

# Utjecaj visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na genski izražaj antioksidativnih enzima i biljega upale u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3

---

Zidar, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:665621>

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 OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Matea Zidar**

**UTJECAJ VISOKOG PREHRAMBENOG**  
**UNOSA KUHINJSKE SOLI NA GENSKI**  
**IZRAŽAJ ANTIOKSIDATIVNIH**  
**ENZIMA I BILJEGA UPALE U**  
**AORTAMA MIŠEVA DIVLJEG TIPA I**  
**MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM *Tff3***

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

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

**Matea Zidar**

**UTJECAJ VISOKOG PREHRAMBENOG**  
**UNOSA KUHINJSKE SOLI NA GENSKI**  
**IZRAŽAJ ANTIOKSIDATIVNIH**  
**ENZIMA I BILJEGA UPALE U**  
**AORTAMA MIŠEVA DIVLJEG TIPA I**  
**MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM *Tff3***

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku

Mentor rada: **doc. dr. sc. Anita Matić, dipl. ing.**

Rad ima 31 list i 7 slika

## **ZAHVALE**

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Aniti Matić na iskazanom povjerenju, velikoj pomoći, korisnim savjetima i strpljenju pri izradi ovoga rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na potpori tijekom studiranja.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Trefoil faktor proteini .....	1
1.1.1. Funkcija TFF proteina.....	1
1.1.2. TFF3 protein .....	1
1.2. Prekomjeran unos soli u organizam i utjecaj soli na endotel .....	2
1.3. Oksidativni stres .....	3
1.3.1. Povezanost oksidativnog stresa i visokog unosa soli .....	3
1.4. Antioksidativni enzimi.....	4
1.4.1. Superoksid dismutaza (SOD).....	4
1.4.2. Katalaza (CAT).....	5
1.4.3. Glutation peroksidaza (GPX).....	5
1.5. Nastanak upale pod utjecajem soli.....	5
1.6. Upalni parametri (IL-6, IL-17A, TNF alfa) .....	6
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	8
<b>3. CILJEVI</b> .....	9
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Materijali.....	10
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Homogenizacija tkiva i izolacija RNA .....	11
4.3.2. Pročišćavanje uzoraka i sinteza cDNA .....	13
4.3.3. PCR u realnom vremenu .....	13
4.4. Statističke metode .....	14
<b>5. REZULTATI</b> .....	15
5.1. Izražaj antioksidativnih enzima u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> .....	15
5.2. Genski izražaj endotelne i inducibilne dušik oksid sintaze u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim <i>Tff3</i> genom.....	17
5.3. Mjerenje genskog izražaja upalnih biljega IL-1 beta, IL-6, TNF alfa i IL-17A u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> .....	18
<b>6. RASPRAVA</b> .....	20
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	24
<b>8. SAŽETAK</b> .....	25
<b>9. SUMMARY</b> .....	26
<b>10. LITERATURA</b> .....	27
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	31

## **Popis kratica**

GPx - glutation peroksidaze

GR - glutation reduktaza

HPRT - hipoksantin gvanin fosforiboziltransferaza (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IL-1 $\beta$  - interleukin 1 beta

IL-6 - interleukin 6

IL-17A - interleukin 17A

CAT - katalaza

NaCl - natrijev klorid

NO - dušikov oksid (engl. *nitric oxide*)

NS - niskoslana dijeta

ROS - reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

SOD - superoksid dismutaza

TFF - obitelj trefoil faktor proteina

TNF alfa - tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (engl. *tumor necrosis factor alfa*)

VS - visokoslana dijeta

WT - divlji tip miševa (engl. *wild tipe*)

## 1. UVOD

### 1.1. Trefoil faktor proteini

U skupinu trefoil faktor proteina (TFF) ubrajaju se mali proteini TFF1, TFF2 i TFF3. To su geni koji su smješteni na 21. kromosoma i to njegovom dugom kraku (1, 2). Njihova veličina je 7-14 kDa, imaju tri disulfidne veze koja su odgovorne za stvaranje strukture koja podsjeća listu djeteline po čemu su dobili ime (3). Brojne studije su pokazale koliko je složena njihova uloga. Sistemski pristup istraživanja uloge proteina TFF2 razjasnio je njihovu ulogu u organizmu i povezanost s imunološkim sustavom (3). Proteini su djelotvorni u obliku monomera (TFF2) i dimera (TFF1 i TFF3) (3). Protein TFF1 je eksprimiran u stanicama želučane mukoze (4). Protein TFF2 prisutan je u antralnim i plioričkim žlijezdama želuca te u Brunnerovim žlijezdama tankoga crijeva (5). Protein TFF3 sintetizira se u vrčastim stanicama crijeva i u nešto manjoj količini u želucu (6). TFF1 i TFF3 nalaze se u epitelnim stanicama i submukoznom glandularnom epitelu nosne sluznice čovjeka (7).

#### 1.1.1. Funkcija TFF proteina

TFF proteini kod čovjeka imaju više funkcija. Oni se vežu na mucine te imaju ulogu složenih proteina koji su uključeni u različite faze karcinogeneze i ulogu u modulaciji imunološkog odgovora. Važne informacije o funkciji proteina TFF2 dobiveni su uz pomoć knockout mišjeg modela u kojem je gen za protein TFF2 inaktiviran (3). Smanjena vrijednost TFF3 proteina utječe na metabolizam masnih kiselina u jetri i TFF3 deficijentni miševi imaju povećan broj malih lipidnih vezikula u hepatocitima bez utjecaja na jetrene biljege oksidativnog stresa koji su povezani s promijenjenom homeostazom lipida u jetri (8). Također, ovi proteini povezani su s poticanjem kemotaksije, antiapoptozom i sudjeluju u imunološkom odgovoru (9). Dokazano je da su trefoil peptidi TFF2 i TFF3 izraženi u glavnim organima koji sudjeluju u imunoregulaciji, inducirani su bakterijskim endotoksinima i sposobni su potaknuti migraciju monocita. Utvrđeno je da trefoil peptidi imaju ulogu u imunološkom odgovoru na ozljedu tkiva (10).

#### 1.1.2. TFF3 protein

TFF2 i TFF3 su pronađeni u limfoidnom tkivu kao što su limfni čvorovi i koštana srž. Vrlo je značajno otkriće mRNA TFF2 i TFF3 u slezeni i timusu štakora za vrijeme istraživanja izražaja trefoila u plućima, jajnicima i limfoidnim organima. Studije preporučuju da TFF mogu



biti regulirani citokinima i transkripcijskim čimbenicima povezanim s imunološkim sustavom i da ih TFF proteini mogu povratno regulirati (11). Pronađen je i u hrskavici tijekom okoštavanja kod miševa, a utišavanje tog gena dovodi do promjene u građi spužvaste kosti kao i promijene u razini sluha (12). Brojna istraživanja su pokazala njegov povećani izražaj u tumorima gastrointestinalnog sustava, pluća, tumora prostate i dojke (13, 14). TFF3 protein je također važan u borbi organizma protiv štetnih čimbenika. Ima protektivan učinak nakon ishemije miokarda i mozga.

## 1.2. Prekomjeren unos soli u organizam i utjecaj soli na endotel

Kuhinjska sol jedan je od glavnih dodataka prehrani koji se koristi od davnina. U početku konzumiranja kuhinjske soli ljudi su konzumirali vrlo niske količine soli, do 0,5 g soli/dan. Kroz vrijeme, konzumacija soli se povećala kroz brojne namirnice te zbog prisutnosti velikih količina NaCl u prerađenim proizvodima. Provedeno istraživanje pokazalo je da je prosječan dnevni unos soli u Republici Hrvatskoj 13,3 g/dan za muškarce i 10,2 g/dan za žene (15). Što znatno nadmašuje prosječnu dozvoljenu koncentraciju unosa soli od 5 g na dan i ukazuje na ozbiljan problem za zdravlje.

Endotel obavlja unutrašnji sloj krvnih žila. Endotelne stanice imaju brojne uloge no jedna od njih je i da djeluju na imunološke stanice i glatke mišićne stanice. Najvažnije funkcije endotela su inhibicija agregacije trombocita i kontrola vaskularnog tonusa te reguliranje propusnosti stjenke krvnih žila (16). U endotelnim stanicama se sintetiziraju čimbenici rasta, nastaju receptori za lipoproteine i stvaraju se produkti arahidonske kiseline (16). Jedna od glavnih funkcija endotela je sposobnost izazivanja vazodilatacije koja nastaje kao odgovor na naglu promjenu krvnog protoka. Endotel regulira protok krvi na način da otpušta vazoaktivne tvari. Stimulacijom endotela potiče se proizvodnja i oslobađanje dušikovog oksida koji prolazi kroz tkiva i pruža zaštitnu ulogu opuštanjem glatkih mišićnih stanica, sprječavanjem adhezije leukocita i trombocita i inhibira mišićnu staničnu proliferaciju (17). U uvjetima bolesti dolazi do gubitka normalne funkcije endotela. Endotel gubi svoju zaštitnu ulogu i zadobiva proaterosklerotsku strukturu. Zbog gubitka funkcije endotela dolazi do smanjene bioraspoloživosti dušikova oksida i povećanja reaktivnih kisikovih radikala (17).

Velik broj cirkulirajućih endotelnih biljega mijenja se prilikom nastanka i razvoja endotelne disfunkcije. Promjene vazoaktivnih agenasa poput NO, nitrita, nitrata i endotelina javljaju se u koronarnoj bolesti i hipertenziji. Potvrđeno je da su razine endotelina, koji je vazokonstriktor endotelnog podrijetla, povišene u stanjima koja su povezana s endotelnom disfunkcijom (16).

Obitelj staničnih adhezijskih molekula (CAMs) su česti biljezi endotelne disfunkcije i izraženi na površini endotelnih stanica. Posreduju u vezanju i migraciji leukocita u subendotelni prostor tijekom upalnog procesa u endotelu. Budući da je otkriven velik broj cirkulirajućih biljega endotelne disfunkcije moguće je detaljnije objasniti patogenezu i način na koji dolazi do oštećenja endotela.

### **1.3. Oksidativni stres**

Oksidativni stres (OS) nastaje ukoliko homeostatski procesi zakažu i kapacitet nastalih radikala prelazi mogućnosti obrambenog sustava, čime mogu nastati stanične ozljede i oštećenje tkiva (17). Također, oksidativni stres može nastati zbog prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih spojeva zbog poremećaja u održavanju redukcijsko-oksidacijskih procesa u biološkim sustavima (18). Oksidativni stres je posljedica štetnog djelovanja slobodnih reaktivnih kisikovih radikala. U biološkim sustavima može rezultirati prekomjernom proizvodnjom slobodnih kisikovih radikala (ROS) i nedostatkom antioksidanata. Uzrokuje oštećenje strukture i funkcije velikog broja biomolekula, što se može vidjeti promjenom u stanicama, tkivima i organima. Oštećenja koja su nastala pod utjecajem oksidativnog stresa mogu narušiti homeostazu iona, gensku transkripciju, prijenos signala u stanicama i uzrokovati brojne poremećaje (18). Doprinosi također i razvoju mnogih bolesti, može uzrokovati nastanak raka, neuroloških poremećaja, ateroskleroze, hipertenzije, akutnog distres sindroma, ishemije, kronične opstruktivne bolesti i astme (19). Slobodni kisikovi radikali nastaju kao rezultat staničnog metabolizma. Imaju jedan ili više nesparenih elektrona koji im daju visoku reaktivnost. U slobodne kisikove radikale ubrajaju se hidroksilni radikal, peroksidni radikal, superoksidni radikal, hipoklorna kiselina i vodikov peroksid. Hidroksilni radikal karakterizira kratko vrijeme polu života i niska specifičnost prema supstratu, upravo zbog toga on je najreaktivniji od slobodnih kisikovih radikala (20).

#### **1.3.1. Povezanost oksidativnog stresa i visokog unosa soli**

Istraživanja su dokazala kako visok unos kuhinjske soli ima utjecaj na nastanak oksidativnog stresa. Unos velikih koncentracija kuhinjske soli u organizam uzrokuje poremećaje mikrocirkulacije, porast krvnog tlaka i nastanak slobodnih kisikovih radikala. Glavne funkcije mikrocirkulacije su dostava kisika i hranjivih tvari te uklanjanje ugljikovog dioksida. Mikrocirkulacija također služi za regulaciju krvotoka i perfuziju tkiva, utječući tako na krvni tlak i na upalu (17). Prekomjernim unosom soli raste razina bazalnoga ROS-a u

limfocitima koji su izolirani iz mezenteričnih limfnih čvorova te slezene štakora (21). Također, povećava se i unutarstanična proizvodnja ROS-a u perifernim limfnim čvorovima. Neravnotežom između antioksidativnog obrambenog mehanizma i proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva nastaje oksidativni stres. Kardiovaskularni rizični čimbenici imaju utjecaj na vaskularni endotel, a oksidativni stres ima vrlo važnu ulogu u aktivaciji endotela, razvoju hipertenzije i ateroskleroze koji dovode do kardiovaskularnih oštećenja (17). Reaktivni kisikovi spojevi, koji nastaju na mjestu upale, pri niskim koncentracijama djeluju kao signalne molekule i reguliraju staničnu aktivnost, dok pri visokim koncentracijama mogu dovesti do stanične ozljede i smrti. Visoke razine oksidativnog stresa dovode do masovnog stvaranja proupalnih citokina i na taj način pobuđuje imunološki sustav (17). Stanice imunološkog sustava stvaranjem slobodnih kisikovih radikala i na taj način dolazi do oštećenja normalnog tkiva domaćina. Ukoliko je izloženost slobodnim kisikovim radikalima velika, aktivira se upalni odgovor u kojem dolazi do povećanja razina TNF alfa, IL-6, IL-8 te povećanog izražaja promotora oksidativnog stresa i adhezijskih molekula (17).

#### **1.4. Antioksidativni enzimi**

Antioksidansi onemogućavaju stvaranje slobodnih radikala i drugih oksidanasa koji nastaju u organizmu. Antioksidansi se mogu unositi hranom kao dodatci prehrani ili mogu nastati u stanici. Unos antioksidanasa važan je za zdravlje, najbolji su prirodni izvori antioksidanasa poput povrća i voća. Antioksidansi također mogu uništiti već stvorene slobodne radikale i popraviti oštećenja koja su nastala u stanici. Zaštita organizma pomoću antioksidanasa obuhvaća enzimske i neenzimske tvari koji održavaju ravnotežu u organizmu, održavanjem slobodnih radikala u njihovim homeostatskim granicama koji nisu štetni za organizam. Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i glutation S-transferaza (22). Antioksidativni enzimi su najvažniji u borbi protiv reaktivnih vrsta, mogu djelovati na njihovo uništavanje ili na regeneraciju neenzimskih antioksidanasa (22).

##### **1.4.1. Superoksid dismutaza (SOD)**

Superoksid dismutaza je važan antioksidativni čimbenik koji sudjeluje u obrani stanica u procesu anaerobnog metabolizma (22). Superoksid dismutaza koristi se kao biomarker za praćenje i dijagnosticiranje bolesti. Njezina povećana ili smanjena aktivnost može ukazivati na različite patološke procese u organizmu. Aktivnost superoksid dismutaze značajno utječe na vidljive vaskularne promjene akutnog te posebno kroničnog oksidativnog stresa (17). Do sada

je poznato pet različitih izoformi enzima superoksid dismutaze. Kod sisavaca su prisutna tri oblika, Cu/Zn-SOD ili SOD1 koji je smješten u citoplazmi, Mn-SOD ili SOD2 koji se nalazi u mitohondriju i EC-SOD ili SOD3 koji sadrži cink i bakar i nalazi se u izvanstaničnom prostoru (23). Cu/Zn-SOD je homodimer izražen je u svim stanicama i krvnim žilama. Njegova smanjena razina povećava vazokonstrikciju i smanjuje NO posredovanu dilataciju kod velikih arterija i u mikrocirkulaciji (17). Mn-SOD je homotetramer i nalazi se u mitohondrijskom matriksu. Predstavlja prvu liniju obrane protiv oksidativnog stresa. Regije u promotorskom genu Mn-SOD sadrže elemente koji su važni u regulaciji upalnih gena (17). Također je dokazano kako povećan izražaj Mn-SOD poboljšava funkciju endotela i smanjuje razinu superoksida (17). EC-SOD se od svih izoformi nalazi u izvanstaničnom prostoru i tako reagira na podražaje u stanjima kao što su dijabetes, ateroskleroza i hipertenzija.

#### **1.4.2. Katalaza (CAT)**

Najvažnija enzimska uloga katalaze je disproporcioniranje vodikova peroksida u kisik i vodu. Može se naći kao slobodni ili enzim vezan uz membranu izvan stanice ili u mitohondrijima, kloroplastu i citosolu. Katalaze kod eukariota su homotetrameri koji imaju hem skupinu u aktivnom mjestu sa željezom u  $Fe^{3+}$  obliku (22). Već pri blagim oksidacijskim stresom povećava se ekspresija i aktivnost katalaze. Njezina povećana aktivnost karakteristična je za bolesti nekih organa kao što su jetra i gušterače te hemolitičke bolesti, dok joj je smanjena aktivnost u prisutnosti malignih bolesti i dijabetesa. Također, katalaza predstavlja neophodnu komponentu antioksidacijskog sustava u uvjetima oksidacijskog stresa (17).

#### **1.4.3. Glutation peroksidaza (GPX)**

Glutation peroksidaza je enzim koji katalizira redukciju vodikova peroksida u vodu i kisik pri čemu dolazi do oksidacije glutationa (22). Glutation peroksidaza je važan enzim jer je uključena u zaštitu od oksidativnog stresa. Glavni je izvor zaštite već pri blagom oksidativnom stresu za razliku od katalaze koja je važnija za zaštitu od teškog oblika oksidativnog stresa. Glutation peroksidaza se razlikuje od katalaze jer može reducirati i organske perokside koji su nastali oštećenjem membrana u kisik i alkohole (22).

### **1.5. Nastanak upale pod utjecajem soli**

Do razvoja endotelne disfunkcije dolazi uslijed povećane razine oksidativnog stresa i vazoaktivnog odgovora koji dovode do povećane aktivacije endotelnih stanica i njihove

infiltracije leukocitima. Kao posljedica toga može se narušiti imunološka homeostaza i još važnije, može doći do nastanka vaskularne upale. Brojna istraživanja koja su do sada provedena utvrdila su kako NaCl ima važan utjecaj na nastanak endotelne disfunkcije. Do sada još uvijek nije potpuno jasno kakve promijene u imunološkom sustavu i upalnom odgovoru uzrokuje unos velike količine kuhinjske soli. Th17/Treg narušena ravnoteža koja je izazvana visokim unosom soli može imati utjecaj na razvoj vaskularne upale te oštećenje organa. Dinamika pojedinih sub populacija monocita može biti značajan predisponirajući čimbenik nepovoljnog učinka soli na krvne žile koji može dovesti do razvoja kardiovaskularnih bolesti. Rezultati provedenog istraživanja pokazali su da su ispitanici na dijeti s visokim udjelom soli pokazali znatno veći broj monocita u usporedbi s ispitanicima koji su unosili manju razinu soli. Korelacijski test je otkrio snažnu povezanost između razina unosa soli i količine monocita. Smanjenje unosa soli popraćeno je smanjenom proizvodnjom proupalnih citokina IL-6 i IL-23 i pojačanom proizvodnjom IL-10 (24). Rezultati ovog istraživanja kojeg su proveli Yi i suradnici (2015) potvrđuju da i kod zdravih ljudi prehrana s visokim udjelom soli može dovesti do prekomjerne aktivacije imunološkog odgovora i vrlo je važno naglasiti kako može doći do nastanka vaskularne upale.

### **1.6. Upalni parametri (IL-6, IL-17A, TNF alfa)**

Prekomjeran unos kuhinjske soli potiče hemodinamske promjene, može dovesti do razvoja vaskularne upale i povezan je s odgovorom imunološkog sustava. Mnoga do sada provedena istraživanja dokazala su da prekomjeran unos kuhinjske soli ima za posljedicu proizvodnju nekoliko citokina koji potiču upalu i oštećenje organa (25). IL-17A se stvara u neutrofilima, dendritičkim stanicama, NK stanicama, no najvećim dijelom nastaje iz Th17 limfocita. Povezan je s kardiovaskularnim bolestima i arterijskom hipertenzijom (26). Također u ovom istraživanju je dokazano da povišena razina IL-17 u serumu značajno povezana s arterijskom hipertenzijom. TNF alfa je upalni citokin kojeg proizvode makrofagi i monociti tijekom akutne upale. Odgovoran je za niz signalnih događaja unutar stanica koji mogu dovesti čak i do apoptoze i nekroze. Njegova primarna uloga je u regulaciji imunoloških stanica. Djeluje kao endogeni pirogen i ima sposobnost inducirati upalu i inhibirati tumorogenezu, te reagira i na sepsu putem stanica koje proizvode IL-1 i IL-6. IL-6 je citokin koji se vrlo brzo proizvodi tijekom razvoja upale, ozljeđuje tkiva i učinkovito aktivira imunološki sustav. Utvrđene su njegove visoke serumske koncentracije kod sistemskih upalnih stanja. IL-6 doprinosi obrani domaćina stimuliranjem reakcija u akutnoj fazi, hematopoezi i imunološkim reakcijama (27).

Njegov izražaj je kontroliran transkripcijskim i posttranskripcijskim mehanizmima, unatoč tome nepravilna sinteza IL-6 ima patološki učinak na kroničnu upalu (27). IL-6 se luči ukoliko dođe do oštećenja tkiva pri neinfektivnim upalama i traumama koji izravno potiču upalu. Porast razine IL-6 u serumu prethodi povišenju temperature i koncentracije proteina akutne faze. IL-6 također ima važnu ulogu u stečenom imunološkom odgovoru jer stimulira stvaranje antitijela i razvoj efektorskih T stanica (27). Ovim istraživanjem na transgeničnim miševima možemo vidjeti učinak prekomjernog unosa soli na razvoj upalnog odgovora.

## **2. HIPOTEZA**

Različiti soj miševa te primijenjeni dijetni protokoli utječu na promjene genskog izražaja ispitanih antioksidativnih gena (Cu/Zn SOD, GPx1 i katalaza) i biljega upale (IL-6, TNF alfa i IL-17A).

### 3. CILJEVI

Glavni ciljevi istraživanja su:

- 1) ispitati utjecaj visokoslane prehrane na genski izražaj antioksidativnih enzima Cu/Zn SOD, GPx1 i katalaze
- 2) ispitati genski izražaj biljega upale (IL-6, TNF alfa i IL17-A) u aortama miševa divljeg tipa (WT) te miševa s isključenim *Tff3* genom
- 3) usporediti postoje li razlike u genskom izražaju svih ispitanih gena ovisno o dijetnom protokolu te soju miševa



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

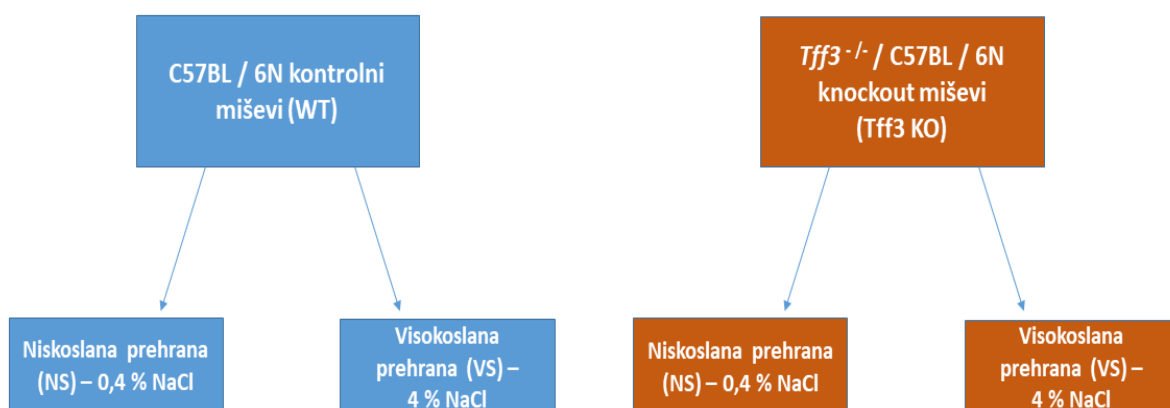
Ovo istraživanje je eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama (miševi). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva za istraživanja Medicinskog fakulteta Osijek (KLASA: 602-04/21-08/08, URBROJ: 2158-61-07-21-108).

### 4.2. Materijali

Uzgoj i dijetni protokol na životinjama provodio se u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. U istraživanju su korištena dva soja miševa *Tff3*<sup>-/-</sup> / C57BL / 6N knockout (Tff3 KO) i C57BL / 6N kontrolni miševi (WT) starosti 8-10 tjedana. Svaki od sojeva bili su podijeljeni u dvije skupine (N-broj životinja po skupini):

- 1) Niskoslana (NS) skupina (N = 5 oba soja) - miševi su tijekom tjedan dana konzumirali standardnu hranu za miševе (hrana sadrži 0,4 % NaCl u svom sastavu, proizvođač Mucedola, Italija).
- 2) Visokoslana (VS) skupina (N = 5 WT miševa i N = 6 Tff3 KO miševa) - miševi su tijekom tjedan dana konzumirali hranu koja sadrži povećani postotak kuhinjske soli u svom sastavu (hrana sadrži 4 % NaCl u svom sastavu, proizvođač Mucedola, Italija).

Za cijelo vrijeme istraživanja životinje su imale slobodno dostupnu vodu za piće.



**Slika 1.** Prikaz pokusnih skupina

### 4.3. Metode

Nakon 7 dana dijetnog protokola miševi su bili izvagani te anestetizirani kombinacijom ketanest S 75 mg/kg (Pfizer, SAD) i midazolama 0,5 mg/kg (Torrex Chiesi Pharma, SAD) i potom dekapitirani. Način usmrćivanja životinje (dekapitacija uz premedikaciju midazolam/ketanest) je najprikladniji protokolu.

Aorte su nakon izoliranja smrznute u tekućem dušiku i skladištene na -80 °C do izvođenja pokusa. U pokusu je korišten najmanji mogući broj životinja s maksimalnim korištenjem uzorka, s obzirom na količinu raspoloživog tkiva („reduction”) te nije bila moguća alternativna metoda („replacement”). Koristila se state-of-the-art metoda, a veća razina „replacementa” nije bila moguća.

#### 4.3.1. Homogenizacija tkiva i izolacija RNA

Osnovni preduvjet za analizu izražaja gena, proučavanje genoma i promjena u genomu je izolacija RNA visoke čistoće i integriteta. RNA je prije upotrebe za utvrđivanje genskog izražaja potrebno odvojiti od ostatka staničnog materijala: proteina, lipida i ugljikohidrata. Stanični proteini, među kojima su enzimi nukleaze te histonski proteini koji sudjeluju u pakiranju i zaštiti nukleinske kiseline, mogu ometati analizu, te ih je potrebno ukloniti. Izolacija započinje homogenizacijom tkiva.

Postupak homogenizacije tkiva i izolacije RNA u našem istraživanju provedena je prema protokolu preuzetom iz znanstvenog rada Chomczynski i suradnici (28). Izolirani uzorak tkiva (aorta) izdvoji se u autoklavirani talionik te se pomoću tekućeg dušika i tučka usitni što je više moguće (**Slika 2.**). Zatim se u navedeni uzorak doda 1 ml trizola i prenese u sterilnu Eppendorf tubicu volumena 2 ml. U istu tubicu se potom odpipetira 100 µl 1-brom-3-klor-propana, uzorci se naglo promiješaju 15 sekundi te inkubiraju 8 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega slijedi centrifugiranje uzoraka pri 12000 RPM-a/15 minuta. Nakon centrifugiranja, dobiveni supernatant se izdvojili u zasebnu sterilnu Eppendorf tubicu i doda 500 µl izopropanola koji omogućava odvajanje RNA od staničnog sadržaja (lipida, proteina, DNA). Ponovno slijedi miješanje uzoraka 15-20 sekundi, inkubacija 8 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugiranje pri 12000 RPM-a kroz 8 minuta. Izdvojenu RNA je potrebno dodatno pročistiti pomoću 75 % - tnog etanola na način da se u uzorku doda 1ml 75 % - tnog etanola i ponovi centrifugiranje pri 7500 RPM-a / 5 minuta (ovaj dio se ponavljao dva puta). Nakon čišćenja s etanolom, odlije se sav etanol, a uzorak ostavio kratko na zraku kako bi preostali etanol ishlapio. U uzorak se

potom doda 30  $\mu$ l NFW vode (od engl. Nuclease-Free Water) te slijedi mjerenje koncentracije i čistoće RNA u svakom uzorku na spektrofotometru IMPLEN P330 (Slika 3.)



**Slika 2.** Homogenizacija uzorka u tarioniku (izvor: original autorice rada)



**Slika 3.** Implen spektrofotometar P330 (izvor: original autorice rada)

### 4.3.2. Pročišćavanje uzoraka i sinteza cDNA

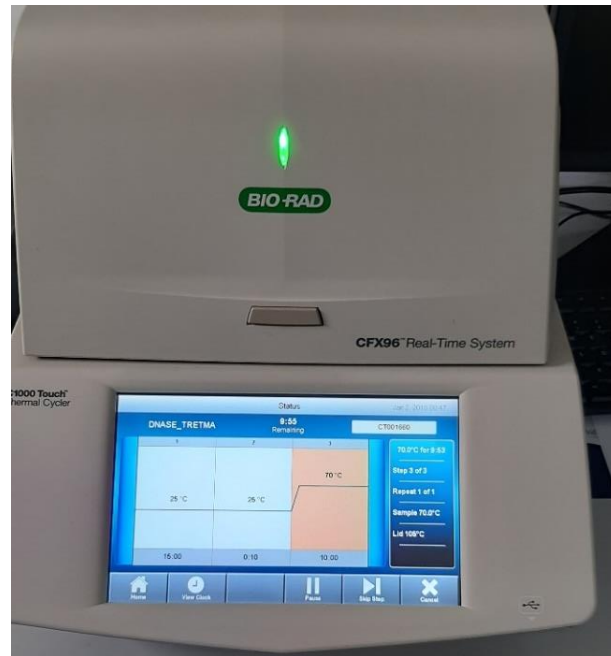
Pročišćavanje uzoraka (DNA-zni tretman) provedi se prema uputama proizvođača Sigma-Aldrich, SAD. Kit za pročišćavanje sastoji se od amplifikacijskog pufera, reakcijskog pufera te otopine za zaustavljanje reakcije. U uzorak RNA se doda 1  $\mu$ l amplifikacijskog i reakcijskog pufera te inkubira 15 minuta na 25 °C. Potom se reakcija zaustavlja s 1  $\mu$ l stop otopine po uzorku pri temperaturi od 70 °C kroz 10 min.

Sinteza cDNA se također provodi prema uputama komercijalno dostupnog kita visokog kapaciteta (eng. *High Capacity cDNA kit*) s inhibitorom RNase tvrtke Applied Biosystems, SAD. Dodatkom svih kemikalija iz kita u uzorke prema definiranim volumenima, isti se postavljaju u uređaju Bio Rad CFX96 te se protokol transkripcije vrši tijekom 3 sata (25 °C/10 min; 37 °C/2 sata; 85 °C/5 min; 4 °C/1 sat). Sintetizirana cDNA se potom razrijedi 5x s NFW vodom (Sigma Aldrich, Njemačka) te se takva koristila za utvrđivanje genskog izražaja metodom PCR u stvarnom vremenu.

### 4.3.3. PCR u realnom vremenu

Za ovo istraživanje korištena je molekularna metoda PCR u realnom vremenu koja je provedena na uređaju Bio Rad CFX96 (**Slika 4.**). Genski izražaj antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, GPx1 i katalaze) i važnih biljega upale (IL-6, TNF alfa i IL-17A) utvrđen je iz uzoraka mišjih aorti te normaliziran u odnosu na rezultate referentnog gena HPRT (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metoda kojom se kratki dio DNA ili RNA umnožava u velik broj identičnih kopija. Na osnovi PCR metode razvijeno je još mnogo postupaka koji su prilagođeni potrebama, razinama osjetljivosti i specifičnosti eksperimentalnih istraživanja. Jedna od njih je i PCR u realnom vremenu (Real-time PCR). Reakcijska se smjesa sastoji od cDNA, četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), oligonukleotidne početnice, enzim Taq DNA polimeraza, ioni magnezija ( $Mg^{2+}$ ), PCR pufer i fluorescentne boje (SYBR Green I, Sigma-Aldrich) ili fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba. SYBER Green I je boja koja se može ugraditi između nukleotida dvostruke uzvojnice DNA i pri tome emitira fluorescenciju. Nakon vezanja DNA jako fluorescira, dok se na jednolančanu DNA ne veže. Nukleinske se kiseline eksponencijalno umnažaju ciklusima koji se ponavljaju. Svaki se ciklus sastoji od razdvajanja roditeljske DNA (denaturacija pri 95 °C tijekom 15-30 s), potom hlađenja na 40 do 60 °C koje omogućuje hibridizaciju početnica s komplementarnim sljedovima. Zatim slijedi sinteza

novonastale DNA tj. elongacija, pri temperaturi od 68-72 °C. U svakom ciklusu broj DNA se udvostruči i novi lanac DNA služi kao kalup za vezanje početnica. Nakon PCR reakcije slijedi detekcija produkata.



**Slika 4.** Bio Rad CFX96 uređaj (izvor: fotografirala autorica rada)

#### 4.4. Statističke metode

Određivanjem minimalnog broja uzoraka potrebnih za istraživanje utvrđeno je kako uz  $\alpha = 0,05$  te snagu testa od 0,80 te predviđenu najmanju detektabilnu razliku u prosječnim vrijednostima od 0,25, potrebne su minimalno 4 pokusne životinje po grupi. Za analizu genskog izražaja između ispitivanih skupina upotrijebljen je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke (jednosmjerna ANOVA), a u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak post hoc test. Za statističku analizu upotrijebljen je Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA). Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Statistička značajnost postavljena je na  $p < 0,05$ . Za grafički prikaz dobivenih rezultata korišten je GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

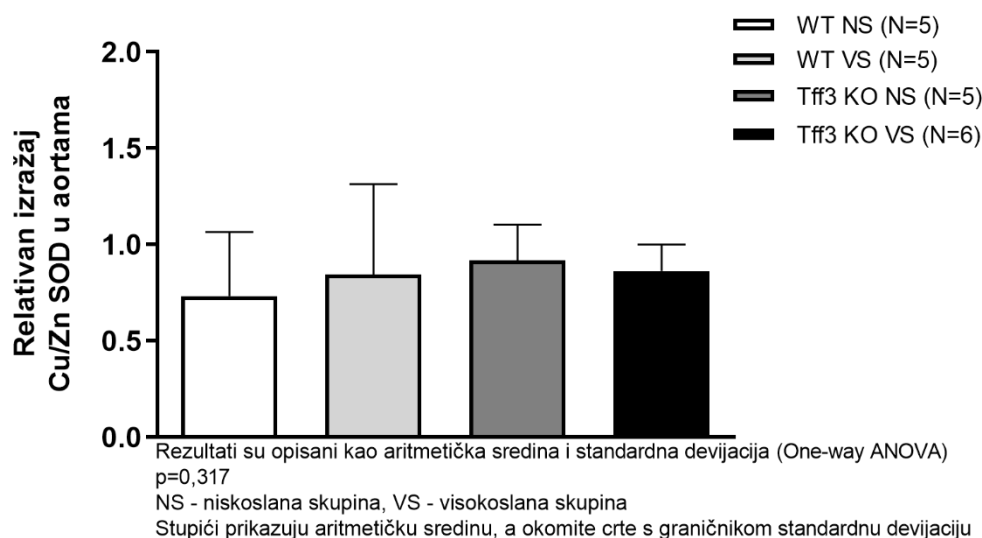
## 5. REZULTATI

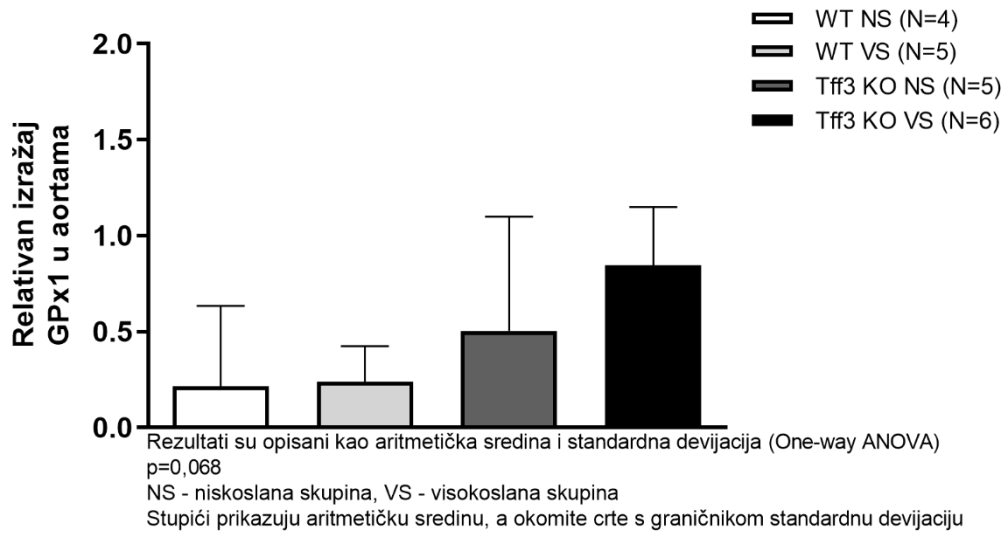
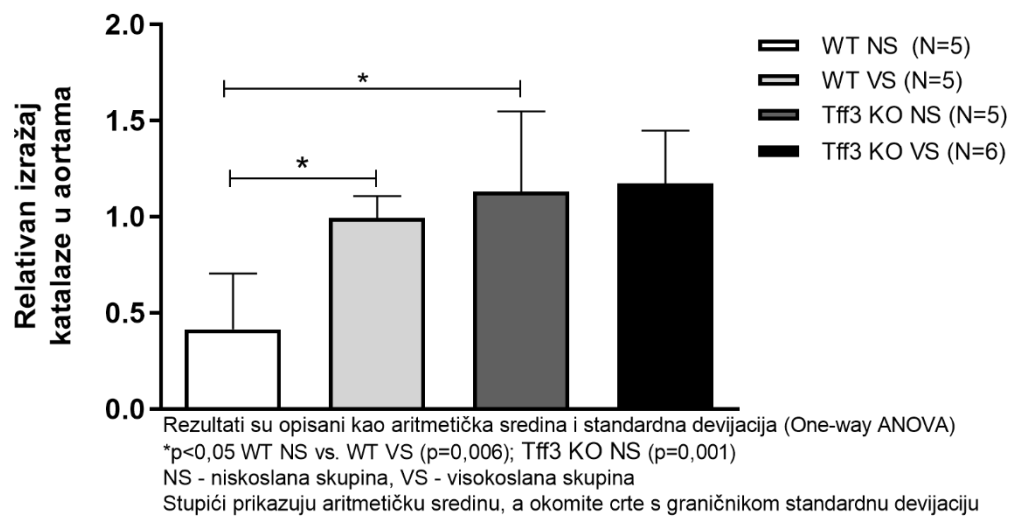
### 5.1. Izražaj antioksidativnih enzima u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*

U ovom dijelu istraživanja izolirana je ukupna mRNA iz uzoraka aorti miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim genom *Tff3* koji su bili podvrgnuti dijetnom protokolu (niskoslana i visokoslana prehrana) te je utvrđen izražaj gena za antioksidativne enzime: Cu/Zn superoksid dismutazu (Cu/Zn SOD), glutation peroksidazu 1 (GPx1) i katalazu. Izmjereni genski izražaj antioksidativnih enzima Cu/Zn SOD (**Slika 5A**), GPx1 (**Slika 5B**) i katalaze (**Slika 5C**) određen je normalizacijom dobivenih vrijednosti s vrijednošću referentnog gena HPRT (engl. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase).

Usporedbom rezultata između ispitivanih skupina utvrđena je statistički značajna razlika jedino u izražaju katalaze. Rezultati su pokazali kako je relativni genski izražaj katalaze značajno snižen u niskoslanjoj skupini kod miševa divljeg tipa u odnosu na isti soj miševa podvrgnut visokoslanjoj prehrani (**Slika 5C**;  $p = 0,006$ ; One-way ANOVA i Holm-Sidak hoc tets) te u odnosu na skupinu miševa s isključenim *Tff3* genom koji su konzumirali niskoslanu prehranu kroz tjedan dana (**Slika 5C**;  $p = 0,001$ ; One-way ANOVA i Holm-Sidak hoc test). Cu/Zn SOD (**Slika 5A**;  $p = 0,317$ ) i GPx1 (**Slika 5B**;  $p = 0,068$ ; One-way ANOVA) genski izražaj nije se značajno promijenio.

**A**



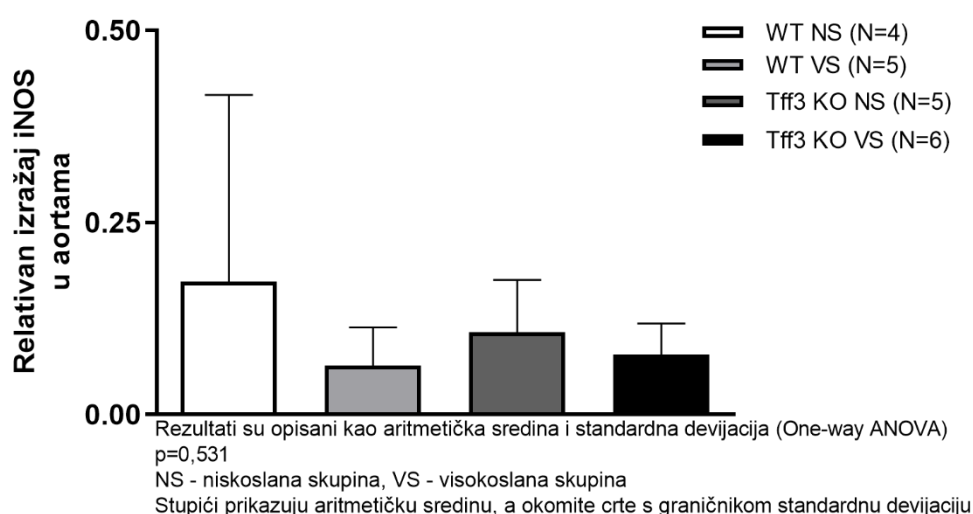
**B****C**

**Slika 5.** Utjecaj dijetnog protokola visokoslane i niskoslane prehrane na relativan izražaj Cu/Zn SOD (A), GPx1 (B) i katalaze (C) u aortama miševa

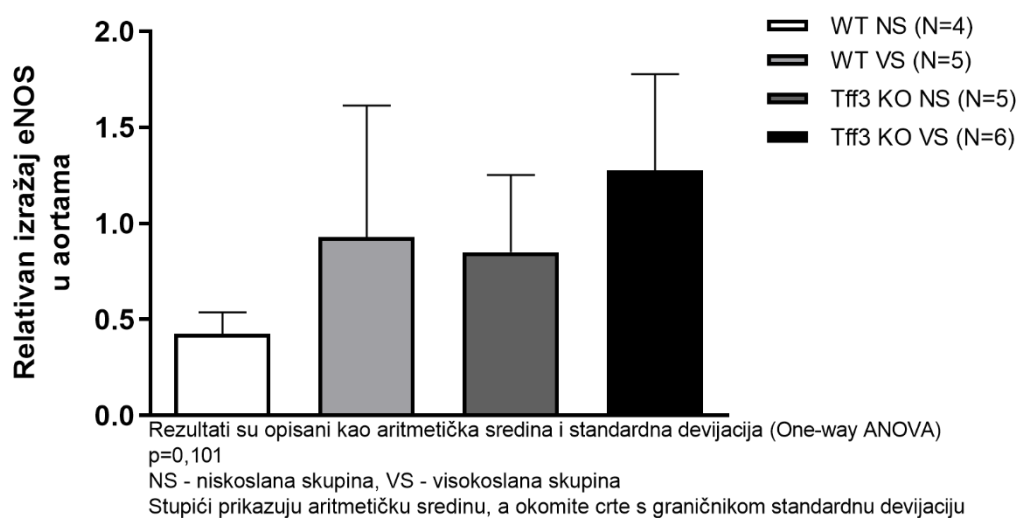
## 5.2. Genski izražaj endotelne i inducibilne dušik oksid sintaze u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *Tff3* genom

Izmjeren je genski izražaj dušik oksid sintaza (inducibilne (iNOS; **Slika 6A**) i endotelne (eNOS; **Slika 6B**) u aortama miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim *Tff3* genom te su rezultati normalizirani u odnosu na referentni gen HPRT (engl. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase).

**A**



**B**





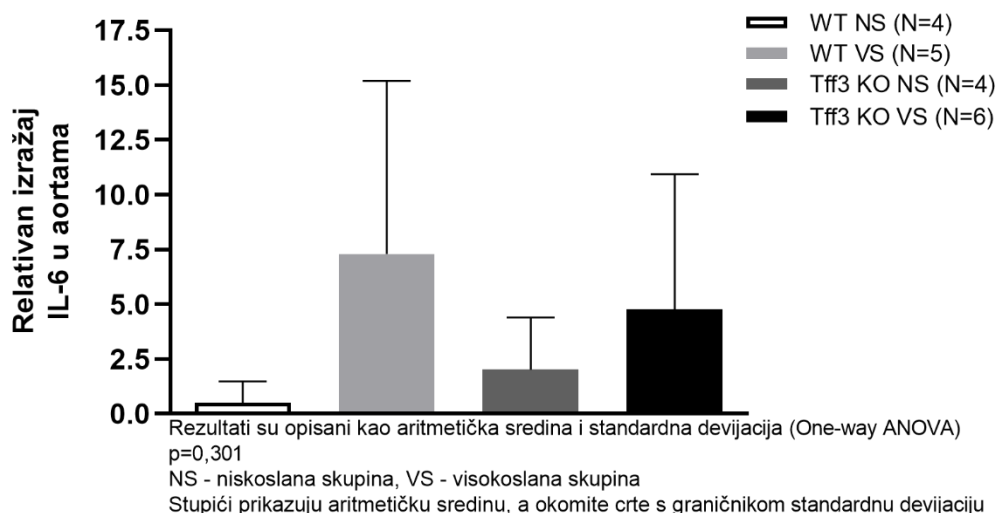
**Slika 6.** Genski izražaja endotelne i inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS (A) i eNOS (B)) u uzorcima aorti miševa podvrgnutih niskoslanom i visokoslanom dijetnom protokolu

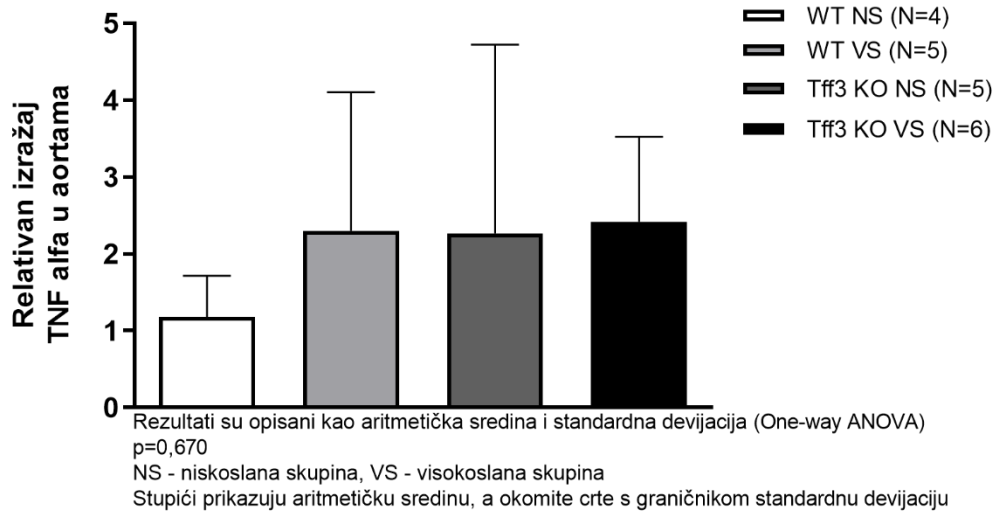
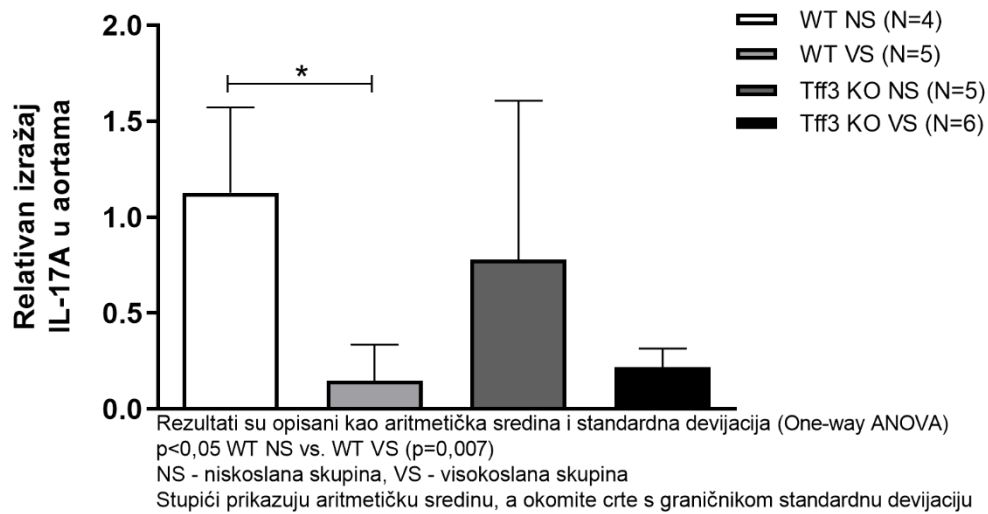
Nije utvrđena statistički značajna razlika u genskom izražaju iNOS (**Slika 6A**;  $p = 0,531$ , One-Way ANOVA) niti eNOS (**Slika 6B**;  $p = 0,101$ , One-Way ANOVA) dušik oksid sintaze između ispitivanih skupina.

### 5.3. Mjerenje genskog izražaja upalnih biljega IL-1 beta, IL-6, TNF alfa i IL-17A u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*

Od upalnih parametara mjerio se relativni genski izražaj IL-6 (**Slika 7A**), TNF alfa (**Slika 7B**) i IL-17A (**Slika 7C**) te su vrijednosti izražaja također normalizirane u odnosu na referentni gen HPRT (engl. hypoxanthine-guanine phosphoribosytransferase). Značajne razlike u relativnom genskom izražaju IL-17A uočen je unutar grupe miševa divljeg tipa, visokoslana prehrana u trajanju od tjedan dana značajno je snizila genski izražaj IL-17A u aortama (**Slika 7C**;  $p = 0,007$ , One-way ANOVA i Holm-Sidak hoc test).

**A**



**B****C**

**Slika 7.** Utjecaj dijetnog protokola visokoslane i niskoslane prehrane na relativan izražaj upalnih biljega IL-6 (A), TNF alfa (B) i IL17-A (C) u aortama

## 6. RASPRAVA

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju jedan od najčešćih uzroka smrtnosti u svijetu te je poznato kako u prisutnost kardiovaskularnih čimbenika rizika, endotel gubi svoju zaštitnu ulogu. Sve navedeno je posljedica smanjene dostupnosti NO koja nastaje kao posljedica povećanja oksidativnog stresa (29, 30). Glavne karakteristike koje opisuju endotelnu disfunkciju su smanjena vazodilatacija, nastanak upale i protrombotičke promjene koje postaju glavni uzročnici povećanog kardiovaskularnog rizika za nastanak patoloških promjena. Usprkos fiziološkoj važnosti, prekomjeren unos kuhinjske soli u organizam vrlo često dovodi do nastanka arterijske hipertenzije i jedan je od glavnih rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Ona se očituje se kao patološko povišenje arterijskog tlaka i to je vrlo složen poremećaj brojnih metaboličkih i hormonskih čimbenika (31). Ukoliko se ne liječi povišen arterijski tlak može povećati rizik od nastanka drugih bolesti kao što su ateroskleroza, angina pektoris, moždani udar, bolesti miokarda, oštećenje bubrega. Dugotrajno povišen krvni tlak oštećuje stjenke arterija i posljedično tome povećava se rizik od nastanka krvnih ugrušaka i formiranja plakova koji mogu začepiti krvne žile (31). Arterijska hipertenzija jedan je od najvažnijih rizičnih faktora smrtnosti i neželjenih kardiovaskularnih događaja. Učinkovito smanjenje unosa soli u populaciji složen je i zahtijevan proces koji treba biti prioritet u liječenju bolesnika s arterijskom hipertenzijom. U pozadini kardiovaskularnih bolesti koje su povezane s prekomjernim unosom soli u organizam je patofiziološki poremećaj oštećenja endotela krvnih žila. Istraživanja su dokazala da dijeta s visokim udjelom soli uzrokuje teške vaskularne komplikacije i na taj način potiče hipertenziju, može uzrokovati i razne imunološke bolesti pojačavanjem upalnog odgovora (32). No, nova humana i animalna istraživanja su pokazala kako oštećenja i promjene na endotelu, kao posljedica visokog unosa soli, nastaju i prije nego što nastane stanje hipertenzije. To znači da već akutni, kratkotrajni unos prekomjernih količina soli narušava funkciju krvnih žila bez da možemo uočiti nastale promjene, tj. prije nego osoba može uočiti povišenje krvnog tlaka (33, 34, 35).

Visok unos kuhinjske soli jedan je od nutritivnih načina kojim se može modificirati metabolizam arahidonske kiseline. Tff3 knockout miševi (Tff3 KO) predstavljaju model za proučavanje sinteze proupalnih i protuupalnih citokina zbog promijenjenog metabolizma lipida, modificiranog metabolizma arahidonske kiseline i povoljnog omjera  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 slobodne masne kiseline u jetri (36). Istraživanje je pokazalo da Tff3 knockout miševi imaju povišen omjer  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 u jetri i smanjen u serumu u usporedbi s divljim sojem miševa te kako je smanjeni omjer  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 u jetri povezan je s poboljšanom tolerancijom glukoze u cijelom tijelu

(8). Manjak TFF3 proteina utječe na metabolizam masnih kiselina u jetri i *Tff3* deficijentni miševi imaju povećan broj malih lipidnih vezikula u svojim hepatocitima bez utjecaja na jetrene biljege oksidativnog stresa koji su često povezani s prekomjernom homeostazom lipida u jetri. Postoji nekoliko studija koje dokazuju da TFF mogu biti regulirani citokinima i transkripcijskim čimbenicima. *Tff3* knockout miševi (*Tff3* KO) predstavljaju model za proučavanje krvožilne funkcije, aterosklerotskih lezija i sinteze proupalnih citokina. Upravo zbog tih činjenica pokazao se kao dobar model za naše istraživanje.

Poznato je kako unos prekomjernih količina soli narušava oksidativnu ravnotežu i uzrokuje poremećaj funkcije krvnih žila. Istraživanja štetnog utjecaja soli na animalnim modelima, kod kojih je potvrđena snižena razina angiotenzina II, pokazala su značajno povišenu produkciju ROS-a u stjenkama krvnih žila (17). Supresija angiotenzina II, tijekom povećanog unosa soli u organizam za posljedicu ima oštećenje funkcije krvnih žila i povećanu produkciju slobodnih kisikovih radikala (37). Naše istraživanje je pokazalo kako miševi divljeg tipa (WT) općenito imaju značajno niži genski izražaj katalaze u odnosu na miševe s isključenim *Tff3* genom. No, promjene uvjetovane visokim unosom soli uočene su samo kod WT miševa. Konzumacija visokih koncentracija soli uzrokovala je porast genskog izražaja katalaze kod miševa divljeg tipa dok je izražaj istog enzima nije promijenio kod *Tff3* KO miševa. Izražaj ostalih enzima nije se značajno mijenjao unutar soja i između grupa. Takav rezultat govori u prilog kako WT miševi bolje reagiraju na promjene nastale pod utjecajem visokoslane prehrane i oksidativnog stresa od *Tff3* KO miševa koje posredno mogu narušiti endotelnu funkciju. Opće je poznato da katalaza razlaže jedan od najčešćih uzročnika povećanog oksidativnog stresa a to je vodikov peroksid te ga eliminira. Mjerenje razine vodikovog peroksida bilo bi potrebno naknadno izvršiti. No, uz činjenicu kako se razine dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS) nisu značajno promijenile daje se naslutiti kako je možda potreban duži period visokoslane ishrane da bi se uočilo utjecaj oksidativnog stresa te koji enzimi zaista imaju ulogu u navedenim procesima. Rindler i suradnici su također pokazali na modelu miševa koji su konzumirali hranu s povećanom količinom masti, kako je takva kratkotrajna prehrana izazvala povećanje izražaja katalaze koji sprječava daljnja oštećena posredovana povećanjem razine oksidativnog stresa, i to posebno utjecaja vodikova peroksida (38). Neki od neobjavljenih rezultata s Katedre za fiziologiju i imunologiju su pokazala kako između sojeva miševa i dijetnog protokola koji smo i mi primijenili u našem istraživanju nije došlo do značajnog povećanja oksidativnog stresa mjerenjem oksidiranih lipoproteina niske gustoće i naprednih oksidiranih proteinskih proizvoda te su naši rezultati u skladu s tim rezultatima mjerenja izražaja antioksidativnih enzima.

Ukoliko se pojavi disfunkcija endotela, dolazi do proupalnih stanja, smanjene vazodilatacije i razvoja protrombotičkih stanja. Disfunkcija endotela napreduje starenjem i povezana je s bolestima kardiovaskularnog sustava. Unošenjem veće količine soli u organizam može se smanjiti endotelna funkcija i protok krvi u krvnim žilama. Zbog toga mogu nastati povećane razine superoksida i reaktivnih kisikovih radikala, što uvjetuje nastanku povećanog oksidativnog stresa u stijenci krvnih žila. Povećani oksidativni stres uzrokuje aktivaciju endotelnih stanica i razvoj upale. Oni mogu biti predisponirajući čimbenici razvoju kardiovaskularnih bolesti. Disfunkcija endotela javlja se znatno prije pojave opstruktivnih lezija u provodnim i otporničkim krvnim žilama (16).

Unos visoke koncentracije soli u organizam može uzrokovati jaki imunološki odgovor krvnih žila koji nastaje uslijed interakcije leukocita sa vaskularnim endotelnim stanicama. Istraživanja koja su provedena na miševima otkrila su da dijeta s visokim udjelom soli može potaknuti upalu tkiva i razvoj autoimunih bolesti (24). Monociti predstavljaju prvu crtu imunološke obrane. Povećavaju proliferacijsku aktivnost koštane srži kao odgovor na upalne podražaje što dovodi do povećanog broja cirkulirajućih monocita (24). Također, pridonose lokalnoj i sistemskoj upalnoj reakciji na način da dolaze na mjesto upale gdje proizvode upalne citokine poput IL-6, IL-23 i IL-10 što izaziva jaki imuni odgovor (17).

Od upalnih biljega u našem istraživanju odlučili smo se za IL-6, TNF alfa i IL-17A. Prvenstveno zato što predstavljaju jedne od najznačajnijih upalnih parametara ali i zato što je poznata njihova međusobna povezanost. Mjerenjem serumske koncentracije IL-6 na istom modelu utvrđena je razlika između niskosolanih skupina WT i Tff3 KO. Tff3 KO skupina je pokazala značajno višu serumsku koncentraciju IL-6 upalnog biljega. U našim rezultatima nismo dobili značajne razlike no vidljiva je tendencija u istom smjeru (39). TNF alfa koji djeluje kao endokrini i parakrini posrednik upalnih i imunoloških reakcija nije pokazao značajnu razliku u izražaju između ispitivanih skupina. Takav rezultat je sukladan rezultatima serumske razine istog parametra i na istom modelu (39). Od svih ispitanih biljega, značajne razlike utvrdili smo kod IL-17A. Brojna istraživanja koja su proučavala konzumaciju visokih koncentracija soli su pokazale kako povećana koncentracija NaCl aktivira pomoćne Th-17 stanice koje pojačano stvaraju IL-17 koji ima proupalno djelovanje. Prekomjeren unos soli može aktivirati dendritičke stanice koje potiču proizvodnju T-stanica IL-17A i IFN- $\gamma$  i stvaraju povećan IL-1 $\beta$  (25). T limfociti luče proupalne citokine u koje se ubraja i IL-17A. Provedeno istraživanje na životinjskim modelima pokazalo je da angiotenzin II potiče lučenje IL-17A podrijetlom iz T limfocita, čime je utvrđeno kako je njihova prisutnost neophodna za negativne učinke hipertenzije na krvne žile (26). Naši rezultati su pokazali kako je u skupini WT miševa

razina IL-17A značajno snižena nakon visokoslane prehrane, što je posljedica povećanog izražaja katalaze tj. uklonjenog vodikovog peroksida kojim se zaustavila upala i snizio oksidativni stres.

Iz navedenih rezultata se da zaključiti kako je potreban duži period visokoslane prehrane da bi se mogle utvrditi značajne promjene i utjecaj soli na ispitivane parametre.

## 7. ZAKLJUČAK

Glavni zaključci ove studije su:

- 1) Unos visokih koncentracija soli povećava genski izražaj katalaze kod miševa divljeg tipa u odnosu na niskoslanu skupinu istog soja
- 2) Genski izražaj Cu/Zn SOD i GPx1 antioksidativnih enzima nije pokazao značajne razlike između ispitivanih skupina
- 3) U skupini miševa divljeg tipa (WT) tjedan dana visokoslane prehrane uzrokovao je značajno sniženje genskog izražaja IL-17A
- 4) Rezultati govore u prilog kako povećanje katalaze u uvjetima visokoslane prehrane uzrokuje smanjene razine oksidativnog stresa i upalnih procesa u aortama miševa divljeg tipa (WT)

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati utjecaj visokoslane prehrane na genski izražaj antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, GPx1 i katalaze) te biljega upale (IL-6, IL-17A i TNF alfa) u aortama miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim *Tff3* genom.

**Nacrt studije:** Pokusno (eksperimentalno) istraživanje.

**Materijali i metode:** Miševi divljeg tipa (C57BL / 6N kontrolni miševi) i miševi s isključenim *Tff3* genom (*Tff3*<sup>-/-</sup> / C57BL / 6N knockout (*Tff3* KO)) starosti 8-10 tjedana bili su podijeljeni u dvije skupine: niskoslane skupina u kojoj su miševi tijekom tjedan dana konzumirali standardnu hranu za miševе koja sadrži 0,4 % NaCl-a te visokoslane skupina u kojoj su miševi tijekom tjedan dana konzumirali hranu s povećanim postotkom NaCl-a (4 % NaCl-a). Nakon žrtvovanja dekapitacijom prikupljene su uzorci aorti iz kojih se PCR metodom u stvarnom vremenu odredio genski izražaj ciljnih antioksidativnih enzima i upalnih biljega.

**Rezultati:** Tjedan dana visokoslane prehrane uzrokovao je povećanje genskog izražaja katalaze kod miševa divljeg tipa (WT) u odnosu na njegovu niskoslanu kontrolu ( $p = 0,006$ ). Općenito se pokazalo da niskoslane skupina *Tff3* KO miševa ima značajno veći genski izražaj od niskoslane WT skupine ( $p = 0,001$ ). Također, 7 dana visokog unosa soli značajno snižava genski izražaj IL-17A kod WT miševa u odnosu na niskoslanu skupinu miševa istog soja ( $p = 0,007$ ).

**Zaključak:** Povećanje katalaze u aortama miševa divljeg tipa nakon tjedan dana visokoslane prehrane sprječava nastanak i štetno djelovanje oksidativnog stresa te posljedično aktivaciju IL-17A i upalu.

**Ključne riječi:** antioksidativni enzimi, miševi, oksidativni stres, PCR u stvarnom vremenu, upala, visokoslane dijeta



## 9. SUMMARY

### **The effect of high dietary kitchen salt intake on antioxidant enzymes and inflammation marker gene expression in aortas of wild-type and *Tff3* knockout mice**

**Objectives:** To investigate the influence of diet with high percent of salt on the genetic expression of antioxidant enzymes (Cu/Zn SOD, GPx1 and catalase) and markers of inflammation (IL-6, IL-17A and TNF alpha) in the aortas of wild-type (WT) mice and mice with the *Tff3* gene excluded

**Study design:** Experimental research

**Materials and Methods:** Wild type mice (C57BL / 6N control mice) and mice with the *Tff3* gene excluded (*Tff3*<sup>-/-</sup> / C57BL / 6N knockout (Tff3 KO)) aged 8-10 weeks were divided into two groups: a low-salt group in which mice were exposed during the week consumed standard mouse chow containing 0,4 % NaCl and a high-salt group in which mice consumed chow with an increased percentage of NaCl (4 % NaCl) for one week. After decapitation, aortic samples were collected from which the gene expression of target antioxidant enzymes and inflammatory markers was determined by real-time PCR.

**Results:** 7 days of high-salt diet caused an increase in catalase gene expression in wild-type (WT) mice compared to its low-salt control (p = 0,006). In general, the low-salt group of Tff3 KO mice was shown to have significantly higher gene expression than the low-salt WT group (p = 0,001). Also, 7 days of high salt intake significantly reduced IL-17A gene expression in WT mice compared to the low-salt group of mice of the same strain (p = 0,007).

**Conclusion:** Increased gene expression of catalase in the aortas of wild-type mice after a week of high-salt diet prevents the onset and detrimental effects of oxidative stress and consequently the activation of IL-17A and inflammation.

**Keywords:** antioxidant enzymes, high-salt diet, inflammation, mice, oxidative stress, real-time PCR

**10. LITERATURA**

1. Gött P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet EJHG*. 1996;4(6):308–15.
2. Busch M, Dünker N. Trefoil factor family peptides - Friends or foes? *Biomol Concepts*. 2015;6(5–6):343–59.
3. Mirela Baus Lončar: Global methods approach in deciphering the role of TFF2 proteins in organism. *Medicina fulminensis*. 2009;265(1):264-269.
4. Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP, Batzenschlager A, Chambon P. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science*. 1988;241:705-8.
5. Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P i sur. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J*. 1990;9:407-14.
6. Suemori S, Lynch Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:11017-21.
7. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:505–13.
8. Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Ćosić A, i sur. Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(2):827–41.
9. Blin N. Cytoprotective trefoil peptides abound in new functions. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(24):2907–9.
10. Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett*. 1999;456(1):155–9.
11. Kozina N, Jukić I. Trefoil Factor Family (TFF): Peptides with Numerous Functions 1. *SEEMEDJ*. 2019;3(1):70-72.
12. Lubka M, Müller M, Baus-Lončar M, Hinz M, Blaschke K, Hoffmann W, i sur. Lack of Tff3 peptide results in hearing impairment and accelerated presbycusis. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(5-6):437-44.

13. Im S, Yoo C, Jung JH, Choi HJ, Yoo J, Kang CS. Reduced expression of TFF1 and increased expression of TFF3 in gastric cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Int J Med Sci.* 2013;10(2):133-40.
14. Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexø E, Tørring N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:807-12.
15. Premužić V, Erceg I, Jovanović A, Reiner Z, Jelaković B (2010). Unos soli u odrasloj populaciji. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* vol 6, 21.
16. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer T, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija-funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski Vjesnik.* 2012;44:135-146.
17. Ćosić A. Uloga oksidativnog stresa u razvoju poremećenog vaskularnog odgovora pod utjecajem visokog unosa natrijeva klorida kod Sprague-Dawley štakora (doktorska disertacija). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2016.
18. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix: Specijalizirani medicinski dvomjesečnik:* 2004:98-102.
19. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defence. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19.
20. Lončar V. Nastajanje i izlučivanje slobodnih radikala kod životinja pri stresnim uvjetima (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet; 2015.
21. Planinac J. Utjecaj kratkotrajnog visokog unosa soli na razinu staničnog oksidativnog stresa kod mononuklearnih stanica periferne krvi kod Sprague-Dawley štakora (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2015.
22. Šurina M. Antioksidacijski enzimi kao biomarkeri oksidacijskog stresa (završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek; 2018.
23. Vitić Z. Oksidativni i antioksidativni status mišića nuhalne regije štakora izloženih kroničnom i akutnom stresu (završni rad). Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za biologiju; 2016.
24. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, i sur. Effect of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res.* 2017;166(1):103-110.
25. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A i sur. Salt intake and Immunity. *Hypertension.* 2018;72:19-23.

26. Šimunović T., Aktivacija imunosti u arterijskoj hipertenziji (disertacija). Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2017.
27. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10).
28. Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
29. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989;13:658–667.
30. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2003;9:2385–2402.
31. Đurić J, Vitale K, Paradinović S, Jelaković B. Unos kuhinjske soli i arterijski tlak u općoj populaciji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* 2011;6:141-147.
32. Jeremiah Stamler. The Intersalt and implications Study: background, methods, findings and implications. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(2):626-642.
33. Ćosić A, Jukić I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljević Z, Novak S, Vuković R i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol.* 2016 Sep 1;594(17):4917-31.
34. Matić A, Jukić I, Stupin A, Barić L, Mihaljević Z, Unfirer S, Tartaro Bujak I, i sur. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):H718-H730.
35. Čavka A, Jukić I, Ali M, Goslawski M, Bian JT, Wang E, Drenjančević I, i sur. Short-term high salt intake reduces brachial artery and microvascular function in the absence of changes in blood pressure. *J Hypertens.* 2016 Apr;34(4):676-84.
36. Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, i sur. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in *tff3*<sup>-/-</sup>/*c57bl/6n* knockout and wt (*C57bl/6n*) control mice. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).
37. Drenjančević-Perić I, Lombard JH. Reduced Angiotensin II and Oxidative Stress Contribute to Impaired Vasodilation in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. *Hypertension.* 2005;45:687-691.
38. Paul M Rindler 1, Scott M Plafker, Luke I Szweda, Michael Kinter, High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria *J Biol Chem.* 2013 Jan 18;288(3):1979-90.

39. Vlahović N. Utjecaj visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na biljege upale kod TFF3<sup>-/-</sup>(C57Bl/6N knockout i WT (C57/6N) kontrolnih miševa (diplomski rad). Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek; 2020.

## 11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Matea Zidar

Datum i mjesto rođenja: 08.06.1999., Osijek

Adresa: Bana Josipa Jelačića 27, 33515 Orahovica

Adresa e-pošte: mzidar@mefos.hr

Obrazovanje:

2018. do danas: Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

2015.-2018. Opća gimnazija Stjepan Ivšić Orahovica