

# Utjecaj kratkotrajne konzumacije NaCl na vaskularnu proizvodnju NO u modelu TFF3-/- /C57BL/6N miševa

---

Ezgeta, Ivana

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:152:100876>

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**

**Ivana Ezgeta**

**UTJECAJ KRATKOTRAJNE**

**KONZUMACIJE NaCl NA**

**VASKULARNU PROIZVODNJU DUŠIK**

**OKSIDA (NO) U MODELU TFF3-/-**

**/C57BL/6N MIŠEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Ivana Ezgeta**

**UTJECAJ KRATKOTRAJNE**

**KONZUMACIJE NaCl NA**

**VASKULARNU PROIZVODNJU DUŠIK**

**OKSIDA (NO) U MODELU TFF3-/-**

**/C57BL/6N MIŠEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Ines Drenjančević

Rad ima 30 listova i 4 slike.

1. UVOD.....	1
1.1. Obitelj Trefoil faktora (TFF).....	1
1.1.2. Trefoil čimbenik 3 (TFF3).....	1
1.1.3. Transgenični TFF3 <sup>-/-</sup> /C57BL/6N (TFF3 <sup>-/-</sup> ) miševi.....	1
1.2. Dušikov oksid, njegova funkcija i utjecaj na mehanizam vazodilatacije.....	2
1.2.1. Dušik oksid i oksidativni stres.....	2
1.3. Oksidativni stres, kisikovi radikali i njihov učinak na organizam.....	3
1.4. Utjecaj povećane konzumacije NaCl na organizam.....	3
2. HIPOTEZA.....	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Eksperimentalni životinjski modeli.....	8
4.2. Provođenje prehrane s povećanim ili niskim udjelom soli.....	8
4.3. Postupak izolacije i stimulacije karotidne arterije.....	9
4.4. Evaluacija razine NO u karotidnim arterijama koristeći fluorescentni mikroskop.....	10
4.5. Statističke metode.....	10
5. REZULTATI.....	11
6. RASPRAVA.....	14
7. ZAKLJUČAK.....	17
8. SAŽETAK.....	18
9. SUMMARY.....	19
10. LITERATURA.....	20

11. ŽIVOTOPIS.....	24
--------------------	----

## KRATICE

---

ACh – acetilkolin (prema engl. *acetylcholine*)

BP - krvni tlak (prema engl. *blood pressure*)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

EPC - endotelne progenitorske stanice (prema engl. *endothelial progenitor cell*)

FID – dilacija uzrokovana protokom (prema engl. *flow induced dilation*)

GI - gastrointestinalni trakt

MUFA - mononezasićene masne kiseline (prema engl. *monounsaturated fatty acid*)

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (prema engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NO - dušik oksid (prema engl. *nitric oxide*)

NOS - dušik oksid sintaza (prema engl. *nitric oxide synthase*)

PUFA - polinezasićene masne kiseline (prema engl. *polyunsaturated fatty acid*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (prema engl. *reactive oxygen species*)

sGC - topljiva gvanilat ciklaza (prema engl. *soluble guanylate cyclase*)

TFF - obitelj trefoil faktor (prema engl. *trefoil factor family*)

TFF 1 / 2 / 3 -trefoil faktor 1 / 2 / 3 (prema engl. *trefoil factor family1/2/3*)

TGF - transformirajući faktor rasta (prema engl. *transforming growth factor beta*)

UH - ugljikohidrati

WT miševi - divlji tip miševa (prema engl. *wild type mice*)

## 1. UVOD

### 1.1. Obitelj Trefoil faktora (TFF)

Obitelj trefoil faktora (prema engl. *Trefoil factor family*, TFF) je grupa peptida koji sadrže jednu ili dvije trefoilske domene (1). TFF uključuje TFF1- peptid povezan s rakom dojke, TFF2 (SP ili spazmolitički polipeptid) i TFF3 (intestinalni trefoil faktor, tj. ITF) koji se nalaze na 21.kromosomu. Sva tri faktora općenito se dominantno izražavaju u gastrointestinalnom (GI) traktu. Međutim, njihova mRNA pronađena je i u mozgu, plućima, štitnjači, prostati, maternici, te se može zaključiti da postoji njihova opća važnost u održavanju homeostaze organizma (2).

Dokazano je da TFF imaju značajnu ulogu u restituciji te je u više studija promatrana uloga TFF u migraciji stanica, najčešće kao odgovor na oštećeni epitel, sa svrhom održavanja neprekidnosti epitela (2,3). Postoje dokazi koji ukazuju i na ključne uloge TFF-a u onkogenoj transformaciji, rastu i metastazi tumora. Tako su, na primjer, TFF1 i TFF3 već korišteni kao markeri za otkrivanje metastatskih stanica karcinoma dojke i koriste se kao prognostički čimbenici za rak želudca, prostate i rektalni karcinom (4).

Istraživanja provedena na miševima s genetičkom delecijom TFF-ova pokazuju da njihov nedostatak može imati određene posljedice na organizam, pa tako TFF1 null miševi pokazuju želučanu hiperproliferaciju i stvaranje adenoma, TFF2 null miševi izgledaju normalno, ali pokazuju povećanu sekreciju kiseline i podložni su ozljedama nesteroidnih protuupalnih lijekova, a TFF3 null miševi također se čine normalnima, ali su fatalno podložni oštećenju crijeva (2,3).

#### 1.1.2. Trefoil faktor 3 (TFF3)

TFF3 je peptid od 59 aminokiselina, izgleda nalik na djetelinu (5). Neke od funkcija TFF3 su zaštite sluznice te uloge u procesima cijeljenja, imunosnom odgovoru i apoptozi (6,7). Dokazano je i da TFF3 iz jetre ima neuroprotektivni i kardioprotektivni učinak (8). Također se navodi da djeluje kao onkogen, potičući staničnu proliferaciju i invaziju i povećavajući onkogenost stanica mliječne žlijezde, želudca i prostate (4). TFF3 se sve više istražuje u smislu njegove uloge u metabolizmu. Tako je, na primjer, TFF3 jedan od najteže pogođenih gena jetre kod ranog dijabetesa i masne jetre u glodavaca (9). U slučaju njegovog nedostatka, dolazi do promjene profila i akumulacije masnih kiselina u jetri, bez očitog povećanja oksidacijskog stresa, iako se izražaj/aktivnost promatranih enzima mijenja. Zbog snažne



regulacije jetrenog TFF3 kod dijabetičnih/pretilih glodavaca te njegove prisutnosti u cirkulaciji i regulaciji putem hrane/inzulina, TFF3 predstavlja zanimljivog kandidata za istraživanje metaboličkih stanja (2). U smislu istraživanja metabolizma, nedavno je dokazano da nakupljanje triglicerida u jetri ne uzrokuje stanično oštećenje samo po sebi, već su slobodne masne kiseline ili njihovi metaboliti primarno odgovorni za ozljede jetre uslijed povećanog oksidativnog stresa. Pojačan izražaj gena za TFF3 primijećen je u kasnoj fazi odgovora stanica na oksidativni stres (na modelu TFF3<sup>-/-</sup>; protein: TFF3 deficit) (9).

### 1.1.3. Transgenični TFF3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N (TFF3<sup>-/-</sup>) miševi

Uzimajući u obzir izražaj TFF3 u različitim tkivima i prethodno navedene brojne biološke uloge, poželjno je imati kontrolirani model kako bi se mogla razjasniti njegova specifična uloga u različitim dijelovima organizma. Novi kongenični soj TFF3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N (TFF3<sup>-/-</sup>) generiran je s ciljem razvoja TFF3<sup>-/-</sup> mišjeg soja bez dodatnih relevantnih mutacija u svrhu procjene utjecaja nedostatka TFF3 na gene povezane s određenim bolestima (pretežno u jetri, kao glavnom metaboličkom organu) (8).

## 1.2. Dušik oksid, njegova funkcija i utjecaj na mehanizam vazodilatacije

Dušikov oksid (NO) je endogeno formirani radikal koji sudjeluje u prijenosu signala. Nastaje iz aminokiseline L-arginina uz djelovanje dušik oksid sinteza (NOS). Neki od najvažnijih učinaka NO na vaskularni sustav potencijalno su vazoprotektivni, jer održavaju važne fiziološke funkcije kao što su: izravna vazodilatacija (ovisna o protoku i receptorima, indirektna vazodilatacija, antitrombotski učinak, protuupalni učinak, anti-proliferativni učinak. Njegova je vjerojatno najvažnija uloga ona vazodilatatora (11). Zbog svih navedenih uloga u slučaju smanjenja proizvodnje NO ili smanjenja njegove bioraspoloživosti može doći do vazokonstrikcije, tromboze, upale, vaskularne hipertrofije i stenozе, hipertenzije, dislipidemije i ateroskleroze (12).

### 1.2.1. Dušik oksid i oksidativni stres

Brojnim istraživanjima utvrđeno je da su razne bolesti, poput ateroskleroze, hipertenzije, dijabetesa, povezane upravo s poremećajem NO raspoloživosti. Mnogi tipični faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti povezani su s povećanjem vaskularnog oksidacijskog stresa i/ili padom antioksidativnog kapaciteta vaskularne stjenke (13,14). Promjena ravnoteže bioraspoloživosti NO zajedno s oksidativnim stresom rezultira pojavom endotelne disfunkcije koja je zajedno s ozljedom endotela ključni događaj u patogenezi vaskularnih bolesti.

Endotelne progenitorske stanice (EPC) porijeklom iz koštane srži, doprinose stvaranju novih krvnih žila, neurovaskularizaciji i homeostazi vaskulature, te su vrlo osjetljive na neravnotežu između NO i oksidativnog stresa (15,16). Prema tome, rezultati sugeriraju da slabljenje endotelne disfunkcije treba smanjiti stopu kardiovaskularnih bolesti i poboljšati prognozu kod bolesnika (13).

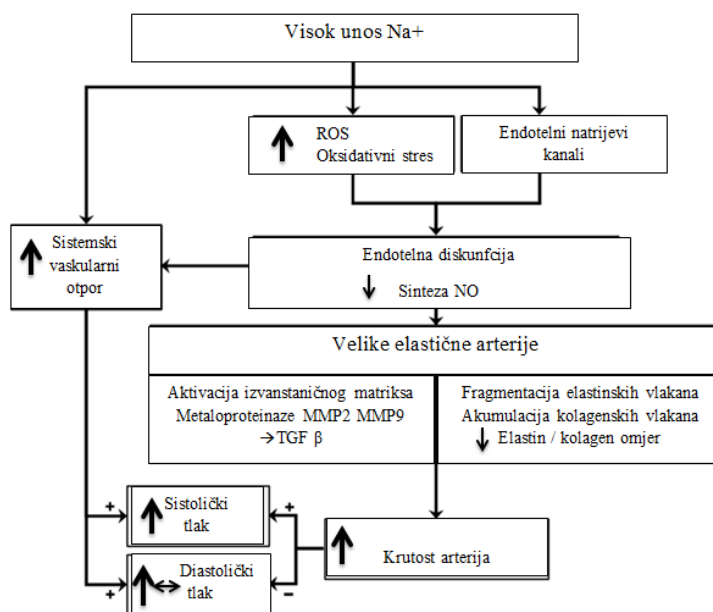
### 1.3. Oksidativni stres, kisikovi radikali i njihov učinak na organizam

Slobodni radikali sudjeluju u procesima oksidacije te sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, zbog čega lako reagiraju s drugim molekulama (17). Međutim, ukoliko se stvori neravnoteža između aktivnosti slobodnih radikala i aktivnosti antioksidansa, slobodni radikali počinju stvarati štetu u organizmu zbog njihovog utjecaja na masne kiseline, DNK i proteine te posljedično dolazi do stvaranja oksidativnog stresa (18). Oksidacijom posredovane reakcije uključene su u mnoge temeljne procese kao što su stanično disanje, fagocitoza, sinteza lipida, biotransformacija organskih spojeva i metabolizam metala. Narušavanjem njihove homeostaze može doći do neselektivnog oštećenja bioloških molekula, pa čak i do stanične smrti (19,20). ROS nastaju staničnim metaboličkim aktivnostima, ali i djelovanjem štetnih okolišnih čimbenika (21). Sve više dokaza upućuje da su ROS ključni regulatori u nekoliko faza procesa ozdravljenja pa tako njihova prekomjerna proizvodnja ili oslabljena detoksikacija uzrokuju oksidativna oštećenja (22). Svi utvrđeni kardiovaskularni čimbenici rizika povećavaju stvaranje ROS-a, a smanjuju proizvodnju NO u endotelu. Ključni molekularni događaji u aterogenezi, poput oksidativne modifikacije lipoproteina i fosfolipida, aktivacija endotelne stanice i infiltracija/aktivacija makrofaga potaknuti su vaskularnim oksidativnim stresom, a inhibirani endotelnim NO (23). ROS i NO mogu nastati procesima redukcije i oksidacije, a disregulacija tih mehanizama važan je uzrok kardiovaskularnih bolesti i cilj za terapiju (24).

### 1.4. Utjecaj povećane konzumacije NaCl na organizam

Na<sup>+</sup> je važan mikronutrijent za regulaciju ravnoteže tjelesnih tekućina, održavanje funkcije živaca i mišića i niz drugih temeljnih fizioloških procesa. Sve je više dokaza da visoki unos soli u prehrani predstavlja čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (25). Višak natrija iz soli unesene prehranom povezan je s povišenjem krvnog tlaka. Međutim, osjetljivost krvnog tlaka na unos soli varira među pojedincima te postoje podaci koji sugeriraju da kuhinjska sol negativno utječe na ciljne organe čak i kod normotenzivnih osoba (25,26). Osim na kardiovaskularni sustav, dokazan je i štetan učinak na bubrege, kožu, mozak i kosti. Do

disfunkcije ciljnih organa dolazi zbog pojačane upale i oksidativnog stresa koji vremenom doprinose razvoju bolesti (26,27). Visok unos soli prehranom, u odsustvu hipertenzije, može dovesti do funkcionalnih deficita u vaskularnom endotelu, koji su dovoljno ozbiljni da ograniče reakciju krvnih žila na različite vazomotorne podražaje (25,27).



Slika 1. Povezanost visokog unosa soli s prehranom, krvnim tlakom i krutosti arterija. ROS - reaktivne kisikove vrste (prema engl. reactive oxygen species), MMP2/MMP9-matriksne metaloproteinaze 2/9 (prema engl. *matrix metalloproteinases*), TGF- $\beta$ -transformirajući čimbenik rasta beta (prema engl. *transforming growth factor beta*), NO-dušik oksid (prema engl. *nitric oxide*). Izvor: Sodium Intake and Hypertension - Scientific Figure on ResearchGate. Dostupno na adresi: [https://www.researchgate.net/figure/Relationship-between-high-salt-intake-with-diet-blood-pressure-and-arterial-stiffness\\_fig1\\_335316746](https://www.researchgate.net/figure/Relationship-between-high-salt-intake-with-diet-blood-pressure-and-arterial-stiffness_fig1_335316746).

Datum pristupa: 6.4.2021.

Studije na normotenzivnim pokusnim životinjama i ljudima otkrile su da je ključna značajka djelovanja soli unesene prehranom smanjenje biorasploživosti vaskularnog NO što je snažno povezano s povišenim razinama ROS-a koje generiraju NAD(P)H oksidazu, ksantin oksidazu i endotelnu sintazu unutar krvožilnih stjenki, što dovodi do uklanjanja NO i do poremećaja signalnih putova koji posreduju njegovoj proizvodnji (25). Prekomjeran unos kuhinjske soli dovodi do poremećaja odgovora na razne fiziološke podražaje ovisne o vaskularnom endotelu, od kojih su neki posredovani metabolitima arahidonske kiseline koji imaju značajnu ulogu u posredovanju vaskularne reaktivnosti na različite podražaje: utječu na perfuziju tkiva, vrše proupalno ili protuupalno djelovanje na žile i druga tkiva. Dokazano je da transgenični

TFF3 miševi imaju promjene u metabolizmu lipida, koji mogu utjecati na vaskularnu funkciju i ishod moždanog udara. Moguće je da TFF3<sup>-/-</sup> miševi, zbog promjene metabolizma lipida, imaju promjene u ravnoteži vazoaktivnih prostaglandina, što bi moglo utjecati na njihovu vaskularnu reaktivnost na podražaje, a budući da je upala važan faktor u oštećenju tkiva, promjene u proupalnim i protuupalnim čimbenicima mogle bi imati pozitivan ishod kod moždanog udara (28,29).

## **2. HIPOTEZA**

Povećan unos prehrambene soli uzrokovat će smanjenu vaskularnu proizvodnju ili bioraspoloživost NO kod divljeg tipa životinja na visokoslanjoj dijeti, dok će TFF3<sup>-/-</sup> miševi na visokoslanjoj dijeti očuvati vaskularnu proizvodnju ili bioraspoloživost NO.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je istraživanja ovog diplomskog rada utvrditi postoje li promjene u proizvodnji NO u karotidnim arterijama miševa TFF3<sup>-/-</sup> i njihovim kontrolama divljeg tipa, u odnosu na miševe istog soja koji konzumiraju niskoslanu dijetu, mjereno direktnom fluorescencijom.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Eksperimentalni životinjski modeli

Istraživanje je provedeno na Medicinskom fakultetu Osijek i u Laboratoriju za fiziologiju cirkulacije pri Medicinskom fakultetu Osijek. U istraživanju su korišteni zdravi transgenični TFF3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N (TFF3<sup>-/-</sup>) miševi s isključenim genom i njihove kontrole divljeg tipa (prema engl. *wild type*) (WT/C57BL/6N).

Miševi su bili starosti od 10 do 11 tjedana, muški, njih ukupno 40.

### 4.2. Provođenje prehrane s povećanim ili niskim udjelom soli

Tijekom 7 dana životinje su bile podvrgnute određenom načinu prehrane i prema tome su bile podijeljene u 4 skupine:

1) TFF3<sup>-/-</sup> soj uz konzumaciju hrane za glodavce s povećanim udjelom soli

→ NaCl (4%); (N=10)

→ TFF3<sup>-/-</sup> HS (prema engl. *high salt*)

2) WT-divlji soj (prema engl. *wild type*) uz konzumaciju hrane za glodavce s povećanim udjelom soli

→ NaCl(4%); (N=10)

→ WT HS (prema engl. *wild type high salt*)

3) TFF3<sup>-/-</sup> soj uz konzumaciju hrane s niskim udjelom soli

→ NaCl(0,4%); (N=10)

→ TFF3<sup>-/-</sup> LS (prema engl. *low salt*)

4) WT-divlji soj (prema engl. *wild type*) uz konzumaciju hrane s niskim udjelom soli

→ NaCl(0,4%); (N=10)

→ WT LS (prema engl. *wild type low salt*)

Životinjama je tijekom svih sedam dana omogućen neograničen pristup hrani i vodi te im je omogućeno slobodno kretanje po kavezu.

Poduzete su sve mjere kako bi se spriječila patnja životinja te su svi eksperimentalni postupci bili u skladu s Europskim smjernicama za skrb i uporabu laboratorijskih životinja (Direktiva 86/609), kao i odobreni od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (EP 195/2019 rbr. 91955).

#### 4.3. Postupak izolacije i stimulacije karotidne arterije

Osmog dana miševi su izvagani i nakon toga anestezirani kombinacijom ketanesta (3,0 ml/kg) i midazolama (Dormicum, 0,5 ml/kg). Nakon toga, životinje su žrtvovane dekapitacijom te je provedena izolacija karotidnih arterija.

Stimulacija karotidne arterije izvedena je promjenama protoka tekućine u komorici za izolirane perfundirane žile. Karotidne su arterije kanalizirane na staklenim mikropipetama u komori ispunjenoj izotoničnom fiziološkom otopinom soli (PSS koji sadrži (u mmol/L) 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO<sub>4</sub>, 1,6 CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 24NaHCO<sub>3</sub>, 0,026 EDTA i 5,5 glukoze) zagrijane na 37°C i kisikom s 21% O<sub>2</sub> -5%CO<sub>2</sub>- balansa N<sub>2</sub>. Nakon 60 minuta inkubacije, pri intraluminarnom tlaku od 100 mmHg (vrijeme uravnoteženja) kako bi se procijenio njihov bazalni promjer (osnovni odgovor), osnovni je promjer tada određen mjerenjem promjera arterija pod tlakom, pri 80mmHg i bez protoka.

Arterije su bile podvrgnute toku gradijenta tlaka od  $\Delta 10$ -  $\Delta 180$ mmHg (reakcija izazvana protokom; FIR) (*Myograph pressure System Model 110P MyoView Version 1.2.0 DMT*, Danish MyoTechnology, Hinnerup, Denmark) za svaki gradijent tlaka (10–180 mmHg), razina dilatacije izražena je kao delta promjer u usporedbi s početnim vrijednostima (stanje bez protoka, 0 mmHg).

Odgovor neovisan o endotelu testiran je koristeći NO donor natrij nitroprusid (SNP; 10–6 mol/L, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka), a o endotelu ovisna vazodilatacija testirana je pomoću acetilkolina (ACh; 10<sup>-6</sup> mol/L, Fluka). Vaskularni odgovor na ACh i SNP procijenjen je u karotidnim arterijama (u uvjetima bez protoka). Na kraju protokola, žile su bile prožete PSS otopinom bez Ca<sup>2+</sup> (maksimalnog promjera).



#### 4.4. Evaluacija razine NO u karotidnim arterijama koristeći fluorescentni mikroskop

Karotidne arterije izolirane su i kanalizirane s protokom od 100 mmHg ili bez protoka u prisustvu ili odsustvu NOS inhibitora L-NAME, s ciljem snimanja izravnih mjerenja fluorescencije proizvodnje endotelnog NO.

Nakon inkubacije od 30 minuta, karotidne su arterije stavljene u HEPES pufer (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O; 10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O; 10 mM ; 20 mM HEPES i 1.2 mM CaCl<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O, pH 7.4).

Razina stvaranja dušikovog oksida određivana je pomoću fluorescentne boje DAF-2DA (4,5-diaminofluorescin) koja je dodana uz HEPES pufer (5 μM DAF-2DA). DAF-2DA je nefluorescentan, ali reagira s dušikovim oksidom pri čemu, u prisutnosti kisika, dolazi do stvaranja vrlo fluorescirajućeg spoja DAF-2T (triazolofluorescin). Intenzitet stvaranja DAF-2T u toj reakciji proporcionalan je razini prisutnog dušikova oksida.

Tubice s uzorcima su za vrijeme inkubacije bile zaštićene aluminijskom folijom, kako bi bile zaštićene od djelovanja svjetlosti.

Nakon 45 minuta inkubacije uzorci su isprani tri puta svježim HEPES puferom. Za snimanje NO zelene fluorescencije korišten je mikroskop Zeiss Axioskop MOT2 s Olympus DP70 kamerom (DAF-2DA pobuđen je na 490 nm i mjeren kroz 530 nm emisijski filter). Slike su obrađene i analizirane pomoću *Image J* softvera.

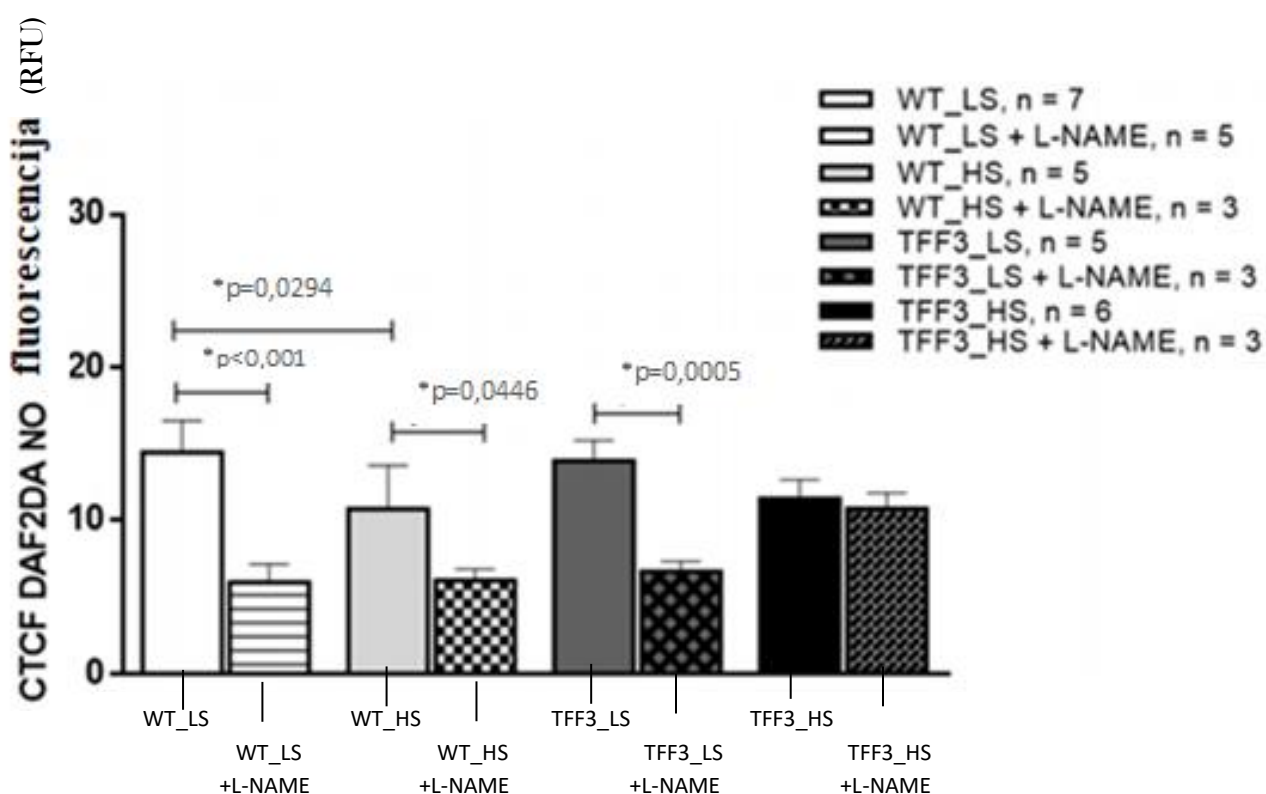
#### 4.5. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija. Normalnost distribucije podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Podaci kontrolne skupine i losartanske skupine uspoređeni su One-way ANOVA testom u slučaju normalne distribucije, a Holm-Sidak ili Kruskal-Wallis testom ukoliko podaci nisu normalno distribuirani. Kao prag statističke značajnosti postavljen je  $p < 0,05$ . Veličina uzorka određena je prema prijašnjim studijama provedenim na Katedri za fiziologiju i imunologiju, te u skladu s poštednim principima rada s pokusnim laboratorijskim životinjama 3R. Za analizu rezultata korišten je *SigmaPlot, v11,2* (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD).

## 5. REZULTATI

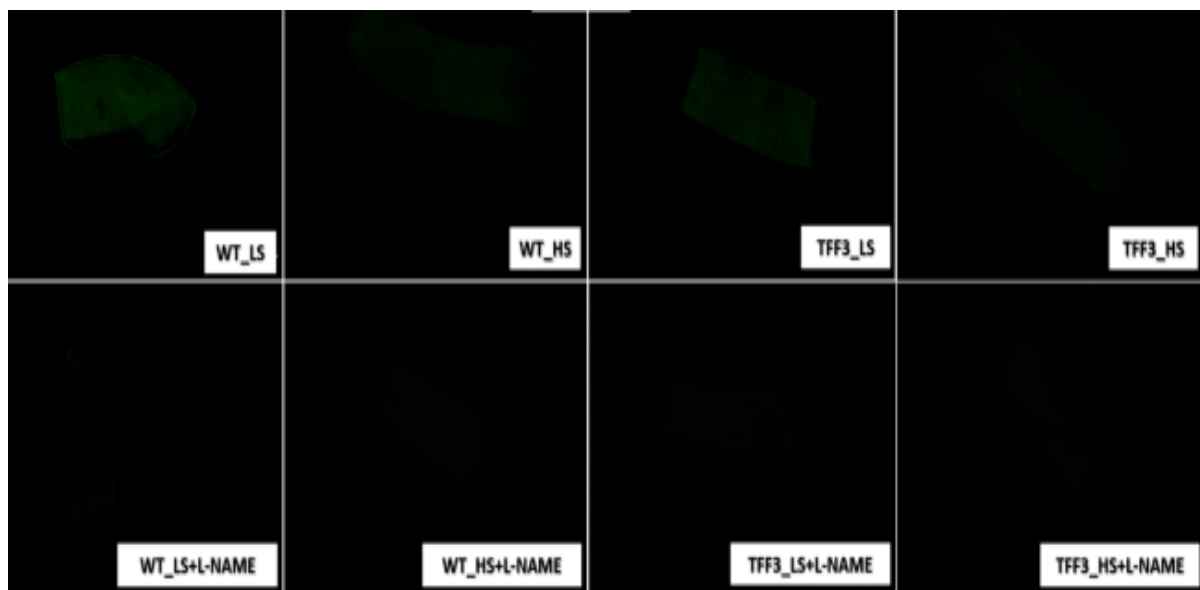
### 5.1. Procjena razine NO u karotidnim arterijama fluorescentnom mikroskopijom

Bazalna proizvodnja NO (bez protoka; slika 2. i 3.) značajno je smanjena kod WT HS miševa u usporedbi s WT LS miševima. Ostale skupine pokazale su slične razine proizvodnje NO u uvjetima bez protoka. L-NAME značajno je smanjio proizvodnju NO u svim skupinama miševa, osim u TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa. U uvjetima pod protokom (slika 4.), proizvodnja NO u karotidnim arterijama WT HS miševa bila je značajno manja nego u WT LS miševa. Proizvodnja NO izazvana protokom u TFF3<sup>-/-</sup> LS miševa bila je znatno niža od proizvodnje NO izazvane protokom kod WT LS miševa. Proizvodnja NO izazvana protokom u TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa bila je slična proizvodnji NO kod TFF3<sup>-/-</sup> LS miševa, kao i kod obje WT grupe. L-NAME nije utjecao na proizvodnju NO izazvanu protokom u karotidnim arterijama kod TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa, ali je značajno smanjio proizvodnju NO u ostale tri grupe.



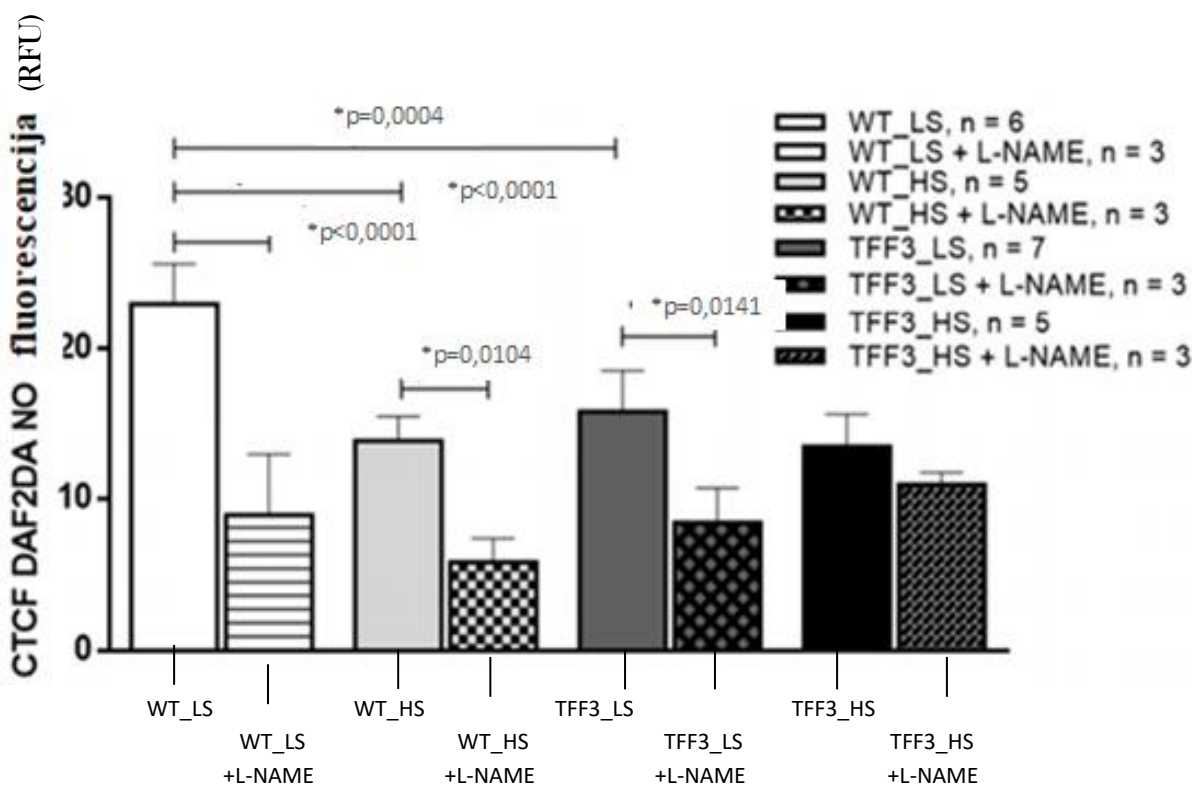
Slika 2. Grafički prikaz in situ određivanja razine NO bez protoka metodom fluorescencije koristeći DAF-2DA specifičnu boju za NO u testiranim grupama. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i SD (standardna devijacija). Intenzitet fluorescencije mjereno u relativnim fluorescentnim jedinicama (prema engl. RFU=relative fluorescence units), što označava količinu svjetlosti koju instrument prikupi. WT\_LS-divlji tip na niskoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type low salt*), WT\_HS –divlji tip na visokoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type high*

*salt*), TFF3\_LS-TFF3 miševi na niskoslanjoj dijeti, TFF3\_HS –TFF3 miševi na visokoslanjoj dijeti, L-NAME-inhibitor NOS-a (prema engl. *N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester*), CTCF-korigirana ukupna fluorescencija stanica (prema engl. *corrected total cell fluorescence*), n-broj uzoraka, \*p-statistička značajnost dobivena One-Way ANOVA testom ( $p < 0,05$ ). \* $p < 0,0001$  = WT\_LS vs. WT\_LS + L-NAME; \* $p = 0,0294$  = WT\_LS vs. WT\_HS; \* $p = 0,0446$  = WT\_HS vs. WT\_HS + L-NAME; \* $p = 0,0005$  = TFF3\_LS vs. TFF3\_LS + L-NAME. Izvor: Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, Justić H, Gajović S, Šešelja K, Bazina I, Horvatić A, Matić A, Bijelić N, Rođak E, Jukić I, Drenjančević I. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in *Tff3*<sup>-/-</sup>/*C57BL/6N* Knockout and WT (*C57BL/6N*) Control Mice (29).



Slika 3. In situ fluorescencija stvaranja NO bez protoka nakon bojanja uzoraka karotidnih arterija DAF-2DA bojom u prisustvu ili odsustvu NOS inhibitora L-NAME. Intenzitet boje proporcionalan je količini dušikovog oksida. Za snimanje NO zelene fluorescencije korišten je mikroskop Zeiss Axioskop MOT2 s Olympus DP70 kamerom (DAF-2DA pobuđen je na 490 nm i mjeran kroz 530 nm emisijski filter). Slike su obrađene i analizirane pomoću *Image J* softvera. WT\_LS-divlji tip na niskoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type low salt*), WT\_HS – divlji tip na visokoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type high salt*), TFF3\_LS-TFF3 miševi na niskoslanjoj dijeti, TFF3\_HS –TFF3 miševi na visokoslanjoj dijeti, L-NAME-inhibitor NOS-a (prema engl. *N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester*). Izvor: Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, Justić H, Gajović S, Šešelja K, Bazina I, Horvatić A, Matić A, Bijelić N, Rođak E, Jukić I, Drenjančević I. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in *Tff3*<sup>-/-</sup>/*C57BL/6N* Knockout and WT (*C57BL/6N*) Control

Mice (29).



Slika 4. Grafički prikaz in situ određivanja razine NO s protokom metodom fluorescencije koristeći DAF-2DA specifičnu boju za NO u testiranim grupama. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i SD (standardna devijacija). Intenzitet fluorescencije mjereno u relativnim fluorescentnim jedinicama (prema engl. RFU=relative fluorescence units), što označava količinu svjetlosti koju instrument prikupi. WT\_LS-divlji tip na niskoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type low salt*), WT\_HS –divlji tip na visokoslanjoj dijeti (prema engl. *wild type high salt*), TFF3\_LS-TFF3 miševi na niskoslanjoj dijeti, TFF3\_HS –TFF3 miševi na visokoslanjoj dijeti, L-NAME-inhibitor NOS-a (prema engl. *N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester*), CTCF-korigirana ukupna fluorescencija stanica (prema engl. *corrected total cell fluorescence*), n-broj uzoraka, \*p-statistička značajnost dobivena One-Way ANOVA testom. \*p=0,0004=WT\_LS vs. TFF3\_LS; \*p<0,0001=WT\_LS vs. WT\_HS; \*p<0,0001= WT\_LS vs. WT\_LS + L-NAME; \*p=0,0104=TFF3\_LS vs. TFF3\_LS + L-NAME. Izvor: Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, Justić H, Gajović S, Šešelja K, Bazina I, Horvatić A, Matić A, Bijelić N, Rođak E, Jukić I, Drenjančević I. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in *Tff3*<sup>-/-</sup>/*C57BL/6N* Knockout and WT (*C57BL/6N*) Control Mice (29).

## 6. RASPRAVA

Ubrzan način života doveo je i do promjene u prehrabmenim navikama kod ljudi. Posljednjih se nekoliko godina sve više razvija svijest o unosima visoke količine prehrabmene soli, te je ista prepoznata kao svjetski zdravstveni problem. Prekomjieran unos soli povezan je ponajprije s povišenim krvnim tlakom, koji je jedan od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj cerebrovaskularnih bolesti. Dokazano je da je visok unos soli povezan s oštećenjem vaskularne funkcije, utječe na mehanizam vazodilatacije ovisne o endotelu, smanjuje bioraspoloživost NO i povećava razinu oksidativnog stresa (29). Među nefarmakološkim pristupima terapiji, fizička aktivnost i prehrana opsežno su proučavane zbog svojih potencijalnih koristi, posebice s prehrabmenog stajališta, gdje se promjena u prehrani koristila kao alat za poboljšanje imunoloških, neuroloških, kardiovaskularnih, metaboličkih i endokrinih funkcija. Zanimljivo je da je jedan od glavnih povezanosti ovih bolesti upravo dostupnost dušikovog oksida, odnosno njegova uloga u više regulatornih procesa važnih za održavanje homeostaze (14).

U svrhu procjene mehanizma krvožilnih funkcija, obično se koriste genetski promijenjeni glodavci. Noviji su model za vaskularne studije i TFF3<sup>-/-</sup> miševi korišteni i u ovom istraživanju. Od otkrića TFF proteina, to je bio model koji se uglavnom koristio kao predmet istraživanja, prvenstveno u kontekstu fiziologije i patofiziologije različitih sluznica (29). Ovaj se model uveo iz razloga što prisutnost TFF-ova u krvotoku i raznim drugim organima (plućima, gušterači, mliječnoj žlijezdi, mozgu) ukazuje na njihovu opću važnost u homeostazi organizma. Dokazano je da TFF3 iz jetre ima neuroprotektivni i kardioprotektivni učinak (8). Ranija istraživanja provedena na Medicinskom fakultetu u Osijeku pokazala su da TFF3<sup>-/-</sup>/C57BL/6N miševi imaju očuvanu vaskularnu funkciju, tj. vazodilatacijski odgovor na podražaj povećanim protokom i kad konzumiraju hranu s povećanim udjelom NaCl (29). Očuvanost vazodilatacijskog odgovora pripisuje se promjeni sastava lipida u krvi i jetri, što je povezano sa „zaštitnim“ vaskularnim fenotipom zbog boljeg omjera nezasićenih n-3 i n-6 masnih kiselina. Istraživanjem učinka nedostatka TFF3 na metabolizam lipida i UH koristeći TFF3 miševe s isključenim genom, dokazano je da dolazi do značajno promijenjenog omjera brojnih masnih kiselina u jetri i serumu u usporedbi s miševima divljeg tipa. Tako su, na primjer, koncentracije monozasićenih masnih kiselina (MUFA) značajno promijenjene. Istodobno, kod promatranja polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), dokazano je da je količina ukupnih PUFA značajno povećana (1,2 puta) u jetri TFF3<sup>-/-</sup> miševa, dok nije bilo utjecaja na udio u serumu. TFF3<sup>-/-</sup> miševi pokazali su značajnu izmjenu omjera  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6,

koji je povećan u jetri, a smanjen u serumu (9). Osim toga uloga TFF3 proteina je i obrana organizma od štetnih agenata. Miševi koji ne mogu sintetizirati dovoljno TFF3 proteina u jetri, lišeni su njegovog protektivnog učinka nakon ishemije mozga ili miokarda, što posljedično dovodi do većeg oštećenja tkiva (2).

Istraživanje prikazano ovim radom ispituje utjecaj provođenja kratkotrajne dijeta s povećanim unosom soli na vaskularnu proizvodnju dušik oksida kod transgeničnih miševa podvrgnutih visokoslanjoj dijeti tijekom sedam dana. Na osnovi spoznaje da je vazodilatacija potaknuta protokom većinom ovisna o NO, a visok unos soli povećava razinu oksidativnog stresa, mogući mehanizam očuvane vazodilatacije kod TFF3<sup>-/-</sup> miševa bio bi ili povećana proizvodnja NO ili njegova povećana bioraspoloživost zbog nižeg oksidativnog stresa u odnosu na miševе divljeg tipa koji nemaju zaštitni fenotip.

Očuvanje proizvodnje i bioraspoloživosti NO izuzetno je važno u organizmu, uzimajući u obzir njegove vazoprotektivne uloge kao što su vazodilatacija, antikoagulacija, adhezija leukocita, proliferacija glatkih mišića i antioksidativni kapacitet (13). Sila smicanja glavni je stimulator proizvodnje NO fosforilacijom eNOS i tirozin kinaze, koje reguliraju eNOS, a samim time i stvaranje endotelnog NO. Osim toga, Ach, bradikinin, trombin, ADP i ATP opuštaju vaskularne glatke mišićne stanice i potiču proizvodnju NO (29). Pojačana inaktivacija i/ili smanjena sinteza NO primijećena je zajedno s čimbenicima rizika za kardiovaskularne bolesti. Posljedično dolazi do endotelne disfunkcije koja je pospješena vaskularnim oksidativnim stresom s povećanom proizvodnjom ROS-a. Povećana koncentracija ROS-a smanjuje količinu bioaktivnog NO kemijskom inaktivacijom, tj. eNOS postaje disfunkcionalni enzim (15). U ovom se istraživanju ispitivanjem proizvodnje NO mjerenog izravnom fluorescencijom dokazalo da je došlo do smanjenja proizvodnje NO kod WT HS miševa, tj. da je na FID značajno utjecala prehrana s prekomjernim unosom soli samo kod WT miševa. Time se potkrijepila hipoteza da će povećan unos kuhinjske soli uzrokovati smanjenu vaskularnu proizvodnju i bioraspoloživost NO kod WT skupina na visokoslanjoj dijeti, dok će TFF3<sup>-/-</sup> očuvati vaskularnu proizvodnju i bioraspoloživost NO.

Druga istraživanja, također provedena na Medicinskom fakultetu u Osijeku koristeći TFF3<sup>-/-</sup> miševе, pokazala su i da postoji značajan učinak dijeta s prekomjernim unosom soli na strukturu aorte WT miševa, da dolazi do složene interakcije iscrpljivanja gena i prehrane dokazano analizom proteoma i da TFF3<sup>-/-</sup> miševi pokazuju veće moždane udare u usporedbi s WT LS miševima, vjerojatno zbog njihovog smanjenog ER odgovora na stres (29).

Rezultati istraživanja prikazanog ovim radom, zajedno s rezultatima drugih, prethodno navedenih istraživanja, sugeriraju da je antioksidativni sustav aktiviran kod TFF3<sup>-/-</sup> osiromašenih miševa kao odgovor na prehranu s prekomjernim unosom soli. Aktivacija antioksidativnog sustava vjerojatno doprinosi nižoj razini upale i boljem vaskularno funkcionalnom odgovoru i činjenici da su zaštićeniji od oštećenja žičanog tkiva.

Uzimajući u obzir sve navedeno, pokazalo se da se TFF3<sup>-/-</sup> osiromašeni miševi i njihova kontrola divljeg tipa mogu koristiti za cerebrovaskularne studije zbog njihovog jedinstvenog fenotipa i potencijalnih implikacija na vazoreaktivnost i upalni odgovor na stresore iz okoliša, poput prehrane s visokim udjelom soli.

## 7. ZAKLJUČAK

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

- 1) Proizvodnja NO mjenog izravnom fluorescencijom pokazala je da je na FID značajno utjecala prehrana s prekomjernim unosom soli samo kod divljeg tipa miševa.
- 2) Povećan unos prehrambene kuhinjske soli uzrokovao je značajnije smanjenje vaskularne proizvodnje i bioraspoloživosti NO u skupini divljeg tipa miševa nego u TFF3<sup>-/-</sup> miševa.
- 3) TFF3<sup>-/-</sup> dobar je potencijalni model za daljnja istraživanja povezana s kardiovaskularnim sustavom zbog njihovog jedinstvenog fenotipa i potencijalnih implikacija na vazoreaktivnost i upalni odgovor na stresore iz okoliša.



## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Utvrditi postoje li promjene u proizvodnji NO u karotidnim arterijama miševa TFF3<sup>-/-</sup> i njihovim kontrolama divljeg tipa na visokoslanjoj prehrani, u odnosu na miševe istog soja na niskoslanjoj dijeti.

**NACRT STUDIJE:** Eksperimentalna studija na animalnom modelu.

**MATERIJALI I METODE:** U istraživanju korišteni zdravi TFF3<sup>-/-</sup> miševi i njihove kontrole, starosti 10-11 tjedana podijeljeni u 4 grupe. Dio miševa konzumirao je hranu s visokim udjelom (4%), a dio s niskim udjelom NaCl (0,4%) tijekom 7 dana. Osmog dana životinje su anestetizirane, žrtvovane dekapitacijom i izolirana im je karotidna arterija. Proizvodnja NO izmjerena je in vitro, direktnom fluorescencijom u bazalnim uvjetima i nakon stimulacije krvne žile promjenama protoka tekućine u komorici za izolirane perfundirane žile. Mjerenje proizvodnje NO odvijalo se u bazalnim uvjetima te u prisutnosti inhibitora eNOS, L-NAME.

**REZULTATI:** Bazalna proizvodnja NO značajno smanjena kod divljeg tipa miševa na visoko slanoj dijeti. L-NAME značajno je smanjio proizvodnju NO u svim skupinama, osim u TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa. U uvjetima pod protokom proizvodnja NO bila je značajno manja u WT HS miševa; u TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa bila je slična proizvodnji NO kod TFF3<sup>-/-</sup> LS miševa, kao i kod obje WT grupe. L-NAME nije utjecao na proizvodnju NO kod TFF3<sup>-/-</sup> HS miševa, ali je značajno smanjio proizvodnju NO u ostale tri grupe.

**ZAKLJUČAK:** Dokazano da prehrana s visokim udjelom soli utječe na razinu oksidativnog stresa i promjene u proizvodnji NO kod WT miševa, dok su TFF3<sup>-/-</sup> miševi bili manje podložni utjecajima visokoslane prehrane.

**KLJUČNE RIJEČI:** dušik oksid; oksidativni stres; prehrambeni NaCl; trefoil faktor 3

## 9. SUMMARY

### **INFLUENCE OF SHORT-TERM CONSUMPTION OF NaCl ON VASCULAR PRODUCTION OF NITROGEN OXIDE (NO) IN THE TFF3 - / - / C57BL / 6N MOUSE MODEL**

**AIM:** To determine whether there are changes in NO production in the carotid arteries of TFF3<sup>-/-</sup> mice and their controls (WT) that are on a high-salt diet compared to mice of the same strain consuming a low-salt diet measured by direct fluorescence.

**STUDY DESIGN:** Experimental study on an animal model.

**MATERIALS AND METHODS:** Healthy TFF3<sup>-/-</sup> mice and their WT controls, aged 10-11 weeks divided into 4 groups (N=10 per group), were used in this study. Part of the mice (both strains, i.e. two groups) consumed food with increased NaCl (4%), and part (second two groups) food with low salt content (0,4%) for 7 days. On the eight day, the animals were anesthetized, sacrificed by decapitation and their carotid arteries were isolated. NO production was measured in vitro, by direct fluorescence on carotid artery samples under basal conditions and after blood vessel stimulation by changes in fluid flow in the chamber for isolated perfused vessels. Measurement of NO production took place in basal conditions and in the presence of eNOS inhibitor L-NAME.

**RESULTS:** The results show that basal NO production (no flow) was significantly reduced in WT mice on a high-salt diet. L-NAME significantly reduced NO production in all groups except Tff3<sup>-/-</sup> HS mice. Under flow conditions, NO production was lower in WT HS mice. NO production in TFF3<sup>-/-</sup> HS mice was similar to that in TFF3<sup>-/-</sup> LS, as in both WT groups. L-NAME did not affect NO production in TFF3<sup>-/-</sup> HS mice, but significantly reduced NO production in the other three groups.

**CONCLUSION:** Research has shown that a high-salt diet affects the level of oxidative stress and changes in NO production in WT mice, while TFF3<sup>-/-</sup> mice were less susceptible to the effects of a high-salt diet.

**KEYWORDS:** dietary NaCl; nitric oxide; oxidative stress; trefoil factor 3

## 10. LITERATURA

- (1) Al-azzeah, Ezzal-din. (2021). Gene regulation of the human trefoil factor family (TFF) in gastrointestinal cell lines. Dostupno na adresi: <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/48397/pdf/diss.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Datum pristupa: 6.4.2021.
- (2) Kozina N, Jukić I. Trefoil Factor Family (TFF): Peptides with Numerous Functions. *Southeastern European Medical Journal* [Internet]. 2019 [pristupljeno 06.04.2021.];3(1):69-77. <https://doi.org/10.26332/seemedj.v3i1.96>
- (3) Taupin, D., Podolsky, D. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 721–732 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrm1203>
- (4) Yusufu A, Shayimu P, Tuerdi R, Fang C, Wang F, Wang H. TFF3 and TFF1 expression levels are elevated in colorectal cancer and promote the malignant behavior of colon cancer by activating the EMT process. *Int J Oncol*. 2019 Oct;55(4):789-804. doi: 10.3892/ijo.2019.4854.
- (5) Oertel M, Graness A, Thim L, Bühling F, Kalbacher H, Hoffmann W. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Oct;25(4):418-24. doi: 10.1165/ajrcmb.25.4.4429. PMID: 11694446.
- (6) Trefoil Factor 3 (TFF3, Intestinal trefoil factor, P1.B, ITF, Polypeptide P1.B, TFI). Dostupno na adresi: <https://www.biovendor.com/trefoil-factor-3>. Datum pristupa 6.4.2021.
- (7) Bijelić N, Belovari T, Tolušić Levak M, Baus Lončar M. Localization of trefoil factor family peptide 3 (TFF3) in epithelial tissues originating from the three germ layers of developing mouse embryo. *Bosn J of Basic Med Sci* [Internet]. 2017 Aug;20;17(3):241-7. Dostupno na adresi: <https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/1838>. Datum pristupa: 6.4.2021.
- (8) Šešelja K, Bazina I, Welss J, Schicht M, Paulsen F, Bijelić N, et al. Effect of Tff3 Deficiency and ER Stress in the Liver. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. MDPI AG; 2019 Sep 6;20(18):4389.

- (9) Bujak M, Bujak I, T, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Ćosić A, Levak M, T, Kopačin V, Mihaljević B, Balog T, Drenjančević I, Loncar M, B: Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:827-841. doi: 10.1159/000490039
- (10) Chen K, Pittman RN, Popel AS. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jul; 10(7): 1185-98. doi: 10.1089/ars.2007.1959.
- (11) Nitric oxide in Ray Living Spirulina dramatically increases blood flow. Dostupno na adresi: [rawlivingsoirulina.com/nitric-oxide-for-your-health/](http://rawlivingsoirulina.com/nitric-oxide-for-your-health/). Datum pristupa: 6.4.2021.
- (12) Klabunde R. Cardiovascular Physiology Concepts : Nitric Oxide. Dostupno na adresi: [cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011](http://cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011). Datum pristupa: 6.4.2021.
- (13) Gewaltig TM, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential, *Cardiovascular Research*, Volume 55, Issue 2, August 2002, Pages 250–260, [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00327-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00327-9).
- (14) Rodrigues-Krause J, Krause M, Rocha IMGD, Umpierre D, Fayh APT. Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Nutrients*, 2018;11(1):15. December 2018, doi:10.3390/nu11010015
- (15) Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):923-39. doi: 10.1007/s00424-010-0808-2.
- (16) Fleissner F, Thum T. Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 15;15(4):933-48. doi: 10.1089/ars.2010.3502.
- (17) Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Jun;25(3):287-99. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
- (18) Dix M. Everything You Should Know About Oxidative Stress. Dostupno na adresi: [healthline.com/health/oxidative-stress](http://healthline.com/health/oxidative-stress). Datum pristupa: 6.4.2021.
- (19) Mittler R. ROS are good. *Trends in Plant Science*, Volume 22, Issue 1, 11-19.

- (20) Oxidative Stress. Dostupno na adresi: [sciencedirect.com/topics/neuroscience/oxidative-stress](https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/oxidative-stress). Datum pristupa: 6.4.2021.
- (21) Yang J, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients*. 2019 Apr 18;11(4):872. doi: 10.3390/nu11040872.
- (22) Cano Sanchez M, Lancel S, Boulanger E, Neviere R. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*. 2018 Jul 24;7(8):98. doi: 10.3390/antiox7080098.
- (23) Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):713-735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
- (24) Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.
- (25) Boegehold MA. The effect of high salt intake on endothelial function: reduced vascular nitric oxide in the absence of hypertension. *J Vasc Res*. 2013;50(6):458-67. doi: 10.1159/000355270.
- (26) Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB. The Influence of Dietary Salt Beyond Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2019 Apr 25;21(6):42. doi: 10.1007/s11906-019-0948-5.
- (27) Sanders P. Vascular Consequences of Dietary Salt Intake. *PresS. Am J Physiol Renal Physiol* (April 1, 2009). doi:10.1152/ajprenal.00027.2009
- (28) Dickinson K, Clifton P, Keogh J. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 93, Issue 3, March 2011; 500-505. doi.org/10.3945/ajcn.110.006155
- (29) Kozina N, Mihaljević Z, Lončar MB, Mihalj M, Mišir M, Radmilović MD, Justić H, Gajović S, Šešelja K, Bazina I, Horvatić A, Matic A, Bijelić N, Rođak E, Jukić I, Drenjančević I. 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. doi: 10.3390/ijms20205188.

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Ezgeta

Datum i mjesto rođenja: 7.2.1996., Osijek, Hrvatska

Adresa: Ulica Ivana Gundulića 41c, 31431 Čepin

Telefon: 099/508 45 12

E-mail: ezgeta.ivana1@gmail.com

Obrazovanje:

2002. – 2003. Osnovna škola Vladimir Nazor, Brijuni

2003.-2010. Osnovna škola Miroslav Krleža , Čepin

2010.-2014. Druga gimnazija Osijek

2014-2017. Medicinski fakultet Osijek – Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika