Utjecaj visokoslane dijete na distribuciju i aktivaciju leukocita Sprague-Dawley štakorica

Jukić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:210948

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Nikolina Jukić

UTJECAJ VISOKOSLANE DIJETE NA DISTRIBUCIJU I AKTIVACIJU LEUKOCITA SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORICA

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Nikolina Jukić

UTJECAJ VISOKOSLANE DIJETE NA DISTRIBUCIJU I AKTIVACIJU LEUKOCITA SPRAGUE-DAWLEY ŠTAKORICA

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.
Mentor rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević
Neposredni voditelj rada: mag. prot. nat. et amb. Nikolina Bilić Dujmušić
Rad ima 25 stranica, 3 tablice i 5 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ines Drenjančević na dostupnosti, informacijama i stručnoj pomoći koje su uvelike pomogle u izvršavanju ovog diplomskog rada.

Također, zahvalila bih magistrici Nikolini Bilić – Dujmušić koja mi je pomogla u skupljanju i obradi podataka te doc. dr. sc. Martini Mihalj za pomoć pri statističkoj obradi podataka.

Osim toga, zahvaljujem svojim prijateljima i obitelji na strpljenju i potpori koju su iskazali tijekom šestogodišnjeg studiranja, a posebice za vrijeme ispita i pisanja diplomskog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. UTJECAJ POVEĆANOG UNOSA SOLI NA NASTANAK KARDIOVASKULARNIH BOLESTI 1

1.2. ENDOTEL I ENDOTELNA FUNKCIJA 1

1.3. ENDOTELNA DISFUNKCIJA 2

1.3.1. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U ENDOTELNOJ DISFUNKCIJI 2

1.4. UPALA KAO PROMOTOR RANIH STADIJA ATEROSKLEROZE 3

1.4.1. SIGNALNE MOLEKULE KOJE SUDJELUJU U NASTANKU ATEROSKLEROTSKE LEZIJE 4

1.4.2 LEUKOCITNA MIGRACIJA I ADHEZIJA 4

1.4.2.1 STANIČNE ADHEZIVNE MOLEKULE - CAM 5

1.4.2.2 INTEGRINI 6

1.4.3 IMUNOLOŠKE STANICE U UPALNOM ODGOVORU 6

2. HIPOTEZA 7

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 8

4. MATERIJALI I METODE 9

4.1. USTROJ STUDIJE 9

4.2. MATERIJALI 9

4.3. PROTOČNA CITOMETRIJA 9

4.4. STATISTIČKE METODE 10

5. REZULTATI 11

6. RASPRAVA 16

7. ZALJUČAK 19

8. SAŽETAK 20

9. SUMMARY 21

10. LITERATURA 22

11. ŽIVOTOPIS 25

KRATICE

NO – dušikov oksid

Dahl SS štakori – Dahl Salt Sensitive štakori

VSD – visokoslana dijeta

NSD – niskoslana dijeta

ROS – reactive oxygen species / reaktivni kisikovi radikali

KVB – kardiovaskularne bolesti

eNOS – endotelna sintetaza NO

NF-kB – nuklearni faktor kappaB

MCP-1 –monocitni kemotaksijski protein1

CD40L – CD40 ligand

CD – klaster diferencijacije

VCAM-1 – vaskularna stanična adhezijska molekula 1

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula1

LFA – leukocitni funkcijski antigen

LAD – deficijencija leukocitne adhezije

VLA-4 - $\alpha_4\beta_1$integrin

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteron sustav

AS – aritmetička sredina

IL – interleukin

Tablica 1. Izražaj CD49d i CD11b na CD4 i CD8 T limfocitima iz periferne krvi Sprague-Dawley štakorica na VSD i NSD. Podatci su pikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. 11
Tablica 2. Izražaj CD49d i Cd11b integrina na granulocitima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. 15
Tablica 3. Izražaj CD49d i CD 11b integrina na monocitima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. 15

Slika 1. Kotrljanje i migracija leukocita do mjesta upale. 5
Slika 2. Izražaj CD49d i CD11b integrina na CD4 i CD8 T limfocitima. 12
Slika 3. Izražaj CD49d i CD11b integrina na površini CD8 limfocita izoliranih iz štakorica na VSD (B) odnosno NSD (C) dijeti.....13
Slika 4. Izražaj CD49d i CD11b integrina na monocitima.....14
Slika 5. Izražaj CD49d i CD11b integrina na granulocitima.....14

1. UVOD

1.1. UTJECAJ POVEĆANOG UNOSA SOLI NA NASTANAK KARDIOVASKULARNIH BOLESTI

Unos soli važan je za održavanje volumena i osmolalnosti plazme te održavanje različitih tjelesnih funkcija (1). Procijenjeno je da je dnevni unos soli prosječne odrasle osobe u Republici Hrvatskoj 8-12 g/dan, što daleko prelazi vrijednosti od preporučenih 5 g/dan prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije. Povećani unos soli izravno je povezan s nastankom kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti koje su vodeći uzrok smrti u svijetu (2, 3). Studije su pokazale da i male redukcije unosa soli, oko 2-2.6 g, smanjuju rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KVB) za 30% (3). Patofiziološki mehanizam nastanka KVB (ateroskleroze, ishemijske bolesti srca) uključuje interakciju upalnih i koagulacijskih procesa. Glavni su regulatori ovih procesa endotelne stanice koje u uvjetima homeostaze djeluju antikoagulacijski i protuupalno (4). Zapaženo je da visoki unos soli hranom izravno negativno utječe na endotelnu funkciju. Dovodi do lučenja prokoagulacijskih i proupalnih medijatora te povećane adhezivnosti leukocita (3, 4).

1.2. ENDOTEL I ENDOTELNA FUNKCIJA

Važan čimbenik u održavanju vaskularnog tonusa jest endotel. Endotelna funkcija odražava se kao sposobnost endotela u otpuštanju različitih vazoaktivnih tvari u svrhu održavanja vaskularnog protoka. U odgovoru na vaskularne promjene protoka, endotel djeluje vazodilatacijom ili vazokonstrikcijom. Jedan od važnih medijatora relaksacije krvne žile jest dušikov oksid (NO). Dušikov oksid otpušta se iz endotelnih stanica kao odgovor na žilni stres i različite spojeve (acetilkolin, bradikinin). Djeluje vazodilatacijski te sprječava adheziju i agregaciju trombocita, adheziju i migraciju leukocita, a osim toga inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (5, 6). Nekoliko istraživanja pokazalo je kako prekomjerni unos soli negativno utječe na endotel promovirajući endotelnu disfunkciju. Čak i kratkotrajna izloženost visokim razinama natrija u normotenzivnoj populaciji dramatično smanjuje vazodilatacijski odgovor krvožilja na acetilkolin (3). Na pojačanu sintezu i oslobađanje NO utječe i angiotenzin II, što štiti endotel od pretjerane vazokonstrikcije (REF).

Osim čimbenika koji djeluju vazodilatacijski, iz endotelnih stanica oslobađaju se i vazokonstrikcijske tvari kao što su endotelin te tromboksan.
Oslobađa se iz svih endotelnih stanica, a posebice iz oštećenih te dovodi do snažne vazokonstrikcije (7). Hipertenzija, dijabetes, pušenje, pretilost, fizička neaktivnost povezani su s razvojem ateroskleroze i ishemijske bolesti srca. Kronična izloženost navedenim čimbenicima rizika ima štetni učinak na cirkulaciju prevladavajući obrambene mehanizme vaskularnog endotela, čime ugrožava njegov integritet i inicira endotelnu disfunkciju (8).

1.3. ENDOTELNA DISFUNKCIJA

Endotelnom disfunkcijom opisujemo oštećenje endotela i njegovu poremećenu funkciju koja nastaje djelovanjem različitih štetnih čimbenika. U uvjetima kronične hipertenzije ili ateroskleroze, smanjena sinteza NO može dovesti do pretjerane vazokonstrikcije te pogoršanja hipertenzije i oštećenja endotelnih stanica (7). Dakle, oštećenje endotelne funkcije najčešće se očituje smanjenom bioraspoloživošću NO, a dominacijom vazokonstriktora (5). Smanjenje bioraspoloživosti NO može biti uzrokovano smanjenom ekspresijom eNOS i nedostatkom njezinih supstrata i kofaktora, poremećajem u staničnoj signalizaciji i pojačanom degradacijom NO (9). Istraživanje na Dahl SS štakorima na visokoslanoj dijeti (VSD) pokazalo je kako oksidativni stres smanjuje bioraspoloživost NO zbog povećane proizvodnje kisikovih radikala, a pri tome su izloženi kronično niskim koncentracijama angiotenzina II. Kronično niske koncentracije angiotenzina II tijekom VSD (ili paradoksalno, niskoslane dijete kod Dahl SS štakora) utječu na aktivnost antioksidativnih mehanizama i dovode do nastanka oksidativnog stresa smanjenjem aktivnosti enzima kao što je superoksid dismutaza (10, 11).

1.3.1. ULOGA OKSIDATIVNOG STRESA U ENDOTELNOJ DISFUNKCIJI

Veliki broj studija pokazuje kako je oksidativni stres uključen u patogenezu različitih KVB - hiperkolesterolemiju, aterosklerozu, hipertenziju, dijabetes (9). Oksidativni stres stanje je u kojem dolazi do neravnoteže stvaranja reaktivnih kisikovih radikala i antioksidativnih mehanizama. Antioksidativni sustav uključuje enzime: superoksid dismutazu, katalazu, glutation peroksidazu i glutation reduktazu. Ovi enzimi održavaju ROS u niskim koncentracijama koji tada djeluju kao stanične signalne molekule sudjelujući u procesu rasta, adhezije i diferencijacije stanica. Stvaraju se na mjestima upale i ozljede. U visokim

koncentracijama mogu dovesti do oštećenja stanice (12). Postoje različiti enzimski i neenzimski sustavi koji sudjeluju u procesu stvaranja ROS-a. Enzim NADH/NADPH oksidaza nalazi se na staničnoj membrani polimorfonuklearnih stanica, makrofaga te endotelnih stanica (13). Nekoliko studija pokazalo je kritičnu ulogu enzima NADH/NADPH oksidaze u hipertenziji induciranoj angiotenzinom II na kulturi glatkih mišićnih stanica štakora. Uočeno je da angiotenzin II povećava aktivnost NADH/NADPH oksidaze te tako dovodi do akumulacije ROS-a (9). U stanju velikih metaboličkih zahtjeva (npr. ozljeda), mitohondriji predstavljaju veliki izvor ROS-a, što može biti jedan od uzroka endotelne disfunkcije (13). U fiziološkim uvjetima, endotel regulira upalu krvožilnog sustava kroz proizvodnju NO, uključujući i ekspresiju i adheziju molekula i leukocita. Čini se da endotelna disfunkcija promovira upalu krvožilnog sustava, ali i upala promovira endotelnu disfunkciju te tako predstavlja čimbenik rizika za KVB. Postoji uzročno-posljedična veza između upale i oksidativnog stresa (8). Visoke razine ROS-a potiču aktivaciju nuklearnog faktora kappaB (NF-kB), što dovodi do proupalnog odgovora karakteriziranog povišenjem razina TNF-α, IL-1 i IL-8 (3, 13, 14). Visoke razine TNF-α nalazimo u različitim KVB. Pokazalo se da visoke razine TNF-α promoviraju nastanak ROS-a djelujući na NADPH oksidazu i ksantinoksidazu te smanjenje ekspresije i povećanje degradacije eNOS (8, 13).

1.4. UPALA KAO PROMOTOR RANIH STADIJA ATEROSKLEROZE

U nastanku ranih aterosklerotskih lezija važnu ulogu ima upala. Dolazi do regrutacije monocita i T-limfocita te ekspresije specifičnih molekula na endotelnim stanicama koje posreduju leukocitnoj adheziji. Nakon adhezije, leukociti prolaze kroz endotel i migriraju u intimu, što je posredovano kemotaksijskim faktorima kao što je MCP-1. Faktor MCP-1 pripada obitelji citokina važnih za regrutaciju monocita na mjesto upale. Navedena kaskada događaja inicira nastanak rane aterosklerotske lezije i stvaranje upalnih citokina čime se promovira upalni proces (Slika 1.) (15). U intimi se monociti pretvaraju u makrofage i izražavaju receptore bitne za unos lipida i pretvorbu makrofaga u pjenušave stanice (8, 15). Ovaj događaj praćen je migracijom glatkih mišićnih stanica u nastali plak. O ravnoteži pro- ili antiinflamatorne aktivnosti, ovisit će daljnja progresija aterosklerotske lezije (15, 16).

U eksperimentalnim studijama na miševima uočeno je da blaga dehidracija, koja uzrokuje mala povećanja ekstracelularnih razina natrija (unutar fiziološkog raspona), aktivira upalne

signalne puteve, povećava adhezivnu sposobnost endotela i dovodi do vaskularnih promjena koje potiču aterosklerotske promjene i zadebljanje endotela u koronarnim arterijama (4).

1.4.1. SIGNALNE MOLEKULE KOJE SUDJELUJU U NASTANKU ATEROSKLEROTSKE LEZIJE

U upalnom procesu sudjeluje velik broj različitih molekula kao što su citokini, adhezijske molekule, CD40/CD40 ligand, metaloproteinaze i dr. Citokini su skupina molekula koja uključuje limfokine, interleukine (IL-1, IL-2, IL-10…), faktor tumorske nekroze TNF-α, kemokine, kao što je MCP-1 te interferone (IFN-γ). Neki od njih djeluju antiinflamatorno, kao što je IL-10 te tako inhibiraju razvitak ateroskleroze, dok drugi promoviraju taj upalni proces. Primjerice, TNF–α potiče stvaranje adhezivnih molekula na endotelu, kao što je ICAM-1 te tako pomaže u leukocitnoj adheziji, odnosno proinflamatorno (15).

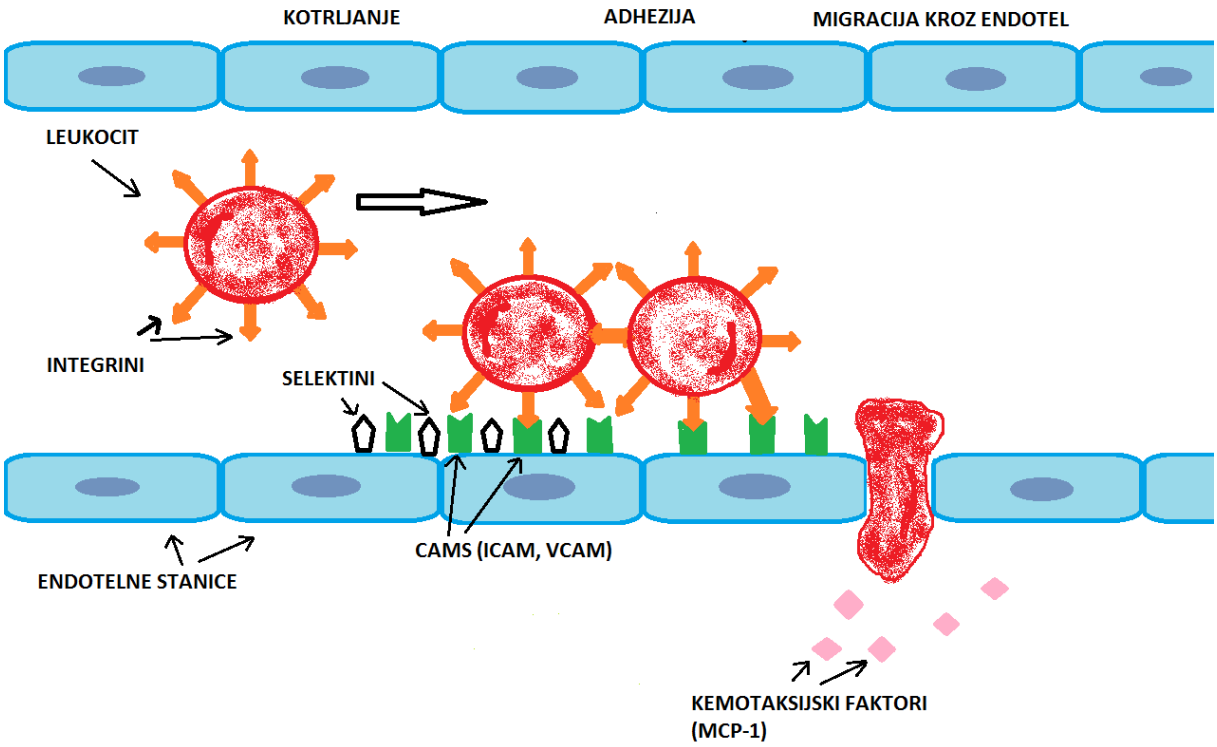
Osim toga citokini potiču endotelne stanice i makrofage na ekspresiju adhezivnih molekula kao što su E-selektin, VCAM-1 i ICAM-1 (8, 13). Na poticaj IL-1 i TNF-α endotelne stanice izražavaju E- i P-selektin koji potpomažu kotrljanju („rolling“) i sidrenju leukocita za endotel te tako sudjeluju u ranim stadijima aterogeneze (Slika 1.). Obitelj selektina čini E-selektin, P-selektin i L-selektin. E-selektin i P-selektin izražavaju endotelne stanice, dok je L-selektin izražen samo na leukocitima (17). Povišene razine E-selektina, zajedno s povišenim razinama ICAM-1, pronađene su u pacijenata s ishemijskom bolesti srca i koronarnom aterosklerozom, za razliku od kontrolne skupine.

CD40L stanična je površinska molekula koju izražavaju aktivirani T-limfociti i trombociti tijekom stvaranja tromba. Nakon što je izražen, CD40L povećava stvaranje IL-8 i MCP-1, važne kemotaksijske faktore neutrofila i monocita. Potiče i stvaranje E-selektina, ICAM-1 i VCAM-1, medijatore potrebne u adheziji neutrofila, monocita i limfocita za endotel. Također, tijekom procesa ekstravazacije leukocita, luče se metaloproteinaze koje potiču strukturne promjene i napredovanje aterosklerotske lezije (15, 16).

1.4.2 LEUKOCITNA MIGRACIJA I ADHEZIJA

Migracija i adhezija leukocita za endotel nužna je za učinkoviti upalni i imunološki odgovor. Kod kroničnih upalnih bolesti kao što je ateroskleroza, dolazi do aktivacije endotelnih stanica

i lučenja kemokina koji pomažu migraciji, a u koju su uključene stanične adhezivne molekule – CAM (18).



Slika 1. Kotrljanje i migracija leukocita do mjesta upale. (vlastiti crtež)

1.4.2.1 STANIČNE ADHEZIVNE MOLEKULE - CAM

CAM pripadaju imunoglobulinskoj superobitelji koja se sastoji od staničnih površinskih proteina za prepoznavanje antigena (C1-tip), za vezanje komplementa ili staničnu adheziju (C2-tip). Nekoliko ih je uključeno u leukocitnu adheziju, a izražavaju ih endotelne stanice: međustanična adhezijska molekula (ICAM-1, ICAM-2), vaskularna stanična adhezijska molekula (VCAM-1), trombocit-endotel, adhezijska molekula (PECAM-1) i mukozni adresini (MadCAM-1). ICAM-1 je eksprimirana na leukocitima, fibroblastima, epitelnim i endotelnim stanicama te sadrži vezno mjesto za leukocitni integrin, što je bitno prilikom adhezije za endotel. MadCAM-1 ima sposobnost vezanja $\alpha_4\beta_7$ integrina i L-selektina. PECAM-1 se nalazi na endotelnim stanicama, trombocitima i leukocitima, pretežito monocitima i neutrofilima te sudjeluje u leukocitnoj migraciji.

1.4.2.2 INTEGRINI

Integrini su transmembranski proteini koji se sastoje od nekovalentno vezanih α i β lanaca, a posreduju u prijenosu signala (17). Za ekstravazaciju leukocita do mjesta upale važna je aktivacija β1 i β2 integrina, odnosno $\alpha_4\beta_1$ integrina i LFA-1 koji posreduju u leukocitnoj adheziji te transendotelnoj migraciji. Važnost integrina uočena je u dvjema nasljednim bolestima s mutacijom gena za integrine, deficijenciji leukocitne adhezije 1 i Glanzmannovoj trombasteniji. U LAD-u, mutacija β_2 podjedinice rezultira povećanim brojem cirkulirajućih neutrofila zbog nedostatne funkcije β_2 podjedinice. Stoga ne dolazi do adhezije i migracije leukocita pa nema adekvatnog odgovora na upalni proces. U Glanzmannovoj trombasteniji, zbog mutacije α ili β podjedinice integrina na trombocitima, ne dolazi do agregacije trombocita i primjerene hemostaze (19).

Također, studija provedena na apolipoprotein E deficijentnim miševima, na dijeti bogatoj mastima tijekom 12 tjedana, pokazala je povećanu ekspresiju $\alpha_4\beta_7$ integrina i njegovih liganada VCAM-1 i MadCAM-1 u aterosklerotskom plaku. Osim toga, uočeno je povećanje ekspresije $\alpha_4\beta_7$ integrina na limfocitima periferne krvi proporcionalno povećanju aterosklerotskog plaka, što govori o njegovoj ulozi u progresiji ateroskleroze (18).

1.4.3 IMUNOLOŠKE STANICE U UPALNOM ODGOVORU

Imunološki sustav ima važnu ulogu u upalnom odgovoru, a istraživanja ukazuju na ulogu različitih populacija i subpopulacija imunoloških stanica u remodeliranju krvnih žila. U KVB-ima dolazi do pojačane ekspresije adhezivnih molekula i njihovih liganada, citokina, leukocitne ekstravazacije, aktivacije imunoloških stanica te oksidativnog stresa (20). U dosadašnjim istraživanjima pokazalo se da konzumacija visokoslane dijete dovodi do promjene leukocitne aktivacije i raspodjele leukocita kod štakora, što može biti rani, neovisni čimbenik rizika ateroskleroze (21).

2. HIPOTEZA

Visokoslana dijeta aktivira leukocite, što je mjerljivo određivanjem specifičnih staničnih adhezivnih molekula na njihovoj površini.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja jest utvrditi utjecaj visokoslane dijete na raspodjelu leukocitnih subpopulacija (granulocita, monocita i limfocita) u krvi. Dodatni cilj je utvrditi utjecaj visokoslane dijete na dinamiku leukocitne aktivacije utvrđivanjem izražaja liganada na leukocitima, komplementarnih aktivacijskim biljezima na endotelnim stanicama kod zdravih štakorica.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Eksperimentalna studija na animalnom modelu.
Istraživanje je provedeno sukladno propisanim etičkim standardima za istraživanja na životinjama: načelo zamjene, smanjenja i poboljšanja (3R; Reduce, Refine, Replace), Zakonu o zaštiti životinja (NN 135/06 i 37/13), te Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13 i 39/17).
Istraživanje je provedeno u Osijeku u sklopu _HRZZ projekta #IP-2014-09-6380 pod nazivom V-ELI Athero (Poremećena vazorelaksacija i endotelno-leukocitna interakcija (ELI) u razvoju aterosklerotskih lezija).
Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.2. MATERIJALI

U istraživanju su se koristile zdrave Sprague-Dawley štakorice starosti 10-11 tjedana (N = 17 po grupi). U toj su dobi podijeljene u dvije skupine te su uvedene u sedmodnevni dijetni protokol.
Prva kontrolna skupina bila je na standardnoj prehrani s niskim udjelom soli uz običnu pitku vodu kroz 7 dana.
Druga skupina štakorica bila je na prehrani s visokim udjelom soli (4% NaCl u hrani) uz običnu pitku vodu kroz 7 dana.

4.3. PROTOČNA CITOMETRIJA

Nakon sedmodnevne dijete, štakorice su anestezirane kombinacijom ketamina (75 mg/kg) i midazolama (2.5 mg/kg). Nakon toga štakorice su dekapitirane. Zatim su prikupljeni uzorci periferne krvi u epruvete s EDTA antikoagulansom i spremljeni na led kako bi se sačuvao što veći broj stanica. Prije bojenja protutijelima, stanice su inkubirane Fc blokom (BD

Bioscience), a zatim su bez ispiranja inkubirane s mješavinom protutijela za tri različita panela tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Tri različita panela korištena su za aktivaciju subpopulacija leukocita i izražaj biljega adhezijskih molekula.

Prvi panel sastoji se od: CD3 PerCP-eFluor® 710 (klon: eBioG4.18, eBioscience), CD11b/c PE (klon: OX42, eBioscience), CD49d APC (klon: MRa4-1, eBioscience), MHC II FITC (klon: HIS19, eBioscience), CD43 biotin (klon: W3/13, BioLegend). Drugi panel sastoji se od: CD11b/c PE (klon: OX42, eBioscience), CD49d APC (klon: MRa4-1, eBioscience), granulocitni marker FITC (klon: HIS48, eBioscience), a treći panel od: CD3 PerCP-eFluor® 710 (klon: eBioG4.18, eBioscience), CD4 FITC (klon: SK3, eBioscience), CD11a PE (klon: WT.1, eBioscience), CD49d APC (klon: MRa4-1, eBioscience), CD8 PE-Cy7 (klon: OX8, eBioscience).

Eritrociti su lizirani BD LysingSolution 10 minuta/37°C i isprani dva puta tijekom pet minuta na 400g/18°C. Dodano je biotinilirano protutijelo označeno streptavidinom APC Cy7 tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim se ispralo. Nakon posljednjeg pranja, stanice su fiksirane 1% formaldehidom. Najmanje 10000 stanica prikupilo se pomoću BD FACS Canto II Cytometer (FACS Canto II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i analizirano koristeći FlowLogic software (Inivai Technologies, Menton, Australia).

4.4. STATISTIČKE METODE

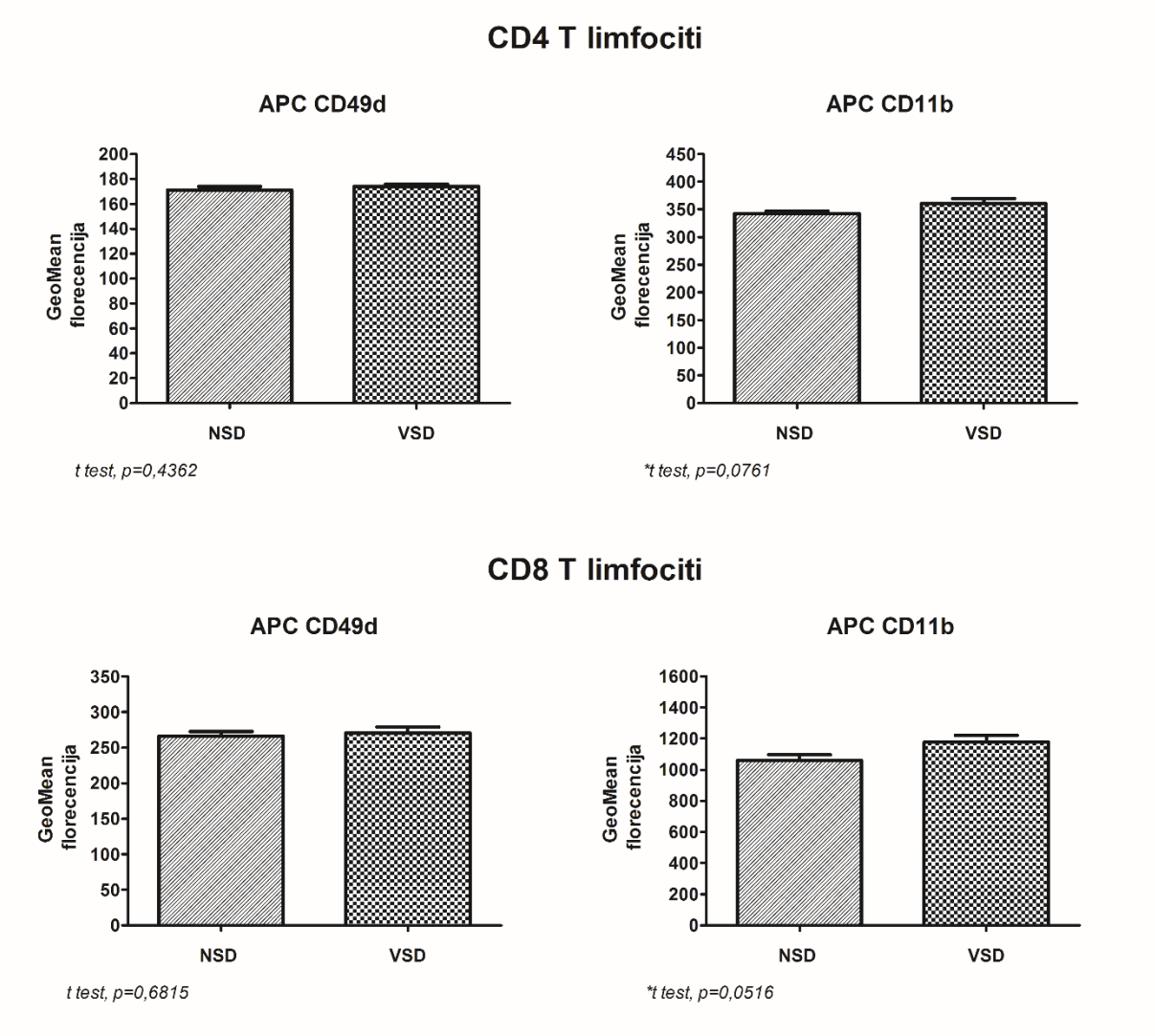
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije podataka određena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom. Podaci prije i nakon dijetnog protokola uspoređivani su paired t-testom u slučaju normalne distribucije, a Wilcoxon rank-sum testom ukoliko podaci nisu normalno distribuirani. Kao prag statističke značajnosti uzima se $p<0.05$. Veličina uzorka određena je prema prijašnjim studijama provedenim na Katedri za fiziologiju i imunologiju te u skladu s poštednim principima rada s pokusnim laboratorijskim životinjama 3R. Za analizu je korišten SigmaPlot, v11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD).

5. REZULTATI

U istraživanju su se koristile zdrave Sprague-Dawley štakorice. Kako bi ispitali raspodjelu leukocitnih subpopulacija, štakorice su podijeljene u dvije skupine. Prva kontrolna skupina bila je na standardnoj prehrani, a druga skupina bila je na visokoslanoj dijeti (4% NaCl u hrani) kroz 7 dana. Nakon toga uzeti su uzorci periferne krvi, a stanice su prikupljene metodom protočne citometrije. Raspodjela leukocitnih subpopulacija - granulocita, monocita, limfocita T i B u perifernoj krvi, analizirana je u obje skupine. Nakon dijetnog protokola, podatci su uspoređivani paired t-testom. Za statističku analizu korišten je SigmaPlot, v11.2.
Rezultati dobiveni protočnom citometrijom za CD4 i CD8 T limfocite prikazani su u Tablici 1. Statističkom analizom nije uočena značajna razlika u učestalosti CD49d i CD11b integrina među populacijama CD4 ($p = 0, 4362$ i $p = 0,0761$) i CD8 T limfocita ($p = 0,6815$ i $p = 0,0516$) kod štakorica na NSD i VSD kako je prikazano na Slici 2. VSD nije značajnije mijenjala raspodjelu T limfocita ($p > 0,05$) (Slika 2., Tablica 1.).

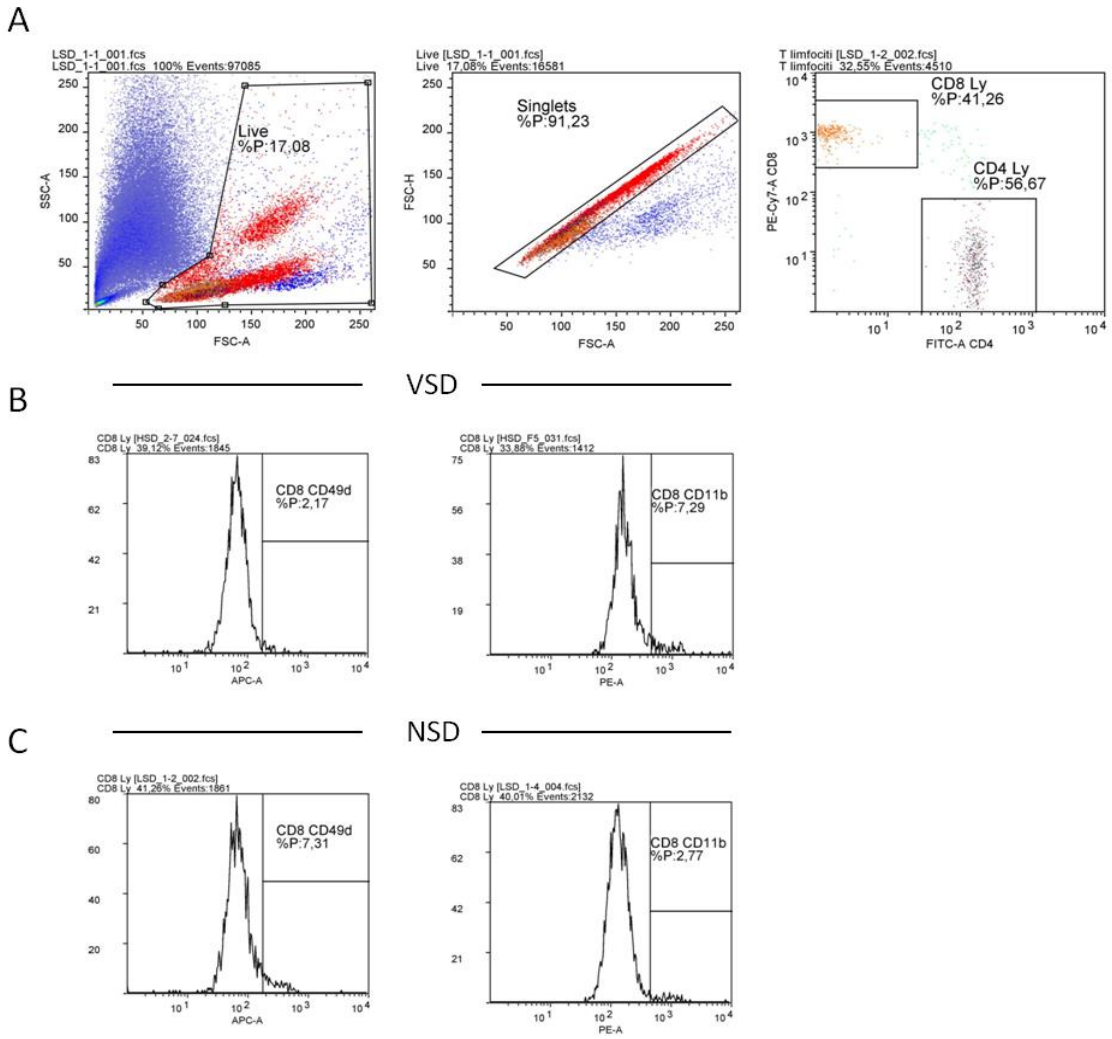
Tablica 1. Izražaj CD49d i CD11b na CD4 i CD8 T limfocitima iz periferne krvi Sprague-Dawley štakorica na VSD i NSD. Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

Dijetni protokol	T limfociti	CD biljeg	Aritmetička sredina	Standardna devijacija
NSD	CD4	CD49d	171,27	11,04
	CD4	CD11b	342,37	18,31
	CD8	CD49d	266,06	25,52
	CD8	CD11b	1058,94	152,69
VSD	CD4	CD49d	173,89	8,06
	CD4	CD11b	360,71	36,98
	CD8	CD49d	270,37	34,52
	CD8	CD11b	1176,35	184,46



Slika 2. Izražaj CD49d i CD11b integrina na CD4 i CD8 T limfocitima.

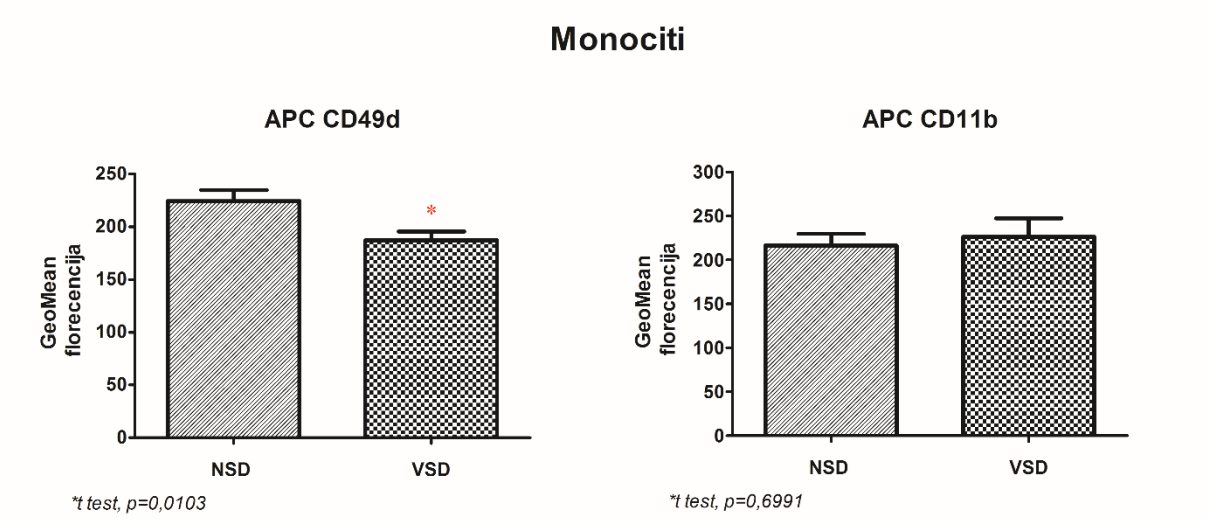
APC = alofikocijanin; fluorokrom (fluorescentna boja) za označavanje CD



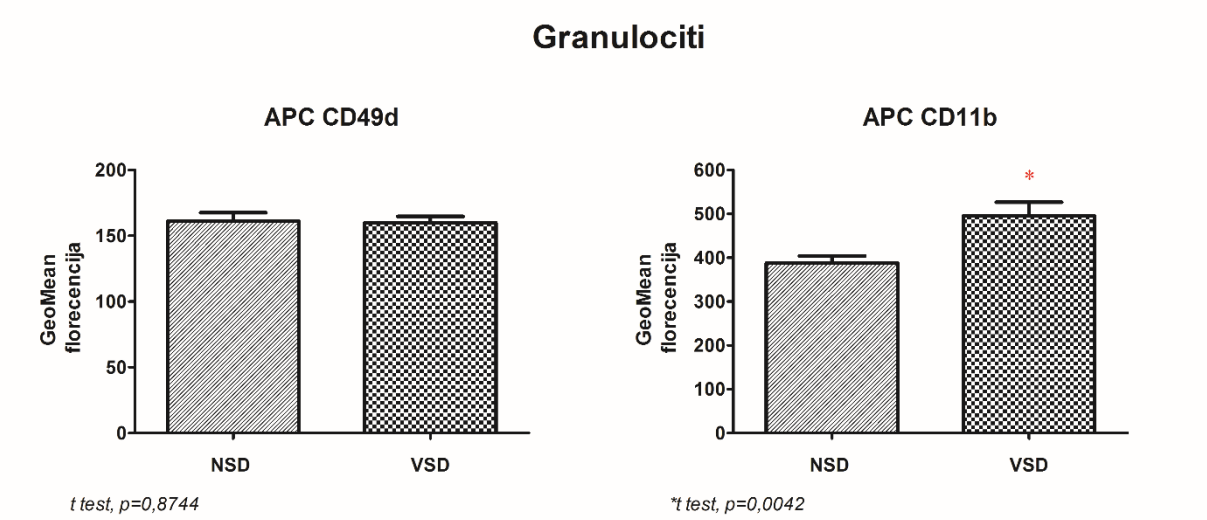
Slika 3. Izražaj CD49d i CD11b integrina na površini CD8 limfocita izoliranih iz štakorica na VSD (B) odnosno NSD (C) dijeti.

Na Slici 3. prikazani su rezultati dobiveni metodom protočne citometrije, analizirani u FlowLogic programu. Slika 3A prikazuje točkasti graf, a napravljen je u programu FlowLogic software. Prikazana je shema postavljanja ograde („gate“), odnosno susljedne definicije populacija. Za definiciju staničnih populacija koristila se veličina (FSC; „forward scatter“) i zrnatost (SSC; „side scatter“) stanica, a ograda je postavljena oko ciljnih stanica (CD8 T limfociti) iz kojih je analiziran izražaj CD biljega. Slika 3B i Slika 3C prikazuju reprezentativne histograme ekspresije CD49d (VLA-4) i CD11b (LFA-1) integrina na površini CD8 limfocita izoliranih iz štakora na VSD (B) odnosno NSD (C) dijeti.

Visok unos soli doveo je do porasta broja granulocita s izražajem CD11b kod štakorica na VSD. Izražaj CD11b značajno je promijenjen, za razliku od ostalih leukocitnih populacija ($p = 0,042$), dok se izražaj CD49d nije značajnije promijenio unosom soli ($p = 0,8744$). (Slika 5.)



Slika 4. Izražaj CD49d i CD11b integrina na monocitima.



Slika 5. Izražaj CD49d i CD11b integrina na granulocitima.

S obzirom na ostale leukocitne populacije periferne krvi, izražaj CD49d integrina na monocitima značajnije je promijenjen kod štakorica na VSD ($p = 0,0103$), što je prikazano na Slici 4. Povećan unos soli utjecao je na smanjenje populacije monocita s izraženim CD49d, ali nije značajnije utjecao na izražaj CD11b na monocitima ($p = 0,6991$) (Slika 4.).

Podatci dobiveni protočnom citometrijom za granulocite i monocite prikazani su u Tablici 2. i Tablici 3.

Tablica 2. Izražaj CD49d i Cd11b integrina na granulocitima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

Granulociti	CD biljeg	Aritmetička sredina	Standardna devijacija
NSD	CD49d	16,95	27,00
	CD11b	387,94	65,07
VSD	CD49d	159,65	20,29
	CD11b	495,50*	128,42

*****p < 0,05 za štakorice na VSD u odnosu na štakorice na NSD

Tablica 3. Izražaj CD49d i CD 11b integrina na monocitima. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija.

Monociti	CD biljeg	Aritmetička sredina	Standardna devijacija
NSD	CD49d	224,21	43,94
	CD11b	216,35	55,27
VSD	CD49d	187,32*	34,32
	CD11b	226,17	87,86

*p < 0,05 za štakorice na VSD u odnosu na štakorice na NSD

6. RASPRAVA

Brza regulacija adhezijskih interakcija među krvnim stanicama te između krvnih stanica i endotela bitna je za održavanje vaskularnog integriteta i obrane od patogena (24). Zdrav, neoštećen endotel selektivno je propusna barijera i ne dopušta aktivaciju i migraciju leukocita niti agregaciju i adheziju trombocita. Ipak, izloženost rizičnim čimbenicima kao što je visok unos soli hranom, mogu dovesti do endotelne disfunkcije i poremećene homeostaze.

Endotelna disfunkcija usko je vezana uz smanjenu bioraspoloživost NO, odnosno neravnotežu između vazokonstrikcijskih i vazodilatacijskih faktora, što dovodi do patofizioloških promjena. Dolazi do redukcije antioksidativnih, antiinflamatornih i antitrombotskih svojstava endotela (zbog smanjene bioraspoloživosti NO), povećane propusnosti endotela, porasta proinflamatornih citokina, ekspresije adhezijskih molekula VCAM i ICAM, što pridonosi leukocitnoj adheziji i nastanku aterosklerotskih promjena (8, 13, 26). Istraživanje provedeno na zdravim Sprague-Dawley štakoricama, koje su bile na visokoslanoj dijeti, pokazalo je da tjedan dana visokog unosa soli značajno smanjuje vazodilatacijski odgovor srednjih cerebralnih arterija, za razliku od skupine štakorica na niskoslanoj dijeti te tako dovodi do endotelne disfunkcije (27).

Upala je povezana s povećanim izražajem proupalnih citokina: TNF-α i IL-1. Povećane razine ovih citokina potiču endotelne stanice i makrofage na pojačan izražaj adhezijskih molekula: VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, IL-6, što rezultira aktivacijom endotela (13). U spontano hipertenzivnih štakora (SHR), adhezija monocita, zajedno s izražajem ICAM-1, povećana je, što dovodi do promjena u moždanoj mikrocirkulaciji te posreduje nastanku spontane hipertenzije (14, 26). Kod pacijenata s hipertenzijom, nakon terapije amlodipinom, uz smanjenje krvnog tlaka, uočeno je i značajno smanjenje serumskih razina ICAM i VCAM. Također, uz smanjenje krvnog tlaka došlo je i do značajno povećane ekspresije CD11a/LFA-1 (ligand za ICAM-1 i endokan) u trima leukocitnim populacijama (limfociti, monociti i granulociti), dok se CD15 i CD49d/VLA-4 (VCAM-1 ligand) nisu značajnije mijenjali (26).

U ovom istraživanju, na Sprague-Dawley štakoricama koje su bile na VSD, uočena je značajna promjena u monocitnoj populaciji leukocita ($p = 0,0103$). Na Slici 4. i u Tablici 3. prikazano je značajno smanjenje broja monocita s izražajem CD49d integrina kod štakorica na VSD (AS = 187,32), za razliku od štakorica na NSD (AS = 224,21). Ovo smanjenje broja monocita s izražajem CD49d integrina, kod štakorica na VSD, može ukazivati na pojačanu

migraciju monocita u subendotel pod utjecajem soli i početak aterosklerotskih promjena. Uz monocite na mjesto upale dolazi i mali broj limfocita, no on nije značajnije promijenjen unosom soli kako je prikazano na Slici 2. ($p > 0,05$) te u Tablici 1. Moguć uzrok tome jest premali uzorak životinja uzetih za istraživanje i kratak period trajanja dijetnog protokola Sprague-Dawley štakorica. U studiji provedenoj na miševima s induciranim kolitisom, opažen je učinak VSD na crijevni trakt. VSD je pojačala stvaranje IL-17 te odgovor pomoćničkih leukocita Th17 u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava. Time je pokazano da VSD promovira upalni odgovor u miševa kojima je induciran kolitis i predstavlja jedan od rizičnih čimbenika za nastanak upalne crijevne bolesti (28).

Čini se da su renin-angiotenzin sustav i kisikovi radikali odgovorni za pojačanu leukocitnu adheziju. Nedavna istraživanja pokazala su kako visokoslana dijeta u Dahl SS štakora dovodi do pojačane leukocitne adhezije. Nije prepoznat točan mehanizam, no uočeno je da postoji razlika između ranije i kasnije faze VSD. U Dahl SS štakora, koji su bili na VSD i tretirani losartanom (blokator angiotenzinskih receptora), u ranoj fazi dijete nije došlo do smanjenja leukocitne adhezije. U kasnijoj fazi VSD, leukocitna je adhezija bila gotovo potpuno prekinuta, što govori o bitnoj ulozi RAAS u leukocitnoj adheziji i posljedičnom organskom oštećenju (14). Animalne studije pokazale se da lijekovi koji se koriste za liječenje hipertenzije (inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima, blokatori kalcijskih kanala) imaju pozitivnu ulogu u smanjenju stvaranja ROS-a djelovanjem na smanjenje aktivnosti NADPH-oksidaze, ali i smanjenje izražaja biljega upale (29). Također, u istraživanju provedenom na Dahl SS štakorima, uočeno je da kronično niske koncentracije angiotenzina II tijekom VSD (ili paradoksalno, nisko slane dijete kod Dahl SS štakora) utječu na aktivnost antioksidativnih mehanizama i dovode do nastanka oksidativnog stresa smanjenjem aktivnosti enzima, kao što je superoksid dismutaza (10, 11).

U patofiziološkim okolnostima, kao što je produljena srčana ishemija, neutrofilnigranulociti su glavni izvor ROS-a tijekom reperfuzije. Osim toga, proizvode citotoksične radikale u borbi protiv patogena (13). U ovom istraživanju utvrđene su značajne statističke promjene u populaciji granulocita. Zabilježen je porast broja granulocita s izražajem CD11b integrina kod štakorica koje su bile na VSD (AS = 495,50), za razliku broja granulocita kod štakorica na NSD (AS = 387,94) (Slika 5, Tablica 2.). Razlog porasta broja granulocita s izraženim CD11b može biti početna faza upalnog procesa na krvnim žilama te njihovo mobiliziranje na mjesto upalne promjene. Nije došlo do značajne promjene u izražaju CD49d integrina na granulocitima ($p = 0,8744$), čemu uzrok može biti premali broj životinja na VSD uzet kao uzorak (Slika 5, Tablica 2.).

Sve je više dokaza koji govore o negativnom utjecaju VSD na endotelnu funkciju. U dosadašnjim, ali i u ovom istraživanju, uočen je utjecaj VSD na raspodjelu leukocitnih subpopulacija. Rezultati upućuju da VSD mijenja raspodjelu granulocita i monocita, dok se raspodjela T limfocita nije značajnije mijenjala ($p > 0,05$). Posebno se ističe porast broja granulocita s izražajem CD11b (LFA-1) integrina, te smanjenje broja monocita s izraženim CD49d (VLA-4) integrinom. Interakcija CD49d/VCAM-1 i CD11b/ICAM-1 adhezijskih molekula vrlo je bitna prilikom leukocitne adhezije i migracije, a njihova pojačana ekspresija može biti uzrok nastanka početnih aterosklerotskih lezija.

Preliminarni rezultati istraživanja potvrdili su hipotezu da visokoslana dijeta aktivira leukocite, što je mjerljivo određivanjem specifičnih CD molekula, CD49d i Cd11b integrina na njihovoj površini, no za bolje razumijevanje mehanizama aktivacije i utjecaju VSD na specifične stanične biljege, potrebni su dodatni eksperimenti na većem broju eksperimentalnih životinja i s duljim dijetnim protokolima.

7. ZALJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Visokoslana dijeta utječe na raspodjelu leukocitnih subopopulacija, što je vidljivo u promjeni broja monocita i granulocita kod štakorica na visokoslanoj dijeti.
2. Smanjenje broja monocita s izražajem CD49d integrina te porast broja granulocita s izražajem CD11b integrina kod štakorica na visokoslanoj dijeti može ukazivati na njihovu ulogu u početnim fazama nastanka aterosklerotske lezije.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Utvrditi utjecaj visokoslane dijete na raspodjelu leukocitnih subpopulacija u krvi. Utvrditi utjecaj visokoslane dijete na dinamiku leukocitne aktivacije utvrđivanjem izražaja liganada na leukocitima komplementarnih aktivacijskim biljezima na endotelnim stanicama kod zdravih štakorica.

Nacrt studije: eksperimentalna studija na animalnom modelu

Materijali i metode: Zdrave Sprague-Dawley štakorice, starosti 10-11 tjedana, podijeljene su u dvije skupine: prva skupina bila je na standardnoj prehrani, a druga na prehrani s visokim udjelom soli (4 % NaCl u hrani) tijekom 7 dana. Prikupljene stanice iz uzoraka periferne krvi analizirane su protočnim citometrom. Podaci prije i nakon dijetnog protokola uspoređivani su paired t-testom u slučaju normalne distribucije, a Wilcoxon rank-sum testom ukoliko podaci nisu normalno distribuirani. Za analizu je korišten SigmaPlot, v11.2.

Rezultati: Dobiveni rezultati pokazuju da VSD mijenja raspodjelu granulocita i monocita, ali nije značajnije promijenila raspodjelu T limfocita. Izražaj CD49d i CD11b na CD4 i CD8 T limfocitima nije značajno promijenjen unosom soli ($p > 0,05$), dok je došlo do statistički značajnog smanjenja broja monocita s izraženim CD49d ($p = 0,0103$) i porasta broja granulocita s izraženim CD11b ($p = 0,0042$) kod štakorica na VSD u odnosu na štakorice na NSD.

Zaključak: VSD utječe na raspodjelu nekih leukocitnih subopopulacija. Smanjenje broja monocita s izražajem CD49d te porast broja granulocita s izražajem CD11b integrina može ukazivati na njihovu ulogu u početnim fazama nastanka aterosklerotske lezije.

Ključne riječi: aktivacija, distribucija, leukociti; Sprague-Dawley štakorice; visokoslana dijeta

9. SUMMARY

The effect of high salt diet on distribution and activation of leukocytes in Sprague-Dawley rats

Objectives: To determine the effect of high salt diet on distribution of leukocyte subpopulations in blood. Determine the effect of high salt diet on dynamics of leukocyte activation by determining ligand expression on leukocytes complementary activation markers on endothelial cells of healthy rats.

Study design: experimental study on animal model

Materials and Methods: Healthy Sprague-Dawley rats, at the age 10-11 weeks were divided into two groups. The first group was on a standard diet and the second group was on the high salt diet (4 % NaCl) for 7 days. Cells collected from peripheral blood samples were analyzed by flow cytometer. Data before and after the dietary protocol were compared with t-paired test in case of normal distribution or Wilcoxon runk-sum test if data were not normally distributed. SigmaPlot, v 11.2, was used for analysis.

Results: The results show that the high salt diet changes the distribution of granulocytes and monocytes, but did not significantly alter the distribution of T lymphocytes. The expression of CD49d and CD11b on CD4 and CD8 T lymphocytes was not significantly altered by the intake of salt ($p > 0.05$), while there was a statistically significant decrease in monocyte counts with expressed CD49d ($p = 0,0103$) and increase in the number of granulocytes expressed with CD11b ($p = 0.0042$) in rats on the high salt diet in comparison with rats on low salt diet.

Conclusion: The high salt diet affects the distribution of some leukocyte subopopulations. Reduce in number of monocytes expressing CD49d and increase in number of granulocytes expressing CD11b integrin may indicate their role in the initial stages of the atherosclerotic lesion.

Keywords: activation, distribution, high salt diet; leukocytes; Sprague-Dawley rats

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. Zhao X, Yang X, Zhang X, Li Y, Zhao X, i sur. Dietary salt intake and coronary atherosclerosis in patients with prehypertension. J Clin Hypertens (Greenwich). 2014;16(8):575-80.
3. Wild J, Soehnlein O, Dietel B, Urschel K, Garlichs CD, Cicha I. Rubbing salt into wounded endothelium: sodium potentiates proatherogenic effects of TNF-α under non-uniform shear stress. Thromb Haemost. 2014;112(1):183-95.
4. Dmitrieva NI, Burg MB. Elevated Sodium and Dehydration Stimulate Inflammatory Signaling in Endothelial Cells and Promote Atherosclerosis. PLoS One. 2015;10(6):1-22.
5. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 2001; 38(2):11-4.
6. Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitricoxide. Kidney Int Suppl. 1996;55:2–53.
7. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
8. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. Cardiovasc J Afr. 2012;23(4):222-31.
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res. 2000;87(10):840-4.
10. Drenjancevic-Peric I, Lombard JH . Reduced Angiotensin II and Oxidative Stress Contribute to Impaired Vasodilation in DahlSalt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. Hypertension. 2005;45: 687-691.
11. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extra cellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. Circ Res. 1999;85:23–28.
12. Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Systems Analysis of Oxidant Stress in the Vasculature. IUBMB Life. 2013; 65(11): 911–920.

13. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, Hasson D. Review Article Oxidative Stress-Related Biomarkers in Essential Hypertension and Ischemia-Reperfusion Myochardial Damage. Dis Markers. 2013; 35(6): 773-90.
14. Takahashi H, Nakagawa S, Wu Y, Kawabata Y, Numabe A, Yanagi Y, i sur. A high-salt diet enhances leukocyte adhesion in association with kidney injury in young Dahlsalt-sensitive rats. Hypertension Res. 2017; 40: 912–920.
15. Tedgui A. The role of inflammation in atherothrombosis: implications for clinical practice. Vasc Med. 2005; 10: 45–53.
16. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J ClinInvest. 2005; 115(12): 3378–3384.
17. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 1994;84(7):2068-101.
18. Zhi K, Li M, Zhang X, Gao Z, Bai J, Wu Y, i sur. α4β7 Integrin (LPAM-1) is upregulated at atherosclerotic lesions and is involved in atherosclerosis progression. Cell Physiol Biochem. 2014; 33(6): 1876-87.
19. McDowall A, Inwald D, Leitinger B, Jones A, Liesner R, Klein N, i sur. A novel form of integrin dysfunction involving β1, β2, and β3 integrins. J Clin Invest. 2003; 111(1): 51–60.
20. Schiffrin EL. Immune modulation of resistance artery remodelling. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012; 110(1): 70-2.
21. Zhou X, Zhang L, Ji WJ, Yuan F, Guo ZZ, Pang B, i sur. Variation in dietary salt intake induces coordinated dynamics of monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in humans: implications in end organ inflammation. PLoS One. 2013;8(4):1-12.
22. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(2):163-176.
23. Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. Paediatr Croat. 2006;50(1):176-182.
24. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion Molecules - Part II. NEJM. 1996;335:43-5.
25. Šimundić AM. Struktura i funkcija adhezijskih molekula. Biochem Med. 2001;11:1-12.
26. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The effects of arterial blood pressure reduction on endocan and soluble endothelial cell adhesion

Molecules (CAMs) and CAMs ligands expression in hypertensive patients on Ca-channel blocker therapy. Kidney Blood Press Res. 2013;37(2-3):103-15.

27. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, i sur. Attenuated flow-induced dilatation of middlecerebralarteriesis related to increased vascularoxidative stress in rats on a short-term highsalt diet. J Physiol. 2016;594(17):4917-31.
28. Wei Y, Lu C, Chen J, Cui G, Wang L, Yu T, i sur. Highsalt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. Oncotarget. 2017;8(1):70–82.
29. Mihalj M, Tadzic R, Vcev A, Rucevic S, Drenjancevic I. Blood Pressure Reduction is Associated With the Changes in Oxidative Stress and Endothelial Activation in Hypertension, Regardless of Antihypertensive Therapy. Kidney Blood Press Res. 2016;41(6):721-735.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Nikolina Jukić
Mjesto i datum rođenja: Vinkovci, 20. prosinca 1993.
Adresa: Vladimira Nazora 36, 32284 Stari Mikanovci
Email adresa: niki438@hotmail.com
Tel.: 099/8438-880

Obrazovanje:

2012. – 2018. Studij medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

2008. - 2012. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku