

# ULOGA TFF3 PEPTIDA U VASKULARNOJ REAKTIVNOSTI KRVNIH ŽILA KOD MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N I MIŠEVA DIVLJEG TIPA (C57BL/6N)

---

Kozina, Nataša

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:152:046332>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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





**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

Nataša Kozina

**ULOGA TFF3 PEPTIDA U VASKULARNOJ REAKTIVNOSTI**  
**KRVNIH ŽILA KOD MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM**  
***Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N I MIŠEVA DIVLJEG TIP (C57BL/6N)**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentorica rada: doc. dr .sc. Ivana Jukić, dr. med.

Komentorica rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med.

Rad ima 139 stranica.

*Predgovor radu*

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Jukić na savjetima i vodstvu tijekom poslijediplomskog studija, kao i pri izradi doktorske disertacije.*

*Veliko hvala komentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević na iskrenoj podršci, poticaju i dostupnosti tijekom cijelog poslijediplomskog studija.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom cijelog studija.*

Ovo je istraživanje financirano iz sredstava projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ IP-2014-09-6380/V-ELI Athero, VIF-2018-MEFOS-09-1509, IP-1-MEFOS-2019, IP1-MEFOS-2020 i IP3-MEFOS- 2021.



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Važnost endotela i pojava endotelne disfunkcije .....	1
1.2. Vazoaktivni čimbenici .....	1
1.2.1. Dušikov oksid .....	1
1.2.2. Prostaciklin i tromboksan A2 .....	3
1.2.3. Endotelin-1.....	3
1.2.4. Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF) .....	4
1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID) .....	5
1.4. Oksidativni stres .....	7
1.5. Uloga antioksidativnih enzima .....	9
1.6. Visok unos soli i vaskularna funkcija.....	10
1.7. Biološka svojstva TFF3 proteina.....	11
1.8. Uloga TFF-a u zaštiti i obnovi sluznice.....	12
1.9. TFF i energetske metabolizam .....	14
1.10. Sudjelovanje TFF3 proteina u obrani od štetnih čimbenika.....	15
1.11. TFF u dišnome sustavu, trudnoći i tumorigenezi .....	16
2. HIPOTEZA.....	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	19
4. MATERIJALI I METODE.....	20
4.1. Ustroj studije.....	20
4.2. Ispitivane skupine .....	20
4.3. Mjerenje krvnoga tlaka .....	21
4.4. Skupljanje uzoraka miješane krvi.....	21
4.5. Funkcionalna studija - protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije .....	22
4.6. Izazivanje ishemijskoga oštećenja mozga .....	23
4.7. Procjena neurološkoga oštećenja.....	24

4.8.	Histomorfološka analiza aorte .....	24
4.9.	Određivanje razine dušikovoga oksida i superoksida <i>in situ</i> metodom fluorescencije .....	25
4.10.	Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (GPx) u serumu .....	25
4.11.	Određivanje koncentracije proteina .....	26
4.12.	Mjerenje biljega oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP) spektrofotometrijskim metodama .....	26
4.13.	Relativni izražaj gena određen PCR metodom u stvarnom vremenu .....	26
4.14.	Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, , IL-6 i CRP-a u serumu .....	27
4.15.	Relativni izražaj proteina .....	27
4.16.	Izražaj mRNA jetre određen PCR metodom u stvarnom vremenu .....	28
4.17.	Analiza izražaja jetrenih proteina aktivacije eIF2 $\alpha$ .....	30
4.18.	Proteomska analiza tkiva karotidne arterije .....	31
4.18.1.	Ekstrakcija proteina i priprema uzoraka .....	31
4.18.2.	LC-MS/MS analiza .....	31
4.18.3.	Analiza proteomskih podataka .....	32
4.19.	Statistička analiza .....	33
5.	REZULTATI .....	34
5.1.	Učinak visokoslane dijeta na arterijski krvni tlak .....	34
5.2.	Biokemijska analiza seruma .....	34
5.3.	Bazični odgovor karotidne arterije niskoslane i visokoslane ispitivane skupine miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> <sup>-/-</sup> /C57BL/6N i miševa divljeg tipa (WT, C57BL/6N), na protokom potaknutu dilataciju .....	36
5.4.	Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) karotidne arterije (vazodilatacija ovisna o endotelu) .....	38
5.5.	Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju karotidne arterije (vazodilatacija neovisna o endotelu) .....	39
5.6.	Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije .....	40

5.7.	Odgovor karotidne arterije na primjenu antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (iberiotoksin); TRPV4 (RN-1734) i ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, glibenclamide) .....	43
5.8.	Odgovor karotidne arterije na primjenu agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (NS-1619); ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, cromakalim ) i TRPV4 (GSK1016790A).....	46
5.9.	Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije .....	49
5.10.	Učinak isključenja gena <i>Tff3</i> i visokoslane dijetete na volumen infarkta mozga kod miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> i WT miševa.....	51
5.11.	Strukturne karakteristike aorte miševa TFF3 i WT na NS i VS prehrani.....	52
5.12.	Određivanje razine dušikovoga oksida <i>in situ</i> metodom fluorescencije .....	55
5.13.	Mjerenje razine superoksida <i>in situ</i> metodom fluorescencije .....	58
5.14.	Serumska aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i serumskih markera oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP) .....	61
5.15.	Izražaj antioksidativnih enzima u aortama miševa divljega tipa i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> .....	61
5.16.	Genski izražaj endotelne i inducibilne dušik-oxid sintaze u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim <i>Tff3</i> genom .....	63
5.17.	Mjerenje genskoga izražaja upalnih biljega IL-6, TNF alfa i IL-17A u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> .....	64
5.18.	Koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, , IL-6 i CRP-a u serumu .....	65
5.19.	Proteinski izražaj COX-1, COX-2, eNOS, iNOS, KCNB1 i TRPV4 .....	69
5.20.	Izražaj gena za markere ER stresa, oksidativni stres i citokine.....	73
5.21.	Aktivacija ER stres proteina eIF2 $\alpha$ .....	76
5.22.	Učinak isključenja gena <i>Tff3</i> i visokoslane dijetete na izražaj proteina .....	77
6.	RASPRAVA.....	82
6.1.	Utjecaj kratkotrajnoga unosa visokih koncentracija soli na promjenu krvnoga tlaka	82
6.2.	Vaskularni odgovor karotidne arterije kod visokoslane dijetete .....	83



6.3.	Učinci prehrane i isključenje gena <i>Tff3</i> na sistemski upalni odgovor i oksidativni stres .....	85
6.4.	Učinak isključenja gena <i>Tff3</i> na volumen moždanoga udara; Uloga modifikacije proteoma .....	86
6.5.	Učinak isključenja <i>Tff3</i> gena i visokoslane dijeta na strukturne komponente žile .....	94
7.	ZAKLJUČCI .....	96
8.	SAŽETAK .....	97
9.	SUMMARY .....	99
10.	LITERATURA .....	101
11.	ŽIVOTOPIS .....	132

## POPIS KRATICA

AA	arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i> )
Ach	acetilkolin
ActB	aktin $\beta$ (engl. <i>actin <math>\beta</math></i> )
ADP	adenozin difosfat
Ang II	angiotenzin II
AOPP	napredni oksidirani proteinski produkti (engl. <i>Advanced Oxidation Protein Products</i> )
ATF4	aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (engl. <i>activating transcription factor 4</i> )
ATP	adenozin trifosfat
BIP	vezujući protein imunoglobulina (engl. <i>Binding Immunoglobulin protein</i> )
BK	bradikinin
B2M	beta-2-mikroglobulin
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CAT	katalaza
CHOP	protein homologan CCAAT-pojačivač-vezujućem proteinu (engl. <i>CCAAT Enhancer – Binding Protein Homologous Protein</i> )
COX	enzim ciklooksigenaza
COX-1	enzim ciklooksigenaza-1
COX-2	enzim ciklooksigenaza-2
CXCL1	kemokinski (C-X-C motiv) ligand 1 (engl. <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i> )
ED	endotelna disfunkcija
EDHF	endotelni čimbenici hiperpolarizacije (engl. <i>endothelium-derived hyperpolarizing factors</i> )
EDRF	endotelni čimbenici relaksacije (engl. <i>endothelium-derived relaxing factors</i> )

EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>Ethylendiaminetetraacetic Acid</i> )
EETs	epoksieikozatrienoična kiselina (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acid</i> )
eIF2 $\alpha$	eukariotski čimbenik inicijacije 2 $\alpha$ (engl. <i>eukaryotic initiation factor 2 <math>\alpha</math></i> )
ET-1	endotelin-1
eNOS	endotelna dušik-oksidi sintaza (engl. <i>endothelial nitric-oxide synthase</i> )
FID	protokom potaknuta dilatacija (engl. <i>flow-induced dilation</i> )
GPx	glutaciona peroksidaza
GPx1	glutaciona peroksidaza 1
GPx4	glutaciona peroksidaza 4
GRP94	94 kD protein reguliran glukozom (engl. <i>glucose-regulated protein 94 kD</i> )
HO•	hidroksil radikal
HPRT	hipoksantinski gvanin fosforiboziltransferaza (engl. <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> )
IL-1 $\alpha$	interleukin 1 alfa
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
IL-17A	interleukin 17A
INDO	indometacin
iNOS	inducibilna dušik-oksidi sintaza (engl. <i>inducible nitric-oxide synthase</i> )
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
L-NAME	N-nitro-L-arginin metil ester
MCAO	okluzija srednje moždane arterije (engl. <i>middle cerebral artery occlusion</i> )
MCP1	monocitni kemoatraktantni protein 1 (engl. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> )

NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NOS	dušik-oksidi sintaza (engl. <i>nitric-oxide synthase</i> )
NP40	pufer za lizu
NS	niskoslana dijeta
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	superoksidni anion
oxLDL	oksidirani lipoproteini niske gustoće (engl. <i>oxidized low-density lipoprotein</i> )
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrit
PGH <sub>2</sub>	prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> (prostaciklin)
RNS	reaktivni dušikovi radikali (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	slobodni kisikovi radikali (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS- PAGE	natrijev dodecil sulfat - poliakril amidna gel elektroforeza (engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
sGC	gvanilat ciklaza
SNP	natrijev nitroprusid (engl. <i>sodium-nitroprusside</i> )
SOD1	superoksid dismutaza 1
SOD3	superoksid dismutaza 3
sXBP1	prekrajani XBP1 (engl. <i>spliced XBP1</i> )
TBS-T	pufer za ispiranje membrane (engl. <i>Tris buffered saline+Tween-20</i> )
TFF	obitelj trolisnih faktora proteina (engl. <i>trefoil factor family</i> )
TGF $\alpha$	transformirajući faktor rasta $\alpha$ (engl. <i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i> )
TNF $\alpha$	tumor nekrotizirajući čimbenik alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alfa</i> )
TXA <sub>2</sub>	tromboksan A <sub>2</sub>
VS dijeta	visokoslana dijeta

## Popis tablica

<b>Tablica 1.1.</b> Masne kiseline u jetri miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> u odnosu na divlji tip. .15	
<b>Tablica 4.1.</b> Oligonukleotidi korišteni za Q-PCR analizu. ....29	
<b>Tablica 5.1.</b> Vrijednosti krvnoga tlaka.....34	
<b>Tablica 5.2.</b> Usporedba biokemijskih parametara među ispitivanim skupinama .....35	
<b>Tablica 5.3.</b> Strukturne karakteristike aorte kod TFF3 i WT miševa .....53	
<b>Tablica 5.4.</b> Serumska aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i serumskih markera oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP).....61	
<b>Tablica 5.5.</b> Rezultati proteomske analize različito izraženih proteina u karotidnim arterijama miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti u usporedbi s WT miševima.....78	

## Popis slika

<b>Slika 1.1.</b> Struktura TFF3 proteina.....	12
<b>Slika 1.2.</b> Restitucija epitela.....	13
<b>Slika 5.1.</b> Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT), na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj (VS) dijeti, na promjenu gradijenta tlaka.....	36
<b>Slika 5.2.</b> Bazični odgovor karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> , na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj (VS) dijeti, na promjenu gradijenta tlaka.....	37
<b>Slika 5.3.</b> Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na niskoslanjoj dijeti (NS), na promjenu gradijenta tlaka.....	37
<b>Slika 5.4.</b> Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti (VS), na promjenu gradijenta tlaka.....	38
<b>Slika 5.5.</b> Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljega tipa (WT) i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> , na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj dijeti (VS) na acetilkolinom ( $10^{-6}$ mol/L) potaknutu dilataciju (AChID).....	39
<b>Slika 5.6.</b> Bazični odgovor karotidne arterije dodatkom NO-donora natrijevog-nitroprusida (SNP, $10^{-6}$ mol/L) na protokom potaknutu dilataciju kod miševa divljega tipa (WT) i miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> , na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj dijeti (VS).....	40
<b>Slika 5.7.</b> Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanjoj dijeti (NS).....	41
<b>Slika 5.8.</b> Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslanjoj dijeti (VS).....	42
<b>Slika 5.9.</b> Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na niskoslanjoj dijeti (NS).....	42
<b>Slika 5.10.</b> Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti (VS).....	43
<b>Slika 5.11.</b> Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanjoj dijeti (NS).....	44

<b>Slika 5.12.</b> Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslanjoj dijeti (VS).....	45
<b>Slika 5.13.</b> Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na niskoslanjoj dijeti (NS) .....	45
<b>Slika 5.14.</b> Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti (VS) .....	46
<b>Slika 5.15.</b> Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanjoj dijeti (NS).....	47
<b>Slika 5.16.</b> Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslanjoj dijeti (VS).....	48
<b>Slika 5.17.</b> Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na niskoslanjoj dijeti (NS) .....	48
<b>Slika 5.18.</b> Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti (VS) .....	49
<b>Slika 5.19.</b> Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT).....	50
<b>Slika 5.20.</b> Učinak <i>in vivo</i> primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> .....	50
<b>Slika 5.21.</b> Veličina infarkta mozga u ispitivanim skupinama.....	51
<b>Slika 5.22.</b> Infarkt mozga u ispitivanim skupinama nakon 60 minuta prolazne okluzije srednje cerebralne arterije (toMCAO). .....	52
<b>Slika 5.23.</b> Presjeci aorte svih ispitivanih skupina. ....	54
<b>Slika 5.24.</b> Reprezentativni dijelovi aorte miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> na visokoslanjoj dijeti (VS) korišteni za histomorfološku analizu. ....	55
<b>Slika 5.25.</b> Grafički prikaz <i>in situ</i> određivanja razine dušikovoga oksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama bez protoka .....	56

<b>Slika 5.26.</b> Reprezentativni prikaz <i>in situ</i> fluorescencije dušikovoga oksida u ispitivanim skupinama bez protoka .....	57
<b>Slika 5.27.</b> Grafički prikaz <i>in situ</i> određivanja razine dušikovoga oksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama s protokom.....	57
<b>Slika 5.28.</b> Reprezentativni prikaz <i>in situ</i> fluorescencije dušikovoga oksida u ispitivanim skupinama s protokom .....	58
<b>Slika 5.29.</b> Grafički prikaz <i>in situ</i> određivanja razine superoksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama bez protoka .....	59
<b>Slika 5.30.</b> Reprezentativni prikaz <i>in situ</i> fluorescencije superoksida u ispitivanim skupinama bez protoka.....	59
<b>Slika 5.31.</b> Grafički prikaz <i>in situ</i> određivanja razine superoksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama s protokom .....	60
<b>Slika 5.32.</b> Reprezentativni prikaz <i>in situ</i> fluorescencije superoksida u ispitivanim skupinama s protokom .....	60
<b>Slika 5.33.</b> Genski izražaj Cu/Zn SOD u aortama miševa. ....	62
<b>Slika 5.34.</b> Genski izražaj GPx1 u aortama miševa. ....	62
<b>Slika 5.35.</b> Genski izražaj katalaze u aortama miševa .....	63
<b>Slika 5.36.</b> Genski izražaj inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS) u aortama miševa. ....	63
<b>Slika 5.37.</b> Genski izražaj endotelne dušik oksid sintaze (eNOS) u aortama miševa. ....	64
<b>Slika 5.38.</b> Genski izražaj IL-6 u aortama miševa. ....	64
<b>Slika 5.39.</b> Genski izražaj TNF alfa u aortama miševa. ....	65
<b>Slika 5.40.</b> Genski izražaj IL-17A u aortama miševa.....	65
<b>Slika 5.41.</b> Koncentracija IFN- $\gamma$ u serumu. ....	66
<b>Slika 5.42.</b> Koncentracija TNF- $\alpha$ u serumu.....	66
<b>Slika 5.43.</b> Koncentracija IL-2 u serumu. ....	67
<b>Slika 5.44.</b> Koncentracija IL-4 u serumu. ....	67
<b>Slika 5.45.</b> Koncentracija IL-6 u serumu. ....	68
<b>Slika 5.46.</b> Koncentracija CRP u serumu. ....	68
<b>Slika 5.47.</b> Proteinski izražaj COX-1 u aortama. ....	69
<b>Slika 5.48.</b> Proteinski izražaj COX-2 u aortama. ....	70
<b>Slika 5.49.</b> Proteinski izražaj CYP2J2 u aortama.....	70
<b>Slika 5.50.</b> Proteinski izražaj CYP2C9 u aortama.....	71
<b>Slika 5.51.</b> Proteinski izražaj iNOS u aortama. ....	71
<b>Slika 5.52.</b> Proteinski izražaj eNOS u aortama. ....	72



<b>Slika 5.53.</b> Proteinski izražaj KCNMB u aortama. ....	72
<b>Slika 5.54.</b> Proteinski izražaj TRPV4 u aortama. ....	73
<b>Slika 5.55.</b> Izražaj gena koji kodiraju markere ER stresa, oksidativni stres/antioksidativne enzime i proupalne citokine u jetri miševa s isključenim genom <i>Tff3</i> i WT miševa na viokoslanjoj (VS) i niskoslanjoj dijeti (NS). ....	75
<b>Slika 5.56.</b> Relativna razina proteina markera ER stresa eIF2 $\alpha$ i p-eIF2 $\alpha$ u jetri WT NS i TFF3 NS miševa s induciranim moždanim udarom. ....	76
<b>Slika 5.57.</b> Shematski prikaz interakcija različito zastupljenih proteina u karotidnim arterijama TFF3 VS miševa u usporedbi s WT VS. ....	80
<b>Slika 5.58.</b> Omjer količine proteina izoliranih iz karotidnih arterija TFF3 VS i WT VS miševa. ....	81

## 1. UVOD

### 1.1. Važnost endotela i pojava endotelne disfunkcije

Endotelne stanice oblažu cijeli vaskularni sustav i imaju metaboličku i sintetsku funkciju. Kod odraslih osoba otprilike deset trilijuna ( $10^{13}$ ) stanica tvori dinamičan organ od gotovo 1 kg. Svojim autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem one djeluju na glatke mišićne stanice, trombocite i periferne leukocite (1). Endotelne stanice kontroliraju vaskularnu funkciju u odgovoru na razne neurotransmitere, hormone i vazoaktivne čimbenike koji utječu na vazomociju, trombozu, agregaciju trombocita i upalu (2). Endotel ima ključnu ulogu u održavanju vaskularnoga tonusa; izazivanje vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka (žilni stres) jedna je od glavnih značajki endotela. Endotel posreduje vazomotorni tonus u odgovoru na različite kemijske (acetilkolin, ACh) ili fizičke (sila smicanja) podražaje, putem sintetiziranja i otpuštanja različitih vazoaktivnih čimbenika (3). To mogu biti vazodilatacijski čimbenici poput dušikovoga oksida (NO), prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) i endotelno hiperpolarizirajućeg faktora (EDHF) ili vazokonstriksijski čimbenici poput tromboksana (TXA<sub>2</sub>) i endotelina-1 (ET-1) (4). Uravnotežena proizvodnja tih vazoaktivnih čimbenika djeluje ateroprotektivno, dok oštećeni endotel uzrokuje poremećenu proizvodnju ovih čimbenika. Nastala neravnoteža dovodi do endotelne disfunkcije (ED), što je rani pokazatelj ateroskleroze (5).

Fenotip neaktivirane endotelne stanice je antikoagulantni, protuupalni i vazodilatacijski, dok je ED povezan s upalnim, prokoagulantnim i vazokonstriksijskim svojstvima (6). Jedno od glavnih obilježja ED-a je neodgovarajuća bioraspodjelivost NO-a, zbog smanjene proizvodnje NO-a od strane NO-sintetaze (NOS) ili povećanja reaktivnih kisikovih radikala (ROS) (7,8).

### 1.2. Vazoaktivni čimbenici

#### 1.2.1. Dušikov oksid

Dušikov oksid (NO) ima važnu ulogu u održavanju bazalnoga vazodilatacijskog tonusa krvnih žila (9). NO nastaje djelovanjem enzima NO-sintetaze (NOS) koja pretvara aminokiselinu L-

arginin u NO. Postoje tri izoforme NOS-a: neuronska izoforma (nNOS) koja proizvodi NO koji djeluje kao neuronski glasnik i regulira otpuštanje sinaptičkih neurotransmitera; makrofagna ili inducibilna izoforma (iNOS) koja se izražava samo u stanicama izloženima upalnim medijatorima i endotelni NOS (eNOS) koji proizvodi dušikov oksid u vaskulaturi (10–13).

Inaktivni eNOS vezan je za protein kaveolin i nalazi se u malim udubljenjima u staničnoj membrani - kaveolama. Kada se unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$  povećaju, eNOS se odvaja od kaveolina i aktivira se. Agonisti NO-a, bradikinin (BK), acetilkolin (ACh), adenozin trifosfat (ATP), adenozin difosfat (ADP) i trombin mogu utjecati na odvajanje eNOS-a od kaveolina otpuštanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatskoga retikuluma (14–16). Nakon što se intracelularne zalihe  $\text{Ca}^{2+}$  potroše, šalje se signal membranskim receptorima za otvaranje  $\text{Ca}^{2+}$  kanala omogućujući izvanstaničnome  $\text{Ca}^{2+}$  ulazak u stanicu.  $\text{Ca}^{2+}$  se veže za protein kalmodulin u citoplazmi stanice, nakon čega prolazi kroz strukturne promjene koje mu omogućuju vezanje na eNOS. eNOS zatim pretvara L-arginin u NO. Taj mehanizam proizvodnje NO-a ovisi o razinama intracelularnoga  $\text{Ca}^{2+}$  u endoplazmatskom retikulumu, kao i  $\text{Ca}^{2+}$  koji difundira u stanicu. Smanjenje  $\text{Ca}^{2+}$  uzrokuje odvajanje kompleksa kalcij-kalmodulin od eNOS-a, koji se zatim veže s kaveolinom i postaje inaktiviran (17–19). Kratkotrajno povećanje NO-a ovisi o intracelularnom  $\text{Ca}^{2+}$ , ali kada se ono smanji, aktiviraju se dodatni mehanizmi za regulaciju proizvodnje NO-a. Takav mehanizam je i fosforilacija eNOS-a (20). Fosforilacija eNOS-a odvija se djelovanjem protein-kinaza, kao što su protein-kinaza A i ciklički gvanozin-3', 5-monofosfat (cGMP) ovisna protein-kinaza II (12,15,20). Sila smicanja (engl. *shear stress*) inicira fosforilaciju eNOS-a djelovanjem protein-kinaze B (21). Sila smicanja proizlazi iz povećanoga protoka krvi u žili i može povećati proizvodnju NO-a fosforilacijom eNOS-a, ali i stimulacijom receptora endotelnih stanica. Konkretno, sila smicanja aktivira  $\text{Ca}^{2+}$ -om aktivirane  $\text{K}^+$  kanale na površini endotelnih stanica, uzrokujući istjecanje  $\text{K}^+$  i priljev  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu (22,23). Doprinos  $\text{Ca}^{2+}$  i fosforilacije eNOS-a proizvodnji NO-a ovisi o trajanju sile smicanja. Primjerice, intracelularno otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  odvija se prilikom kratkotrajne sile smicanja, dok sila smicanja duljega trajanja (> 30 minuta) može iscrpiti unutarstanične zalihe  $\text{Ca}^{2+}$  pa proizvodnja NO-a ovisi o fosforilaciji eNOS-a (24,25). Nakon sinteze NO difundira kroz endotelnu stanicu u susjedne mišićne stanice, gdje se veže na gvanilil ciklazu (sGC). Sada aktiviran enzim povećava stopu pretvorbe gvanozin trifosfata (GTP) u cGMP, što smanjuje kontrakciju glatkih mišića (26,27). Nadalje, cGMP smanjuje oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazmatskoga retikuluma u stanicama glatkih mišića, a također pomaže vratiti  $\text{Ca}^{2+}$  u sarkoplazmatski retikulum (28,29).

Osim vazodilatacije, NO također sudjeluje u sprečavanju adhezije i agregacije trombocita, adhezije i migracije leukocita te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (30,31).

### 1.2.2. Prostaciklin i tromboksan A<sub>2</sub>

Sinergijsko djelovanje dvaju prostanoida - prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) i tromboksana (TXA<sub>2</sub>), također regulira vaskularnu funkciju. Njihovu proizvodnju kataliziraju enzimi ciklooksigenaze (COX). Poznate su dvije izoforme COX-1 i COX-2 (32,33), COX-1 se kontinuirano izražava u endotelnim stanicama, dok se COX-2 izražava samo prilikom oštećenja endotela (34,35). COX-2 pretvara arahidonsku kiselinu u prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), koji se zatim sintetizira u PGI<sub>2</sub> s pomoću prostaciklin sintaze. PGI<sub>2</sub> se veže na prostaciklinske receptore (IP) koji se nalaze i na trombocitima i na vaskularnim glatkim mišićnim stanicama. Aktivacija trombocitnih IP-receptora dovodi do inhibicije agregacije trombocita. Vežanje PGI<sub>2</sub> na IP-receptor glatke mišićne stanice aktivira adenilat ciklazu koja inducira sintezu cikličkoga adenzin monofosfata (cAMP) (36–40). cAMP tada aktivira protein-kinazu A, što omogućuje opuštanje glatkih mišića (41,42). Važno je napomenuti da u prisutnosti NO-a blokiranje proizvodnje PGI<sub>2</sub> nema učinka na vazodilataciju. Međutim, kada je NO blokiran, rezidualna dilatacija posljedica je povećane sinteze PGI<sub>2</sub> (43,44), što sugerira da PGI<sub>2</sub> igra kompenzatornu ulogu u dilataciji krvnih žila kada se NO smanji.

Za razliku od PGI<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub> uzrokuje agregaciju trombocita i vazokonstrikciju (45). COX-1 pretvara arahidonsku kiselinu u PGH<sub>2</sub>, nakon čega se sintetizira TxA<sub>2</sub> tromboksan sintazom. TxA<sub>2</sub> posreduje svoje učinke djelovanjem na tromboksan-prostanoidne (TP) receptore koji se nalaze na trombocitima i njihova aktivacija uzrokuje agregaciju trombocita (32,34).

TP-receptor se također nalazi na glatkim mišićnim stanicama i uključen je u povećanje unutarstaničnih razina Ca<sup>2+</sup> u glatkim mišićima, što dovodi do vazokonstrikcije (46). Ravnoteža aktivnosti PGI<sub>2</sub> i TxA<sub>2</sub> pomaže u održavanju homeostaze u zdravoj žili (47).

### 1.2.3. Endotelin-1

Endotelin (ET) je vazokonstriktor čiju proizvodnju i otpuštanje stimuliraju upalni interleukini i TNF $\alpha$ , a smanjuju NO i PGI<sub>2</sub>. ET-1 receptori nalaze se na glatkim mišićnim stanicama (ETA i

ET-B2) i na endotelnim stanicama (ET-B1) (48–50). Prilikom vezanja ET-1 za ETA ili ET-B2 receptore,  $\text{Ca}^{2+}$  kanali se otvaraju dopuštajući izvanstaničnome  $\text{Ca}^{2+}$  ulazak u stanicu. Aktivacija ET-B1 receptora na endotelu uzrokuje vazodilataciju inducirajući otpuštanje NO-a i PGI2 (51,52).

Osim vazoaktivnih učinaka, ET-1 također uzrokuje upalu i proliferaciju stanica glatkih mišića u krvnim žilama. Vezanje ET-1 za ETA receptore aktivira makrofage, povećava interakcije neutrofila i stijenke krvnih žila te povećava koncentracije slobodnih radikala, što dovodi do ED-a (53). ET-1 uzrokuje proliferaciju glatkih mišićnih stanica vezanjem na ET-receptore ili aktiviranje čimbenika rasta poput faktora rasta trombocita, što rezultira povećanjem debljine intime-medije stijenke krvne žile (54–56).

### 1.2.4. Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF)

EDHF su vazodilatatorski čimbenici koji hiperpolariziraju glatke mišićne čineći membranski potencijal stanice negativnijim (57). EDHF se oslobađa kada se endotelne stanice aktiviraju agonistima kao što su BK i ACh (58). NO i PGI2 također mogu relaksirati krvne žile hiperpolarizacijom glatkih mišićnih stanica, međutim, kada su NO i PGI2 inhibirani, još uvijek dolazi do hiperpolarizacije, što ukazuje na uključenost trećega hiperpolarizirajućeg čimbenika (59). Brojni mehanizmi uključeni su u izazivanje hiperpolarizacije. Iako je točan put još uvijek nepoznat, pozornost se do sada posebno pridavala trima mehanizmima.

Aktivacija endotelnih receptora i posljedično povećanje razine  $\text{Ca}^{2+}$  uzrokuje istjecanje  $\text{K}^+$  iz stanice. Glatke mišićne stanice reagiraju na promjene u izvanstaničnim razinama  $\text{K}^+$  i također otpuštaju  $\text{K}^+$  iz glatkih mišićnih stanica uzrokujući hiperpolarizaciju. Promjena membranskoga potencijala glatkih mišićnih stanica smanjuje unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$ , što rezultira relaksacijom (60,61).

Epoksieikosatrienske kiseline (EET) produkti su metabolizma arahidonske kiseline, a djeluju povećavajući istjecanje  $\text{K}^+$  iz glatkih mišićnih stanica što rezultira hiperpolarizacijom i opuštanjem (62–64). Međutim, u krvnim žilama gdje je aktivnost EET-a inhibirana, hiperpolarizacija se i dalje događa (65), što sugerira da drugi mehanizmi moraju biti uključeni u hiperpolarizaciju glatkih mišićnih stanica.

Treći mehanizam odnosi se na međustanične kanale (engl. *gap junctions*) koji mogu prenijeti signale iz glatkih mišićnih stanica u endotelne stanice (66).

### 1.3. Mehanizam protokom potaknute dilatacije (FID)

Protokom potaknuta dilatacija (engl. *flow-induced dilatation*, FID ) fiziološki je mehanizam koji regulira vaskularni tonus i homeostazu periferne cirkulacije. Mehanizam protokom posredovane dilatacije proučavan je u raznim krvnim žilama (67–71) i odvija se pomoću vazoaktivnih medijatora koje proizvodi endotel (72,73). Jedna od najvažnijih funkcija endotela mogućnost je izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka koju uzrokuje žilni stres (74). Studije na ljudima pokazale su da, osim NO-a, koji ima najveću ulogu u održavanju dilatacije, postoje i drugi čimbenici koji mogu kompenzirati nedostatak NO-a i omogućiti nesmetano odvijanje FID-a (75,76). Proizvodnja NO-a potaknuta laminarnim žilnim stresom djelomično je odgovorna za protokom potaknuto izlučivanje PGI<sub>2</sub> (73) koji je znatan inhibitor agregacije trombocita. Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) također može umjesto dušikova oksida biti posrednik dilatacije ovisne o endotelu u otporničkim arterijama visceralnoga masnog tkiva kod koronarne arterijske bolesti (77). Brojne studije ukazuju na to kako bi porast oksidativnoga stresa mogao biti glavni mehanizam koji podupire razvoj vaskularne endotelne disfunkcije. Smanjena razina protokom posredovane dilatacije jedan je od prvih znakova razvoja kardiovaskularnih bolesti i aterosklerotskih srčanih bolesti (75,78,79).

Jedan od ključnih aspekata patogeneze kardiovaskularnih bolesti posredovane slobodnim radikalima je endotelna disfunkcija, pri čemu je poremećena regulacija mikrokruženja vaskularne stijenke. Endotel je aktivna komponenta vaskulature, koja ima ulogu u regulaciji vaskularnoga tonusa, aktivnosti trombocita, tromboze, upale i ateroskleroze (80). Smanjenje vazodilatacije ovisne o endotelu uzrokovano smanjenjem biorasploživosti NO-a igra značajnu ulogu u endotelnoj disfunkciji. Stvaranje tromba tijekom akutnoga koronarnog sindroma rezultira otpuštanjem različitih vazoaktivnih tvari, kao što su trombin i serotonin. U normalnome endotelu te tvari posreduju vazodilataciju (81–83). U uvjetima endotelne vazodilatacijske disfunkcije dolazi do vazokonstrikcije. To je potencirano prisutnošću endotelina, čije su koncentracije povišene koncentracije u plaku bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Narušena vazodilatacija kao odgovor na acetilkolin pokazatelj je

endotelne disfunkcije i korelira s povećanom lokalnom proizvodnjom ROS-a i smanjenom aktivnošću superoksid-dismutaze (78,84,85).

Disfunkcija endotelnoa vazodilatatora može dovesti do paradoksalnih učinaka vazokonstrikcije. U srčanoj vaskulaturi to može rezultirati anginom pektoris. Pokazalo se da disfunkcija vazodilatatora u koronarnim žilama tijekom povećanih metaboličkih potreba može rezultirati ishemijom, čak i u odsutnosti patološke stenoze (84).

Ateroskleroza u koronarnim arterijama čak je i u ranim stadijima povezana s disfunkcijom endotela. Dugotrajno pušenje cigareta neovisan je čimbenik rizika za oslabljenu koronarnu vazodilataciju ovisnu o endotelu, bez obzira na prisutnost ili odsutnost koronarnih aterosklerotskih lezija. Studije na ljudima pokazale su smanjenu dilataciju ovisnu o endotelu kod kroničnih pušača (86,87). Narušena dilatacija ovisna o endotelu kod kroničnih je pušača poboljšana antioksidansom - vitaminom C, što ukazuje na uključenost ROS-a u patogenezu. Hipertenzija je također povezana s povećanim vaskularnim oksidativnim stresom na brojnim životinjskim modelima hipertenzije (46,88). Smanjenje biorasploživosti NO-a može biti smanjeno putem nekoliko mehanizama, uključujući smanjenje izražaja eNOS-a, nedostatak supstrata ili kofaktora za aktivnost eNOS-a, promjene stanične signalizacije eNOS-a i povećanje razgradnje NO-a. eNOS *knockout* miševi skloniji su razvoju tipičnih aterosklerotskih lezija kao odgovora na ozljedu stijenke žile u usporedbi s miševima divljega tipa (89).

Biorasploživost NOS-a važnija je za dilataciju koronarne arterije od aktivnosti eNOS-a i stvaranja NOS-a. Na biorasploživost NOS-a utječe količina prisutnoga ROS-a koja može transformirati NO u ONOO- i oksidirani tetrahidrobiopterin u dihidrobiopterin što dovodi do odvajanja eNOS-a i daljnje proizvodnje ROS-a. Pokazalo se da pojačana regulacija tetrahidrobiopterina koji poboljšava biorasploživost NOS-a poboljšava funkciju endotela i smanjuje proizvodnju superoksida. Suplementacija antioksidansa superoksid-dismutaze također je pokazala da poboljšava vazodilataciju koronarnih arterija ovisnu o endotelu (80,90). Utvrđeno je da liječenje L-argininom, prekursorom intracelularnoga NOS-a, poboljšava vazodilataciju ovisnu o endotelu kod pacijenata sa srčanim rizikom. Uz to, ograničenja kalorija tijekom 3-12 mjeseci dovode do pojačanog izražaja eNOS-a i stvaranja cGMP-a u različitim tkivima kod miševa. To je popraćeno mitohondrijskom biogenezom, povećanom potrošnjom kisika i proizvodnjom ATP-a i pojačanim izražajem sirtuina-1. Ti su učinci poništeni kod miševa s isključenim genom eNOS (91,92).

#### 1.4. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje kada je ravnoteža između prooksidacijskih i antioksidacijskih sustava poremećena. Oksidativni stres u endotelnim stanicama može biti induciran izloženosti čimbenicima kao što su oxLDL, visoka razina glukoze u plazmi, slobodne masne kiseline, homocistein, starenje, mokraćna kiselina, Ang-II, fine čestice iz zraka, arsen, trimetilamin-noksid (metabolit ovisan o crijevnoj flori) i dr. (93–101).

ROS u endotelnim stanicama uglavnom potječe od ksantin oksidaze, NADPH oksidaze, nevezanoga eNOS-a i disfunkcionalnih mitohondrija (102). Prekomjerne razine ROS-a oksidiraju makromolekule kao što su nukleinske kiseline, lipidi i proteini. Važno je da u vaskularnoj homeostazi antioksidacijski sustav, uključujući superoksid-dismutazu, katalazu, glutation peroksidazu, tioredoksin i peroksiredoksin, dominira nad prooksidacijskim putovima (103,104). Nedavne studije pokazale su da klasterin (105), protein toplinskoga šoka 22 (106) i nikotinamid nukleotidna transhidrogenaza (98) inhibiraju mitohondrijsko stvaranje ROS-a i suzbijaju endotelnu disfunkciju induciranu putem dijabetesa/Ang- II. Inhibicija sirtuina 3, razgradnja Nrf2, proizvodnja mitohondrijskih ROS-a i nedostatak CR6 interakcijskoga faktora 1 izazivaju prerano starenje endotelnih stanica (107). Kao regulator izražaja gena, mikroRNA također regulira funkciju endotela utječući na oksidativni stres. mikroRNA-92a potiče oksidativni stres i ubrzava endotelnu disfunkciju, dok se za miR-195-5p navodi da čuva funkciju endotela (108,109). Kuosmanen i sur. (110) pokazali su da miR-21-5p, miR-100-5p i miR-126-3p mogu posredovati u smanjenju transkripcijskoga čimbenika 2 povezanog s NF-E2 (Nrf2) tijekom starenja endotelnih stanica. Osim toga, smanjenje razine S-adenozilhomocisteina, prekursora homocisteina, inhibicijom aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze korištenjem kratke ukosnice RNA (shRNA) inducira endotelnu disfunkciju kod miševa putem mehanizma posredovanoga regulacijom p66shc (111).

S obzirom na važnu ulogu oksidativnoga stresa u endotelnoj disfunkciji, otkrivanje novih markera (npr. oksidativno modificiranih lipida i proteina) oksidativnoga stresa i primjena antioksidansa može predstavljati obećavajuću strategiju za prevenciju bolesti povezanih s endotelnom disfunkcijom.

Iako su mnoge studije bile usmjerene na antioksidativne učinke poznatih kardiovaskularnih lijekova, razvijeni su i novi spojevi koji ciljano djeluju na oksidativni stres (112). U posljednja dva desetljeća provedeno je nekoliko kliničkih ispitivanja i meta-analiza kako bi se procijenili



korisni učinci antioksidansa kao što su vitamin C, vitamin E, inhibitori ksantin oksidaze, a-lipoična kiselina, te sintetski agens NXY-059 (113–116).

Posljednjih godina svjedočimo razvoju aktivatora Nrf2, inhibitora NADPH oksidaze i ROS čistača mitoQ (117–121) kao obećavajućem novom pristupu antioksidansima. Osim toga, inhibitor poli(ADP-riboza) polimeraze PJ-34 poboljšava funkciju cerebromikrovaskularnoga endotela i poboljšava kognitivne sposobnosti kod starih miševa smanjenjem oksidativnoga stresa (122).

Slobodni radikali stvaraju se tijekom normalnoga staničnog metabolizma. Nastaju u mitohondrijima putem oksidativne fosforilacije, u endoplazmatskom retikulumu prijenosom elektrona u sustavu citokroma P-450, metabolizmom arahidonske kiseline u staničnim membranama, u peroksisomima oksidacijom masnih kiselina te fagocitozom (123).

Slobodni radikal može se definirati kao atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u valentnoj ljusci što ih čini nestabilnim i vrlo reaktivnim. Zbog svoje visoke reaktivnosti primaju elektrone od drugih molekula kako bi postigli stabilnost. Takva oksidirana molekula gubitkom elektrona i sama postaje slobodni radikal, započinjući kaskadu lančane reakcije koja konačno oštećuje živu stanicu. Najvažniji slobodni radikali koji nastaju tijekom metaboličkih reakcija radikali su koji potječu iz kisika, ROS. I reaktivni kisikovi radikali (ROS) i reaktivni dušikovi radikali (RNS) uključuju slobodne radikale i druge neradikalne reaktivne vrste (124). Primjeri radikala uključuju superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), kisikov radikal ( $O_2^{\cdot\cdot}$ ), hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ), alkoksilni radikal ( $RO\cdot$ ), peroksilni radikal ( $ROO\cdot$ ), dušikov monoksid ( $NO\cdot$ ) i dušikov dioksid ( $NO_2$ ). Neradikalne vrste uključuju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritnu kiselinu ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), nitratnu kiselinu ( $HNO_2$ ), i peroksinitrit ( $ONOOH$ ) (125,126). Ove neradikalne vrste nisu slobodni radikali, ali mogu lako dovesti do reakcija slobodnih radikala u živim organizmima (127).

ROS/RNS imaju dvostruku ulogu kao korisni i toksični spojevi za živi sustav. Umjerene ili niske razine ROS/RNS-a imaju korisne učinke, uključene su u različite fiziološke funkcije kao što su imunološka funkcija (tj. obrana od patogenih mikroorganizama), u nizu su staničnih signalnih puteva, u mitogenom odgovoru i u redoks-regulaciji, ali pri višoj koncentraciji i ROS i RNS stvaraju oksidativni i nitrozativni stres, uzrokujući potencijalno oštećenje biomolekula (125,126). Slobodni radikali uključeni su u mnoga patološka stanja, kao što su dijabetes, neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti (KVB), rak, katarakta, astma, reumatoidni artritis, upale, opekline, bolesti probavnoga trakta, progerije, ishemijske patologije itd. (123).

## 1.5. Uloga antioksidativnih enzima

Antioksidansi su tvari koje neutraliziraju višak slobodnih radikala, štite stanice od njihovih štetnih učinaka i doprinose prevenciji bolesti. Antioksidativni obrambeni sustav sastoji se od antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidansa. Prema sastavu antioksidanse dijelimo na enzime (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-transferaza,), proteine (ferritin, albumin, transferin, laktoferin) i male molekule (vitamin E, karotenoidi, vitamin C, glutation, alfa-lipoična kiselina, ubikinon, flavonoidi). Guttering i Halliwell klasificirali su antioksidanse na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni su uključeni u prevenciju nastanka slobodnih radikala (albumin, transferin). Sekundarni uklanjaju nastale slobodne radikale (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation, vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi). Tercijarni popravljaju nastala oštećenja (fosfolipaze, proteaze, peptidaze, DNA polimeraza I) (128,129).

Postoje tri izoforme superoksid-dismutaze (SOD): citosolni bakar/cink SOD (CuZn SOD ili SOD-1), mangan-SOD (MnSOD ili SOD-2) smješten u mitohondrijima i izvanstanični oblik EC-SOD ili SOD-3. SOD katalizira dismutaciju dviju molekula superoksidnoga aniona ( $\text{*O}_2$ ) u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i molekularni kisik ( $\text{O}_2$ ). Izražaj i aktivnost SOD-a zasigurno imaju velik utjecaj na odgovor vaskularnih stanica na akutni i kronični oksidativni stres (130). Snižena razina Cu/Zn SOD-a uslijed povišenih razina vaskularnoga superoksida i peroksinitrita povećava miogeni ton, smanjuje endotelno ovisnu (NO posredovanu) dilataciju velikih arterija i u mikrocirkulaciji te pojačava vazokonstriktorski odgovor (131–133). Promjene u izražaju utječu na vaskularnu strukturu; tako nedostatak Cu/Zn-SOD-a dovodi do hipertrofije moždanih arteriola (134).

Zbog svoje lokalizacije u mitohondrijima, MnSOD čini prvu liniju obrane od ROS-a, što dokazuje i studija provedena na miševima s potpunim nedostatkom MnSOD-a, u kojoj je deficit MnSOD-a doveo do velikih mitohondrijskih oštećenja i uginuća (135). Izražaj EC-SOD-a u vaskularnim stanicama može se mijenjati u odgovoru na razne podražaje, faktore rasta, citokine, Ang II, NO te tijekom hipertenzije i ateroskleroze (136–142).

Glutation-peroksidaze (GPx) su skupina osam (GPx1-8) enzima važnih za smanjenje razine  $\text{H}_2\text{O}_2$ . GPx su selenocistein enzimi koji koriste glutation kao redukcijsko sredstvo i zahtijevaju selen (143,144). Glutation-peroksidaza i katalaza smanjuju razinu vodikovoga peroksida

samostalnim djelovanjem, ali zajedničkim djelovanjem učinkovitije smanjuju njegovu toksičnost (145).

Katalaza (CAT) je enzim vrlo velike aktivnosti, jedna molekula katalaze može reducirati oko 6 milijuna molekula  $H_2O_2$  do vode i kisika u minuti. Najviše je zastupljena u jetri i eritrocitima (146,147).

Povećano zanimanje za ulogu oksidativnog stresa kod niza raznih bolesti usmjerilo je pozornost na istraživanje lijekova koji sprječavaju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) pripada skupini nitroksidnih spojeva koji imitiraju djelovanje superoksid dismutaze (SOD). Također, metabolizira i sprječava nastanak ili štetno djelovanje singlet kisika, hidroksilnog aniona, peroksidnog radikala i drugih ROS-a te pospješuje biorasploživost NO-a (148). Proučavani su u životinjskim modelima povećanja ROS-a i njegovih učinaka na endotelnu funkciju i hipertenziju (149).

### 1.6. Visok unos soli i vaskularna funkcija

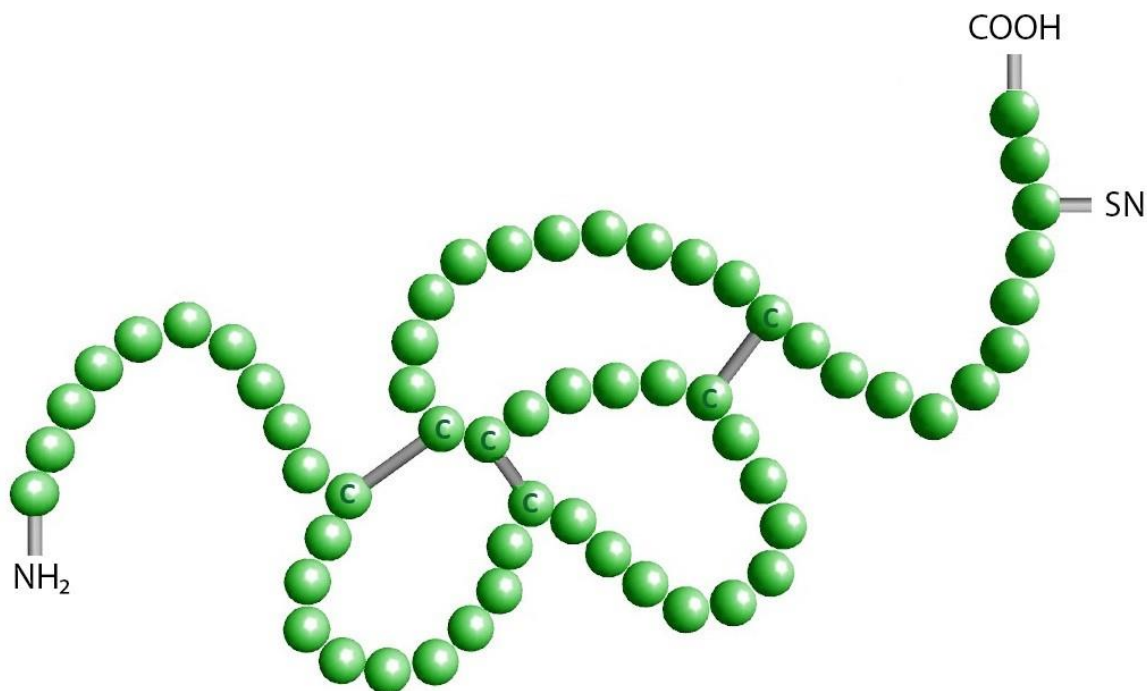
Visok unos soli (VS) predstavlja svjetski zdravstveni problem (148,149). Nedavna je studija pokazala da većina populacija ima srednji unos natrija veći od 100 mmol/d (2,30 g/d), a u mnogim populacijama (osobito azijskim zemljama) veći od 200 mmol/d (4,60 g/d) (150). Prekomjeran unos soli esencijalni je čimbenik rizika za razvoj i progresiju hipertenzije i cerebrovaskularne bolesti (151). Visok unos soli povezan je s poremećenom vaskularnom funkcijom, npr. utječe na mehanizme vazodilatacije ovisne o endotelu, povećanu razinu oksidativnoga stresa, smanjenu biorasploživost NO-a i osjetljivost na metabolite arahidonske kiseline, kao što je pokazano u studijama na životinjama i ljudima. Dokazano je da tjedan dana visokoslane dijeta smanjuje protokom posredovanu dilataciju brahijalne arterije, neovisno o promjenama arterijskog tlaka u zdravih ispitanika, dok visokoslane dijeta nije narušila acetilkolinom (ACh) i protokom induciranu dilataciju arteriola, ali je prebacila mehanizme vazodilatacije na puteve neovisne o NO. Istraživanja su pokazala da je vaskularna reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice u odgovoru na vaskularnu okluziju i stimulaciju acetilkolinom (ACh) smanjena nakon tjedan dana visokoslane dijeta kod zdravih ispitanika, u odsutnosti promjena arterijskog tlaka, sastava tijela i tjelesnih tekućina. Čavka i sur. pokazali su da je smanjenje vaskularne reaktivnosti bilo posljedica slabljenja endotelne funkcije nakon akutnog

unosa soli u čijem su posredovanju značajnu ulogu imali vazokonstriksijski metaboliti COX enzima, posebice COX-1 (152,153). Rezultati naših ranijih studija na Sprague -Dawley štakorima pokazali su da je visokoslana dijeta povećala razinu oksidativnog stresa, a iako aktivnost antioksidativnih enzima (katalaza, GPx i SOD) nije bila promijenjena, mRNA izražaj iNOS -a i antioksidativnog enzima GPx4 u srednjoj cerebralnoj arteriji bio je smanjen. Mehanizmi protokom posredovane dilatacije su različiti kod niskoslane i visokoslane dijetete – dilatacija središnje moždane arterije kod niskoslane skupine ovisna je o razini NO, metabolitima ciklooksigenaza i metabolitima EETs-a podjednako dok je protokom potaknuta dilatacija kod visokoslane dijetete isključivo ovisna o razini dostupnog NO (154–156).

### 1.7. Biološka svojstva TFF3 proteina

Obitelj trolisnih čimbenika proteina (TFF, engl. *Trefoil Factor Family*) sastoji se od skupine malih proteina, čiji je prvi član (TFF2) otkriven osamdesetih godina dvadesetoga stoljeća (157). TFF1 (ranije poznat kao peptid povezan s rakom dojke pS2), TFF2 (bivši spazmolitički polipeptid SP) i TFF3 (nekadašnji intestinalni trolisni faktor ITF) tri su člana obitelji trolisnih faktora (TFF) poznate kod sisavaca. Ime obitelji „*trefoil*“ faktor proteina potječe od motiva u obliku trolista djeteline koji nastaje u peptidnom lancu zbog disulfidnih veza. Dok TFF1 i TFF3 (Slika 1.1.) sadrže samo jednu trolisnu domenu, TFF2 sadrži dvije trolisne domene. Osnovni elementi trolisne domene su 42-43 aminokiselinska ostatka. Šest cisteinskih ostataka tvori tri disulfidne veze, stvarajući karakterističnu trolisnu strukturu (158,159).

Postoji nekoliko studija koje sugeriraju da se TFF proteini mogu regulirati citokinima i transkripcijskim čimbenicima (posebno NF- $\kappa$ B), ali postoje i podaci koji upućuju na suprotno (160–163).



**Slika 1.1.** *Struktura TFF3 proteina*

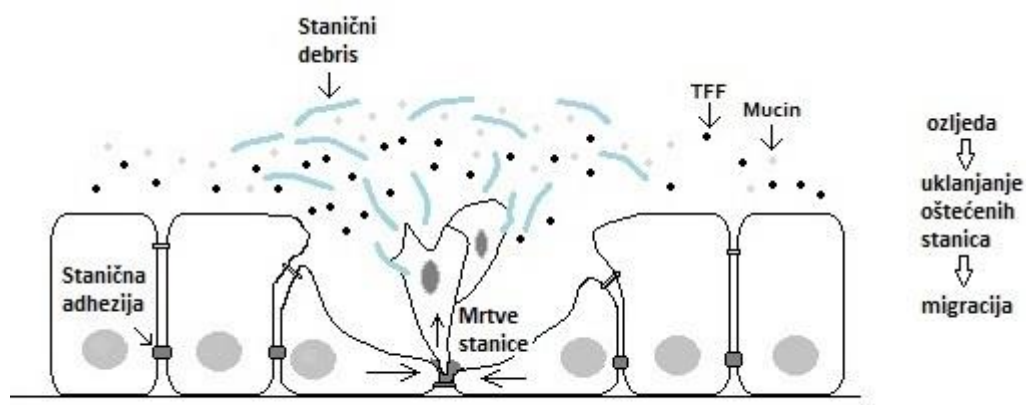
TFF3 proteini imaju tri disulfidne veze koje čine strukturu sličnu listu djeteline (engl. *trefoil*).

(Izvor: izradila autorica rada)

### 1.8. Uloga TFF-a u zaštiti i obnovi sluznice

Zbog svoje strukture, TFF proteini su izuzetno otporni na proteolitičku razgradnju u želucu i tankom crijevu (164). TFF proteini uglavnom se mogu naći kao izlučene molekule u sluzi koja prekriva epitel. Najprije su ti proteini proučavani u okviru probavnoga sustava, dok je kasnije utvrđeno da i u drugim epitelima stanice koje luče mucine sintetiziraju i TFF proteine te da se oni zajedno izlučuju. Izražaj pojedinih TFF proteina različit je u različitim tkivima. Sva tri TFF-a izražavaju se u želucu i lokalizirani su na površinskim stanicama želučane sluznice (165). Njihova mRNA pronađena je u mozgu, plućima, dušniku, štitnjači, žlijezdama slinovnicama, prostati, maternici i drugim organima (166). Geni za sva tri proteina nalaze se na dugom kraku 21. kromosoma (genomska regija 21q22.3) (167).

Unatoč činjenici da su pronađeni u gotovo svim tkivima koja sadrže stanice koje izlučuju sluz, TFF proteini pretežno se izražavaju u gastrointestinalnom traktu. S obzirom na njihovu pojavu u mukoznom tkivu, može se zaključiti da bi njihovo djelovanje moglo biti povezano s djelovanjem mucina. Ipak, izražaj TFF2 nije tako čest i postoji mogućnost da različiti TFF proteini imaju različite uloge u zaštiti epitela, što je potkrijepljeno komplementarnim izražajem TFF-a u GI traktu i istovremenom pojavom svakoga od njih s njihovim jedinstvenim tipom mucina (MUC); TFF1 se pojavljuje s MUC5AC, TFF2 s MUC6 i TFF3 s MUC2 (168–170), iako se također javlja želučana i okularna kolokalizacija TFF3 s MUC5AC (171,172). Pretpostavlja se da se obrana sluznice poboljšava izravnom interakcijom TFF peptida i mucina. Uloga TFF peptida u migraciji stanica uočena je u nekoliko studija (173–176), uglavnom kao posljedica odgovora oštećenoga epitela koji nastoji obnoviti svoj kontinuitet. U slučajevima maloga diskontinuiteta epitela, gdje nije potrebna stanična proliferacija, restitucija epitela odvija se ubrzo nakon ozljede, uz koordinaciju uklanjanja oštećenih stanica i migracije zdravih epitelnih stanica na ozlijeđeno mjesto (Slika 1.2) (177). Važnost učinkovite restitucije s fiziološkoga stajališta je velika, jer se gubitak tekućine i elektrolita mora zaustaviti, a luminalnim antigenima i bakterijama treba onemogućiti ulazak u tkivo domaćina.



**Slika 1.2.** Restitucija epitela

Nakon ozljede dolazi do uklanjanja oštećenih stanica i migracije zdravih epitelnih stanica na ozlijeđeno mjesto.

(Izvor: izradila autorica rada)

### 1.9. TFF i energetska metabolizam

Utjecaj TFF3 proteina na energetska metabolizam može se uočiti kod miševa s isključenim genom *Tff3*. Miševi s isključenim genom *Tff3* imaju drugačiji izražaj miRNA povezan s metaboličkim putevima glikolize i glukoneogeneze u usporedbi s miševima divljega tipa. Masne promjene u jetri miševa povezane su s promjenom izražaja *Tff3* gena (178). Istraživanja su pokazala da protein TFF3 sudjeluje u metabolizmu glukoze. Razine izražaja jetrenoga TFF3 bile su niže kod pretilih (ob/ob) i pretilih miševa izazvanih dijetom s visokim udjelom masti. Eksperimenti koji su koristili test tolerancije na glukozu i test tolerancije na inzulin pokazali su da prekomjerni izražaj TFF3 posredovan adenovirusom kod dijabetičkih ili pretilih miševa poboljšava toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin. Rezultati su također pokazali da su TFF3 peptidi čimbenik u homeostazi glukoze i osjetljivosti na inzulin. Slijedom toga, zaključeno je da bi navedeni peptid mogao biti dio uspješne terapije usmjerene na metaboličke poremećaje povezane s dijabetesom melitusom tipa 2 (179). Smanjenje regulacije TFF3 uočeno je kod bolesnika s dijabetesom mellitusom tipa 1, ali su vrijednosti modificirane liječenjem inzulinom. Otkriveno je da je inzulinska signalizacija važna za optimalni izražaj TFF3 u stanicama crijevnoga epitela, budući da podiže unutarstanične razine glukoze i posreduje u izražaju gena (180). Aberantni energetska metabolizam u jetri potiče rezistenciju na inzulin, dijabetes i nealkoholne masne bolesti jetre (181). Nedavno je pokazano da nakupljanje triglicerida u jetri ne uzrokuje staničnu ozljedu u jetri; primarni uzroci ozljede jetre zbog povećanoga oksidativnog stresa su slobodne masne kiseline ili njihovi metaboliti (182). Promjene u metabolizmu lipida, posebice povećanje zasićenih masnih kiselina, povezane su s povećanim stresom endoplazmatskoga retikuluma (ER), oksidativnim stresom i ozljedom jetre u tijeku razvoja bolesti masne jetre (28). Sirtuin 1 (SIRT1) igra ključnu ulogu u metaboličkoj regulaciji, prilagodbi i oksidativnom stresu. Djelujući kao nuklearni metabolički senzor i deacetilirajući širok raspon ciljeva, dovodi do epigenetskih modifikacija histona i modulacije transkripcijskih čimbenika ili metaboličkih enzima (183). Uz SIRT1, receptori aktivirani proliferatorom peroksisoma (PPAR) također imaju važnu ulogu u metabolizmu stanica (184). Nedostatak TFF3 utječe na profil i nakupljanje masnih kiselina (FA) u jetri (Tablica 1.1.) (177) bez očitoga povećanja oksidativnoga stresa, iako se izražaj/aktivnost praćenih enzima mijenja, kao i razina proteina SIRT1 i PPARg. Zbog smanjene regulacije jetrenoga TFF3 kod dijabetičkih/pretilih miševa, njegove prisutnosti u cirkulaciji i njegove regulacije hranom/inzulinom, TFF3 zanimljiv je novi kandidat za istraživanje metaboličkih stanja (185).

**Tablica 1.1.** Masne kiseline u jetri miševa s isključenim genom *Tff3* u odnosu na divlji tip.

Masne kiseline	Tff3 <sup>-/-</sup>
<b>ZASIĆENE</b>	
C14:0 miristinska kiselina	↓
C18:0 stearinska kiselina	↑
C20:0 arahidna kiselina	↑
<b>MONONEZASIĆENE</b>	
C16:1 palmitoleinska kiselina(ω-9)	↓
C18:1 oleinska kiselina (ω-9)	↓
C18:1 vakcenska kiselina (ω-7)	↓
C20:1 eikozenska (gondoična kiselina) (ω-9)	↓
<b>POLINEZASIĆENE</b>	
C20:2 eikosadienska kiselina (ω-6)	↑
C20:4 (AA) arahidonska kiselina (ω-6)	↑
C18:3 (ALA) alpha linolenska (ω-3)	↓
C22:6 (DHA) dokosaheksaenoična (ω-3)	↑
OMJER ω-3/ω-6	↑

(povišen ↑, snižen ↓)

(Izvor: izradila autorica rada.)

### 1.10. Sudjelovanje TFF3 proteina u obrani od štetnih čimbenika

Miševi koji ne mogu sintetizirati dovoljno TFF3 proteina u svojoj jetri lišeni su zaštitnoga učinka TFF3 proteina u serumu nakon ishemije miokarda i mozga (186), što posljedično dovodi do jačega oštećenja tkiva. Kod takvih miševa uočena je značajno veća aktivnost kaspaze 3, koja potiče apoptozu nakon ozljede moždanoga tkiva. Budući da su miševi imali manjak TFF3, rekombinantni TFF3 davan je intravenozno i potaknuo je promjene u cerebralnoj ozljedi i motoričkoj funkciji prednjih ekstremiteta, ukazujući na postojanje endokrinoga neuroprotektivnog mehanizma koji koristi TFF3 iz jetre u eksperimentalnoj cerebralnoj



ishemiji/reperfuzijskoj ozljedi (187). Miševi s isključenim genom *Tff3* imaju poteškoća s regeneracijom sluznice gastrointestinalnoga trakta (188).

Prema provedenome istraživanju, iako peptid TFF3 nije izražen u netaknutome epitelu rožnice, njegov izražaj značajno je povišen nakon ozljede epitela. Uz to, ozljedama rožnice kod miševa s isključenim genom *Tff3* potrebno je mnogo više vremena za ponovnu epitelizaciju u usporedbi sa sličnim ozljedama kod miševa divljeg tipa. U slučaju povreda rožnice izazvanih alkalijama vanjska primjena rekombinantnoga TFF3 na rane ubrzava *in vivo* i na modelu kombinirano *in vivo/in vitro* zacjeljivanje rana i kod divljega tipa i kod miševa s isključenim genom *Tff3*. To dokazuje da TFF3 ima ključnu ulogu u mehanizmu zacjeljivanja rana rožnice, što otvara nove mogućnosti liječenja rana koje teško zacjeljuju (189).

### 1.11. TFF u dišnome sustavu, trudnoći i tumorigenezi

Studija koja opisuje model mišje astme pokazala je da trans-diferencirajuće Clara stanice specifično izražavaju TFF1 koji je pohranjen u specifičnoj podskupini sekretornih granula (190). To je dokaz da je TFF1 autokrini faktor za trans-diferencijaciju Clara stanica u vrčaste stanice. Druga studija pokazala je da TFF igraju takvu ulogu i u diferencijaciji dišnih putova, pokazujući indukciju sinteze TFF3 s diferencijacijom u *in vivo* humaniziranom trahealnom ksenotransplantatu i *in vitro* modelima. Dodatno tome, egzogeni TFF3 potaknuo je diferencijaciju cilijarnih stanica na način ovisan o EGF-receptoru (191). Obje studije implicirale su da TFF može imati važnu ulogu u različitim procesima diferencijacije dišnih putova, što ih čini novim ciljevima u liječenju teških kroničnih i akutnih bolesti dišnih putova.

Dinamičke promjene TFF3 proteina u serumu trudnice ukazuju na njihovu važnost u embriogenezi (192). Dokazana je prisutnost proteina TFF3 u hrskavici fetusa miševa tijekom endohondralne osifikacije, dok isključenje *Tff3* gena uzrokuje promjene histomorfološke strukture spongiozne kosti te poremećaje sluha, što ukazuje na ulogu u morfogenezi organa (193–195).

*Tff3* gen sudjeluje u proliferaciji stanica gušterače – smanjeni izražaj *Tff3* gena dovodi do smanjene proliferacije stanica gušterače, dok povišen izražaj dovodi do povećane proliferacije stanica gušterače, bez utjecaja na njihovu funkciju (196).

Protein TFF3 također je povezan s angiogenezom, što ga čini važnim čimbenikom u patogenezi tumora (197). Istraživanja su pokazala povišen izražaj gena *Tff3* u tumorima probavnoga sustava i pluća, uznapredovalome karcinomu prostate, hepatocelularnome karcinomu i drugim tumorima (198–201). Izražaj *Tff3* gena ima prediktivnu ulogu u tumorima dojke (202) i vrijedan je biomarker u probiru za rak želuca. Štoviše, serumski TFF3 mogao bi predvidjeti rak želuca učinkovitije od PG testa, dok bi kombinirano testiranje serumskoga PG (pepsinogen test) i TFF3 moglo učiniti probir raka želuca još učinkovitijim (203).

*Tff3*<sup>-/-</sup> / C57BL / 6N miševi predstavljaju novi model za proučavanje vaskularne funkcije, aterosklerotskih lezija i sinteze proupalnih citokina zbog promijenjenoga metabolizma lipida, modificiranoga metabolizma arahidonske kiseline i povoljnoga omjera  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 masne kiseline u jetri. Miševi s isključenim genom *Tff3* imaju povećanu količinu malih lipidnih vezikula u hepatocitima, bez učinka na biljege oksidativnoga stresa u jetri koji su često povezani s promijenjenom homeostazom lipida u jetri (185).

Zbog svega navedenog potreba za provođenjem ovog istraživanja proizlazi iz ograničenog broja dostupne literature o ulozi TFF3 peptida na vaskularnu funkciju.

## 2. HIPOTEZA

Vazodilatacija kod miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N kod visokoslane dijeta bit će očuvana u odnosu na kontrolnu skupinu miševa divljeg tipa (WT miševa C57BL/6N).

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti ulogu TFF3 peptida u vaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu izoliranih krvnih žila.
2. Identificirati specifične mehanizme kojima TFF3 peptid utječe na vazodilataciju potaknutu protokom kod miševa divljeg tipa (WT miševa C57BL/6N) te kod miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N.
3. Odrediti učinak visokoslane dijeta na proteomiku kod miševa divljeg tipa te kod miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N.
4. Odrediti učinak isključenja gena *Tff3* i visokoslane dijeta na ishod eksperimentalno izazvanog moždanog udara.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Životinje su konzumirale komercijalno dostupnu hranu za male laboratorijske životinje (Mucedola, Italija), standardnu (0.4 % NaCl) i visokoslanu (4 % NaCl). Hranu i vodu (ili vodu u kojoj je otopljen TEMPOL, 1 Mm) životinje su uzimale prema vlastitoj potrebi tijekom sedam dana. Nakon sedam dana dijete miševi su izvagani te anestetizirani kombinacijom ketanesta S 75 mg/kg (Ketanest S 25 mg/ml, ampule 2ml, Pfizer) i midazolama 0,5 mg/kg (Midazolam Torrex 5 mg/ml, 3 ml, Torrex Chiesi Pharma). Miševima je prije dekapitacije izmjeren krvni tlak te je prikupljena krv. Zatim su životinje dekapitirane te je izolirana karotidna arterija (funkcionalne studije) i aorta (rtPCR, WB). Svi eksperimentalni postupci usklađeni su s europskim smjernicama za skrb i primjenu laboratorijskih životinja (direktiva 86/609) te su poduzete sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja. Navedena istraživanja su odobrena za provedbu od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek (2158-61-07-18-138, 2158-61-07-19-136, 2158-61-07-20-164, 2158-61-07-21-187) te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-10/0255-19-7, 525-10/1315-20-3, 525-10/1338-21-4, 525-09/559- 22-3).

#### 4.2. Ispitivane skupine

Istraživanje je provedeno na miševima muškoga spola u dobi od 8 do 10 tjedana starosti. Miševi su bili podijeljeni u osam skupina:

- 1) Niskoslana (NS) skupina miševa divljega tipa (WT miševi C57BL/6N) konzumirala je standardnu hranu za miševe (0,4 % NaCl-a) i običnu pitku vodu sedam dana; WT NS
- 2) Niskoslana (NS) skupina miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N konzumirala je standardnu hranu za miševe (0,4 % NaCl-a) i običnu pitku vodu sedam dana; TFF3 NS
- 3) Visokoslana (VS) skupina miševa divljeg tipa (WT miševi C57BL/6N) konzumirala je hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i običnu pitku vodu sedam dana; WT VS
- 4) Visokoslana (VS) skupina miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N konzumirala je hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i običnu pitku vodu sedam dana; TFF3 VS

## 4. MATERIJALI I METODE

5) Niskoslana (NS) skupina miševa divljeg tipa (WT miševi C57BL/6N) konzumirala je standardnu hranu za miševe (0,4 % NaCl-a) i vodu s otopljenim TEMPOL-om sedam dana ; WT NS + TEMPOL

6) Niskoslana (NS) skupina miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N konzumirala je standardnu hranu za miševe (0,4 % NaCl-a) i vodu s otopljenim TEMPOL-om sedam dana; TFF3 NS + TEMPOL

7) Visokoslana (VS) skupina miševa divljeg tipa (WT miševi C57BL/6N) konzumirala je hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i vodu s otopljenim TEMPOL-om sedam dana; WT VS + TEMPOL

8) Visokoslana (VS) skupina miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N konzumirala je hranu s visokim udjelom soli (4 % NaCl-a) i vodu s otopljenim TEMPOL-om sedam dana; TFF3 VS + TEMPOL

U svakoj skupini bilo je po deset miševa.

### 4.3. Mjerenje krvnoga tlaka

Miševi su anestezirani ketamin kloridom (100 mg/kg) i midazolamom (5 mg/kg) i prebačeni na grijrač. Neinvazivna metoda za mjerenje krvnoga tlaka miša provedena je postavljanjem okluzivne manžete koja nakon napuhavanja zaustavlja protok krvi na bazu repa. Kako je okluzivna manžeta polako ispuhivana, za praćenje krvnoga tlaka korištena je manžeta (VPR) postavljena distalno od okluzivne manžete.

Kada je tjelesna temperatura životinje dosegla 38,5 °C započeli su ciklusi mjerenja. Cijeli set (20 ciklusa) traje oko 15 min. Za pouzdano konačno očitavanje krvnoga tlaka mora biti valjano najmanje deset ciklusa (204–206).

### 4.4. Skupljanje uzoraka miješane krvi

Nakon mjerenja krvnoga tlaka prikupljeni su miješani uzorci krvi u epruvetu bez antikoagulansa kako bismo dobili uzorak seruma. Krv je centrifugirana 10 min/3500 rpm te je

serum pohranjen u hladnjaku na  $-80^{\circ}\text{C}$  do upotrebe u svrhu određivanja pojedinih biokemijskih parametara, antioksidativnih enzima (GPx), oksidiranih lipoproteina niske gustoće (oxLDL), naprednih oksidiranih proteinskih produkata (AOPP) i koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 i CRP-a. Razine ukupnoga kolesterola u serumu, lipoproteina visoke gustoće (HDL), lipoproteina niske gustoće (LDL), triglicerida (TG), glukoze, aspartat transaminaze (AST), alanin transaminaze (ALT), ureje, ukupnih proteina (TP), mokraćne kiselina, alkalne fosfataze i C-reaktivnoga proteina (CRP) određene su u laboratoriju pomoću Architect c8000 instrumenta (Abbot).

### 4.5. Funkcionalna studija - protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije

Nakon dekapitacije pomoću mikrokirurškoga pribora i operacijskoga mikroskopa izolirana je karotidna arterija te je postavljena između staklenih mikropipeta (vanjskoga promjera  $\sim 150\text{--}250\ \mu\text{m}$ ) smještenih u komorici koja je ispunjena toplom ( $37^{\circ}\text{C}$ ) fiziološkom slanom otopinom (PSS,  $\text{pH} = 7,4 \pm 0,05$ ) sastava (u mM / l): 119 NaCl (Kemika, Hrvatska), 4,7 KCl (Kemika, Hrvatska), 1,17  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{MgSO}_4$  (Merck), 1,18  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Hrvatska), 24  $\text{NaHCO}_3$  (Merck), 0,026 EDTA (Sigma-Aldrich) i 5,5 glukoze (Kemika, Hrvatska). Sustav je kontinuirano oksigeniran smjesom plinova s 21 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$  i balans  $\text{N}_2$ . Krajevi karotidne arterije pričvršćeni su tankim šavom (10-0 nylon Black) za pipete. Nakon postavljanja u komoricu arterija je inkubirana 60 minuta pri tlaku  $\Delta 80\ \text{mmHg}$  (P1 80 mmHg, P2 0 mmHg). Žila je cijelo vrijeme snimana infracrvenom kamerom uz prikaz slike na monitoru. Promjena promjera krvne žile mjerena je pomoću softvera Pressure Myograph System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT (Danish Myo Technology) (154,155,207,208). Kao bazični odgovor mjerena je unutarnji promjer žile nakon inkubacije, a zatim nakon protokom-posredovane promjene promjera, koja se postiže različitim gradijentima tlaka,  $\Delta 100$ ,  $\Delta 120$ ,  $\Delta 140$ ,  $\Delta 160$ ,  $\Delta 180\ \text{mmHg}$ . Za procjenu endotelno ovisne vazodilatacije korišten je acetilkolin (ACh, Fluka). Protokom potaknuta dilatacija krvnih žila mjerena je u odsutnosti i prisutnosti: a) inhibitora NO sintaze (NOS), N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estera (L-NAME, Sigma-Aldrich); b) inhibitora ciklooksigenaze, indometacina (INDO, Sigma-Aldrich); c) selektivnoga inhibitora CYP450 epoksidaze, MS-PPOH (donacija John R. Falck, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; d) NO donora, natrijeva nitroprusida (SNP, Sigma-Aldrich); e) agonista i antagonist kalijevih kanala osjetljivih na kalcij ( $\text{KCa}^{2+}$ , NS-1619; iberiotoksin, Biosynth); ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, cromakalim; glibenclamide, Sigma-

Aldrich) i TRPV4 (GSK1016790A i RN-1734, Sigma-Aldrich) i f) "hvatača" superoksidnih radikala, TEMPOL-a (Sigma-Aldrich). Na kraju pokusa karotidna arterija je perfundirana s otopinom PSS-a bez iona kalcija kako bi se utvrdio maksimalni promjer krvne žile.

### 4.6. Izazivanje ishemijskoga oštećenja mozga

Za izazivanje ishemijskoga oštećenja mozga miša korištena je unilateralna intraluminalna okluzija srednje moždane arterije, tj. MCAO metoda (engl. *middle cerebral artery occlusion method*) u trajanju od 60 minuta. (209,210). Prije zahvata mišu je intraperitonealno (i. p.) primijenjena fiziološka otopina u volumenu od 0,2 ml i subkutano (s.c.) 0,03 mg/kg buprenorfin (Buprenoret, Bayer, Germany) za analgeziju. Životinje su anestezirane postavljanjem u indukcijsku komoru s 4 % izoflurana (Isoflurane, Abbott, UK) te održavane pod anestezijom mješavinom 1,5-2 % izoflurana i kisika korištenjem vaporizatora. Miš je tijekom cijeloga zahvata položen na grijanu podlogu koja održava tjelesnu temperaturu na 37,0 °C, čime se izbjegava moguća hipotermija miša.

Nakon aseptičke pripreme kirurškoga mjesta napravljen je mali rez na desnome temporalnom mišiću u rostralnome dijelu temporalnoga područja, dorzalno u odnosu na retroorbitalni sinus. Potom je postavljena kalibrirana laserska sonda promjera 1 mm (Moor Instruments, Millwey, Devon, UK) kako bi se pratile promjene cerebralnoga krvotoka MCA na laserskom dopler perfuzijskom monitoru (Moor Instruments, Millwey, Devon, UK) nakon postavljanja filameta. Izveden je zasjek u području vrata, odmaknuto meko tkivo i žlijezde slinovnice te su izložene lijeva zajednička karotidna arterija te vanjska i unutrašnja karotidna arterija rasijecanjem od okolnoga tkiva i živaca. Okluzija srednje moždane arterije provedena je uvođenjem kirurškoga konca obloženoga silikonom (monofilament), debljine 6-0 (Docol Corporation, Sharon, MA, SAD) prvo u lijevu unutrašnju karotidnu arteriju te nakon njezinoga grananja u srednju moždanu arteriju.

Nakon 60 minuta okluzije životinje su ponovno anestezirane i reperfuzija je pokrenuta uklanjanjem filameta. Uspješno postignutom okluzijom smatra se kada je kod životinja moždani protok < 20 % nakon okluzije i neposredno prije izvlačenja katetera. Lijeva zajednička karotidna arterija bila je trajno vezana. Nakon operacije životinje su liječene buprenorfinom kako bi se postiglo postkirurško ublažavanje bola. Hrana je omekšavana vodom kako oštećenje vratnih mišića potrebnih za žvakanje ne bi dovelo do kaheksije. Životinje su vagane prije i 24 h nakon operacije.



### 4.7. Procjena neurološkoga oštećenja

Miševi su podvrgnuti procjeni neurološkoga oštećenja, modificiranom metodom koja je opisana u literaturi (211–213). Ocjena neurološkoga deficita provedena je prije i 24 sata nakon MCAO-a pomoću ljestvice od pet stupnjeva.

Procjenjivani parametri bodovani su sljedećim vrijednostima:

0 bodova - normalna motorička funkcija

1 bod - miševi koji su pokazivali slabost (nemogućnost ispružanja) prednjih udova te okretanje torza prema ipsilateralnoj strani pri pridržavanju miša za rep

2 boda - kruženje miševa tijelom prema oštećenoj strani pri kretanju unutar kaveza

3 boda - nemogućnost podnošenja težine na oštećenoj strani prilikom pridržavanju miša za rep

4 boda - nedostatak spontane lokomotorne aktivnosti

### 4.8. Histomorfološka analiza aorte

Aorte miševa s isključenim genom *Tff3* i WT miševa na NS i VS dijeti fiksirane su u 4 % paraformaldehidu, uklopljene u parafinske blokove te izrezane na dijelove debljine 6  $\mu\text{m}$  mikrotomom (Leica SM 2000R, Leica, Wetzlar, Njemačka). Rezovi su deparafinirani i obojeni orcein bojom za prikaz elastičnih vlakana i picosirius crvenom bojom za prikaz kolagenih vlakana. Korišteno je 1 % orceina u 70 % etanolu, rezovi su držani u otopini 3 h, diferencijacija je učinjena u 1 % HCl u 70 % etanola tijekom 5 minuta, a za pozadinsko bojenje korištena je zasićena pikrinska kiselina u 96 %-tnome etanolu. Metoda za prikaz kolagenih vlakana izvedena je prema Puchtleru (214). Rezovi su pregledani pod Zeiss Axioskop 2 FS MOT mikroskopom (Zeiss, Oberkochen, Njemačka), fotografije su snimljene digitalnim fotoaparatom Olympus DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) pod 10x objektivom. Digitalne slike obrađene su u programu FIJI (FIJI is Just Image J) (215,216). Za obje tehnike bojenja alat za prag boje uspješno je korišten za izradu crno-bijelih maski koje sadrže elastin ili kolagen. Nadalje, digitalne slike obrađene su u programu Gimp (GNU Image Manipulation Program, GIMP tim, GIMP 2.10.10, [www.gimp.org](http://www.gimp.org)) kako bi se stvorile maske označene bojama koje označavaju različite slojeve i strukture aorte koje treba analizirati. Crno-bijele maske i maske u boji otvorene su i analizirane u FIJI programu. Udio elastičnih vlakana i udio kolagenih vlakana u tkivu stijenke aorte izračunati su iz površine elastina ili kolagena podijeljene s površinom

tkiva aortalne stijenke i izražene kao %. Debljina medije i adventicije izražene su kao % debljine stijenke aorte. Prebrojane su elastične lamele i izmjerena je površina lumena.

### 4.9. Određivanje razine dušikovoga oksida i superoksida *in situ* metodom fluorescencije

Razina stvaranja dušikovoga oksida procijenjena je pomoću DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein, Santa Cruz Biotechnology) boje. Za određivanje stvaranja superoksida korištena je DHE (Dihydroethidium, Santa Cruz Biotechnology) boja (20 $\mu$ M) (154,208,217). Nakon 30 min bazične inkubacije uslijedila je inkubacija žile s fluorescentnom bojom, 45 min pri 37 °C u HEPES otopini (pH 7,4; sastav: 137 mM NaCl (Kemika, Hrvatska); 5,4 mM KCl (Kemika, Hrvatska); 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub> (Merck); 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska); 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska); 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (Kemika, Hrvatska); 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O (Kemika, Hrvatska); 10 mM glukoza (Kemika, Hrvatska); 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich) i 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O (Merk)). Tubice su zaštićene od djelovanja svjetlosti aluminijskom folijom i držane su u CO<sub>2</sub> inkubatoru na konstantnoj temperaturi 37 °C. Nakon 45 minuta inkubacije žile su isprane svježim HEPES puferom tri puta te nakon toga slikane na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere. Slike su procesuirane i analizirane ImageJ softverom. Intenzitet boje određen je pomoću ImageJ programa (National Institute of Health).

### 4.10. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima (GPx) u serumu

Aktivnost antioksidativnoga enzima GPx u serumu mjerila se pomoću standardiziranoga protokola spektrofotometrijskom metodom, pomoću Lambda 25UV-Vis spektrofotometra (155,217,218). Metoda mjerenja aktivnosti GPx zasnovana je na principu oksidacije reduciranoga oblika glutationa (GSH), koju provodi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri čemu nastaje oksidirani glutation disulfid (GSSG). GSSG se zatim regenerira u prisutnosti glutation-reduktaze (GR), a reakcija je ovisna o NADPH kao reducensu (donoru elektrona). Prati se pad apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm, do kojega dolazi zbog oksidacije i smanjenja koncentracije NADPH, odnosno otpuštanja elektrona i nastanka NADP<sup>+</sup>.

### 4.11. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u serumu korištena je metoda po Bradfordu (1967). Postupak se temelji na nespecifičnom vezanju anionskoga oblika boje Coomassie briljant plavo G-250 (CBB G-250) za proteine u kiselom mediju, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein – boja. Zatim je na spektrofotometru izmjeren intenzitet obojenja otopine pri valnoj duljini 595 nm. Za standardizaciju je korišten albumin goveđeg seruma (BSA, Sigma-Aldrich) u području koncentracija  $0.01 - 0.15 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ . Iz vrijednosti izmjerenih apsorbancija poznatih koncentracija BSA dobiva se standardna krivulja iz koje se potom određuje koncentracija proteina u serumu.

### 4.12. Mjerenje biljega oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP) spektrofotometrijskim metodama

Oksidirani lipoprotein niske gustoće (oxLDL) i napredni oksidirani proteinski produkti (AOPP) mjereni su u uzorcima seruma komercijalno dostupnim kitovima u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju (Advanced oxidation protein products (AOPP), MyBioSource, USA; Oxidized Low- Density Lipoprotein (oxLDL), Aviva Systems Biology, USA).

### 4.13. Relativni izražaj gena određen PCR metodom u stvarnom vremenu

U zasebnoj skupini pokusa iz uzoraka mišjih aorti određen je genski izražaj antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, GPx1 i katalaze) i važnih biljega upale (IL-6, TNF alfa i IL-17A) metodom rtPCR na uređaju Bio Rad CFX96. Uzorci su smrznuti u tekućem dušiku i do daljnje obrade pohranjeni na  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ukupna RNA ekstrahirana je pomoću TRI Reagent (Molecular Research Center, INC), prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća RNA provjerena je pomoću NanoDrop (Thermo Scientific). Upotrebom Deoxyribonuclease kita (Sigma) ukupna RNA dodatno je pročišćena od gDNA. Reverzna transkripcija učinjena je pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription kita (Applied Biosystems), prema uputama proizvođača na MyCycler thermal cycler (BioRad). Izražaj je određena uporabom jedinstveno dizajniranih („*custom made*“) primera na Primer Express (Applied Biosystems) sustavu uporabom ABsolute

QPCR SYBR Green low ROX master mix-a (Thermo scientific). Izražaj gena izražen je preko dva „housekeeping gena“ - HPRT i 18S.

### 4.14. Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, , IL-6 i CRP-a u serumu

Koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, , IL-6 i CRP-a u serumu izmjerene su pomoću kita (Invitrogen ProcartaPlex kits, Thermo Fisher Scientific i panela za multipleks kvantifikaciju proteina korištenjem Luminex 200 instrumenta prema uputama proizvođača. Mjerenja su provedena u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku KBC-a Osijek. Kvantifikacija je provedena pomoću softvera ProcartaPlex Analyst i izražena kao koncentracija u pikogramima po mililitru.

### 4.15. Relativni izražaj proteina

Određen je relativni izražaj proteina COX-1, COX-2 CYP2C9, CYP2J2, iNOS i eNOS, ionskih kanala (KCa, TRPV4) u izoliranim mišjim aortama. Pulirana su po dva uzorka. Protokol ekstrakcije i homogenizacije proteina uspostavljen je u laboratoriju Medicinskoga fakulteta Osijek (154,208,219,220). Tkivo je homogenizirano u tekućem dušiku na ledu s ULTRA-TURRAX homogenizatorom (IKA, Njemačka) pomoću pufera za homogenizaciju (koji sadrži 10 mmol / L Tris baze, 1 mmol / L EDTA, 0,4 % SDS (Acros Organics, SAD), koktel inhibitora proteaze (4 $\mu$ L / 100  $\mu$ L, Sigma-Aldrich)) i centrifugirano na 15000 g, 30 min, i 4 °C. Bio-Rad Mini PROTEAN tetra Cell and Criterion blotter korišten je za SDS-PAGE elektroforezu (100V) i za prijenos (200mA, 2 sata ) na PVDF membrane te inkubiran s primarnim antitijelom preko noći na 4 °C (COX-1-HRP mouse MonoAB, Santa Cruz Biotechnology, USA, #sc-19998, 1:500; COX-2-HRP mouse MonoAB, Santa Cruz Biotechnology, USA, #sc-376861, 1:500; iNOS rabbit PolyAB, Novus Biological, USA, #NB300-605, 1:500; eNOS rabbit PolyAB, Novus Biological, USA, #NB300-500, 1:1000; CYP2C9 rabbit PolyAB, MyBioSource, USA, #MBS9126586, 1:1000; CYP2j2 rabbit PolyAB, MyBioSource, USA, #MBS9604129, 1:1000; TRPV4 rabbit PolyAB, Thermo Fisher Scientific, USA, #OSR00136W, 1:500; KCNMB1 rabbit PolyAB, Thermo Fisher Scientific, USA, #PA1-924, 1:500). Sljedećega dana membrana je inkubirana odgovarajućim sekundarnim antitijelom označenim peroksidazom hrena (HRP)

## 4. MATERIJALI I METODE

(goat anti-rabbit HRP, Abcam, UK, #ab205718, 1:7500). Detekcija kemiluminiscencije pomoću Pierce ECL Western Blotting supstrata izvršena je prema uputama proizvođača, a signal je zabilježen na Bio-Rad ChemiDoc Imager. Detektirani izražaj proteina obrađen je i analiziran softverom ImageJ (National Institutes of Health) prema uputama programera softvera. Razine izražaja proteina normalizirane su na izražaj  $\beta$ -aktina ( $\beta$ -actin-HRP, mouse MonoAb, Abcam, UK, #ab49900, 1:30000) i izražene kao relativne razine proteina.

### 4.16. Izražaj mRNA jetre određen PCR metodom u stvarnom vremenu

Za izolaciju RNA iz uzoraka tkiva jetre miševa s isključenim genom *Tff3* i WT kontrola na NS i VS dijete korišten je RNeasy Mini Kit (Qiagen). Izolirana RNA prevedena je u cDNA pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription seta kemikalija (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Kvantitativna reverzna transkripcijska polimerazna lančana reakcija (qRT-PCR) provedena je korištenjem boje SYBR Green I (Invitrogen) na PCR uređaju (StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Barcelona, Španjolska) prema sljedećim postavkama: inicijacija 95°C kroz 3 min 40 ciklusa, denaturacija 95 °C kroz 1 min, temperatura za vezivanje početnica kroz 30 s te elongacija 72 °C kroz 30 s. Popis specifičnih početnica (Applied Biosystems) optimiziranih uvjeta za PCR navedeni su u Tablici 2. Nastali produkti analizirani su programom krivulje taljenja (engl. *melting curve*). Izražaj gena analiziran je na osnovi  $\Delta\Delta C_t$  metode pomoću REST© programa (Quiagen). Kao referentni geni (tzv. "*housekeeping geni*") korišteni su  $\beta$ -aktin i  $\beta 2$ -mikroglobulin. Promjene su prikazane kao  $\log_2$ . Oligonukleotidi korišteni za Q-PCR analizu navedeni su u Tablici 4.1.

#### 4. MATERIJALI I METODE

**Tablica 4.1.** Oligonukleotidi korišteni za Q-PCR analizu.

Gen	No.	Počelnica slijed Naprijed (5'-3') natrag (5'-3')	Optimizirani PCR uvjeti (temperature vezanja početnica /MgCl <sub>2</sub> )
<b>ER stress markeri</b>			
ATF4	NM_009716.3	CCACTCCAGAGCATTCTTTAG CTCCTTTACACATGGAGGGATTAG	59 °C; 3,5 mM
BIP	NM_001163434.1	GAGACTGCTGAGGCGTATTT CAGCATCTTTGGTTGCTTGTC	58 °C; 3,5 mM
CHOP	NM_007837.4	TTGAGCCTAACACGTCGATTAT CACTTCCTTCTGGAACACTCTC	58 °C; 3 mM
EDEM	NM_138677.2	TGAAAGCATGTGAGGGTAGTG GAGAGAAGGGAAGACAGGATAGA	61 °C; 3,5 mM
GRP94	NM_011631.1	AAGAATGAAGGAAAAACAGGACAAAA CAAATGGAGAAGATTCCGCC	58 °C; 3 mM
sXBP1	NM_008934.4	GAGTCCGCAGCAGGTG GTGTCAGAGTCCATGGGA	56 °C; 3 mM
<b>Citokini</b>			
CXCL1	NM_008176.3	GTGTCAACCACTGTGCTAGT CACACATGTCCTCACCTAATAC	61 °C; 3,5 mM
IL1 $\alpha$	NM_010554.4	CCTTACACCTACCAGAGTGATTT CCTTACACCTACCAGAGTGATTT	65 °C; 3 mM
IL1 $\beta$	NM_008361.4	ATGGGCAACCACTTACCTATTT GTTCTAGAGAGTGCTGCCTAATG	64 °C; 3 mM
IL6	NM_031168.2	GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG TTGCCGAGTAGATCTCAAAGTG	59 °C; 3,5 mM
MCP1	NM_011333.3	CCTGGATCGGAACCAAATGA CGGGTCAACTTCACATTCAAAG	62 °C; 3 mM
TGF $\alpha$	NM_031199.4	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG GTGTGTCCAGGCTCCAAATA	66 °C; 3 mM
TNF $\alpha$	NM_013693.3	GTCTCAGAATGAGGCTGGATAAG CATTGCACCTCAGGGAAGAA	63 °C; 2,5 mM
<b>Markeri oksidativnoga stresa</b>			
COX1	NM_008969.4	GTGCCAGAACCAGGGTGTCT GTAGCCCGTGCGAGTACAATC	58 °C 3 mM
GPX1	NM_008160.6	GGTTCGAGCCCAATTTTACA CATTCGCAGGAAGGTAAAG	58 °C 2,5 mM
NOX2	NM_007807.5	ACTCCTTGGGTCAGCACTGG GTTCTGTCCAGTTGTCTTCG	62 °C 3 mM

## 4. MATERIJALI I METODE

Gen	No.	Počelnica slijed Naprijed (5'-3') natrag (5'-3')	Optimizirani PCR uvjeti (temperature vezanja početnica /MgCl <sub>2</sub> )
SOD1	NM_011434.2	GCCTTCTGCTCGAAGTGGAT GGAAGCATGGCGATGAAAGC	59 °C 3,5 mM
SOD3	NM_011435.3	TGGCTGATGGTTGTACCCTG TGAGAAGATAGGCGACACGC	60 °C 2,5 mM
<b>Housekeeping Geni</b>			
ActB	NM_007393.5	GCAAGCAGGAGTACGATGAG CCATGCCAATGTTGTCTCTT	61 °C; 3,5mM
B2M	NM_009735.3	CCTGCAGAGTTAAGCATGACAGT TCATGATGCTTGATCACATGTCT	60 °C; 3mM

ATF4, Aktivirajući transkripcijski faktor 4; BIP, endoplazmatski retikulum Chaperone BiP; CHOP, DNK-inducibilan transkript 3; GRP94, Protein toplinskoga šoka 90 Beta član obitelji 1; sXBP1, spojeni X-box Binding Protein 1; CXCL1, C-X-C kemokinski ligand 1; IL1 $\alpha$ , interleukin 1 alfa; IL1 $\beta$ , Interleukin 1 Beta; IL6, Interleukin 6; MCP1, monocitni kemoatraktantni protein-1; TGF $\alpha$ , Alfa faktor rasta tumora; TNF $\alpha$ , faktor nekroze tumora alfa; COX1, ciklooksigenaza 1; GPX1, glutation peroksidaza 1; NOX2, NADPH oksidaza 2, SOD1, Superoksid dismutaza 1; SOD3, superoksid dismutaza 3; ActB, Actin Beta; B2M, Beta-2-mikroglobulin.

### 4.17. Analiza izražaja jetrenih proteina aktivacije eIF2 $\alpha$

Uzorci jetre miševa WT i TFF3 na NS i VS dijeti homogenizirani su korištenjem RIPA pufera (50 mM TRIS HCL, pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP40, 1 % natrijevoga deoksiholata, 0,1 % SDS ) dopunjenoga inhibitorima fosfataze i proteaze (Roche), obrađeni ultrazvukom (3x30 sekundi) i centrifugirani na 16,000 x g tijekom 20 minuta. Supernatant je sakupljen te je BCA protein assay kit (Pierce, Thermo Fischer) korišten za mjerenje ukupne koncentracija proteina. Proteini su odvojeni denaturirajućom elektroforezom natrijevoga dodecil sulfata u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), prebačeni su na nitroceluloznu membranu i blokirani s 5 % BSA u TBS-T. Aktivacija proteina relevantnih za stres ER detektirana je poliklonskim anti-eIF2 $\alpha$  (#9722) i anti-fosfo eIF2  $\alpha$  (#9721) (Cell Signaling Technology) u razrjeđenju 1:1000 u 5 % BSA/TBST i inkubiranim preko noći na 4 °C. Sekundarno protutijelo bilo je goat anti-rabbit IgG-HRP (#170-6515; Biorad), a signali kemiluminiscencije detektirani su pomoću Alliance 4.7 Imaging System (UVITEC, Cambridge). Kao kontrola nanošenja uzoraka i za normalizaciju korištena je boja Amido black (Sigma-Aldrich). Intenzitet signala analiziran je s Image J 1.48v (215).

### 4.18. Proteomska analiza tkiva karotidne arterije

#### 4.18.1. Ekstrakcija proteina i priprema uzoraka

Ekstrakcija proteina iz karotidnih arterija izvedena je pomoću Minute Kita prema uputama proizvođača. Koncentracije ukupnih proteina u lizatima određene su pomoću BCA proteinskoga testa (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). Dodatno, referentni uzorak pripremljen je miješanjem jednakih količina proteina svih uzoraka i korišten kao interni standard. Obilježavanje peptida izobarnim privjescima (tandem mass tag, TMT) je izvedeno kako je prethodno opisano (221). Ukratko, 20 µg proteina iz svakoga uzorka razrijeđeno je 0,1 M trietil amonijevim bikarbonatom (TEAB, pH 7,8) do konačnoga volumena od 50 µL. Uzorci su reducirani (2,5 µL 200 mM DTT, 1 h na 55 °C), alkilirani (2,5 µL 375 mM jodoacetamida IAA, 30 min na sobnoj temperaturi, u mraku) i precipitirani korištenjem ledeno hladnoga acetona (-20 °C preko noći). Nakon centrifugiranja (8000×g, 10 min na 4 °C) proteinski talog otopljen je u 50 µL 0,1 M TEAB-a koji je sadržavao tripsin (1:40, w/w) i razgrađen preko noći na 37 °C. Triptički peptidi obilježeni su TMT tenplex reagensima (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) koji su pripremljeni prema uputama proizvođača. Za označavanje je korištena količina od 19 µL i reakcija je zaustavljena upotrebom 5 % hidroksilamina. Peptidi obilježeni TMT privjescima su prebačeni u novu epruvetu i spojeni te alikvotirani, osušeni i pohranjeni na -80 °C za LC-MS/MS analizu.

#### 4.18.2. LC-MS/MS analiza

Provedena je LC-MS/MS analiza visoke rezolucije temeljena na izobarnom obilježavanju kako bi se dobila kvalitativna i kvantitativna informacija o proteomu žila kao što je prethodno objavljeno (222). Ukratko, osušeni TMT-obilježeni peptidi su otopljeni u puferu (2 % ACN u 0,1 % FA) i analizirani pomoću sustava Ultimate 3000 RSLSnano (Dionex) vezanog s Q Exactive plus spektrometrom masa (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, SAD). Za odvajanje peptida korištena je kolona PepMap—RSLC C18 (50 cm × 75 µm ID) i linearni gradijent u trajanju od 5-35 % B (0,1 % FA u 80 % ACN) pri protoku od 300 nL/min. Ionizacija je postignuta korištenjem izvora iona nanospreja Flex i emitera od nehrđajućega čelika (New Objective). Napon ionizacije je postavljen na 2,1 kV, a temperatura kapilare za prijenos iona



bila je 250 °C. Analiza je provedena u pozitivnom načinu rada koristeći Top 8 metodu. U analizi su korišteni sljedeći parametri: raspon mase  $m/z$  350,0 do  $m/z$  1900,0 s maksimalnim vremenom ubrizgavanja 110 ms, rezolucijom 70 000 i AGC vrijednošću  $1 \times 10^6$ . Za fragmentaciju je korištena normalizirana kolizijska energija (NCE) od 25, 35 i 40 %, rezolucija 17500 i AGC vrijednost  $2 \times 10^5$ . Prozor izolacije mase od  $\pm 2,0$  Da primijenjen je za izolaciju iona prekursora s dinamičkim isključenjem od 30 s. Ioni prekursori s nabojem +1, kao i više od +7 izuzeti su iz fragmentacije. Masa iona  $m/z$  445.1200 omogućila je internu kalibraciju.

### 4.18.3. Analiza proteomskih podataka

Identifikacija proteina izvršena je korištenjem SEQUEST algoritma implementiranoga u programu Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) i pretraživanjem baze podataka koja je sadržavala *Mus musculus* FASTA podatke (preuzeto iz NCBI baze podataka, 7. prosinca 2017., 46105 unosa).

Parametri pretraživanja postavljeni su kako slijedi: dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancije mase prekursora i fragmenta od 10 ppm i 0,05 Da; karbamidometil (C) kao fiksna peptidna modifikacija, oksidacija (M) i TMT sixplex (K, peptidni N-terminus) kao dinamičke modifikacije. Najmanje dva jedinstvena peptida i granica od 5 % FDR postavljeni su za dobivanje pouzdane identifikacije proteina. FDR je automatski izračunat za cijeli skup podataka pomoću algoritma Percolator unutar programa Proteome Discoverer. Relativna kvantifikacija, statistička analiza, genska ontologija i analize bioloških puteva provedene su u programu Proteome Discoverer i STRINGdb (<https://string-db.org/>). Prije samog izračuna omjera zastupljenosti proteina, provedena je normalizacija na temelju ukupne količine peptida. Prilikom statističke obrade nije korištena imputacija vrijednosti koje nedostaju već su proteini s nepotpunim vrijednostima izostavljeni iz analize. Za statističku analizu p-vrijednosti su izračunate korištenjem nesparenoga t-testa s naknadnom Benjamini-Hochbergovom korekcijom korištenjem maksimalno prilagođene p-vrijednosti postavljene na 0,05.

### 4.19. Statistička analiza

Dilatacija koju proizvode protok, acetilkolin i natrijev-nitroprusid izražena je kao delta dijamer (µm) u odnosu na bazalne vrijednosti izmjerene pri Δ0 mmHg. Odgovor na protok analiziran je s Two-Way ANOVA testom za ponavljane uzorke (engl. *repeated measures ANOVA*) kako bi se odredio učinak tretmana na odgovor krvne žile. Za usporedbu rezultata genskoga izražaja korišten je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke One (oneway ANOVA) ili u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis test. Kod pojedinih rezultata za utvrđivanje međusobne razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina korišten je Studentov t-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyev U test. Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA). Statistička je značajnost podešena na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

## 5.1. Učinak visokoslane dijeta na arterijski krvni tlak

Nije bilo značajnih razlika u arterijskome krvnom tlaku među ispitivanim skupinama (Tablica 5.1.).

**Tablica 5.1.** Vrijednosti krvnoga tlaka

	sistolički (mmHg)	dijastolički (mmHg)	srednji arterijski tlak (mmHg)
<b>WT NS</b>	99,44 (12,64)	77,41 (11,37)	85,27 (12,59)
<b>WT VS</b>	104,76 (17,02)	86,75 (14,62)	92,80 (15,29)
<b>TFF3 NS</b>	93,35 (14,89)	73,83 (11,96)	80,33 (12,89)
<b>TFF3 VS</b>	99,65 (21,00)	80,97 (17,84)	87,19 (18,85)

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD); razlike su testirane pomoću One-way ANOVA, p vrijednosti  $\leq 0,05$  smatrane su značajnim.

## 5.2. Biokemijska analiza seruma

Izmjerene su razine mokraćne kiseline, razine glukoze u krvi, AST, ALT, CRP, uree, ukupni kolesterol, LDL, HDL, trigliceridi, alkalne fosfataze i ukupni proteini u serumu. Razine izmjerenih biokemijskih parametara u serumu prikazane su u Tablici 5.2. Isključenje gena *Tff3* i visokosлана dijeta nisu utjecali niti na jedan ispitivani parametar.

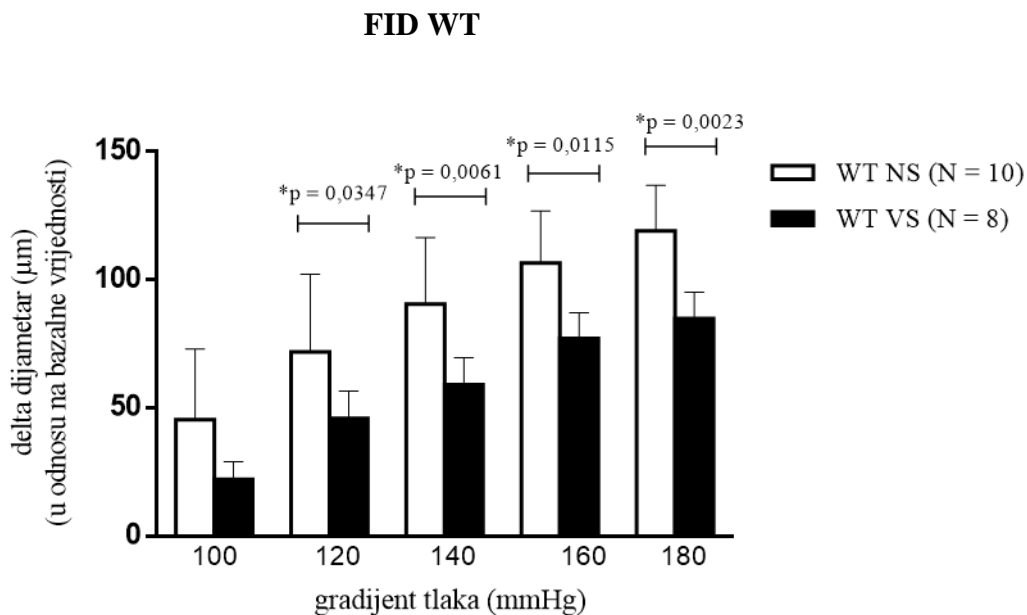
Tablica 5.2. Usporedba biokemijskih parametara među ispitivanim skupinama

Parametar	Jedinica	Grupa				ANOVA
		WT NS	TFF3 NS	WT VS	TFF3 VS	p
Mokraćna kiselina	μmol/L	189,8 (74,2)	217,6 (54,2)	164,1 (19,4)	201,6 (25,9)	0,157
Razina glukoze u krvi	mmol/L	6,23 (3,64)	5,96 (2,97)	6,99 (1,85)	6,43 (3,04)	0,954
AST	U/L	353,6 (216,4)	487,3 (90,74)	389,5 (214,6)	413,3 (230,3)	0,630
ALT	U/L	42,6 (21,1)	48,7 (4,93)	39,8 (11,1)	39,8 (14,9)	0,835
CRP	mg/L	0,14 (0,02)	0,15 (0,03)	0,12 (0,01)	0,12 (0,01)	0,054
Urea	mmol/L	5,18 (0,73)	3,63 (0,87)	4,62 (0,73)	5,10 (1,57)	0,233
Ukupni kolesterol	mmol/L	4,03 (0,52)	3,97 (0,47)	3,46 (0,69)	3,65 (0,45)	0,253
LDL	mmol/L	1,66 (0,40)	1,57 (0,55)	1,32 (0,44)	1,33 (0,21)	0,423
HDL	mmol/L	1,92 (0,23)	2,05 (0,10)	1,64 (0,35)	1,83 (0,38)	0,295
Trigliceridi	mmol/L	0,98 (0,21)	0,77 (0,07)	1,11 (0,58)	1,07 (0,22)	0,261
Alkalne fosfataze	U/L	26,8 (2,68)	25,3 (5,69)	34,8 (12,9)	27,7 (4,18)	0,263
Ukupni proteini	g/L	55,0 (2,83)	54,0 (3,46)	52,3 (3,44)	50,2 (6,43)	0,352

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD); razlike su testirane pomoću One-way ANOVA, p vrijednosti  $\leq 0,05$  smatrane su značajnim.

**5.3. Bazični odgovor karotidne arterije niskoslane i visokoslane ispitivane skupine miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N i miševa divljeg tipa (WT, C57BL/6N), na protokom potaknutu dilataciju**

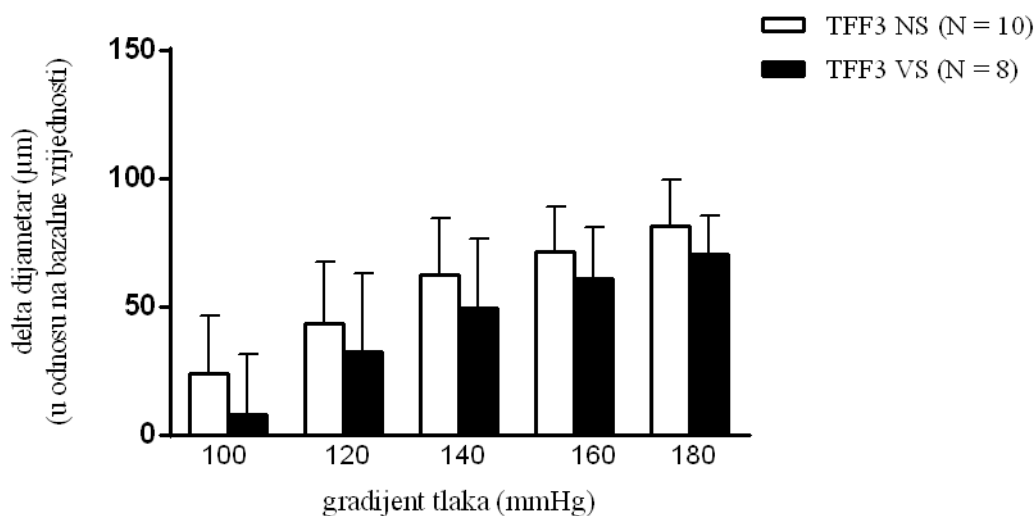
Protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije značajno je smanjena u WT VS u odnosu na WT NS skupinu pri gradijentu tlaka  $\Delta 120$  ( $p = 0,0347$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0061$ ),  $\Delta 160$  ( $p = 0,0115$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0023$ ) (Slika 5.1.), dok u skupinama TFF3 VS i TFF3 NS nije bilo značajnih razlika (Slika 5.2.). Protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije značajno je smanjena u TFF3 NS skupini u odnosu na WT NS pri gradijentu tlaka  $\Delta 120$  ( $p = 0,0351$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0401$ ),  $\Delta 160$  ( $p = 0,0049$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0021$ ) (Slika 5.3.), dok između skupina WT VS i TFF3 VS nije bilo značajnih razlika (Slika 5.4).



**Slika 5.1.** Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanoj (NS) i visokoslanoj (VS) dijeti na promjenu gradijenta tlaka

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

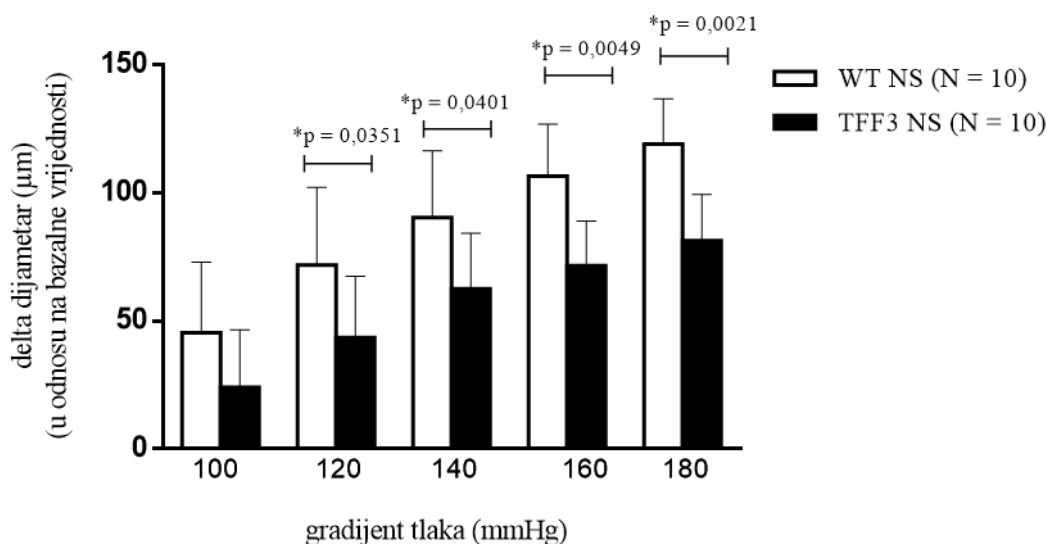
## FID TFF3



**Slika 5.2.** Bazični odgovor karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanoj (NS) i visokoslanoj (VS) dijeti na promjenu gradijenta tlaka

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

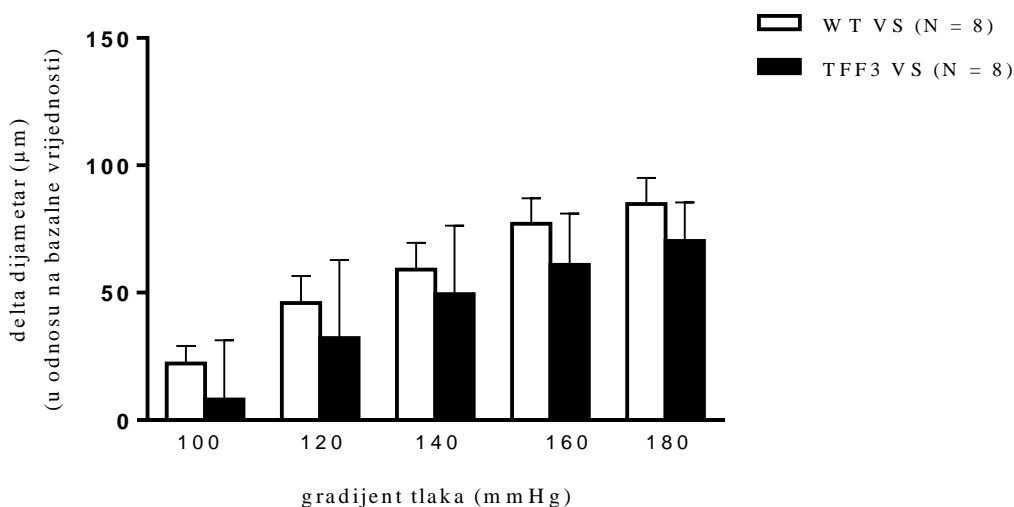
## FID WT NS vs. TFF3 NS



**Slika 5.3.** Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanoj dijeti (NS) na promjenu gradijenta tlaka

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

## FID WT VS vs. TFF3 VS

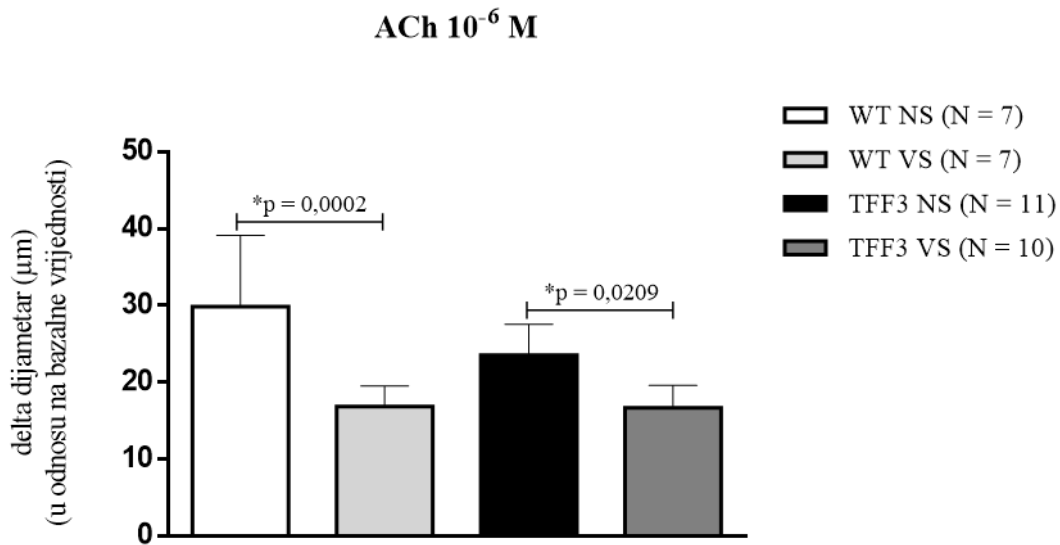


**Slika 5.4.** Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanoj dijeti (VS) na promjenu gradijenta tlaka

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

#### 5.4. Bazični odgovor na acetilkolinom (ACh) potaknutu dilataciju (AChID) karotidne arterije (vazodilatacija ovisna o endotelu)

Dilatacijski odgovor karotidne arterije visokoslanih skupina miševa divljega tipa (WT) ( $p = 0,0002$ ) i miševa s isključenim genom *Tff3* ( $p = 0,0209$ ) značajno je smanjen u odnosu na niskoslane skupine oba soja (Slika 5.5.).



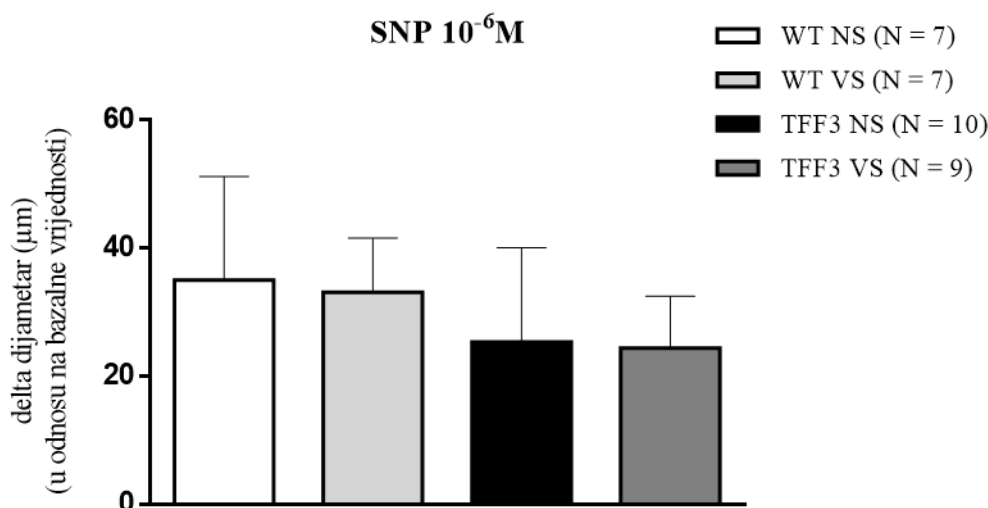
**Slika 5.5.** Bazični odgovor karotidne arterije miševa divljega tipa (WT) i miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj dijeti (VS) na acetilkolinom ( $10^{-6}$  mol/L) potaknutu dilataciju (AChID)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### 5.5. Bazični odgovor na natrij-nitroprusidom (SNP) potaknutu dilataciju karotidne arterije (vazodilatacija neovisna o endotelu)

U vaskularnom odgovoru donora NO-a (SNP) neovisnoga o endotelu, vazodilatacija je očuvana i nisu utvrđene razlike između ispitivanih skupina (Slika 5.3.).





**Slika 5.6.** Bazični odgovor karotidne arterije dodatkom NO-donora natrijevog-nitroprusida (SNP,  $10^{-6}$  mol/L) na protokom potaknutu dilataciju kod miševa divljega tipa (WT) i miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanjoj (NS) i visokoslanjoj dijeti (VS)

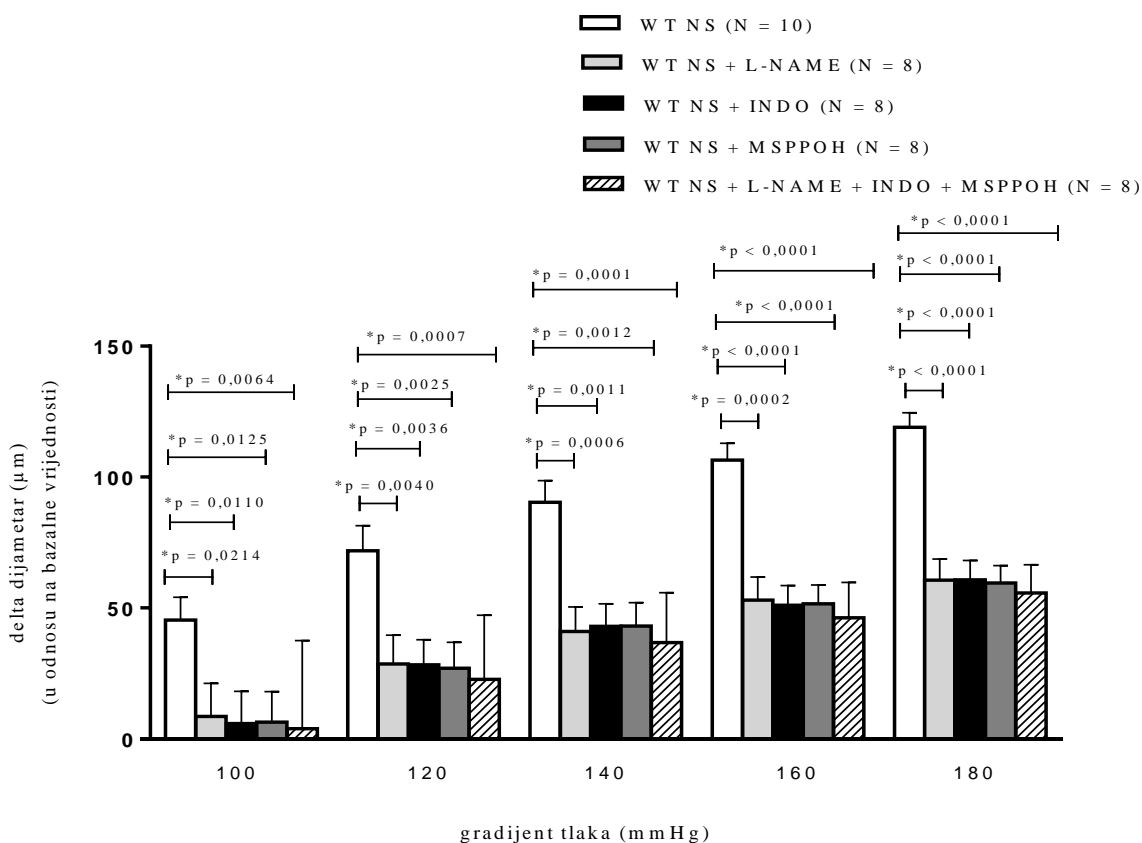
Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### 5.6. Učinak inhibicije NO sintaze, ciklooksigenaza i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije

U prisutnosti inhibitora NO sintaze (L-NAME ( $10^{-5}$ M)), ciklooksigenaza (indometacin (INDO;  $10^{-5}$ M)) te selektivnog inhibitora CYP450 epoksidaze (MS-PPOH ( $10^{-5}$ M)), zasebno i u kombinaciji značajno je smanjena protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije pri svim gradijentima tlaka u skupinama WT NS ( $\Delta 100$  ( $p = 0,0214$ ,  $p = 0,0110$ ,  $p = 0,0125$ ,  $p = 0,0064$ ),  $\Delta 120$  ( $p = 0,0040$ ,  $p = 0,0036$ ,  $p = 0,0025$ ,  $p = 0,0007$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0006$ ,  $p = 0,0011$ ,  $p = 0,0012$ ,  $p = 0,0001$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0002$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) (Slika 5.7.), WT VS ( $\Delta 100$  ( $p = 0,0144$ ,  $p = 0,0026$ ,  $p = 0,0026$ ,  $p = 0,0150$ ),  $\Delta 120$  ( $p = 0,0020$ ,  $p = 0,0009$ ,  $p = 0,0005$ ,  $p = 0,0012$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0069$ ,  $p = 0,0032$ ,  $p = 0,0008$ ,  $p = 0,0023$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0008$ ,  $p = 0,0011$ ,  $p = 0,0005$ ,  $p = 0,0005$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0021$ ,  $p = 0,0043$ ,  $p = 0,0014$ ,  $p =$

0,0030) (Slika 5.8.) i u skupini TFF3 NS ( $\Delta 100$  ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0037$ ,  $p < 0,0001$ ),  $\Delta 120$  ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0069$ ,  $p < 0,0001$ ),  $\Delta 140$  ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0001$ ,  $p = 0,0074$ ,  $p < 0,0001$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0007$ ,  $p = 0,0163$ ,  $p < 0,0001$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0012$ ,  $p = 0,0015$ ,  $p = 0,0190$ ,  $p = 0,0001$ ) (Slika 5.9.), dok je u skupini miševa TFF3 VS jedino prisutnost indometacina značajno smanjila protokom potaknutu dilataciju te primjena svih inhibitora zajedno pri gradijentima  $\Delta 120$  ( $p = 0,0050$ ,  $p = 0,0084$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0045$ ,  $p = 0,0038$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0086$ ,  $p = 0,0135$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0295$ ,  $p = 0,0165$ ) (Slika 5.10.).

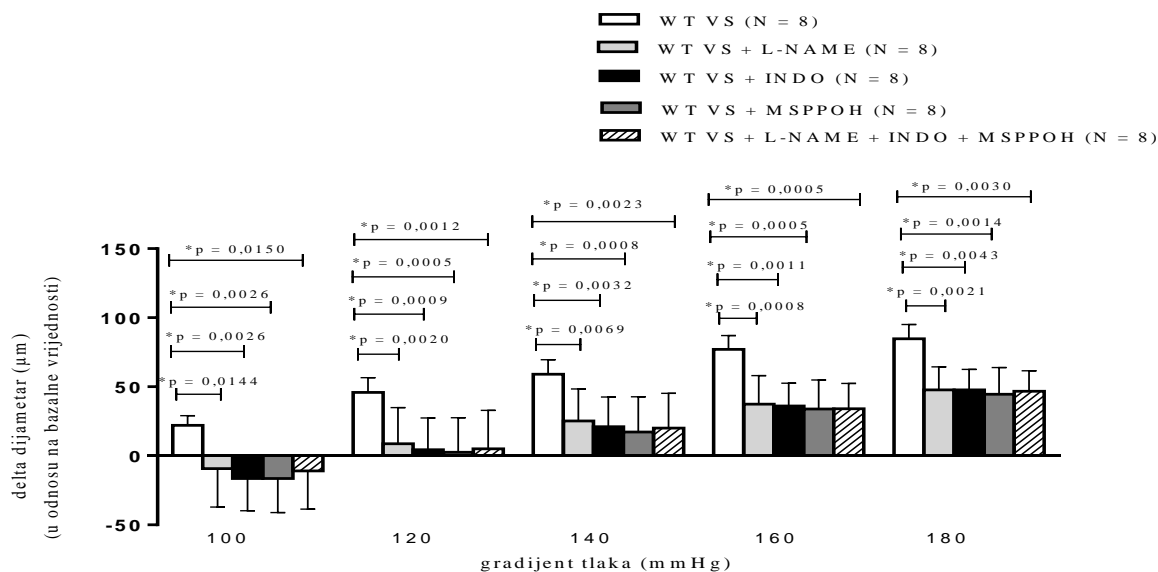
## WT NS



**Slika 5.7.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanjoj dijeti (NS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijаметar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD).  $*p < 0,05$ .

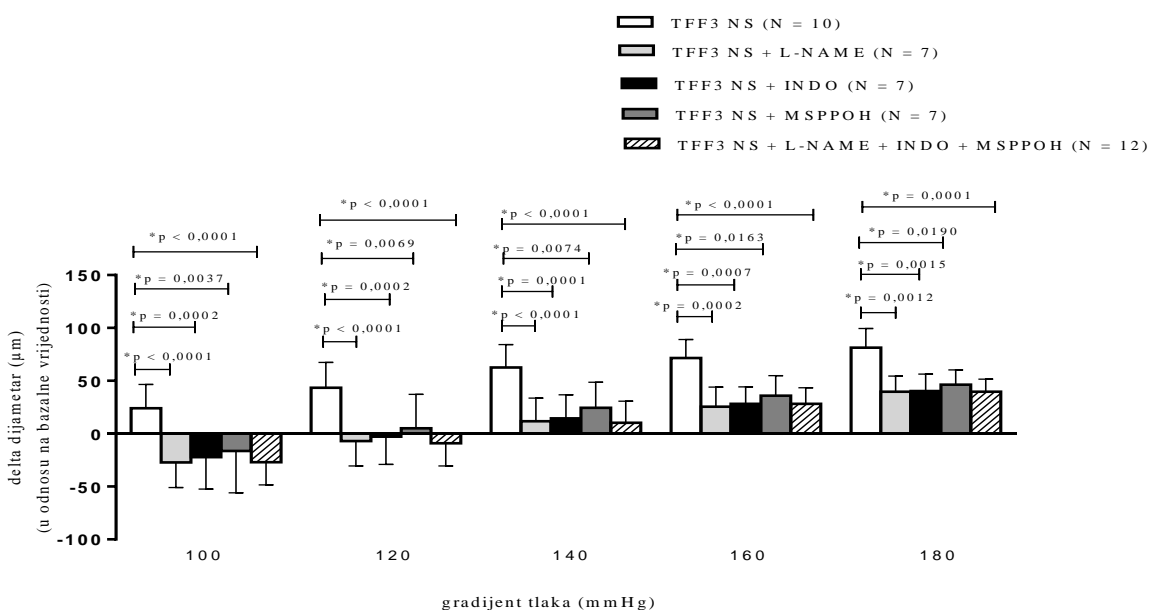
## WT VS



**Slika 5.8.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslanjoj dijeti (VS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamentar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

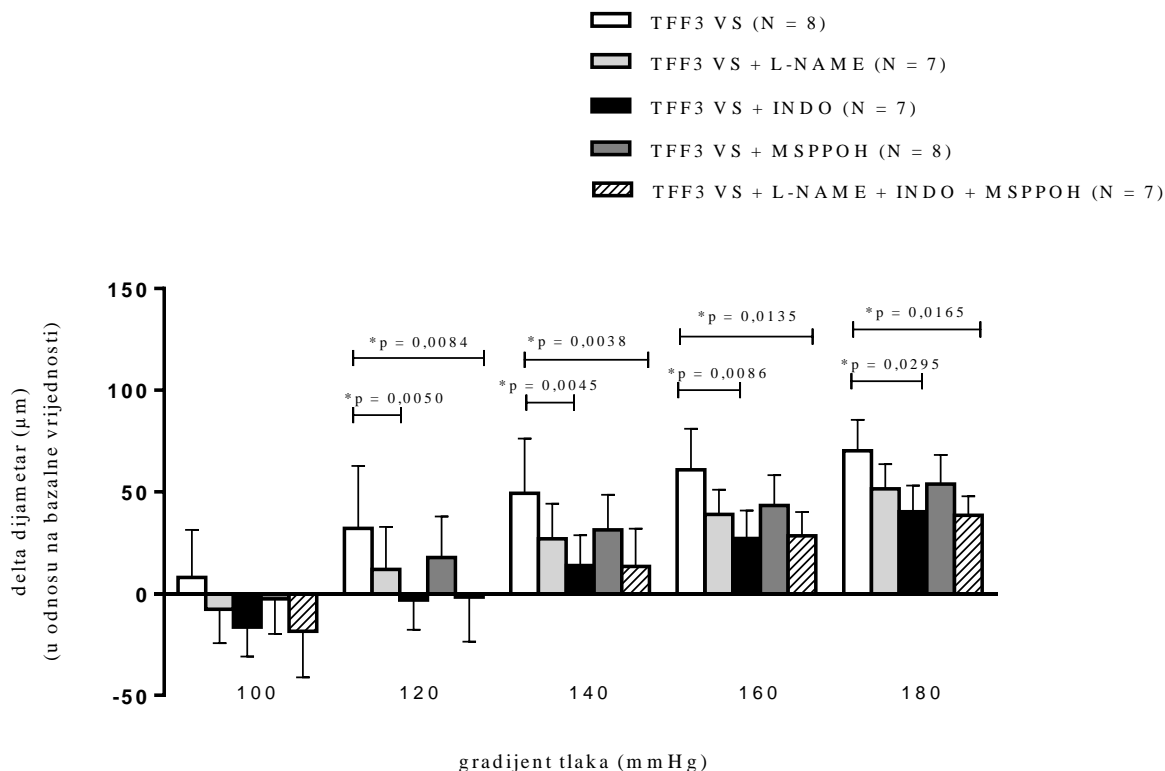
## TFF3 NS



**Slika 5.9.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanjoj dijeti (NS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### TFF3 VS



**Slika 5.10.** Učinak inhibicije NO sintaze (NOS), ciklooksigenaza (COX) i metabolita EETs-a na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanjoj dijeti (VS)

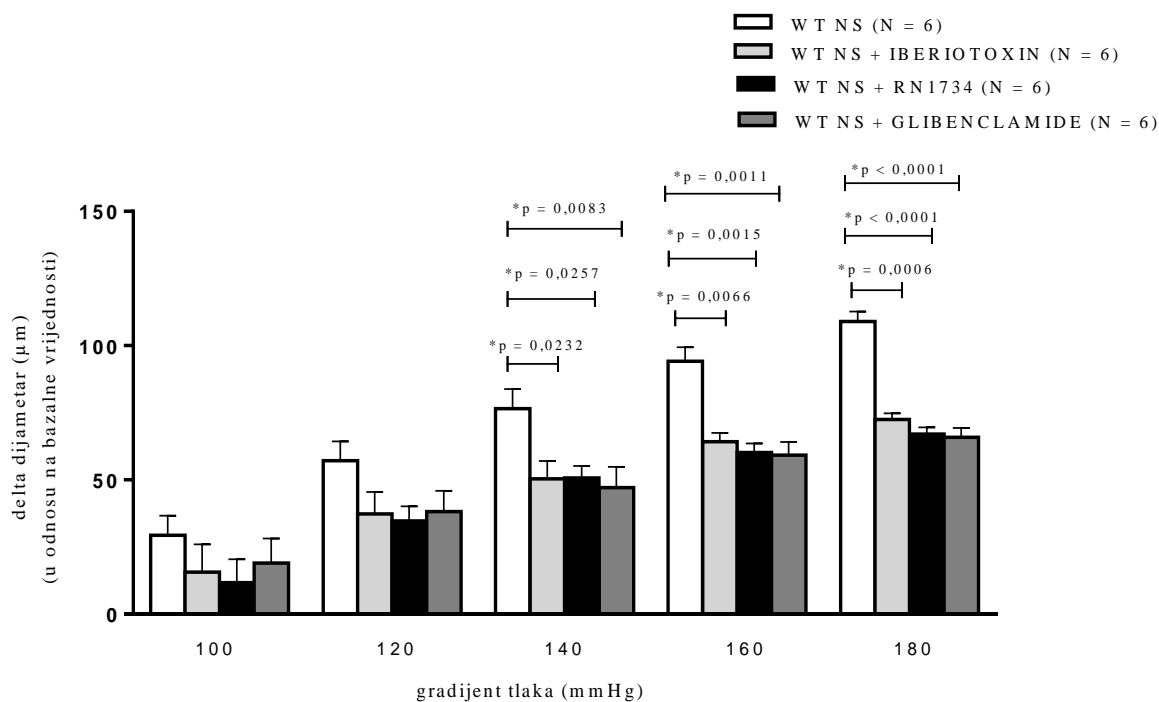
Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

#### 5.7. Odgovor karotidne arterije na primjenu antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (iberiotoksin); TRPV4 (RN-1734) i ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, glibenclamide)

U prisutnosti antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (iberiotoksin); TRPV4 (RN-1734) i ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, glibenclamide) značajno je smanjena protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije u skupini WT NS pri gradijentima tlaka  $\Delta 140$  mmHg ( $p = 0,0232$ ,  $p = 0,0011$ ,  $p = 0,0257$ ,  $p = 0,0083$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0066$ ,  $p = 0,0015$ ,

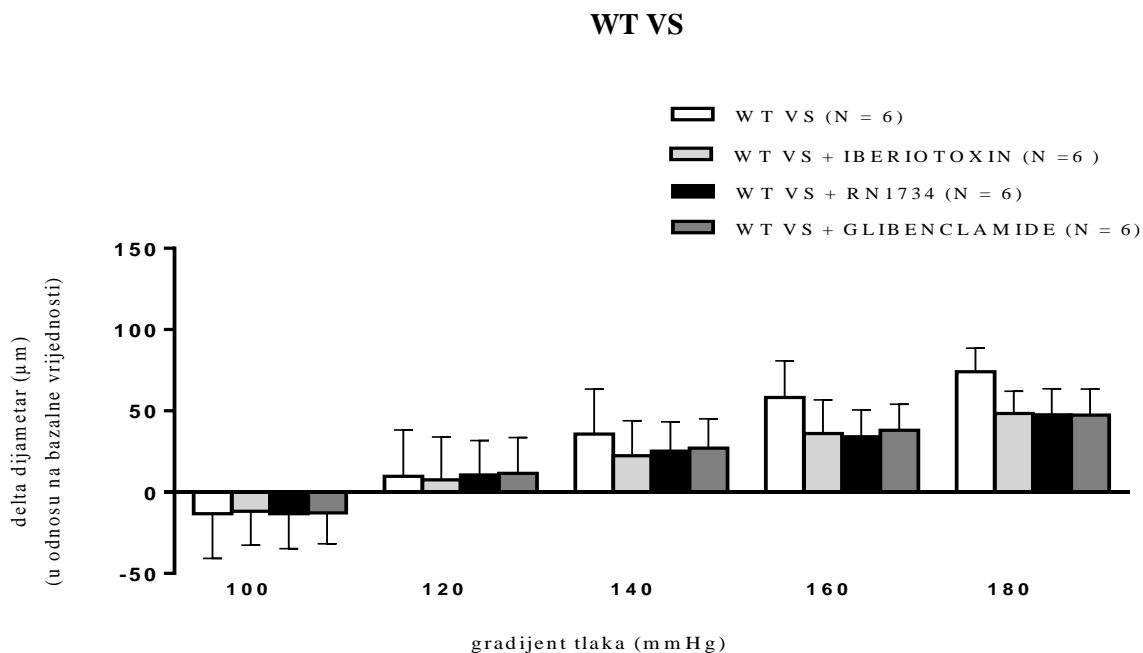
$p = 0,0011$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0006$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ) (Slika 5.11.). U skupini TFF3 NS iberiotoksin i glibenclamid značajno su smanjili FID pri gradijentu tlaka od  $\Delta 180$  mm Hg ( $p = 0,0273$ ,  $p = 0,0281$ ) (Slika 5.13). U skupini WT VS (Slika 5.12.) i TFF3 VS (Slika 5.14.) niti jedan antagonist nije imao učinak.

## WT NS



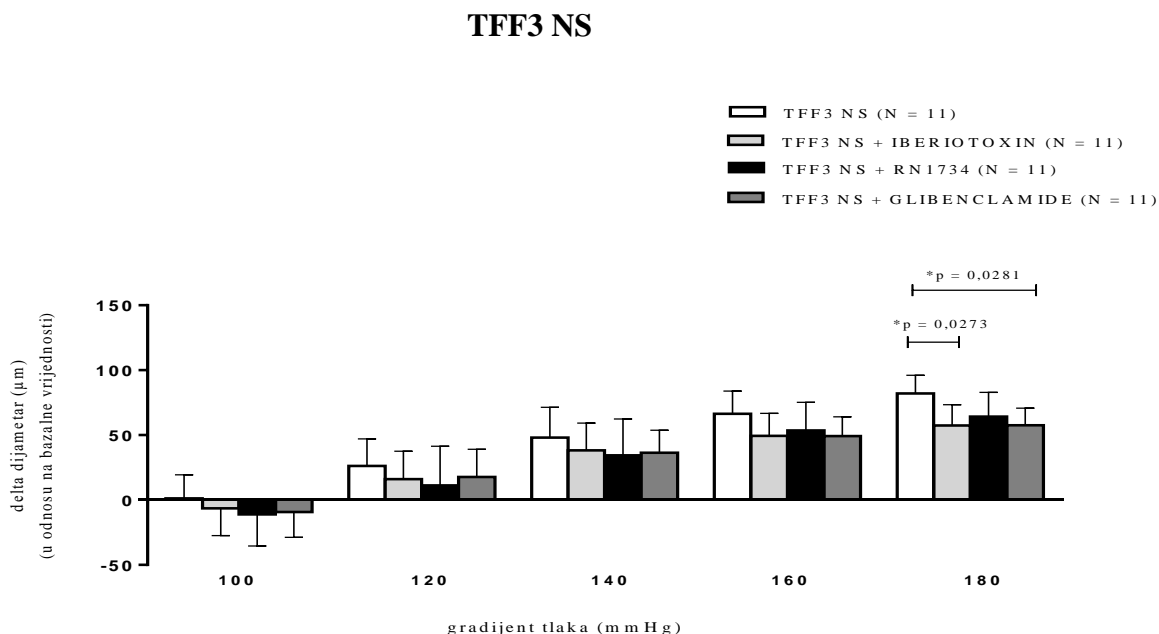
**Slika 5.11.** Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslojnoj dijeli (NS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijаметar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



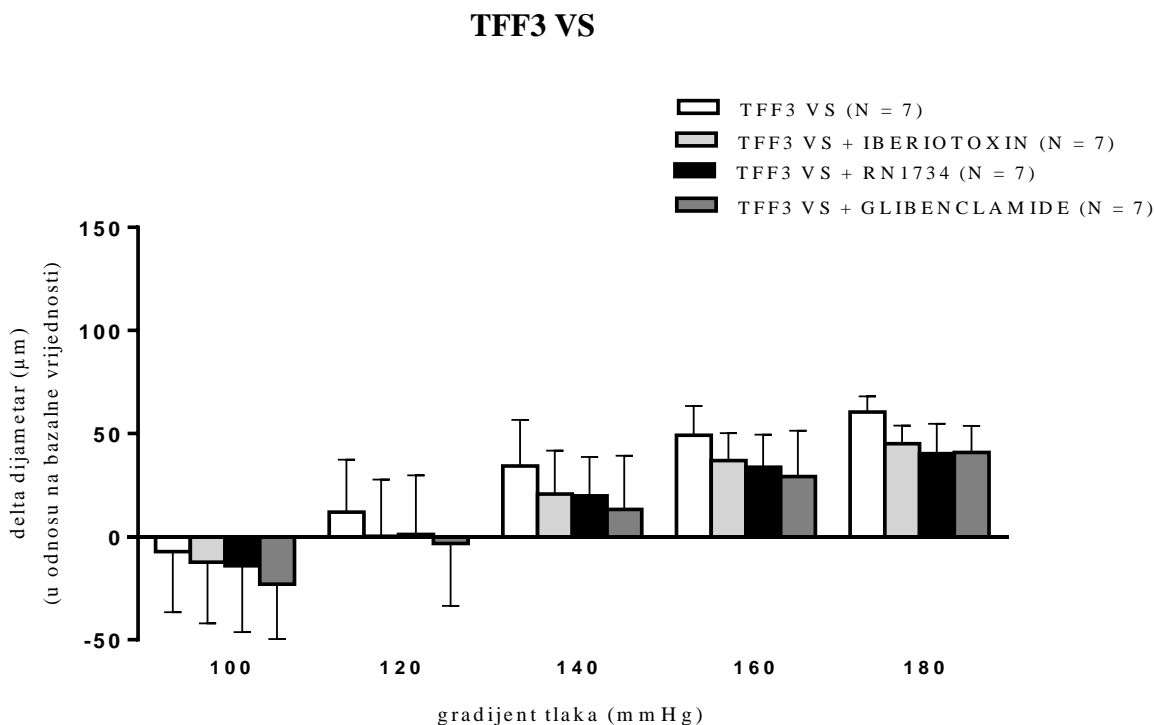
**Slika 5.12.** Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslanjoj dijeti (VS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijаметar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.13.** Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslanjoj dijeti (NS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.14.** Učinak antagonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanoj dijeti (VS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

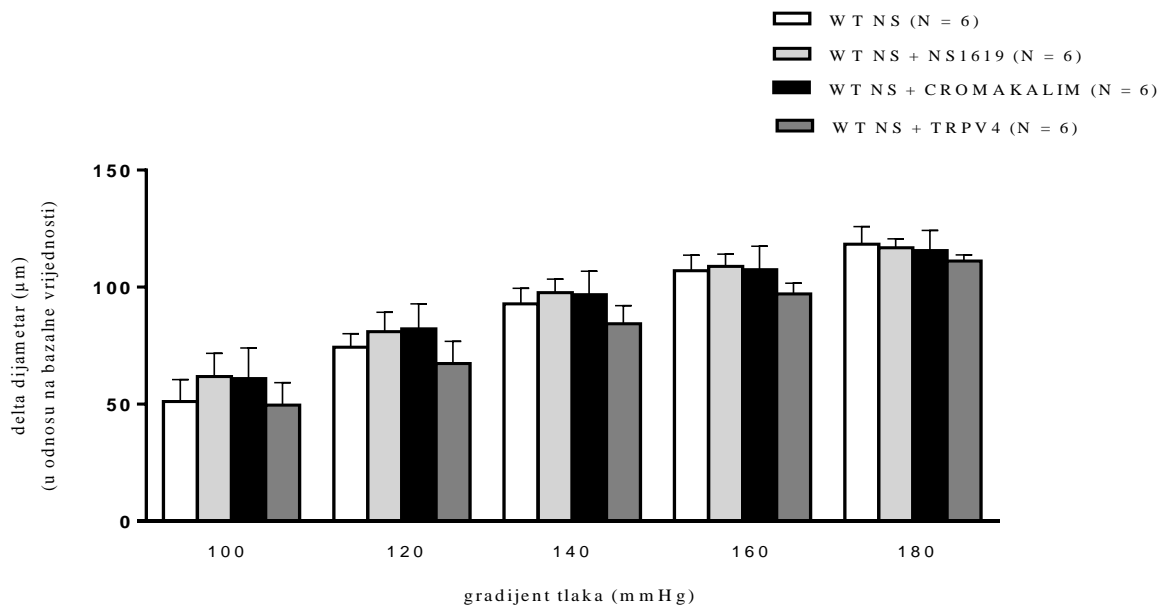
#### 5.8. Odgovor karotidne arterije na primjenu agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (NS-1619); ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, cromakalim) i TRPV4 (GSK1016790A).

U prisutnosti agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (NS-1619); ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, cromakalim) i TRPV4 (GSK1016790A) nije došlo do značajne promjene protokom potaknute dilatacije u skupini WT NS (Slika 5.15.). U skupini WT VS GSK1016790A povećao je FID na svakome gradijentu tlaka ( $\Delta 100$  mmHg ( $p = 0,0228$ ),  $\Delta 120$

mmHg ( $p = 0,0020$ ),  $\Delta 140$  mmHg ( $p = 0,0034$ ),  $\Delta 160$  mmHg ( $p = 0,0063$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0133$ )), dok je NS1619 povećao FID na  $\Delta 120$  mmHg ( $p = 0,0422$ ) 140 mmHg ( $p = 0,0422$ ) i 160 mmHg ( $p = 0,0378$ ) (Slika 5.16).

U skupini TFF3 NS agonisti nisu imali učinak ni na jednom gradijentu tlaka (Slika 5.17), dok je u skupini TFF3 VS GSK1016790A povećao FID na  $\Delta 100$  ( $p = 0,0433$ ) i  $\Delta 180$  mm Hg ( $p = 0,0479$ ) te cromakalim na  $\Delta 180$  mm Hg ( $p = 0,0287$ ) (Slika 5.18).

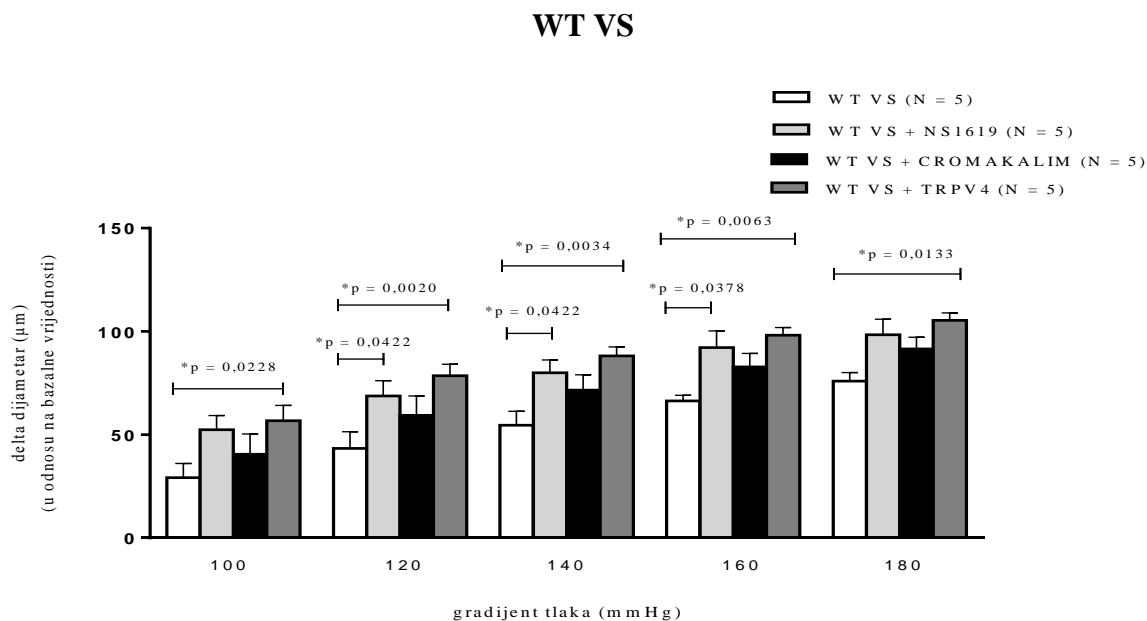
### WT NS



**Slika 5.15.** Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na niskoslanjoj dijeti (NS)

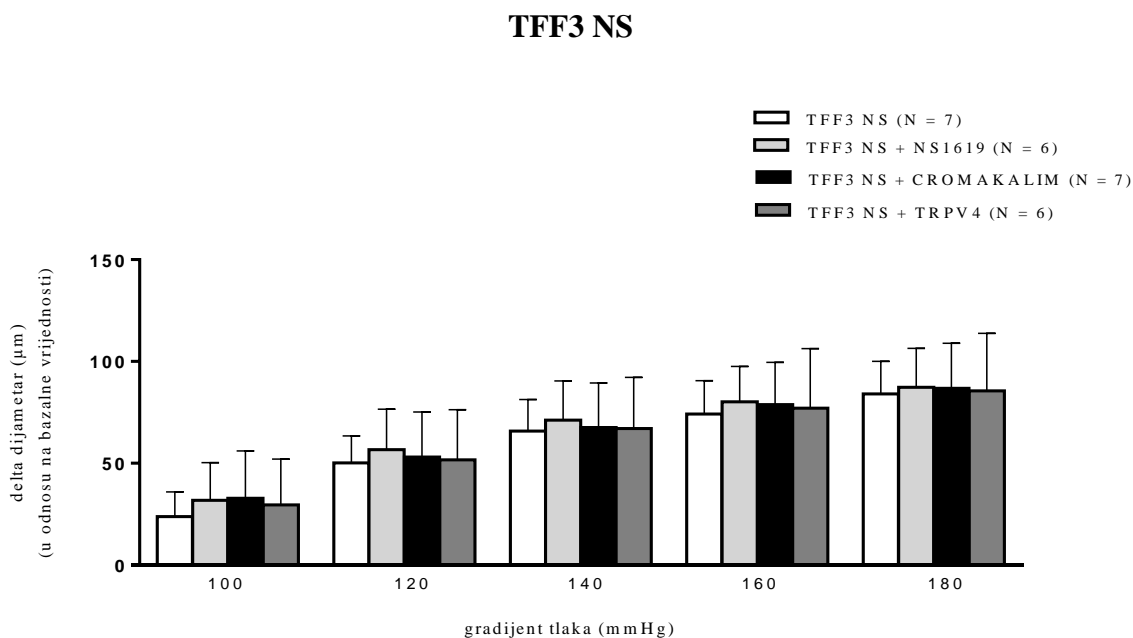
Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijamer u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .





**Slika 5.16.** Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT) na visokoslojnoj dijeti (VS)

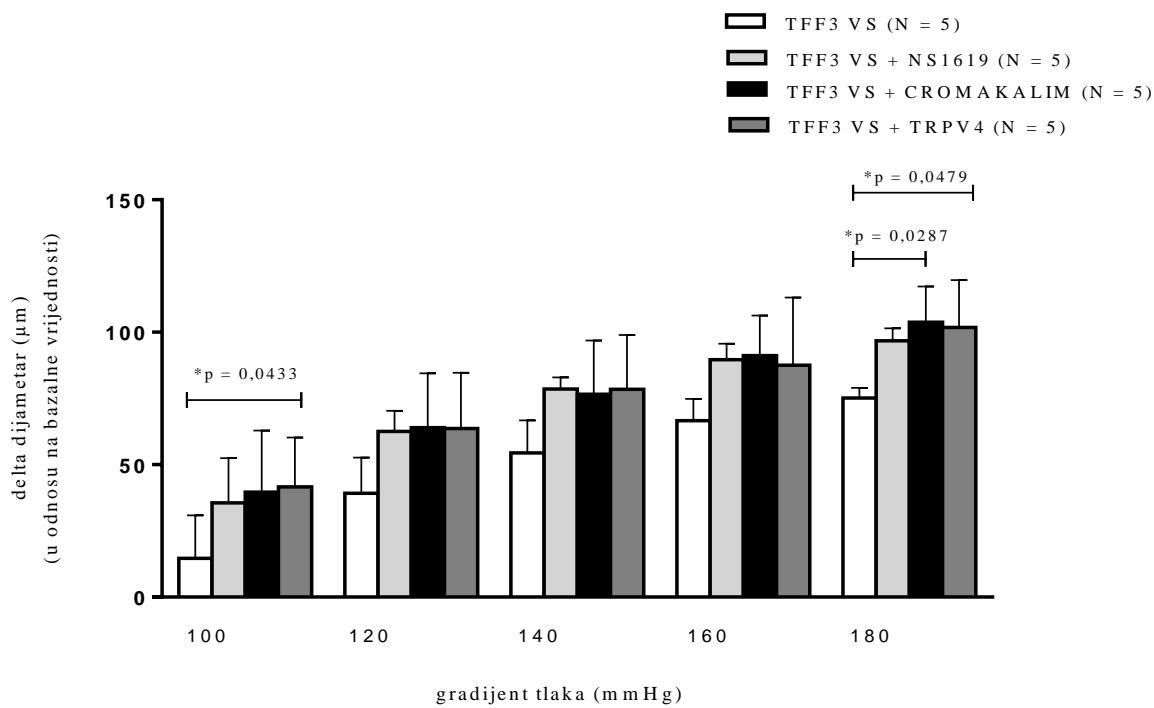
Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijаметar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.17.** Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na niskoslojnoj dijeti (NS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### TFF3 VS

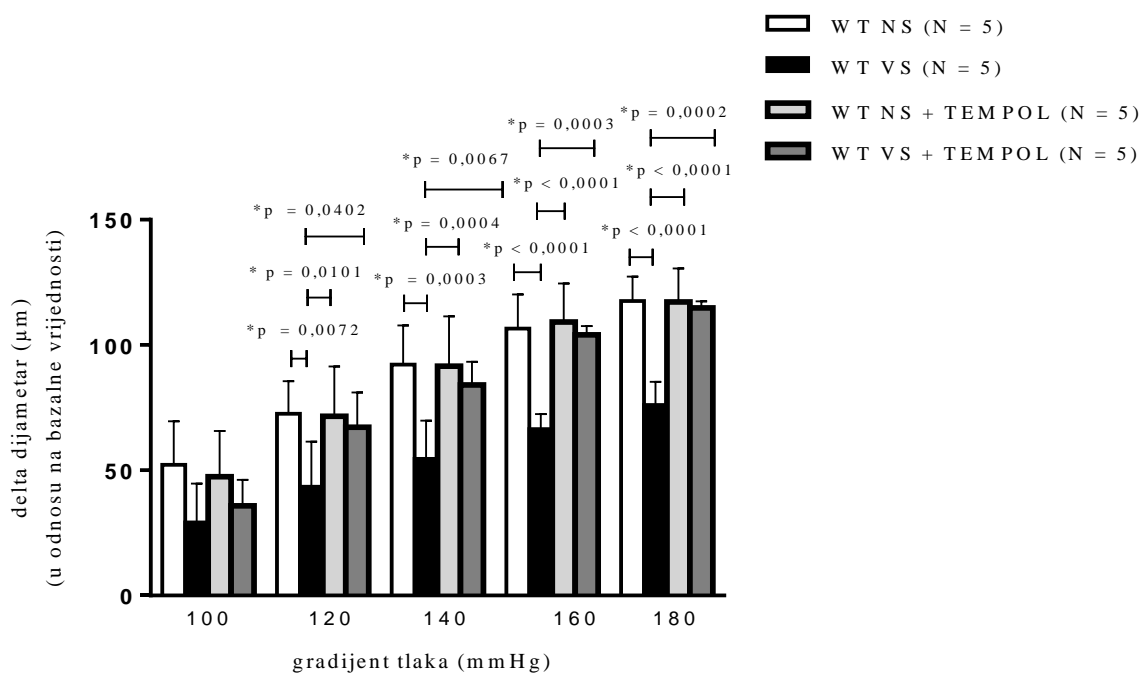


**Slika 5.18.** Učinak agonista kalijevih kanala osjetljivih na kalcij, ATP-osjetljivih kalijevih kanala i TRPV4 na protokom potaknutu dilataciju (FID) karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanjoj dijeti (VS)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

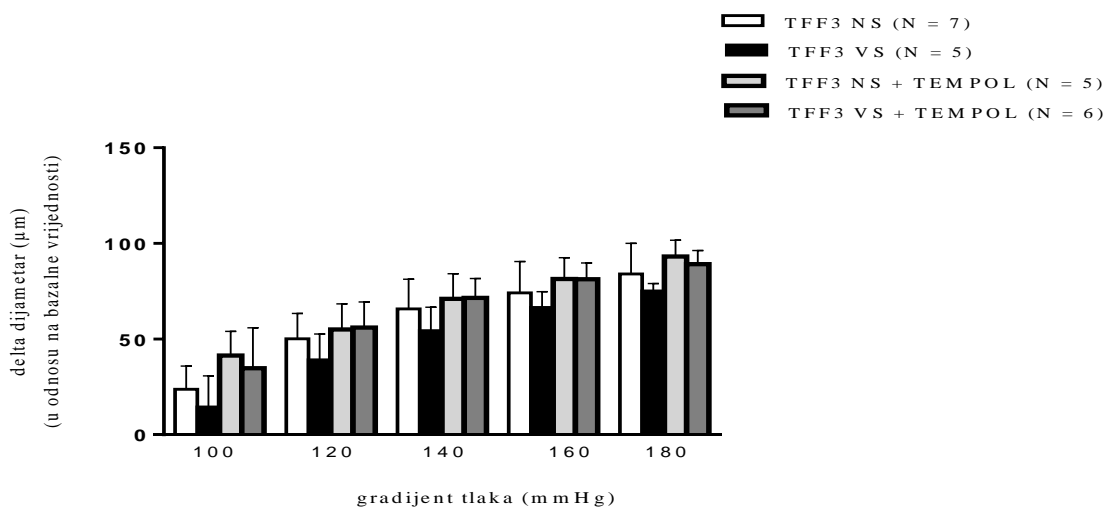
#### 5.9. Učinak *in vivo* primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije

TEMPOL *in vivo* poboljšava razinu protokom potaknute dilatacije karotidne arterije u skupini WT VS + TEMPOL pri gradijentu tlaka  $\Delta 120$  ( $p = 0,0402$ ),  $\Delta 140$  ( $p = 0,0067$ ),  $\Delta 160$  ( $p = 0,0003$ ) i  $\Delta 180$  mmHg ( $p = 0,0002$ ) do razine dilatacije koja je utvrđena u niskoslanjoj skupini (Slika 5.19.). Visokoslanom dijetom te primjenom TEMPOLA-a *in vivo* kod miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N nije došlo do značajnih razlika među ispitivanim skupinama (Slika 5.20).

TEMPOL *in vivo* WT

**Slika 5.19.** Učinak *in vivo* primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije miševa divljeg tipa (WT)

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijаметar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

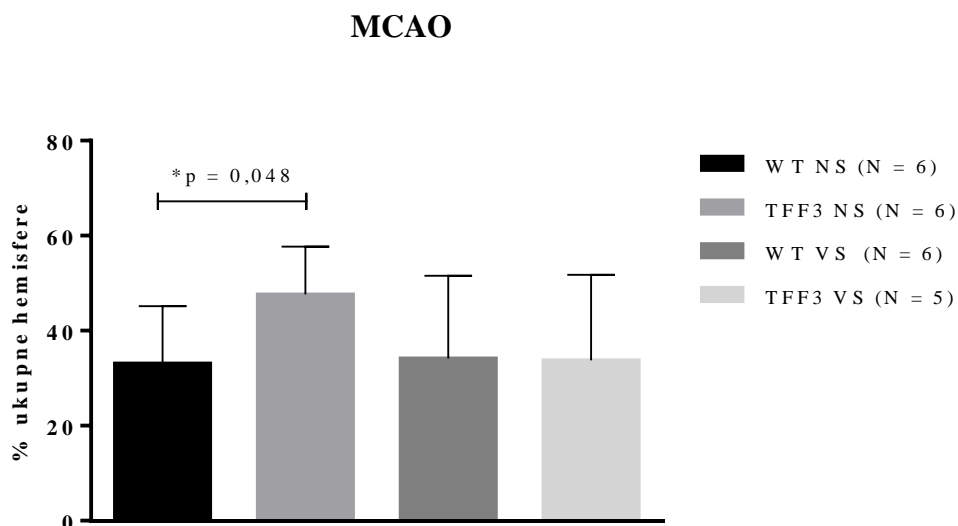
TEMPOL *in vivo* TFF3

**Slika 5.20.** Učinak *in vivo* primjene TEMPOL-a na protokom potaknutu dilataciju karotidne arterije miševa s isključenim genom *Tff3*

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. Two Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

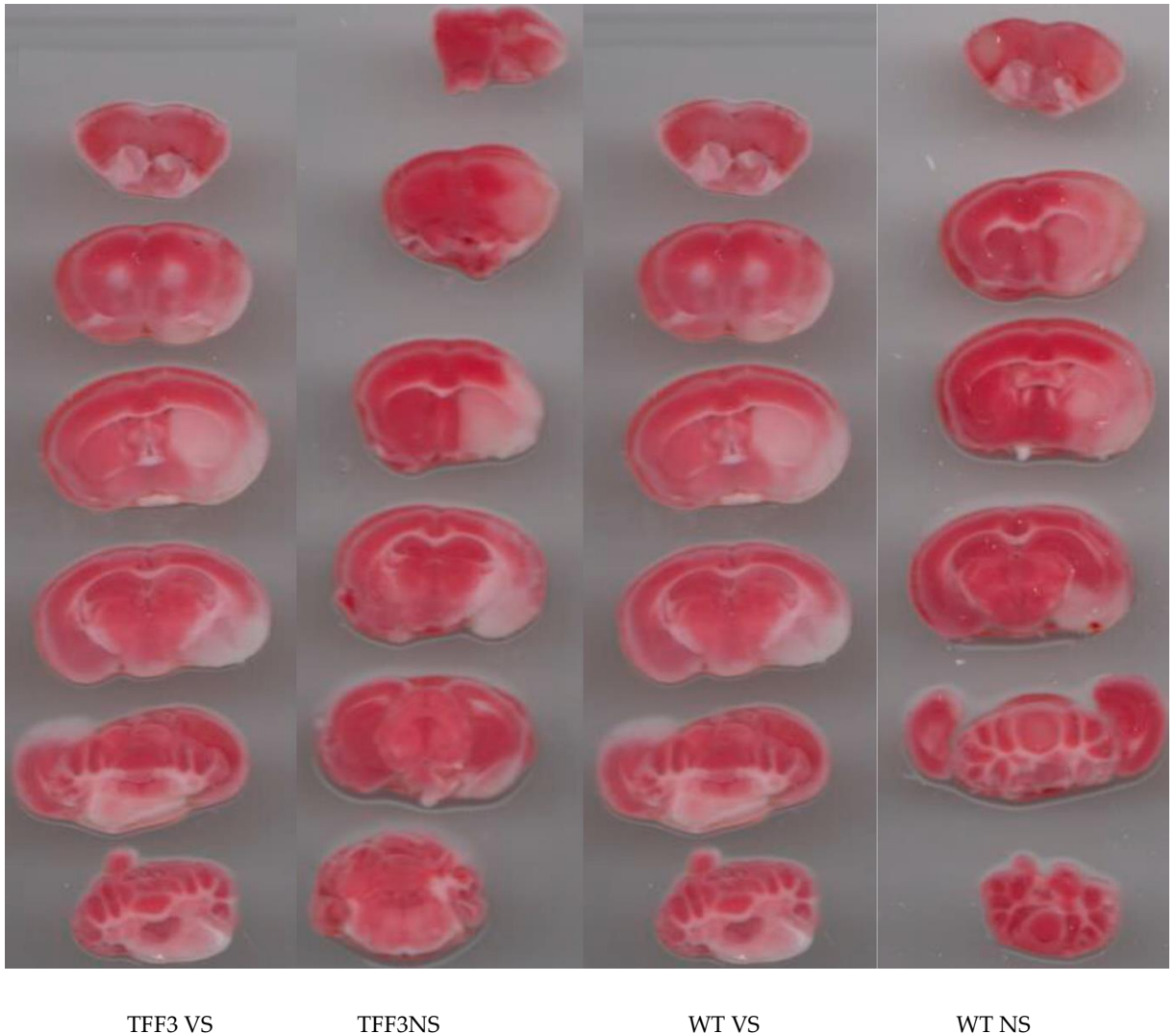
#### 5.10. Učinak isključenja gena *Tff3* i visokoslane dijeta na volumen infarkta mozga kod miševa s isključenim genom *Tff3* i WT miševa

U svim ispitivanim skupinama došlo je do ishemijskoga oštećenja mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije, tj. MCAO. Međutim, značajna razlika uočena je samo u TFF3 NS skupini, gdje je došlo do značajno većega infarkta u usporedbi s WT NS miševima ( $p = 0,048$ ) (Slika 5.21.). Miševi s isključenim genom *Tff3* na visokoslanoj dijeti manje osjetljivi na ozljede moždanoga udara (Slika 5.22.).



**Slika 5.21.** Veličina infarkta mozga u ispitivanim skupinama

Razlike u dilataciji izražene su kao delta dijametar u odnosu na bazalne vrijednosti. One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.22.** Infarkt mozga u ispitivanim skupinama nakon 60 minuta prolazne okluzije srednje cerebralne arterije (toMCAO)

U svim skupinama je izazvan cerebralni infarkt. Presjeci su obojeni 2,3,5-trifeniltetrazolijevim kloridom (TTC). Zdravo tkivo je ciglastocrvene boje, dok infarktno tkivo, u kojemu nedostaju mitohondrijski enzimi potrebni za transformaciju TTC-a, ostaje bijelo.

### 5.11. Strukturne karakteristike aorte miševa TFF3 i WT na NS i VS prehrani

Morfološkom analizom utvrđena je normalna struktura svih slojeva aorte u svim ispitivanim skupinama. Tunica media bila je najdeblji sloj, sadržavala je 5-6 elastičnih lamina, uključujući unutarnju elastičnu membranu (Slika 5.10. i 5.11.). TFF3 miševi na NS dijeti imali su značajno veći sadržaj elastina i debljinu tunike medije te značajno smanjen omjer adventicije i stijenke

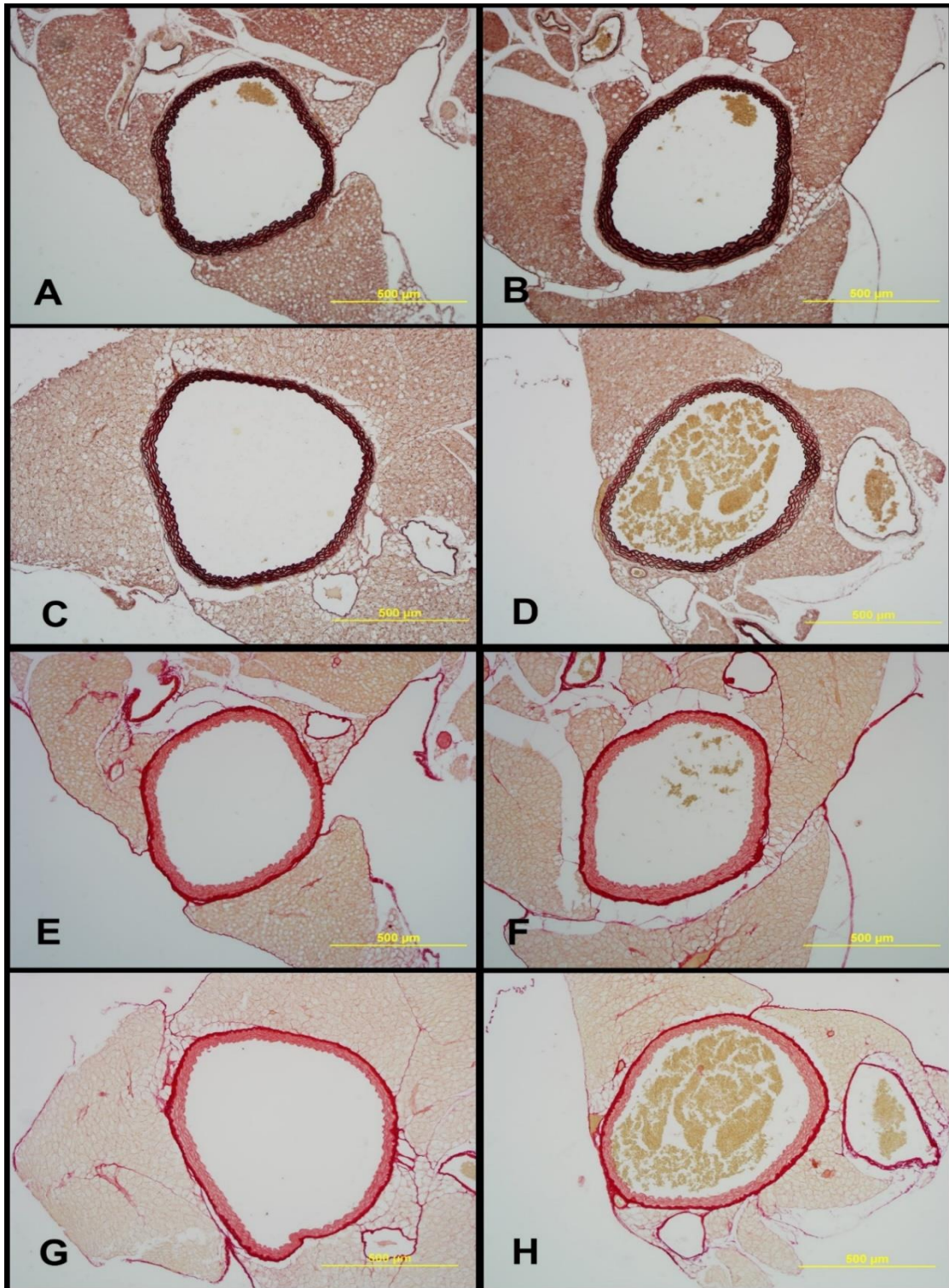
## 5. REZULTATI

prema lumenu u usporedbi na WT NS kontrole. Aorte WT VS imale su značajno povećan sadržaj elastina, a WT VS miševi i TFF3 VS miševi imali su značajno povećanu debljinu medie i smanjenu komponentu kolagena u usporedbi s miševima WT NS. Nije bilo uočenih razlika u strukturi aorte između TFF3 NS i TFF3 VS skupine miševa (Tablica 5.3.).

**Tablica 5.3.** Strukturne karakteristike aorte kod TFF3 i WT miševa

	Lumen [ $\mu\text{m}^2$ ]	Elastin [%]	Media [%]	ADV [%]	Površina zida [ $\mu\text{m}^2$ ]	Kolagen [%]	Omjer zida i lumena [%]
<b>WT NS</b>	714.834,57 (128.116,62)	52,908 (4,44)	70,669 (3,71)	29,331 (3,71)	379.241,52 (51.995,64)	32,23 (4,32)	54,00 (9,19)
<b>WT VS</b>	772.048,33 (100.916,49)	<b>59,53</b> <b>(4,69)*</b>	<b>76,83</b> <b>(4,77)*</b>	23,165 (4,77)	374.726,27 (54.361,98)	28,51 (4,59)	48,8 (6,58)
<b>TFF3 NS</b>	912.555,53 (256.729,08)	<b>60,74</b> <b>(6,65)*</b>	<b>76,49</b> <b>(3,90)*</b>	<b>23,50</b> <b>(3,90)*</b>	345.104,12 (39.500,88)	30,01 (4,66)	<b>39,9</b> <b>(10,03) *</b>
<b>TFF3 VS</b>	739.867,67 (182.518,08)	57,06 (4,56)	<b>77,4</b> <b>(1,79)*</b>	<b>22,51</b> <b>(1,79)*</b>	362.517,18 (39.568,26)	<b>27,24</b> <b>(2,45) *</b>	53,5 (22,37)

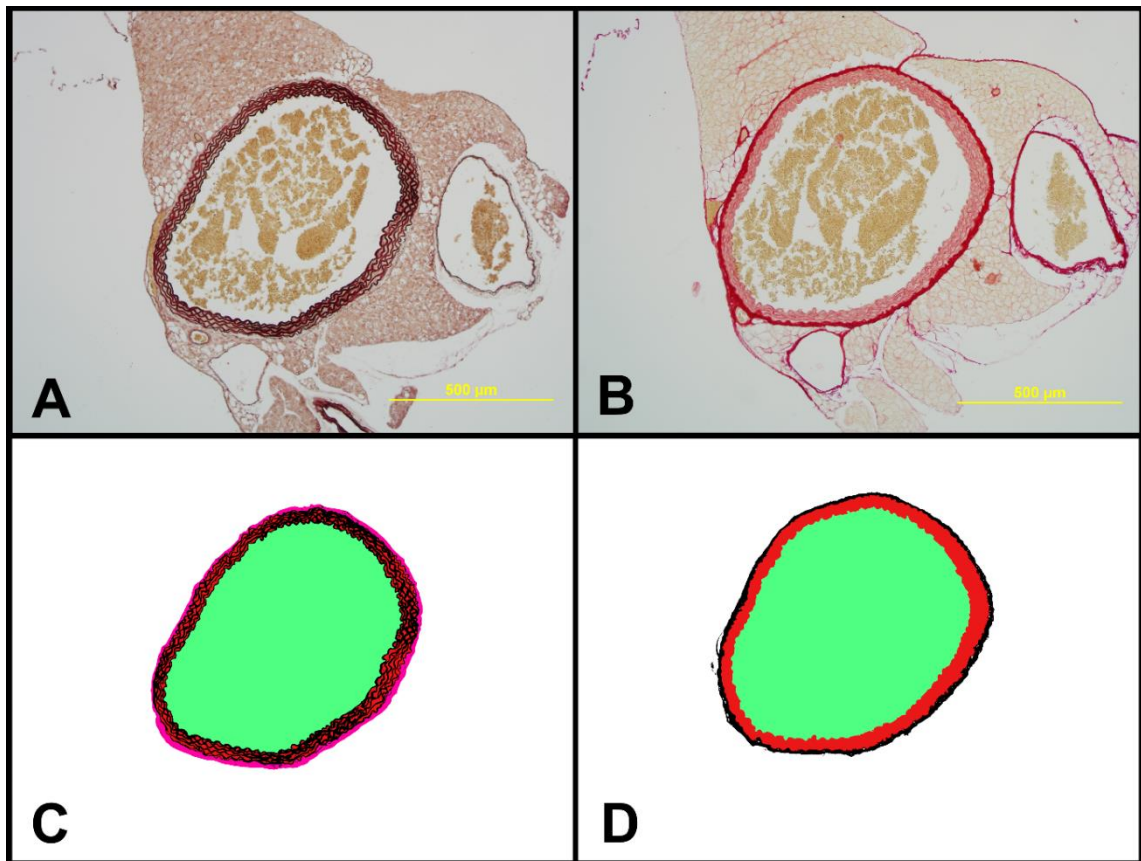
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD); razlike su testirane pomoću One-way ANOVA, \*  $p < 0,05$  - u usporedbi s WT NS.



*Slika 5.23. Presjeci aorte svih ispitivanih skupina*

Presjeci aorte: WT NS (A i E), WT VS (B i F), TFF3 NS (C i G), TFF3 VS (D i H).

Presjeci su obojeni orceinom za vizualizaciju sadržaja elastina (A–D) i picrosirius crvenom za vizualizaciju kolagenih vlakana (E–H). Objektiv: 10×; skala: 500 µm.



**Slika 5.24.** Reprezentativni dijelovi aorte miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanjoj dijeti (VS) korišteni za histomorfološku analizu

(A) Orceinom obojena aorta s elastičnim vlaknima obojenim crnom do smeđom. Objektiv 10×, skala bar 500 µm. (B) Picrosirius crveno obojena aorta koja pokazuje količinu kolagena (crvena). (C) Segmentirana maska označena bojom iz dijela obojenoga orceinom. Elastična vlakna prikazana su crnom, tunica media crvenom, adventitia tunica ružičastom, a područje lumena zelenom. (D) Segmentirana maska označena bojom iz odjeljka obojenoga crvenom picrosiriusom. Kolagen je prikazan crnom bojom, tunica media crvenom, a područje lumena zelenom.

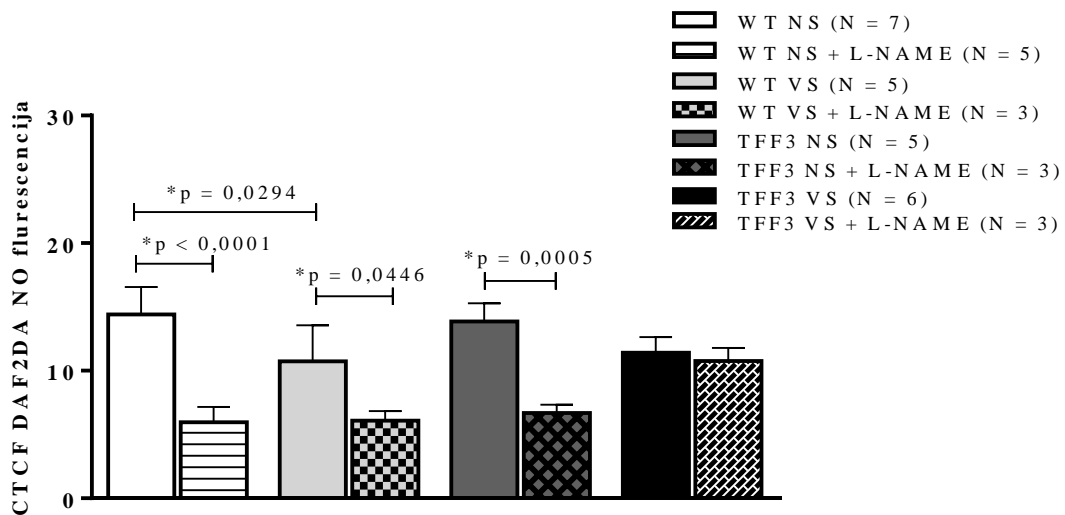
### 5.12. Određivanje razine dušikovoga oksida *in situ* metodom fluorescencije

Bazalna (bez protoka) razina NO-a bila je značajno smanjena u WT VS skupini miševa u usporedbi s WT NS skupinom miševa ( $p = 0,0294$ ). Druge skupine pokazale su slične razine NO-a u uvjetima bez protoka. L-NAME je značajno smanjio razinu NO-a u svim skupinama miševa (WT NS ( $p < 0,0001$ ), WT VS ( $p = 0,0446$ ), TFF3 NS ( $p = 0,0005$ )), osim u TFF3 VS skupini (Slika 5.25 i 5.26). Protokom potaknuto stvaranje dušikovoga oksida u karotidnim



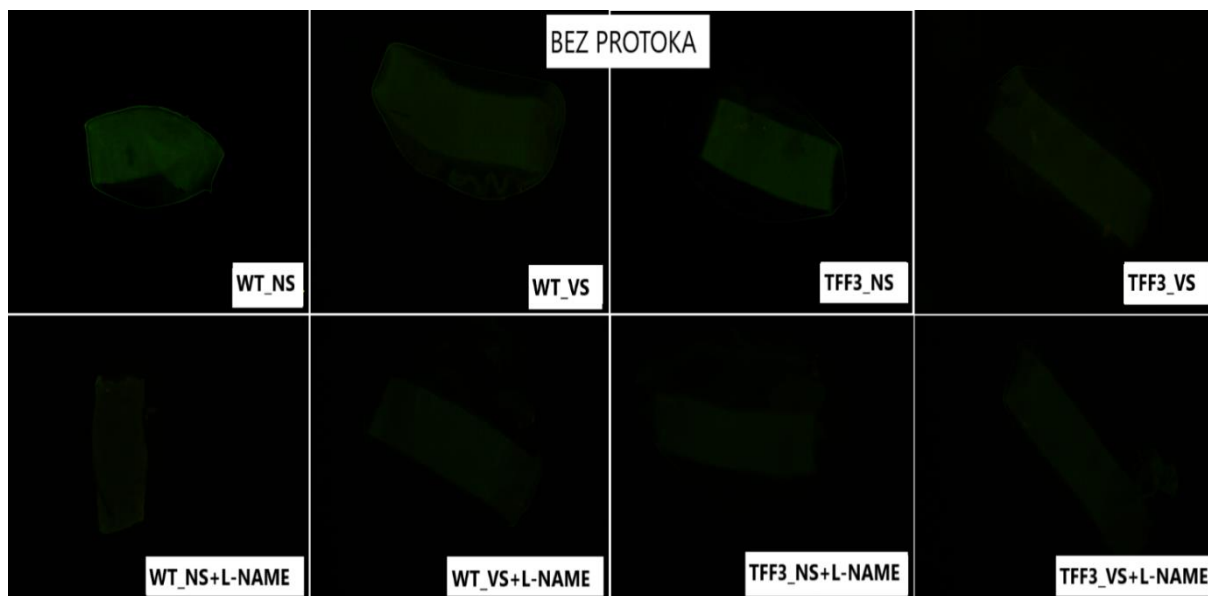
arterijama u WT VS skupini miševa bilo je značajno niže nego u WT NS skupini miševa. Protokom potaknuto stvaranje dušikovoga oksida u TFF3 NS skupini miševa bilo je značajno niže od protokom potaknutoga stvaranja dušikovoga oksida u WT NS skupini ( $p = 0,0004$ ). Protokom potaknuto stvaranje dušikovoga oksida u TFF3 VS skupini miševa bilo je slično kao u TFF3 NS skupini miševa i obje skupine miševa divljeg tipa (WT). Primjena L-NAME značajno je smanjila proizvodnju NO-a u te tri skupine miševa (WT NS ( $p < 0,0001$ ), WT VS ( $p = 0,0104$ ) i TFF3 NS ( $p = 0,0141$ )), dok nije utjecala na razinu NO-a potaknutu protokom u karotidnim arterijama u TFF3 VS skupini (Slika 5.27 i 5.28).

## BEZ PROTOKA



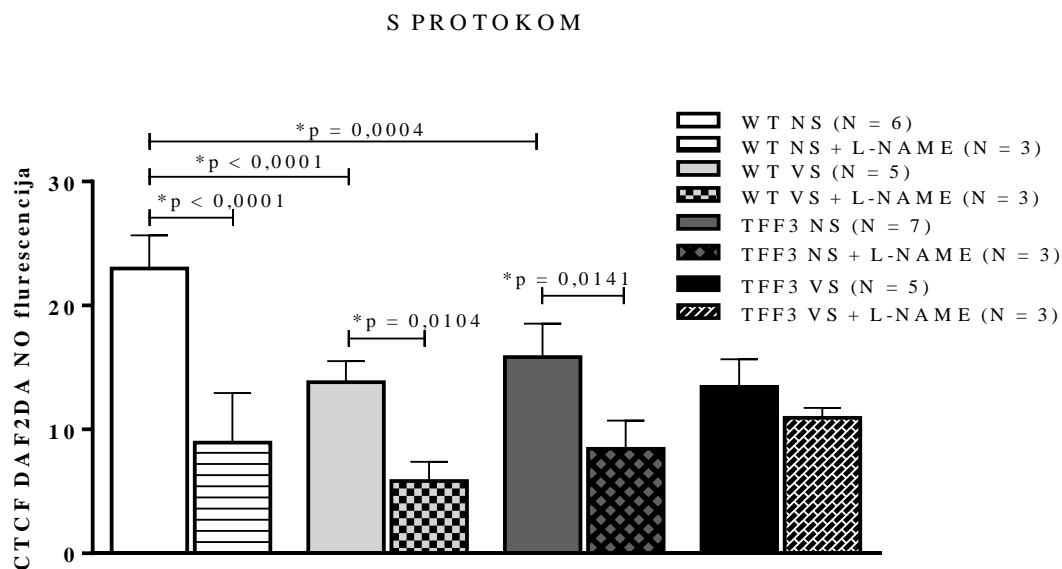
**Slika 5.25.** Grafički prikaz in situ određivanja razine dušikovoga oksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama bez protoka

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD).  $*p < 0,05$ .



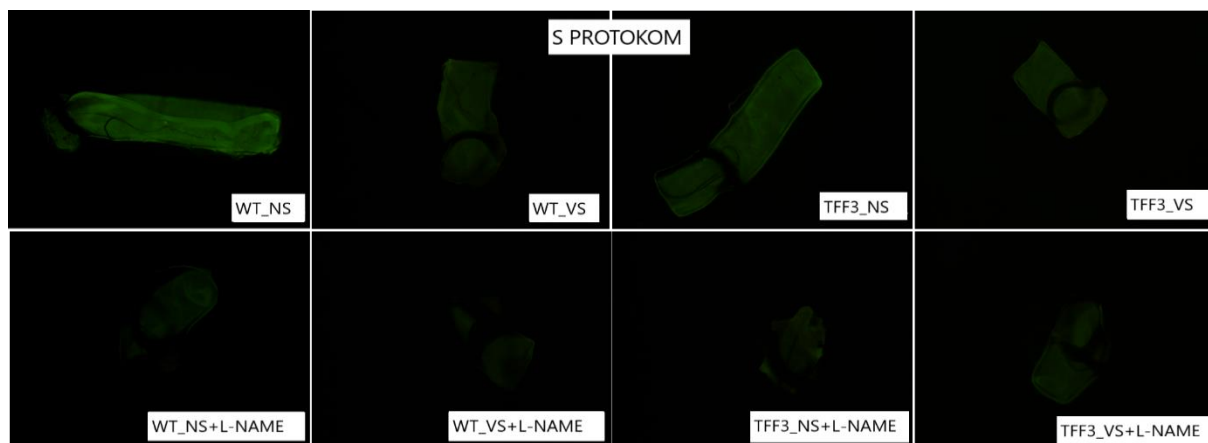
*Slika 5.26. Reprezentativni prikaz in situ fluorescencije dušikovoga oksida u ispitivanim skupinama bez protoka*

Razina dušikovoga oksida procijenjena pomoću DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein) boje. Objektiv 5x; skala 200 um.



*Slika 5.27. Grafički prikaz in situ određivanja razine dušikovoga oksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama s protokom*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \*p < 0,05.



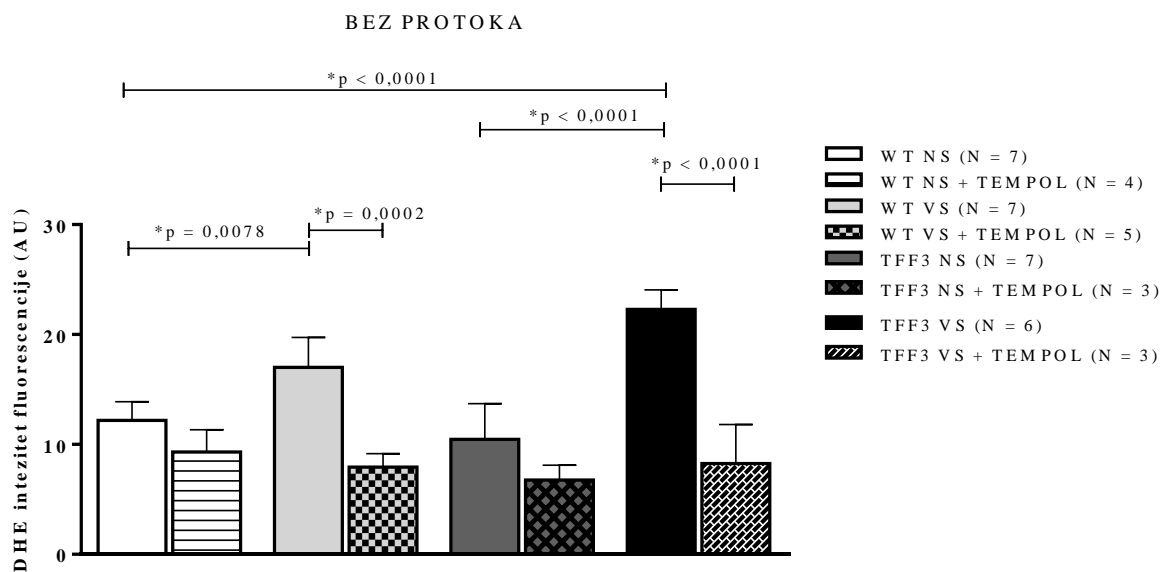
**Slika 5.28.** Reprezentativni prikaz *in situ* fluorescencije dušikovoga oksida u ispitivanim skupinama s protokom

Razina dušikovoga oksida procijenjena pomoću DAF-2DA (4,5-diaminofluorescein) boje. Objektiv 5x; skala 200 um.

### 5.13. Mjerenje razine superoksida *in situ* metodom fluorescencije

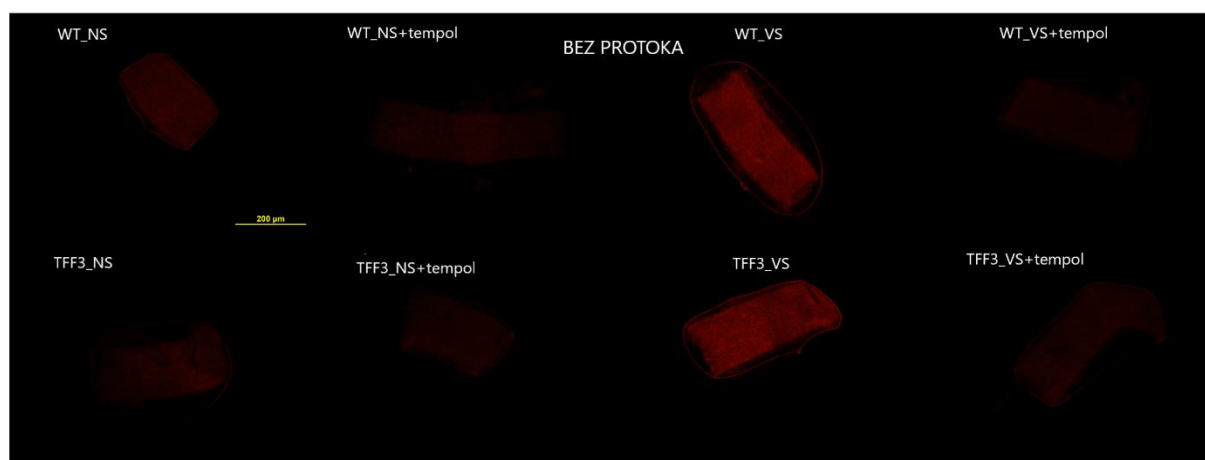
Bazalna (bez protoka) razina ROS-a značajno je povećana u skupini miševa WT VS u usporedbi sa skupinom WT NS ( $p = 0,0078$ ) i skupini TFF3 VS u usporedbi s TFF3 NS ( $p < 0,0001$ ). Tempol je značajno smanjio razinu superoksida u skupinama WT VS ( $p = 0,0002$ ) i skupini TFF3 VS ( $p < 0,0001$ ) (Slika 5.29. i 5.30).

Protokom potaknuto stvaranje superoksida značajno je povećano u skupini WT VS u usporedbi sa skupinom WT NS ( $p = 0,0117$ ) i u skupini TFF3 VS u usporedbi s TFF3 NS skupinom ( $p = 0,0066$ ). TEMPOL je značajno smanjio stvaranje superoksida u svim ispitivanim skupinama (WT NS ( $p = 0,0277$ ), WT VS ( $p < 0,0001$ ), TFF3 NS ( $p = 0,0002$ ) i TFF3 VS ( $p < 0,0001$ )) (Slika 5.31 i 5.32).



**Slika 5.29.** Grafički prikaz in situ određivanja razine superoksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama bez protoka

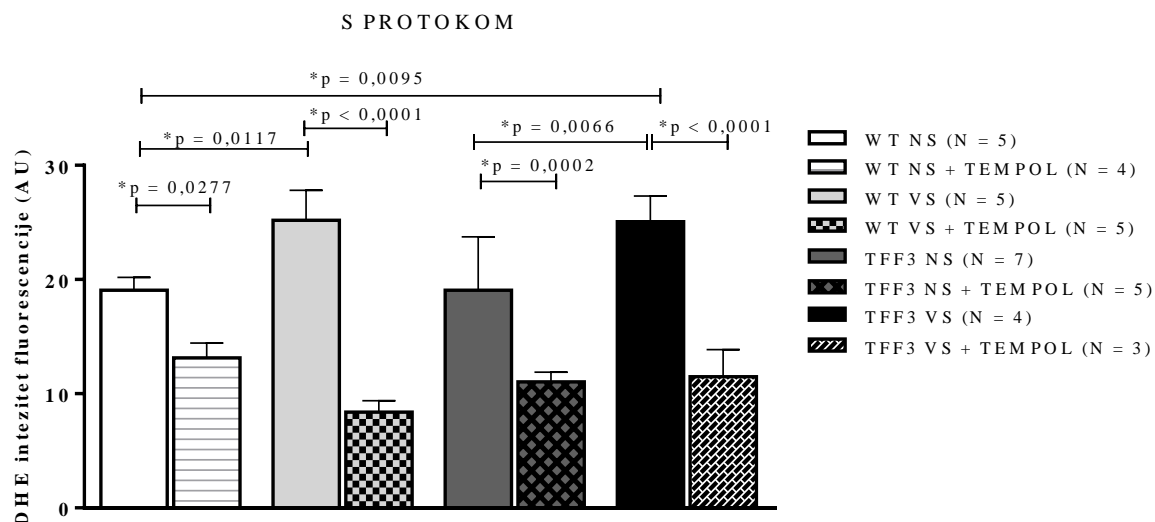
One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.30.** Reprezentativni prikaz in situ fluorescencije superoksida u ispitivanim skupinama bez protoka

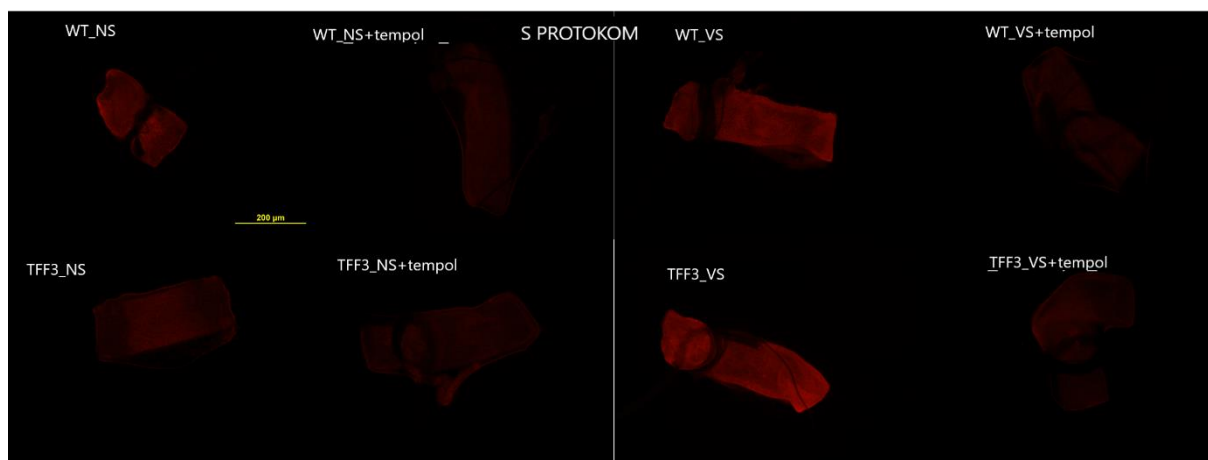
In situ fluorescencija superoksida nakon bojenja karotidne arterije s DHE bojom u svim ispitivanim skupinama prije i nakon inkubacije s TEMPOL-om bez protoka. Intenzitet boje proporcionalan je količini superoksida.

Slike su napravljene na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm).



**Slika 5.31.** Grafički prikaz in situ određivanja razine superoksida metodom fluorescencije u ispitivanim skupinama s protokom

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \*p < 0,05.



**Slika 5.32.** Reprezentativni prikaz in situ fluorescencije superoksida u ispitivanim skupinama s protokom

In situ fluorescencija superoksida nakon bojenja karotidne arterije s DHE bojom u svim ispitivanim skupinama prije i nakon inkubacije s TEMPOL-om bez s protokom. Intenzitet boje proporcionalan je količini superoksida.

Slike su napravljene na ZeissAxioskop MOT2 mikroskopu, pomoću Olympus DP70 kamere uz Zeiss filter set 15 (546 nm valna duljina za ekscitaciju i 590 nm za emisiju uz razdjeljivač snopa na 580 nm).

#### 5.14. Serumska aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i serumskih markera oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP)

Visoki unos soli značajno je smanjio aktivnost GPx u VS skupini miševa divljeg tipa u odnosu na NS skupinu, dok nije bilo značajne razlike među skupinama miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N. Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama oxLDL i AOPP između ispitivanih skupina (Tablica 5.4.).

**Tablica 5.4.** Serumska aktivnost glutation peroksidaze (GPx) i serumskih markera oksidativnoga stresa (oxLDL i AOPP)

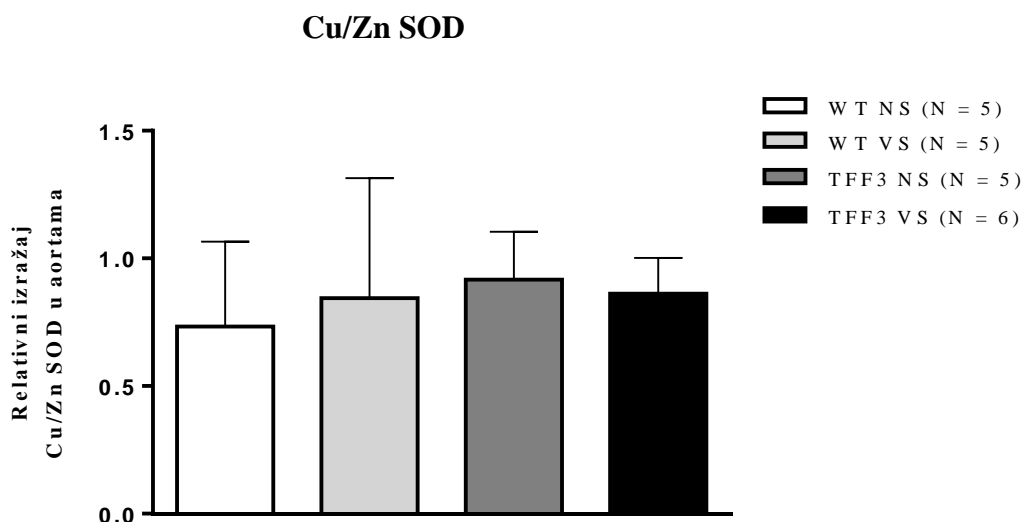
	WT NS (N=8)	WT VS (N=7)	TFF3 NS (N=8)	TFF3 VS (N=8)
GPx (U/mgP)	0,04 (0,02)	0,005 (0,002)*	0,03 (0,0199)	0,03 (0,01)
AOPP (ng/ml)	149,2 (16,3)	148,4 (12)	148,9 8 (13,1)	158,0 (6,7)
oxLDL (pg/ml)	2101,6 (583,1)	1737,9 (332,1)	1981,4 (396,6)	1782,9 (458,9)

\*p<0,05 WT VS vs. WT NS; TFF3 NS, TFF3 VS

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \*p < 0,05.

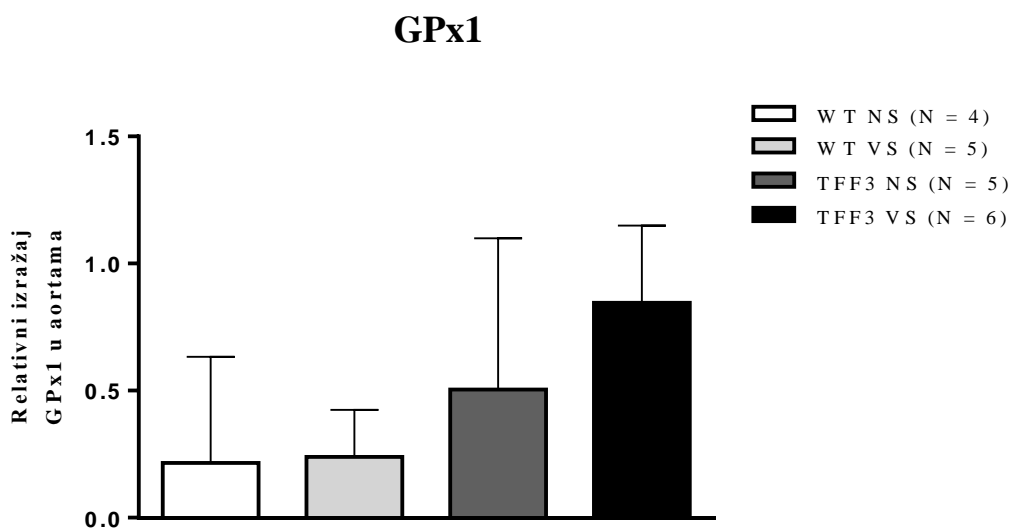
#### 5.15. Izražaj antioksidativnih enzima u aortama miševa divljega tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*

Između ispitivanih skupina utvrđena je statistički značajna razlika jedino u izražaju katalaze. Relativni genski izražaj katalaze značajno je snižen u WT NS skupini u odnosu na WT VS skupinu (p = 0,006) (Slika 5.35.) te u odnosu na skupinu TFF3 NS (p = 0,001) (Slika 5.35). Genski izražaj Cu/Zn SOD (Slika 5.33.) i GPx1 (Slika 5.34.) nije se značajno promijenio.



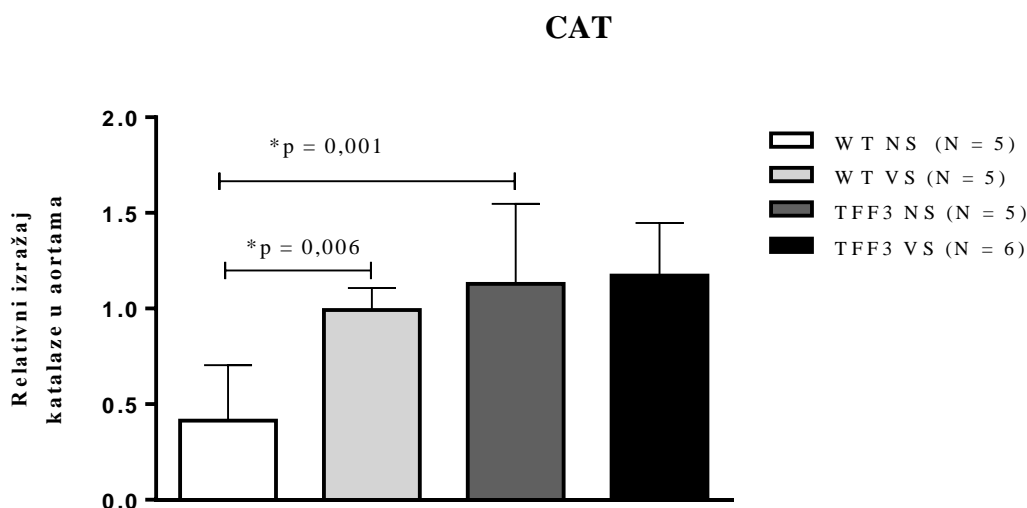
*Slika 5.33. Genski izražaj Cu/Zn SOD u aortama miševa*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



*Slika 5.34. Genski izražaj GPx1 u aortama miševa*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

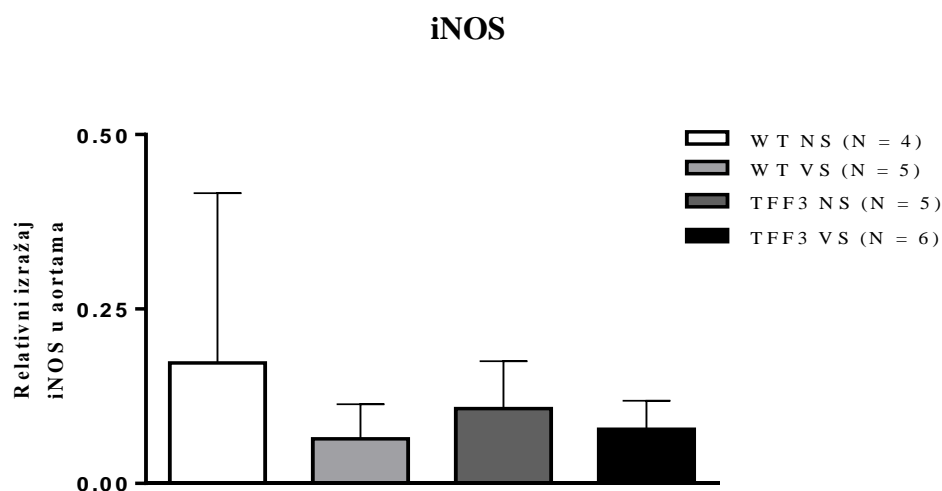


**Slika 5.35.** Genski izražaj katalaze u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

#### 5.16. Genski izražaj endotelne i inducibilne dušik-oksida sintaze u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *Tff3* genom

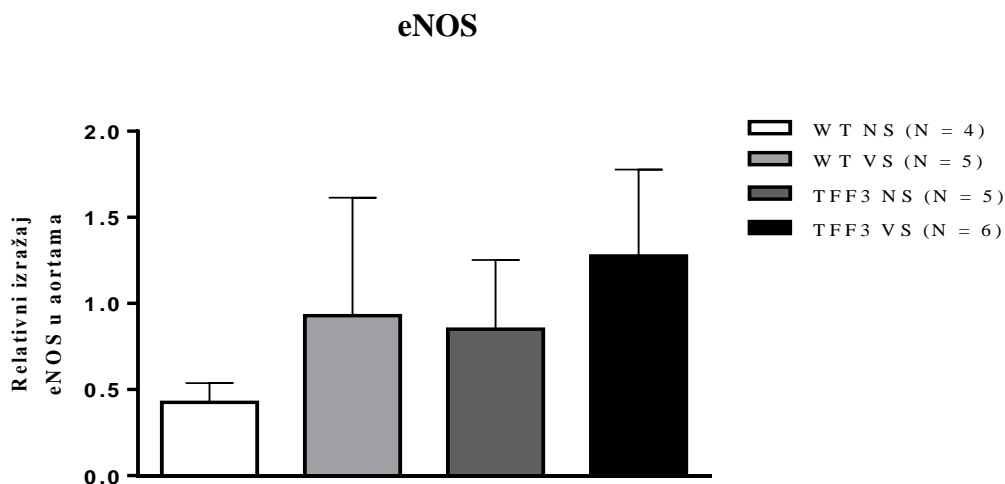
Izmjeren je genski izražaj dušik-oksida sintaza, inducibilne (iNOS; Slika 5.36.) i endotelne (eNOS; Slika 5.37.) u aortama miševa divljeg tipa (WT) i miševa s isključenim *Tff3* genom te su rezultati normalizirani u odnosu na referentni gen HPRT (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Nije utvrđena statistički značajna razlika u genskom izražaju iNOS-a niti eNOS-a dušik-oksida sintaze između ispitivanih skupina.



**Slika 5.36.** Genski izražaj inducibilne dušik oksida sintaze (iNOS) u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



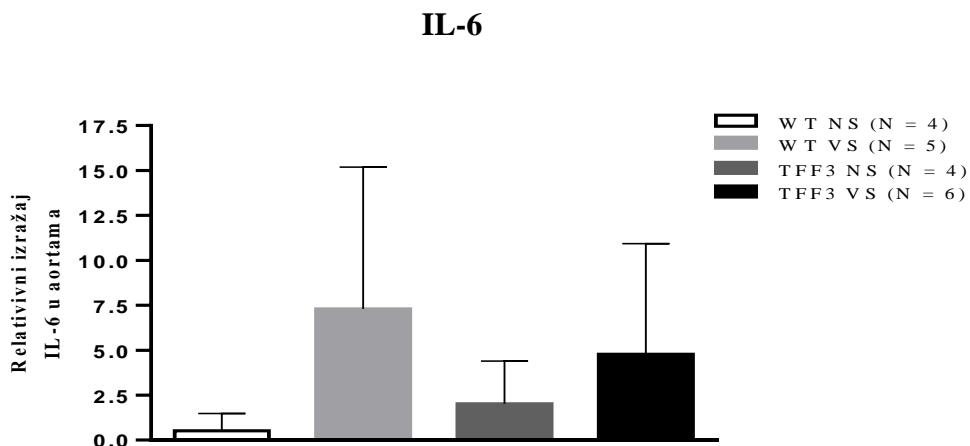


**Slika 5.37.** Genski izražaj endotelne dušik oksid sintaze (eNOS) u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

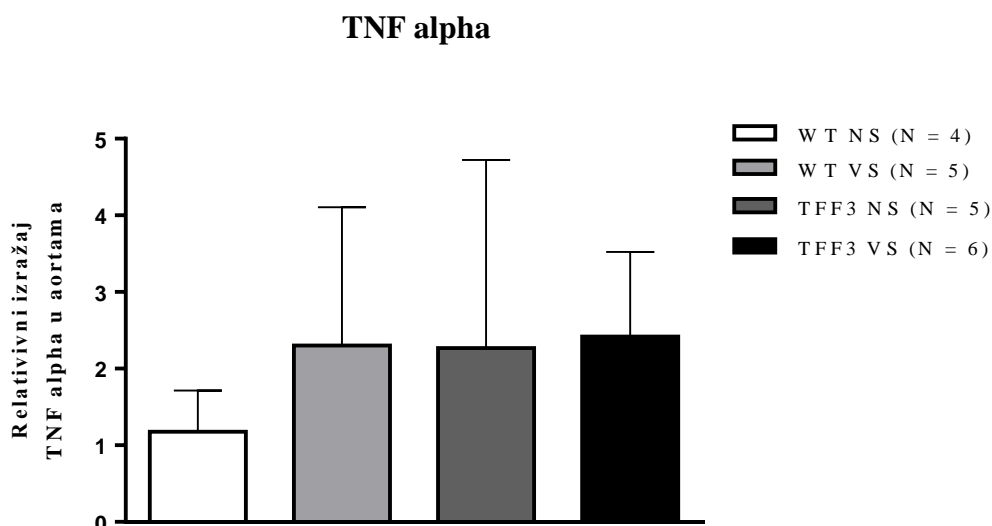
#### 5.17. Mjerenje genskoga izražaja upalnih biljega IL-6, TNF alfa i IL-17A u aortama miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*

Od upalnih parametara određen je relativni genski izražaj IL-6 (Slika 5.38.), TNF alfa (Slika 5.39.) i IL-17A (Slika 5.40.). Vrijednosti izražaja normalizirane su u odnosu na referentni gen HPRT. Značajna razlika u relativnom genskom izražaju IL-17A utvrđena je unutar skupina miševa divljeg tipa, visokoslana dijeta značajno je snizila genski izražaj IL-17A u aortama ( $p = 0,007$ ) (Slika 5.40.).



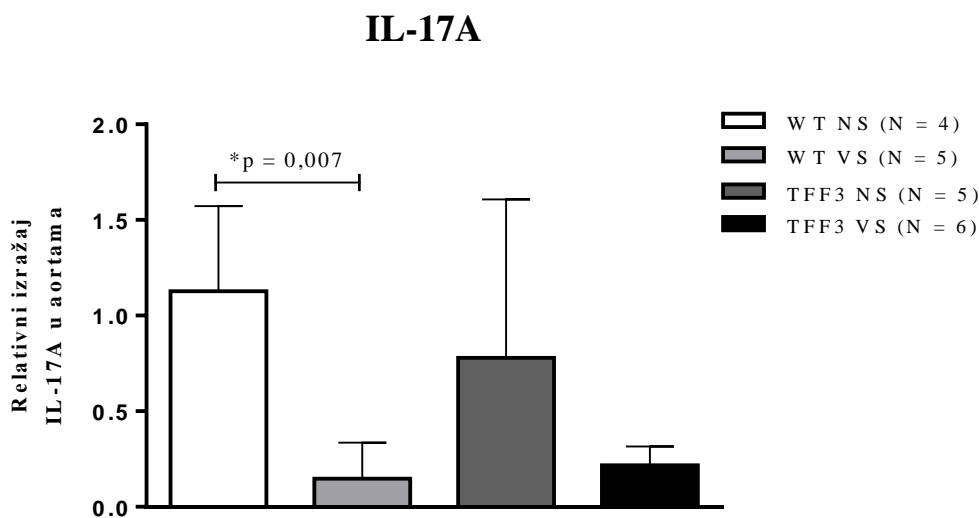
**Slika 5.38.** Genski izražaj IL-6 u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.39.** Genski izražaj *TNF alfa* u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



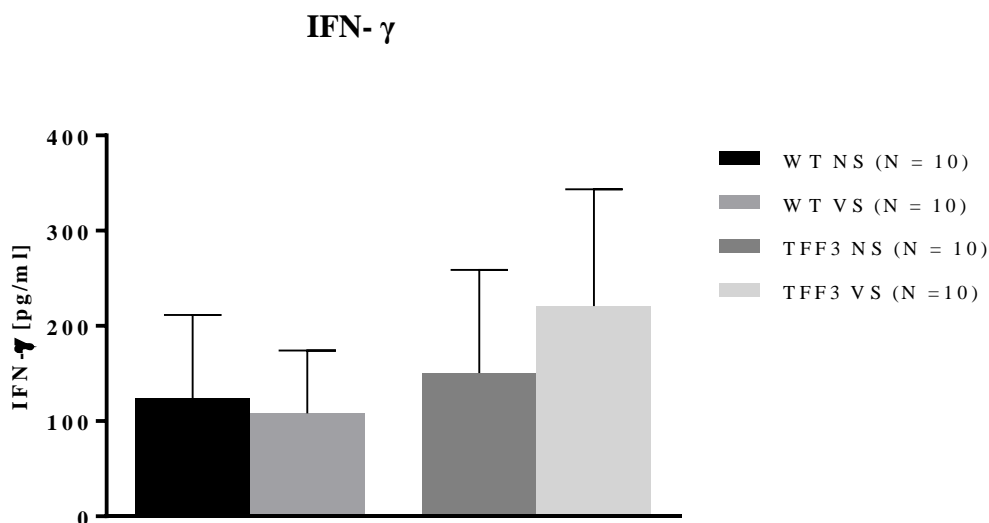
**Slika 5.40.** Genski izražaj *IL-17A* u aortama miševa

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### 5.18. Koncentracije IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 i CRP-a u serumu

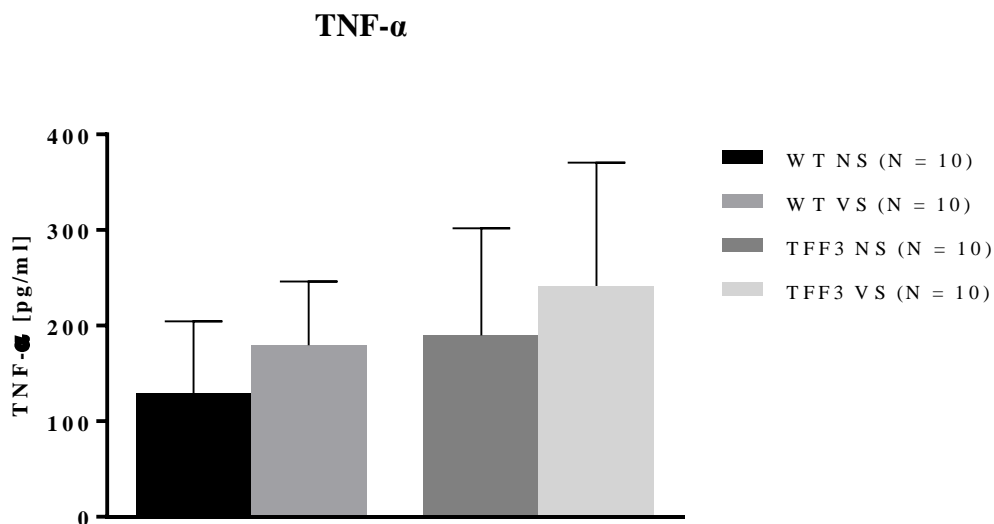
Određena je koncentracija upalnih parametara IFN- $\gamma$  (Slika 5.41.), TNF- $\alpha$  (Slika 5.42.), IL-2 (Slika 5.43.), IL-4 (Slika 5.44.), IL-6 (Slika 5.45.) i CRP-a (Slika 5.46.) u serumu miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*. Od ispitivanih parametara uočena je povećana

koncentracija IL-6 u skupini TFF3 NS u odnosu na WT NS ( $p = 0,0015$ ). Visokoslana dijeta povećala je koncentraciju CRP-a kod miševa divljeg tipa ( $p = 0,0034$ ), dok nije imala učinak kod miševa s isključenim genom *Tff3*.



*Slika 5.41. Koncentracija IFN- $\gamma$  u serumu*

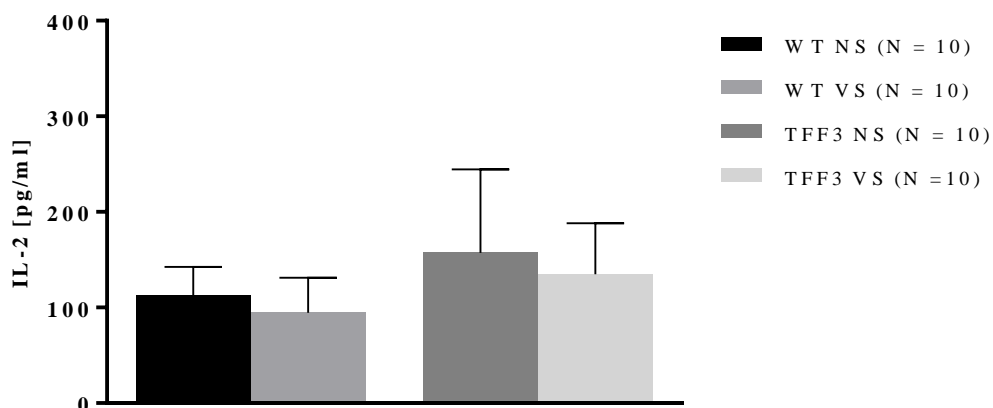
One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



*Slika 5.42. Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

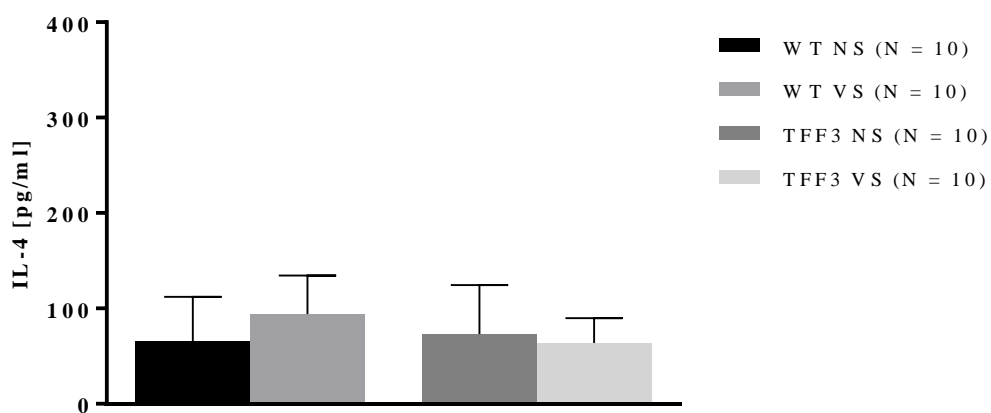
## IL-2



*Slika 5.43. Koncentracija IL-2 u serumu*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

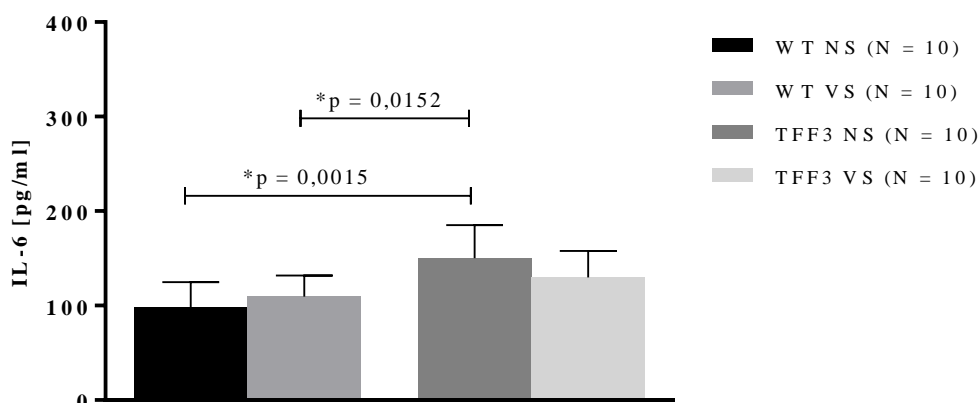
## IL-4



*Slika 5.44. Koncentracija IL-4 u serumu*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

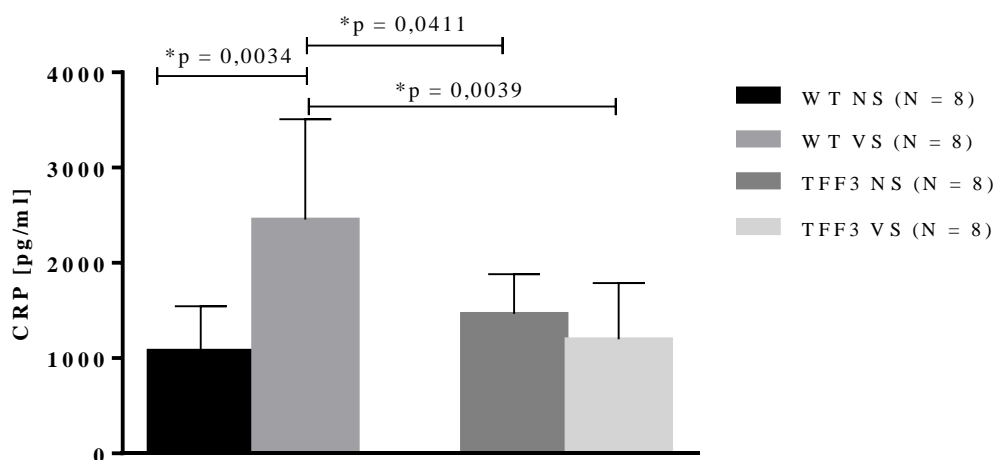
## IL-6



*Slika 5.45. Koncentracija IL-6 u serumu*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

## CRP



*Slika 5.46. Koncentracija CRP-a u serumu*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

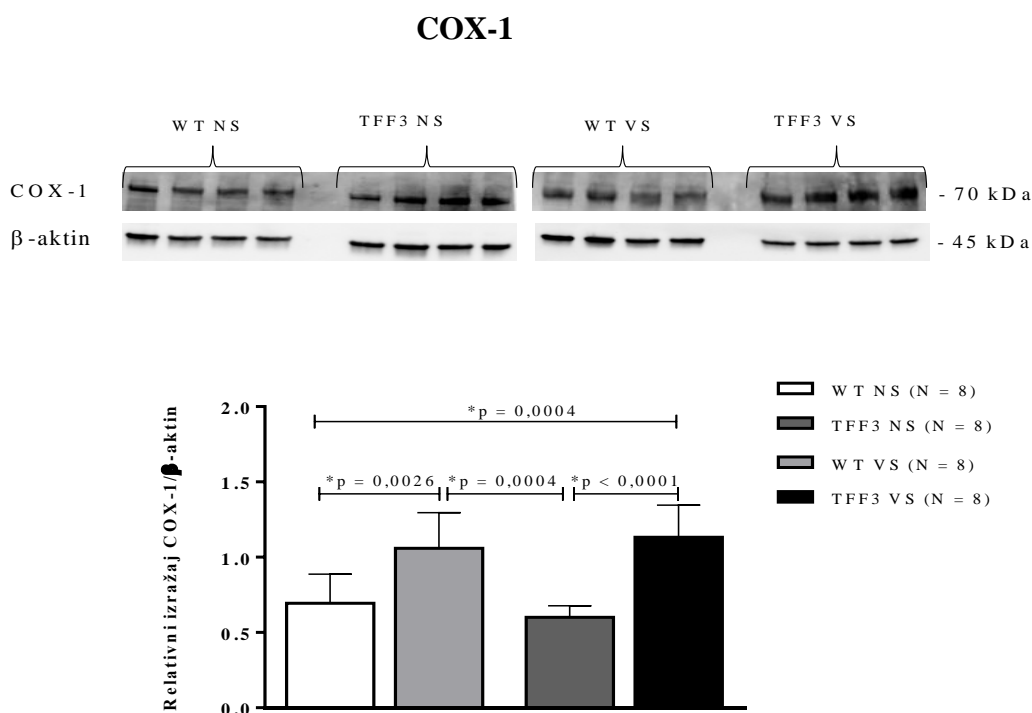
**5.19. Proteinski izražaj COX-1, COX-2, eNOS, iNOS, KCNB1 i TRPV4**

Izražaj proteina enzima COX-1 značajno je povišen u TFF3 NS ( $p = 0,0026$ ) i TFF3 VS ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi s njihovim odgovarajućim WT kontrolama. Visokoslana dijeta nije utjecala na izražaj enzima COX-1 niti u jednom soju (Slika 5.47.). Izražaj proteina enzima COX-2 značajno je snižen u WT VS skupini u usporedbi s WT NS grupom ( $p = 0,0028$ ) (Slika 5.48.). Nisu pronađene značajne razlike između skupina u izražaju proteina CYP2J2 (Slika 5.49.) i CYP2C9 (Slika 5.50.)

Izražaj proteina iNOS (Slika 5.51.) bio je značajno povišen u WT VS ( $p < 0,0001$ ), TFF3 NS ( $p = 0,0011$ ) i TFF3 VS ( $p = 0,0480$ ) u usporedbi s WT NS grupom.

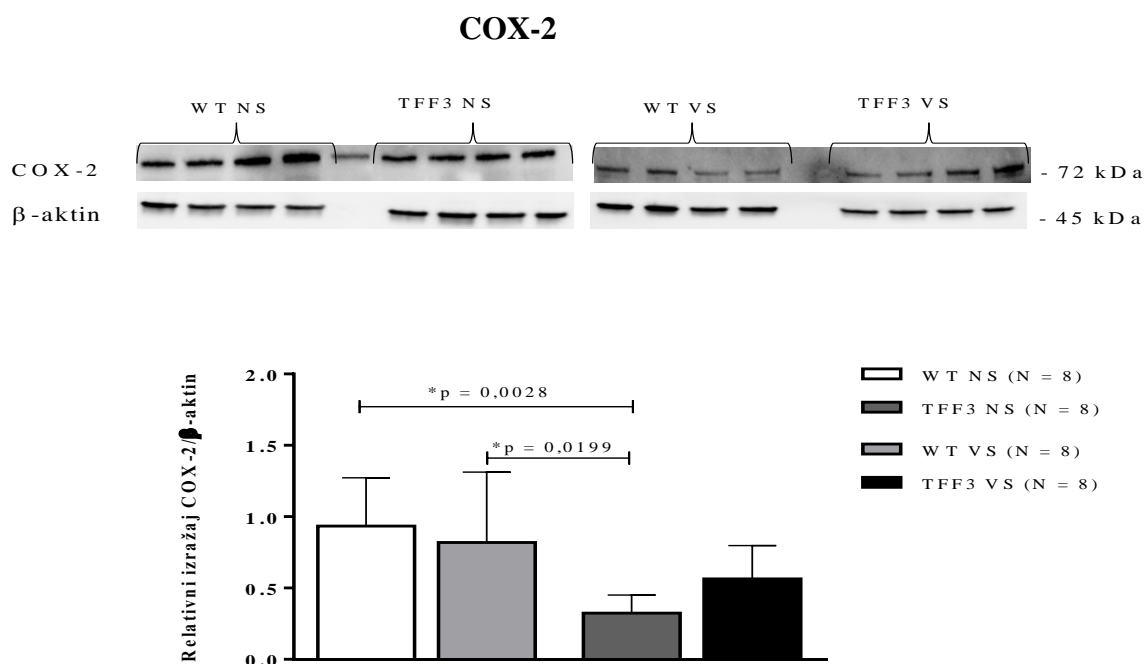
Izražaj proteina eNOS (Slika 5.52.) bio je značajno povišen u WT VS ( $p=0,0011$ ), TFF3 NS ( $p = 0,0005$ ) i TFF3 VS ( $p = 0,0011$ ) u usporedbi s WT NS grupom. Izražaj proteina eNOS bio je značajno povišen u TFF3 VS u usporedbi s TFF3 NS ( $p = 0,0011$ ) skupinom i WT VS skupinom ( $p = 0,0005$ ).

Izražaj proteina KCNB1 (Slika 5.53.) značajno je povišen u TFF3 VS u usporedbi s TFF3 NS grupom ( $p = 0,005$ ). Izražaj proteina KCNB1 značajno je povišen u WT NS ( $p = 0,005$ ) i WT VS ( $p < 0,0001$ ) u usporedbi sa skupinom TFF3 NS. Izražaj proteina TRPV4 bio je značajno povišen u skupini TFF3 NS u usporedbi sa skupinom WT NS ( $p = 0,0147$ ) i WT VS ( $p = 0,0344$ ) (Slika 5.54.).



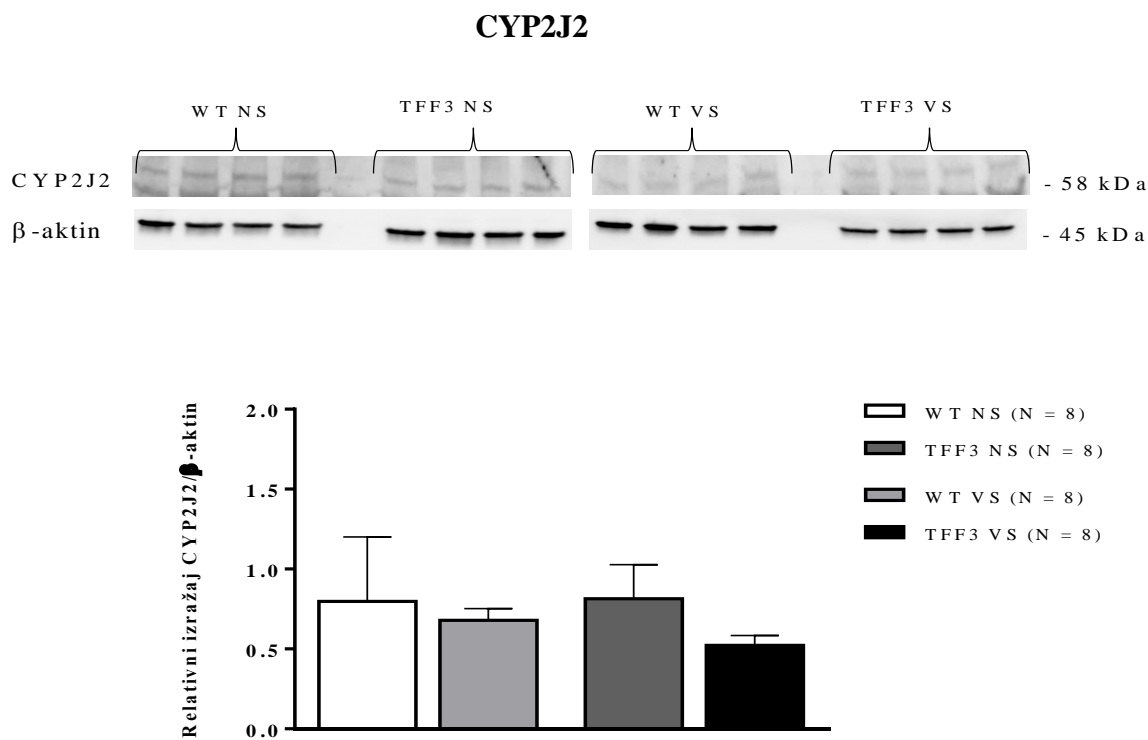
*Slika 5.47. Proteinski izražaj COX-1 u aortama*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



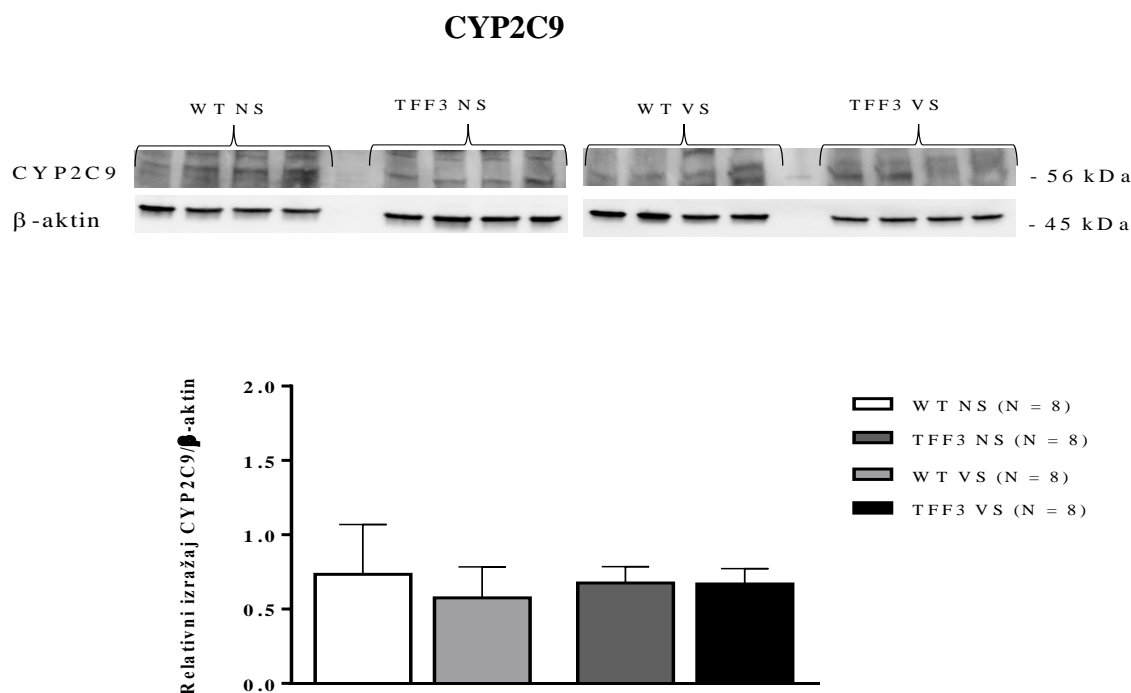
**Slika 5.48.** Proteinski izražaj COX-2 u aortama

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



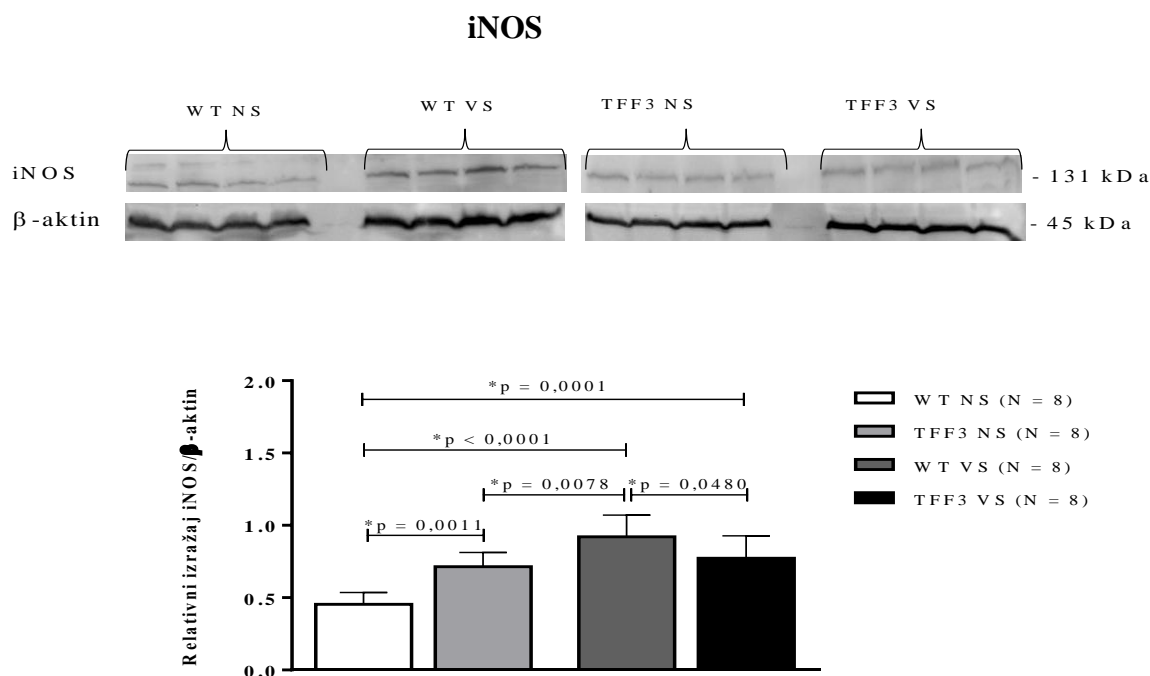
**Slika 5.49.** Proteinski izražaj CYP2J2 u aortama

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



*Slika 5.50. Proteinski izražaj CYP2C9 u aortama*

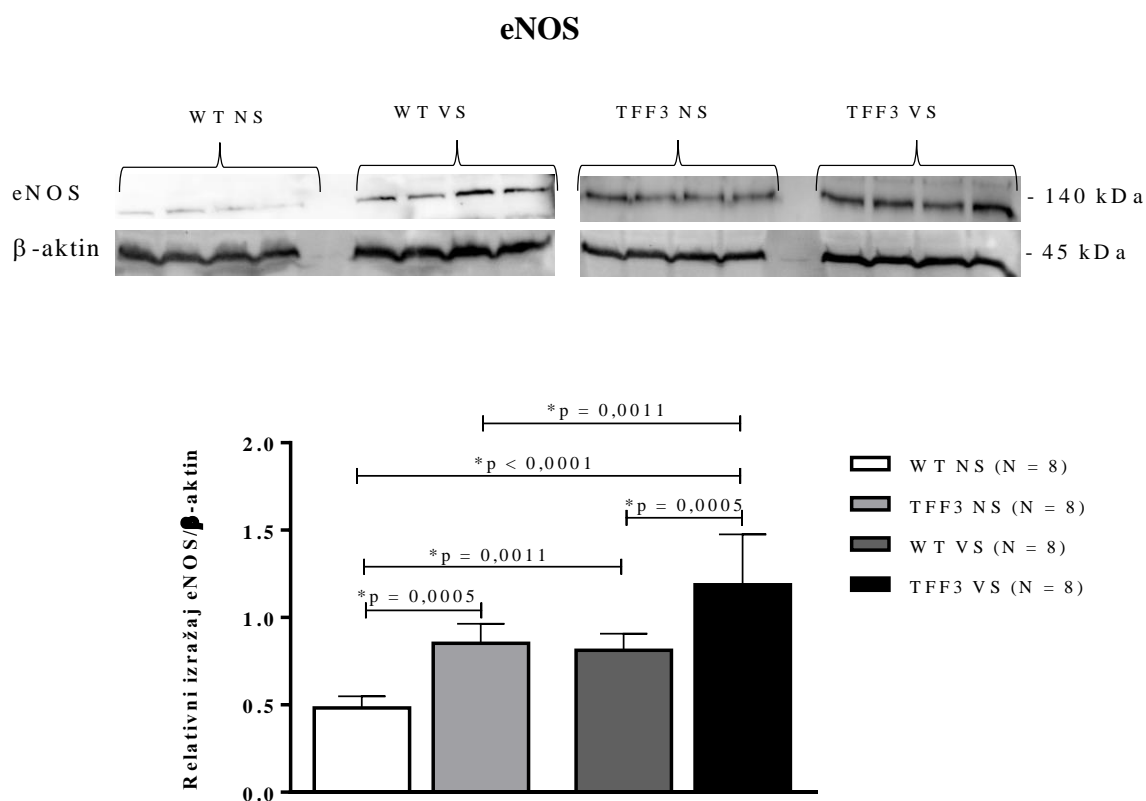
One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



*Slika 5.51. Proteinski izražaj iNOS u aortama*

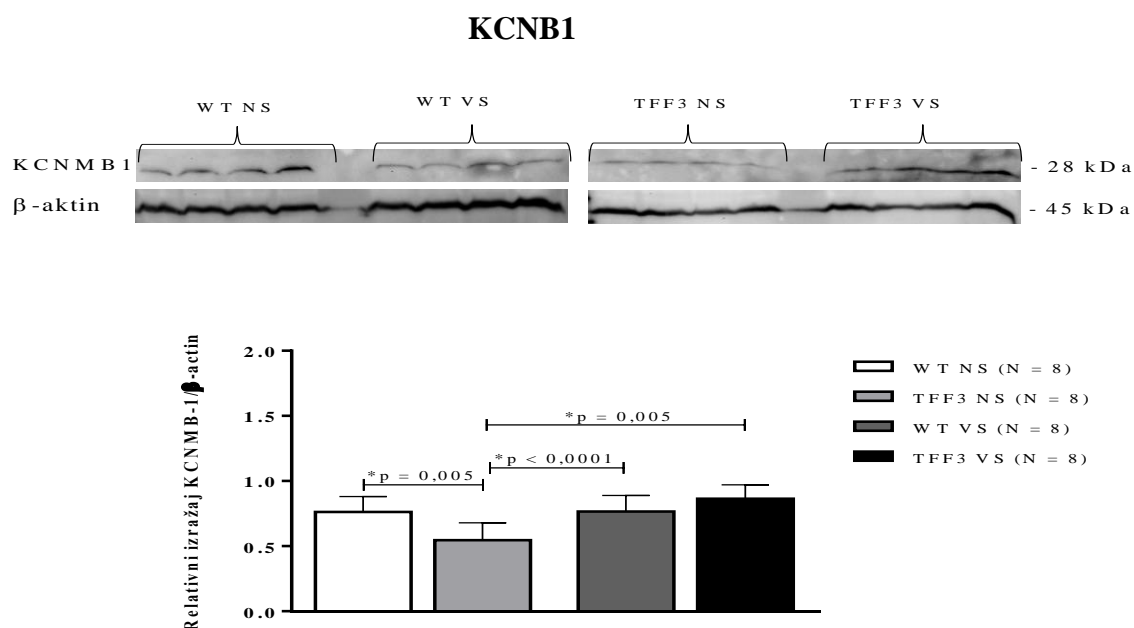
One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .





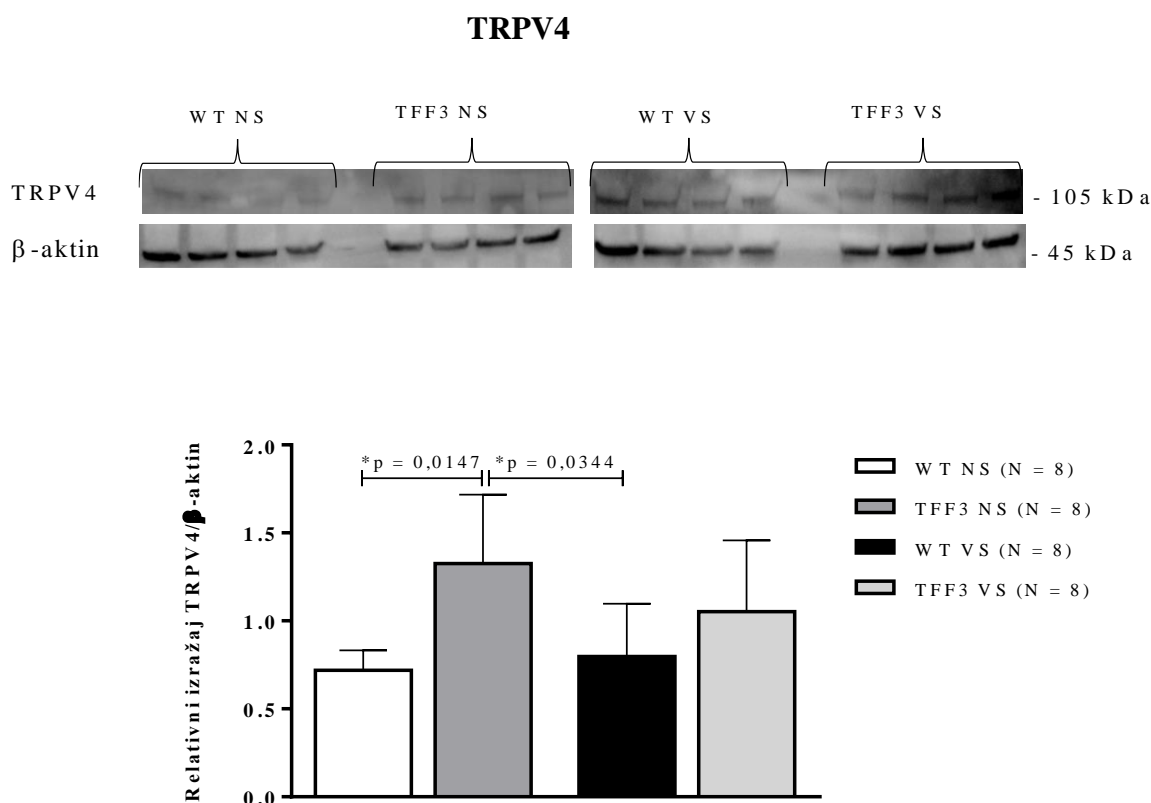
*Slika 5.52. Proteinski izražaj eNOS u aortama*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



*Slika 5.53. Proteinski izražaj KCNB1-a u aortama*

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .



**Slika 5.54.** Proteinski izražaj TRPV4 u aortama

One Way ANOVA test. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina (SD). \* $p < 0,05$ .

### 5.20. Izražaj gena za markere ER stresa, oksidativni stres i citokine

Razine izražaja gena koji kodiraju markere ER stresa, oksidativni stres/antioksidativne enzime i proupalne citokine određene su u tkivu jetre miševa s isključenim genom *Tff3* i WT miševa izloženih VS prehrani ili NS prehrani tijekom protokola ishemije mozga.

Kod WT miševa kratkotrajna VS prehrana rezultirala je značajno smanjenom regulacijom gena sXBP1 u odnosu na skupinu WT NS (1,51 puta;  $p = 0,036$ ), dok nije bilo značajne razlike u razinama izražaja preostalih ER stresnih markera, antioksidativnih enzima i gena za citokine (Slika 5.55.A). Za razliku od WT miševa, miševi s isključenim genom *Tff3* na VS (TFF3 VS grupa) imali su značajno više razine mRNA ATF4 (1,57 puta;  $p = 0,038$ ), BIP (2,38 puta;  $p = 0,049$ ), CHOP (2,51 puta;  $p = 0,016$ ), COX1 (15,4 puta;  $p = 0,002$ ) i SOD3 (36 puta;  $p = 0,002$ )

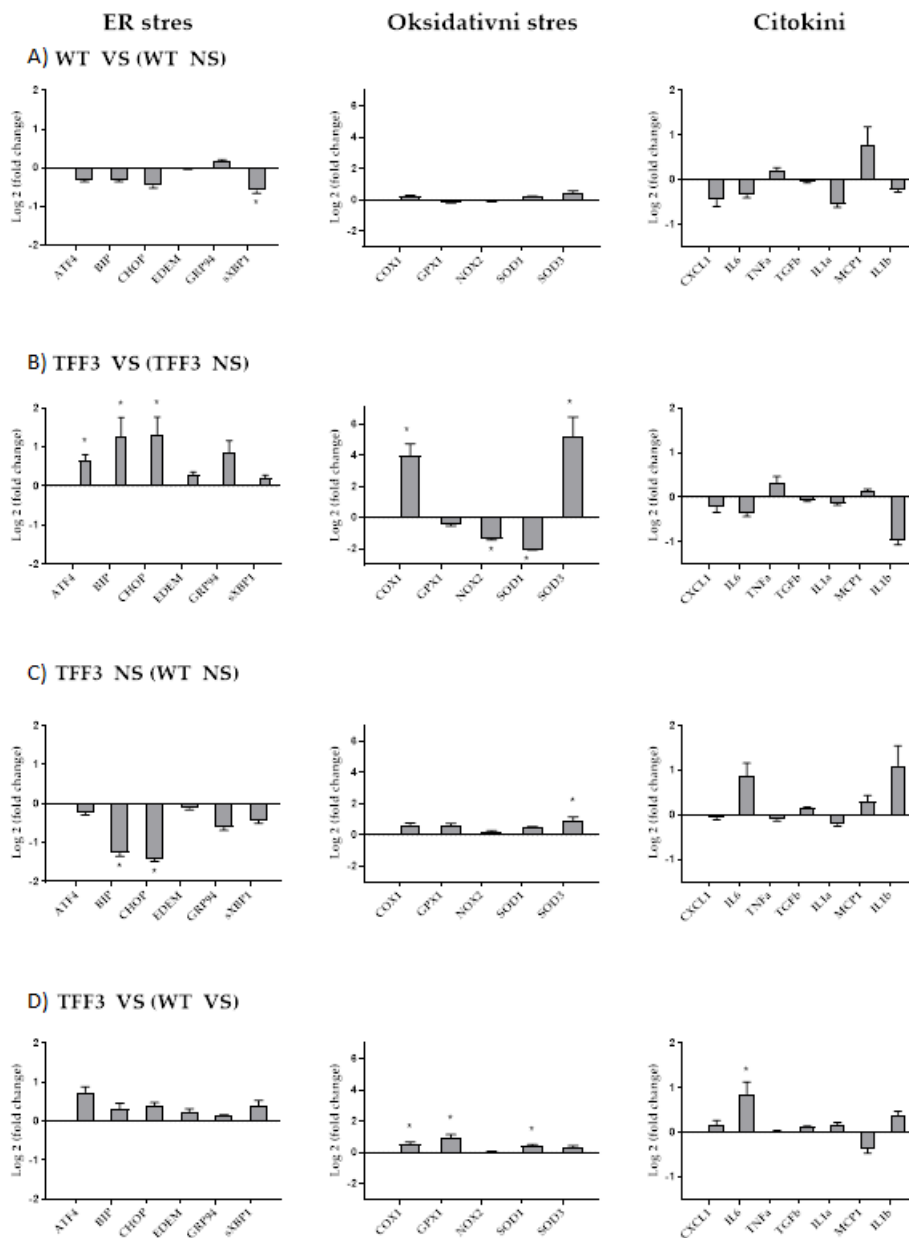
geni, dok su NOX2 (2,56 puta;  $p = 0,001$ ) i SOD1 (4,12 puta;  $p = 0,001$ ) bile značajno snižene (Slika 5.55.B).

Jedino je u skupini TFF3 NS došlo do smanjenje regulacije gena BIP (2,40 puta;  $p = 0,044$ ) i CHOP (2,68 puta;  $p = 0,012$ ) i približno dvostrukim povećanjem gena SOD1 ( $p = 0,042$ ; Slika 5.55.C).

TFF3 VS miševi imali su značajno više razine mRNA gena COX1 (1,47 puta;  $p = 0,046$ ), GPX1 (1,88 puta;  $p = 0,021$ ), SOD1 (1,35 puta;  $p = 0,015$ ) i IL-6 (1,81 puta;  $p = 0,05$ ; Slika 5.55.D) u odnosu na WT VS skupinu.

Visokoslana dijeta imala je znatno manji učinak na izražaj ciljnih gena kod WT miševa (Slika 5.55.A), što je u suprotnosti s TFF3 VS miševima koji su pokazali diferencijalni izražaj nekoliko ciljnih gena, uključujući 15 puta i 36 puta povećane razine izražaja mRNA gena COX1 i SOD3 (Slika 5.55.B).

Miševi s isključenim genom *Tff3* imaju promijenjen odgovor na VS prehranu u odnosu na miševe s isključenim genom *Tff3* na NS prehrani u smislu gena relevantnih za ER stres i gena oksidativnoga stresa (Slika 5.55.A i 5.55.B). Životinje izložene moždanom udaru pokazale su da su miševi s isključenim genom *Tff3* na NS prehrani imali izraženiji volumen infarkta mozga. Jetra tih miševa pokazala je značajno smanjenje gena relevantnih za ER stres (BIP, CHOP; Slika 5.55.C) u usporedbi s WT miševima. Jetra miševa s isključenim genom *Tff3* na VS prehrani nije pokazala razliku u aktivaciji markera relevantnih za ER stres u usporedbi s WT miševima.

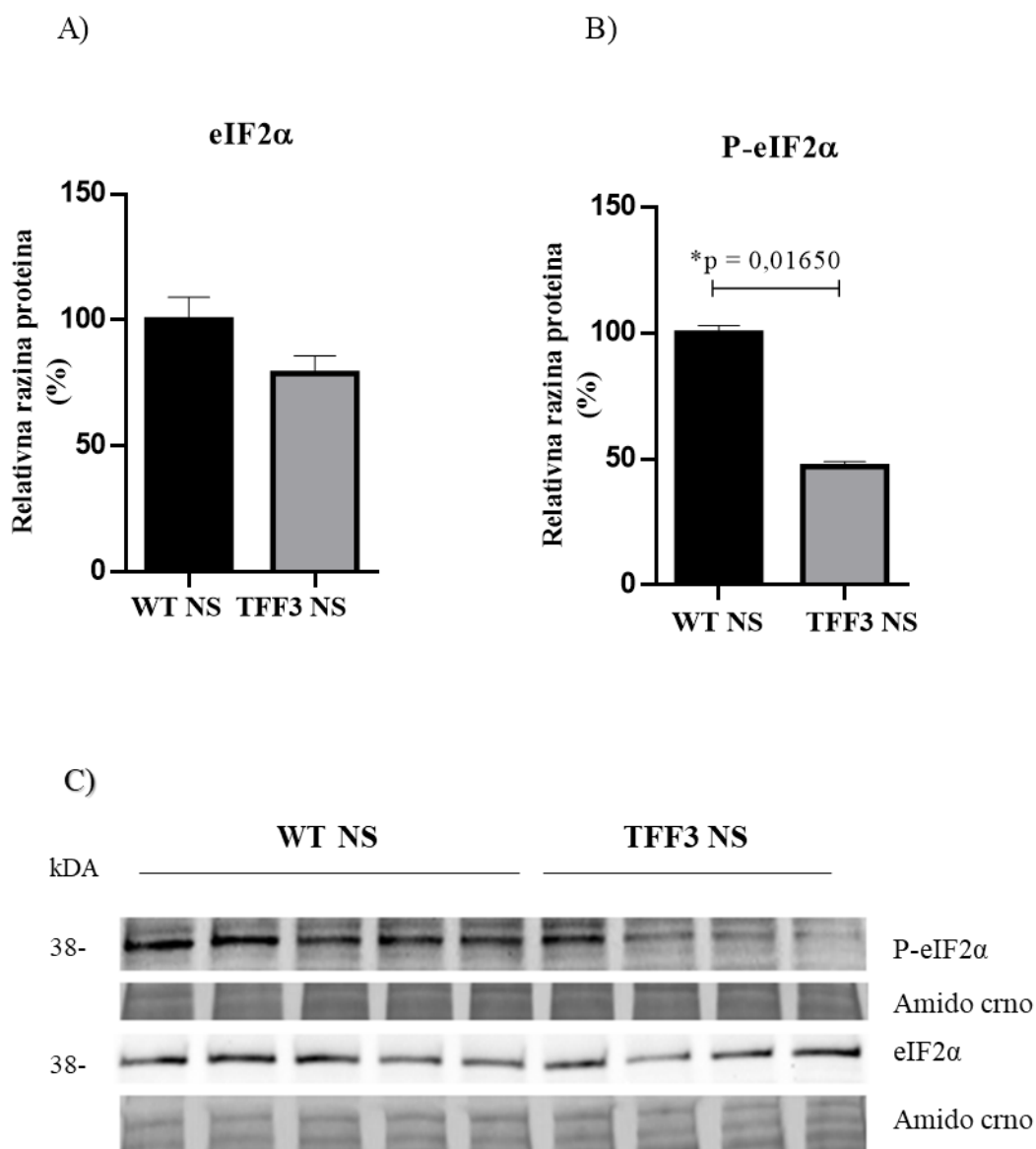


**Slika 5.55.** Izražaj gena koji kodiraju markere ER stresa, oksidativni stres/antioksidativne enzime i proupalne citokine u jetri miševa s isključenim genom *Tff3* i WT miševa na viokoslanjoj (VS) i niskoslanjoj dijeti (NS)

qPCR je proveden korištenjem Sybrgreen detekcije, a Ct podaci analizirani su REST programom. Podaci su izraženi kao log<sub>2</sub> promjene puta za WT VS grupu u odnosu na WT NS (A), TFF3 VS grupu u odnosu na TFF3 NS (B), TFF3 NS grupu u odnosu na WT NS (C) i TFF3 VS skupina u odnosu na WT VS (D). Podaci su uspoređeni kako je opisano da bi se procijenili učinci prehrane (A i B) ili genotipa (C i D). \* Značajna razlika ( $p < 0,05$ ).

5.21. Aktivacija ER stres proteina eIF2 $\alpha$ 

Usporedba aktivacije eIF2 $\alpha$  u jetri WT i TFF3 miševa na NS dijeti pokazala je razliku u intenzitetu moždanoga udara (Slika 5.56.A, Slika 5.56.C). Miševi s isključenim genom *Tff3* imaju za 50 % smanjenu aktivaciju P-eIF2 $\alpha$  (Slika 5.56.B, Slika 5.56.C).



**Slika 5.56.** Relativna razina proteina markera ER stresa eIF2 $\alpha$  i p-eIF2 $\alpha$  u jetri WT NS i TFF3 NS miševa s induciranim moždanim udarom

Razina proteina prikazana je u odnosu na WT miševe kao aritmetička sredina (SEM). Razlika između skupina uspoređena je Studentovim t-testom. \* Značajna razlika ( $p < 0,05$ ).

### 5.22. Učinak isključenja gena *Tff3* i visokoslane dijetete na izražaj proteina

Rezultati proteomske analize različito zastupljenih proteina u karotidnim arterijama miševa s isključenim genom *Tff3* i miševa divljeg tipa na visokoslanjoj dijeti prikazani su u Tablici 5.5. (Slika 5.57.)

Proteomska analiza pokazala je značajan učinak nedostatka gena *Tff3* na izražaj proteina kod miševa na visokoslanjoj dijeti.

Pronađeno je 186 značajno reguliranih proteina, uključujući proteine koji sudjeluju u staničnoj organizaciji i biogenezi, staničnoj proliferaciji, staničnoj smrti i metaboličkim procesima. Štoviše, neki od tih proteina uključeni su u nekoliko različitih signalnih puteva, kao što su putevi osjetljivosti na SIDS, signalni put MAPK, signalni put EGFR1, signalni put TNF-alfa i NF- $\kappa$ B; adhezija-PI3K-Akt-mTOR-signalni put, i signalizacija interferona tipa II (IFNG). Omjer izražaja proteina bio je u rasponu od 0,221 (keratin 35) do 9,625 (protein toplinskoga šoka 65). Statistički relevantni proteini s 50 % povećanim/smanjenim izražajem ekstrahirani su (40 različitih entiteta) za identifikaciju proteinskih mreža pomoću STRING programa (Slika 5.57., Slika 5.58).

Ova analiza otkrila je pet mreža, uključujući (1) interakciju tri strukturalna proteina keratina 18, keratina 35 i keratina 82; (2) skupina strukturalnih i funkcionalnih neuronskih proteina (teški polipeptid neurofilamenta, peptidaza b22 povezana s kalikreinom 1, 20,30-ciklički nukleotid 30-fosfodiesteraza, mijelinski protein P0, mijelinski proteolipidni protein, neurofilamentni teški polipeptid); (3) proteina uključenih u aktivaciju urođenoga imunološkog sustava i TNF-alfa i NF- $\kappa$ B signalizaciju (protein toplinskoga šoka HSP 90-beta, 60 kDa protein toplinskoga šoka, CD9 antigen ad histonski klaster 2, H4) koji je u izravnoj interakciji sa (4) skupinom strukturalnih i funkcionalnih/kontrakcijskih mišićnih stanica povezanih proteina (protein koji veže miozin C, brzi tip, miomezin 2, miozin-3, troponin T) i klaster od dva ribosomska proteina (ribosomski protein S26, ribosomski protein S26, pseudogen 1).

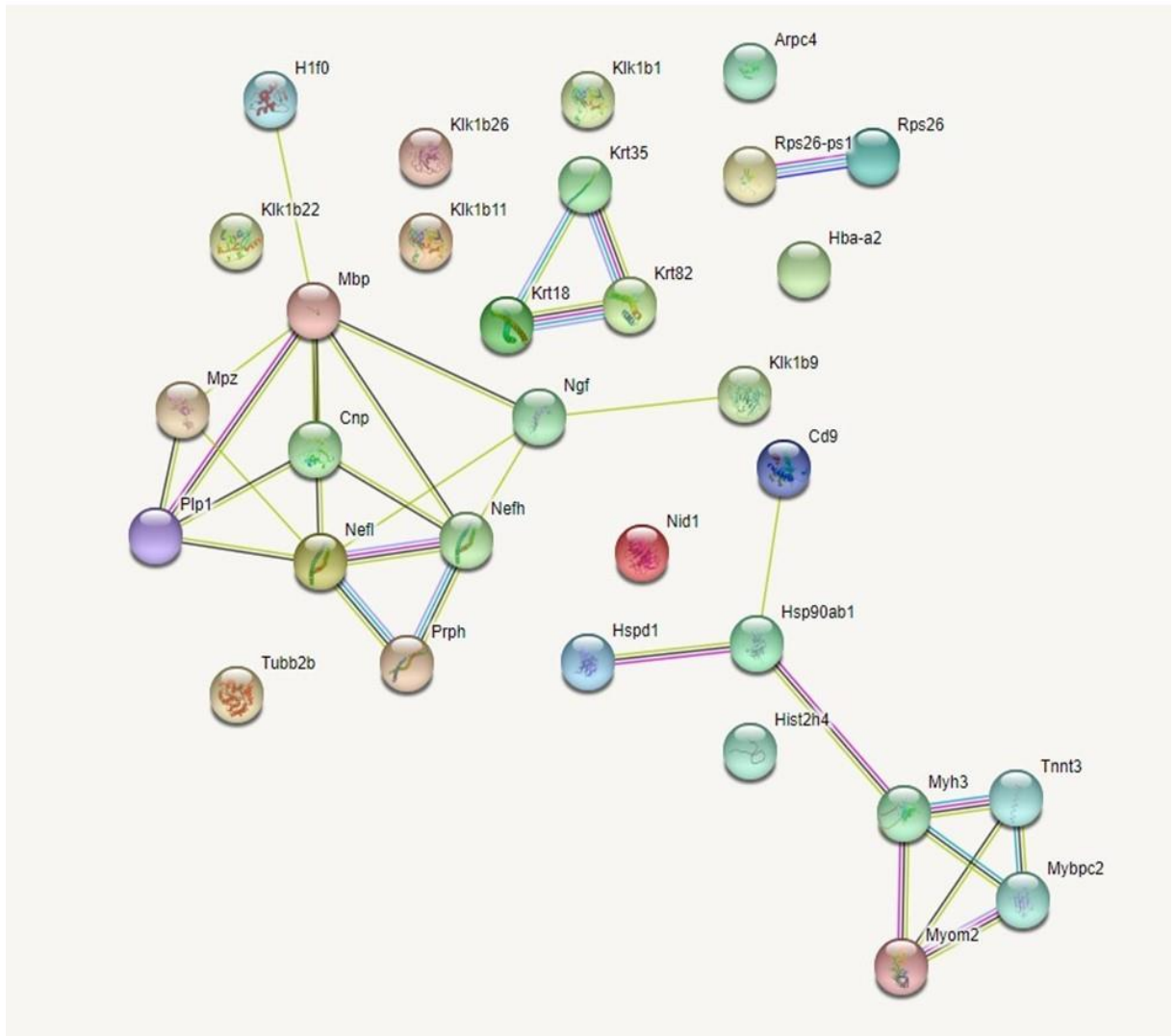
**Tablica 5.5.** Rezultati proteomske analize različito izraženih proteina u karotidnim arterijama miševa s isključenim genom *Tff3* na visokoslanjoj dijeti u usporedbi s WT miševima

<b>Simbol proteina</b>	<b>Omjer</b>	<b>p Vrijednost</b>
Hspd1	9,625	$1,08 \times 10^{-15}$
Nefl	4,248	$1,08 \times 10^{-15}$
Ngf	3,339	$1,08 \times 10^{-15}$
Krt18	3,299	$1,08 \times 10^{-15}$
Tubb2b	3,293	$1,08 \times 10^{-15}$
Nid1	3,207	$1,08 \times 10^{-15}$
Mpz	2,962	$1,08 \times 10^{-15}$
Krt18	2,727	$3,59 \times 10^{-13}$
Mpz	2,688	$8,81 \times 10^{-13}$
Klk1b26	2,683	$9,04 \times 10^{-13}$
Mbp	2,432	$2,27 \times 10^{-10}$
Plp1	2,389	$5,80 \times 10^{-10}$
Nefh	2,270	$7,15 \times 10^{-09}$
Mbp	2,193	$3,89 \times 10^{-08}$
Klk1b1	2,187	$4,35 \times 10^{-08}$
Cnp	2,138	$1,23 \times 10^{-07}$
Nefh	1,982	$3,64 \times 10^{-06}$
Hsp90ab1	1,892	$2,31 \times 10^{-05}$
Prph	1,86	$4,48 \times 10^{-05}$
Mbp	1,849	$5,42 \times 10^{-05}$
Arpc4	1,848	$5,42 \times 10^{-05}$
Arpc4	1,848	$5,42 \times 10^{-05}$
Tnnt3	1,824	$6,44 \times 10^{-05}$
Myom2	1,756	$2,58 \times 10^{-04}$
Klk1b11	1,742	$3,41 \times 10^{-04}$
Klk1b22	1,741	$3,48 \times 10^{-04}$
Prph	1,734	$4,01 \times 10^{-04}$
Cd9	1,682	0,0011
Klk1b9	1,677	0,0012

<b>Simbol proteina</b>	<b>Omjer</b>	<b>p Vrijednost</b>
Hist2h4	1,661	0,0016
H1f0	1,655	0,0017
Prph	1,606	0,044
Mybpc2	1,533	0,017
Myh3	1,501	0,029
Rps26	1,479	0,042
Rps26; Rps26-ps1	1,479	0,042
Gm6654	1,479	0,042
Nid1	1,478	0,042
Hba-a2	0,623	0,0035
Krt82	0,336	$1,08 \times 10^{-15}$
Krt35	0,221	$1,08 \times 10^{-15}$

Omjer prikazuje log<sub>2</sub> (TFF3 VS/WT VS),  $p \leq 0,05$  smatralo se značajnim

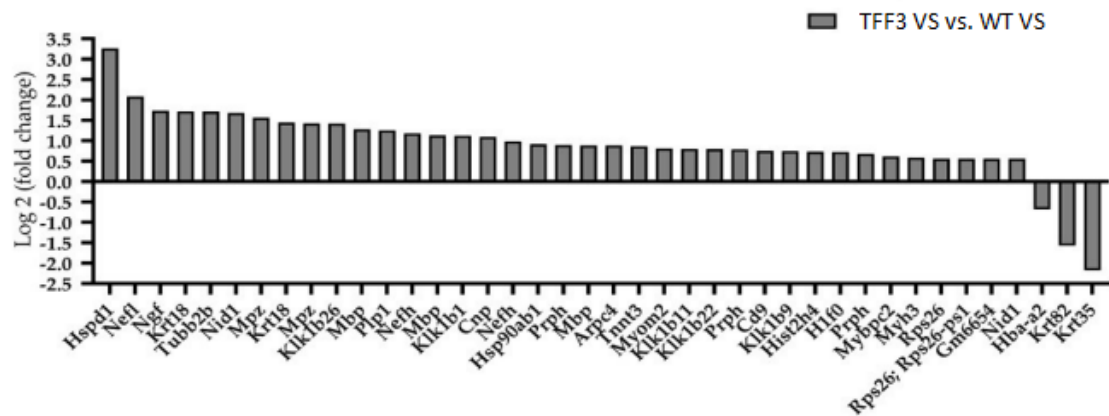




**Slika 5.57.** Shematski prikaz interakcija različito zastupljenih proteina u karotidnim arterijama TFF3 VS miševa u usporedbi s WT VS

Različito obojeni čvorovi - proteini koji stupaju u interakcije. Linije: poznate interakcije (plavo-iz baze podataka, ružičasto - eksperimentalno dobiveni podaci, zeleno - susjedni geni, crveno - spajanje gena, tamno plavo - zajedničko pojavljivanje gena, žuto - pretraživanje teksta, crno - ko-ekspresija, ljubičasto - homologija proteina).

## 5. REZULTATI



**Slika 5.58.** Omjer količine proteina izoliranih iz karotidnih arterija TFF3 VS i WT VS miševa

Podaci su izraženi kao log (2) omjera (TFF3 VS/ WT VS) za pojedini statistički značajno promijenjen gen.

## 6. RASPRAVA

Glavne spoznaje ovoga istraživanja su: a) razina krvnoga tlaka ne mijenja se značajno tijekom sedam dana visokoslane dijeta; b) visokosлана dijeta narušava protokom potaknut odgovor karotidne arterije miševa divljeg tipa, dok ne utječe na odgovor miševa s isključenim genom *Tff3*, što je potvrđeno smanjenom vaskularnom proizvodnjom NO-a kod WT miševa; c) utvrđena je oporavljena protokom potaknuta dilatacija u *in vivo* uvjetima u prisutnosti “hvatača” superoksida TEMPOL-a u WT VS skupini, što dokazuje da povećana razina oksidativnoga stresa, nastala pod utjecajem visokoga unosa soli, dovodi do poremećenoga FID-a; d) povećan vaskularni oksidativni stres potvrđen je procjenom razina endotelnoга superoksida/ROS u karotidnoj arteriji; e) dilatacija u skupinama miševa TFF3 NS, WT NS i WT VS jednako je ovisna o razinama NO-a, ciklooksigenazama i metabolitima EET-a, dok je dilatacija u TFF3 VS skupini miševa ovisna o COX-u; i d) genetska modifikacija, kao i unos soli, značajno utječu na mehanizme FID-a, mijenjajući angažman ionskih kanala; e) strukturna analiza aorte pokazala je da VS prehrana nije utjecala na strukturna svojstva aorte TFF3 miševa. Međutim, postoji značajan učinak VS prehrane na strukturu aorte WT miševa, što ukazuje na zaštitni učinak isključenja *Tff3* gena na krvne žile; f) ishemijsko oštećenje mozga bilo je slično u obje skupine životinja na VS prehrani, što ukazuje na to da VS prehrana nije pogoršala učinke ishemije kod oba soja. Međutim, TFF3 NS miševi pokazali su veće ishemijsko oštećenje u usporedbi s WT NS miševima, vjerojatno zbog njihovoga smanjenog odgovora na ER stres.

### 6.1. Utjecaj kratkotrajnoga unosa visokih koncentracija soli na promjenu krvnoga tlaka

Brojna istraživanja na životinjama i ljudima pokazala su da 3 - 7 dana visokoslane dijeta ne povećava krvni tlak (223–226), što je u skladu s dobivenim rezultatima, koji pokazuju da kratkoročna VS dijeta povećava proizvodnju slobodnih radikala, posljedično narušavajući vaskularnu reaktivnost, bez obzira na razinu krvnoga tlaka (Tablica 5.1.).

## 6.2. Vaskularni odgovor karotidne arterije kod visokoslane dijete

Mjerenjem razine protokom potaknute dilatacije kod NS i VS skupine životinja u ovisnosti o prisutnosti pojedinih inhibitora utvrđena je razlika u mehanizmima koji dovode do dilatacije. Dilatacija NS skupina oba soja miševa je značajno smanjena u prisutnosti sva tri inhibitora zasebno (L-NAME, INDO i MSPPOH) (Slika 5.7. i Slika 5.9.). Za razliku od NS skupina oba soja i skupine WT VS kod TFF3 VS skupine dilatacija potaknuta protokom pokazala se ovisna jedino o razini COX-a (Slika 5.10). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je protokom potaknuta dilatacija karotidne arterije kod NS dijete oba soja i WT VS ovisna o metabolitima NO, COX-u i EETs-ima podjednako, odnosno da niti jedan od metabolita nije pokazao primarnu ulogu u utjecaju na razinu dilatacije, dok kod unosa soli, dilatacija karotidne arterije TFF3 VS ovisi primarno o razini COX-a. Proteinski izražaj COX-1 značajno je viši u TFF3 VS u odnosu na WT NS (Slika 5.47.) Iako se izražaj gena dušik oksid sintaza (iNOS i eNOS) nije značajno promijenio uočena je povišena razina u izražaju proteina iNOS i eNOS kod miševa s isključenim genom *Tff3*. Proteinski izražaj eNOS-a znatno je povišen u VS skupinama oba soja (Slika 5.52.). Uočeni rezultati su u skladu sa studijama koje sugeriraju da bi regulacija izražaja proteina eNOS mogla biti kompenzacijski odgovor na smanjenje dostupnosti NO (225,226). Primjena L-NAME smanjila je razinu NO određenu *in situ* metodom fluorescencije u svim skupinama, osim u TFF3 VS skupini (Slika 5.32.). O endotelu ovisna vazodilatacija na ACh značajno smanjena nakon visokoslane dijete, što predstavlja dodatnu potvrdu endotelne disfunkcije (Slika 5.5.). Funkcionalna sposobnost stanica vaskularnih glatkih mišića testirana je pomoću endotel neovisnog donora NO natrijeva-nitroprusida (SNP) te je utvrđeno kako je odgovor očuvan u svim ispitivanim skupinama (Slika 5.6.).

Povećano zanimanje za ulogu oksidativnoga stresa kod niza raznih bolesti usmjerilo je pozornost na istraživanje lijekova koji sprječavaju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) pripada skupini nitroksidnih spojeva koji imitiraju djelovanje superoksid-dismutaze (SOD). Također, metabolizira i sprječava nastanak ili štetno djelovanje singlet kisika, hidroksilnoga aniona, peroksidnoga radikala i drugih ROS-a te pospješuje bioraspoloživost NO-a (227). Proučavani su u životinjskim modelima povećanja ROS-a i njegovih učinaka na endotelnu funkciju i hipertenziju (228). U ovoj studiji primjena TEMPOL-a *in vivo* nije imala učinak na FID kod WT NS, TFF3 NS i TFF3 VS. Međutim, u WT VS TEMPOL je poboljšao FID. Također, TEMPOL je značajno smanjio razinu superoksida u svim ispitivanim skupinama (Slika 5.31).

Ti rezultati potvrđuju da visok unos soli značajno povećava razinu slobodnih radikala kisika i oksidativni stres. Nekoliko važnih antioksidativnih sustava sudjeluje u smanjenju ROS-a, kao što su SOD, CAT i GPx (229).

Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da miševi divljeg tipa (WT) imaju značajno niži genski izražaj katalaze nego miševi s isključenim genom *Tff3*. (Slika 5.35.). Promjene uvjetovane visokoslanom dijetom uočene su samo kod WT miševa. Visokoslana dijeta rezultirala je porastom genskoga izražaja katalaze kod WT miševa, dok je izražaj istoga enzima ostao nepromijenjen kod miševa s isključenim genom *Tff3*. Nisu uočene promjene izražaja ostalih enzima unutar pojedinoga soja i između skupina. Katalaza razlaže i eliminira vodikov peroksid, jedan od najčešćih uzroka povećanoga oksidativnog stresa. Studija provedena na miševima također je pokazala da kratkotrajna prehrana s visokim udjelom masti uzrokuje povećani izražaj katalaze što je spriječilo daljnje oštećenje posredovano povećanim razinama oksidativnoga stresa, osobito utjecaja vodikovoga peroksida (230).

VS dijeta rezultirala je značajno smanjenom aktivnošću GPx u WT VS skupini miševa u usporedbi sa svim ostalim skupinama (Tablica 5.4.). Unatoč tome što se genski izražaj SOD i GPx ne razlikuje značajno među skupinama u ovoj studiji, druga studija pokazala je značajno snižen izražaj Cu/Zn SOD kod štakora na visokoslanjoj dijeti (231), što potvrđuje njegovu ulogu u smanjenim antioksidativnim obrambenim mehanizmima. Poznato je da su GPx1 i GPx4 važni enzimi za peroksidaciju fosfolipida, posebno GPx4, koji štite od peroksidacije lipida (232).

Uključenost ionskih kanala u bolestima povezanim s oksidativnim stresom prvenstveno se opaža u kardiovaskularnim (227) i neurodegenerativnim bolestima (228,229). Ovo je istraživanje pokazalo da isključenje gena *Tff3*, kao i visokoslana dijeta, značajno utječu na mehanizme FID-a mijenjanjem angažmana ionskih kanala. U skupini TFF3 NS Ca<sup>2+</sup>-aktivirani K<sup>+</sup>- kanal i ATP-osjetljivi kalijevi kanali imaju značajnu ulogu u FID-u. Kod WT miševa na NS dijeti, osim Ca<sup>2+</sup>-aktiviranih K<sup>+</sup>- kanala i ATP-osjetljivih kalijevih kanala, TRPV4 doprinosi FID-u. Kod TFF3 i WT miševa na VS dijeti, primijenjeni antagonisti nemaju učinka na FID. Izražaj TRP kanala varira između različitih endotelnih stanica (230). Izražaj proteina TRPV4 znatno je povišen kod miševa s isključenim genom *Tff3* (Slika 5.54.), dok je proteinski izražaj KCNB značajno snižen (Slika 5.53.). KCa kanali mogu se podijeliti u tri glavne skupine s obzirom na njihovu vodljivost: SK (mala vodljivost; 4-14 pS), IK (srednja vodljivost; 32-39 pS) i BK (velika vodljivost; 200-300 pS.) kanala (231). BK kanali su najraznovrsnija skupina KCa kanala i osjetljivi su na iberiotoksin, haribdotoksin i paksilin (232). KATP kanali su mete

za antidijabetičke blokatore sulfonilureje i za lijekove koji se koriste kao antianginali i antihipertenzivi (233).

*Tff3*<sup>-/-</sup> / C57BL / 6N (*Tff3*) miševi predstavljaju model za proučavanje sinteze protuupalnih i proupalnih citokina zbog promijenjenoga metabolizma lipida, modificiranoga metabolizma arahidonske kiseline te povoljnoga omjera  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 u jetri (207).

Visokoslana dijeta može potaknuti snažan imunološki odgovor krvnih žila uslijed interakcije leukocita s vaskularnim endotelnim stanicama. Studije provedene na miševima pokazale su da visokoslana dijeta može potaknuti upalu tkiva i razvoj autoimunih bolesti. Monociti čine prvu crtu imunološke obrane. Oni povećavaju proliferacijsku aktivnost koštane srži u odgovoru na upalne podražaje te dolazi do povećanoga broja cirkulirajućih monocita (233). Također, doprinose lokalnoj i sistemskoj upalnoj reakciji dolazeći na mjesto upale gdje proizvode upalne citokine poput IL-6, IL-23 i IL-10, što uzrokuje snažan imuni odgovor.

Mjerenjem serumske koncentracije IL-6 uočena je razlika između WT i TFF3 skupina na niskoslanjoj dijeti. TFF3 NS skupina je imala značajno višu serumsku koncentraciju upalnoga biljega IL-6. U genskom izražaju nije bilo značajne razlike, no vidljiva je tendencija u istom smjeru. TNF alfa, endokrini i parakrini posrednik upalnih i imunoloških reakcija nije pokazao značajnu razliku u izražaju između ispitivanih skupina, što je u skladu s rezultatima serumske razine ispitivanoga parametra. Od svih ispitanih biljega, značajne razlike uočene su kod IL-17A. Mnoge studije koje su istraživale konzumaciju visokih koncentracija soli pokazale su da povišena koncentracija soli aktivira pomoćne Th-17 stanice koje povećano stvaraju IL-17 koji ima proupalno djelovanje. Povišen unos soli može uzrokovati aktivaciju dendritičkih stanica koje potiču proizvodnju T-stanica, IL-17A i IFN- $\gamma$  i stvaraju povećan IL-1 $\beta$  (234). T-limfociti luče proupalne citokine u koje spada i IL-17A. Ovi su rezultati pokazali kako je u skupini WT miševa razina IL-17A značajno niža nakon visokoslanske dijete, uslijed povećanoga izražaja katalaze tj. uklonjenoga vodikovog peroksida čime se snizio oksidativni stres i zaustavila upala.

### **6.3. Učinci prehrane i isključenje gena *Tff3* na sistemski upalni odgovor i oksidativni stres**

Danas je općenito prihvaćeno da je upala niskoga stupnja prisutna u vaskularnom tkivu u svim kardiometaboličkim bolestima (npr. hipertenzija, dijabetes melitus, ateroskleroza) (235). Nadalje, oksidativni stres i upala u osnovi su ishemijsko-reperfuzijske ozljede neuralnoga tkiva.

Visok unos soli u prehrani narušava vaskularnu funkciju putem endotelne aktivacije (152,154,155). Proteini akutne faze upale najvećim se dijelom sintetiziraju u jetri, kao odgovor na TNF $\alpha$ , IL-1 i IL6. Oni su uključeni u sistemsku reakciju organizma na infekciju, ozljedu tkiva, traumu, neoplastični rast ili imunološke poremećaje poznate kao odgovor akutne faze (236). Reakcija uključuje oslobađanje proupalnih citokina, aktivaciju imunoloških stanica i krvožilnoga sustava. Prehrana s visokim udjelom soli može utjecati na aktivaciju imunološkoga sustava. Rezultati ove studije ukazuju na to da je visokoslana dijeta imala manji učinak na izražaj ciljnih gena kod WT miševa (Slika 5.55.A), što je u suprotnosti s TFF3 VS miševima, koji su pokazali diferencijalni izražaj nekoliko ciljnih gena, uključujući 15- i 36 - puta povećane razine izražaja mRNA gena COX1 i SOD3 (Slika 5.55.B). Na odgovor na prehranu s visokim udjelom soli utjecalo je isključenje gena *Tff3*. VS dijeta povećala je GPX1 (1,88 puta;  $p = 0,021$ ), SOD1 (1,35 puta;  $p = 0,015$ ) i IL-6 gene (1,81 puta;  $p = 0,05$ ; Slika 5.55.D) kod TFF3 VS miševa u odnosu na WT VS miševe. Uočeno je da povećane razine NaCl mogu povećati unutarstanični i površinski izražaj HSP60 proteina u ljudskim endotelnim stanicama pupčane vene. Dodatno, povećani Na može inducirati staničnu apoptozu (237). Uzeti zajedno, rezultati ovoga istraživanja upućuju na to da je antioksidativni sustav aktiviran kod miševa s isključenim genom *Tff3* kao odgovor na VS dijetu, što je vjerojatno pridonijelo njihovoj nižoj razini upale, boljem vaskularnom funkcionalnom odgovoru i činjenici da su zaštićeni od oštećenja neuralnoga tkiva (kao što je pokazano u našim eksperimentima s moždanim udarom (Slika 5.21.)).

#### **6.4. Učinak isključenja gena *Tff3* na volumen moždanoga udara; Uloga modifikacije proteoma**

Kratkotrajna i kronična VS dijeta dovode do poremećene autoregulacije u cerebralnoj cirkulaciji, kao što je pokazano kod štakora Sprague–Dawley (238). Zajednička karotidna arterija djelotvoran je „prigušivač tlaka” duž svoje duljine i doprinosi značajnom smanjenju pulsnooga tlaka, čime se štiti cerebralna mikrocirkulacija. Brzina karotidno-cerebralnoga pulsnooga vala (ccPWV) odražava krutost segmenta (C-M segment) između zajedničke karotidne arterije i ipsilateralne srednje moždane arterije (239). Nedavno je pokazano da je ateroskleroza C-M segmenta neovisno povezana s višim sistoličkim krvnim tlakom, ccPWV i debljinom karotidne intime-medije kod osamdeset i jednoga bolesnika s akutnim ishemijskim

moždanim udarom (240). Ovi rezultati podupiru važnost razjašnjavanja mehanizama vaskularne reaktivnosti u provodnim arterijama, kao što je karotidna arterija.

Analizirani proteini:

Proteini toplinskog stresa (engl. *heat shock proteins*, *Hsp*) prvotno su definirani kao skupina proteina induciranih toplinskim stresom, no ubrzo je otkriveno da Hsp mogu stimulirati i drugi agensi, uključujući ishemijsko/reperfuzijske ozljede tkiva, povišenu tjelesnu temperaturu, infekcije, upale, trovanja alkoholom i teškim metalima, mehaničke ozljede i dr. U stanju stresa dolazi do pojave nenormalno namotanih proteina te njihove agregacije, a stresni proteini štite stanicu pomažući degradaciju ili renaturaciju proteina, zbog čega se nazivaju molekulskim šaperonima. Hsp su uključeni u nekoliko procesa, među njima su savijanje proteina, promet proteina i sastavljanje/rastavljanje proteinskog kompleksa (241). *Heat shock cognate* (HSc) je termin koji se koristi za opisivanje konstitutivno izraženih oblika Hsp-a. Proteini toplinskog stresa podijeljeni su obzirom na molekulsku masu u sedam skupina: Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i mali Hsp (približno 15-30 kDa). Međutim, njihov sve veći broj i rezultirajuće nedosljednosti u označavanju naveli su Kampinga i sur. da uvedu novu nomenklaturu humanih Hsp-ova tako da su trenutno svrstani u sljedeće skupine: HspH (Hsp110), HspC (Hsp90), HspA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HspB (mali HSP) i obitelj šaperonina HspD/E (Hsp60/Hsp10) i CCT (TRiC) (242). Neki od glavnih šaperona (Hsp70, Hsp90, mali Hsp) prisutni su u visokim koncentracijama u stanicama koje nisu pod stresom i dosežu 1 – 5 % ukupnoga staničnog proteina, što je u skladu s važnom ulogom šaperona u staničnoj homeostazi.

Obitelj Hsp90 je o ATP-u ovisan šaperon koji djeluje u aktivaciji i stabilizaciji proteina klijenata; uključujući proteinkinaze, regulatore staničnog ciklusa, receptore s površine stanice i transkripcijske čimbenike. Stoga Hsp90 ima ključnu ulogu u staničnim procesima, uključujući prijenos signala, progresiju staničnog ciklusa, apoptozu i degradaciju proteina (243). Aktivaciju Hsp90 klijenta pokreće ciklus vezanja i otpuštanja supstrata posredovan nizom konformacijskih promjena u šaperonu i ATP-induciranim prijelazom između otvorene i zatvorene konformacije. Hsp90 postoji u obliku homodimera, a svaka podjedinica sastoji se od tri domene; N-terminalne ATP-vezujuće domene (N-domena), srednje domene koja veže supstrat (M-domena) i C-terminalne dimerizacijske domene (C-domena). U odsutnosti ATP-a Hsp90 poprima otvorenu konformaciju u obliku slova V. Vezanje ATP-a za N-domenu izaziva konformacijsku promjenu te dolazi do zatvaranja otvora iznad džepa za vezanje nukleotida. Nakon zatvaranja džepa N-



domene dimeriziraju, tvoreći kompaktnu strukturu zatvorene konformacije. Stvaranje zatvorenog dimera inducira hidrolizu ATP-a, posljedično potičući disocijaciju N-domena i povratak Hsp90 u otvorenu konformaciju, uz oslobađanje supstrata (244).

Obitelj Hsp60, tzv. šaperonini, veliki su dvostruki prstenasti kompleksi koji okružuju središnju šupljinu. Supstrati su im nepotpuno smotani proteini, koje inkapsuliraju u središnjoj šupljini, štiteći tako izložene hidrofobne ostatke od agregacije i omogućujući supstratu zauzimanje ispravne konformacije u zaštićenom okruženju. Šaperonini se dijele u dvije podskupine. Šaperonini skupine I (HSPD) prisutni su u bakterijama (GroEL) i mitohondrijskom matriksu (Hsp60). Sadrže sedam podjedinica po prstenu i zahtijevaju ko-šaperone (HSPE) koji djeluju kao poklopci preko kompleksa (GroESin bakterije i Hsp10 u mitohondrijima). Šaperonini skupine II nalaze se u termosomima arheja i u citosolu eukariota (CCT ili TRiC). Obično imaju osam podjedinica po prstenu i ne zahtijevaju pomoćne ko-šaperone (245). Hsp90ab1- protein toplinskog šoka HSP 90-beta; šaperon koji potiče sazrijevanje i pravilnu regulaciju specifičnih ciljnih proteina uključenih, na primjer, u kontrolu staničnog ciklusa i prijenos signala.

Citoskelet neurona sastoji se od aktinskih mikrofilamenata (MF), mikrotubula (MT) i intermedijarnih filamenata (IF). Neurofilamenti (NF) su glavni IF prisutni u odraslim neuronima i njihov je izražaj specifičan za stanični tip. Neuronima različito izražavaju nekoliko IF proteina ovisno o njihovom stadiju razvoja ili njihovoj lokalizaciji u živčanom sustavu: nestin (200 kDa), tri NF podjedinice (zvane NFL (laka, 68 kDa), NFM (srednja, 160 kDa) i NFH (teška, 205 kDa)),  $\alpha$ -interneksin (66 kDa), periferin (57 kDa) i sinemin (41 kDa). Glavna uloga NF-a je provođenje električnog impulsa. Također, pridonose dinamičkim svojstvima citoskeleta tijekom diferencijacije neurona, rasta aksona i regeneracije (246,247). Poremećaji u njihovom metabolizmu često su povezani s raznim neurodegenerativnim bolestima, uključujući amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) i Alzheimerovu bolest (AD) (248,249).

Prph - periferin; protein intermedijarnog neuronskog filamena klase III. Funkcija periferina, IF tipa III, ostaje kontroverzna (250). Periferin se izražava u podskupu senzornih, motoričkih i autonomnih neuronskih populacija od kojih većina ima barem dio svog aksona u perifernom živčanom sustavu (251–253), a studije sugeriraju da ima ulogu u izrastanju i regeneraciji aksona na temelju prostornih i vremenskih obrazaca ekspresije (254) i funkcionalnih studija u stanicama feokromocitoma štakora (PC12) (255). Međutim, miševi s nultim periferinom ne pokazuju očiti fenotip i, s iznimkom smanjenja nepeptidergičkih nociceptivnih aferentnih vlakana u leđnoj moždini, razvoj aksona odvijao se normalno za većinu perifernih neurona koji

ekspimiraju periferin (256). Nadalje, prekomjerna ekspresija periferina u transgenih miševa dovodi do kasnog početka bolesti motoričkih neurona koja ima patologiju sličnu onoj koja se obično opaža u degenerirajućim motoričkim neuronima pacijenata s amitrofičnom lateralnom sklerozom (ALS) (257).

Čimbenik rasta neurona (NGF) član je dobro proučene obitelji neurotrofina, proteina koji imaju važnu ulogu u regulaciji rasta stanica, proliferacije, preživljavanja i smrti (258). NGF je glikoprotein koji se sastoji od tri podjedinice:  $\alpha$ -NGF koji je neaktivan;  $\beta$ -NGF koji je biološki aktivan i  $\gamma$ -NGF koji prerađuje NGF prekursor u njegov zreli oblik. NGF se sintetizira iz prekursora pro-NGF i izlučuje se izvan stanica ili se cijepa unutar stanice u zreli NGF. Postoje tri tipa NGF receptora, a to su; TrkA, p75 i sortilin. Neurotrofni učinak NGF-a posredovan je preko TrkA i p75 receptora, dok je neurotoksični učinak pro-NGF-a posredovan receptorom p75 konjugiranim sa sortilinom (259). Studija provedena na miševima pokazala je da proNGF inhibira proliferaciju i diferencijaciju hipokampalnih neuralnih matičnih stanica (260). Kod starih štakora uočene su povišene razine pro-NGF, p75NTR i sortilina u prefrontalnom korteksu i hipokampusu koje su povezane s opadanjem kognitivnih funkcija, smetnjama prostornog učenja i pamćenja (261).

Keratin 18 (CK18/KRT18) jedan je od keratina (citokeratina), koji su intermedijarni filamenti (IF) bitni za završetak tkiva. Keratini prvenstveno igraju ulogu u zaštiti epitelnih stanica od mehaničkih i nemehaničkih stresora. Keratinske niti mogu se dinamički preoblikovati, podvrgavajući se reorganizaciji različitim mehaničkim i nemehaničkim podražajima za regulaciju staničnih procesa, uključujući staničnu migraciju i signalizaciju (262).

Krt18 - keratin, tip I citoskeleta 18. Kada je fosforiliran, ima ulogu u reorganizaciji filamena. Zajedno s KRT8, uključen je u zaštitu barijere posredovanu interleukinom-6 (IL-6).

Krt82 - keratin, tip II kutikularni Hb2; keratin 82. Pripada obitelji intermedijarnih filamenata.

Krt35 - keratin, kutikularni tip I Ha5; keratin 35.

Tubb2b - tubulin, beta 2b. Tubulin je glavni sastojak mikrotubula. TUBB2B je jedan od izotipova b-tubulina, koji je visoko izražen u mozgu odraslog čovjeka (263). Tijekom kortikalnog razvoja u miševa Tubb2b je izražen u neuralnim progenitorima i postmitotskim migrirajućim neuronima, dok je u postnatalnom mišjem mozgu izražaj Tubb2b ograničen na makroglije (264).

Nid1 - nidogen (entaktin) je glikoprotein od 150 kDa i bitna je komponenta bazalne membrane. NID1 se sastoji od tri (G1-G3) globularne domene - jedne fleksibilne vezne domene koja povezuje G1 i G2 domene i jedne štapičaste domene koja razdvaja G2 i G3 domene. NID1 izlučuju mezenhimalne stanice i taloži se između epitelnih stanica. NID1 je osjetljiv na različite proteaze i igra značajnu ulogu u remodeliranju bazalne membrane (265,266).

Mpz - mijelinski protein nula. Adhezijska je molekula neophodna za normalnu mijelinizaciju u perifernom živčanom sustavu. Posreduje adheziju između susjednih mijelinskih ovoja i na kraju pokreće zbijanje mijelina (267).

Klk1b26 - kallikrein 1-srodna peptidaza b26; kalikreini cijepaju Met-Lys i Arg-Ser veze u kininogenu. Kalikrein 1 (KLK1) ključna je komponenta kalikrein-kinin sustava. Gen KLK1 je smješten na dugom kraku kromosoma 19 koji sadrži nekoliko srodnih serin endopeptidaza. Biološka uloga ovih peptidaza povezanih s kalikreinom nije jasna, ali novi dokazi upućuju na to da bi mogle biti važne u nekoliko fizioloških sustava, primjerice u reprodukciji muškaraca, homeostazi kože, formiranju zubne cakline te neuralnom razvoju i plastičnosti (268).

Proteolipidni protein (PLP) glavna je komponenta mijelina CNS-a. PLP i njegova alternativna izoforma DM20 su acilirani integralni membranski proteini, koji sadrže četiri transmembranska  $\alpha$ -heliksa s citoplazmatskim N- i C-krajevima (269,270). Plp1 ima važnu ulogu u formiranju i održavanju multilamelarne strukture mijelina.

Mijelinski bazični protein (MBP) drugi je najzastupljeniji protein, nakon proteolipidnog proteina (PLP), u mijelinu središnjeg živčanog sustava (CNS): čini 30 % ukupnog proteina i oko 10 % suhe težine mijelina. To je jedini strukturni protein za koji je do sada utvrđeno da je neophodan za stvaranje mijelina CNS-a, a nazvan je "izvršnom molekulom mijelina" (271).

Eukariotska DNK upakirana je u složenu makromolekularnu strukturu zvanu kromatin kako bi se olakšalo zbijanje genetskog materijala. Osnovne strukturne jedinice kromatina nazivaju se nukleosomi, koji se sastoje od 145-147 parova baza DNK omotanih oko oktamerne jezgre koja sadrži po dvije molekule histona H2A, H2B, H3 i H4 (272). Histon H1 stabilizira sastavljanje oktamerne jezgre u strukture višeg reda karakteristične za kromatin. Ovi proteini su podložni raznim vrstama post-translacijskih modifikacija, uključujući metilaciju, ADP-ribozilaciju, fosforilaciju, ubikvitilaciju i acetilaciju. Takve poslijetranslacijske modifikacije histona povezane su s različitim nuklearnim aktivnostima, uključujući replikaciju, sastavljanje kromatina i transkripciju i najčešće se odvijaju na amino-terminalnim i karboksiterminalnom kraju (273–275). Hist2h4 – pripada histonskom klasteru 2, H4.

H1f0 - H1.0 vezni histon; histon H1.0. Histoni H1 su neophodni za kondenzaciju lanaca nukleosoma. Histoni H1f0 nalaze se u stanicama koje su u terminalnim fazama diferencijacije ili imaju niske stope stanične diobe.

Miozin vezujući protein C (MyBP-C) je sarkomerni protein koji regulira snagu kontrakcije u poprečno-prugastim mišićima. Mutacije u obitelji MYBPC gena, uključujući spore skeletne (MYBPC1), brze skeletne (MYBPC2) i srčane (MYBPC3), mogu rezultirati srčanim i skeletnim miopatijama (276).

Mybp2 - miozin vezujući protein C, brzi tip. In vitro veže MHC, F-aktin i native tanke filamente, te modificira aktivnost miozinske ATPaze aktivirane aktinom. Može modulirati mišićnu kontrakciju.

Myh3 – pripada obitelji miozin II. Myh3 igra ključnu ulogu u razvoju mišića fetusa, a mutacije u ovom genu povezane su s Freeman–Sheldonovim sindromom, distalnom artrogripozom 8 (DA8) i autosomno dominantnom spondilokarpotarzalnom sinostozom (277).

Eukariotski ribosom sastoji se od male (40S) i velike (60S) podjedinice. Rps26 je jedan od esencijalnih ribosomskih proteina 40S podjedinice i kodiran je s dva gotovo identična gena, RPS26a i RPS26b. Studije su pokazale da Rps26 stupa u interakciju s 5' neprevedenom regijom mRNA preko motiva 62-YXXPKXYXK-70 (Y62-K70) specifičnog za eukariote, što sugerira da bi ovaj peptid mogao igrati važnu i specifičnu ulogu tijekom inicijacije translacije (278). Rps26-ps1 - ribosomski protein S26, pseudogen 1. Pripada obitelji eukariotskih ribosomskih proteina eS26.

Natriuretski peptid tipa C (CNP) djeluje kao parakrini/autokrini vazoprotektor. CNP mRNA je pojačano regulirana u stanicama glatkih mišića humanih krvnih žila (SMC) preko PDGF-BB putova ovisnih o protein kinazi C (PKC) i općom aktivacijom PKC-a s forbol miristat acetatom (PMA) (279).

ARPC4 je središnja podjedinica kompleksa proteina povezanog s aktinom (ARP2/3), koji katalizira stvaranje F-aktinskih mreža (280).

Troponin je protein ključan za kontrakciju poprečno-prugaste i srčane muskulature. Troponin je kompleks triju različitih podjedinica, troponina C, I i T, koje imaju karakteristične funkcije troponina, kao što je vezanje  $Ca^{2+}$  (troponin C), inhibicija interakcije aktomiozina (troponin I) i vezanje na tropomiozin. (troponin T). Troponin C je  $Ca^{2+}$  osjetljiva podjedinica kompleksa. Troponin I se veže na aktinske filamente i u stanju mirovanja sprječava razdvajanje aktina i

tropomiozina. Također, sprječava aktivaciju miozinske ATP-aze. Troponin T veže tropomiozin za ostatak troponinskog kompleksa. Pri niskim koncentracijama unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ , troponin zajedno s tropomiozinom potiskuje kontraktilnu interakciju između miozina i aktina, a kada se koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  poveća, ta se supresija oslobađa vezanjem  $\text{Ca}^{2+}$  na troponin te dolazi do konformacijske promjene samog kompleksa i konačno do mišićne kontrakcije (281).

Miomezin2 (MYOM2), također poznat kao M-protein, nalazi se u M-traci transverzalnog mišića. Obitelj miomezinskih gena sastoji se od tri člana (MYOM1, MYOM2 i MYOM3) i kodira proteine miozina koji igraju ključnu ulogu u razvoju srca i skeletnih mišića (282).

Podaci o ulozi gena/proteina *Tff3* u cerebralnoj ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi su oskudni. Nedavna studija pokazala je da nakon ishemije miokarda i mozga (283) miševi koji nisu u stanju sintetizirati zadovoljavajuće količine proteina Tff3 u svojoj jetri nemaju zaštitni učinak proteina Tff3 u serumu, što rezultira većim oštećenjem tkiva. Dakle, takvi su miševi pokazali značajno veću aktivnost kaspaze 3 i posljedično višu razinu stanične smrti u ishemijskoj cerebralnoj leziji, zajedno s većim udjelom cerebralnih infarkta. Imali su izraženije motoričke deficite prednjih ekstremiteta. Rekombinantni protein Tff3 primijenjen intravenozno preokrenuo je cerebralnu ozljedu i motoričku funkciju prednjih ekstremiteta, što ukazuje na to da je endokrini neuroprotektivni mehanizam koji koristi jetreni Tff3 protein uključen u cerebralnu ishemijsko/reperfuzijsku ozljedu (187).

Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s takvim opažanjima Liua i sur. (187). U ovoj su studiji TFF3 NS miševi pokazali veći cerebralni infarkt u usporedbi s WT NS miševima. Nadalje, proteomska analiza pokazala je značajne promjene u skupini strukturnih i funkcionalnih neuronskih proteina (teški polipeptid neurofilamenta, peptidaza b22 povezana s kalikreinom 1, 2',3'-ciklički nukleotid 3'-fosfodiesteraza P0, mijelin P0, mijelinski proteolipidni protein, neurofilamentni teški polipeptid); i proteina uključenih u aktivaciju urođenoga imunološkog sustava, te TNF-alfa i NF-kB signalizaciju (protein toplinskoga šoka HSP 90-beta, 60 kDa protein toplinskoga šoka, CD9 antigen i histonski klaster 2, H4) kod TFF3 VS miševa u usporedbi s WT VS miševima. Međutim, značaj uočenih promjena u izražaju proteina tek treba utvrditi. Čini se da visokoslana dijeta nije povećala moždani udar kod TFF3 VS miševa, jer je infarkt bio sličan između TFF3 NS i TFF3 VS miševa (Slika 5.8.), vjerojatno zbog kratkoga trajanja VS dijeta.

Nedavno je sugerirano da bi primjena arahidonske kiseline mogla inhibirati upalni odgovor i oksidativni stres, čime bi se ublažilo oštećenje moždanoga tkiva u štakorskom modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede (284). U ovoj studiji analiza markera ER stresa eIF2 $\alpha$  i p-eIF2 $\alpha$  u jetri WT NS miševa i TFF3 NS miševa s induciranim moždanim udarom pokazala je da su miševi TFF3 NS imali za 50 % nižu aktivaciju p-eIF2 $\alpha$  u usporedbi s WT kontrolama na NS dijete, što ukazuje na smanjeni ERS odgovor. Ti su rezultati u skladu sa smanjenjem regulacije CHOP-a i BIP-a prikazanom na razini transkripcije (Slika 5.55.C).

Neravnoteža između potrebe i kapaciteta namatanja proteina u ER-u dovodi do stresa endoplazmatskoga retikuluma, odnosno pretjeranoga nakupljanja krivo namotanih i nenamotanih proteina. Tada se aktivira odgovor nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*, UPR), adaptivni mehanizam kojim stanica nastoji uspostaviti homeostazu endoplazmatskoga retikuluma (285,286). Inicijatori tri signalna puta UPR-a su: IRE1 $\alpha$  (engl. *inositol requiring enzyme 1 $\alpha$* ), PERK (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*) i ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*). U slučaju stresa ER-a BiP (engl. *binding immunoglobulin protein*), odvaja se sa senzora što uzrokuje aktivaciju IRE1 $\alpha$  i PERK putem transautofosforilacije i ATF6 putem proteolize (287).

PERK je transmembranska kinaza tipa I ER. Njegova aktivacija sastoji se od homodimerizacije i autofosforilacije što dalje omogućava fosforilaciju Ser51 na  $\alpha$  podjedinici faktora eukariotskoga inicijacijskoga faktora 2 (eIF2 $\alpha$ ). Fosforilirane molekule eIF2 ne mogu graditi translacijske komplekse te se tako smanjuje sinteza proteina i njihov unos u lumen ER-a. S druge strane, omogućeno je prepisivanje posebnih mRNA koje zahtijevaju fosforilaciju eIF2 $\alpha$  za translaciju, poput mRNA koja kodira aktivirajući transkripcijski faktor 4 (ATF4). ATF4 pojačava izražaj gena vezanih uz antioksidativni odgovor, metabolizam aminokiselina i apoptoze preko C/EBP homolognoga proteina (CHOP). CHOP pojačava izražaj GADD34 proteina koji stvara kompleks s proteinskom fosfatazom 1C (PP1C) što dovodi do defosforilacije eIF2 $\alpha$  i nastavka translacije proteina. Pri dužem stresu ER-a CHOP povećava izražaj proapoptotskih gena (DR5, TRB3, Bim, PUMA) (288,289).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je isključenje *Tff3* dovelo do smanjenoga odgovora na stres ER, naročito PERK puta.

### 6.5. Učinak isključenja *Tff3* gena i visokoslane dijetete na strukturne komponente žile

Od svojega su otkrića Tff proteini prvenstveno proučavani u kontekstu fiziologije i patologije različitih sluznica. Ipak, nedavne studije potvrdile su ulogu Tff3 peptida u nekoliko vezivnih tkiva. Rösler i sur. pokazali su da peptid Tff3 utječe na matriksne metaloproteinaze u hrskavici i stoga utječe na remodeliranje matriksa hrskavice kod upalnih bolesti hrskavice (290). Nadalje, Tff3 peptidi su značajni u procesu endohondralne osifikacije u fetusa miša, a miševi s isključenim genom *Tff3* imaju nižu kvalitetu spužvaste kosti od miševa divljeg tipa (194,291). Tff3 peptidi pokazuju proangiogenu aktivnost, budući da potiču stvaranje kapilarnih žila u testu korioalantoične membrane (CAM). Broj mikrožila u karcinomu dojke i želuca značajno korelira s izražajem Tff3 (197,292). Prema Lau i sur., Tff3 izražen u stanicama raka dojke potiče *de novo* angiogenezu izravno kroz stimulaciju endotelnih stanica i neizravno kroz povećani izražaj IL-8 (293,294). Međutim, izražaj Tff3 nije opisan u velikim krvnim žilama, kao što je aorta.

U ovome istraživanju uočene su neke strukturne razlike u analiziranim komponentama žila između sojeva, odnosno veći sadržaj elastina i debljina tunice medije te značajno smanjen omjer adventicije i stijenke prema lumenu kod TFF3 NS miševa u usporedbi s WT NS kontrolama. Prehrana s visokim udjelom soli utjecala je na vaskularnu strukturu uglavnom u WT skupinama miševa, što je rezultiralo povećanim postotkom elastina kod WT VS miševa u usporedbi s WT NS miševima. Čini se da isključenje gena *Tff3* štiti od strukturnih vaskularnih promjena izazvanih prehranom, budući da nisu uočene razlike u strukturnim komponentama aorte (elastin ili kolagen) ili strukturno preuređenje između TFF3 NS i TFF3 VS skupina miševa (Tablica 5.3.).

Zanimljivo je da je isključenje gena *Tff3* imalo značajan učinak na promjene izražaja proteina u karotidnim arterijama uzrokovane visokoslanom dijetom, što je otkriveno proteomskom analizom (207). Potencijalno zanimljive mreže koje mogu utjecati na vaskularnu funkciju su interakcija triju strukturnih proteina, keratina 18, keratina 35 i keratina 82, koji su uglavnom bili smanjeni VS prehranom; i skupina strukturnih i funkcionalnih/kontrakcijskih proteina povezanih s mišićnim stanicama (protein C koji veže miozin, brzi tip, miomezin 2, miozin-3, troponin T) koji su pojačani VS dijetom. Međutim, ovaj nalaz zahtijeva daljnje istraživanje i analizu u smislu njihovoga funkcionalnog značaja.

U novije vrijeme, uporaba sintetičkih malih interferirajućih RNK, siRNA (engl. *silencing* RNA, *utišavajuće* RNK) u istraživanjima, postala je jedna od vrlo učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje izražaja gena na razini gRNK. Primjena specifičnih siRNA molekula ima značajnu ulogu u proučavanju funkcije gena te se primjenjuje u postupcima manipulacije gena. S obzirom na dobivene rezultate potrebno je provesti daljnja istraživanja promijenjenih mehanizama vaskularne reaktivnosti koristeći navedenu metodu. Također, potrebno je provesti imunohistokemijsku analizu krvnih žila kako bi se dodatno razjasnila lokalizacija i uloga TFF3 peptida u krvožilnom sustavu.

### Ograničenja studije

Kod proteomske analize nisu rađene skupine na niskoslanjoj dijeti, budući da nas je zanimao učinak visokoslane dijetete na izražaj proteina. Također, istraživanje je provedeno samo na životinjama muškog spola, zbog učinka ženskih spolnih hormona na vaskularnu funkciju.

Rezultati ovoga istraživanja upućuju na to da je antioksidativni sustav aktiviran kod miševa s isključenim genom *Tff3* kao odgovor na VS dijetu, što je vjerojatno pridonijelo njihovoj nižoj razini upale, boljem vaskularnom funkcionalnom odgovoru i činjenici da su zaštićeni od oštećenja neuralnoga tkiva (kao što je pokazano u pokusima s moždanim udarom).



## 7. ZAKLJUČCI

- Visokoslana dijeta u trajanju od sedam dana nije dovela do značajnih promjena krvnoga tlaka
- Visokoslanom dijetom narušena je protokom potaknuta dilatacija ovisna o endotelu u karotidnim arterijama miševa divljeg tipa
- Isključenje gena *Tff3* uzrokuje narušenu dilataciju u odnosu na divlji soj miševa C57BL/6N
- Dilatacija u skupinama miševa TFF3 NS, WT NS i WT VS jednako je ovisna o razinama NO-a, ciklooksigenazama i metabolitima EET-a, dok je dilatacija u TFF3 VS skupini miševa ovisna o COX-u
- Utvrđena je oporavljena protokom potaknuta dilatacija u *in vivo* uvjetima u prisutnosti “hvatača” superoksida TEMPOL-a u WT VS skupini, što dokazuje da povećana razina oksidativnoga stresa, nastala pod utjecajem visokoga unosa soli, dovodi do poremećenoga FID-a
- Povećani vaskularni oksidativni stres potvrđen je procjenom razine endotelnog superoksida/ROS u karotidnoj arteriji oba soja nakon visokoslane dijete
- Genetska modifikacija, kao i unos soli, značajno utječe na mehanizme FID-a mijenjajući angažman ionskih kanala
- Strukturna analiza aorte pokazala je da visokoslana dijeta nije utjecala na strukturna svojstva aorte TFF3 miševa za razliku od divljeg soja
- TFF3 NS miševi pokazali su veće ishemijsko oštećenje u usporedbi s WT NS miševima, vjerojatno zbog njihovoga smanjenog odgovora na ER stres
- Isključenje *Tff3* gena dovodi do povećanog genskog izražaja katalaze koji ostaje nepromijenjen nakon visokoslane dijete, dok kod WT soja visokoslana dijeta rezultira porastom genskoga izražaja katalaze
- VS dijeta rezultirala je značajno smanjenom aktivnošću GPx u WT VS skupini miševa u usporedbi sa svim ostalim skupinama
- Isključenje *Tff3* gena dovodi do povišene serumske koncentracije upalnoga biljega IL-6 u odnosu na WT miševe
- VS dijeta dovodi do smanjenog genskog izražaja biljega IL-17A samo u WT skupini

## 8. SAŽETAK

**ULOGA TFF3 PEPTIDA U VASKULARNOJ REAKTIVNOSTI KRVNIH ŽILA KOD MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N I MIŠEVA DIVLJEG TIP (C57BL/6N)**

**Cilj istraživanja:** Odrediti ulogu TFF3 peptida u vaskularnoj reaktivnosti ovisnoj o endotelu izoliranih krvnih žila i razjasniti specifične mehanizme kojima TFF3 peptid utječe na vazodilataciju potaknutu protokom kod miševa s isključenim genom *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N i miševa divljeg tipa (WT miševa C57BL/6N).

**Metode:** Zdravi mužjaci starosti 10 tjedana hranjeni su komercijalnom hranom, standardnom (0.4 % NaCl) i visokoslanom (4 % NaCl). Hranu i vodu (ili vodu s TEMPOL-om, 1 Mm) životinje su uzimale prema vlastitoj potrebi 7 dana. Reaktivnost karotidne arterije u odgovoru na povećanje protoka izmjerena je u odsutnosti/ prisutnosti inhibitora NO-sintaze (NOS), N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estera (L-NAME); inhibitora ciklooksigenaze, indometacina (INDO); selektivnoga inhibitora CYP450 epoksidaze, MS-PPOH; agonista i antagonist kalijevih kanala osjetljivih na kalcij (KCa<sup>2+</sup>, NS-1619; iberiotoksin); ATP-osjetljivih kalijevih kanala (KATP, cromakalim; glibenclamide) i TRPV4 (GSK1016790A; RN-1734). Razine dušikovoga oksida i superoksida određene su *in situ* metodom fluorescencije. Aktivnost antioksidativnoga enzima GPx u serumu određena je spektrofotometrijskom metodom. Genski izražaj antioksidativnih enzima (Cu/Zn SOD, GPx1 i CAT) utvrđen je kvantitativnom PCR metodom u stvarnom vremenu.

**Rezultati:** Visokoslana dijeta (VS) narušava protokom potaknut odgovor karotidne arterije WT miševa. Utvrđena je oporavljena protokom potaknuta dilatacija u *in vivo* uvjetima u prisutnosti "hvatača" superoksida TEMPOL-a u WT VS skupini miševa. Dilatacija u skupinama miševa TFF3 NS, WT NS i WT VS jednako je ovisna o razinama NO-a, ciklooksigenazama i metabolitima EET-a, dok je dilatacija u TFF3 VS skupini miševa ovisna o COX-u. U WT LS skupini miševa, TRPV4, Ca<sup>2+</sup>-aktivirani-K<sup>+</sup>-kanali i KATP-kanali imaju ulogu u FID-u, dok u skupini TFF3 LS miševa, Ca<sup>2+</sup>-aktivirani K<sup>+</sup>-kanali i KATP-kanali imaju značajnu ulogu. U skupini TFF3 VS agonisti TRPV4 i KATP kanala povećali su FID, dok su u skupini WT VS agonisti TRPV4 i KCa<sup>2+</sup> kanala povećali FID. Povećan vaskularni oksidativni stres potvrđen je procjenom razina endotelnooga superoksida/ROS u karotidnoj arteriji. WT miševi imaju niži

genski izražaj katalaze. VS dijeta rezultirala je smanjenom aktivnošću GPx u WT VS skupini miševa.

**Zaključak:** VS dijeta zbog povećanog oksidativnog stresa narušava protokom potaknut odgovor karotidne arterije WT miševa, dok ne utječe na odgovor miševa *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N. Isključenje gena *Tff3* slabi vazodilataciju u odnosu na divlji soj miševa C57BL/6N. VS prehrana i isključenje gena *Tff3* mijenjaju mehanizme FID-a i uključenost ionskih kanala u FID.

**Ključne riječi:** oksidativni stres, protokom potaknuta dilatacija, *Tff3* gen, visokoslana dijeta

## 9. SUMMARY

**THE ROLE OF TFF3 PEPTIDE IN VASCULAR REACTIVITY OF BLOOD VESSELS IN *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N GENE KNOCKOUT MICE AND WILD-TYPE MICE (C57BL/6N)**

**Objectives:** To determine the role of the Tff3 peptides in the endothelium-dependent vascular reactivity of the isolated blood vessels and to clarify the specific mechanisms of Tff3 peptide affecting the flow-induced vasodilation in *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N gene knockout mice and wild-type mice (C57BL/6N).

**Methods:** Ten weeks old healthy male specimens were fed with standard (0,4% NaCl) and high-salt (4% NaCl) commercial rodent chow. They took food and water (or water with diluted TEMPOL, 1 mM) *ad libitum* over a period of 7 days. Carotid artery reactivity to gradual increase of the flow was measured in the presence or without the NO synthase (NOS) inhibitors, N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); cyclooxygenase inhibitors, indomethacin (INDO); the CYP450 epoxidase selective inhibitor MS-PPOH; agonists and antagonists of calcium-sensitive potassium channels (KCa<sup>2+</sup>, NS-1619; iberiotoxin); ATP-sensitive potassium channels (KATP, cromakalim; glibenclamide) and TRPV4 (GSK1016790A; RN-1734). The levels of nitric oxide and superoxide were determined using *in situ* fluorescence technique. The activity of the antioxidant enzyme GPx in the serum was measured in line with the standardised spectrophotometric protocol. The gene expression of antioxidant enzymes (Cu/Zn SOD, GPx1 and CAT) was determined using the quantitative real-time PCR method.

**Results:** The high-salt diet (HS) impaired the flow-induced response of the wild type (WT) mice carotid artery. The recovered flow-induced dilation was observed under *in vivo* conditions in the presence of the superoxide “scavenger” TEMPOL in WT HS mice. The increased vascular oxidative stress was confirmed with the estimated levels of endothelial superoxide/ROS in carotid artery. The dilation in TFF3 LS, WT LS i WT HS groups was equally dependent on the levels of NO, the cyclooxygenases and EET metabolites, while the dilation in the TFF3 HS group was COX-dependent. In WT LS group, the TRPV4, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and KATP channels have a FID role, while in the TFF3 LS group the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and KATP channels have a significant role. In the TFF3 HS group, the agonists of TRPV4 and KATP channels increased the FID, while in the WT HS group the FID was increased by the agonists of the TRPV4 i KCa<sup>2+</sup> channels. The increased vascular oxidative stress was confirmed with the estimated levels of endothelial superoxide/ROS in

## 9. SUMMARY

carotid artery. WT mice have a substantially lower catalase gene expression. The HS diet resulted in the substantially reduced GPx activity in the WT HS group.

**Conclusion:** Due to the increased oxidative stress, the HS diet substantially decreases the vasodilation in the WT mice, whereas it does not affect the response of TFF3 knockout mice. The knockout of the *Tff3* gene decreases the vasodilation compared to WT mice. The HS diet and the *Tff3* gene knockout alter the FID mechanisms and ion channel involvement in FID.

**Keywords:** flow-induced dilation, high-salt diet, oxidative stress, *Tff3* gene

**10. LITERATURA**

1. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004 Jul;93(1):105–13.
2. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II27-33.
3. Anderson TJ, Phillips SA. Assessment and prognosis of peripheral artery measures of vascular function. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015 Apr;57(5):497–509.
4. Sandoo A, van Zanten JJCSV, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010 Dec 23;4:302–12.
5. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):363–8.
6. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial Expression of a Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecule During Atherogenesis. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):788–91.
7. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6\_pt\_2):658–67.
8. 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(29):2385–402.
9. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *The Lancet*. 1989 Oct;334(8670):997–1000.
10. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333(6174):664–6.
11. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*. 2001 May;64(1):51–68.
12. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997 Nov 1;100(9):2146–52.

13. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 15;89(14):6348–52.
14. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1362–7.
15. Bae SW, Kim HS, Cha YN, Park YS, Jo SA, Jo I. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jul 11;306(4):981–7.
16. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology: The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147(S1):S193–201.
17. Schilling WP, Cabello OA, Rajan L. Depletion of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca<sup>2+</sup>-influx pathway. *Biochem J*. 1992 Jun 1;284 ( Pt 2):521–30.
18. Schilling WP, Elliott SJ. Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol*. 1992 Jun;262(6 Pt 2):H1617-1630.
19. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):532–41.
20. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Fröhlich LG, Sickmann A, et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2000 Feb 18;275(7):5179–87.
21. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3388–96.

22. Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000 Oct;48(1):13–22.
23. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest.* 2005 Jun;127(6):2254–63.
24. Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994 Mar;266(3 Pt 1):C628-636.
25. Pittner J, Wolgast M, Casellas D, Persson AEG. Increased shear stress-released NO and decreased endothelial calcium in rat isolated perfused juxtamedullary nephrons. *Kidney Int.* 2005 Jan;67(1):227–36.
26. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Jun;237(3):893–900.
27. Jones KA, Wong GY, Jankowski CJ, Akao M, Warner DO. cGMP modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1):L35-40.
28. Collins P, Griffith TM, Henderson AH, Lewis MJ. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. *J Physiol.* 1986 Dec;381:427–37.
29. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991 Dec;40(6):923–31.
30. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4651–5.
31. Nong Z, Hoylaerts M, Van Pelt N, Collen D, Janssens S. Nitric oxide inhalation inhibits platelet aggregation and platelet-mediated pulmonary thrombosis in rats. *Circ Res.* 1997 Nov;81(5):865–9.
32. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A<sub>2</sub> balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull.* 1983 Jul;39(3):271–6.



33. Flavahan NA. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Mar;28(3):106–10.
34. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A<sub>2</sub> as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.* 1991 Sep 3;68(7):11B-15B.
35. Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl.* 1997 Jul;49:6–8.
36. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5;96(1):272–7.
37. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994 Jun;46(2):205–29.
38. Nicosia S, Oliva D, Noè MA, Corsini A, Folco GC, Fumagalli R. PGI<sub>2</sub> receptors in vasculature and platelets: 5Z-carbacyclin discriminates between them. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1987;17A:474–8.
39. Chow KBS, Jones RL, Wise H. Protein kinase A-dependent coupling of mouse prostacyclin receptors to G<sub>i</sub> is cell-type dependent. *Eur J Pharmacol.* 2003 Aug 1;474(1):7–13.
40. Billington CK, Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res.* 2003;4:2.
41. Stitham J, Stojanovic A, Ross LA, Blount AC, Hwa J. Clusters of transmembrane residues are critical for human prostacyclin receptor activation. *Biochemistry.* 2004 Jul 20;43(28):8974–86.
42. Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007 Jan;82(1–4):109–18.
43. Verma S, Raj SR, Shewchuk L, Mather KJ, Anderson TJ. Cyclooxygenase-2 blockade does not impair endothelial vasodilator function in healthy volunteers: randomized

- evaluation of rofecoxib versus naproxen on endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2001 Dec 11;104(24):2879–82.
44. Beverelli F, Béa ML, Puybasset L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(3):252–9.
  45. Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, Latour A, Oliver JA, Hoffman M, et al. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A<sub>2</sub>. *J Clin Invest*. 1998 Dec 1;102(11):1994–2001.
  46. Alexander RW, Griendling KK. Signal transduction in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl Off J Int Soc Hypertens*. 1996 Dec;14(5):S51-54.
  47. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):3228–32.
  48. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):411–5.
  49. Davenport AP, Kuc RE, Maguire JJ, Harland SP. ETA receptors predominate in the human vasculature and mediate constriction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 3:S265-267.
  50. Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 3:S439-441.
  51. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9797–800.

52. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Panza JA. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2000 Jun;35(6):1237–41.
53. Pernow J. The role of the endothelium for reperfusion injury. *Eur Heart J Suppl*. 2001 Jun;3:C22–7.
54. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, et al. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Feb 1;165(3):398–405.
55. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997 Sep 2;96(5):1432–7.
56. Yahiaoui L, Villeneuve A, Valderrama-Carvajal H, Burke F, Fixman ED. Endothelin-1 regulates proliferative responses, both alone and synergistically with PDGF, in rat tracheal smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2006;17(1–2):37–46.
57. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988 Mar;93(3):515–24.
58. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3337–49.
59. Scotland RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S, Andresen J, Nilsson H, et al. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation*. 2005 Feb 15;111(6):796–803.
60. Edwards G, Weston AH. Potassium and potassium channels in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol Res*. 2004 Jun;49(6):535–41.
61. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998 Nov 19;396(6708):269–72.

62. Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Apr;21(4):121–4.
63. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996 Mar;78(3):415–23.
64. Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, Reddy YK, Bondlela M, Falck JR, et al. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res.* 2002 May 17;90(9):1028–36.
65. Petersson J, Zygmunt PM, Högestätt ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 1997 Apr;120(7):1344–50.
66. Bryan RM, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 2005 Jun;102(6):1261–77.
67. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1986 Jan;8(1):37–44.
68. Hull SS, Kaiser L, Jaffe MD, Sparks HV. Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries. *Blood Vessels.* 1986;23(4–5):183–98.
69. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol.* 1990 Oct;259(4 Pt 2):H1063-1070.
70. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol.* 1991 Dec;261(6 Pt 2):H1706-1715.
71. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res.* 1993 Jun;72(6):1276–84.

72. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1314–9.
73. Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1994 Jul 1;267(1):H326–32.
74. Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res*. 2014 Sep;30(3):141–8.
75. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994 Mar;74(3):416–21.
76. Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1752–8.
77. Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H93-100.
78. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Nov 15;24(6):1468–74.
79. Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, Hockenberry JC, Gutterman DD. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation. *Circ Res*. 2014 Aug 15;115(5):525–32.
80. Zorio E, Gilabert-Estelles J, Espana F, Ramon L, Cosin R, Estelles A. Fibrinolysis: The Key to New Pathogenetic Mechanisms. *Curr Med Chem*. 2008 Apr 1;15(9):923–9.
81. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. 1991 Nov;84(5):1984–92.

82. Sakai T, Inoue S, Matsuyama T aki, Takei M, Ota H, Katagiri T, et al. Eosinophils May Be Involved in Thrombus Growth in Acute Coronary Syndrome Histologic Examination of Aspiration Samples: Histologic Examination of Aspiration Samples. *Int Heart J.* 2009;50(3):267–77.
83. Fraley AE, Schwartz GG, Olsson AG, Kinlay S, Szarek M, Rifai N, et al. Relationship of Oxidized Phospholipids and Biomarkers of Oxidized Low-Density Lipoprotein With Cardiovascular Risk Factors, Inflammatory Biomarkers, and Effect of Statin Therapy in Patients With Acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jun;53(23):2186–96.
84. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2673–8.
85. Schachinger V, Zeiher AM. Alterations of coronary blood flow and myocardial perfusion in hypercholesterolaemia. *Heart.* 1996 Oct 1;76(4):295–8.
86. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993 Nov;88(5):2149–55.
87. Swee A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 1997 Dec;30(6):1628–33.
88. Zeiher AM, Schächlinger V, Hohnloser SH, Saurbier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation.* 1994 Jun;89(6):2525–32.
89. Brandes RP, Barton M, Philippens KM, Schweitzer G, Mügge A. Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries: evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *J Physiol.* 1997 Apr 15;500 ( Pt 2):331–42.

90. Lerman A, Burnett JC, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*. 1998 Jun 2;97(21):2123–8.
91. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005 Oct 14;310(5746):314–7.
92. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Dec;2(5):259–69.
93. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis-- Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2015 Nov;151:101–13.
94. Sun L, Liu YL, Ye F, Xie JW, Zeng JW, Qin L, et al. Free fatty acid-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates TRPM2 to aggravate endothelial insulin resistance via Ca<sup>2+</sup>-dependent PERK/ATF4/TRB3 cascade in obese mice. *Free Radic Biol Med*. 2019 Nov 1;143:288–99.
95. Xu S, Xu Y, Liu P, Zhang S, Liu H, Slavin S, et al. The novel coronary artery disease risk gene JCAD/KIAA1462 promotes endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2019 Aug 1;40(29):2398–408.
96. Haas MJ, Feng V, Gonzales K, Onstead-Haas L, Mooradian AD. High-throughput analysis identifying drugs that reduce oxidative and ER stress in human coronary artery endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2020 Jul 15;879:173119.
97. Ko J, Kang HJ, Kim DA, Kim MJ, Ryu ES, Lee S, et al. Uric acid induced the phenotype transition of vascular endothelial cells via induction of oxidative stress and glycocalyx shedding. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019 Dec;33(12):13334–45.
98. Rao KNS, Shen X, Pardue S, Krzywanski DM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) regulates mitochondrial ROS and endothelial dysfunction in response to angiotensin II. *Redox Biol*. 2020 Sep;36:101650.

99. Piotrowska A, Syguda A, Wyrwas B, Chrzanowski L, Luckenbach T, Heipieper HJ. Effects of ammonium-based ionic liquids and 2,4-dichlorophenol on the phospholipid fatty acid composition of zebrafish embryos. *PloS One*. 2018;13(1):e0190779.
100. Brunt VE, Gioscia-Ryan RA, Casso AG, VanDongen NS, Ziembra BP, Sapinsley ZJ, et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Age-Related Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Mice and Healthy Humans. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2020 Jul;76(1):101–12.
101. Yan J, Lai CH, Lung SCC, Wang WC, Huang CC, Chen GW, et al. Carbon black aggregates cause endothelial dysfunction by activating ROCK. *J Hazard Mater*. 2017 Sep 15;338:66–75.
102. Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 10;20(2):308–24.
103. Liu Z, Liu Y, Xu Q, Peng H, Tang Y, Yang T, et al. Critical role of vascular peroxidase 1 in regulating endothelial nitric oxide synthase. *Redox Biol*. 2017 Aug;12:226–32.
104. Lovatt M, Adnan K, Kocaba V, Dirisamer M, Peh GSL, Mehta JS. Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells. *Redox Biol*. 2020 Feb;30:101417.
105. Ren L, Han F, Xuan L, Lv Y, Gong L, Yan Y, et al. Clusterin ameliorates endothelial dysfunction in diabetes by suppressing mitochondrial fragmentation. *Free Radic Biol Med*. 2019 Dec;145:357–73.
106. Yu L, Liang Q, Zhang W, Liao M, Wen M, Zhan B, et al. HSP22 suppresses diabetes-induced endothelial injury by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species formation. *Redox Biol*. 2019 Feb;21:101095.
107. Kim S, Piao S, Lee I, Nagar H, Choi SJ, Shin N, et al. CR6 interacting factor 1 deficiency induces premature senescence via SIRT3 inhibition in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2020 Apr;150:161–71.



108. Shang F, Wang SC, Hsu CY, Miao Y, Martin M, Yin Y, et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017 Nov;28(11):3251–61.
109. Xu Y, Jiang W, Zhong L, Li H, Bai L, Chen X, et al. miR-195-5p alleviates acute kidney injury through repression of inflammation and oxidative stress by targeting vascular endothelial growth factor A. *Aging*. 2020 Jun 3;12(11):10235–45.
110. Kuosmanen SM, Sihvola V, Kansanen E, Kaikkonen MU, Levonen AL. MicroRNAs mediate the senescence-associated decline of NRF2 in endothelial cells. *Redox Biol*. 2018 Sep;18:77–83.
111. Xiao Y, Xia J, Cheng J, Huang H, Zhou Y, Yang X, et al. Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Induces Endothelial Dysfunction via Epigenetic Regulation of p66shc-Mediated Oxidative Stress Pathway. *Circulation*. 2019 May 7;139(19):2260–77.
112. Scioli MG, Storti G, D’Amico F, Rodríguez Guzmán R, Centofanti F, Doldo E, et al. Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *J Clin Med*. 2020 Jun 25;9(6):E1995.
113. Khaw KT, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, et al. Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Lancet Lond Engl*. 2001 Mar 3;357(9257):657–63.
114. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2004 Feb;21(2):114–21.
115. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2007 Aug 9;357(6):562–71.
116. Bredemeier M, Lopes LM, Eisenreich MA, Hickmann S, Bongiorno GK, d’Avila R, et al. Xanthine oxidase inhibitors for prevention of cardiovascular events: a systematic

- review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc Disord.* 2018 Feb 7;18(1):24.
117. Sharma A, Rizky L, Stefanovic N, Tate M, Ritchie RH, Ward KW, et al. The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) activator dh404 protects against diabetes-induced endothelial dysfunction. *Cardiovasc Diabetol.* 2017 Mar 3;16(1):33.
  118. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):348–83.
  119. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res.* 2015;49(11):1308–18.
  120. Gray SP, Jha JC, Kennedy K, van Bommel E, Chew P, Szyndralewicz C, et al. Combined NOX1/4 inhibition with GKT137831 in mice provides dose-dependent renal and atheroprotection even in established micro- and macrovascular disease. *Diabetologia.* 2017 May;60(5):927–37.
  121. Gioscia-Ryan RA, Battson ML, Cuevas LM, Eng JS, Murphy MP, Seals DR. Mitochondria-targeted antioxidant therapy with MitoQ ameliorates aortic stiffening in old mice. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2018 May 1;124(5):1194–202.
  122. Tarantini S, Yabluchanskiy A, Csipo T, Fulop G, Kiss T, Balasubramanian P, et al. Treatment with the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34 improves cerebrovascular endothelial function, neurovascular coupling responses and cognitive performance in aged mice, supporting the NAD<sup>+</sup> depletion hypothesis of neurovascular aging. *GeroScience.* 2019 Oct;41(5):533–42.
  123. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem IJCB.* 2015 Jan;30(1):11–26.
  124. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2008 Jun;4(2):89–96.

125. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002 Dec;30(6):620–50.
126. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. eLS [Internet]. 1st ed. Wiley; 2005 [cited 2022 Jul 25]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913>
127. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007 Sep;19(9):1807–19.
128. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar 23;53(6):1841–56.
129. Singh RP, Khanna R, Kaw JL, Khanna SK, Das M. Comparative effect of benzantrone and 3-bromobenzanthrone on hepatic xenobiotic metabolism and anti-oxidative defense system in guinea pigs. *Arch Toxicol.* 2003 Feb;77(2):94–9.
130. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Jan;21(1):2–14.
131. Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002 Nov 15;91(10):938–44.
132. Veerareddy S, Cooke CLM, Baker PN, Davidge ST. Gender differences in myogenic tone in superoxide dismutase knockout mouse: animal model of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jul;287(1):H40-45.
133. Cooke CLM, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003 Dec 1;60(3):635–42.
134. Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM. Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase. *Stroke.* 2006 Jul;37(7):1850–5.

135. Contributors to volume 349. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2002 [cited 2022 Jul 25]. p. ix–xiii. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687902493135>
136. Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998 May 15;101(10):2101–11.
137. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Büttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2000 May 16;101(19):2264–70.
138. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 1;55(2):239–49.
139. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res*. 1999 Jul 9;85(1):23–8.
140. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug 1;33(3):337–49.
141. Strålin P, Marklund SL. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Oct;281(4):H1621-1629.
142. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003 Aug 1;35(3):236–56.
143. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973 Feb 9;179(4073):588–90.
144. Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. 1973 May 15;32(1):132–4.

145. Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* 1997 Jun 6;759(1):67–75.
146. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem PPB.* 2010 Dec;48(12):909–30.
147. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev.* 1970 Jul;50(3):319–75.
148. Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):1–11.
149. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ.* 1988 Jul 30;297(6644):319–28.
150. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol.* 2009 Jun 1;38(3):791–813.
151. Strazzullo P, D’Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 2009 Nov 24;339(nov24 1):b4567–b4567.
152. Cavka A, Jukic I, Ali M, Goslawski M, Bian JT, Wang E, et al. 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.
153. Barić L, Drenjančević I, Matic A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, et al. Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44(4):835–47.
154. Matic A, Jukic I, Stupin A, Barić L, Mihaljević Z, Unfirer S, et al. 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):H718–30.

155. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, et al. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet: Cerebral artery dysfunction and high salt diet. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4917–31.
156. Priestley JRC, Kautenburg KE, Casati MC, Endres BT, Geurts AM, Lombard JH. The NRF2 knockout rat: a new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2016 Feb 15;310(4):H478–87.
157. Blin N. Trefoil factors. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005 Dec 1;62(24):2907–9.
158. Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci*. 1997;53(12):888.
159. Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Links to Inflammation: A Re-evaluation and New Medical Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 May 6;22(9):4909.
160. Nikolaidis NM, Zimmermann N, King NE, Mishra A, Pope SM, Finkelman FD, et al. Trefoil Factor-2 Is an Allergen-Induced Gene Regulated by Th2 Cytokines and STAT6 in the Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Oct;29(4):458–64.
161. Chen YH, Lu Y, De Plaen IG, Wang LY, Tan XD. Transcription Factor NF- $\kappa$ B Signals Antianoinic Function of Trefoil Factor 3 on Intestinal Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug;274(3):576–82.
162. Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein Kinase C and ERK Activation Are Required for TFF- peptide-stimulated Bronchial Epithelial Cell Migration and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Secretion. *J Biol Chem*. 2002 May;277(21):18440–6.
163. Zhu YQ, Tan XD. TFF3 modulates NF- $\kappa$ B and a novel negative regulatory molecule of NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- $\alpha$ . *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2005 Nov;289(5):C1085–93.

164. Thim L, Woeldike HF, Nielsen PF, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Characterization of Human and Rat Intestinal Trefoil Factor Produced in Yeast. *Biochemistry*. 1995 Apr 11;34(14):4757–64.
165. Hanby AM, Poulsom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: Distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology*. 1993 Oct;105(4):1110–6.
166. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue Localization of Human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007 May;55(5):505–13.
167. 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*. 1996;4(6):308–15.
168. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*. 2001 Jan 1;(16):319–34.
169. Matsuoka Y, Pascall JC, Brown KD. Quantitative analysis reveals differential expression of mucin (MUC2) and intestinal trefoil factor mRNAs along the longitudinal axis of rat intestine. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr*. 1999 Dec;1489(2–3):336–44.
170. Longman RJ. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut*. 2000 Dec 1;47(6):792–800.
171. Langer G, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W. Ocular TFF-Peptides: New Mucus-Associated Secretory Products of Conjunctival Goblet Cells. In: Sullivan DA, Stern ME, Tsubota K, Dartt DA, Sullivan RM, Bromberg BB, editors. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2002 [cited 2022 Apr 12]. p. 313–6. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 506). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0717-8\\_44](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0717-8_44)

172. Kouznetsova I, Laubinger W, Kalbacher H, Kalinski T, Meyer F, Roessner A, et al. Biosynthesis of Gastrokine-2 in the Human Gastric Mucosa: Restricted Spatial Expression along the Antral Gland Axis and Differential Interaction with TFF1, TFF2 and Mucins. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):899–908.
173. Xue L, Aihara E, Podolsky DK, Wang TC, Montrose MH. In vivo action of trefoil factor 2 (TFF2) to speed gastric repair is independent of cyclooxygenase. *Gut*. 2010 Sep 1;59(9):1184–91.
174. Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor– and MAP kinase–dependent interregulation. *J Clin Invest*. 1999 May 1;103(9):R31–8.
175. Xue L, Aihara E, Wang TC, Montrose MH. Trefoil Factor 2 Requires Na/H Exchanger 2 Activity to Enhance Mouse Gastric Epithelial Repair. *J Biol Chem*. 2011 Nov;286(44):38375–82.
176. Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79(1):357–80.
177. Kozina N, Jukić I. Trefoil Factor Family (TFF). *Southeast Eur Med J [Internet]*. 2019 Jun 4 [cited 2022 Apr 11];3(1). Available from: <https://doi.org/10.26332/seemedj.v3i1.96>
178. Guillén N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbonés-Mainar JM, Acín S, et al. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics*. 2009 May;37(3):187–98.
179. Xue Y, Shen L, Cui Y, Zhang H, Chen Q, Cui A, et al. Tff3, as a Novel Peptide, Regulates Hepatic Glucose Metabolism. Wagner B, editor. *PLoS ONE*. 2013 Sep 23;8(9):e75240.
180. Barrera Roa J, Sanchez Tortolero G, Gonzalez E. Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *J Health Sci*. 2013 Apr 15;3(1):1–12.



181. Rui L. Energy Metabolism in the Liver. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2014 [cited 2022 Apr 12]. p. 177–97. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c130024>
182. Liu J, Han L, Zhu L, Yu Y. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats. *Lipids Health Dis.* 2016 Dec;15(1):27.
183. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Ann Med.* 2011 May;43(3):198–211.
184. Poulsen L la C, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Aug;23(6):631–9.
185. Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Čosić A, et al. Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(2):827–41.
186. Liu SQ, Tefft BJ, Zhang D, Roberts D, Schuster DJ, Wu A. Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia. *Mol Cell Biomech MCB.* 2011 Dec;8(4):319–38.
187. Liu SQ, Roberts D, Zhang B, Ren Y, Zhang LQ, Wu YH. Trefoil Factor 3 as an Endocrine Neuroprotective Factor from the Liver in Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. Câmara NOS, editor. *PLoS ONE.* 2013 Oct 18;8(10):e77732.
188. Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, Cario E. Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. *Gastroenterology.* 2009 Jul;137(1):209–20.
189. Paulsen FP, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger K, et al. Intestinal Trefoil Factor/TFF3 Promotes Re-epithelialization of Corneal Wounds. *J Biol Chem.* 2008 May;283(19):13418–27.
190. Kouznetsova I, Chwieralski CE, Bälder R, Hinz M, Braun A, Krug N, et al. Induced Trefoil Factor Family 1 Expression by Trans-Differentiating Clara Cells in a Murine Asthma Model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Mar;36(3):286–95.

191. LeSimple P, van Seuning I, Buisine MP, Copin MC, Hinz M, Hoffmann W, et al. Trefoil Factor Family 3 Peptide Promotes Human Airway Epithelial Ciliated Cell Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Mar;36(3):296–303.
192. Hessellund Samson M, Vestergaard EM, Milman N, Seier Poulsen S, Nexø E. Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008 Jan;68(5):369–74.
193. Bijelić N, Belovari T, Baus Lončar M. Trefoil factor family protein 3 (TFF3) is present in cartilage during endochondral ossification in the developing mouse fetus. *Acta Histochem.* 2013 Apr;115(3):204–8.
194. Bijelić N, Perić Kačarević Ž, Belovari T, Radić R. Trefoil factor family protein 3 affects cancellous bone formation in the secondary centers of ossification of mouse tibiae. *Period Biol.* 2015 Mar 1;117:59–64.
195. Lubka M, Müller M, Baus-Loncar M, Hinz M, Blaschke K, Hoffmann W, et al. Lack of Tff3 Peptide Results in Hearing Impairment and Accelerated Presbycusis. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(5–6):437–44.
196. Fueger PT, Schisler JC, Lu D, Babu DA, Mirmira RG, Newgard CB, et al. Trefoil Factor 3 Stimulates Human and Rodent Pancreatic Islet  $\beta$ -Cell Replication with Retention of Function. *Mol Endocrinol.* 2008 May 1;22(5):1251–9.
197. Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, et al. Expression of Trefoil Factor Family Members Correlates with Patient Prognosis and Neoangiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6472–8.
198. 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.
199. Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep.* 2012 Apr;27(4):1277–83.

200. 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 Feb 1;12(3):807–12.
201. Okada H, Kimura MT, Tan D, Fujiwara K, Igarashi J, Makuuchi M, et al. Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol.* 2005 Feb;26(2):369–77.
202. May FEB, Westley BR. TFF3 is a valuable predictive biomarker of endocrine response in metastatic breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015 Jun;22(3):465–79.
203. Huang Z, Zhang X, Lu H, Wu L, Wang D, Zhang Q, et al. Serum trefoil factor 3 is a promising non-invasive biomarker for gastric cancer screening: A monocentric cohort study in China. *BMC Gastroenterol.* 2014 Dec;14(1):74.
204. Farah V, Joaquim L, Bernatova I, Morris M. Acute and chronic stress influence blood pressure variability in mice. *Physiol Behav.* 2004 Oct 30;83(1):135–42.
205. Mattson DL. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am J Hypertens.* 2001 May;14(5 Pt 1):405–8.
206. Zhao X, Ho D, Gao S, Hong C, Vatner DE, Vatner SF. Arterial Pressure Monitoring in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2011;1:105–22.
207. Kozina N, Mihaljević Z, Baus Lončar M, Mihalj M, Mišir M, Radmilović M, et al. 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 Oct 19;20(20):5188.
208. Jukic I, Mihaljevic Z, Matic A, Mihalj M, Kozina N, Selthofer-Relatic K, et al. Angiotensin II type 1 receptor is involved in flow-induced vasomotor responses of isolated middle cerebral arteries: role of oxidative stress. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2021 Apr 1;320(4):H1609–24.
209. Adamczak JM, Schneider G, Nelles M, Que I, Suidgeest E, van der Weerd L, et al. In vivo bioluminescence imaging of vascular remodeling after stroke. *Front Cell Neurosci*

- [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2022 Apr 12];8. Available from:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00274/abstract>
210. Bahmani P, Schellenberger E, Klohs J, Steinbrink J, Cordell R, Zille M, et al. Visualization of Cell Death in MICE with Focal Cerebral Ischemia using Fluorescent Annexin A5, Propidium Iodide, and TUNEL Staining. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 May;31(5):1311–20.
  211. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989 Jan;20(1):84–91.
  212. Shah ZA, Namiranian K, Klaus J, Kibler K, Doré S. Use of an optimized transient occlusion of the middle cerebral artery protocol for the mouse stroke model. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* 2006 Aug;15(4):133–8.
  213. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995 Apr;26(4):627–34; discussion 635.
  214. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization Microscopic Studies of Connective Tissue Stained with Picro-Sirius Red FBA. *Beitr Zur Pathol.* 1973 Nov;150(2):174–87.
  215. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):676–82.
  216. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis: T H E I M A G E J E C O S Y S T E M. *Mol Reprod Dev.* 2015 Jul;82(7–8):518–29.
  217. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Rašić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute Hyperbaric Oxygenation, Contrary to Intermittent Hyperbaric Oxygenation, Adversely Affects Vasorelaxation in Healthy Sprague-Dawley Rats due to Increased Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–15.
  218. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:325–33.

219. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Frkanec R, Tavčar B, Kelava V, et al. Arachidonic Acid Metabolites of CYP450 Enzymes and HIF-1 $\alpha$  Modulate Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats under Acute and Intermittent Hyperbaric Oxygenation. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 1;21(17):6353.
220. Kibel A, Novak S, Cosic A, Mihaljevic Z, Falck JR, Drenjancevic I. Hyperbaric oxygenation modulates vascular reactivity to angiotensin-(1-7) in diabetic rats: Potential role of epoxyeicosatrienoic acids. *Diab Vasc Dis Res.* 2015 Jan;12(1):33–45.
221. Horvatić A, Guillemin N, Kaab H, McKeegan D, O'Reilly E, Bain M, et al. Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin. *J Proteomics.* 2019 Feb;192:64–77.
222. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques.* 2007 Jul;43(1S):S25–30.
223. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, et al. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans: High-salt diet and microvascular dysfunction. *J Physiol.* 2015 Dec 15;593(24):5313–24.
224. Vollmer WM, Sacks FM, Ard J, Appel LJ, Bray GA, Simons-Morton DG, et al. Effects of Diet and Sodium Intake on Blood Pressure: Subgroup Analysis of the DASH-Sodium Trial. *Ann Intern Med.* 2001 Dec 18;135(12):1019.
225. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse Cardiovascular Effects of Acute Salt Loading in Young Normotensive Individuals. *Hypertension.* 2008 Jun;51(6):1525–30.
226. Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelakovic B, Lombard JH, et al. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(4–5):432–42.
227. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev.* 2008 Dec;60(4):418–69.

228. Neil S, Huh J, Baronas V, Li X, McFarland HF, Cherukuri M, et al. Oral administration of the nitroxide radical TEMPOL exhibits immunomodulatory and therapeutic properties in multiple sclerosis models. *Brain Behav Immun.* 2017 May;62:332–43.
229. Fridovich I. Superoxide Anion Radical ( $O_2^-$ ), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *J Biol Chem.* 1997 Jul;272(30):18515–7.
230. Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, Kinter M. High Dietary Fat Selectively Increases Catalase Expression within Cardiac Mitochondria. *J Biol Chem.* 2013 Jan;288(3):1979–90.
231. McEwen ST, Schmidt JR, Somberg L, Cruz L de la, Lombard JH. Time-Course and Mechanisms of Restored Vascular Relaxation by Reduced Salt Intake and Angiotensin II Infusion in Rats Fed a High-Salt Diet. *Microcirculation.* 2009 Jan;16(3):220–34.
232. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1982 Feb;710(2):197–211.
233. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, et al. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res.* 2015 Jul;166(1):103–10.
234. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siriopol D, Covic A, et al. Salt Intake and Immunity. *Hypertension.* 2018 Jul;72(1):19–23.
235. 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 Calcium Channel Blocker Therapy. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(2–3):103–15.
236. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci.* 2005 Nov;6B(11):1045–56.

237. Jakic B, Buszko M, Cappellano G, Wick G. Elevated sodium leads to the increased expression of HSP60 and induces apoptosis in HUVECs. Cappello F, editor. PLOS ONE. 2017 Jun 12;12(6):e0179383.
238. Allen LA, Schmidt JR, Thompson CT, Carlson BE, Beard DA, Lombard JH. High salt diet impairs cerebral blood flow regulation via salt-induced angiotensin II suppression. *Microcirculation*. 2019 Apr;26(3):e12518.
239. James NL, Milijasevic Z, Ujhazy A, Edwards G, Jermyn K, Mynard JP, et al. The common carotid artery provides significant pressure wave dampening in the young adult sheep. *IJC Heart Vasc*. 2019 Jun;23:100343.
240. Fu X, Li X, Xiong L, Li X, Huang R, Gao Q. Cerebral Arterial Stiffness as A New Marker of Early Stage Atherosclerosis of The Cerebral Large Artery in Acute Stroke. *J Atheroscler Thromb*. 2019 Sep 1;26(9):783–91.
241. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*. 1999 Apr;29(4):748–51.
242. Penke B, Bogár F, Crul T, Sántha M, Tóth M, Vígh L. Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: From Molecular Bases to Pharmacological Interventions. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 22;19(1):325.
243. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu Rev Biochem*. 2013 Jun 2;82(1):323–55.
244. Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:271–94.
245. Smith HL, Li W, Cheetham ME. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr;40:142–52.
246. Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2008 Aug;38(1):27–65.

247. Nixon RA, Shea TB. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1992;22(2):81–91.
248. Munoz DG, Greene C, Perl DP, Selkoe DJ. Accumulation of Phosphorylated Neurofilaments in Anterior Horn Motoneurons of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1988 Jan;47(1):9–18.
249. Nukina N, Kosik KS, Selkoe DJ. Recognition of Alzheimer paired helical filaments by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with tau protein. *Proc Natl Acad Sci*. 1987 May;84(10):3415–9.
250. Lariviere RC, Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*. 2004 Jan;58(1):131–48.
251. Barclay M, Noakes PG, Ryan AF, Julien JP, Housley GD. Neuronal expression of peripherin, a type III intermediate filament protein, in the mouse hindbrain. *Histochem Cell Biol*. 2007 Dec;128(6):541–50.
252. Barclay M, Julien JP, Ryan AF, Housley GD. Type III intermediate filament peripherin inhibits neuritogenesis in type II spiral ganglion neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2010 Jul 5;478(2):51–5.
253. Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM. Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1990 Mar;10(3):764–84.
254. Troy CM, Brown K, Greene LA, Shelanski ML. Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience*. 1990;36(1):217–37.
255. Helfand BT, Mendez MG, Pugh J, Delsert C, Goldman RD. A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec;14(12):5069–81.
256. Larivière RC, Nguyen MD, Ribeiro-da-Silva A, Julien JP. Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice. *J Neurochem*. 2002 May;81(3):525–32.



257. Beaulieu JM, Jacomy H, Julien JP. Formation of intermediate filament protein aggregates with disparate effects in two transgenic mouse models lacking the neurofilament light subunit. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000 Jul 15;20(14):5321–8.
258. Harrington AW, St. Hillaire C, Zweifel LS, Glebova NO, Philippidou P, Haleboua S, et al. Recruitment of Actin Modifiers to TrkA Endosomes Governs Retrograde NGF Signaling and Survival. *Cell*. 2011 Aug;146(3):421–34.
259. Josiane, Tatiani, Francielle, Michelle, Alexandra. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015;6(5):331.
260. Guo J, Wang J, Liang C, Yan J, Wang Y, Liu G, et al. proNGF inhibits proliferation and oligodendrogenesis of postnatal hippocampal neural stem/progenitor cells through p75NTR in vitro. *Stem Cell Res*. 2013 Sep;11(2):874–87.
261. Terry AV, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav*. 2011 Feb;102(2):149–57.
262. Chen B, Xu X, Lin D dan, Chen X, Xu Y tao, Liu X, et al. KRT18 Modulates Alternative Splicing of Genes Involved in Proliferation and Apoptosis Processes in Both Gastric Cancer Cells and Clinical Samples. *Front Genet*. 2021 Jul 5;12:635429.
263. Leandro-García LJ, Leskelä S, Landa I, Montero-Conde C, López-Jiménez E, Letón R, et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human  $\beta$ -tubulin isotypes. *Cytoskeleton*. 2010 Apr;67(4):214–23.
264. Breuss M, Morandell J, Nimpf S, Gstrein T, Lauwers M, Hochstoeger T, et al. The Expression of Tubb2b Undergoes a Developmental Transition in Murine Cortical Neurons. *J Comp Neurol*. 2015 Oct 15;523(15):2161–86.
265. Durkin ME, Chakravarti S, Bartos BB, Liu SH, Friedman RL, Chung AE. Amino acid sequence and domain structure of entactin. Homology with epidermal growth factor precursor and low density lipoprotein receptor. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 2):2749–56.

266. Zhang B, Xu C, Liu J, Yang J, Gao Q, Ye F. Nidogen-1 expression is associated with overall survival and temozolomide sensitivity in low-grade glioma patients. *Aging*. 2021 Mar 18;13(6):9085–107.
267. Shy ME, Jáni A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, et al. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain J Neurol*. 2004 Feb;127(Pt 2):371–84.
268. Lundwall Å, Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jul;65(13):2019–38.
269. Coet T, Suzuki K, Popko B, Suzuki K, Popko B, Suzuki K, et al. New perspectives on the function of myelin galactolipids. *Trends Neurosci*. 1998 Mar;21(3):126–30.
270. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol CB*. 2016 Oct 24;26(20):R971–5.
271. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Sep;63(17):1945–61.
272. Sato S, Dacher M, Kurumizaka H. Nucleosome Structures Built from Highly Divergent Histones: Parasites and Giant DNA Viruses. *Epigenomes*. 2022 Aug 2;6(3):22.
273. Verdone L, Agricola E, Caserta M, Di Mauro E. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Sep;5(3):209–21.
274. McGinty RK, Tan S. Nucleosome structure and function. *Chem Rev*. 2015 Mar 25;115(6):2255–73.
275. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol CB*. 2004 Jul 27;14(14):R546-551.
276. Desai DA, Rao VJ, Jegga AG, Dhandapany PS, Sadayappan S. Heterogeneous Distribution of Genetic Mutations in Myosin Binding Protein-C Paralogs. *Front Genet*. 2022;13:896117.
277. Scala M, Accogli A, De Grandis E, Allegri A, Bagowski CP, Shoukier M, et al. A novel pathogenic *MYH3* mutation in a child with Sheldon-Hall syndrome and vertebral fusions. *Am J Med Genet A*. 2018 Mar;176(3):663–7.

278. Belyy A, Levanova N, Tabakova I, Rospert S, Belyi Y. Ribosomal Protein Rps26 Influences 80S Ribosome Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *mSphere*. 2016;1(1):e00109-15.
279. Mendonça MC, Koles N, Sellitti DF. Protein kinase C- $\delta$  (PKC- $\delta$ ) and PKC- $\alpha$  mediate Ca<sup>2+</sup>-dependent increases in CNP mRNA in human vascular cells. *Vascul Pharmacol*. 2012 Sep;57(2-4):98-104.
280. Laboy Cintron D, Muir AM, Scott A, McDonald M, Monaghan KG, Santiago-Sim T, et al. A recurrent, de novo pathogenic variant in ARPC4 disrupts actin filament formation and causes microcephaly and speech delay. *HGG Adv*. 2022 Jan 13;3(1):100072.
281. Marston S, Zamora JE. Troponin structure and function: a view of recent progress. *J Muscle Res Cell Motil*. 2020 Mar;41(1):71-89.
282. Gu W, Li Q, Ding M, Cao Y, Wang T, Zhang S, et al. Regular Exercise Rescues Heart Function Defects and Shortens the Lifespan of *Drosophila* Caused by dMnM Downregulation. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Dec 9;19(24):16554.
283. Liu SQ, Tefft BJ, Roberts DT, Zhang LQ, Ren Y, Li YC, et al. Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2012 Dec 15;303(12):H1446-58.
284. Qu Y, Zhang HL, Zhang XP, Jiang HL. Arachidonic acid attenuates brain damage in a rat model of ischemia/reperfusion by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2018 Feb;37(2):135-41.
285. Yoshida H. ER stress and diseases: ER stress and diseases. *FEBS J*. 2007 Feb;274(3):630-58.
286. Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008 Feb 1;3(1):399-425.
287. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Sep;12(9):703-19.
288. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology*. 2007 Jun;22(3):193-201.

289. Osowski CM, Urano F. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2022 Apr 12]. p. 71–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851147000040>
290. Rösler S, Haase T, Claassen H, Schulze U, Schicht M, Riemann D, et al. Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb 25;62(3):815–25.
291. Bijelić N, Belovari T, Stolnik D, Lovrić I, Baus Lončar M. Histomorphometric Parameters of the Growth Plate and Trabecular Bone in Wild-Type and Trefoil Factor Family 3 ( *Tff3* )-Deficient Mice Analyzed by Free and Open-Source Image Processing Software. *Microsc Microanal.* 2017 Aug;23(4):818–25.
292. Ahmed ARH, Griffiths AB, Tilby MT, Westley BR, May FEB. TFF3 Is a Normal Breast Epithelial Protein and Is Associated with Differentiated Phenotype in Early Breast Cancer but Predisposes to Invasion and Metastasis in Advanced Disease. *Am J Pathol.* 2012 Mar;180(3):904–16.
293. Lau WH, Pandey V, Kong X, Wang XN, Wu Z, Zhu T, et al. Trefoil Factor-3 (TFF3) Stimulates De Novo Angiogenesis in Mammary Carcinoma both Directly and Indirectly via IL-8/CXCR2. Singh RK, editor. *PLOS ONE.* 2015 Nov 11;10(11):e0141947.
294. Balcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Xu JF, Gutierrez PL. Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in human breast, colon, and gastric tumor cells exposed to X-rays. *Mol Cancer Ther.* 2002 Apr;1(6):405–15.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

**Ime i prezime:** Nataša Kozina

**Adresa:** Osječka 109b, 31207 Tenja

**Tel:** +385 98 446 985

**E-mail:** [natasa.kozina@mefos.hr](mailto:natasa.kozina@mefos.hr)

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum rođenja:** 28.09.1979.

### **Obrazovanje:**

1998.-2004. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Filozofski fakultet Osijek, Studij biologija-kemija (prof.)

2009.-2010. Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Ekonomski fakultet Osijek (Projekt manager)

2018.- 2023. Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“, Medicinski fakultet u Osijeku

### **Zaposlenje:**

- Asistent, Filozofski fakultet Osijek, Studij biologija- kemija, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku – održavanje vježbi iz kolegija Praktikum iz metodike nastave kemije (2005.)
- Tehnolog, Tekstil LIO d.o.o., Osijek (2006.-2015)
- Nastavnik biologije i kemije, OŠ Grigor Vitez, Osijek (2015.-2016.)
- Prof. biologije, Gospodarska škola Varaždin (2016.-2017)
- asistent na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku (2017.-)

**Znanstvena i stručna djelatnost:****Objavljeni znanstveni radovi:**

1. Matić, Anita; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Kozina, Nataša; Tartaro Bujak, Ivana; Kibel, Aleksandar; Lombard, Julian H; Drenjancevic, Ines. Low-dose angiotensin II supplementation restores flow-induced dilation mechanisms in cerebral arteries of Sprague-Dawley rats on a high salt diet // Journal of hypertension, 40 (2021), 3; 441-452 doi:10.1097/HJH.0000000000003030
2. Breškić Ćurić, Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selthofer-Relatić, Kristina; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita; Kozina, Nataša et al. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid- Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome—A Randomized Study // Biology, 10 (2021), 8; 774, 20 doi:10.3390/biology10080774
3. Jukić, Ivana; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Matić, Anita; Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Šušnjara, Petar; Stupin, Marko; Breškić Ćurić, Željka et al. Carnosine, small but mighty - prospect of use as functional ingredient for functional food formulation // Antioxidants, 10 (2021), 7; 1037, 31 doi:10.3390/antiox10071037
4. Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Mihalj, Martina; Kozina, Nataša; Selthofer- Relatić, Kristina; Mihaljević, Dubravka; Koller, Akos; Tartaro Bujak, Ivana; Drenjančević, Ines. Angiotensin II type 1 receptor is involved in flow-induced vasomotor responses of isolated middle cerebral arteries: role of oxidative stress // American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 320 (2021), 4; 1609-1624 doi:10.1152/ajpheart.00620.2020
5. Kozina, Nataša; Jukić, Ivana. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides with Numerous Functions // Southeastern European medical journal, 3 (2019), 1; 69-77 doi:10.26332/seemedj.v3i1.96

6. Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Baus Lončar, Mirela; Mihalj, Martina; Mišir, Mihael; Radmilović, Marina; Justić, Helena; Gajović, Srećko; Šešelja, Kate; Bazina, Iva et al. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N Knockout and WT (C57BL/6N) Control Mice // International journal of molecular sciences, 20 (2019), 20; 5188, 25 doi:10.3390/ijms20205188

### **Kongresna priopćenja, sažeci i poster:**

1. Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. Assessment of the effect of carnosine supplementation on flow induced dilation mechanisms of a middle cerebral arteries (MCAs) in low salt and high salt fed Sprague-Dawley rats // 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian Physiological Society Plitvička Jezera, Hrvatska, 2022. str. 26-26 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
2. Kozina, Nataša; Kolobarić, Nikolina; Drenjančević, Ines. Impact of elevation of NaCl concentrations in cell culture media on Human Aortic Endothelial Cells // Acta Physiologica / Persson, Pontus B (ur.). Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 2022. str. 906-907 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Mihaljević, Zrinka; Kozina, Nataša; Kibel, Aleksandar; Šušnjara, Petar; Biljan, Darko; Lenz, Ivana; Drenjančević, Ines. Effect of carnosine on vascular function of Sprague-Dawley rats on a high-salt diet – a pilot study // 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian Physiological Society - Book of Abstracts Plitvička jezera, Hrvatska, 2022. str. 76-76 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Stupin, Ana; Drenjančević, Ines; Mihalj, Martina; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Stupin, Marko; Matić, Anita; Kolobarić, Nikolina; Kozina, Nataša; Mrakovčić-Šutić, Ines et al. Short-term high-salt loading effects on microvascular endothelial function in salt-resistant humans – specific role of oxidative stress and sympathovagal imbalance // 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian

Physiological Society - Book of Abstracts Plitvička jezera, Hrvatska, 2022. str. 23-23  
(predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

5. Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Matić, Anita; Stupin, Ana; Kolobarić, Nikolina; Kozina, Nataša; Šušnjara, Petar; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. PERMISSIVE ROLE OF ANGIOTENSIN II IN MAINTENANCE OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASODILATION IN CEREBRAL MICROCIRCULATION // Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e282 / Heagerty, Anthony M. (ur.). Atena, Grčka: Wolters Kluwer, 2022. str. e282-e282 doi:0.1097/01.hjh.0000838440.67547.4c (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
6. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Kolobarić, Nikolina; Kolar, Luka; Masle, Ana Marija; Breškić Ćurić, Željka; Kozina, Nataša; Jukić, Ivana; Stupin, Marko et al. Does Functional Food Provide Benefits for Cardiovascular Health? Ongoing Studies in Scientific Centre of Excellence // Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e206 Atena, Grčka, 2022. str. e206-e206 doi:10.1097/01.hjh.0000837544.05525.4c (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
7. Bijelić, Nikola; Kozina, Nataša; Rođak, Edi; Bazina Iva; Šešelja, Kate; Baus Lončar, Mirela; Belovari, Tatjana; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. Structural characteristics of femoral arteries in wild-type and TFF3 knock-out mice on standard and high-salt diet // 4th Croatian Microscopy Congress with international participation : Book of Abstracts / Macan, Jelena ; Kovačević, Goran (ur.). Zagreb: Croatian Microscopy Society ; Ruđer Bošković Institute, 2022. str. 34-35 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
8. Lukačević, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Kozina, Nataša; Stupin, Ana, Drenjančević, Ines; Jukić Ivana. Ion Channels Modulation in Sprague-Dawley Rats on a High Salt Intake – Changes in Flow-induced Dilation Mechanisms // 4th International Student and 17th Bridges in Life Sciences Conferences - Book of Abstract / -, 2022, 32-32 Prag, Češka, 2022. str. 32-32 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)



9. Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana. Assessment of the role of ion channels in flow- induced dilation mechanisms of a carotid artery in low salt and high salt fed *Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N* mice and their wild type controls // 3rd Young Scientists` Day Conference Osijek, Hrvatska, 2021. str. 32-32 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
10. Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Matić, Anita; Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Šušnjara, Petar; Stupin, Marko. Antioxidative and anti-inflammatory characteristics of carozine- a perspective for use in functional food. // 15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation- abstract book Zagreb, Hrvatska, 2021. str. 22-22 (pozvano predavanje, sažetak, znanstveni)
11. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Breškić-Čurić Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selhofer-Relatić, Kristina; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita et al. Changes in serum levels of inflammatory biomarkers in patients with acute and chronic coronary syndrome consuming n-3 PUFA enriched hen eggs- a randomized study. // Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021 Trogir, Hrvatska, 2021. str. 41-41 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)
12. Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana. Effect of high salt diet on vascular production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in *Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N* knockout mice // 15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation. Zagreb, Hrvatska, 2021. str. 1-1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
13. Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana. Effect of high salt diet on vascular reactive oxygen species production in *Tff3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N* knockout mice // XII ISIN Conference on Immunonutrition Barcelona, Spain, 2021. str. 1-1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
14. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Breškić Čurić, Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selhofer-Relatić, Kristina; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita et al. Changes in serum levels of inflammatory biomarkers in patients with

- acute and chronic coronary syndrome consuming n-3 polyunsaturated fatty acid enriched hen eggs - a randomized study // Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021, Abstract book Trogir, Hrvatska, 2021. str. 40-40 (poster, recenziran, sažetak, ostalo)
15. Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines; Jukić, Ivana; Assessment of the role of ion channels in flow- induced dilation mechanisms of a carotid artery in low salt and high salt fed *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N mice and their wild type controls // RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference online, 2021. str. 1-1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
16. Kozina, Nataša; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. Assessment of the mechanisms of flow-induced dilation of carotid artery in low salt and high salt fed *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL/6N mice and their wild type controls // RECOOP 15th Bridges in Life Sciences Video Conferences on-line, 2020. str. 1-1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
17. Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Matić, Anita; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Kibel, Aleksandar; Kolobarić, Nikolina; Šušnjara, Petar; Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines Ion channels modulation after acute and intermittent hyperbaric oxygen exposure – changes in vascular relaxation mechanism // The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book Virtual conference (online), 2020. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
18. Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. Trefoil Factor Peptide 3 (Tff3) and its potential role in cardiovascular system // RECOOP 10th Annual Project Review Meeting Wroclaw, Poljska, 2019. str. 1-1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
19. Drenjancevic, Ines; Mihalj, Martina; Stupin, Ana; Matić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; KOzina, Nataša; Rašić, Lidija; Kolar, Luka; Kolobarić, Nikolina et al. Functional food in cardiovascular protection- effects of n-3 polyunsaturated fatt acids // 12 međunarodna znanstvena i stručna konferencija Hranom do zdravlja / Babić, Jurislav; Šubarić, Drago; Jašić, Midhat (ur.). Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet

- Osijek, Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, 2019. str. 56-56 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
20. Matić, Anita; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Unfirer, Sanela; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Kozina, Nataša; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. The Effects of High Salt Intake on Cerebral Circulation // 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book Osijek, Hrvatska, 2019. str. IL5-/ (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
21. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Matic, Anita; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Jukić, Ivana; Kozina, Nataša; Rašić, Lidija; Kolar, Luka; Kolobarić, Nikolina, Šušnjara, Petar; Stupin, Marko. Is oxidative stress a link between harmful effects of high NaCl intake and veneficiary effects of N-3 PUFAs intake on microcirculation in normotensive subjects? // European SOciety for Vascular Medicine Contress 2019, International Union of ANgiology- EUrochap 2019, Central European Vascular Forum- Course 2019, Programme with book of abstract Ljubljana, Slovenija, 2019. str. 35-35 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
22. Mihaljević, Zrinka; Mišir, Mihael; Radmilović, Marina; Justić, H; Grgić, S; Matić, Anita; Šušnjara, Petar; Kozina, Nataša; Drenjančević, Ines. Establishing the model of tMCAO induced stroke in TFF3-/- knockout mice // ACTA PHYSIOLOGICA Volume 227, Issue S718 Bologna, Italija, 2019. str. 87-87 doi:.org/10.1111/apha.13366 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
23. Drenjančević, Ines; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Ana; Mihalj Martin; Kozina, Nataša. Omega-3 Fatty Acids and the Membrane Transport System and Channels in Endothelium // [https://www.remedicon.hu/tartalmak/fajlok/fajl\\_eloadas-absztraktok\\_20190509141814.pdf](https://www.remedicon.hu/tartalmak/fajlok/fajl_eloadas-absztraktok_20190509141814.pdf) Sumeg, Mađarska, 2019. (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, znanstveni)
24. Kozina, Nataša; Matić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Šušnjara, Petar; Vuković, Ana; Vuković, Rosemary; Drenjančević, Ines. The Effect of High Salt Dietary Intake and Angiotensin II Infusion on Activity of Antioxidative Enzymes in Serum of Sprague-

- Dawley Rats // *Journal of Vascular Research* 56:1–134 Maastricht, Nizozemska, 2019. str. 67-67 doi:10.1159/000499516 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
25. Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Šušnjara, Petar; Kozina, Nataša; Kolobarić, Nikolina; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. Angiotensin II-Type 1 Receptor Blockade with Losartan Affects the Expression of Enzymes Involved in Vascular Reactivity and Balance of Vascular Oxidative Stress of Sprague-Dawley Rats // *Journal of Vascular Research* 56:1–134 Maastricht, Nizozemska, 2019. str. 82-83 doi:10.1159/000499516 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
26. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Barić, Lidija; Stupin, Marko; Mihalj, Martina; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Jukić, Ivana; Šušnjara, Petar; Kozina, Nataša; Kolobarić, Nikolina. Increased Oxidative Stress Underlies Impaired Endothelial Function and Vascular Reactivity with High Salt Dietary Intake, Independently of Blood Pressure Changes – Translational Studies // *Journal of Vascular Research* 56(suppl 1):1–134 Maastricht, Nizozemska, 2019. str. 29-30 doi:10.1159/000499516 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
27. Kozina, Nataša; Šušnjara, Petar; Mihaljević, Zrinka; Perica, Ante; Drenjančević, Ines The establishment of the method for measurement of the markers of oxidative stress in HeLa cell culture // *The 12th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International participation Rijeka, Hrvatska, 2018.* str. 38-38 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
28. Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Matić Anita; Kolobarić Nikolina; Kozina Nataša; Drenjančević Ines. The role of angiotensin II AT-1 type receptors in maintenance of the vascular oxidative stress balance of Sprague-Dawley rats // *The 12th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ Rijeka, Croatia., 2018.* str. 16-17 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)