

# Povezanost izražaja transkripcijskog čimbenika HIF-1alpha i omjera Th17/Treg stanica kod Sprague Dawley štakora na visokoslanjoj dijeti.

---

Hrkač, Ines

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:152:258715>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ines Hrkač**

**POVEZANOST IZRAŽAJA  
TRANSKRIPCIJSKOG ČIMBENIKA HIF-  
1 $\alpha$  I OMJERA Th17 / Treg STANICA KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA  
VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ines Hrkač**

**POVEZANOST IZRAŽAJA  
TRANSKRIPCIJSKOG ČIMBENIKA HIF-  
1 $\alpha$  I OMJERA Th17 / Treg STANICA KOD  
SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA NA  
VISOKOSLANOJ DIJETI**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

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

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

Rad ima 36 lista, 2 slike i 4 tablice.

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Utjecaj NaCl-a na arterijski krvni tlak.....   | 1  |
| 1.1.1. Reninsko-angiotenzinsko-aldosteronski sustav (RAAS).....                                   | 2  |
| 1.2. HIF-1 $\alpha$ .....   | 3  |
| 1.3. NaCl i imunosne stanice.....   | 3  |
| 1.3.1. Utjecaj NaCl-a na monocite.....  | 4  |
| 1.3.2. T limfociti .....  | 5  |
| 1.4. Glukokortikoidna kinaza (od engl. <i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1</i> , SGK)..... | 6  |
| 2. HIPOTEZA .....   | 7  |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 8  |
| 4. ISPITANICI I METODE .....  | 9  |
| 4.1. Ustroj studije.....  | 9  |
| 4.2. Ispitanici (materijal) .....   | 9  |
| 4.3. Metode .....   | 10 |
| 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi.....                                    | 10 |
| 4.3.2. Izolacija limfnog tkiva i krvnih žila Sprague-Dawley štakora .....                         | 10 |
| 4.3.3. Izolacija ukupnih proteina.....  | 11 |
| 4.3.4. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom.....                                   | 11 |
| 4.3.5. Kultivacija i stimulacija stanica .....  | 13 |
| 4.3.6. Protočna citometrija .....   | 13 |
| 4.3.7. Western blot .....   | 16 |
| 4.3.8. Blokirane membrane i inkubacija protutijelima .....  | 17 |
| 4.3.9. Kemiluminiscencijska detekcija .....   | 18 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3.10. Ispiranje vezanih protutijela s membrane ..... | 18 |
| 4.4. Statističke metode.....                           | 19 |
| 5. REZULTATI.....                                      | 20 |
| 6. RASPRAVA.....                                       | 27 |
| 7. ZAKLJUČAK .....                                     | 29 |
| 8. SAŽETAK.....  | 30 |
| 9. SUMMARY .....                                       | 31 |
| 10. LITERATURA.....                                    | 32 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....                                    | 36 |

## KRATICE

NaCl - natrijev klorid

CD - klaster diferencijacije, od engl. *Cluster of differentiation*

EDTA - etilendiaminotetraoctena kiselina, od engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*

Na<sup>+</sup> - natrijev ion

NF-κB – nuklearni čimbenik κB, od engl. *Nuclear factor κB*

RAAS - reninsko-angiotenzinsko-aldosteronski sustav, od engl. *Renin-Angiotensin-Aldosteron System*

IL - interleukin

AT<sub>1</sub> - angiotenzin II receptor tip 1, od engl. *Angiotensin II receptor type 1*

O<sub>2</sub> - superoksidni anion

NO - dušični oksid

NAD(P)H - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, od engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

SOD - superoksidna dismutaza, od engl. *Superoxide dismutase*

ROS - kisikovi radikali, od engl. *Reactive Oxygen species*

HIF-1α - hipoksijom inducirani čimbenik 1α, engl. *Hypoxia-inducible factor 1α*

Th – pomoćnički limfocit T, od engl. *T helper*

TNF- čimbenik tumorske nekroze, od engl. *Tumor necrosis factor*

Treg - regulatorni T limfociti, engl. *Regulatory T cell*

RORγt - prema engl. *Retinoic Acid- related Orphan Receptor gamma*

Foxp3 - prema engl. *Forkhead box p3*

RANKL - receptorski aktivator nuklearnog faktora  $\kappa$ B ligand, od engl. *Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*

TGF - transformirajući čimbenik rasta, od engl. *Transforming growth factor*

SGK – glukokortikoidna kinaza, od engl. *Serum/glucocorticoid regulated kinase*

PI3K - fosfoinozitol-3 kinaza, od engl. *Phosphoinositide 3-kinase*

EAE - eksperimentalni autoimunosni encefalitis, od engl. *Experimental autoimmune encephalomyelitis*

PBMC - periferne mononuklearne stanice, od engl. *Peripheral blood mononuclear cell*

PMA - forbol-12-miristat-13-acetat

RPMI - Roswell Park Memorial Institute 1640 za stanične kulture

SCC - zrnatost, od engl. *Side scatter*

mLN - mezenterični limfni čvor, od engl. *Mesenteric lymph node*

PKB – protein kinaza B, od engl. *Protein kinase B*

Foxo1 – od engl. *Forkhead Box O1*



### 1. UVOD

Unazad nekoliko desetljeća bilježi se porast incidencije autoimunskih bolesti. Mogući razlog tomu je promjena vanjskih čimbenika koji mogu utjecati na razvoj autoimunih bolesti kao što je unos visoke koncentracije soli natrijeva klorida (NaCl) (1). Procesuirana hrana sadrži visoke koncentracije NaCl-a te dugotrajna konzumacija takve hrane povećava rizik razvoja autoimunih bolesti.

Natrijev ion ( $\text{Na}^+$ ) najzastupljeniji je ekstracelularni kation te je važan za održavanje volumena tekućina, osmotsku ravnotežu i funkciju mišića i živaca. Također i kloridni ion ima vrlo važnu ulogu u organizmu. Pomaže u očuvanju acido-baznog statusa, pomaže prilikom apsorpcije kalija, poboljšava prijenos ugljičnog dioksida iz tkiva u pluća putem krvi, sastavni je dio želučane kiseline i ima bitnu ulogu prilikom razgradnje hrane. Najzastupljeniji unos NaCl-a je putem kuhinjske soli. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje dnevni unos NaCl-a manje od 5g (2). No, ipak, u većini kultura dnevna konzumacija NaCl-a premašuje preporučenu dozu. Prosječna dnevna upotreba NaCl-a kod odrasle osobe je 9 – 12 g (3). Dokazano je da pretjeran unos NaCl-a potiče upalni odgovor i pogoršava simptome kod pacijenata s reumatoidnim artritisom, lupusom, multiplom sklerozom i upalnom bolesti crijeva (1).

#### 1.1. Utjecaj NaCl-a na arterijski krvni tlak

Natrij je esencijalan za optimalno funkcioniranje organizma. Bubrezi kontroliraju razinu NaCl-a u organizmu te, ako je previše soli, bubrezi smanjuju apsorpciju  $\text{Na}^+$ , posljedično tome dolazi do njegova otpuštanja putem urina. No, kad razina NaCl-a postane previsoka, bubrezi više ne mogu kompenzirati i posljedično tomu, NaCl završi u krvotoku. NaCl privlači vodu i kad je previše NaCl-a u krvi, dolazi do povećanja volumena krvi. Rezultat toga je povećani arterijski krvni tlak (4). Visoke koncentracije  $\text{Na}^+$ , uz povećanje izvanstaničnog volumena, mogu uzrokovati i hipertrofiju glatkih mišićnih stanica, aktivirati nuklearni čimbenik  $\kappa\text{B}$  (od engl. *Nuclear factor  $\kappa\text{B}$* , NF $\kappa\text{B}$ ) u proksimalnim tubularnim stanicama (uzrok bubrežne upale), promjene u reninsko-angiotenzinsko-aldosteronskom sustavu (RAAS), oksidacijski stres (5). U

## Uvod

mnogim studijama dokazan je štetan učinak NaCl-a na kardiovaskularni sustav. Hipertenzija je vodeći uzrok smrti i smanjenja životnog vijeka (6). Primjerice, vrijednosti arterijskog tlaka u 50 % bolesnika osjetljivo je na NaCl. Primijećeno je da unosom NaCl-a arterijski krvni tlak raste, a smanjuje se restrikcijom unosa NaCl-a (7).

Također je dokazano da pretjerano korištenje kuhinjske soli uz odsutnost hipertenzije može uzrokovati smanjenje funkcije vaskularnog endotela, što može biti toliko opsežno da limitira osjetljivost krvnih žila na razne vazomotorne stimulanse. Disfunkcija endotela prekursor je budućih kardiovaskularnih bolesti (7).

### 1.1.1. Reninsko-angiotenzinsko-aldosteronski sustav (RAAS)

Reninsko-angiotenzinsko-aldosteronski sustav (RAAS) vrlo je važan za kontrolu soli i volumena vode u organizmu te za kontrolu arterijskog krvnog tlaka (8). Renin proteaza, koji stvaraju jukstaglomerularne stanice bubrega, kontrolira RAAS. Renin je aspartil proteaza i cijepa iz jetre otpušten angiotenzinogen u angiotenzin I. Potom se angiotenzin I konvertira u angiotenzin II putem angiotenzin konvertirajućeg enzima. Angiotenzin II glavni je efektor kaskade RAAS-a jer aktivacijom  $AT_1$  receptora održava krvni tlak te homeostazu vode i soli u organizmu (8). Općenito je prihvaćen koncept da je, u normalnom bubrežnom i vaskularnom stanju, odgovor organizma na visok unos soli inhibicija RAAS-a, dok nizak unos soli potiče izlučivanje renina i aldosterona (9). Nije još poznato kako visoka razina soli utječe na RAAS. Pretpostavka je, smanjenjem cirkulirajućeg angiotenzina II i u korelaciji s tim dolazi do povećanog izražaja  $AT_1$  receptora (9). Aktivacija RAAS-a također dovodi do razvoja oksidativnog stresa, posebice do pojave superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ). Akumulacija  $O_2^-$  u bubregu može dovesti do poremećaja kontrole bubrežne funkcije te na taj način doprinosi razvoju hipertenzije i osjetljivosti na NaCl (10). Funkcija  $O_2^-$  u bubregu je vazokonstrikcija i poticaj tubularne resorpcije soli, dok dušični oksid (NO), također bitan u regulaciji funkcije bubrega, pokazuje dijametralno suprotan učinak.  $O_2^-$  je u bliskoj interakciji s NO. Stoga, kad dođe do akumulacije  $O_2^-$ , dolazi do smanjenja biodostupnosti NO te do poremećaja regulacije funkcije bubrega (10). Angiotenzin II je poznati stimulan koji dovodi do formacije  $O_2^-$  putem aktivacije nikotinamid-adenin-dinukletid fosfat oksidaze (NAD(P)H) enzima. Uz angiotenzin II i povećana

## Uvod

koncentracija soli dovodi do povišenja razine NAD(P)H enzima. Također, posljedica prolongiranog djelovanja angiotenzina II i povišene razine soli dovodi do smanjenja izražaja obrambenog mehanizma protiv  $O_2^-$  kao što je superoksidna dismutaza (SOD) (10). Stoga, povišena proizvodnja kisikovih radikala (ROS) i smanjenje njihove degradacije može dovesti do oksidativnog stresa sa širokim spektrom patofizioloških posljedica.

### 1.2. HIF-1 $\alpha$

Visoka razina NaCl-a potiče izražaj transkripcijskog faktora hipoksijom induciranog čimbenika-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) i njegove ciljane gene u bubrežnoj srži. Taj proces predstavlja važan prilagodbeni mehanizam na visok unos NaCl-a (11). Regulira gene čiji su produkti enzimi, kao što su dušični oksid sintaza, ciklooksigenaza 2 i hem oksigenaza-1 (12). Produkti navedenih gena imaju bitnu ulogu u regulaciji protoka krvi kroz bubrežnu srž i tubularne aktivnosti. Zbog toga održavaju volumen tjelesne tekućine i arterijski krvni tlak (11). Odgovor na povišen unos NaCl-a povećanje je sinteze ovih enzima, dok inhibicija ovih enzima u bubrežnoj srži smanjuje izlučivanje natrija i povećava osjetljivost arterijskog krvnog tlaka na NaCl (12). Regulacija izražaja gena u bubrežnoj srži putem HIF-1 $\alpha$  vrlo je važan način prilagodbe organizma na visoke razine soli i održanja ravnoteže. No, i dalje nije poznat točan mehanizam kako visoka koncentracija NaCl-a dovodi do povišenja razine HIF-1 $\alpha$  u bubrežnoj srži.

HIF-1 $\alpha$  potiče Th17 diferencijaciju tako što izravno potiče transkripciju ROR $\gamma$ t (od engl. *Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*) i shodno tomu, surađuje s ROR $\gamma$ t u nadzoru nizvodnih Th17 gena. Također utječe na diferencijaciju regulatornih T (Treg) limfocita. Inhibira njihovu diferencijaciju tako što utječe na razgradnju Foxp3 (od engl. *Forkhead box P3*) proteina (13). Foxp3 je transkripcijski čimbenik važan za diferencijaciju Treg stanica. Ovi podatci nam pružaju moguće nove metode liječenja bolesti uzrokovane neravnotežom između Th17 stanica i Treg stanica.

### 1.3. NaCl i imunosne stanice

Visokoslana dijeta također utječe i na imunosne stanice te dovodi do upalnog odgovora imunskog sustava. Posebice utječe na diferencijaciju CD4<sup>+</sup> T stanica u pomoćničke T stanice 17. Dokazan je i utjecaj na regulatorne T stanice (Treg). Dovodi do poremećaja funkcije Treg stanica (14).

#### 1.3.1. Utjecaj NaCl-a na monocite

Monociti su prekursori stanica koje prezentiraju antigen, makrofaga i dendritičnih stanica, koji čine vezu između urođene i stečene imunosti. Sve navedene stanice mogu poslužiti kao fagocitne stanice te biti dijelom prve crte obrane organizma. Dokazano je da povišene razine soli dovode do povećanja broja monocita, dok su subjekti na niskoslanjoj dijeti imali smanjen broj monocita (3). Također, kao odgovor na stimulaciju mitogenom, prilikom smanjenog unosa soli došlo je i do smanjenja proupalnih citokina interleukina 6 (IL-6) i interleukina 23 (IL-23) te do povećane sposobnosti za proizvodnju protuupalnog citokina interleukina 10 (IL-10) (3). Vrlo je važna uloga citokina IL-23 u procesu razvoja i stabilizacije stanica Th17 fenotipa, visoko upalnih pomoćničkih stanica koje na podražaj IL-23 odgovaraju povećanom ekspresijom IL-23 receptora (IL-23R). Također, IL-23 pospješuje razvoj Th17 stanica s patogenim efektorskim funkcijama (15). Točan molekularni mehanizam kako IL-23 održava odgovor Th17 stanica i kako uzrokuje patogene efektorske funkcije i dalje nije poznat.

Napravljena je studija prilikom koje su miševi bili na visokoslanjoj i niskoslanjoj dijeti tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Prilikom smanjenog unosa soli primijećena je smanjena produkcija IL-23 i IL-6. Povišena, odnosno snižena razina soli, nije pokazala značajan utjecaj na produkciju čimbenika tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , od engl. *Tumor necrosis factor*). No, smanjen unos soli pokazao je značajan porast u proizvodnji IL-10 (3). Također je primijećena povećana proizvodnja IL-23 tijekom visokoslane dijete (3). U drugoj studiji promatrani su miševi na visokoslanjoj dijeti koji su bili inficirani lat. *Salmonellom typhimurium*. U promatranoj skupini došlo je do porasta proupalnih citokina nakon tri dana infekcije (16). Time možemo zaključiti da pojedinci koji pretjerano konzumiraju sol imaju povećan rizik od pretjerane imunosne reakcije

## Uvod

prilikom infekcije. Moguća je poremećena imunosna homeostaza, otežan oporavak organizma nakon infekcije, produženi uvjeti upale i posljedični razvoj autoimunih bolesti.

### 1.3.2. T limfociti

T limfociti imaju važnu ulogu u razvoju autoimunskih bolesti i upale. Bitna skupina su CD4<sup>+</sup> T limfociti, također zvani i pomoćničke T stanice (Th stanice), kao što su Th1, Th2, Th17 te regulatorni T limfociti (Treg stanice). Th1 stanice dio su obrane od intracelularnih patogena i određenih bakterija usmjeravanjem stanične imunosti. Th2 stanice usmjeravaju humoralnu imunost posredovanu protutijelima te brane organizam od ekstracelularnih patogena i dovode do razvoja alergijskih reakcija. Th17 stanice visoko su patogene pomoćničke T stanice. Proizvode interleukin 17 A (IL-17A), sudjeluju u regulaciji proksimalnih i distalnih bubrežnih prijenosnika natrija i doprinose ozljedi bubrega posredovano angiotenzinom II (17). Treg stanice imaju ulogu održavanja imunološke homeostaze i imunosupresije Th17 stanica (18). Diferencijacija Th17 i Treg stanica zahtijeva ROR $\gamma$ t i Foxp3. Njihova diferencijacija uzajamno je inhibitorna. Primjerice, citokini kao što su IL-6, IL-21, IL-23 promoviraju diferencijaciju Th17, no inhibiraju razvoj Treg stanica, dok citokini kao što je IL-2 imaju suprotan učinak (18). Poremećaj Th17/Treg ravnoteže, povećan broj Th17 i smanjen broj Treg stanica dovode do razvoja hipertenzije i osteoporoze. Th17 stanice jedan su od važnijih faktora koji dovode do razvoja raznih bolesti kostiju, kao što je osteoporoza. Razne studije dokazale su da povećan unos soli smanjuje intestinalnu apsorpciju kalcija, bitnog minerala za izgradnju kostiju. Th17 stanice su glavne stanice odgovorne za povećanu resorpciju kostiju, povećanom proizvodnjom IL-17, aktivatora receptora nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B liganda (od engl. *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*, RANKL), TNF- $\alpha$  i smanjenom proizvodnjom TNF- $\gamma$ , dok Treg stanice proizvodnjom IL-10 i transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$ 1 (od engl. *Transforming growth factor  $\beta$  1*, TGF- $\beta$ 1) suprimiraju Th17 stanice (15). Stoga utjecaj soli na Th17/Treg ravnotežu dovodi do narušavanja mikroarhitekture kostiju. Kod miševa kojima nedostaje proupalni citokin IL-17A dokazano je smanjenje hipertenzije, vaskularne upale i očuvanje vaskularne funkcije prilikom hipertenzije uzrokovane angiotenzinom II (17). Povišen krvni tlak uzrokovan angiotenzinom II smanjen je u miševima kojima je inhibiran IL-17. Također, u dijabetičara s hipertenzijom

## Uvod

zabilježene su povišene razine serumskog Th17 u usporedbi s normotenzivnim pacijentima (18). No, i dalje nije poznat točan mehanizam kako Th17/Treg neravnoteža može dovesti do hipertenzije.

### 1.4. Glukokortikoidna kinaza (od engl. *Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1*, SGK)

Glukokortikoidna kinaza (SGK) dio je obitelji serin/treonin kinaza i sastoji se od triju izoformi: SGK1, SGK2, SGK3. Obitelji SGK srodna serin/treonin kinaza protein kinaza B (od engl. *Protein kinase B*, PKB) ima bitnu ulogu u promociji preživljavanja stanica. SGK, kao i PKB, aktivirani su putem fosfoinozitol-3 kinaze (PI3K) i nakon stimulacije faktorom rasta premještaju se u jezgru (20). Obitelj SGK ima ulogu u regulaciji staničnog rasta, proliferacije, preživljavanja stanica i njihove migracije. Novije studije pokazuju da SGK1 ima kritičnu ulogu u regulaciji Th17/Treg diferencijacije u upali prouzrokovanoj utjecajem soli i u hipertenziji koju uzrokuje angiotenzin II. SGK1 deaktivacijom Foxo1 (od engl. *Forkhead Box O1*), direktnog represora ekspresije IL-23, ima ključnu ulogu u reguliranju ekspresije IL-23R i stabiliziranju fenotipa Th17 stanica (15). Zabilježeno je da blag porast unosa soli potiče ekspresiju SGK1 i receptora IL-23 te time povećava diferencijaciju Th17 stanica *in vitro* i *in vivo*. Dakle, SGK1 signalizacija u T stanicama potencijalno promovira hipertenziju i doprinosi oštećenju organa (18). Kako bi se dokazala uloga SGK1 u hipertenziji, u studiji su korišteni miševi s T stanicama kojima je uklonjen SGK1. Tim je pokusom utvrđeno da je došlo do smanjenja hipertenzije te do utišavanja bubrežne i vaskularne upale (17). Dakle, delecija gena SGK1 dovela je do zaštite od hipertenzije i bubrežne i vaskularne ozljede. Svi navedeni podatci ukazuju na važnost uloge koju SGK1 ima u diferencijaciji patogenih Th17 stanica te kako na molekularnoj razini vanjski faktori, kao što je visokosлана dijeta, mogu pospješiti razvoj Th17 stanica i upale tkiva (15).

Hipoteza

## 2. HIPOTEZA

Polazna pretpostavka bila je da kratkotrajni (7 i 14 dana) povećani unos soli dovodi do promjene u ravnoteži Th17 i Treg stanica te da njihove frekvencije značajno koreliraju s izražajem HIF-1 $\alpha$  u krvnim žilama istih životinja.

Cilj istraživanja

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je ispitati povezanost izražaja transkripcijskog čimbenika HIF-1 $\alpha$  u krvnim žilama i udio Th17 i Treg stanica u krvi kod Sprague-Dawley štakora nakon kratkotrajne visokoslane dijeta.



#### 4. ISPITANICI I METODE

##### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje provedeno u sklopu ovog završnog rada bilo je osmišljeno kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje na životinjskom modelu visokoslane dijeta. U tu svrhu korišteni su Sprague-Dawley štakori.

Eksperimentalni dio studije proveden je u eksperimentalnoj nastambi Vivarija Medicinskog fakulteta te u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju pri Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Istraživanje provedeno prema Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja koje su korištene u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU) odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/14-08/06, Ur.br. 2158-61-07-14-04) i Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-005).

Provedeno istraživanje dio je znanstvenog projekta financirano putem Hrvatske zaklade za znanost „Poremećena vazorelaksacija i endotelno-leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ (HRZZ IP-09-2014-6380/V-ELI Athero).

##### 4.2. Ispitanici (materijal)

U istraživanju su korišteni zdravi Sprague Dawley štakori obaju spolova u dobi od 6 do 9 tjedana. Štakori su bili uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku, a za vrijeme izvedbe pokusa bili su smješteni u eksperimentalnoj nastambi i podijeljeni u tri skupine (N = 6 - 9 po skupini). Jedna je skupina bila na visokoslanjoj dijeti tijekom 7 dana (VSD-7; 4 % NaCl, Mucedola, Italija), a druga skupina životinja na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana (VSD-14). Životinje iz obiju skupina imale su slobodan pristup vodi i komercijalno pripremljenoj hrani s vi-

## Ispitanici i metode

sokim sadržajem soli (4 % NaCl, Mucedola, Italija) te su bile izložene dvanaestosatnom ciklusu svjetla i tame. Treća skupina životinja hranjena je standardnom laboratorijskom hranom s 0,4 % NaCl *ad libidum* (Mucedola, Italija) te je služila kao kontrolna skupina životinja. Na 7. ili 14. dan štakori su bili anestezirani i žrtvovani dekapitacijom.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Životinje su bile žrtvovane dekapitacijom nakon anestezije kombinacijom ketamina [75 mg/kg, 25 mg/ml Ketanest S, Pfizer Inc. (New York, New York, SAD)] i midazolama [2,5 mg/kg, 5 mg/ml Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma GmbH, Beč, Austrija]. Puna krv skupljana je u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA (od engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*). Mononuklearne stanice periferne krvi stanice (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) izolirane su u gradijentu fikola [Ficoll-Paque PREMIUM 1,084, GE Healthcare (Chicago, Illinois, SAD)]. Također je određena koncentracija stanica i za to je korištena Bürker-Türk komorica. Stavljeno je 50 µl suspenzije stanica i 100 µl tripanskog plavila. Koncentracija stanica određuje se prema sljedećoj općoj formuli:

Stanice po µL = izbrojane stanice/[pregledana površina (mm<sup>2</sup>) x dubina komore (mm) x dilucijski faktor\*]

\*faktor razrjeđenja je 3

#### 4.3.2. Izolacija limfnog tkiva i krvnih žila Sprague-Dawley štakora

Štakori su bili izvagani, zatim anestezirani kombinacijom ketamina 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2 mL, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/mL, 3 mL, Torrex, Chiesi Pharma) te ostavljeni kratko vrijeme kako bi započelo djelovanje anestetika. Nakon što je anestetik počeo djelovati, štakori su postavljeni na minijaturnu giljotinu gdje su žrtvovani. Nakon obavljene dekapitacije štakora, otvoren im je abdomen te su pažljivom

## Ispitanici i metode

preparacijom mezenterija izolirani mezenterični limfni čvorovi (od engl. *Mesenteric lymph nodes*, mLN). Potrebna suspenzija stanica iz mezenteričnih limfnih čvorova (mLN) dobivena je nježnom disocijacijom tkiva pritiskanjem mLN između dvaju matiranih krajeva histoloških/predmetnih stakalaca te daljnjim propuštanjem dobivene suspenzije kroz pamučnu vatu ili sito. Dobivene stanice pohranjene su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u fetalnom goveđem serumu s 10 % DMSO do kultivacije i analize.

Nakon izolacije mezenteričnih limfnih čvorova uslijedilo je uzorkovanje krvnih žila mozga pomoću mini pincete i škarica te nekoliko igala kako bi se mozak bolje fiksirao u Petrijevoj zdjelici, čije dno je prekriveno voskom i koja je prethodno napunjena hladnom fiziološkom slanom otopinom. Krvne su žile mozga po izolaciji pohranjene u Eppendorf tubice i stavljene u tekući dušik te nakon toga prebačene na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sve dok nije došlo do homogenizacije uzorka.

### 4.3.3. Izolacija ukupnih proteina

Uzorci krvnih žila usitnjeni su do praha u tekućem dušiku, nakon toga izvagani, dodatno homogenizirani pomoću mehaničkog homogenizatora na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se izbjegla moguća denaturacija proteina u homogenizacijskom puferu te kako bi se stvorila tekuća suspenzija tkiva za centrifugiranje. Dodano je 1 mL homogenizacijskog pufera na 100 mg usitnjenog tkiva krvnih žila mozga. Homogenizacijski pufer sastojao se od 1 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,4 % SDS-a i koktela inhibitora proteaza (0,4  $\mu\text{L}/100\mu\text{L}$ ). Dodan je Triton-X, u koncentraciji 0,062 %, u kojoj ne interferira s Bradfordom, a koncentracija SDS-a smanjila se na 0,1 %, kako bi određivanje proteina po Bradfordu bilo pravilnije. Također se koristio koktel inhibitora proteaza (1 tableta u 1,5 mL vode) kako bi se spriječila razgradnja proteina. Centrifugiranje se odvijalo 30 minuta na 17000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ . U svrhu stabilizacije samog transkripcijskog čimbenika HIF-1 $\alpha$ , u homogenizacijski pufer dodan je i 1 mmol kobaltovog klorida. Supernatanti su alikvotirani te pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do korištenja.

### 4.3.4. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom

Dobiveni supernatant podvrgnut je mjerenju koncentracije proteina Bradford metodom u svakom pojedinom uzorku. Korišteni su standardi otopine BSA poznatih koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 i 1,4 mg/mL. Priređene su po dvije replike svakog standarda, a kao slijepa proba koristio se homogenizacijski pufer istog sastava kao i pufer u kojem su homogenizirani uzorci. Intenzitet plavog obojenja, nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom, (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, SAD), proporcionalan je koncentraciji proteina, a mjeren je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm. Temeljna standardna otopina BSA pripremljena je otapanjem 100 mg [od engl. *Bovine serum albumin* (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, SAD)] u 10 mL destilirane vode (10 mg/mL). Pripremljena temeljna standardna otopina BSA pohranjena je na -20 °C u alikvotima od 1 mL. Nakon odmrzavanja, korištena je za pripremu standarda. Korišten je gotovi Bradfordov reagens. Standardna krivulja napravljena je uz pomoć standarda BSA poznate koncentracije, kako bi se odredila koncentracija nepoznatih uzoraka, pomoću mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 595 nm. Uzorci krvnih žila mozga iz dviju životinja iste skupine štakora zajedno su homogenizirani tako da je svaki uzorak krvnih žila mozga tvorio tzv. „pool“ proteina kako bi ukupna količina proteina bila dovoljna za provođenje Western blot analize. Priređeni su standardi koncentracija 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 i 1,4 mg/mL koji su nanoseni na mikrotitarsku pločicu, za usporedbu njihove apsorbancije s apsorbancijom nepoznatih uzoraka. Svi standardi pripremljeni su u replikama. Nulta proba korištena je kao kontrola, za poravnavanje spektrofotometra na vrijednost apsorbancije 0. Volumen uzorka nepoznate koncentracije koji se nanosi na mikrotitarsku pločicu također je bilo potrebno prilagoditi, tako da se izmjerena apsorbancija nalazi unutar intervala koji je izmjeren za uzorke BSA poznate koncentracije, korištene za izradu baždarnе krivulje. Nakon pripreme standarda, u ostale jažice dodan je ekstrakt proteina nepoznate koncentracije, u različitim volumenima.

Neposredno prije mjerenja apsorbancije, u svaku jažicu dodano je 250 µL Bradfordova reagensa, dok je u zadnje četiri jažice dodan čisti reagens. Do reakcije dolazi vrlo brzo pa se unutar 10 minuta od dodavanja reagensa mjeri apsorbancija. Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 595 nm.

### 4.3.5. Kultivacija i stimulacija stanica

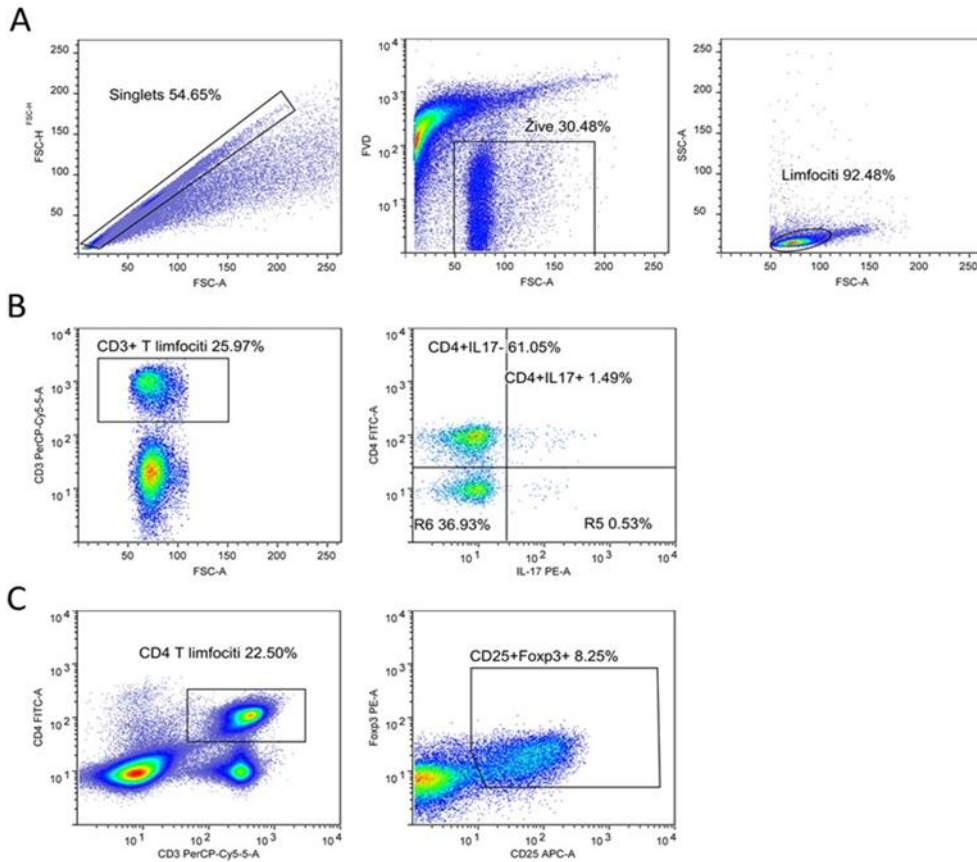
Ovako dobivena suspenzija stanica i PBMC-a bila je kultivirana u kompletnom RPMI mediju u prisutnosti forbol-12-miristat-13-acetata [(PMA), Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, SAD], ionomicina (10 mM, Abcam, Cambridge, UK) i Brefeldina A (10 mg/mL Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD) tijekom 4 sata. Nakon toga su obrađene za analizu protočnim citometrom ili smrznute na temperaturi do -80 °C do Western blot analize.

### 4.3.6. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda čija je namjena analiza ekspresije markera stanične površine i unutarstaničnih molekula, karakterizacija i definiranje raznih staničnih tipova u heterogenoj staničnoj populaciji, određuje se čistoća izoliranih subpopulacija te se analizira stanična veličina i volumen (21). Također, namjena protočne citometrije može biti i određivanje funkcionalne aktivnosti stanica i vijabilnosti, mjerenje apoptoze i nekroze te analiza staničnog ciklusa (22). Tri bitne komponente protočnog sustava su protočni, optički i elektronički sustav. Protočni se sustav sastoji od tuba, pumpi i ventila. Pokretačkom tekućinom uzorak sa stanicama se usmjerava kroz uske kapilare te na taj način omogućuje da u jednom trenutku kroz laser prođe samo jedna stanica. Optički se sustav sastoji od laserskog svjetla, leća i filtera (23). Ispred lasera smješten je detektor koji će detektirati lomljenu svjetlosnu zraku s površine stanice koja se i dalje kreće u originalnom smjeru putanje zrake (od engl. *Forward scatter*, FSC). Proporcija ovako lomljene svjetlosne zrake nam daje informaciju o veličini stanice. Također je postavljeno nekoliko detektora sa strane koji će detektirati lomljene svjetlosne zrake pod pravim kutom u odnosu na originalni smjer putanje svjetlosne zrake (od engl. *Side scatter*, SSC). Ovo nam daje informaciju o granularnosti stanica (22). Stanice se mogu razvrstati i na temelju fluorescentne emisije. Izvor mogu biti fluorescentne molekule prirodno svojstvene stanici ili ako su obilježene fluorescentnom molekulom, kao što je fluorokrom. Svaka stanica koja prođe kroz lasersko svjetlo detektirana je zasebno i svaka vrsta detektiranog svjetla ima zaseban kanal (22). Uloga elektronskog sustava je prikupiti sve svjetlosne signale i pretvoriti ih u digitalne signale. Digitalni su signali potom preneseni u elektroničko računalo i služe nam za analizu (23).

## Ispitanici i metode

U slučaju određivanja udjela Th17 stanica, limfociti izolirani iz mLN i periferne krvi najprije su stimulirani s PMA i ionomicinom kako je prethodno opisano te potom označeni s FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience, San Diego, Kalifornija, SAD). U slučaju određivanje Treg limfocita, korištene su nestimulirane stanice iz mLN i periferne krvi te su bile označene s FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience), PerCP-eFluor710 anti-CD3 (klon G4.18, eBioscience), PE anti-Foxp3 (klon FJK-16s, eBioscience) te APC-CD25 (klon OX39, eBioscience) protutijelima. Strategija primijenjena za analizu Th17 i regulatornih T limfocita prikazana je na slici 1. Mrtve stanice isključene su na temelju bojenja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (LIVE/DEAD®Fixable Near-IR stain, Applied Biosystems LS 4351104, Waltham, MA, SAD), dvostruke (od. engl. *doublets*) stanice analizom FSS-A i FSS-H parametara. Analizirano je 50 000 živih, jednostrukih stanica pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD) te FlowLogic programom (Inivai Technologies, Victoria, Australija), dok se izražaj proteina HIF-1alfa odredio putem Western blota te su dobivene vrijednosti normalizirane prema izražaju  $\beta$ -aktina (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, SAD) u istim uzorcima.



**Slika 1. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora protočnom citometrijom.**

Periferne mononuklearne stanice izolirane iz krvi štakora na gradijentu fikola analizirane su na protočnom citometru BD FACS Canto II. Slika 1 A prikazuje strategiju susljednog postavljanja prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica. Mrtve su stanice bile isključene na temelju bojenja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD), dok su jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene analizom FSS-A i FSS-H parametara. Slika 1 B prikazuje strategiju analize CD4 T limfocita, koji luče IL-17, dok je na slici 1 C prikazana strategija analize regulatornih T limfocita definiranih pomoću CD4, CD25 i Foxp3 markera.

### 4.3.7. Western blot

Western blot važna je metoda koja nam omogućuje identificiranje specifičnih proteina unutar smjese proteina koji su izdvojeni iz stanica. Stoga su bitni za staničnu i molekularnu biologiju (24). Proteini se odvajaju na temelju njihove mase, a razdvajaju se u poliakrilamidnom gelu, putem gel elektroforeze. Proteini manje mase putuju brže, dok proteini veće mase putuju sporije. Potom tako odvojene proteine s gela prenosimo na membranu i pomoću električne struje određene snage se fiksiraju. Proteini tada stvaraju *band* specifičan za svaki protein, a debljina nastalog *banda* korelira s količinom proteina (24). Izdvojene proteine od interesa vizualiziramo pomoću primarnih i sekundarnih protutijela te uz dodatak supstrata dolazi do emitiranja svjetlosti. Nastali signal bilježi se digitalnom kamerom ili na rendgenskom filmu (RTG).

Uzorci su pripremljeni tako da su najprije žile mozga usitnjene u tekućem dušiku, nakon toga prebačene u Eppendorf tubicu, tkivo je izvagano i dodan je homogenizacijski pufer u omjeru 1 mL pufera na 100 mg tkiva. Zatim su uzorci centrifugirani na 17 000 g 30 minuta, supernatant je alikvotiran i čuvan na -80 °C do analize. Jedan je alikvot iskorišten za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu koristeći BSA kao standard. Uzorci su prije nanošenja na gel prokuhani s Laemmli puferom (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, SAD) u omjeru 1 : 1.

Nakon pripremljenih otopina za donji i gornji poliakrilamidni gel, stakla su složena i postavljena na postolje za izlivanje gelova. Prvo se pripremi 10 % donji gel (gel za razdvajanje) koji odgovara veličini proteina, te se izlijeva do razine ispod donjeg ruba češljica za jažice koji nam služi kao granica do koje se izlijeva donji gel. Gel se nadsvođi izopropanolom kako bi se blokirao kontakt sa zrakom koji bi spriječio polimerizaciju. Za vrijeme polimeriziranja donjeg gela, koje traje 45 minuta, pripremljen je 4 % gornji gel (gel za sabijanje), potom se on izlijeva i polimerizira oko 1 - 1,5 sat. Nakon polimerizacije sustav za elektroforezu postavljen je u kadicu koja je napunjena prethodno pripremljenim puferom (10 x temeljna standardna otopina, pH = 8,3). Pufer mora prekrivati jažice, češljic se pažljivo uklanja, a jažice se dobro ispiru s puferom za elektroforezu kako bi se uklonio nepolimerizirani akrilamid. Nakon toga počinje se nanositi uzorak zajedno s puferom za nanošenje uzoraka na gel, oko 5 do 10  $\mu$ L po jažici. Elektroforeza je provođena na 100 V, oko 3 sata, na 4 °C.



## Ispitanici i metode

Prethodno pripremljen pufer za prijenos proteina na membranu potrebno je ohladiti na 4 °C, namočiti spužvice zajedno s filter papirima i PVDF membranom koja je prethodno aktivirana metanolom. Nakon što je elektroforeza završila, stakla su izvađena, gornji gel je uklonjen, a donji gel se s proteinima pažljivo prenosi u posudu s hladnim puferom za prijenos. Na bijeli šupljikavi okvir postavljena je spužvica, filter papir te PVDF membrana. Na PVDF membranu položen je donji gel, filter papir i spužvica te je cijela struktura pričvršćena crnim šupljikavim okvirom. Preko svakog sloja potrebno je prijeći valjkom zbog uklanjanja mjehurića zraka. Transfer se provodio 2 sata na 200 mA, 4 °C, a po završetku membrana se bojala u Amido-BlueBlack (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, SAD) boji nekoliko sekundi te potom odmah prebačena u otopinu za odbojavanje.

### 4.3.8. Blokiranje membrane i inkubacija protutijelima

Nakon odbojavanja, membrana je isprana od otopine za odbojavanje u TBST puferu 2 x po 15 minuta. Nakon ispiranja membrana je blokirana u 4 % otopini bezmasnog mlijeka u prahu, s dodatkom 1 % BSA, 2 sata na sobnoj temperaturi u tresilici. Blokiranje reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Ukoliko se membrana previše blokira, može doći do redukcije signala, a ukoliko se premalo blokira, dolazi do jakog pozadinskog obojenja. Po završetku blokiranja, membrana je inkubirana primarnim protutijelima u otopini za primarna protutijela (3 %). Stavlja se 2 mL otopine po membrani, a inkubacijski pufer za primarna protutijela sastoji se od bezmasnog mlijeka u prahu i TBST-a. Membrana se inkubirala u primarnim protutijelima preko noći na 4 °C na rotirajućoj tresilici, a zatim i na sobnoj temperaturi 2 sata. Membrana je isprana u TBST-u 4 x po 15 minuta. Korišteno je zečje protuštakorsko HIF-1 $\alpha$  protutijelo u razrjeđenju 1 : 1000 (Applied Biosystems LS 4351104, Waltham, MA, SAD).

Nakon toga membrana je inkubirana sekundarnim protutijelima koja se otapaju u otopini za sekundarna protutijela, a inkubacija traje 2 sata na sobnoj temperaturi na rotirajućoj tresilici. Korišteno je kozje protuzečje sekundarno protutijelo konjugirano s HRP (od engl. *horse radish peroxidase*) enzimom obilježeno u razrjeđenju 1 : 10000. Tijekom inkubacije sa sekundarnim kozjim protutijelima usmjerenim na Fc fragment mišjih protutijela, dodana su i streptaktinska

## Ispitanici i metode

protutijela za detekciju *Strep-Tag* aminokiselinske sekvence koju sadrže proteini poznate molekulske mase, konjugirana s peroksidazom iz hrena, kako bi se i proteinski standard prenio na film i detektirao na isti način kao i traženi proteini. Nakon inkubacije membrana je isprana 4 x po 15 minuta u TBST puferu.

### 4.3.9. Kemiluminiscencijska detekcija

Nakon ispiranja membrana je lagano obrisana i na nju je primijenjen kemiluminiscencijski reagens te je inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi. Supstrat s kojim će reagirati peroksidaza iz hrena (HRP) pripremi se miješanjem komponenti A [(luminol), (Applied Biosystems LS 4351104, Waltham, MA, SAD)] i komponente B u omjeru 100 : 1.

U prisutnosti vodikovog peroksida, HRP katalizira oksidaciju cikličkog diacilhidrazida kao što je luminol. Pritom se stvara aktivirani intermedijarni reakcijski produkt, radikal luminola (endoperoksid), koji se vraća u primarno stanje (3-aminoflatni ion) što emitira svjetlost. Jako pojačanje emisije svjetlosti proizvodi se 4-jodofenolom koji služi kao medijator prijenosa elektrona. Nakon inkubacije uklonjen je višak kemiluminiscencijskog reagensa, a membrana je stavljena između dvije folije kako se ne bi posušila, a mjehurići zraka su istisnuti. Membrane su postavljene u kasetu, učvršćene, te je u potpunom mraku u kasetu stavljen radiološki film. Membrane su snimljene na Odjelu za radiologiju, u Kliničkoj bolnici Osijek. Ekspozicija je trajala 15 sekundi, 30 sekundi, 1 minutu i 5 minuta.

### 4.3.10. Ispiranje vezanih protutijela s membrane

Po završetku ekspozicije membrana je isprana 2 x po 15 minuta u TBST puferu te je čuvana na 4 °C. Membrana se može upotrijebiti za detekciju nekog drugog proteina s novim protutijelom. Ako novi protein, čiju ekspresiju želimo provjeriti, nije u istom rangu po molekularnoj masi (kDa) kao prethodni, nije potrebno uklanjati protutijela niti ponovno blokirati membranu, već se direktno može staviti na inkubaciju u željenom protutijelu. Međutim, kada su istraživani proteini u blizu po vrijednostima molekularne mase (kDa), tada se membrana tretira

## Ispitanici i metode

puferom za skidanje protutijela kako bi se uklonila sva vezana protutijela, 2 - 5 minuta, a nakon toga se ispiru 10 minuta u TBST puferu. Za kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju određena je i koncentracija  $\beta$ -aktina (42 kDa).  $\beta$  aktin jedan je od visoko konzerviranih proteina u eukariotskim stanicama i zato se koristi kao kontrola u Western blot metodi. Korišteno je mišje protuštakorsko  $\beta$ -aktin primarno protutijelo u razrjeđenju 1 : 1000 te sekundarno kozje protumišje protutijelo u razrjeđenju 1 : 10000.

### 4.4. Statističke metode

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između triju nezavisnih skupina bile su testirane jednosmjernom analizom varijanci (One way ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallis testom. Razlike između skupina dodatno su testirane Tukey post hoc testom. Povezanost kontinuiranih varijabli je Spearmanovim i Pearsonovim koeficijentom korelacije rangova ( $\rho$ ). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardne devijacije, a razina značajnosti bila je postavljena na  $p < 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program Stigma stat 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, SAD).

### 5. REZULTATI

Naše je istraživanje dokazalo da visokoslana dijeta dovodi do značajne promjene u frekvenciji Th17 i regulatornih T limfocita (Treg, Foxp3+) u perifernoj krvi te u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora (Tablica 1 i 2). Rezultati su također pokazali da visokoslana dijeta dovodi do promjene u izražaju HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog čimbenika u krvnim žilama istih životinja (Slika 2), međutim te promjene nisu bile statistički značajne, niti smo utvrdili statistički značajnu povezanost s frekvencijama Th17 i Treg limfocitima iz periferne krvi (Tablica 3 i 4).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da sedmodnevna dijeta s visokim udjelom soli dovodi do značajnog porasta udjela Th17 pomoćničkih limfocita u populaciji perifernih mononuklearnih stanica u usporedbi s rezultatima koje smo dobili kod Sprague-Dawley štakora na standardnoj prehrani [2,79 (1,18) % u odnosu na 0,92 (0,52) %;  $p = 0,028$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test]. Suprotno očekivanom, nakon dodatnih sedam dana visokoslane dijete rezultiralo je padom frekvencije Th17 stanica, na razine usporedive s onima u kontrolnoj skupini štakora [1,44 (0,62) % u odnosu na 0,92 (0,52) %;  $p = 0,655$ ; jednosmjerna ANOVA] (Tablica 1). Također, nije primijećena statistički značajna razlika između štakora koji su bili na visokoslanoj dijeti tijekom 7 i 14 dana [2,79 (1,18) u odnosu na 1,44 (0,62);  $p = 0,106$ ; jednosmjerna ANOVA] (Tablica 1).

Nakon sedam dana visokoslane dijete došlo je do porasta udjela Th17 stanica u mezenteričkim limfnim čvorovima štakora na visokoslanoj dijeti u odnosu na rezultate zabilježene u kontrolnoj skupini štakora na standardnoj prehrani, međutim, te razlike nisu bile statistički značajne [2,45 (0,86) % u odnosu na 1,35 (0,29) %;  $p = 0,054$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test] (Tablica 1). Nakon dodatnih sedam dana visokoslane dijete dolazi do skoro potpune normalizacije frekvencije Th17 stanica [1,31 (0,37) % u odnosu na 1,35 (0,29) %;  $p = 0,031$ ; jednosmjerna ANOVA]. Navedena redukcija udjela Th17 limfocita nakon 14 dana visokoslane dijete pokazala se značajnom u odnosu na udjele zabilježene nakon 7 dana [1,31 (0,37) % u odnosu na 2,45 (0,86) %;  $p = 0,046$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test] (Tablica 1).

**Tablica 1. Udjeli Th17 limfocita iz periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora izloženih kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti.**

| Obilježje<br>(mjerna jedinica)  | Aritmetička sredina (standardna devijacija) |             |             |       |
|---------------------------------|---|-------------|-------------|-------|
|                                 | Kontrola*                                   | VSD-7†      | VSD-14‡     | p§    |
| PBMC§<br>(% Th17 stanica)<br>** | 0,92 (0,52)                                 | 2,79 (1,18) | 1,44 (0,62) | 0,028 |
| mLN¶ (% Th17 stanica)<br>**     | 1,35 (0,29)                                 | 2,45 (0,86) | 2,45 (0,86) | 0,031 |

\* Kontrola – Štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje;

† VSD-7 – Štakori na visokoslanjoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom 7 dana;

‡ VSD-14 – Štakori na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana;

§ p – Rezultati su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom;

|| PBMC – Mononuklearne stanice periferne krvi;

¶ mLN – Limfociti iz mezenteričnih limfnih čvorova;

\*\* (% Th17 stanica) – Udio (%) stanica pozitivnih za CD3, CD4 i IL-17 markere utvrđene analizom protočnim citometrom.

Usporedbom udjela regulatornih T limfocita u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora primijećen je značajan pad u vrijednosti regulatornih Foxp3+ T limfocita po završetku visokoslane dijetе u trajanju od 7 dana u odnosu na vrijednosti udjela istih stanica kontrolne skupine štakora na standardnoj prehrani [5,30 (0,49) % u odnosu na 6,48 (0,22) %;  $p < 0,001$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test]. Zabilježen je daljnji pad frekvencija Foxp3+ stanica tijekom produžene visokoslane dijetе te je 14. dana protokola razlika u odnosu na kontrolnu skupinu štakora bila još izraženija

## Rezultati

[0,08 (0,08) % u odnosu na 6,48 (0,22) %  $p = 0,001$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test], kao i na skupinu štakora koji su kraće bili izloženi visokoslanjoj dijeti, odnosno samo 7 dana [0,08 (0,08) % u odnosu na 5,30 (0,49) %  $p < 0,001$ ; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test] (Tablica 2).

**Tablica 2. Udjeli regulatornih T limfocita iz periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora izloženih kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti.**

| Obilježje<br>(mjerna<br>jedinica)  | Aritmetička sredina (standardna devijacija) |             |             |    |         |
|------------------------------------|---|-------------|-------------|----|---------|
|                                    | Kontrola*                                   | VSD-7†      | VSD-14‡     | N§ | $p$     |
| PBMC¶<br>(% Treg<br>stanica)<br>†† | 6,48 (0,22)                                 | 5,30 (0,49) | 0,08 (0,08) | 4  | < 0,001 |
| mLN**(%<br>Treg<br>stanica)<br>††  | 9,69 (2,03)                                 | 8,06 (0,79) | 7,45 (0,82) | 4  | 0,102   |

\* Kontrola – Štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje;

† VSD-7 – Štakori na visokoslanjoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom 7 dana;

‡ VSD-14 – Štakori na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana;

§ N - Broj životinja po skupini;

||  $p$  – Rezultati su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom;

¶ PBMC – Mononuklearne stanice periferne krvi;

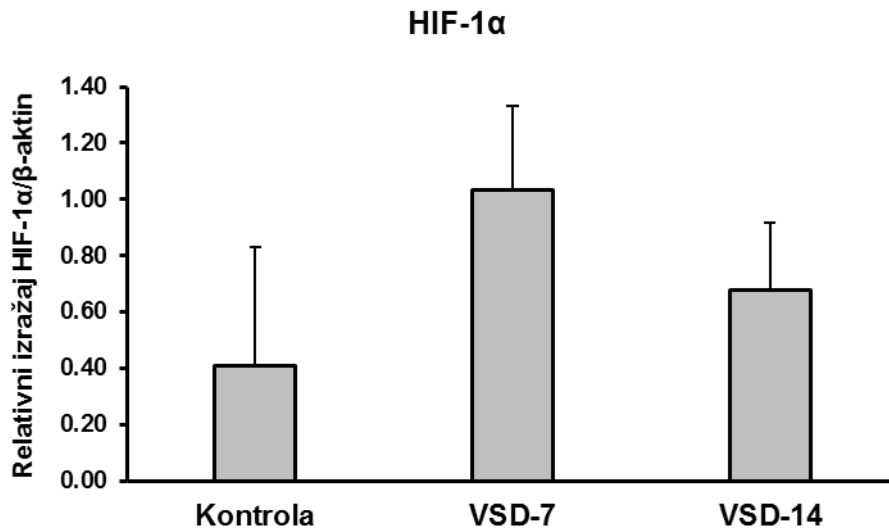
\*\* mLN – Limfociti iz mezenteričnih limfnih čvorova;

†† (% Treg stanica) – Udio (%) stanica pozitivnih za CD4, CD25 i Foxp3 markere utvrđene analizom protočnim citometrom.

## Rezultati

U slučaju rezultata dobivenih analizom mononuklearnih stanica izoliranih iz mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora dobivene su slične razlike, no one nisu postigle statističku značajnost ( $p = 0,102$ ; jednosmjerna ANOVA). Snižene vrijednosti prosječne frekvencije regulatornih Foxp3<sup>+</sup> T limfocita zabilježene su u skupinama životinja na sedmodnevnoj i četrnaestodnevnoj visokoslanoj dijeti [8,06 (0,79) % i 7,45 (0,82) %], dok su najviše vrijednosti zabilježene u kontrolnoj skupini i prosječno su iznosile 9,69 (2,03) %.

Izražaj HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog čimbenika u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora nije se statistički značajno promijenio uslijed sedmodnevne i četrnaestodnevne visokoslane dijete ( $p = 0,007$ ; jednosmjerna ANOVA; Slika 2). Međutim, zamijetili smo tendenciju povećanog izražaja HIF-1 $\alpha$  nakon sedmodnevnog protokola visokoslane dijete. Nadalje, izražaj HIF-1 $\alpha$  nije značajno korelirao s udjelom Th17 i Treg stanica periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova, kao ni njihovim omjerom (Tablica 3 i 4). Za izračun korelacija između zadanih parametara korišten je Personov ili Spearmanov test, ovisno o normalnosti distribucije podataka.



**Slika 2. Izražaj HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog čimbenika u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih kratkotrajnom utjecaju visokoslane dijete**

*Slika 2 prikazuje izražaj HIF-1 $\alpha$  u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora koji su bili izloženi kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti. Izražaj HIF-1 $\alpha$  proteina određen je Western blot metodom te su vrijednosti izražene relativno u odnosu na izražaj  $\beta$ -aktina u istim uzorcima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom, a  $p < 0,05$  se smatrao značajnim. Kontrola – štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; VSD-7 – štakori na visokoslanjoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom 7 dana; VSD-14 – štakori na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana.*



**Tablica 3. Povezanost udjela Th17 stanica periferne krvi i ekspresije HIF-1 $\alpha$  u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti.**

| Obilježje<br>(mjerna jedinica)             | Mononuklearne stanice periferne krvi |                                     |                                      | Krvne žile                                     |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|
|  | Udio CD3<br>(%<br>limfocita)‡        | Udio<br>Th17(%<br>CD4+IL-<br>17)§   | Udio Treg (%<br>CD4+CD25+Foxp3+)     | Izražaj<br>HIF-<br>1 $\alpha$ / $\beta$ aktin¶ |
| <b>Omjer Th17/Treg</b>                     | r* = 0,051<br>p = 0,875<br>N† = 12   | r* = 0,075<br>p = 0,818<br>N† = 12  | r* = -0,553<br>p = 0,062<br>N† = 12  | r* = -0,094<br>p = 0,771<br>N† = 12            |
| <b>Udio CD3 (% limfocita)‡</b>             |                                      | r* = -0,370<br>p = 0,237<br>N† = 12 | r* = -0,341<br>p = 0,279<br>N† = 12  | r* = -0,074<br>p = 0,800<br>N† = 12            |
| <b>Udio Th17<br/>(% CD4+IL-17+)§</b>       |                                      |                                     | r* = -0,0058<br>p = 0,857<br>N† = 12 | r* = 0,531<br>p = 0,0758<br>N† = 12            |
| <b>Udio Treg<br/>(% CD4+CD25+Foxp3+)  </b> |                                      |                                     |                                      | r* = 0,0868<br>p = 0,789<br>N† = 12            |

\* r – Koeficijent korelacije;

† N – Broj uzoraka;

‡ (% limfocita) - Frekvencija CD3+ T limfocita u ukupnoj populaciji mononuklearnih stanica periferne krvi;

§ (% CD4+IL-17+) – Frekvencija Th17, % CD4+IL-17+ limfocita u ukupnoj populaciji pomoćničkih CD3+CD4+ pomoćničkih T limfocita periferne krvi;

|| (% CD4+CD25+Foxp3+) – Frekvencija Treg, CD25+Foxp3+ limfocita u ukupnoj populaciji CD 2+CD4+ pomoćničkih T limfocita periferne krvi.

¶ HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ aktin – Izražaj HIF-1 $\alpha$  određen je metodom Western blot te su dobiveni rezultati normalizirani prema izražaju  $\beta$ -aktina u istim uzorcima.

**Tablica 4. Povezanost udjela regulatornih T limfocita periferne krvi i ekspresije HIF1 $\alpha$  u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora izloženih kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti**

| Obilježje<br>(mjerna jedinica)             | Mezenterični limfni čvorovi         |                                      |                                     | Krvne žile                           |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|  | Udio CD3<br>(%<br>limfocita)‡       | Udio Th17 (%<br>CD4+IL-<br>17+)§     | Udio Treg (%<br>CD4+CD25+Foxp3+)    | Izražaj HIF-<br>1 $\alpha$ /Baktin¶  |
| <b>Omjer Th17/Treg</b>                     | r* = -0,145<br>p = 0,652<br>N† = 12 | r* = 0,945<br>p < 0,001<br>N† = 12   | r* = -0,188<br>p = 0,559<br>N† = 12 | r* = -0,005<br>p = 0,987<br>N† = 12  |
| <b>Udio CD3 (%<br/>limfocita)‡</b>         |                                     | r* = -0,0853<br>p = 0,792<br>N† = 12 | r* = 0,220<br>p = 0,492<br>N† = 12  | r* = -0,005<br>p = 0,987<br>N† = 12  |
| <b>Udio Th17 (%<br/>CD4+IL-17+)§</b>       |                                     |                                      | r* = 0,220<br>p = 0,691<br>N† = 12  | r* = -0,0205<br>p = 0,950<br>N† = 12 |
| <b>Udio Treg (%<br/>CD4+CD25+Foxp3+)  </b> |                                     |                                      |                                     | r* = -0,149<br>p = 0,644<br>N† = 12  |

\* r - Koeficijent korelacije;

† N - Broj uzoraka;

‡ (% limfocita) – Frekvencija CD3+ T limfocita u ukupnoj populaciji mononuklearnih stanica mLN;

§ (% CD4+IL-17+) – Frekvencija Th17, % CD4+IL-17+ limfocita u ukupnoj populaciji CD3+CD4+ pomoćničkih T limfocita mLN;

|| (% CD4+CD25+Foxp3+) – Frekvencija Treg, CD25+Foxp3+ limfocita u ukupnoj populaciji CD3+CD4+ pomoćničkih T limfocita mLN.

¶ HIF-1 $\alpha$ /Baktin- Izražaj HIF-1 $\alpha$  određen je metodom Western blot te su dobiveni rezultati normalizirani prema izražaju  $\beta$ -aktina u istim uzorcima.

## 6. RASPRAVA

Povećana proizvodnja procesuirane hrane, ubrzana urbanizacija i promjena životnog stila rezultirali su promjenom načina prehrane (25). Zabilježena je povećana globalna konzumacija hrane bogate zasićenim masnim kiselinama, šećerom i NaCl-om. NaCl je primarni izvor  $\text{Na}^+$  i njegov povećani unos dovodi do hipertenzije, povećanog rizika od razvoja srčanih bolesti i srčanog udara (25). Godine 2010. zabilježeno je 1,65 milijuna smrtnih slučajeva kao posljedica kardiovaskularnih bolesti prouzrokovanih konzumacijom NaCl-a iznad preporučene dnevne doze (26). Također, povećana dnevna konzumacija NaCl-a povećava rizik od razvoja raka i favorizira proupalni odgovor kod pacijenata s reumatoidnim artritismom, sistemskim eritemskim lupusom, multiplom sklerozom i upalnom bolesti crijeva (1).

Koristeći mišji model upalne bolesti crijeva, Wei i suradnici dokazali su kako povišen unos NaCl-a rezultira povećanom proizvodnjom IL-17A putem Th17 stanica u intestinalnoj lamini propriji, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja (27). U našem smo istraživanju ispitali kratkotrajni učinak visokoslane dijeta na udio  $\text{CD4}^+$  T limfocita periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora koji su promijenjenoj prehrani bili izloženi 7 i 14 dana. U usporedbi s kontrolnim životinjama na standardnoj prehrani, u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima zabilježen je porast broja Th17 stanica.

Limfociti Th17 čine podskupinu  $\text{CD4}^+$  T pomoćničkih stanica koje luče IL-17A, IL-17F i IL-21. Između navedenih, IL-17 najpotpunije je istražen i smatra se karakterističnim efektorskim citokinom Th17 stanica zbog čega ima vrlo važnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti (27).

Potaknuti preliminarnim rezultatima drugih istraživača, Kleinewietfeld i suradnici proveli su studiju koja istražuje učinak varijabilnog faktora, kao što je visokosлана dijeta, na imunski sustav. Genetska predispozicija se i dalje smatra glavnim čimbenikom razvoja autoimunih bolesti, no pretpostavka je da okolišni faktori dovode do porasta incidencije autoimunih oboljenja. Kleinewietfeld i suradnici došli su do rezultata koji se slažu s rezultatom našeg istraživanja. Dokazali su da povišena koncentracija NaCl-a u fiziološkim uvjetima in vivo drastično povećava diferencijaciju mišjih i humanih Th17 stanica (28). Dokazali su i da povišena razina NaCl-a dovodi do povećane ekspresije SGK-1 tijekom citokin inducirane Th17 polarizacije. Utišavanje gena ili kemijska inhibicija SGK-1 spriječila je nastajanje Th17 stanica

## Rasprava

pod utjecajem visoke razine soli (28). Nakon dodatka 40 mM NaCl-a kulturi Th17 diferencirajućih stanica dovelo je ne samo do porasta ekspresije IL-17A, nego i do formacije patogenog fenotipa Th17 stanica. Ujedno su i dokazali da povišena razina NaCl-a dovodi do pogoršanja simptoma kod miševa s eksperimentalnim autoimunim encefalitisom (EAE) koje prati povećan broj Th17 stanica, infiltracija središnjeg živčanog sustava i periferna indukcija antigen specifičnih Th17 stanica. Dakle, prehrana s visokim udjelom NaCl-a predstavlja jedan od mogućih okolišnih čimbenika za razvoj autoimunih bolesti poticajem formacije patogenih Th17 stanica (28).

Luo i suradnici su 2016. godine proveli studiju na 15 muških dobrovoljaca radi utvrđivanja utjecaja visokoslane dijeta na Th17/Treg ravnotežu. Studija se sastojala od faze u kojoj su subjekti bili na uobičajenoj dijeti, potom na visokoslanjoj dijeti i nakon toga na niskoslanjoj dijeti. Nakon svake faze mjerio se udio Th17 i Treg limfocita u perifernoj krvi. Rezultati istraživanja pokazali su da prelaskom s normalne prehrane na visokoslanu dijetu, unutar 24 sata dolazi do pada u broju Th17 stanica te do porasta broja Treg stanica (29). Dakle, dolazi do smanjenog Th17/Treg omjera. Nakon sedmodnevne visokoslane dijeta, zabilježen je postupan rast u broju Th17 stanica i pad u broju Treg stanica, što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Stoga, utvrđen je međudnos između Th17 i Treg stanica te povezanost između kratkotrajnog povećanja unosa NaCl-a i poremećaja ravnoteže broja Th17 i Treg stanica.

Wang i suradnici obavili su eksperiment na muškim Sprague-Dawley štakorima radi dolaska do rezultata kako visokoslanu dijetu utječe na razinu HIF-1 $\alpha$ . Jedan je dio štakora bio na niskoslanjoj dijeti, a drugi dio štakora na visokoslanjoj dijeti (4 % NaCl). Ustanovili su da je kod normotenzivnih štakora na visokoslanjoj dijeti nakon 10 dana došlo do povećanja razine HIF-1 $\alpha$  i povećane ekspresije njegovih ciljnih gena putem inhibicije proteina koji sadrži HIF prolil-hidroksilazu 2 (PHD2) (30). PHD2 je najzastupljenija izoforma unutar ove skupine proteina i nalazi se u bubrežima te je primarno zastupljen u bubrežnoj srži. Opisani rezultati ranijih studija nisu u skladu s našim rezultatima. Unatoč tomu, zabilježena tendencija povećanog izražaja ekspresije HIF-1 $\alpha$  nakon sedmodnevne visokoslane dijeta ukazuje na potrebu analize dugotrajnih učinaka visokoslane dijeta na većem broju eksperimentalnih životinja, uključujući i druge sudionike u HIF-1 signalnoj kaskadi.

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja utjecaja kratkotrajne visokoslane dijeta na frekvenciju Th17 i regulatornih Treg stanica te njihovog odnosa s izražajem transkripcijskog čimbenika HIF-1 $\alpha$  i dobivenih podataka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Visokoslana dijeta dovodi do značajne promjene u frekvenciji Th17 i regulatornih T limfocita u perifernoj krvi te u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Te su razlike vidljive nakon sedmodnevne visokoslane dijeta.

- Uslijed prilagodbe na povećan unos soli, tijekom produženog trajanja visokoslane dijeta dolazi do normalizacije udjela Th17 stanica, dok su udjeli Treg stanica bili dodatno smanjeni.

- Visokoslana dijeta dovodi do sličnih promjena u izražaju HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog čimbenika u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora. Međutim, te promjene nisu bile statistički značajne niti smo utvrdili statistički značajnu povezanost s frekvencijama i omjerom Th17 i Treg limfocita iz periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati povezanost izražaja transkripcijskog čimbenika HIF-1 $\alpha$  i udjela Th17 i Treg stanica kod Sprague-Dawley štakora na kratkotrajnoj visokoslanjoj dijeti.

**Nacrt studije:** Pokusno istraživanje.

**Materijali i metode:** Sprague-Dawley štakori u dobi 6 - 9 tjedana podijeljeni su u tri skupine (N = 4 - 6). Prva skupina životinja bila je na visokoslanjoj dijeti tijekom 7 dana (VSD-7) (4 % NaCl, Mucedola, Italija), a druga skupina na visokoslanjoj dijeti tijekom 14 dana (VSD-14). Treća je skupina bila hranjena standardnom laboratorijskom prehranom *ad libidum* (KONTROLA). 7. i 14. životinje su bile žrtvovane dekapitacijom. Prikupljeni su uzorci periferne krvi, mezenteričnih limfnih čvorova i moždanih krvnih žila, koji su analizirani protočnom citometrijom i Western blotom.

**Rezultati:** Visokoslana dijeta dovodi do značajne promjene u frekvenciji Th17 i Treg limfocita u perifernoj krvi te mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Sedmodnevna visokoslana dijeta rezultirala je porastom Th17 stanica te padom Treg stanica. Dodatnih 7 dana dovelo je do normalizacije udjela Th17 stanica, dok je udio Treg stanica bio dodatno snižen. Rezultati su također pokazali da visokoslana dijeta dovodi do sličnih promjena u izražaju HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog čimbenika u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora, međutim, te promjene nisu bile statistički značajne niti smo utvrdili statistički značajnu povezanost s frekvencijama i omjerom Th17 i Treg limfocita iz periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova.

**Zaključak:** Kratkotrajna visokoslana dijeta uzrokovala je značajne promjene u frekvencijama Th17 i Treg stanica, koje potencijalno uzrokuju upalu. Međutim, uslijed prilagodbe na povećani unos soli tijekom produženog trajanja visokoslane dijetete dolazi do normalizacije protuupalnih Th17 stanica.

**Ključne riječi:** HIF-1 $\alpha$ ; Natrijev klorid; Th17/Treg odnos; Visokoslana dijeta.

## Summary

### 9. SUMMARY

**Title:** The correlation between the expression of the HIF-1 alpha transcription factor and the Th17 / Treg ratio of Sprague-Dawley rats on a high density diet.

**Objectives:** To investigate the associated expression of the transcription factor HIF-1 alpha and the proportion of Th17 and Treg cells in Sprague-Dawley rats on a short-term high-salt diet.

**Study design:** Experimental research.

**Material and methods:** Sprague-Dawley rats aged 6 - 9 weeks were divided into three groups (N = 4 - 6). The first group was on a high-salt diet for 7 days (VSD-7) (4 % NaCl, Mucedola, Italy). The second group was on a high-salt diet for 14 days (VSD-14). The third group was fed a standard laboratory diet ad libidum (CONTROL). On the 7th and 14th day animals were sacrificed by decapitation. Their samples of peripheral blood, mesenteric lymph nodes and cerebral vessels were collected and then analyzed using flow cytometry and western blot.

**Results:** A high-salt diet led to a significant change in the frequency of Th17 and regulatory T lymphocytes in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats. The seven-day high-salt diet resulted in a rise of Th17 and a decline of Treg cells. An additional 7 days led to the normalization of Th17 cells, while the Treg cell portion was further reduced. The results also showed that a high-salt diet led to similar changes in the expression of the HIF-1 alpha transcription factor in the blood vessels of Sprague-Dawley rats. However, these changes were not statistically significant nor did we establish a statistically significant association with the frequencies and ratios of Th17 and Treg lymphocytes from peripheral blood and mesenteric lymph nodes.

**Conclusion:** Short-term high-salt diets led to significant changes in Th17 and Treg cell frequencies, potentially causing inflammation. However, the adaptation to increased salt intake over the prolonged duration of high-salt diets normalizes proinflammatory Th17 cells.

**Keywords:** HIF-1 $\alpha$ ; High-salt diet; Sodium chloride; Th17/Treg ratio

## 10. LITERATURA

1. Scrivo R, Perricone C, Altobelli A, Castellani C, Tinti L, Conti F i sur. Dietary Habits Bursting into the Complex Pathogenesis of Autoimmune Diseases: The Emerging Role of Salt from Experimental and Clinical Studies. *Nutrients*. 2019;11(5).
2. World Health Organization. WHO issues new guidance on dietary salt and potassium. Dostupno na adresi: [//www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt\\_potassium\\_20130131/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/salt_potassium_20130131/en/). Datum pristupa 22. srpnja 2019.
3. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I i sur. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res*. 2015;166(1):103-10.
4. Stibich M, Eating Salt When You Have High Blood Pressure. Dostupno na adresi: <https://www.verywellhealth.com/salt-and-high-blood-pressure-2223421>. Datum pristupa: 08. kolovoza 2019.
5. Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard J, Kunert M, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34(1):1-11.
6. Hennings J, Hübner C. Disorders of renal NaCl transport and implications for blood pressure regulation. *Med Genet*. 2019;31:1:1-7.
7. Boegehold MA. The effect of high salt intake on endothelial function: reduced vascular nitric oxide in the absence of hypertension. *J Vasc Res*. 2013;50(6):458-67.
8. Schweda F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Pflugers Arch*. 2015;467(3):565-76.
9. Kotliar C, Kempny P, Gonzalez S, Castellaro C, Forcada P, Obregon S i sur. Lack of RAAS inhibition by high-salt intake is associated with arterial stiffness in hypertensive patients. *JRAAS*. 2014, Vol.15(4)498-504.



## Literatura

10. Kopkan L, Červenka L. Renal Interactions of Renin-Angiotensin System, Nitric Oxide and Superoxide Anion: Implications in the Pathophysiology of Salt-Sensitivity and Hypertension. *Physiol Res.* 2009;58(Dodatak 2):S55-S67.
11. Wang Z, Zhu Q, Xia M, Li PL, Hinton SJ, Li N. Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase 2 senses high salt intake to increase hypoxia inducible factor 1alpha levels in the renal medulla. *Hypertension.* 2010;55(5):1129-36.
12. Li N, Chen L, Yi F, Xia M, Li PL. Salt-sensitive hypertension induced by decoy of transcription factor hypoxia-inducible factor-1alpha in the renal medulla. *Circ Res.* 2008;102(9):1101-8.
13. Dang E, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y i sur. Control of Th17/Treg Balance by Hypoxia-inducible Factor 1. *Cell.* 2011;146(5):772-784.
14. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A i sur. Salt Intake and Immunity. *Hypertension.* 2018;72:19-23.
15. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y i sur. Induction of pathogenic Th17 cells by inducible salt sensing kinase SGK1. *Nature.* 2013;496(7446):513-517.
16. The American Association of Immunologists, Inc. High Salt Diet Exacerbate IBD. *J Immunol.* 2017;199(3):829-830.
17. Norlander A, Saleh M, Pandey A, Itani H, Wu J, Xiao L i sur. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive eng-organ damage. *JCI Insight.* 2017;2(13):e92801.
18. Du YN, Tang XF, Xu L, Chen WD, Gao PJ, Han WQ. SGK1-FoxO1 Signaling Pathway Mediates Th17/Treg Imbalance and Target Organ Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Front Physiol.* 2018;9:1581.
19. Dar H, Singh A, Shukla P, Anupam R, Mondal R, Mishra P i sur. High dietary salt intake correlates with modulated Th17-Treg cell balance resulting in enhanced bone loss and impaired bone-microarchitecture in male mice. *Sci Rep.* 2018;8:2503.

## Literatura

20. Brunet A, Park J, Tran H, Hu L, Hemmings B, Greenberg M. Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol.* 2001;21(3):952-965.
21. Abcam. Introduction to flow cytometry. Dostupno na adresi: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>. Datum pristupa: 06. kolovoza 2019.
22. Surat P, Flow Cytometry Methodology, Uses and Data Analysis. Dostupno na adresi: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Flow-Cytometry-Methodology-Uses-and-Data-Analysis.aspx>. Datum pristupa: 07. kolovoza 2019.
23. Thermo Fisher Scientific. How a Flow Cytometer Works. Dostupno na adresi: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>. Datum pristupa: 07. kolovoza 2019.
24. Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434.
25. World Health Organization. Salt reduction. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>. Datum pristupa: 29. kolovoza 2019.
26. Mozaffarian D, Fahimi S, Singh G, Micha R, Khatibzadeh S, Engell R i sur. Global Sodium Consumption and Death from Cardiovascular Causes. *N Engl J Med.* 2014;371:624-634.
27. Wei Y, Lu C, Chen J, Cui G, Wang L, Yu T. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget.* 2016;8(1):70-82.
28. Kleiweiefeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker R i sur. Sodium Chloride Drives Autoimmune Disease by the Induction of Pathogenic Th17 Cells. *Nature.* 2013;496(7446):518-522.
29. Luo T, Ji WJ, Yuan F, Guo ZZ, Li XY, Dong Y i sur. Th17/Treg Imbalance Induced by Dietary Salt Variation Indicates Inflammation of Target Organs in Humans. *Sci Rep.* 2016;6:26767.

## Literatura

30. Wang Z, Zhu Q, Xia M, Li PL, Hinton S, Li N. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl-Hydroxylase 2 Senses High-salt Intake to Increase Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  Levels in the Renal Medulla. *Hypertension*. 2010;55(5):1129-36.

## Životopis

### 11. ŽIVOTOPIS

#### **OPĆI PODATCI:**

IME I PREZIME: Ines Hrkač

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 21. svibnja 1996., Đakovo

ADRESA STANOVANJA: Ante Starčevića 225, Đakovo

Email: hrkacines@gmail.com

#### **OBRAZOVANJE:**

2003. - 2011. Osnovna škola Josipa Antuna Čolnīća, Đakovo

2011. - 2015. Opća gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo

2016. - 2019. Medicinski fakultet Osijek - preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika