

# Histomorfološka analiza tkiva bubrega u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3 kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice

---

Aliti, Đilferije

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:152:382098>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Diljferije Aliti**

**HISTOMORFOLOŠKA ANALIZA TKIVA  
BUBREGA U MIŠEVA DIVLJEG TIPA I  
MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM  
*TFF3* KOJIMA JE INDUCIRAN STRES  
ENDOPLAZMATSKE MREŽICE**

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Diljferije Aliti**

**HISTOMORFOLOŠKA ANALIZA TKIVA  
BUBREGA U MIŠEVA DIVLJEG TIPA I  
MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM  
*TFF3* KOJIMA JE INDUCIRAN STRES  
ENDOPLAZMATSKE MREŽICE**

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Bijelić

Rad ima 22 lista, 2 tablice i 4 slike.

## **Predgovor**

Ovaj rad napisan je u svrhu analize histomorfoloških karakteristika tkiva bubrega u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice.

Najprije bih se htjela zahvaliti svom mentoru doc. dr. sc. Nikoli Bijeliću na uloženom trudu i izdvojenom vremenu za izrada ovog završnog rada te med. lab. ing. Danici Matić na pomoći i strpljenju pri izradi preparata.

Neizmjerne hvala mojim roditeljima na njihovom odricanju, ohrabrivanju svakog mog sna i cilja te bezuvjetnoj podršci i ljubavi. Hvala vam što ste moj kamen oslonac.

Hvala mojim sestrama i bratu jer su uvijek spremni poslušati i jer je s njima sve lakše.

Nikako ne mogu zaboraviti i svoje prijatelje koji su sa mnom prolazili kroz sve lijepe i manje lijepe dane studiranja. Hvala vam na pomoći i podršci tijekom studija.

Posebna zahvala ide osobi koja mi je i manje lijepe dane učinila predivnima. Hvala na svakom savjetu, razgovoru i lijepom trenutku.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1.    Bubreg .....	1
1.2.    Tff proteini .....	2
1.3.    Tff proteini u patološkim procesima .....	3
1.4.    Tff3 protein .....	3
1.5.    Stres endoplazmatske mrežice .....	4
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	6
4. MATERIJAL I METODE .....	7
4.1. Ustroj studije.....	7
4.2. Materijal .....	7
4.3. Metode.....	7
4.4. Statističke metode .....	9
5. REZULTATI.....	10
6. RASPRAVA .....	15
7. ZAKLJUČAK .....	17
8. SAŽETAK .....	18
9. SUMMARY .....	19
10. LITERATURA .....	20
11. ŽIVOTOPIS .....	22

## POPIS KRATICA

Akt – protein-kinaza B

ER – endoplazmatski retikulum

ERAD – ER povezana razgradnja (engl. *ER associated degradation*)

KO – miševi s isključenim genom Tff3 (engl. *knockout*)

PAS – perjodna kiselina – Schiff bojanje (engl. *Periodic acid – shiff reaction*)

P13K – fosfatidil-inozitol 3-kinaza

TFF – obitelj trefoil factor proteina (engl. *trefoil factor family*)

TFF3 – *trefoil factor family 3* protein

UPR – odgovor nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response, UPR*)

WT – miševi divljeg tipa (engl. *wild type*)

## 1. UVOD

### 1.1. Bubrezi

Bubrezi su organi smješteni retroperitonealno. Imaju medijalni rub koji je konkavan i kroz koji ulaze krvne i limfne žile i živci, a izlaze žile i mokraćovod te konveksnu lateralnu površinu. Zajedno s mokraćovodom, mokraćnim mjehurom i mokraćnom cijevi čine mokraćni sustav (1).

Na prerezu bubrega može se razlikovati kora i srž. Širina kore je oko 1 cm, a boja kore je bljedosmeđa. Medulu oblikuju isprugane piramide crvene i sivkaste boje. Kora bubrega ulazi i u dio srži pa na taj način odjeljuje piramide. Vršci piramida ili papile strše u male vrčeve nakapnice. Na njima se nalaze otvori kroz koje se izvodni kanalići otvaraju u nakapnicu (2).

Svaki bubrezi sastoji se od 1 do 4 milijuna nefrona, a nefron predstavlja funkcionalnu jedinicu bubrega. Sastoji se od bubrežnog tjelešca, proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića, debelog i tankog kraka Henleove petlje te sabirnih cijevi. Bubrežno tjelešce sastoji se od klupka kapilara koje nazivamo glomerul. Glomerul je okružen Bowmanovom čahuricom koju čini dvostruka stijenka. Visceralni, odnosno unutarnji list čahure, obavija kapilare glomerula dok parijetalni, vanjski list, čini vanjsku granicu glomerula (1). Bubrezi imaju različite uloge u organizmu od kojih je najvažnija filtracija krvi i uklanjanje štetnih tvari iz organizma. Uz to, sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka pomoću enzima kojeg izlučuje, a to je enzim renin. Renin izlučuju stanice jukstaglomerularnog aparata i on je dio renin angiotenzinskog sustava. Također, bubrezi izlučuju i eritropoetin koji regulira stvaranje eritrocita (1).

Proksimalni zavijeni kanalić polazi od mokraćnog pola bubrežnog tjelešca. Obložen je niskim cilindričnim ili kubičnim epitelom koji sadrži četkastu prevlaku koju pak čine brojni mikrovili. Za resorpciju 60 % glomerularnog filtrata odgovoran je proksimalni kanalić jer apsorbira sve aminokiseline i glukozu te 85 % vode i natrijeva klorida te kalcij i fosfat. Proksimalni kanalić se nastavlja na Henleovu petlju, a ona ima ulogu u koncentriranju mokraće te zadržavanju vode u organizmu. Henleova petlja sastoji se od tankog i debelog dijela silaznog kraka te tankog i debelog dijela uzlaznog kraka. Debeli uzlazni krak Henleove petlje ulazi u koru, polako se zavija i postaje distalni zavijeni kanalić. Distalni zavijeni kanalić obložen je jednim slojem kubičnih stanica i razlikuje se od proksimalnog kanalića jer nema četkastu prevlaku ni apikalne kanaliće. U distalnom zavijenom kanaliću vrši se izmjena iona,



apsorbira se natrij i izlučuju se ioni kalija. Distalni kanalići izlučuju u mokraću vodik i amonijeve ione. Sve navedeno djeluje na ukupnu količinu vode i soli u tijelu. Iz distalnih kanalića mokraća odlazi u sabirne cjevčice koje se potom udružuju u veće sabirne cijevi. Manje sabirne cjevčice oblažu kubične stanice koje na putu kroz srž postupno prelaze u cilindrične. Glavna je uloga sabirnih kanala u srži koncentriranje mokraće (1,3)

### 1.2. Tff proteini

Tff1, Tff2 i Tff3 proteini pripadaju obitelji trefoil factor proteina (TFF, engl. *Trefoil Factor Family*). Svi navedeni proteini mali su proteini koji imaju važnu ulogu u različitim tjelesnim sustavima poput mokraćnog, probavnog, dišnog i živčanog sustava. Geni za ova tri proteina nalaze se na dugom kraku 21. kromosoma (4).

Tff proteini najprije su se istraživali u probavnom sustavu jer ih luče vrčaste stanice tog sustava, ali daljnjim istraživanjima uočena je njihova sinteza u različitim stanicama epitela koji luče mucine poput onih u respiratornom sustavu, žlijezdama slinovnicama i uterusu (4,5). Tff proteini imaju središnju ulogu u održavanju cjelovitosti površine epitela kao sastojci sluzi koja pokriva sluznice, a poznati su i po svojim antiapoptotičkim svojstvima (5). Nadalje, potiču stvaranje krvnih žila u tkivu te imaju utjecaj na imunološki sustav (4).

Ekspresija Tff proteina različita je u različitim tkivima. U sluznici želuca najviše su eksprimirani Tff1 i Tff2, a oba proteina mogu se pronaći i u Brunnerovim žlijezdama. Tff1 protein također se nalazi i u ljudskoj konjunktivi. Za razliku od navedena dva proteina, Tff3 ima izrazito različitu lokalizaciju. Njegova ekspresija u probavnom sustavu vrlo je slaba, ali se može pronaći u ostalim epitelima koji luče mucine u kojima nema Tff1 i Tff2 proteina. Na primjer Tff3 protein jako je eksprimiran u vrčastim stanicama crijeva, a Tff2 gotovo uopće nije eksprimiran. Tff3 također se nalazi i u ljudskoj maternici gdje se većinom otpušta iz površinskog epitela (4,5).

### 1.3. Tff proteini u patološkim procesima

Tff proteini i njihova uloga istraživani su u različitim patološkim procesima. U probavnom sustavu uočena je izmijenjena ekspresija Tff proteina u karcinomu želuca, debelog crijeva i upalnim bolestima crijeva. U nekim slučajevima smatra se da imaju zaštitnu ulogu (Tff2 pomaže u cijeljenju želučane sluznice), a u drugim da potiču širenje malignih promjena (Tff1 doprinosi nastanku karcinoma debelog crijeva). Dugo je istraživana i povezanost Tff proteina s tumorom dojke. Prisutnost Tff3 proteina, čija je ekspresija potaknuta estrogenom, upućuje na veću sklonost stvaranju metastaza zbog povećavanja invazivnosti i proliferacije tumorskih stanica dojke. Blokiranje aktivnosti Tff3 proteina dovodi do povećanja apoptoze i sporijeg rasta tumora. Povećana koncentracija Tff proteina uočena je i u plazmi bolesnika s karcinomom prostate (4).

### 1.4. Tff3 protein

Tff3 protein član je obitelji trefoil factor proteina i tipični je sekretorni produkt epitela sluznice (6,7). Njegova dominantna ekspresija je u vrčastim stanicama crijeva, ali eksprimiran je i u žlijezdama slinovnicama, jednjaku, respiratornom traktu, maternici, vagini, mokraćnom sustavu i konjunktivi (6). Pored svega navedenog, Tff3 protein eksprimiran je i u endokrinom dijelu gušterače, središnjem živčanom sustavu te ima utjecaj i na imunološki sustav (6,8).

Tff proteini pojačavaju crijevnu barijeru, a neki od načina dobro su razjašnjeni te uključuju djelovanje Tff3 proteina i Toll-like receptora 2 na P13K/Akt signalni put. U miševa kojima je onespособljen gen za Tff3 protein narušena je mogućnost cijeljenja sluznice debelog crijeva (4).

Tff3 protein smješten je u Langerhansovim otočićima gdje njegova ekspresija potiče proliferaciju beta-stanica (4,9). Smješten je u stanicama koje luče inzulin i glukagon, čija razina u krvi može utjecati na razinu Tff3 proteina (4).

U mokraćnom sustavu, najizraženija ekspresija Tff3 proteina je u tkivu bubrega. Smatra se da Tff3 i Tff2 pomažu u procesu cijeljenja oštećenja epitela bubrežnih kanalića. Također, brojna istraživanja pokazala su da Tff proteini imaju ulogu u patologiji mokraćnog sustava. Značajna je i uloga u poticanju invazivnosti stanica karcinoma bubrega, a *Tff3* nalazi se među genima

koji su eksprimirani u karcinomu bubrega potaknutom oksidativnim stresom. Povišenu razinu Tff3 u urinu i krvi nalazimo u kroničnim bubrežnim bolestima, a brojne su studije pokazale povezanost povišene razine sa smrtnošću od bubrežnih bolesti (4).

### 1.5. Stres endoplazmatske mrežice

Endoplazmatski retikulum (ER) je intracelularni organel različitih funkcija. Regulira homeostazu proteina, pridonosi skladištenju i regulaciji kalcija, sintezi i skladištenju lipida i metabolizmu glukoze (10). Regulaciju homeostaze proteina obavlja različitim mehanizmima poput smatanja, transporta, modifikacije i degradacije proteina. Kako bi se proteini pravilno smotali, pomažu im šaperoni, a u modificiranju im pomažu enzimi iz skupina izomeraza, transferaza, oksidoreduktaza (11). ER osigurava da se samo pravilno smotani proteini pošalju na određeno mjesto djelovanja jer pogrešno smotani proteini potencijalno štetno djeluju na stanicu te ih je bitno strogo kontrolirati. Pogrešno smatanje proteina događa se neprestano pa je ER razvio sustav kontrole kvalitete koji mu pruža mogućnosti popravka pogrešno smotanih proteina ili u krajnjem slučaju eliminaciju tih proteina procesom koji nazivamo degradacija povezana s ER (engl. *ER associated degradation*, ERAD) (10).

U slučaju pojačane sinteze proteina i poremećaja njihove degradacije, zbog različitih endogenih ili egzogenih faktora (upala, hipoksija, suficit ili deficit nutrijenata itd.), dolazi do nakupljanja pogrešno smotanih proteina zbog smanjene efikasnosti ER-a i njegove mogućnosti da pravilno smota proteine. Ti se proteini nakupljaju u lumenu gdje izazivaju stres ER-a. Nakon što se izazove stres ER-a, aktivira se poseban mehanizam kojim stanica pokušava smanjiti stres i ponovno uspostaviti homeostazu. Taj mehanizam nazivamo odgovor nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*, UPR). UPR čine signalni putevi kojima se prikupljaju informacije iz lumena ER-a i prenose u citoplazmu i jezgru stanice kako bi se povećao kapacitet endoplazmatskog retikuluma za smatanje proteina, a ukoliko to bude neuspješno, UPR vodi stanicu u apoptozu (11).

## 2. HIPOTEZA

Nakon izazivanja stresa endoplazmatske mrežice, histomorfološka obilježja bubrega miševa s isključenim genom *Tff3* razlikuju se od miševa divljeg tipa.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) usporediti površinu presjeka glomerula miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice
- 2) usporediti visinu epitela i promjer lumena kanalića miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice
- 3) usporediti promjer kanalića u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice

### 4. MATERIJAL I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao presječna studija u kojoj su se koristili uzorci mišjih bubrega iz arhiva Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

#### 4.2. Materijal

Za istraživanje su korišteni histološki preparati bubrega miševa divljeg tipa i onih s isključenim genom *Tff3* kojima je tunikamicinom induciran stres endoplazmatske mrežice 24 h prije žrtvovanja. Miševi su uzgojeni na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu i žrtvovani u sklopu HRZZ projekta „Tff3 protein na raskrižju metabolizma i neurodegeneracije“ (Šifra 2717, akronim „Inter MeNe-3“, voditeljica prof. dr. sc. Mirela Baus Lončar) te je projekt dobio odobrenje nadležnog etičkog povjerenstva (HR-POK-003). Prikupljeni organi fiksirani su u 4 %-tnom paraformaldehidu i uklopljeni u parafinske blokove standardnim parafinskim postupkom te pohranjeni u arhivu Zavoda. Istraživanje na arhivskom materijalu odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (Ur. broj 2158-61-07-20-59).

#### 4.3. Metode

Fiksirani bubrezi uklopljeni su u parafinske blokove te su izrezani rotacijskim mikrotomom CUT 4060 marke Slee (Mainz, Njemačka) na rezove debljine 5-6  $\mu\text{m}$ . Rezovi su nakon rezanja nanoseni na predmetna stakalca i obojeni pomoću PAS metode (engl. *Periodic acid – shiff reaction*).

Otopine za bojenje PAS metodom:

1. 0,5 %-na vodena otopina perjodne kiseline
- otopiti 0,5 g perjodne kiseline u 100 mL destilirane vode

## 4. MATERIJAL I METODE

### 2. Shiff-ov reagens

- otopiti 1,0 g bazičnog fuksina (pararosalina) u 200 mL vruće destilirane vode (dok ne prokuha)
- ohladiti na 50 °C i dodati 20,0 ml u 36,5 g HCl (hladiti dalje i dodati 1,0 g Na-metabisulfita)
- spremi u hladnjak na tamno 48 sati, dok otopina ne dobije slamnatožutu boju
- dodati 5 g aktivnog drvenog ugljena, miješati i filtrirati nekoliko puta dok otopina ne bude bistra

Bistri filtrat je Schiff-ov reagens.

Postupak bojenja PAS metodom:

1. deparafinirati rezove i provesti kroz alkohole do destilirane vode
2. 0,5 %-na perjodna kiselina 5 min
3. isprati dobro nekoliko puta u destiliranoj vodi
4. Schiff-ov reagens 15 min
5. isprati u tekućoj vodi (mlaka voda) 5-10 min
6. bojati jezgre Mayer-ovim hematoksilinom
7. isprati u tekućoj vodi
8. apsolutni alkohol, Xylol i Canada balsam

Na ovaj način, PAS bojenjem, jezgre su obojene plavo, a glikogen i drugi ugljikohidrati grimiznoljubičasto jer reagiraju s perjodnom kiselinom.

Digitalne fotografije kore i srži bubrega načinjene su digitalnim fotoaparatom marke Olympus®, model C-5050, spojenim na mikroskop marke Olympus®, model BX-50 uz pomoć računalnog programa QuickPHOTO Pro (Promicra s.r.o, Prag, Republika Češka). Ukupno je načinjeno 5 fotografija kore i 3 fotografije srži za svaki preparat odnosno životinju, osim za jedan bubreg, za koji su učinjene samo fotografije kore zbog artefakta preparata. Na svakoj dobivenoj fotografiji izmjerene su zadane strukture u kori i srži bubrega te su iz dobivenih vrijednosti izračunate aritmetičke sredine mjerenja za svaku mjerenu strukturu koje

## 4. MATERIJAL I METODE

su korištene u daljnjoj statističkoj analizi. Mjerenja su izvršena u računalnom programu FIJI (FIJI is Just ImageJ) (12).

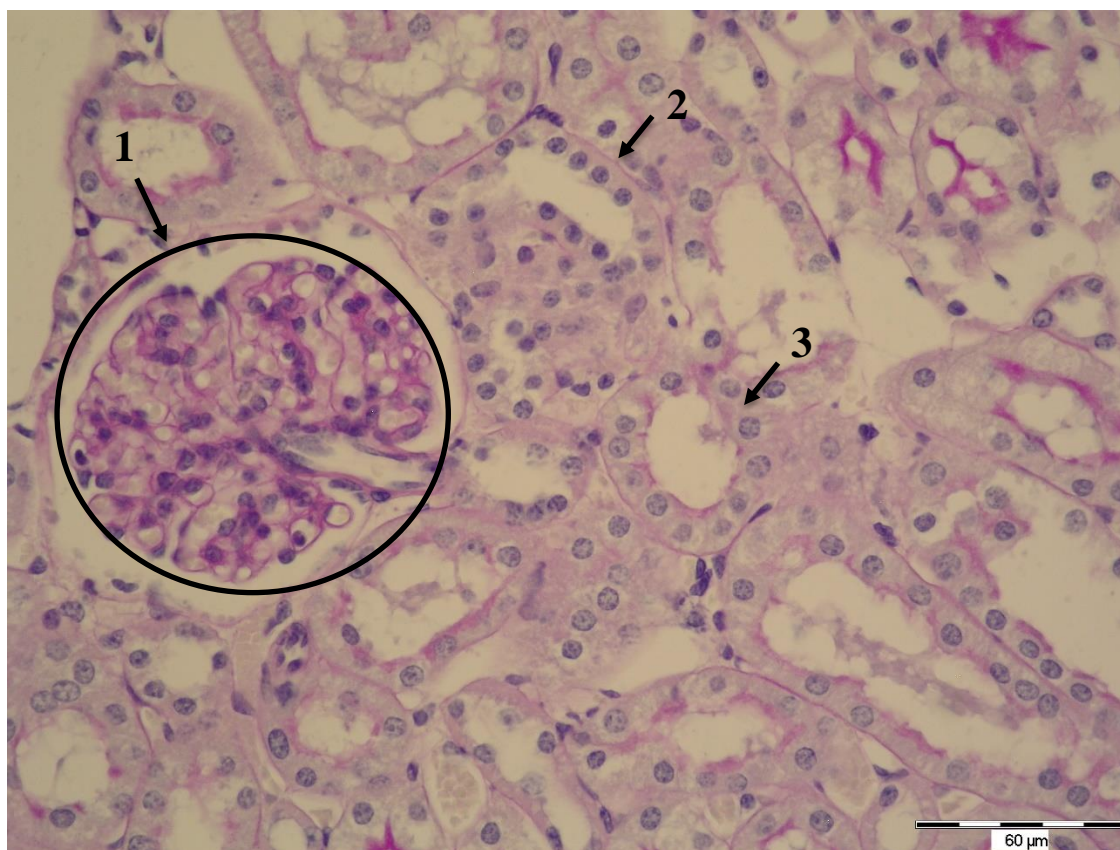
### 4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U testom za nezavisne uzorke. Sve  $P$  vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je program MedCalc Statistical Software verzija 18 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>;2019).

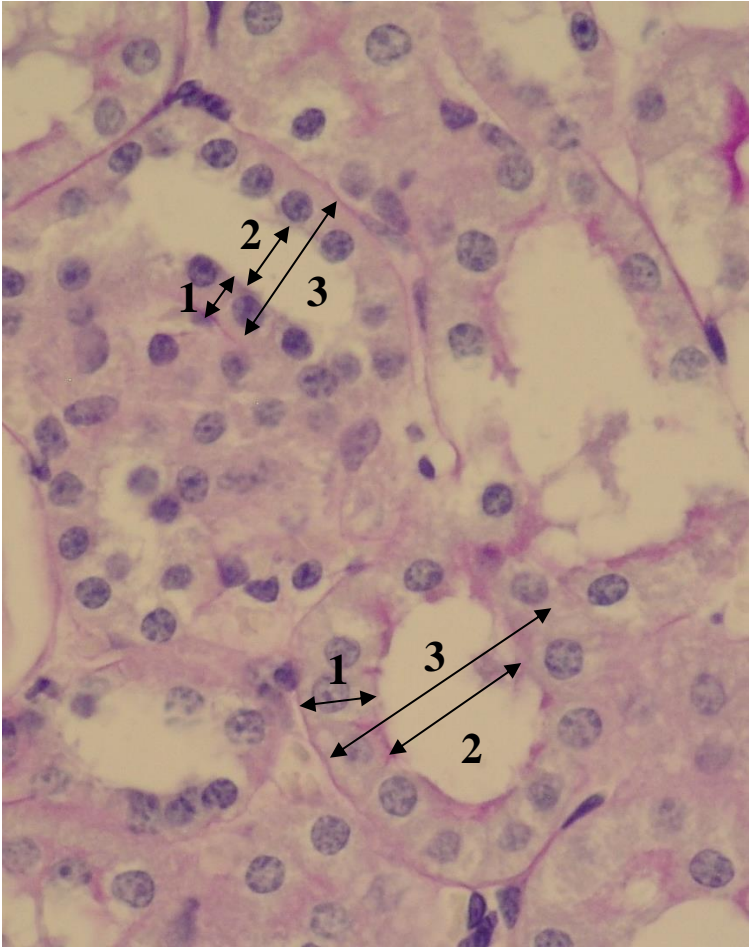


## 5. REZULTATI

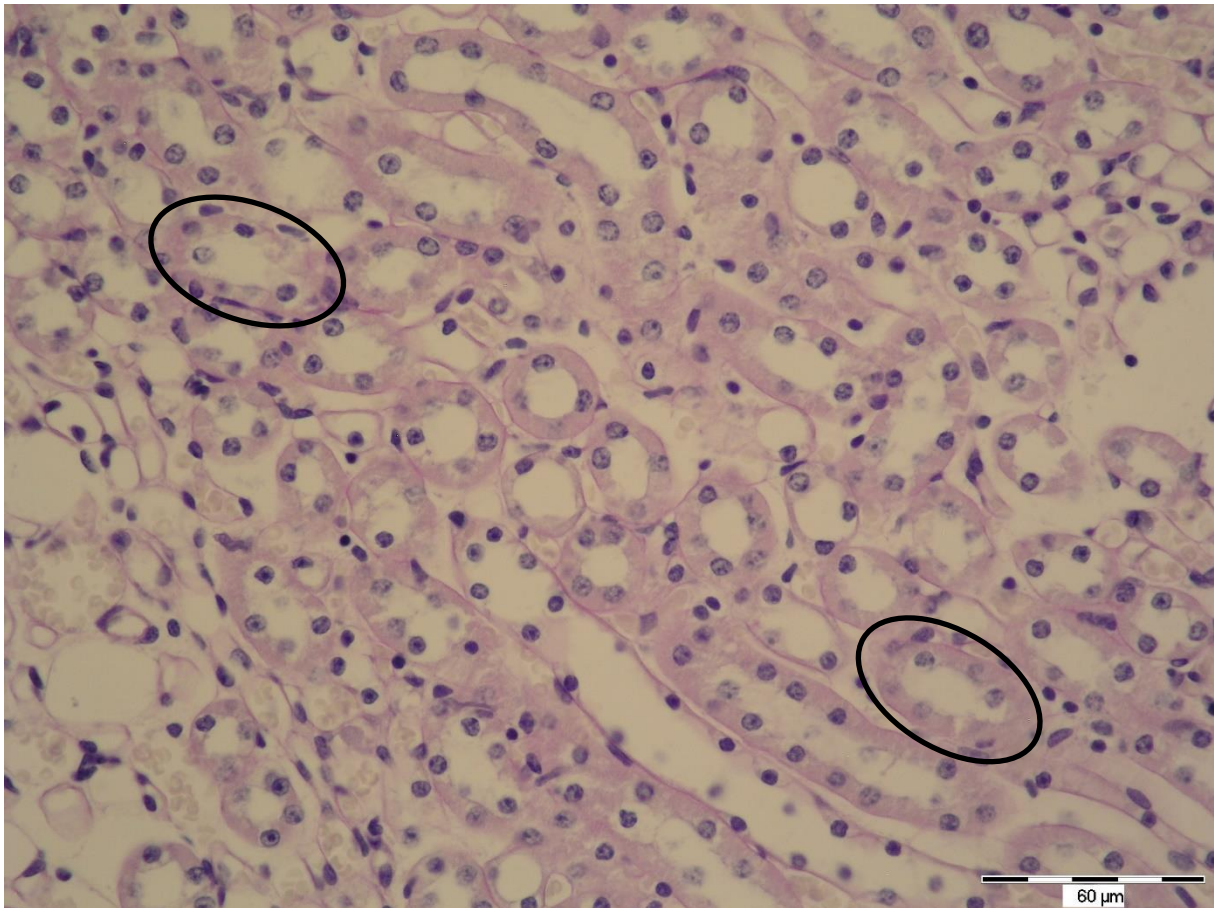
Kako bi se ispitalo postoji li razlika u histomorfološkim obilježjima miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice, analizirano je 5 uzoraka iz svake skupine miševa. Uzorci su obojeni PAS metodom. Morfološkim pregledom preparata nisu uočena veća oštećenja struktura kore i srži, osim mjestimične vakuolizacije i oštećenja apikalne površine stanice proksimalnih zavijenih kanalića te mjestimičnih oštećenja apikalnih dijelova stanica sabirnih cijevi. Stupanj oštećenja nije se razlikovao između skupina. U kori bubrega promatralo se postoji li razlika u površini glomerula, promjeru, visini stanica i promjeru lumena proksimalnih i distalnih kanalića, dok se u srži promatralo postoji li razlika u promjeru, visini stanica i promjeru lumena sabirnih cijevi. Mjerene strukture kore i srži bubrega prikazane su na slikama 1 – 3.



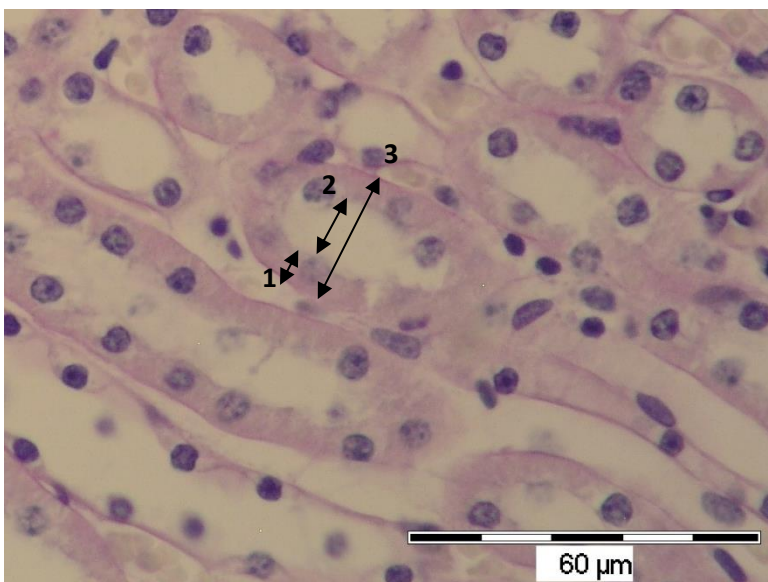
Slika 1. Kora bubrega miša s isključenim genom *Tff3* kojemu je induciran stres endoplazmatske mrežice u kojoj je vidljiv glomerul (1), distalni kanalić (2) i proksimalni kanalić (3). Mjerilo: 60 μm (fotografirala autorica).



Slika 2. Kora bubrega miša s isključenim genom *Tff3* kojemu je induciran stres endoplazmatske mrežice u kojoj su vidljivi mjereni parametri: visina epitela (1), promjer lumena (2), promjer kanalića (3); gore lijevo strelice i brojevi označavaju mjerenja distalnog, a dolje desno proksimalnog zavijenog kanalića (fotografirala autorica, isječak iz sredine slike 1).



Slika 3. Srž bubrega divljeg tipa miša u kojoj su vidljivi (označeno kružićem) sabirni kanalići. Mjerilo: 60 μm (fotografirala autorica).



Slika 4. Kora srži divljeg tipa miša u kojoj su vidljivi mjereni parametri: visina epitela (1), promjer lumena (2), promjer kanalića (3) (fotografirala autorica, isječak iz desnog kuta slike 3).

## 5. REZULTATI

Izmjerene vrijednosti za mjerene strukture u kori bubrega obje skupine miševa prikazane su u tablici 1, za one u srži u tablici 2, a sve su vrijednosti prikazane u obliku medijana i interkvartilnog raspona.

Tablica 1. Rezultati mjerenja struktura kore bubrega miševa divljeg tipa i onih s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice.

KORA	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Divlji tip	Miševi s isključenim genom <i>Tff3</i>	
Površina glomerula ( $\mu\text{m}^2$ )	3919,44 (3468,68 – 4312,39)	4647,22 (4509,10 – 5011,69)	0,06
Promjer proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	37,62 (36,36 – 40,18)	40,66 (38,58 – 40,93)	0,30
Visina epitela proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	11,16 (10,43 – 12,24)	13,33 (12,35 – 13,90)	0,06
Promjer lumena proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	11,48 (11,07 – 11,99)	11,36 (8,20 – 13,24)	> 0,95
Promjer distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	24,62 (22,31 – 25,23)	23,28 (21,98 – 26,49)	> 0,95
Visina epitela distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	6,61 (6,21 – 6,93)	6,98 (6,48 – 8,56)	0,42
Promjer lumena distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	9,03 (8,51 – 9,79)	9,55 (7,45 – 10,73)	> 0,95
*Mann-Whitney U test			

Obradom statističkih podataka Mann-Whitneyjevim testom i pregledom svih dobivenih *P* vrijednosti, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u površini presjeka glomerula, visini epitela i promjeru lumena, kako proksimalnog tako i distalnog kanalića u kori bubrega niti razlika u promjeru proksimalnog i distalnog kanalića miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice, iako je *P* vrijednost za površinu glomerula i visinu epitela proksimalnog kanalića bila granična (tablica 1).

## 5. REZULTATI

Tablica 2. Rezultati mjerenja struktura srži bubrega miševa divljeg tipa i onih s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice.

SRŽ	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Divlji tip	Miševi s isključenim genom <i>Tff3</i>	
Mjerena vrijednost			
Promjer sabirnih kanalića (μm)	23,73 (22,26 – 25,55)	23,27 (22,82 – 23,45)	> 0,95
Visina epitela sabirnih kanalića (μm)	5,66 (5,48 – 6,00)	5,6953 (5,57 – 5,91)	0,90
Promjer lumena sabirnih kanalića (μm)	13,02 (11,86 – 14,12)	11,3543 (11,30 – 12,00)	0,06
*Mann-Whitney U test			

Obradom statističkih podataka Mann-Whitneyjevim testom i pregledom svih dobivenih *P* vrijednosti, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u visini epitela sabirnog kanalića, promjeru lumena sabirnih kanalića, a ni promjeru samog kanalića u srži bubrega miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice iako je *P* vrijednost za promjer lumena sabirnih kanalića bila granična (tablica 2).

## 6. RASPRAVA

Tff3 protein najjače je izražen Tff protein u bubrežima, a i istraživanja pokazuju da pomaže u procesu oporavka epitelnih oštećenja bubrežnih kanalića (4). Provedbom ovog istraživanja nije uočena statistički značajna razlika u histomorfološkim obilježjima bubrega divljeg tipa miševa i onih kojima je isključen *Tff3* gen te izazvan stres endoplazmatske mrežice tunikamicinom. Nakon tretmana tunikamicinom i žrtvovanja životinja 24 h nakon tretmana, izgled kanalića kore i srži u skladu je s očekivanim.

Iz rezultata je vidljivo da se reakcija na stres ER-a u smislu morfološkog izgleda bubrežnog tkiva ne razlikuje u WT i KO miševa. To upućuje na zaključak da nedostatak Tff3 proteina ne utječe bitno na stanične mehanizme koji su odgovorni za promjene nakon stresa endoplazmatskog retikuluma. S druge strane, ovo istraživanje bilo je prvenstveno morfološkog karaktera, stoga se detaljniji uvid u stanične mehanizme može dobiti daljnjim istraživanjima.

Ranije provedena istraživanja pokazala su da stres endoplazmatskog retikuluma pridonosi tubularnim i glomerularnim oštećenjima u bubrežnim bolestima. Dokazano je da nakon injekcije tunikamicina miševi razvijaju akutnu nekrozu bubrežnih tubula, a tunikamicin je induktor stresa ER-a na koji su stanice tubula posebno osjetljive. Tunikamicin remeti glikozilaciju proteina u ER i uzrokuje stres endoplazmatskog retikuluma (13).

Iako je dokazano da stres ER-a pridonosi oštećenjima bubrega i da Tff3 protein sudjeluje u obnovi oštećenog epitela, do sada nije istraženo utječe li isključenje gena za Tff3 protein u miševa na histomorfološke karakteristike bubrežnog tkiva nakon tunikamicinom induciranog stresa ER-a. Premda u ovom istraživanju nije uočena statistički značajna razlika u histomorfološkim obilježjima bubrega između WT miševa i KO miševa, treba uzeti u obzir da je analiza izvršena na uzorcima miševa žrtvovanih 24 h nakon induciranja stresa. Neka druga istraživanja koristila su razdoblje od 72 h nakon stresa ER-a za uzimanje uzoraka (14). Moguće je da bi u slučaju duljeg djelovanja tunikamicina došlo do značajnijih razlika, pogotovo kad se uzme u obzir da su neke vrijednosti bile granične ( $P = 0,06$ ). Granično veće vrijednosti visine epitela proksimalnih kanalića, odnosno manje vrijednosti promjera lumena sabirnih cijevi, mogle bi upućivati na protektivni učinak isključenja gena *Tff3*, stoga su daljnja istraživanja potrebna kako bi se dodatno razjasnilo je li doista tako.

Istraživanja na miševima s isključenim genom *Tff3* pokazala su da nedostatak tog gena nema značajan utjecaj na akutni odgovor stanica jetre na stres ER-a, no da je izražaj nekih proinflammatornih gena nakon stresa ER-a smanjen u miševa s isključenim genom *Tff3* (15). Buduća istraživanja trebala bi pokazati događa li se nešto slično i u tkivu bubrega i bi li oštećenja u kanalicićima bila manje izražena na većem uzorku i nakon duljeg vremena izloženosti tunikamicinu.

### 7. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem došli smo do sljedećih zaključaka:

- 1) Površina presjeka glomerula miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice ne razlikuje se značajno.
- 2) Visina epitela i promjer lumena kanalića miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice ne razlikuje se značajno.
- 3) Promjer kanalića u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice ne razlikuje se značajno.



### 8. SAŽETAK

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA:** Cilj ovog istraživanja uspoređivanje je različitih morfoloških karakteristika bubrežnog tkiva između miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice.

**USTROJ STUDIJE:** Istraživanje je provedeno kao presječna studija u kojoj su se koristili uzorci mišjih bubrega iz arhiva Zavoda za histologiju i embriologiju.

**MATERIJAL I METODE:** Za istraživanje su korišteni histološki preparati bubrega miševa divljeg tipa i onih s isključenim genom *Tff3* kojima je tunikamicinom induciran stres endoplazmatske mrežice 24h prije žrtvovanja. Preparati su bojani PAS metodom. Korišteno je 5 miševa iz svake skupine i načinjeno 5 fotografija kore i 3 fotografije srži za svaku životinju na kojoj su mjerene vrijednosti površine presjeka glomerula, promjera kanalića, visine epitela kanalića i promjera lumena kanalića.

**REZULTATI:** Nije bilo statistički značajne razlike u površini presjeka glomerula, promjeru kanalića niti u visini epitela i promjeru lumena kanalića miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice.

**ZAKLJUČAK:** Ne postoje značajne razlike u ispitivanim morfološkim obilježjima tkiva bubrega u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* kojima je induciran stres endoplazmatske mrežice. Nedostatak *Tff3* proteina ne utječe značajno na odgovor stanica bubrega na stres endoplazmatske mrežice.

**KLJUČNE RIJEČI:** bubreg; stres endoplazmatske mrežice; *Tff3*; glomerul; promjer kanalića

### 9. SUMMARY

#### **Histomorphological analysis of kidney tissue of wild-type and *Tff3* knock-out mice with induced endoplasmic reticulum stress**

**OBJECTIVES:** The objective of this study was to compare different morphological characteristics of kidney tissue between wild-type mice and *Tff3* knock-out mice with induced endoplasmic reticulum stress.

**STUDY DESIGN:** This research was done as a cross-sectional study using mouse kidney samples from the archives of the Department for Histology and Embryology.

**MATERIAL AND METHODS:** Histological samples of the kidneys of wild-type mice and *Tff3* knock-out mice with tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress 24 h before sacrifice were used for this study. The samples were stained with the PAS method. 5 mice from each group were used for the study and 5 pictures of the medulla and 3 pictures of the cortex for each animal were taken on which values of glomerular area, tubular diameter, tubular cell height and tubular lumen diameter were measured.

**RESULTS:** There weren't any significant differences in the glomerular area, tubular diameter, tubular cell height and tubular lumen diameter between wild-type mice and *Tff3* knock-out mice with induced endoplasmic reticulum stress.

**CONCLUSION:** There are no significant differences in examined morphological characteristics of kidney tissue between wild-type mice and *Tff3* knock-out mice with induced endoplasmic reticulum stress. *Tff3* protein deficiency does not affect cellular mechanisms responsible for changes after endoplasmic reticulum stress.

**KEYWORDS.** kidney; endoplasmic reticulum stress; *Tff3*; glomerulus; tubular diameter

### 10. LITERATURA

1. Junqueira LC, Camerio J. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga;1995.
2. Ivanda M. Onkocitni tumori bubrega [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2019 [pristupljeno 26.08.2020.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:830279>
3. Mateljan I. Patohistološke karakteristike svijetlostaničnog i papilarnog karcinoma bubrega u pacijenata liječenih u KBC-u Split u razdoblju 2002. - 2011. godine [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2015 [pristupljeno 24.08.2020.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:281165>
4. Bijelić N. Smještaj Tff1 i Tff3 proteina u različitim stadijima razvoja mišjeg zametka [Disertacija]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2017 [pristupljeno 24.08.2020.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:5>
5. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol.* 2001.;16(1):319–34.
6. Fu T, Znalesniak EB, Kalinski T, Möhle L, Biswas A, Salm F, i ostali. TFF Peptides Play a Role in the Immune Response Following Oral Infection of Mice with *Toxoplasma Gondii*. *Eur J Microbiol Immunol.* 2015.;5(3):221–31.
7. Kjellef S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2009.;66(8):1350–69.
8. Jackerott M, Lee YC, Møllgård K, Kofod H, Jensen J, Rohleder S, i ostali. Trefoil factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: differential regulation by growth hormone. *Endocrinology.* 2006.;147(12):5752–9.
9. Fueger PT, Schisler JC, Lu D, Babu DA, Mirmira RG, Newgard CB, i ostali. Trefoil Factor 3 Stimulates Human and Rodent Pancreatic Islet  $\beta$ -Cell Replication with Retention of Function. *Mol Endocrinol.* 2008.;22(5):1251–9.
10. Almanza A, Carlesso A, Chintia C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, i ostali. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 2019.;286(2):241–78.

11. Bašić M. Utjecaj stresa endoplazmatskog retikuluma na ekspresiju citokina IL-1beta, IL-6, IL-10 i TGF-beta u jetri miša [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2019 [citirano 26. kolovoz 2020.]. Dostupno na:  
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:685671>
12. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i ostali. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
13. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2009.;112(1):e1-9
14. Liu X, Zhang R, Huang L, Zheng Z, Vlassara H, Striker G, i ostali. Excessive Oxidative Stress Contributes to Increased Acute ER Stress Kidney Injury in Aged Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 28. siječanj 2019. [citirano 02. rujan 2020.]. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369482/>
15. Šešelja K, Bazina I, Wess J, Schicht M, Paulsen F, Bijelić N, i ostali. Effect of Tff3 Deficiency and ER Stress in the Liver. *Int J Mol Sci*. 2019.;20(18)

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Điljferije Aliti

Datum i mjesto rođenja: 4. 6. 1998., Osijek

Adresa stanovanja: Županijska 40, Osijek

Kontakt: +385 95 544 3300

E-mail: alitidiljferije@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2005. – 2013. Osnovna škola Svete Ane u Osijeku

2013. – 2017. II. gimnazija Osijek

2017. – 2020. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika