

Utjecaj visokoslane prehrane na morfološka obilježja femoralnih arterija u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3

Ivančević, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:943127>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



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

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Lucija Ivančević

**UTJECAJ VISOKOSLANE PREHRANE
NA MORFOLOŠKA OBILJEŽJA
FEMORALNIH ARTERIJA MIŠEVA
DIVLJEG TIPA I MIŠEVA S
ISKLUČENIM GENOM TFF3**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

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

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Lucija Ivančević

**UTJECAJ VISOKOSLANE PREHRANE
NA MORFOLOŠKA OBILJEŽJA
FEMORALNIH ARTERIJA MIŠEVA
DIVLJEG TIPA I MIŠEVA S
ISKLUČENIM GENOM TFF3**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod za histologiju i embriologiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Bijelić

Rad ima 30 listova, 3 tablice i 7 slika.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	II
1. UVOD.....	1
1.1. Krvožilni sustav.....	1
1.2. Učinak soli na morfološka obilježja krvnih žila.....	2
1.3. Tff proteini	3
1.3.1. Uloga Tff3 proteina u fiziološkim i patološkim procesima.....	3
1.3.2. Tff3 protein i krvožilni sustav	5
2. HIPOTEZA.....	6
3. CILJEVI.....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Ustroj studije	8
4.2. Materijal	8
4.3. Metode.....	9
4.4. Statističke metode	15
5. REZULTATI.....	16
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČCI	22
8. SAŽETAK.....	23
9. SUMMARY.....	24
10. LITERATURA	25
11. ŽIVOTOPIS.....	30

POPIS KRATICA

TFF	obitelj trefoil factor proteina (engl. <i>trefoil factor family</i>)
TFF3	<i>trefoil factor family 3</i> protein
<i>Tff3</i> ^{-/-}	miševi s isključenim genom <i>Tff3</i>
<i>Tff3</i> ^{-/-} HSD	miševi s isključenim genom <i>Tff3</i> hranjeni visokoslanom prehranom
<i>Tff3</i> ^{-/-} LSD	miševi s isključenim genom <i>Tff3</i> hranjeni standardnom prehranom
WT	miševi divljeg tipa
WT HSD	miševi divljeg tipa hranjeni visokoslanom prehranom
WT LSD	miševi divljeg tipa hranjeni standardnom prehranom

1. UVOD

1.1. Krvožilni sustav

Krvožilni ili kardiovaskularni sustav dio je žilnog sustava, a čine ga srce, arterije, arteriole, kapilare, venule i vene. Njegova uloga je osigurati protok krvi do svih organa i tkiva i ukloniti štetne tvari. Žilni sustav se još dijeli na makrocirkulaciju, koju čine žile promjera većeg od 0,1 mm – mišićne vene, mišićne i elastične arterije te velike arteriole, i na mikrocirkulaciju koju čine arteriole, kapilare, postkapilarne venule. Srce je mišićna pumpa koja pokreće krv i osigurava njen protok kroz mrežu krvnih žila. Kapilare su krvne žile najmanjeg promjera, od 7 do 9 μm , dužine do 50 μm . Kroz njihovu stijenku se odvija izmjena tvari između krvi i tkiva. Kapilare povezuju male arteriole i postkapilarne venule. Krvne žile većeg promjera građene su od tri različita sloja ili tunike: 1) *tunica interna* ili *intima* (unutarnji sloj, sastoji se od endotela i rahlog vezivnog tkiva sa elastičnim i kolagenim vlaknima), 2) *tunica media* (srednji i najdeblji sloj, čine je slojevi glatkih mišićnih stanica između kojih se nalaze elastična i kolagena vlakna) i 3) *tunica externa* ili *adventitia* (vanjski sloj vezivnog tkiva, uglavnom sadrži kolagena vlakna tipa I, povezuje žilu s okolnih tkivom). Arteriole, kapilare i venule u stijenci većih krvnih žila čine *vasa vasorum*, čija svrha je da dovode hranjive tvari u vanjski dio tunike medije i tuniku adventiciju velikih krvnih žila u kojima se nalaze. Arterije su snažne, elastične žile koje imaju ulogu prenošenja krvi i hranjivih tvari od srca prema tkivima. Aorta je najveća arterija u tijelu i ubrajamo je u velike elastične arterije. Mišićne arterije srednjeg promjera stezanjem i otpuštanjem glatkih mišićnih stanica kontroliraju dotok krvi do organa, a subendotelni sloj u tunici intimi im je deblji nego kod arteriola. Arteriole većinom imaju promjer manji od 0,5 mm, tanak subendotelni sloj i uzak lumen. Udio elastičnih vlakana opada kako arterije postaju manje, a udio glatkih mišićnih stanica raste. Slojevi žila također postaju tanji kako žile postaju manje. Vene su krvne žile koje vraćaju krv prema atrijima srca i možemo ih podijeliti na venule, male vene, srednje velike vene te velike vene. Venule imaju promjer od 0,2 mm do 1 mm. Zbog tanke naslage vezivnog tkiva ispod endotela imaju deblju stijenku nego kapilare. Male i srednje velike vene obično imaju promjer 1 – 9 mm, imaju tanju stijenku od pratećih arterija i slabo razvijenu tuniku mediju, zbog čega nisu elastične kao arterije. Velike vene su vene koje su najbliže srcu. One sadrže zaliske – polumjesečaste nabore intime koji se izbočuju u lumen i osiguravaju protok krvi u jednom smjeru, prema srcu (1 – 3).

Femoralna ili bedrena arterija je glavna arterija donjih ekstremiteta, pripada skupini mišićnih arterija i daje ogranke za okolne mišiće, limfne čvorove i kožu. Prehranjuje prednju i stražnju skupinu mišića natkoljenice i daje grane za vrat femura i zglob kuka. Spušta se anteromedijalnom stranom natkoljenice iz femoralnog trokuta, kroz tetivno-mišićni prostor, aduktorni kanal, na stražnju stranu koljena u zakoljenu jamu (*fossa poplitea*) te se nastavlja u arteriju popliteu. Ona nastavlja tok sredinom zakoljene jame i daje ogranke za koljeni zglob u zakoljenoj jami i srednju koljenu arteriju. Grana se na: 1) *a. tibialis anterior* (opskrbljuje strukturu prednjeg dijela potkoljenice i grebena stopala) i 2) *a. tibialis posterior* (opskrbljuje stražnju i lateralnu skupinu mišića potkoljenice, u stopalu se grana još na *a. plantaris medialis* i *a. plantaris lateralis*) (2, 4).

1.2. Učinak soli na morfološka obilježja krvnih žila

Kardiovaskularne bolesti su postale globalni i javnozdravstveni problem, pogotovo u razvijenim zemljama. Smatra se da je povećani dnevni unos kuhinjske soli jedan od čimbenika rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, npr. hipertenzije i moždanog udara. Kardiovaskularne bolesti su trenutno vodeći uzrok smrti u zemljama Europske unije. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje dnevni unos soli do 5 g/dan, a u današnje vrijeme u razvijenim zemljama prosjek je oko 12 g/dan (5). Poremećaj endotela prethodi raznim kardiovaskularnim bolestima. Istraživanja su pokazala da čak i kratkotrajan unos veće količine kuhinjske soli ima negativan utjecaj na funkciju i morfološka obilježja endotela krvnih žila. Također, visok unos soli utječe na reaktivnost krvnih žila, a dugotrajna hipertenzija može uzrokovati remodeliranje krvnih žila u smislu promjene debljine stijenke, pojedinih slojeva i širine lumena. Nedavni pokusi na životinjama pokazali su da visok unos soli može na više načina utjecati na remodeliranje krvnih žila (6). Povećani unos soli dovodi do smanjene razine angiotenzina II u plazmi što dovodi do povećanja oksidativnog stresa i narušavanja vaskularne reaktivnosti. Povećanje oksidativnog stresa negativno utječe na mehanizme dilatacije i povezano je s pojavom endotelne disfunkcije (7).

Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da visokoslana prehrana narušava cirkulaciju u mozgu te mehanizme relaksacije krvnih žila ovisne i neovisne o endotelu. Također je potvrđeno da i kratkotrajan unos prekomjernih količina soli dovodi do poremećaja vaskularne funkcije i vazodilatacijskog odgovora u mezenteričnim „otporničkim“ arterijama (engl. *resistance arteries*) štakora, koje pripadaju mikrocirkulaciji i važne su u regulaciji krvnog tlaka (8, 9).

1.3. Tff proteini

Tff1 protein, Tff2 protein i Tff3 protein, zajedno čine skupinu Tff (engl. *Trefoil factor family*) proteina, koji imaju važnu ulogu u fiziološkim i patološkim procesima sluznice. Imaju brojne *in vivo* i *in vitro* učinke na diferencijaciju i migraciju stanica i time omogućuju zaštitu i obnavljanje stanica epitela (10). Luče ih vrčaste stanice u sluznici probavnog sustava i druge epitelne stanice (stanice u respiracijskom epitelu, mukozni dijelovi slinovnica, epitel bubrežnih kanalića, epitel mliječne žlijezde, kubični epitel štitnjače i dr.), a pronađeni su i u neuronima središnjeg živčanog sustava. Utječu na apoptozu stanica i imunosti sustav, a novija istraživanja pokazuju da su važni za prirođeni imunitet sluznice. Izražaj pojedinih Tff proteina razlikuje se u različitim tkivima, no sva tri imaju lektinsku aktivnost i često se izlučuju zajedno s mucinima na površinu sluznica. Tff1 i Tff3 protein se sastoje od jedne Tff domene i dodatnog slobodnog 7. cisteinskog ostatka, a Tff2 protein sadrži dvije Tff domene (11 – 13). Geni koji kodiraju Tff proteine nalaze se na dugom kraku 21. kromosoma (genomska regija 21q22.31) (14).

1.3.1. Uloga Tff3 proteina u fiziološkim i patološkim procesima

Tff proteini imaju važnu ulogu u održavanju i cijeljenju sluznice probavnog sustava, koji im je i glavno mjesto sinteze i fiziološkog djelovanja. Vrčaste stanice sluznice probavnog sustava su jedno od glavnih mjesta sinteze ovih proteina. Prema nekim istraživanjima Tff proteini doprinose liječenju oštećenja sluznice u određenim gastrointestinalnim poremećajima, stoga je ovo područje jedno od glavnih područja istraživanja Tff proteina (15, 16). Nedavno istraživanje sinteze Tff3 proteina i njegovih kemijskih svojstava je pokazalo da su i Tff3 protein i njegov homodimer osjetljivi na degradaciju u probavnom sustavu, te je otkriven metabolit Tff3 proteina (Tff3⁷⁻⁵⁴) koji je stabilan u crijevima. Smatra se da mogućnost kemijske sinteze Tff3 proteina i otkriće stabilnog bioaktivnog metabolita predstavljaju temelj za budući razvoj analoga Tff3 proteina i moguću terapijsku upotrebu navedenih molekula (17). Osim u fiziološkim, Tff3 protein sudjeluje i u patološkim procesima u probavnom sustavu. Podaci pokazuju da Tff3 protein u serumu može biti prognostički marker kod bolesnika sa karcinomom želuca, jer njegovo lučenje pokazuje pozitivnu korelaciju sa metastazama, veličinom tumora i uznapredovalost bolesti te se pomoću njega može pratiti odgovor bolesnika na liječenje (18 – 21).

Tff3 protein je najzastupljeniji Tff protein u dišnom sustavu, a izlučuju ga vrčaste stanice respiracijskog epitela. Tff3 protein potiče migraciju i diferencijaciju stanica epitela što dovodi do bržeg obnavljanja i stabilizacije samog epitela (22). U alergijskim reakcijama ekspresija Tff3 proteina je povišena. Slično kao i u slučaju nekih novotvorina probavnog sustava, Tff3 protein može se koristiti kao prognostički marker u osoba oboljelih od karcinoma pluća te kao dijagnostički marker kod primarnog i sekundarnog adenokarcinoma. Ekspresija Tff3 proteina ovisi o histološkim podtipovima adenokarcinoma pluća. Koncentracija Tff3 proteina znatno je veća u papilarnom i acinarnom, nego u lepidičnom adenokarcinomu (23, 24).

Osim u epitelima sluznice organa, zabilježena je ekspresija Tff3 proteina i u živčanom tkivu miševa, štakora, svinja i ljudi. Osim u živčanom tkivu odraslih životinja, pronađen je i u živčanom tkivu mišjih zametaka i to u citoplazmi neurona u mozgu i produženoj moždini, sivoj tvari kralježnične moždine, koroidnom pleksusu i ganglijskim stanicama (25). Tff3 protein otkriven je u živčanim stanicama koje proizvode oksitocin te se najvjerojatnije zajedno s oksitocinom izlučuje u krv iz istih sekretnih zrnaca (26).

U upalnim stanjima ljudske i životinjske zglobne hrskavice (septički artritis i osteoartritis) dolazi do povećane ekspresije Tff3 proteina koja nije karakteristična za zdravu zglobnu hrskavicu. Također je i dokazana prisutnost Tff3 proteina u procesima okoštavanja, u zonama u kojima hondrociti i međustanična tvar prolaze kroz morfološku transformaciju. Osim toga Tff3 protein utječe na kvalitetu spužvaste kosti. Njegov nedostatak uzrokuje smanjen broj i veću udaljenost među koštanim gredicama, ali ne uzrokuje promjene u udjelu hrskavice i zrelog koštanog tkiva u gredicama (27 – 30).

Tff proteini su predmet istraživanja u povezanosti s rakom dojke (31, 32). Istraživanja pokazuju da u pacijentica s rakom dojke koncentracija i ekspresija Tff3 proteina pokazuje pozitivnu korelaciju sa veličinom tumora, brojem metastaza i brojem zahvaćenih limfnih čvorova, stupnjem razvoja bolesti te lošijom prognozom (33). Razina Tff3 proteina je povezana sa estrogenom. Estrogen potiče ekspresiju Tff3 proteina, a Tff3 protein pomaže u angiogenezi i metastatskom širenju tumorskih stanica pozitivnih na estrogenske receptore. Visoke razine Tff3 proteina otkrivene su u metastazama u plućima i limfnim čvorovima (34 – 36).

U prostati, Tff3 protein je prisutan u normalnom tkivu, ali je njegova koncentracija puno veća u stanicama karcinoma prostate i zbog toga se kao i kod drugih zloćudnih bolesti

može koristiti kao biomarker i dijagnostički marker. Inhibicija Tff3 proteina usporava rast i migraciju tumorskih stanica te dovodi do smanjene ekspresije BCL-2 (protein iz obitelji BCL2 proteina) i povećane ekspresije i translokacije BAX-a (protein iz obitelji BCL2 proteina) u mitohondrije (37 – 39).

1.3.2. Tff3 protein i krvožilni sustav

Utjecaj Tff3 proteina na krvožilni sustav te morfologiju i funkciju krvnih žila je novo područje istraživanja. Trenutno dostupna literatura pokazuje kako nedostatak *Tff3* gena utječe na strukturu mišje aorte u smislu promijenjene debljine pojedinih slojeva stijenke aorte i količine elastina u njoj stijenci, ali nije poznat mehanizam koji dovodi do tih promjena niti eventualni značaj za fiziološke funkcije žile i zdravlje životinje. Prema istom istraživanju, nedostatak *Tff3* gena djelovao je protektivno na krvožilnu funkciju u životinja hranjenih visokoslanom dijetom. Slično je bilo i s ishodima moždanog udara u istih životinja, no životinje sa isključenim genom *Tff3* na niskoslanom dijeti imale su teži moždani udar, što je u skladu s istraživanjima koja pokazuju da Tff3 protein u serumu djeluje neuroprotektivno u pokusno izazvanom moždanom udaru (40, 41). Postoji mogućnost i da homodimer Tff3-FCGBP ima ulogu u krvnim žilama (11). Do sada nije bilo znanstvenih istraživanja kojima bi se ispitale morfološke razlike u građi femoralnih arterija ovisno o isključenju *Tff3* gena i izlaganju životinja visokoslanom prehrani. Prethodno navedeno morfološko istraživanje provedeno je na aortama, međutim, aorta se ubraja u velike elastične arterije dok femoralne arterije spadaju u mišićne arterije, koje se po građi i funkciji donekle razlikuju od velikih elastičnih arterija.

2. HIPOTEZA

Povećani unos soli značajno utječe na morfološka obilježja femoralnih arterija miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su ispitati sljedeća morfološka obilježja femoralnih arterija miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom:

- 1) omjere debljine stijenke, promjera lumena žile i ukupnog promjera žile
- 2) omjere površine stijenke, površine lumena žile i ukupne površine žile
- 3) omjere površine i debljine pojedinih slojeva žila i stijenke žile
- 4) udio kolagena i elastina u stijenci žile

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedeno je pokusno istraživanje na životinjama. U istraživanju su se koristile femoralne arterije miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* iz arhive Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Preparati femoralnih arterija miševa obojeni su orceinom i pikrosirijus crvenilom, a histomorfološka građa je analizirana kvantitativno i kvalitativno.

4.2. Materijal

Za istraživanje su korištene femoralne arterije miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* koji su uzgojeni u vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. Transgenični miševi s isključenim genom *Tff3* (*Tff3*^{-/-}/C57BL/6N) i miševi divljeg tipa (WT/C57BL/6N) stari deset tjedana podijeljeni su u skupinu hranjenu standardnom prehranom (0,4 % NaCl) i skupinu hranjenu visokoslanom prehranom (4 % NaCl) tjedan dana. Životinje su podijeljene u 4 skupine kako slijedi:

1. miševi divljeg tipa hranjeni standardnom prehranom
2. miševi divljeg tipa hranjeni visokoslanom prehranom
3. miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni standardnom prehranom
4. miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni visokoslanom prehranom

Korišteno je 6 miševa iz 1. i 2. skupine, te 5 miševa iz 3. i 4. skupine (ukupno 22 životinje), osim u slučaju analize udjela kolagena gdje je zbog artefakta u skupini broj 2 jedan uzorak isključen iz analize te je u toj skupini bilo 5 miševa (ukupno 21 uzorak).

Životinje su žrtvovane i organi su prikupljeni u arhivu Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Osijek, odakle su uzeti za provedbu ovog istraživanja. Pokusi su izvršeni u sklopu projekta IP-2014-09-6380/V-ELI Athero, te projekta VIF-2018-MEFOS-09-1509 voditeljice prof. dr. sc. Ines Drenjančević koji su dobili odobrenje nadležnih etičkih povjerenstava. Istraživanje u sklopu izrade diplomskog rada je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/21-08/07, Ur. broj: 2158-61-07-21-144).

4.3. Metode

Korištene su femoralne arterije miševa koje su fiksirane u 4 %-nom paraformaldehidu i uklopljene u parafinske blokove standardnim parafinskim postupkom. Parafinski blokovi s femoralnim arterijama ispitivanih životinja izrezani su na rezove debljine 5-6 μm pomoću rotacijskog mikrotoma (SLEE Cut 4060, Mainz, Njemačka). Rezovi su naneseni na predmetna stakalca i obojeni orceinom (prikaz elastičnih vlakana) i pikrosirijus crvenilom (prikaz kolagenih vlakana).

Postupak bojenja 1 %-nim orceinom:

1. Deparafiniranje preparata
2. Rehidracija preparata silaznim nizom alkohola do 70 %-nog alkohola
3. Orcein 1 – 24 sata (svaka 2 sata pratiti na svjetlosnom mikroskopu)
4. Isprati 70 %-nim alkoholom
5. Kiseli alkohol 5 min diferenciranje (70 %-ni alkohol + 1 ml HCl-a)
6. Isprati 70 %-nim alkoholom
7. Zasićena pikrinska kiselina u 96 %-nom alkoholu
8. Preparate brzo sušiti finim filter papirom
9. Dvaput isprati u 100 %-nom alkoholu
10. Držati u ksilolu 2 puta po 10 min
11. Kanadski balzam i pokrovnica

Priprema 1 %-nog orceina:

1. 100 mL 70 %-nog alkohola
2. 1 g orceina
3. 1 mL koncentrirane HCl

Postupak bojenja pikrosirijus crvenilom:

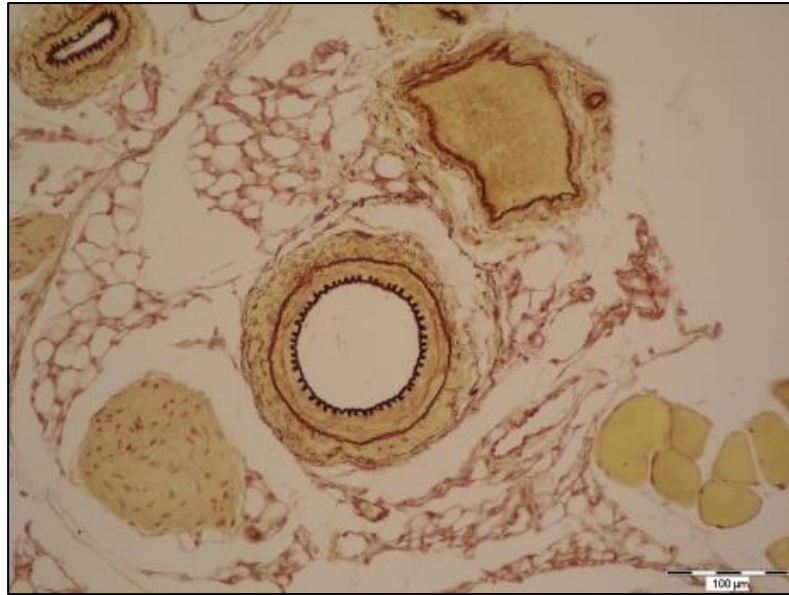
1. Deparafiniranje preparata
2. Rehidracija preparata silaznim nizom alkohola
3. Dobro isprati destiliranom vodom
4. Pikrosirijus crvenilo 1 sat
5. Isprati 2 puta u octenoj vodi

6. Dehidracija preparata uzlaznim nizom alkohola
7. Držati u ksilolu 2 puta po 10 min
8. Kanadski balzam i pokrovnica

Priprema otopina:

1. Pikrosirijus crvenilo – 0,5 g sirijus crvenila F3B i 500 mL zasićene otopine pikrinske kiseline (vodene)
2. Octena voda – 5 mL ledene octene kiseline i 1000 mL destilirane vode

Preparati su fotografirani digitalnim fotoaparatom marke Olympus® (model C-5050; Olympus, Tokyo, Japan), spojenim na mikroskop marke Olympus® (model BX-50) uz pomoć računalnog programa QuickPHOTO Pro (Promicra s.r.o, Prag, Republika Češka). Fotografije obojenih preparata obrezane su i pripremljene u besplatnom programu otvorenog koda GIMP (GNU Image Manipulation Program; <https://www.gimp.org/>) kako bi izdvojili samo femoralne arterije kao područje interesa. Slika 1. prikazuje jedan od uzoraka prije obrade u računalnom programu GIMP, a Slika 2. nakon obrade. Mjerenja su izvršena pomoću besplatnog programa otvorenog koda FIJI (FIJI is Just ImageJ), koji se temelji na programskom paketu ImageJ (42).

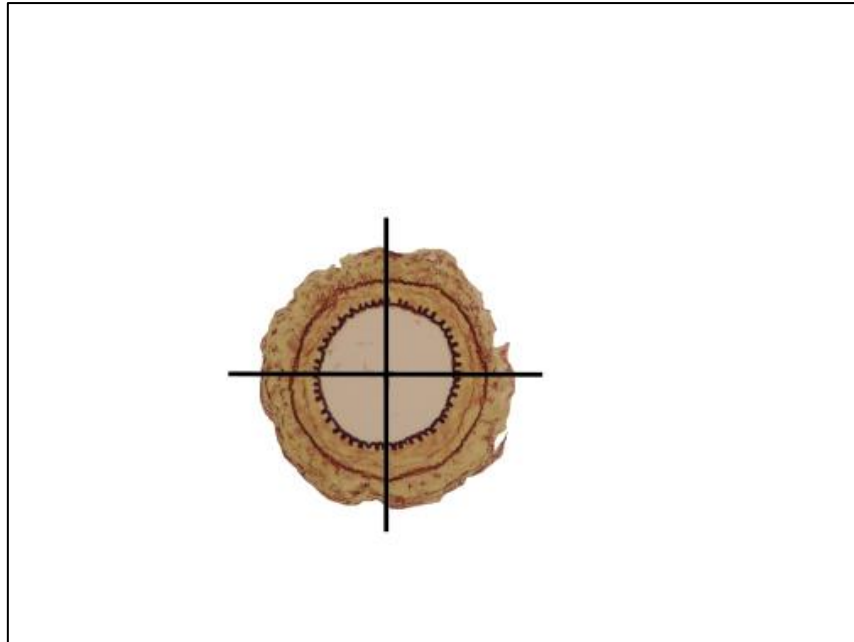


Slika 1. Uzorak femoralne arterije jednog od miševa divljeg tipa s okolnim tkivima (vena, periferni živac, skeletni mišić, masno tkivo i male krvne žile). Bojenje orceinom. Mjerilo: 100 μm . Fotografirala autorica.

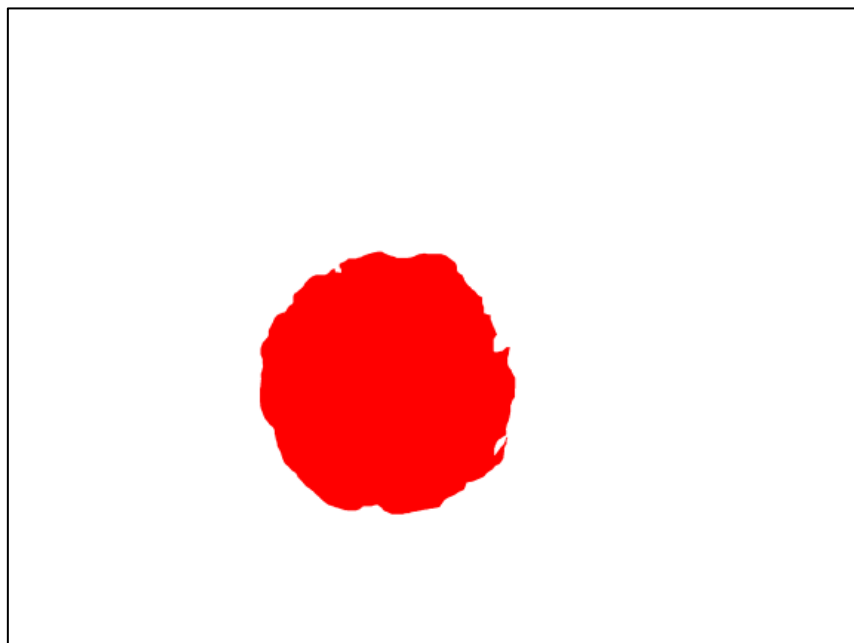


Slika 2. Fotografija sa Slike 1. obrađena u računalnom programu GIMP tako da je sa prethodne fotografije izdvojena samo femoralna arterija (fotografiju obradila autorica).

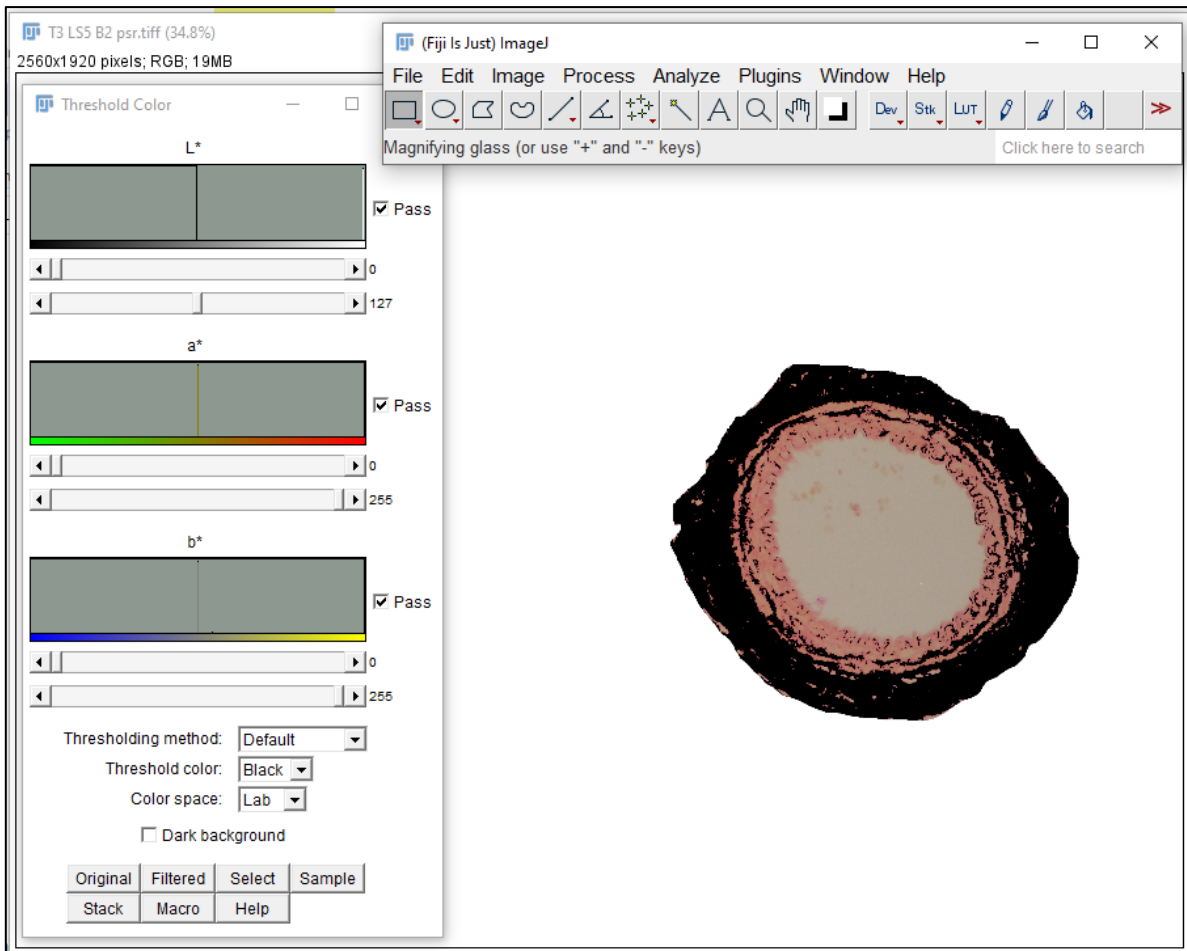
U programu FIJI (korištenjem alata *Straight line* i funkcije *Analyze/Measure*) izmjerena je debljina stijenke, promjer lumena, promjer arterije, debljina medije i debljina adventicije. U računalnom programu GIMP preko obrađenih fotografija preparata femoralnih arterija superponirana je "meta" (dvije međusobno okomite crte sa sjecištem u području sredine lumena femoralne arterije) koja je u nastavku postupka poslužila kao referentno područje mjerenja debljine i promjera (Slika 3.). Tako je za mjerenje debljine stijenke, debljine medije i debljine adventicije pomoću mete u programu FIJI izvršeno 4 mjerenja (gore i dolje te lijevo i desno). Iz dobivene 4 vrijednosti debljine medije, adventicije i stijenke izračunata je aritmetička sredina debljina pojedinih dijelova femoralne arterije koja je korištena u statističkoj analizi. Kod mjerenja promjera lumena i promjera cijele arterije pomoću mete su izvršena 2 mjerenja, vertikalno i horizontalno kroz lumen, odnosno kroz cijelu arteriju, te je iz tih vrijednosti izračunata aritmetička sredina svake mjere koja je korištena u statističkoj analizi. Za mjerenje površine lumena korišten je alat *Freehand selection* i funkcija *Analyze/Measure*, dok je za površinu cijele žile korišten alat *Color thresholding* i funkcija *Analyze/Measure*. Slika 4. prikazuje preparat pripremljen za mjerenje površine cijele žile u računalnom programu FIJI. Površina stijenke žile izračunata je kao razlika površine cijele žile i površine lumena žile. Pomoću alata *Color thresholding* također je izmjerena i površina elastina (na preparatima obojenim orceinom) i površina kolagena (na preparatima obojenim pikrosirijus crvenilom) u stijenci. Slika 5. prikazuje sučelje računalnog programa FIJI prilikom mjerenja udjela kolagena u stijenci, a Slika 6. prilikom mjerenja udjela elastina u stijenci femoralne arterije. Postotak je izračunat kao kvocijent površine elastina, odnosno kolagena, i površine stijenke žile. Uz pomoć mjerila na fotografijama i alata *Analyze/Set scale* izmjerene vrijednosti u pikselima pretvorene su u mikrometre, odnosno kvadratne mikrometre. Detaljne upute za korištenje alata navedenih u ovom dijelu nalaze se na internetskim stranicama projekata ImageJ i FIJI.



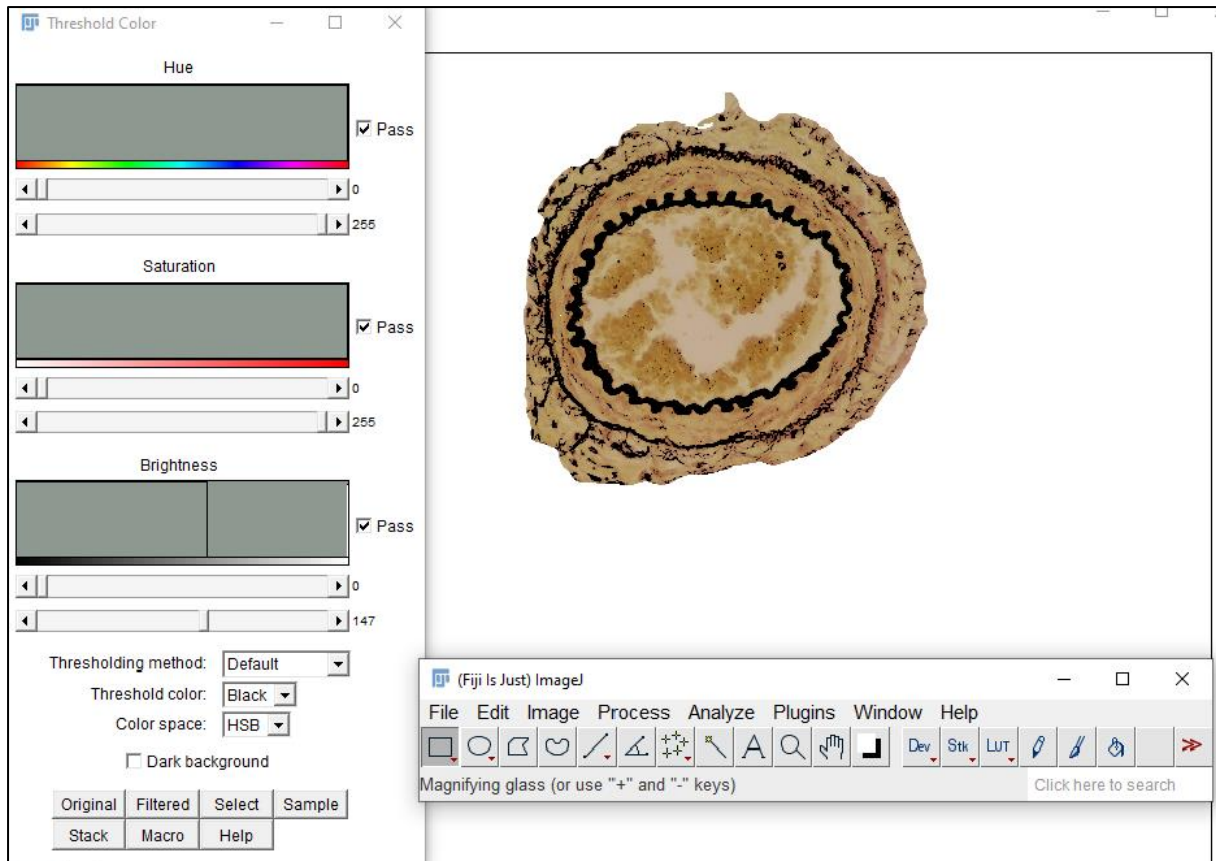
Slika 3. Meta superponirana na obrađenu fotografiju preparata femoralne arterije jednog od miševa divljeg tipa u računalnom programu GIMP (fotografiju obradila autorica).



Slika 4. Odabir površine cijele žile jednog od miševa divljeg tipa u računalnom programu FIJI pomoću alata *Color thresholding* radi mjerenja (fotografiju obradila autorica).



Slika 5. Sučelje računalnog programa FIJI prilikom mjerenja udjela kolagena u stijenci na preparatu femoralne arterije obojenom metodom pikrosirijus, gdje je računalni program FIJI u obliku crne boje izdvojio sva područja kolagena na temelju praga intenziteta bojenja (fotografirala autorica).



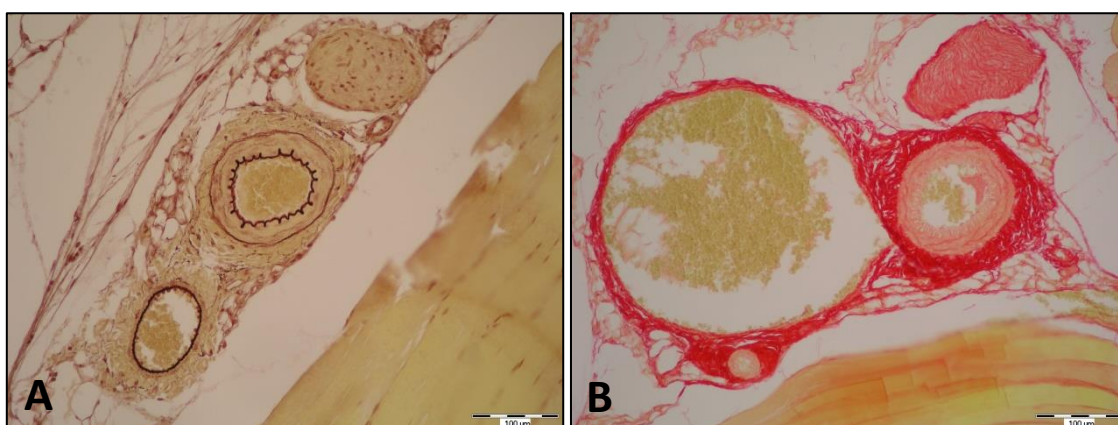
Slika 6. Sučelje računalnog programa FIJI prilikom mjerenja udjela elastina u stijenci na preparatu femoralne arterije obojenom orceinom, gdje je računalni program FIJI u obliku crne boje izdvojio područja elastina na temelju praga intenziteta bojenja (fotografirala autorica).

4.4. Statističke metode

Numerički podatci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike između četiri skupine testirane su Kruskal-Wallis testom i napravljena je *post hoc* analiza Dunnovim testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu je korišten program MedCalc Statistical Software verzija 18 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

5. REZULTATI

Analizirano je 12 uzoraka miševa divljeg tipa i 10 uzoraka miševa s isključenim genom *Tff3* kako bi se ispitalo postoje li razlike u histomorfološkim obilježjima femoralnih arterija miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom. Slika 7. prikazuje preparat obojen orceinom, gdje se elastin obojio smeđe, a citoplazma stanica i kolagen su se obojili žuto (A) te preparat obojen pikrosirijus crvenilom gdje se kolagen obojio žarko crveno, a citoplazma stanica obojila se žuto (B). Pregledom arterija pod svjetlosnim mikroskopom prije samog mjerenja u programu FIJI nisu uočene razlike u intenzitetu bojenja, niti u morfološkim obilježjima femoralnih arterija. Femoralne arterije u svim skupinama izgledale su normalno, slojevi su se mogli jasno razaznati u skladu s primijenjenim bojenjem te nisu uočene patološke promjene stijenke ni lumena ni u jednoj od skupina.



Slika 7. (A) Preparat femoralne arterije i okolnih struktura obojen orceinom. (B) Preparat femoralne arterije i okolnih struktura obojen pikrosirijus crvenilom. Mjerilo: 100 µm. (fotografirala autorica).

U tablici 1. prikazane su vrijednosti medijana i interkvartilog raspona za promjer lumena i promjer cijele arterije miševa divljeg tipa hranjenih standardnom prehranom (WT LSD), miševa divljeg tipa hranjenih visokoslanom prehranom (WT HSD), miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom prehranom (*Tff3*^{-/-} LSD) i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih visokoslanom prehranom (*Tff3*^{-/-} HSD). Analizom mjerenja

promjera lumena i promjera cijele arterije nije uočena značajna razlika između miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

Tablica 1. Rezultati analize promjera lumena žile i promjera cijele žile WT i *Tff3*^{-/-} miševa hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

SKUPINA	PROMJER LUMENA ŽILE (µm)	PROMJER CIJELE ŽILE (µm)
	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)
WT LSD*	102,883 (80,176 - 118,906)	206,038 (175,784 - 231,075)
WT HSD†	123,116 (56,053 - 143,538)	234,305 (207,758 - 241,845)
<i>Tff3</i>^{-/-} LSD‡	121,707 (61,057 - 131,337)	216,500 (127,152 - 234,041)
<i>Tff3</i>^{-/-} HSD§	59,660 (58,652 - 99,680)	154,412 (146,575 - 207,611)
P vrijednost	0,76	0,37

*WT LSD - miševi divljeg tipa hranjeni standardnom prehranom, †WT HSD - miševi divljeg tipa hranjeni visokoslanom prehranom, ‡*Tff3*^{-/-} LSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni standardnom prehranom, §*Tff3*^{-/-} HSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni visokoslanom prehranom

Tablica 2. prikazuje vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona površine lumena, površine cijele žile i površine stijenke WT i *Tff3*^{-/-} miševa hranjenih LS i HS prehranom. Nije pronađena značajna razlika između ispitivanih skupina miševa.

Tablica 2. Rezultati analize površine lumena, površine cijelog presjeka žile i površine stijenke WT i *Tff3*^{-/-} miševa hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

SKUPINA	POVRŠINA LUMENA (μm^2)	POVRŠINA CIJELE ŽILE (μm^2)	POVRŠINA STIJENKE (μm^2)
	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)
WT LSD*	8114,176 (5479,597 - 10102,569)	32977,272 (25038,877 - 42009,291)	24863,096 (19559,280 - 31906,722)
WT HSD†	11685,620 (2242,261 - 15082,023)	42676,914 (30463,233 - 48518,078)	29613,806 (26230,364 - 33812,095)
<i>Tff3</i>^{-/-} LSD‡	11907,574 (2303,720 - 13744,619)	39750,255 (12609,739 - 112749,945)	26037,174 (10486,287 - 99393,629)
<i>Tff3</i>^{-/-} HSD§	2616,755 (2417,630 - 6440,074)	18962,515 (16716,404 - 31840,717)	16359,128 (14288,748 - 25400,643)
P vrijednost	0,71	0,52	0,49

*WT LSD - miševi divljeg tipa hranjeni standardnom prehranom, †WT HSD - miševi divljeg tipa hranjeni visokoslanom prehranom, ‡*Tff3*^{-/-} LSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni standardnom prehranom, §*Tff3*^{-/-} HSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni visokoslanom prehranom

U tablici 3. su prikazane vrijednosti medijana i inetkvartilnog raspona debljine stijenke, debljine medije, debljine adventicije i postotka elastina i kolagena u stijenci žile WT i *Tff3*^{-/-} miševa hranjenih LS i HS prehranom. Analizom uzoraka nije uočena značajna razlika između skupina miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*.

Tablica 3. Rezultati analize debljine stijenke, debljine medije, debljine adventicije, postotka elastina i kolagena u stijenci žile WT i *Tff3*^{-/-} miševa hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

SKUPINA	DEBLJINA STIJENKE (µm)	DEBLJINA MEDIJE (µm)	DEBLJINA ADVENTICIJE (µm)	ELASTIN (%)	KOLAGEN (%)
	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)	Medijan (interkvartilni raspon)
WT LSD*	52,770 (46,550 - 59,819)	27,066 (26,787 - 30,430)	24,875 (23,045 - 26,757)	0,186 (0,161 - 0,196)	0,539 (0,508 - 0,570)
WT HSD[†]	55,511 (50,566 - 62,182)	26,211 (25,650 - 32,353)	23,416 (20,201 - 26,882)	0,184 (0,150 - 0,234)	0,525 (0,472 - 0,632)
<i>Tff3</i>^{-/-} LSD[‡]	41,554 (39,087 - 55,742)	24,146 (21,622 - 25,395)	16,928 (14,462 - 23,190)	0,185 (0,180 - 0,203)	0,559 (0,496 - 0,563)
<i>Tff3</i>^{-/-} HSD[§]	49,310 (48,783 - 57,336)	29,036 (25,385 - 30,378)	19,595 (17,718 - 20,844)	0,174 (0,165 - 0,195)	0,490 (0,439 - 0,541)
P vrijednost	0,24	0,21	0,1	0,84	0,87

*WT LSD - miševi divljeg tipa hranjeni standardnom prehranom, [†]WT HSD - miševi divljeg tipa hranjeni visokoslanom prehranom, [‡]*Tff3*^{-/-} LSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni standardnom prehranom, [§]*Tff3*^{-/-} HSD - miševi s isključenim genom *Tff3* hranjeni visokoslanom prehranom

6. RASPRAVA

U ovom radu istražen je utjecaj isključenja gena *Tff3* i visokoslane prehrane na morfologiju femoralne arterije, koja spada u srednje, mišićne arterije. Istraživanje krvožilne morfologije i funkcije u miševa s isključenim genom *Tff3* je relativno novo područje istraživanja, kao i utjecaj visokoslane prehrane u tih životinja. Do danas nije temeljito istraženo koju ulogu *Tff3* protein ima u mehanizmu odgovora žilnog sustava na visokoslanu prehranu. Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima su pokazala da miševi sa isključenim genom *Tff3* imaju donekle promijenjenu strukturu aorte, npr. povećanu površinu tunike medije, a smanjenu površinu tunike adventicije. Isto istraživanje na aortama je pokazalo da nedostatak *Tff3* gena djeluje protektivno na promjene strukture aorti pri visokoslanjoj prehrani (40), međutim nije poznat mehanizam putem kojeg dolazi do toga. S druge strane, poznato je da *Tff3* protein potiče angiogenezu i da je gustoća mikrožilja u nekim vrstama zloćudnih tumora ovisna o ekspresiji *Tff3* proteina (32, 33, 43). Buduća istraživanja u ovom području mogla bi dodatno rasvijetliti ulogu *Tff3* proteina u navedenim zbivanjima. Osobito bi bilo zanimljivo slična istraživanja provesti na mikrocirkulaciji, s obzirom da čak i kratkotrajan unos velikih količina soli može izazvati štetne posljedice na mikrocirkulaciju (8). S obzirom da je unos soli velik javnozdravstveni problem u svijetu te da postoji jasna povezanost između unosa povećane količine soli i kardiovaskularnih bolesti (hipertenzija i moždani udar), kronične bubrežne bolesti te štetnih posljedica na mikrocirkulaciju oka (44, 45), svakako je zanimljivo istražiti te pojave na životinjskim modelima koji u određenom mjeri utječu na vaskularnu funkciju i morfologiju, kao što su miševi s isključenim genom *Tff3*.

Kvalitativnim pregledom pod svjetlosnim mikroskopom nisu uočene veće razlike u građi femoralnih arterija, što odgovara dosadašnjim spoznajama da miševi s isključenim genom nemaju grubih promjena u fenotipu, osim u slučaju eksperimentalnih uvjeta koji otkrivaju narušen odgovor na određene stresore (46). Histomorfometrijska analiza građe femoralnih arterija pokazala je da nema značajne razlike u strukturi femoralne arterije miševa divljeg tipa koji su bili hranjeni standardnom i visokoslanom prehranom te miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom. Iako prema statističkoj analizi dobiveni rezultati površine lumena, površine cijelog presjeka žile i površine stijenke nisu bili značajni, vidljivo je da je ipak došlo do promjena u dimenzijama

arterije u *Tff3*^{-/-} HSD skupini. S obzirom da nije bilo statističke značajnosti, ove rezultate trebalo bi provjeriti na većem broju uzoraka te provjeriti utjecaj ekstremnih vrijednosti na statističku analizu.

Važno je napomenuti da su istraživanja morfologije krvnih žila u ovih skupina miševa rađena na velikim elastičnim arterijama (aorta) i mišićnim arterijama (femoralna arterija). Međutim, do sada nisu rađena istraživanja na mikrocirkulaciji, osobito na tzv. „otporničkim“ krvnim žilama, koje su važne za regulaciju sistemskog krvnog tlaka, tim više što se zna da visokosлана prehrana dovodi do vaskularne disfunkcije mikrocirkulacije (8, 9). To bi bio sljedeći logičan korak u istraživanju vaskularne morfologije i funkcije u životinja s isključenim genom *Tff3*. Dickinson i suradnici ispitivali su utjecaj niskoslane prehrane na krvne žile i studija je pokazala da niskosлана prehrana ima protektivne učinke s obzirom na hipertenziju i kardiovaskularna oboljenja (47). Potrebna su i daljnja istraživanja kako bi se ispitali učinci nedostatka Tff3 proteina i prehrane sa smanjenim unosom soli na vaskularnu funkciju. Također, nije poznato ni utječe li nedostatak Tff3 proteina na vrijeme koje je potrebno da dođe do promjena na krvnim žilama. Također se još uvijek treba istražiti funkcija nedavno otkrivenog homodimera Tff3-FCGBP u krvnim žilama i njegov utjecaj na fiziološku i patološku funkciju krvnih žila.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

- 1) omjeri debljina stijenke, promjera lumena žile i ukupnog promjera žile miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom ne razlikuju se značajno
- 2) omjeri površina stijenke, površina lumena žile i ukupne površine žile miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom se ne razlikuju značajno
- 3) omjeri površina i debljine pojedinih slojeva žila i stijenke žile miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom se ne razlikuju značajno
- 4) udio kolagena i elastina u stijenci žile miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom ne razlikuje se značajno

8. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA. Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitati morfološka obilježja te udio kolagena i elastina u stijenci femoralnih arterija miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

USTROJ STUDIJE. Istraživanje je provedeno kao pokusno istraživanje na životinjama u kojem su korištene femoralne arterije miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

MATERIJAL I METODE. Korišteno je ukupno 22 uzorka femoralnih arterija miševa podijeljenih u 4 skupine. Preparati su obojeni orceinom (analiza elastina) i pikrosirijus crvenilom (analiza kolagena). Za analizu su izmjerene debljine i površine stijenke i njenih slojeva, površina i promjer lumena, površina i promjer cijele arterije te udio elastina i kolagena u stijenci. Fotografije su obrađene u računalnom programu GIMP, a mjerenja izvršena u programu FIJI.

REZULTATI. Kvalitativnim pregledom pod svjetlosnim mikroskopom i kvantitativnom analizom pomoću izmjerenih vrijednosti nije uočena značajna razlika u ispitivanim morfološkim obilježjima femoralnih arterija miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

ZAKLJUČAK. Ne postoje značajne razlike u omjerima debljine stijenke, promjera lumena žile i ukupnog promjera žila, omjerima površine stijenke, površine lumena žile i ukupne površine žile, omjerima pojedinih slojeva žile i stijenke žile te u udjelu kolagena i elastina u stijenci žile miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* hranjenih standardnom i visokoslanom prehranom.

KLJUČNE RIJEČI. femoralna arterija; morfološka obilježja; *Tff3*; visokoslana prehrana

9. SUMMARY

THE EFFECT OF HIGH-SALT DIET ON FEMORAL ARTERY MORPHOLOGY IN WILD-TYPE AND *Tff3* KNOCK-OUT MICE

OBJECTIVES: The aim of this research was to examine the morphological properties and the share of collagen and elastin in the femoral arteries in wild-type and *Tff3* knock-out mice fed with standard and high-salt diet.

STUDY DESIGN: This was an experimental study on animals in which the femoral arteries of wild-type and *Tff3* knock-out mice fed with standard and high-salt diet were used.

MATERIALS AND METHODS: A total of 22 samples of mouse femoral artery were divided into four groups. The samples were stained with orcein (elastin analysis) and picrosirius red (collagen analysis) stain. Measurements of thickness and area of the wall and its layers, the area and diameter of lumen, the area and diameter of the entire artery, and the share of elastin and collagen in the artery wall were taken for the analysis. Photographs were processed in GIMP software, and the measurements were done in FIJI program.

RESULTS: By qualitative analysis under the light microscope and quantitative analysis with the help of measured values no significant difference was discovered in the femoral artery morphology in wild-type and *Tff3* knock-out mice fed with standard and high-salt diet.

CONCLUSION: There are no significant differences in wall thickness ratio, lumen diameter and total artery diameter, the ratio of individual artery layers and the artery wall, and the share of collagen and elastin in the femoral artery wall in wild-type and *Tff3* knock-out mice fed with standard and high-salt diet.

KEY WORDS: femoral artery; morphological attributes; *Tff3*; high-salt diet

10. LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Školska knjiga; 1995.
2. Jalšovec D. Sustavna i topografska anatomija čovjeka. Školska knjiga; 2005.
3. Durst-Živković B. Praktikum iz histologije. Školska knjiga; 1998.
4. Keros P, Pećina M. Temelji anatomije čovjeka. Medicinska naklada; 1977.
5. Premužić V, Erceg I, Jovanović A, Reiner Ž, Jelaković B. Unos soli u odrasloj populaciji. 2010. Dostupno na: <https://www.semanticscholar.org>. Datum pristupa: 24. srpanj 2021.
6. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, i sur. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol*. 2015.;593(24):5313–24.
7. Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1994.;74(3):416–21.
8. 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. *Microcirc N Y N* 1994. 2009.;16(3):220–34.
9. Zhu J, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on vascular relaxation and oxidative stress in mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res*. 2007.;44(5):382–90.
10. Otto WR, Thim L. Trefoil factor family-interacting proteins. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005.;62(24):2939–46.
11. Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and their Different Roles in the Mucosal Innate Immune Defense and More: An Update. *Curr Med Chem*. 2021.;
12. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*. 2001.;16(1):319–34.

13. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2007.;55(5):505–13.
14. Gött P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet EJHG.* 1996.;4(6):308–15.
15. Braga Emidio N, Brierley SM, Schroeder CI, Muttenthaler M. Structure, Function, and Therapeutic Potential of the Trefoil Factor Family in the Gastrointestinal Tract. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020.;3(4):583–97.
16. Braga Emidio N, Hoffmann W, Brierley SM, Muttenthaler M. Trefoil Factor Family: Unresolved Questions and Clinical Perspectives. *Trends Biochem Sci.* 2019.;44(5):387–90.
17. Braga Emidio N, Meli R, Tran HNT, Baik H, Morisset-Lopez S, Elliott AG, i sur. Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite. *J Med Chem.* 2021.;64(13):9484–95.
18. Xiao L, Liu Y-P, Xiao C-X, Ren J-L, Guleng B. Serum TFF3 may be a pharmacodynamic marker of responses to chemotherapy in gastrointestinal cancers. *BMC Clin Pathol.* 2014.;14:26.
19. Zhang C-X, Wu C-T, Xiao L, Tang S-H. The diagnostic and clinicopathological value of trefoil factor 3 in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem.* 2021.;26(2):95–102.
20. Cui H-Y, Wang S-J, Song F, Cheng X, Nan G, Zhao Y, i sur. CD147 receptor is essential for TFF3-mediated signaling regulating colorectal cancer progression. *Signal Transduct Target Ther.* 2021.;6(1):268.
21. Vocka M, Langer D, Petryl J, Vockova P, Hanus T, Kalousova M, i sur. Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer. *Neoplasma.* 2015.;62(3):470–7.

22. LeSimple P, van Seuning I, Buisine M-P, Copin M-C, Hinz M, Hoffmann W, i sur. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007.;36(3):296–303.
23. Wang X-N, Wang S-J, Pandey V, Chen P, Li Q, Wu Z-S, i sur. Trefoil factor 3 as a novel biomarker to distinguish between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2015.;94(20):e860.
24. Luo W, Tahara S, Kawasaki K, Kobayashi A, Nojima S, Morii E. The expression of trefoil factor 3 is related to histologic subtypes and invasiveness in lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2021.;21(1):63.
25. Belovari T, Bijelić N, Levak MT, Lončar MB. Trefoil factor family peptides TFF1 and TFF3 in the nervous tissues of developing mouse embryo. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015.;15(1):33–7.
26. Schwarz H, Jagla W, Wiede A, Hoffmann W. Ultrastructural co-localization of TFF3-peptide and oxytocin in the neural lobe of the porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* 2001.;305(3):411–6.
27. 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.;115(3):204–8.
28. 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 Off J Microsc Soc Am Microbeam Anal Soc Microsc Soc Can.* 2017.;23(4):818–25.
29. Rösler S, Haase T, Claassen H, Schulze U, Schicht M, Riemann D, i sur. Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2010.;62(3):815–25.
30. Ivančević L. Analiza koštanog i hrskavičnog tkiva u zoni okoštavanja miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom TFF3. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek.

- Faculty of Medicine Osijek; 2019. Dostupno na:
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:304069>. Datum pristupa: 19. kolovoz 2021.
31. Tolušić Levak M, Mihalj M, Koprivčić I, Lovrić I, Novak S, Bijelić N, i sur. Differential Expression of TFF Genes and Proteins in Breast Tumors. *Acta Clin Croat*. 2018.;57(2):264–77.
 32. Bijelić* N, Abramović M, Rajc J, Rođak E, Marušić Z, Levak MT, i sur. Neoadjuvant Chemotherapy Affects TFF3 Peptide Expression in Luminal B Subtype of Breast Cancer – A Pilot Study. *Southeast Eur Med J*. 2020.;4(2):20–7.
 33. 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.;180(3):904–16.
 34. Elnagdy MH, Farouk O, Seleem AK, Nada HA. TFF1 and TFF3 mRNAs Are Higher in Blood from Breast Cancer Patients with Metastatic Disease than Those without. *J Oncol*. 2018.;2018:4793498.
 35. Pandey V, Wu Z-S, Zhang M, Li R, Zhang J, Zhu T, i sur. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. *Breast Cancer Res BCR*. 2014.;16(5):429.
 36. Lau W-H, Pandey V, Kong X, Wang X-N, Wu Z, Zhu T, i sur. Trefoil Factor-3 (TFF3) Stimulates De Novo Angiogenesis in Mammary Carcinoma both Directly and Indirectly via IL-8/CXCR2. *PloS One*. 2015.;10(11):e0141947.
 37. Liu J, Kim SY, Shin S, Jung S-H, Yim S-H, Lee JY, i sur. Overexpression of TFF3 is involved in prostate carcinogenesis via blocking mitochondria-mediated apoptosis. *Exp Mol Med*. 2018.;50(8):110.
 38. Che Y, Shi X, Shi Y, Jiang X, Ai Q, Shi Y, i sur. Exosomes Derived from miR-143-Overexpressing MSCs Inhibit Cell Migration and Invasion in Human Prostate Cancer by Downregulating TFF3. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019.;18:232–44.

39. Abou-Ouf H, Ghosh S, Box A, Palanisamy N, Bismar TA. Combined loss of TFF3 and PTEN is associated with lethal outcome and overall survival in men with prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019.;145(7):1751–9.
40. Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, i sur. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in *Tff3*^{-/-}/*C57BL/6N* Knockout and WT (*C57BL/6N*) Control Mice. *Int J Mol Sci.* 2019.;20(20).
41. Liu SQ, Roberts D, Zhang B, Ren Y, Zhang L-Q, Wu YH. Trefoil Factor 3 as an Endocrine Neuroprotective Factor from the Liver in Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *PLOS ONE.* 2013.;8(10):e77732.
42. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012.;9(7):676–82.
43. Ross-Innes CS, Debiram-Beecham I, O'Donovan M, Walker E, Varghese S, Lao-Sirieix P, i sur. Evaluation of a minimally invasive cell sampling device coupled with assessment of trefoil factor 3 expression for diagnosing Barrett's esophagus: a multi-center case-control study. *PLoS Med.* 2015.;12(1):e1001780.
44. Malta D, Petersen KS, Johnson C, Trieu K, Rae S, Jefferson K, i sur. High sodium intake increases blood pressure and risk of kidney disease. From the Science of Salt: A regularly updated systematic review of salt and health outcomes (August 2016 to March 2017). *J Clin Hypertens Greenwich Conn.* 2018.;20(12):1654–65.
45. Wenstedt EFE, Beugelink L, Schrooten EM, Rademaker E, Rorije NMG, Wouda RD, i sur. High-salt intake affects retinal vascular tortuosity in healthy males: an exploratory randomized cross-over trial. *Sci Rep.* 2021.;11(1):801.
46. Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci.* 2020.;21(12):4535.
47. Dickinson KM, Keogh JB, Clifton PM. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr.* 2009.;89(2):485–90.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Lucija Ivančević, studentica 2. godine, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Datum i mjesto rođenja: 22. svibnja 1996., Osijek

Kućna adresa: S. S. Kranjčevića 28, 31550 Valpovo

Tel. +385953652395

E-mail: lucijaaivancevic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2003. – 2011. Osnovna škola Matije Petra Katančića Valpovo

2011. – 2015. Srednja škola Valpovo, opća gimnazija

2015. – 2019. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2019. – 2021. Medicinski fakultet u Osijeku, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

OSTALE AKTIVNOSTI:

2000. – 2012. trenirala gimnastiku

2012. postala gimnastički sudac

2010. volonter u udruzi osoba s invaliditetom Vjera i svjetlo

2009. članica Hrvatskog Crvenog križa

2013. – 2014. voditelj na Ljetnoj školi mladih Crvenog križa

2018. vozačka dozvola B kategorije

2019. član SRK Baraber extreme team