati naljepnice.
- **Začini i umaci:** Većina začina koji se kupuju u trgovini, poput kečapa, senfa, preljeva za salatu, umaka od soje, slastica, umaka za roštilj i umaka od špageta, ima veliku količinu natrija u sebi. Pažljivo pročitajte naljepnice i kupujte proizvode s smanjenim sadržajem ili bez natrija kad god je to moguće. Još bolje, napravite sami domaće umake i preljeve.
- **Sir i mliječni proizvodi:** Većina ljudi ne misli na sol kada je sir u pitanju, ali sol se koristi u procesu proizvodnje sira i oni su značajan izvor natrija u prehrani. Mlijeko također sadrži natrij, preko 100mg natrija po šalici mlijeka.
- **Konzervirana hrana:** Sol se koristi za aromu i očuvanje većine konzerviranih namirnica poput juha, variva i povrća. Tzv. "juhe iz vrećice" imaju ogromnih 1000mg natrija po porciji. Konzervirani grah također sadrži visok udio natrija. Tako jedna šalica kuhanog nekonzerviranog graha sadrži 12 mg natrija, dok 1 šalica konzerviranog graha sadrži čak 856 mg natrija. Razlika je velika! Potražite verzije s malo soli i bez soli ili napravite svoje.
- 

*Obratite pozornost na to da natrij može biti i skriven u hrani – hrana ne mora imati izuzetno slan okus da bi imala u sebi puno natrija i soli.*

- U slijedećoj tablici navedeno je gdje sve ima natrija i u kojim (okvirlim) količinama.

Vrsta hrane	Natrij (mg)
<b>Cijelovite i druge žitarice, tjestenina</b>	
Riža, kuhanica bez soli, 1 šalica	9
Gotovi musli ili žitarice (uvijek provjeriti na pakiranju)	0 - 360
Kruh (1 šnita)	100 - 175
Tjestenina, 1 šalica, kuhanica u nezasoljenoj vodi	1
<b>Povrće</b>	
1 srednji krumpir, kuhan ili pečen, nezasoljen	20
1 srednji batat, kuhan ili pečen, nezasoljen	53
1 šalica kuhanog špinata (bez soli)	126
1 šalica bundeve, kuhanica ili pečena, nezasoljena	2
1 srednja tikvica, kuhanica u nezasoljenoj vodi	20
1 šalica kelja, kuhanog u nezasoljenoj vodi	30
1 glavica zelene salate iceberg, nezasoljena	78
1 šalica graha iz konzerve	856
1 šalica graha, nekonzerviran, kuhan bez soli	12
1 šalica graška, nekonzerviran, kuhan bez soli	6
1 šalica graška iz konzerve	428
1 kom crvenog luka	3
1 srednji krastavac	6
1 srednja rajčica	6
100g pasirane rajčice (Passata Podravka)	52
1 šalica konzerviranog umaka od rajčice	1284
1 kom sušene cherry rajčice	42
1 šalica konzerviranog soka od rajčice	654
1 šalica brokule, kuhanice u nezasoljenoj vodi	64
1 šalica gljiva, pripravljene bez soli	3
1 šalica konzerviranih gljiva	663
<b>Voće</b>	
1 marelica	4
1 srednja banana	1
1 srednja naranča	0
1 šalica dinje	26
1 šalica lubenice	2
1 srednja jabuka	1
1 nektarina	0
1 kivi	2
1 šalica jagoda	2

<b>Mlijeko i mlijekočni proizvodi</b>	
Mlijeko (1 šalica)	107
Jogurt (1 šalica)	175
Kiselo vrhnje (100g)	36
Sveži sir (100g) – uvijek pogledati sastav na proizvodu	100
Dukatela sirni namaz 100g	240
Feta sir (100g)	1000
Mozarella (100g)	534
Emmentaler (100g)	365
Gauda (100g)	819
Edamer (100g)	965
Brie (100g)	629
Camembert (100g)	842
1 č.žl. margarina	153
1 kugla sladoleda	40 - 60
<b>Sjemenke i orašasti proizvodi</b>	
Kikiriki (neslani, 1/3 šalice)	0 - 5
Kikiriki (slani, 1/3 šalice)	120
1/3 šalice badema, nezasoljeni	0
1/3 šalice oraha, nezasoljeni	1
1/3 šalice ljenjaka, nezasoljeni	0
1/3 šalice pistacija	115
¼ šalice suncokretovih sjemenki	135
<b>Meso, riba, jaja</b>	
Tuna (iz konzerve, 100g)	230 - 350
Šunka (100g)	1020
Svinjetina (100g), nezasoljena, nedimljena	100 - 200
junetina, piletina, puretina (100g), nezasoljena, nedimljena	100 - 200
Pileća prsa, 1 kom	130
Pileća jetrica, 1kom, nezasoljena	15
1 jaje, kuhan, nezasoljeno, kuhan u nezasoljenoj vodi	62
1 jaje, kajgana	162
<b>Pića</b>	
Kava, 1 šalica, bez mlijeka	4 - 8
Mlijeko, 1 šalica	98
Čaj, 1 šalica	2
Jamnica, gazirana, 2 dL	170
Sok od jabuka, 1 šalica	7
Vino, crno, 1 dL	4
Vino, bijelo, 1 dL	5
Pivo, alkoholno piće, 0.33L	14
Žestoka alkoholna pića (rum, gin, vodka, whiskey)	0

Začini i ostalo	
1 č.žl. šećera	0
1 č.žl. papra	1
1 č.žl. origana	0
1 č.žl. crvene paprike	1
1 č.žl. Chilli praha	26
1 č.žl. curry praha	1
1 č.žl. meda	1
1 č.žl. soli	2000
1 "prstohvat soli"	cca 200
1 č.žl. vegete	1096
1 č.žl. sode bikarbonate	1259
1 vrećica praška za pecivo (pogledati pakiranje)	5 - 400
1 č.žl. maslinovog ulja	0
1 č.žl. suncokretovog ulja	0
1 žl. sirupa od čokolade	66
Primjeri gotovih proizvoda	
1 šalica konzervirane juhe iz vrećice	1010
1 jušna žl. sojinog umaka (konzervirani)	902
100 g štapića s kikirikijem	1040
Velika porcija pomfri-ja iz McDonaldsa	1600
1 komad Capricosa pizze	520
1 komad pite	300 - 400
1 porcija tjestenine s gotovim umakom iz vrećice	1053
Sendvič iz fast food restorana	800 - 1700
Zrnati sir s dodatkom soli	850
Konzerva kiselog kupusa	1530
Konzervirani umak od rajčice	1284
Vafla, 1 kom	384

## Primjeri dnevnih menija:

### Dan 1.

Doručak	Natrij (mg)
3/4 šalice zobenih pahuljica	1
1 srednja banana	1
1 šnita kruha s cjelovitim žitaricama	140
1 šalica mlijeka s malo masnoće	107
1 žličica mekog margarina	26
1 šalica soka od naranče	5
Ručak	
100g svinjske lopatice, nezasoljene	150
1 šalica mahuna, pirjano s 1 žličicom maslinovog ulja	12
2 pečena krumpira krumpir	40
1 žlica kiselog vrhnja, bez masti	10
1 žlica svježeg sira	40
1 žličica senfa	145
1 žlica nasjeckanog mladog luka	5
1 šnita integralnog kruha	100
1 jabuka	1
1 dL crnog vina	5
Večera	
3/4 šalice pileće salate*	120
1 kriške integralnog pšeničnog kruha	150
1 šalica kriški krastavaca	2
1 šalica cherry rajčice	6
1 žlica sjemenki suncokreta	0
1 žličica kiselog vrhnja	10
1 čaša soka od jabuka	7
Užine tijekom dana	
1 banana	1
1 šalica nezasoljenih badema	0
1 šalica voćnog jogurta od jagode	120
<b>Ukupno: 1204 mg natrija</b>	

**Dan 2**

Doručak	Natrij (mg)
1/2 šalica zobenih pahuljica	1
1 šalica jogurta	175
1 malo pecivo od pšeničnog brašna	150
1 šalica kave s malo mlijeka	20
1 žličica mekog margarina	26
1 šalica soka od jabuke	7
<b>Ručak</b>	
1 i pol šalica špageta	3
% šalice umaka od rajčica*	253
1 čajna žličica parmezana	150
1 šalica špinata	25
1 šalica gljiva, nekonzerviranih	10
1 žličica senfa	145
1 žlica nasjeckanog mladog luka	5
1 šnita integralnog kruha	100
1 jabuka	1
1 dL crnog vina	5
<b>Večera</b>	
Sendvič od pilećih prsa	
100 g pilećih prsa	75
1 šnita integralnog kruha	140
1 žlica svježeg sira	40
1 list zelene salate	0
1 rajčica	5
1 čaša soka od jabuka	7
<b>Užine tijekom dana</b>	
1 jabuka	1
½ šalica sušenih marelica	0
1 šalica voćnog jogurta	120
<b>Ukupno: 1464 mg natrija</b>	

**Dan 3.**

<b>Doručak</b>	<b>Natrij (mg)</b>
<b>1 kriška cjelovitog pšeničnog kruha</b>	149
<b>1 žličica margarina</b>	26
<b>1 šalica voćnog jogurta</b>	173
<b>1 breskva</b>	0
<b>1 šalica soka od grejpa</b>	4
<b>Ručak</b>	
<b>1 pileća prsa</b>	130
<b>1 šalica riže</b>	9
<b>1 šalica graška</b>	12
<b>100 g vrhnja za kuhanje</b>	4
<b>1 dinstani crveni luk</b>	3
<b>1 žličica senfa</b>	145
<b>1 žlica nasjeckanog mladog luka</b>	5
<b>1 jabuka</b>	1
<b>Večera</b>	
<b>1/2 šalice salate od tunjevine*</b>	171
<b>1 kriške integralnog pšeničnog kruha</b>	140
<b>1 šalica kriški svježeg krastavca</b>	2
<b>2 kom rajčice rajčice</b>	5
<b>1/2 šalice svježeg sira, nemasno</b>	100
<b>1 velika lista zelene salate</b>	5
<b>1 čaša soka od jabuka</b>	7
<b>Užine tijekom dana</b>	
<b>2 šalice jagoda</b>	4
<b>Kajgana od 1 jajeta</b>	162
<b>1 šalica voćnog jogurta od jagode</b>	120
<b>Ukupno: 1377 mg natrija</b>	

### Salata od piletine (recept iz Dan 1)

1 pileća prsa, kuhanja, u kockama i bez kože  
1/4 šalice celera, nasjeckanog  
1 žlica limunovog soka  
Prstohvat papra i bosiljka  
1 žličica kiselog vrhnja  
1. Pecite piletinu narezanu na kockice i stavite u hladnjak.  
2. U velikoj zdjeli kombinirajte ostatak sastojaka, dodajte ohlađeno piletinu i dobro promiješajte.

### Umak od rajčica (recept iz Dan 2)

2 žlice maslinovog ulja  
2 mala luka, nasjeckana  
3 režnja češnjaka, nasjeckana  
1 i pol šalica tikvica, narezane na kriške  
1 žlica origana, sušena  
1 žlica bosiljka, sušena  
200 g rajčica, nasjeckanih  
200 ml pasirane rajčice  
1 šalica vode  
1. U srednje tepljiji zagrijte ulje. Pirjajte luk, češnjak i tikvice u ulju 5 minuta na srednje jakoj vatri.  
2. Dodajte preostale sastojke i pirjajte poklopljeno 45 minuta.  
Poslužite preko špageta.

### Salata od tunjevine (recept iz Dan 3)

2 konzerve tune od 150 g  
1/2 šalice sirovog celera, nasjeckanog  
1/3 šalice mladog luka, nasjeckanog  
3 žlice kiselog vrhnja  
Prstohvat papra  
1. Isperite i ocijedite tunu kroz 5 minuta. Razbiti se vilicom.  
2. Dodajte celer, luk i vrhnje i dobro promiješajte.