

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Marija Lovrić

UTJECAJ KRATKOTRAJNO
POVEĆANOG UNOSA KUHINJSKE
SOLI NA UDIO TH17 LIMFOCITA U
PERIFERNOJ KRVI I
MEZENTERIČNIM LIMFNIM
ČVOROVIMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Marija Lovrić

UTJECAJ KRATKOTRAJNO
POVEĆANOG UNOSA KUHINJSKE
SOLI NA UDIO TH17 LIMFOCITA U
PERIFERNOJ KRVI I
MEZENTERIČNIM LIMFNIM
ČVOROVIMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju,
u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Rad ima: 24 lista, 5 slika i 1 tablicu.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj na pristupačnosti, strpljivosti, ažurnosti i na svim stručnim savjetima koji su uvelike pomogli u izradi ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem dr. sc. Aniti Ćosić na velikoj pomoći i trudu uloženom pri izvođenju pokusa i prikupljanju podataka.

Velika zahvala ide mojim roditeljima, najužoj obitelji i prijateljima koji su mi bili najveća potpora i oslonac tijekom cijelog obrazovanja. Oni su ti koji daju smisao svemu što radim te bez njih ovo ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SOL I PREKOMJERAN UNOS SOLI.....	1
1.2. IZVRŠNE CD4+ STANICE T.....	2
1.2.1. <i>Razvoj i uloga Th17 stanica</i>	2
1.2.2. <i>Interleukin 17</i>	4
1.3. SOL, HIPERTENZIJA I STANICE T.....	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJ	7
4. MATERIJALI I METODE	8
4.1. USTROJ STUDIJE.....	8
4.2. MATERIJALI.....	8
4.3. METODE.....	9
4.3.1. <i>Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi</i>	9
4.3.2. <i>Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova</i>	10
4.3.3. <i>Protočna citometrija</i>	10
4.4. STATISTIČKE METODE.....	10
5. REZULTATI	11
6. RASPRAVA	16
7. ZAKLJUČAK	18
8. SAŽETAK	19
9. SUMMARY	20
10. LITERATURA	21
11. ŽIVOTOPIS	24

KRATICE

Ang – angiotenzin

CD – klaster diferencijacije

CTLA – citotoksični protein vezani T limfocit

EAE – eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

GM-CSF – granulocit-makrofag kolonijski stimulacijski faktor

HS – visoki unos soli

HSV – herpes simplex virus

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

JGE – jukstagolerularne epitelioidne stanice

LS – niski unos soli

mLN – mezenterični limfni čvor

MS – multipla skleroza

NaCl – natrijev klorid

PBMC – periferne mononuklearne stanice

PMA – forbol-12-miristat-13-acetat

RA – reumatoidni artritis

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sustav

RPMI – Roswell Park Memorial Institute 1640 medij za stanične kulture

SLE – sistemski eritemski lupus

SGK1 – serum glukokortikoid kinaza 1

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TGF – transformirajući čimbenik rasta

Th – pomagačka stanica T

TNF – tumor nekrotizirajući faktor

VSD – visokoslana dijeta

SLIKE

Slika 1: Razvoj stanica Th17

Slika 2: Izolacija PBMCa na gradijentu fikola

Slika 3: Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora protočnom citometrijom

Slika 4: Udio Th17 limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

Slika 5: Udio Th17 limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

TABLICE

Tablica 1: Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja koje su korištene u pokusu

1. UVOD

1.1. Sol i prekomjieran unos soli

Natrijev klorid (NaCl), najčešće poznat kao kuhinjska sol, bitan je spoj za pravilno funkcioniranje organizma. Natrij i klor neophodni su za mnogo osnovnih metaboličkih procesa u našem organizmu (1). Natrij predstavlja glavni kation u izvanstaničnoj tekućini, dok je klor glavni negativno nabijeni ion, odnosno anion. Zajedno s ionima kalija i bikarbonata, ovi su ioni važni za transport preko stanične membrane, čime se stanica zapravo hrani, obnavlja i izbacuje iz sebe štetne tvari. Naime, natrij je neophodan za izmjenu iona vodika i izlučivanje vode, te se na taj način osigurava acidobazna ravnoteža organizma. Pored toga, natrij ulazi u čitav niz mehanizama koji rezultiraju podražljivošću živčanog i mišićnog tkiva. Klor sudjeluje u velikoj mjeri u osnovnim biokemijskim procesima, a jedna od najvažnijih uloga klora ostvaruje se u procesu probave (1, 2).

Mnogo je, dakle dobrobiti koje donosi svakodnevno konzumiranje kuhinjske soli. S druge strane, zbog neznanja, loših prehrambenih navika i pretjerane uporabe, kuhinjska sol danas uzrokuje više štete nego dobrobiti za ljudski organizam (3).

Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije preporučena količina kuhinjske soli iznosi pet grama/dan (dva g natrija), no suvremenim prehrambenim navikama dnevno unosimo čak pet do deset grama kuhinjske soli više nego što je potrebno ljudskom tijelu (3, 4). Prema posljednjim istraživanjima u Republici Hrvatskoj u prosjeku unese se 11,6 grama soli dnevno što je približno dvostruka količina u odnosu na preporučenu dnevnu količinu (3).

Opće je poznato kako prekomjieran unos kuhinjske soli pospješuje razvoj kardiovaskularnih bolesti. Dolazi do razvoja hipertenzije i posljedično povećane učestalosti moždanog udara, srčane koronarne bolesti i zatajenja srca. Kod ljudi s neliječenim visokim krvnim tlakom dolazi i do zatajenja bubrega. U pozadini kardiovaskularnih bolesti povezanih s prekomjernim soljenjem nalazi se oštećenje unutrašnjeg sloja stanica krvnih žila – endotela (5).

Prepoznata je i povezanost prekomjernog unosa soli s drugim, različitim bolestima kao što su hiperkalciurija, bubrežni kamenci, osteoporoza, karcinom želuca, astma, Meniereova bolest te također problemi sa zadržavanjem tekućine (6).

1.2. Izvršne CD4+ stanice T

Uloge izvršnih CD4+ stanica T jesu novačenje i aktivacija fagocita (makrofaga i neutrofila) te drugih leukocita koji uništavaju unutarstanične i neke izvanstanične mikroorganizme, kao i poticanje limfocita B na proizvodnju protutijela (7).

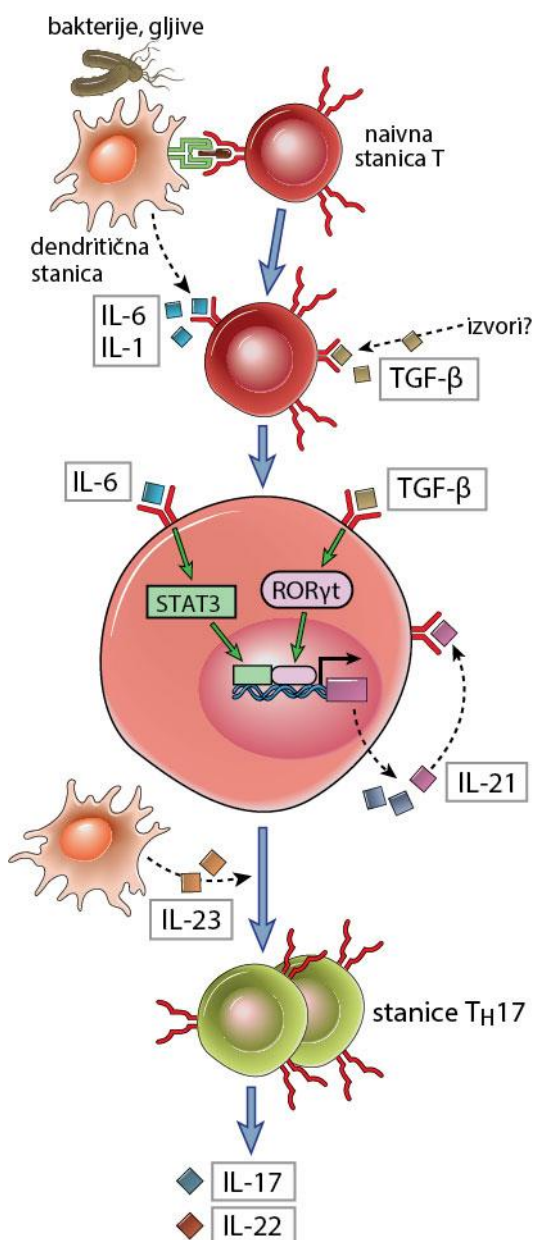
Tri glavne podskupine izvršnih CD4+ stanica T, zvane Th1, Th2 i Th17, sudjeluju u obrani domaćina od različitih vrsta zaraznih patogena te su uključene u različite vrste tkivnog oštećenja u imunskim bolestima. Četvrta je podskupina, zvana folikularne pomagačke stanice T, važna za proizvodnju protutijela. Regulacijske stanice T još su jedna specifična populacija CD4+ stanica T. One nisu izvršne stanice, već je njihova uloga nadzor nad imunoreakcijama na vlastite i strane antigene (7).

Primarna uloga Th1-limfocita jest imunološki odgovor na unutarstanične patogene, dok su pri alergijskim reakcijama odgovorni za supresiju alergijske upale. Njihov je efektorski citokin interferon- γ (IFN- γ). Th2 limfociti važni su u infestaciji parazitima, ali i u nizu zbivanja tijekom alergijskih reakcija koja uključuju stvaranje specifičnih IgE-protutijela, nastanak eozinofilije te novačenje upalnih stanica. Njihov spektar efektorskih citokina obuhvaća interleukine IL-4, IL-5 i IL-13. Th17 limfociti važni su pri upalnom odgovoru na izvanstanične patogene te imaju ulogu u kroničnim bolestima koje karakterizira neutrofilna upala (8). Većinu upalnih djelovanja tih stanica posreduje IL-17, no mogu im pridonijeti i ostali citokini koje proizvodi ova podskupina poput IL-22 i IL-21 (7, 8).

1.2.1. Razvoj i uloga Th17 stanica

Proupalni citokini koji se stvaraju u odgovoru na bakterije i gljive potiču razvoj Th17 stanica. Mnoge bakterije i gljive djeluju na dendritične stanice i potiču proizvodnju citokina koji pospješuju diferencijaciju CD4+ stanica T u podskupinu Th17 (7). Slika 1. prikazuje razvoj stanica Th17. Diferencijacija Th17 stanica kontrolirana je brojnim citokinima, uključujući IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-21 i IL23, koji stimuliraju, te IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-10

i IL-27, koji inhibiraju diferencijaciju Th17 stanica (9). Neke novije studije pokazale da postoje velike razlike između diferencijacije Th17 stanica kod miševa i ljudi. Nekoliko studija izvjestilo je da u suprotnosti sa studijama na životinjama, TGF- β kod ljudi ne potiče, nego inhibira Th17 diferencijaciju (10).



Slika1. Razvoj stanica Th17 (Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, 2018.) (7).

1.2.2. Interleukin 17

Interleukin 17 (IL-17) jest citokin čiji je gen izoliran iz hibrida T-stanica štakora i miša 1993. godine. Budući da je pokazao visok stupanj homologije s genom HSV13 herpes virusa, smatralo se da je podtip citotoksičnog proteina povezanog s T limfocitima (CTLA) te tako spada u tu skupina proteina. Nazvali su ga CTLA-8 (11). Međutim, 1995. godine prepoznat je kao novi citokin i nazvan IL-17. Porodica IL-17 sastoji se od šest građom srodnih bjelančevina od kojih su međusobno najbliži IL-17A i IL-17F. Do danas je većina istraživanja bila usmjerena na IL-17A, IL-17E i IL-17F. IL-17A i IL-17F visoko su homologni i dijele receptore što znači da imaju vrlo slične funkcije. Stvaraju stanice Th17, dok ostali članovi porodice stvaraju razne vrste stanica (7, 11).

1.3. Sol, hipertenzija i stanice T

Hipertenzija je vodeći uzrok smrtnosti i invaliditeta od kardiovaskularnih i bubrežnih bolesti uključujući infarkt miokarda, zatajenje srca, moždani udar i kroničnu bubrežnu bolest. Rastuća prevalencija hipertenzije, dobrim dijelom zbog promjena u prehrani i preradi hrane, čini je velikim javnozdravstvenim problemom (12). Samo u SAD-u hipertenzija pogađa približno jednu trećinu svih odraslih osoba starijih od 18 godina, a to se povećava na dvije trećine u dobi od 60 godina (13). Visoki krvni tlak 2010. godine bio je rangiran kao vodeći pojedinačni čimbenik rizika za bolesti cjelokupno (12).

Mnoga istraživanja pokazala su kako je hipertenzija upalna bolest karakterizirana aktivacijom T limfocita, infiltracijom ciljnih organa kao što su bubreg i krvožilni sustav te produkcijom citokina. Citokini zatim dovode do zadržavanja soli i vode, vaskularne disfunkcije i oštećenja bubrega (12). Ono što je posebno zanimljivo u nekim istraživanjima jest to da, primjerice, miševi s nedostatkom proinflatornog citokina IL-17A pokazuju hipertenziju, oslabljenu bubrežnu i vaskularnu funkciju te očuvanje vaskularne funkcije u odgovoru na angiotenzin II-induciranu (Ang II-induciranu) hipertenziju (14). IL-17A regulira također i proksimalne i distalne renalne prijenosnike natrija i doprinosi Ang II-induciranoj ozljedi bubrega (12).

Činjenica da je povećan unos soli usko povezan s nastankom arterijske hipertenzije, opće je poznata (15). Naime, povećan unos soli djeluje na renin-angiotenzin-aldosteron sustav (RAAS) suprimirajući ga. RAAS je središnji element u kontroli ravnoteže soli i vode u tijelu

kao i u ravnoteži arterijskog krvnog tlaka (16). Djelovanje RAAS-a pod kontrolom je renina koji se oslobađa iz bubrežnih jukstaglomerularnih epitelioidnih stanica (JGE stanica) u cirkulaciju. Oslobađanje renina regulirano je složenim uzajamnim djelovanjem nekoliko lokalno djelujućih hormona ili mehanizama i dulje povratne veze što uključuje i unos soli (16). U fiziološkim uvjetima akutno i/ili dugoročno povišen unos soli suprimira lučenje renina te smanjuje aktivnost RAAS-a, dok ju redukcija unosa soli stimulira. S druge strane, promjene u aktivnosti RAAS-a imaju ključnu ulogu u etiopatologiji raznih patoloških stanja, kao što su bubrežne bolesti i bolesti kardiovaskularnoga sustava. U tim bolestima prisutno je patološko povišenje aktivnosti RAAS-a koji u početnim fazama bolesti predstavlja kompenzacijski mehanizam, ali s razvojem bolesti postaje aktivni supstrat progresije bolesti te krajnjeg oštećenja organa (17).

Međutim, pažnju treba obratiti i na to kako povećan unos soli direktno utječe i na funkciju stanica imunološkog sustava (12). To nam potvrđuje više istraživanja koja su provedena na miševima (18, 19). Naime, visoki unos soli pogoduje proupalnom statusu T limfocita koje je posredovano promjenama u kinazama osjetljivim na sol. Visokoslanom dijetom (VSD) naive stanice T proliferiraju se u Th17 stanice putem serum glukokortikoidne kinaze 1 (SGK1) (12). Povećanje koncentracije soli inducira ekspresiju SGK1, potiče ekspresiju IL-23R i pojačava diferencijaciju Th17 stanica *in vitro* i *in vivo* ubrzavajući razvoj autoimunosti. SGK1, dakle igra ključnu ulogu u indukciji patogenih Th17 stanica i pruža molekularni uvid u mehanizam pomoću kojeg čimbenik okoliša, kao što je visokoslana dijeta, potiče razvoj Th17 i potiče upalu tkiva (19).

Proliferacija stanica T u Th17 stanice kao posljedica visokoslane dijetete u mnogim istraživanjima povezuje se s nastankom raznih autoimunih bolesti. Naime, ograničeni unos soli u organizam može smanjiti upalni odgovor u bolesti kao što je reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus (20). Povećan broj Th17 stanica primijećen je i u mišjem modelu multiple skleroze, eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (EAE) (19). Također, Th17 stanice imaju jednu od glavnih uloga u patofiziologiji različitih bolesti kostiju uključujući osteoporozu (20).

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja bila je da će kratkotrajno povećan unos soli (7 i 14 dana) dovesti do povećanja udjela Th17 limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora.

3. CILJ

Cilj istraživanja bio je ispitati učinak kratkotrajne (7 i 14 dana) dijeta s povećanim udjelom soli na udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je bila ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje. Eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjericama za dobrobit laboratorijskih životinja koje se koriste u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU) te ju je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/14-08/06, Ur.br. 2158-61-07-14-04) i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-005). Istraživanje je dio znanstvenog projekta koji financira Hrvatska zaklada za znanost „Poremećena vazorelaksacija i endotelno-leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ (HRZZ IP-09-2014-6380/V-ELI Athero).

Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.2. Materijali

U istraživanju su korišteni Sprague-Dawley štakori u dobi od šest do devet tjedana. Životinje su bile uzgojene u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku te su tijekom pokusa bile nastanjene u eksperimentalnoj nastambi. Tijekom cijelog pokusa imale su pristup hrani i vodi *ad libidum* te su bile izložene dvanaestosatnom ciklusu svjetla i tame. Pokusne životinje bile su podijeljene u tri skupine (N = 6 – 9 po skupini).

Prvu ispitivanu skupinu činile su životinje izložene visokoslanjoj dijeti tijekom sedam dana (VSD-7; 4 % NaCl, Mucedola, Italija). Druga skupina životinja bila je na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana (VSD-14), dok je treća skupina životinja bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom (KONTROLA). Životinje su bile žrtvovane dekapitacijom nakon anestezije kombinacijom ketamina (75 mg/kg, 25 mg/ml Ketanest S, Pfizer) i midazolama (2,5 mg/kg, 5 mg/ml Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma).

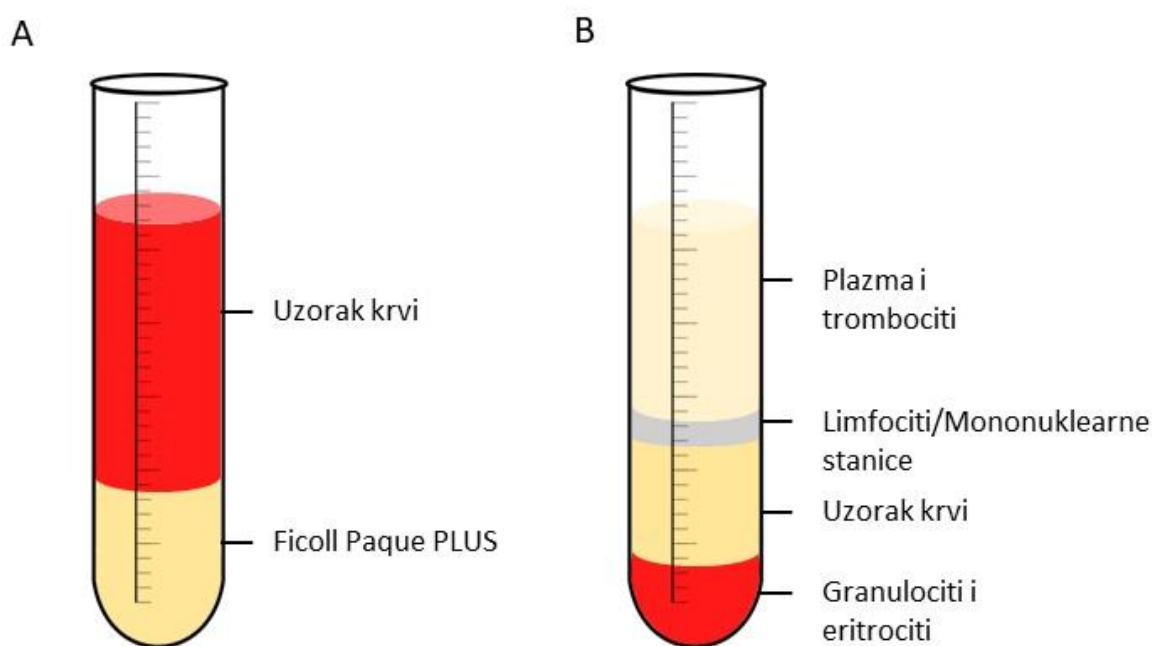
4.3. Metode

4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Periferna krv sakupljena je u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA. Mononuklearne stanice iz periferne krvi (PBMC) izolirane su na gradijentu fikola (Ficoll-Paque PREMIUM 1,084, GE Healthcare) (Slika 2.). Potom je određena koncentracija stanica pomoću Burker-Turk komorice gdje smo koristili 50 μ l suspenzije stanica i 100 μ l otopine tripanskog plavila. Koncentracija je određena prema sljedećoj formuli:

$$\text{Koncentracija stanica} = (\text{BROJ STANICA}/4) \times 3 \times 10^4 / \text{ml}$$

**dilucijski faktor je 3 (50 u 100 μ l)*



Slika 2. Izolacija perifernih mononuklearnih stanica na gradijentu fikola – slika 2 A prikazuje uzorak krvi nadslojen na fikol, dok slika 2 B prikazuje slojeve nastale odvajanjem sastavnica krvi na gradijentu fikola prilikom centrifugiranja. (Sliku nacrtala Martina Mihalj, objavljeno uz dozvolu autorice)

4.3.2. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova

Nakon žrtvovanja štakorima je otvoren abdomen te su uz pažljivu preparaciju mezenterija izolirani mezenterični limfni čvorovi. Suspenzija stanica mezenteričnih limfnih čvorova pripravljena je nježnom disocijacijom tkiva pritiskanjem limfnih čvorova između dvaju matiranih krajeva histoloških/predmetnih stakalaca te susljednim propuštanjem dobivene suspenzije kroz pamučnu vatu. Tako pripravljene suspenzije stanica i PBMC bile su kultivirane u potpunom RPMI mediju u prisutnosti PMA, ionomicina te Brefeldina A tijekom četiri sata te potom obrađene za analizu protočnim citometrom.

4.3.3. Protočna citometrija

Limfociti izolirani iz mLN te PBMC bili su označeni FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience), PerCP-eFluor710 anti-CD3 (klon G4.18, eBioscience) te anti-IL17 PE (klon eBio17B7, eBioscience) prema standardnom protokolu za bojanje površnih staničnih i nuklearnih antigena uz pomoć "Foxp3 staining" seta pufera (eBioscience). Mrtve stanice bile su isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (LIVE/DEAD®Fixable Near-IR stain, Thermo Fisher), a dvostruke (tzv. *doublets*) stanice analizom FSS-A i FSS-H parametara.

Analizirali smo 50 000 živih jednostrukih stanica pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD) te FlowLogic programa (Inivai Technologies, Australija).

4.4. Statističke metode

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između tri nezavisne skupine bile su testirane jednosmjernom analizom varijanci (one way ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallis testom. Razlike između grupa su dodatno testirane Tukey post hoc testom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardne devijacije, a razina značajnosti bila je postavljena na $p < 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program Sigma Stat 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, SAD).

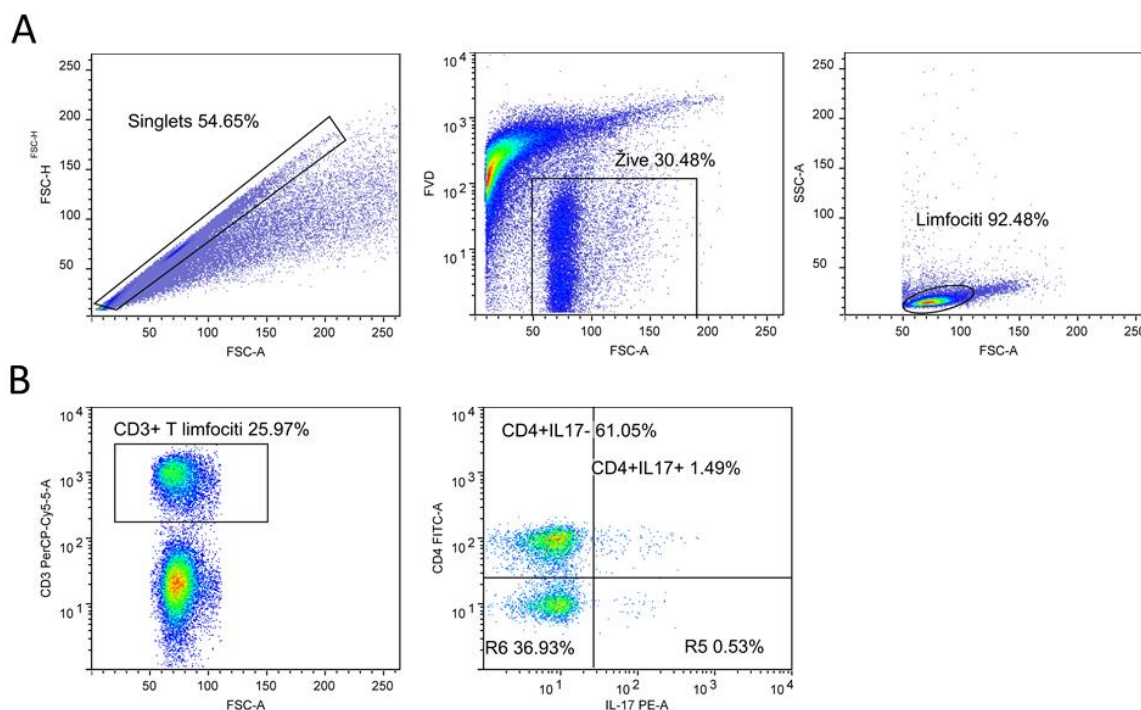
5. REZULTATI

Dijeta s povećanim udjelom soli nije značajno utjecala na srednji arterijski tlak, kao niti na tjelesnu masu životinja koje su bile uključene u pokus (Tablica 1). Prosječna aritmetička sredina tlakova svih ispitivanih životinja u pokusu je iznosila 103 mmHg sa standardnom devijacijom 4,51 mmHg.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da dijeta s visokim udjelom soli dovodi do statistički značajnih promjena u frekvencijama Th17 pomoćničkih limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Slika 3 prikazuje primjer analize kojom su u uzorku perifernih mononuklearnih stanica i suspenziji stanica izoliranih iz mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora identificirani pojedinačni živi limfociti (Slika 3 A) te potom pomoćnički T limfociti (CD3+CD4+) koji luče IL-17 nakon kratkotrajne stimulacije s PMA i ionomicinom u prisutnosti Brefeldina A (Slika 3 B).

Tablica 1. Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja koje su korištene u pokusu

Obilježje (mjerna jedinica)	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		
	Niskoslana dijeta	Visokoslana dijeta tijekom 7 dana	Visokoslana dijeta tijekom 14 dana
Srednji arterijski tlak (mm Hg)	103 (2,53)	108 (5,26)	99 (9,57)
Tjelesna masa (g)	408 (16,7)	362 (7,22)	409 (31,7)

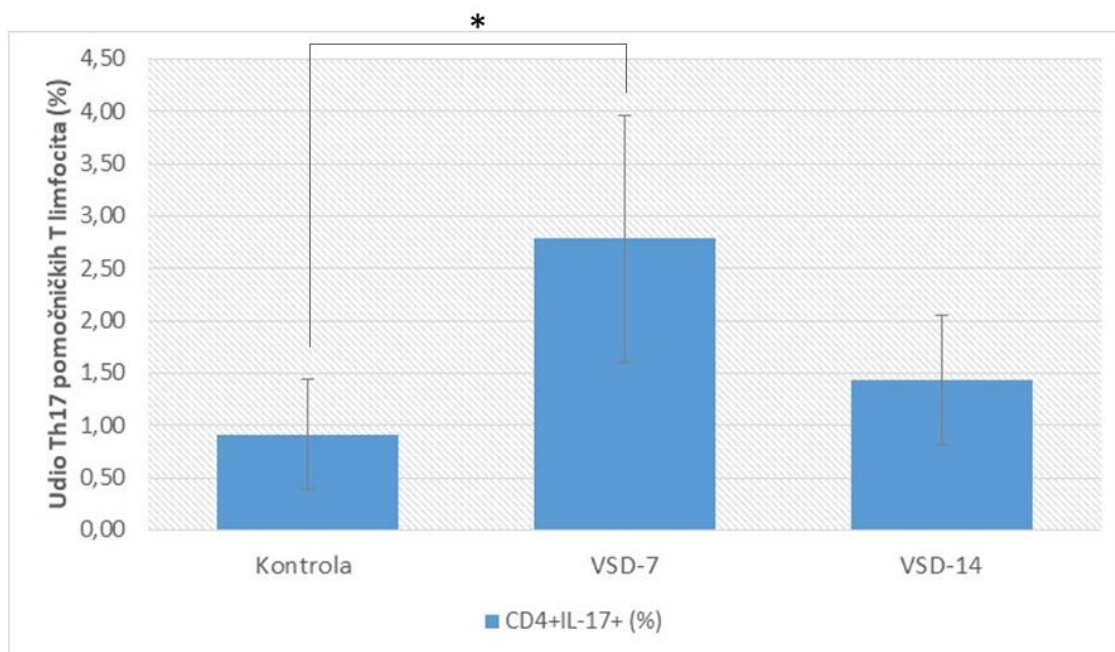


Slika 3. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora protočnom citometrijom

Periferne mononuklearne stanice izolirane iz krvi štakora na gradijentu fikola analizirane su na protočnom citometru BD FACS Canto II. Slika 3 A prikazuje strategiju susljednog postavljanja prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica. Mrtve stanice su bile isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD), dok su jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene analizom FSS-A i FSS-H parametara. Slika 3 B prikazuje strategiju analize CD4 T limfocita, koji luče IL-17.

Usporedba udjela Th17 pomoćničkih limfocita u populaciji perifernih mononuklearnih stanica izoliranih iz Sprague-Dawley štakora pokazala je značajan porast Th17 stanica nakon sedam dana visokoslane dijeta u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora na standardnoj ishrani [2,79 (1,18) % u odnosu na 0,92 (0,52) %; $p = 0,028$; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test], dok je tijekom dodatnih sedam dana dijeta s visokim udjelom soli došlo do gotovo potpune normalizacije frekvencije Th17 stanica [1,44 (0,62) % u odnosu na 0,92 (0,52) %; $p = 0,655$;

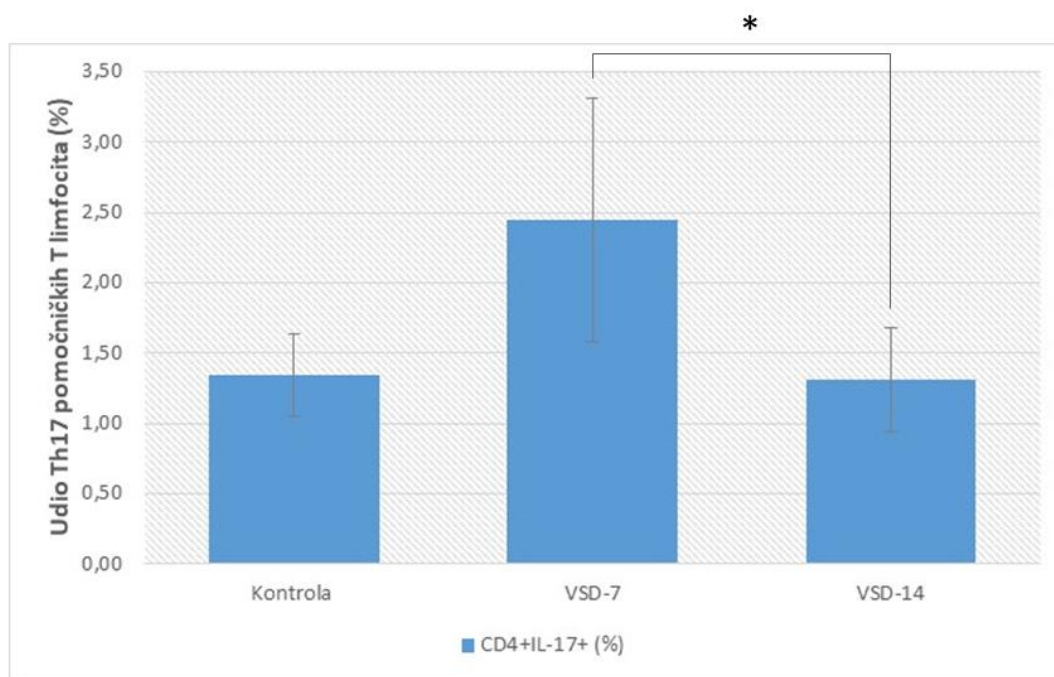
jednosmjerna ANOVA]. Nismo pronašli statistički značajnu razliku između skupina štakora koje su bile izložene visokoslanjoj dijeti tijekom 7 i 14 dana [2,79 (1,18) u odnosu na 1,44 (0,62); $p = 0,106$; jednosmjerna ANOVA].



Slika 4. Udio Th17 limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

*Slika 4 prikazuje udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. Kontrola – štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; VSD-7 – štakori na visokoslanjoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom 7 dana; VSD-14 – štakori na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana.*

Nadalje, usporedba frekvencija Th17 stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora pokazala je slične razlike. Udio Th17 stanica nakon sedam dana visokoslane dijeta bio je veći u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora na standardnoj ishrani, međutim, razlike nisu dosegle statističku značajnost [2,45 (0,86) % u odnosu na 1,35 (0,29) %; $p = 0,054$; jednosmjerna ANOVA]. Tijekom dodatnih sedam dana dijeta s visokim udjelom soli dolazi do gotovo potpune normalizacije frekvencije Th17 stanica [1,31 (0,37) % u odnosu na 1,35 (0,29)%; $p = 0,955$; jednosmjerna ANOVA]. Frekvencije Th17 limfocita u mezenteričnim čvorovima štakora na sedmodnevnoj visokoslanjoj dijeti bile su statistički značajno više u odnosu na frekvencije istih stanica kod štakora koji su dodatnih sedam dana bili izloženi dijeti s povećanim udjelom soli [2,45 (0,86) % u odnosu na 1,35 (0,29) %; $p = 0,046$; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test].



Slika 5. Udio Th17 limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijeta s visokim udjelom soli

Slika 5 prikazuje udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 u mezenteričkim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom.

**statistički značajna razlika, $p < 0,05$. Kontrola – štakori koji su htranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; VSD-7 – štakori na visokoslanjoj dijeti (hrana koja sadrži 4% NaCl) tijekom 7 dana; VSD-14 – štakori na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana.*

6. RASPRAVA

Štetni učinci prehrane s visokim udjelom soli na zdravlje ljudi dobili su mnogo pozornosti u posljednjih nekoliko godina. Prema procjenama SZO-a kronične nezarazne bolesti, u koje ubrajamo arterijsku hipertenziju, dijabetes, debljinu, srčane, bubrežne i plućne bolesti te rak, odgovorne su za 86 % preuranjenih smrtnih slučajeva u Europi. Za pojavu svih navedenih bolesti kao jedan od najvažnijih čimbenika rizika navodi se prekomjeren unos kuhinjske soli (3, 21). Iako je dobro poznato kako je visok unos soli u organizam povezan sa svim navedenim bolestima, sve je više dokaza da višak soli također utječe i na imunološki sustav i može se smatrati čimbenikom rizika u različitim autoimunim bolestima (21). Eksperimentalne studije na životinjama pružile su čvrste dokaze kako visoke količine soli izazivaju i utječu na ozbiljnost nekoliko modela autoimunih bolesti kao što su kolitis, sistemski eritematozni lupus (SLE) i multipla skleroza (MS) (8).

Koristeći mišji model multiple skleroze (EAE), Wu i suradnici dokazali su kako je visokosлана dijeta rezultirala povišenim brojem Th17 stanica u središnjem živčanom sustavu i mezenteričnim limfnim čvorovima (19), što se slaže s rezultatima ovog istraživanja. U našem istraživanju ispitivali smo učinak sedmodnevne i četrnaestodnevne dijeta s povećanim udjelom soli na udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima. Nakon sedam dana visokoslane dijeta broj Th17 stanica u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima značajno je porastao u usporedbi s kontrolnom skupinom na standardnoj ishrani.

Naime, IL-17 koji proizvode CD4+ pomoćničke T stanice, odnosno Th17 stanice, ima ključnu ulogu u razvoju mnogih autoimunih bolesti (18). S druge strane, IL-23, koji je također ovisan o Th17, pokazao se kritičan u nastanku i razvoju EAE-a (22).

Danas se malo zna o okolišnim čimbenicima koji izravno utječu na Th17 stanice. Kleinewietfeld i suradnici pokazali su da povećane koncentracije soli pronađene lokalno pod fiziološkim uvjetima *in vivo* dramatično pojačavaju indukciju mišjih i ljudskih Th17 stanica (18), što se također slaže s našim istraživanjem. Uvjeti visoke soli aktiviraju između ostalih serum glukokortikoidni kinaza 1 put (SGK1) tijekom citokin-inducirane Th17 polarizacije (18, 23). Utišavanje gena ili kemijska inhibicija SGK1 poništava razvoj Th17 stanica induciranih visokoslanom dijetom. Th17 stanice generirane pod visokim sadržajem soli pokazuju visoko

patogeni i stabilni fenotip karakteriziran povećanom regulacijom proupalnih citokina GM-CSF, TNF α i IL-2. Miševi hranjeni hranom visoke soli razvijaju teži oblik EAE, u skladu s proširenim infiltriranim središnjim živčanim sustavom i periferno induciranim antigen specifičnim Th17 stanicama. Stoga, povećani unos soli iz prehrane može predstavljati faktor rizika za razvoj autoimunih bolesti indukcijom patogenih Th17 stanica (18).

Prvo istraživanje koje je ispitivalo učinak soli na adaptivni imunološki odgovor u autoimunih bolesnika proveli su Scrivero i suradnici 2017. godine (24). Oni su istraživali učinak restriktivnog unosa soli na učestalost i funkciju Th17 limfocita i regulatornih T limfocita (Treg) u bolesnika s reumatoidnim artritisom (RA) i sistemskim eritemskim lupusom (SLE). Kod pacijenata s RA, ali i kod pacijenata sa SLE, uočena je sklonost smanjenja učestalosti Th17 stanica. S druge strane, Treg stanice pokazuju suprotnu tendenciju te se njihova učestalost povećava, što se moglo i očekivati jer spomenute stanice imaju obratne funkcije (7, 25). Th17 stanice uzrokuju autoimunost i upalu, a Treg stanice inhibiraju ove pojave i održavaju imunološku homeostazu (25). Otkrivanje mehanizama koji utječu na ravnotežu Th17/Treg stanica od ključne je važnosti ako želimo bolje razumjeti autoimunost i toleranciju. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju kako ograničeni unos soli može pridonijeti smanjenju proupalnog odgovora.

To možemo usporediti i s našim istraživanjem u kojem smo uočili da kratkotrajna visokoslana dijeta dovodi do ekspanzije Th17 stanica s proupalnim učinkom. Međutim, ti učinci su kratkotrajni, obzirom da smo u skupini ispitivanih životinja koje su bile izložene četrnaestodnevnoj visokoslanjoj dijeti dolazi do normalizacije frekvencija Th17 stanica što upućuje na aktivaciju kompenzacijskih mehanizama s protuupalnim učincima, a koji za sada ostaju nepoznati.

7. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pokazalo je da kratkotrajni sedmodnevni povećan unos soli dovodi do ekspanzije Th17 limfocita, što sugerira proupalni učinak visokog unosa soli, međutim, povećan unos soli kroz duže razdoblje vjerojatno aktivira kompenzacijske mehanizme koji su u našem istraživanju rezultirali normalizacijom frekvencije Th17 stanica nakon 14 dana.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati učinak kratkotrajne (7- i 14-dnevna) dijeta s povećanim udjelom soli na udio CD4 T limfocita koji luče IL-17 u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

Materijali i metode: Sprague-Dawley štakori u dobi od šest do devet tjedana bili su podijeljeni u tri skupine (N = 6). Prva skupina životinja bila je na visokoslanjoj dijeti tijekom sedam dana (VSD-7) (4 % NaCl, Mucedola, Italija), druga skupina životinja bila je na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana (VSD-14) dok je treća skupina životinja bila hranjena standardnom laboratorijskom hranom *ad libidum* (KONTROLA). Nakon žrtvovanja dekapitacijom prikupljene stanice iz uzoraka perifernog krvi i mezenteričnih limfnih čvorova analizirane su protočnim citometrom (BD FACS Canto II).

Rezultati: Nakon sedam dana visokoslane dijeta broj Th17 stanica u perifernoj krvi značajno je porastao u usporedbi s kontrolnom skupinom na standardnoj ishrani, dok je tijekom dodatnih sedam dana dijeta s visokim udjelom soli došlo do gotovo potpune normalizacije frekvencije Th17 stanica. Frekvencije Th17 limfocita u mezenteričnim čvorovima štakora na sedmodnevnoj visokoslanjoj dijeti bile su statistički značajno više u odnosu na frekvencije istih stanica kod štakora koji su bili izloženi dodatnih sedam dana dijeti s povećanim udjelom soli.

Zaključak: Kratkotrajni sedmodnevni povećan unos soli dovodi do ekspanzije Th17 limfocita, što sugerira proupalni učinak visokog unosa soli, međutim, povećan unos soli kroz duže razdoblje vjerojatno aktivira kompenzacijske mehanizme koji su u našem istraživanju rezultirali normalizacijom frekvencije Th17 stanica nakon 14 dana.

Ključne riječi: IL-17, natrijev klorid, protočna citometrija, Th17 limfociti, visokoslanja dijeta

9. SUMMARY

The effect of short-term high salt diet on frequencies of Th17 cells in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats

Objectives: The effect of short-term high salt diet (7 and 14 days) on CD4 T lymphocytes producing IL17 in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats.

Study design: Experimental research

Materials and Methods: Sprague Dawley rats at 6-9 weeks of age were divided into three groups (N = 6). The first group of animals was fed high salt diet for 7 days (HSD-7; 4% NaCl, Mucedola, Italy), the second group was fed high salt diet for 14 days (HSD-14) while the third group of animals was fed standard laboratory chow *ad libidum* (CONTROL). After sacrifice by decapitation, the cells collected from peripheral blood and mesenteric lymph nodes were analyzed by flow cytometry (BD FACS Canto II).

Results: After 7 days of high salt diet, the frequency of Th17 cells in peripheral blood was significantly increased compared to control group fed standard diet, and the additional 7 days of high-salt diet resulted in almost complete normalization of Th17 cell frequency. In the case of mesenteric lymph nodes, frequency of Th17 cells in HSD-7 group of rats was significantly increased compared to HSD-14 group of animals.

Conclusion: A short term increase of salt intake leads to Th17 lymphocyte expansion, suggesting a pro-inflammatory effect of high salt diet. However, over a longer period, the increased salt intake presumably activates the compensatory mechanisms that after 14 days resulted in the normalization of the Th17 cell frequency in our study.

Keywords: flow cytometry, high salt diet, IL-17, sodium chloride, Th17 lymphocytes

10. LITERATURA

1. Higdon J, Delage B, Sodium (Chloride), Linus Pauling Institute, Oregon State University, 2016.
2. Verbanec D, Poremećaji cirkulacije i prehrana – Sol, Pliva zdravlje, 2011. Dostupno na adresi: <https://www.plivazdravlje.hr/centar/prehrana/19/namirnica/76/Sol.html>. Datum pristupa: 26. travnja 2019.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015. – 2019. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019..pdf>. Datum pristupa: 15. travnja 2019.
4. WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva, World Health Organization (WHO), 2012.
5. Drenjančević I, Prekomjieran unos kuhinjske soli i utjecaj na zdravlje vaskularnog i koštanog sustava kod mladih ljudi. // 1. Međunarodni znanstveno.stručni skup “Fizioterapija u sportu, rekreaciji i wellnessu”, Vukovar, Hrvatska, 2015.
6. Cappuccio FP, Cardiovascular and other effects on salt consumption. *Kidney Int Suppl* (2011) 2013 Dec; 3(4): 312–315.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
8. Willebrand R, Kleinewietfeld M. The role of salt for immune cell function and disease, *Immunology*, 2018.
9. Marković-Pleše S, Mehanizmi djelovanja interferona beta u liječenju pacijenata s multiplom sklerozom. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2011.
10. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. 2007; *Nat Immunol* 8:942-949.
11. Taku Kuwabara, Fumio Ishikawa, Motonari Kondo, Terutaka Kakiuchi. “The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, Article ID 3908061, 11 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3908061>.

12. Norlander AE, Saleh MA, Pandey AK, Itani HA, Wu J, Xiao L, i sur. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. *JCI Insight*. 2017;2(13):e92801. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92801>.
13. Nwankwo T, Yoon SS, Burt V, Gu Q. 2013. Hypertension Among Adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2012. *NCHS Data Brief*. 2013;(133):1–8.
14. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, i sur. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2010;55(2):500–507.
15. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*, Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
16. Schweda F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone pathway. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2015) 467: 565. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1668-y>
17. Ružić A. Određivanje plazma reninske aktivnosti i koncentracije aldosterona u serumu, kao indikatora unosa kuhinjske soli u organizam zdravih mladih ispitanika, Diplomski rad, Sveučilište JJ Strossmayera u Osijeku, 2017.
18. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, i sur. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013 Apr 25; 496(7446):518–22. <https://doi.org/10.1038/nature11868> PMID: 23467095
19. Wu C, Yosef N, Thalhammer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, i sur. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013 Apr 25; 496(7446):513–7. <https://doi.org/10.1038/nature11984> PMID: 23467085
20. Dar HY, Singh A, Shukla P, Anupam R, Mondal RK, Mishra PK, i sur. High dietary salt intake correlates with modulated Th17-Treg cell balance resulting in enhanced bone loss and impaired bone-microarchitecture in male mice, *Scientific reports*, 2018, DOI:10.1038/s41598-018-20896-y
21. Haase S, Wilck N, Kleinewietfeld M, Müller D, Ralf A. Sodium chloride triggers Th17 mediated autoimmunity, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.016>
22. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.

23. 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.
24. Scrivo R, Massaro L, Barbati 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. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184449>
25. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):730. Published 2018 Mar 3. doi:10.3390/ijms19030730

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

IME I PREZIME: Marija Lovrić

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 18. ožujka 1996., Split

ADRESA STANOVANJA: Ante Starčevića 60, 21210 Solin

Email: marija.lovric96@gmail.com, Mobitel: 091/722/6397

OBRAZOVANJE:

2002. – 2010. Osnovna škola don Lovre Katića, Solin

2010. – 2014. IV. gimnazija Marko Marulić, Split

2014. – 2017. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu – Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2017. – 2019. Medicinski fakultet Osijek – diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

JEZICI:

Engleski jezik: kompetentno služenje jezikom (C2)

Njemački jezik: osnovno služenje jezikom (A2)

Talijanski jezik: osnovno služenje jezikom

RAČUNALNE VJEŠTINE: vješto korištenje Microsoft Office paketom (Word, Excell, PowerPoint), služenje internetom

OSTALI INTERESI: pjevanje, volontiranje