

# Učinak kratkotrajne dijetе s povećanim udjelom NaCl na zastupljenost Th17 i Treg limfocita u perifernoј krvi zdravih mladih ispitanika

---

Krstanović, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:427708>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ines Krstanović**

**UČINAK KRATKOTRAJNE DIJETE S**  
**POVEĆANIM UDJELOM NAČL NA**  
**ZASTUPLJENOST TH17 I TREG**  
**LIMFOCITA U PERIFERNOJ KRVI**  
**ZDRAVIH MLADIH ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

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

**Ines Krstanović**

**UČINAK KRATKOTRAJNE DIJETE S**  
**POVEĆANIM UDJELOM NACL NA**  
**ZASTUPLJENOST TH17 I TREG**  
**LIMFOCITA U PERIFERNOJ KRVI**  
**ZDRAVIH MLADIH ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

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

Neposredni voditelj: Nikolina Kolobarić, mag. prot. nat. et amb.

Rad ima 30 listova i 7 slika.

*Predgovor radu*

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu, pomoći i savjetima.*

*Također, ovim putem se zahvaljujem Nikolini Kolobarić, mag. prot. nat. et amb. na svojoj pruženoj pomoći tijekom izvođenja istraživanja i pisanja rada, na šalama te beskonačnom bodrenju i razumijevanju.*

*Posebno hvala mojoj obitelji, prijateljima i dečku na pruženoj podršci tijekom izrade diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Dijeta s visokim udjelom soli</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. T limfociti</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.1. Th17 limfociti</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.2. Treg limfociti</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Kinaza 1 regulirana serumom i glukokortikoidima</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3.1. Učinci SGK1 na Th17 stanice</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3.2. Učinci SGK1 na Treg stanice</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Plastičnost stanica</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5. Diferencijacijski put</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5.1. Diferencijacijski put Th17 stanica</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5.2. Diferencijacijski put Treg stanica</b> .....	<b>6</b>
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>7</b>
<b>3. CILJ</b> .....	<b>8</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>9</b>
<b>4.1. Ustroj studije</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2. Ispitanici</b> .....	<b>9</b>
<b>4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi</b> .....	<b>10</b>
<b>4.3.2. Smrzavanje / odmrzavanje mononuklearnih stanica periferne krvi</b> .....	<b>11</b>
<b>4.3.3. Magnetsko sortiranje pomoćničkih CD4+ T limfocita</b> .....	<b>12</b>
<b>4.3.4. Poliklonska aktivacija mononuklearnih stanica periferne krvi</b> .....	<b>12</b>
<b>4.4. Statističke metode</b> .....	<b>14</b>
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1. Th17 stanice</b> .....	<b>15</b>
<b>5.2. Treg stanice</b> .....	<b>17</b>
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>23</b>

<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>24</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>25</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>30</b>

## Popis kratica

APC – Antigen prezentirajuće stanice (engl. *Antigen presenting cells*)

BSA – Goveđi serumski albumin (engl. *Bovine serum albumin*)

CaCl<sub>2</sub> – Kalcijev klorid

CD4<sup>+</sup> T limfociti – T limfociti koji na svojoj membrani imaju stanični diferencijacijski antigen 4 (engl. *Cluster of differentiation 4 T lymphocytes*)

CO<sub>2</sub> – Ugljikov dioksid

DMSO – Dimetil sulfoksid

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina

FBS – Fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

FcR – Fc receptor (engl. *Fc Receptor*)

FMO – Fluorescencijski minus jedan (engl. *Fluorescence Minus One*)

FOXO1 – Transkripcijski čimbenik FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*)

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

FSC – Raspršenje prema naprijed (engl. *Forward side scatter*)

FSC-A – Površina raspršenja prema naprijed (engl. *Forward side scatter area*)

FSC-H – Visina raspršenja prema naprijed (engl. *Forward side scatter height*)

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

GM – CSF – Faktor stimulacije granulocitno – makrofagnih kolonija (engl. *Granulocyte – macrophage colony – stimulating factor*)

IFN $\gamma$  – Interferon gamma (engl. *Interferon gamma*)

IL – Interleukin

IL-23R – Receptor interleukina 23 (engl. *IL-23 receptor*)

iTreg stanice – Inducirane Treg stanice (engl. *Induced regulatory T cells*)

MAPK – Mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen activated protein kinase*)

MHC – Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Major histocompatibility complex*)

mTORC2 – Proteinski kompleks akutno neosjetljiv na rapamicin (engl. *Mammalian target of rapamycin*)

NaCl – Natrijev klorid

NaN<sub>3</sub> – Natrijev azid

NFAT5 – Nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5 (engl. *Nuclear factor of activated T cells 5*)

NK stanice – Prirodnoubilačke stanice (engl. *Natural killer cells*)

NSD – Niskoslana dijeta



PBMC – Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS – Fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. *Phosphate – buffered saline*)

PMA – Forbol – 12 – miristat – 13 – acetat (engl. *phorbol – 12 – myristate – 13 – acetate*)

RCF – Relativno centrifugalno polje (engl. *Relative centrifugal field*)

rorc gen – gen za receptor siročadi c povezan s receptorom retinoične kiseline (engl. *Retinoic – acid – receptor – related orphan receptor c*)

ROR $\gamma$ t – Transkripcijski čimbenik (engl. *Retinoic – acid – receptor – related orphan nuclear receptor gamma*)

RPM – Okretaji u minuti (engl. *Revolutions per minute*)

RPMI – 1640 – Roswell Park Memorial Institute medij (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*)

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

SMAD2 – Transkripcijski čimbenik SMAD2 (engl. *Sma and Mad related protein 2*)

SMAD3 – Transkripcijski čimbenik SMAD3 (engl. *Sma and Mad related protein 3*)

SSC – Postranično raspršenje (engl. *Side scatter*)

SSC-A – Površina postraničnog raspršenja (engl. *Side scatter area*)

STAT3 – Transduktor signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)

STAT5 – Transduktor signala i aktivator transkripcije 5 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*)

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

Tfh – folikularne pomoćničke T stanice (engl. *follicular T helper cells*)

TGF –  $\beta$  – Transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*)

Th – pomoćničke T stanice / pomoćnički T limfociti (engl. *T helper cells*)

TNF – Tumorski čimbenik nekroze (engl. *Tumor necrosis factor*)

TonEBP – Protein koji veže pojačivač koji reagira na toničnost (engl. *Tonicity – responsive enhancer binding protein*)

Treg stanice – Regulatorne T stanice / regulatorni T limfociti (engl. *Regulatory T cells*)

VSD – Visokoslana dijeta

### 1. UVOD

#### 1.1. Dijeta s visokim udjelom soli

Sve veća proizvodnja prerađene hrane te naglo naseljavanje gradova praćeno promjenom načina života značajno su utjecali na prehrambene navike pojedinaca, a uz to visoko prerađena hrana postaje sve pristupačnija. Iz spomenutih razloga, ljudi se okreću konzumiranju hrane koja je bogata zasićenim mastima, transmastima, šećerima i solju (1). Narušene prehrambene navike pridonose mnogobrojnim bolestima te se smatraju čimbenicima rizika za pretilost i bolesti kardiovaskularnog sustava. Kuhinjska sol (natrijev klorid, NaCl), odnosno  $\text{Na}^+$ , je esencijalni nutrijent koji sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima kod ljudi, međutim pretjerana konzumacija soli ima štetne učinke na krvožilni sustav, uzrokujući hipertenziju te ugrožavajući rad srca i bubrega (2). Zastupljenost NaCl-a u zapadnjačkoj prehrani je relativno visoka, kao i konzumacija prerađene i brze hrane (engl. *Fast food*), čiji je udio soli znatno veći u usporedbi s domaćom hranom (3). Pretjerana količina kuhinjske soli usko je povezana s razvojem kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara (3), a osim toga, prethodna istraživanja su pokazala da prekomjerni unos kuhinjske soli dovodi do aktivacije urođenog i stečenog imunološkog sustava, promičući razvoj pro-upalnih T stanica te upalne ozljede ciljnih organa (2).

#### 1.2. T limfociti

Glavna uloga imunološkog sustava je zaštita organizma od patogenih mikroorganizama, no ono također može proizvesti tzv. auto-reaktivne stanice koje prepoznaju vlastito tkivo kao strano što dovodi do razvoja autoimunih bolesti.  $\text{CD4}^+$  T stanice su podvrsta T limfocita, koje također nazivamo pomoćničkim T limfocitima jer „pomažu“ u usmjeravanju upalnog odgovora ovisno o vrsti štetnog čimbenika, odnosno u aktivaciji obrambenih mehanizama optimalnih za neutralizaciju štetnog čimbenika. Naivne  $\text{CD4}^+$  T stanice aktiviraju se vezanjem specifičnog T staničnog receptora (TCR; engl. *T cell receptor*) i CD28 molekule na glavni kompleks histokompatibilnosti (MHC; engl. *Major histocompatibility complex*) koji sadrži dio stranog antigena, odnosno na kostimulacijsku molekulu B7,1 ili B7,2 na površini antigen prezentirajuće stanice (APC; engl. *Antigen presenting cells*) (4). Podvrste T limfocita, kao važni dijelovi stečenog imunološkog sustava, igraju ključnu ulogu u

## UVOD

iskorjenjivanju invazivnih virusa, bakterija i drugih patogena infiltriranjem u ozlijeđena tkiva i stvaranjem citokina i / ili citotoksičnih čimbenika, koji sudjeluju u borbi protiv specifičnih patogena (5). Ovisno o antigenu i jačini stimulacije, citokinskom okolišu, ko-stimulatorima i raznim dodatnim čimbenicima, CD4+ T stanice mogu se podijeliti u različite subpopulacije sa specijaliziranim funkcijama (6). Među njih ubrajamo T pomoćničke stanice 1, 2 i 17 (Th1, Th2, Th17; engl. *T helper cells 1, 2, 17*), folikularne pomoćničke T stanice (Tfh; engl. *T follicular helper cells*) i regulatorne T stanice (Treg stanice; engl. *Regulatory T cells*). Konačnu diferencijaciju prvenstveno određuje neposredni stanični okoliš (npr. citokini) tijekom T stanične aktivacije (4).

### 1.2.1. Th17 limfociti

Th17 stanice su podskupina CD4+ pomoćničkih T stanica, koje imaju važnu ulogu u obrani organizma od izvanstaničnih bakterija i gljivica, a obilježava ih proizvodnja interleukina IL-17A, IL-17F i IL-21 (2). ROR $\gamma$ t (od engl. *Retinoic – acid – receptor – related orphan nuclear receptor gamma*) je ključni transkripcijski čimbenik koji upravlja diferencijacijom Th17 stanica, a osim njega važnu ulogu u njihovom razvoju ima i STAT3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (6). Naime, angažiranje TCR-a i ko-stimulacijskih molekula, zajedno s receptorima za transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ; engl. *Transforming growth factor beta*) i IL-6 dovodi do aktivacije STAT3, koji potom potiče izražaj i aktivaciju ROR $\gamma$ t, odnosno diferencijaciju Th17 stanica (4). Osim spomenutih citokina, Th17 stanice izražavaju niz drugih citokina uključujući faktor stimulacije granulocitno – makrofagnih kolonija (GM-CSF; engl. *Granulocyte – macrophage colony – stimulating factor*) i IL-22 (5). Nadalje, citokini TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-21 aktiviraju diferencijaciju naivnih T stanica u zrele Th17 stanice dok je IL-23 faktor rasta i stabilizacije Th17 stanica (2). U slučaju nesvrshodnog angažmana Th17 stanica dolazi do razvoja autoimunih bolesti poput psorijaze, upalne bolesti crijeva, reumatoidnog artritisa i multiple skleroze (4).

### 1.2.2. Treg limfociti

Regulatorni T limfociti imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze imunološkog sustava te tolerancije na vlastito. Do sada je identificirano nekoliko vrsta regulatornih T

## UVOD

stanica, koje su u perifernoj krvi zastupljene s oko 5 – 10 % od ukupne populacije pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T limfocita (6). Foxp3<sup>+</sup> (engl. *forkhead box P3*) regulatorne T stanice koje nastaju u timusu nazivaju se prirodne Treg stanice, a nastaju ligacijom TCR visokog afiniteta. Međutim, istraživanja su pokazala da Treg stanice mogu nastati i na periferiji od konvencionalnih naivnih CD4<sup>+</sup> T stanica u prisutnosti protu-upalnih citokina poput TGF-β, a nazivamo ih induciranim Treg stanicama (iTreg stanice) (7). Uloga Treg stanica je u inhibiciji aktivacije imunološkog odgovora na vlastito proizvodnjom protuupalnih citokina IL-10, IL-35 i TGF-β (5). Na taj način, nakon aktivacije, mogu neutralizirati funkciju drugih efektorskih stanica, uključujući CD4<sup>+</sup> T stanice, CD8<sup>+</sup> T stanice, prirodnoubilačke stanice (NK stanice; engl. *Natural killer cells*), B stanice i druge APC stanice (6). Treg stanice ovise o IL-2 za preživljavanje te stoga a svojoj površini izražavaju velik broj receptora za IL-2 (CD25). Potiskuju postojeće imunološke odgovore putem izravnih i neizravnih mehanizama koji uključuju sekreciju citokina TGF-β i IL-10, uz mehanizme ovisne o interakcijama između stanica (8).

### 1.3. Kinaza 1 regulirana serumom i glukokortikoidima

Kinaza 1 regulirana serumom i glukokortikoidima (SGK; engl. *Serum and glucocorticoid – regulated kinase 1*) sudjeluje u staničnom odgovoru na stres i nizvodnoj aktivaciji natrijskih, kalijevih i kloridnih kanala. Istraživanja su pokazala da razina izražaja SGK1 doprinose hipertenziji i bubrežnoj bolesti, a rezultati nedavnih studija koje su uključivale analizu transkripcijske mreže pokazali su da SGK1 također djeluje kao ključni čimbenik za indukciju Th17 stanica (9). SGK1 je nizvodna meta proteina koji veže nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5 (NFAT5; engl. *Nuclear factor of activated T cells 5*). Kada se organizam nalazi u fiziološkim uvjetima, razine SGK1 su niske, ali se znatno povećavaju kada su razine glukokortikoida ili mineralokortikoida povišene. Hiperglikemija, ishemija te upala također mogu uzrokovati povišene razine SGK1. Nakon stimulacije inzulinom i čimbenikom rasta, poput TGF-β, SGK1 se fosforilira u roku od nekoliko minuta putem signalnih putova koji uključuju fosfatidilinositid-3-kinazu, 3-fosfoinozimid-ovisnu kinazu i mTORC2 (engl. *Mammalian target of rapamycin*). Stimulacija TGF-β također povećava izražaj gena za SGK1 (10).

### 1.3.1. Učinci SGK1 na Th17 stanice

Dvije studije iz 2013. godine uočile su potencijalni učinak soli na diferencijaciju Th17 stanica. Kad su CD4+ T stanice uzgojene u uvjetima povećane koncentracije soli do viška od 40 mM, opažena je pojačana diferencijacija naivnih CD4+ T stanica u potencijalno patogene Th17 stanice koje luče IL-17 i tumorski čimbenik nekroze (TNF; engl. *Tumor necrosis factor*) (11). Visoke koncentracije soli mogu dovesti do povećane aktivnosti Th17 stanica fosforilacijom mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK; engl. *Mitogen activated protein kinase*), uključujući NFAT5 i SGK1. Već spomenuta kinaza deaktivira izravnog inhibitora ekspresije receptora IL-23 (IL-23R; engl. *IL-23 receptor*), odnosno transkripcijskog čimbenika FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*), nuklearnom ekskluzijom, što dovodi do povećane ekspresije receptora IL-23R te stabilizira njegovu signalizaciju u Th17 stanicama. Signalizacija IL-23R inducira ekspresiju ROR $\gamma$ t, koja ima ključnu ulogu u diferencijaciji stanica Th17 (11). Ovi podaci pokazuju da SGK1 ima kritičnu ulogu u indukciji patogenih Th17 stanica te daju uvid u molekularni mehanizam prema kojem čimbenik iz okoliša, poput prehrane bogate soli, potiče razvoj Th17 i potiče upalu tkiva (12).

### 1.3.2. Učinci SGK1 na Treg stanice

Povećana razina soli također ima učinke i na Treg stanice. Uzgoj ovih stanica u uvjetima visoke količine soli remeti regulatorne funkcije Treg stanica. Paralelno, NaCl potiče izražaj interferona gamma (IFN $\gamma$ ; engl. *Interferon gamma*) u Treg stanicama, čime se njihov fenotip pomiče prema fenotipu Th1 stanice (11). Na molekularnoj razini, povećana koncentracija NaCl može se negativno odraziti na ravnotežu između Th17 i Treg stanica povećanjem aktivnosti SGK1. Pokazalo se da SGK1 negativno regulira populaciju Treg stanica nuklearnom ekskluzijom FOXO1, čime se inhibira ekspresija FOXP3, ključnog transkripcijskog faktora uključenog u diferencijaciju i funkciju Treg stanica (11).

### 1.4. Plastičnost stanica

Subpopulacije CD4+ T stanica imaju sposobnost promijeniti svoj fenotip pod utjecajem citokina u neposrednom okolišu, odnosno poprimiti fenotip druge subpopulacije, a ta se fleksibilnost naziva plastičnost stanica. Prijašnje studije su pokazale da Treg stanice kod ljudi

## UVOD

mogu ko-izražavati IL-17 te tako pospješiti diferencijaciju Th17 stanica kroz njihovu sposobnost proizvodnje TGF- $\beta$ . Poznato je da TGF- $\beta$  inducira FoxP3 i inhibira diferencijaciju Th17, no ako su prisutni upalni citokini poput IL-6, FoxP3 induciran TGF- $\beta$ -om je suprimiran te se daje prednost ekspresiji transkripcijskih faktora koji definiraju Th17 stanice (13). Smatra se da je neravnoteža u funkciji Th17/Treg uzrokovana visokim unosom soli povezana s upalom i oštećenjem organa, međutim, vrlo se malo zna o uključenosti ovih subpopulacija u zdravim ispitanicima (3).

### 1.5. Diferencijacijski put

Iako Th17 i Treg stanice imaju znatno različite uloge u imunološkom sustavu, one također pokazuju i mnoge zajedničke karakteristike. Obje se populacije obilno nalaze na periferiji, osobito u crijevima, a sastoje se od heterogenih subpopulacija koje su u stanju promijeniti efektorske ili supresorske sposobnosti u različitim uvjetima (14). Th17 i Treg stanice dijele zajednički signalni put posredovan TGF- $\beta$ -om. Međutim, pro-upalni signali prisutni tijekom aktivacije stanica reguliraju sudbinu ovih stanica (4). Ipak, postavilo se pitanje kako TGF- $\beta$  može regulirati diferencijaciju stanica sa suprotnim funkcijama. U niskim koncentracijama, TGF- $\beta$  djeluje zajedno s IL-6 i IL-21 kako bi potaknuo ekspresiju IL-23R, tako promičući diferencijaciju prema Th17 stanicama. U suprotnim uvjetima, odnosno kada je koncentracija TGF- $\beta$  visoka, on potiskuje izražaj IL-23R te se ravnoteža diferencijacije okreće prema Treg stanicama koje zatim inhibiraju funkciju ROR $\gamma$ t-a (14). Nasuprot tome, IL-21 i IL-23 mogu ublažiti inhibiciju ROR $\gamma$ t posredovanu Foxp3-om, čime se potiče diferencijacija Th17 stanica. Stoga, odluka da se stanice stimulirane antigenom diferenciraju u Th17 ili Treg stanice ovisi o ravnoteži citokina koji reguliraju izražaj ključnih transkripcijskih čimbenika, ROR $\gamma$ t i Foxp3 (14).

#### 1.5.1. Diferencijacijski put Th17 stanica

Na samom početku diferencijacijskog puta TGF- $\beta$  inducira Th17 i Treg stanične programe, no prisutnost IL-6 odlučujuća je sastavnica diferencijacije Th17 stanica. IL-6 stimulira diferencijaciju Th17 stanica fosforilacijom i aktivacijom STAT3, koji potom inducira gene karakteristične za Th17 stanice, kao što su gen transkripcijski čimbenik rorc (engl. *Retinoic – acid – receptor – related orphan receptor c*), il17 i il23r. STAT3 također

## UVOD

ima funkciju inhibicije izražaja FoxP3 inducirane TGF- $\beta$ -om te tako inhibira diferencijaciju Treg stanica. Iako je kombinacija IL-6 i TGF- $\beta$  kritični pokretač diferencijacije stanica Th17, ona nije dovoljna da bi Th17 stanice potpuno stekle patogena svojstva pa je za patogenost Th17 stanica potreban signal posredovan s IL-23 zajedno s IL-6 i TGF- $\beta$  kako bi se inducirao izražaj receptora za IL-23 (4).

### **1.5.2. Diferencijacijski put Treg stanica**

Za diferencijaciju Treg stanica osim TGF- $\beta$  potreban je i IL-2 koji inhibira diferencijaciju Th17 stanica. TGF- $\beta$  fosforilira i aktivira transkripcijske čimbenike SMAD2 i SMAD3 (engl. *Smad and Mad related protein 2; 3*) koji se zatim vežu za lokus FoxP3 i induciraju izražaj gena za FoxP3 (4). Unutarstanični signali posredovani receptorom za IL-2 dovode do fosforilacije transduktora signala i aktivatora transkripcije 5 (STAT5; engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) koji se također veže za lokus FoxP3 i inducira izražaj FoxP3.

## HIPOTEZA

### **2. HIPOTEZA**

Kratkotrajno povečan unos kuhinjske soli kroz prehranu dovodi do neravnoteže u omjeru Th17 i regulatornih T limfocita što pogoduje razvoju Th17 posredovane upale.



## CILJ

### 3. CILJ

Cilj istraživanja je odrediti zastupljenost Th17 limfocita i regulatornih Foxp3+ T limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika prije i nakon sedmodnevne dijeta s povećanim udjelom kuhinjske soli.

### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani pokus u kojem su svi ispitanici bili podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja.

#### 4.2. Ispitanici

U gore navedenu studiju bili su uključeni zdravi mladi dobrovoljci oba spola (n = 20, deset žena i deset muškaraca). Protokol je trajao 14 dana, a uključivao je: 1) 7 dana dijete s malim udjelom kuhinjske soli, tzv. period ispiranja (niskoslana dijeta, NSD) tijekom koje su ispitanici konzumirali oko 3,5 g kuhinjske soli dnevno prema DASH protokolu (US Department of Health and Human Services; 2006.) te 2) 7 dana dijete s visokim udjelom kuhinjske soli (visokoslana dijeta, VSD) tijekom kojeg su ispitanici konzumirali oko 14 g kuhinjske soli dnevno. Uzorkovanje pune venske krvi odvijalo se tijekom dva studijska posjeta, 7. i 14. dan protokola. Tijekom VSD oko 3,5 g soli se nastavilo unositi u obliku hrane dok je ostatak soli bio nadomješten u obliku 11,2 g praha soli/dnevno. Pridržavanje plana prehrane bilo je potvrđeno analizom izlučivanja soli u 24 – satnom urinu. Iz istraživanja su bili isključeni pojedinci s pozitivnom anamnezom za hipertenziju ili hipotenziju, koronarnu bolest, šećernu bolest, hiperlipidemiju, bubrežno oštećenje, cerebrovaskularne bolesti, bolesti perifernih krvnih žila, autoimune i/ili upalne bolesti. Dodatni isključni kriteriji bili su uzimanje oralnih kontraceptiva ili pušenje. Svaki ispitanik bio je detaljno obaviješten o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja. Također, svaki ispitanik je morao potpisati informirani pristanak prije ulaska u protokol istraživanja. Protokol studije je u skladu sa standardima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobren od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07, Broj: 2158-61-07-21-52). Studija je provedena u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju na Medicinskom fakultetu Osijek.

#### 4.3. Metode

### 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Uzorci pune venske krvi zdravih mladih ispitanika prikupljeni su u epruvete s antikoagulansom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) volumena 10 mL (BD Vacutainer, Becton, Dickinson i Company, Franklin Lakes, NJ, SAD). Uzorci su se analizirali unutar tri sata od prikupljanja. Reagensi i puferi koji su korišteni za izolaciju mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC; engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) prethodno su bili zagrijani na sobnu temperaturu koja je iznosila ~ 20 – 25 °C (15).

Otprilike 16 mL pune krvi razrijeđeno je s ranije pripremljenom 1 x fiziološkom otopinom puferiranom fosfatima (PBS; engl. *Phosphate – buffered saline*) u omjeru 1 : 1. Za ovu primjenu koristile su se epruvete za centrifugu volumena 50 mL. Potom se uzorak krvi razrijeđen s PBS-om naneo na približno 16 mL (ovisno o volumenu uzorka) medija za centrifugiranje Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) pazeći da se slojevi ne pomiješaju. Potom je slijedila centrifuga tijekom 25 minuta na RCF (engl. *Relative centrifugal field*) 800 G s prekidima (Rotina 380, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka) na sobnoj temperaturi. Nakon centrifuge, epruvete su stavljene na stalak, a mononuklearne stanice su vidljive kao zamućeni prsten koji razdvaja žutu plazmu od bezbojnog medija (Slika 1) (16).



**Slika 1. Prikaz izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi iz pune krvi pomoću medija za odvajanje. Izvorna slika autora.**

*Slika prikazuje odvajanje mononuklearnih stanica (bijeli prsten) iz pune venske krvi od eritrocita i seruma pomoću gradijenta fikola.*

## ISPITANICI I METODE

Mononuklearne stanice prikupljene su u epruvete volumena 10 mL te su ponovno centrifugirane (10 min, RCF 800G s prekidima) i dvaput isprane 1 x PBS-om). Nakon centrifuge, supernatant je bio odbačen, a stanice su se resuspendirale u 5 mL 1 x PBS-a. Potom je slijedilo bojanje stanica 0,4 %-tnom otopinom Trypan plave boje (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) te su prebrojene pomoću Bürker-Türk-ove komore kako bi se provjerila vijabilnost stanica. Za brojanje se koristilo 50 µL suspenzije stanica i 100 µL otopine za bojanje (16).

Mononuklearne stanice bile su kultivirane u RPMI-1640 mediju (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*) koji je sadržavao aminokiselinu L-glutamin (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), 10 %-tni fetalni goveđi serum (FBS; engl. *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i 1 %-tni penicilin-streptomycin antibiotik (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka). Za pohranjivanje stanica korištene su pločice s 24 jažice nakon čega je slijedila inkubacija (Shel Lab, serija CO<sub>2</sub>, Sheldon Manufacturing Inc, OR, SAD) na temperaturi od približno 37 °C, uz 5 % ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) i razinom vlažnosti većom od 80 % tijekom 24 sata (17).

### 4.3.2. Smrzavanje / odmrzavanje mononuklearnih stanica periferne krvi

Za potrebe krioprezervacije stanica korišteni su dimetil sulfoksid (DMSO) (Supelco, Merck KGaA) i FBS u omjeru 1 : 9. Dodatno, da bi se stanice što bolje očuvale, kriotubice su pohranjene u posudu za zamrzavanje „Mr. Frosty“ (Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) koja sadrži alkohol izopropil te su zamrznuti na - 80 °C tijekom najmanje 24 sata. Stanice su potom bile premještene u zasebne obilježene spremnike na - 80 °C (17).

U svrhu odmrzavanja uzoraka koristio se RPMI-1640 stanični medij uz dodatak FBS i antibiotika, koji je zagrijan na približno 37 °C. Prije samog dodavanja medija, kriotubice sa uzorcima pažljivo su uronjene u vodenu kupelj na 37 °C približno 1 minutu. Čim se uzorak odvojio od stijenke kriotubice, stanice su premještene u epruvete za centrifugiranje volumena 15 mL te je dokapavanjem dodano 10 ml prethodno zagrijanog medija kako bi se izbjegao osmotski šok. Uzorci su potom centrifugirani 5 minuta na 1500 okretaja u minuti (RPM; engl. *Revolutions per minute*) pri sobnoj temperaturi. Nakon dva dodatna koraka ispiranja stanica s 5 mL medija, stanice su resuspendirane u 1,5 mL svježeg medija. Stanice su pohranjene u pločice s 24 jažice te su inkubirane na 37 °C, uz 5 % CO<sub>2</sub> i razinom vlažnosti većoj od 80 % tijekom 24 sata (17).

### 4.3.3. Magnetsko sortiranje pomoćničkih CD4+ T limfocita

Nakon odmrzavanja i podešavanja broja stanica na  $1,2 \times 10^7$ , a neposredno prije ulaska u protokol aktivacije, pomoćnički CD4+ T limfociti bili su izdvojeni iz ukupne smjese mononuklearnih stanica periferne krvi metodom negativnog magnetskog sortiranja uz pomoć komercijalno dostupnog seta MagniSort™ Human CD4+ T cell Enrichment kit (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Negativno odabrane stanice su pripremljene za aktivaciju (17, 18).

Uzorci su zatim preneseni u epruvete s okruglim dnom (12 x 75 mm; BD Falcon, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD). Stanice su prethodno bile isprane dva puta s 1 x PBS-om (5 min, 800 G). Stanice su resuspendirane u 200 µL otopine 1 x PBS / 3 % FBS / 10 mM EDTA. Nadalje, dodano je 40 µL MagniSort™ Human T cell Enrichment Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) te su stanice inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodano 4 mL 1 x PBS-a i 10 mM EDTA nakon čega je slijedila centrifuga (800 G / 5 min). Nakon centrifuge, supernatant je odbačen, a uzorcima dodano 200 µL 1 x PBS / 3 % FBS / 10 mM EDTA uz 40 µL engl. *MagniSort* zrnaca negativne selekcije. Nadalje, slijedila je inkubacija 5 minuta na sobnoj temperaturi (17, 18).

Nakon inkubacije, dodan je 1 x PBS / 10 mM EDTA do 2,5 mL ukupnog volumena te su stanice ponovno resuspendirane. Epruvete su jedna po jedna stavljane u magnet (MagniSort™ Human CD4+ T cell, Enrichment kit; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) te je slijedila inkubacija tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, magnet koji sadrži epruvetu je podignut te je u jednom kontinuiranom pokretu supernatant prebačen u novu epruvetu od 5 ml. Supernatant se prenio u jednom kontinuiranom pokretu bez tapkanja zbog mogućnosti smanjenja čistoće stanica. Epruvete koje sadrže vezane stanice uklonile su se s magneta te su se ispraznile. Negativno odabrane stanice bile su spremne za upotrebu (17, 18).

### 4.3.4. Poliklonska aktivacija mononuklearnih stanica periferne krvi

Kako bi se aktivirale CD4+ T stanice i potaknulo stvaranje citokina bila je potrebna kratkotrajna aktivacija tijekom 4 sata pomoću komercijalno dostupnog stimulacijskog koktela koji sadrži forbol – 12 – miristat – 13 – acetat (PMA; engl. *phorbol – 12 – myristate – 13 – acetate*) i ionomicin u završnoj koncentraciji od 2 µL/mL (Cell stimulation cocktail 500X;

eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (17, 19). Kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) dodan je mediju za stimulaciju kako bi izazvao dugotrajnu unutarstaničnu signalizaciju kalcija koja bi izazvala stanični odgovor. Stanice su se potom kultivirale u pločicama s 24 jažice pri standardiziranim uvjetima ( $\sim 37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , > 80 % vlažnosti). Također, zajedno sa  $\text{CaCl}_2$  mediju se dodao i Brefeldin A u koncentraciji od 4  $\mu\text{g/mL}$ . Brefeldin A sprječava prijenos proteina iz endoplazmatske mrežice u Golgijev aparat te time služi kao inhibitor proteinske sekrecije. Nakon završetka četverosatne inkubacije, dodano je 200  $\mu\text{L}$  0,1 M EDTA te su stanice inkubirane tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se zaustavila reakcija (17, 20).

### 4.3.5. Imunofenotipizacija Th17 i regulatornih Foxp3+ T limfocita protočnom citometrijom

Zastupljenost Th17 ( $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$  i IL – 17+) i regulatornih T limfocita ( $\text{CD}3^+$ ,  $\text{CD}4^+$ ,  $\text{CD}25^{\text{high}}$ ,  $\text{CD}127^{\text{low}}$  i Foxp3+) u ukupnim pomoćničkim  $\text{CD}4^+$  T limfocitima izoliranim iz periferne krvi određena je metodom protočne citometrije. Prije staničnog bojenja, mrtve stanice bile su ireverzibilno obilježene fiksabilnom bojom za vijabilnost Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), a nespecifično bojanje posredovano vezanjem protutijela za Fc receptor (FcR; engl. *Fc Receptor*) blokirano je dodavanjem 5 uL Human Fc Block (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Nakon osam minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi, uzorcima je dodana smjesa specifičnih fluorescentno obilježenih protutijela, kako slijedi:

Za određivanje Th17 limfocita  $\text{CD}3$  PerCP (klon OKT3, eBioscience),  $\text{CD}4$  PE-Cy7 (klon RPA-T4), eBioscience),  $\text{CD}196$  APC (klon R6H1, eBioscience) i IL-17A FITC (klon eBio64DEC17, eBioscience), dok su za određivanje regulatornih T limfocita korištena protutijela  $\text{CD}3$  FITC (klon OKT3, eBioscience), Foxp3 PE (klon 236A/E7, eBioscience),  $\text{CD}4$  PerCP (klon SK3, eBioscience),  $\text{CD}127$  PE-Cy7 (klon eBioRDR3, eBioscience) i  $\text{CD}25$  APC (klon BC96, eBioscience) (17).

U protokolu za bojanje stanica koristio se fosfatni pufer s dodatkom 0,5 – 1 % goveđeg serumskog albumina (BSA; engl. *Bovine serum albumin*) i 0,1 % natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) prilagođene pH vrijednosti od približno 7,4 te komercijalno dostupan set pufera za bojanje unutarstaničnih i nuklearnih antigena Foxp3 staining buffer (eBioscience) (17).

U svrhu optimizacije protokola bojanja, tijekom uhadavanja pokusa pripremile su se jednoboje, fluorescencijske minus jedan (FMO; engl. *Fluorescence Minus One*), neobojene i

## ISPITANICI I METODE

negativne kontrole kako bi se sa sigurnošću mogle razlikovati pozitivne stanice od pozadinskog/negativnog i nespecifičnog bojanja (17).

Kompenzacijska matrica izračunata je pomoću komercijalno dostupnih kompenzacijskih kuglica BD™ CompBead Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) i jednobojnih kontrola. Mjerenje uzoraka provedeno je na BD FACSCanto II™ protočnom citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) opremljenim s dva lasera, plavim Argon 488 nm i crvenim Red HeNe 633 nm. Analiza i vizualizacija podataka izvedena je pomoću FlowLogic programa (v11,0; Inivai Technologies; Mentone; Australija).

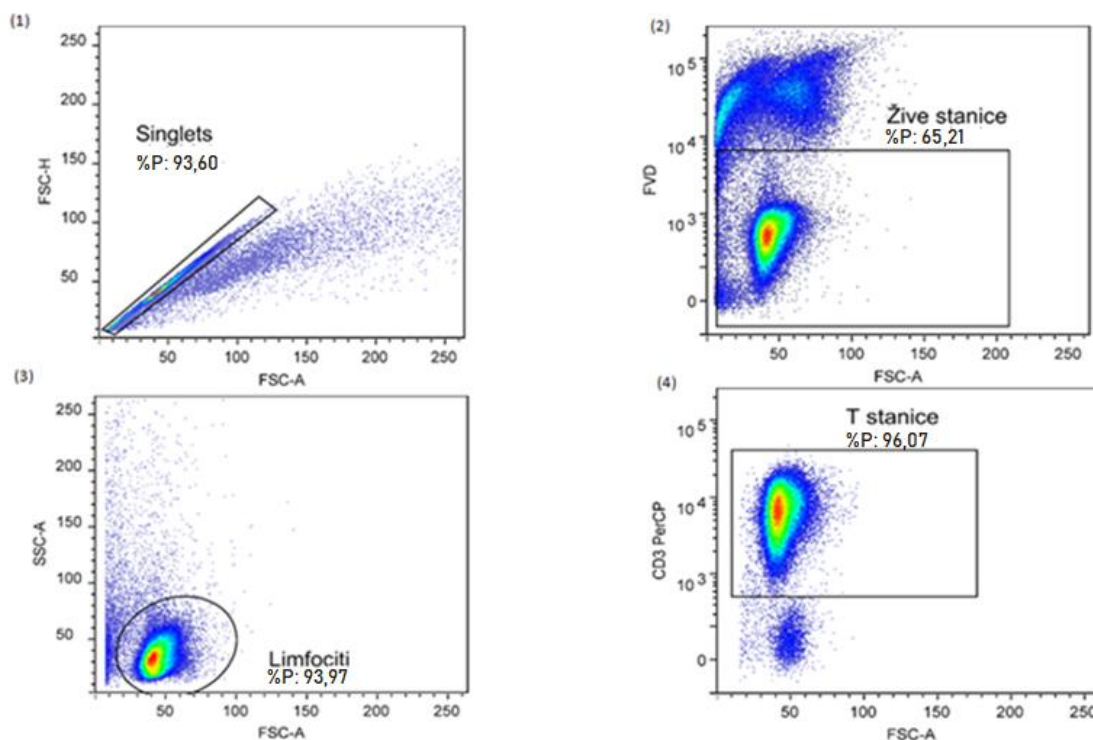
### 4.4. Statističke metode

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je D'Agostino – Pearsonovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju zavisnih skupina testirane su uparenim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Wilcoxonovim testom. Sve p vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program Graph Pad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Th17 stanice

Populacija T limfocita u ukupnoj populaciji jednostrukih živih mononuklearnih stanica periferne krvi definirana je pomoću obilježja raspršenja laserske zrake prema naprijed (FSC; engl. *forward side scatter*) i CD3 markera strategijom susljednog postavljanja prozora u programu FlowLogic (Slika 2).



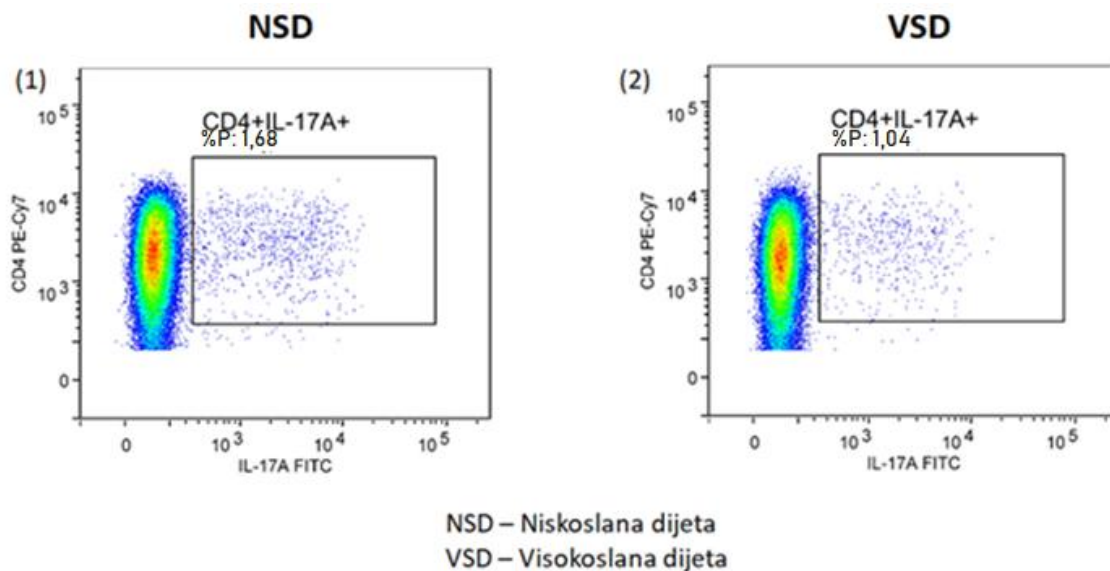
**Slika 2. Strategija analize T limfocita iz periferne krvi ispitanika metodom protočne citometrije**

Jednostruke stanice (tzv. *singlets*) izdvojene su analizom obilježja visine raspršenja prema naprijed (FSC-H; engl. *Forward side scatter height*) i površine raspršenja prema naprijed (FSC-A; engl. *Forward side scatter area*) (1) dok su mrtve stanice isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD; engl. *Fixable Viability Dye*) (2). Limfociti su izdvojeni analizom FSC-A i površine postraničnog raspršenja (SSC-A; engl. *Side scatter area*) (3), dok su T limfociti definirani analizom obilježja FSC-A te izražaja CD3 markera (4).



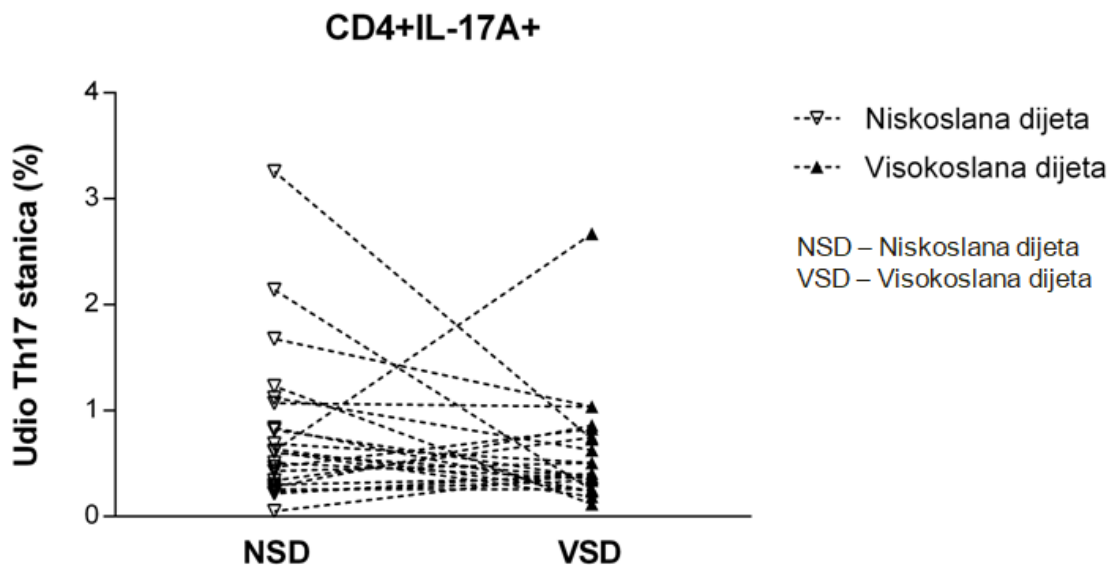
## REZULTATI

Th17 stanice definirane su istovremenim izražajem CD4 i IL-17 molekula (Slika 3), a analiza dobivenih podataka pokazala je da nije došlo do statistički značajne promjene u frekvencijama Th17 stanica u perifernoj krvi nakon sedmodnevne VSD u odnosu na NSD ( $p = 0,1936$ ; Slika 4). Za ocjenu sredine podataka tijekom VSD i NSD korištena je aritmetička sredina, a kao mjera raspršenja standardna devijacija. Podaci za aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju tijekom VSD iznosili su 0,66 (1,15), a tijekom NSD 0,34 (0,27).



**Slika 3. Analiza Th17 limfocita metodom protočne citometrije**

*Analiza Th17 limfocita tijekom NSD (1) i VSD (2) definirana je pomoću CD4 i IL-17A markera.*



**Slika 4. Promjena udjela Th17 stanica tijekom NSD i VSD .**

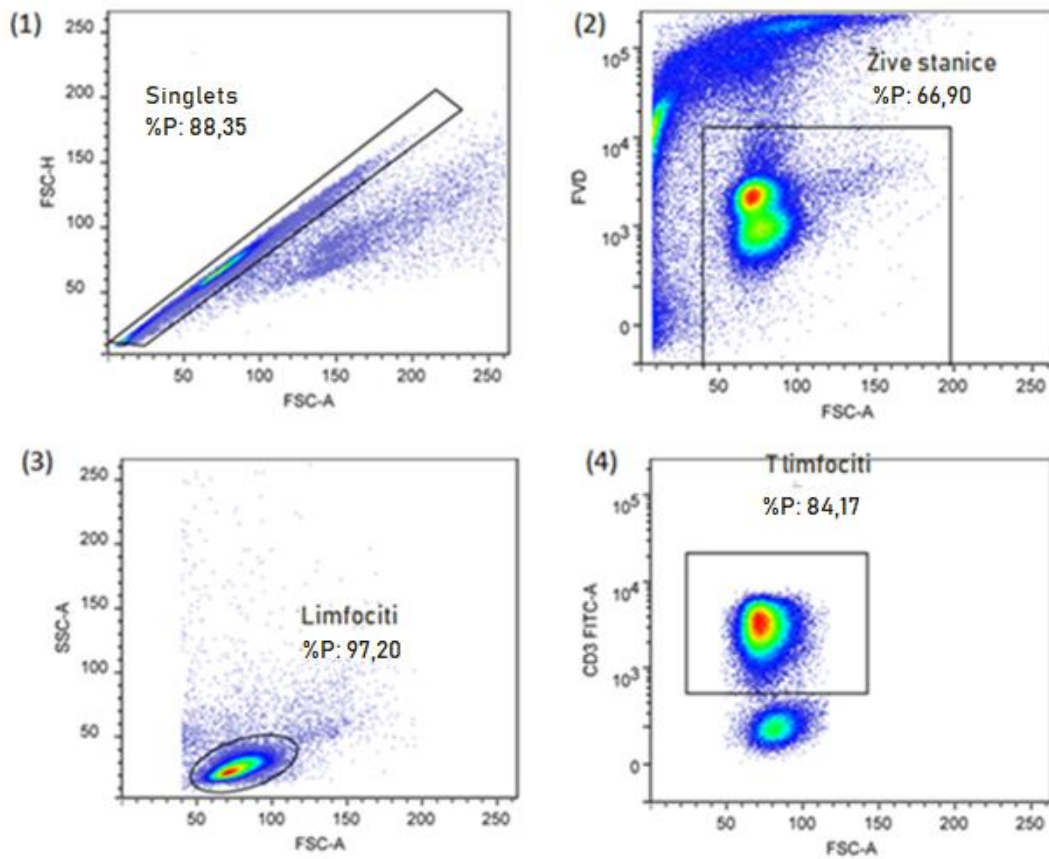
*Isprekidane crtice te njihov smjer predstavljaju promjenu udjela Th17 stanica u perifernim mononuklearnim stanicama svakog pojedinog ispitanika nakon visokoslane dijete. Upareni t test ( $p = 0,1936$ ).*

## 5.2. Treg stanice

Tijekom analize Treg stanica najprije je u ukupnoj populaciji jednostrukih živih mononuklearnih stanica definirana subpopulacija perifernih T limfocita analizom izražaja CD3 markera (Slika 5). Potom su ukupne periferne Treg stanice definirane kao CD25+Foxp3+ subpopulacija stanica unutar perifernog T staničnog odjeljka (Slika 6).

Ispitanici su imali nešto niže prosječne vrijednosti udjela perifernih Treg stanica nakon VSD, međutim statistička analiza dobivenih podataka je pokazala da nije došlo do značajne promjene udjela Treg stanica nakon VSD u odnosu na NSD ( $p = 0,2883$ ; Slika 7). Za ocjenu sredine podataka tijekom VSD i NSD korištena je aritmetička sredina, a kao mjera raspršenja standardna devijacija. Podaci za aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju tijekom VSD iznosili su 14,54 (7,75), a tijekom NSD 13,49 (7,53).

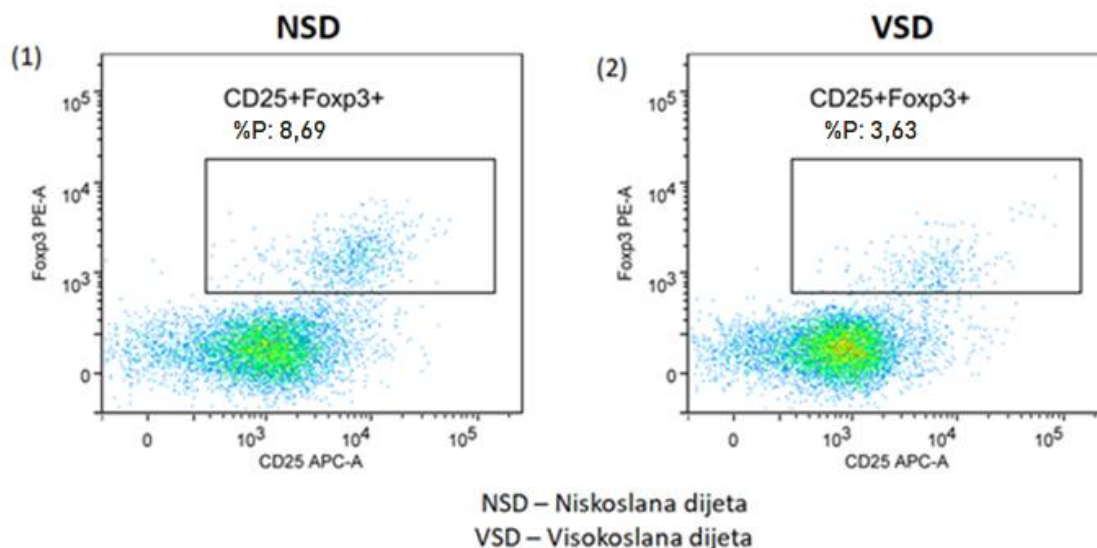
## REZULTATI



**Slika 5. Susljedno izdvajanje T limfocita iz periferne krvi ispitanika metodom protočne citometrije**

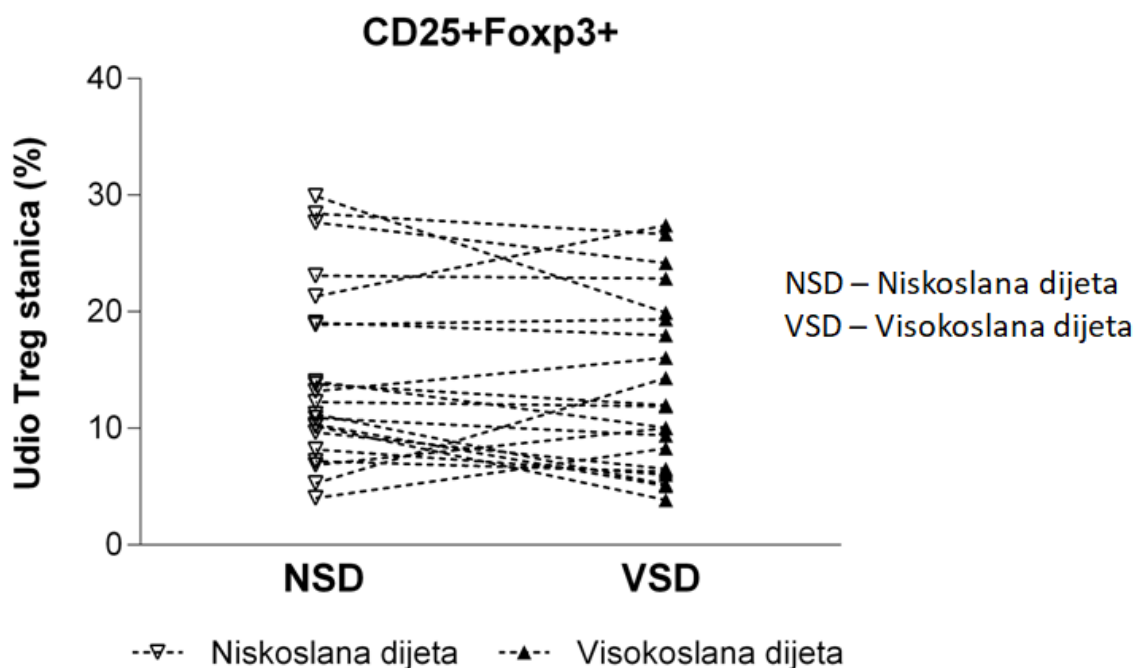
Jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H obilježja (1) dok su mrtve stanice isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD) (2). Limfociti su izdvojeni analizom FSC-A i SSC-A parametara na temelju veličine i zrnatosti stanica (3), dok su T limfociti definirani analizom FSC-A parametra i analizom CD3 markera (4).

## REZULTATI



**Slika 6. Analiza Treg limfocita metodom protočne citometrije**

*Analiza Treg limfocita tijekom NSD (1) i VSD (2) definirana je pomoću CD25 i Foxp3 markera.*



**Slika 7. Promjena udjela Treg stanica tijekom NSD i VSD**

*Isprekidane crtice te njihov smjer predstavljaju promjenu udjela Th17 stanica u perifernim mononuklearnim stanicama svakog pojedinog ispitanika nakon visokoslane dijete. Upareni t test ( $p = 0,2883$ )*

## 6. RASPRAVA

Populacije Th17 i Treg stanica pripadaju stečenom dijelu imunološkog sustava, no s međusobno oprečnim ulogama. Dok Th17 stanice imaju proupalnu ulogu, Treg stanice djeluju protuupalno čime sprečavaju razvoj autoimunih bolesti te općenito ograničavaju tijekom upalnih procesa. Jedna od važnijih uloga Th17 stanica, koja je relevantna za ova rad, je uloga u nastanku autoimunih bolesti, poput psorijaze, upalne bolesti crijeva, reumatoidnog artritisa i multiple skleroze. Poznato je da prekomjerna količina soli utječe na hipertenziju i kardiovaskularne bolesti, no pokazalo se da sol može imati sposobnost aktivacije stečenog imunološkog sustava promičući diferencijaciju Th17 stanica i narušavajući ravnotežu Th17 i Treg stanica (2). Upravo zato, sve je više istraživanja koja ispituju utjecaj visoke lokalne koncentracije soli na udio / diferencijaciju / transdiferencijaciju Th17 i Treg stanica, odnosno učinke povećanog unosa soli prehranom na imunološki sustav.

Iz tog su razloga Hernandez i sur. proveli istraživanje u kojem su uspjeli dokazati inhibitornu ulogu NaCl na supresivnu funkciju Treg stanica. Visoka koncentracija NaCl od 10 – do 40 mM spriječila je *in vitro* supresivni efekt humanih Treg stanica. Nadalje, povećana koncentracija NaCl stimulirala je fenotip Treg stanica prema proinflamatornom Treg fenotipu Th1 stanica. Također je došlo do povećane proizvodnje proupalnog citokina IFN $\gamma$  te do ekspresije mRNA povezane s Th-17, uključujući RORC i IL17A. U istom istraživanju neutralizacija INF- $\gamma$  ljudskim neutralizirajućim antitijelom dovela je do rehabilitacije supresivnih funkcija T reg stanica u visokoslanim uvjetima (9).

Međutim, Luo i sur. došli su do različitih rezultata analizirajući podskupinu Treg stanica koje nastaje na periferiji ili u *in vitro* uvjetima, tzv. inducibilne Treg (iTreg) stanice. Oni su dokazali da ni razvoj ni funkcija ljudskih iTreg stanica, nisu smanjeni uslijed izloženosti visokoj koncentraciji soli. Nadalje, dokazali su da velika koncentracija soli ne potiče ni promjenu fenotipa iTreg stanica u fenotip Th1 ili Th17 stanica. Za razliku od iTreg, kod prirodnih Treg stanice koje nastaju u timusu našli su narušenu stabilnost i funkciju Foxp3 što sugerira veći terapijski potencijal iTreg stanica kod oboljelih od autoimunih bolesti (21).

S druge strane, Kleinewitfeld i sur. istražili su utjecaj visoke koncentracije soli (10 – 40 mM) na *in vitro* diferencijaciju ljudskih Th17 stanica te pokazali da u tim uvjetima Th17 stanica pojačano izražavaju IL-17A, IL-2, TNF $\alpha$ , IL-9 i nekoliko drugih kemokina (22).

Istraživanja na ljudima u ovom području su malobrojna. Među njima je istraživanje koje je uključivalo 15 dobrovoljaca, međutim, za razliku od našeg protokola, istraživanje je bilo

podijeljeno na 3 dijela. U prvom dijelu, koje je trajalo 3 dana, ispitanici su konzumirali uobičajenu prehranu. Potom je slijedilo razdoblje visokoslane dijete, koje je trajalo 7 dana te naposljetku razdoblje niskoslane dijete, koje je također trajalo 7 dana. Uzorci urina i krvi su opetovano uzorkovani te je na temelju toga određena dinamika promjene frekvencija perifernih Th17 i Treg stanica. Najprije se udio Th17 stanica smanjio s povećanjem unosa soli u hrani između 3. i 4. dana, a zatim se postupno povećavao tijekom razdoblja visokoslane dijete. S druge strane, broj Treg stanica se povećavao tijekom prvih 4 dana, a zatim se smanjio i ostao na nižoj razini tijekom cijelog razdoblja s visokim unosom soli. Omjer Th17/Treg stanica značajno je bio povećan od 4. do 10. dana, dok je 17. dan zabilježen povrat na osnovnu vrijednost (3).

Još jedno istraživanje u kojem su ispitanici bili zdravi dobrovoljci provedeno je u Meksiku. U tom je istraživanju sudjelovao veći broj ispitanika, njih 28. Unos soli izračunat je pomoću dva kriterija; 24 - satnim izlučivanjem natrija urinom i pomoću pisanog upitnika. Rezultati ove presječne studije pokazali su da povećana koncentracija soli ne utječe na diferencijaciju i funkciju Th17 i Treg stanica u perifernoj krvi zdravih ispitanika (23).

Wenstedt i sur. su također proveli studiju koja je istražila utjecaj dvotjedne prehrane s niskom i velikom koncentracijom soli na Th17 i Treg stanica na zdrave mlade ispitanike. U ovom istraživanju sudjelovalo je pet zdravih muškaraca prosječne dobi od 33 godine, s normalnim indeksom tjelesne mase, funkcijom bubrega i početnim krvnim tlakom. Tijekom razdoblja niskoslane dijete konzumirana su otprilike 3 grama soli dnevno, a za prehranu tijekom visokoslane dijete 17 grama soli dnevno. Također, kao ni u prethodnoj studiji, nije dokazana povezanost između visokoslane dijete s promjenom udjela Th17 i Treg stanica u perifernoj krvi (24).

U ovom se radu istraživao utjecaj sedmodnevne dijete s povećanim udjelom soli na zastupljenost Th17 i Treg limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika. U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika, a ono je trajalo dva tjedna. Prvi tjedan su ispitanici bili na niskoslanjoj dijeti, a tijekom 2. tjedna na visokoslanjoj dijeti. Statističkom analizom dobivenih podataka nismo utvrdili značajne promjene u frekvencijama Th17 i Treg stanica u perifernoj krvi nakon sedmodnevne dijete s visokim udjelom soli. Međutim, potrebno je navesti kako je u ovom istraživanju, ali i u istraživanjima provedenim u Meksiku i Nizozemskoj (23,24) sudjelovao relativno mali broj ispitanika te da bi potencijalno drukčiji ishod rezultata mogao biti na većem broju uzoraka. Između ostaloga, prikladno bi bilo provesti kohortnu studiju uz analizu različitih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja. Osim toga, većina istraživanja vođena su na životinjama ili u *in vitro* uvjetima (9, 22) te su njihovi rezultati suprotni istraživanjima

## RASPRAVA

provedenim na ljudima. Navedene razlike se djelomično mogu objasniti s relativno kratkim razdobljem izloženosti ispitanika djeci s povećanim udjelom soli (animalne studije koriste VSD tijekom minimalno 14 dana), dobra regulacija koncentracije  $\text{Na}^+$  u perifernoj krvi (za razliku od perifernih tkiva poput probavnog trakta i kože) te time da se radi o imunološki „neutralnim“ mladim, zdravim ispitanicima bez evidentnih upalnih procesa u organizmu.

Neosporivo je negativno djelovanje prekomjernog unosa kuhinjske soli u organizam na pojedinačne organske sustave, u prvom redu kardiovaskularni sustav te bubrege. Sve je više, međutim, znanstvenih dokaza za negativni učinak VSD na imunološki sustav u smislu promoviranja upale i oštećenja različitih organa. Upravo zbog toga, potrebna su dodatna istraživanja kako bismo bolje razumjeli mehanizme pomoću kojih sol djeluje na regulaciju imunoloških procesa te kako isto možemo iskoristiti za unapređenje zdravlja.

## ZAKLJUČAK

### 7. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata iz provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Kratkotrajna dijeta s povećanim udjelom kuhinjske soli ne utječe na zastupljenost Th17 limfocita i regulatornih Foxp3+ T limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika.



## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti zastupljenost Th17 i Treg limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika prije i nakon sedmodnevne dijeta s povećanim udjelom kuhinjske soli.

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao nerandomizirani kontrolirani pokus u kojem su svi ispitanici bili podvrgnuti istom eksperimentalnom protokolu s više ponovljenih mjerenja.

**Ispitanici i metode:** U istraživanju su sudjelovali zdravi mladi dobrovoljci, 10 žena i 10 muškaraca. Istraživanje je trajalo 14 dana te je bilo podijeljeno na sedmodnevno razdoblje NSD i sedmodnevno razdoblje VSD. Tijekom prvog razdoblja ispitanici su konzumirali 3,5 g soli, a tijekom drugog 14 g soli dnevno. Nakon svakog razdoblja ispitanicima je uzorkovana periferna venska krv iz koje su na gradijentu fikola izolirane mononuklearne stanice. Stanice su do analize pohranjene na - 80 °C. Za odmrzavanje uzoraka koristio se RPMI-1640 medij uz dodatak FBS-a i antibiotika. Dio stanica korišten je za imunofenotipizaciju Treg stanica. Iz preostalog uzorka izdvojeni su ukupni Th limfociti metodom magnetskog sortiranja pomoću komercijalno dostupnog seta (MagneSort™ Human CD4+ T cell Enrichment kit). Za poliklonsku aktivaciju Th stanica korišten je komercijalni set koji sadrži PMA i ionomicin (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail). Naposljetku je slijedila imunofenotipizacija Th17 limfocita pomoću BD FACS Canto II citometra. Za statističku analizu korišten je program Graph Pad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Rezultati:** Nema značajne promjene u perifernim udjelima Treg i Th17 stanica nakon sedmodnevne VSD u odnosu na NSD.

**Zaključak:** Kratkotrajna dijeta s povećanim udjelom kuhinjske soli ne utječe na zastupljenost Th17 i Treg limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika.

**Ključne riječi:** Th17 stanice; regulatorni T limfociti, natrijev klorid

## SUMMARY

### 9. SUMMARY

**Title:** The effect of short-term diet with increased NaCl content on the frequencies of Th17 and Treg lymphocytes in the peripheral blood of healthy young subjects.

**Objectives:** To determine the presence of Th17 and Treg lymphocytes in the peripheral blood of healthy young subjects before and after a seven-day high-salt diet

**Study Design:** The study was organized as a nonrandomized controlled experiment in which all subjects were subjected to the same experimental protocol with multiple replicate measurements.

**Participants and methods:** Healthy young volunteers of both sexes (10 women and 10 men) participated in the study. The study lasted 14 days and included a 7-day period of low (NSD) and a 7-day period of high salt intake (VSD). In the first part of the study, subjects consumed 3,5 g of salt, while during the HSD intended salt intake was around 14 g per day. On days 7 and 14 of the protocol peripheral venous blood was sampled from which mononuclear cells were isolated on a ficol gradient. The cells were then stored at - 80 ° C until analysis. RPMI-1640 cell medium with the addition of FBS and antibiotics was used for cell recovery. Immediately after thawing, part of the cells were used for immunophenotyping of Treg cells, while remaining sample was used for total CD4+ helper T lymphocytes (Th) isolation by magnetic sorting using a commercially available set (MagniSort™ Human CD4+ T cell Enrichment). A commercial set containing PMA and ionomycin was used for polyclonal activation of Th cells (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail). Finally, immunophenotyping of Th17 lymphocytes by BD FACS Canto II cytometer was performed. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism (v6.01, San Diego, CA, USA)

**Results:** There was no significant change in peripheral Treg and Th17 cells frequencies after 7-day VSD compared to NSD.

**Conclusion:** A short-term high-salt diet had no significant effect on Th17 and Treg lfrequencies in the peripheral blood of healthy young subjects.

## SUMMARY

Keywords: Th17 cells; regulatora T cells; sodium chloride

**10. LITERATURA**

1. Salt reduction. World Health Organization. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>. Pristupljeno 24. 08. 2021.
2. Wei Y, Lu C, Chen J, Cui G, Wang L, Yu T i sur. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget*. 2017;8(1):70-82.
3. 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;6:26767.
4. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):730.
5. Ren J, Crowley SD. Role of T-cell activation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;316(6):H1345-H1353.
6. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25(4):305-12.
7. Willebrand R, Kleinewietfeld M. The role of salt for immune cell function and disease. *Immunology*. 2018;154(3):346-353.
8. Arroyo Hornero R, Hamad I, Côrte-Real B, Kleinewietfeld M. The Impact of Dietary Components on Regulatory T Cells and Disease. *Front Immunol*. 2020;11:253.
9. Hernandez AL, Kitz A, Wu C, Lowther DE, Rodriguez DM, Vudattu N i sur. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4212-22.
10. Binger KJ, Linker RA, Muller DN, Kleinewietfeld M. Sodium chloride, SGK1, and Th17 activation. *Pflugers Arch*. 2015;467(3):543-50.
11. 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(4):243-254.
12. 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;25;496(7446):513-7.
13. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(2):109-19.

## LITERATURA

14. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol.* 2015;6:639.
15. Recommended Standard Method for Isolating Mononuclear Cells. Merck. Dostupno na adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/hematology/recommended-standard-method>. Pristupljeno: 26. 08. 2021.
16. PBMC isolation from buffy coats or whole blood. Infinity Inserm. Dostupno na adresi: <https://www.infinity.inserm.fr/wp-content/uploads/2018/01/PBMC-isolation-and-cryopreservation.pdf>. Pristupljeno: 26. 08. 2021.
17. Kolobarić N, Drenjančević I, Matic A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of *n*-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults-A Randomised Study. *Nutrients.* 2021;13(6):1851.
18. MagniSort™ Human CD4 T cell Enrichment Kit. ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/8804-6811-74?SID=srch-srp-8804-6811-74?query=MagniSort%E2%84%A2%20Human%20CD4%20T%20cell%20Enrichment%20Kit#/8804-6811-74?SID=srch-srp-8804-6811-74%3Fquery>. Pristupljeno: 27. 08. 2021.
19. eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (500X). ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4970-03#/00-4970-03>. Pristupljeno 27. 08. 2021.
20. eBioscience™ Brefeldin A Solution (1000X). ThermoFisher Scientific. Dostupno na adresi; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-4506-51?SID=srch-srp-00-4506-51?query=brefeldin%20a%20solution%201000#/00-4506-51?SID=srch-srp-00-4506-51%3Fquery>. Pristupljeno 27. 08. 2021.
21. Luo Y, Xue Y, Wang J, Dang J, Fang Q, Huang G i sur. Negligible Effect of Sodium Chloride on the Development and Function of TGF- $\beta$ -Induced CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 2019;26(7):1869-1879.e3.
22. 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;496(7446):518-22.
23. Vitales-Noyola M, Layseca-Espinosa E, Baranda L, Abud-Mendoza C, Niño-Moreno P, Monsiváis-Urenda A i sur. Analysis of Sodium Chloride Intake and Treg/Th17

## LITERATURA

Lymphocytes in Healthy Individuals and Patients with Rheumatoid Arthritis or Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res.* 2018;2018:9627806.

24. Wenstedt EFE, Remmerswaal EBM, van der Bom-Baylon ND, Schrooten EM, Bemelman FJ, Vogt L. The effect of high-salt diet on t-lymphocyte subpopulations in healthy males-A pilot study. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2020;22(11):2152-2155.

## ŽIVOTOPIS

### 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Ines Krstanović

**Datum i mjesto rođenja:** 03. 09. 1997., Osijek, Republika Hrvatska

**Adresa:** Ulica Franje Račkog 16b, 31431 Čepin

**Telefon:** +385 95 399 9327

**E-mail:** ineskrstanovic02@gmail.com

#### **Akademsko obrazovanje:**

2019. – danas Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek

2016. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek

2012. – 2016. Opća gimnazija Osijek