

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Naučno veće Medicinskog fakulteta u Beogradu na sednici održanoj 26.11.2018. godine, broj 9700/01-MV, odredilo je članove Komisije za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Milene Vesković pod nazivom

**„DEJSTVO BETAINA I NEUREGULINA-1 NA TKIVNE, ĆELIJSKE I
MOLEKULARNE PROMENE NA *IN VIVO* I *IN VITRO* MODELIMA NEALKOHOLNE
MASNE BOLESTI I FIBROZE JETRE“**

Mentori za izradu doktorske disertacije su

Doc. dr Dušan Mladenović i Prof. dr Vincent Segers (Univerzitet u Antverpenu, Belgija)

Imenovana je Komisija u sastavu:

1. **Prof. dr Tatjana Simić**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. **Prof. dr Tatjana Radosavljević**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. **Prof. dr Vladimir Trajković**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
4. **Prof. dr Gilles De Keulenaer**, Fakultet farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih nauka, Univerzitet u Antverpenu, Belgija
5. **Prof. dr Vincent Segers**, Fakultet farmaceutskih, biomedicinskih i veterinarskih nauka, Univerzitet u Antverpenu, Belgija

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu disertaciju i podnose Naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja disertacije

Disertacija dr Milene Vesković „Dejstvo betaina i neuregulina-1 na tkivne, ćelijske i molekularne promene na *in vivo* i *in vitro* modelima nealkoholne masne bolesti i fibroze jetre“ napisana je na 124 strane i sastoji se od sedam poglavlja: Uvod, Ciljevi, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. Disertacija sadrži i sažetak na srpskom i engleskom jeziku. Disertacija je dokumentovana sa 21 figurom i 4 tabele. Citirano je 240 referenci iz inostrane literature. Struktura i kompozicija rada u celini sadrži sve elemente i zadovoljava sve kriterijume doktorske disertacije.

Poglavlje **Uvod** obuhvata prikaz dosadašnjeg znanja o dijagnozi, patogenezi i eksperimentalnim modelima nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD), kao i njenoj progresiji u fibrozu jetre. Nakon kraćeg prikaza dosadašnjih modela koji se koriste za eksperimentalna istraživanja, akcenat je stavljen na uloge različitih mehanizama u patogenezi i progresiji NAFLD: akumulaciju masti i lipotoksičnosti, oksidacijskog stresa, mitohondrijske disfunkcije, inflamacije, apoptoze i autofagije. Citirani su najnoviji radovi iz vodećih svetskih časopisa koji opisuju poremećaje metabolizma masti i glukoze, razvoj insulinske rezistencije, kao i disbalans između produkcije slobodnih radikala i antioksidativne zaštite hepatocita. Detaljno je opisana i povezanost oksidacijskog stresa sa mitohondrijskom disfunkcijom, ulogom proinflamatornih citokina, aktivacijom apoptotskih signalnih puteva i autofagijom. Pored toga opisani su i mehanizmi uključeni u progresiju NAFLD do nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) i fibroze jetre putem aktivacije Kupferovih i Hepatičnih zvezdastih ćelija i njihove transformacije u miofibroblaste.

Takođe, u Uvodu je naveden prikaz eksperimentalnih modela NAFLD i fibroze jetre sa svojim prednostima i manama. U završnom delu Uvoda navedeni su povoljni efekti betaina na alkoholno oštećenje jetre, na smanjenje insulinske rezistencije i steatoze modulacijom signalnih puteva uključenih u sintezu glikogena i glukoneogenezu, kao i na antioksidativna svojstva.

Opisana su i do sada poznata anti-fibrogena dejstva neuregulina na fibrozisu srca, pluća, bubrega i kože.

Kandidat je kao ciljeve istraživanja odredio ispitivanje tkivnih, ćelijskih i molekularnih promena u jetri miševa tretiranih dijetom deficitarnom u metioninu i holinu (MCD dijeta), kao i uticaj betaina na tok i progresiju NAFLD; i ispitivanje efekata neuregulina-1 na procese fibrogenaze u jetri na *in vivo* i *in vitro* modelima.

U poglavlju **Materijali i metode** prikazan je protokol istraživanja na animalnom eksperimentalnom modelu. Studija je obavljena na 88 mužjaka miševa C57BL/6 soja podeljenih u tri celine.

Prvi deo istraživanja imao je za cilj definisanje modela NAFLD. Životinje su bile podeljene u kontrolnu i eksperimentalne grupe tretirane MCD dijetom u vremenskim intervalima od dve, četiri i šest nedelja. Ovaj deo istraživanja odnosio se na uticaj MCD dijetete na patohistološke promene u tkivu jetre, lipidni status u serumu, profil masnih kiselina, lipidnu peroksidaciju, i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri.

Drugi deo istraživanja je bio usmeren na ispitivanje uticaja betaina na akumulaciju masti i zapaljenskog infiltrata u jetri, na ekspresiju markera inflamacije, apoptoze i autofagije kao i na ultrastrukturne promene hepatocita. Za ovaj deo eksperimenta životinje su bile podeljene u sledeće grupe: kontrolna, MCD grupa životinja koje su bile na MCD dijeti tokom 6 nedelja, BET grupa životinja koje su bile na standardnoj ishrani i tretirane betainom (1,5% rastvor u vodi za piće) i MCD+BET grupa životinja na MCD dijeti tretirana betainom. Životinje su žrtvovane nakon 6 nedelja i za dalje analize prikupljeni su uzorci jetre i krvi. Uzorci jetre za patohistologiju su fiksirani u 10% pufersanom formalinu i ukalupljeni u parafinu. Isečci tkiva debljine 5 μm su bojeni hematoksilinom i eozinom (HE bojenje) i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom Olympus BX41.

Nivo malondialdehida, redukovanog glutaciona, aktivnost antioksidativnih enzima: superoksid dizmutaze, katalaze, glutacion peroksidaze i glutacion reduktaze, kao i aktivnost paroksonaze i arilesteraze određeni spektrofotometrijskom metodom u uzorcima jetre. Ekspresija markera zapaljenja (TNF- α , IL-6, IL-10 i TGF- β), markera apoptoze (Bax, Bcl2, Bcl3, Bak1) i autofagije (Beclin 1, Atg4b, Atg5, Atg7) određivana je Real-Time PCR metodom, dok su LC3II,

p62, p-mTOR, p-S6K, p-Akt i p-AMPK određivani Western blot metodom. Ultrastrukturne promene u jetri su ispitivane transmisijom elektronskom mikroskopijom.

U trećem delu istraživanja ispitivan je uticaj neuregulina-1 na dva animalna modela fibroze jetre, kao i na izolovanim hepatocitima. U tu svrhu korišćeni su toksični model fibroze jetre izazvan ugljentetrahloridom (CCl₄) u dozi od 1mg/kg telesne mase 3x nedeljno intraperitonealno (i.p.) i holestazni model izazvan podvezivanjem žučnih puteva životinja. Tokom 4 nedelje, eksperimentalne grupe životinja bile su tretirane rekombinantnim humanim neuregulinom-1 (rhNRG-1) u dozi od 20 µg/kg i.p. 5 x nedeljno. Nakon žrtvovanja uzeti su uzorci krvi za određivanje aktivnosti transaminaza, dok je tkivo jetre bojeno Masson's Trichrome bojenjem u cilju kvantifikacije fibroze. U jetri je određivana ekspresija kolagena tip I i tip III, matriksmetaloproteinaza (MMP) 2 i 9 korišćenjem Real-Time PCR metode. Prisustvo i fosforilacija ErbB3 i ErbB4 receptora su određivani u jetri kontrolnih i životinja tretiranih neuregulinom-1. Ekspresija transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β) je određivana in vitro na izolovanim hepatocitima pre i 16h nakon stimulacije neuregulinom-1.

U poglavlju Materijal i metode navedene su i statističke metode obrade dobijenih podataka. Za procenu statističke značajnosti razlika korišćeni su analiza varijanse (ANOVA), Studentov t-test ili Kruskal-Wallis sa Mann-Whitney neparametrijskim testom.

Poglavlje **Rezultati** sumira rezultate istraživanja. Sadrži ukupno 4 tabele, 16 grafikona i 5 slika.

U poglavlju **Diskusija** je prikazano poređenje rezultata ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u vodećim međunarodnim naučnim časopisima. Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa prethodnim studijama, ali i značajno proširuju dosadašnja saznanja o mogućim hepatoprotektivnim efektima betaina na tok i progresiju NAFLD, kao i o profibrogenim efektima neuregulina-1 u jetri.

U poglavlju **Zaključci** navedeni su konačni zaključci istraživanja kojima je jasno odgovoreno na postavljene ciljeve i hipoteze istraživanja.

B. Kratak opis postignutih rezultata

MCD dijeta je izazvala blagu steatozu sa fokalnim masnim promenama nakon 2 nedelje, koja je bila izraženija nakon 4 nedelje. Difuzna makro- i mikrovezikularna steatoza sa inflamatornim infiltratom bila je prisutna u grupi miševa na MCD dijeti tokom 6 nedelja ukazujući na razvijen NASH. MCD dijeta je uzrokovala promeneu lipidnom profilu u serumu miševa, značajno smanjujući ukupni holesterol, trigliceride i HDL i povećavajući koncentraciju LDLa. Značajne promene su uočene i u hepatičnom profilu slobodnih masnih kiselina, gde je MCD dijeta za 6 nedelja uzrokovala porast oleinske i linolne kiseline, a smanjenje zastupljenosti zasićenih i dokozaheksanoične kiseline (DHA).

Suplementacija betainom je vidljivo ublažila steatozu i inflamaciju na histološkom nalazu i poboljšala lipidni profil u serumu smanjujući nivo ukupnog holesterola i LDLa, a povećavajući nivo HDLa u poređenju sa MCD grupom. Betain je takođe smanjio lipidnu peroksidaciju i nitrozativni stress i povećao aktivnost antioksidativnih enzima PON1, ARE, ukupnu SOD, katalazu i GPx. Pored toga, betain je značajno povećao sardžaj glutationa u jetri i smanjio aktivnost GRed. Betain je, takođe, povećao ekspresiju antiinflamatornog IL-10 i ujedno smanjioekspresiju proinflamatornih citokina (IL-6, IL-10 i TNF- α). Pored smanjenja inflamatornog odgovorna, tretman betainom je smanjio i ekspresiju proapoptotskih markera.

Suplementacija betainom je dovela po povećanja expresije gena za autofagiju Atg4, Atg5, Atg7 i Beclin1 kao i sadržaj fosforilisanog mTOR i p-Akt. Analiza tkiva jetre elektronskom mikroskopijom je pokazala povećano prisustvo autofagozoma, kao i smanjeno prisustvo apoptotskih telašaca kod miševa na MCD dijeti koji su bili tretirani betainom.

Tretman neuregulinom-1 je statistički začajno pogoršao fibrozu jetre od 1,86 na 2,65% u CCl₄- izazvanoj fibrozi, od 5,03 na 8,25% u fibrozi izazvanoj podvezivanjem žučnih puteva (BDL). Ekspresija gena za colla1 i col3a1 nije bila promenjena pod dejstvom NRG-1 u CCl₄ grupi, dok je na modelu izražene fibroze NRG-1 doveo do povećanja genske ekspresije za oba tipa kolagena . Pored toga, NRG-1 je indukovao značajno smanjenje ekspresije za MMP 2 u odnosu na CCl₄ grupu. U BDL grupi, genska ekspresija za MMP 9 u jetri je bila značajno povišena u odnosu na kontrolu, dok tretman NRG-1 nije uzrokovao promene u ekspresiji gena za MMP 2 i MMP 9. NRG-1 je izazvao povećanu fosforilaciju ErbB3 receptora u jetri miševa u

mnogo većoj meri nego ErbB4. Pored toga, NRG-1 je povećao gensku ekspresiju za TGF- β in vitro na izolovanim hepatocitima, u poređenju sa netretiranim ćelijama.

C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Patohistološke i biohemijske promene u jetri miševa na MCD dijeti tokom 2, 4 i 6 nedelja su ukazali da je korišćenje ove dijete pogodno za postavljanje modela steatoze, nakon dve, odnosno steatohepatitisa nakon 6 nedelja. Prednosti ovog modela su opisani i ranije u literaturi (Ibrahim S. Et al., 2016; Kucera O. Et al., 2014), gde se posebno ističe patohistološki nalaz koji odgovara NASH kod ljudi, zatim reproducibilnost i brzina razvoja promena koji su jako pogodni za ispitivanje patogeneze i toka ove bolesti. Na MCD modelu rezultati disertacije ukazuju i na imenjeni lipidni profil u serumu, kao i na imenjen profil masnih kiselina u jetri, gde je posebno značajno smanjenje dokozaheksanoične kiseline kod životinja na MCD dijeti u trajanju od 6 nedelja. Kliničke studije se takođe bave ispitivanjem deficijencije omega-3 i omega-6 masnih kiselina u NAFLD, je gde je pokazano da njihovom suplementacijom dolazi do ublažavanja steatoze (Tobin D. et al., 2018; Kang S. et al., 2018). Slično rezultatima disertacije, i u humanoj populaciji sa NAFLD pokazano je da dolazi do razvoja dislipidemije (Neuschwander-Tetri B. 2010; Katsiki N. et al., 2016).

Rezultati doktorske disertacije ukazuju na potencijalne protektivne efekte betaina na animalnom modelu NAFLD. Do sada su ispitivana antioksidativna svojstva betaina u mozgu miševa sa alkoholnom bolesti jetre (Alirezalei M. et al., 2011), u jetri sa hroničnim alkoholnim oštećenjem jetre (Heidar R. et al., 2018), kao i efekti betaina na insulinsku rezistenciju (Kim D. et al., 2017). Ovo je prva studija koja je ispitivala efekte betaina na lipotoksičnost, oksidativni stres, inflamaciju, apoptozu i autofagiju od miševa sa NAFLD izazvanoj MCD dijetom. Suplementacija betainom je značajno ublažila steatozu jetre i pored toga povećala nivo HDL_a, a snizila nivo LDL_a u serumu. Pretpostavljeni mehanizmi ublažavanja steatoze su poboljšanje funkcije masnog tkiva, povećanje nivoa adiponektina, kao i inhibicija de novo lipogeneze u jetri (Wang Z. et al., 2010). U disertaciji su ispitivani efekti betaina na oksidativni stres, inflamaciju, apoptozu i autofagiju. Poznato je da betain ispoljava antioksidativna dejstva u jetri, mozgu, srcu i bubrezima (Alirezalei M. et al., 2011; Heidar R. et al., 2018; Hagar H. et al., 2015; Hasanzadeh-Moghadam M. et al., 2018), što je potvrđeno i u ovoj studiji gde je betain smanjio lipidnu peroksidaciju i nitrozativni stres, a povećao aktivnost antioksidativnih enzima. Betain je pokazao

antiinflamatorno dejstvo u jetri, što je potvrđeno i patohistološki i određivanjem ekspresije pro- i antiinflamatornih citokina u jetri. Antiinflamatorni efekti betaina su ispitivani na kulturama ćelija gde je pokazano da betain inhibiše oslobodjenje IL-1 β (Yaoyao X. et al., 2018). Takođe, betain smanjuje inflamatorni odgovor u masnom tkivu kod miševa na dijeti bogatoj mastima (Airaksinen K. et al., 2018). Antiapoptotsko dejstvo betaina, pokazano je u ovoj studiji kao još jedan dodatni efekat betaina na ublažavanje toka NAFLD smanjenjem genske ekspresije za Bax i povećanjem genske ekspresije za Bcl-2. Sličan efekat betaina je pokazan na životinjama sa podvezanim žučnim putevima, kao i na kulturi izolovanih hepatocita, gde je betain sprečio povećanje genske ekspresije za kaspaze 3, 8 i 9 (Graf D. et al., 2002). U jetri miševa na MCD dijeti tokom 6 nedelja došlo je do značajnog smanjenja autofagije. Kako autofagija predstavlja protektivni mehanizam uklanjanja oštećenih organela i ćelija, inhibicija ovog procesa u jetri doprinosi nakupljanju lipida. To su pokazale studije na knockout životinjama sa nedostatkom gena za autofagiju (Czaja M. et al., 2013; Kwanten W. et al., 2014). Još jedno značajno protektivno dejstvo betaina se ogleda u stimulaciji autofagije u jetri preko povećanja ekspresije gena Atg4, Atg5, Atg7 i Beclin1 kao i sadržaj fosforilisanog mTOR i p-Akt. Povećan broj autofagozoma u tkivu jetre potvrđen je i elektronskom mikroskopijom. Imajući u vidu ulogu autofagije u lipolizi (Singh et al., 2009), inhibiciji apoptoze (Marino et al., 2014), oksidativnog oštećenja (Filomeni et al., 2015), i inflamacije (Netea-Maier et al., 2016), možemo pretpostaviti da su ovi mehanizmi podstaknuti indirektno podsrestvom autofagije, kao i direktnim dejstvom betaina.

Prethodne studije su pokazale da rhNRG-1 sprečava razvoj fibroze u srcu, bubrežima, koži i plućima (Vandekerckhove L. et al., 2016; Vermeulen Z. et al., 2017). Antifibrogeni efekat NRG-1 na fibroblaste je posredovan ErbB4 receptorima (Vandekerckhove L. et al., 2016). Rezultati disertacije su pokazali izraženiju fibrozu jetre kod miševa tretiranim NRG-1, kao i povećanu ekspresiju profibrogenog faktora TGF- β u izolovanim hepatocitima tretiranim NRG-1. Nasuprot srcu, u jetri je značajno veća ekspresija ErbB3 receptora u odnosu na ErbB2 i ErbB4 (Campreciós G. et al., 2011; Scheving L. et al., 2016). Profibrogeni efekat NRG-1 u jetri se može objasniti prevasodno aktivacijom ErbB3 receptora, što je i u skladu sa rezultatima ove studije koji ukazuju na povećanu fosforilaciju ovih receptora u jetri nakon tretmana životinje NRG-1. Knockout miševi kojima nedostaje ErbB3 ili ErbB3/EGF receptor razvijaju manje izraženu

fibrozu nakon injekcije CCl₄ (Scheving L. et al., 2016), što govori u prilog tome da ovi receptori igraju značajnu ulogu u progresiji fibroze jetre.

D. Objavljeni ili saopšteni rezultati koji čine deo teze

1. **Stanković NM, Mladenović D, Djuričić I, Šobajić S, Timić J, Jorgačević B, Aleksić V, Vučević D, Ješić-Vukićević R, Radosavljević T.** Time-dependent changes and association between liver free fatty acids, serum lipid profile and histological features in mice model of NAFLD. *Arch Med Res* 2014; 45(2):116-124.
2. **Stankovic NM, Mladenovic D, Ninkovic M, Djuricic I, Sobajic S, Jorgacevic B, De Luka S, Jesic-Vukicevic R, Radosavljevic T.** The Effects of α -Lipoic Acid on Liver Oxidative Stress and Free Fatty Acid Composition in Methionine–Choline Deficient Diet-Induced NAFLD. *J Med Food* 2014; 17 (2): 254-261.

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Na osnovu analize priložene disertacije kao i publikovanih naučnih radova, članovi komisije smatraju da doktorska disertacija „Dejstvo betaina i neuregulina-1 na tkivne, ćelijske i molekularne promene na *in vivo* i *in vitro* modelima nealkoholne masne bolesti i fibroze jetre“ kandidata dr Milene Vesковиć u potpunosti ispunjava zakonom i Statutom Medicinskog fakulteta predviđene uslove u pogledu obima i naučnog značaja dobijenih rezultata.

Opisano poboljšanje steatoze, lipidnog statusa, molekularnih i biohemijskih parametara zapaljenja, apoptoze i autofagije na životinjskom modelu NAFLD ukazuje na hepatoprotektivno dejstvo betaina. Ovo je prva studija koja je ispitivala efekte betaina na tok i progresiju NAFLD preko višestrukih patogenetskih mehanizma i efekte NRG-1 na fibrogenezu u jetri na *in vivo* i *in vitro* modelima, što predstavlja originalan naučni doprinos ove doktorske disertacije.

Rezultati disertacije su u skladu sa rezultatima prethodnih studija kandidata i sličnih studija drugih autora na temu patogenetskih mehanizama NAFLD i fibroze jetre, publikovanih u vrhunskim međunarodnim časopisima. Ova disertacija čini osnovu za dalja istraživanja vezana

za poboljšanje sadašnje terapije NAFLD i fibroze jetre i evaluaciju patogenetskih mehanizama uključenih u razvoj, tok i progresiju nealkoholnog oštećenja jetre.

Stoga, na osnovu celokupne analize priloženog materijala, Komisija jednoglasno zaključuje da su, pored zakonskih, ispunjeni i svi ostali formalni uslovi i na osnovu toga predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta da usvoji pozitivnu ocenu i da odobri javnu odbranu doktorske disertacije „Dejstvo betaina i neuregulina-1 na tkivne, ćelijske i molekularne promene na *in vivo* i *in vitro* modelima nealkoholne masne bolesti i fibroze jetre“ kandidata dr Milene Vesković

U Beogradu, 17.12.2018.godine

Mentori:

Doc. dr Dušan Mladenović

Prof. dr Vincent Segers,
Universiteit Antwerpen

Članovi Komisije:

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Tatjana Radosavljević

Prof. dr Vladimir Trajković

Prof. dr Gilles De Keulenaer, Universiteit
Antwerpen

Prof. dr Vincent Segers, Universiteit Antwerpen