

# Imunohistokemijska lokalizacija ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i FGFR2 tijekom razvoja fetalnog bubrega čovjeka

---

Šimac, Paola

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:936459>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Paola Šimac

Imunohistokemijska lokalizacija ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i  
FGFR2 tijekom razvoja humanog fetalnog bubrega

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Paola Šimac

Imunohistokemijska lokalizacija ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i  
FGFR2 tijekom razvoja humanog fetalnog bubrega

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Medicinskom fakultetu u Splitu, na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, pod mentorstvom redovne profesorice Katarine Vukojević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Želim se zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Katarini Vukojević red. prof. na stručnim i korisnim savjetima, korekciji rada i ugodnim trenutcima provedenim u laboratoriju tijekom istraživanja, te cijelom osoblju Laboratorija za istraživanje ranog razvoja čovjeka, na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, na Medicinskom fakultetu u Splitu, naročito doktorandici Aniti Racetin na pruženoj pomoći.

Posebnu zahvalu upućujem suvoditeljici doc. dr. sc. Romani Gračan na stručnim i inspirativnim predavanjima za vrijeme mog fakultetskog obrazovanja te za savjetovanje, oblikovanje rada i strpljenje koje je imala za mene.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, kolegama i prijateljima, a najljepšu zahvalu i posvetu ovog diplomskog rada upućujem svojoj mami Sanji, tati Srđanu i bratu Karlu za iznimnu podršku i ljubav.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### IMUNOHISTOKEMIJSKA LOKALIZACIJA EKSPRESIJE FAKTORA RASTA VEGF, FGFR1 I FGFR2 TIJEKOM RAZVOJA HUMANOG FETALNOG BUBREGA

Paola Šimac

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Osnovni cilj ove studije je imunohistokemijski ispitati ekspresiju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i receptora fibroblastnog čimbenika rasta 1 i 2 (FGFR1 i 2), u fetalnim bubrezima kako bi se utvrdila prostorna (glomeruli, proksimalni i distalni kanalići) i vremenska (od 18. do 37. tjedna razvoja) distribucija ekspresije navedenih čimbenika kao potencijalnih determinanti razvoja bubrega. Tkivo fetalnog bubrega uklopljeno u parafin i analizirano metodom imunofluorescencije pomoću antitijela na VEGF, FGFR1 i FGFR2. Podaci su analizirani različitim testovima: „Kruskal-Wallis“, „Dunn's Multiple Comparison“, „Tamhane's T2 multiple comparisons“, „Brown-Forsythe ANOVA“, „Welch's ANOVA“ testom i testom za linearni trend. VEGF, FGFR1 i FGFR2 su eksprimirani tijekom svih istraživanih tjedana razvoja fetalnog bubrega što potvrđuje njihov utjecaj i u ranijim i u kasnijim stadijima. Također je dokazana njihova kolokalizacija (prekrojanje). Uočeno je smanjenje ekspresije svih čimbenika, u svim tkivima, od 18. prema 37. tjednu razvoja i testovima je dokazana prisutnost statistički značajne razlike među pojedinim tjednima i pojedinim tkivima. Prisutnost VEGF, FGFR1 i FGFR2 tijekom razvoja humanog fetalnog bubrega dokazuje njihovu potencijalno bitnu ulogu u formiranju organa i funkciji istog. U budućnosti bi se trebalo više posvetiti istraživanju uloge ovih molekula u glomerulima, proksimalnim i distalnim zavijenim kanalicima.

(48 stranica, 22 slika, 12 tablica, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** razvoj bubrega; faktori rasta; VEGF; FGFR1; FGFR2

**Voditelj:** dr. sc. Katarina Vukojević, redovni profesor

**Suvoditelj:** dr. sc. Romana Gračan, docentica

**Ocjenitelji:** dr. sc. Romana Gračan doc., dr. sc. Ana Galov izv. prof., dr. sc. Petra Peharec Štefanić doc.

**Zamjena:** dr. sc. Sofia Ana Blažević doc.

**Rad prihvaćen:** 07. siječnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GROWTH FACTORS VEGF, FGFR1 AND FGFR2 EXPRESSION DURING HUMAN FETAL KIDNEY DEVELOPMENT

Paola Šimac

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

The aim of this study is to immunohistochemically examine the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 (FGFR1 and 2), in fetal kidneys to determine spatial (glomeruli, proximal and distal ducts) and temporal (from 18th to 37th week of development) expression of these factors as potential determinants of kidney development. Fetal kidney tissue embedded in paraffin was stained with VEGF, FGFR1 and FGFR2 antibodies by double immunofluorescence. Data were analyzed by various tests: Kruskal-Wallis, Dunn's Multiple Comparison, Tamhane's T2 multiple comparisons, Brown-Forsythe ANOVA, Welch's ANOVA test and the Linear Trend Test. VEGF, FGFR1 and FGFR2 were expressed during all of the studied weeks of fetal kidney development, confirming their impact at both earlier and later stages. Their co-localization has also been proven. A decrease in the expression of all factors, in all tissues, over time was observed and the presence of a statistically significant difference between weeks and tissues was demonstrated by tests. The presence of VEGF, FGFR1 and FGFR2 during the development of human fetal kidney proves their potentially important role in organ formation and function. In the future, more attention should be devoted to investigating the role of these factors in glomeruli, proximal and distal convoluted ducts.

(48 pages, 22 figures, 12 tables, 32 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

**Key words:** kidney development; growth factors; VEGF; FGFR1; FGFR2

**Supervisor:** Dr. Katarina Vukojević, Prof.

**Co-supervisor:** Dr. Romana Gračan, Asst. Prof.

**Reviewers:** Dr. Romana Gračan, Asst. Prof., Dr. Ana Galov, Assoc. Prof., Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

**Backup reviewer:** Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

**Thesis accepted:** January 07, 2020

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Bubrež .....	1
1.1.1. Embrionalni razvoj bubrega .....	2
1.1.2. Funkcija bubrega .....	5
1.2. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF).....	6
1.2.1. Izoforme VEGF .....	6
1.2.2. Regulacija ekspresije .....	7
1.2.3. Receptori endotelnog faktora rasta (VEGFR) .....	7
1.2.4. Uloga u patogenim stanjima.....	9
1.3. Fibroblastni faktor rasta (FGF).....	10
1.3.1. Potporodice FGF .....	10
1.3.2. Receptori fibroblastnog faktora rasta (FGFR).....	11
1.3.3. Izoforme receptora.....	13
1.3.4. Patogeneza.....	14
1.4. Glavni cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE.....	15
2.1. Sakupljanje humanih materijala .....	15
2.2. Imunohistokemijsko i imunofluorescencijsko bojenje .....	15
2.3. Prikupljanje podataka .....	16
2.4. Statistička analiza .....	16
2.5. Etička načela.....	17
3. REZULTATI .....	18
3.1. Ekspresija faktora rasta tijekom 18. razvojnog tjedna.....	18
3.2. Ekspresija faktora rasta tijekom 25. razvojnog tjedna.....	20
3.3. Ekspresija faktora rasta tijekom 28. razvojnog tjedna.....	22
3.4. Ekspresija faktora rasta tijekom 29. i 30. razvojnog tjedna.....	24
3.5. Ekspresija faktora rasta tijekom 37. razvojnog tjedna.....	26
3.6. Statistička analiza Kruskal-Wallis testa .....	29
3.7. Statistička analiza Dunn's Multiple Comparison testa .....	30
3.8. Dodatni statistički testovi .....	35
4. RASPRAVA.....	40
5. ZAKLJUČAK .....	44



6. LITERATURA .....	45
7. ŽIVOTOPIS .....	48

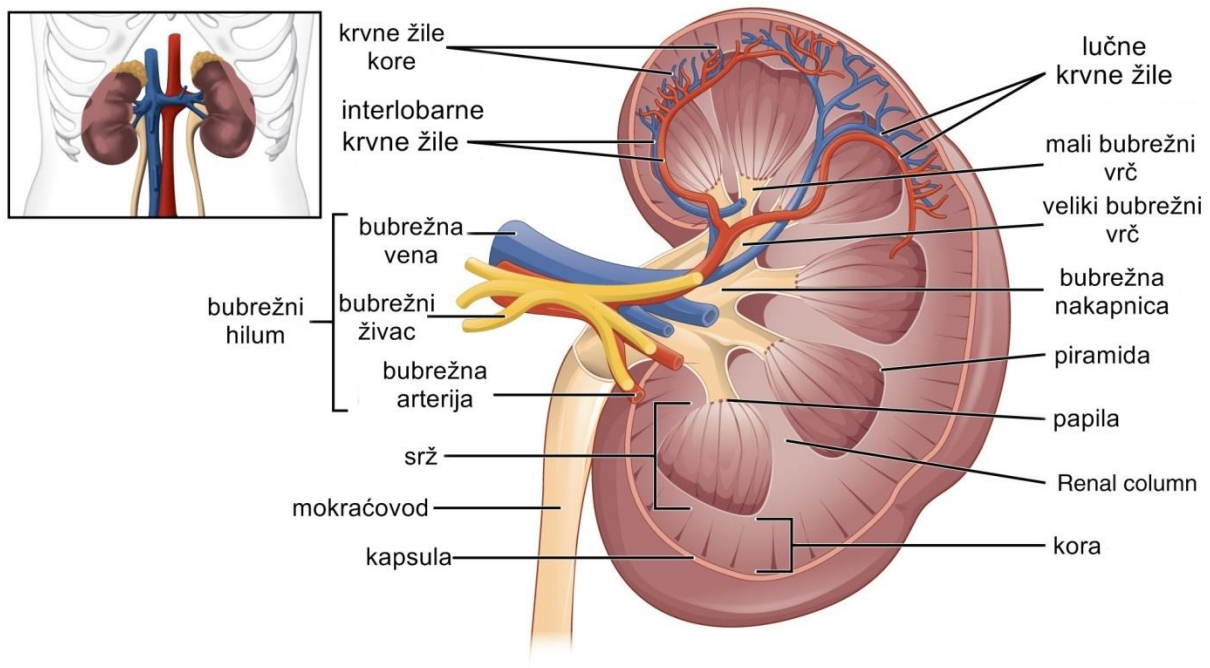
# 1. UVOD

## 1.1. Bubrežni

Bubreg je parni žljezdani organ u kralježnjaka koji iz krvi izlučuje mokraću. Tijekom razvoja embrija bubrezi se najprije nalaze u predjelu zdjelice, a smanjenjem zakrivljenosti embrija i rastom tijela u slabinskom i križnom području se pomiču prema gornjem dijelu trbuha što se naziva „uspinjanje bubrega“ (*ascensus renis*). Tijekom uspinjanja u njega urastaju arterije viših razina, a niže žile obično propadaju (Hill 2011). U odraslog čovjeka nalaze se s obje strane kralježnice u trbušnoj šupljini, iza potrbušnice, približno u visini 12. rebra. Oblikom su nalik zrnju graha i jedan su prema drugomu okrenuti konkavnom stranom na kojoj se nalazi bubrežni hilus, mali uvučeni otvor kroz koji ulaze arterije, a izlaze mokraćovod (ureter) i vene. Obavijeni su masnom čahuricom koja im održava stalnu toplinu i štiti ih od mehaničkih oštećenja, a na gornjem polu svakoga bubrega leži nadbubrežna žlijezda.

Građeni se od kore i moždine (srži). Moždinu (medulu) oblikuju tvorbe nalik piramidama načinjene od bubrežnih kanalića, koje su međusobno odvojene izdancima bubrežne kore (korteksa). Njihovi vrškovi (papile) obavijeni su bubrežnim vrčevima (*calices renales*) i usmjereni koncentrično pa se slijevaju u bubrežnu nakapnicu (*pelvis renalis*), koja prelazi u mokraćovod. Bubrežna kora je zrnata izgleda zbog velikog broja bubrežnih (Malpighijevih) tjelešaca, mjehurića veziva sa svitkom krvnih kapilara (glomeruli), obavijenih epitelom (Bowmanovom čahuricom); od njih se nastavlja sustav kanalića koji se udružuju u izvodne kanale i izljevaju u bubrežne vrčeve. Bubrežno tjelešce i pripadni kanalići tvore osnovnu funkcionalnu jedinicu bubrega, nefron; svaki bubreg sadrži oko 1,2 milijuna nefrona.

Kroz bubreg protječe velika količina krvi (oko 1,2 L/min), koja se ondje filtrira. Veći dio izlučene vode (zajedno s tvarima potrebnima organizmu: glukozom, aminokiselinama, elektrolitima) ponovno se apsorbira, a manji se dio zajedno s otpadnim tvarima skuplja u bubrežnoj čašici i kao mokraćna odlazi u mokraćovod. Konačno nastaje oko 1,5 L mokraćne na dan. Glavne funkcije bubrega su održavanje acidobazične ravnoteže, čišćenje krvi od metaboličkih otpadnih tvari, održavanje stalnoga volumena krvi i koncentracije elektrolita utjecajem na promet vode i soli, regulacija arterijskoga krvnog tlaka i lučenje nekih hormona (eritropoetin, koji pobuđuje nastajanje crvenih krvnih stanica, renin i neki drugi koji utječu na krvni tlak). Rad bubrega također nadziru hormoni, antidiuretski hormon (ADH) i aldosteron. Ako je jedan bubreg oštećen ili uklonjen, drugi može preuzeti njegovu funkciju. Pri teško oštećenoj funkciji oba bubrega bolesnik se može održati na životu hemodijalizom ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)).



**Slika 1.** Prikaz građe bubrega (preuzeto s web stranice: <https://www.openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/25-3-gross-anatomy-of-the-kidney>)

### 1.1.1. Embrionalni razvoj bubrega

Bubrezi kod čovjeka počinju se razvijati u prvom tromjesečju trudnoće. Tijekom embrionalnog razvoja nastaju tri različite generacije bubrega: pronephros (predbubreg - rudimentaran), mesonephros (prabubreg - izlučuje kratko vrijeme) i metanephros (definitivni bubreg - dalje se razvija i izlučuje mokraću) (Rosenblum i sur. 2017).. Sve tri generacije nastaju od intermedijarnog mezoderma (Stevanović 2017).

#### **Pronefros**

Pronefros se razvija trećeg tjedna gestacije (Saxén 1987). Sastoji od 7 do 10 nakupina stanica (nefrotoma) (Rosenblum i sur. 2017) koji se diferenciraju u nekoliko poprečno postavljenih rudimentarnih kanalića koji nestanu prije nastanka donjih nefrotoma (Saxén 1987). Pronefros se kod čovjeka ne formira potpuno i nije funkcionalan (Stevanović 2017) te se već krajem četvrtog tjedna potpuno gubi (Saxén 1987).

## Mezonefros

Mezonefros se razvija kaudalno od pronefrosa, 4. do 10. gestacijskog tjedna. U mezonefrosu se formira i do 40 parova kanalića koji formiraju petlje. Na medijalnom slijepom početnom kraju kanalići formiraju proširenje (Bowmanova čahura) u kojem grane dorzalne aorte stvaraju glomerule. Čahura i glomerul čine bubrežno tjelašće; bubrežno tjelašće i nefrični tubul grade nefron - ekskretornu jedinicu mezonefrosa. Na lateralnom kraju kanalića sa otvaraju u primarni mokraćni, tj. Wolffov kanal (Stevanović 2017) te se ulijeva u kloaku. Tijekom drugog mjeseca mezonefros je velik parni organ. S njegove medijalne strane stvara se osnova spolne žlijezde, pa oba organa, kao urogenitalni nabor, izlučuju u celom. Dok se donji kanalići diferenciraju, gornji zajedno s glomerulima iščezavaju iako se kod muškog spola nekoliko njih održava zajedno s kanalom mezonefrosa i sudjeluju u nastajanju muškog spolnog organa (Hill 2011). Kod muškaraca od Wolffovog (mezonefričnog) kanala nastaju: *ductus epididymis*, *ductus deferens*, *ductus ejaculatorius* i *vesicula seminalis*. Kod muškaraca i kod žena iz kaudalnog dijela mezonefričnog kanala izrasta mokraćovodni pupoljak koji će dati osnovu za razvitak mokraćovoda i sabirnog sustava metanefrosa (Stevanović 2017).

## Metanephros ili definitivni bubreg

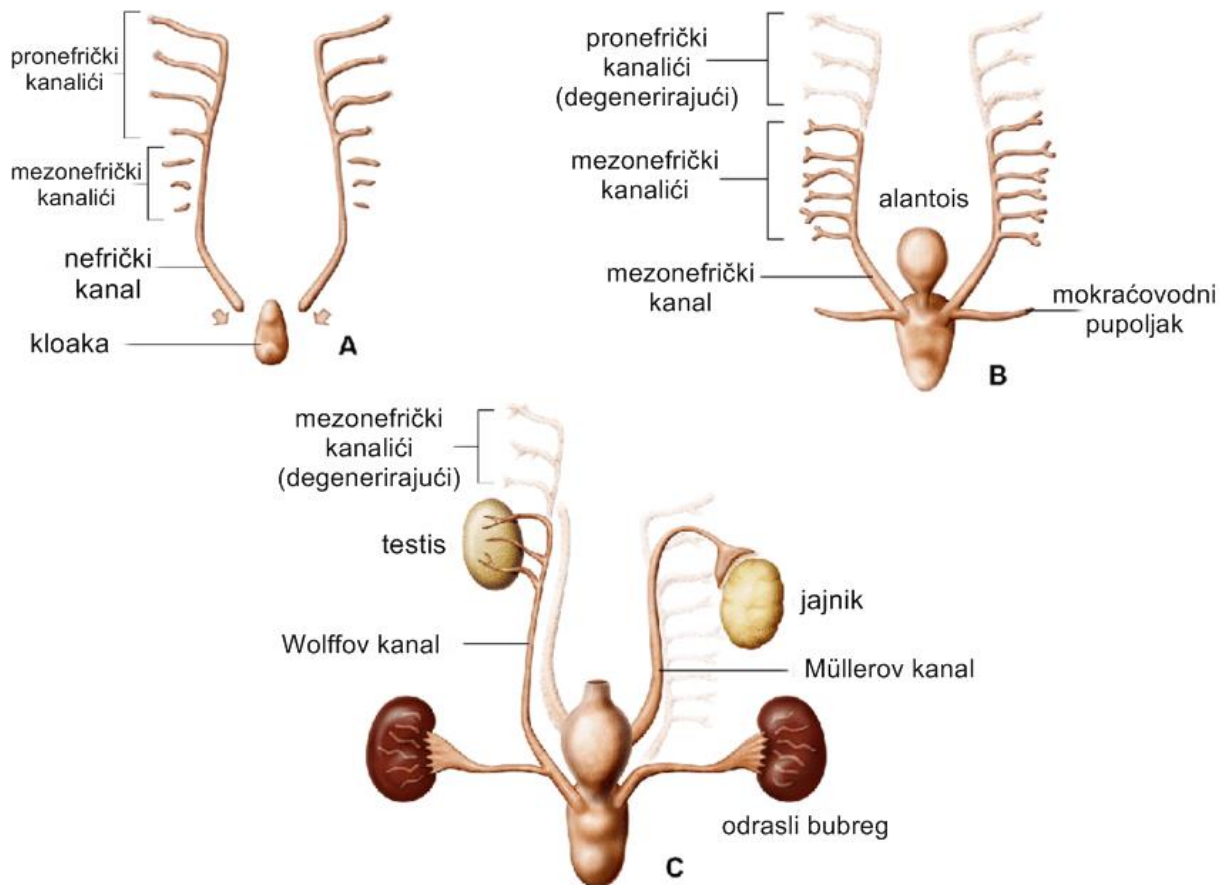
Metanephros se pojavljuje u petom tjednu te se iz njega kasnije stvara definitivni ili trajni bubreg. Dolazi do dva različita događaja: sustav sabirnih kanalića nastaje od metanefrogenog mezoderma na isti način kao u mezonefrosu (Hill 2011), dok iz mokraćovodnog pupoljka nastaju mokraćovod (ureter), bubrežna nakapnica (*pelvis renalis*), velik bubrežni vrčevi (*calyces renales majores*) i mali bubrežni vrčevi (*calyces renales minores*).

Degeneriranjem mezonefrosa stvara se metanefrički (Wollfov) kanal (Rosenblum i sur. 2017). iz kojeg kasnije, kao što je već rečeno, nastaju dijelovi muškog spolnog sustava, dok kod žena u potpunosti iščezava. Njegovim ispupčenjem nastaje mokraćovodni pupoljak koji je okružen metanefrogenim mezenhimom. Metanefrogeni mezenhim šalje signale koji potiču daljnje produljenje mokraćovodnog pupoljka te prodiranje u sami metanefrički mezenhim, gdje se naknadno grana na način da formira visoko razgranati sustav sabirnih kanala (Treub i sur. 2013).

Distalni kraj pupoljka proširi se i čini primitivnu bubrežnu nakapnicu, a zatim se podijeli u buduće velike bubrežne vrčeve. Prodiranjem u metanefrogeno tkivo svaki se vrč podijeli u dva nova pupoljka, koji se nastavljaju dijeliti sve dok ne nastane 12 ili više generacija kanalića. Kanalići druge generacije se povećavaju i apsorbiraju kanaliće treće i četvrte generacije i tako nastanu mali bubrežni vrčevi. Tijekom daljnjeg razvoja odvodni (sabirni) kanalići pete i sljedećih generacija se izdužuju i teku prema malom bubrežnom vrču te tako nastaje bubrežna piramida. Zaključno, od mokraćovodnog pupoljka nastaju: mokraćovod, nakapnica, veliki i mali bubrežni vrčevi i 1-3 milijuna odvodnih kanalića (sabirnih cjevčica) bubrega (Hill 2011).

Istovremeno mokraćovodni pupoljak otpušta signale koji potiču kondenzaciju metanefričkog mezenhima oko vrhova pupoljka (Treub i sur. 2013) te se to tkivo naziva kapa metanefrogenog tkiva. Indukcijskim utjecajem kanalića stanice u kapi stvaraju male bubrežne mjehuriće (vezikule) (Hill 2011). U stadiju ranog renalnog vezikula, distalni dijelovi početnih nefrona fuziraju s mokraćovodnim vrhovima kako bi formirali granični odvodni sustav. Zatim se vezikuli produljuju i formiraju tijela u obliku zarez, koji se naknadno formiraju u tijela oblika slova S. Proksimalni dijelovi tog tijela se diferenciraju u podocyte i Bowmanovu čahuru i konačno postanu prokrvljeni (Treub i sur. 2013). Takvim harmoniziranim razvojem Bowmanove čahure zajedno s kapilarama nastaje glomerul (Kitamoto i sur. 1997). Prvi glomeruli formiraju se 9.-10. tjedna gestacije (Rosenblum i sur. 2017). Distalni se dijelovi diferenciraju u tubule nefrona. Svaki slobodni kraj kanalića obuhvati glomerul te oni zajedno čine osnovu za nefron ili sekrecijsku jedinicu bubrega. Proksimalni kraj osnove nefrona čini Bowmanova čahura, a distalni kraj se spoji s odvodnim kanalićem stvarajući put od Bowmanove čahure do sustava odvodnih kanala bubrega. Proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić nastaju izduživanjem i savijanjem sekretnog kanalića (Hill 2011). Ti kanalići postanu dalje segmentirani u proksimalnu tubularnu domenu, Henleovu petlju i distalnu tubularnu domenu te na taj način nastaje nefron. Indukcija i sazrijevanje nefrona je konstantan proces koji se odvija u kortikalnoj regiji bubrega u razvoju (Treub i sur. 2013). Tijekom kasnog drugog i trećeg tromjesečja eksponencijalni je rast nefrona između 18. i 32. tjedna. Razvoj nefrona je potpun između 32. i 36. tjedna (Rosenblum i sur. 2017). Nefroni se stvaraju do rođenja te ih je tada u svakom bubregu prisutno oko milijun. Zaključno, bubreg se razvija od metanefrogenog tkiva od kojeg nastaju nefroni te od mokraćovodnog pupoljka od kojeg nastaje sustav odvodnih kanala.

Proizvodnja mokraće započinje rano tijekom trudnoće, ubrzo nakon diferencijacije kapilara glomerula. Nakon rođenja nefroni nastavljaju rasti, ali se njihov broj ne povećava (Hill 2011).



**Slika 2.** A) Pronefros (pronefrički kanalići i kanal) i formiranje mezonefrosa, B) Iščezavanje pronefrosa, formiran mezonefros (metanefrički kanalići i kanal) i ispupčenje mezonefrosa (mokraćovodni pupoljak), C) Iščezavanje mezonefrosa, kod muškaraca nastaju testisi iz istog, dok kod žena potpuno iščezava. Stvaranje definitivnog bubrega tj. metanefrosa (Seely 2017).

### 1.1.2. Funkcija bubrega

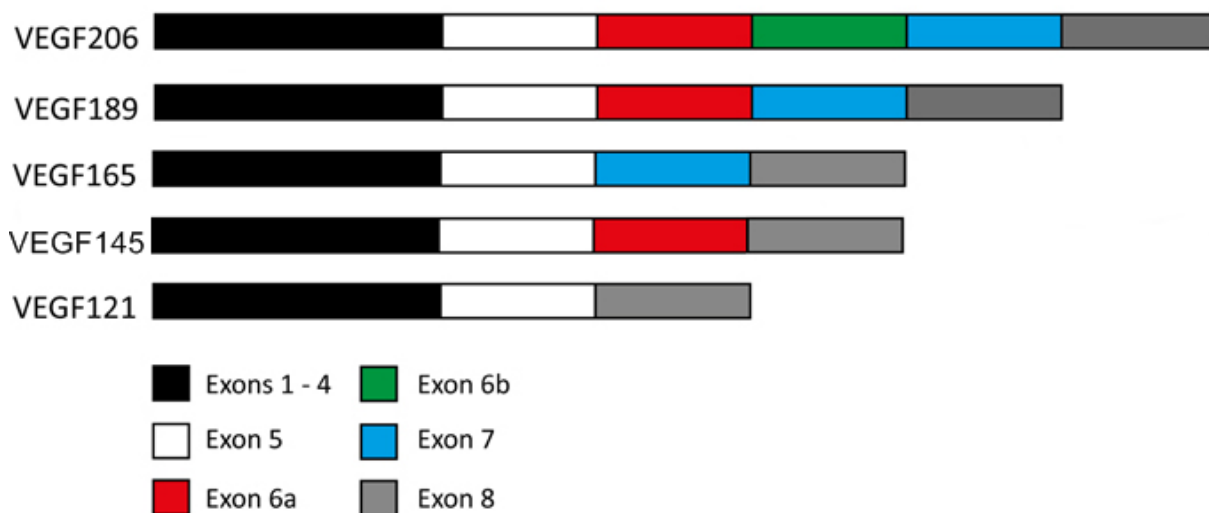
Bubreg sisavaca počinje funkcionirati formiranjem urina u ograničenom volumenu prije rođenja. Fetalni bubreg sadrži urin do četvrtog mjeseca gestacije, koji se u velikoj količini otpušta u amnionsku tekućinu, što pokazuje progresivno povećanje koncentracije uree i mokraćne kiseline, vjerojatno urinarnog porijekla. Prvi rijetko prekoračuje 50 mg/100 cm<sup>3</sup>., vjerojatno zbog njegove difuzibilnosti; kasnije može akumulirati od 40 do 50 mg/100 cm<sup>3</sup>. Osmotski tlak amnionske tekućine kroz vrijeme opada što ukazuje da je do neke mjere osmotski izoliran od fetusa i od majke te da može utjecati na akumulaciju fetalnog hipotoničnog urina. Urin novorođenog djeteta je generalno kiseo i sadrži nisku koncentraciju normalnih urinarnih sastojaka. Albumin je često prisutan i nastavlja se izlučivati u malim količinama tijekom prvog tjedna života. Bubrežna funkcionalnost nije bitna fetusu sve dok placenta normalno funkcionira, što govori da fetus može preživjeti bez bubrega do rođenja (Smith i Library 1992).

## 1.2. Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)

VEGF (*engl.* vascular endothelial growth factor) je angiogeni citokin (Kitamoto i sur. 1997), visoko specifičan mitogen za vaskularne endotelne stanice (Neufeld i sur. 1999) koji pripada *VEGF/PDGF* (*engl.* platelet-derived growth factor, trombocitni faktor rasta) nadporodici gena (Majumder i Advani 2017). Esencijalan je za diferencijaciju endotelnih stanica (vaskularogenezu) i za nastajanje novih kapilara iz već postojećih (angiogeneza) (Kim i Goligorsky 2003), naročito tijekom embriogeneze. VEGF inducira proliferaciju stanica endotela, potiče migraciju stanica i inhibira apoptozu (Neufeld i sur. 1999) te također olakšava vazodilataciju i povećava vaskularnu permeabilnost (Majumder i Advani 2017). Njegova sekrecija varira obzirom na stadije razvoja (Kitamoto i sur. 1997). Dokazano je da je VEGF faktor preživljavanja koji omogućava stanicama da prežive i proliferiraju u uvjetima ekstremnog stresa (Kim i Goligorsky 2003), tako što sprječava apoptozu (Neufeld i sur. 1999). VEGF je dominantno eksprimiran na endotelnim stanicama kao efektorski sustav, ali također i u glomerulima fetalnih i odraslih bubrega. Glomerularne epitelne stanice (GEC, *engl.* glomerular epithelial cells) identificirane su kao proizvođači VEGF. Prisutan je i u tubulima, distalnim i proksimalnim kanalićima te sabirnoj cijevi, ali njegova uloga u njima je manje istražena (Kim i Goligorsky 2003).

### 1.2.1. Izoforme VEGF

Pet je članova porodice VEGF (*VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* i *PlGF* (*engl.* placental growth factor)) u genomu sisavaca (Park i sur. 2018), koji se razlikuju u biološkim svojstvima kao što je sposobnost vezivanja na površinu heparin-sulfat proteoglikana (Neufeld i sur. 1999). Postoji još jedan član, *VEGF-E*, koji je kodiran određenim virusima te njegov gen nije u ljudskom genomu (Majumder i Advani 2017). Alternativnim prekrajanjem primarnih RNA transkripata VEGF porodice gena nastaju različite izoforme. Na primjer, ljudski *VEGF-A*, koji je najviše istraživani, označen je kao *VEGF-A<sub>121</sub>*, *VEGF-A<sub>145</sub>*, *VEGF-A<sub>165</sub>*, *VEGF-A<sub>189</sub>* i *VEGF-A<sub>206</sub>* (Park i sur. 2018) koji imaju 121, 145, 165, 189 odnosno 206 aminokiselina (Feffara i sur. 2003) (Slika 3.).



**Slika 3.** Humane izoforme gena *VEGF-A* nastale alternativnim prekrajanjem (Danastas i sur. 2015)

### 1.2.2. Regulacija ekspresije

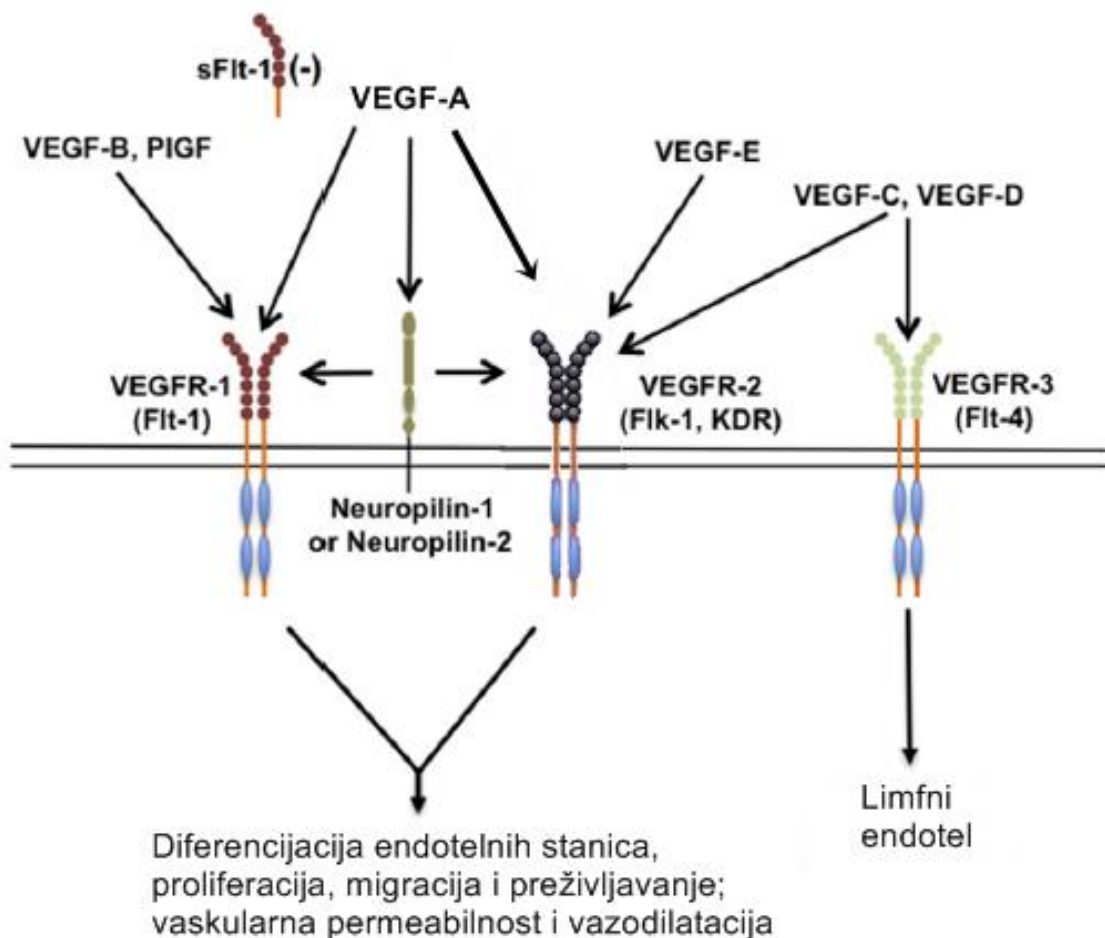
Ekspresija VEGF regulirana je različitim stanjima i molekulama. Smatra se da je hipoksija (niska razina kisika u stanicama i tkivima) ključni regulator (Ferrara i sur. 2003) koji regulaciju provodi induciranjem transkripcije VEGF mRNA te stabilizacijom iste (Kim i Golgorsky 2003). Ekspresija je također regulirana različitim stimuliranim citokinima, faktorima rasta, gonadotropinima te onkogenima koji direktno mogu modulirati angiogenezu mijenjajući ekspresiju VEGF u specifičnim stanicama i tako potaknuti indirektnu angiogenezu ili anti-angiogeni efekt. Neki od njih su FGF-4 (fibroblastni faktor rasta-4), PDGF (*engl.* platelet-derived growth factor-trombocitni faktor rasta), TNF- $\alpha$  (faktor nekroze tumora- $\alpha$ ), TGF- $\beta$  (transformirajući faktor rasta- $\beta$ ), KGF (keratinocitni faktor rasta) (Neufeld i sur. 1999) te interleukini IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-10, IL-13 (Ferrara i sur. 2003). Isto tako, ekspresija može biti regulirana i visokom razinom glukoze, kada stanice postanu nefunkcionalne (Kim i Golgorsky 2003).

### 1.2.3. Receptori endotelnog faktora rasta (VEGFR)

VEGF i njegov sustav receptora (VEGFR) imaju izrazito bitnu ulogu u regulaciji angiogeneze i limfogeneze kod kralješnjaka (Park i sur. 2018). Tri su receptora: VEGFR-1 (Flt-1, *engl.* fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (Flk-2, *engl.* murine fetal liver kinase-1 ili KDR, *engl.* kinase domain region kod ljudi) i VEGFR-3 (Flt-4, *engl.* fms-like-tyrosine kinase) koji je eksprimiran gotovo isključivo u limfnom endotelu kod odraslih (Majumder i Advani 2017). Postoji još jedna topljiva molekula sVEGFR-1 (solubleVEGFR) (Park i sur. 2018) koja je skraćeni oblik VEGFR-1 i funkcionira, barem dijelom, kao antagonist *VEGF-A* (Majumder i Advani 2017). Receptori se



razlikuju u signalizaciji (Ferrara i sur. 2003). Većina VEGFR pokazuje sličnu strukturu koja se sastoji od tri primarne domene, vanstanična domena, na koju se veže ligand, sa sedam imunoglobulin-like (Ig-like) domena, transmembranska domena i domena tirozin kinaze koja je podijeljena kinaznim umecima i karboksilnim krajevima. Svaki VEGF ima svoje specifične receptore koji su aktivirani vezivanjem liganda na vanstaničnu domenu receptora. *VEGF-A* se veže za Ig domene 2 i 3 lokalizirane na izvanstaničnoj domeni VEGFR-1 i VEGFR-2. *VEGF-B* i *PlGF* se vežu na VEGFR-1, ali mehanizam aktivacije receptora je drugačiji. *VEGF-C* i *VEGF-D* su specifični ligandi za VEGFR-3 (Park i sur. 2018). VEGF surađuje i s porodicom koreceptora koji su manje mase od VEGFR-1 i VEGFR-2, a nazivaju se neuropilin-1 (NP-1) i neuropilin-2 (NP-2). To su izoforme koje imaju kratku unutarstaničnu domenu, ne mogu funkcionirati kao zasebni receptori (Neufeld i sur. 1999) već formiraju homo- ili hetero-dimere te mogu formirati holoreceptorски kompleks s VEGFR-2 (Majumder i Advani, 2017). Specifični su za vezivanje na *VEGF<sub>165</sub>* (Neufeld i sur. 1999).



**Slika 4.** Vezivanje liganda i receptora članova porodice VEGF (Majumder i Advani 2017).

#### 1.2.4. Uloga u patogenim stanjima

Smatra se da je VEGF također upleten u različite bolesti bubrega, gdje ima ulogu u patogenezi, poput dijabetičke nefropatije, policističnih bubrega (Kim i Goligorsky 2003) te različitih drugih bolesti karakteriziranih abnormalnom angiogenezom (Neufeld i sur. 1999). Također je uključen i u patološku angiogenezu povezanu s tumorima (Ferrara i sur. 2003) i metastazama. Više je angiogenih faktora koji to reguliraju, ali najvažniji je VEGF. Dokazan je njegov utjecaj u tumorima bubrega. Uočeno je da je razina VEGF mRNA i proteina značajno povišena u tumorima u odnosu na normalni bubreg što sugerira vezu s mikrožilnom gustoćom (Gunningham i sur. 2001).

Nedostatak VEGF je letalan zbog defekta u razvoju kardiovaskularnog sustava, dok pretjerana ekspresija dovodi do razvoja bolesti, što govori da razvoj kardiovaskularnog sustava ovisi o točno određenoj koncentraciji VEGF te da smanjena koncentracija istog tijekom razvoja može dovesti do smanjene angiogeneze s fatalnim posljedicama (Neufeld i sur. 1999).

Homozigotna delecija VEGF gena u podocitima rezultira perinatalnom letalnošću, a heterozigotnost VEGF gena specifična za podocyte uzrokuje proteinuriju i endoteliozu, koja podsjeća na preeklampsiju. Pretjerana ekspresija *VEGF<sub>164</sub>* specifična za podocyte kod miševa izaziva glomerulopatiju, dok pretjerana ekspresija *VEGF<sub>165</sub>* u jetri i bubrezima transgeničnih miševa uzrokuje rani razvitak protenurije, hipertrofije glomerula i podocitnu hipertrofiju (Majumder i Advani 2017). Inaktivacija jednog VEGF alela uzrokuje embrionalnu smrt kod miševa. Embriji VEGF<sup>+/-</sup> izloženi su brojnim razvojnim anomalijama, defektima vaskularizacije u različitim organima (Ferrara i sur. 2003).

Mutacijacija gena koji kodiraju VEGF receptore tirozin kinaze VEGFR-1 i VEGFR-2 rezultira različitim abnormalnostima u formiranju krvnih žila. Embriji kojima nedostaje VEGFR-2 umiru prije rođenja jer ne dolazi do diferencijacije endotelinih stanica i ne formiraju se krvne žile. Mutacija gena koji kodiraju VEGFR-1 sprječava razvoj funkcionalnih krvnih žila. Aktivacija VEGFR-1 potiče migraciju stanica, ali ne inducira efikasno proliferaciju (Neufeld i sur. 1999).

Uloga VEGF je također istraživana *in vivo* blokiranjem endogene aktivnosti VEGF antitijelima kod novorođenih miševa (većina ostalih organa je već bila razvijena, dok su se bubrezi i dalje razvijali). Životinje tretirane antitijelima pokazale su normalan rast, ali sistematski edem. Formacija žila u bubrežnom korteksu bila je poremećena, nefrogena područja smanjena, a broj nefrona u razvoju znatno je opao. Detektirani su abnormalni glomeruli, smanjen broj kapilara kod životinja tretiranih antitijelima te je ekspresija VEGF u njihovim Bowmanovim čahurama pokazala kompenzacijsko povećanje. Takvi rezultati sugeriraju da VEGF posreduje u komunikaciji između Bowmanove čahure i kapilara endotelinih stanica tijekom razvoja glomerula kao i poticanju nefrogeneze. Zaključno, VEGF je vjerojatno esencijalna molekula kod razvoja bubrega, a posebice kod glomerulogeneze (Kitamoto i sur. 1997).

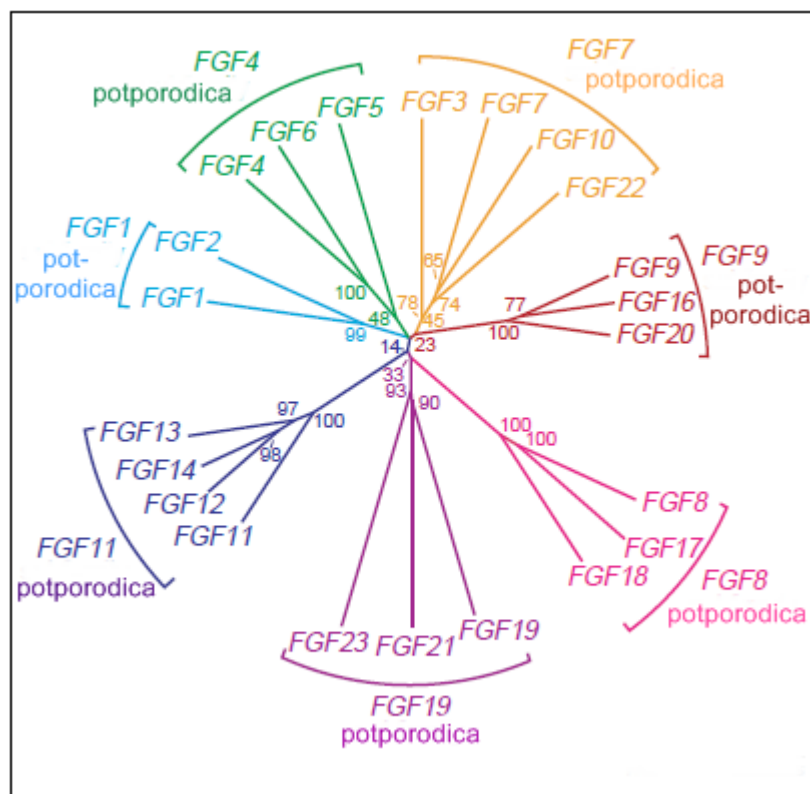
### 1.3. Fibroblastni faktor rasta (FGF)

FGF (*engl.* fibroblast growth factor) spada u veliku porodicu polipeptidnih faktora rasta koji su pronađeni kod avvertebrata i kod vertebrata, ali ne i kod jednostaničnih organizama kao što je *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Kralješnjaci imaju 22 člana porodice koji dijele 13-17% aminokiselina. Kod sisavaca su različito eksprimirani u gotovo svim tkivima, ali uzorci i vrijeme ekspresije variraju.

Između vrsta kralješnjaka, visoko su konzervirani u genskoj strukturi i sekvencama aminokiselina, većina ih ima sličnu unutarnju jezgru, s 28 visoko konzerviranih i 6 identičnih aminokiselinskih ostataka. Svi FGF su monomerni proteini koji međusobno reagiraju s proteoglikanom heparin sulfatom, koji djeluju kao koreceptori, povećavaju njihovu aktivnost (Trueb i sur. 2013) i olakšavaju interakciju između liganda i receptora (Ornitz i sur. 1996). Zajedno s heparin sulfatom, FGF geni se vežu na četiri različita receptora (FGFR1-4), inducirajući njihovu dimerizaciju i okidajući unutarstanične signale (Trueb i sur. 2013). Većina FGF gena razbacano je širom genoma. Tijekom embrionalnog razvoja, FGF geni imaju različite uloge u regulaciji proliferacije stanica, migraciji i diferencijaciji, dok su u odraslom organizmu homeostatski faktori te imaju funkciju u obnovi tkiva i odgovoru na ozljede (Ornitz i Itoh 2001). Signalizacija FGF je izrazito bitna za rast i strukturiranje svih dijelova bubrega tijekom ranog razvoja, ali i u kasnijim stadijima (Bates 2011).

#### 1.3.1. Potporodice FGF

Fibroblastni faktori rasta grupirani su prema sličnosti sekvenci i specifičnosti (biokemijskim i razvojnim svojstvima) u sedam potporodica (Ornitz i Itoh 2001), koje se dijele na intrakrine, parakrine i endokrine (Xu i Dai 2017): potporodica FGF1 (*FGF1*, 2), potporodica FGF4 (*FGF4*, 5, 6), potporodica FGF7 (*FGF3*, 7, 10, 22), potporodica FGF8 (*FGF8*, 17, 18), FGF9 potporodica (*FGF9*, 16, 20), endokrina potporodica FGF (*FGF15/19*, 21, 23; gdje je *FGF19* humani ortolog mišjeg *FGF15*) i potporodica homolognih faktora FGF (*FGF11*, 12, 13, 14). Potporodice FGF imaju sličan uzorak ekspresije, ali i jedinstvo mjesto ekspresije. Neki geni FGF eksprimirani su isključivo tijekom embrionalnog razvoja (npr. *FGF3*, 4, 8, 17 i 19), dok su drugi eksprimirani u embrionalnom i odraslom tkivu (npr. *FGF1*, 2, 5-7, 9-14, 16, 18 i 20-23) (Trueb i sur. 2013).



**Slika 5.** Evolucijska veza između ljudskih FGF gena. 22 kodirajuća FGF gena pronađena su u ljudskom genomu. Filogenska analiza predlaže da ovi geni mogu biti razvrstani u sedam potporodica, od kojih svaka sadrži dva do četiri člana (Itoh i Ornitz 2004).

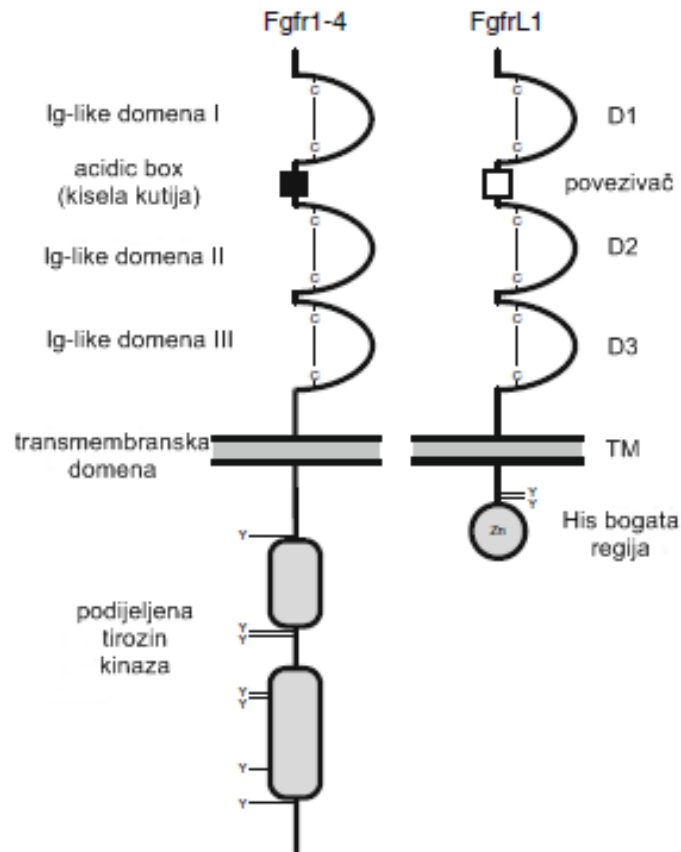
### 1.3.2. Receptori fibroblastnog faktora rasta (FGFR)

Receptori fibroblastnog faktora rasta (FGFR) su receptori tirozin kinaze s četiri signalizirajuća člana porodice (Bates 2011), FGFR-1, -2, -3 i -4 (Itoh i Ornitz 2004) koji se aktiviraju vezivanjem na jedan od 22 poznata FGF liganda kod sisavaca (Bates 2011), odnosno FGF, koji je prethodno vezan na heparin sulfat (Trueb i sur. 2013), veže se na FGFR i inducira njegovu dimerizaciju (Itoh i Ornitz 2004) koja rezultira jednim ili više trans-fosforilizacijskim događajima te aktivacijom samog receptora (Ornitz i sur. 1996). Jednom kad su aktivirani, receptori signaliziraju različitim signalnim putevima u unutrašnjost stanice (Trueb i sur. 2013). Aktivacija FGFR povezana je s različitim biološkim odgovorima, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, migraciju te inhibiciju apoptoze. Proteini FGFR sadrže izvanstaničnu domenu za vezivanje liganda, transmembransku domenu i unutarstaničnu tirozin kinaznu domenu (Bates 2007). Izvanstanična domena sadrži dvije ili tri domene nalik Ig (Ig-like) i domenu za vezivanje heparina (Itoh i Ornitz 2004). Prva domena Ig-like je odvojena od druge nizom kiselih ostataka koji se nazivaju „acidic box“ odnosno „kisela kutija“. U slučaju FGFR1, koji je najistraživaniji FGF receptor, unutarstanična domena sadrži sedam tirozinskih ostataka koji bivaju

fosforilirani nakon vezivanja liganda (Trueb i sur. 2013) (Slika 6.). FGFR su eksprimirani u mnogim tkivima embrija u razvoju, počevši od stadija implantacije, ali primarno su izraženi u mokraćovodnom pupoljku i metanefričkom mezenhimu bubrega, gdje potiču njihov rast i sazrijevanje. Njihova ekspresija često se zadržava i u odrasloj dobi (Bates 2007). Distribuirani su širom genoma, što ukazuje da su vjerojatno nastali iz zajedničkog genskog pretka putem dvije duplikacije gen(om)a unutar loze svitkovaca (Itoh i Ornitz 2004).

FGFR1 i FGFR2 su najbitniji receptori kad je u pitanju razvoj bubrega. FGFR1 je najistaknutiji u mezenhimskom tkivu (rani metanefrički mezenhim, kondenzirani mezenhim, nefroni u razvoju), ali također je prisutan i u nižim strukturama mokraćovodne loze i strome kore bubrega. FGFR2 je jako eksprimiran u Wolffovoj cijevi i mokraćovodnom pupoljku te diferenciranim nefronima, ali i u nižim strukturama, ranom metanefričkom mezenhimu i stromalnom mezenhimu (Bates 2011).

Otkriven je i peti receptor FGF koji je nazvan FGFR1 (engl. fibroblast growth factor receptor-like 1). Slično klasičnim receptorima, sadrži signalni peptid i tri vanstanične domene Ig-like, gdje je prva odvojena od druge nizom hidrofilnih ostataka. Izvanstanični dio dijeli oko 40% sličnosti sekvenci s receptorima FGFR1-FGFR4, no unutarstanična domena FGFR1 je znatno kraća od one kod drugih receptora (Slika 6.). Dok vezivanje na ligande i heparin slijedi shemu klasičnih receptora, signaliziranje ne. FGFR1 nema aktivnosti proteina tirozin kinaze u unutarstaničnoj domeni i sukladno tomu ne može signalizirati trans-autofosforilizacijom. Zbog toga je zaključeno da se FGFR1 ponaša kao receptor „mamac“ koji odvaja FGF ligande od signalizirajućih receptora (Trueb i sur. 2013).



**Slika 6.** Struktura domena FGF receptora i usporedba s FGFR1. Svi proteini sadrže izvanstanični dio s tri Ig-like domene („D1-D3“) stabilizirana disulfidnom vezom („C-C“). Prva je od druge odvojena poveziivačem koji je nazvan „kiselja kutija“ kod klasičnih receptora te oni sadrže podijeljenu tirozin kinaznu domenu u unutarstaničnom dijelu. FGFR1 umjesto toga sadrži regiju bogatu histidinom koja djeluje s cinkovim ionima. FGFR1 sadrži sedam tirozinskih ostataka („Y“) koji bivaju fosforilirani nakon vezivanja s ligandom. FGFR1 sadrži dva tirozinska ostatka u svojoj unutarstaničnoj domeni (Trueb i sur. 2013).

### 1.3.3. Izoforme receptora

Uz različite molekularne puteve koji reguliraju receptorsko signaliziranje u unutrašnjost stanice, dodatna regulacija postiže se alternativnim prekrajanjem mRNA prekursora za FGF i FGFR. U slučaju receptora, treća Ig-like domena D3 je mjesto alternativnog prekrajanja. U genima za FGFR1, FGFR2 i FGFR3, ta domena je kodirana trima egzonomima, IIIa, IIIb i IIIc. Sve izoforme sadrže egzon IIIa, ali egzoni IIIb i IIIc se prekrajuju na međusobno isključivi način što rezultira stvaranjem dviju različitih varijanti, b-varijanta i c-varijanta. Zbog toga, četiri različita receptorska gena mogu biti prepisana i prevedena u sedam različitih receptorskih proteina, FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c i FGFR4. B-varijanta je najčešće eksprimirana u epitelu, dok je c-varijanta

uglavnom u mezenhimu (Trueb i sur. 2013). Te izoforme imaju različite specifičnosti vezanja liganda (Poladia i sur. 2006) zbog različitosti u izvanstaničnim domenama (Ornitz i sur. 1996), npr. FGF7 i FGF10 se vežu na FGFR2IIIb, ali ne i za FGFR2IIIc.

#### **1.3.4. Patogeneza**

Kada je FGF nepravilno eksprimiran, može doprinijeti razvoju karcinoma (Ornitz i Itoh 2001) i metastaza. Studije su dokazala pretjeranu ekspresiju FGFR1 i FGFR2 u više različitih ljudskih tumora, poput renalnog tumora (Tsimafeyeu i sur. 2011), karcinoma dojki (Bates 2011), karcinoma prostate (Wu i sur. 2013) i sl. Također i promjene u uzorku alternativnog prekrajanja mogu korelirati s progresijom nekoliko tumora prema malignosti (Ornitz i sur. 1996). Obzirom da je fibroblastni faktor rasta kritičan za razvoj, delecije i druge mutacije mogu poremetiti njegov rad (Bates 2011). Delecija samog FGF dovodi do manjih bubrega s manje sabirnih kanala i nefrona, dok prekomjerna ekspresija dovodi do aplazije i diaplazije. Delecija receptora i liganada kod miševa uzrokuje embrionalnu letalnost. Delecija FGFR2 uzrokuje defekte u grananju mokraćovodnog pupoljka te strukturi stromalnog mezenhima (Bates 2007), a nedostatak istog u mezenhimu rezultira anomalijama bubrega i mokraćnog sustava (Bates 2011). Delecija FGFR1 i FGFR2 u metanefričkom mezenhimu rezultira aplazijom koja je karakterizirana defektima u formaciji metanefričkog mezenhima te inicijalnom produljenju i grananju mokraćovodnog pupoljka (Bates 2007).

#### **1.4. Glavni cilj istraživanja**

Glavni cilj ove studije je istraživanje prostorne i vremenske ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i FGFR2 kao potencijalnih determinanti razvoja bubrega tijekom različitih stadija razvoja (18.-37. tjedan) zdravog humanog fetalnog bubrega primjenom imunohistokemijskih biljega bojenjem jezgre bojom DAPI te usporedbom izražaja navedenih čimbenika u glomerulima, proksimalnim i distalnim tubulima. Ispitana je i istovremena prisutnost (kolokalizacija) VEGF i FGFR1 odnosno VEGF i FGFR2 u navedenim tkivima.

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Sakupljanje humanih materijala**

Embrionalni i fetalni uzorci tkiva bubrega (tkivo spontano pobačenih zametaka) prikupljeni su i obrađeni na Zavodu za patologiju, citologiju i sudsku medicinu, KBC Split, te su sada dio arhivske zbirke Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta u Splitu. Starost zametaka je procijenjena vanjskim mjerenjima (dužina tjeme-zadak) i podacima o menstruaciji (datum posljednje menstruacije). Uzorci su pregledani mikroskopski i izmjereni. U ovoj studiji su korišteni samo uzorci bez ikakvih abnormalnosti. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu, Hrvatska i u skladu je s Helsinškom Deklaracijom. Istraživanje je provedeno na 14 uzoraka normalnih ljudskih fetalnih bubrega (starosti od 18. do 37. tjedna razvoja) (Raguž 2017).

### **2.2. Imunohistokemijsko i imunofluorescencijsko bojenje**

Tkivo bubrega je secirano i fiksirano 4%-tnim paraformaldehidom u fosfatnom puferu. Potom je dehidrirano prenošenjem kroz sve veće koncentracije etanola (70%-1 sat, 96%-2 sata pa 1 sat i 100%-2 sata pa preko noći) radi uklanjanja vode iz tkiva kako bi mogao prodrjeti parafin. Slijedilo je natapanje u ksilolu (3 x 20 minuta) čime se isprao alkohol. Zatim je tkivo prožeto parafinom u termostatu (3 x 3 sata, na 58 °C) zbog odstranjivanja ksilola te kako bi se u kasnijem postupku tkivo moglo tanko rezati. Parafinom prožeto tkivo uklopljeno je u parafinski blok koji je napravljen na način da se u metalni kalup ulilo tekućeg parafina u koji se stavilo tkivo, a potom se do vrha opet ulio tekući parafin. Blok se hladio preko noći, a nakon toga je oblikovan u kvadratnu piramidu i fiksiran na drveno postolje. Ovako priređeni blokovi montirani su na mikrotom te je uslijedilo rezanje tkiva na debljinu od 5 µm (Racetin 2019) spuštanjem/pomicanjem mikrotomskog noža po površini pripremljenog parafinskog bloka. Izrezani preparati su se kistom prebacivali na vodu u kupelji, zagrijanu na 50 °C, kako bi se rez razvukao, izravnao i lako postavio na predmetno stakalce. Tako pripremljeni preparati sušeni su preko noći. Nakon toga je provedeno deparafiniranje u ksilolu (2 x 5 minuta) koji otapa parafin, zatim rehidracija u alkoholu sve niže koncentracije (100%, 96% i 70% po 3 minute) i na kraju ispiranje u destiliranoj vodi (5 minuta) kako bi se uklonio etanol. Radi otkrivanja epitopa za vezivanje primarnih antitijela preparati su zatim kuhani u citratnom puferu u kupelu za vodu (20 minuta). Nakon hlađenja ispirani su u PBS-u (razrijeđenje 1:10 s destiliranom vodom, 2 x 5 minuta) kako bi se uklonio citrat. Preparati su ocijedeđeni i okruženi PAP penom, a zatim je na njih



nanesen pufer za blokiranje (20 minuta) koji blokira nespecifično vezivanje antitijela, on se nije ispirao već odlio. Nakon toga su se nakapala primarna antitijela razrijeđena u Dako REAL antibody diluentu (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) i stavljena u vlažnu komoru preko noći kako se ne bi osušila. Korištena antitijela su: mišje monoklono: anti-VEGFA Antibody (1:150 razrijeđenje, ab68334, Abcam), zečja poliklonalna: Flg Antibody (C-15) (1:100 razrijeđenje, sc-121, Santa Cruz Biotechnology), Bek Antibody (C-17) (1:100 razrijeđenje; sc-122, Santa Cruz Biotechnology). Nakon cjelonoćne inkubacije s odgovarajućom kombinacijom primarnih antitijela, rezovi su ispirani u PBS-u (3 x 10 minuta) te inkubirani (1 sat) u vlažnoj komori sa sekundarnim imunofluorescencijskim antitijelima: Alexa fluor Donkey Anti-Mouse IgG H&L (1:400 razrijeđenje, ab150105, Abcam), Alexa fluor Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (1:400 razrijeđenje, ab150073, Abcam) koja su također razrijeđena u Dako REAL antibody diluentu (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Nakon inkubacije rezova sa sekundarnim antitijelima, rezovi su ponovo isprani u PBS-u (3 x 10 minuta) i obojani DAPI nuklearnom bojom (2 minute). Nakon završnog ispiranja u PBS-u, na osušene rezove dodalo se lijepilo za pokrovnice (Shadon Immu mount), te se prilikom lijepljenja pazilo na mjehuriće. Kontrole specifičnosti protutijela su provedene izostavljajući primarna protutijela iz uobičajenog protokola bojenja.

### **2.3. Prikupljanje podataka**

Analiza je izvođena fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX61, Tokyo, Japan) opremljenim digitalnom kamerom DP71 (Olympus, Tokyo, Japan). Za svaki period razvoja fotografirano je 20-ak fotografija različitih struktura bubrega: glomerula, proksimalnih tubula i distalnih tubula na povećanju mikroskopa 40×. ImageJ i Adobe Photoshop su korišteni za mjerenje udjela površine prekrivene pozitivnim signalom biljega. Marker koji su korišteni u ovoj studiji pokazuju citoplazmatski pozitivitet i bilo koji stupanj obojenosti smatran je pozitivnim, dok se odsutnost obojenosti smatrala negativnom reakcijom. Postotak stanica imunoreaktivnih na VEGF, FGFR1 i FGFR2 je izračunat.

### **2.4. Statistička analiza**

Za statističke analize, nakon testiranja distribucije podataka, korišten je Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison test, Tamhane's T2 multiple comparisons test, Brown-Forsythe ANOVA test, Welch's ANOVA test i Test za linearni trend (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kako bi se istražile razlike u postocima pozitivnih stanica između proksimalnih tubula, distalnih tubula i

glomerula u svim vremenskim razdobljima. Postotak pozitivnih stanica je izračunat i izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Statistička značajnost je postavljena na  $p < 0.05$ .

## **2.5. Etička načela**

Istraživanje je provedeno na fetalnom ljudskom tkivu starosti od 18. do 37. tjedna. Tkivo spontano pobačenih zametaka je dobiveno s Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Za istraživanje je zatražena i dobivena suglasnost Etičkog povjerenstva. Poštivala su se etička načela o istraživanju fetalnog materijala u skladu s etičkim normama i međunarodnim ugovorima (World Medical Association Declaration of Helsinki - 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000).

Izjavljujem da je istraživanje provedeno u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04). Poštovala su se etička načela o istraživanju fetalnog materijala u skladu s etičkim normama i međunarodnim ugovorima (Matas i sur. 2015).

### **3. REZULTATI**

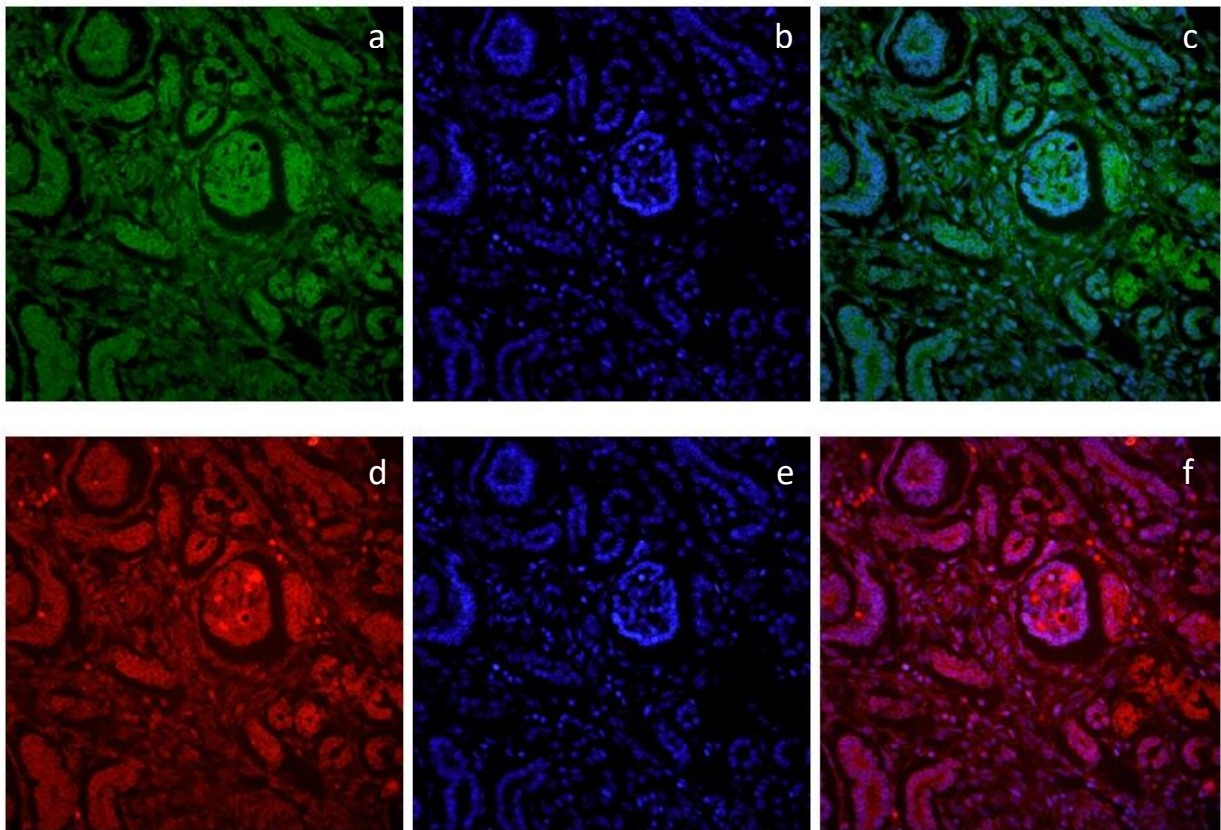
Lokalizacija i semi-kvantifikacija ekspresije VEGF, FGFR1 i FGFR2 je analizirana u već formiranim nefronima s jasno diferenciranim glomerulima, proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima u razdoblju od 18. do 37. razvojnog tjedna ljudskog zametka primjenom imunofluorescentnog bojanja. Istraživanje je provedeno na 14 uzoraka normalnih fetalnih bubrega koji su prikupljeni na Zavodu za patologiju, citologiju i ljudsku medicinu, KBC Split, te su sada dio arhivske zbirke Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju. Statistička analiza uzoraka napravljena je testovima: Kruskal-Wallis Test, Dunn's Multiple Comparison Test, Tamhane's T2 multiple comparisons test, Brown-Forsythe ANOVA test, Welch's ANOVA test i Test za linearni trend.

#### **3.1. Ekspresija faktora rasta tijekom 18. razvojnog tjedna**

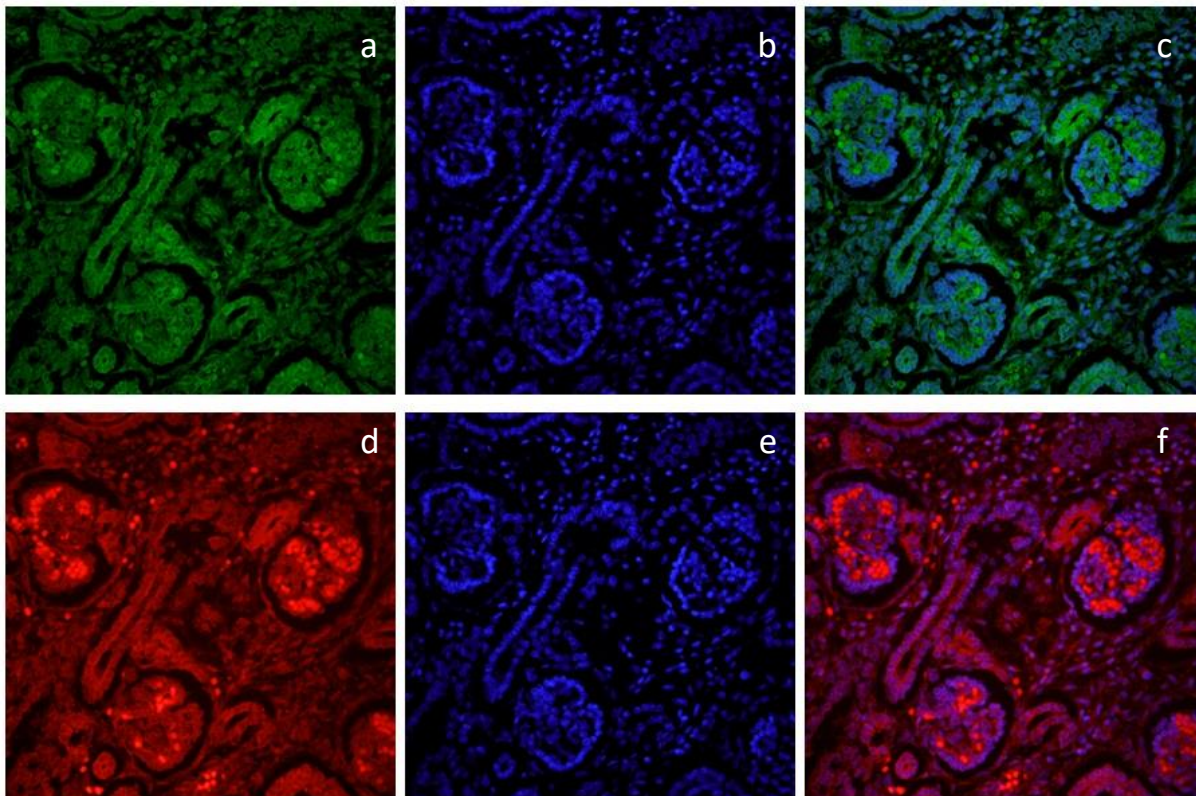
Tijekom 18. tjedna fetalnog razvoja ekspresija VEGF bila je najjače izražena u proksimalnim zavijenim kanalićima glomerulima s postotkom od 84% pozitivnih stanica. Slična, ali nešto slabija ekspresija uočena je i u proksimalnim zavijenim kanalićima gdje je postotak pozitivnih stanica 83% te u distalnim zavijenim kanalićima 80% pozitivnih stanica.

Ekspresija FGFR1 u 18. tjednu fetalnog razvoja najizraženija je u glomerulima s postotkom od 94% pozitivnih stanica. Postotak pozitivnih stanica u proksimalnim zavijenim kanalićima iznosi 90%, dok je u distalnim zavijenim kanalićima ekspresija nešto niža s 87% pozitivnih stanica. Sva tri postotka čine najviši postotak ekspresije FGFR1 u glomerulima, proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima kroz sve istraživane tjedne.

FGFR2 je u 18. tjednu fetalnog razvoja najviše izražen u glomerulima s 93% pozitivnih imunoreaktivnih stanica, što je najviši postotak obzirom na ostala tkiva u tom tjednu. Ekspresija u proksimalnim zavijenim kanalićima nešto je manja s postotkom od 90% pozitivnih stanica, a u distalnim zavijenim kanalićima iznosi 85%.



**Slika 7.** Stanice bubrega u 18. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR1 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR1 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).



**Slika 8.** Stanice bubrega u 18. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR2 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR2 i obojenih s DAPI (preklapanje panela e i f).

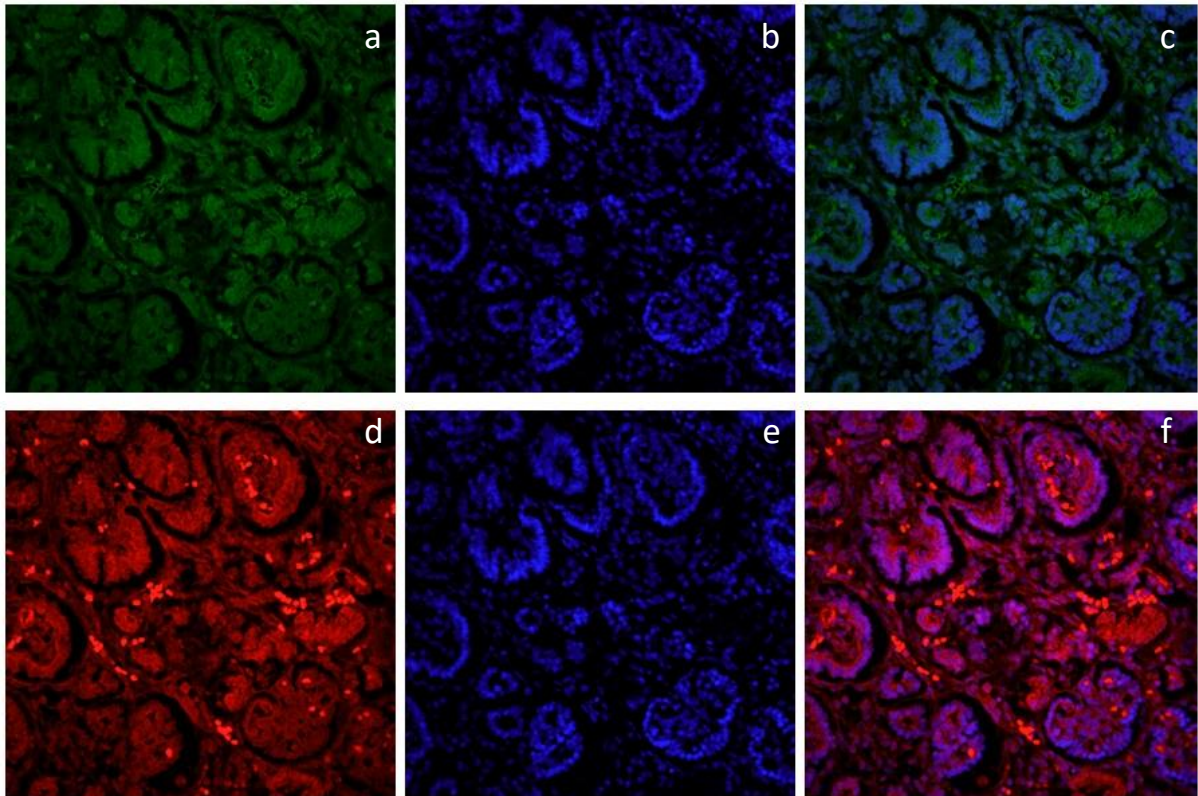
### 3.2. Ekspresija faktora rasta tijekom 25. razvojnog tjedna

Tijekom 25. tjedna fetalnog razvoja ekspresija VEGF podjednako je izražena u glomerulima i proksimalnim zavijenim kanalićima s postotkom od 75% pozitivnih stanica, dok je u distalnim zavijenim kanalićima postotak ekspresije 74% pozitivnih stanica.

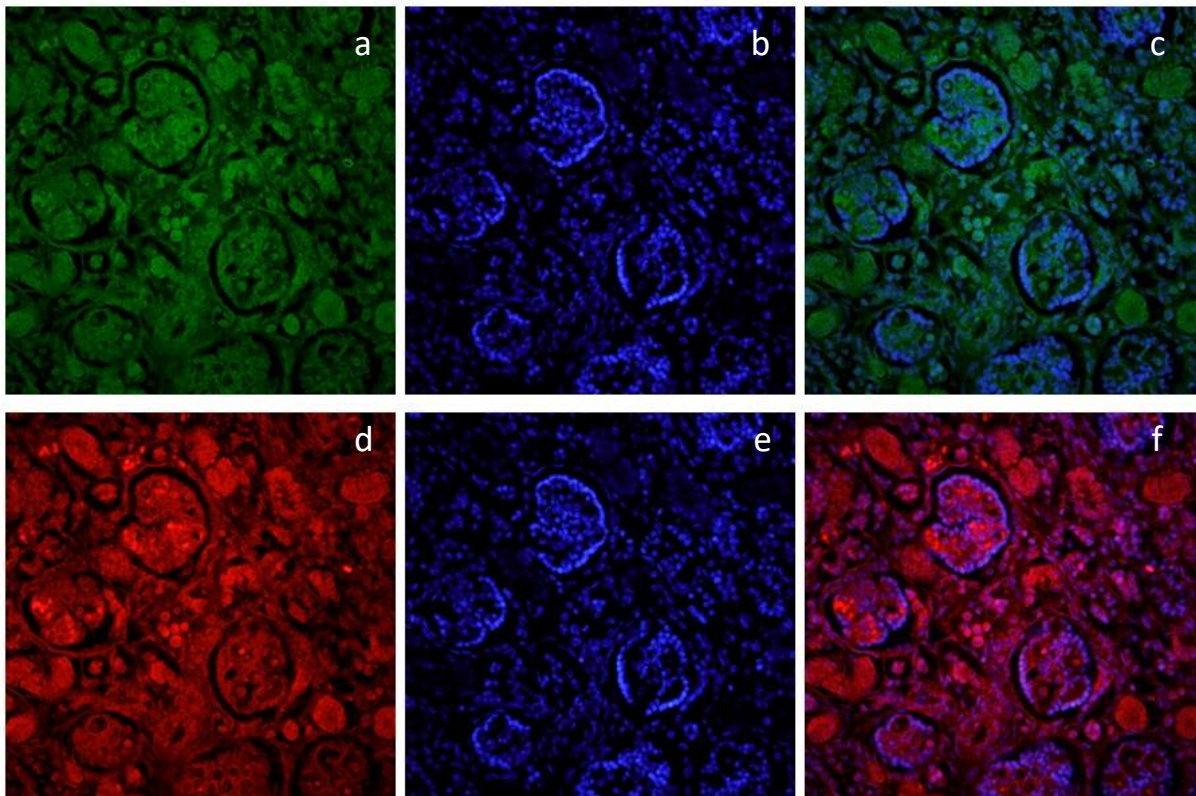
Ekspresija FGFR1 u 25. tjednu fetalnog razvoja najizraženija je u glomerulima gdje postotak stanica s ekspresijom iznosi 90%. Postotak istih u proksimalnim zavijenim kanalićima je 88%, dok u distalnim zavijenim kanalićima iznosi 84%.

FGFR2 je u 25. tjednu fetalnog razvoja najviše izražen u glomerulima s postotkom pozitivnih stanica od 90%. Nešto niži postotak od 89% iznosi u proksimalnim zavijenim kanalićima, dok je najniži broj stanica s ekspresijom FGFR2 prisutan u distalnim zavijenim kanalićima, s postotkom od 82% pozitivnih stanica.





**Slika 9.** Stanice bubrega u 25. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR1 pod crvenim obojenjem (TRITC), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR1 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).



**Slika 10.** Stanice bubrega u 25. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FIT 2), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR2 pod crvenim obojenjem (TRITC), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR2 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).

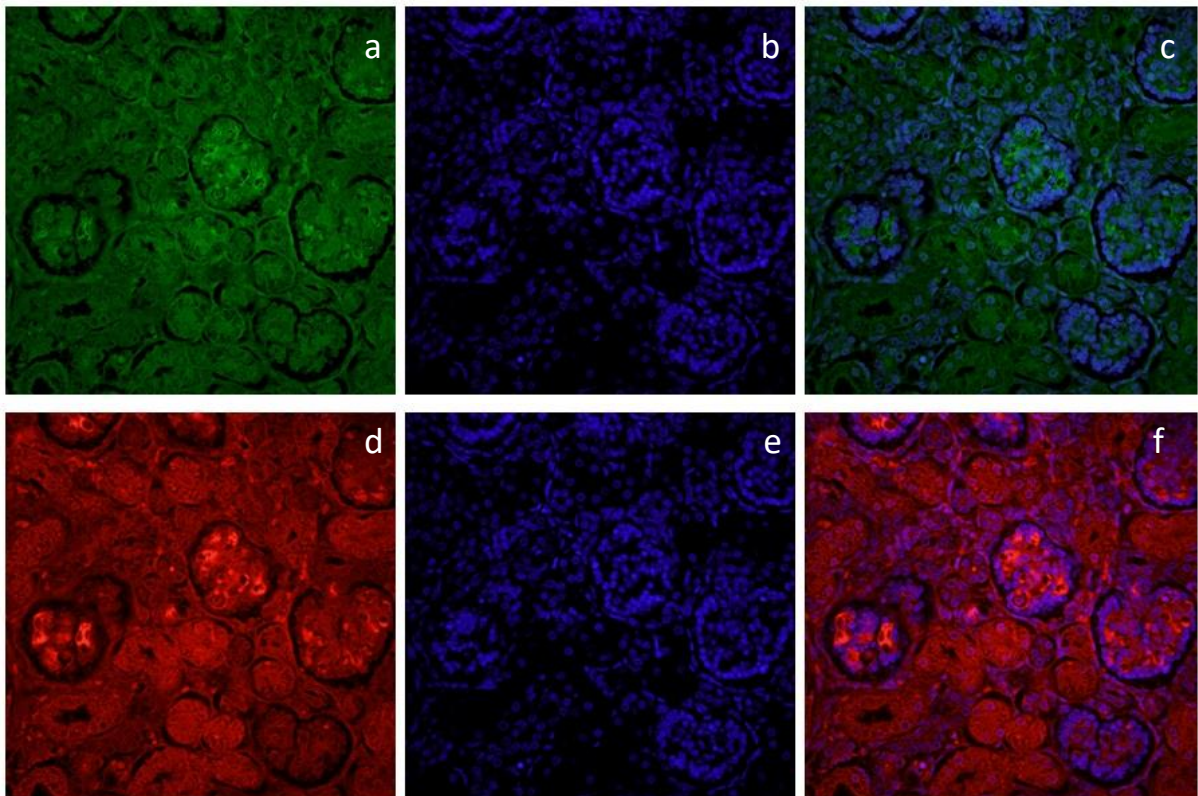
### 3.3. Ekspresija faktora rasta tijekom 28. razvojnog tjedna

Tijekom 28. tjedna fetalnog razvoja VEGF je u glomerulima eksprimiran u 73% stanica, što je manje od prethodnog tjedna. Postotak pozitivnih stanica u proksimalnim kanalićima iznosi također 73%, dok je ekspresija u distalnim zavijenim kanalićima također niža nego u prethodnom tjednu s postotkom od 68%.

Ekspresija FGFR1 u 28. tjednu fetalnog razvoja najizraženija je u glomerulima, s postotkom od 82% pozitivnih stanica. U distalnim zavijenim kanalićima postotak iznosi 77%, dok je u proksimalnim zavijenim kanalićima ekspresija FGFR1 najniža s postotkom od 74% pozitivnih stanica.

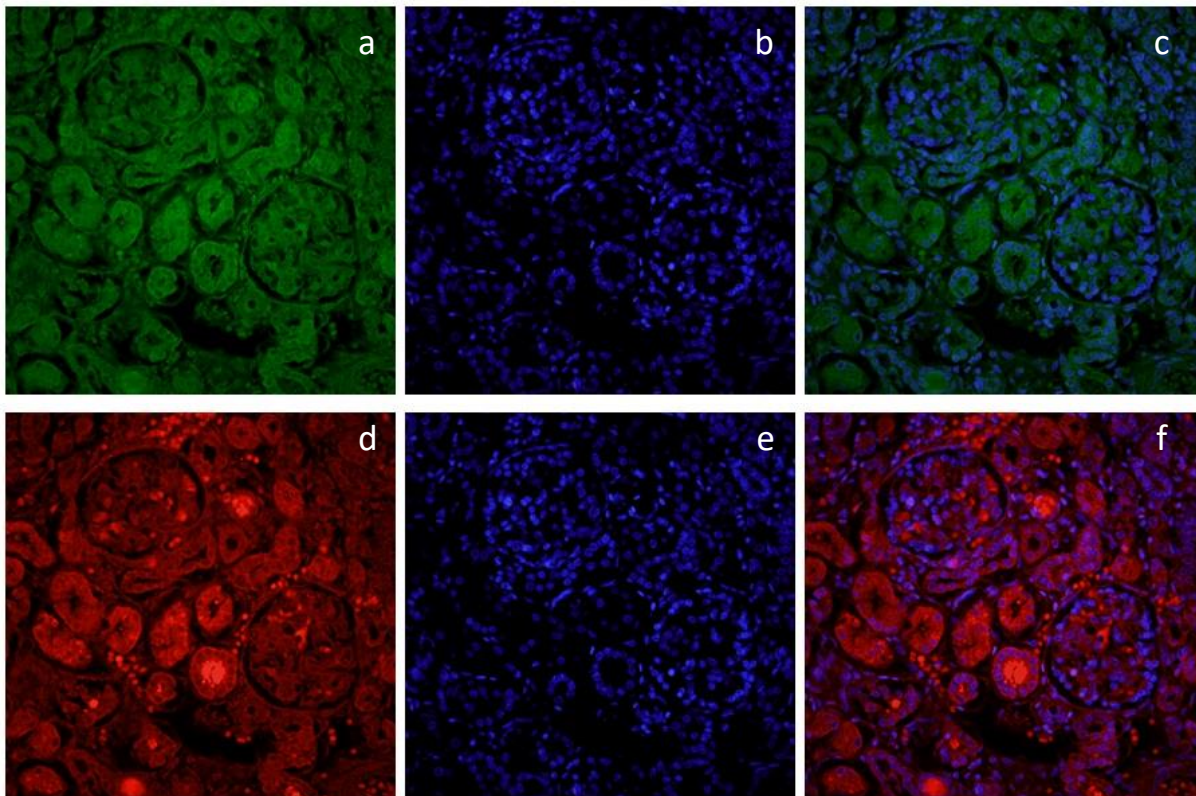
FGFR2 je u 28. tjednu fetalnog razvoja najviše eksprimiran u glomerulima, gdje postotak pozitivnih stranica iznosi 84%. Izražaj u proksimalnim zavijenim kanalićima je 76%, dok je isti najniži u distalnim zavijenim kanalićima i iznosi 75% pozitivnih stanica.





**Slika 11.** Stanice bubrega u 28. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR1 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR1 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).





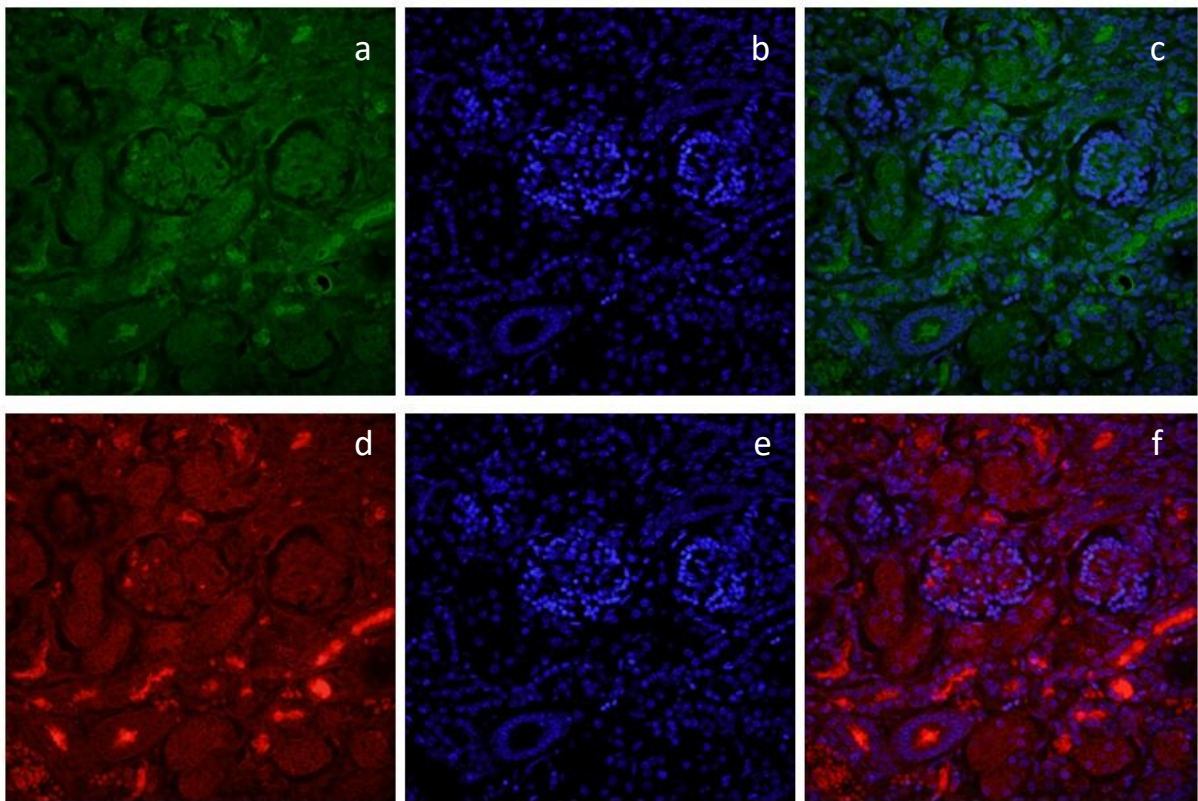
**Slika 12.** Stanice bubrega u 28. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR2 pod crvenim obojenjem (TRITC), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR2 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).

### 3.4. Ekspresija faktora rasta tijekom 29. i 30. razvojnog tjedna

U razdoblju od 29. Do 30. fetalnog razvojnog tjedna ekspresija VEGF podjednako je izražena u glomerulima i proksimalnim zavijenim kanalićima s postotkom od 69% pozitivnih stanica. Ekspresija u distalnim kanalićima iznosi 66% pozitivnih stanica.

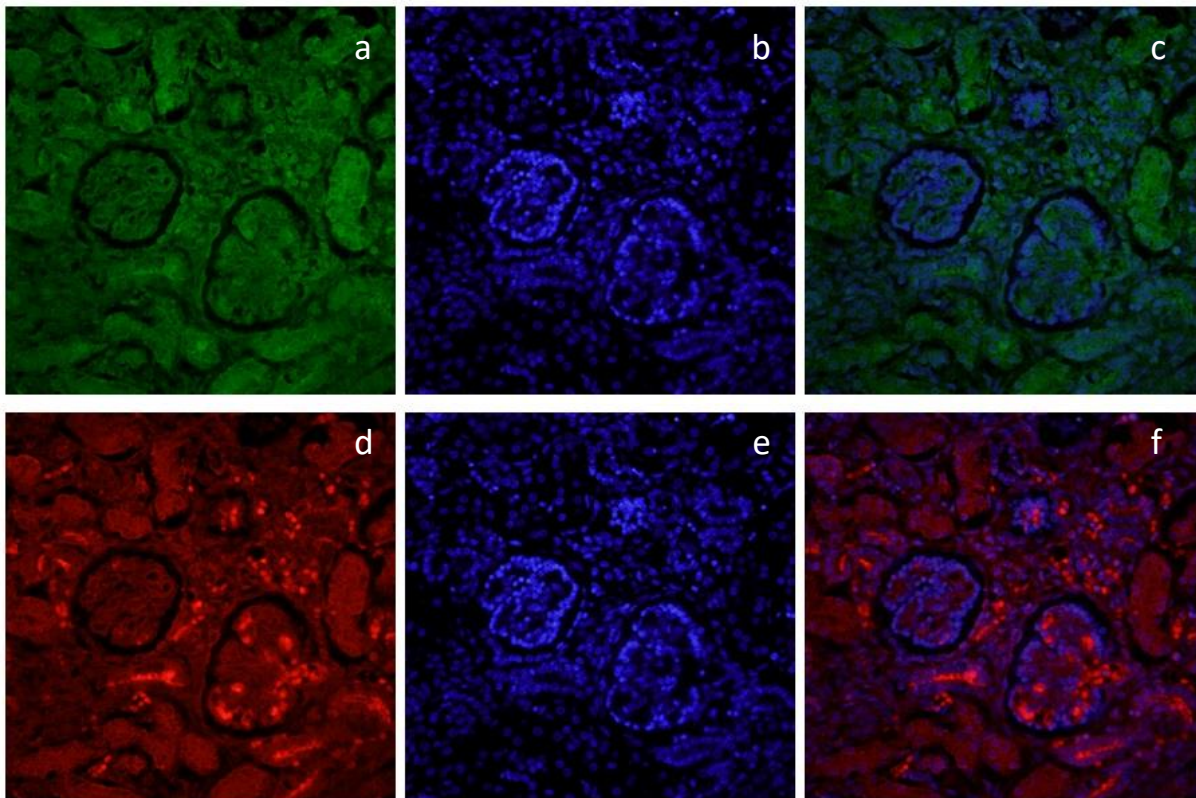
Ekspresija FGFR2 tijekom razdoblja 29.-30. tjedna fetalnog razvoja je najviše izražena u glomerulima, s postotkom pozitivnih stanica od 71%. U distalnim zavijenim kanalićima postotak istih iznosi 69%, a u proksimalnim, neznatno manji, ali ujedno najmanji postotak u ovom tjednu, od 68% pozitivnih stanica.

FGFR2 u periodu 29.-30. tjedna fetalnog razvoja najviše je eksprimiran u glomerulima, s postotkom od 74% pozitivnih stanica. Nakon toga slijede proksimalni zavijeni kanalići s postotkom pozitivnih stanica od 72% te na kraju s najmanjim postotkom u ovom tjednu nalaze se distalni zavijeni kanalići, u iznosu od 70% pozitivnih stanica.



**Slika 13.** Stanice bubrega u 29.-30. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR1 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija pozitivnih na FGFR1 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).





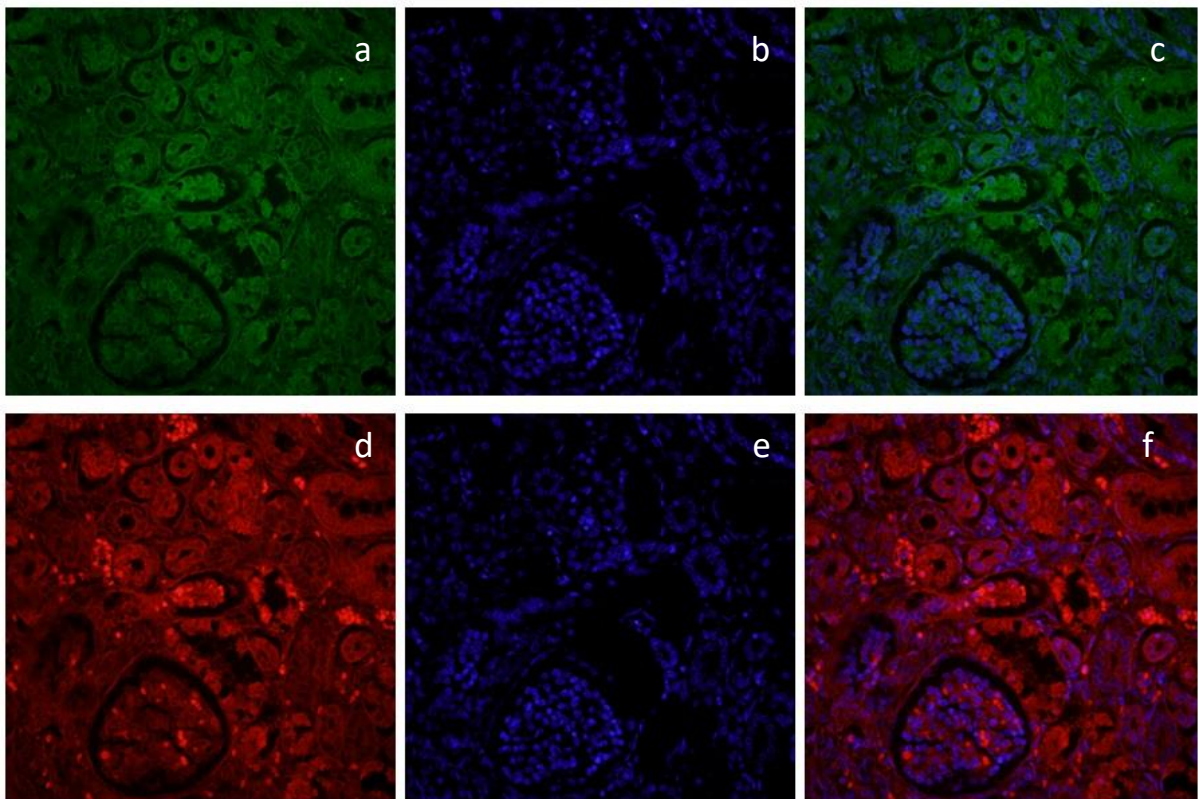
**Slika 14.** Stanice bubrega u 29.-30. tjednu razvoja: a) stanice pozitivne na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) stanice pozitivne na FGFR2 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR2 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).

### 3.5. Ekspresija faktora rasta tijekom 37. razvojnog tjedna

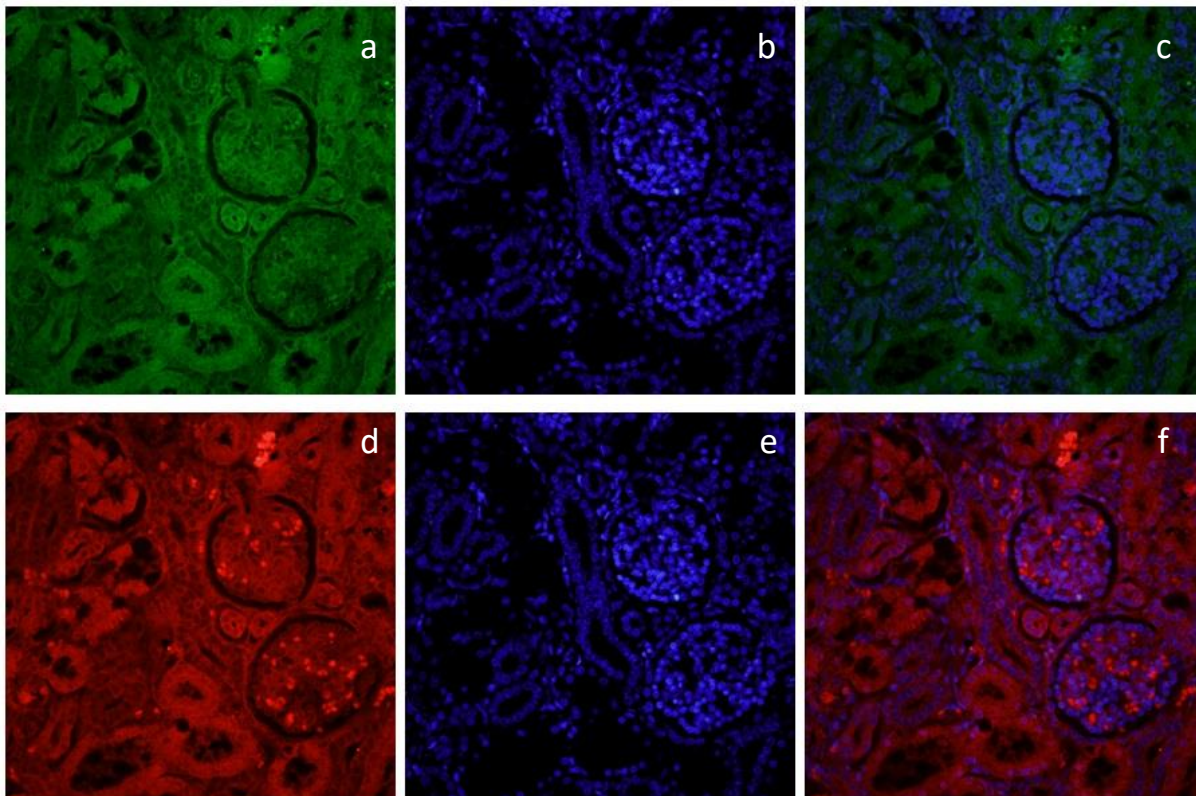
Tijekom 37. tjedna fetalnog razvoja ekspresija VEGF najjače je izražena u glomerulima s 60% pozitivnih stanica. Najslabija ekspresije VEGF kroz sve tjedne u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima izražena je u ovom tjednu i to s postotkom pozitivnih stanica od 58%.

Ekspresija FGFR1 tijekom 37. tjedna fetalnog razvoja najviše je izražena u glomerulima, gdje je postotak pozitivnih stanica 63%. Neznatno manja ekspresija u proksimalnim zavijenim kanalićima s postotkom od 62%, te najmanji postotak u distalnim kanalićima od 60%, koji je ujedno i najmanji obzirom na sve postotke u svim tjednima.

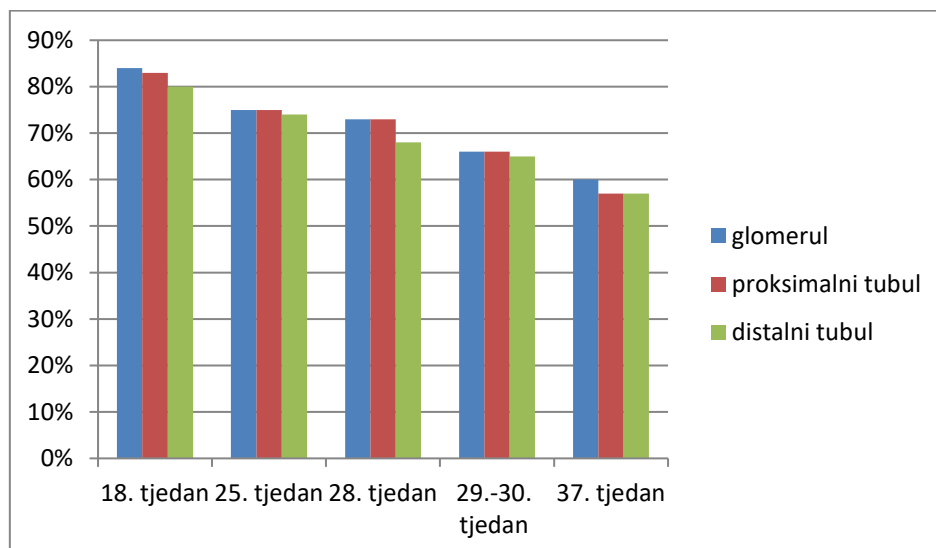
FGFR2 ekspresija tijekom 37. tjedna fetalnog razvoja najveća je u glomerulima, gdje postotak pozitivnih stanica iznosi 68%, dok je postotak istih u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima jednak i iznosi 65%. To je ujedno i najmanji postotak u odnosu na sve uzorke i sve tjedne. Kroz ovih pet istraživanih tjedana uočeno je smanjenje svih postotaka kroz vrijeme.



**Slika 15.** Stanice bubrega u 37. tjednu razvoja: a) pozitivne stanice na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) pozitivne stanice na FGFR1 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje, f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR1 i obojenih s DAPI (preklapanje panela d i e).

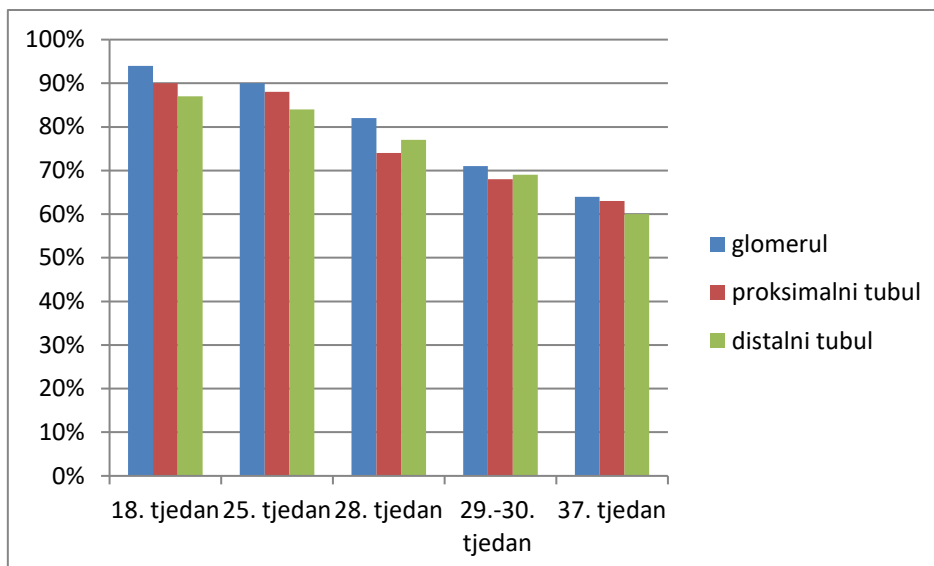


**Slika 16.** Stanice bubrega u 37. tjednu razvoja: a) pozitivne stanice na VEGF pod zelenim osvjetljenjem (FITC), b) DAPI nuklearno obojenje, c) kolokalizacija stanica pozitivnih na VEGF i obojenih s DAPI (preklapanje panela a i b), d) pozitivne stanice na FGFR2 pod crvenim obojenjem (TRICT), e) DAPI nuklearno obojenje f) kolokalizacija stanica pozitivnih na FGFR2 i obojenih s DAPI (preklapanje d i e).

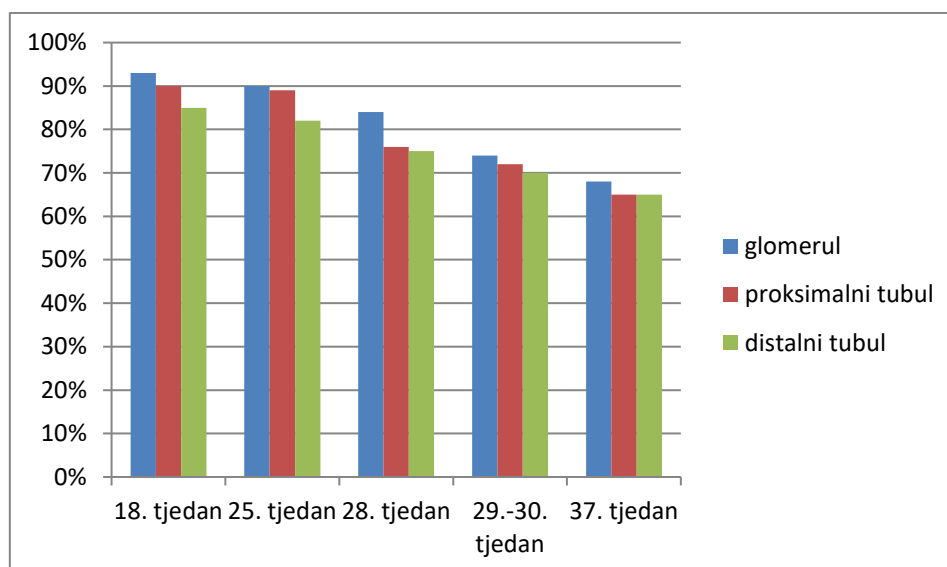


**Slika 17.** Ekspresija VEGF u postocima od 18. do 37. tjedna fetalnog razvoja čovjeka u glomerulima (plavo), proksimalnim zavijenim kanalićima (crveno) i distalnim zavijenim kanalićima (zeleno)





**Slika 18.** Ekspresija FGFR1 u postocima od 18. do 37. tjedna fetalnog razvoja čovjeka u glomerulima (plavo), proksimalnim zavijenim kanalićima (crveno) i distalnim zavijenim kanalićima (zeleno)



**Slika 19.** Ekspresija FGFR2 u postocima od 18. do 37. tjedna fetalnog razvoja čovjeka u glomerulima (plavo), proksimalnim zavijenim kanalićima (crveno) i distalnim zavijenim kanalićima (zeleno)

### 3.6. Statistička analiza Kruskal-Wallis testa

Napravljena je analiza ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i FGFR2 pomoću Kruskal-Wallis testa i uočena statistički značajna razlika u postotku pozitivnih stanica unutar svih tkiva odnosno glomerula, proksimalnih zavijenih kanalića i distalnih zavijenih kanalića kroz pet istraživanih tjedana. Zbog velikih vrijednosti uzoraka, p vrijednost je približno određena iz Gaussian approximation (Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ).

### 3.7. Statistička analiza Dunn's Multiple Comparison testa

Provedena je analiza ekspresije faktora rasta VEGF, FGFR1 i FGFR2 pomoću Dunn's Multiple Comparison testa. Kod ekspresije VEGF u glomerulima, prisutna je statistički značajna razlika između 18. i 29.-30. tjedna (\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 37. tjedna (\*\*) te 28. i 37. tjedna (\*). Kod ekspresije istog u proksimalnim zavijenim kanalicima statistički značajna razlika prisutna je između 18. i 29.-30. tjedna (\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 37. tjedna (\*\*) te 28. i 37. tjedna (\*\*). Dok kod ekspresije u distalnim zavijenim kanalicima statistički značajna razlika je prisutna između 18. i 37. tjedna (\*\*\*) te 25. i 37. tjedna (\*\*) (Dunn's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ).

**Tablica 1.** Analiza ekspresije VEGF i prisutnosti statistički značajne razlike u glomerulima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost $P < 0.05$	Razina značajnosti
g: 18. tjedan vs. g: 25. tjedan	Ne	nz
g: 18. tjedan vs. g: 28. tjedan	Ne	nz
g: 18. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Da	**
g: 18. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	***
g: 25. tjedan vs. g: 28. tjedan	Ne	nz
g: 25. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Ne	nz
g: 25. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	**
g: 28. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Ne	nz
g: 28. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	*
g: 29.-30. tjedan vs. g: 37. tjedan	Ne	nz

g (glomerul), nz ( $P > 0.05$ , nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ), \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ )

**Tablica 2.** Analiza ekspresije VEGF i prisutnosti statistički značajne razlike u proksimalnim zavijenim kanalićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
p: 18. tjedan vs. p: 25. tjedan	Ne	nz
p: 18. tjedan vs. p: 28. tjedan	Ne	nz
p: 18. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Da	**
p: 18. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	***
p: 25. tjedan vs. p: 28. tjedan	Ne	nz
p: 25. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Ne	nz
p: 25. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	**
p: 28. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Ne	nz
p: 28. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	**
p: 29.-30. tjedan vs. p: 37. tjedan	Ne	nz

p (proksimalni zavijeni kanalić), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001)

**Tablica 3.** Analiza ekspresije VEGF i prisutnosti statistički značajne razlike u distalnim zavijenim kanalićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
d: 18. tjedan vs. d: 25. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	***
d: 25. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 25. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Ne	nz
d: 25. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	**
d: 28. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Ne	nz
d: 28. tjedan vs. d: 37. tjedan	Ne	nz
d: 29.-30. tjedan vs. d: 37. tjedan	Ne	nz

d (distalni zavijeni kanalić), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001)

Kod ekspresije FGFR1 u glomerulima, prisutna je statistički značajna razlika između 18. i 28. tjedna (\*), 18. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 29.-30. tjedna (\*\*) te 25. i 37. tjedna (\*\*). Kod ekspresije FGFR1 u proksimalnim zavijenim kanalićima statistički značajna razlika prisutna je između 18. i 28. tjedna (\*\*\*), 18. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 28. tjedna (\*\*), 25. i 29.-30. tjedna (\*\*\*) te 25. i 37. tjedna (\*\*). Dok kod ekspresije u distalnim zavijenim kanalićima



statistički značajna razlika je prisutna između 18. i 29.-30. tjedna (\*\*\*) 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 29.-30. tjedna (\*), 25. i 37. tjedna (\*\*\*) te 28. i 37. tjedna (\*) (Dunn's Multiple Comparison Test,  $p < 0,05$ ).

**Tablica 4.** Analiza ekspresije FGFR1 i prisutnosti statistički značajne razlike u glomerulima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost $P < 0.05$	Razina značajnosti
g: 18. tjedan vs. g: 25. tjedan	Ne	nz
g: 18. tjedan vs. g: 28. tjedan	Da	*
g: 18. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Da	***
g: 18. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	***
g: 25. tjedan vs. g: 28. tjedan	Ne	nz
g: 25. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Da	**
g: 25. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	***
g: 28. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Ne	nz
g: 28. tjedan vs. g: 37. tjedan	Ne	nz
g: 29.-30. tjedan vs. g: 37. tjedan	Ne	nz

g (glomerul), nz ( $P > 0,05$ , nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).

**Tablica 5.** Analiza ekspresije FGFR1 i prisutnosti statistički značajne razlike u proksimalnim zavijenim kanalićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost $P < 0.05$	Razina značajnosti
p: 18. tjedan vs. p: 25. tjedan	Ne	nz
p: 18. tjedan vs. p: 28. tjedan	Da	***
p: 18. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Da	***
p: 18. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	***
p: 25. tjedan vs. p: 28. tjedan	Da	**
p: 25. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Da	***
p: 25. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	***
p: 28. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Ne	nz
p: 28. tjedan vs. p: 37. tjedan	Ne	nz
p: 29.-30. tjedan vs. p: 37. tjedan	Ne	nz

p (proksimalni zavijeni kanalić), nz ( $P > 0,05$ , nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).

**Tablica 6.** Analiza ekspresije FGFR1 i prisutnosti statistički značajne razlike u distalnim zavijenim kanalićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
d: 18. tjedan vs. d: 25. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Da	***
d: 18. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	***
d: 25. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 25. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Da	*
d: 25. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	***
d: 28. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Ne	nz
d: 28. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	*
d: 29.-30. tjedan vs. d: 37. tjedan	Ne	nz

d (distalni zavijeni kanalić), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).

Kod ekspresije FGFR2 u glomerulima, prisutna je statistički značajna razlika između 18. i 28. tjedna (\*), 18. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), 25. i 37. tjedna (\*\*\*), te 28. i 37. tjedna (\*). Kod ekspresije istog u proksimalnim zavijenim kanalićima statistički značajna razlika prisutna je između 18. i 28. tjedna (\*\*\*), 18. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. i 28. tjedna (\*\*\*), 25. i 29.-30. tjedna (\*\*\*), te 25. i 37. tjedna (\*\*\*). Dok kod ekspresije u distalnim zavijenim kanalićima statistički značajna razlika je prisutna između 18. i 29.-30. tjedna (\*\*), 18. i 37. tjedna (\*\*\*), 25. do 29.-30. tjedna (\*) te 25. i 37. tjedna (\*\*\*) (Dunn's Multiple Comparison Test, p<0,05).

**Tablica 7.** Analiza ekspresije FGFR2 i prisutnosti statistički značajne razlike u distalnim zavijenim kanalčićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
g: 18. tjedan vs. g: 25. tjedan	Ne	nz
g: 18. tjedan vs. g: 28. tjedan	Da	*
g: 18. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Da	***
g: 18. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	***
g: 25. tjedan vs. g: 28. tjedan	Ne	nz
g: 25. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Da	***
g: 25. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	***
g: 28. tjedan vs. g: 29.-30. tjedan	Ne	nz
g: 28. tjedan vs. g: 37. tjedan	Da	*
g: 29.-30. tjedan vs. g: 37. tjedan	Ne	nz

g (glomerul), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).

**Tablica 8.** Analiza ekspresije FGFR2 i prisutnosti statistički značajne razlike u proksimalnim zavijenim kanalčićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
p: 18. tjedan vs. p: 25. tjedan	Ne	nz
p: 18. tjedan vs. p: 28. tjedan	Da	***
p: 18. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Da	***
p: 18. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	***
p: 25. tjedan vs. p: 28. tjedan	Da	**
p: 25. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Da	***
p: 25. tjedan vs. p: 37. tjedan	Da	***
p: 28. tjedan vs. p: 29.-30. tjedan	Ne	nz
p: 28. tjedan vs. p: 37. tjedan	Ne	nz
p: 29.-30. tjedan vs. p: 37. tjedan	Ne	nz

p (proksimalni zavijeni kanalčić), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).

**Tablica 9.** Analiza ekspresije FGFR2 i prisutnosti statistički značajne razlike u distalnim zavijenim kanalčićima, pomoću Dunn's Multiple Comparison testa.

Dunn's Multiple Comparison Test	Značajnost P < 0.05	Razina značajnosti
d: 18. tjedan vs. d: 25. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 18. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Da	**
d: 18. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	***
d: 25. tjedan vs. d: 28. tjedan	Ne	nz
d: 25. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Da	*
d: 25. tjedan vs. d: 37. tjedan	Da	***
d: 28. tjedan vs. d: 29.-30. tjedan	Ne	nz
d: 28. tjedan vs. d: 37. tjedan	Ne	nz
d: 29.-30. tjedan vs. d: 37. tjedan	Ne	nz

d (distalni zavijeni kanalčić), nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).

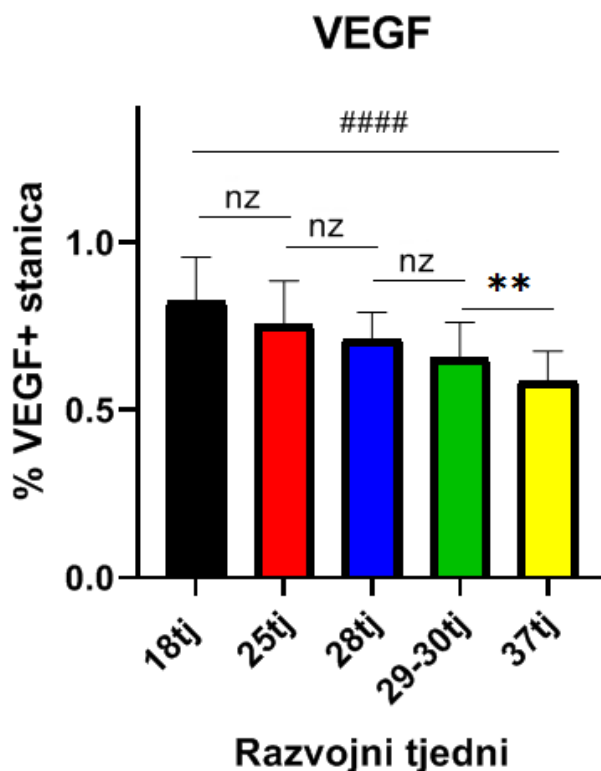
### 3.8. Dodatni statistički testovi

Daljnijim analiziranjem uočena je statistički značajna razlika kod ekspresije VEGF između 18. i 28. tjedna, 18. i 29.-30. tjedna, 18. i 37. tjedna, 25. i 37. tjedna te 28. i 37. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Također, statistički značajna razlika uočena je i između 25. i 29.-30. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p = 0,0012$ , \*\*) i 29.-30. i 37. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p = 0,0084$ , \*\*). Nadalje analizirajući podatke putem Brown-Forsythe ANOVA testa, Welch's ANOVA testa i Testa za linearni trend, kod sva tri, uočena je statistički značajna razlika s vrijednošću  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

**Tablica 10.** Analiza ekspresije VEGF i prikaz statistički značajne razlike među tjednima pomoću Tamhane's T2 multiple comparisons testa.

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Značajnost	Razina značajnosti	Prilagođena P vrijednost
18. tjedan vs. 25. tjedan	Ne	nz	0,1754
18. tjedan vs. 28. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 28. tjedan	Ne	nz	0,4129
25. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	**	0,0012
25. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
28. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Ne	nz	0,0614
28. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
29.-30. tjedan vs. 37. tjedan	Da	**	0,0084

nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).



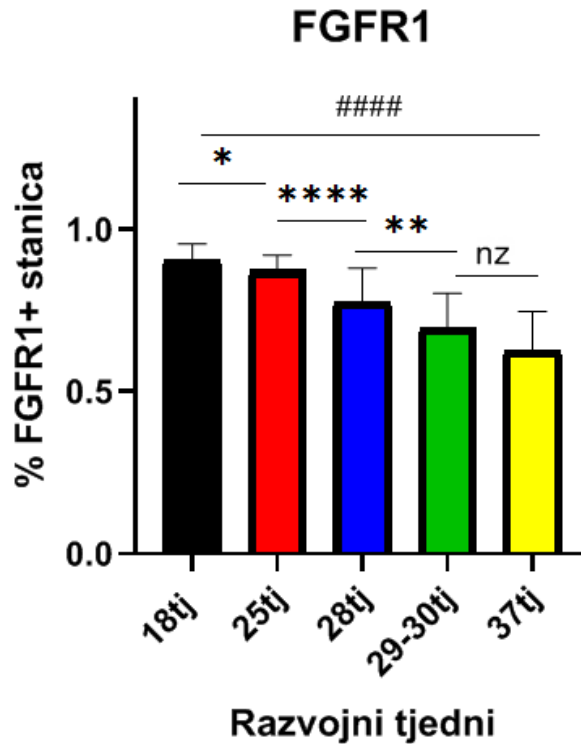
**Slika 20.** Ekspresija VEGF u stanicama bubrega embrija od 18. do 37. tjedna razvoja. nz (p>0.05, nema statistički značajne razlike), \*\* (p<0.01), #### (p<0.0001)

Kod ekspresije FGFR1 prisutna je statistički značajna razlika između 18. i 28. tjedna, 18. i 29.-30. tjedna, 18. i 37. tjedna, 25. i 28. tjedna, 25. i 29.-30. tjedna, 25. i 37. tjedna te 28. i 37. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Između 18. i 25. tjedna također je prisutna statistički značajna razlika (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p = 0,03269$ , \*) kao i između 28. i 29.-30. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p = 0,0059$ , \*\*). Daljnjim analiziranjem podataka pomoću Brown-Forsythe ANOVA testa, Welch's ANOVA testa i Testa za linearni trend također je, kod sva tri, uočena statistički značajna razlika s vrijednošću  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

**Tablica 11.** Analiza ekspresije FGFR1 i prikaz statistički značajne razlike među tjednima pomoću Tamhane's T2 multiple comparisons testa.

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Značajnost	Razina značajnosti	Prilagođena P vrijednost
18. tjedan vs. 25. tjedan	Da	*	0,0269
18. tjedan vs. 28. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 28. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
28. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	**	0,0059
28. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
29.-30. tjedan vs. 37. tjedan	Ne	nz	0,0589

nz ( $P > 0,05$ , nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).



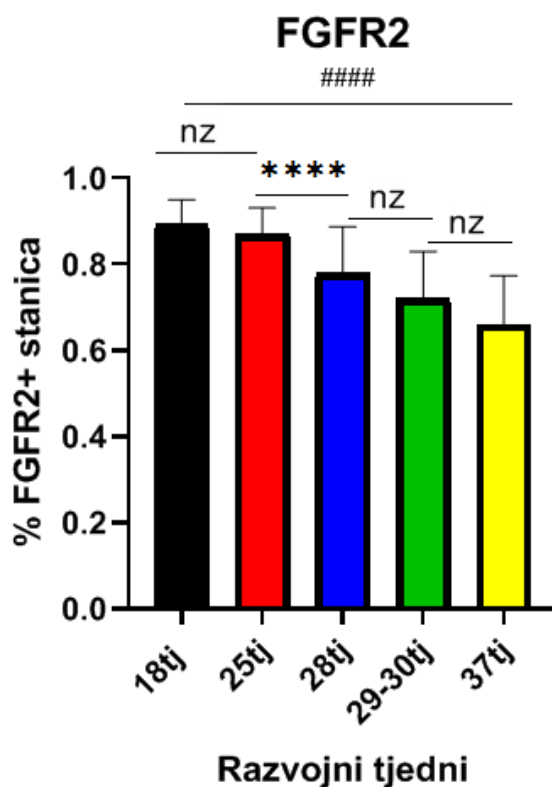
**Slika 21.** Ekspresija FGFR1 u stanicama bubrega embrija od 18. do 37. tjedna razvoja. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ), ns ( $p > 0.05$ , nema statistički značajne razlike), ##### ( $p < 0.0001$ )

Kod ekspresije FGFR2 statistički značajna razlika uočena je između 18. i 28. tjedna, 18. i 29.-30. tjedna, 18. i 37. tjedna, 25. i 28. tjedna, 25. i 29.-30. tjedna, 25. i 37. tjedna te 28. i 37. tjedna (Tamhane's T2 multiple comparisons test,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Daljnjim analiziranjem podataka pomoću Brown-Forsythe ANOVA testa, Welch's ANOVA testa i Testa za linearni trend također je, kod sva tri, uočena statistički značajna razlika s vrijednošću  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

**Tablica 12.** Analiza ekspresije FGFR2 i prikaz statistički značajne razlike među tjednima pomoću Tamhane's T2 multiple comparisons testa.

Tamhane's T2 multiple comparisons test	Značajnost	Razina značajnosti	Prilagođena P vrijednost
18. tjedan vs. 25. tjedan	Ne	nz	0,5764
18. tjedan vs. 28. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	****	<0,0001
18. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 28. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Da	****	<0,0001
25. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
28. tjedan vs. 29.-30. tjedan	Ne	nz	0,105
28. tjedan vs. 37. tjedan	Da	****	<0,0001
29.-30. tjedan vs. 37. tjedan	Ne	nz	0,1143

nz (P>0.05, nije značajno - nema statistički značajne razlike), \* (P<0.05), \*\* (P<0.01), \*\*\* (P<0.001), \*\*\*\* (P<0.0001).



**Slika 22.** Ekspresija FGFR1 u stanicama bubrega embrija od 18. do 37. tjedna razvoja. ns (p>0.05, nema statistički značajne razlike), \*\*\*\* (p<0.0001), #### (p<0.0001)



## 4. RASPRAVA

Osnovni cilj ovog rada bio je istraživanje prostorne i vremenske ekspresije VEGF, FGFR1 i FGFR2 kao potencijalnih determinanti razvoja bubrega tijekom različitih stadija razvoja zdravog humanog fetalnog bubrega te usporedba njihove ekspresije u glomerulima, proksimalnim i distalnim zavijenim kanalčićima. Nakon sustavnog pregleda velikog broja znanstvenih radova, utvrdili smo da do sada ne postoje slična istraživanja u tkivu bubrega, već postojeća istraživanja prate ulogu ovih faktora u različitim tkivima, poput kostiju, jajnika, mrežnice, nekim drugim djelovima bubrega, tumorima (Ferrara i sur. 2003) te u različitim bolestima (Bates 2011). Pojedine studije prate prekomjernu ekspresiju ovih faktora (Tsimafeyu i sur. 2011), njihove delecije, mutacije ili pak njihov nedostatak. Obzirom na glavni cilj ovog istraživanja pokazano je eksponencijalno smanjenje ekspresije VEGF, FGFR1 i FGFR2 kroz vrijeme tj. kroz istraživane tjedne razvoja bubrega odnosno njegovih dijelova-glomerula, proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića. Rezultati su izraženi u postocima pozitivnih stanica koje ekspimiraju istraživane faktore. Također je pomoću različitih statističkih testova dokazana prisutnost značajnih statističkih razlika između pojedinih tjedana razvoja i pojedinih tkiva, što je ispisano u prethodnom poglavlju.

Postojanje angiogenih faktora početno je postulirano na temelju snažnog neovaskularnog odgovora izazvanog transplantiranim tumorima. Naknadno je pokazano da je i normalno tkivo također izvor angiogenske aktivnosti te da mnoge molekule imaju ulogu pozitivnih regulatora angiogeneze, poput vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), fibroblastnog faktora rasta (FGF), ali i transformirajućeg faktora rasta (TGF)  $-\alpha$  i  $-\beta$ , hepatocitnog faktora rasta (HGF), faktora nekroze tumora (TNF)  $-\alpha$ , angiogenina, interleukina (IL)-8 i angiopietina.

Uloga VEGF u regulaciji angiogeneze intenzivno se istražuje. Dokazano je da je rast i sazrijevanje novih žila visoko kompleksan i koordiniran proces, koji zahtijeva sekvencijsku aktivaciju serije receptora pomoću niza liganda, ali signaliziranje VEGF često predstavlja kritično ograničavanje brzine u fiziološkoj angiogenezi (Ferrara i sur. 2003). Angiogeneza je nužna ne samo za razvoj organa i diferencijaciju tijekom embriogeneze već i za fiziološke događaje, poput cijeljena rana i reproduktivnih funkcija, a također je umješana i u patogenezu tumora i različitih bolesti (Kim i Goligorsky 2003).

VEGF je esencijalni angiogeni citokin te njegova deficijencija dovodi do smrti miševa u ranom embrionalnom stadiju razvoja. Sekrecija VEGF u kultiviranim bubrezima varira obzirom na stadij razvoja pa je njegova uloga u razvoju bubrega istraživana *in vivo* blokiranjem endogene VEGF aktivnosti pomoću protutijela kod novorođenih miševa, kod kojih je većina organa već bila razvijena dok su se bubrezi i dalje razvijali. Životinje tretirane protutijelom pokazuju normalan rast, ali sistemski edem. Formacija krvnih žila u superficijalnoj kori bubrega je poremećena, nefrogena zona smanjena te broj nefrona u razvoju znatno smanjen. Mnogo abnormalnih glomerula je uočeno, a

VEGF ekspresija u njihovim Bowmanovim čahurama pokazuje kompenzacijsko smanjenje. Takvi rezultati ukazuju na to da VEGF posreduje komunikaciji između Bowmanove čahure i endotelne stanice kapilara za razvoj glomerula kao i za provođenje nefrogeneze. Zaključno, smatra se da je VEGF nužna molekula za razvoj bubrega, a naročito za glomerulogenezu (Kitamoto i sur. 1997).

Nadalje, endohondralna formacija kosti je osnovni mehanizam za rast longitudinalnih kostiju. VEGF mRNA je eksprimirana u hondrocitima u epifiznoj ploči, što sugerira da je VEGF gradijent potreban za usmjereni rast i invaziju hrskavice metafiznim krvnim žilama. Nakon VEGF blokade pomoću topljivog sVEGFR-1 kimernog proteina ili monoklalnog protutijela protiv VEGF, invazija krvnih žila je gotovo potpuno suprimirana, praćena smanjenom trabekularnom formacijom kostiju, kod miševa i primata. Iako je proliferacija, diferencijacija i sazrijevanje hondrocita normalno, resorpcija hipertrofičnih hondrocita je inhibirana, što rezultira označenom ekspanzijom heterotrofične hondrocitne zone. Prestanak anti-VEGF tretmana praćeno je kapilarnom invazijom, obnovom rasta kostiju i normalizacijom arhitekture epifizne ploče (Ferrara i sur. 2003).

VEGF je također uključen i u angiogenezu jajnika. Folikularni rast i razvoj žutog tijela ovise o proliferaciji novih kapilara. Nakon tih događaja, dolazi do regresa krvnih žila, što ukazuje na kordiniranu akciju induktora i inhibitora angiogeneze. Prethodne studije pokazuju da je VEGF mRNA ekspresija privremena i prostorno povezana s proliferacijom krvnih žila u jajniku. Primjena VEGF inhibitora suprimira lutealnu angiogenezu i odgađa folikularni razvoj kod glodavaca i primata. Nedavne studije su ukazale da endokrini EG-VEGF (*engl. gland-derived VEGF*), novi selektivni angiogeni faktor, ima kooperativnu ulogu s VEGF u regulaciji angiogeneze u ljudskom jajniku. EG-VEGF nije strukturno povezan s VEGF, ali pripada jedinstvenoj genskoj porodici. Sekvencijalna aktivacija dvaju gena pojavljuje se u žutom tijelu. Iako je VEGF jako eksprimiran u ranom stadiju žutog tijela, njegova ekspresija je reducirana srednjom lutealnom fazom. EG-VEGF započinje ekspresiju kasnije nego VEGF, ali i dalje ostaje barem kroz srednju lutealnu fazu (Ferrara i sur. 2003).

Proizvodnja VEGF potaknuta hipoksijom može osigurati pokretačku snagu koja stimulira angiogenezu koja prati formaciju organa tijekom razvoja. Najbolje istraživani primjer takvog događaja je razvoj mrežnice i udružene mreže krvnih žila mrežnice. Dok se mrežnica razvija, astrociti i prekursori neurona se šire i migriraju dalje od postojećih krvnih žila. Kako se udaljenost između astrocita i vaskulature povećava, astrociti se susreću s progresivno sve većim hipoksičnim uvjetima. Astrociti su osjetljiviji na hipoksiju od migrirajućih neuronskih stanica i na taj način služe kao receptori za hipoksiju. Hipoksija stimulira astrocite na proizvodnju VEGF, a VEGF pokreće angiogeni odgovor. Formiran koncentracijski gradijent VEGF stimulira rast novih krvnih žila prema astrocitima koji proizvode VEGF. Rezultat je da rastuće krvne žile prate astrocite koji nastavljaju migrirati prema van. Nakon što tlak hipoksije opadne nakon dolaska krvnih žila, smanji se proizvodnja VEGF pomoću astrocita. Ipak, određeni prag koncentracije VEGF je potreban da inhibira apoptozu endotelne stanice i nužan je za stabilizaciju novo formiranih krvnih žila. Snižavanje razine VEGF uzrokuje rastavljanje nekih od ovih krvnih žila, ostavljajući netaknutu krvožilnu mrežu koja je fino podešena kako bi

odgovorila na zahtjeve pojedinih organa. Preostale žile su kasnije stabilizirane i postaju neosjetljive na povlaćenje VEGF pomoću pericita koji slijede nakon endotelnih stanica da pokriju novonastale krvne žile (Ferrara i sur. 2003).

*In situ* hibridizacija ukazuje da je VEGF mRNA eksprimirana u mnogim ljudskim tumorima (Ferrara i sur. 2003). Iako tumori sadrže dediferencirane stanice i nemaju organiziranu strukturu, s gledišta angiogeneze tumor je zapravo novi organ u razvoju. Angiogeneza je nužna za njegov rast odnosno sama opskrba tumora krvnim nutrijentima, što znači da je proizvodnja angiogenih faktora nužna za njegovo formiranje. Istraživanja su pokazala da inhibicija signalizacije VEGF doprinose smanjenju angiogeneze i rasta tumora. VEGF doprinosi samom rastu tumora zbog mogućnosti poticanja propusnosti krvnih žila odnosno stvaranju otvora na istim kojima se propuštaju proteini. Na taj način se stvara izvanstanični fibrinski gel koji omogućava stvaranje matriksa koji potiče rast endotelnih i tumorskih stanica te prodiranje stromalnih stanica u tumor u razvoju (Neufeld i sur. 1999). Pojačana ekspresija VEGF također je uočena u u različitim bolestima i poremećajima bubrega (dijabetička nefropatija, policistični bubrezi) (Kim i Goligorsky 2003), ali i drugih tkiva (policistični jajnici, edem mozga, psorijaza, različiti upalni procesi) (Neufeld i sur. 1999).

Fibroblastni faktori rasta (FGF) i njihovi receptori (FGFR) proučavani su već više desetljeća (Ornitz i Itoh 2001). Signalni putevi FGF igraju bitnu ulogu u ljudskoj biologiji kao regulatori embrionalnog razvoja, homeostaze i regenerativnih procesa. Nenormalno signaliziranje dovodi do skeletnih, olfaktornih i metaboličkih poremećaja, uključujući i tumore. Aktivacija FGF receptora povezana je s mnogim biološkim odgovorima uključujući proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica te inhibiciju apoptoze (Poladia i sur. 2006). Većina studija fokusirana je na mehanizme koji reguliraju stabilnost, sekreciju te interakciju s heparinom i mehanizme i posljedice signalne transdukcije u različitim tipovima stanica. Većina studija koje proučavaju receptore proučavaju njihovu specifičnost i strukturu (Ornitz i Itoh 2001) te ekspresiju u metanefričkom mezenhimu i mokraćovodnom pupoljku tijekom razvoja bubrega (Bates 2011). Početne studije su fokusirane na regulaciju proliferacije, migracije i diferencijacije stanica, dok novije više proučavaju negativni utjecaj FGF i FGFR na iste događaje (Ornitz i Itoh 2001).

FGF receptori igraju kritičnu ulogu u razvoju bubrega. Pokazano je da posreduju različitim koracima razvoja, a neki od njih su mokraćovodno grananje i razvoj nefrona (Sims-Lucas i sur. 2011). Eksperimenti na transgeničnim i *knockout* životinjama pokazali su da su FGFR1 i FGFR2 u mezenhimu bubrega kritični za rani razvoj metanefričkog mezenhima i mokraćovodnog pupoljka te da su oni najbitnije molekule u razvoju bubrega. FGFR1 je dominantno izražen u metanefričkom mezenhimu, a nešto manje u mokraćovodu i bubrežnoj kortikalnoj stromi. FGFR2 je jako izražen u Wolffovom kanalu i mokraćovodnom pupoljku te u diferencirajućim nefronima, a nešto manje u metanefričkom mezenhimu i mezenhimu koji okružuje Wollfov kanal (Bates 2011). Odsutnost FGFR1 u mokraćovodnom pupoljku (FGFR1<sup>UB-/-</sup>) ne pokazuje abnormalnosti, dok miševi FGFR2<sup>UB-/-</sup>

pokazuju nenormalno grananje pupoljka, tanki pupoljak te manje vrhova pupoljka što govori da na razvoj mokraćovodnog pupoljka djeluje FGFR2, a ne FGFR1 (Zhao i sur. 2004). Delecija FGFR1 i FGFR2 u metanefričkom mezenhimu uzrokuje aplaziju i defekte u formiranju metanefričkog mezenhima te elongaciji i grananju mokraćovodnog pupoljka (Bates 2011). Pomoću *in situ* hibridizacije pokazana je prisutnost oba receptora u oba tkiva, no unatoč tome izgleda da je FGFR1 najjače izražen u metanefričkom mezenhimu, a FGFR2 u mokraćovodnom pupoljku, pogotovo kod starijih embrija (Poladia i sur. 2006).

Delecija FGFR1 i FGFR2 rezultirala je ranom embrionalnom smrću kod miševa i prije početka razvoja bubrega. Delecija tri od četiri alela FGFR1 i FGFR2 rezultirala je razvojem robustnih bubrega, dok je delecija sva četiri alela rezultirala bubrežnom disgenezom (nepravilan razvoj organa) s neprepoznatljivim metanefričkim mezenhimom. Transgenični miševi koji imaju pretjeranu ekspresiju FGFR razvijaju aplaziju ili displaziju (Bates 2011).

Strukturalni poremećaji bubrega su glavni uzrok kroničnih bolesti bubrega kod djece. Otkrivene su pojedine mutacije koje dovode do takvih poremećaja, uključujući mutaciju FGFR. Mutacija FGFR1 i/ili FGFR2 uzrokuje različite sindrome (Apertov, Antley-Bixlerov, Pfeifferov i Beare-Stevensonov) koji su ponekad povezani s urogenitalnim anomalijama. Spektar različitih strukturalnih anomalija bubrega povezano je s mutacijama FGFR. Također i poremećaji u njihovom signaliziranju mogu biti uzrok sporadičnih kogenitalnih bubrežnih malformacija (Bates 2011).

Poremećena regulacija FGF i FGFR povezana je s razvojem tumora. Dokazano je da igraju kritičnu ulogu u transformaciji nekoliko mišjih i ljudskih tumora. Postoje istraživanja koja proučavaju ulogu njihovih signalnih puteva u tumorima pluća i dojke. Studije su pokazale visoku razinu ekspresije FGFR u tim tumorima. Također je istraživana i njihova ekspresija u primarnim i metastaziranim karcinomima bubrežnih stanica (Tsimafeyu i sur. 2011).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju smo saznali prostornu i vremensku ekspresiju faktora rasta VEGF, FGFR1 i FGFR2, u 14 uzoraka, starosti od 18. do 37. tjedna fetalnog razvoja, koji predstavljaju potencijalne determinante razvoja bubrega u glomerulima, proksimalnim zavijenim kanalićima i distalnim zavijenim kanalićima te njihovu istovremenu prisutnost (kolokalizaciju) u navedenim tkivima, što pokazuje da su eksprimirani i u ovim dijelovima te da vjerojatno imaju značajnu ulogu i u njihovom razvoju. Obzirom na njihovu prisutnost u svim istraživanim tjednima razvoja, potvrđena je njihova važnost u ranim i u kasnijim stadijima razvoja bubrega. Dokazana je također statistički značajna razlika među pojedinim tjednima i među pojedinim tkivima kroz tjedne, što ukazuje na različite molekularne mehanizme ekspresije istraživanih faktora rasta.

Poremećaj funkcije VEGF, FGFR1 i/ili FGFR2 ili njihov nedostatak uzrokuje različiti spektar poremećaja, abnormalnosti pa i moguću smrt embrija. Upravo zbog toga se sve više istražuju terapijske svrhe ovih faktora koje mogu značajno pridonijeti liječenju ili sprječavanju nastanka određenih bolesti/tumora. U tom području VEGF je više istraživan nego FGFR1 i FGFR2 te bi se u budućnosti trebalo više posvetiti istraživanju dodatnih mehanizama preko kojih navedeni faktori djeluju. Obzirom na neistraženost ove tematike, trebalo bi dodatno istražiti ulogu ovih faktora u glomerulima, proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima te općenito istraživanja više provoditi na humanom tkivu, kako bi rezultati bili vjerodostojniji, te ponudili najbolji model za istraživanje faktora rasta i njihovih receptora kao potencijalnih ciljnih molekula za razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih mogućnosti.

## 6. LITERATURA

1. Bates, C. M., (2011): Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **26**: 1373-1379.
2. Bates, C. M., (2007): Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *Pediatric Nephrology* **11**(3): 343-349.
3. Bates, C. M., (2011): Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **301**(2): 245-251.
4. Danastas K., Combes V., Lindsay L. A., Grau G. E. R., Thompson M. B., i Murphy C. R. (2015): VEGF111: new insights in tissue invasion. *Frontiers in Physiology*, **6**: 2.
5. Ferrara, N., Gerber H.-P., LeCouter J., (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* **9**(6): 669-676.
6. Gunningham, S. P., Currie M. J., Han C., Turner K., Scott P. A. E., Robinson B. A., Harris A. L., Fox S. B., (2001): Vascular Endothelial Growth Factor-B and Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Renal Cell Carcinomas: Regulation by the von Hippel-Lindau Gene and Hypoxia. *Cancer Research* **61**(7): 3206-3211.
7. Itoh N., Ornitz D. M., (2004): Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* **20**(11): 563-569.
8. Kim B.-S., Goligorsky M. S., (2003): Role of VEGF in Kidney Development, Microvascular Maintenance and Pathophysiology of Renal Disease. *The Korean journal of internal medicine* **18**(2): 65-75.
9. Kitamoto Y., Tokunaga H., Tomita K., (1997): Vascular Endothelial Growth Factor Is an Essential Molecule for Mouse Kidney Development: Glomerulogenesis and Nephrogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **99**(10): 2351-2357.
10. Majumder S., Advani A., (2017): VEGF and the diabetic kidney: More than too much of a good thing. *Journal of Diabetes and it's Complications* **31**(1): 273-279.
11. Matas A., Filipović N., Znaor L., Mardešić S., Saraga-Babić M., Vukojević K., (2015): Interplay of proliferation and differentiation factors is revealed in the early human eye development. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **253**(12): 2187-2201.
12. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltozak Z., (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and it's receptors. *The FASEB Journal* **13**(1): 9-22.
13. Ornitz D. M., Itoh N., (2001): Fibroblast growth factors. *Genome Biology* **2**(2): 3001-3005.
14. Ornitz D. M., Xu J., Colvin J. S., McEwen D. G., MacArthur C. A., Coulier F., Gao G., Goldfarb M., (1996): Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *Journal of Biological Chemistry* **271**(25): 15292-15297.

15. Park S. A., Jeong M. S., Ha K.-T., Jang S. B., (2018): Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB receptors* **51**(2): 73-78.
16. Poladia D. P., Kish K., Kutay B., Hains D., Kegg H., Zhao H., Bator C. M., (2006): Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the metanephric mesenchyme. *Developmental Biology* **291**(2): 325-339.
17. Racetin, A., Jurić M., Filipović N., Šolić I., Kosović I., Bajo D., Glavina Durđov M., Kunac N., Zekić Tomaš S., Saraga M., Šoljić V., Martinović V., Petričević J., Restović I., Lasić V., Kostić S., Sanna-Cherchi S., Kablar B., Watanabe K., Katsuyama Y., Saraga-Babić M., Vukojević K., (2019): Expression and localization of Dab1 and Reelin during normal human kidney development. Neobjavljena doktorska disertacija. Sveučilište u Splitu: Medicinski fakultet.
18. Raguž F. (2017): Značenje primarne cilije podocita tijekom normalnog glomerularnog razvoja i u nefrotskom sindromu dinskog tipa. Doktorska disertacija. Sveučilište u Mostaru: Medicinski fakultet.
19. Rosenlum S., Pal A., Reidy K., (2017): Renal development in the fetus and premature infant. *Semin Fetal Neonatal Med* **22**(2): 58-66.
20. Saxén L., (1987): Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press.
21. Seely J. C., (2017): A Brief Review of Kidney Development, Maturation, Developmental Abnormalities, and Drug Toxicity: Juvenile Animal Relevancy. *Journal of Toxicologic Pathology* **30**(2): 125-133.
22. Sims-Lucas S., Cusack B., Baust J., Eswarakumar V. P., Masatoshi H., Takeuchi A., Bates C. M., (2011): Fgfr1 and the IIIc isoform of Fgfr2 play critical roles in the metanephric mesenchyme mediating early inductive events in kidney development. *Development dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **240**(1): 240-249.
23. Smith H. W., C. o. M. Library (1992): The Kidney: Structure and Function in Health and Disease. Classics of Medicine Library.
24. Trueb B., Amann R., Gerber S. D., (2013): Role of FGFR1 and other FGF signaling proteins in early kidney development. *Cellular and molecular life sciences* **70**(14): 2505-2518.
25. Tsimafeyu I., Demidov L., Stepanova E., Wynn N., Ta H., (2011) Overexpression of fibroblast growth factor receptors FGFR1 and FGFR2 in renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology* **45**(3): 190-195.
26. Wu Y.-M., Su F., Kalyana-Sundaram S., Khazanov N., Ateeq B., Cao X., Chinnaiyan A. M., (2013): Identification of Targetable FGFR Gene Fusions in Diverse Cancers. *Cancer discovery* **3**(6): 636-647.
27. Xu Z., Dai C., (2017): Ablation of FGFR2 in fibroblasts ameliorates kidney fibrosis after ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Diseases* **3**(4): 160-170.

28. Zhao H., Kegg H., Grady S., Truong H.-T., Robinson M. L., Baum M., Bates C. M., (2004): Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud. *Developmental Biology* **276**(2): 403-415.

Izvori s interneta:

29. Bubrež, (n.d.): Preuzeto 2019. s web stranice: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=9912>
30. Hill M., (2011): Renal System Development. Preuzeto 2019. s web stranice: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Renal\\_System\\_Development?fbclid=IwAR3EseZJY2cF7k8bgtgtio61jTTF1SETqclOZKdRnw0jY6I3SeIvFxoCtY8](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Renal_System_Development?fbclid=IwAR3EseZJY2cF7k8bgtgtio61jTTF1SETqclOZKdRnw0jY6I3SeIvFxoCtY8)
31. Stevanović T., (2017): Embriologija (Skripta). Preuzeto 2019. s web stranice: [https://kupdf.net/download/embriologija-skripta-skracena\\_59b64ee1dc0d60f03c8ceb1b\\_pdf](https://kupdf.net/download/embriologija-skripta-skracena_59b64ee1dc0d60f03c8ceb1b_pdf)
32. <https://www.openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/25-3-gross-anatomy-of-the-kidney>



## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu, Hrvatska. Osnovnu i srednju školu završila sam također u istom gradu i državi. Nakon završetka opće gimnazije „Kraljica Jelena“, upisala sam studij jednopredmetne biologije na Fakultetu Prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru. Diplomirala sam 2017. godine i stekla titulu prvostupnice jednopredmetne biologije. Završetkom preddiplomskog studija, upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam na različitim aktivnostima poput Noć istraživaća, Noć biologije, Simpozij studenata bioloških usmjerenja itd. Usporedno sa studiranjem, obavila sam stručnu laboratorijsku praksu na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, na Zavodu za molekularnu biologiju, pod mentorstvom dr. sc. Marijane Popović Hadžije.