

# Utjecaj kratkotrajnog unosa visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na dinamiku subpopulacija leukocita u krvi štakora

---

Meščić, Gordana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:601475>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Meščić Gordana

**Utjecaj kratkotrajnog visokog  
prehrambenog unosa kuhinjske soli na  
dinamiku subpopulacija leukocita u krvi  
štakora**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Meščić Gordana

**Utjecaj kratkotrajnog visokog  
prehrambenog unosa kuhinjske soli na  
dinamiku subpopulacija leukocita u krvi  
štakora**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

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

Mentor rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević

Neposredni voditelj: dr. sc. Anita Čosić, dipl. ing.

Rad ima: 42 lista, 5 tablica i 7 slika.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević na velikoj stručnoj pomoći i strpljenju tijekom provođenja istraživanja i pisanja rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Aniti Ćosić, dipl. ing. na velikoj pomoći i trudu uloženom pri izvođenju pokusa i prikupljanju podataka te dr.sc. Sanji Novak, mag.exp. koja mi je bila od velike pomoći tijekom statističke obrade podataka.

Zahvaljujem se mojoj obitelji koja daje smisao svemu što radim. Hvala im na strpljenju, potpori i razumijevanju koju su mi pružali tijekom cijeloga studija i izrade diplomskoga rada.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	
1.1. Unos soli i kardiovaskularne bolesti .....	1
1.2 Važnost i funkcija endotela .....	2
1.2.1. Endotelna disfunkcija.....	3
1.2.2.Utjecaj oksidativnog stresa na endotelnu funkciju.....	3
1.3. Uloga i struktura adhezijskih molekula.....	4
1.3.1. Integrini.....	4
1.3.1.1. $\beta$ 2 integrini.....	5
1.3.1.2 $\beta$ 1 i $\beta$ 7 integrini.....	6
1.3.2. Adhezijske molekule iz porodice imunoglobulina.....	8
1.3.3. Selektini.....	9
1.4 Adhezijska kaskada.....	11
<b>2. HIPOTEZA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>16</b>
4.1 Animalni model visokog unosa soli.....	16
4.2.Metode.....	16
4.2.1. Protočna citometrija.....	17
4.3 Statističke metode.....	19
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>33</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>34</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>35</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>36</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>42</b>

## Kratice

**NO** – dušikov oksid

**Na** - natrij

**ROS** – slobodni kisikovi radikali

**ED** – endotelna disfunkcija

**TNF** – tumor nekrotizirajući čimbenik

**IL**- interleukin

**CD** – klaster diferencijacije

**LFA** – leukocitni funkcijski antigen

**Mac** – makrofag

**NK stanice** – prirodno ubilačke stanice

**VLA** – vrlo kasni antigen

**VCAM** – vaskularna stanična adhezijska molekula

**MadCAM** - mukozno adresirana stanična adhezijska molekula

**ICAM** – međustanična adhezijska molekula

**PECAM** – trombocitna/endotelna adhezijska molekula

**EGF** – endotelni faktor rasta

**IFN** - interferon

**LAD** – leukocitni adhezijski nedostatak

**GlyCAM** – glikolizacijski ovisna stanična adhezijska molekula

**T reg** - regulatorni limfocit T

**MHC** - glavni sustav tkivne snošljivosti

**LS** - niskoslana dijeta

**HS** – visokoslana dijeta

## Popis tablica

**Tablica 1.** Ligandi za integrine

**Tablica 2.** Paneli za aktivaciju subpopulacija leukocita i izražaja biljega adhezijskih molekula

**Tablica 3.** Učestalost leukocitnih staničnih populacija i izražaja adhezijskih molekula iz uzoraka periferne krvi Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana

**Tablica 4.** Granulocitna stanična populacija i izražaj adhezijskih molekula na leukocitima Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana

**Tablica 5.** Limfocitna stanična populacija i izražaj adhezijskih molekula na leukocitima Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana



## **Popis slika**

**Slika 1.** Opća struktura integrina

**Slika 2.** Opća struktura adhezijskih molekula iz superporodice imunoglobulina

**Slika 3.** Opća struktura selektina

**Slika 4.** Adhezijska kaskada

**Slika 5.** Visokoslanom dijetom izazvane promjene u izražaju CD49d i CD43 biljega na leukocitima periferne krvi

**Slika 6.** Visokoslanom dijetom izazvane promjene u izražaju CD49d i CD11a biljega na leukocitima periferne krvi

**Slika 7.** Shematski prikaz utjecaja visokog unosa soli na migraciju i adheziju leukocita

## 1.UVOD

### 1.1 Unos soli i kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti, kao vodeći uzrok smrtnosti u suvremenom svijetu, sa značajnim udjelom u prijevremenom umiranju, morbiditetu i dizabilitetu stanovništva, važan su javno zdravstveni problem. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, uzrok su smrti 17,3 milijuna ljudi diljem svijeta, odnosno uzrokuju 30% sveukupne smrtnosti. Od toga je 7,3 milijuna smrti od ishemijskih bolesti srca, a 6,2 milijuna od cerebrovaskularnih bolesti (1). U Hrvatskoj su kardiovaskularne bolesti također vodeći uzrok smrti s udjelom od 48,3% u ukupnom mortalitetu 2012. godine (2). Prehrana može na različite načine utjecati na razvoj kardiovaskularnih bolesti. Nepravilan odabir namirnica, prevelik unos ugljikohidrata, kolesterola i masti, kao i prevelik kalorijski unos pridonose razvoju i pogoršanju bolesti (3). S druge strane, dijetna prehrana, povećani unos nezasićenih masnih kiselina iz ribe i ekstradjevičanskoga maslinova ulja mogu znatno reducirati kardiovaskularni rizik (4). Svakako treba paziti i na unos soli te voditi brigu o dovoljnom unosu vitamina, minerala i elemenata u tragovima (5). Sol je potrebna za normalno funkcioniranje organizma. Dnevna potreba za njom iznosi 5 – 6 g (1 čajna žličica) (6). Međutim, povećan unos kuhinjske soli jedan je od glavnih čimbenika za razvoj arterijske hipertenzije. Arterijska hipertenzija je bolest povišenog krvnog tlaka ukoliko mjerene vrijednosti krvnog tlaka, kroz određeni vremenski period, prelaze graničnu vrijednost od 140/90 mmHg. Arterijska hipertenzija nije samo bolest koja se očituje kao patološko povišenje arterijskog tlaka, već je to složeni poremećaj brojnih hormonskih i metaboličkih čimbenika. Neliječena bolest povišenog arterijskog tlaka povećava rizik razvoja drugih bolesti, kao što su bolesti miokarda, angina pectoris, moždani udar, oštećenje bubrega i ateroskleroza. Kronično visoki krvni tlak oštećuje stijenke arterija, a kao posljedica raste vjerojatnost pojave aneurizme, a formiranje plakova i ugrušaka na oštećenim dijelovima stijenke arterija stvara preduvjete za pojavu ili pogoršanje ateroskleroze. Neovisno o primarnom poremećaju arterijska hipertenzija najčešće traje godinama bez bitnih simptoma pa je zbog toga i zovu „tihi ubojica“ (7). U Hrvatskoj je prosječan unos soli oko 13 g na dan, a od povišenoga krvnog tlaka oboli svaka treća osoba (8). Epidemiološke studije su pokazale povezanost unosa soli i arterijske hipertenzije. Populacijske skupine koje uzimaju manje od 3g natrija (Na) na dan gotovo nemaju primarnu hipertenziju niti pokazuju porast krvnog tlaka sa životnom dobi (9). Nedavna metaanaliza 26 kliničkih pokusa pokazala je da smanjenje ekskrecije Na u 24-satnom urinu za 78 mmol (što odgovara 4,6 g Na) snizuje sistolički tlak za –2,0 mmHg, a dijastolički tlak za –1,0 mmHg u

normotenzivnih osoba. Ovaj učinak u hipertoničara iznosi za sistolički tlak  $-5,0$  i dijastolički tlak  $-2,7$  mmHg (10). Slični rezultati dobiveni su i ostalim metaanalizama, što je samo potvrdilo povoljan učinak smanjenog unosa soli na krvni tlak (11). Zapreka smanjivanju unosa kuhinjske soli temelji se na činjenici da 75 – 80% kuhinjske soli unosimo bez svojeg znanja iz gotovih i polugotovih prehrambenih proizvoda, dok tek 15% dodajemo sami (12). Stoga, glavno preventivno mjesto djelovanja trebala bi biti prehrambena industrija s ciljem smanjenog dodavanja Na u različite prehrambene proizvode. Da je takav primjer moguć, pokazuju rezultati iz Finske. Od 1970. godine smanjen je unos Na za 30%, od 4.700 na 3.300 mg/d. Posljedica ovog učinka je sniženje dijastoličkog tlaka u populaciji za 10 mmHg, a to je dovelo do 60%-tnog smanjenja smrtnosti od ishemične bolesti srca i cerebrovaskularnih incidenata (13). Iako velik broj dosadašnjih istraživanja ukazuje na štetni utjecaj visokog unosa soli u prehrani kako na krvni tlak tako i na posljedične štetne učinke po kardiovaskularni sustav, novija istraživanja Weinbergera i suradnika, upućuju da štetni učinci soli mogu biti potpuno neovisni o promjeni krvnoga tlaka te da se izražavaju i u normotenzivnih pojedinaca (14). Studije koje su sljedile potvrdile su štetan učinak visokog unosa soli na vaskularnu funkciju koji se zbiva neovisno o promjenama krvnoga tlaka. Veliki broj istraživanja nastoji razjasniti način i mehanizme kojima sol dovodi do promjena u vaskularnoj funkciji neovisnim o promjenama krvnoga tlaka, no oni još uvijek nisu u potpunosti jasni.

## **1.2. Važnost i funkcija endotela**

Za endotel se nekoć mislilo da je bez posebnih funkcija osim da je selektivno propustan za vodu i elektrolite (15). Međutim, ogromni napredak posljednjih 30 godina dovodi do razumijevanja složenih funkcija ovog velikog endokrinog organa (16). Endotelne stanice oblažu cijeli krvožilni sustav, te imaju vrlo posebne i jedinstvene funkcije kao što su filtracija tekućina, održavanje tonusa krvnih žila, hemostaza, prijenos hormona i drugih hranjivih tvari (17). Pod fiziološkim uvjetima endotelne stanice sintetiziraju i izlučuju veliki spektar antiaterosklerotskih tvari, od kojih je najviše pozornosti zauzeo dušikov oksid (NO) (18). U normalnim uvjetima stimulacija endotela potiče proizvodnju i oslobađanje NO koji difundira kroz okolna tkiva i stanice čime pokazuje svoju kardiovaskularnu zaštitnu ulogu u vidu opuštanja stanica glatkih mišića, sprječavanja adhezije leukocita i njihove migracije u arterijskom zidu, adhezije trombocita, te izraza adhezijskih molekula (19).

### **1.2.1. Endotelna disfunkcija**

U uvjetima bolesti uz prisutnost kardiovaskularnih čimbenika rizika, endotel prolazi funkcionalne i strukturne promjene. Gubi svoju zaštitnu ulogu i poprima proaterosklerotsku strukturu. Gubitak normalne funkcije karakteriziran je smanjenom bioraspoloživostu NO koja je posljedica povećanja reaktivnih kisikovih radikala (ROS) (18-19). Endotelnu disfunkciju (ED) karakteriziraju smanjena vazodilatacija, proupalna stanja i protrombotičke promjene te kao takva predstavlja i nezavisni prediktor kardiovaskularnog rizika. ED nastaje starenjem, ali i u mnogim drugim uvjetima povezanim s povećanim kardiovaskularnim rizikom kao što su hipertenzija, ateroskleroza, dijabetes, dislipidemija, pretilost, pušenje, zatajenja bubrega (20).

### **1.2.2. Utjecaj oksidativnog stresa na endotelnu funkciju**

Oksidativni stres posljedica je neravnoteže između proizvodnje ROS-a i antioksidativnog obrambenog mehanizma. Mjesto djelovanja kardiovaskularnih rizičnih čimbenika je u vaskularnom endotelu. Oksidativni stres ima važnu ulogu u aktivaciji endotela, razvoju ateroskleroze i hipertenzije koje vode progresiji strukturnih i funkcionalnih kardiovaskularnih oštećenja (21). ROS nastaju na mjestima upale i ozljede. Pri niskim koncentracijama djeluju kao signalne molekule i reguliraju temeljne stanične aktivnosti, kao što su rast stanica i prilagodbu stanica; dok pri višim koncentracijama, mogu prouzročiti stanične ozljede i smrt. Vaskularni endotel koji regulira prolaz makromolekula i cirkulirajućih stanica iz krvi do tkiva, glavni je cilj oksidativnog stresa te igra ključnu ulogu u razvoju vaskularnih bolesti i poremećaja. Fiziološki ROS održavaju vaskularni integritet i reguliraju funkciju endotela. U patološkim uvjetima povećane koncentracije ROS-a dovode do disfunkcije endotela pri čemu se aktiviraju patološki mehanizmi koji sudjeluju u razvoju hipertenzije. Povećava se propusnost endotela krvnih žila i pospješuje prijanjanje leukocita (22). Povećanjem razine oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog izražaja proupalnih citokina, što za posljedicu ima prekomjerno pobuđivanje imunološkog sustava, infiltracije stijenke krvnih žila leukocitima, te razvoja upale koja vodi razvoju ateroskleroze. U imunološkom sustavu ROS ima fiziološku ulogu u signalizaciji te kao takvi mogu postati citotoksični ako je signal prejak, traje predugo ili ako se pojavi u pogrešno vrijeme na pogrešnom mjestu. Stanice održavaju homeostazu katabolizirajući reaktivne kisikove radikale i popravljajući oksidativnu ozljedu (23). Stvaranjem ROS-a stanice imunološkog sustava, u prvom redu makrofazi (monociti i neutrofili), uništavaju štetne mikroorganizme što dovodi i do oštećenja normalnog tkiva domaćina. Svaka stanična komponenta može biti meta ROS-a, a učinci ROS-a na stanicu

ovise o razini stanične izloženosti (24). Izlaganjem stanica visokim razinama ROS –a, aktivira se upalni odgovor karakteriziran povećanim razinama tumor nekrotizirajućeg faktora alfa (TNF $\alpha$ ), interleukina – 6 (IL-6), interleukina – 8 (IL-8), povećanim izražajem biljega adhezijskih molekula i promotora oksidativnog stresa.

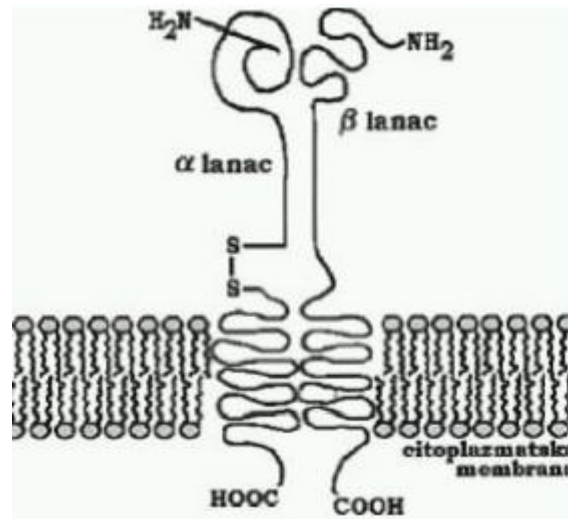
### **1.3. Uloga i struktura adhezijskih molekula**

Adhezijske molekule su proteini na staničnoj površini čija je uloga međusobno povezivanje stanica koje može biti homotropno i heterotropno, te povezivanje stanica s elementima izvanstaničnog matriksa (25). Homotropna adhezija je međusobno povezivanje istovrsnih stanica koje se događa npr. pri adheziji trombocita u procesu stvaranja ugruška. Heterotropna adhezija je međusobno povezivanje različitih vrsta stanica, a primjer za to je vezanje neutrofila za endotel krvnih žila (26). Adhezijske molekule imaju važnu ulogu u mnogim granama medicine, uključujući embriologiju, imunologiju, onkologiju, te su karakterizirane kao „ljepilo života.” U posljednjih 5 godina struktura, regulacija i funkcija mnogih adhezijskih molekula je razjašnjena te je dokazan njihov doprinos u fiziološkim i patološkim stanjima (27, 28). Proces akumulacije leukocita na mjestima upale je dinamičan i uključuje više koraka. Svi koraci moraju biti precizno regulirani kako bi se osigurao brzi odgovor, s minimalnim oštećenjima zdravog tkiva. Leukocitna interakcija s vaskularnim endotelnim stanicama vodeća je u usmjeravanju upalnog odgovora, te je posredovana s nekoliko porodica adhezijskih molekula - integrinima, selektinima i adhezijskim molekulama iz superporodice imunoglobulina. Sve molekule uključene su u različitoj fazi migracije leukocita kroz endotel, a usklađivanje njihovog izražaja i funkcije od ključne je važnosti za normalno novačenje leukocita iz krvi u tkivo.

#### **1.3.1. Integrini**

Skupinu integrina čini niz molekula stanične površine koje sudjeluju u procesima međusobne adhezije stanica te adhezije stanica s elementima unutarstaničnog matriksa (29). Njihova je uloga važna u mnogim biološkim procesima kao što su diferencijacija i morfogeneza, organogeneza, remodeliranje tkiva, tromboza, migracija leukocita i dr. (30). Građeni su od dvije podjedinice,  $\alpha$  (120-180 kDa) i  $\beta$  (90-110 kDa), koje se protežu kroz čitavu staničnu membranu i povezane su nekovalentnim vezama (Slika 1.) Prisutnost dvovalentnih kationa i obje podjedinice neophodna je za vezivanje liganda. Specifičnost vezanja različitih čimbenika stanične adhezije, prvenstveno ovisi o izvanstaničnom dijelu  $\alpha$  podjedinice (31). Do sada je opisano preko 8  $\alpha$  podjedinica, 18  $\beta$  podjedinica te 24

heterodimera, članova porodice integrina (32). S obzirom na  $\beta$  podjedinicu, integrine dalje dijelimo u podskupine. Te podskupine čine molekule integrina, koje osim strukturnih podudarnosti, dijele i neke zajedničke fiziološke funkcije (28). Samo pet članova iz porodice integrina uključeno je u proces adhezije leukocita na endotel. Tri pripadaju  $\beta 2$  leukocitnim integrinima (CD18), jedan  $\beta 1$  leukocitnim integrinima (CD27), i zadnji pripada  $\beta 7$  podporodici.



**Slika 1.** Opća struktura integrina

[http://klinikemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol\\_11\\_1-2\\_2001/2Adhezijske\\_molekule\\_cl\\_1.pdf](http://klinikemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol_11_1-2_2001/2Adhezijske_molekule_cl_1.pdf) Datum pristupa 22.5.2017.

### 1.3.1.1. $\beta 2$ integrini

$\beta 2$  integrini su prisutni isključivo na membranama leukocita i ključni su u procesu migracije leukocita do mjesta upale (26). Porodica  $\beta 2$  integrina sastoji se od tri membranska glikoproteina s uobičajenim  $\beta$  podjedinicama, označenim  $\beta 2$  (CD18).  $\alpha$  podjedinice svakog od tri člana heterodimera LFA-1, Mac-1, i p150,95 označene su kao CD11a, CD11b i CD11c. Obje  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice imaju relativno malu citoplazmatsku domenu na kojoj su regije za vezanje citoskeletnih elemenata (33). Izvanstanična domena je znatno veća, a terminalni dio  $\beta$  podjedinice, koji sadrži ligand vezivajuću regiju, presavijen je u petlju stabiliziranu disulfidnim vezama. Obje podjedinice su potrebne za ekspresiju. U odsutnosti CD18, CD11 se ne može detektirati na površini stanice, iako se sinteza odvija normalno (34). Izražaj  $\beta 2$

integrina je ograničen na leukocite, a raspodjela CD11/CD18 među subpopulacijama leukocita se razlikuje. CD11a je izražen na limfocitima, monocitima i neutrofilima, dok su CD11b i CD11c izraženi prvenstveno na mijeloidnim stanicama, iako su zabilježeni i na nekim limfocitima i prirodno ubilačkim stanicama (NK). Osim što sudjeluju u adheziji leukocita na endotel, imaju ulogu i u fagocitozi, uništavanju bakterija i staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (35). Prianjanje neutrofila i monocita na endotel uglavnom se oslanja na ulogu CD11a i CD11b. Adhezija limfocita uključuje interakciju CD11a s njegovim endotelnim ligandima (36). Važna karakteristika leukocitnih integrina je da su pod normalnim uvjetima u relativno neaktivnom obliku, čineći leukocite neprijanjajućima. Jedan od ključnih događaja u kaskadi adhezije je aktivacija i deaktivacija tih integrina u određenom vremenu i na odgovarajućem mjestu. Aktivacija leukocita različitim medijatorima (npr. C5a, faktor aktivacije trombocita, ili IL-8) dovodi do prolaznog povećanja adhezije ovisnoj o CD11/CD18 mehanizmu. Ova povećana sposobnost adhezije događa se kroz kvalitativne promjene - transformaciju CD11a i CD11b od niskog do visokog stupnja afiniteta, a u fagocita kroz regulaciju površinske ekspresije Mac-1 i p150,95 (27, 28). Leukociti adheziraju putem vezivanja na njihove ligande, članove imunoglobulinskih integrina izražene na svim stanicama.

### **1.3.1.2. $\beta$ 1 i $\beta$ 7 Integrini**

Najveći broj integrina pripadaju  $\beta$ 1 ili VLA porodici. Oni obuhvaćaju niz proteinskih staničnih receptora izvanstaničnog matriksa, uključujući fibronektin, kolagen i laminin. Jedan član ove porodice  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4, CD49d/CD29), je odgovoran za adheziju limfocita, eozinofila, bazofila, NK stanica i monocita na fibronektin i na citokinom aktivirane endotelne stanice vežući se na površinski protein endotelnih stanica (VCAM-1) (35). Mjesto vezanja VLA-4 za VCAM-1 je različito od mjesta vezanja fibronektin jer neutrofilu ne izražavaju VLA-4 i ne mogu koristiti ovaj put adhezije na endotel.  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrin izražen je uglavnom na limfocitima i glavni je receptor vezanja na sluznički vaskularni adresin MAdCAM-1. Ligandi za integrine mogu se podijeliti u dvije skupine: jedna skupina obuhvaća molekule na staničnoj površini iz porodice imunoglobulina (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 i MAdCAM-1), a u drugu ubrajamo čitavo mnoštvo makromolekularnih elemenata izvanstaničnog matriksa (fibronektin, vitronektin, fibrinogen i neke komponente komplekta). Pojedinačni integrini mogu vezati više od jednog liganda i obrnuto. Pojedini ligandi mogu često biti prepoznati od više integrina (Tablica 1).

**Tablica 1.** Ligandi za integrine

Izvor: [http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol\\_11\\_1-2\\_2001/2Adhezijske\\_molekule\\_cl\\_1.pdf](http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol_11_1-2_2001/2Adhezijske_molekule_cl_1.pdf) Datum pristupa: 12.05.2017.

Podjedinica	Ligand	Tip stanice	
		ne – leukocitni	leukocitni
$\beta 1$	$\alpha 1$ kolagen, laminin	fibroblasti, bazalna membrana	aktivirane T i B st.
	$\alpha 2$ kolagen, laminin	trombociti, fibroblasti, endotel, epite	aktivirane T stanice
	$\alpha 3$ fibronektin, laminin, kolagen	epitel, fibroblasti	
	$\alpha 4$ fibronektin, VCAM-1	NC*, fibroblasti	T i B stanice, monociti veliki limfociti
	$\alpha 5$ fibronektin	fibroblasti, epitel, endotel, trombo	timociti, T stanice
	$\alpha 6$ laminin	trombociti	T stanice
	$\alpha 7$ laminin	miociti, epitel	
	$\alpha 8$ osteopontin, vitronektin, fibronektin fibronektin, osteopontin, vitronektin	epitel, NC*	
	$\alpha v$	fibroblasti	
	$\beta 2$ $\alpha L$ ICAM -1, ICAM -2, ICAM-3		T i B stanice,
	$\alpha M$ C3b, fibrinogen, faktor X, ICAM -1		monociti, granulociti
	$\alpha x$ C3b, fibrinogen		monociti, granulociti monociti, granulociti
	$\beta 3$ $\alpha IIb$ fibronektin, fibrinogen, Vwf, vitronektin, trombospondin	trombociti	
	$\alpha v$ osteopontin, kolagen	endotel	
	$\beta 4$ $\alpha 6$ laminin	kancerogene stanice	
	$\beta 5$ $\alpha v$ fibronektin, vitronektin	kancerogene stanice, fibroblasti, epitel	
	$\beta 6$ $\alpha v$ fibronektin	kancerogene stanice, epitel	
	$\beta 7$ $\alpha 4$ fibronektin		unutarepitelni limfociti
	$\alpha E$ E kadherin		unutarepitelni limfociti
	$\beta 8$ $\alpha v$ fibronektin, VCAM-1, laminin		

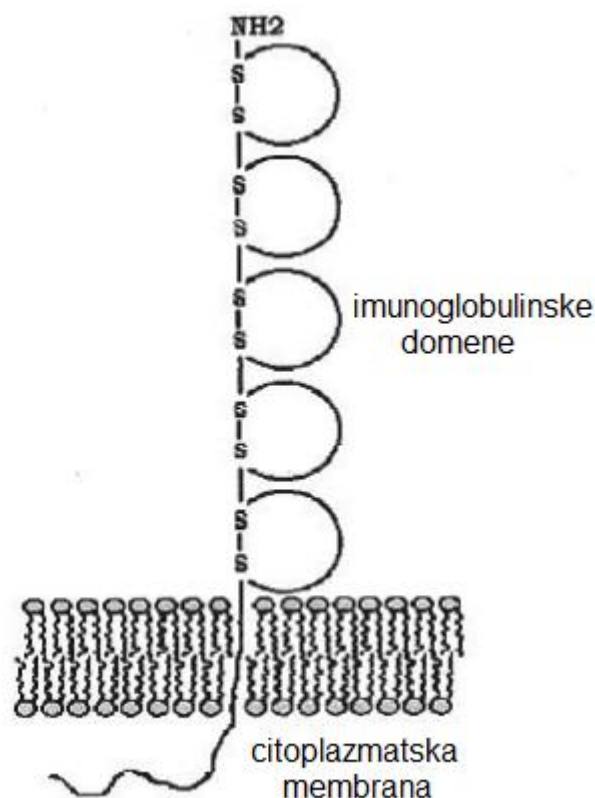
NC\*= stanice podrijetlom iz najranijih začetaka živčevlja

Vrlo često neki unutarstanični uvjeti modificiraju specifičnost integrina prema ligandu, tako da jedan integrin koji se u jednom trenutku nalazi izražen na površini stanice ne mora uvijek nužno moći vezati sve ligande navedene u Tablici 1. Adhezijske interakcije ovisne o integrinima predstavljaju niz složenih događaja koji uključuju aktivaciju, vezanje liganda, reorganizaciju citoskeleta i adheziju. Iako se čini da neki integrini mogu vezati ligande i bez prethodne stimulacije stanice, poznato je da je za pokretanje leukocita ili trombocita iz cirkulacije do mjesta njihovog djelovanja potrebno sudjelovanje nekoliko različitih adhezijskih molekula, kao i aktivacija izvjesnih staničnih signalnih puteva (37).



### 1.3.2. Adhezijske molekule iz superporodice imunoglobulina

Ova skupina adhezijskih molekula obuhvaća čitav niz strukturno i funkcionalno različitih proteina, koji su svrstani u istu skupinu zbog toga što dijele neke zajedničke karakteristike. Sve adhezijske molekule iz porodice imunoglobulina imaju jednu ili više imunoglobulinsku domenu koja ima disulfidni most, a ukupne je dužine 55 do 75 aminokiselinskih ostataka (26). Imunoglobulinske se domene nalaze na vanjskoj strani membrane. Vrlo često, iako to nije uvijek pravilo, radi se o transmembranskim proteinima stanične membrane čija je citoplazmatska domena vrlo kratka (Slika 2.).



*Slika 2. Opća struktura adhezijskih molekula iz superporodice imunoglobulina*

[http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol\\_11\\_1-2\\_2001/2Adhezijske\\_molekule\\_cl\\_1.pdf](http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol_11_1-2_2001/2Adhezijske_molekule_cl_1.pdf) Datum pristupa 22.5.2017.

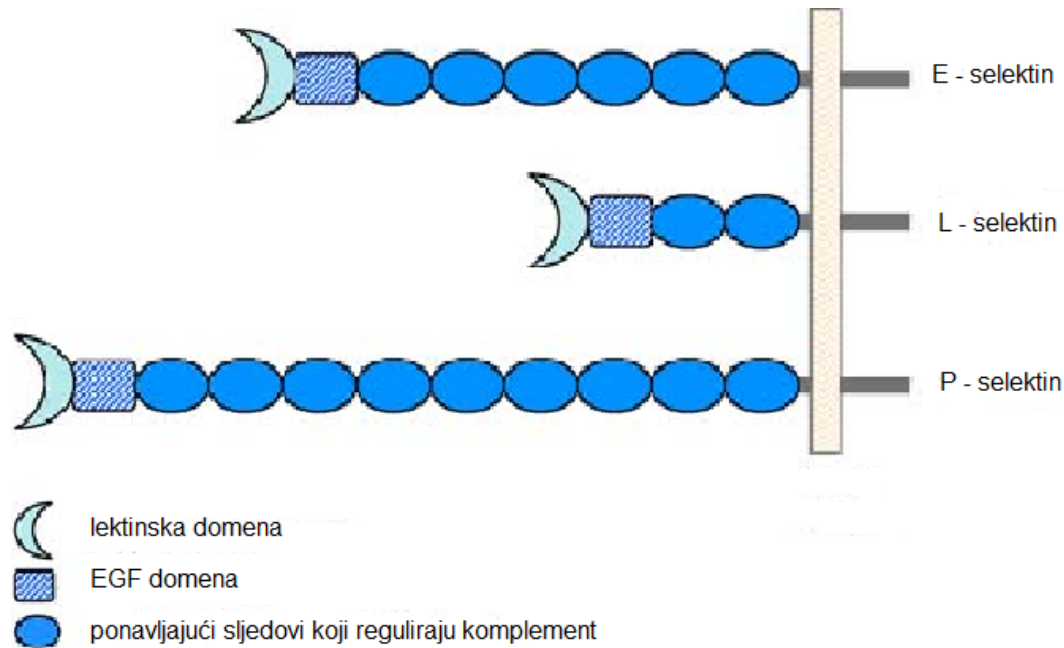
Adhezijske molekule iz ove skupine sudjeluju u čitavom nizu procesa pri razvitku živčanog sustava kao i u embriološkom razvitku, te konačno u imunom i upalnom odgovoru (38). U imunološkom sustavu uloga adhezijskih molekula iz ove porodice je iznimno važna. Glavni su predstavnici ICAM molekule, kojih je sada već poznato pet, zatim VCAM-1 i MAdCAM-1

(27). Ovi proteini služe kao ligandi za integrine, a adhezijske procese treba razmatrati u ovisnosti o endotelnoj stanici i pojedinačnom leukocitu koji međusobno ulaze u interakciju. Nasuprot tome PECAM, još jedan član ove porodice koji sudjeluje u adhezijskim procesima leukocita, pokazuje sposobnost homotropnih adhezijskih interakcija i ima važnu ulogu u staničnoj adheziji između endotelnih stanica i leukocita. ICAM molekule na leukocitima koje pripadaju ovoj porodici su: ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3. Te adhezijske molekule sadrže od 2 do 5 izvanstaničnih imunoglobulinskih domena i kratki citoplazmatski odsječak (26,27). Druga po redu imunoglobulinska domena odgovorna je za vezanje s integrinima na leukocitima, kao i s LFA-1 i s Mac-1 (39,40). Iako je poznato da se unutarstanična domena ICAM-1 molekule može vezati na brojne proteine, od kojih su neki vezani sa staničnim skeletom, prava uloga te domene još nije u potpunosti razjašnjena. VCAM-1 može postojati u dva oblika, odnosno može sadržavati šest ili sedam imunoglobulinskih domena, te može ulaziti u adhezijsku interakciju s dva različita integrina:  $\alpha 4\beta 1$  i  $\alpha 4\beta 7$ . Za vezivanje s integrinima odgovorne su prva i četvrta domena, koje su homologne i smatra se da bi mogle biti rezultat genske duplikacije. MAdCAM-1 posjeduje imunoglobulinske domene homologne s onima u ICAM-1, te usto još i jedinstvenu obilno glikoziliranu regiju, a može ulaziti u adhezijske interakcije s  $\alpha 4\beta 7$  integrinima te s L-selektinom. U uvjetima upale pojačava se izražaj ovih molekula na staničnoj površini, kao rezultat indukcije od strane medijatora upale (27). Izražaj je moduliran tipom medijatora koji se oslobađa na mjestu upale i čini se da predstavlja način nadzora nad tipom leukocita koji će krenuti u migraciju, kao i nad vremenskim slijedom događaja. Stanični izražaj ICAM-1 i VCAM-1 molekula na endotelnoj stanici povećava se kao odgovor na upalni stimulus, za razliku od ICAM-2 koji ima konstitucijski izražaj. Medijatori upale koji induciraju stanični izražaj ICAM-1 i VCAM-1 su TNF-a, lipopolisaharidi i trombin, dok IFN-a regulira izražaj ICAM-1, a IL-4 VCAM-1. Zahvaljujući izražaju ovih adhezijskih molekula, leukociti se novače do površine endotelne stanice, gdje u tom trenutku dolazi do aktivacije izražaja integrina na površini endotelne stanice, nakon čega slijedi čvrsta adhezija leukocita i endotelne stanice (41,37).

### 1.3.3. Selektini

Porodica selektina je najmanje istražena skupina adhezijskih molekula. Sve što se o njima zna uglavnom potječe od ispitivanja procesa novačenja leukocita iz cirkulacije u subendotel. Kako se do sada pokazalo, radi se o maloj porodici koja broji samo tri člana: L-selektin (CD62L), E-selektin (CD62E), i P-selektin (CD62P), koji pokazuju veliku strukturnu sličnost. Selektini sadrže jednu N-terminalnu lektinsku domenu, jednu domenu koja pokazuje visoki

stupanj homologije s epidermalnim čimbenikom rasta (EGF), 2-9 ponavljajuća slijeda koja reguliraju komplement i vrlo kratku citoplazmatsku domenu (Slika 3.) (27,28).



*Slika 3. Opća struktura selektina*

[https://www.researchgate.net/publication/5953701\\_Selectins\\_and\\_selectin\\_ligands\\_in\\_extravasation\\_of\\_cancer\\_cells\\_and\\_organ\\_selectivity\\_of\\_metastasis](https://www.researchgate.net/publication/5953701_Selectins_and_selectin_ligands_in_extravasation_of_cancer_cells_and_organ_selectivity_of_metastasis) Datum pristupa 12.5.2017.

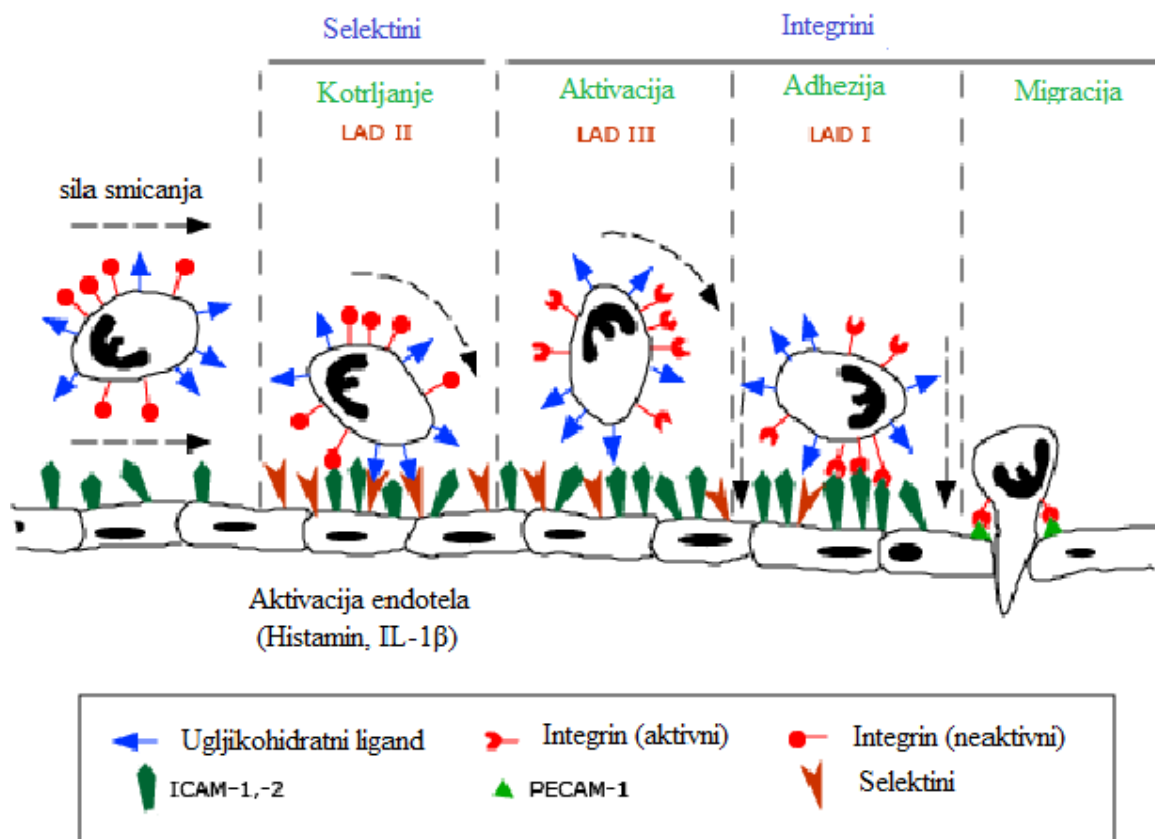
Adhezija koja se odvija uz pomoć selektina je proces ovisan o kalciju. Selektini su medijatori prve faze adhezije leukocita, tzv. prijanjanja cirkulirajućih leukocita na endotelne stanice, trombocite ili druge leukocite (42). Interakcije selektina s ligandom, koje su presudne u tom početnom koraku novačenja cirkulirajućih leukocita do mjesta upale, uključuju brzo stvaranje veze kako bi se omogućilo prijanjanje, brza disocijacija u svrhu klizanja, odnosno kotrljanja uzduž endotela i pogodna slobodna energija veze, dovoljno snažna da bi se leukocit mogao oduprijeti silama protoka krvi (43). Na staničnoj površini postoji vrlo niska razina ekspresije selektina. Sva tri selektina imaju ulogu u novačenju leukocita do ozlijeđenog tkiva, no postoje razlike u njihovoj raspodjeli, aktivaciji i izražaju (44). P - selektin se sintetizira u megakariocitima i endotelnim stanicama, u kojima se skladišti unutar  $\alpha$  granula u trombocitima, odnosno Weibel- Paladijevih tjelešaca u endotelnim stanicama. Nakon stimulacije stanice medijatorima upale (poglavito trombinom i histaminom), P-selektin se novači na površinu stanice iz granula u kojima je skladišten, i to vrlo brzo nakon upalnog

stimulusa, tako da se već unutar 10 minuta zapaža pojačan izražaj P-selektina na staničnoj površini (45). Izražaj P-selektina *in vitro* je vrlo kratkog vijeka, najduže do 15 min (46). E - selektin se sintetizira *de novo* i transportira do stanične površine nakon upalnog stimulusa koji može potjecati od čitavog niza medijatora, a poglavito su bitni IL-1 i TNF-alfa (45). Maksimalni izražaj E-selektina postiže se otprilike 4-6 sata nakon stimulacije, a spušta se na normalnu razinu u roku od 24 sata (44). Iako je izražaj *in vitro* prolazan, zabilježeni su slučajevi izražaja *in vitro* u serumu bolesnika s kroničnim upalnim stanjima. Uloga topivog oblika E - selektina još uvijek nije razjašnjena te koncentracija u serumu nije povezana s aktivnošću bolesti (46). L - selektin je konstitucijski prisutan na staničnoj površini leukocita. Iako je izvorno opisan kao limfocitni receptor, naknadno se pokazalo da ima izražaj i na većini drugih leukocita (47). Topivi cirkulirajući oblik L - selektina može se mjeriti u plazmi kako u zdravih pojedinaca, tako i u nekim patološkim stanjima (48). Poznato je da topivi oblik L - selektina djelomično inhibira adheziju leukocita na stimuliranom endotelu, ali *in vivo* njegova uloga još nije u potpunosti razjašnjena (49). Ligandi za selektine su glikoproteini sa stanične površine koji posjeduju specifične sijalinizirane LewisX strukture, koje još nalazimo i u antigenima krvnih grupa. Točna uloga tih receptora intenzivno se istražuje. P-selektin se veže za odgovarajući glikoproteinski ligand - PSGL-1 (50), L-selektin ulazi u interakciju s GlyCAM-1 i CD34, a E-selektin vjerojatno s ESL-1 (51). Značaj uloge selektina, kao medijatora procesa novačenja cirkulirajućih leukocita do mjesta upale, prepoznat je nakon što je ustanovljeno da postoji čitav niz bolesnika koji pate od teških bakterijskih infekcija od rođenja, grešaka u razvoju, te naposljetku abnormalnosti u profilu krvnih grupa. Sklonost infekcijama te otežano cijeljenje rana nakon teških bakterijskih infekcija u bolesnika s poremećajem u funkciji selektina slično je već prethodno opisanom poremećaju u ekspresiji  $\beta 2$  integrina na staničnoj površini: taj rijetki poremećaj nazivamo LAD-2, a do njega dolazi zbog nedostatka ključnog enzima u procesu stvaranja sijaliziranih Lewis-X struktura (52). U tih se bolesnika normalno stvara selektin, ali nedostaje njegov ligand. Leukociti bolesnika pogođenih tim poremećajem ne mogu se adekvatno novačiti iz cirkulacije do mjesta upale zbog toga što ne mogu izvesti tzv. klizanje uz endotel (53,54).

#### **1.4. Adhezijska kaskada**

Pokretanje leukocita iz cirkulacije u smjeru kemoatraktanta događa se kao posljedica dobro usklađenog zbira događaja. Faze tog događaja su usporavanje leukocita i prijanjanje uz endotel krvne žile, klizanje odnosno kotrljanje duž endotela krvne žile, aktivacija, adhezija i

migracija, a zbivaju se zahvaljujući interakciji selektina ili integrina s odgovarajućim ligandima (50,55). Ti procesi su prikazani na Slici 4.



**Slika 4.** Adhezijska kaskada

<http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?7/62/8162>

(Datum pristupa 11.5.2017)

Izražavanje liganda za selektine i integrine potiču upalni signali kao što je interferon ili TNF- $\alpha$ . Kemokini oslobođeni iz sloja endotela zahvaćenog upalom ulaze u interakciju sa specifičnim receptorima na neutrofilima, aktivirajući na taj način unutarstaničnu kaskadnu reakciju. Kao rezultat te kaskadne reakcije dolazi do aktivacije ekspresije integrina i takvih promjena citoskeleta koje omogućuju neutrofilu da se prostre uzduž površine endotelne stanice, kako bi se što bolje priljubio uz nju. Nakon toga se neutrofil počinje provlačiti kroz sloj endotelnih stanica i dopijeva u subendotelni prostor kao odgovor na upalni stimulus. Iako je poznato da selektini imaju presudnu ulogu u prijanjanju i klizanju neutrofila uz endotelnu stanicu, da kemokini izlučeni na mjestu upale aktiviraju neutrofile te da su integrini

zaslužni za čvrstu adheziju neutrofila uz endotelnu stanicu, ipak je još uvijek nedovoljno poznat i istražen točan redosljed zbivanja i svi čimbenici koji u njemu sudjeluju (56).

## **2. HIPOTEZA**

Ispitat ćemo hipotezu da kratkotrajni povećani unos soli dovodi do promjena u izražajnosti biljega stanične adhezije, kao i do promjena u subpopulaciji leukocita u perifernoj krvi.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Ocijeniti dinamiku aktivacije leukocita kod Sprague-Dawley štakora na HS i LS dijeti određivanjem izražajnosti komplementarnih liganada za adhezijske molekule endotelne stanice (CD11b, CD15 i CD49d) na različitim podskupinama leukocita (CD4<sup>+</sup> T-stanica, CD8<sup>+</sup> T-stanice, neutrofil, monociti); a posebno CD11b visoko afinitetnu aktivnu izoformu i memorijske/naivne T stanice (CD25, CD62L i CD44) kako bi se odredili ranije aktivirani leukociti.



## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Animalni model visokog unosa soli**

U istraživanju su se koristili zdravi Sprague-Dawley štakori oba spola starosti 10 - 11 tjedana. U toj dobi životinje su slučajnim odabirom bile podjeljene u 2 skupine i uvedene u dijetni protokol u trajanju od 7 dana:

1. Niskoslana (LS) skupina (N= 6; životinje su konzumirale standardnu hranu za štakore i običnu pitku vodu kroz 7 dana)
2. Visokoslana (HS) skupina (N= 6; životinje su konzumirale hranu s visokim udjelom soli (4% NaCl-a) i običnu pitku vodu kroz 7 dana)

Nakon 7 dana dijete, štakori su izvagani te anestetizirani kombinacijom ketanesta S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Životinje su potom dekapitirane te su uzorci miješane krvi (venske i arterijske) skupljene u epruvete s EDTA antikoagulansom i spremljene na led kako bi što veći broj stanica preživio.

Svi eksperimentalni postupci su usklađeni s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (Klasa:602-04/14-08/06, Broj: 2158-61-07-14-04)

### **4.2. Metode**

*Protokol prikupljanja periferne krvi i bojanje protutijelima:*

Uzorci periferne krvi prikupljeni su odmah nakon dekapitacije životinja u epruvete koje sadrže 6-10% 0.5 M EDTA. Prije bojenja protutijelima, stanice su inkubirane štakorskim Fc blokom (BD Bioscience), a zatim bez ispiranja, inkubirane su mješavinom CD3 PerCP-eFluor® 710 (klon: eBioG4.18, eBioscience), CD11b/c PE (klon: OX42, eBioscience), CD49d APC (klon: MRa4-1, eBioscience), MHC II FITC (klon: HIS19, eBioscience), CD43 biotin (klon: W3 / 13, BioLegend), granulocitni marker FITC (klon: HIS48, eBioscience),

CD11a PE (klon: WT.1, eBioscience) i CD8 PE-Cy7 (klon: OX8, eBioscience) 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. Eritrociti su lizirani pomoću BD Lysing Solution 10 min/37 ° C i isprani dva puta po 5 minuta na 400g/18°C. Biotinilirano protutijelo obilježeno je streptavidinom APC Cy7 (bBioLegend) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i potom isprano. Nakon posljednjeg procesa pranja, stanice su fiksirane 1% formaldehidom. Sakupljeno je najmanje 10.000 stanica pomoću BD FACS Canto II citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i analizirano pomoću softvera FlowLogic (Inivai Technologies, Menton, Australija).

#### **4.2.1. Protočna citometrija**

Protočna citometrija je metoda visoke osjetljivosti i multiparametarskog pristupa, tj. mogućnošću istodobne analize fizičkih (veličina i zrnatost) i imunoloških parametara (biljega) pojedinačnih stanica. Membranski i citoplazmatski biljezi otkrivaju se pomoću specifičnih protutijela, obilježenih fluorokromima. Monoklonska antitijela su dizajnirana tako da prepoznaju različite epitope vrlo sličnih molekula kao i različite izotipove istih molekula, tako da je odabir protutijela ključan za dokazivanje željenih staničnih biljega. Danas se primjenjuje dvostruko, trostruko ili četverostruko bojenje stanica, čime se osigurava bolji uvid u odnos specifičnih biljega na stanici (57-58). Protočna citometrija je u današnjem obliku poznata 40 - ak godina, iako su se slični oblici mjerenja protočnim sustavom pomoću rasapa svjetla pojavili puno ranije. Protočni citometar sastoji se od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje da stanice iz stanične suspenzije, pojedinačno, laminarno, protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti pokazatelj je fizičkih osobina stanica - veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom, FSC - prema engl. forward scatter) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. side scatter). Dodatno obilježavanje stanica slobodnim ili (najčešće), za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi, obasjani laserskom svjetlošću, emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici (detektori) protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u

elektroničko računalo i služe za analizu. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC), na kojem se postavlja regija (gate) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da stanice prije analize nije potrebno prethodno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu mjerenja signala ( $> 10^3$  stanica u sekundi) te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala) stoga se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do desetak parametara. Premda je do danas razvijen velik broj protočnocitometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja i/ ili funkcija, protočna citometrija još se uvijek ponajviše rabi u svrhu imunofenotipizacije, tj. obilježavanja specifičnih staničnih biljega (59).

### *Imunofenotipizacija*

Imunofenotipizacija je tehnika koja omogućuje određivanje različitih staničnih biljega, upotrebom specifičnih protutijela, te proučavanje njihova međusobnog odnosa. Na površini pojedinih vrsta stanica nalaze se specifični stanični biljezi koji omogućuju identifikaciju pojedinog tipa stanica. Specifični biljezi mogu se naći i na strukturama unutar stanice, na organelama, staničnoj jezgri i u slobodnom obliku unutar stanične citoplazme. Specifični biljezi ili antigeni nazivaju se CD antigeni (CD-Cluster of Differentiation; razlikovna obilježja). Otkrićem specifičnih monoklonskih antitijela za te stanične biljege i njihovom upotrebom u imunofenotipizaciji stanica, omogućeno je izdvajanje određene stanične populacije na temelju točno definiranih značajki (5). Prema međunarodnoj klasifikaciji, svi su leukocitni diferencijacijski biljezi razvrstani u 339 CD skupina (60). Oni mogu biti specifični za staničnu lozu, stupanj diferencijacije stanice ili odražavaju posebna biološka svojstva stanica. (aktivaciju i proliferaciju) (61).

### *Priprema uzorka*

Periferna krv je bila sakupljena u epruvete koje su sadržavale 6-10% 0.5 M EDTA. Dobivena stanična suspenzija se 1x ispirala u PBS-u (1 x 5 min centrifugiranja na  $400g/+4^{\circ}C$ ) te resuspendirala u adekvatnom volumenu svježeg PBS-a. Koncentracija stanica je bila prilagođena na  $1 \times 10^7$  stanica/ml.

### *Površinsko stanično bojanje*

Prije bojanja stanice su bile inkubirane štakorskim Fc block (BD Bioscience) i zatim bez ispiranja inkubirane smjesom prethodno titriranih protutijela u optimalnoj koncentraciji, koja su konjugirana određenim fluorokromom. Korišteni su paneli prikazani u Tablici 2. Pokusi protočne citometrije odrađeni su u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju u sklopu Medicinskog fakulteta Osijek.

Tablica 2. Paneli za aktivaciju subpopulacija leukocita i izražaja biljega adhezijskih molekula

<b>PANEL I za aktivacija makrofaga, definiranje podvrste CD43 i izražaj integrina VLA-4 i CD11b/c</b>	<b>PANEL II za određivanje aktiviranih neutrofila i izražaj integrina VLA-4 i CD11b/c</b>	<b>PANEL III za praćenje aktivacije T limfocita i izražaj VLA-4 i CD11a</b>
CD3 PerCP-eFluor® 710	CD11b/c PE	CD3 PerCP-eFluor® 710
CD 4 FITC	CD 49d APC	CD4 FITC
CD 11b/c PE	marker granulocita FITC (klon: HIS48)	CD11a PE
CD 49d APC		CD49d APC
MHC II FITC		CD8 PE –Cy7
streptavidin APC Cy7		

Stanice su inkubirane 20 min. na sobnoj temperaturi u mračnoj komori, potom su eritrociti lizirani pomoću BD PharmLysis puferom kroz 10 min/37°C. Uzorci su zatim isprani 2x pomoću PBS-a 5 min/400g/18°C. Biotinilirano protutijelo, koje je označeno streptavidin APC Cy7 (protokol I), inkubirano je na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta u mračnoj komori i ponovno isprano. Prije samog očitavanja rezultata, stanice su fiksirane 1% formaldehidom.

#### *Analiza uzoraka na protočnom citometru*

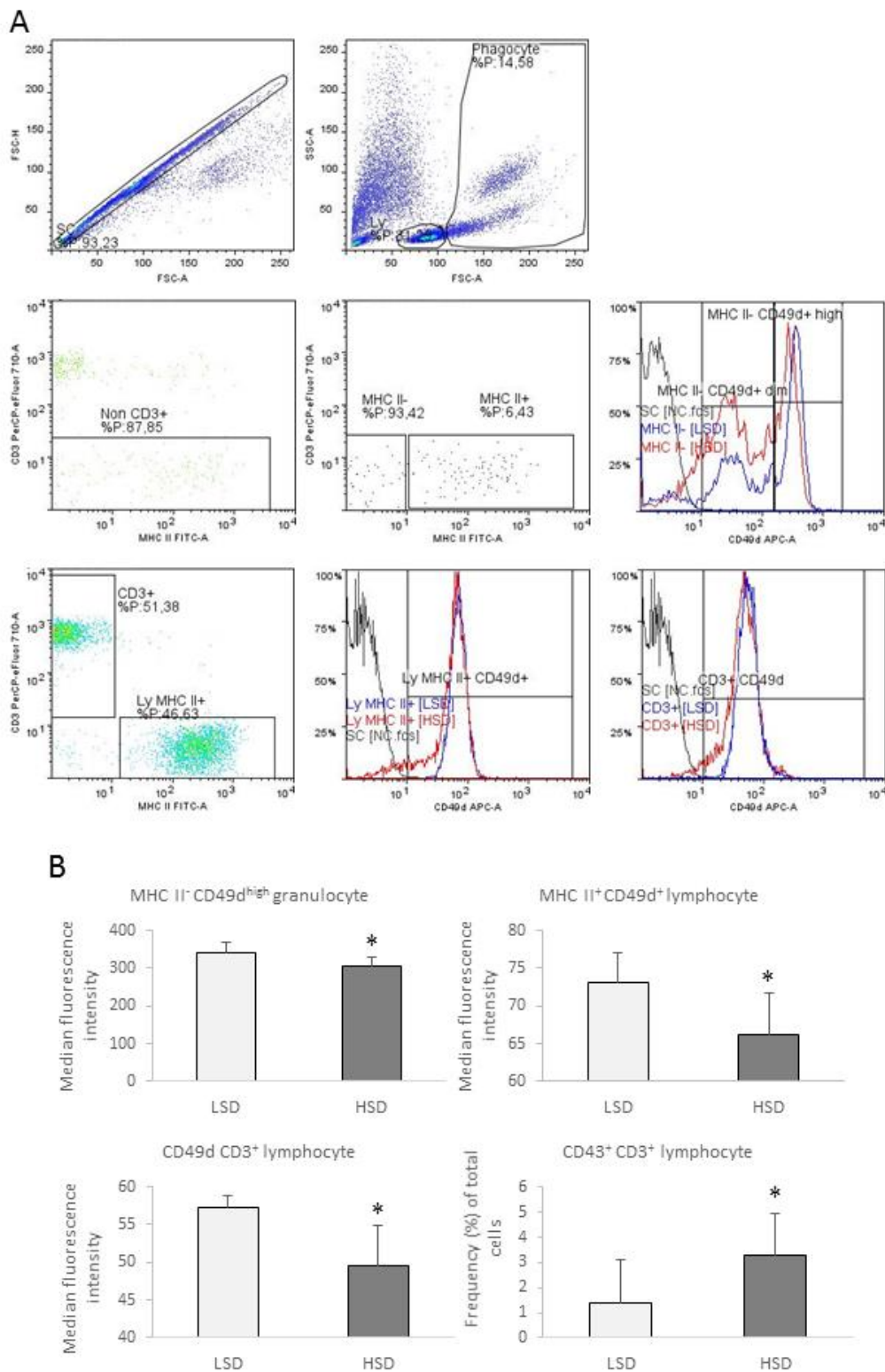
Za analizu uzoraka i pohranu podataka korišten je protočni citometar FACS Canto II (BD Bioscience; 488 laser za ekscitaciju te 530/30 BP filter za analizu) i Diva 6 program. Završne analize učinjene su pomoću besplatnog programa za analizu FSC datoteka, Flowing software (by Perttu Terho).

### 4.3. Statističke metode

Veličina uzorka određena je na temelju preliminarnih rezultata istraživanja. Za uočavanje učinka  $0,18 \pm 0,05$  uz  $\alpha = 0,05$  i snagu testa 0,8 potrebna veličina uzorka je najmanje 3 životinje po skupini (2 skupine, 9 životinja po skupini). Za usporedbu normalno distribuiranih numeričkih varijabli između dvije skupine koristit će se Student t-test, a u slučaju odstupanja od normalne distribucije rezultati će biti analizirani pomoću Mann-Whitney U testa. Razina statističke značajnosti bit će određena kao  $p < 0,05$ . Rezultati će biti prikazani kao standardna pogreška srednje vrijednosti (SEM). Kao statistički program koristit će se SigmaPlot (inačica 11.0, Systat Software, Inc, Chicago, USA).

## 5. REZULTATI

Raspodjela upalnih stanica u perifernoj krvi, uključujući limfocite T i B, granulocite i makrofage / dendritičke stanice i izražaj adhezijskih molekula procijenjena je u niskoslanjoj skupini (LS) i visokoslanjoj skupini (HS) Sprague Dawley štakora. Učestalost staničnih populacija - T i B limfocita, granulocita i makrofaga / dendritičkih stanica nije se razlikovala u eksperimentalnim skupinama ( $P > 0,05$  Tablica 3.) Visokoslana dijeta izazvala je značajno smanjenje leukocita s visokom ekspresijom CD49d + (u granulocitima  $P = 0,004$  MHC II + limfocita  $P = 0,008$  i CD3 + limfocita  $P = 0,001$  slika 5). Upotrijebljen je granulocitni marker HIS48 u svrhu daljnjeg određivanja granulocitne populacije i izražaja CD49d biljega. Njihova ukupna učestalost nije promijenjena zbog njihove veće sposobnosti proliferacije / diferencijacije ( $P = 0.326$ ). Izražaj CD11b/c biljega na granulocitima periferne krvi (HIS48 pozitivne stanice) nije promijenjen unosom soli. Izražaj CD43 + biljega povećan je u HS grupi u usporedbi s LS skupinom ( $P = 0.031$ ). Mjerena je učestalost populacija CD3 + CD4 + i CD3 + CD8 + stanica između ispitivanih skupina i rezultati nisu pokazali statističku razliku u HS u usporedbi s LS skupinama ( $P = 0.142$  i  $P = 0.145$ ). Medijan izražaja CD49d na CD3 + CD4 + i CD3 + CD8 + stanicama nije promijenjen povećanim unosom prehrambene soli (Tablica 5.).



**Slika 5.** Visokoslanom dijetom izazvane promjene u izražaju CD49d i CD43 biljega na leukocitima periferne krvi

Na slici A prikazan je točkasti graf i histogram leukocita periferne krvi dobiven protočnom citometrijom, te područje postavljanja ograde („gate“). Slijepljene stanice su isključene iz analize pomoću mjere veličine (forward scatter area (FSC-A)) i znatosti (forward scatter height (FSC-H)) stanica. Postavljena je ograda na fagocitnu populaciju na FSC-A i SSC-A, a isključene su CD3 + MHCII + stanice. Ograđena je i populacija limfocita, te su T i B limfociti potvrđeni izražajem CD3 i MHC II biljega, te je određen medijan izražaja CD49d i CD43 biljega na stanicama. Na histogramu plava linija predstavlja uzorak LS skupine, crvena linija uzorak HS skupine, dok je sivom linijom prikazan neobojani uzorak. Izmjeren je medijan izražaja CD49d biljega na granulocitima periferne krvi, te je izračunat medijan izražaja CD49d biljega na visoko pozitivnim CD49d granulocitima, MHC II + na populaciji monocita i limfocita te učestalost CD43 + CD3 + limfocita periferne krvi (slika B). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija živih pojedinačnih limfocita. \* Statistički različiti od LS,  $P < 0,05$ . LS, niskoslana dijeta; HS, visokoslana dijeta.



**Tablica 3.** Učestalost leukocitnih staničnih populacija i izražaja adhezijskih molekula iz uzoraka periferne krvi Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

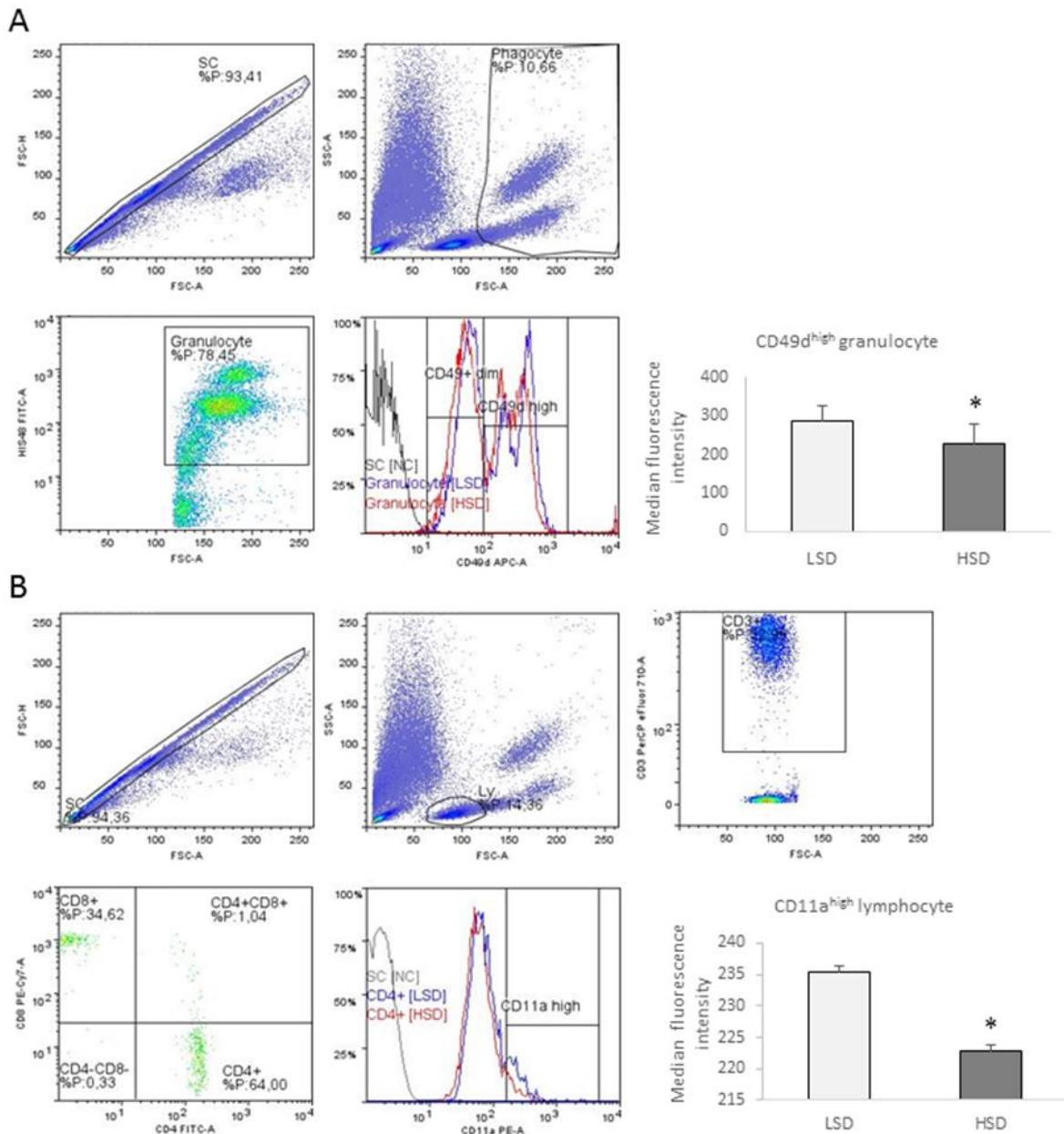
Stanične populacije	LS (niskoslanja dijeta)	HS (visokoslanja dijeta)	P vrijednost
CD3 <sup>+</sup> neg. stanice (% od ukupnih leukocita)	6,95 $\pm$ 3,45	9,37 $\pm$ 6,78	0,353
MHC II <sup>+</sup> fagociti (% od ukupnih leukocita)	0,46 $\pm$ 0,27	0,55 $\pm$ 0,34	0,523
MHC II <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	0,11 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,07	0,106
Medijan izražaja CD43 <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> fagocita	24,54 $\pm$ 12,47	21,51 $\pm$ 9,69	0,573
MHC II <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	0,46 $\pm$ 0,27	0,52 $\pm$ 0,32	0,647
Medijan izražaja CD49d <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> fagocita	200,83 $\pm$ 35,89	163,36 $\pm$ 45,51	0,070
Monociti MHC II <sup>+</sup> CD11b/c <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	0,22 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,18	0,327
Medijan izražaja CD11b/c <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> fagocita	312,16 $\pm$ 82,73	276,41 $\pm$ 80,21	0,366
MHC II <sup>+</sup> fagociti (% od ukupnih leukocita)	6,48 $\pm$ 3,19	8,81 $\pm$ 6,49	0,349
MHC II <sup>+</sup> CD11b/c <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	6,09 $\pm$ 3,12	8,04 $\pm$ 6,17	0,412
Medijan izražaja CD11b/c <sup>+</sup> MHC II-fagocita	311,11 $\pm$ 53,21	290,73 $\pm$ 95,62	0,586
MHC II <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	6,23 $\pm$ 3,23	7,51 $\pm$ 5,06	0,533
Medijan izražaja CD49d <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> fagocita	135,38 $\pm$ 87,89	74,18 $\pm$ 46,76	0,090
MHC II <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> visokopozitivni (% od ukupnih leukocita)	2,69 $\pm$ 1,29	2,11 $\pm$ 1,15	0,326
<b>Medijan izražaja visokopozitivnih CD49d<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> fagocita</b>	<b>343,04 <math>\pm</math> 25,56</b>	<b>304,43 <math>\pm</math> 23,47</b>	<b>0,004</b>
MHC II <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> dimer (% od ukupnih leukocita)	3,50 $\pm$ 2,02	5,35 $\pm$ 4,27	0,257
Medijan izražaja CD49d <sup>+</sup> dimera MHC II- fagocita	36,65 $\pm$ 3,41	34,17 $\pm$ 5,13	0,244
MHC II <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	3,24 $\pm$ 1,20	5,33 $\pm$ 4,64	0,222
Medijan izražaja CD43 <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> fagocita	40,35 $\pm$ 23,61	50,77 $\pm$ 36,23	0,482
MHC II <sup>+</sup> limfociti (% od ukupnih leukocita)	7,82 $\pm$ 3,61	7,12 $\pm$ 3,50	0,681
MHC II <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> limfociti (% od ukupnih leukocita)	7,82 $\pm$ 3,61	7,12 $\pm$ 3,50	0,338
<b>Medijan izražaja CD49d<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> limfocita</b>	<b>73,07 <math>\pm</math> 4,03</b>	<b>66,18 <math>\pm</math> 5,54</b>	<b>0,008</b>
MHC II <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> limfociti (% od ukupnih leukocita)	3,35 $\pm$ 1,37	4,57 $\pm$ 2,62	0,237
Medijan izražaja CD43 <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> limfocita	32,67 $\pm$ 27,91	36,74 $\pm$ 27,78	0,758
CD3 <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	7,58 $\pm$ 3,74	6,24 $\pm$ 2,70	0,397
CD3 <sup>+</sup> CD49d <sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)	7,53 $\pm$ 3,72	5,96 $\pm$ 2,50	0,311
<b>Medijan izražaja CD3<sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup> limfocita</b>	<b>57,26 <math>\pm</math> 1,57</b>	<b>49,53 <math>\pm</math> 5,29</b>	<b>0,001</b>
<b>CD3<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> (% od ukupnih leukocita)</b>	<b>1,37 <math>\pm</math> 1,77</b>	<b>3,29 <math>\pm</math> 1,68</b>	<b>0,031</b>
Medijan izražaja CD3 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup> limfocita	33,67 $\pm$ 27,56	38,09 $\pm$ 25,15	0,727

**Tablica 4.** Granulocitna staničana populacija i izražaj adhezijskih molekula na leukocitima Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Stanične populacije	LS (niskoslanja dijeta)	HS (visokoslanja dijeta)	P vrijednost
Granulociti (% od ukupnih leukocita)	5,71 $\pm$ 2,03	7,41 $\pm$ 4,61	0,326
CD11b/c (% od ukupnih leukocita)	5,05 $\pm$ 1,78	6,44 $\pm$ 4,18	0,373
Medijan izražaja CD11b/c PE	325,59 $\pm$ 60,03	392,28 $\pm$ 102,62	0,112
CD49d (% od ukupnih leukocita)	5,66 $\pm$ 2,03	7,31 $\pm$ 4,56	0,336
Medijan izražaja CD49d APC-A	113,71 $\pm$ 66,47	86,16 $\pm$ 52,29	0,344
CD49+ dimer( % od ukupnih leukocita)	2,66 $\pm$ 1,20	3,97 $\pm$ 3,30	0,288
Medijan izražaja CD49d dimera APC-A	33,84 $\pm$ 6,27	31,66 $\pm$ 4,90	0,423
CD49d visokopozitivni (% od ukupnih leukocita)	2,99 $\pm$ 0,94	3,33 $\pm$ 1,57	0,586
<b>Medijan izražaja APC-A kod visokopozitivnih CD49d stanica</b>	<b>286,92 <math>\pm</math> 39,54</b>	<b>227,37 <math>\pm</math> 49,90</b>	<b>0,013</b>

**Tablica 5.** Limfocitna stanična populacija i izražaj adhezijskih molekula na leukocitima Sprague Dawley štakora na niskoslanjoj dijeti (LS) i Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti (HS) tijekom 7 dana. Podatci su prikazani kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Stanične populacije	LS (niskoslana dijeta)	HS (visokoslana dijeta)	P vrijednost
CD8+ % od ukupnih leukocita	2,94 ± 1,26	2,09 ± 1,11	0,145
CD8+CD11a+ % od ukupnih leukocita	2,94 ± 1,26	2,09 ± 1,11	0,146
Medijan izražaja CD11a PE-A kod CD8+ stanica	127,33 ± 22,95	140,21 ± 38,09	0,398
CD8+CD49d+ % od ukupnih leukocita	2,94 ± 1,26	2,08 ± 1,11	0,144
Medijan izražaja CD49d+ APC-A kod CD8+ stanica	68,05 ± 2,92	67,23 ± 2,69	0,545
CD4+ % od ukupnih leukocita	4,59 ± 1,80	3,28 ± 1,78	0,142
CD11a++ % od ukupnih leukocita	0,88 ± 0,48	0,95 ± 0,79	0,821
<b>Medijan izražaja CD11a++ PE-A</b>	<b>235,36 ± 7,62</b>	<b>222,80 ± 13,49</b>	<b>0,027</b>
CD4+CD11a+ % od ukupnih leukocita	4,59 ± 1,80	3,28 ± 1,78	0,141
Medijan izražaja CD11a PE-A kod CD4+	99,30 ± 18,77	121,90 ± 39,17	0,138
CD49d++ % od ukupnih leukocita	0,43 ± 0,15	0,31 ± 0,16	0,114
Medijan izražaja CD49d++ APC-A	164,43 ± 11,45	161,35 ± 11,23	0,572
CD4+CD49d+ % od ukupnih leukocita	4,51 ± 1,78	3,24 ± 1,76	0,145
Medijan izražaja CD49d+ APC-A kod CD4+ stanica	57,56 ± 1,86	55,56 ± 2,62	0,080



**Slika 6.** Visokoslanom dijetom izazvane promjene u izražaju CD49d i CD11a biljega na leukocitima periferne krvi.

Na slici A prikazan je točkasti graf i histogram leukocita periferne krvi dobivenih protočnom citometrijom, te područje postavljanja ograde i izražaj biljega CD49d u LS i HS skupini. Slijepljene stanice su isključene analize pomoću mjere veličine (forward scatter area (FSC-A)) i zrnatosti (forward scatter height (FSC-H)) stanica te su HIS48 pozitivne stanice dalje analizirane mjerenjem medijana izražaja CD49d biljega na granulocitima periferne krvi. Na slici B prikazan je točkasti graf i histogram leukocita periferne krvi dobivenih protočnom

citometrijom, te područje izdvojenih limfocita. Mjerena je učestalost CD3 + CD4 + i CD3 + CD8 + stanica i medijan izražaja CD11a biljega na limfocitima periferne krvi sa značajno nižim MFI na CD4 + limfocitima skupini štakora na visokoslanoj dijeti. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija živih pojedinačnih limfocita. \* Statistički različit od LS, P <0,05. LS, niskoslana dijeta; HS, visokoslana dijeta, izražaj CD49d biljega u HIS48 + granulocitima, podatci su prikazani kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija, P <0,05, \* statistički različita od LS.

## 6. RASPRAVA

Visok unos kuhinjske soli dovodi do aktivacije imunološkog sustava, a smanjena regulacija izražaja određenih adhezijskih molekula u HS skupini upućuje da navedene stanice migriraju kroz endotelni sloj krvnih žila, eventualno do mjesta budućeg stvaranja plaka. Oštećena funkcija endotela, zajedno s upalom, obilježava ranu aterosklerozu. Visoki unos soli dovodi do oštećene funkcije endotela, kako u makro tako i u mikrocirkulaciji. Međutim, učinci soli na funkciju imunološkog sustava nisu poznati. Nedavne studije su pokazale kako visoki unos soli u hrani može utjecati na normalno funkcioniranje imunološkog sustava. Posebice, pokazano je da povećane koncentracije soli u fiziološkim uvjetima in vivo značajno pojačavaju indukciju mišjih i ljudskih Th17 stanica i smanjuju funkciju T regulatornih stanica koje zajedno olakšavaju razvitak autoimunosti (62,63). Stanice imunološkog sustava, uključujući limfocite T, posjeduju receptore za Ang II, no njihova uloga u aktivaciji limfocita i promoviranju aterogenih procesa još uvijek nije poznata. U posljednjih nekoliko godina objavljeno je nekoliko studija u pokušaju da se shvati da li HS dijeta utječe i / ili djeluje kao pokretač za nastanak upalnog procesa ili je zapravo zaštitna zbog suzbijanja RAS-a (64). Studije na ljudima ukazuju da promjene u razinama konzumiranja soli mogu imati značajan utjecaj na populacije pojedinih krvnih stanica i na izlučene razine pro i protuupalnih citokina kao što su IL-6, IL-23 i IL-10 in vivo što dovodi do prekomjernog imunog odgovora (65). Pokazano je također na modelu miševa da već mali porast koncentracije soli inducira serumsku razinu glukokortikoidne kinaze 1 (SGK1) i izražaj serin / treonin kinaze, potičući izražaj IL-23R i promjenu u diferencijaciji TH17 stanica in vitro i in vivo, ubrzavajući razvoj autoimunosti. Povećanje razine soli, bilo in vitro ili u mišjim modelima putem prehrane, značajno narušava regulatorne T-stanice (Treg) (63). Ćosić i suradnici su dokazali kako tjedan dana visokog unosa soli prehranom povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS-a) u perifernim limfnim organima i tako stvara dodatnu razinu oksidativnog stresa što može pridonijeti smanjenoj vazodilataciji središnje moždane arterije(66). Jednako tako, povećanjem razine oksidativnog stresa dolazi do prekomjernog izražaja proupalnih citokina, što uzrokuje prekomjerno pobuđivanje imunološkog sustava. Na taj način dovodi do aktivacije endotela, infiltracije stijenke krvnih žila leukocitima i razvoja upale koja vodi razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti.

U imunološkom sustavu ROS ima fiziološku ulogu u signalizaciji koja se vjerojatno proteže na svaki tip stanice. Kao i svaki signalni mehanizam, ROS može postati citotoksičan ako je signal prejak, ako traje predugo ili ako se pojavi u pogrešno vrijeme na pogrešnom mjestu.

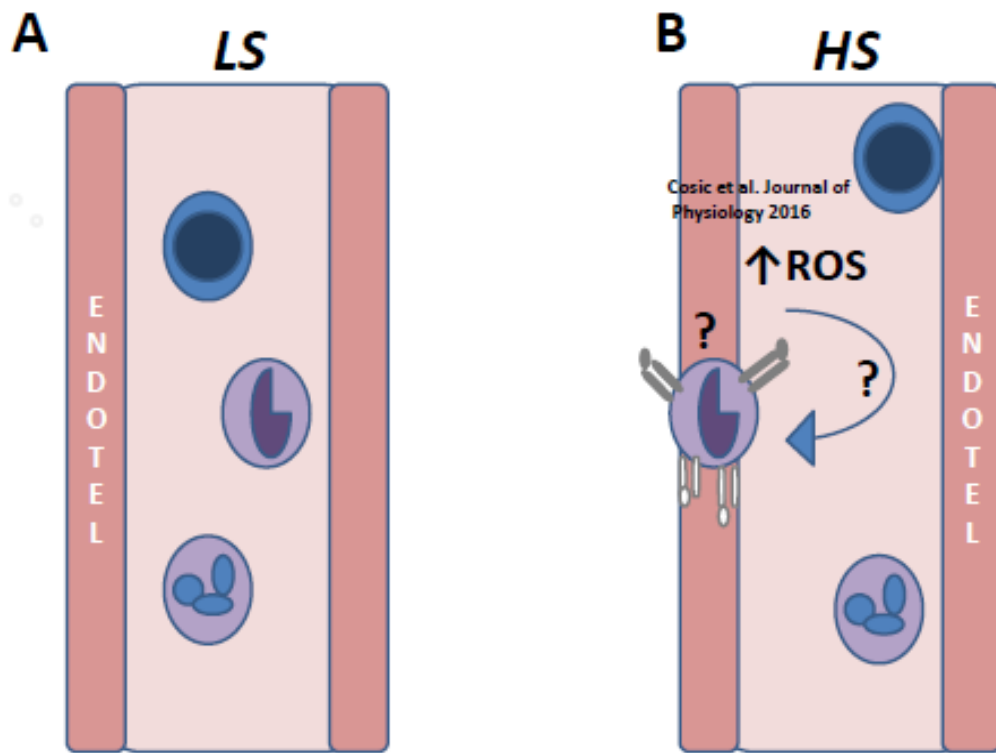
Stanice održavaju homeostazu unatoč proizvodnji ROS-a, ne samo katabolizirajući ROS nego i popravljajući oksidativnu ozljedu (23). Stvaranje ROS-a važan je mehanizam kojim stanice imunološkog sustava, u prvom redu makrofazi (monociti i neutrofili), uništavaju štetne mikroorganizme što dovodi i do oštećenja normalnog tkiva domaćina. Podrijetlo unutarstaničnog ROS-a u limfocitima dolazi iz najmanje dva izvora - egzogeni ROS proizveden iz dendritičnih stanica i fagocita te intracelularno proizveden ROS tijekom različitih staničnih procesa, uključujući i T staničnim receptorima posredovana aktivacije T stanica. Egzogeni ROS može dovesti do nastanka oksidativnog stresa dok endogeno proizvedeni ROS prvenstveno djeluju kao signalne molekule koje promoviraju ili aktivaciju ili apoptoze T stanica (67). U fiziološkim uvjetima postoji ravnoteža između ROS-a i antioksidanata, a ometanje te ravnoteže može dovesti do pojačanog ili oslabljenog odgovora T-stanica što dovodi do razvoja raznih patoloških pojava. Isto tako, staničke adhezivne molekule, poput ICAM-1 i VCAM-1 pokazale su se kao važni biljezi endotelne aktivacije koja prethodi adheziji aktiviranih leukocita te inicira nastanak aterosklerotskih lezija(68). Brojna istraživanja do sada pokazala su različito viđenje promjene razine staničnih adhezivnih molekula kod visokog unosa soli te su ta istraživanja najčešće rađena na hipertenzivnim ispitanicima(69,70). Tadzić i suradnici su pokazali kako je plazmatska razina endokana bila snižena u pacijenata s hipertenzijom, budući da se endokan natječe s ICAM-1 za vezno mjesto LFA-1 i time ometa adheziju (70).

Raspodjela upalnih stanica u perifernoj krvi, uključujući limfocite T i B, granulocite i makrofage / dendritičke stanice i izražaj adhezijskih molekula procijenjena je u niskoslanjoj skupini (LS) i visokoslanjoj skupini (HS) Sprague Dawley štakora. Učestalost staničnih populacija - T i B limfocita, granulocita i makrofaga / dendritičkih stanica nije se razlikovala u eksperimentalnim skupinama ( $P > 0,05$ ) HS dijeta izazvala je značajno smanjenje leukocita s visokom ekspresijom CD49d + (u granulocitima  $P = 0,004$ , MHC II + limfocita  $P = 0,008$  i CD3 + limfocita  $P = 0,001$  slika 1). Upotrijebljen je granulocitni marker HIS48 u svrhu daljnjeg određivanja granulocitne populacije i izražaja CD49d biljega. Potvrđena je smanjena regulacija izražaja CD49d biljega adhezijskih molekula na visoko pozitivnim granulocitima CD49d u HS skupini štakora u odnosu na LS skupinu (medijan CD49d ekspresije u LS skupini štakora bio je  $286.92 \pm 39.54$  i  $227.37 \pm 49.90$  u HS skupini;  $P = 0.013$ , slika 2A) CD 49d biljeg veže se za  $\alpha 4$  lanac integrina izraženog kao heterodimer sa  $\beta 1$  ili  $\beta 7$  podjedinicom. Integrin  $\alpha 4\beta 1$  poznat kao VLA-4 izražen je na neutrofilima, limfocitima, monocitima, timocitima i NK stanicama. Posreduje migraciju i adheziju leukocita na mjesto upale vežući

se za VCAM-1 i CS regiju fibronektina, dok je za integrin  $\alpha 4\beta 7$  u dosadašnjim animalnim istraživanjima dokazano da se uz VCAM-1 i fibronektin veže i na MadCAM. Pretpostavljamo da su našem slučaju leukociti migrirali kroz endotelni sloj do mjesta upale.

Mjerena je učestalost populacija CD3 + CD4 + i CD3 + CD8 + stanica između ispitivanih skupina i rezultati nisu pokazali statističku razliku u HSD u usporedbi s LSD skupinama ( $P = 0.142$  i  $P = 0.145$ ). Medijan izražaja CD49d na CD3 + CD4 + i CD3 + CD8 + stanicama nije promijenjen povećanim unosom prehrane soli (Tablica 3). Nadalje, medijan izražaja CD11a biljega nije promijenjen u populaciji CD4 + limfocita ( $P = 0.138$ ), no statistički je vidljiv niži izražaj CD3 + CD4 + stanica s visokim izražajem CD11a biljega u HS skupini ( $P = 0.027$ ) u usporedbi s LS skupinom štakora. CD11a veže se za  $\alpha$  podjedinicu integrina vezanu uz  $\beta 2$  podjedinicu tvoreći tako heterodimerski glikoprotein (CD11a/CD18) poznat kao LFA-1 prisutan na svim leukocitima. LFA-1 posreduje adheziju limfocita na vaskularni endote. Pretpostavka je da stanice s višim izražajem CD11a biljega također prolaze endotelni sloj krvnih žila i migriraju na mjesto upale. Učestalost CD3+ CD4+ stanica u krvi nije promijenjen što upućuje na povećanu proliferaciju limfocita i granulocita s visokim izražajem CD49d u HS skupini. Izražaj CD43 + biljega na CD 4 + limfocitima povećan je u HS grupi u usporedbi s LS grupom ( $P = 0.031$ ) što ide u prilog našoj pretpostavci o aktivaciji limfocita solju budući da sudjeluje u regulaciji aktivacije i adhezije T limfocita.





**Slika 7.** Shematski prikaz utjecaja visokog unosa soli na migraciju i adheziju leukocita

## 7. ZAKLJUČAK

1. Visok unos kuhinjske soli dovodi do aktivacije imunološkog sustava, infiltracije stijenske krvnih žila leukocitima koja može voditi razvoju ateroskleoze i kardiovaskularnih bolesti.
2. Nije utvrđena značajna razlika u učestalosti populacija pojedinih leukocita između LS i HS skupine.
3. Smanjena regulacija izražaja CD49d biljega adhezijskih molekula na visokopozitivnim granulocitima CD49d te smanjenje izražaja CD3+ CD4+ stanica koje povećavaju izražaj CD11a molekule u HS skupini što sugerira da su navedene stanice migrirale kroz endotelni sloj krvnih žila, eventualno do mjesta budućeg stvaranja plaka.
4. Rezultati sugeriraju da povećan unos kuhinjske soli dovodi do interakcije specifične i urođene imunosti putem aktivacije monocita/makrofaga te CD3+CD4+ T limfocita.

## 8. SAŽETAK

**Ključne riječi:** visoko slana dijeta, adhezijske molekule, stanične populacije

**Cilj:** Ocijeniti dinamiku aktivacije leukocita kod Sprague-Dawley štakora na LS i HS dijeti određivanjem izražajnosti komplementarnih liganada za adhezijske molekule endotelne stanice na različitim podskupinama leukocita.

**Metode:** Zdravi SD štakori starosti 11 tjedana hranjeni su standardnom hranom 0,4% NaCl (NS grupa) ili hranom s 4% NaCl (VS grupa) 7 dana. Protočnom citometrijom iz uzoraka pune krvi određena je učestalost staničnih populacija te izražaj adhezijskih molekula.

**Rezultati:** Učestalost staničnih populacija nije se razlikovala u eksperimentalnim skupinama. HS dijeta izazvala je značajno smanjenje leukocita s visokim izražajem CD49d<sup>+</sup>. Izražaj CD11b/c biljega na granulocitima nije promijenjen unosom soli. Mjerena je učestalost subpopulacija limfocita T između ispitivanih skupina i rezultati nisu pokazali statističku razliku. Medijan izražaja CD49d na T limfocitima nije promijenjen povećanim unosom prehrane soli. Medijan izražaja CD11a biljega nije promijenjen u populaciji CD4<sup>+</sup> limfocita, no statistički je vidljiv niži izražaj CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> stanica s visokim izražajem CD11a biljega u HS skupini u usporedbi s LS skupinom.

**Zaključak:** Visok unos soli dovodi do aktivacije imunološkog sustava, infiltracije stijenke krvnih žila leukocitima koja može voditi razvoju ateroskleroze. Smanjena regulacija izražaja CD49d biljega adhezijskih molekula na visokopozitivnim granulocitima CD49d te smanjenje izražaja CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> stanica koje povećavaju izražaj CD11a molekule u HS skupini što sugerira da su navedene stanice migrirale kroz endotelni sloj krvnih žila do mjesta budućeg stvaranja plaka. Rezultati sugeriraju da povećan unos soli dovodi do interakcije specifične i urođene imunosti putem aktivacije monocita/makrofaga te CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfocita.

## 9. SUMMARY

**Key words:** high salty diet, adhesion molecule, cell population

**Objective:** To evaluate the dynamics of leukocyte activation in Sprague-Dawley rats on an LS and HS diet by determining the expression of complementary ligands for endothelial cell adhesion molecules on different leukocyte subgroups.

**Methods:** Healthy SD rats aged 11 weeks were fed with standard food 0.4% NaCl (NS group) or food with 4% NaCl (VS group) for 7 days. Flow chart cytometry from full blood samples determines the frequency of cell populations and the expression of adhesion molecules.

**Results:** The frequency of cell populations did not differ in experimental groups. HS dieting has caused a significant decrease in high expression CD49d + leukocytes. The expression of CD11b / c markers on granulocytes has not been changed by salt intake. The frequency of subpopulation of lymphocytes T between the examined groups was measured and the results showed no statistical difference. Median expression CD49d on T lymphocytes was not changed by increased intake of dietary salt. Median expression of CD11a markers was not changed in the CD4 + lymphocyte population but there was statistically lower CD3 + CD4 + expressing CD11a marking in HS group compared to LS group.

**Conclusion:** High salt intake leads to activation of the immune system, leukocyte infiltration of the blood vessels that may lead to the development of atherosclerosis. Reduced regulation of expression of CD49d markers of adhesion molecules on high-release CD49d granulocytes and CD3 + CD4 + expression expressing CD11a molecule expression in HS group suggesting that these cells migrated through the endothelial layer of blood vessels to the site of future plaque formation. The results suggest that increased salt intake leads to the interaction of specific and innate immunity by activating monocytes / macrophages and CD3 + CD4 + T lymphocytes.

## 10. LITERURA

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.
2. Kralj V, Brkić-Biloš I. Mortalitet i morbiditet od kardiovaskularnih bolesti. *Cardiologia Croatica*. 2013;8(10-11):373-8.
3. Mozaffarian D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity. *Circulation* 2016;133:187–225.
4. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL i sur. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779–85.
5. Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 2013;8(2):e56803.
6. Mattes RD, Donnelly D. Relative contributions of dietary sodium sources. *J Am Coll Nutr* 1991;10:383–9.3
7. Vrhovac B. i suradnici, *Interna medicina*, Zagreb, Naknada Ljevak, 2008.
8. Jelaković B, Zeljković-Vrkić T, Pećin I i sur. Arterijska hipertenzija u Hrvatskoj. Rezultati EH-UH studije. *Acta Med Croatica* 2007;61:287–92.
9. Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure: results for 24-hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* 1988;297:319-28.
10. SUPURAN CT. Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharm Des* 2008;1:641-8.
11. GELEIJNSE JM, KOK FJ, GROBBEE DE. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: a metaregression analysis of randomised trials *J Hum Hypertens* 2003;17:471-80.
12. Jelaković B, Vuković I, Reiner Ž. Arterijska hipertenzija i kuhinjska sol. *Acta Med Croatica* 2010;64:105–10.

13. CUSHMAN WC, FORD CE, CUTLER JA i sur. Success and predictors of blood pressure control in diverse North American settings: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *J Clin Hypertens* 2002;4:393-404.
14. Weinberger MH. Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2002;4(4):274-6.
15. Wilson SH, Lerman A. Function of Vascular Endothelium. *Heart Physiology and Pathophysiology* 2001:27.
16. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373–376.
17. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation* 2013;20(3):239–247.
18. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989;13:658–667.
19. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*. 2003;9:2385–2402.
20. Endemann DH and Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction Canadian Institutes of Health Research Multidisciplinary Research Group on Hypertension and Hypertension Clinic, Clinical Research Institute of Montréal, Montréal, Québec, Canada. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1983–1992.
21. Viridis A, Duranti E, Taddei S. Review Article Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310.
22. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C719–41.
23. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Review Article Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myocardial Damage. *Dis Markers*. 2013;35(6):773-90.

24. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;15; 83(12):1643–1654.
25. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. 1999;106:467-76.
26. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34
27. Carlos TM, Harlan JM 1994 Leukocyte endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068–2101
28. Springer TA 1994 Traffic signals for lymphocyte recruitment and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301–314.
29. Liu SC, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000;113:3563-71.
30. Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* 2001;32:427-38.
31. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
32. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol* 2000;19:203-9.
33. Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA 1991 Regulation of the adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin subunit. *Science* 251:1611–1613.
34. Springer TA, Thompson NS, Miller LJ, Schmalstieg FC, Anderson DC 1984 Inherited deficiency of the MAC-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med* 160:1901–1918.
35. Lobb RR, Hemler ME 1994 The pathophysiology role of  $\alpha 4$  integrins in vivo. *J Clin Invest* 94:1722–1728.

36. Dustin ML, Springer TA 1988 Lymphocyte function associate antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cell. *J Cell Biol* 107:321–331.
37. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-6.
38. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996;274:1123-33.
39. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991;65:961-71.
40. Hayflick JS, Kilgannon P, Gallatin WM. The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res* 1998;17:313-27.
41. Diamond MS, Springer TA. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* 1994;4:506-17.
42. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270:11025-8.
43. Price D.T, Loscalzo J. Cellular Adhesion Molecules and Atherogenesis. *Am J Med* 1999;107:85-97.
44. Cotran RS, Gimbrone MA, Bevilacqua PM, Mendrick DL, Pober JS 1986 Induction and detection of a human endothelial activation antigens in vivo. *J Exp Med* 164:661–666.
45. Gimbrone MAJ. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985;76:2003- 11.
46. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D 1994 Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- in vivo. *Cell Adhes Commun* 2:7–14.



47. Jung TM, Dailey MO 1990 Rapid modulation of homing receptors (gp90 mel-14) induced by activators of protein kinase C: receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol* 144:3130–3136.
48. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF 1992 Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 119:229–238.
49. Varki A 1994 Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7390–7397.
50. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:485-92.
51. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 1997;100:31-5.
52. Etzioni A, Frydman M, Pollack S, et al. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *NEJM* 1992;327:1789-92.
53. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-9.
54. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *NEJM* 1976;295:369-77 and 420-5.
55. Wagner DD. Adhesion Molecules - Part II. *NEJM* 1996;335:43-5.
56. Hogg N, Bates PA. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol* 2000;19:211-22.
57. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem* 2002;24:1-13.
58. Osborn M, Domagala W. Immunocytochemistry. U: Bibbo M. Ur. *Comprehensive Cytopathology*. 2. izd. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997:1033-1074.
59. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry* 2nd, New York: Alan R. Liss, Inc. 1988.

60. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, Interna medicina, četvrto, promjenjeno i dopunjeno izdanje, Zagreb, Naklada Ljevak, 2008.
61. Prof.dr.sc. Antica Duletić-Načinović, Prof.dr.sc. Toni Valković, Prof.dr.sc. Štefica Dvornik, Hematologija za prvostupnike medicinsko laboratorijske dijagnostike, Rijeka 2011, str.112-117.
62. Kleinewietfeld M1, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN & Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496(7446):518-522.
63. 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):4212-4222.
64. Tikellis C1, Pickering RJ, Tsorotes D, Huet O, Chin-Dusting J, Cooper ME, Thomas MC. Activation of the Renin-Angiotensin system mediates the effects of dietary salt intake on atherogenesis in the apolipoprotein E knockout mouse. *Hypertension*. 2012 Jul;60(1):98-105. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191767. Epub 2012 May 29.
65. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, Schelling G, Morukov B, Choukèr A. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res*. 2015 Jul;166(1):103-10. doi: 10.1016/j.trsl.2014.11.007. Epub 2014 Nov 22.
66. Ćosić, Anita; Jukić, Ivana; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Novak, Sanja; Vuković, Rosemary; Drenjančević, Ines. Attenuated flow-induced dilation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. // *The Journal of Physiology*. 594 (2016), 17; 4917-4931.
67. Belikov AV, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci*. 2015;22(1):85.
68. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.

69. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Giuliani E, De Sisti L, Cicogna S, Santucci A. Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertensive: influence of dietary sodium load and depletion. *Hypertension* 1998; 32:862-868.
70. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The Effects of Arterial Blood Pressure Reduction on Endocan and Soluble Adhesion Molecules (CAMs) and CAMs Ligands Expression in Hypertensive Patients on Ca-Channel Blocker Therapy. *Kidney Blood Press Res* 2013;37:1-9.

## 11. ŽIVOTOPIS

Gordana Meščić, univ. bacc. med. lab. diagn.

Datum rođenja: 11. lipnja 1980.

Adresa: V. Nazora 39, 31208 Petrijevci, Hrvatska

Email adresa: [gordanamescic@hotmail.com](mailto:gordanamescic@hotmail.com)

### Obrazovanje:

- listopad 2010. - listopad 2013.: Dodiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

- listopad 2015. do danas : Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

### Radno iskustvo:

Klinički bolnički centar Osijek, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku

- rujan 1998. - rujan 1999.

- siječanj 2001. do danas