Utjecaj kratkotrajno povećanog unosa kuhinjske soli na udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora

Blažević, Martina

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:712742

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Martina Blažević

UTJECAJ KRATKOTRAJNO POVEĆANOG UNOSA KUHINJSKE SOLI NA UDIO REGULATORNIH T LIMFOCITA U PERIFERNOJ KRVI I MEZENTERIČNIM LIMFNIM ČVOROVIMA SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Martina Blažević

UTJECAJ KRATKOTRAJNO POVEĆANOG UNOSA KUHINJSKE SOLI NA UDIO REGULATORNIH T LIMFOCITA U PERIFERNOJ KRVI I MEZENTERIČNIM LIMFNIM ČVOROVIMA SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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

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

Rad ima 25 listova, 4 slike i 1 tablicu.

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Martini Mihalj, dr.med. na velikoj stručnoj pomoći tijekom istraživanja i izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Aniti Matić, dipl.ing. na trudu, strpljenju i pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju koje su mi pružali tijekom cijelog školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. UNOS SOLI 1
1.2. IMUNOLOŠKI SUSTAV I T REGULATORNI LIMFOCITI 1
1.2.1. Podskupine Treg limfocita 3
1.2.2. Funkcija Treg limfocita 3
1.3. ULOGA SOLI NA STANICE IMUNOSNOG SUSTAVA I BOLESTI 4
1.3.1. Hipertenzija 5
1.3.2. Autoimunosne bolesti 5
1.3.3. Alergijske bolesti 6

2. HIPOTEZA 7

3. CILJ 8

4. MATERIJALI 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 limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova 11
4.3.3. Protočna citometrija 11
4.4. STATISTIČKE METODE 12

5. REZULTATI 13

6. RASPRAVA 17

7. ZAKLJUČAK 19

8. SAŽETAK 20

9. SUMMARY 21

10. LITERATURA 22

11. ŽIVOTOPIS 25

POPIS KRATICA

CD – prema engl. *cluster of differentiation*, klaster diferencijacije

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

FITC – prema engl. *fluorescein isothiocyanate*, fluorescein izotiocijanat

Foxp3 – prema engl. *forkhead box p3*

FSC - engl. *forward scatter*, veličina

IFN – interferon

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

IPEX – prema engl. *the immune dysregulation, polyendocrinopahty, enteropathy, X-linked syndrome,* imunosna disregulacija, poliendokrinopatija i enteropatija, vezana uz kromosom X

LP – *lamina propria*

MHC – prema engl. *major- histocompatibility-complex*, glavni produkt tkivne podudarnosti

mLN – mezenterični limfni čvor

MS – multipla skleroza

NK – prema engl. *natural killer*, prirodnoubilačke stanice

PBMC – prema engl. *peripheral blood mononuclear cell*, mononuklearna stanica periferne krvi

PMA – forbol-12-miristat-13-acetat

Rag – prema engl. *recombination-activating gene*, gen koji aktivira rekombinaciju

RPMI – Roswell Park Memorial Institute 1640 medij za stanične kulture

SCC – prema engl. *side scatter*, zrnatost

SGK – prema engl. *serum glucocorticoid-regulated kinase*, glukokortikoidna kinaza

shRNA – prema engl. *short hairpin RNA*

SLE – sistemski eritematozni lupus

TGF – prema engl. *transforming growth factor*, transformirajući čimbenik rasta

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

Treg – T regulatorni limfociti

VEGF – prema engl. *vascular endothelial growth factor,* vaskularni endotelni faktor rasta

VSD – visokoslana dijeta

POPIS SLIKA

Slika 1. Izolacija PBMCa na gradijentu fikola

Slika 2. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague – Dawley štakora protočnom citometrijom

Slika 3. Udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

Slika 4. Udio regulatornih T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

TABLICE

Tablica 1. Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja koje su korištene u pokusu

1. UVOD

1.1. Unos soli

Unos soli važan je za održavanje volumena i osmolalnosti plazme te održavanje različitih tjelesnih funkcija (1). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, preporučeni dnevni unos soli za odrasle osobe je pet g/dan, ali s pojavom zapadnjačke prehrane u svijetu, dnevni unos se povećao na 12 g dnevno (2). Prema posljednjim istraživanjima u Republici Hrvatskoj se prosječno dnevno unese približno dvostruka količina soli (11,6 g/dan) u odnosu na preporučenu. Zbog neznanja, loših prehrambenih navika i pretjerane uporabe kuhinjska sol danas uzrokuje višestruku štetu za zdravlje (3). Povećan unos soli vodi povećanom riziku za hipertenziju, kardiovaskularne bolesti zajedno sa oštećenjem bubrega (2), početku i ozbiljnosti nekoliko autoimunih bolesti, kao što su, primjerice, kolitis, sistemski eritemski lupus i multipla skleroza (4). Za 86 % preuranjenih smrtnih slučajeva u Europi uzrok su kronične nezarazne bolesti (debljina, hipertenzija, srčane, bubrežne i plućne bolesti te rak), za čiju je pojavu jedan od najvažnijih čimbenika rizika prekomjeran unos kuhinjske soli. Budući da se Hrvatska nalazi na trećem mjestu u Europi po dnevnom unosu soli, pokrenut je Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli čiji je cilj postupno smanjiti unos kuhinjske soli u općoj populaciji Republike Hrvatske za prosječno 4 % godišnje, odnosno sa sadašnjih 11,6 grama dnevno na 9,3 grama do 2019. godine (3).

1.2. Imunološki sustav i T regulatorni limfociti

Ljudski imunološki sustav se sastoji od drevnog urođenog sustava, koji se prenosi evolucijom iz beskralješnjaka, i stečenog adaptivnog imunološkog sustava, koji je jedinstveno prisutan u kralješnjaka. Prepoznavanje s naknadnom eliminacijom stranih antigena, stvaranje imunološke memorije te razvoj tolerancije na vlastite antigene glavne su funkcije imunološkog sustava. Populacija limfocita uglavnom se sastoji od limfocita iz timusa (T limfociti), limfocita iz koštane srži (B limfociti) i prirodnoubilačkih stanica (NK stanice). T limfociti koji sudjeluju u staničnom imunitetu, zajedno s B limfocitima koji posreduju u humoralnom imunitetu, osiguravaju stečeni imunitet koji djeluje usko povezano s urođenim imunološkim sustavom (5).

Razred regulatornih T limfocita (Treg) otkriven je 1970. godine kao razred T limfocita koji posjeduje mogućnost međureakcije s drugim stanicama u okolini na utišavajući, odnosno supresivan način (6). Regulacijski limfociti T podskupina su $CD4^+$ stanica T koje imaju ulogu utišavanja imunosnog odgovora i održavanja tolerancije na vlastito. Većina Treg limfocita izražava veliki broj CD25 površinskih biljega (α lanac interleukin-2 receptora, IL-2Rα) te posjeduju transkripcijski čimbenik zvan Foxp3 (engl. *forkhead box p3*), član skupine transkripcijskih čimbenika koji posreduju razvoj i funkciju većine T regulacijskih stanica. Multisistemske autoimunosne bolesti povezane s nedostatkom $CD25^+$ regulacijskih stanica T razvijaju se u miševa sa spontanim ili eksperimentalno induciranim mutacijama. Rijetka autoimunosna bolest u ljudi, nazvana IPEX (imunosna disregulacija, poliendokrinopatija i enteropatija, vezana uz kromosom X), uzrokovana je mutacijom gena Foxp3 i povezana s nedostatkom regulacijskih stanica T i upravo su ova zapažanja istaknula važnost regulacijskih stanica T za održavanje tolerancije na vlastito. Za održavanje, stvaranje i djelovanje Treg limfocita potrebni su Foxp3 i CD25. Regulacijska uloga je najbolje istražena kod vrsta stanica koje izražavaju fenotip $CD4^+$ $Foxp3^+$ $CD25^{jak}$. One tipično izražavaju niske razine receptora za IL-7 (CD127) te koriste IL-2, ali ne i IL-7 kao vlastiti čimbenik rasta i preživljavanja. Demetilacija Foxp3 genskog lokusa, kao i ostalih genskih lokusa izraženih u ovim stanicama, služi za održavanje stabilnog fenotipa regulacijskih stanica T, a upravo ove epigenetičke promjene služe kao svojstvo identifikacije regulacijskih stanica T u temeljnim i kliničkim istraživanjima (7).

Tek nakon otkrića ključne uloge Foxp3 transkripcijskog čimbenika u razvoju Treg fenotipa i funkcije (8), dolazi do značajnih spoznaja o važnosti Treg limfocita u različitim autoimunim bolestima i poremećajima imunosnog sustava u miševa (9), ali također s brojnim malignim oboljenjima u ljudi poput tumora dojki (10), gastrointestinalnog sustava (5), jetre (11) te tumora jajnika (12). Također, Treg stanice imaju bitnu ulogu u alergijskim bolestima, kao i u imunološkom odgovoru zdravih osoba na bezazlene alergene iz okoliša (13).

1.2.1. Podskupine Treg limfocita

T regulatorni limfociti se mogu podijeliti na dvije subpopulacije: urođeni Treg limfociti (engl. *natural*, nTreg) i adaptivni ili inducirani Treg limfociti (engl. *inducible*, iTreg).

Urođene nTreg populacije, koje čine 5-10 % perifernih $CD4^+$ T limfocita, razvijaju se u timusu kao limfociti predodređeni za obavljanje supresivnih funkcija pa su stoga važni za održavanje tolerancije na vlastito kao i za održavanje periferne homeostaze unutar imunološkog sustava. Bitna karakteristika nTreg limfocita jest povećana ekspresija α-lanca receptora za IL-2 (CD25) i transkripcijskog čimbenika Foxp3 (13).

Skupinu regulatornih limfocita, koji nastaju na periferiji iz $CD4^+$ $CD25^-$ $Foxp3^-$ T limfocita nakon podražaja antigenom, čine inducirani ili potaknuti Treg limfociti (iTreg). Specifični su za antigen koji ih je potaknuo, ali ekspresijom protuupalnih citokina mogu vršiti i o kontaktu neovisnu supresiju aktiviranih izvršnih stanica koje ne izražavaju ciljni antigen (13).

1.2.2. Funkcija Treg limfocita

Dosad je istraživanjima utvrđeno deset funkcija Treg stanica u imunosnom sustavu, a to su:

1. prevencija autoimunih bolesti uspostavljanjem i održavanjem imunološke samotolerancije (14)
2. supresija alergija i astme (15)
3. indukcija oralne tolerancije (16)
4. indukcija majčinske tolerancije na fetus (17)
5. supresija patogenom inducirane imunopatologije (18)
6. regulacija cjelokupnog izvršnog odgovora (19)
7. supresija odgovora slabo aktiviranih T stanica (20)
8. kontrola jačine imunosnog odgovora uzrokovana aktivacijom T stanica (21)
9. zaštita simbiotskih bakterija od prepoznavanja i uništavanja od strane imunosnog sustava (22)
10. sprječavanje prekomjerne reakcije aktiviranih T stanica u slučaju kada su aktivirane jakim vezanjem i šire svoj napadački ustroj prema onim stanicama koje imaju čak i slične MHC molekule bez potrebnog prepoznavanja (23)

Regulatorne T limfocite karakteriziraju anergija (nereaktivnost prema stimulaciji antigenom) i imunosupresivna aktivnost (zaustavljanje aktivacije i funkcije različitih efektorskih stanica). Svoje učinke ostvaruju u direktnom kontaktu s drugim stanicama i/ili otpuštanjem regulatornih citokina IL-10 i TGF-β (13).

Transformirajući čimbenik rasta-β (engl. *transforming growth factor-β*, TGF-β) predstavlja proizvod tumora koji potiče opstanak tumorskih stanica *in vitro*. Proizvode ga regulacijske $CD4^+$ stanice T, aktivirani makrofagi i druge vrste stanica. Njegove važne i vrlo različite uloge u imunosnom sustavu jesu: inhibicija proliferacije i izvršnog djelovanja stanica T i aktivacija makrofaga, regulacija diferencijacije funkcijski različitih podskupina stanica T, poticanje proizvodnje protutijela IgA poticanjem izotipnog prekapčanja stanica B, poticanje cijeljenja tkiva nakon utišavanja lokalnih imunosnih i upalnih reakcija (7).

Interleukin-10 (IL-10) uključen je u kontrolu urođenih imunoreakcija i imunost posredovanu stanicama. Proizvodi se u makrofagima i dendritičnim stanicama koje također inhibira, stoga djeluje kao regulator negativnom povratnom spregom. Pripada porodici heterodimernih citokina kao što su IL-22, IL-27 i drugi. Mnoge vrste imunosnih stanica kao što su aktivirani makrofagi i dendritične stanice, regulacijske stanice T te pomoćničke T_H2 linije proizvode IL-10. Interleukin-10 inhibira proizvodnju IL-12 u aktiviranim dendritičnim stanicama i makrofagima te ekspresiju kostimulatora i molekula MHC-II na dendritičnim stanicama i makrofagima (7).

1.3. Uloga soli na stanice imunosnog sustava i bolesti

Ravnoteža između efektorskih i Treg stanica važna je za održavanje imuniteta bez štetnih nuspojava. Treg stanice osjetljive su na NaCl. Pokazano je da *in vitro* izlaganje Treg stanica iz ljudske periferne krvi povećanim koncentracijama natrija smanjuje njihovu sposobnost supresije zajedno s većom ekspresijom proupalnih citokina (3) kao što su IL-17 i IFN-γ (24). Konkretnije, Treg stanice izložene povećanoj koncentraciji soli gube supresivni kapacitet, potencijalno kao posljedica solju inducirane aktivacije glukokortikoidne kinaze 1 (SGK-1) koja potiče ekspresiju receptora interleukina-23 (IL-23R) i pospješuje diferencijaciju Th17 limfocita. To je potvrđeno utišavanjem SGK-1 ekspresije korištenjem SGK-1-specifične shRNA transducirane lentivirusom. Gubitak aktivnosti SGK-1 u mišjim Treg limfocitima, uzrokuje smanjenu fosforilaciju FoxO1 nizvodnog proteina u SGK-1 signalnoj kaskadi, čime

se onemogućava eksport FoxO1 iz jezgre u citoplazmu i pospješuje FoxO1 posredovana transkripcija gena Foxp3, ključnog regulatora Treg funkcije i fenotipa. Utišavanje ekspresije SGK-1 u Treg stanicama dakle posreduje povećanje supresivnog kapaciteta Treg limfocita čak i u uvjetima visoke koncentracije soli (25).

1.3.1. Hipertenzija

Prvi dokazi koji opisuju osjetljivost imunoloških stanica na Na^+ *in vivo* dobiveni su analizom imunosnih stanica izoliranih iz štakora s visokom solnom dijetom. Pokazalo se da prekomjerni unos Na^+ uzrokuje aktivaciju makrofaga u koži i stimulira njihovu proizvodnju dušikovog oksida i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Postoje brojni dokazi aktivnosti adaptivnog imunološkog sustava u odgovoru na hipertenziju. Miševi koji imaju manjak B stanica i odjeljak T stanica s genom koji aktivira rekombinaciju ($Rag^{-/-}$) otporni su na angiotenzin II induciranu hipertenziju. Adaptivni prijenos T stanica u Rag $^{-/-}$ miševe inducira hipertenzijske simptome kao što je opaženo u kontroli divljeg tipa. Nedavno je pokazano da su miševi s $CD4^+$ T- stanično ograničenim nedostatkom u SGK1 rezistentni na angiotenzin II induciranu hipertenziju i vaskularnu upalu. Utvrđeno je da su IL-17 i IFN-γ povišeni u bolesnika sa simptomima koronarne arterijske ateroskleroze, čime se podržava uloga T stanica kao medijatora oštećenja krvnih žila kod ljudi (4).

1.3.2. Autoimunosne bolesti

Eksperimentalne studije na životinjama pružile su čvrste dokaze da bi prekomjerni natrij u hrani također mogao utjecati na indukciju i ozbiljnost nekoliko autoimunosnih bolesti kao što su, primjerice, kolitis, sistemski eritematozni lupus (SLE) i multipla skleroza (MS). U miševa, visokoslana dijeta pogoršava kolitis što je povezano s povišenim odgovorom Th17 u lamini propriji (LP). Visokoslana dijeta inducira urođene limfoidne stanice LP da proizvode IL-17, dok male intestinalne Treg stanice proizvode manje IL-10 i oštećene su u svojoj supresijskoj aktivnosti (4). Različiti podatci ukazuju na značajnu ulogu $CD4^+Foxp3^+$ Treg stanica u patogenezi autoimunih bolesti, uključujući prirođeni nedostatak Foxp3, što rezultira IPEX sindromom. Osim toga, promjene u broju i funkciji $CD4^+Foxp3^+$ Treg stanica zabilježene su u većini autoimunih bolesti kao i u drugim imunološki posredovanim stanjima. U skladu s time, abnormalni broj i funkcija $CD4^+Foxp3^+$ Treg stanica zabilježeni su u

reumatoidnom artritisu i sistemskom eritematoznom lupusu, te je predloženo da bi autoimuni odgovori koji su opaženi kod ovih pacijenata mogli biti kontrolirani kliničkom upotrebom Treg stanica za liječenje ovih stanja (26). Objavljeno je da visoke koncentracije natrija ometaju diferencijaciju i funkciju $CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg stanica, što pogoduje diferencijaciji i aktivaciji proupalnih M1 makrofaga (26).

1.3.3. Alergijske bolesti

Treg stanice imaju važnu ulogu u regulaciji alergijskih reakcija potičući i održavajući imunološku reakciju na alergene. Fiziološki, Treg stanice trebaju održavati tolerantno stanje neškodljive tvari i ograničiti neispravan ili prekomjeran imunološki odgovor, a to postižu tako što izravno inhibiraju aktivaciju Th2 stanica (potiskivanje proizvodnje IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13), blokiraju migraciju efektorskih T stanica u upalno tkivo, potiskuju proizvodnju IgE, induciraju IgG4 u B stanicama i ograničavaju Th17- posredovanu upalu kao što je dokazano na miševima. Poznato je da je kod pojedinaca s alergijom, funkcija regulatornih limfocita T narušena i njihov broj često snižen. Jedna od hipoteza o patogenezi astme razmatra ulogu funkcijskog ili brojčanog nedostatka regulatornih T stanica koja može biti uzrokovana genetskom predispozicijom ili okolišnim čimbenicima koji mogu narušiti krhku imunološku ravnotežu. Broj plućnih Foxp3 Treg stanica je smanjen u djece s astmom i njihova produkcija može biti inhibirana prekomjernom proizvodnjom upalnih citokina TNF-α i IL-6 (27).

2. HIPOTEZA

Polazna je pretpostavka da povećani unos kuhinjske soli djeluje na smanjenje udjela regulatornih CD4 T-limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora.

3. CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak kratkotrajne (7 i 14 dana) dijete s povećanim udjelom soli na udio regulatornih CD4 T-limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Studija je bila ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje na animalnim modelima.

Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja koje se koriste u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU) te ih je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/14-08/06, Ur.br. 2158-61-07-14-04) i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-005).

Istraživanje je dio znanstvenog projekta koji financira Hrvatska zaklada 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 starosti od šest do devet tjedana. Životinje su bile uzgojene u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku te su tijekom pokusa bile nastanjene u eksperimentalnoj nastambi. Tijekom cijelog pokusa su imale pristup hrani i vodi *ad libidum* te su bile izložene dvanaestosatnom ciklusu svjetla i tame. Pokusne životinje bile su podijeljene u tri skupine (N = 6 – 9 po skupini):

1. Životinje izložene visokoslanoj dijeti tijekom sedam dana (VSD-7,4 % NaCl, Mucedola, Italija)
2. Životinje na visokoslanoj dijeti tijekom 14 dana (VSD-14)
3. Životinje koje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom (KONTROLA)

Životinje su bile žrtvovane dekapitacijom nakon anestezije kombinacijom ketamina (75 mg/kg, 25 mg/ml Ketanest S, Pfizer) i midazolama (2.5 mg/kg, 5 mg/ml Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma).

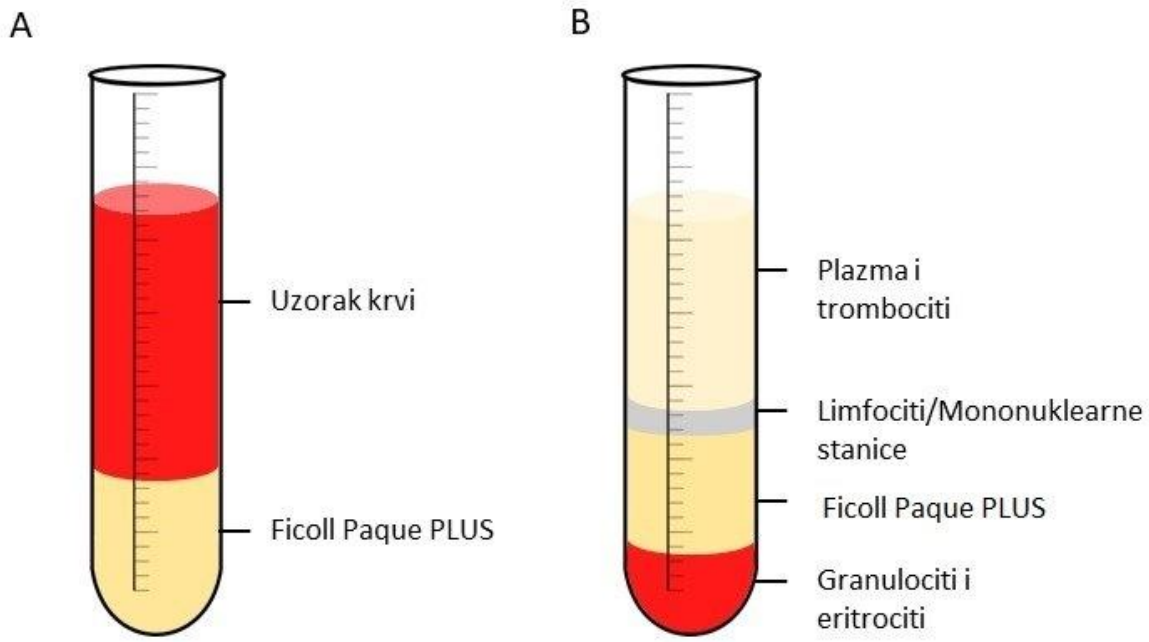
4.3. METODE

4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Periferna krv sakupljena je u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA. Mononuklearne stanice iz periferne krvi (PBMC) izolirane su na gradijentu fikola (Ficoll-Paque PREMIUM 1,084, GE Healthcare) (Slika 1.). Potom je određena koncentracija stanica pomoću Bürker-Türk komorice gdje smo koristili 50 µl suspenzije stanica i 100 µl otopine tripanskog plavila. Koncentracija je određena prema sljedećoj formuli:

Koncentracija stanica = (BROJ STANICA/4)x3*x10^4/ml

**dilucijski faktor je 3 (50 u 100 µl)*



Slika 1. Izolacija PBMCa na gradijentu fikola – slika 1 A prikazuje uzorak krvi nadslojen na fikol, dok slika 1 B prikazuje slojeve nastale odvajanjem sastavnica krvi na gradijentu fikola prilikom centrifugiranja. Sliku nacrtala Martina Mihalj, objavljeno uz dozvolu autorice.

4.3.2. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova

Nakon žrtvovanja štakorima je otvoren abdomen te su uz pažljivu preparaciju mezenterija izolirani mezenterični limfni čvorovi. Suspenzija stanica iz mezenteričnih limfnih čvorova (mLN) pripremljena je nježnom disocijacijom tkiva pritiskanjem limfnih čvorova između dvaju matiranih krajeva histoloških/predmetnih stakalaca te susljednim propuštanjem dobivene suspenzije kroz pamučnu vatu.

Tako pripremljene suspenzije stanica i PBMC bile su kultivirane u kompletnom RPMI mediju u prisutnosti forbol-12-miristat-13-acetata (PMA), ionomicina (10 mM, Abcam, UK) te Brefeldina A (10 mg/mL, Invitrogen, USA) tijekom četiri sata te potom obrađene za analizu protočnim citometrom.

4.3.3. Protočna citometrija

Protočna citometrija visokoosjetljiva je metoda koja posjeduje mogućnost istodobne analize fizičkih (veličina i zrnatost) i imunoloških parametara (biljega) pojedinačnih stanica (28). Protočni citometar uređaj je koji se sastoji od tri međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav omogućuje da sve stanice iz stanične suspenzije pojedinačno kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla, a sastoji se od pokretačke tekućine, stanične suspenzije i zračnog potiska. Optički sustav sastoji se od laserskog svjetla s lećama, filtrima i osjetnicima. Lasersko svjetlo obasjava stanice, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine ukazuje na fizičke osobine stanica- veličinu (svjetlost raspršena pod malim kutom od 0,5 – 10 °, FSC engl. *forward scatter*) i zrnatost (svjetlost raspršena pod pravim kutom – SCC engl. *side scatter*). Elektronski sustav prikuplja sve svjetlosne signale i pretvara ih u digitalne signale koji se zatim prenose u elektroničko računalo i služe za analizu (29).

Limfociti izolirani iz mLN te PBMC bili su označeni FITC anti-CD4 (klon OX35, eBioscience), PerCP-eFluor710 anti-CD3 (klon G4.18, eBioscience) te PE anti-Foxp3 protutijelima (klon FJK-16s, eBioscience) prema standardnom protokolu za bojanje površnih staničnih i nuklearnih antigena uz pomoć „Foxp3 staining“ seta pufera (eBioscience). Mrtve stanice isključene su na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (LIVE/DEAD®Fixable Near-IR stain, Termo Fisher), a dvostruke (tzv. *doublets*) stanice analizom FSS-A i FSS-H parametara. Analizirali smo 50 000 živih jednostrukih stanica

pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD) te FlowLogic programa (Inivai Technologies, Australija).

4.4. STATISTIČKE METODE

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između tri nezavisne skupine bile su testirane jednosmjernom analizom varijanci (One way ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele, Kruskal Wallis testom. Razlike između grupa su dodatno testirane Tukey post hoc testom. 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 Sigma Stat 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, SAD).

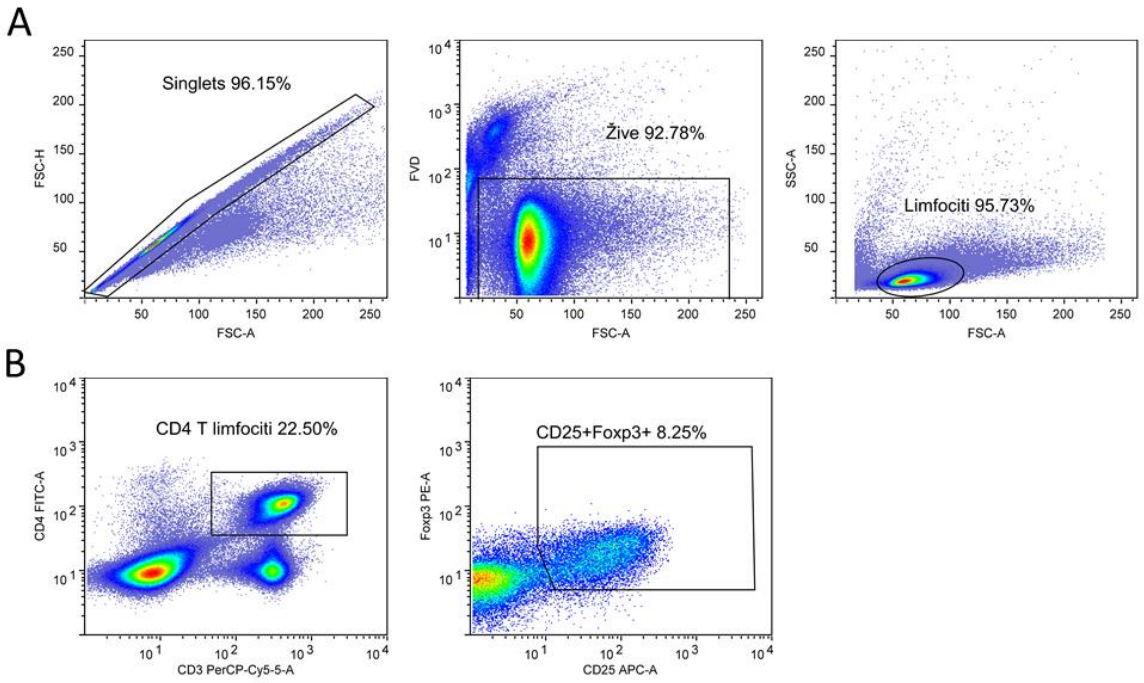
5. REZULTATI

Dijeta s povećanim udjelom soli nije značajno utjecala na srednji arterijski tlak, kao niti na tjelesnu masu životinja koje su bile uključene u pokus (Tablica 1). Prosječna aritmetička sredina tlakova svih ispitivanih životinja u pokusu iznosila je 103 mmHg sa standardnom devijacijom 4,51 mmHg.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da dijeta s visokim udjelom soli dovodi do statistički značajnih promjena u frekvencijama regulatornih ($Foxp3^+$) Treg limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Slika 2 prikazuje primjer analize kojom su u uzorku perifernih mononuklearnih stanica i suspenziji stanica izoliranih iz mezenteričnih limfnih čvorova Sprague-Dawley štakora identificirani pojedinačni, živi limfociti (Slika 2 A) te potom pomoćnički Treg limfociti ($CD3^+CD4^+$) koji su dvostruko pozitivni za IL-2R/CD25 i Foxp3 (Slika 2 B).

Tablica 1. Tjelesna masa i srednji arterijski tlak životinja koje su korištene u pokusu

	Aritmetička sredina (standardna devijacija)		
Obilježje (mjerna jedinica)	**Niskoslana dijeta**	**Visokoslana dijeta tijekom 7 dana**	**Visokoslana dijeta tijekom 14dana**
Srednji arterijski tlak (mm Hg)	103 (2,53)	108 (5,26)	99 (9,57)
Tjelesna masa (g)	408 (16,7)	362 (7,22)	409 (31,7)

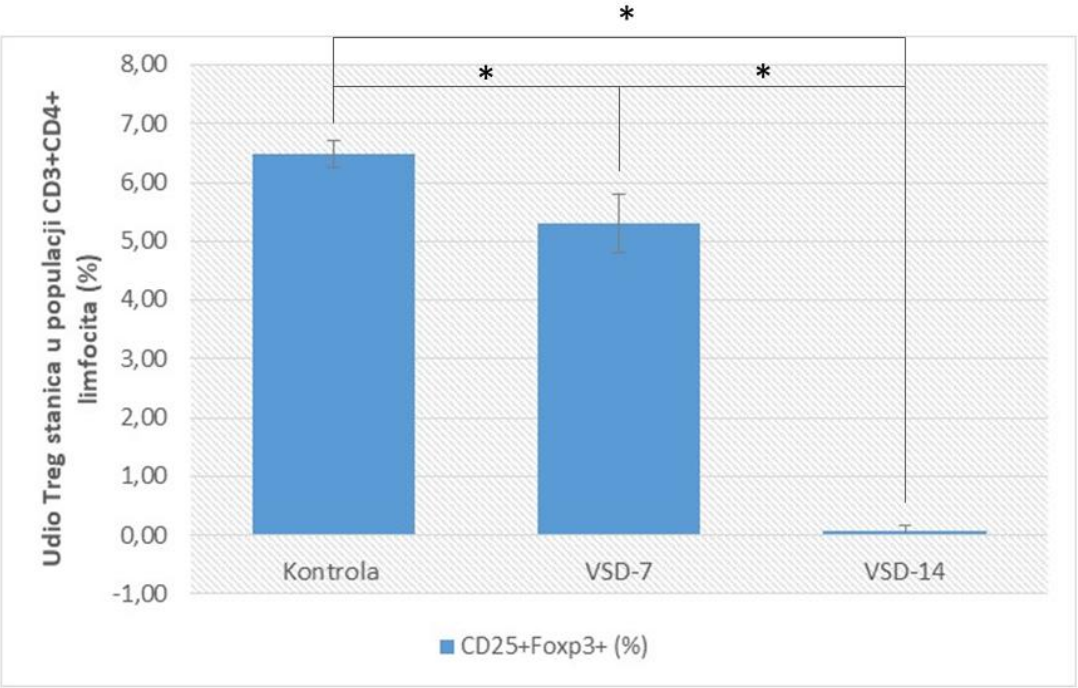


Slika 2. Reprezentativni primjer analize mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague –Dawley štakora protočnom citometrijom

Periferne mononuklearne stanice izolirane iz krvi štakora na gradijentu fikola analizirane su na protočnom citometru BD FACS Canto II. Slika 2 A prikazuje strategiju susljednog postavljanja prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica. Mrtve stanice bile su isključene na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD), dok su jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene analizom FSS-A i FSS-H parametara. Slika 2 B prikazuje strategiju analize regulatornih Foxp3$^+$ CD4 T limfocita.

Usporedba udjela regulatornih T limfocita u populaciji mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora (Slika 3.) pokazala je značajni pad udjela regulatornih (Foxp3$^+$) T limfocita nakon sedam dana visokoslane dijete u usporedbi s kontrolnom skupinom štakora na standardnoj ishrani [5,30 (0,49) % u odnosu na 6,48 (0,22) %, p < 0,001; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test]. Njihove frekvencije su nastavile padati tijekom dodatnih sedam dana dijete s visokim udjelom soli što je 14. dan protokola bilo značajno u odnosu na kontrolnu skupinu životinja [0,08 (0,08) % u odnosu na 6,48 (0,22) %; p = 0,001; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test], kao i skupinu životinja na kraćem

sedmodnevnom protokolu visokoslane ishrane [0,08 (0,08) % u odnosu na 5,30 (0,49) %; $p < 0,001$; jednosmjerna ANOVA i Tukey post hoc test].

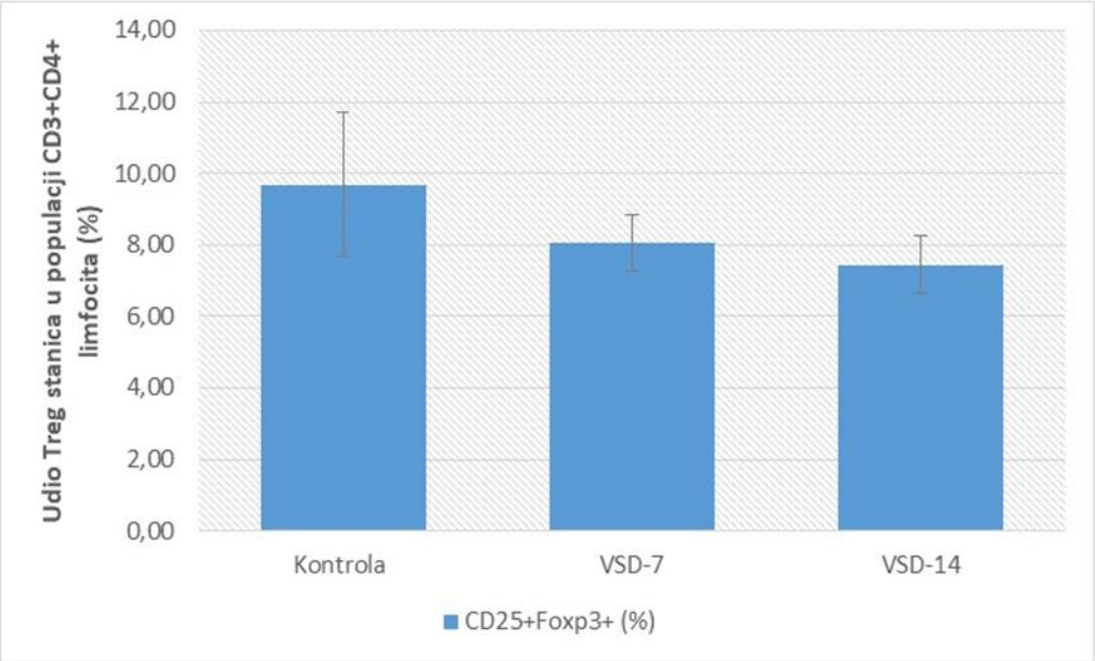


Slika 3. Udio regulatornih T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

*Slika 3 prikazuje udio regulatornih Foxp3$^+$ T limfocita u perifernoj krvi Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, p < 0,05. Kontrola – štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; VSD-7 – štakori na visokoslanoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom sedam dana; VSD-14 – štakori na visokoslanoj dijeti tijekom 14 dana.*

Nadalje, usporedba frekvencija regulatornih Foxp3$^+$ T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora (Slika 4.) pokazala je slične razlike, međutim, one nisu dosegle statističku značajnost (p = 0,234; jednosmjerna ANOVA). Prosječan udio regulatornih Foxp3$^+$ T limfocita je bio najviši u kontrolnoj skupini životinja i iznosi 9,69

(2,03) % , dok je u skupinama životinja na sedmodnevnoj i četrnaestodnevnoj dijeti s visokim udjelom soli udio Treg limfocita bio snižen [8,06 (0,79) % i 7,45 (0,82) %].



Slika 4. Udio regulatornih T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora nakon 7 i 14 dana dijete s visokim udjelom soli

*Slika 4 prikazuje udio regulatornih Foxp3$^+$ T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija te su uspoređeni jednosmjernom analizom varijanci i Tukey post hoc testom. *statistički značajna razlika, $p < 0,05$. Kontrola – štakori koji su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje; VSD-7 – štakori na visokoslanoj dijeti (hrana koja sadrži 4 % NaCl) tijekom sedam dana; VSD-14 – štakori na visokoslanoj dijeti tijekom 14 dana.*

6. RASPRAVA

Brojnim dosadašnjim istraživanjima dokazani su štetni i nepovoljni učinci povećanog unosa soli na ljudski organizam. Razumijevanje načina na koji pojedine dijetetske komponente utječu na podtipove imunoloških stanica predstavlja prekretnicu za razvoj terapija temeljenih na prehrani za učinkovito liječenje bolesti. Posljednjih godina različita izvješća ukazuju na značajan utjecaj koncentracije natrija i unosa soli na prirođene i adaptivne imunološke odgovore (26). Sol utječe na funkciju imunoloških stanica s negativnim učincima na početak i napredovanje bolesti kao što su hipertenzija, pretilost, rak, metabolički sindrom i autoimune bolesti (3). Patogeneza nekoliko ovih bolesti karakterizirana je deregulacijom ravnoteže Treg-Th17 stanica i indukcijom različitih proupalnih i antiupalnih citokina kao što su TNF-α, IL-6, IFN-γ i IL-10 (2). Brojna istraživanja su pokazala da natrijev klorid inhibira supresijsku aktivnost limfocita $Foxp3^+$ Treg (26).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da kratkotrajna dijeta s visokim udjelom soli dovodi do smanjenja frekvencije regulatornih T limfocita u perifernoj krvi i mezenteričkim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora. Slično istraživanje na ljudima 2016. godine proveli su Tao Luo i suradnici. Njihovo istraživanje uključivalo je 3 mjerenja udjela Treg i Th17 limfocita iz periferne krvi, uključujući mjerenje nakon standardne dijete, potom nakon dijete s povećanim udjelom soli (15 g dnevno) te nakon niskoslane dijete (5 g dnevno). Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da nagli prelazak s normalne prehrane na dijetu s visokim udjelom soli dovodi nakon 24 sata do smanjenja Th17 stanica i recipročnog porasta Treg stanica, odnosno smanjenog Th17/Treg omjera. Nakon sedam dana visokoslane dijete, sukladno našim istraživanjima, dolazi do značajnog porasta Th17 stanica te recipročnog smanjenja Treg stanica. Autori su zaključili da se recipročna veza između Treg i Th17 značajno mijenja s unosom visoke količine soli, što pokazuje da kratkotrajan unos soli može dovesti do neravnoteže između Treg i Th17 stanica. Utvrdili su da se broj Treg stanica povećao sa smanjenjem Th17 nakon jednog dana visokog unosa soli, što ukazuje da Treg stanice induciraju imunološku toleranciju brzo reagirajući na upalne znakove, kao potencijalni mehanizam koji podupire njihov doprinos slaboj ekspanziji Th17 stanica tijekom visokog unosa soli (30).

Slično istraživanje je ispitivalo učinak smanjenog unosa soli kod pacijenata s reumatoidnim artritisom (RA) i sistemskim eritematoznim lupusom (SLE). Zanimljivo, istraživanje je

pokazalo da smanjenje unosa soli ima imunosupresivni učinak te smanjuje aktivnost Th17 stanica koje sudjeluju u patogenezi navedenih bolesti. Također, dokazano je da redukcija unosa soli dovodi do povećanja postotka Treg stanica koje dodatno doprinose protuupalnom učinku redukcije soli u prehrani kod bolesnika oboljelih od autoimunih bolesti (24). Suprotno tome, postoje i studije u kojima je zabilježeno da zdravi pojedinci, kao i pacijenti sa SLE ili RA, pokazuju slične razine Foxp3 i CD69 Treg stanica u perifernoj krvi te nisu otkrivene značajne razlike u supresijskoj aktivnosti ovih podskupina Treg stanica kod osoba s niskim i visokim unosom kuhinjske soli. Konačno, nije uočena očita povezanost između aktivnosti bolesti i razine unosa natrija u bolesnika sa SLE ili RA (26).

Navedene studije provedene na ljudima možemo usporediti i s našim istraživanjem na animalnim modelima. Pri kratkotrajnoj niskoslanoj dijeti i kod ljudi i kod životinja dolazi do ekspanzije broja Treg limfocita, dok pri dijeti s visokim unosom soli dolazi do smanjenja broja Treg limfocita s protuupalnim učinkom što smo dokazali našim istraživanjem.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti da kratkotrajni sedmodnevni i četrnaestodnevni povećani unos kuhinjske soli dovodi do smanjenja frekvencije T regulatornih limfocita.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati učinak kratkotrajne (7 i 14 dana) dijete s povećanim unosom soli na udio regulatornih CD4 T-limfocita u perifernoj krvi i mezenteričnim limfnim čvorovima Sprague-Dawley štakora.

Nacrt studije: Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

Materijali i metode: Sprague-Dawley štakori starosti od šest do devet tjedana podijeljeni su u tri skupine (N = 6 – 9). Prva skupina životinja bila je izložena visokoslanoj dijeti tijekom sedam dana (VSD-7,4 % NaCl, Mucedola, Italija), druga skupina životinja bila je na visokoslanoj dijeti 14 dana (VSD-14), a treća skupina životinja bila je hranjena standardnom laboratorijskom hranom (KONTROLA). Prikupljene stanice iz uzoraka periferne krvi i mezenteričnih limfnih čvorova analizirane su protočnim citometrom (BD FACS Canto II).

Rezultati: Pokazano je da dijeta s visokim udjelom soli dovodi do statistički značajnih promjena u frekvencijama T regulatornih limfocita. Nakon sedmodnevne i četrnaestodnevne visokoslane dijete frekvencija Treg stanica u perifernoj krvi štakora je bila statistički značajno snižena u odnosu na udio Treg stanica u kontrolnoj skupini, dok je frekvencija Treg stanica u mezenteričnim limfnim čvorovima također bila snižena u odnosu na udio Treg stanica kontrolne skupine, ali bez statističke značajnosti.

Zaključak: Povećani unos soli dovodi do smanjenja frekvencije T regulatornih limfocita što ukazuje da visokoslana dijeta djeluje na smanjenje broja Treg stanica u Sprague-Dawley štakora.

Ključne riječi: Treg, visokoslana dijeta, natrijev klorid

9. SUMMARY

The effect of short term high salt diet on frequencies of nTreg cells in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats

Objectives: The affect of short term (7 and 14 days) high salt diet on frequencies of nTreg cells in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of Sprague-Dawley rats.

Study draft: Experimental research

Materials and methods: Sprague-Dawley rats, age 6-9 weeks diveded into three groups (N=6-9). The first group of animals was on a high-salt diet for 7 days (HSD-7,4 % NaCL, Murcedola , Italy), the second group of animals was on the same diet for 14 days(HSD-14) and the third group was fed on standard lab diet (CONTROL). Collected peripheral blood and mesentric lymph nodes sample cells were analysed by flow cytometer.

Results: It is indicated that high-salt diet leads to statistically significant changes in T regulatory lymphocytes frequencies. After 7 and 14-days high-salt diet the frequency of regulatory T cells in peripheral rat blood was statistically significantly reduced comparing to ratio of Treg cells of the control group while the frequency in mesentric lymph nodes was also reduced comparing to Treg cells ratio of the control group but with no statistical significance.

Conclusion: Excessive salt consumption leads to reduction of Treg cell frequency which indicates that high-salt diet affects Treg cell numbers in Sprague-Dawley rats.

Key words: Treg, high-salt diet, sodium chloride

10. LITERATURA

1. Nerbass FB, Calice- Silva V, Pecoits- Filho R. Sodium Intake and Blood Pressure in Patients with Chronic Kidney Disease: A Salty Relationship. Blood Purif. 2018; 45 (1-3):166-172
2. Dar HY, Singh A, Shukla P, Anupam R, Mondal RK, Mishra PK, i sur. High dietary salt intake correlates with modulated Th17-Treg cell balance resulting in enhanced bone loss and impaired bone-microarchitecure in male mice. Sci Rep. 2018; 8(1):2503
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Strateški plan za smanjenje prekomjernog unosa kuhinjske soli u Republici Hrvatskoj 2015.-2019. Dostupno na adresi: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/11/Strate%C5%A1ki-plan-za-smanjenje-prekomjernog-unosa-kuhinjske-soli-u-RH-2015.-2019.pdf. Datum pristupa: 15.5.2019.
4. Willebrand R, Kleinewitfeld M. The role of salt for immune cell function and disease. Immunology. 2018; 154(3):346-353
5. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. Clinical and Developmental Immunology. Hindawi Limited. 2012;1-12
6. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology. 1970; 18(5):723-37
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija, 8. izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2018.
8. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma. Cancer Res. 2005; 65(6):2457–2464
9. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, i sur. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med. 2004; 10(9):942–949.
10. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, i sur. Conversion of Peripheral $CD4^+CD25^-$ Naive T Cells to $CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cells by TGF-β Induction of Transcription FactorFoxp3. J Exp Med. 2003; 198(12):1875–1886.
11. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA i sur. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. Nature. 2007; 445(7129):771–775

12. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. Nat Immunol. 2006; 7(4):401–410
13. Pevec B, Pevec MR, Marković AS, Batišta I. Patofiziološki mehanizmi u nastanku i liječenju alergijskih bolesti. Acta Med Croatica. 2011; 65(2011)391-403
14. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH i sur. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. Nat Med. 2002; 8(9):1024–1032
15. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM i sur. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. Nat Med. 2002; 8(9):625–629
16. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science. 1994; 265(5176):1237-40
17. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat Immunol. 2004; 5(3):266–271
18. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonaryhyperinflammation driven by Pneumocystis carinii in immunodeficient mice. European Journal of Immunology. 2002; 1282-91
19. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. Nat Immunol. 2004; 5(6):615–22
20. Baecher-allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. J Immunol. 2002; 169(11):6210-7
21. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. Nat Immunol. 2002; 5(6):615-22
22. Chai JN, Zhou YW, Hsieh CS. T cells and intestinal commensal bacteria-ignorance, rejection, and acceptance. FEBS Lett. 2014; 588(22):4167–4175
23. Anderson CC. Placing regulatory T cells into global theories of immunity: an analysis of Cohn's challenge to integrity (Dembic). Scand J Immunol. 2009; 69(4):306-9
24. Scrivo R, Massaro L, Barbati C, Vomero M, Ceccarelli F, Spinelli FR, i sur. The role of dietary sodium intake on the modulation of T helper 17 cells and regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. PLoS One. 2017; 12(9)

25. Wu C, Chen Z, Xiao S, Thalhamer T, Madi A, Han T, i sur. SGK1 Governs the Reciprocal Development of Th17 and Regulatory T Cells. Cell Rep. 2018; 22(3):653–665
26. Noyola MV, Espinosa EL, Baranda L, Mendoza CA, Moreno PN, Urenda AM, i sur. Analysis of Sodium Chloride Intake and Treg/Th17 Lymphocytes in Healthy Individuals and Patients with Rheumatoid Arthritis or Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol Res. 2018; 2018:9627806
27. Emmel AS. Regulatory T cells in children with allergy and asthma: It is time to act. Respir Physiol Neurobiol. 2015; 209:59-63
28. Meščić G. Utjecaj kratkotrajno visokog prehrambenog unosa kuhinjske soli na dinamiku subpopulacija leukocita u krvi štakora. Diplomski rad. Medicinski fakultet Osijek. 2017.
29. Delić H. Izražaj biljega CD15s na leukocitima štakora i biljega CD77 na štakorskom bubregu pod hiperbaričnim uvjetima. Diplomski rad. Medicinski fakultet Split. 2015.
30. Luo T, Ji W, Yuan F, Guo Z, Li Y, Dong Y, i sur. Th17/Treg Imbalance Induced by Dietary Salt Variation Indicates Inflammation of Target Organs in Humans. Sci Rep. 2016; 6:26767

11. ŽIVOTOPIS

Martina Blažević

Datum i mjesto rođenja: 1. lipnja 1995., Vitez, Bosna i Hercegovina

Adresa: Jardol 41, 72250 Vitez, BiH

E- adresa: martinablazevich@gmail.com

Obrazovanje:

2010. – 2014.: Opća gimnazija Vitez

2014. – 2017.: Zdravstveno veleučilište Zagreb – preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

2017. – 2019.: Medicinski fakultet Osijek – diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike