

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 15.03.2018. godine, broj 5940/15-MŽ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Uloga interakcije receptora za fibroblastni faktor rasta sa neuralnim ćelijskim  
adhezionim molekulom u fibrozi bubrega“**

kandidata dr **Maje Životić**, asistenta na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski, redovni profesor na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Imenovani članovi Komisije za ocenu završene doktorske disertacije su:

1. **Doc. dr Sanja Radojević Škodrić**, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Radomir Naumović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Gerhard Müller**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Göttingenu, Nemačka (Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität Göttingen), gostujući profesor (*visiting profesor*) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

**I Z V E Š T A J**

**A) PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija dr Maje Životić „Uloga interakcije receptora za fibroblastni faktor rasta sa neuralnim ćelijskim adhezionim molekulom u fibrozi bubrega“ napisana je na

engleskom jeziku, ima 114 stranica i sadrži 12 tabela i 43 slike (od čega su 3 šeme, 21 kompozitna slika sačinjena od mikrofotografija, 17 slika samo sa grafikonima, 2 kompozitne slike sačinjene od mikrofotografija i grafikona). Podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i reference. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

Poglavlje **UVOD** sadrži 23 stranice, a podeljeno je u 5 glavnih podnaslova. U uvodu je napravljen kratak osvrt na patofiziologiju i morfologiju intersticijske fibroze u bubregu, kao i uvid u molekularnu osnovu i mehanizme nastanka fibroze, sa posebnim akcentom na ulogu TGF- $\beta$  signalnog puta. Opisani su mnogobrojni efektorski proteini i mehanizmi aktivacije fibrogeneze posredovane TGF- $\beta$  ligandom. Prikazan je klinički značaj ispitivanja molekularne osnove intersticijske fibroze u bubregu, kao i do sada ispitane strategije za terapijska delovanja. Takođe, opisana je struktura i funkcija neuralnog ćelijskog adhezionog molekula (NCAM), a prikazani su i signalni putevi koji mogu biti aktivirani NCAM molekulom. U tom pogledu, opisane su homofilne NCAM-NCAM interakcije, kao i indukcija FGFR (receptor za fibroblastni faktor rasta) signalnog puta direktnom NCAM stimulacijom ovog receptora. Na kraju, dat je i osvrt na praktičan značaj NCAM-FGFR interakcija i potencijalnu ulogu u ranoj fazi intersticijske fibroze u bubregu. Time je otvoreno novo pitanje: mogućnost modulacije NCAM-FGFR interakcija i terapijski efekat na indukovani proces fibrogeneze u bubregu.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su precizno definisani i napisani na jednoj stranici doktorske disertacije. Definisana su 4 osnovna cilja koja su podrazumevala (1) ispitivanje kvantitativne povezanosti između NCAM eksprimirajućih intersticijskih ćelija sa stepenom intersticijske fibroze i patohistološkim nefrološkim dijagnozama na biopsijskim uzorcima, (2) utvrđivanje molekularnog profila NCAM eksprimirajućih intersticijskih ćelija u tkivu bubrega u pogledu prisustva proteina i nivoa ekspresije iRNK tri osnovne NCAM izoforme (NCAM-120, NCAM-140, NCAM-180), molekula koji mogu imati regulatornu ulogu u fibrozi bubrega (FGFR1, HE4,  $\alpha$ -SMA, MMP-2, MMP-9, SLUG, SNAIL, BMP 7, ALK 3), kao i molekula uključenih u TGF- $\beta$  signalni put (SMAD2, SMAD3), (3) upoređivanje nivoa iRNK ekspresije NCAM, FGFR1, ITGA5, ITGB1, RUNX1 i RUNX1T1 u tkivima bubrega bez i sa različitim stepenom intersticijske fibroze i poređenje nivoa genske ekspresije među različitim patohistološkim dijagnozama, i (4) ispitivanje uticaja TGF- $\beta$  liganda na migraciju ćelija, molekularni profil, nivo

i dinamiku ekspresije gena u TGF- $\beta$  tretiranim tubulskim epitelnim ćelijama (HK-2 ćelijska linija) u prisustvu i odsustvu FGFR inhibitora (PD173074) i upoređivanje sa kontrolnim (netretiranim) tubulskim epitelnim ćelijama - ispitivanje NCAM izoformi (NCAM-120, NCAM-140, NCAM-180), FGFR1 i FGFR2 (njihovih IIIb i IIIc izoformi), SLUG, SNAIL, TWIST 1, MMP-2, MMP-9, RUNX1, RUNX1T1, N-cadherina, E-cadherina, ITGA5, ITGB1,  $\alpha$ -SMA, SMAD2 i SMAD3.

Poglavlje **MATERIJAL I METOD** je napisano na 11 stranica. Ovo poglavlje je podeljeno na tri glavna podnaslova: 1) Humani uzorci bubrega; 2) Ćelijske kulture (HK-2 ćelijska linija); 3) Statistička analiza. U ovom poglavlju tabelarno (5 tabela) su prikazana antitela i prajmeri za qRT-PCR koji su korišćeni prilikom izrade doktorske disertacije.

#### 1) Humani uzorci bubrega

Na humanim biopsijskim uzorcima bubrega primenjene su imunohistohemijske i imunofluorescentne metode detekcije različitih molekula, kao i laserka mikrodisekcija koja je omogućila dobijanje populacije NCAM ekspimirajućih intersticijskih ćelija za dalja ispitivanja (nivo genske ekspresije različitih gena uključenih u proces modulacije fibroze u bubregu). U cilju procene obima NCAM ekspresije u intersticijumu bubrega urađeno je imunohistohemijsko bojenje na parafinskim isečcima, a u svrhu imunofenotipizacije ovih ćelija primenjena je metoda duple imunofluorescencije na kriostatskim isečcima. Imunomorfološka analiza urađena je na uzorku od 93 biopsije bubrega, nakon završene dijagnostičke procedure iz parafinskih kalupa i kriostatskih isečaka. Iz medicinske dokumentacije prikupljeni su klinički podaci o pacijentima i procenjen je stadijum hronične bubrežne insuficijencije (engl. Chronic kidney disease, *CKD*). Metodom laserske mikrodisekcije, iz kriostatskih isečaka, nakon imunohistohemijskog bojenja izdvojene su NCAM ekspimirajuće intersticijske ćelije, iz kojih je korišćenjem specijalno dizajniranog kita (*Arcturus PicoPure RNA isolation kit, Applied Biosystems*) izolovana iRNK i nakon reverzne transkripcije korišćena za procenu relativne ekspresije različitih gena (NCAM izoformi, FGFR1, HE4,  $\alpha$ -SMA, MMP-2, MMP-9, SLUG, SNAIL, BMP 7, ALK 3) baziranoj na metodi real-time PCR (engl. *polimerase chain reaction*). Ove analize urađene su korišćenjem iRNK NCAM ekspimirajućih ćelija dobijenih iz kriostatskih isečaka biopsija bubrega 16 pacijenata. Na humanim uzorcima tkiva bubrega ispitana je i relativna ekspresija NCAM,

FGFR1, ITGA5, ITGB1, RUNX1 i RUNX1T1 i prikazan je nivo ekspresije navedenih gena u tkivima bez i sa različitim stepenom intersticijske fibroze.

## 2) Ćelijske kulture (HK-2 ćelijska linija)

Opisana je detaljno eksperimentalna procedura *in vitro* TGF- $\beta$  indukovane epitelno mezenhimne transformacije (engl. Epithelial to mesenchymal transition, *EMT*) tubulskih epitelnih ćelija bubrega na HK-2 ćelijskoj liniji, kao i primena FGFR inhibitora (PD 173074) u cilju EMT modulacije. Opisano je praćenje morfoloških promena izgleda ćelija (optička mikroskopija), sposobnost migracije (*scratch assay* analiza) i promena genske ekspresije (*real-time* RT-PCR, imunofluorescentno bojenje) u različitim vremenskim intervalima nakon TGF- $\beta$  tretmana (od 0-96h), kao i u prisustvu FGFR inhibitora (PD 173074), kako bi se utvrdio efekat blokiranja FGFR signalnog puta na TGF- $\beta$  indukovanu EMT tubulskih epitelnih ćelija. Kontrolne grupe bile su nativna HK-2 ćelijska linija i HK-2 ćelijska linija kojoj je dodat FGFR inhibitor (PD 173074). Razvoj EMT evaluiran je optičko-mikroskopski (sticanjem morfoloških karakteristika, tj. pojava ćelija vretenastog oblika redukovane kohezivnosti) i metodama molekularne biologije (imunofluorescentno detektovanje prisustva i lokalizacije proteina uključenih u TGF- $\beta$  signalni put, kao i detektovanje kvantitativnih promena u ekspresiji gena – sticanje mezenhimnih karakteristika i karakteristika fibroblasta, kao i slabljenje ili gubitak svojstava karakterističnih za ćelije epitela).

## 3) Statistička analiza

Na poslednjoj stranici ovog poglavlja opisani su statistički testovi koji su korišćeni u svrhu procene značajnosti razlike i povezanosti među različitim varijablama, a u zavisnosti od broja ispitivanih grupa.

Originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju izneti su u poglavlju **REZULTATI**, koje sadrži 46 stranica. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljeni slikama, grafikonima i tekstualno kroz 6 glavnih podnaslova: 1) NCAM ekspimirajuće intersticijske ćelije u bubregu i fibroza bubrega; 2) Molekularni profil NCAM ekspimirajućih intersticijskih ćelija u bubregu; 3) Klinički značaj NCAM ekspimirajućih intersticijskih ćelija u bubregu; 4) TGF- $\beta$  nishodni efektorski proteini u uzorcima biopsija bubrega; 5) Nivo ekspresije gena – uzorci biopsija

bubrega sa intersticijskom fibrozom; 6) Efekti TGF- $\beta$  na proksimalne tubulske epitelne ćelije (HK-2 ćelijska linija) i modulacija ovih efekata primenom FGFR inhibitora

**DISKUSIJA** dobijenih rezultata napisana je jasno i pregledno na 17 stranica, upoređivanjem originalnih rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature.

Poglavlje **ZAKLJUČCI** je napisano na dve stranice doktorske disertacije gde su izdvojeni najvažniji rezultati studije.

U poglavlju **LITERATURA** citirana je 151 bibliografska jedinica iz referentnih međunarodnih časopisa.

## **B) KRATAK OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Značajan porast broja NCAM eksprimirajućih ćelija u intersticijumu bubrega detektovan je u početnoj fazi intersticijske fibroze (<25% tkiva zahvaćeno fibrozom), poređenjem sa uznapređovalijim stadijuma fibroze ( $p < 0.001$ ). Analizom 93 biopsijskih uzoraka različitih glomerulonefritisa i glomerulopatija, povećan broj NCAM ćelija uočen je kod 45.6% ispitanika i nalaz je bio nezavistan od patohistološke dijagnoze. Primenom qRT-PCR metode, korišćenjem iRNK dobijene iz NCAM+ ćelija prikupljenih laserskom mikrodisekcijom, uočeno je da NCAM+ ćelije u početnoj fazi fibroze imaju povećanu ekspresiju NCAM-140 izoforme ( $p = 0.006$ ), kao i da pojačano eksprimiraju  $\alpha$ SMA ( $p = 0.014$ ) i SLUG ( $p = 0.004$ ) gene. NCAM+ ćelije pokazivale se međusobno značajnu heterogenost, pri čemu su pojedine populacije ovih ćelija eksprimirale neke od molekula značajnih u procesu fibrogeneze, kao što je HE4. Međutim, prisustvo intersticijske ekspresije NCAM molekula nije imalo dugotrajan uticaj na tok i ishod bolesti bubrega, tako da ovaj parametar ne može biti korišćen kao prediktor pogoršanja ekskretorne funkcije bubrega. Štaviše, NCAM intersticijska imunoreaktivnost češće je detektovana kod pacijanata sa nižim vrednostima proteinurije. S obzirom na to da je TGF- $\beta$  glavni citokin uključen u proces fibrogeneze, imunomorfološkom detekcijom efektor ovog signalnog puta (SMAD proteini, SNAIL) uočili smo da je njihovo prisustvo značajno povezano sa morfološkim karakteristikama hroničnog oštećenja bubrežnog parenhima (tubulska atrofija i intersticijska fibroza), kao i da klinički korelira sa značajno višim vrednostima serumskog

kreatinina i uree, ali i sa sniženim vrednostima jačine glomerulske filtracije (eGFR), te sa razvojem hronične bubrežne insuficijencije i njene progresije u više CKD stadijume. SNAIL je, kao i SMAD2, bio povezan hroničnim lezijama u tubulointersticijumu i ishodom bolesti bubrega, ali je pored ovih obrazaca ispoljavanja uočena i značana detekcija ovog molekula u podocitima pacijenata sa nefrotskim vrednostima proteinurije. TGF- $\beta$ 1 indukovao EMT program u ćelijskoj liniji, morfološki je bio primetan 48h nakon stimulacije TGF- $\beta$ 1, ali su se jasni morfološki znaci EMT mogli uočiti tek 72h od započinjanja eksperimenta i bili su udruženi sa gubitkom ekspresije CDH1 (enkodira E-Cadherin) i sa transkripcionom indukcijom SNAI1 (enkodira SNAIL), SNAI2 (enkodira SLUG), TWIST1, MMP2, MMP9, CDH2 (enkodira N-Cadherin), ITGA5 (enkodira integrin- $\alpha$ 5), ITGB1 (enkodira integrin- $\beta$ 1), ACTA2 (enkodira  $\alpha$ -SMA) and S100A4 (enkodira FSP1). U toku rane, inicijalne faze EMT, već 24h nakon stimulacije TGF- $\beta$ 1 detektovana je jasna indukcija ekspresije sve tri NCAM izoforme (najviše NCAM-140 izoforme) kao i FGFR1, sugerišući mehanističku povezanost između NCAM/FGFR1 signalnog puta i indukcije EMT programa. Ove opservacije su dalje potkrepljene činjenicom da je EMT uspešno suprimiran kada se blokirao FGFR signalni put uz pomoć PD173074. Pored značajne inhibicije ekspresije mRNA i proteina značajnih u procesu EMT, FGFR inhibitor je takođe uspešno usporio migraciju ćelija koja je prethodno bila stimulirana TGF- $\beta$ 1 uticajem.

### **C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE**

NCAM/FGFR interakcije su opsežno analizirane u mnogim istraživanjima, pre svega u nervnom tkivu i kancerskim ćelijama (*Cavallaro U. 2011, Cavallaro U. 2001, Francavilla C. 2009, Christensen C. 2006, Kiselyov VV. 2005, Kochoyan A. 2008, Lehembre F. 2008*). Međutim, ne postoje dokazi o značaju ovih interakcija u toku procesa fibrogeneze, iako je nekoliko studija pokazalo da oba ova molekula (NCAM i FGFR) individualno mogu biti uključeni u proces fibroze (*Vanstherthem D. 2010, Nakatani K. 2006, Thannickal VJ. 1998*). Tako je FGFR receptor do sada ispitivan u mnogim patološkim procesima, uključujući i fibrozu. Međutim, dostupni literaturni podaci ukazuju da je potencijalna uloga NCAM molekula u procesu intersticijske fibroze pretpostavljena od strane samo dva istraživačka tima, našeg i

Vanstherthem i saradnika (*Vanstherthem D. 2010, Marković-Lipkovski J. 2015, Marković-Lipkovski J. 2007*).

NCAM i FGFR signalni putevi tokom razvoja EMT procesa opisani su u literaturi i primećeno da su oba molekula fundamentalna u toku EMT procesa u *in vitro* istraživanjima (*Cavallaro U. 2011, Cavallaro U. 2001, Zecchini S. 2011, Tomlinson DC. 2012, Lehembre F. 2008*). Štaviše, njihova povećana ekspresija u odgovoru na TGF- $\beta$  stimulaciju takođe je opisana u literaturi (*Miller MW. 2002, Roubin R. 1990, Stewart HJ. 1995, Thannickal VJ. 1998, Kanda T. 2003*). Međutim, značaj njihovih interakcija tokom EMT procesa u bubregu nije poznat, iako su NCAM i FGFR interakcije ispitivane u nekim onkološkim istraživanjima (*Zecchini S. 2011*).

Kako je TGF- $\beta$  indukovana EMT tubulskih epitelnih ćelija bubrega jedan od najboljih eksperimentalnih modela za incijalno ispitavanje uloge pojedinih molekula u procesu fibroze bubrega, a uzimajući u obzir da značaj NCAM/FGFR interakcija u fibrogenezi nije poznat, po prvi put, u ovoj doktorskoj disertaciji prikazan je funkcionalni značaj NCAM i FGFR interakcija u indukciji fibroze u bubregu, posredovanoj TGF $\beta$ -1 ligandom. Pored toga, primenom FGFR inhibitora, koji je do sada ispitivan u mnogim patološkim procesima, uključujući i intersticijsku fibrozu u srcu, rezultati ove doktorske teze ukazuju da su uspešno suprimirane mnogobrojne genotipske i fenotipske karakteristike ćelija koje su otpočele EMT proces kao odgovor na TGF $\beta$ -1 stimulaciju.

Imajući u vidu da je intersticijska fibroza patomorfološki supstrat narušavanja funkcije bubrega, a da se javlja kod mnogih, etiološki raznovrsnih oboljenja bubrega, ulažu se veliki naponi u otkrivanju signalnih puteva i medijatora uključenih u ovaj proces, a sve više studija ispituje različite supstance koje mogu imati antifibrotski efekat (*Zeisberg M. 2015*). Po prvi put, o ovoj doktorskoj disertaciji pokazana je direktna mehanistička povezanost NCAM i FGFR molekula u incijalnoj fazi EMT procesa proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija bubrega, a ispitan je i klinički značaj detektovanja efektorskih proteina TGF- $\beta$ 1 signalnog puta u biopsijama bubrega ukazujući na povezanost ovog molekularnog mehanizma sa oslabljenom ekskretornom funkcijom bubrega i razvojem hronične bubrežne insuficijencije. Kako je aberantna NCAM i FGFR ekspresija podjednako zastupljena među različitim oboljenjima bubrega, a u vezi sa pojavom ranog stadijuma intersticijske fibroze (*Marković-Lipkovski J, 2015*), a uzimajući u obzir i činjenicu da je glavni TGF- $\beta$ 1 incijator procesa fibrogeneze u bubregu, rezultati ove doktorske

teze mogli bi imati značajnog uticaja na buduća istraživanja i uticati na implementaciju FGFR inhibitora u terapijske svrhe.

S obzirom da na to da rezultati ove doktorske teze ukazuju da su NCAM i FGFR molekuli najraniji pokazatelji indukcije (rane faze) intersticijske fibroze u bubregu, kao i da uspešno blokiranje ovih interakcija primenom FGFR inhibitora (PD173074) suprimira proces fibroze u *in vitro* modelu, prikazan je novi patogenetski mehanizam aberantnog EMT procesa i čime su definisane nove mete za ciljna terapijska deovanja. Kako je efikasnost FGFR inhibitora (PD173074) do sada već ispitana u mnogim neoplastičnim i ne-neoplastičnim oboljenjima, a uzimajući u obzir i činjenicu da je ovaj molekul već klinički testiran, rezultati ove teze proširuju naša saznanja u pogledu uloge NCAM/FGFR signalnog puta u indukciji EMT procesa i fibroze u bubregu. Stoga bismo mogli reći da bi specifična inhibicija NCAM/FGFR signalnog puta mogla imati podjednako dobar efekat u tretmanu oboljenja bubrega udruženih sa aberantnim EMT procesom.

#### **D) OBJAVLJENI RAD KOJI ČINI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

Marković-Lipkovski J\*, Životić M\*, Müller CA, Tampe B, Ćirović S, Vještica J, Tomanović N, Zeisberg M, Müller GA. Variable expression of neural cell adhesion molecule isoforms in renal tissue: possible role in incipient renal fibrosis. PLoS One 2015; 10(9): e0137028. (\*- *equal authors contribution, shared first authorship*) [M21, IF 3.535]

#### **E) ZAKLJUČAK (OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE)**

Doktorska disertacija dr Maje Životić se odnosi na ispitivanje uloge NCAM molekula u intersticijskoj fibrozi bubrega, kao i ispitivanje interakcije ovog molekula sa receptorom za fibroblastni faktor rasta (FGFR) u *in vitro* modelu fibroze bubrega. Poseban doprinos ove disertacije ogleda se u prikazanom mehanizmu modulacije NCAM/FGFR interakcije primenom FGFR inhibitora (PD173074).

Istraživanjem je pre svega prikazano da se povećana NCAM ekspresija u intersticijumu bubrega javlja u početnoj fazi fibroze, te je pretpostavljeno da ovaj molekul može imati regulatornu ulogu u toku procesa fibrogeneze. Stoga su sprovedeni mnogobrojni eksperimenti na



ćelijskim kulturama koji su dalje potvrdili značaj NCAM i FGFR molekula u modelu fibroze bubrega. Sveobuhvatno, najvažniji rezultati ukazuju na izraženu indukciju NCAM ekspresije u početnim fazama intersticijske fibroze i značaj NCAM/FGFR interakcija u inicijaciji procesa fibroze koja bi mogla biti uspešno suprimirana inhibicijom ovog signalnog puta primenom FGFR inhibitora (PD173074), čime bi mogle biti otvorene nove mogućnosti za terapijska delovanja kod nefroloških bolesnika.

Komisija zaključuje da je istraživanje sprovedeno u skladu sa najvišim metodološkim standardima, uz integrisan kliničko-patološki pristup problemu. Disertacija je napisana jasno, rezultati detaljno izneti, ciljevi i zaključci jasno definisani, uz relevantan literaturni pregled i kritički osvrt na svoja i tuđa iskustva.

Na osnovu navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom veću da prihvati priloženu disertaciju Asist. dr Maje Životić pod naslovom **”The role of interaction between fibroblast growth factor receptor and neural cell adhesion molecule in renal fibrosis”** („Uloga interakcije receptora za fibroblastni faktor rasta sa neuralnim ćelijskim adhezionim molekulom u fibrozi bubrega“) i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 16.03.2018. godine

Mentor:

---

Prof. dr Jasmina Marković-Lipkovski

Članovi Komisije:

---

Prof. dr Gerhard Müller

---

Prof. dr Radomir Naumović

---

Doc. dr Sanja Radojević Škodrić