

# Utjecaj visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na biljege upale kod TFF3-/-/C57BL/6N knockout i WT (C57BL/6N) kontrolnih miševa

---

Vlahović, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:336844>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I  
DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Nika Vlahović**

**UTJECAJ VISOKOG PREHRAMBENOG  
UNOSA KUHINJSKE SOLI NA BILJEGE  
UPALE KOD TFF3-/-/C57BL/6N  
KNOCKOUT I WT (C57BL/6N)  
KONTROLNIH MIŠEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I  
DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Nika Vlahović**

**UTJECAJ VISOKOG PREHRAMBENOG  
UNOSA KUHINJSKE SOLI NA BILJEGE  
UPALE KOD TFF3-/-/C57BL/6N  
KNOCKOUT I WT (C57BL/6N)  
KONTROLNIH MIŠEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: prof.dr.sc. Ines Drenjančević

Neposredni voditelj: doc.dr.sc. Anita Matić

Rad ima 23 listova i 4 slike.

## Sadržaj

Popis kratica .....	II
1. Uvod .....	1
2. Hipoteza .....	4
3. Cilj .....	5
4. Materijali i metode .....	6
4.1. Ustroj studije .....	6
4.2. Pokusne životinje .....	6
4.3. Prehrambeni protokol .....	6
4.4. Metode .....	6
4.5. Etičko postupanje sa životinjama .....	7
4.6. Statističke metode .....	7
5. Rezultati .....	9
6. Rasprava .....	11
7. Zaključak .....	15
8. Sažetak .....	16
9. Summary .....	17
10. Literatura .....	18
11. Životopis .....	22

## Popis kratica

GM-CSF – od eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, granulocitni stimulirajući čimbenik kolonija makrofaga

IL-1 $\alpha$  – interleukin 1 alfa

IL-6 – interleukin 6

IL-10 – interleukin 10

IL-17A – interleukin 17A

MCP-1 – od eng. *monocyte chemoattractant protein 1*, monocitni kemoatraktantni protein 1

MIP-1 $\alpha$  – od eng. *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* , inflamatorni protein makrofaga 1 alfa

MIP-1 $\beta$  – od eng. *macrophage inflammatory protein 1 $\beta$* , inflamatorni protein makrofaga 1 beta

NS – niskoslana dijeta

TFF – od eng. *trefoil factor family*, obitelj trefoil factor proteina

TNF- $\alpha$  – od eng. *tumor necrosis factor*, tumor nekrotizirajući čimbenik alfa

VS – visokoslana dijeta

WT – od eng. *wild type*, divlji soj miša

## 1. Uvod

Obitelj peptida trefoil faktora (TFF) sastoji se od triju članova malih proteina: TFF1, TFF2 i TFF3, prije nazvanih peptid povezan s karcinomom dojke 2, spazmolitički peptid i intestinalni trefoil faktor, a prvi put opisani su prije oko 35 godina. Sva tri ljudska TFF gena grupirana su na kromosomu 21q22.3 (1). Mnoge su studije napravljene ne bi li se otkrila uloga TFF peptida u organizmu. In vivo i in vitro istraživanja pokazala su da ovi mali peptidi poboljšavaju obnovu epitela gastrointestinalnog i drugih organskih sustava (2). TFF1 i TFF3 izraženi su i u dišnim putevima. U gornjim dišnim putevima oba se proteina nalaze u epitelnim stanicama i submukoznom glandularnom epitelu žlijezda nosne sluznice čovjeka (3). Manjak TFF3 proteina utječe na metabolizam masnih kiselina u jetri i TFF3 deficijentni miševi imaju povećan broj malih lipidnih vezikula u svojim hepatocitima bez utjecaja na jetrene biljege oksidativnog stresa koji su često povezani s promijenjenom homeostazom lipida u jetri (4).

Međutim, razumijevanje funkcija TFF-a pokazalo se kao zahtjevniji posao. Ovi peptidi povezani su s antiapoptozom, poticanjem kemotaksije te sudjelovanjem u imunološkom odgovoru (5). Postoji nekoliko studija koje sugeriraju da TFF mogu biti regulirani citokinima i transkripcijskim čimbenicima (posebno NF- $\kappa$ B) povezanim s imunološkim sustavom i da ih TFF-ovi mogu povratno regulirati (2). Također, TFF2 i TFF3 pronađeni su u limfodnom tkivu kao što su koštana srž i limfni čvorovi. Osim toga, za vrijeme istraživanja izražaja trefoila u drugim ne-neoplastičnim tkivima koja izlučuju mucin i glikoproteine, kao što su pluća, jajnici i limfoidni organi, mRNA trefoil factora 2 i 3 otkrivena je u slezeni i timusu štakora. Pokazalo se da su trefoil peptidi TFF2 i TFF3 izraženi u glavnim organima koji sudjeluju u imunoregulaciji, da su inducirani bakterijskim endotoksinima i sposobni potaknuti migraciju monocita. Ova zapažanja zajedno ukazuju na potencijalnu ulogu trefoil peptida u imunološkom odgovoru na ozljede tkiva (6). *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N (*Tff3*) knockout miševi predstavljaju model za proučavanje sinteze proupalnih i protuupalnih citokina zbog promijenjenog metabolizma lipida, to jest modificiranog metabolizma arahidonske kiseline i povoljnog omjera  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 slobodne masne kiseline u jetri (7). Istraživanje je pokazalo da *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N (*Tff3*) knockout miševi imaju povišen omjer  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 u jetri (1,3 puta) i smanjen u serumu (1,9 puta) u usporedbi s divljim sojem miševa. Smanjeni omjer  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 u jetri povezan je s poboljšanom tolerancijom glukoze u cijelom tijelu (4).

Metabolizam arahidonske kiseline može biti modificiran različitim nutritivnim tvarima, npr. kuhinjskom soli (NaCl). Natrij je neophodan za održavanje homeostaze organizma utjecajem na osmotski tlak, raspodjelu tjelesnih tekućina, održavanje normalne pH vrijednosti i većinu



metaboličkih procesa. Prema prikupljenim podacima Nacionalne ankete o hrani u Velikoj Britaniji u 2000. godini, proizvodi od žitarica (uključujući kruh, druge pekarske proizvode i žitarice za doručak) činile su najveći udio (38 %) unosa natrija u domaćinstvu. Drugi najveći izvor (21 %) bili su mesni proizvodi (uključujući prerađeno meso poput šunke, slanine itd.) (8). Podatci u Hrvatskoj pokazuju da najveću količinu kuhinjske soli naša populacija dnevno unosi putem pekarskih proizvoda, budući da oni sadrže velik udio kuhinjske soli, a što je još važnije, to su i namirnice koje konzumiramo u najvećoj količini (9). Kuhinjska sol, natrijev klorid (NaCl), povijesno je bila korisna također kao metoda konzerviranja hrane. Međutim, početkom 20. stoljeća te izumom hladnjaka, u mnogim zemljama je potreba bila smanjena. Međutim, i dalje u mnogim slučajevima ljudi konzumiraju mnogo više soli od trenutne preporuke Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) o potrošnji natrija za odrasle, što je 2 g natrija/dnevno (ekvivalent je 5 g soli/dan) (10). Prosječan dnevni unos kuhinjske soli u Hrvatskoj za žene iznosi 10,2 g po danu, a za muškarce 13,3 g te je više nego dvostruko veći od preporučene količine (9). U europskim i sjevernoameričkim zemljama velik udio unesenog natrija (čak 75 % u SAD-u i Velikoj Britaniji) dodaje se (kao natrijev klorid) u proizvodnji hrane i hrane koja se jede izvan kuće. Drugačija je slika u pogledu prehrambenih izvora natrija u nekim zemljama u razvoju, gdje natrij u prehrani dolazi uglavnom od soli koja se dodaje tijekom kuhanja ili se nalazi u umacima (npr. sojin umak u Kini). Te su zemlje usred epidemiološke tranzicije s povećanom stopom kroničnih bolesti, uključujući hipertenziju i kardiovaskularne bolesti (11).

Učinak je unosa natrija na zdravlje populacije kontroverzan. U usporedbi s preporučenim unosom natrija, oni koji su konzumirali više ili manje natrija imali su povećan rizik za sveukupnu smrtnost i bolesti kardiovaskularnog sustava. Osim toga, nije pronađena razlika u ishodima između skupina koje su unosile visoke, odnosno niske količine natrija. Povećana konzumacija natrija povezana je s povišenim krvnim tlakom, dok se čini da manja konzumacija natrija smanjuje krvni tlak kod odraslih (12, 13). Unatoč svojoj povijesnoj vrijednosti i fiziološkoj važnosti, velika konzumacija soli prepoznata je kao štetna za zdravlje. Istraživanja su pokazala da dijeta s visokim udjelom soli (VS) ne uzrokuje samo teške vaskularne komplikacije promičući hipertenziju, već može uzrokovati razne imunološke bolesti reguliranjem imunološkog sustava i pojačavanjem upalnog odgovora (13, 14).

Izraziti porast pojavnosti autoimunih i upalnih bolesti upućuje na to da okolišni čimbenici, poput zapadnjačke prehrane bogate natrijem i masnoćom, mogu igrati ulogu. Uz to je sada prepoznato da imunološki sustav igra aktivnu ulogu u razvoju i napredovanju hipertenzije i unos soli ne samo da pokreće hemodinamičke promjene, već je povezan i s

promjenama imunološkog odgovora. Brojne studije dosljedno pokazuju da prekomjerni unos soli potiče proizvodnju nekoliko citokina koji potiču upalu i oštećenje organa (15), kao i destruktivne učinke na indukciju teških upalnih procesa i razvoj autoimunih poremećaja (16). Imunološke stanice mogu igrati važnu ulogu u posredovanju štetnih učinaka visoke koncentracije natrija. Otkriveno je da povećana koncentracija natrijeva klorida inducira pomoćne T (Th-17) stanice koje stvaraju proupalni interleukin 17 (IL-17) (17). U eksperimentalnim modelima hipertenzije uzrokovane angiotenzinom II također je utvrđeno da visok unos natrija povećava proizvodnju IL-17A signalnim putem ovisnim o SGK1. Postoji i interakcija između visoke koncentracije natrija s dendritičkim stanicama. Dendritične stanice aktivirane viškom natrija stvaraju povećani IL-1 $\beta$  i potiču proizvodnju T-stanica IL-17A i IFN- $\gamma$  (15).

Izvođenjem ovog istraživanja na transgeničnim *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N knockout miševima usporedo s WT/C57BL/6N kontrolnim miševima koji su roditeljski soj, imamo uvid u moguću interakciju TFF3 peptida, odnosno njegove odsutnosti, u razvoju upalnog odgovora uzrokovanog prekomjernim unosom natrijeva klorida te jasniju sliku ove problematike.

## 2. Hipoteza

Visok unos kuhinjske soli uzrokuje poremećeni odgovor vaskularnog endotela na fiziološke stimulanse u *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa. Ovi miševi imaju promijenjeni metabolizam lipida i zbog toga moguće promijenjenu upalnu i endotelnu reakciju na visok unos kuhinjske soli.

### 3. Cilj

Cilj je ovoga istraživanja:

1. Izmjeriti biljege upale (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) pomoću ProcartaPlex Multiplex Immunoassay sustava kod *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N knockout i WT(C57BL)/6N kontrolnim miševima na niskoslanjoj i visokoslanjoj dijeti u trajanju 7 dana.

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Ustroj studije

Ovo je istraživanje eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama.

### 4.2. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na zdravim mužjacima dvaju sojeva miševa, *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N knockout miševi i WT (C57BL/6N) kontrolni miševi.

### 4.3. Prehrambeni protokol

Tijekom tjedan dana prehrambenog protokola pokusne životinje podijeljene su u dvije skupine po osam do deset jedinki. Prva je skupina predstavljala miševe na visokoslanjoj dijeti, hranjeni su hranom za miševe koja je sadržavala 4 % NaCl-a. Druga je skupina hranjena standardnom hranom za glodavce s 0,4 % NaCl-a te je predstavljala miševe na niskoslanjoj dijeti. Miševi su vodu mogli piti *ad libitum*.

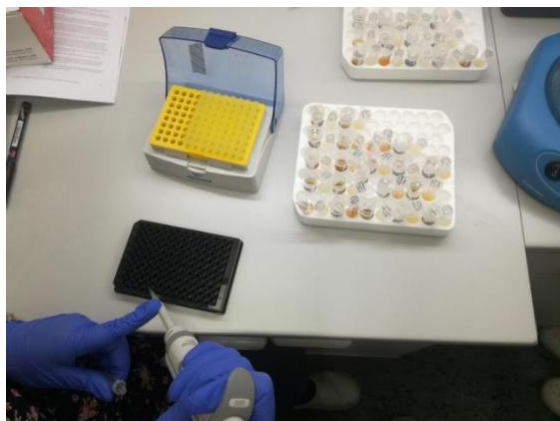
### 4.4. Metode

Nakon prehrambenog protokola miševi su anestetizirani ketamin-kloridom (100 mg/kg) i midazolamom (5 mg/kg) te su potom žrtvovani dekapitacijom. Prikupljena je miješana arterijska i venska krv za analizu 8 upalnih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) u uzorcima seruma uporabom ProcartaPlex Multiplex imunoanalize.

Uzorke seruma prije analize bilo je potrebno pripremiti po uputstvima za imunoanalizu dobivenim u ProcartaPlex kitu. Analiza počinje pripremanjem standarda različitih razrjeđenja i koncentracija u svrhu izrade kalibracijske krivulje. Zatim se na Luminex pločicu (96-Well Hand-Held Magnetic) dodaju magnetski bidovi, po 50  $\mu$ l u svaku jažicu. Magnetski su bidovi posebni za svaku analizu te su u ovom istraživanju korišteni bidovi za analizu osam upalnih parametara (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). U idućem koraku dodaju se standardi te po 25  $\mu$ l seruma u predviđene jažice, nakon čega slijedi inkubacija u trajanju od 90 min., u mraku, pri sobnoj temperaturi i 500 rpm (revolutions per minute). Slijedi ispiranje jažica tri puta i dodavanje detekcijskog protutijela volumena 25  $\mu$ l u svaku jažicu, prikazano na slici 1. Ponavlja se inkubacija 90 min., u mraku, pri sobnoj temperaturi i 500 rpm te ispiranje tri puta. Streptavidin-PE dodaje se u svaku jažicu u volumenu od 50  $\mu$ l i inkubira se 30 min., također u mraku, pri sobnoj temperaturi i 500 rpm. Streptavidin-PE koristi se u protokolima indirektnog bojenja jer se streptavidin veže na biotin s visokim afinitetom. Pločica se ponovno ispire tri puta, u jažice se dodaje po 120  $\mu$ l pufera za očitavanje te se miješa 5 min. na 500 rpm. Pločica je nakon ovog postupka spremna za očitavanje na Luminex™ 200 uređaju prikazanom na slici 2. Dobiveni podatci obrađeni su ProcartaPlex analitičim softverom.

#### 4.5. Etičko postupanje sa životinjama

Eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjernicama za njegu i uporabu laboratorijskih životinja (Direktiva 86/609) te su odobreni od Lokalnog etičkog povjerenstva (# 2158-61-07-18-138) 28. rujna 2018., Nacionalnog etičkog odbora (EP 195/2019) i Ministarstva poljoprivrede (# 525-10 / 0255-19-7) 12. travnja 2019. godine.



Slika 1. Prikaz dodavanja detekcijskog protutijela pipetom na Luminex pločicu, (fotografirala autorica rada)



Slika 2. Luminex<sup>200</sup> uređaj, (fotografirala autorica rada)

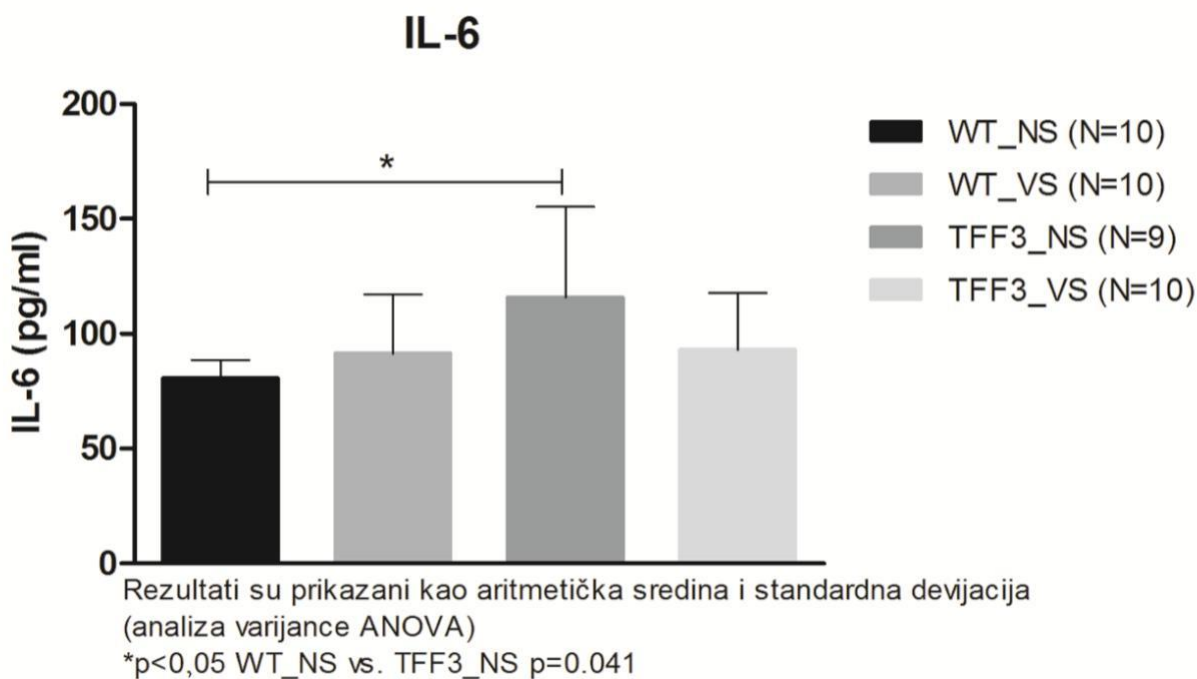
#### 4.6. Statističke metode

Za statističku analizu korišten je Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA). Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli među svim ispitivanim grupama (3 eksperimentalne grupe) nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Razina statističke značajnosti određena je sa  $p < 0,05$ . Veličina uzorka određena je prema prijašnjim studijama

provedenima na Katedri za fiziologiju i imunologiju te u skladu s poštednim principima rada s pokusnim laboratorijskim životinjama 3R.

## 5. Rezultati

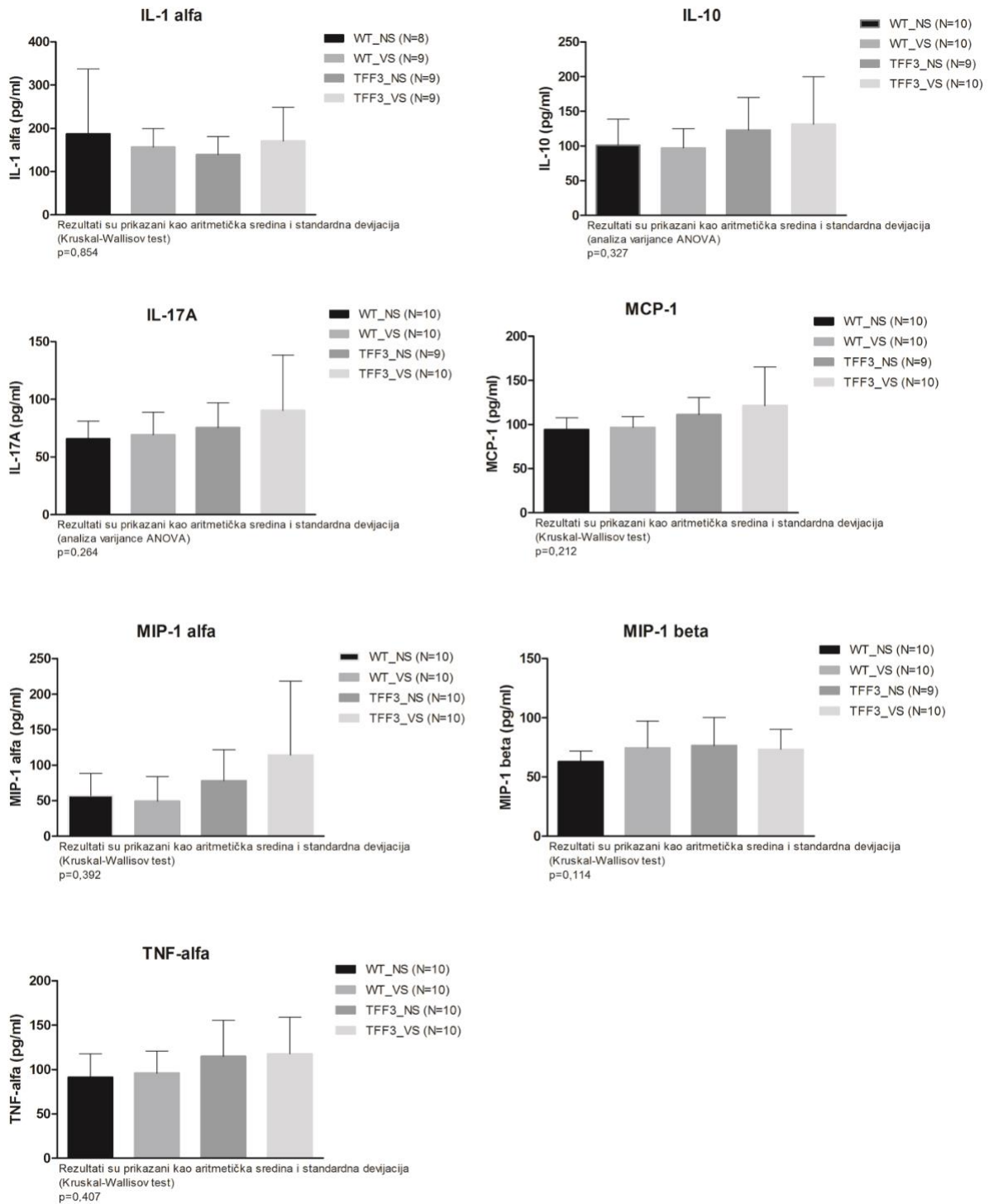
U ovom istraživanju izmjerene su koncentracije osam citokina te je obrada podataka pokazala da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji IL-6 između *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa na niskoslanjoj dijeti u usporedbi s WT miševima na niskoslanjoj dijeti, pri čemu je koncentracija IL-6 bila viša kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa (slika 3). Povećani unos soli nije značajno utjecao na produkciju citokina niti u jednoj ispitivanoj skupini.



Slika 3. Razina IL-6 izmjerena u serumu WT i *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa nakon visokoslane (VS) i niskoslane dijetete (NS)

Koncentracije preostalih sedam citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) nisu pokazale statistički značajnu razliku ni između divljeg tipa i transgeničnih miševa ni između skupina hranjenih visokoslanom, odnosno niskoslanom dijetom (slika 4).





Slika 4. Razina IL-1 $\alpha$ , IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  izmjerena u serumu WT i *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa nakon visokoslane (VS) i niskoslane dijeta (NS)

## 6. Rasprava

Nedavna istraživanja pokazuju da visokosлана prehrana dovodi do smanjenog i oštećenog vaskularnog endotelnog odgovora na brojne fiziološke podražaje u različitim eksperimentalnim modelima, uključujući *Tff3*<sup>-/-</sup> miševe (7). Međutim, čini se da izlučivanje upalnih citokina analiziranih u ovoj studiji nije pod utjecajem prisutnosti TFF-a ili dijetalnog režima.

Visok unos soli pozitivno je povezan s rizikom od mnogih bolesti, posebice kardiovaskularnih, te postaje globalni zdravstveni problem. Opće je prihvaćeno da je u svim kardiometaboličkim bolestima, kao što su hipertenzija i ateroskleroza, prisutna kronična upala niskog stupnja (18). Proupalni procesi važni su patofiziološki mehanizmi koji su uključeni u razvoj i napredovanje bolesti kardiovaskularnog sustava. Upala doprinosi rupturi plakova, što je osnova ishemijskih događaja u koronarnoj i cerebralnoj cirkulaciji (19).

Dobro je poznato da visokosлана dijeta inducira proupalnu kaskadu koja dovodi do kroničnih upalnih bolesti poput hipertenzije, infarkta miokarda, neurološkog prolaznog ishemijskog napada i raka. Primjer su T regulatorne stanice koje luče protuupalni citokin IL-10. Međutim, visoke koncentracije soli djeluju inhibitorno na njihovu supresivnu funkciju te uz to povećavaju proupalne faktore poput IFNG, TBX21 i CXCR3 (20). Istraživanje izvedeno na ženama Sprague–Dawley štakora koje su hranjene visokosланom i masnom hranom pokazalo je značajno povećanu sekreciju i ekspresiju IL-1 $\beta$ . Ekspresija gena TNF $\alpha$  značajno je bila povišena u skupini na visokosланoj dijeti, kao i u skupini koja je hranjena hranom s visokim udjelom masti. Zanimljivo, ovo povećanje proinflammatoryh citokina povezano je s pojačanom ekspresijom CD68, markera infiltracije makrofaga, u objema skupinama (21). Povezanost utjecaja soli na upalu pokazana je i na in vitro modelu, u kojemu je diferencijacija naivnih T stanica prema Th-17 stanicama povećana u uvjetima visoke soli. U skladu s time, visoko slani medij posebice inducira diferencijaciju u patogeni fenotip Th-17 stanica manifestiran poboljšanom proizvodnjom TNF- $\alpha$  i GM-CSF te pojačanom ekspresijom CCR6 i receptora za IL-23 (22).

U ovoj studiji promatrani su upalni parametri, odnosno citokini, i njihovo izlučivanje u odgovoru na VS i NS dijetu. Citokini su polipeptidni posrednici koje uglavnom sintetiziraju stanice imunološkog sustava i sudjeluju u stvaranju, koordinaciji te prestanku imunološkog ili upalnog odgovora. Oni imaju zajednički opći način na koji utječu na stanice, to jest vezanjem na i aktiviranjem specifičnih receptora stanične površine visokim afinitetom (23).

Interleukin 6 (IL-6), je topljivi posrednik s plejotropnim učinkom u upali, imunološkom odgovoru i hematopoezi. Pored imunološki posredovanih stanica, mezenhimijskih stanica,

endotelnih stanica i fibroblasta, u proizvodnji IL-6 uključene su mnoge druge stanice kao odgovor na razne podražaje (24). Interleukin 6 nastaje na mjestu upale i igra ključnu ulogu u odgovoru akutne faze koju karakteriziraju razne kliničke i biološke značajke poput proizvodnje proteina akutne faze te u kombinaciji s njegovim topljivim receptorom sIL-6R $\alpha$ , određuje prijelaz iz akutne u kroničnu upalu promjenom prirode infiltrata leukocita (od polimorfonuklearnih neutrofila do monocita / makrofaga) (25). Studija na štakorima osjetljivima na sol (Dahl salt sensitive rats) pokazala je da dijeta s velikom količinom soli inducira porast IL-6 u bubregu (26). Za razliku od ovih podataka, rezultat ove studije pokazao je povišenu razinu IL-6 pri niskoslanjoj dijeti kod *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout miševa, za razliku od WT miševa. Međutim, eksperimentalnim istraživanjem dokazano je da TFF3 izoliran iz ljudskog majčinog mlijeka snižava IL-6 i IL-8 u epitelnim stanicama HT-29 tretiranih LPS-om (lipopolisaharidom) (27). Ovaj podatak indirektno ukazuje da bi nedostatak TFF3 peptida uzrokovao povećanje IL-6, što se upravo i pokazalo ovom studijom. Međutim, istraživanje na staničnim kulturama pokazalo je da IL-1 $\beta$  i IL-6 inhibiraju izražaj endogenih TFF gena (28). Povećanje IL-6 kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa sugeriralo bi međusobnu regulaciju između TFF peptida i interleukina, odnosno povećanim upalnim odgovorom u odsutnosti TFF-a. Više vrijednosti interleukina 6 kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa na niskoslanjoj dijeti upućivale bi na veću proupalnu stimulaciju u jetri i veću proizvodnju proteina akutne faze upale. U nedavnom istraživanju usporedbe WT i *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa, *Tff3*<sup>-/-</sup> miševi na niskoslanjoj dijeti imali su povećanu transkripciju od približno 200 % SOD1 gena koji kodira Cu-Zn superoksid-dismutazu ( $p = 0,042$ ). Međutim, jetra ovih miševa pokazala je značajno snižene gene povezane s ER stresom (BIP, CHOP). Uz to, imaju 50 % smanjenu aktivaciju P-eIF2 $\alpha$  u jetri. (7). Zanimljivo je da IL-6, koji je proupalni citokin, povećava izražaj druge izoforme SOD, MnSOD u jetri štakora, što upućuje na povezanost antioksidativnog i proupalnog puta (29).

Interleukin 6, aktivacijom pretvarača signala i aktivatora transkripcije 3 (STAT3) i TFF3 peptida, uključen je u promicanje proliferacije i migracije bilijarnih epitelnih stanica miša (BES). Inducirana ekspresija TFF3 interleukinom 6 u BES ljudi i IL6/STAT3/TFF3 signalizacija uključene su u migraciju bilijarnih epitelnih stanica kod ljudi i zacjeljivanje rana (30).

TNF- $\alpha$  ima nekoliko terapijskih uloga u organizmu, koji uključuju imunostimulaciju, otpornost na uzročnike infekcije, otpornost na tumore, regulaciju spavanja i embrionalni razvoj (31).

Korelacija između TNF- $\alpha$  i TFF3 pokazana je u studijama upalnih bolesti crijeva. Utvrđeno je da TNF- $\alpha$  inducira snižavanje TFF3 transkripcije pomoću NF $\kappa$ B (32). Također, dokazan je zaštitni učinak TFF3 protiv kolitisa popraćen smanjenjem ekspresije TNF- $\alpha$  u endotelu kolona (33). Eksperimentalni kolitis izazvan kod miševa trinitrobenzen-sulfonskom kiselinom ili dekstran sulfatom pogoršava se prekomjernim unosom soli. Aktivirane mononuklearne stanice u crijevnoj lamini proprii povećavaju proizvodnju IL-17A, IL-23R, TNF- $\alpha$  kada su izložene velikoj koncentraciji soli (34). U ovoj studiji razina TNF- $\alpha$  ne razlikuje se između WT i *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout soja miša, kao ni među VS i NS skupinama životinja.

Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) koji se sintetizira i otpušta iz makrofaga kao odgovor na razne podražaje igra ključnu ulogu u gotovo svim upalnim stanjima (35). Proizvodi se i u endotelnim stanicama. IL-1 $\alpha$  sintetizira se i akumulira kao unutarstanični molekularni prekursor s molekularnom masom od 31 kDa (IL-11-271), koji se kasnije može obraditi u 18 kDa karboksi-terminalni fragment (36). Interleukin 1 (IL-1) ne proizvodi se po stanicama zdravih pojedinaca, s izuzetkom kožnih keratinocita, nekih epitelnih stanica i određenih stanica središnjeg živčanog sustava. Međutim, u odgovor na podražaje poput onih koje proizvode upalni agensi, infekcije ili mikrobnog endotoksini, drastično se povećava proizvodnja IL-1 u makrofazima i raznim drugim tipovima stanica (37). U ovoj studiji nije dokazana korelacija između promjene u koncentraciji IL-1 $\alpha$ , VS dijete i nedostatka TFF3.

Interleukin 10 (IL-10) snažan je citokin s protuupalnim svojstvima koji ima središnju ulogu u ograničavanju imunološkog odgovora domaćina na patogene, čime se sprječava oštećenje domaćina i omogućava održavanje normalne homeostaze tkiva. Disregulacija IL-10 povezana je s pojačanom imunopatologijom kao reakcijom na infekciju, kao i s povećanim rizikom za razvoj mnogih autoimunih bolesti. Manjak ili aberantna ekspresija IL-10 može pojačati upalni odgovor na mikrobe, ali također dovesti do razvoja upalne bolesti crijeva i niza autoimunih bolesti. Tako oslabljena IL-10 ekspresija ili signalizacija može pojačati upalni odgovor, što rezultira pogoršanom imunopatologijom i oštećenjem tkiva (38). Pri *ex vivo* izlaganju peritonealnih stanica visokoj koncentraciji NaCl značajno je bila smanjena proizvodnja IL-6, dok su razine TNF- $\alpha$  i IL-10 značajno povećane (39). Statistički značajna razlika nije utvrđena između VS i NS grupe miševa u ovoj studiji, za što je mogući razlog mali broj eksperimentalnih modela.

Dalje promatrani citokini su IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i MCP-1. Interleukin 17A (IL-17A) proizvodi se u širokom spektru leukocita i igra važnu ulogu u obrani domaćina. Također je

uključen u patologiju nekoliko autoimunih bolesti, uglavnom putem regulacije ekspresije kemokina i migracije leukocita na mjesto upale (40). Faracao i njegovi kolege otkrili su povećan broj limfocita IL-17<sup>+</sup> u lamini proprij tankog crijeva i IL-17A u cirkulaciji kao odgovor na VS dijete (41). Dendritičke stanice aktivirane viškom natrija pojačano proizvode IL-1 $\beta$  i promoviraju proizvodnju T-staničnih citokina IL-17A i IFN- $\gamma$  (42).

Članovi obitelji MIP-1 orkestriraju akutni i kronični upalni odgovor domaćina na mjestima ozljede ili infekcije uglavnom regrutiranjem proupalnih stanica. Ključne su za kemotaksiju T-stanica iz cirkulacije u upaljeno tkivo, a također igraju važnu ulogu u regulaciji transendotelne migracije monocita, dendritičkih stanica i NK stanica (43). Makrofagni upalni protein-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) kemokin je koji in vitro ima protuupalno djelovanje i inhibitornu aktivnost matičnih stanica (44). Monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1/CCL2) član je porodice C-C kemokina i moćan kemotaktički faktor za monocite. Nekoliko studija povezano je MCP-1 s kardiovaskularnim bolestima. Korištenjem miševa koji su MCP-1 knockout za ispitivanje ateroskleroze, pokazano je da u nedostatku MCP-1 ili njegova receptora dolazi do znatnog smanjenja u taloženju arterijskog lipida (45).

Gore navedeni i ukratko opisani upalni parametri generalno su povezani s kroničnim upalnim stanjima koja mogu nastati konzumacijom velikih količina soli. Neki od proučavanih parametara (IL-6, TNF- $\alpha$ ) dokazano su u vezi s regulacijom pomoću TFF3 peptida. Međutim, u ovoj studiji nije pronađena poveznica, odnosno značajna promjena koja bi ukazivala na utjecaj visokoslane dijeta na razvoj upalnog odgovora kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa.

U ovoj studiji ostali citokini nisu bili značajno promijenjeni kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa niti su se promijenili pod utjecajem slane dijeta. Mogući razlog za to je prehrambeni režim u trajanju od samo jednog tjedna, gdje bi dulji dijetalni protokol moguće pokazao drugačije rezultate. Također, još jedan od potencijalnih razloga je i korištenje nativnih seruma. Međutim, više vrijednosti interleukina 6 kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa na niskoslanjoj dijeti upućivale bi na veću proupalnu stimulaciju u jetri i veću proizvodnju proteina akutne faze upale.

## 7. Zaključak

Na temelju provedenog eksperimentalnog istraživanja i analize dobivenih podataka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Visoko slana dijeta nije utjecala na promijenjenu proizvodnju upalnih markera mjerenim u serumu *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N knockout miševa i WT (C57BL/6N) kontrolnih miševa.
2. Rezultati ovog istraživanja na *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N miševima pokazuju da ne postoji povezanost između uloge TFF3 proteina u upalnom odgovoru uzrokovanom prehranom s visokom koncentracijom kuhinjske soli.
3. Povećanje koncentracije IL-6 kod *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N miševa na niskoslanjoj dijeti upućivalo bi na njihov veći kapacitet ili osjetljivost na proupalne stimulse i mogući veći kapacitet proizvodnje proteina akutne faze upale.

## 8. Sažetak

**Cilj istraživanja:** Cilj je studije ispitati učinak visokog unosa soli na razinu markera upale i utvrditi postoji li razlika između divljeg tipa i *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout miševa.

**Nacrt studije:** eksperimentalna studija na pokusnim životinjama

**Pokusne životinje i metode:** *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout miševi i WT kontrolni miševi (N = 6-8 po grupi) održavani su na sedmodnevnoj standardnoj prehrani glodavaca (0,4 % NaCl; niska sol; NS grupa) ili visokoslanjoj (VS) prehrani (4 % NaCl). Krv je prikupljena za analizu 8 upalnih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1, TNF- $\alpha$ ) u uzorcima seruma uporabom ProcartaPlex Multiplex Immunoassaya.

**Rezultati:** Serumska koncentracija IL-6 bila je veća kod *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa na NS dijeti u usporedbi s WT na NS dijeti. Nisu pronađene značajne razlike u drugim skupinama ili analitima. Nije bilo značajnih efekata visokoslane prehrane ni u jednom soju miševa.

**Zaključak:** Visokosлана dijeta nije utjecala na proizvodnju upalnih markera u serumu. Iako se zna da TFF peptidi imaju različite funkcije, rezultati ovog istraživanja na miševima koji su knockout za *Tff3*<sup>-/-</sup> pokazuju da ne postoji povezanost između njihove uloge u upalnom odgovoru uzrokovanom prehranom s velikom soli.

**Key words:** *Tff3*<sup>-/-</sup>; visokosлана dijeta; upala

## 9. Summary

**Objective:** The aim of this study was to determine the effect of high salt intake on the level of inflammation markers and to determine whether there is a difference between the wild type and the *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout mice.

**Study Design:** experimental study on animals

**Participants and methods:** *Tff3*<sup>-/-</sup> knockout mice and WT control mice (N=6-8 per group) were maintained on 7 day standard rodent chow (0.4 % NaCl; low salt; LS group) or high salt (HS) diet (4 % NaCl). Blood was collected for the analysis of 8 inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) in serum samples of using ProcartaPlex Multiplex Immunoassay.

### Results:

**Results:** Serum concentration of IL-6 was higher in *Tff3*<sup>-/-</sup> mice on LS diet compared to WT on LS diet. No significant difference was found in other groups or analytes. There were no significant effects on HS diet in either strain of mice.

**Conclusion:** HS diet has not affected the production of inflammatory markers in serum. Although TFF peptides are known to have various functions, the results of this study on *Tff3* knockout mice indicates that there is no connection between their role in inflammatory response caused by high salt diet.

**Key words:** *Tff3*<sup>-/-</sup>; high salt diet; inflammation



## 10. Literatura

1. Busch M, Dünker N. Trefoil factor family peptides - Friends or foes? *Biomol Concepts*. 2015;6(5–6):343–59.
2. Kozina N, Jukić I. Trefoil Factor Family ( TFF ): Peptides with Numerous Functions 1. 2019;3(1).
3. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007;55(5):505–13.
4. Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Cosić A, et al. Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(2):827–41.
5. Blin N. Cytoprotective trefoil peptides abound in new functions. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(24):2907–9.
6. Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett*. 1999;456(1):155–9.
7. Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, et al. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in *tff3<sup>-/-</sup>/c57bl/6n* knockout and wt (C57bl/6n) control mice. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
8. Singh M. Salt and health. *Nutr Bull*. 2003;28(3):303–4.
9. Jelaković B, Reiner Ž, Kusić Z, Ugarčić Ž, Drenjančević I. Znanstveno mišljenje o učinku samnjenog unosa kuhinjske soli u prehrani ljudi. Hrvatska agencija za hranu. 2014.
10. WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. *World Heal Organ*. 2012;1–56.
11. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: Implications for public health. *Int J Epidemiol*. 2009;38(3):791–813.
12. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Vol. 916, World Health Organization technical report series. Switzerland; 2003.
13. Jeremiah Stambler. The INTERSALT and implications Study : background , methods , findings , and implications. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(2):626S-642S.
14. Sumiyoshi M, Kitazato KT, Yagi K, Miyamoto T, Kurashiki Y, Matsushita N, et al. The accumulation of brain water-free sodium is associated with ischemic damage independent of the blood pressure in female rats. *Brain Res [Internet]*. 2015;1616:37–44.

15. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A, et al. Salt intake and immunity. *Hypertension*. 2018;72(1):19–23.
16. Abdoli A. Hypothesis: High salt intake as an inflammation amplifier might be involved in the pathogenesis of neuropsychiatric disorders. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2017;8(2):146–57.
17. Zhang WC, Zheng XJ, Du LJ, Sun JY, Shen ZX, Shi C, et al. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na). *Cell Res [Internet]*. 2015;25(8):893–910.
18. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The effects of arterial blood pressure reduction on endocan and soluble endothelial cell adhesion molecules (CAMs) and CAMs ligands expression in hypertensive patients on calcium channel blocker therapy. *Kidney Blood Press Res*. 2013;37(2–3):103–15.
19. Khazim K, Azulay EE, Kristal B, Cohen I. Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. *Immunol Rev*. 2018;281(1):40–56.
20. Amara S, Tiriveedhi V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int J Oncol*. 2017;50(5):1477–81.
21. Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, Segovia SA, Gray C. High fat and/or high salt intake during pregnancy alters maternal meta-inflammation and offspring growth and metabolic profiles. *Physiol Rep*. 2014;2(8):1–12.
22. Willebrand R, Kleinewietfeld M. The role of salt for immune cell function and disease. *Immunology*. 2018;154(3):346–53.
23. Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften*. 1995 Apr;82(4):178–87.
24. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10).
25. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(SUPPL. 2):1–6.
26. Hashmat S, Rudemiller N, Lund H, Abais-Battad JM, Van Why S, Mattson DL. Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2016;311(3):F555–61.
27. Jose Barrera G, Sanchez G, Gonzalez JE. Trefoil factor 3 isolated from human breast milk downregulates cytokines (IL8 and IL6) and promotes human beta defensin (hBD2 and hBD4) expression in intestinal epithelial cells HT-29. *Bosn J Basic Med Sci [Internet]*. 2012 Nov 20;12(4 SE-Biochemistry):256–64.

28. Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12(4):197–206.
29. DOUGALL WC, NICK HS. Manganese Superoxide Dismutase: A Hepatic Acute Phase Protein Regulated by Interleukin-6 and Glucocorticoids\*. *Endocrinology* [Internet]. 1991 Nov 1;129(5):2376–84.
30. Jiang GX, Zhong XY, Cui YF, Liu W, Tai S, Wang ZD, et al. IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro. *Mol Biol Rep*. 2010;37(8):3813–8.
31. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184–95.
32. Loncar MB, Al-Azzeh ED, Sommer PSM, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, et al. Tumour necrosis factor  $\alpha$  and nuclear factor  $\kappa$ B inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut*. 2003;52(9):1297–303.
33. Teng X, Xu LF, Zhou P, Sun HW, Sun M. Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF- $\alpha$ , TLR4, and NF- $\kappa$ B in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. *Inflammation*. 2009;32(2):120–9.
34. Monteleone I, Marafini I, Dinallo V, Di Fusco D, Troncone E, Zorzi F, et al. Sodium chloride-enriched Diet Enhanced Inflammatory Cytokine Production and Exacerbated Experimental Colitis in Mice. *J Crohns Colitis*. 2017 Feb;11(2):237–45.
35. Postlethwaite AE, Raghow R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol*. 1988 Feb;106(2):311–8.
36. Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1845–51.
37. Karamehic J, Mekic M, Gavrankapetanovic F, Delic-Sarac M, Subasic D, Resic H, et al. Comparative study of interleukin 1ALFA and interleukin 6 concentrations in serum specimens detected by ELISA. *Med Arh*. 2008;62(3):136–8.
38. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23–63.

39. Vaartjes D, Nandakumar KS, Holmdahl R, Raposo B. Increased salt exposure affects both lymphoid and myeloid effector functions, influencing innate-associated disease but not T-cell-associated autoimmunity. *Immunology*. 2018;154(4):683–94.
40. Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2011 Nov;106(5):787–95.
41. Faraco G, Brea D, Garcia-Bonilla L, Wang G, Racchumi G, Chang H, et al. Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci*. 2018 Feb;21(2):240–9.
42. Wenzel UO, Bode M, Kurts C, Ehmke H. Salt, inflammation, IL-17 and hypertension. *Br J Pharmacol*. 2019 Jun;176(12):1853–63.
43. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1882–6.
44. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, et al. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science*. 1995 Sep;269(5230):1583–5.
45. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313–26.

## 11. Životopis

Ime i prezime: Nika Vlahović

Adresa: Trg bana Josipa Jelačića 4

e-mail: [vlahovic30@gmail.com](mailto:vlahovic30@gmail.com)

Datum rođenja: 30. 1. 1996.

Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

### OBRAZOVANJE:

2014. - 2020. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet

1. - 27.8.2016. tečaj medicinskog njemačkoga jezika na Albert-Ludwig sveučilištu Freiburg,

2010. - 2014. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

7. - 27.7.2013. tečaj njemačkoga jezika u Goethe institutu Schwäbisch Hall, Njemačka

2002. - 2010. Osnovna škola Jagoda Truhelka, Osijek

19.7. - 1.8.2009. tečaj njemačkoga jezika na ActiLingua akademiji u Beču, Austrija

### ZNANJE I VJEŠTINE:

Materinski jezik: hrvatski jezik

Strani jezici: engleski, njemački C1 stupanj, španjolski

Rad na računalu: Windows, Microsoft Office, internet

### NAGRADE I PRIZNANJA:

2018./2019. – Dekanova nagrada za uspješnost u studiranju

## KONGRESNA PRIOPĆENJA:

Vlahović Nika, Zrinka Mihaljević, Anita Matic, Drenjančević Ines. Influence of high dietary intake of kitchen salt (NaCl) on the markers of inflammation in *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BK/6N knockout mice and WT (C57BL/6N) control mice. // RECOOP 3<sup>rd</sup> Student Conference, Wroclaw, Poljska. (sažetak)