Utjecaj promjene temperature i epigenetskih lijekova na razvoj pupoljaka udova štakora ex vivo

Mužić, Vedrana

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:719803

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedrana Mužić

Utjecaj promjene temperature i epigenetskih lijekova na razvoj pupoljaka udova štakora *ex vivo*

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedrana Mužić

Utjecaj promjene temperature i epigenetskih lijekova na razvoj pupoljaka udova štakora *ex vivo*

DISERTACIJA

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Zavodu za biologiju i Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Istraživačka jedinica Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Floriana Bulić-Jakuš, dr.med.
prof. dr. sc. Gordana Jurić-Lekić, dr. med.

Posebno se zahvaljujem poštovanim mentoricama prof. dr. sc. Floriani Bulić-Jakuš i prof. dr. sc. Gordani Jurić-Lekić što su prepoznale moju znanstvenu znatiželju i želju da povežem prijašnji znanstveno-bazični i današnji klinički rad. Hvala od srca na inspirativnoj znanstvenoj podršci, svekolikoj pomoći i prijateljskim savjetima.

Kolegama i suradnicima Zavoda za medicinsku biologiju i Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ponajviše izvrsnoj znanstvenici dr.sc. Ani Katušić Bojanac, dugujem najljepšu zahvalnost zbog nesebične pomoći i suradnje pri izradi ovoga rada.

Studenticama Marti Himelreich, Katarini Mariji Tupek i Maji Bolješić se zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu.

Veliko hvala predstojnici Kliničkog zavoda za rehabilitaciju i ortopedska pomagala Kliničkog bolničkog centra Zagreb doc. dr. sc. Idi Kovač na podršci i razumijevanju, te svim djelatnicima Kl. zavoda s kojima svakodnevno uspješno surađujem.

Disertaciju posvećujem svojem suprugu Endiju i roditeljima Jagodi i Vinku, koji me kontinuirano potiču i nesebično mi pomažu u ostvarenju mojih ideja.
Bez njihove ogromne i velikodušne pomoći,
ne bih ostvarila ulogu zaposlene majke-supruge-doktorice-znanstvenice…
Hvala vam, zaista! Divni ste!

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. RAZVOJ UDOVA SISAVACA 1

1.1.1.Uspostava razvojnog obrasca 1

1.1.2. Morfogeneza prednjih i stražnjih pupoljaka udova 2

1.1.3. Molekularna osnova razvoja udova 4

1.2. TEMPERATURA U RAZVOJU 6

1.2.1. HIPERTERMIJA 7

1.2.1.1. Stanični molekularni odgovor na hipertermiju 11

1.2.2. HIPOTERMIJA 12

1.3. EPIGENETSKI LIJEKOVI I UTJECAJ NA EMBRIONALNI RAZVOJ 13

1.3.1. 5-AZACITIDIN 17

1.3.1.1. 5-azacitidin i utjecaj na razvoj 18

1.3.2. TRIHOSTATIN A 19

1.3.2.1. Utjecaj trihostatin A na razvoj 21

1.4. ANTIOKSIDANS N-TERT-BUTIL-A-FENILNITRON (PBN) 21

1.5. ANIMALNI MODELI U ISTRAŽIVANJU EMBRIONALNOG RAZVOJA 24

1.5.1. MODELI *IN VIVO* 24

1.5.1.1. Ektopična transplantacija *in vivo* 25

1.5.2. MODELI *EX VIVO* 28

1.5.2.1. Modeli razvoja udova *in vitro* 29

1.5.2.2. Kultura pupoljaka udova *in vitro* 30

1.5.3. KOMBINACIJA METODA *IN VITRO* I *IN VIVO* 33

1.6. SVRHA RADA 35

2. HIPOTEZA 37

3. CILJEVI RADA 37

3.1. OPĆI CILJ 37

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI 37

4. MATERIJAL I METODE 38

4.1. Eksperimentalne životinje 38

4.2. Izolacija pupoljaka udova 38

4.3. Kultura *ex vivo* (u *in vitro* modelu kulture organa) 39

4.4. Osnovni mediji za kultivaciju 40

4.5. Biološki aktivne supstancije dodane u osnovne kultivacijske medije 40
4.6. Transplantacija kultiviranih eksplantata pod čahuru bubrega *in vivo* 41
4.7. Mjerenje rasta eksplantata 42
4.8. Klasična histološka obrada za svjetlosnu mikroskopiju 42
4.9. Imunohistokemijska metoda 43
4.9.1. Protutijela 43
4.9.2. Priprema rezova za imunohistokemiju 44
4.9.3. Proliferacijski biljeg PCNA 44
4.9.4. Biljeg apoptoze – pocijepana kaspaza-3 45
4.9.5. Biljeg acetiliranog histona H3 (H3K9ac) 46
4.10. Stereološka kvantitativna analiza 47
4.11. Statistička analiza podataka 48
5. REZULTATI 49
5.1. PUPOLJCI UDOVA 49
5.2. PUPOLJCI UDOVA U KULTURI *EX VIVO* 51
5.2.1. NORMOTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI 52
5.2.1.1. 5-AZACITIDIN 52
5.2.1.1.1. 5-azacitidin u kulturi sa serumom 52
5.2.1.1.2. 5-azacitidin u kulturi bez seruma 54
5.2.1.1.3. 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma 56
5.2.1.2. TRIHOSTATIN A 58
5.2.1.2.1. Rast eksplantata udova u kulturi bez seruma sa trihostatinom A 58
5.2.1.3. BSA U KULTURI BEZ SERUMA 60
5.2.1.3.1. Rast eksplantata u kulturi sa BSA 60
5.2.1.3.2. Ekspresija PCNA u kulturi sa BSA 61
5.2.1.4. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA NORMOTERMIJI 61
5.2.1.5. TRANSPLANTACIJA PRETHODNO KULTIVIRANIH PUPOLJAKA UDOVA 66
5.2.2. HIPOTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI 70
5.2.2.1. HIPOTERMIJA U KULTURI SA SERUMOM I BEZ SERUMA 70
5.2.2.1.1. Rast eksplantata udova u uvjetima dugotrajne hipotermije 70

5.2.2.1.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima u uvjetima dugotrajne hipotermije 73
5.2.2.2. HIPOTERMIJA I 5-AZACITIDIN 74
5.2.2.2.1. Hipotermija i 5-azacitidin u kulturi sa serumom 74
5.2.2.2.2. Hipotermija i 5-azacitidin u kulturi bez seruma 75
5.2.2.2.3. Hipotermija, 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma 77
5.2.2.3. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA HIPOTERMIJI 79
5.2.3. HIPERTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI 81
5.2.3.1. HIPERTERMIJA U KULTURI SA SERUMOM I BEZ SERUMA 81
5.2.3.1.1. Rast eksplantata udova u uvjetima kratkotrajne hipertermije 81
5.2.3.1.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima u uvjetima kratkotrajne hipertermije 83
5.2.3.2. HIPERTERMIJA I 5-AZACITIDIN 85
5.2.3.2.1. Hipertermija i 5-azacitidin u kulturi sa serumom 85
5.2.3.2.2. Hipertermija i 5-azacitidin u kulturi bez seruma 86
5.2.3.2.3. Hipertermija, 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma 87
5.2.3.3. HIPERTERMIJA I TRIHOSTATIN A 89
5.2.3.3.1. Rast eksplantata udova u kulturi sa trihostatinom A u uvjetima kratkotrajne hipertermije 89
5.2.3.3.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima pupoljaka udova u kulturi sa trihostatinom A u uvjetima kratkotrajne hipertermije 91
5.2.3.4. HIPERTERMIJA I BSA U KULTURI BEZ SERUMA 91
5.2.3.4.1. Rast eksplantata udova u kulturi sa BSA u uvjetima kratkotrajne hipertermije 92
5.2.3.4.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima udova u kulturi sa BSA u uvjetima kratkotrajne hipertermije 93
5.2.3.5. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA HIPERTERMIJI 93
5.2.4. USPOREDBA REZULTATA PROMJENE TEMPERATURE I EPIGENETSKIH LIJEKOVA 97
5.2.4.1. UTJECAJ MEDIJA I PROMJENE TEMPERATURE 97
5.2.4.1.1. Utjecaj seruma 97

5.2.4.1.2. Utjecaj DMSO 100
5.2.4.1.3. Utjecaj promjene temperature medija 103
5.2.4.1.4. Utjecaj promjene temperature medija sa DMSO 104
5.2.4.2. UTJECAJ 5-AZACITIDINA I PROMJENE TEMPERATURE 107
5.2.4.3. UTJECAJ TRIHOSTATINA A I PROMJENE TEMPERATURE 107
5.2.4.4. UTJECAJ BSA I PROMJENE TEMPERATURE 112
6. RASPRAVA 113
7. ZAKLJUČCI 125
8. SAŽETAK 126
9. SUMMARY 127
10. POPIS LITERATURE 129
11. ŽIVOTOPIS 155

POPIS OZNAKA I KRATICA

A – površina elipse (area)
AER - apikalni ektodermalni greben
ATF - lizinske acetiltransferaze
AP – anteroposteriorna os
5-azaC – 5-azacitidin
BMP – engl. *bone morphogenic protein*
BSA – engl. *bovine serum albumin*
DAB - 3,3'-diaminobenzidin
DMSO – dimetil sulfoksid
DNMT- DNA metiltransferatza
DV – dorzoventalna os
EC - engl. *embryonal carcinoma cell*
FGF – engl. *fibroblast growth factor*
HDAC/HDACi –histonska deacetilaza/ inhibitor histonske deacetilaze
HE – hemalaun eozin
H3ac – acetilirani histon H3
H3K9ac – acetilacija lizina 9 histona H3
Hox – engl. *homebox*
HSP – engl.*heat shock protein*
IBD - iritabilna bolest crijeva
MM – engl. *micromass* stanična kultura
MMP - matriksne metaloproteinaze
MEM – minimalni esencijalni medij
Nrf1 – engl. *nuclear respiratory factor-1*
NfκB – engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NOS - sintetaza dušikovog oksida
Nv – numerička gustoća
PBN - N-tert-butil-α-fenilnitron
PBS – engl. *Phosphate Buffered Saline*
PCNA - nuklearni antigen proliferirajućih stanica
PD – proksimalnodistalna os

RASF - sinovijalni fibroblasti reumatoidnog artritisa

ROS – engl. *Reactive Oxygen Species*

RPD3 – transkripcijski faktor iz gljivica kvasca (histonska deacetilaza)

Shh – engl. *sonic hedgehog*

SIR2 – engl. *silent information regulators*

SLE - sistemski lupus erythematosus

Src – engl. *Sarcoma virus tyrosine-protein kinase*

TSA – trihostatin A

TUNEL – engl. *terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling*

Wnt – engl. *wingless-int*

ZP – zona progresije

ZPA – zona polarizirajuće aktivnosti

Grem1 – engl. Gremlin1

SŽS – središnji živčani sustav (CNS)

OA - osteoartrits

SOX – engl. *Sry-related HMG box*

RA - reumatoidni artritis

1. UVOD

1.1. RAZVOJ UDOVA SISAVACA

Prvi znaci stvaranja budućih udova u zametku sisavca malene su simetrične izrasline ventrolateralnih strana tjelesne stijenke rostralnih i kaudalnih somita, koje se postupno izbočuju tvoreći prednje i stražnje pupoljke udova. Nastup izbijanja pupoljaka udova tijekom embriogeneze i vrijeme između sukcesivnog izbijanja prvo prednjih, potom stražnjih udova specifično je za pojedinu vrstu sisavaca (najčešće jedan do dva dana). Zajedničko je, razvoj udova nakon morfogeneze vitalnih organa zametka (Rugh, 1968).

Pupoljci udova su tipično formirani od homogene populacije nediferenciranih mezenhimskih stanica (uglavnom derivata lateralne ploče mezoderma) utisnutih u ektoderm. Već u ranom stadiju morfogeneze stanice prekursora endotelnih i mišićnih stanica koloniziraju nediferencirani mezenhim pupoljka migracijom iz regija dermomiotoma pripadajućih somita (Tuan, 2004; Fernandez-Teran i Ros, 2008). Razvoj uda diktira mreža signala koji usklađuju diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu. Kako teče organogeneza izmjenjuju se parakrine i autokrine poruke između slojeva stanica i definiranih regija s različitom ekspresijom proteina.

1.1.1. Uspostava razvojnog obrasca

Morfogeneza pupoljka je kontrolirana usklađenom interakcijom stanica ektoderma i mezenhima (Gilbert, 2006; Towers i Tickle, 2009; Zeller, 2010; Sheth i sur., 2013). Tri centra specijaliziranih stanica: apikalni ektodermalni greben AER (engl. *apical ectodermal ridge*), zatim zona progresije (ZP) smještena subektodermalno tik ispod AER i zona polarizirajuće aktivnosti (ZPA) uz stražnji rub pupoljka uda, osiguravaju nužne faktore rasta za razvojni obrazac (engl. *patterning*) budućeg uda prema tri osnovne osi embrionalnog pupoljka. Normalan razvoj udova prati složen proces sazrijevanja triju temeljnih skeletnih segmenata uda, od proksimalno prema distalno nazvanih: *stylopodium* (humano odgovara kostima - nadlaktice/natkoljenice), *zeugopodium* (-podlaktice/potkoljenice) i *autopodium* (-

šake/stopala). Njihovo je oblikovanje definirano, gore spomenutim, trima osnovnim osima uda: proksimalno-distalnom (PD), antero-posteriornom (AP) i dorzo-ventralnom (DV). AER kontrolira PD elongaciju uda i pojavljivanje temeljnih skeletnih segmenata u smjeru rasta. Unutar svakog segmenta pod utjecajem ZPA, duž AP osi (u smjeru palac - mali prst) formiraju se buduće koštane osnove u zrakasti mezenhim, apikalno najčešće u pet dijelova (*pentadactyl*), a preostala ZP je bitna za DV plošno oblikovanje uda (Fernandez-Teran i Ros, 2008; Gurrieri i Everman, 2013; Suzuki, 2013). Stanična interakcija, dakle određuje tijek embrionalnog razvoja uda sisavaca regulirajući uzajamno rast i razvojni obrazac.

1.1.2. Morfogeneza prednjih i stražnjih pupoljaka udova

Rani stadij formiranog pupoljka uda karakterizira pojačana stanična aktivnost, usporedno s navalom proliferacije stanica nastupa PD i AP organizacija uda (Sheth i sur., 2013). Vršno nastupa zadebljanje ektoderma i formira se AER. Ubrzanom mitotičkom aktivnošću pupoljci se izdužuju prema van i počinju poprimati oblik uda sa širim područjem vrška kao budućom osnovom za razvoj šake (ili stopala), odnosno *autopodiuma*. Zgušnjavanjem mezenhima formiraju se zrakaste osnove prstiju i kosti pešća (ili nožja) s rahlim interdigitalnim regijama. Istovremeno uz izduženje pupoljka u PD smjeru, mezenhimske stanice proksimalno na bazi pupoljka (odgovara *stylopodiumu*) počinju se diferencirati, dok distalne subektodermalne mezenhimske stanice vrška ostaju nediferencirane. Diferenciraju se krvne žile i hrskavične osnove (Moore i sur., 2011). Zanimljivo, u ranom razvoju pupoljka elementi apendikularnog skeleta formiraju se u jedinstvenoj populaciji diferenciranih stanica. Privremeni dijelovi hrskavičnog skeleta čine jednu cjelinu, od proksimalno prema distalnim budućim prstima na vršku uda (Tuan, 2004). Rana morfogeneza prednjih i stražnjih udova je identična. Kasnije se razlikuju u izgledu distalnog vrška, prednji kao veslo i stražnji poput peraje (vidi: 5.1. Slika 1.).

U zadnjoj fazi morfogeneze mezenhim vrška uda zrakastih osnova za prste (*pentadactyl*) od distalno prema proksimalno diferencira se u hrskavicu i formira osnove falanga prstiju (Moore, 2011), a onaj iz interdigitalnih regija odlazi u programiranu staničnu smrt apoptozom. U regijama formiranja zglobova zgusnute stanice se ne diferenciraju u hondrocite, već također kreću u programiranu apoptozu.

Apoptoza, dakle, omogućuje prekide u hrskavičnom skeletu na mjestu budućeg zgloba i eliminira stanice interdigitalnog mekog tkiva između zrakastih hrskavičnih osnova za prste (Gilbert, 2006).

Rani razvoj pupoljka uda obilježen je proliferacijom stanica. Potvrđeno je su stanice koje se dijele jednakomjerno raspoređene duž cijelog pupoljka. Reduciran je broj proliferirajućih stanica u regijama diferencijacije stanica u hondrocite, koje su migrirale s periferije u proksimalne dijelove pupoljka. Diferencirani hondrociti ostavljaju za sobom područje u obliku potkove na periferiji pupoljka sa nediferenciranim mezenhimskim stanicama u mitozi (Towers i Tickle, 2009).

U istraživanjima sazrijevanja hrskavice, formiranja zglobova i budućih interdigitalnih prostora (De Valck i Luyten, 2001) najčešće se koriste eksperimentalni modeli formiranja udova koji koriste period u kojem se javlja povećanje koncentracije mezenhimalne prehrskavice u pupoljcima prednjih udova, a što odgovara dvanaestom danu (Martin, 1990) u zametku miša (engl. *midgestation),* 13. danu razvoja štakora i po prilici 36. danu razvoja humanog embrija (Rugh, 1968). Stražnji udovi kasne u razvoju po prilici jedan dan za prednjima u rastu i diferencijaciji (Rugh, 1968; Martin, 1990; De Valck i Luyten, 2001) u humanom embriju i do dva dana (Rugh, 1968; Moore i sur., 2011).

Sukladno korištenim uzorcima u eksperimentalnom radu ovog istraživanja, kasna morfogeneza opisuje se na prednjem pupoljku uda zametka štakora. Tijek razvoja je sličan ostalim zamecima sisavaca. U zametku štakora 13.-og dana formirana je pentagonalna osnova dlana s potpuno razvijenim ektodermom, zajednička karpalna blastema s osnovama za svih pet metakarpalnih kostiju i započeta je hondrifikacija dugih kostiju pešća. Tik ispod epidermisa nalazi se tanka avaskularna zona i ispod nje splet krvnih žila kože (Martin, 1990). Slijedećeg dana osnova za dlan je duboko nazubljena s početkom regresije apikalnog ektoderma. Petnaestog dana vidljiva je apoptoza u budućim interdigitalnim prostorima, pojavljuju se živčani ogranci u osnovi dlana probijanjem iz leđne moždine (Martin, 1990), zatim ventralna i dorzalna skupina mišića (iz miotuba koje su migrirale u ranom stadiju), započinje osifikacija u cjevastim kostima u istoj maniri kao i hondrifikacija u PD smjeru, i formiranje dermisa u proksimalnim djelovima (2-3 reda okruglih stanice ispod epidermisa). Šesnaestog dana prsti su razdvojeni s formiranim zglobovima i derivatima kože. Dalje se nastavlja hondrifikacija i osifikacija do okota (Rugh, 1968).

Greške u gore opisanim procesima razvoja i to bilo da su genetski uvjetovane, bilo da su uvjetovane vanjskim faktorima rezultirat će malformacijama kao što su sindaktilija kožnog ili koštanog tkiva, polidaktilija, amelija, mikromelija i fokomelija (Gilbert, 2006).

1.1.3. Molekularna osnova razvoja udova

Iako je poznato da tijek morfogeneze uda koordiniraju tri signalna centra AER, ZPA i ZP (Fernandez-Teran i Ros, 2008; Gurrieri i Everman, 2013), potpun mehanizam za sada ostaje nepoznanica (Sheth i sur., 2013). Dosadašnja genetska istraživanja otkrivaju prilično dinamičan razvoj pupoljka uda dirigiran regulacijom ekspresije ključnih gena, koordinirane u vremenu i prostoru, a sve pod samokontrolom stanica pupoljka (Gilbert, 2006; Towers i Tickle, 2009; Zeller, 2010; Sheth i sur., 2013). Spoznaje podupiru od ranije poznatu činjenicu o različitim histomorfologijskim značajkama ranog i kasnog stadija razvoja pupoljka uda (vidi 1.1.), za koje sad znamo da su odraz razlike u pojavnosti i vremenu izlaganja signalnim molekulama.

Za početak formiranja pupoljka nužni su signali porodice FGF gena iz AER (grupno nazvanih AER-FGF), čiju ekspresiju reguliraju mezenhimalni čimbenici *Shh* (producira ga ZPA pod aktivacijom *Hox* gena), *Fgf10* i *Gmen1*. U lateralnoj ploči mezoderma na mjestu budućeg pupoljka uda *Fgf10* (parakrino iz buduće ZP) pomoću *Wtn* iz ektoderma izvan AER centra (Haro i sur., 2014) aktivira ekspresiju ektodermalnog *FgF8* (jedan od AER-FGF), koji povratno održava ekspresiju *Fgf10* u ranom pupoljku (Sheth i sur., 2013; Haro i sur., 2014). Nastavak ranog PD i AP rasta održava pozitivna povratna sprega između *Shh*, *Grem1* i AER-FGF - gdje *Shh* podržava transkripciju *Grem1*, koji antagonizira BMP i omogućuje aktivnost AER-FGF (Zeller, 2010). Također, AER-FGF i *Wnt* održavaju subektodermalne mezenhimske stanice vrška nediferenciranima i u proliferaciji, dok se nad proksimalnim stanicama baze pupoljka zbog postupnog udaljavanja gubi utjecaj, što potakne njihovu diferencijaciju (Zeller, 2010). Kasniji rast pupoljka zasniva se na elongaciji skeletnih elemenata pod utjecajem *Shh*, zbog regresije AER koja u miša nastupa oko 13. dana razvoja (Sheth i sur.; 2013) i poklapa se s formiranjem osnova za buduće prste (Haro i sur., 2014). *Hox* geni reguliraju oblikovanje uda (Moore i sur.,

2011). Endogena retinoična kiselina morfogen je ranog razvoja uda koji sudjeluje u oblikovanju *stylopodiuma* (Zeller, 2010) i regulira programiranu staničnu smrt (Rodriguez-Leon i sur., 1999; Ali-Khan i Hales, 2003), odnosno apoptozu preko BMP signalnog puta (Rodriguez-Leon i sur., 1999; Moore i sur., 2011). Tri umrežena gena *Bmp-Sox9-Wnt* (Raspopovic i sur., 2014) nadziru oblikovanje prsta prema samoregulirajućem mehanizmu Turingova modela (Turing, 1990) razlike gradijenata morfogena u tkivu tijekom razvoja, formirajući periodične obrasce za razvoj prstiju i interdigitalnih regija tijekom razvoja.

Mogući su i drugi signalni centri u kasnijem stadiju razvoja. Shodno tome, postoje dokazi interakcije stanica zrakastih osnova prstiju i interdigitalnih mezenhimalnih regija (Dahn i Fallon, 2000; Towers i Tickle, 2009). Recentni rad o razvoju prstiju (Suzuki, 2013) potvrđuje da interdigitalna regija određuje sudbinu svake pojedinačne zrakaste osnove budućeg prsta, bolje reći koji će prst iz nje nastati.

Programirana stanična smrt, koja se očituje apoptozom stanica, predstavlja važan proces u normalnom embrionalnom razvoju (Glucksman, 1951; Jacobson i sur., 1997), pa tako i u morfogenezi udova (Saunders i Gasseling, 1962; Gilbert, 2006; Moore, 2011). Osim toga, apoptoza je često i obilježje poremećenog razvoja induciranog teratogenom koji uzrokuje strukturne malformacije. Apoptoza može biti potaknuta intrizičnim mitohondrijskim ili ekstrizičnim putem posredovanim receptorima (Ueda i sur., 2002). Stanična smrt, bilo programirana u normalnom razvoju bilo inducirana teratogenom, selektivna je za određenu vrstu tkiva. Tkiva pokazuju različitu osjetljivost na apoptozu induciranu teratogenom (Umpierre i sur., 2001). Primjerice, stanice neuroektoderma ranog zametka glodavca su izrazito osjetljivije na apoptozu induciranu teratogenim djelovanjem hipertermije (Edwards, 2006; Gilbert-Barness, 2010), nego li stanice mišića srca (Mirkes i Little, 1998).

Prva istraživanja (Tewari i sur., 1995; Alnemri i sur., 1996) već opisuju značajnost kaspaza u procesu apoptoze kroz njezinu centralnu ulogu u proteolizi. Nazvane su prema mjestu vezanja za cisteinski ostatak i mjestu cijepanja proteina nakon aspartatskog ostatka (engl. *caspase - cysteinyl aspartate-specific proteases*) što vrijedi za cijelu porodicu kaspaza (Alnemri i sur., 1996). Svih 15 kaspaza dijeli neke zajedničke osobine: sve su cistein-aspartat proteaze, posjeduju konzervirano pentapeptidno aktivno mjesto ‘QACXG’ (X može biti R, Q ili D), prekursori su

prokaspaze (zimogeni), dijele sposobnost autoaktivacije i aktivacije drugih kaspaza, stvaraju heterodimere s jednom manjom i većom podjedinicom, a dva heterodimera udružuju se u aktivni enzim heterotetramer (Chowdhury i sur., 2008***).***

Kaspaza-3 ima ključnu ulogu u kaskadi apoptoze inducirane različitim stimulusima (Tewari i sur., 1995; Faleiro i sur., 1997) i bitna je za programiranu staničnu smrt mozga miša (Kuida i sur., 1996). Nalazi se u staničnoj citoplazmi u inaktivnom obliku proenzima molekularne težine 32 kDa. Prilikom apoptotičkog stimulusa, aktiviraju je kaspaza-8 (Tewari i sur., 1995; Boldin i sur., 1995; Fernandes-Alnemri, 1996) i kaspaza-9 (Li i sur., 1997) cijepanjem u dvije podjedinice (17 i 12 kDa) koje se udružuju u heterotetramerni aktivni enzim. Jednom aktivirana kapaza-3 direktno cijepa različite proteine, poput onih uključenih u replikaciju DNA, transkripciju i translaciju, zatim proteine citoskeleta, kinaze, fosfataze, druge kaspaze i indirektno aktivira nukleazu (engl. *caspase-activated nuclease*) odgovornu za internukleosomalnu fragmentaciju DNA (Umpierre i sur., 2001). Smatra se glavnim efektorom u cijepanju supstrata terminalne faze apoptoze (Walsh i sur., 2008), efektorom u apoptozi induciranoj retinoidima (Ali-Khan i Hales, 2003) i zajedno s kaspazom-7 medijatorom u apoptotičkim mitohondrijskim zbivanjima (Lakhani i sur., 2006).

Apoptoza u normalnom razvoju pupoljka uda zahvaća interdigitalnu regiju (Lee i sur., 1999; Suzuki, 2013), prednju i stražnju rubnu regiju pupoljka i AER (Umpierre i sur., 2001). U zametku miša ova su područja vidljiva oko 10,5 do 14,5 dana embrionalnog razvoja (Zakeri i Ahuja, 1997) što odgovara razvoju štakora jedan dan kasnije (Rugh, 1986). Prikazom kaspaze-3 u interdigitalnim regijama u prednjim udovima 13 dana starih zametaka miševa potvrđena je apoptoza (Umpierre i sur., 2001; De Valck i Luyten, 2001), a prije toga bilo je nejasno da li se radi o apoptozi ovisnoj o kaspazama ili o nekrozi (Chen i Zhao, 1998).

1.2. TEMPERATURA U RAZVOJU

Sisavci su homeotermni organizmi, a pojedina životinjska vrsta ima svoju normalnu temperaturu tijela (engl. *normal body temperature*) koja dnevno varira u rasponu od ±0.6-0.8 ºC. Srednja vrijednost normalnog temperaturnog raspona

štakora je 38,5 ºC (Webster i sur., 1985; Germain i sur., 1985), njemu bliskog glodavca miša 38,3 ºC (Shiota, 1988), a u čovjeka 37 ºC mjereno u usnoj šupljini. Normalna humana temperatura tijela u trbušnoj šupljini (engl. *deep body* ili *core temperature*) je viša od one u usnoj šupljini. Kao normalna tjelesna temperatura prihvaćena je 37 ºC s dnevnim oscilacijama ±0.5-1 ºC (Mellette i sur., 1951; Hardy, 1961), iako u široj populaciji vjernija je srednja vrijednost normalne temperature od 36.8 ºC ±0.4 (Mackowiak i sur., 1991). *In utero* fetus nema sposobnost regulacije vlastite temperature pa majčina temperatura tijela određuje njegovu temperaturu tijela gubitkom topline putem umbilikalne cirkulacije (eliminira 85% fetalne topline) i placentarnim protokom, a preostalih 15% se rasipa kroz kožu fetusa, amnionsku tekućinu i stijenku uterusa (Gilbert i sur., 1985; Power, 1989; Schroder i Power, 1997). Tijekom gestacije temperatura humanog fetusa raste (Power, 1989; Asakura, 2004) i pred kraj je čak 0.5 ºC viša nego majčina temperatura u tjelesnoj šupljini (Macaulay i sur.; 1992).

Promjena temperature odnosno odstupanje od normalne tjelesne temperature podrazumijeva dva pojma hipertermiju (povišenje temperature) i hipotermiju (sniženje temperature).

Dokazano je da prenatalno izlaganje promjeni temperature može modificirati razvoja zametka pomoću epigenetskih promjena regulacije genske ekspresije, što potvrđuje pokus na pilićima *in vivo* u kojem je povišena temperatura tijekom inkubacije jaja, povećala razinu mišićnih čimbenika rasta i postnatalnu mišićnu masu (Serrat, 2013).

1.2.1. HIPERTERMIJA

Hipertermija ili povišena temperatura (Benjamin i sur., 2002) koristi se u fizikalnoj terapiji i za liječenje tumora. Tri su načina primjene: površinski (lokalno), duboko (regionalno) i sistemski (cijelo tijelo). Sistemski učinak postiže se intenzivnim vježbanjem na visokim temperaturama, prelaskom topline iz medija u okolini (kao u eksperimentu s hipertermijom) i vrućicom. Tople procedure uključuju toplu vodu, parafin, zagrijani vlažni zrak, perfuziju zagrijanom krvlju, kratkovalnu dijatermiju, infracrveno zračenje, mikrovalno i radiofrekventno zračenje, ultrazvuk i konvekciju topline zagrijavanjem tijela. Hipertermiju u čovjeka izazivaju unutarnji (vrućica,

intenzivno vježbanje na visokim temperaturama) i vanjski čimbenici (ultrazvuk, elektromagnetsko zračenje, saune, solariji) (Chambers i sur., 1998; Chambers, 2006, Katušić, 2008).

Poznati su teratogeni učinci hipertermije na embrionalni razvoj životinja i ljudi (Edwards, 2006). Teratogeni učinak varira ovisno o visini temperature (broj ºC viših od normalne temperature tijela), vremenu izlaganja povišenoj temperaturi i razvojnom stadiju zametka u trenutku ekspozicije (Katušić, 2008). Dogovorno je predložen univerzalni prag povišenja od 1.5 ºC iznad normalne tjelesne temperature za teratogenu vrijednost hipertermije, u ljudi i životinja (Edwards, 1986; 1993). Svaki stupanj više, skraćuje potrebno vrijeme ekspozicije. U animalnim modelima 15-minutno povišenje ≥4 ºC iznad normalne tjelesne temperature majke uzrokovalo je malformacije embrija (Ziskin i Morrissey, 2011).

Istraženi animalni modeli u eksperimentalnoj teratologiji hipertermije uključuju piliće (Buckiovà i sur., 1998; Primmett i sur., 1988), miševe (Pennycuik, 1965; Webster i Edwards, 1984), štakore (Kreshover i Clough, 1953; Škreb i Frank, 1963; Edwards, 1968), hrčke (Kilham i Ferm, 1976), zamorce (Edwards, 1967; Edwards i sur., 1974; 1984), zečeve (Brinsmade i Rubsaamen, 1957), primate (Hendrick i sur., 1979) i goveda (Ulberg i Sheean, 1973; Edwards i Hansen, 1996,1997; Rivera i Hansen, 2001; Sakatami i sur., 2008). Provedena su i kontrolirana humana istraživanja utjecaja povišene temperature u trudnoći (Abramowicz i sur., 2008).

Povišenje temperature tijela zametka u sisavaca najčešće uzrokuje resorpciju i intrauterinu smrt, a u manjim dozama uzrokuje ukupnu retardaciju rasta i morfološke promjene različitih tkiva (Edwards, 2006). Istražena je osjetljivost pojedinih organa i tkiva na hipertermiju, te su određeni temperaturni pragovi koji su specifični za pojedini stupanj razvoja zametka i teratogeni učinak (Edwards, 2006). Teratogeni učinak pod utjecajem hipertermije nastaje kao posljedica deregulacije stanične proliferacije, migracije, diferencijacije i apoptoze u sisavaca (Edwards i sur., 2003). Nije poznat točan mehanizam oštećenja stanice. Pretpostavlja se da je termalni šok usko povezan s generiranjem slobodnih ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) što rezultira oksidativnim stresom (Krausova i Peterka, 2007; Sakatami i sur., 2008). Model upalnog artritisa štakora generirao je ROS molekule i pokazao pojačana svojstva degradacije hrskavice (Benjamin i sur., 2002). Tezu potvrđuje termoprotektivni učinak antioksidansa u kombinaciji s hipertermijom (Edwards, 2006).

Kratkotrajna hipertermija u ranom stadiju zametka miša nije izazvala apoptozu stanica srca (Mirkes, 1985) i žumanjčane vreće. Pretpostavlja se da ova važna tkiva za nastavak razvoja posjeduju mehanizam obrane od apoptoze intrizičnog mitohondrijskog puta (Umpierre i sur., 2001). Vrsta stanice i doza hipertermije moduliraju odgovor stanice na oksidativni stres - od stimulacije proliferacije do zastoja rasta, stanične smrti apoptozom ili nekrozom (Krausova i Peterka, 2007).

Klinička istraživanja majčinih vrućica u trudnoći potvrđuju ovisnost štetnog učinka o dozi hipertemije i stupnju razvoja. U animalnih majki povišenje normalne tjelesne temperature za 5 ºC uzrokuje povišenje krvnog tlaka, pulsa, razinu hormona stresa i stres proteina, te sisitemskih kortikosteroida (Abramowicz i sur., 2008), u ljudi kod povišenja <1 ºC nastupa znojenje i tahikardija (Abart i sur., 1989). Umjereno preimplantacijsko izlaganje i veće tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja često završava resorpcijom i pobačajem. Najosjetljiviji na hipertermiju je SŽS u prvom trimestru (4-14 tjedan) i to vjerojatno zbog antimitotičkog učinka hipertermije (Umpierre i sur., 2001; Edwards, 2006; Gilbert-Barness, 2010). Opisuju se malformacije neuralne cijevi, ali i druge anomalije iz istog razvojnog stadija u vrijeme zatvaranja neuralne cijevi: mikroftalmija, rascjep usne i nepca, kardiovaskularne malformacije i malformacije bubrega (Krausova i Peterka, 2007). U eksperimentalnim animalnim modelima potvrđena su najučestalija neuralna oštećenja: egzencefalija, anencefalija, encefalokela, mikroftalmija, mikroencefalija. Rani zameci štakora (stari 10 dana) izloženi kratkotrajnoj (15-240 minuta) hipertermiji od 41-43 ºC potvrdili su senzitivnost neurološkog tkiva na hipertermiju, incidencija mikrocefalije i mikroftalmije rasla je s povišenjem temperature i vremenom ekspozicije (Mirkes, 1985). Potvrđene su i deformacije drugih tkiva, opisano je oštećenje srca, hipoplazija zubi, defekti kože i razvojne anomalije skeleta poput oštećenja kraniofacijalnog razvoja (rascjepi), promjene na aksijalnom i apendikularanom skeletu (kifoza, skolioza, hipoplazija rebara i kralježaka, skraćenje udova, kontrakture poput talipesa /uvrnuto stopalo i gležanj/ i artrogripoze) (Edwards i sur., 2003; Katušić, 2008). Hipertermija čini se dodatno uzrokuje mikrovaskularnu insuficijenciju zbog oštećenja endotela i pojačane permeabilnosti što uzrokuje perivaskularne i intersticijalne edeme i vjerojatno posljedičnu hipoplaziju udova i prstiju, rascjep trbušne stijenke, artrogripozu i hipodaktiliju (Graham i sur., 1998). Preintenzivna majčina tjelovježba i egzogena hipertermija (npr. vruće kupke) može smanjiti tjelesnu težinu fetusa, iako je samo

teratogeno djelovanje zbog kompenzatorne fetalne hipotermije smanjenjem placentarnog protoka, još uvijek hipotetsko (Artal i sur., 2003). Tezu potvrđuje studija provedena na fetusima treniranih štakora (mjereno u prednjim i stražnjim udovima), gdje nije bilo razlike u ekspresiji induciranog HSP71 (engl. *Heat Shock Protein*) prema kontroli (Mottola i sur., 2007).

Umjerena hipertermija (39-41 ºC kroz 1 sat izlaganja) u *in vitro* kulturi humanih stromalnih stanica i stanica sličnim osteoblastima potiče proliferaciju i diferencijaciju osteoprogenitornih stanica (Shui i Scutt, 2001), te mineralizaciju kolagena (Wadkins, 1968; Shui i Scutt, 2001). Kratkotrajna hipertermija (42 ºC kroz 15 minuta) u *in vitro* kulturi štakora starog 9,5 dana potakla je povećanje promjera 5. dana kulture (Katušić, 2008). Što se tiče utjecaja hipertermije na diferencijaciju pokazano je da kratkotrajno izlaganje visokoj temperaturi regulira diferencijaciju kardiomioblasta. Mala molekula HSP25 brani skeletni mišić od utjecaja oksidativnog stresa (Escobedo i sur., 2004: Takayuki, 2009). A toplinski šok prije transplantacije produžuje preživljavanje presadka skeletnih mioblasta u živom animalnom modelu (Heng i sur., 2004). Istraživanje utjecaja majčine hipertemije u miša ukazalo je na kašnjenje miogeneze udova (Lee i sur., 2009).

Kliničke studije na zrelim hondrocitima zglobne hijaline hrskavice pokazuju da HSP 70 induciran hipertermijom protektivno djeluje na hrskavicu i inhibira apoptozu hondrocita u osteoartritisu. Intraartikularna toplina stimulirana mikrovalovima povećala je ekspresiju HSP70 u hondrocitima i djelomično pojačala metabolizam matriksa hrskavice (Takahashi i sur., 2009; Tonomura i sur., 2006) sintezom glizoaminoglikana (Wei i sur., 2004). Tkivnu specifičnost utjecaja temperature pokazala je kultura humane zglobne hrskavice *in vitro*, gdje su kod osteoartrotski oštećene fibrozirane hijaline hrskavice nastupile morfološke promjene na nižim temperaturama nego u intaktnoj hijalinoj hrskavici (Kaplan i sur., 2004). Bilo koje povišenje temperature iznad normale u kulturi udova pupoljaka pilića uzrokovalo je poremećaj diferencijacije hondrocita epifizne ploče rasta i posljedičnu dishondroplaziju (Yalçin i sur., 2007). Pored indukcije HSP (Shui i Scutt, 2001) i genske kontrole staničnog ciklusa (Takaoki i sur., 2004) pretpostavlja se da hipertermija u hondrocitima inducira stres endoplazmatske mrežice, koji regulira proliferaciju, apoptozu i sintezu međustaničnog matriksa (Yang i sur., 2005). Zanimljivo je da primjena niskih terapijskih doza ultrazvuka na epifizne ploče nije

poremetila diferencijaciju hondrocita i rast udova štakora. Razlog je u tome što se kod slabije izlazne energije ultrazvuka ne podiže temperatura tkiva i izostaje učinak hipertermije na epifizne ploče rasta (Lyon i sur., 2006). Novija studija (Morton i sur., 2009) opisuje citoprotektivnu ulogu nekoliko HSP (među inima je HSP70, HSC70) na skeletni mišić u čovjeka kod stresa induciranog vježbanjem. Također, smanjenu količinu citoprotektivnih HSP našli su istraživači u novom *in vivo* štakorskom modelu s razvijenom miopatijom kritičkne bolesti u stadiju unapredovale atrofije (Llano-Diez i sur., 2011).

1.2.1.1. Stanični molekularni odgovor na hipertermiju

Endogeni stanični odgovor na hipertermiju ekspresija je gena za porodicu proteina toplinskog šoka (HSP). Zbog indukcije i drugim stresogenim čimbenicima, nazivaju se i stres-proteinima. U sisavaca se prema molekularnoj težini klasificiraju u dvije grupe (male i velike HSP molekule). HSP su šaperoni staničnih proteina s citoprotektivnim učinkom (Lanneau i sur., 2008), povezuju se s normalnim i poremećenim embrionalnim razvojem (Zhu i sur., 2010). Hipertermijom inducirani HSP mogu djelovati termotolerancijski ili teratogeno. Embriotoksičnost hipertermije (Katušić, 2008) je fazno i dozno ovisna što korelira sa spoznajom da i HSP geni pokazuju faznu i tkivnu specifičnost ekspresije tijekom embriogeneze. Čini se da svaki *hsp* gen ima barem dvije kopije, jednu konstitutivnu koja djeluje u normalnom razvoju zametka (engl. *cognate*) i drugu induciranu stresom (već nakon 10-15 minuta hipertermije) koja posjeduje termotolerancijski učinak (Walsh i sur., 1987). Opetovano izlaganje toplinskim udarima u normalnim stanicama i tkivima izaziva rezistenciju. „Akutna termotolerancija“ razvija se nekoliko sati nakon epizode subletalnog izlaganja hipertermiji i traje nekoliko dana, dok je „kronična termotolerancija“ rezultat dužeg kontinuiranog izlaganja hipertermiji i ne ovisi o HSP (Benjamin i sur., 2002). U *in vitro* pokusu kulture ranog zametka štakora (pre-somitni stadij) stečena termotolerancija nije djelovala teratogeno. Prethodno kratkotrajno izlaganje povišenoj temperaturi (42 ºC kroz 10 minuta) djelovalo je termotolerancijski preko indukcije HSP71, te su izostale malformacije kada je nakon sat vremena ponovno primijenjen toplinski šok (Walsh i sur., 1987). Zhu (Zhu i sur., 2010) je sa suradnicima potvrdio faznu specifičnost 17 različitih HSP u normalnom tkivu prednjih

pupoljka udova miša u kulturi *ex vivo*, i različitu ekspresiju istih u paralelnim modelima s poremećajem u razvoju udova (fokomelija i oligodaktilija). Novije istraživanje potvrđuje korelaciju obrasca ekspresije različitih HSP gena s fazom razvoja na mišjem modelu razvoja nepca. Smatra se da sudjeluju u razvoju putem odgovora na stres i/ili antiapoptotički (Zhu i sur.; 2013). Samo je nekoliko molekula HSP detaljnije istraženo (HSP27, HSP47, HSP70 i HSP90, HSP 110) u odnosu na embrionalni razvoj, ostale su još nerazjašnjene (Zhu i sur.; 2013).

HSP blokiraju apoptozu ometanjem aktivacije kaspaza, modulirajući signalne puteve, kontrolom otpuštanja apoptotičkih molekula i djelovanjem na postmitohondrijske procese (Lanneau i sur., 2008). HSP27, HSP70, HSP60 i HSP90 djelovali su djelovali u različitim modelima bez obzira na stresogen (Lanneau i sur., 2008). Ekspresija HSP70 u selektivnim modelima inhibirala je aktivaciju kaspaze-3 (Li i sur., 2001; Lanneau i sur., 2008), čime je objašnjen termotolerancijski učinak umjerene kratkotrajne hipertermije.

Na molekularnoj razini hipertermija djeluje na slabe molekularne veze što uzrokuje destabilizaciju makromolekula. Nastupa hiperpermabilnost zbog denaturacije proteina citoskeleta i membrana, kao i denaturacija važnih enzima. Promjene u ionskom statusu stanice koče oksidativnu fosforilaciju, dovode do translacijskog aresta i promjena u funkciji mitototičkog vretena, inhibiraju DNA sintezu i odgađaju spajanje novonastale DNA. Zbog utjecaja na mitotičko vreteno mogu nastati kromosomske aberacije, poput poliplodije, i stanična smrt u S fazi ciklusa. Iako su stanice u mitozi posebno osjetljive na toplinu, smrt stanice izazvana hipertermijom nije ovisna o mitozi (Benjamin i sur., 2002).

1.2.2. HIPOTERMIJA

Hipotermija se definira kao temperatura tijela u trbušnoj šupljini (engl. *deep body* ili *core temperature*) niža od 35 ºC (Gilbert-Barness, 2010). Uzrokovana može biti izlaganjem cijelog tijela nižoj okolišnoj temperaturi (hladnjača, imerzija u hladnoj vodi) ili perfuzijom pothlađene krvi majke iz kardiopulmonalnog optoka majke, iz aparata za izvantjelesni krvni optok ili u slučaju. kemijski inducirane hipotermije alkoholom (Randall i sur., 1988), antipsihoticima poput klorpromazina (Asanami i Shimono, 1997; Asanami i sur., 1998) i haldola (Asanami i Shimono, 2009), te

fenolom (Spencer i sur., 2007). Hipotermiju klasificiramo (Brown i sur., 2012) u četiri razreda: blaga (32-35 ºC), umjerena (28-32 ºC), teška (28-32 ºC) i vrlo teška (<20 ºC).

Nedovoljno je istražen utjecaj hipotermije na trudnoću. Opisano je svega nekoliko slučajeva djece sa SŽS disgenezom i multiplim kongenitalnim defektima povezanih s hipoperfuzijom uslijed hipotermije (Gilbert-Barness, 2010). U *in vivo* modelima istraživanja teratogenog učinka hipotermije, najveća manjkavost se pripisuje nemogućnosti anuliranja majčinog odgovora na hipotermiju. Potrebno je znatno sniziti normalnu temperaturu u trbušnoj šupljini tijela majke kako bi se se utjecalo na razvoj zametka unutar maternice (Pillitteri, 1992) pa rana *in vivo* animalna istraživanja ne opisuju negativne učinke hipotermije (Shepard i Lemire, 2004). Znatno sniženje temperature okoline (uranjanjem trudne ženke hrčka u kupku temperature -5 ºC) u kraćoj ekspoziciji (30 minuta) na starijem zametku (9-11.-ti dan) izazvalo je resorpciju, dok duže (45 minuta) na zametku 6-8 dana starosti defekte neuralne cijevi, nepca i udova (Smith, 1957). Cjelodnevno izlaganje na 20 ºC majki miševa starih 7,5-8,5 dana uzrokovalo je oštećenje kralježnice (Lecyk, 1965). Prema tome, učinak hipotermije pokazao je ovisnost o fazi organogeneze, osjetljivosti tkiva, vremenu i temperaturi izlaganja, što je u skladu s podacima o teratogenosti povišenja temperature (Edwards, 2006; Katušić, 2008).

1.3. EPIGENETSKI LIJEKOVI I UTJECAJ NA EMBRIONALNI RAZVOJ

Epigenetiku kao pojam uveo je 1942. Conrad Waddington (Liyanage i sur., 2014). Biologija (genetika) definira epigenetiku kao proučavanje mitotički ili mejotički nasljedne promjene genske ekspresije ili staničnog fenotipa. Promjene su prouzrokovane mehanizmima koji ne mijenjaju neukleotidni redoslijed molekule DNA-a kao što to radi mutacija (Russo i sur., 1996). Epigenetika se bavi nasljednim, ali revezibilnim oznakama (engl. *marks*) koje se postavljaju na nepromijenjeni genom (Bulić-Jakuš, 2013), koje selektivno i kontrolirano utječu na gensku ekspresiju (Liyanage i sur., 2014). Epigenetski status stanice je dinamičan, on se mijenja tijekom diferencijacije stanice i embriogeneze (Futscher, 2013) ovisno o fiziološkim (oksidativni status, hormonalne ili nutritivne promjene) ili okolišnim utjecajima (poput

fizikalnih agensa, lijekova ili metaboličkih promjena kao što je promjena medija). U sklopu odgovora stanice na utjecaje iz okoliša tijekom embrionalnog razvoja, upravo je plastičnost stanice (engl. *cellular plasticity*) rezultat epigentskih promjena koje omogućuju stanično reprogramiranje (Arrowsmith i sur., 2012).

U regulaciju genske ekspresije uključena su tri epigenetska mehanizma: DNA metilacija, posttranslacijske modifikacije histona i nekodirajuće molekule RNA. Epigenetskim procesima omogućuje se relaksirajuće stanje kromatina i pristup ponavljajućim nukleosomima u kojim je DNA omotana oko jezgre histonskih proteina (Liyanage i sur., 2014). Proces DNA metilacije normalno je uključen u utiskivanje (engl. *imprinting*) gena, reprogramiranje i stabilnost, diferencijaciju stanica, inaktivaciju X kromosoma, utišavanje transpozona, prekrajanje RNA i popravak DNA. DNA metiltransferaze (DNMT) su grupa enzima odgovornih za metilaciju DNA (DNMT1 i *de novo* DNMT3A, DNMT3B i kofaktor DNMT3L). DNMT kataliziraju kovalentno vezivanje metilne skupine (najčešće donacija metilne skupine S-adonzil metionin) na tzv. *„petu bazu“,* odnosno peti ugljik citozina, najčešće (70-80%) u CpG dinukleotidnim sekvencama i uglavnom negativno reguliraju ekspresiju u genskim promotorima. Neke DNMT su neophodne u stanicama u diferencijaciji, te tijekom rane i kasne embriogeneze (Rose i Klose, 2014). Postranslacijske kemijske modifikacije histona uključuju: metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitinilaciju i sumoilaciju (Hashimoto i sur., 2010). Lizinske acetiltransferaze (ATF) acetiliraju histon (uglavnom na N terminalnom kraju), dok su za deacetilaciju odgovorane histon deacetilaze (HDAC). Acetilacija histona relaksira kromatin, olakšava gensku ekspresiju i transkripciju. Nekodirajuće molekule RNA utišavaju gensku ekspresiju na razini RNA (mikroRNA, male interferirajuće RNA) ili u kromatinu poput dugačkih nekodirajućih RNA (Bulić-Jakuš, 2013).

Regulacija genske ekspresije modifikacijom histona, posebice histonska deacetilacija i acetilacija, jedan je od glavnih mehanizama djelovanja epigenetskih lijekova (Esteller, 2008; Huber i sur., 2007). Hiperacetilacija histona je uobičajno udružena s razrijeđenim kromatinom (eukromatin) i uvećanom genskom transkripcijom. Dok suprotno, deacetilacija jača interakciju histona i DNA te stvara kondenzirani heterokromatin, spriječavajući vezanje RNA polimeraze II i transkripcijskih čimbenika. Histoni (osnovna građa lizin i arginin) su oktameri sastavljeni od dva para molekula histona H2A, H2B, H3 i H4 i s obavijenom DNA čine

neukleosom. H1 pomaže u kondenziranju DNA (Young i sur., 2005). Prve acetilacije ATF na lizinskim krajevima opisane su na histonima H2, H3 i H4 (Mufti i sur., 2003). Preciznije acetilacija se odvija češće na mjestima s vrlo kondenziranim lizinima (K) u histonima H4 (K5, K8, K12 i K16) i H3 (K9, K14, K18, K23 i K27), te manje na rijeđima u H2A i H2B (Kurdistani i sur., 2004).

Histon H3 na mjestu K9 (H3K9) ima dvojaku funkciju. Prilikom acetiliranja potiče (H3K9ac) ekspresiju u genskim promotorima, a metilacijom (H3K9me) utišava. H3K9ac je jedna od važnijih acetilacija histona i visoko korelira s aktivnim promotorima (Karmodiya i sur., 2012), kao i acetilacija H4 (Futscher, 2013). H3K9ac zajedno s H3K14ac i H3K4me3 čini tri oznake karakteristične za aktivne genske promotore (Karmodiya i sur., 2012). Iako biološka acetilacija histona ne pokazuje specifičnu funkciju, u kulturi matičnih stanica (ES) razina H3K9ac je predskazala sposobnost pluripotencije i reprogramiranja (Hezroni i sur., 2011), te se njena vrijednost smanjivala s porastom diferencijacije ES (Krejcí i sur., 2009). Imunohistokemijskim bojanjem signal H3K9ac je otkriven u embrionalnom tkivu epifiznih hrskavica (E16.5) miša, kao i PCNA (Ideno i sur., 2014).

Histon H3 sudjeluje u procesu mitoze (Cimini i sur., 2003). Dugotrajno izlaganje gljivica kvasca trihostatinu A izazvalo je hiperacetilaciju histona H3 i H4 u centromernom heterokromatinu (Ekwall i sur., 1997; Cimini i sur., 2003), derepresiju reporter gena u centromernim regijama i gubitak kromosoma (Ekwall i sur., 1997).

Skupinu enzima histonskih deacetilaza (HDAC) (De Ruijter i sur., 2003) čine četiri strukturna podrazreda s različitom tkivnom specifičnosti i ovisnosti o Zn^+ ili NAD+, podjeljena u dvije obitelji: NAD+ ovisnu i klasičnu obitelj HDAC ovisnu o Zn^+. NAD+ obitelj ima više naziva: HDAC klasa III, SIR2 (engl. *silent information regulators*) obitelj i sirtuini. Nađena je u gljivici kvasca i čine ju sedam enzima (SIRT1-7). Klasičnu obitelj čine HDAC klase I, II i IV prema filogenetskoj podjeli. Klasa HDAC I (HDAC1, 2, 3 i 8) su povezane s transkripcijskim faktorom RPD3 iz gljivica kvasca. HDAC II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 i 10) su povezane s histon deacetilazom HDA1 iz gljivica kvasca, dok je je HDAC IV (HDAC11) opisana u svim eukariotima, osim u gljivicama kvasca (Gregoretti i sur., 2004).

Klasa HDAC I (De Ruijter i sur., 2003) se nalazi u različitim tkivima i u većini vrsta stanica, uglavnom lokalirana u jezgri. Klasa HDAC II je reducirane rasprostanjenosti u tkivima i smatra se da djeluje u staničnoj diferencijaciji i razvojnim

procesima. HDAC4, 5, 7 i 9 iz klase HDAC II su eksprimirane u srcu, mišiću i mozgu, a ostale u testisu, jetri, slezeni i bubregu. U *in vitro* istraživanjima HDAC4 je nađen u prehipertrofičnim hondrocitima i povezuje se s enhondralnim okoštavanjem (McGee-Lawrence i Westendorf, 2011). Opisano je protektivno djelovanje HDAC4 za normalnu funkciju miocita (Llano-Diez i sur., 2011). Izrazitu tkivnu specifičnost pokazuje klasa HDAC IV, koja se eksprimira mozgu, srcu, skletnom mišiću i bubregu (Gregoretti i sur., 2004).

HDAC deacetiliranjem lizina u repu histona sudjeluju u modulaciji kromatina, ponovno uspostavljaju pozitivni naboj i jačaju vezu DNA sa histonom, te nadziru ekspresiju onkogena, tumor supresor gena i upalnih gena (De Ruijter i sur., 2003).

U posljednje vrijeme istražuju su epigenetski faktori koji u normalnom i tumorskom razvoju mijenjaju gensku ekspresiju. Reverzibilnost epigenetskih promjena nudi potencijalnu mogućnost terapijskog usmjeravanja epigenetskog statusa. Epigenetski mehanizmi odgovorni su na nivou stanice za integraciju signala iz okoline, te je njihova uloga važna u bolestima povezanim s prehranom, stilom života, ranim razvojem i izloženošću toksinima iz okoline. Zbog toga se danas razvija mogućnost terapijske primjene epigenetskih lijekova u različitim kroničnim bolestima kao što su tumori, reumatske i druge upalne bolesti, zatim metabolički i neuropsihijatrijski poremećaji, te u regenerativnoj medicini (Arrowsmith i sur., 2012). Cilj je djelovanja epigenetskog lijeka izmijeniti epigenetski status bolesti direktnom manipulacijom involviranih molekularnih faktora. Koncept epigenetske terapije već je potvrđen u kliničkoj praksi, jer su inhibitori DNA metilacije i HDACi odobreni za kliničku primjenu u hematološkim malignim oboljenjima (Taberlay i Jones, 2011).

Gotovo se ništa ne zna o kombiniranom učinku epigenetskog lijeka i promjene vanjskih okolišnih faktora (poput temperature) na stanice koje se dijele i diferenciraju, odnosno mogućem teratogenom učinku. Ovo bi bilo važno otkriti posebno kada se zna da se hipertermija primjenjuje u onkologiji i fizikalnoj medicini kroz fizikalnu terapiju, a epigenetski lijekovi već su u onkološkoj primjeni, a neki su u fazi razvoja protokola za liječenje upalnih reumatskih bolesti. Uzimajući u obzir, da je kod artritisa lokalna hipertermija jedan od kliničkih znakova upalnih reumatskih bolesti, kao i subfebrilno povišenje tjelesne temperature,

da se razmatra mogućnost multimodalnog liječenja hipertermijom i medikamentima u onkologiji i reumatologiji; kao i poznavanje činjenice da povišenje

temperature okoliša može uzrokovati epigenetsku promjenu (Serrat, 2013), postavlja se pitanje međusobnog utjecaja hipertermije i epigenetskog lijeka na epigenetski status pojedinca, odnosno stanice. Dodatno, primjena lijekova ili fizikalnih agensa u djece, može izazvati promjene u diferencijaciji. Zna se da je tkivo hrskavice u razvoju osjetljivo na temperaturu, a difuzija tvari u avaskularno tkivo epifiznih hrskavica se ubrzava u zagrijanim udovima (Serrat i sur., 2009). Međutim, učinak epigenetskog lijeka može ovisiti i o njegovim kemijskim karakteristikama. Difuzija bioloških agensa poput lijekova, hormona, kisika ili parakrinih signalnih čimenika ovisi i o kvaliteti međustanične tvari hrskavice, naboju, proteinskom nosaču, afinitetu receptora i molekularnoj težini same supstance. U animalnom modelu miša *in vivo* (Farnum i sur., 2006) dokazano je da čestice do 10 kDa lako ulaze u epifiznu hrskavicu, a od 40kDa i naviše u nedovoljnoj količini. Činjenica da povišenje temperature u okolišu stanice mijenja njezinu gensku ekspresiju i time utječe na njezin razvoj (Barter i sur., 2012) te da postoji mogućnost dodatne promjene genske ekspresije i utjecaja na razvoj putem epigenetskih lijekova, daje obrazloženje potrebe za dodatnim istraživanjima ovih utjecaja u normalnom i poremećenom embrionalnom razvoju.

1.3.1. 5-AZACITIDIN

Epigenetski lijek, DNA demetilirajuće sredstvo *Vidaza* (Raj i Mufti, 2006) nedavno je odobren kao lijek u humanoj medicini za liječenje mijelodisplastičnog sindroma (Taberlay i Jones, 2011). Ovdje se radi o sintetičkom pripravku 5-azacitidinu (5-azaC) koji je analog pirimidinskog nukleozida citozina koji na petom mjestu pirimidinskog prstena umjesto ugljika ima atom dušika, te je na mjestu ugradnje 5-azaC onemogućena metilacija DNA i započinje degradacija DNMT. 5-azaC je neselektivni lijek i djeluje na sve DNMT (Raj i Mufti, 2006; Komashko i Farnham, 2010). Pri primjeni viših doza djeluje citotoksično zbog ugradnje u DNA i RNA, a kod nižih uzrokuje hipometilaciju genoma (Esteller, 2008) i inducira diferencijaciju (Raj i Mufti, 2006). DNA metilacija je jedan od ključnih mehanizama u embrionalnom razvoju (Rose i Klose, 2014) i karcinogenezi (Sinčić i Herceg, 2011). Nedavno je dokazano da 5-azaC reorganizira genomski obrazac modifikacije histona (Komashko i Farnham, 2010) što je potvrdilo da su DNA metilacija i histoni povezani

preko DNMT i histonskih metiltransferaza (Rose i Klose, 2014). Udruživanje DNMT1 i HDAC vodi deacetilaciji histona i ponekad CpG metilaciji (Vaissiere i sur., 2008), što negativno djeluje na transkripciju (Zhang i sur., 2013). 5-azaC negativno regulira ekspresiju gena uključenih u mitohondrijsku regulaciju i aktivnost oksidoreduktaze (Komashko i Farnham, 2010). Kako je DNA demetilacija uključena u brojne stanične procese koji još nisu istraženi, tek je nedavno u istraživanju djelovanja 5-azaC otkiveno da DNA demetilacija u kasnoj fazi miogeneze potiče diferencijaciju mioblasta i njihovu hipertrofiju (Senesi i sur., 2014). DNMT1 i DMNT3A su jače eksprimirani u hondrocitima, nego DNMT3B, što navodi da su ova dva enzima ključna za metilaciju u hrskavici (Barter i sur., 2012).

1.3.1.1. Utjecaj 5-azacitidina na razvoj

Budući da 5-azaC mijenja regulaciju gena potrebnu za normalni embrionalni razvoj, njegova primjena utjecala je na razvoj *in vivo* kao i na različite razvojne parametre istražene na kulturama stanica ili samom zametku *ex vivo*.

Primjenjen u gestaciji štakora 5-azaC izaziva fazno specifične poremećaje razvoja zametka i placente (Kapron i Trasler*,* 1997*;* Vlahović i sur., 1999; Šerman i sur., 2007; Sobočan, 2009; 2011). Tretiranje ženki *in vivo* do 11. dana gestacije rezultiralo je resorpcijom zametka, a kasnije retardacijom u rastu (Sinčić i sur., 2002). 5-azaC pojačao je apoptozu primjenjen u gestaciji tijekom razvoja fetalnog testisa (Katušić, 2010). Kronično tretiranje štakora s 5-azaC rezultiralo je anomalijama muških spolnih stanica, poremećajem ranog embrionalnog razvoja potomaka, ali ne i povećanom incidencijom kongenitalnih malformacija (Doerksen i Trasler, 1996).

U kulturama embrionalnih stanica 5-azaC stimulira hondrogenezu, adipogenezu (Konieczny i Emerson, 1984) i miogenezu skeletnih mišića (Montesano i sur., 2013), a u kulturama matičnih stanica diferencijaciju u srčane mišićne stanice (Kaur i sur., 2014). Zna se da primjena 5-azaC *in vitro* inducira diferencijaciju stromalnih stanica koštane srži (Makino i sur., 1999) i EC (engl. *embrional carcinoma cell*) staničnih linija F9 (Darmon i sur., 1984). Predtretman s 5-azaC tkiva pretklijetke miša, u naknadnoj kulturi sa niskom koncentracijom seruma izazvao je transdiferencijaciju u skeletni mišić, dok je u mediju s dodatkom inzulina i deksametazona nastupila adipogeneza (Kaur i sur., 2014). 5-azaC pokazuje

specifični učinak ovisan o vrsti medija u kulturi i vrsti razvojnog modela u eksperimentu. 5-azaC u kulturi zametaka štakora *in vitro* inducira diferencijaciju derivata mezoderma (mišić, hrskavica, masne stanice i krvni otočići), a od ektoderma živčano tkivo (Vlahović i sur., 2008). U kulturi bez seruma sa 5-azaC smanjuje se preživljavanje, rast i diferencijacija zametka štakora koji se sastoji od triju zametnih listića (Bulić-Jakuš i sur., 1999), dok uz dodatak seruma potiče diferencijaciju mišića u istom modelu (Škreb i sur., 1993). Nedavni rezultati u *in vitro* i *in vivo* kulturama pokazuju kontradiktorni učinak 5-azaC, što objašnjava specifičnost učinka ovisnu o vrsti tkiva i eksperimentalnom sustavu. U kulturi *in vitro*, u staničnoj liniji mišjih mioblasta povezuju 5-azaC s antiproliferacijskim učinkom (Montesano i sur., 2013) i suprotno, proproliferacijskim učinkom u kulturi mezenhimalnih matičnih stanica (Yan i sur., 2014). U *in vivo* uvjetima u transplantatu hrskavičnog organa djelovao je proproliferativno (Marinovic-Kulisic i sur., 2011), a nasuprot tome, na udovima primijenjen *in vivo* za vrijeme gestacije antiproliferativno (Sobočan, 2009). Razlike u proliferativnom učinku 5-azaC vjerojatno ovise i o gestacijskoj dobi, jer se *in vivo* pokazalo da mijenja ekspresiju PCNA ovisno o fazi trudnoće (Šerman i sur., 2007). Pored toga, DNMT1 pokazuje veći afinitet vezivanja za molekulu DNA na koju je već vezan PCNA (engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Iida i sur. 2002), te se demetilacijom smanjuje količina DNMT1 i detektira se niža ekspresija PCNA.

1.3.2. TRIHOSTATIN A

Fungicid trihostatin A (TSA) je najsnažniji reverzibilni inhibitor histonskih deacetilaza (HDACi ili HDI) i upravo se veže na kalitičko mjesto HDAC enzima (Huber i sur., 2007). TSA je širokog spektra i inhibira HDAC klase I i II, ali ne i SIR2 obitelj (Yoshida i sur., 1990). HDACi acetiliraju N-krajeve histona (Esteller, 2008) odvajanjem iona Zn^{+} s katalitičkog mjesta (De Ruijter i sur., 2003) čime blokiraju deacetilaciju histona. Novonastala prevaga uvećane acetilacije histona pozitivno regulira gensku ekspresiju. HDACi uglavnom djeluju antiproliferativno i proapoptotički u tumorskim stanicama, te su u pripremi za kliničko liječenje (Santini i sur., 2007), a opisuje se i negativna regulacija genske ekspresije (Young i sur., 2005). Iz rada na *Drosophili* pokazalo se da TSA može pojačati ekspresiju HSP 70 gena izazvavši

hiperacetilaciju histona H3 i time vjerojatno modulaciju kromatina potrebnu za ekspresiju ovog gena (Zhao i sur., 2005).

Epigenetski lijekovi HDACi uz dokazano protutumorsko djelovanje, u animalnim modelima *in vivo* i *in vitro,* pokazuju i protuupalno djelovanje, te su potencijalna imunomodulacijska terapija za kronična upalna i imunološka stanja kao što je rheumatoidni artritis (RA), osteoarthritis (OA) (Chen i sur., 2010), psorijaza, iritabilna bolest crijeva (IBD), multipla skleroza, sistemska skleroza, sistemski lupus erythematosus (SLE) i reakcije odbacivanja presadka (Misaki i sur., 2011). TSA suprimira sinovitis (smanjuje oteklinu zgloba i upalu sinovije) i destrukciju priležeće kosti i zglobne hrskavice u animalnim *in vivo* RA modelima. Smatra se da je destrukcija hrskavice blokirana moduliranjem ekspresije različitih matriks metaloproteinaza (MMP) kroz negativnu regulacije različitih HDAC enzima (Hemmatazad i sur., 2009; Barter i sur., 2012), potvrđeno u kulturi stanica (Young i sur., 2007).

U *in vivo* istraživanju na zečevima s OA, tjedna primjena TSA je smanjila eroziju hrskavice i razinu nekih citokina (Chen i sur., 2010). U *in vitro* humanim modelima inhibira rast sinovijalnih fibroblasta reumatoidnog artritisa (RASF) na dva načina: putem promjene fenotipa i produkcije citokina dendritičkih stanica, te moduliranjem diferencijacije monocita u dendritičke stanica (Misaki i sur., 2011). Drugo istraživanje na RASF otkrilo je sinergistički protuupalni učinak TSA u kombinaciji s ultrazvukom niskog inteziteta, s potencijalom kliničke upotrebe kao ciljane fizikalne terapije za upaljene zglobova u RA (Nakamura i sur., 2008). Antitumorsko djelovanje TSA inducira zaustavljanje staničnog ciklusa, diferencijaciju stanice i apoptozu, a istražuje se i antifibrinogeni učinak u hepatalnoj fibrozi i prevenciji postiradijacijskog kožnog sindroma (Huber i sur., 2007). Inače inhibitori histonskih deacetilaza predviđeni su za nove terapijske pristupe u liječenju tumora jer pojačavaju apoptozu (Shankar i Srivastava, 2008). Nedavno su objavljeni *in vitro* i *in vivo* podaci koji govore o protuupalnom djelovanju HDAC inhibitora, posebice TSA, preko mehanizma stanične smrti acetilacijom nehistonskih proteina. Također, opisuje se i višak histonskih AFT u upalnim bolestima (Adcock, 2007). U eksperimentalnim modelima spinalne mišićne atrofije u glodavaca TSA pokazao je pokazao pozitivan terapijski učinak (Naver i sur., 2008), uvećanu razinu H3ac i H4ac, te povećanje broja

i veličine miofibrila, kao i veličine stanica prednjeg roga leđne moždine (Avila i sur., 2007).

1.3.2.1. Utjecaj trihostatina A na razvoj

In vivo teratogenost povezana je s regulacijom genske ekspresije mehanizmom inhibicije HDAC (Schuman, 2010). Teratogenost TSA pokazuje doznu i faznu specifičnost. U *in vivo* pokusu (Menegola i sur., 2005) na mišu (E8) TSA je uzrokovao teške i o dozi ovisne malformacije zametka i aksijalnog skeleta (fuzije kralježaka i abnormalnosti rebara). Međutim, TSA u nižoj dozi nije pokazao teratogeni učinak u *in vivo* primjeni na (E12) zametak glodavaca, osim na rast jer su zameci bili veći od kontrolne skupine (Nervi i sur., 2001). U *in vivo* istraživanju razvoja udova pupoljaka pileta, TSA je promjenio ekspresiju nekih gena važnih za morfogenezu uda (regulirajući pozitivno i negativno), ali je PCNA aktivnost ostala intaktna (Zhao i sur., 2009). Sve je više radova na temu kloniranja i reprogramiranja jezgara pomoću TSA (Chen i sur., 2013).

HDACi su zaustavili hondro- i osteogenezu u staničnoj kulturi (E12) prednjih udova miša (Paradis i Hales, 2012). TSA pokazuje faznu specifičnost u induciranju diferencijacije mišićnih stanica (Mozzetta i sur., 2008). U *in vitro* uvjetima TSA je djelovao samo na nediferencirane mioblaste s dramatičnim povećanjem jezgara i veličine, što se objašnjava selektivnom genskom ekspresijom pod utjecajem TSA. Regeneracijski učinak TSA pokazao se na oštećeni skeletni mišić primjenjen u *in vivo* pokusima miševa s mišićnom distrofijom (Minetti i sur., 2006; Iezzi i sur., 2004), gdje TSA djeluje kao antagonist miostatina. Regenerirani mišići bili su kvalitetniji od tretiranih, pokazali su bolju snagu, arhitekturu i smanjenu staničnu infiltraciju.

1.4. ANTIOKSIDANS N-TERT-BUTIL-A-FENILNITRON (PBN)

N-tert-butil-α-fenilnitron (PBN) pripada kemijskoj skupini nitrona. Najčešće se koristi u analitičkoj kemiji za detekciju i stabilizaciju slobodnih radikala (Miyajima i Kotake, 1995) ili kao antioksidans (Floyd, 1999). Zbog neuroprotektivnog (Floyd,

1997; 1999) i protuupalnog djelovanja (Miyajima i Kotake, 1995; 1997; Nakae, 1998), zatim sudjelovanja antioksidansa u procesu starenja i karcinogeneze (Nakae, 1998; Doblas i sur., 2007) u tijeku su brojna klinička istraživanja (Miyajima i Kotake, 1995; 1997; Green i sur., 2003.)

Dugotrajna primjena pokazala je relativnu netoksičnost nitrona. U animalnim istraživanjima ksenobiotici nisu uzrokovali embriotoksičnost i teratogenost sa svojom osnovnom komponentom koja je relativno netoksična (proteratogen), već sa visoko toksičnim reaktivnim međuproduktima (Wells i Winn, 1996; Winn i Wells, 1997). Proteratogeni (Sobočan, 2011) se bioaktiviraju embrionalnim citokromom P450, prostoglandin H sintetazom i lipooksigenazom u reaktivne međuprodukte kao što su reaktivni radikali kisika (ROS) i dušika, te ireverzibilno oštećuju embrionalne stanične makromolekule. Nitroni imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala na svoju CN skupinu čime nastaje stabilan dušični oksid (NO), koji se sigurno metabolizira i izlučuje urinom (Floyd i sur., 2008). Ekspresija teratogenosti ovisi o ravnoteži proteratogene bioaktivacije s posljedičnim molekularnim oštećenjem i embrioprotektivnih mehanizama majčine eliminacije proteratogena, embrionalne detoksikacije reaktivnih međuprodukata, citoprotekcije i popravaka oštećenih staničnih makromolekula (Wells i Winn, 1996). Elektrofilni reaktivni međuprodukti se kovalentno ireverzibilno vežu za stanične makromolekule, a to rezultira započinjanjem teratogeneze. Dolazi do ireverzibilne oksidacije DNA, proteina i lipida zametka u procesu oksidativnog stresa (Wells i Winn, 1996; Hansen i sur., 2002).

Slobodni kisikovi radikali (ROS) koji se pojavljuju u prirodi tipično imaju nespareni elektron u sklopu molekule kisika i dušika. Primjeri su O_2^- (superoksid anion), OH (hidroksi radikal), NO i H_2O_2 (vodikov peroksid). Dokazano je da bioaktivni NO, produkt dušik oksid sintetaza (NOS), utječe na organogenezu regulacijom genske ekspresije, remodeliranjem vanstanične tvari, rasta, proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Primjena NOS inhibitora u majke tijekom rane organogeneze, rezultirala je malformacijama aksijalnog skeleta i redukcijom udova vaskularne geneze. Disregulacija sinteze NO povezuje se s mehanizmom djelovanja poznatih teratogena /valproična kiselina, talidomid, manjak bakra i šećerna bolest/ (Tiboni i Ponzano, 2014). Slobodni radikali kisika i dušika posreduju u staničnim odgovorima posredstvom različitih ekstracelularnih liganda (Lander, 1997). Dijele se u pet međusobno isprepletenih kategorija prema mogućem objektu djelovanja: 1.

aktivacija i sekrecija citokina, čimbenika rasta i hormona, 2. ionski transporteri, 3. transkripcija, 4. neuromodulacija i 5. apoptoza (Sobočan, 2011).

Danas znamo da su ROS signalne molekule (Covarrubias i sur., 2008) koje svojim aktivnim djelovanjem u prijenosu ekstracelularnih poruka, zajedno s drugim glasnicima, bude specifičan stanični odgovor. Parakrina komunikacija potvrđena je na stanicama srca *Drosophile* (Lim i sur., 2014), gdje kardiomiociti reguliraju svoju funkciju preko signalne kaskade D-MKK3-D-p38 MAPK u perikardijalnim stanicama. ROS pasivno preko redukcijsko-oksidativne (redoks) modifikacije više vrsta molekula sudjeluju u gotovo svim otkrivenim signalnim putevima (Covarrubias i sur., 2008; Hernández-García i sur., 2010; Montagna i sur., 2014). Zanimljivo je da su brojni važni proteini u razvoju također osjetljivi na oksidacijske procese. Poznato je da se proteini modificiraju redoks procesima na cisteinskom ostatku, ali i druge aminokiseline mogu oksidirati (npr. triptofan, histidin ili tirozin). Različite makromolekule osjetljive su na redoks modifikacije, od vanstaničnih molekula do fosfataza, kinaza i veliki broj transkripcijskih čimbenika. Upravo zato, novija definicija oksidativnog stresa (Hansen i Harris, 2013) počiva na procesu redoks modifikacije proteina u ključnim signalnim putevima. Redoks modifikacijom sparuju se tioli i cisteinski ostatak proteina, nastaju specifični redoks (tiol/cistein) spojevi koji ometaju redovan prijenos signala i mijenjaju stanični odgovor. Tijekom razvoja pojačana stanična aktivnost vjerojatno je udružena s ubrzanim metabolizmom koji generira velike količine ROS, a stanice se moraju zaštiti od potencijalnog oštećenje ROS-om (Hernández-García i sur., 2010). Promjene u količini ROS, čak i privremene, mogu utjecati na omjer intracelularnih redukcijskih i oksidacijskih ekvivalenata, odnosno stanični redoks status. ROS prebacuje redoks omjer u korist okidacijskih ekvivalenata i smanjuje redukcijski potencijal. Antioksidans glutation (tiol) je najzastupljeniji među intracelularnim redukcijskim ekvivalentima (Hansen i sur., 2002). Promjene u intracelularnom redoks statusu povezane su s alteracijama u apoptozi, diferencijaciji i proliferaciji (Hansen i sur., 2002).

Dakle, ROS na više načina regulira bitne molekule u razvoju: 1. zametak u razvoju mijenja metabolizam, prelazi iz početnog anaerobnog u aerobni (negdje oko nastupa angiogeneze) i postaje ovisan o kisiku, čime se generiraju novonastale ROS molekule, 2. tijekom razvoja redoks modifikacija može inhibirati ili aktivirati određene molekule (primjerice *HoxB5* i *Src*) i 3. signalni putevi posredovani ROS mogu utišati

ili pobuditi ekspresiju molekula u embriogenezi (primjerice *Wnt*, *Nrf1* ili *NfκB*) i utjecati na njihovu aktivnost.

1.5. ANIMALNI MODELI U ISTRAŽIVANJU EMBRIONALNOG RAZVOJA

Animalni modeli embrionalnog razvoja koriste se ne samo za istraživanje normalnog razvoja nego o i svrhu istraživanja poremećenog razvoja uzrokovanih vanjskim utjecajima. Teratogen (grč. *teras*, odnosno nakaznost) uzrokuje poremećaje u razvoju fetusa u formi kongenitalnih malformacija (Edwards i sur., 1997). Prema dostupnim podacima oko 10% grešaka u razvoju humanog fetusa uzrokuju teratogeni čimbenici iz okoliša, 60% su nepoznate etiologije, a ostalo su genetski uzroci (mutacije gena ili kromosoma). U pokusima na eksperimentalnim životinjama dokazano je oko 1500 kemijskih i fizikalnih teratogenih čimbenika, od kojih je samo 40 potvrđeno u ljudi. U eksperimentalnoj teratologiji potvrđena je ovisnost o periodu intrauterinog razvoja i o primjenjenoj dozi, te specifičan mehanizam teratogenog djelovanja, dok za humane malformacije još u potpunosti nije razjašnjen način utjecaja vanjskih okolišnih čimbenika (Shepard i Lemire, 2004). Različite kemikalije i lijekovi mogu djelovati teratogeno, primjerice retinoična kiselina (Škreb i sur., 1993), talidomid (McBride, 1961), 5-azacitidin (Vlahović i sur., 1999; 2008; Šerman i sur., 2007) (vidi: 1.3.), ili fizikalni agensi poput hipertermije (Edwards, 1967; Katušić, 2008) (vidi 1.2.1.), zračenja (Brent, 1983) ili potencijalnog teratogena – dijagnostičkog ultrazvuka (Brent, 1983; Shepard i Lemire, 2004; Abramowicz i sur., 2008).

Prema eksperimentalnim uvjetima istraživanja, modele možemo podjeliti na *in vivo* - odnosno praćenje razvoja unutar organizma majke (intrauterino) ili ekstrauterino (ektopično) u organizmu primaoca i *ex vivo* - izvan organizma majke.

1.5.1. MODELI *IN VIVO*

In vivo istraživanja pojedinih učinaka vanjskih čimbenika kao što su lijekovi, hipertermija, hipotermija, i ostali fizikalni agensi (primjerice klinička primjena

ultrazvučnih, svjetlosnih ili elektromagnetskih valova putem fizikalnih procedura) limitirana su zbog varijabilnosti gestacijskog razvoja zametka i mogućeg utjecaja majke, u sklopu njenog odgovora na vanjske čimbenike. Osim toga majčin utjecaj na intrauterino oštećenje teško je mjerljiv kao i endogena temperatura zametka *in utero*. Učinak fizikalnog agensa, u *in vivo* uvjetima, mogu modulirati promjene u živčanoj provodljivosti i cirkulaciji organizma, dodatno podložnog udaljenosti i kutu djelovanja aplikatora fizikalne procedure (Houghton, 1999). Jednako je i s ektopičnom transplantacijom zametka ili dijelova zametka *in vivo*, gdje se fizikalnim agensom ne može ciljano tretirati samo transplantat. Primatelj transplantata podložan je mehaničkim, prehrambenim, vaskularnim, sistemskim hormonalnim promjenama (Serrat i sur., 2008) i drugim potencijalnim činiteljima, kao što su interakcije tkiva (Friedman, 1987) koje mogu nastati kao reakcija na fizikalni agens.

Udovi zametaka glodavaca, često se koriste u istraživanjima *in vivo* za analizu učinka pojedinog agensa, potencijalnog teratogena ili praćenje embrionalnog razvoja. Detaljna diferencijacija i histomorfologija tijekom embrionalnog razvoja uda miša opisana je na *in vivo* modelu koristeći zametke od 9,5 do 14,5 dana gestacije (Martin, 1990). Genetske manipulacije rađene su na stražnjim udovima miševa *ex utero* u cilju istraživanja morfogena razvoja prstiju (Tang i sur., 2000*;* Ngo-Muller i Muneoka, 2000*)*, no zbog zahtjevnosti kirurške tehnike nisu rutinski prihvaćene. Zatim, teratogeni učinak antiaritmika (*Dofetilide*) potvrđen je u *in vivo* istraživanju, a očitovao se malformacijom udova (Ritchie i sur., 2013). Antiaritmik je administriran 13. dana gestacije štakora, kada započinje organogeneza udova i na završetku, 20. dana su analizirane malformacije udova. Druga istraživanja teratogena *in vivo*, koristila su udove štakora ili miša za mjesto praćenja embriotoksičnosti agensa, prateći parametre razvoja poput proliferacije ili rasta na udovima (Sobočan, 2009; 2011).

1.5.1.1. Ektopična transplantacija *in vivo*

Ovaj model istraživanja embrionalnog razvoja sisavaca uključuje presađivanje tj. transplantaciju zametka ili dijelova zametka na ektopična (ekstrauterina) mjesta s ciljem testiranja potencijala razvoja, odnosno diferencijacije (Bulić-Jakuš, 2001; Belovari, 2001) ili transdiferencijacije (Jurić-Lekić i Švajger, 1989). Iako su prve

transplantacije rađene na animalnim modelima štakora još u prošlome stoljeću (Nicholas 1934; 1942), kada je doprinos razvoju metode dala i Zagrebačka embriološka škola Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Levak-Švajger i Škreb, 1965; Solter i sur., 1970), suvremenost metode pokazuje primjena i u novijim istraživanjima (Robertson i sur., 2007; Nicholson i sur., 2013; Shultz i sur., 2014: Marinović-Kulišić i sur., 2011).

Transplantirani zametak ili dijelovi zametka (npr. pojedini zametni listići) mogu se razviti u tumore koji se nazivaju eksperimentalni embrionalni teratomi. Budući da koordinacija prostornog i vremenskog razvojnog obrasca, te tkivne interakcije koje postoje tijekom normalnog razvoja *in situ,* nedostaju u ovome modelu pa teratomu slične strukture grade diferencirana tkiva najčešće bez jasnog organospecifičnog rasporeda. Ipak neki transplantati, poput epiglotisa, mogu zadržati svoju originalnu formu (Marinović-Kulišić i sur., 2011). Transplantati zametka miša mogu i maligno alterirati (Solter i sur., 1970; Skreb i sur., 1991). Uspješnost transplantacije i konačna forma transplantata ovisi o više činitelja: vrsti transplantata, vremenskom periodu transplantacije, vaskularizaciji, nekrozi, interakciji tkiva primaoca s transplantatom, prethodna manipulacija *in vitro* (Levak-Švajger i sur., 1991, Belovari i sur., 2001).

Istraživana su različita mjesta ektopične transplatacije kao što su testis, slezena, peritoneum, prednja očna komorica i prostor pod čahuru bubrega (Levak-Švajger i sur., 1991, Strahinić, 1995), potkožno tkivo (Salaün i sur., 1986) ili obraz hrčka (Levak-Švajger i sur., 1991). Ektopična transplanacija pod čahuru bubrega pokazala se najprikladnijom za istraživanje razvoja ranih postimplantacijskih zametaka štakora (Švajger i sur., 1986; Levak-Švajger i sur., 1991; Robertson i sur., 2007). Transplantat je smješten u „džep“ između dvaju dobro vaskulariziranih tkiva (vidi 4.6), bubrežne čahure i parenhima bubrega, sa centripetalno uraslim krvnim kapilarama (Levak-Švajger i sur., 1991). Bubreg, pored dobre vaskularizacije, ima prednost zbog još nekoliko tehničkih karakteristika: jednostavnosti kirurškog pristupa, omogućava čvrsti smještaj i zadržavanje transplantata tijekom perioda transplantacije pod čahurom bubrega, retroperitonealno je smješten i izdvojen od drugih organa. Ove karakteristike čine ga pogodnim za slikovne metode dijagnostike i biopsiju, te se često koristi kao mjesto primatelja transplantata za druga normalna ili maligna tkiva ili stanice (Shultz i sur., 2014), poput ksenotransplantata tkiva benigne hipertrofije

prostate prilikom testiranja učinka lijeka (Nicholson i sur., 2013) ili kulture organa zuba u cilju ispitivanja regenerativnih sposobnosti (Otsu i sur., 2012).

U prethodnim istraživanjima transplantati različitih embrionalnih tkiva štakora uspjela su preživjeti period od 14 dana nakon transplantacije pod čahuru bubrega singeničnog odraslog mužjaka (Bulić-Jakuš i sur., 2005). Zagrebačka embriološka škola temeljem dugogodišnjeg vlastitog iskustva i komparacije rezultata s drugim laboratorijima, najčešće koristi period od 14 dana uzgoja transplantata pod bubrežnu čahuru, koji se pokazao kvalitativno i kvantitativno dovoljnim za uspješnu diferencijaciju (Solter i sur., 1970; Levak-Švajger i sur., 1991; Bulić-Jakuš i sur., 2005; Belovari i sur., 2001). Pokusi na transplantiranim tkivima zametka štakora obuhvaćaju različite gestacijske periode. Prednost je transplantacije pod čahuru bubrega u odnosu na neko drugo ektopično mjesto (npr. prednja očna komorica) što nema restrikcije u diferencijaciji ovisno o gestacijskom stadiju. Transplantati zametnog štita pod čahurom bubrega jednako će iskazati potpuni kapacitet za diferencijaciju, bilo da s radi o stadiju s dva ili tri zametna listića (Švajger i sur., 1986). Transplantati zametnog štita štakora (tri zametna listića), odnosno zametak bez ekstraembrionalnih ovojnica, starosti 9,5 dana diferencirao je derivate svih triju zametnih listića (derivate ektoderma: epidermis sa privjescima kao što su dlake, žlijezde znojnice, zatim moždano tkivo, epitel retine, vegetativni ganglij; zatim mezoderma: mast, vezivno tkivo, glatki i skeletni mišić, hrskavica, kost te endoderma tj. epitel probavne cijevi i respiratornog sustava i žlijezdano tkivo). Transplantati neuralne mrežnice zametka starog 20 dana, te lentektomirane oči 14 i 18 dana starih zametaka preživjeli su i rasli pod čahurom bubrega te su redom pokazali oskudnu diferencijaciju neuralnih stanica retine (Katušić i sur., 2008) i transdiferencijaciju stanica mrežnice u stanice leće (Bulić-Jakuš i sur., 2005). Transplantacija suznih žlijezda zametaka starih 17 do 20 dana, pogodovala je razvoju žljezdanog parenhima i epidermisa. Zanimljivo je da su transplantati nešto čvršćih tkiva, poput epiglotisa 17 dana starog zametka i mandibule 13 i 14 dana starih zametka zadržali organotipičnu formu u transplantatu. Hrskavica epiglotisa bila je okružena perihondrijem (Marinovic-Kulisic i sur., 2011) s orožnjelim mnogoslojnim epitelom s jedne i neorožnjelim s druge strane. Mogućnost potpune morfogeneze tijekom transplantacije pokazao je transplantat mandibule, gdje su se razvili i zubi (Bulić-Jakuš i sur., 2005). Prethodne spoznaje poslužit će za usporedbu s transplantatima u ovome istraživanju, jer nisu

nađena istraživanja transplantacije prethodno kultiviranih eksplantanata pupoljaka udova niti u štakora niti u srodnog glodavca miša.

1.5.2. MODELI *EX VIVO*

Eksperimenti u *ex vivo* uvjetima pokazali su se iznimno korisnima u istraživanju normalne i poremećene embriogeneze, te testiranju embriotoksičnosti lijekova u predkliničkim fazama istraživanja (Haschek i Rousseaux, 2002) radi svoje izdvojenosti iz kompleksnosti organizma majke pa stoga i bolje definiranosti vanjskih utjecaja što vodi i većoj reproducibilnosti. Za pokuse *ex vivo* koriste se kulture *in vitro*.

Istraživanja embrionalnog razvoja *in vitro* provode se u kulturama, koje mogu biti: stanične, kulture organa ili kulture zametka. Kulture zametka *in vitro* obično se dijele na preimplantacijske i postimplantacijske. Postimplantacijski zametak može se kultivirati sa ekstraembrionalnim ovojnicama, odnosno kao kultura cijelog zametka WEC (engl. *whole embryo culture)* ili kao kultura zametnog štita (zametka u užem smislu riječi koji se sastoji od triju zametnih listića bez ekstraembrionalnih struktura) (engl. *embryo-proper*). Iako kultura cijelog zametka štakora zadržava svoju morfologiju tijekom kultiviranja, limitirana je na samo dva dana kulture zbog apsorbirajućih svojstava ovojnica (Sturm i Tam, 1993; Cockroft, 1997) i nastupa nekroze SŽS (Haschek i Rousseaux, 2002). Zato su kulture zametnog štita pogodnije za praćenje razvoja embrionalnog tkiva, ili ispitivanje embriotoksičnosti u kulturi u dužem vremenskom periodu (Bulić-Jakuš i sur., 1999) makar se organiziraju u eksperimentalni teratom sa ispremiješanim embrionalnim tkivima.

Organotipični modeli u kulturi *ex vivo* tj. izvan organizma majke, poput modela pupoljaka udova, koriste se za istraživanje organogeneze i teratogenosti (Freidman, 1987) uzrokovane bilo lijekovima, fizikalnim agensima ili ostalim okolišnim čimbenicima, te u tkivnom inžinjerstvu i regenerativnoj medicini. Prednost je *ex vivo* modela organa u kulturi što, za razliku od *in vivo* istraživanja, nije skup, sistem je jednostavan i etički prihvatljiviji (Smith i sur., 2013). U *ex vivo* uvjetima kada se zametak ili njegov dio istražuju izvan organizma majke eliminira se utjecaj majke i općenito postižu reproducibilniji uvjeti (Freidman, 1987), jasniji su odgovori na djelovanje teratogena, posebice npr. u kemijski definiranom mediju bez seruma,

odnosno MEM-u (engl. „*minimum essential medium*“) (Bulić-Jakuš i sur. 1999, Bulić-Jakuš i sur. 2000).

Trend je kliničke farmakologije kroz translacijska istraživanja ubrzati put do registracije lijeka i kliničke primjene. Istraživanja u animalnim modelima *in vitro* su brža, jeftinija i definiranija jer je izbjegnut majčin organizam sa mnogobrojnim interakcijama, što je od značaja kod medikamenata koji, poput epigentskih lijekova, mogu rezultirati nuspojavama (Bulić-Jakuš, 2013). *In vitro* istraživanja ne mogu u potpunosti zamjeniti animalna *in vivo* istraživanjima (pitanje farmakokinetike, doze lijeka i slično), ali mogu smanjiti broj korištenih životinja u istraživanjima razvojne toksikologije (Schumann, 2010). *The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* (EURL-ECVAM), od 2011. nasljednik *The European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), validira potencijalne sisteme i predlaže alternativne inačice animalnim istraživanjim *in vivo* (Piersma, 2004; Spielmann i sur., 2004) u ispitivanju embriotoksičnosti. U sisavaca (Eisenbrand i sur., 2002) to su testovi matičnih stanica zametka (engl. *embryonic stem cell test*) i drugih staničnih linija, zatim postimplantacijski model cijelog zametka i MM (engl. *micromass)* model pupoljka udova (*vidi 1.5.2.1*).

1.5.2.1. Modeli razvoja udova *in vitro*

Čitavi zametak može poslužiti kao model za istraživanje razvoja udova *in vitro.* Obični se kultiviraju u kraćim vremenskim periodima, i češće se za istraživanje razvoja udova koriste modeli pilića (Freidman, 1987). Općenito, štakorski zameci starosti 8,5-10,5 dana kultivirani su do 48 sati u kulturi sa serumom i postigli su stadij oko 12. dana gestacije (Nadolney i sur., 1990), što je prekratko za kompletnu organogezu udova.

U pokušajima razvijanja organotipičnog modela, rađena su i istraživanja na izoliranim tkivima pupoljaka udova, a u kulturi tkiva: mišić (Nadolney i sur., 1990), kost i hrskavica (Freidman, 1987), ali je to odbačeno jer potpuno izostaju tkivne interakcije.

Razvoj udova može se istraživati u modelima staničnih kultura pupoljaka udova. Jednostavniji modeli jedne ili dvostranične kulture (engl. *limb bud cell culture*) su manje u upotrebi (Levitt i Dorfman, 1973), a naprednija je *„micromass”* (MM)

kultura stanica pupoljka udova (Gay i Kosher, 1984; 2005; Hansen i sur., 2002; Piersma, 2004; Spielmann i sur., 2004). Orginalna MM kultura pupoljaka udova štakora 13 dana starosti (Flint i Orton, 1984; Kistler, 1987; Kistler i Howard, 1990) validirana je kao alternativni model *in vitro* testiranja embriotoksičnosti (Kistler, 1987; Piersma, 2004; Spielmann i sur., 2004). U *in vitro* MM kulturi mezenhimalne stanice pupoljka uda su disocirane i kultiviraju se u sistemu s 96 jezerca kratkotrajno do 5 dana. Pojedinačno u svakom jezercu nalaze se zgusnute stanice u agregatima tzv. *foci*, diferenciraju se u hondrocite koji luče proteoglikane i kolagen. Dodatkom boje Alcian blue oboje se proteoglikani, te se stupanj diferencijacije mjeri spektrometrom. Testira se potencijal razvoja uda, hrskavice i kosti, a moguća je i diferencijacija mišića (Kang i sur., 2010). MM kulture stanica češće se koriste u testiranju embriotoksičnosti (Piersma, 2004; Spielmann i sur., 2004) novog lijeka za potrebe farmaceutske industrije u predkliničkom probiru ili fizikalnog agensa na stanice tkiva udova u kraćim kulturama. U tkivnom inženjerstvu MM kulture stanica pupoljka uda služe za razvoj hrskavičnog i koštanog tkiva *ex vivo* (Corsi i sur., 2007; Handschel i sur., 2007), gdje se koriste svojstva reagregacije stanica u kulturi nastale interakcijom s dodacima međustanične tvari, kao i samom autokrinom sekrecijom. U odnosu na *in vivo* testiranje prednost je MM kultura u jednostavnosti, jeftinoći i brzoj reproducibilnosti. Nedostatak je modela manjak organotipičnog rasporeda i arhitekture stanica, što onemogućuje međustaničnu komunikaciju te komunikaciju stanica i izvanstanične tvari. U staničnoj kulturi odvija se diferencijacija, ali ne i morfogeneza. Rađene su MM kulture sa stanicama eksplantanata pupoljaka udova 12,5 dana (Kang i sur., 2010) i 13 dana starih zametaka štakora (Hansen i sur., 2002), u kojima je teratogenost primijenjenih lijekova inhibirala hondrogenezu u više stupnjeva u ovisnosti o ispitivanom teratogenu.

1.5.2.2. Kultura pupoljaka udova *in vitro*

Poznato je više modela razvoja pupoljaka udova (engl. *limb bud culture*) u različitih vrsta: pile (Smith i sur., 2013), miš (De Valck i Luyten, 2001), štakor (Szabat i Rauvala, 1996), zec (Lessmöllmann i sur., 1976), majmun (Neubert i Krowke, 1983*)* i čak humani (citirani neobjavljeni podaci) eksplantati (Rajan, 1974). Na zametku štakora, korišteni modeli obuhvaćali su eksplantate udova ranog stadija do 12. dana

gestacije (Freidman, 1987; Szabat i Rauvala, 1996) u kraćim kulturama (od 44 sati do 6 dana). U translacijskim istraživanjima razvoja skeletnih elemenata udova favoriziraju se modeli sisavaca, zbog toga što iako nema razlike u signalnim i staničnim događanjima, u pileta postoje neke razlike u morfologiji tkiva i tijeku razvoja (Roach, 1997). Karakteristike modela eksplantanata pupoljaka udova *ex vivo,* kao što su kratki period razvoja uda, jednostavnost eksperimentalnih manipulacija, dostupnost sekvence genoma, zatim prisutnost više vrsta stanica i tkiva u kulturi organa u njihovom prirodnom izvanstaničnom miljeu i prostornom rasporedu koja omogućuje rekapitulaciju brojnih bioloških procesa *in vivo,* stavljaju ovaj model u fokus aktualnog interesa naspram jednostavnijih staničnih kultura *in vitro* gdje nema sačuvane međustanične interakcije. Bilo da se radi o istraživanju u tkivnom inženjerstvu (Smith i sur., 2013) ili istraživanju normalne morfogeneze uda (Raspopovic i sur., 2014). Model pupoljaka udova predstavlja savršen sustav za praćenje signala potrebnih za diferencijaciju, proliferaciju i oblikovanje uda (Szabat i Rauvala, 1996). Nedavno istraživanje na modelu pupoljka uda miša *ex vivo,* objasnilo je „genetsku petlju“ prilikom formiranja pojedinačnih prstiju u zametku sisavaca (Raspopovic i sur., 2014).

Testirane su varijacije modela kulture pupoljka udova glodavca: na nosaču (fiksirani eksplantant na granici zraka i tekućine) ili u rotatoru (uronjeni eksplantant je mobilan). Pupoljci udova štakora testirani su u orginalnoj (Trowell, 1961) varijanti na nosaču (Nadolney i sur., 1990), a mišji u obje (Nadolney i sur., 1990; De Valck i Luyten, 2001). U kratkotrajnoj (3 dana) kulturi *ex vivo* u mediju bez seruma (De Valck i Luyten, 2001) nakon 24 sata, diferencirala se hrskavica i osnove zglobova u oba modela, u mobilnom modelu zaustavila se djelomična regresija interdigitalnih regija, dok u fiksnom nije ni nastupila. Dodatak nutrijenata (10% goveđi serum) u kulturu, nije utjecao na diferencijaciju. Zaključak je obje grupe autora da se mogu koristiti obje varijante modela s maksimumom diferencijacije već u osnovnom siromašnijem mediju (MEM), ali ovisno o ranom ili kasnom stadiju pupoljka udova tj. fazi razvoja zametka, postići će se različiti stupanj diferencijacije hrskavičnih osnova budućih kostiju i mišića.

Diferencijacija koja se obično postiže u modelima razvoja *in vitro* obično je nižeg stupnja od one koja se odvija *in vivo*. Pokazalo se da eksplantati udova glodavca u kulturi prate rast, diferencijaciju i organizaciju tkiva sličnu onoj *in vivo*

(Freidman, 1987). Razvoj udova glodavca u kulturi *ex vivo* bilo organa (De Valck i Luyten, 2001) ili cijelog zametka (Nadolney i sur., 1990; Robinson i sur., 2012) prvih 48 sati kulture prati *in vivo*, nakon čega je sporiji i vremenski kasni dva dana za gestacijskom fazom normalnog razvoja, posebno naglašeno u hrskavičnim elementima. Neovisno o gestacijskoj dobi obično do šestog dana kulture razviju se maksimum diferencijacije i rasta (Freidman, 1987; Robinson i sur., 2012). Serum u kulturi organa udova (De Valck i Luyten, 2001, Smith i sur., 2013) ne utječe na razvoj, čak suprotno, u organotipičnim kulturama serum ima trend smanjenja proliferacije (Smith i sur., 2013). Poznato je da se u uvjetima kulture odvija rana morfogeneza skeletnih elemenata poput hrskavice i osnova zglobova u potpunom kapacitetu, osifikacija započinje do šestog dana kulture (Freidman, 1987), a može i ranije već treći dan kulture (De Valck i Luyten, 2001), dok je regresija interdigitalnih regija promijenjena u *ex vivo* kulturama. Nepoznat je razlog, jer apoptoza nije blokirana u interdigitalnom mezenhimu, već su signali apoptoze u obilju (De Valck i Luyten, 2001). No, razvoj pupoljka uda duž PD osi, jednak je normalnom razvoju *in utero*. Dodatno, u kasnom stadiju jako sliči normalnom udu s formiranim hrskavičnim osnovama budućih kostiju. Iako je sam tijek razvoja jednak u prednjim i stražnjim udovima (Rugh, 1968; Martin, 1990; Gilbert, 2006; Towers i Tickle, 2009; Moore i sur. 2011), u istraživanjima se češće koriste prednji udovi (Friedman, 1987, De Valck i Luyten, 2001) zbog naprednije faze razvoja (vidi 1.1.).

Modeli kulture eksplantiranih pupoljaka udova *in vitro* pokazali su se posebno prikladnim modelom za istraživanje sazrijevanja hrskavice, formiranje zglobova i budućih interdigitalnih prostora udova embrija (Freidman, 1987; De Valck i Luyten, 2001), dapače u upotrebi su više od osamdeset godina (Smith i sur., 2013). Prednost ovog modela je mogućnost direktnog istraživanja razvoja udova pod utjecajem pojedinih okolišnih čimbenika ili njihove kombinacije i to je najčešće u dužem periodu od uobičajenog perioda kultiviranja čitavog zametka od 3 dana, a prednost pred MM kulturama jest mogućnost djelomičnog odvijanja morfogeneze (De Valck i Luyten, 2001). Ovakav model organa u kulturi *in vitro* odnosno *ex vivo* jer istražujemo organogenezu izvan organizma majke, može podnijeti uvjete kulture kroz duži vremenski period, do 14 dana prema našim podacima (Mužić i sur., 2013). Sustav je dobar za istraživanje utjecaja lijekova na: različite parametre razvoja, stupanj diferencijacije pojedinih tkiva i ciljane morfološke promjene ovisne o fazi. Tako da se

mogu koristiti različiti ishodi (engl. *endpoints*) probira embriotoksičnosti lijekova: proliferacija, diferencijacija, rast, apoptoza, veličina i oblik dijelova udova, hondrogeneza, sinteza kolagena i proteoglikana, i slično (Kochhar, 1982). Kvantitativna obrada može biti biokemijska ili numerička, poput sterologije (Nadolney i sur., 1990). Manjkavost sustava u pogledu teratogena koji djeluje prije nego nastupi organogeneza uda, mogu se izbjeći izlaganjem teratogenu *in vivo* i naknadnom kultivacijom eksplantata pupoljka uda *ex vivo* (Neubert i sur., 1986; Haschek i Rousseaux, 2002).

Istraživanja udova u kulturi *ex vivo* omogućuju uvjete ispitivanja direktnog utjecaja fizikalnog agensa na ciljana tkiva. Eksplantati pupoljka udova miša gestacijske dobi 11,5 dana, podvrgnuti su direktnom utjecaju elektromagnetskog zračenja niske frekvencije od 50 Hz i inteziteta 13,1 mT u kulturi sa serumom *ex vivo* kroz 2 sata. Dokazano je da elektromagnetsko zračenje stimulira diferencijaciju hrskavice i proliferaciju stanica mezenhima i eritrocita (Parivar i sur., 2006).

1.5.3. KOMBINACIJA METODA *IN VITRO* I *IN VIVO*

Kombinacija metoda *in vitro* i *in vivo* ima za cilj istražiti preostalu razvojnu sposobnost embrionalnih stanica i tkiva nakon kulture *in vitro* (Strahinić, 1995; Belovari i sur., 2001). Naknadnom transplantacijom *in vivo* (vidi 1.5.1.1.) testira se stabilnost diferencijacije i ostatna sposobnost za diferencijaciju kultiviranih organa ili zametka. Ektopična transplantacija pod čahuru bubrega pokazala se najprikladnijom za razvoj tkiva štakora (Levak-Švajger i sur., 1991; Robertson i sur., 2007).

Sredinom prošlog stoljeća objavljuju se prvi rezultati primjene ove kombinacije metoda kultiviranih zametaka miša i transplantacije u prednju očnu komoricu (Grobstein, 1951; 1952). Među pionirima su i doajeni Zagrebačke škole Škreb i Levak-Švajger, koji su na transplantatima štakorskih zametaka utvrdili kritičan stadij za diferencijaciju tkiva svih triju zametnih listića. Stadij formiranog mezoderma razvija se, naknadnom ektopičnom transplantacijom u prednjoj očnoj komorici, u ektodermalna, mezodermalna i endodermalna tkiva (Levak-Švajger i Škreb, 1965). Škreb (Škreb i Crnek, 1977) je nastavio istraživanja dužine trajanja kulture zametnih štitova štakora (8 i 9 dana starosti) i naknadne transplantacije pod bubrežnu čahuru u

trajanju od 14 dana. Eksplantati kultivirani u mediju sa štakorskim serumom 7 i 14 dana, imali su oskudniju diferencijaciju, nego nakon transplantacije. Transplantati su pokazali bolji stupanj diferencijacije tkiva nego *in vitro*, te su se razvila nova tkiva - glatki i skeletni mišić, kost i masno tkivo. Duži period prethodne kultivacije (14 dana) restriktivno je djelovao na hrskavicu i u potpunosti na skeletni mišić u transplantatu. Živčano tkivo nije bilo osjetljivo na promjenu uvjeta. Drugo istraživanje iste škole (Belovari i sur., 2004) testiralo je utjecaj promjene medija na diferencijaciju u naknadnom transplantatu pod bubrežnu čahuru. U gotovo ponovljenom pokusu štakorski zameci stari 9,5 dana, kultivirani *in vitro* 7 i 14 dana i naknadno transplantirani u trajanju od 14 dana, pokazali su oporavak diferencijacije *in vivo*. U transplantatima (Belovari i sur., 2004) razvila su se ista tkiva (živčano – ganglionske stanice, mišićno – glatki i skeletni mišić, mast, hrskavica, kost i derivati epidermisa – dlaka, žlijezda lojnica) kao i u prethodnom istraživanju (Škreb i Crnek, 1977). Incidencija diferenciranih tkiva ovisila je o vrsti medija i periodu prethodne kulture. Najsiromašniji medij MEM restriktivno je djelovao na živčano tkivo već nakon 7 dana kulture, a nakon 14 dana na skeletne mišiće, mast i žljezdani epitel. Epidermis se pokazao neosjetljivim na promjenu medija (Bulić-Jakuš i sur., 2001) i trajanje kulture (Belovari i sur., 2004). Dodatkom transferina u medij, bilo u MEM, bilo u MEM sa štakorskim serumom potencijal diferencijacije je bio bolji i direktno je utjecao na poboljšanu diferencijaciju neuroblasta (Belovari i sur., 2001).

Razvoj novih tkiva u naknadnom transplantatu, kao što je kost i masno tkivo koje se nikad ne pojavljuju u kulturi *in vitro* (Škreb i Crnek, 1977) i slabija diferencijacija prethodno kultiviranih transplantata u odnosu na direktnu transplantaciju *in vivo,* ukazuju na osiromašenost metaboličkih uvjeta u kulturi i njihov restriktivni učinak na razvojni potencijal (Strahinić, 1995). No, eksperimentalni sistem kombinacije *in vitro* i *in vivo* metode pokazuje prednost u testiranju pojedine supstance, odnosno utjecaja fizikalnog agensa na embrionalni razvoj zbog kontroliranih uvjeta kulture i metabolički bogatijeg mikrookoliša *in vivo* pod čahurom bubrega, pogodnim za postizanje boljeg potencijala diferencijacije (Belovari i sur., 2004). Pozitivni učinci kombiniranih metoda *in vitro*, odnosno *ex vivo* kada je riječ o kompletnoj organogenezi poput razvoja zuba ili kože (Salaün i sur., 1986), i naknadnom *in vivo* transplantatu pod bubrežnu čahuru upravo su prednosti ovog sistema u istraživanjima normalne i poremećene morfogeneze (Otsu i sur., 2012).

Stoga je kombinacija kulture *in vitro* i *in vivo* pod čahuru bubrega prikladna za testiranje: lijekova, regenerativnih sposobnosti matičnih stanica (Katušić i sur., 2008) i cijelih organa (Salaün i sur., 1986; Otsu i sur., 2012), te potencijala morfogeneze embrionalnih organa *ex utero* u svrhu unaprjeđenja klasične alotransplantacije organa *in situ* (Geng i sur., 2013).

Nisu nađena istraživanja kombiniranih metoda *in vitro* kulture modela organa pupoljaka udova i naknadnih *in vivo* transplantata pupoljka udova štakora, niti bilo kakve transplantacije izoliranih pupoljaka udova. Ektopična transplantacija pod čahuru bubrega pokazala se najprikladnijom za razvoj tkiva štakora (Levak-Švajger i sur., 1991; Robertson i sur., 2007). Prema prikupljenim literaturnim podacima, te znanjem i iskustvu ektopične transplantacije pod bubrežnu čahuru na Medicinskom fakultetu u Zagrebu i radi lakše usporedbe s rezultatima drugih laboratorija, korišten je period transplantacije *in vivo* od 14 dana uz prethodnu kultivaciju pupoljaka udova *in vitro* 14 dana u različitim medijima.

1.6. SVRHA RADA

Makar odavno postoje podaci o teratogenom djelovanju hipertermije i to naročito na mozak (Škreb i Frank, 1963), zbog važnosti ovog problema i za humanu medicinu (vidi: Uvod), potrebna su još uvijek dodatna istraživanja na različitim modelima razvoja sisavaca od kojih su posebno vrijedni oni *ex vivo* tj. izvan organizma majke u kojima je izbjegnuta sva kompleksnost interakcije s majčinskim organizmom, a omogućena je direktna eksperimentalna manipulacija (vidi Uvod). Dosadašnja istraživanja razvoja pupoljaka udova u takvim sustavima bazirala su se većinom na razvoju pilećih udova, a u sisavaca mišjih u kulturi *in vitro*. Zapravo nema istraživanja na izoliranim pupoljcima udova zametaka štakora starosti 13 i 14 dana nego su istraživanja provođena na kulturama cijelog zametka *in vitro*, a razvoj udova je opisan u sklopu kratkotrajnog razvoja čitavog zametka. Što se tiče hipotermije, podaci su još oskudniji, a budući da nije opisano djelovanje dugotrajne hipotermije niže od 32 ºC na razvoj pupoljka udova sisavaca *ex vivo*, postoji općenita potreba za dodatnim istraživanjima dugotrajne hipotermije pa tako i njenog utjecaja na embrionalni razvoj udova.

Kao što je razvidno iz Uvoda, epigenetski lijekovi koji su već u kliničkoj primjeni poput DNA demetilacijskog sredstva 5-azacitidina ili oni za koje se predviđa klinička primjena poput trihostatina A (HDACi), mijenjaju razvojne parametre. Prema tome, potrebno je detaljno poznavati njihove nuspojave i interakcije s drugim čimbenicima okoliša kao što su fizikalni agensi (hipertermija, hipotermija) koji se također primjenjuju u kliničkom liječenju u djece i odraslih (fizikalna medicina i rehabilitacija, ortopedija, kirurgija, onkologija i ostalo).

Prema tome, u ovoj disertaciji istražen je utjecaj promjene temperature i epigenetskih lijekova (5-azacitidin i trihostatin A) na razvoj pupoljaka udova *ex vivo*.

2. HIPOTEZA

Fizikalni agensi, hipertermija i hipotermija, negativno će djelovati na *ex vivo* razvoj pupoljaka udova štakora. U kombinaciji s epigenetskim lijekovima, DNA demetilacijskim agensom 5-azacitidinom ili HDAC inhibitorom trihostatinom A, taj učinak će se pojačati.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJ:

Istražiti utjecaj promjena temperature i epigenetskih lijekova na razvoj pupoljaka udova štakora u *ex vivo* modelu.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Kreiranje *ex vivo* modela razvoja pupoljaka udova 13 i 14 dana starih zametaka sisavca (štakora) u kulturi bez seruma i sa serumom.

2. U *ex vivo* uvjetima istražiti ukupni rast, diferencijaciju i proliferaciju pupoljka udova primjenjujući pojedinačno hipotermiju, hipertermiju, 5-azacitidin i trihostatin A.

3. Istražiti kombinirano djelovanje promjene temperature i trihostatina A ili 5-azacitidina na razvoj pupoljaka udova *ex vivo.*

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišteni mužjaci i ženke laboratorijskog albino štakora soja *Fisher* iz uzgoja Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u dobi od 3 mjeseca starosti. Ukupno je korišteno 100 skotnih ženki i 50 odraslih mužjaka. Za svaku eksperimentalnu skupinu korištene su najmanje 4 skotne ženke štakora.

U svim eksperimentalnim skupinama početak trudnoće ženki štakora određen je nalazom spermija u rodnici. Ciljana starost zametaka postiže se stavljanjem ženki štakora u kavez s mužjacima preko noći na parenje. Sutradan ujutro, prisutnost spermija u razmazu iz rodnice označava se kao 1. dan trudnoće, tj. 0,5. dan starosti zametka.

Istraživanje je provedeno uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prema pozitivnim Zakonima i propisima RH.

4.2. Izolacija pupoljaka udova

Skotne ženke su eutanazirane letalnom dozom anestetika *Xylapan* (ksilazin) sa sedativnim, miorelaksirajućim i analgetskim djelovanjem 48 mg/kg težine i *Narketana 10* (ketamin) s narkotičkim djelovanjem 300 mg/kg težine 13.– i 14.-og dana trudnoće. Koža životinje u trbušnom dijelu premazana je 70%-tnim alkoholom. Horizontalnim rezom u donjem dijelu abdomena otvara se trbušna šupljina. Pincetom se pristupa rogovima uterusa i uz pridržavanje rogova, odvaja se mezometrij. Oba roga maternice izvade se iz trbušne šupljine i ispiru u Petrijevoj zdjelici u Eaglovom MEM-u (engl. „*minimum essential medium*“). Na rogovima uterusa uočavaju se izbočine, nazvane decidua, unutar kojih su smješteni zameci.

Postupak izolacije se nastavlja u sterilnim uvjetima pod binokularnom lupom. U Petrijevoj zdjelici s MEM-om, ururarskim pincetama otvara se stijenka uterusa.

Izolirane decidue prebacuju se u drugu Petrijevu zdjelicu s MEM-om. Pažljivo se otvore ururarskim pincetama i izoliraju zameci stadija pupoljaka udova. Pod binokularnom lupom mikrokirurški se odrežu prednji i stražnji pupoljci udova od ostatka zametka.

4.3. Kultura *ex vivo* (u *in vitro* modelu kulture organa)

Izolirani pupoljci udova (eksplantati) se nasađuju u jednokratne posudice za kulturu organa (Falcon 3037) sa zdencem u sredini. U udubinu zdenca postavljena je čelična mrežica trokutastog oblika, odignuta od dna podloge. Na mrežicu se polaže trokutasti komadić poroznog lećnog papira. Na papir se *braking* pipetom polažu 3 eksplantata i taj dan se označava 0. (nultim) danom kulture. Za uzgoj eksplantata izvan organizma neophodan je kultivacijski medij, koji se ulijeva u zdenac kako bi ovlažio lećni papir. Medij se mijenja svaki drugi dan, prilikom čega se ponovno dodaje svježa otopina epigenetskog lijeka ili antioksidansa.

Eksplantati su uzgajani u termostatu minimalno 3 dana ili do 14 dana u inkubatoru na granici zraka i tekućine u 5% CO_2 i 95% zraka na uobičajenoj temperaturi od 37 ºC sa vodom koja vlaži zrak.

Dio eksplantata starih 14 dana izloženo je definiranim uvjetima kratkotrajne hipertermije u 3-dnevnoj kulturi. Kratkotrajna hipertermija odgovara izlaganju eksplantanata u *ex vivo* uvjetima na toplinski udar od 43 ºC u trajanju od 15 minuta (Katušić, 2008) u termostatu koji je 24 sata prije eksperimenta kalibriran na povišenu temperaturu. Zadana hipertermija u termostatu je povišenje temperature za 5 ºC od normalne temperature tijela štakora (Germain i sur., 1985). Nakon 15 minuta eksplantati se premještaju u drugi paralelni inkubator na 37 ºC do kraja 3-dnevne kulture. Također je u nekim tretiranim pokusnim grupama primijenjena i dugotrajna hipotermija od 31 ºC tijekom 14 dana u kalibriranom inkubatoru.

Posljednjeg dana kulture dio kultiviranih eksplantata je transplantiran pod čahuru bubrega, a preostali eksplantati su se fiksirali za klasičnu histološku ili imunohistokemijsku obradu.

4.4. Osnovni mediji za kultivaciju

Tijekom kultiviranja korištena su tri medija. Eagleov minimalni esencijalni medij (MEM) je najjednostavniji kemijski definirani medij bez bjelančevina. Sastoji se od 13 aminokiselina, 8 vitamina, glukoze, penicilina, streptomicina, fenolnog crvenila (indikator pH) i Hanksovih soli koje održavaju konstantan pH. Čuva se na +5 ºC, a svaka 3 tjedna dodaje se L-glutamin u koncentraciji od 29,2 mg/100 ml MEM-a budući da se s vremenom raspada.

Slijedeći korišteni medij je MEM sa dodatkom štakorskog seruma (1:1). Štakorski se serum dobiva od 3 mjeseca starih štakorskih mužjaka soja *Fisher*. Životinja se anestezira jednokratnom intraperitonealnom injekcijom mješavine otopina *Xylapan*a (ili *Rompuna* – ksilazin) u dozi od 12 mg/kg tjelesne težine i *Narketana 10* (ketamin) u dozi od 75 mg/kg tjelesne težine. U sterilnim uvjetima otvori se trbušna šupljina, preparira se abdominalna aorta te se iz njene bifurkacije izvadi krv. Krv se odmah centrifugira na 4000 rpm 15 minuta. Nakon centrifugiranja serum se inaktivira zagrijavanjem na 56 ºC kroz 30 minuta te se sterilizira filtriranjem kroz 0,22 µm Milipore filter, alikvotira i čuva na -20 ºC.

Kao treći osnovni medij za kulturu korišten je u nekim pokusima MEM sa dodatkom BSA (H9319; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) u koncentraciji od 4 mg/ml BSA u MEM-u.

4.5. Biološki aktivne supstancije dodane u osnovne kultivacijske medije

U dijelu pokusa koristio se 5-azacitidin (A2385; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Ako je medij bio bez seruma, korišteno je 5 µM 5-azacitidina, dok je u serumu korištena doza od 30 µM 5-azacitidina (Škreb i sur., 1993).

U pojedinim eksperimentalnim skupinama primijenjen je trihostatin A (T1952; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) otopljen u MEM-u i to u dvije koncentracije 33 nM trihostatina A i 66 nM trihostatina A. Također je korištena otopina dimetil sulfoksida (DMSO; D8418; Sigma-Aldrich Taufkirchen, Njemačka) u koncentraciji od 1,32% i 0,66% .

U dijelu pokusa, u mediju bez seruma, eksplantati su tretirani s antioksidansom 22,6 µM PBN (alpha-phenil-N-*tert*-butylnitron) (B7263; Sigma

Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) ili u kombinaciji s 5 μM 5-azacitidina, na normotermiji i hipotermiji.

Kontrolne grupe eksplantanta uzgajane su s i bez 5-azacitidina, trihostatina A i PBN-a.

4.6. Transplantacija kultiviranih eksplantata pod čahuru bubrega *in vivo*

Eksplantati (prednji i stražnji) su prethodno izolirani gore navedenom metodom (vidi 4.2.), zatim kultivirani *in vitro* kroz 14 dana u standardnim uvjetima (vidi 4.3.) u pet različitih eksperimentalnih skupina: 1. bez seruma, 2. sa serumom, 3. sa 5 μM 5-azacitidina u MEM-u, 4. sa 22,6 μM PBN u MEM-u i 5. sa kombinacijom 5 μM 5-azacitidina i 22,6 μM PBN u MEM-u. Nakon 14 dana kulture *in vitro* eksplantati su transplantirani *in vivo* pod čahuru bubrega gdje su proveli period od 14 dana (Belovari i sur., 2004).

Prethodno kultivirani eksplantati su pod binokularnom lupom pažljivo odvojeni od mrežice u kulturi i isprani u MEM-u, nakon čega su spremni za transplantaciju.

Sam postupak ektopične transplantacije *in vivo* pod čahuru bubrega (Levak-Švajger i sur., 1991) obuhvaća slijedeće korake. Odrasli singenični mužjaci uvedeni su u anesteziju (vidi 4.4.). Nastavak procesa transplantacije izvodi se u aseptičnim uvjetima pod binokularnom lupom. U desnom lumbalnom području, paralelno s kralježnicom škarama se učini incizija kože i mišića duljine 0,5-0,7 cm. Vrh pincete podvuče se pod bubreg u području hilusa te se bubreg atraumatski fiksira izvan lože. Slijedi incizija čahure bubrega skalpelom u duljini 3 mm uz izbjegavanje krvarenja iz bubrega. Kako bi se stvorio “džep” za transplantat, tupi vrh pincete podvuče se pod čahuru bubrega i odljušti se od parenhima. Zatim se prethodno kultivirani eksplantat, pomoću *braking* pipete postavlja pojedinačno u novoformirani “džep” ispod čahure bubrega. Postupak uspješne transplantacije provjerava se nalazom transplantata u “džepu”, što se jasno vidi ako nije došlo do krvarenja. Potom se otpuštanjem atraumatske fiksacije bubreg samostalno reponira. Rana kroz mišićje i kožu zatvara se šesnaest milimetarskim Michelovim kopčama. Životinje su odvojene u različite kaveze po vrsti prethodnog tretmana *in vitro* i održavane tijekom 14 dana u standardnim uvjetima uz dnevnu veterinarsku kontrolu.

Nakon eutanazije (vidi 4.2.), transplantati su izolirani pod binokularnom lupom, fiksirani i uklopljeni za analizu klasičnom svjetlosnom mikroskopijom ili imunohistokemijskom metodom.

4.7. Mjerenje rasta eksplantata

Rast elipsoidinih eksplantata, odnosno pupoljaka udova, prati se mjerenjem većeg i manjeg promjera pomoću okularnog mikrometra postavljenog u binokularnu lupu na povećanju od x1,6. Početni izmjereni promjeri iznosili su za prednje pupoljke udova: veći (od 1,8270 do 2,3240 mm) i manji (od 1,1725 do 1,7990 mm), a za stražnje pupoljke udova: veći (od 1,8520 do 2,4640 mm) i manji (od 1,1113 do 1,5858 mm). Promjeri su mjereni prilikom izmjene medija u kulturi. Broj mjerenja ovisi o trajanju kulture. U kulturi od tri dana, mjerilo se dva puta tj. odmah nakon nasađivanja i na kraju kulture (mjerenje 0. i 3. dan). Tijekom 14-dnevne kulture mjerilo se šest puta (0., 3., 6., 10., 12. i 14. dan).

Dobivene vrijednosti uvrštene su u formulu za površinu elipse (A = area):

$$A = \pi \cdot \text{veći promjer} \cdot \text{manji promjer} / 4$$

Izračunate A vrijednosti po danima mjerenja normalizirane su dijeljenjem s inicijalnom vrijednosti mjerenja nultoga dana (A_0) i kao takve korištene su za mjeru rasta (A/A_0) u određenom danu. A_0 vrijednosti kretale su se u različitim pokusima za netom izolirane prednje pupoljke udova od 2,255259 do 3,360302 mm^2 i za stražnje pupoljke udova od 1,887828 do 3,188902 mm^2. Prema tome, za nulti dan tj. odmah nakon nasađivanja eksplantata u kulturu na granicu između tekućine i zraka, mjera njihove površine A/A_0 iznosi 1 (Mužić i sur., 2013).

4.8. Klasična histološka obrada za svjetlosnu mikroskopiju

Posljednjeg dana kulture eksplantati se iz svih eksperimentalnih i kontrolnih skupina ispiru u PBS-u. Pod binokularnom lupom se odvoje od lećnog papira. Zatim se fiksiraju u fiksativu „St. Marie“, ohlađenom na +4 ºC. Fiksativ se sastoji od 96%-tnog alkohola i 1%-tne ledene octene kiseline (+4 ºC) koja se dodaje neposredno prije fiksacije. Završetkom 24 satnog fiksiranja, eksplantati se ispiru i postupkom

dehidracije kroz uzlazni niz alkohola (96% i 100% etanola, svaki 2 x 20 minuta) i benzola (1 x 30 minuta), pripremaju se za uklapanje u parafin na 56 °C.

Parafinski blokovi se prethodno pripreme i serijskim rezanjem na rotacijskom mikrotomu režu se rezovi debljine 5 μm. Dio rezova se obrađuje i boja klasičnim metodama za promatranje svjetlosnom mikroskopijom (hemalaun-eozin /HE/, Masson i Azan). Odnosno, drugi dio rezova se dalje priprema za imunohistokemiju.

4.9. Imunohistokemijska metoda

Dio serijskih rezova eksperimentalnih i kontrolnih skupina debljine 5 μm priprema se za imunohistokemijsku obradu i nanaša se na silanizirana stakalca (S3003; DAKO, Glostrup, Danska). Stakalca se suše na zraku kroz 24 sata pri sobnoj temperaturi.

4.9.1. Protutijela

U radu su korištena tri specifična primarna protutijela: 1. *Monoclonal Mouse - Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), *Clone PC10* (M0879; DAKO, Glostrup, Danska), 2. *Polyclonal Rabbit Cleaved Caspase–3 (Asp 175) Antibody* (#9661; Cell Signaling technology, Danvers, SAD) i 3. *Polyclonal Rabbit to Histone H3* (acetyl K9) - ChIP Grade (ab10812, Abcam, University of Cambridge, Velika Britanija) sva tri u razrjeđenju 1:100. U pokusima s PCNA i acetiliranim histonom H3 korišten je *Anti-Mouse and Rabbit/HRP* (DM822, DAKO, Glostrup, Danska) za sekundarno biotinilirano protutijelo. Prilikom imunohistokemijske analize s pocijepanom kaspazom-3 korišteno je sekundarno biotinilirano protutijelo *Anti-Rabbit IgG* (cijela molekula) – *Biotin*, protutijelo proizvedeno u kozi 028K4858 (B8895; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Standardno nespecifično protutijelo upotrijebljeno je za negativne kontrole (No. V 1617 mišji IgG_1, DAKO, Glostrup, Danska).

4.9.2. Priprema rezova za imunohistokemiju

Rezovi se deparafiniraju uranjanjem u ksilol (2 x 5 minuta). Potom se rehidriraju provlačenjem stakalaca kroz niz otopina: 100%-, 96%-, 70% - etanol (svaki 2 x 5 minuta), slijedi ispiranje u destiliranoj vodi 30 sekundi i uranjanje u PBS 5 minuta. Demaskiranje (engl. *retrieval*) antigena vrši se kuhanjem u mikrovalnoj pećnici. Otopina *ChemMate*^{TM} *Target Retrieval Solution* (x10) (S2031; DAKO, Glostrup, Danska) se zagrije u plastičnoj kadici kroz 2,5 minute u mikrovalnoj pećnici na maksimumu. Otopina se potom hladi jednu minutu izvan mikrovalne pećnice. Slijedi uranjanje rezova na silaniziranim stakalcima u otopinu kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom se otopina s rezovima zagrije 30 sekundi i ostavi u mikrovalnoj pećnici 5 minuta. Postupak se ponavlja 3 puta. Na kraju se otopina s rezovima hladi 30 minuta na sobnoj temperaturi, ispire u PBS-u (engl. *Phosphate Buffered Saline)* 5 minuta te se postupak ponovi u svježem PBS-u 1 minutu. Rezovi se na stakalcima zaokruže masnom olovkom (S2002; DAKO, Glostrup, Danska) kako bi se stvorili „bazenčići“. Slijedi blokiranje peroksidaze otopinom koja se priređuje neposredno prije upotrebe (100 ml = 75 ml metanola, 25 ml destilirane vode i 75 ml 3% H_2O_2), kroz 30 minuta namakanja stakalaca u mraku. Završava se ispiranjem u PBS-u (3x 10 minuta). Treba napomenuti da blokiranje peroksidaze u protokolu za kapazu-3 i acetilirani histon H3 slijedi iza nakapavanja primarnog protutijela.

4.9.3. Proliferacijski biljeg PCNA

Prema uputama proizvođača pripremi se kozji serum i primarno protutijelo, proliferacijski biljeg Monoclonal Mouse - Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Clone PC10 (M0879; DAKO, Glostrup, Danska) koji se veže za antigen u jezgri stanice. Kozji serum (10% kozji serum razrijeđen s 1% BSA/PBS) se nakapa na bazenčiće i ostavi 20 minuta. Otrese se višak seruma i dokapava se otopina razrijeđenog primarno protutijelo PCNA (s 1% PBS 1: 100), te se ostavi u vlažnoj komori preko noći na +4 ºC. Na negativnu kontrolu se dokapava nespecifično protutijelo - standardan negativni kontrolni reagens (No. V 1617 DAKO, Glostrup, Danska /7 ml mišjeg IgG 1 u 0,05 M Tris puferu, pH 7,6 koji sadrži proteinski nosač i 15 mM natrij azida/). Slijedi inkubacija s biotin-streptavidin-peroksidaza kompleksom.

Stakalca se prvo ispiru u PBS (3 x 10 minuta), zatim se inkubiraju 25 minuta s biotinom (K0609; *Labelled streptavidin-biotin kit*, Dakocytomation, LSAB®2 *System–HRP*, DAKO, Glostrup, Danska) i 20 minuta sa Streptavidin Peroksidaza kompleksom (P0397; Streptavidin/HRP, DAKO, Glostrup, Danska /streptavidin konjugiran s peroksidazom iz hrena u PBS-u/) u vlažnoj komori. Nakon pojedine inkubacije stakalca se ispiru u PBS-u 5 minuta. Signal tj. prisutnost PCNA se vizualizira inkubacijom rezova s 1 kapi otopine DAB (3,3'-diaminobenzidin) i *Chromogen-Substrate* kompleksa za peroksidazu (K3468; Dakocytomation, Liquid DAB+ substate, Chromogen system, DAKO, Glostrup, Danska) kroz 30 sekundi, odnosno dok ne posmeđi. Reakcija se zaustavlja uranjanjem stakalaca u destiliranu vodu (2 puta). Rezovi se potom kontrastiraju 2,5 minute s hemalaunom i ispiru u hladnoj vodovodnoj vodi tijekom 20 minuta dok se voda nerazbistri. Nakon toga se stakalca ostave 5 minuta u destiliranoj vodi. Zadnji korak je dehidracija, prekrivenje stakalaca s 50%-tnim glicerolom u PBS i 24-satno sušenje na zraku.

4.9.4. Biljeg apoptoze – pocijepana kaspaza-3

Nativni eksplantati i oni iz pokusa hipertermije analizirani su na biljeg apoptoze pocijepanu kaspazu-3 prema uputama proizvođača, a primarno protutijelo se veže za antigen u citoplazmi. Nakon rehidracije i demaskiranja antigena prema standardnom postupku, rezovi se nakapaju s kozjim serumom (10% kozji serum razrijeđen u 1% BSA/PBS) 20 minuta. Slijedi ispiranje u PBS-u (2 x 5minuta). Razrijeđeno primarno protutijelo *Polyclonal Rabbit Cleaved Caspase–3 (Asp 175) Antibody* (#9661; Cell Signaling technology, Danvers, SAD) 1: 100 s 1% BSA/PBS i standardni negativni kontrolni reagens (No. V 1617 DAKO, Glostrup, Danska /7 ml mišjeg IgG 1 u 0,05 M Tris puferu, pH 7,6 koji sadrži proteinski nosač i 15 mM natrij azida/) se nakapaju na ciljane rezove eksperimenta, odnosno negativne kontrole i ostave na +4 ºC preko noći. Slijedeći korak je ispiranje u PBS-u (3 x 5 minuta) i blokiranje peroksidaza kao što je navedeno ranije. Potom se rezovi inkubiraju 1 sat s otopinom sekundarnog biotiliniziranog protutijela *Anti-Rabbit IgG* (*whole molecule*) – *Biotin*, *antibody produced in goat* 028K4858 (B8895; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) koje je razrijeđeno i 1% BSA u omjeru 1:300. Slijedeći koraci obuhvaćaju ispiranje u PBS-u

(3 x 5 minuta) i inkubiranje 20 minuta sa Streptavidin Peroksidaza kompleksom (P0397; Streptavidin/HRP, DAKO, Glostrup, Danska /streptavidin konjugiran s peroksidazom iz hrena u PBS-u) u vlažnoj komori. Nakon inkubacije stakalca se ispiru u PBS-u 5 minuta. Signal tj. prisutnost pocijepane kaspaze-3 se vizualizira inkubacijom rezova s 1 kapi otopine DAB (3,3'-diaminobenzidin) + Chromogen-Substrate kompleksa za peroksidazu (K3468; Dakocytomation, Liquid DAB+ substate, Chromogen system, DAKO, Glostrup, Danska) kroz 30 sekundi, odnosno dok ne posmeđi. Zadnji postupci protokola istovjetni su protokolu s PCNA. Reakcija se zaustavlja uranjanjem stakalaca u destiliranu vodu (2 puta). Potom se rezovi kontrastiraju s hemalaunom, ispiru u vodovodnoj vodi tijekom 20 minuta, ponovno 5 minuta u destiliranoj vodi i prekrivaju s 50%-tnim glicerolom u PBS.

4.9.5. Biljeg acetiliranog histona H3 (H3K9ac)

Eksplantati iz pokusa s HDACi tj. 33nM TSA i hipertermijom, te hipertermijom u kemijski definiranom mediju (MEM) analizirani su na biljeg acetiliranog histon, koji se veže u jezgri na acetilirani lizin na mjestu K9 u histonu H3 (H3K9ac) prema uputama proizvođača. Nakon rehidracije i demaskiranja antigena prema standardnom postupku, rezovi se nakapaju s kozjim serumom (10% kozji serum razrijeđen u 1% BSA/PBS) 20 minuta. Slijedi ispiranje u PBS-u (2 x 5minuta). Razrijeđeno primarno protutijelo Polyclonal Rabbit to Histone H3 (acetyl K9) - ChIP Grade (ab10812, Abcam, University of Cambridge, Velika Britanija) 1: 100 s 1% BSA/PBS i standardni negativni kontrolni reagens (No. V 1617 DAKO, Glostrup, Danska /7 ml mišjeg IgG 1 u 0,05 M Tris puferu, pH 7,6 koji sadrži proteinski nosač i 15 mM natrij azida/) se nakapaju na ciljane rezove eksperimenta, odnosno negativne kontrole. Primarno protutijelo odstoji 8 minuta, dok se kontrole ostave na +4˚C preko noći. Slijedeći korak je ispiranje u PBS-u (3 x 5 minuta) i blokiranje peroksidaza kao što je navedeno ranije. Potom se rezovi inkubiraju 1 sat s otopinom sekundarnog biotiniziranog protutijela anti-mouse and rabbit/HRP (DM822, DAKO, Glostrup, Danska) koje je razrijeđeno i 1% BSA u omjeru 1:300. Nakon inkubacije stakalca se ispiru u PBS-u 5 minuta. Signal tj. prisutnost acetiliranog histona H3 se vizualizira inkubacijom rezova s 1 kapi otopine DAB (3,3'-diaminobenzidin) + Chromogen-

Substrate kompleksa za peroksidazu (K3468; Dakocytomation, Liquid DAB+ substate, Chromogen system, DAKO, Glostrup, Danska) kroz 30 sekundi, odnosno dok ne posmeđi. Zadnji postupci protokola istovjetni su protokolu s PCNA. Reakcija se zaustavlja uranjanjem stakalaca u destiliranu vodu (2 puta). Potom se rezovi kontrastiraju s hemalaunom, ispiru u vodovodnoj vodi tijekom 20 minuta, ponovno 5 minuta u destiliranoj vodi, prekrivaju s 50%-tnim glicerolom u PBS i suše na zraku kroz 24 sata.

4.10. Stereološka kvantitativna analiza

Kvantitativna razlika u proliferacijskoj sposobnosti stanica pupoljka udova između eksperimentalnih grupa i kontrole analizirala se pomoću relativne stereološke varijable numeričke gustoće (Nv) odnosno broja stanica sa signalom po mm^3 tkiva. Nasumično je odabrano po 6 parafinskih blokova iz svake eksperimentalne grupe za stereološku analizu stanica s PCNA-pozitivnim signalom. Iz serije narezanih parafinskih rezova svakoga bloka, slučajnim odabirom izdvojilo se 5 imunohistokemijski (PCNA) obrađenih rezova. Rezovi su analizirani pod binokularnim svjetlosnim mikroskopom “Nikon Alphaphot” pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema s 42 (M 42) testne točke, pri povećanju 400x. Ukupna duljina testnih linija (L_t) iznosila je 1,008 mm, dok je površina testnog areala (A_t) bila 0,0837 mm^2 za svako analizirano mikroskopsko polje.

Veličina uzorka svake eksperimentalne skupine, odnosno potreban broj testiranih vidnih polja, odredio se prethodnim stereološkim mjerenjem na orijentacijskom uzorku od 10 vidnih polja i uz 95%-tni interval povjerenja prema DeHoff-ovoj formuli:

$$„n“ = (200/y \cdot s/\bar{x})^2$$

gdje je „n“ broj polja koje treba analizirati, $\bar{x}$ je aritmetička sredina orijentacijskog uzorka, s je standardna devijacija orijentacijskog uzorka i y je dopušteno odstupanje od rezultata aritmetičke sredine (Kališnik, 1985). Pri 95%-tnom intervalu povjerenja, izračunati broj testnih vidnih polja „n“ ne odstupa od vrijednosti prosjeka za više od 10%.

Pomoću Weibelovog mnogonamjenskog testnog sistema brojale su se PCNA pozitivne stanice u uzorcima, potom je uslijedilo izračunavanje numeričke gustoće. Numerička gustoća (Nv) je relativna stereološka varijabla koja nam daje podatak o broju čestica u jedinici prostora (mm^{-3}). Broj profila čestica u ravnini presjeka (N_A) je razmjeran produktu njihove numeričke gustoće (Nv) i njihovog prosječnog tangentnog promjera D (Wicksell, 1925 i 1926), prema jednadžbi:

$$N_A=Nv\cdot D$$

Iz nje možemo izraziti numeričku gustoću:

$$Nv=N_A/D$$

Nakon što su prebrojeni profili čestica (N) na testnom arealu (A_t) izračunat je njihov kvocijent $N_A=N/A_t$, te uvršten u prethodnu formulu, pa se dobiva slijedeće:

$$Nv=N/A_t\cdot D$$

Prosječni tangentni promjer izračunat je pomoću računalnog programa Ellipse 3D i on za 100 stanica iznosi D=0,0147 mm, a površina testnog areala (A_t) je 0,0837 mm^2. Koristeći ove vrijednosti izračunata je numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica u pupoljcima udova štakora.

4.11. Statistička analiza podataka

Statistička analiza učinjena je pomoću računalnog programa *Graph Pad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, SAD). U statističkoj obradi eksperimentalnih podataka (numerička gustoća, mjerenje promjera) dobiveni rezultati prikazani su mjerom centralne tendencije (aritmetička sredina) i mjerom disperzije (standardna pogreška) koristeći deskriptivnu statistiku. U uvjetima normalne raspodjele značajnost razlika mjerenih parametara između pokusnih skupina (mjera rasta (A/A_0), numerička gustoća PCNA) testirana je prikladnim statističkim testovima (Student t-test ili ANOVA), dok su u suprotnim uvjetima korišteni Mann-Whitney U test za nezavisne uzorke ili Kruskall Wallis test. Kao značajna razlika u svim pokusnim skupinama priznata je ona na razini stupnja vjerojatnosti od $p<0.05$.

5. REZULTATI

U rezultatima su prvo opisani pupoljci udova koji su izolirani 13. i 14. dan gestacije i poslužili su kao ishodišna tkiva za *ex vivo* pokuse. Zatim su opisani rezultati dobiveni nakon njihove kultivacije na normotermiji, hipotermiji i hipertermiji u različitim medijima sa i bez dodatka biološki aktivnih supstanci.

U zadnjem poglavlju nalazi se usporedba rezultata kulture pupoljka udova *ex vivo* obzirom na različite medije za kultivaciju, dodane supstance i promjenu temperature tijekom kultivacije.

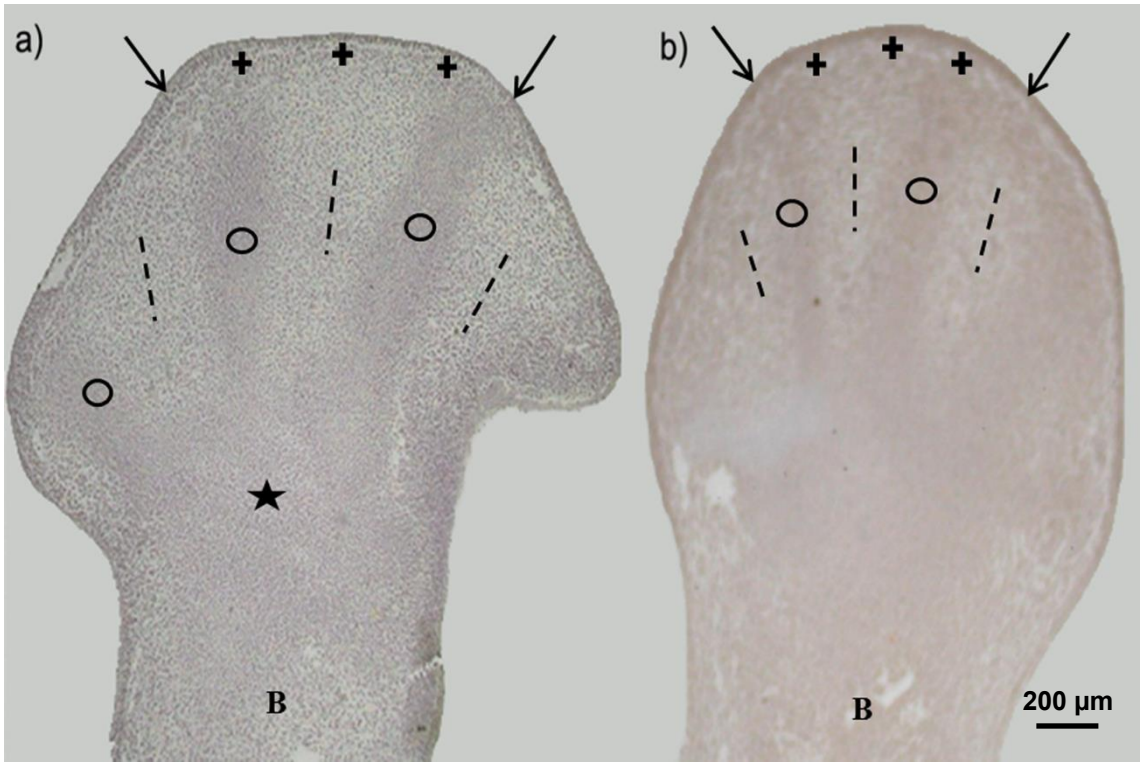
5.1. PUPOLJCI UDOVA

Prednji i stražnji pupoljci udova 13 i 14 dana starih štakorskih zametaka analizirani su klasičnom svjetlosnom mikroskopijom. Analizom imunohistokemijskog bojanja detektirana je ekspresija signala PCNA i pocijepane kaspaze-3, odnosno potencijala proliferacije i apoptoze u stanicama pupoljaka udova.

Tipična forma prednjih pupoljaka udova u obliku peraje i stražnjih pupoljka udova u obliku vesla nađena je u oba gestacijska stadija (Slika 1.). Središnji dio pupoljka uda građen je od nediferenciranog mezenhima. Izvana ga prekriva dvoslojni nezreli epitel (ektoderm). U vršnom dijelu pupoljka uda nalaze se zrakasta zgusnuća mezenhima tj. buduće osnove hrskavice prstiju (nešto gušće kod 14 dana starih zametaka) okružene rahlim mezenhimom na mjestima budućih interdigitalnih regija. Opisana zgusnuća nastavljaju se u zgusnuća buduće hrskavice kostiju pešća (ili nožja u stražnjim pupoljcima udova), okruženih rahlim mezenhimom u bazi pupoljka uda. U stražnjim pupoljcima udova zrakasta zgusnuća mezenhima su nešto rjeđa u odnosu na prednje pupoljke udova. Tipično su nađeni su različiti stupnjevi vaskulogeneze, od hemagioblasta, njihovih agregata, krvnih otočića i krvnih kapilara (Mužić i sur., 2013).

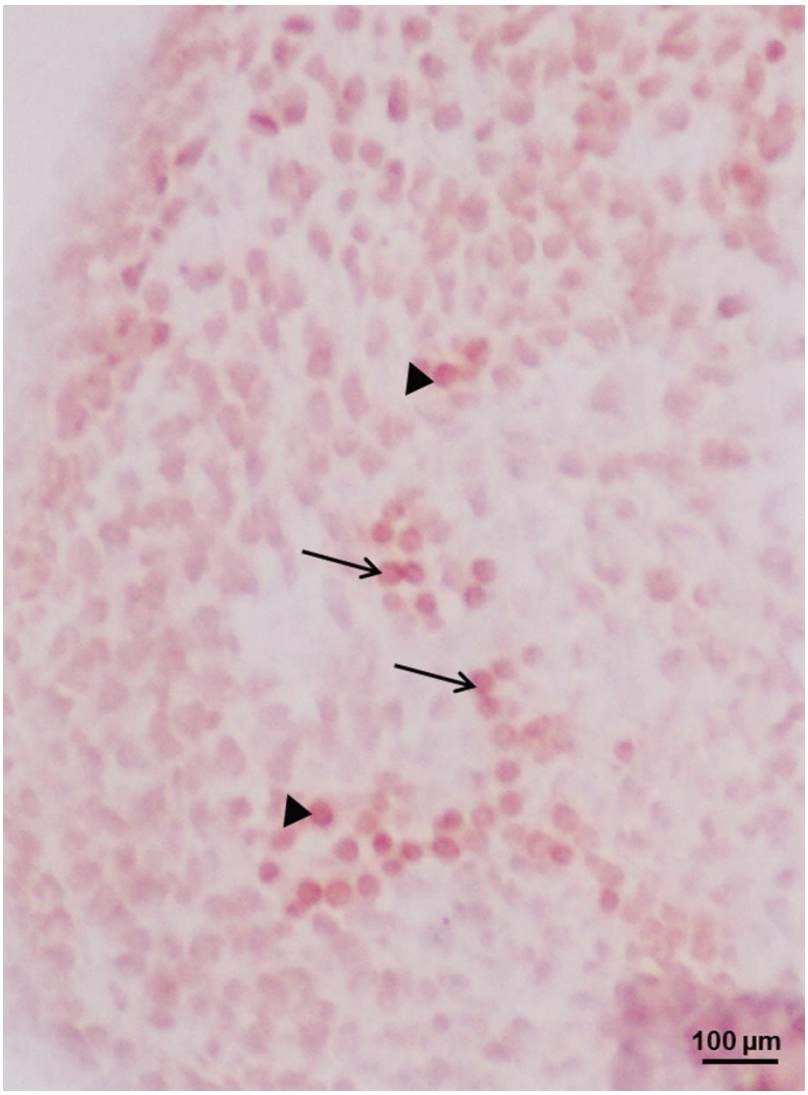
Ekspresija PCNA otkrivena je u oba stadija analiziranih štakorskih zametaka i to u pojedinim stanicama epitela i mezenhima u obliku smeđeg obojenja jezgre. Jezgre negativne na PCNA bile su plave boje (hemalaunski kontrast) što je poslužilo kao negativna interna kontrola. Karakteristično za ranu fazu morfogeneze, najgušći i

najjači signal PCNA prikazao se u zoni progresije (ZP) koja se nalazi subektodermalno na vršku pupoljka uda u obliku potkove (ZP vidljiva na Slici 1.)



Slika 1. Prednji (a) i stražnji (b) pupoljak uda 13 dana starog štakorskog zametka. a) Negativna kontrola ekspresije PCNA. b) Ekspresija pocijepane kaspaze-3. DAB, kontrastirano hemalaunom, x40. ⟶ = nezreli epitel u vršku pupoljka uda; ○ = zrakasta zgusnuća mezenhima; – – – = buduća interdigitalna regija; ★ = buduće hrskavice kostiju pešća/nožja; ✚ = zona progresije; **B** = baza pupoljka uda.

Ekspresija signala pocijepane kaspaze-3 pokazala se u svega nekoliko mezenhimskih stanica u području vrška 14 dana starih prednjih pupoljaka udova (u predmnijevanom području interdigitalne regije i interfalangealnog zgloba (Slika 2.), te na bazi pupoljka u obliku smeđeg obojenja jezgre). Kao negativnu internu kontrolu koristili smo plavo obojane (hemalaunski kontrast) jezgre, koje su negativne na pocijepanu kaspazu-3.



Slika 2. Ekspresija pocijepane kaspaze-3 u mezenhimskim stanicama prednjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka. DAB, kontrastirano hemalaunom, x200. ⟶ = buduća interdigitalna regija; ► = budući interfalangealni zglob.

5.2. RAST PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO*

Eksperimentalni dio istraživanja utjecaja epigenetskih lijekova (5-azacitidina i trihostatina A) i promjene temperature na razvoj udova u *ex vivo* kulturi obuhvatio je 3 grupe pokusa. U svakom pokusu korišteni su pupoljci prednjih i stražnjih udova 13 i/-ili 14 dana starih zametaka štakora. Kako se radi o pupoljcima udova koji su eksplantirani iz zametaka i kultivirani, u daljnjem tekstu će se za njih koristiti pojam „eksplantat“.

Rezultati su prikazani u tri cjeline, prema temperaturi na kojoj su kultivirani eksplantati (normotermija 37 ºC, hipotermija 31 ºC i hipertermija 43 ºC). Na navedene temperature su eksplantati stavljeni odmah nakon izolacije. Eksplantati kultivirani na 37 ºC inkubirani su od 3 do 14 dana. U eksperimentima sa dugotrajnom hipotermijom eksplantati su kultivirani na 31ºC do dva tjedna kulture. U pokusu sa kratkotrajnom hipertermijom eksplantati su tretirani 15 minuta na 43 ºC te nadalje kultivirani 3 dana na 37 ºC.

Svaka cjelina sadrži rezultate analize rasta i proliferacijske aktivnosti eksplantata. Proliferacija na staničnoj razini pokazana je korištenjem biljega nuklearnog antigena proliferirajućih stanica (PCNA), koji se eksprimira u jezgrama proliferativnog tkiva i čija je ekspresija analizirana stereološkim metodama (Nv= numerička gustoća). Na kraju je prikazana analiza diferencijacije eksplantata.

U drugom dijelu prikaza rezultata provedena je usporedba rezultata.

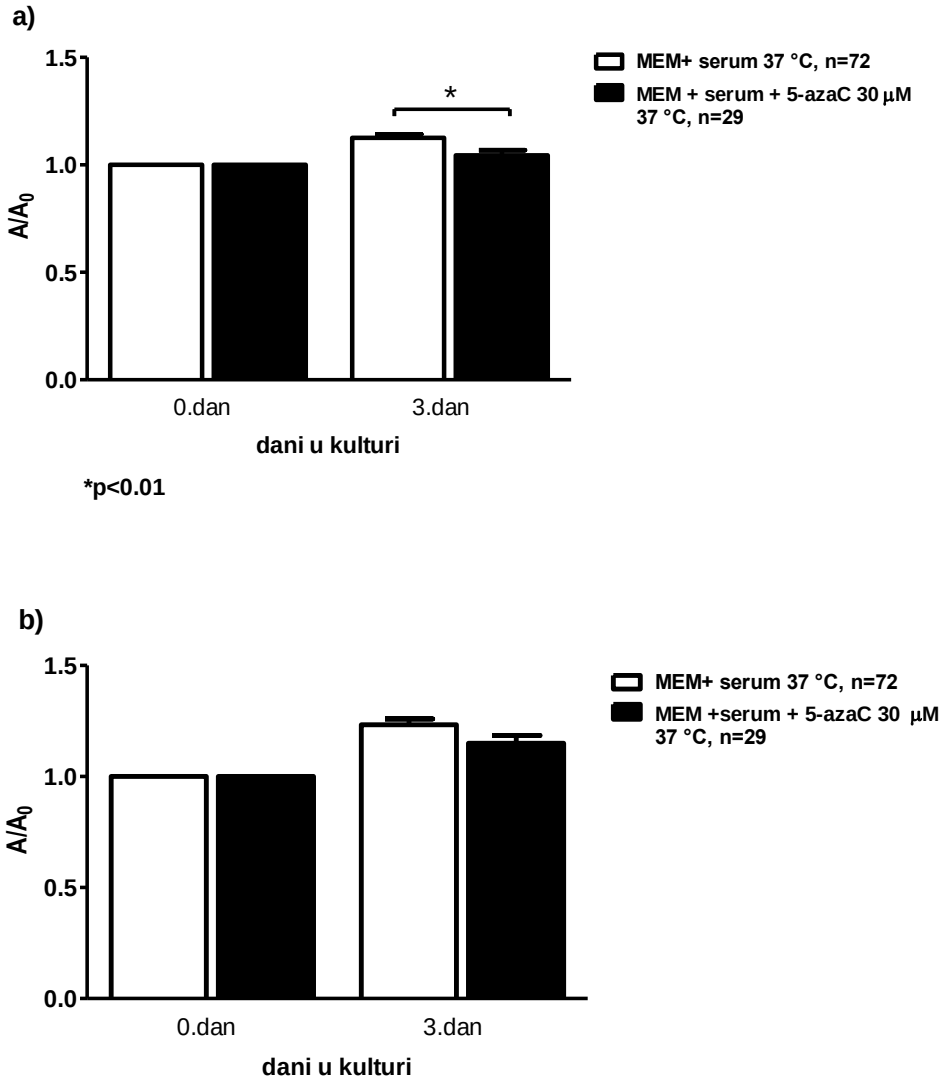
5.2.1. NORMOTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI

5.2.1.1. 5-AZACITIDIN

U istraživanju utjecaja epigenetskog lijeka 5-azacitidina na razvoj pupoljaka udova *ex vivo* eksplantati 14 dana starih zametaka štakora kultivirani su u mediju sa serumom i bez seruma, u koji je dodan 5-azacitidin. Koncentracija 5-azacitidina u mediju sa serumom iznosila je 30 μM (Škreb i sur., 1993), a u kemijski definiranom (MEM) mediju bez seruma 5 μM (Bulić-Jakuš i sur., 2001).

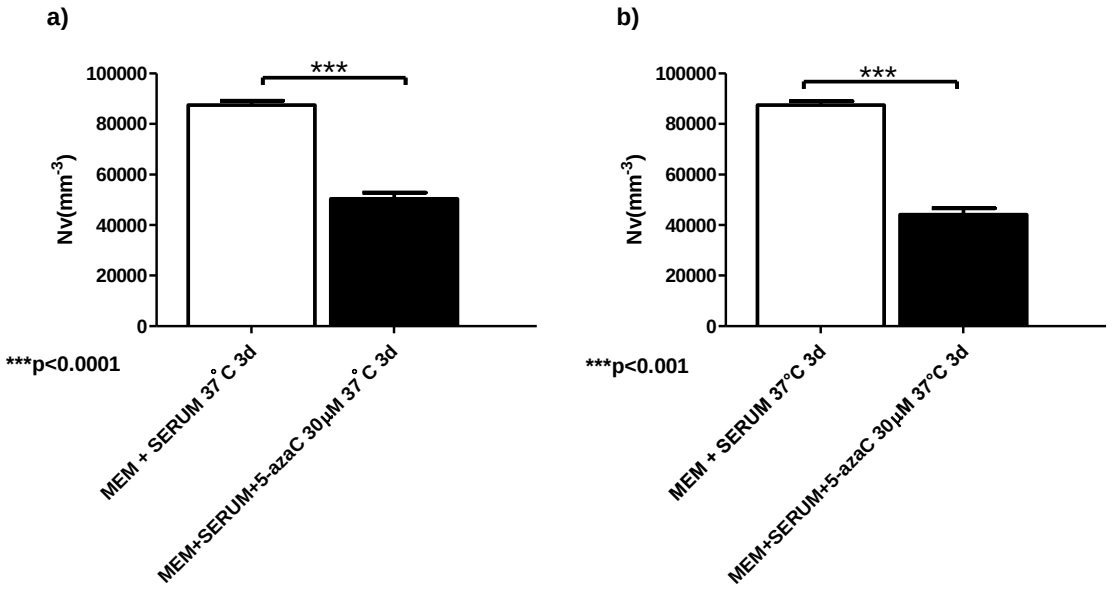
5.2.1.1.1. 5-azacitidin u kulturi sa serumom

U kulturi sa serumom prednji i stražnji eksplantati kultivirani su 3 dana u prisutstvu 30 μM 5-azacitidina. Nakon 3 dana kulture opaženo je smanjenje rasta eksplantata u odnosu na kontrolne eksplantate kultivirane samo u serumu. Ipak, ovo smanjenje bilo je statistički značajno samo u slučaju prednjih pupoljka udova ($p<0.01$), koji su se pokazali osjetljivijima na 5-azacitidin (Slika 3.).



Slika 3. Rast eksplantata u kulturi *in vitro* s 5-azacitidinom dodanim u medij sa serumom u koncentraciji 30 μM. a) prednji eksplantat; b) stražnji eksplantat. Studentov t-test.

Nadalje, proliferativna aktivnost stanice u ovom eksperimentu analizirana je nakon 3 dana kulture stereološkom analizom ekspresije proliferativnog biljega PCNA u prednjim i stražnjim eksplantatima. Pokazalo se da je numerička gustoća PCNA pozitivnih stanica izrazito smanjena u prednjim ($p<0.0001$) i stražnjim ($p<0.001$) eksplantatima koji su kultivirani u mediju sa 30 μM 5-azacitidina, u komparaciji sa kontrolnim eksplantatima kultiviranima samo u serumu (Slika 4.).

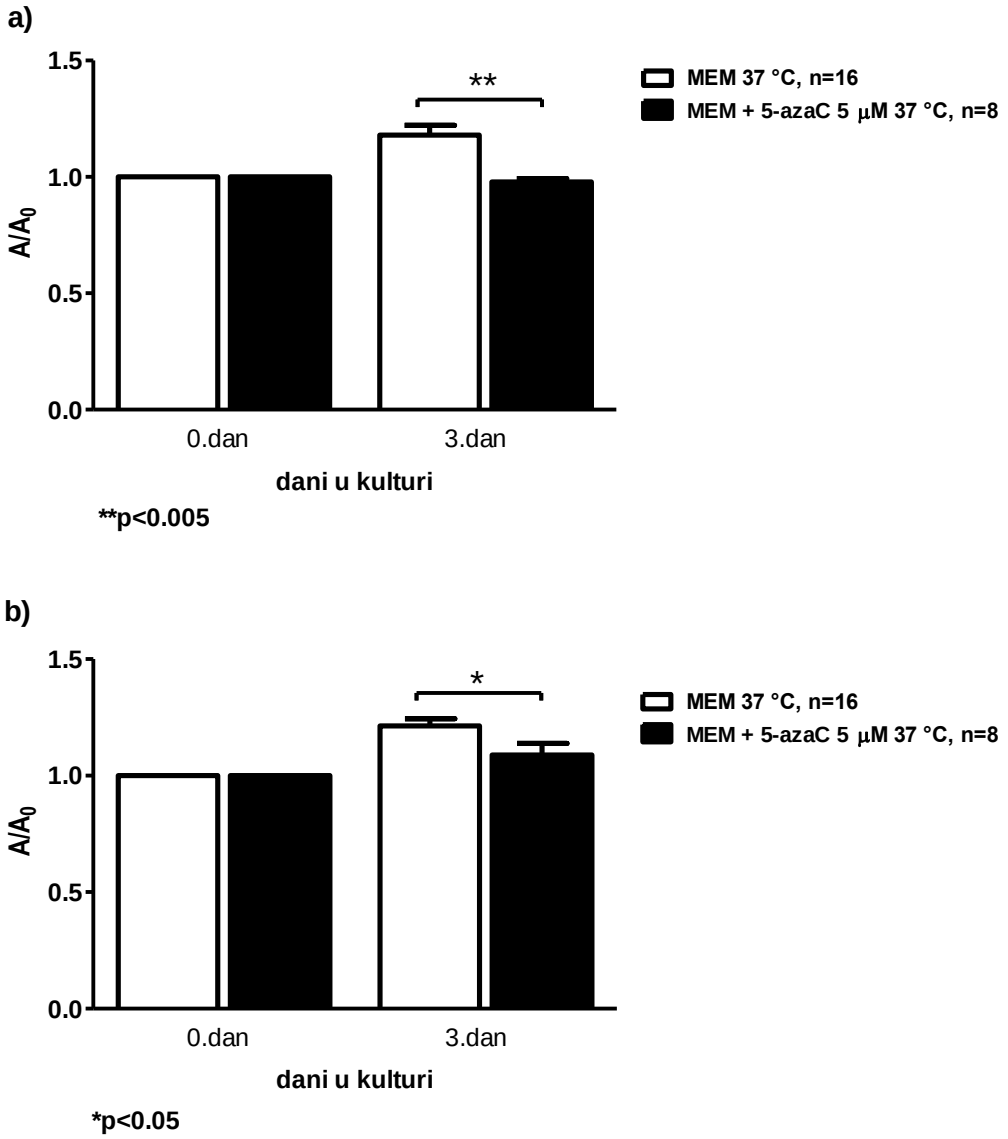


Slika 4. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima nakon 14 dana kulture u mediju sa serumom i 30 µM 5-azacitidina. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

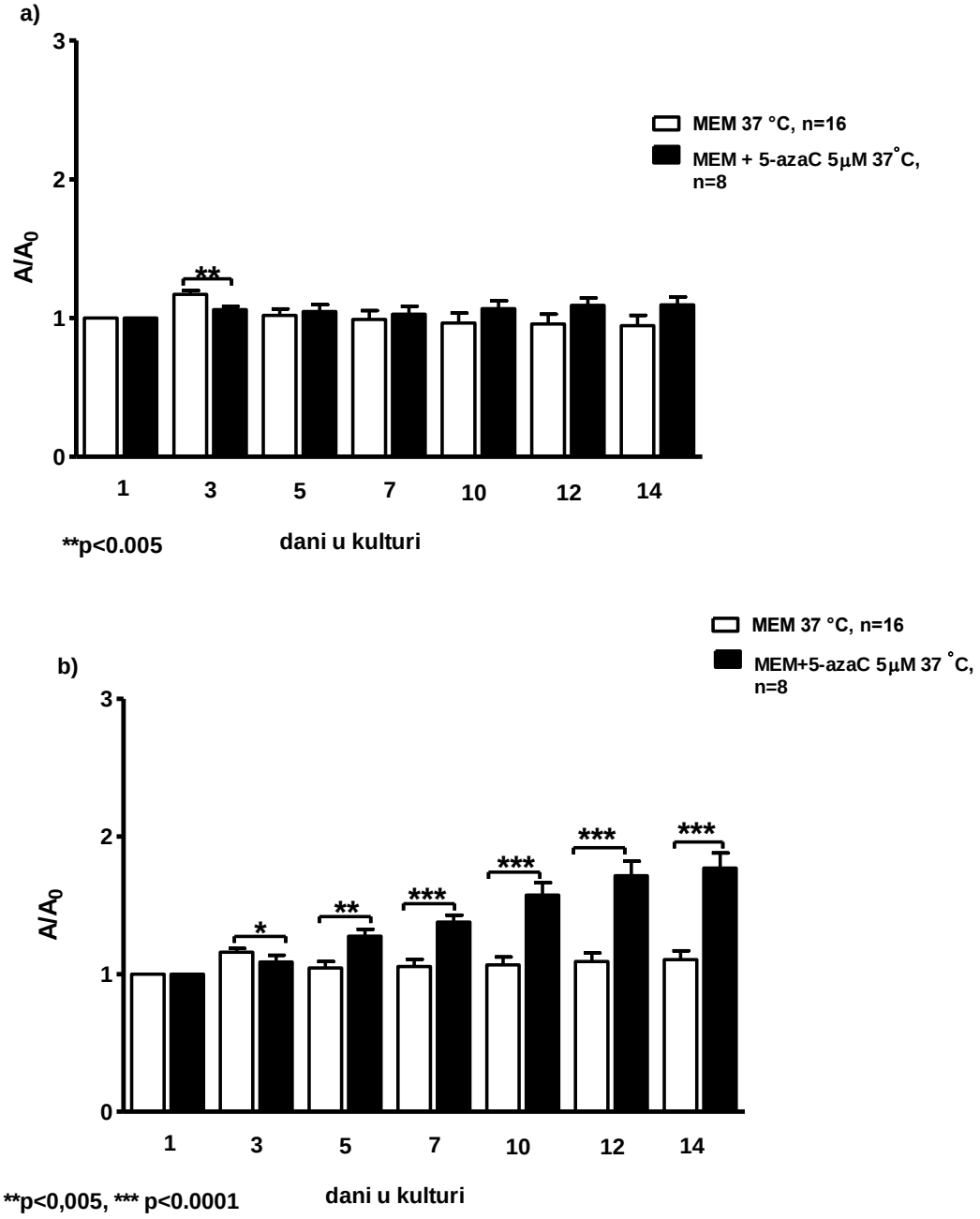
5.2.1.1.2. 5-azacitidin u kulturi bez seruma

Eksplantatima pupoljaka udova kultiviranima u kemijski definiranom mediju bez seruma na početku kulture dodano je 5 µM 5-azacitidina. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje veličine prednjih i stražnjih eksplantata nakon 3 dana kulture (Slika 5.). Ovaj negativan utjecaj na rast izraženiji je kod prednjih ($p<0.05$), nego kod stražnjih ($p<0.05$) eksplantata, slično kao u uvjetima sa 5-azacitidinom u serumu. No izostanak seruma ovdje je bolje iskristalizirao utjecaj 5-azacitidina, jer u kulturama stražnjih eksplantata u serumu sa 5-azacitidinom nije bilo značajnog smanjenja rasta, a i kod prednjih statistička značajnost je bila manja.

Nakon dugotrajnog kultiviranja, opaženo je da nakon početnog smanjenja u rastu, od 5. dana pa do kraja kulture i prednji i stražnji eksplantati tretirani 5-azacitidinom rastu bolje od kontrolnih. Statistički značajna razlika pokazana je ipak samo kod stražnjih ($p<0.0001$) eksplantata (Slika 6.).



Slika 5. Rast eksplantata 14 dana starih štakorskih zametaka u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u mediju bez seruma kojemu je dodano 5 μM 5-azacitidina. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



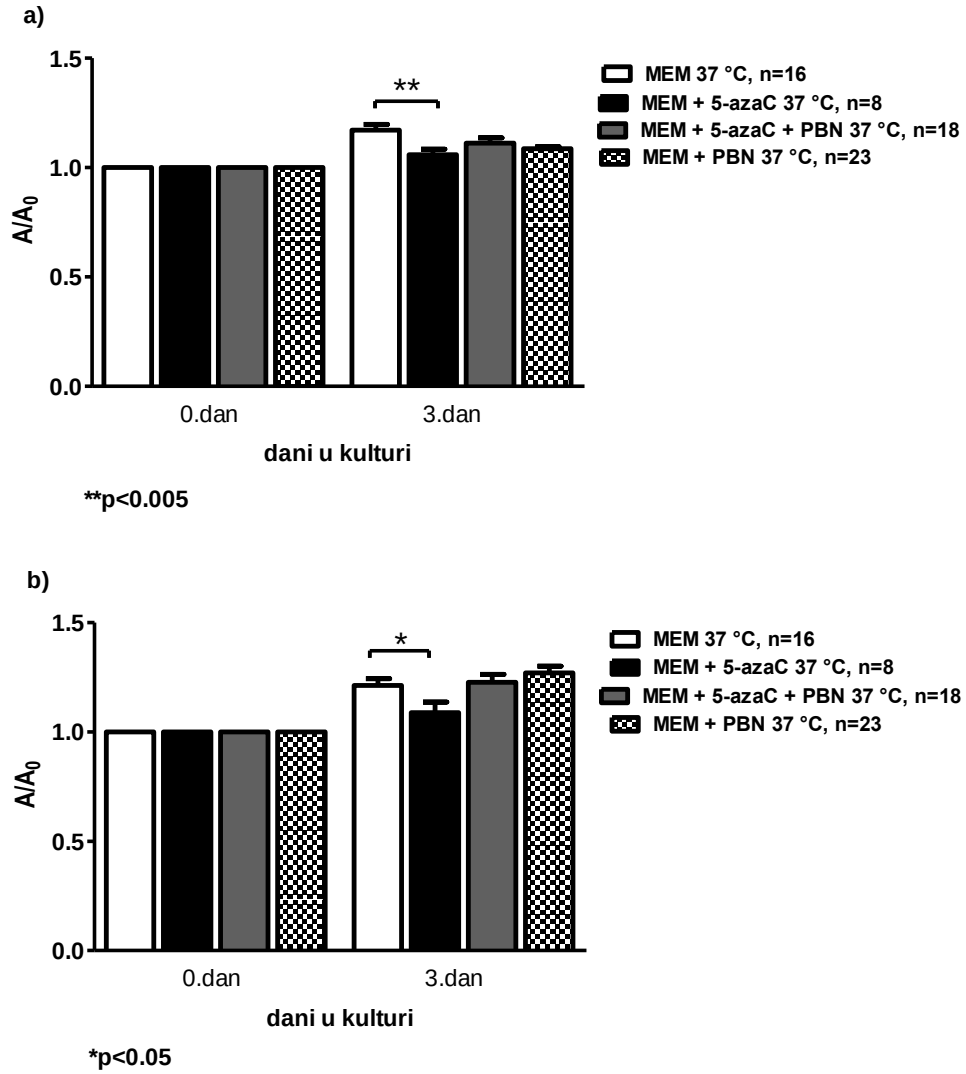
Slika 6. Rast eksplantata u dvotjednoj kulturi *ex vivo* u mediju bez seruma kojemu je dodano 5 μM 5-azacitidina. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.1.1.3. 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma

U ovom radu istraživan je također i učinak antioksidansa N-*tert*-fenilbutilnitrona (PBN) na razvoj pupoljaka udova *in vitro*. Za PBN je pokazano da smanjuje

negativan učinak 5-azacitidina na razvoj cijelog zametka (gastrulacije) u kulturi bez seruma (Sobočan, 2009), te smo istražili njegov učinak na 5-azacitidinom tretiranu skupinu prednjih i stražnjih eksplantata tijekom 3 dana.

Prednji i stražnji eksplantati ovdje su kultivirani u 3 zasebna eksperimentalna medija. U prvoj skupini je u MEM dodano 5 μM 5-azacitidina, u drugoj 5 μM 5-azacitidina i 22,6 μM PBN-a dok je treća skupina kultivirana u MEM-u uz dodatak 22,6 μM PBN-a.



Slika 7. Rast prednjih i stražnjih eksplantata u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u mediju bez seruma kojemu je dodano 5 μM 5-azacitidina, te 22,6 μM PBN-a. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. ANOVA.

Rezultati mjerenja rasta pokazuju da su i 5-azacitidinom tretirani prednji i stražnji eksplantati kojima je bio dodan još i PBN u medij rasli bolje od onih tretiranih 5-azacitidinom iako to nije bilo statistički značajno (Slika 7.). Međutim, 5-azacitidinom I PBN-om tretirani eksplantati nisu pokazivali statistički značajno zaostajanje u rastu u odnosu na kontrolne eksplantate, kao što je bio slučaj kod tretmana samo sa 5-azaC.

5.2.1.2. TRIHOSTATIN A

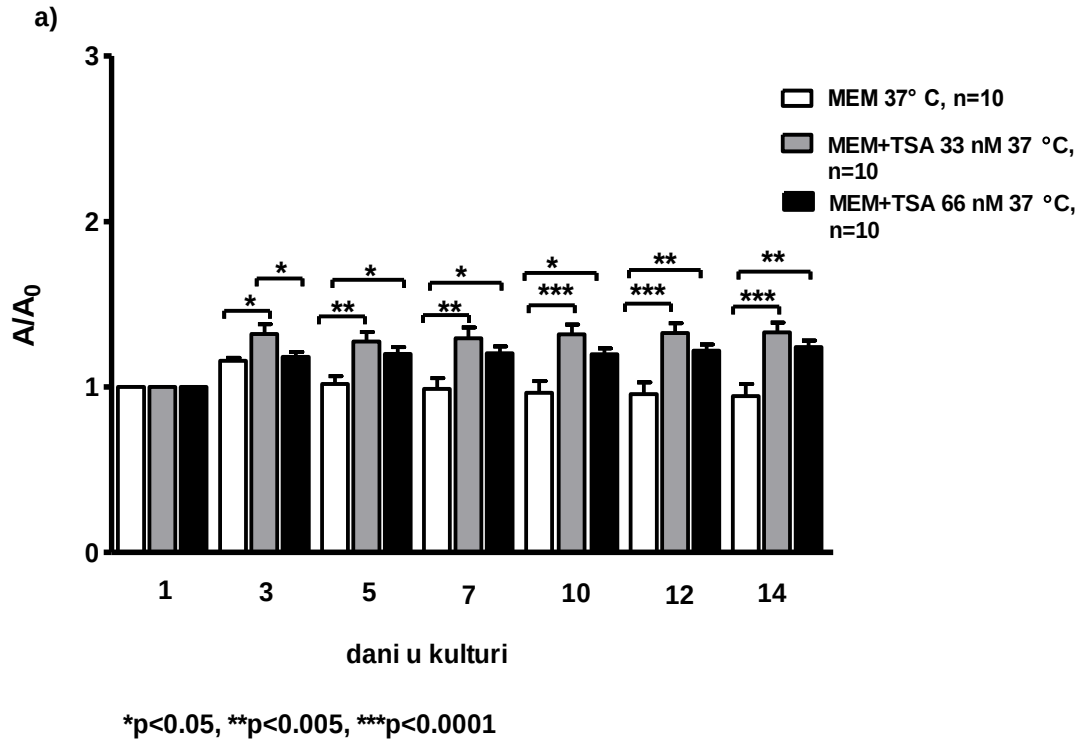
U eksperimentima s trihostatinom A kultivirani su prednji i stražnji pupoljci udova izolirani iz zametaka 14. dan gestacije. Kultura je trajala dva tjedna, a prilikom svake promjene medija, u MEM je dodan trihostatin A.

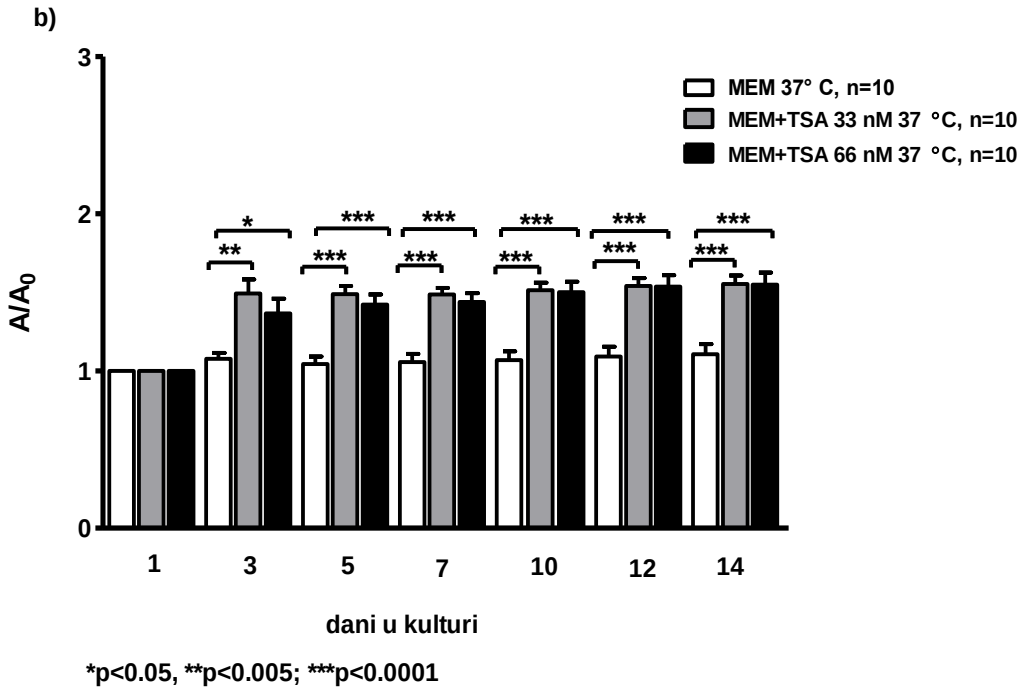
Napravljena su dva eksperimenta gdje su korištene dvije koncentracije trihostatina A zasebno: 33 nM, odnosno 66 nM. Kao kontrola služili su nam pupoljci udova kultivirani samo u MEM-u.

5.2.1.2.1 Rast eksplantata udova u kulturi bez seruma sa trihostatinom A

Rezultati dobiveni izračunom površine eksplantata iz najmanje 2 odvojena eksperimenta gdje je primijenjen tretman sa trihostatinom A u određenoj koncentraciji kroz dva tjedna pokazali su da prednji i stražnji pupoljci udova iskazuju različit odgovor na tretman (Slika 8.). Prednji eksplantati tretirani trihostatinom A u obje koncentracije značajno su veći od kontrolnih tijekom dva tjedna kulture (Slika 8a.). Razlika je najmanja 3. dana ($p<0.05$), a potom se povećava ($p<0.0001$). Isto tako, prednji eksplantati su veći kod koncentracije 33 nM trihostatina A u usporedbi s onima kod 66 nM, no statistički značajna razlika pokazana je samo 3. dana kulture.

Stražnji pupoljci udova pak pokazuju bolji odgovor na dodatak trihostatina A u medij (Slika 8b.). Naime, tijekom cijele kulture tretirani eksplantati bili su statistički značajno veći od kontrolnih kod obje koncentracije trihostatina A. Kao i kod prednjih, razlika je najmanja 3. dana ($p<0.05$), a potom se povećava ($p<0.0001$).





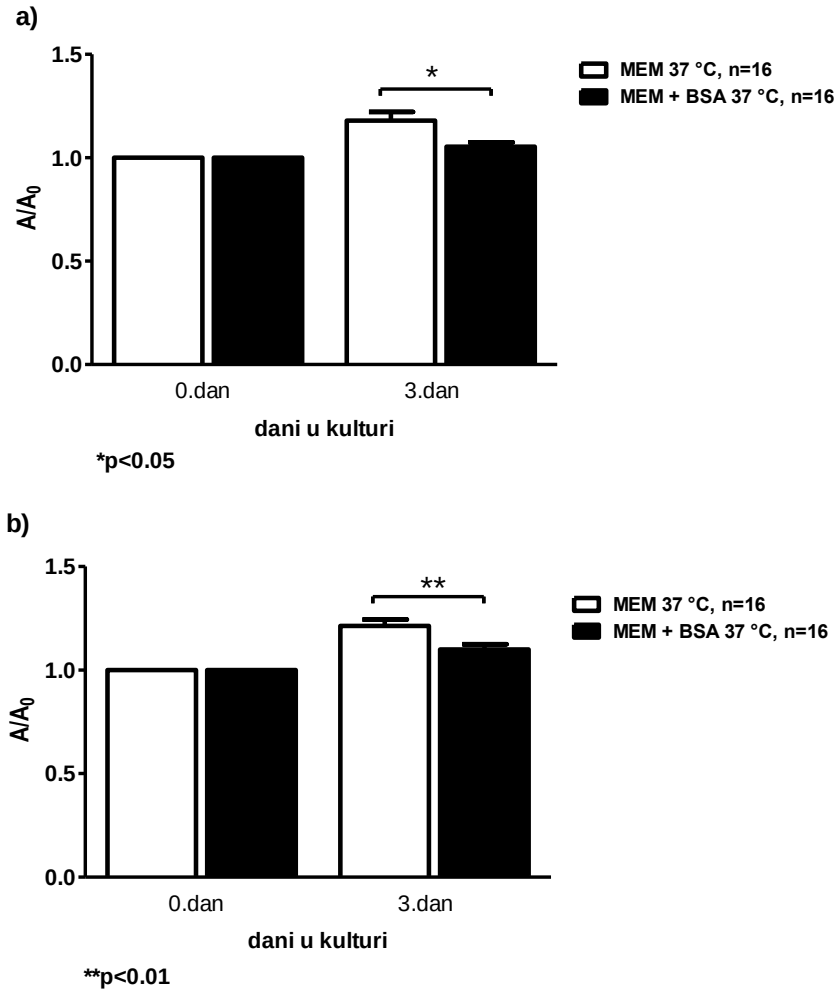
Slika 8. Rast eksplantata u kulturi *ex vivo* s trihostatinom A dodanim u MEM u koncentracijama 33 nM i 66 nM. Kontrolni eksplantati kultivirani su u MEM-u. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. ANOVA.

5.2.1.3. BSA U KULTURI BEZ SERUMA

Da bismo pomnije istražili utjecaj pojedinih komponenti seruma u kulturama bez seruma i pokušali stvoriti optimalni model kultivacije u definiranom mediju napravljeni su eksperimenti kultiviranja eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih zametaka u MEM-u sa dodatkom BSA kao jedinog proteina. Eksplantati su kultivirani 3 dana. Kontrolni eksplantati kultivirani su samo u MEM-u.

5.2.1.3.1. Rast eksplantata u kulturi sa BSA

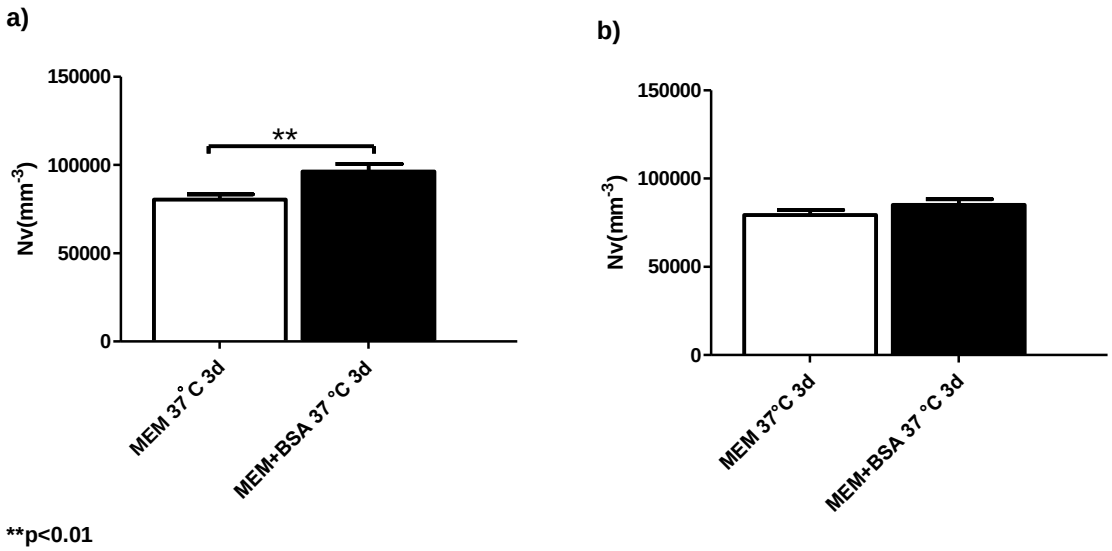
Analiza eksplantata ukazuje da dodatak BSA u medij nakon 3 dana kulture uzrokuje statistički značajno smanjenje rasta prednjih ($p<0.05$) i stražnjih ($p<0.01$) eksplantata gdje je smanjenje značajnije u slučaju stražnjih udova (Slika 9.)



Slika 9. Rast eksplantata kultiviranih 3 dana u mediju bez seruma, sa dodatkom BSA na 37 °C. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.1.3.2. Ekspresija PCNA u kulturi sa BSA

U eksperimentima gdje je praćen utjecaj dodatka BSA u medij, analizirana je i proliferativna aktivnost stanice u eksplantatima nakon 3 dana kultiviranja u mediju sa BSA (Slika 10.). Pokazalo se da je i u prednjim i stražnjim eksplantatima numerička gustoća PCNA-obilježenih stanica čak veća u tretiranom tkivu, sa statističkom značajnošću samo kod prednjih ($p<0.01$).



Slika 10. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima nakon 3 dana kulture u mediju sa dodatkom BSA. a) prednji eksplantati; b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.1.4. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA NORMOTERMIJI

Eksplantati 13 i 14 dana starih zametaka štakora analizirani su klasičnom svjetlosnom mikroskopijom i imunohistokemijskim bojanjem na ekspresiju signala PCNA (proliferacijska sposobnost stanica). U kratkotrajnoj kulturi od tri dana kultivirani su 14 dana stari pupoljci udova u osnovnim medijima (kemijski definirani mediji MEM i MEM s dodatkom 4 mg/ml BSA, te MEM sa štakorskim serumom u omjeru 1:1). U dužoj dvotjednoj kulturi eksplantati su tretirani s 33 nM TSA u MEM-u i 5-azaC (koncentracije 5 μM u MEM-u i 30 μM u mediju sa serumom) sa i bez dodatka 22,6 μM PBN u MEM-u. Pupoljci udova 13 dana starih zametaka kultivirani

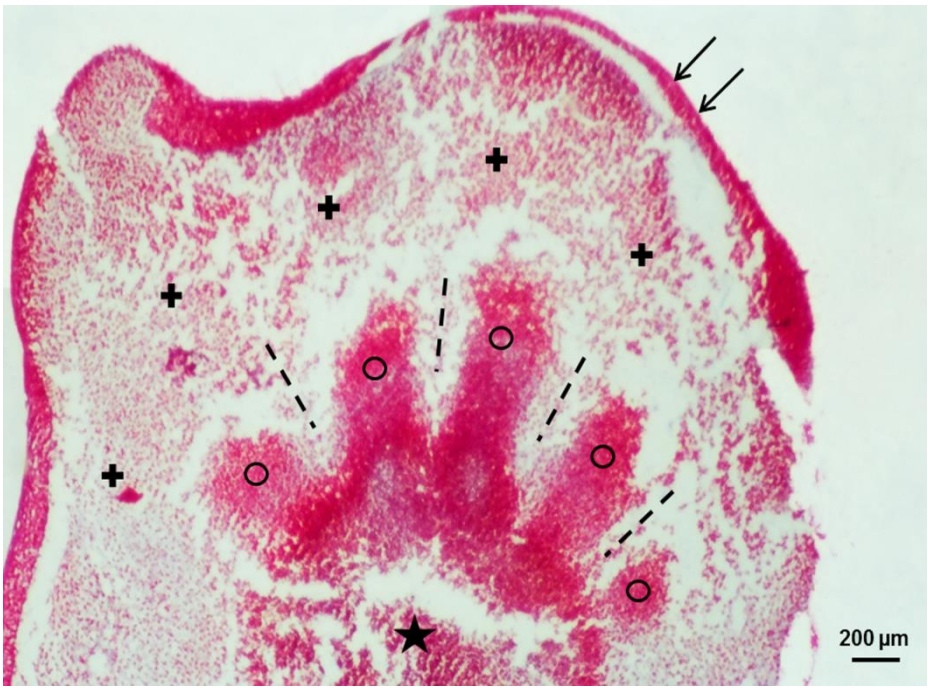
su u dvotjednoj kulturi bez seruma i u mediju sa serumom, bez i sa dodatkom 30 μM 5-azaC.

Eksplantati u dvotjednoj kulturi prate organizaciju tkiva i morfogenezu pupoljka uda sličnu onoj *in vivo*. Zadržana je morfologija pupolja uda elipsoidne forme, bez tipične razlike u vršnome dijelu za prednje i stražnje pupoljke uda. Karakteristično za razvoj pupoljka uda *in vivo* i u *in vitro* uvjetima smjer diferencijacije mezenhima započinje proksimalno u bazi pupoljka uda i nastavlja se prema distalno u smjeru vrška pupoljka uda (Slika 11.). U bazi pupoljka uda otkrivene su veće osnove hrskavice koje se preko centralne zone propadanja nastavljaju u zrakasta zgusnuća mezenhima u vršnom dijelu pupoljka uda (Slika 11.) tj. osnovama budućih prstiju (ukupno 5). Osnove hrskavice okružuje perihondrij. Sukladno razvoju *in vivo* (vidi Uvod), i ovdje su nađene brojne mišićne stanice (miotube) paralelno uz hrskavične osnove budućih dugih kostiju, odnosno u tankom području rahlog mezenhima (subepitelni mezenhim) koje ograničava perihondrij s jedne strane i bazalni sloj epitela s druge stane na bazi pupoljka uda (nije prikazano). U mediju sa serumom u hrskavici se jasno razlikuju zone perifernog apozicijskog i centralnog intersticijskog rasta (više hondrocita unutar lakune čini izogenu grupu), te se otkrivaju mjesta stvaranja budućih osnova zglobova (Slika 12.) u kojima će nastupiti apoptoza hondrocita. Započeta je hondrifikacija zrakastih zgusnuća mezenhima budućih osnova kostiju prstiju, koja je vidljiva i u pokusu sa eksplantatima kultiviranim u MEM-u s dodatkom antioksidansa (PBN). U svim pokusima eksplantati su s vanjske strane prekriveni orožnjelim mnogoslojnim pločastim epitelom. Na prikazanom tangencijalnom rezu jasno se vidi *stratum granulosum* na mjestima koja odgovaraju debljoj koži (Slika 13.). Nad područjima budućih interdigitalnih regija tj. između dvaju zrakastih zgusnuća mezenhima, u epitelu su vidljivi invaginirani epitelni tračci (Slika 14.). Opisana diferencijacija u kulturama sa serumom slična je kasnom stadiju razvoja pupoljka uda i otprilike se podudara s periodom između 14. i 15. dana razvoja *in vivo*. U pokusima s metabolički siromašnijim medijem (MEM) razvoj je slabiji. Naime, otkrivene su manje osnove hrskavice u bazi, javlja se tek po koja miotuba i rijetko orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel, a posvuda se vide brojne piknotičke jezgre koje upućuju na propadanje eksplantata. Opisano naliči ranom stadiju razvoja pupoljka uda između 13.i 14. dana razvoja *in vivo*. Stražnji pupoljci udova čini se da zaostaju u stupnju razvoja za prednjima.

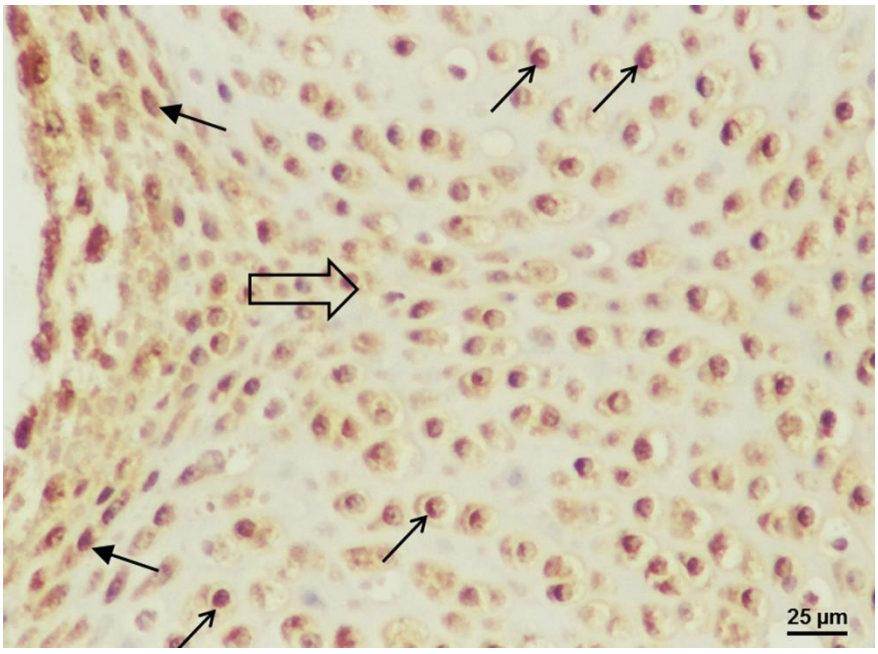
Dodatak 33nM TSA u dvotjednoj kulturi u MEM-u omogućio je inicijalnu diferencijaciju, jer se na bazi pupoljka uda otkiva manja buduća osnova nezrelije hrskavice i dvo- do troslojni epitel koji pokriva eksplantat, što je slično ranom stadiju razvoja *in vivo*. Međutim, do kraja kulture nastupila je generalizirana nekroza sa dominirajućom centralnom zonom propadanja.

U komparaciji dužih dvotjednih kultura sa kraćim trodnevnim u osnovnim medijima, vidljivo je da se već nakon 3 dana kulture diferencira manja hrskavična osnova s perihondrijem, orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel i nešto mišićnih stanica (miotube). Nešto apoptotičkih jezgara otkriveno je u subepitelnom mezenhimu. Za razliku od dvotjednih kultura u kojima su elementi vaskulogenze rijetko nađeni, a što se poklapa sa našim prethodnim rezultatima (Mužić i sur., 2013), u trodnevnim kulturama otkrivene su krvne kapilare i elementi kao i u tek izoliranim pupoljcima udova (vidi 5.1.). U mediju bez seruma opisana diferencijacija čini za nešto slabija jer se javlja začetak hondrifikacije mezenhima s dominacijom nediferenciranog mezenhima, a razvijeni epitel je većinom nezreo iako se javlja i mnogoslojni pločasti epitel.

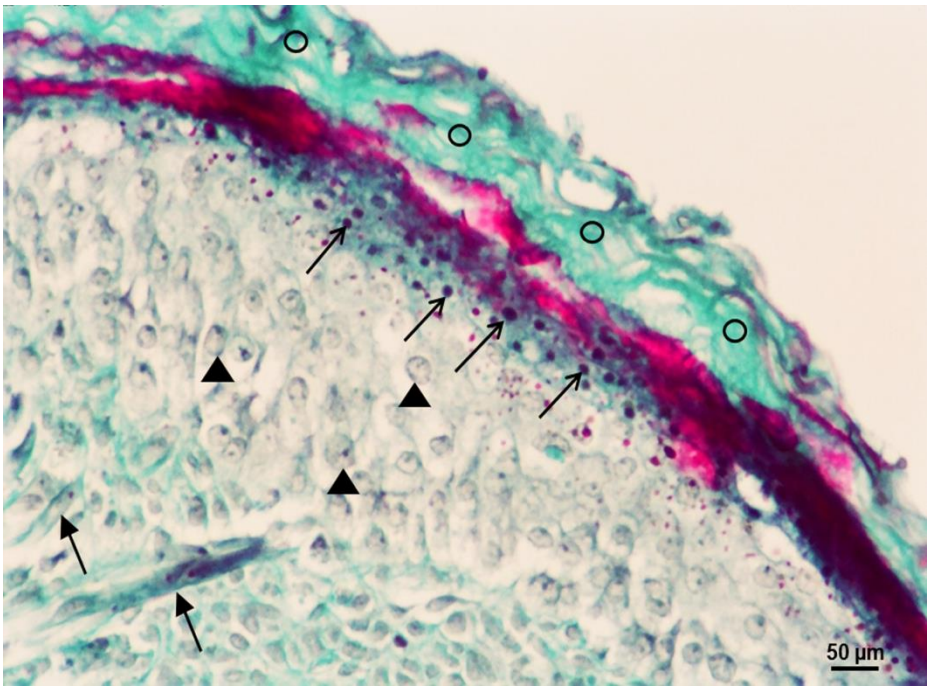
Pozitivni PCNA signal detektiran je u svim pokusima u smeđe obojanim jezgrama (Slika 13. i 14.) hrskavičnog tkiva i okolnog perihondrija, u bazalnom sloju orožnjelog mnogoslojnog pločastoj epitela, mišićnim stanicama i po kojoj stanici mezenhima u bazi pupoljka uda. Prednji pupoljci udova čini se imaju nešto gušću ekspresiju PCNA u odnosu na stražnje. Plave jezgre (obojane hemalaunom) koristili smo za negativnu internu kontrolu.



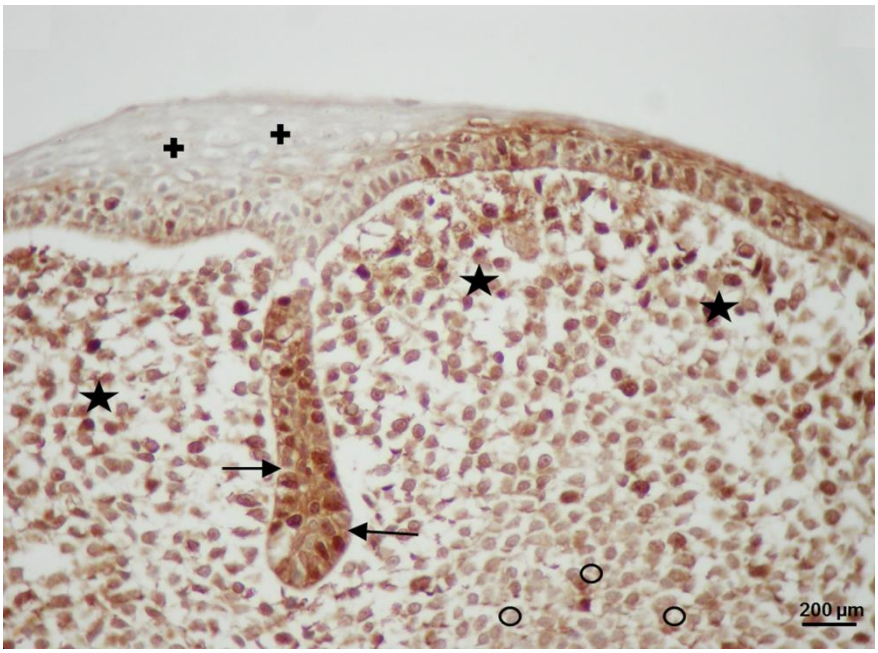
Slika 11. Zrakaste osnove budućih prstiju (○) u vršku prednjeg pupoljka uda 13 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* u serumu na normotermiji kroz 14 dana (kontrola sa serumom). Azan, x40. - - - = interdigitalna regija; ⟶ = epitel; ★ = centralna zona propadanja; ✚ = mezenhim.



Slika 12. Ekspresija PCNA u prednjem pupoljku uda 13 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* u serumu na normotermiji kroz 14 dana. DAB, kontrastirano hemalaunom, x400. ⟶ = PCNA pozitivan signal u stanici mezenhima; ⟶ = PCNA pozitivan signal u hondrocitu; ⇨ = smjer stvaranja osnove budućeg interfalangealnog zgloba.



Slika 13. Stratum granulosum (⟶) orožnjelog epitela u stražnjem pupoljku uda 13 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* u serumu na normotermiji kroz 14 dana (kontrola sa serumom). Masson, x200. ○ = roževina; ⟶ = miotuba; ▲ = stanice mezenhima.



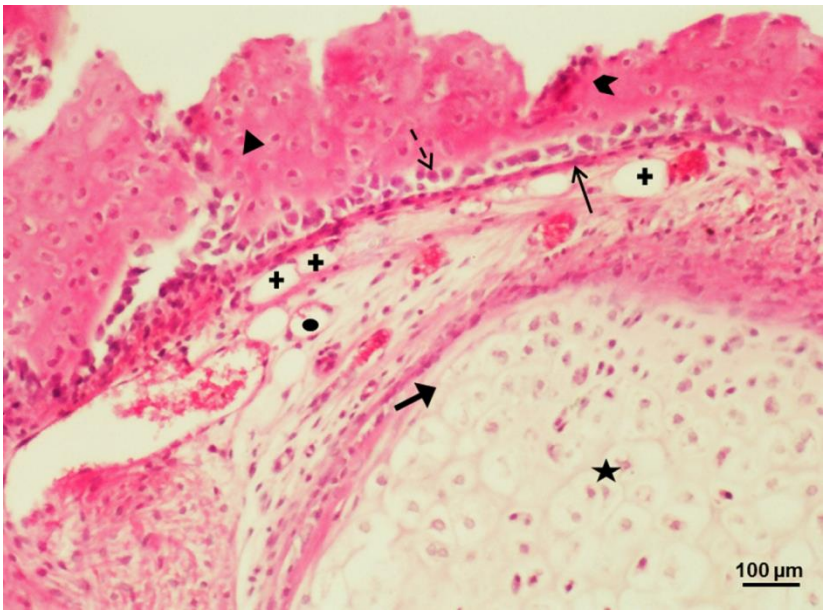
Slika 14. Ekspresija PCNA u prednjem pupoljku uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* s 30 µM 5-azaC u serumu na normotermiji kroz 3 dana. DAB, kontrastirano hemalaunom, x40. ✚= orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel; ★ = subepitelni mezenhim; ⟶ = epitelni tračak; ○ = vrh zrakastog zgusnuća mezenhima.

5.2.1.5. TRANSPLANTACIJA PRETHODNO KULTIVIRANIH PUPOLJAKA UDOVA

Naknadnom transplantacijom pod čahuru bubrega, prethodno *ex vivo* kultiviranih eksplantata pupoljaka udova, istražen je klasičnom svjetlosnom mikroskopijom potencijal za naknadnu diferencijaciju u metabolički optimalnim *in vivo* uvjetima, a analizom imunohistokemijskog bojanja detektirana je ekspresija signala PCNA tj. potencijal za proliferaciju stanica. Analizirani su transplantati prednjih i stražnjih pupoljaka udova iz četiri pokusne skupine prethodno kultiviranih *ex vivo* na normotermiji tj. kontrola bez seruma, kontrola sa serumom, tretirani s 5μM 5-azaC i tretirani kombinacijom 5μM 5-azaC s 22,6 μM PBN-a u mediju bez seruma (MEM).

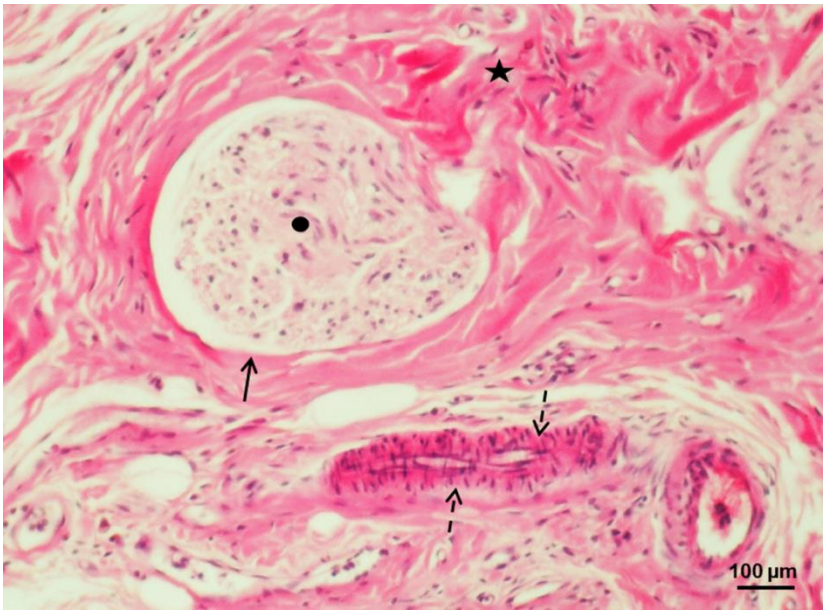
Eksplantati su se pod čahurom bubrega razvili u tvorbe slične teratomima koji nisu zadržali organotipični raspored pupoljka uda u razvoju, ali je diferencijacija napredovala. Diferencirala se kost i derivati kože što se nikad nije primijetilo u kulturi.

U transplantatima svih pokusnih skupina nađena je hrskavica i enhodralno okoštavanje (Slike 15., 16. i 19.) s tipičnim zonama, razvijenom pokosnicom (stratum fibrosum i stratum germinativum), mineralizacijom međustanične tvari, te jasno vidljivim osteoklastima i osteocitima u lakunama (Slika 15.). Također, otkrivena je diferencijacija u zrelo vezivno tkivo, masne stanice, krvne žile (Slika 17.) i koštanu srž (Slika 16. i 20.) u svim pokusnim skupinama. U prednjim pupoljcima udova u kontroli sa serumom otkriveno je i živčano tkivo – snop živčanih vlakana s jasno ograničenim perineurijem (Slika 17.), a u kontroli bez seruma kožni privjesci - folikul dlake i žlijezda lojnica (Slika 18.). Žlijezda lojnica je primjer holokrine žlijezde u koje se sekret izlučuje zajedno sa ostacima stanica, a vidljive matične stanice (Slika 18.) u bazalnom dijelu žlijezde lojnice umnažaju se i nadomještaju propale stanice. U transplantatima s dodatkom PBN, čini se da je nešto zreliji izgled stanica u odnosu na tretirane samo s 5-azaC, ali istog stupnja diferencijacije tkiva.

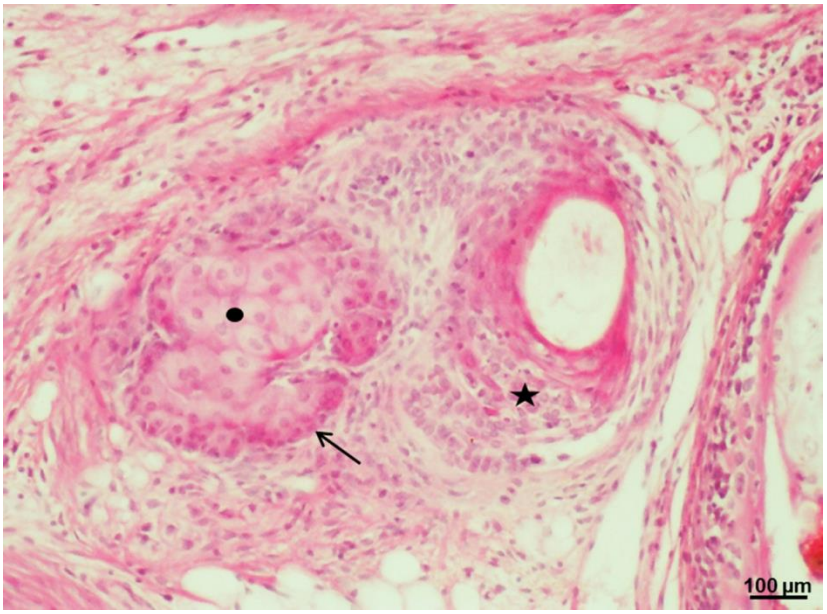


Slika 15. Koštano i hrskavično tkivo u transplantatu stražnjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog u MEM-u na normotermiji (kontrola bez seruma). HE, x100. ▲ = osteocit; ➤ = osteoklast; ⟶ = stratum fibrosum; - - > = stratum germinativum; ➡ = perihondrij; ★ = hondrociti u lakunama; ✚ = masna stanica; ● = kapilara.

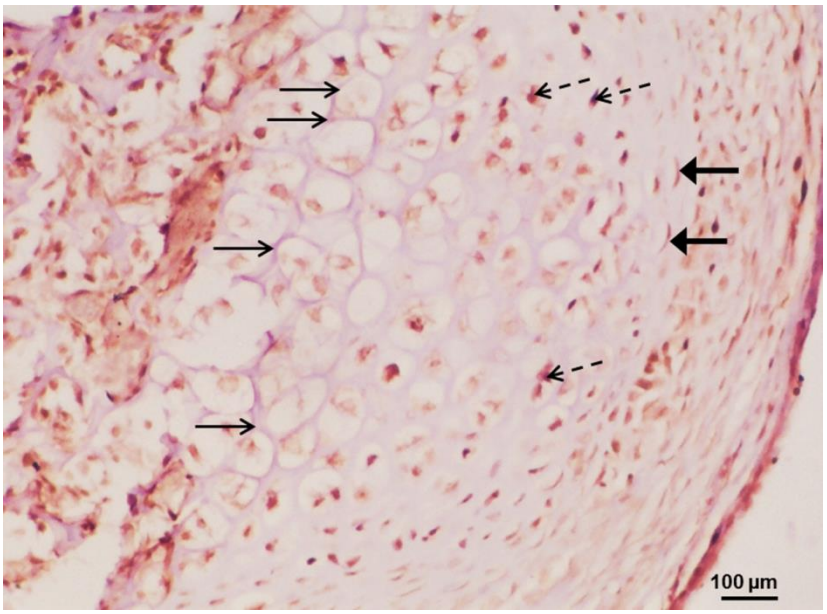
Slika 16. Enhodralno okoštavanje i folikul dlake u transplantatu prednjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog *ex vivo* u MEM-u na normotermiji (kontrola bez seruma). HE, x100. ⟶ = folikul dlake; ● = bulbus dlake; **E** = enhondralno okoštavanje; ✚ = zona mirovanja; ..... = zona umnažanja; ★ = zona hipertrofične hrskavice; ➡ = zona okoštavanja; - - -> = koštana srž.



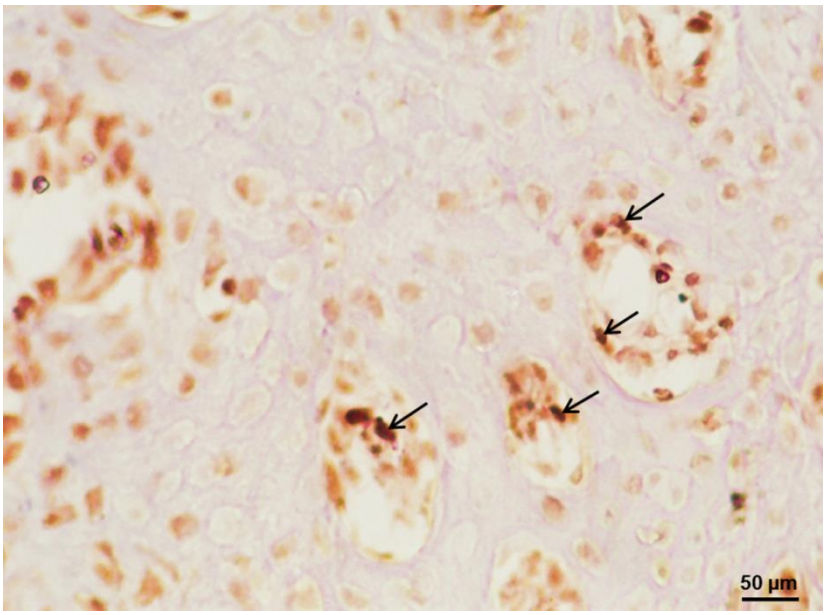
Slika 17. Snop živčanih vlakana, krvne žile i vezivno tkivo u transplantatu prednjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog u MEM-u sa štakorskim serumom *ex vivo* na normotermiji (kontrola sa serumom). HE, x100. ● = snop živčanih vlakana; ⟶ = perineurij; ★ = snopovi kolagenih vlakana; - - → = tangencijalni rez kroz arteriju.



Slika 18. Žlijezda lojnica, folikul dlake i vezivno tkivo u transplantatu prednjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog u MEM-u *ex vivo* na normotermiji (kontrola bez seruma). HE, x100. ★ = folikul dlake; ● = žlijezda lojnica; ⟶ =matične stanice.



Slika 19. Enhondralno okoštavanje i ekspresija PCNA u transplantatu stražnjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog s 5µM 5-azactidinom u MEM-u *ex vivo* na normotermiji. DAB, kontrastirano hemalaunom, x100. → = ekspresija PCNA u zoni mirovanja; - - → = ekspresija PCNA u zoni umnažanja; ⟶ = zona ovapnjele hrskavice.



Slika 20. Ekspresija PCNA u predstadijima krvnih stanica koštane srži (⟶) u transplantatu stražnjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka prethodno kultiviranog *ex vivo* s 5µM 5-azacitidinom u MEM-u na normotermiji. DAB, kontrastirano hemalaunom, x200.

U pojedinim stanicama hrskavice, periosta, koštane srži, endotela krvnih žila, bulbusu folikula dlake i vezivu otkrivena je ekspresija PCNA (Slike 19. i 20.) u obliku smeđeg obojenja jezgre, a jezgre negativne na PCNA bile su plave boje (hemalaunski kontrast) što je poslužilo kao negativna interna kontrola. Ekspresija PCNA u stražnjim pupoljcima udova bila je čini se nešto slabija u vezivu i pojačana u hondrocitima u kontroli bez seruma. U skupini s 5-azaC najjači je signal bio u koštanoj srži, a u stražnjim udovima su hondrociti imali izraženiju ekspresiju PCNA u odnosu na prednje. Dodatak antioksidansa PBN-a, čini se, pojačao je signal PCNA samo u stanicama veziva.

5.2.2. HIPOTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI

U ovom radu po prvi puta je istražen utjecaj dugotrajne hipotermije u kulturi pupoljaka udova štakora. Eksplantirani prednji i stražnji pupoljci udova štakorskog zametka starog 14 dana kultivirani su dva tjedna u inkubatoru koji je kalibriran na temperaturu od 31 ºC, dok su kontrolni eksplantati kultivirani na 37 ºC. U kombinaciji sa hipotermijom, prednji i stražnji eksplantati kultivirani su u MEM-u sa 50% štakorskog seruma (MEM+serum) ili samo u MEM-u.

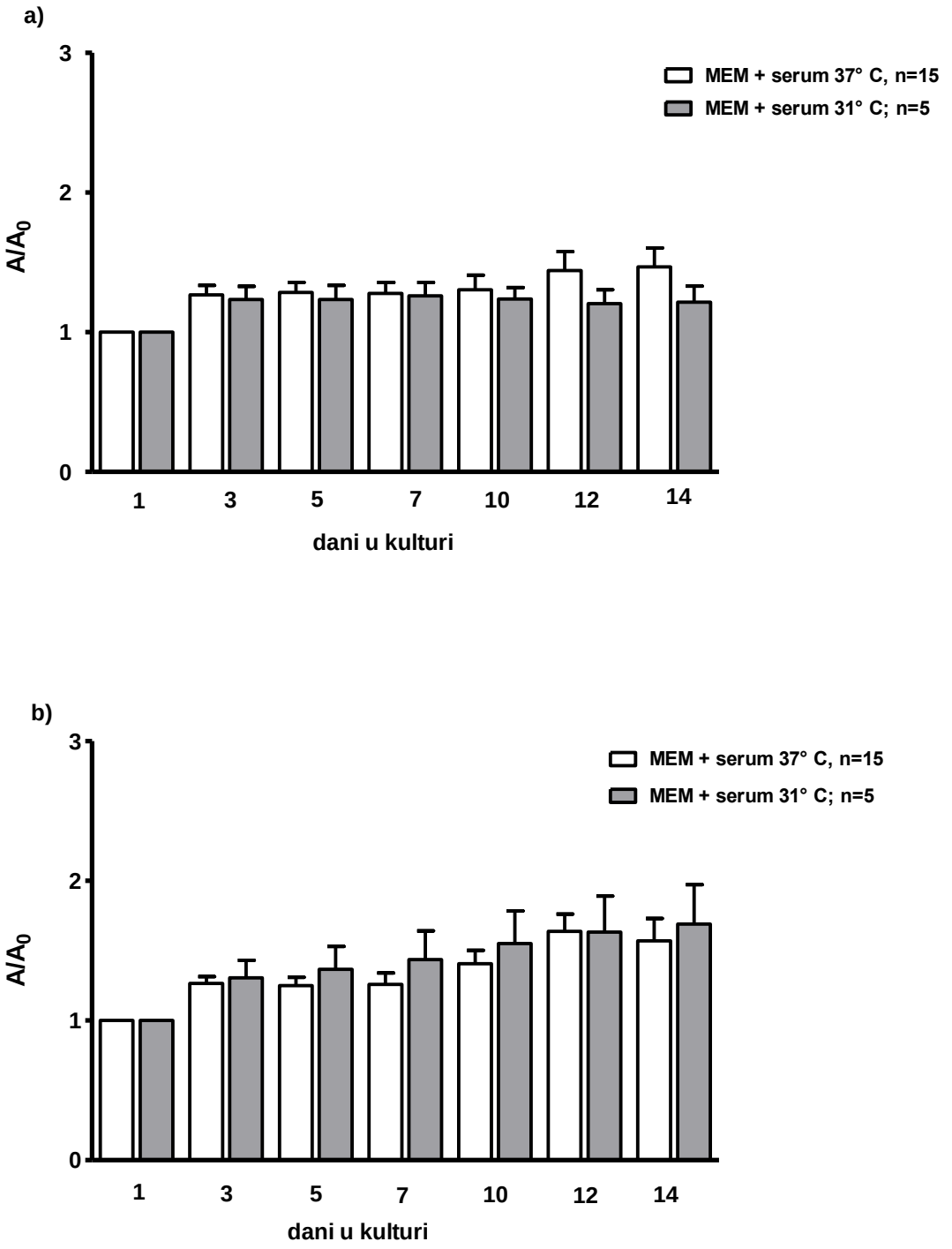
5.2.2.1. HIPOTERMIJA U KULTURI SA SERUMOM I BEZ SERUMA

5.2.2.1.1. Rast eksplantata udova u uvjetima dugotrajne hipotermije

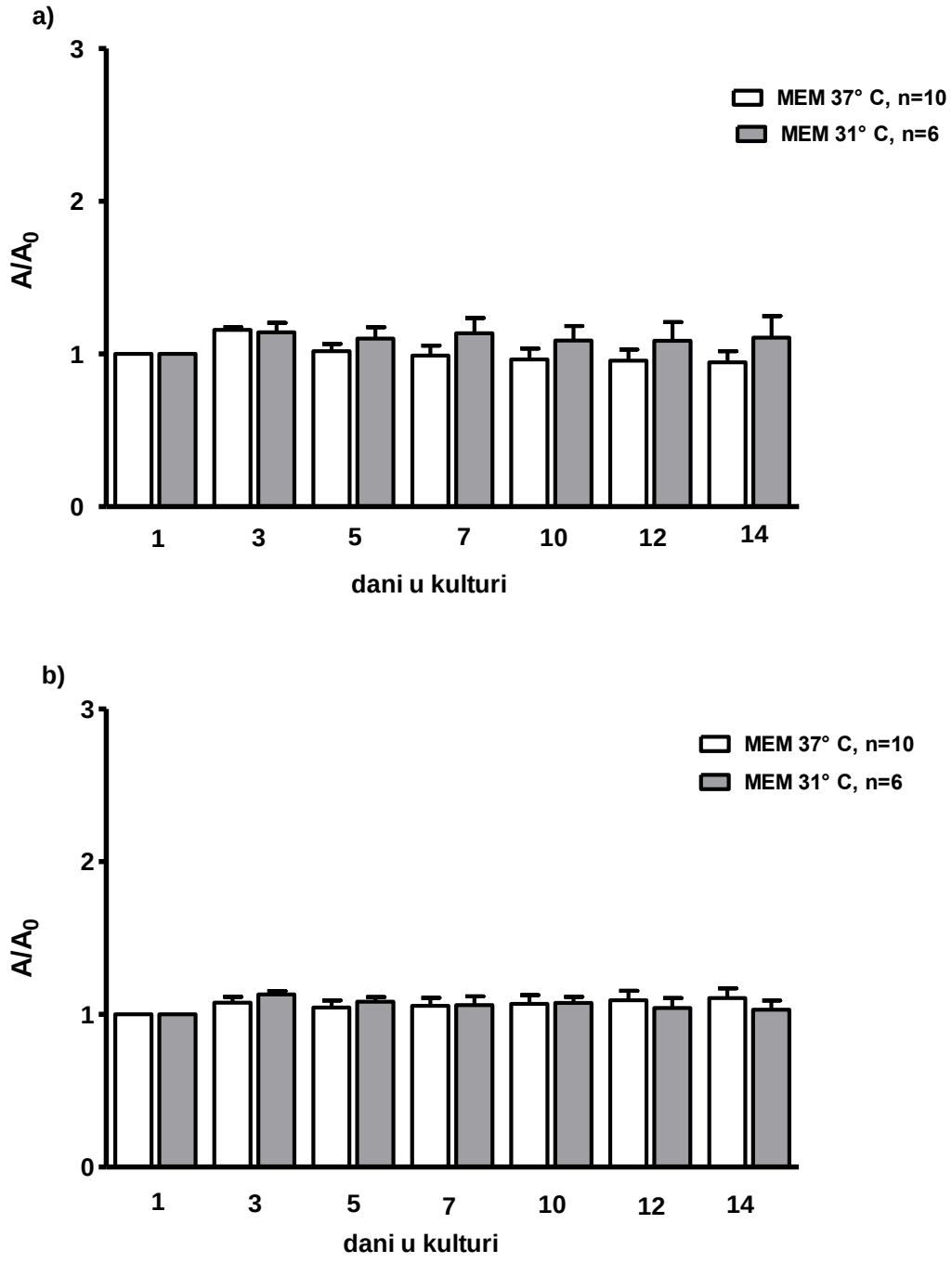
Dugotrajna hipotermija imala je različit utjecaj na prednje i stražnje eksplantate (Slika 21.). U uvjetima gdje je u medij dodan serum, prednji i stražnji eksplantati od nultog do 3. dana kulture rastu kultivirani bilo na normotermiji bilo na hipotermiji (37 ºC, odnosno 31 ºC).

Kasnije tijekom kulture prednji eksplantati koji su rasli na 31 ºC se čine manji, a stražnji eksplantati na 31 ºC veći od kontrolnih, no statistička analiza ne daje značajnost ovih razlika (Slika 21.).

U uvjetima bez seruma (Slika 22.) eksplantati prednjih i stražnjih udova očekivano su manji od onih u serumu, iako nikakva značajna razlika nije otkrivene u njihovu rastu tijekom dva tjedna kulture.



Slika 21. Usporedba rasta eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranih u mediju sa serumom na 37 °C i na 31 °C. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 22. Usporedba rasta eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranih u MEM-u na 37 °C i na 31 °C. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.2.1.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima u uvjetima dugotrajne hipotermije

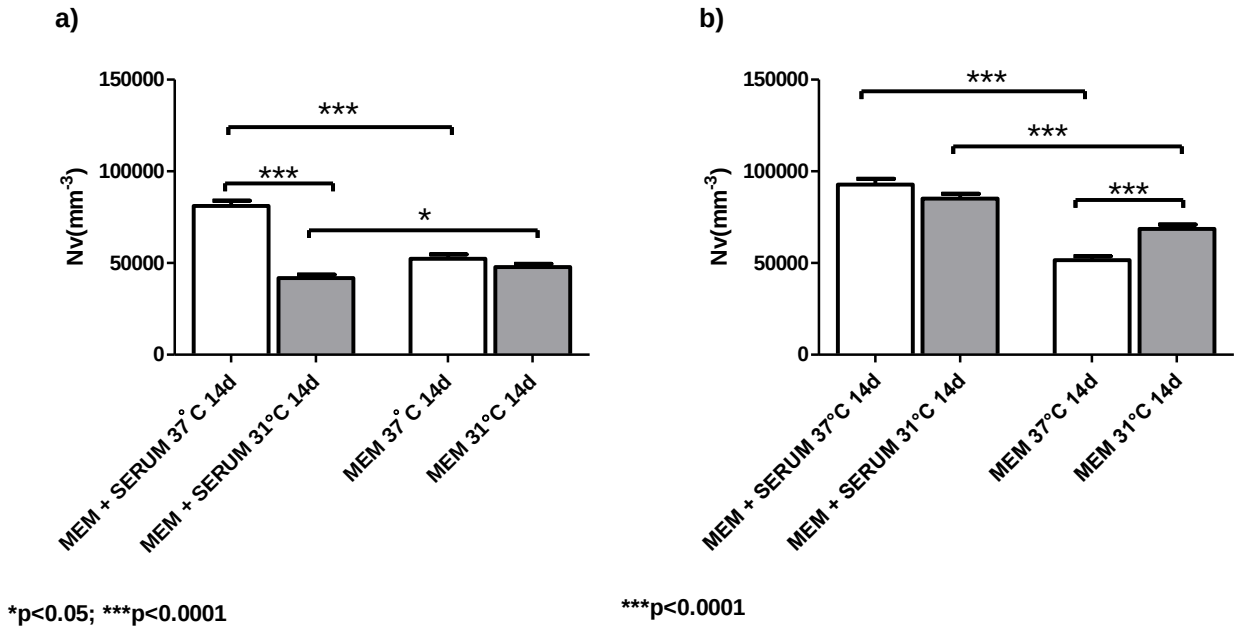
U ovom radu po prvi puta je istražena proliferacija stanica u tkivima eksplantata pupoljaka udova tretiranih hipotermijom. Rezultati su slikovno prikazani i objedinjuju eksplantate kultivirane u mediju sa serumom i mediju bez seruma (Slika 23.).

Prednji i stražnji pupoljci udova pokazuju različitost u proliferativnoj aktivnosti stanice kod tretmana hipotermijom nakon dva tjedna *ex vivo* kulture, ovisno o mediju u kojem su kultivirani. U kulturama sa serumom, numerička gustoća (Nv) PCNA pozitivnih stanica značajno je smanjena u prednjim eksplantatima koji su rasli na 31 ºC u odnosu na kontrolu kultiviranu na 37 ºC, dok su stražnji eksplantati također nešto manji, no statistički neznačajno (Slika 23.).

U kulturama bez seruma situacija je pak obrnuta. Prednji eksplantati koji su rasli na 31 ºC imaju neznačajno manju numeričku gustoću (Nv) proliferativnog biljega PCNA u odnosu na one kultivirane na 37 ºC, dok je kod stražnjih gustoća PCNA signala čak značajno veća nego u kontroli kultiviranoj u MEM-u na 37 ºC.

Ako analiziramo utjecaj seruma na temperaturi od 37 ºC, numerička gustoća proliferativnog biljega PCNA ovisi o dodatku seruma, jer je i u prednjim i stražnjim eksplantatima uglavnom značajno veća kod kultiviranja u mediju sa serumom.

No ako uspoređujemo eksplantate na temperaturi od 31 ºC, ovaj utjecaj seruma na proliferaciju je ponešto promijenjen. Naime, prednji eksplantati kultivirani u serumu imaju manju numeričku gustoću PCNA od onih kultiviranih na hipotermiji samo u MEM-u (Slika 23a), iako s malom statističkom značajnošću ($p<0.05$). Stražnji pak eksplantati u ovim uvjetima hipotermije pokazuju ovisnost proliferacije o dodatku seruma (Slika 23b), jer je u kulturama na hipotermiji u mediju sa serumom numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica značajno veća nego u kulturama na hipotermiji bez seruma ($p<0.0001$).



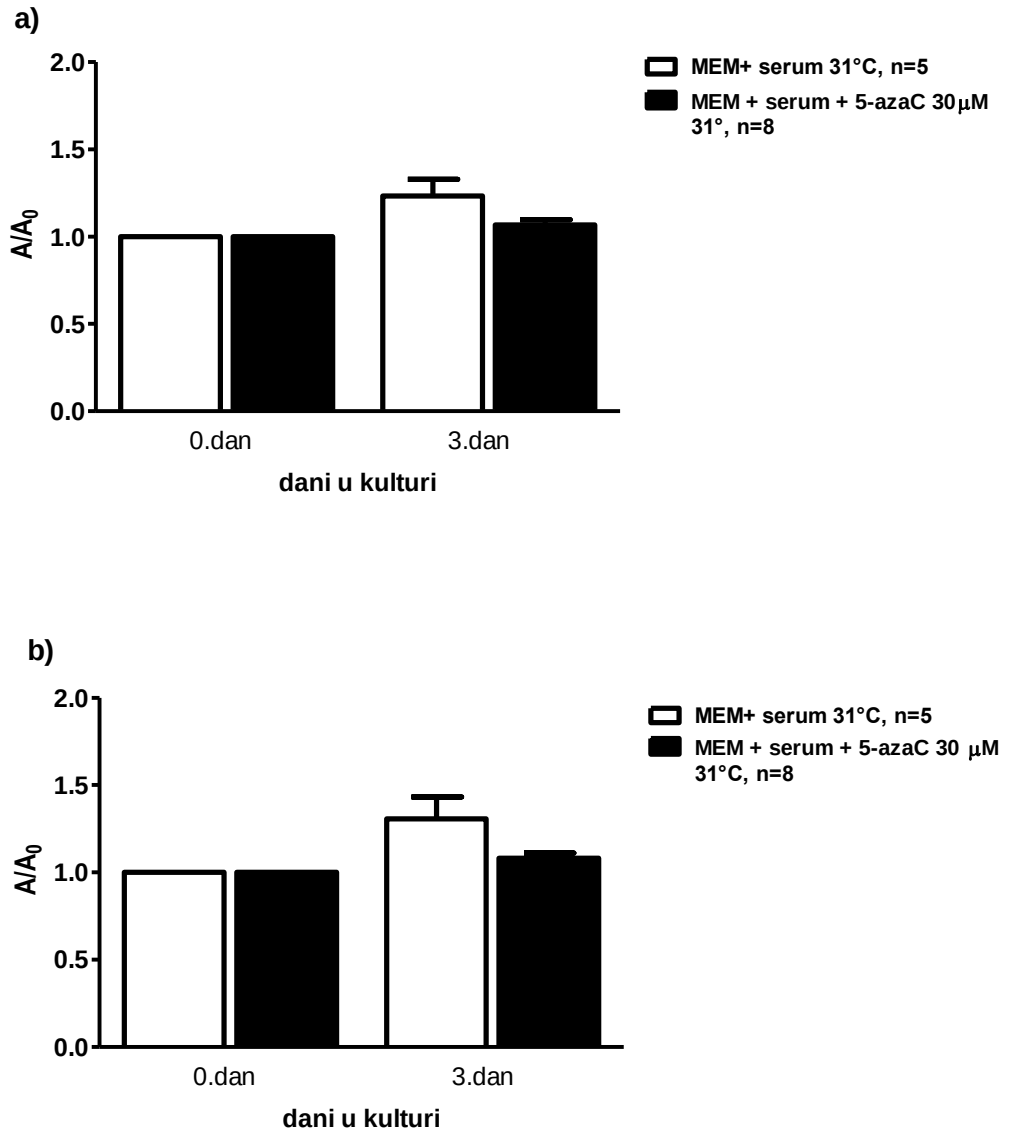
Slika 23. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima14 dana starog štakorskog zametka nakon dva tjedna kulture u mediju sa serumom ili bez seruma, na 37 °C i na 31 °C. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.2.2. HIPOTERMIJA I 5-AZACITIDIN

Hipotermija je primijenjena i u eksperimentima gdje se proučavao utjecaj 5-azacitidina pa su tako eksplantati tretirani sa 5-azacitidinom koji je dodan u koncentracijama 30 μM u mediju sa serumom ili 5 μM u mediju bez seruma, te su eksplantati kultivirani na 31 °C.

5.2.2.2.1. Hipotermija i 5-azacitidin u kulturi sa serumom

Kada su prednji i stražnji eksplantati kultivirani sa 5-azacitidinom i na 31 °C u trodnevnoj kulturi, bili su manji od kontrolnih eksplantata kultiviranih u serumu na 31 °C, no ne značajno (Slika 24.), kao što je prije pokazano kod prednjih udova kad su kultivirani na 37 °C (Slika 3.)

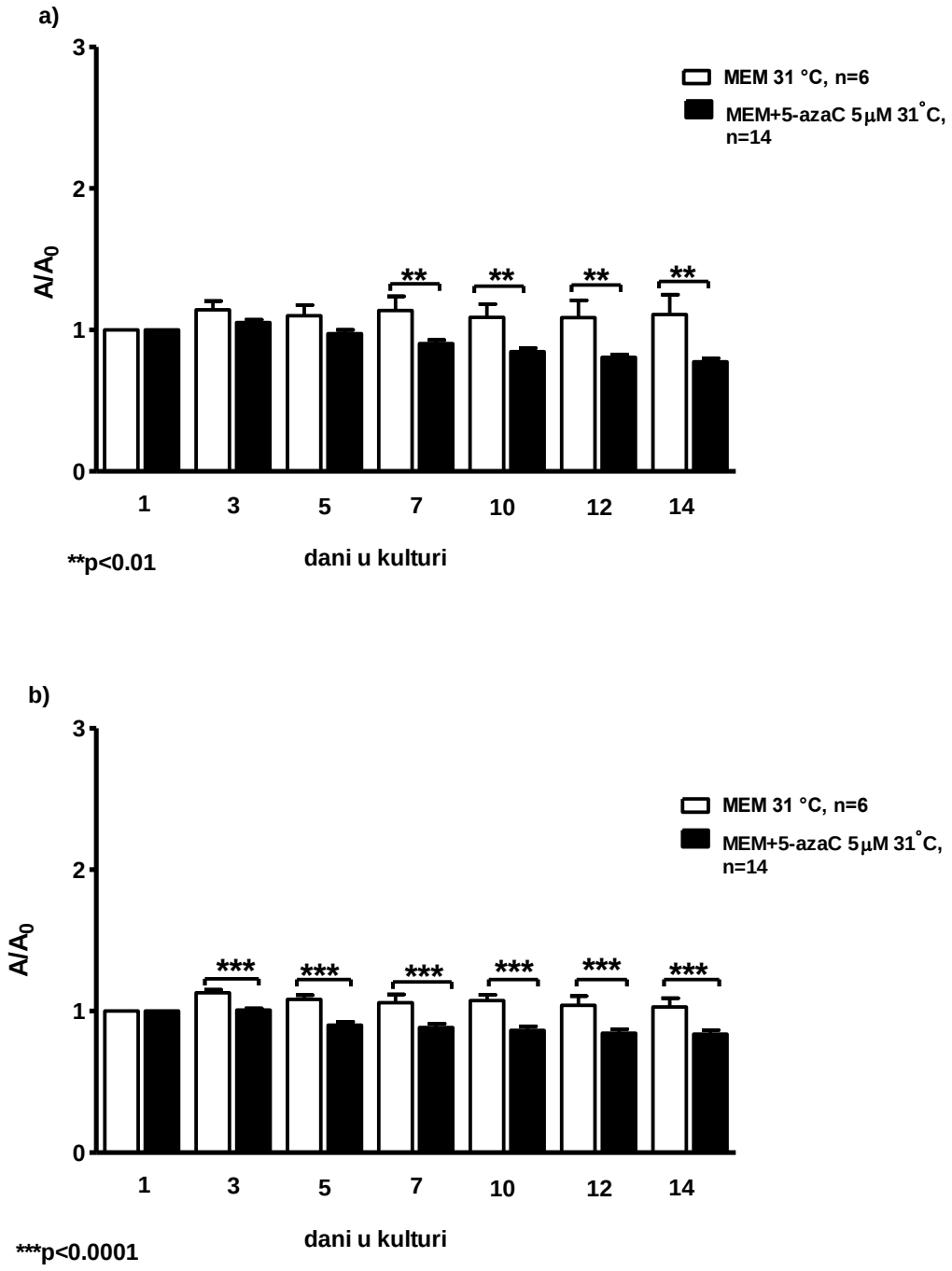


Slika 24. Rast eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranih 3 dana na 31 °C gdje je u medij sa serumom dodano 30 μM 5-azacitidina. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.2.2.2. Hipotermija i 5-azacitidin u kulturi bez seruma

Eksplantati podvrgnuti dugotrajnoj hipotermiji u trajanju od dva tjedna tretirani su sa 5-azacitidinom u dozi od 5 μm u mediju bez seruma. Analiza rasta eksplantata pokazala je da su hipotermijom i 5-azacitidinom tretirani eksplantati bili uvijek manji tijekom cijele kulture od kontrolnih eksplantata koji su bili kultivirani na 31 ºC u MEM-

u. Prednji eksplantati značajno su bili manji u drugom tjednu kulture ($p<0.01$), a stražnji eksplantati ($p<0.0001$) od samog početka kulture (Slika 25.)



Slika 25. Rast eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranih *ex vivo* 14 dana na 31 °C gdje je u medij seruma dodano 5 μM 5-azacitidina. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

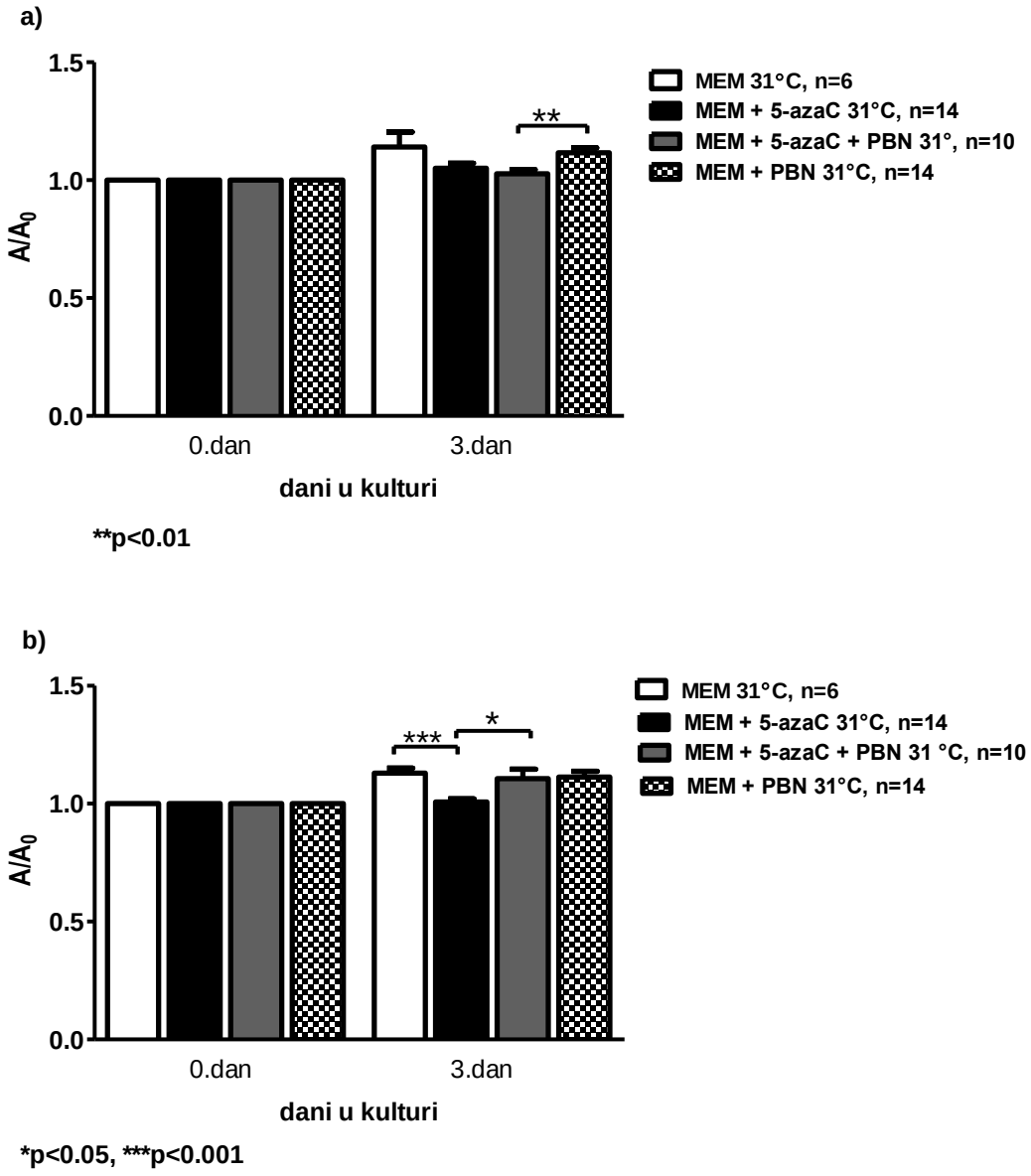
U ovoj skupini analizirana je i numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica (Slika 27.). Pokazalo se da na hipotermiji u eksplantatima kultiviranima u mediju bez seruma, 5-azacitidin uzrokuje značajno smanjenje proliferativne aktivnosti na kraju dvotjedne kulture ($p<0.0001$).

5.2.2.2.3. Hipotermija, 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma

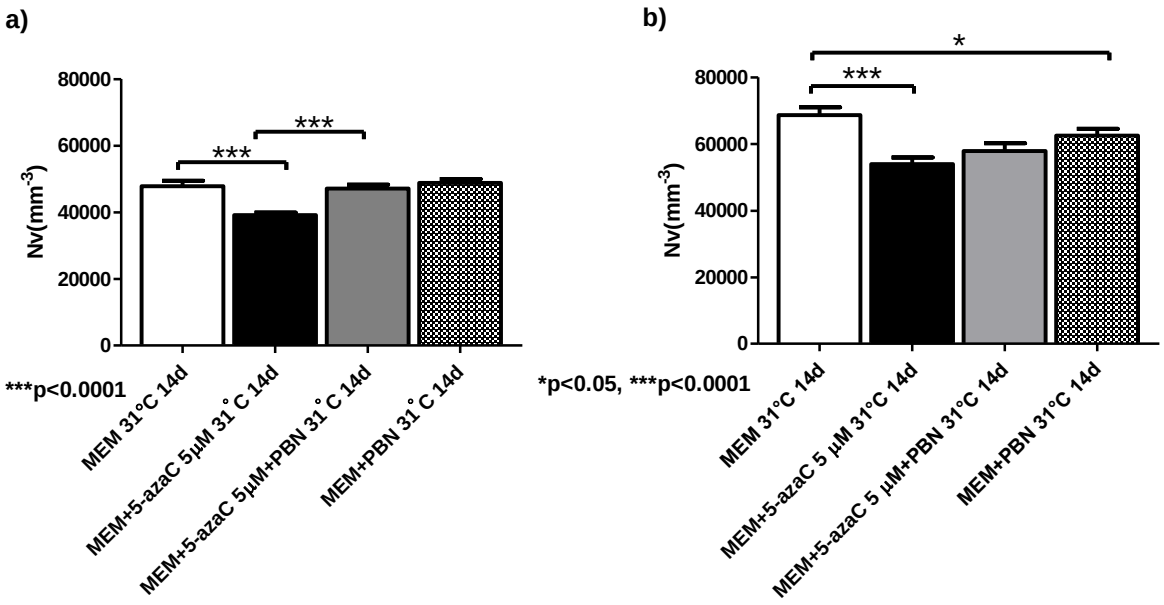
Prednji i stražnji eksplantati ovdje su kultivirani na 31 ºC u 3 zasebna eksperimentalna medija. U prvoj skupini je u MEM dodano 5 μM 5-azacitidina, u drugoj 5 μM 5-azacitidina i 22,6 μM PBN-a, dok je treća skupina kultivirana u MEM-u uz dodatak 22,6 μM PBN-a. Kulture su trajale 14 dana, a anliziran je rast 3. dana i proliferacija.

Kod prednjih eksplantata dodatak PBN-a u medij sa 5-azacitidinom nije značajno poboljšao rast jer su takvi eksplantati bili slične površine kao i oni tretirani samo sa 5-azaC te značajno manji od onih kultiviranih samo u MEM-u uz dodatak PBN-a (slika 26a.). No ipak PBN primijenjen uz 5-azaC smanjio je negativan učinak 5-azaC na proliferaciju jer je Nv PCNA pozitivnih stanica u mediju sa 5-azaC i PBN-om bila značajno veća od Nv u mediju gdje je dodan samo 5-azaC ($p<0.0001$, Slika 27 a.).

No, kod stražnjih eksplantata, gdje je tretman sa 5-azacitidinom uz dugotrajnu hipotermiju značajno smanjio rast, dodatak PBN-a u medij sa 5-azacitidinom značajno je poboljšao rast eksplantata (Slika 26b.), koji su bili značajno veći od onih tretiranih samo sa 5-azaC ($p<0.05$). Ipak nakon 14 dana PBN nije značajno djelovao na proliferaciju jer Nv PCNA pozitivnih stanica u mediju sa 5-azaC i PBN-om nije bila značajno različita od one u mediju sa 5-azaC bez PBN-a. Ipak, dodatak PBN-a u medij na hipotermiji u slučaju stražnjih udova, smanjuje proliferaciju kada se usporedi s proliferacijom u samom MEM-u na hipotermiji ($p<0.05$, Slika 27b.).



Slika 26. Rast eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u uvjetima dugotrajne hipotermije u mediju s 5-azacitidinom i/ili PBN-om. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 27. Numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica u eksplantatima 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranima *ex vivo* 14 dana u uvjetima dugotrajne hipotermije na 31 °C u mediju bez seruma i sa 5 µM 5-azacitidina i 22,6 µM PBN-a. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

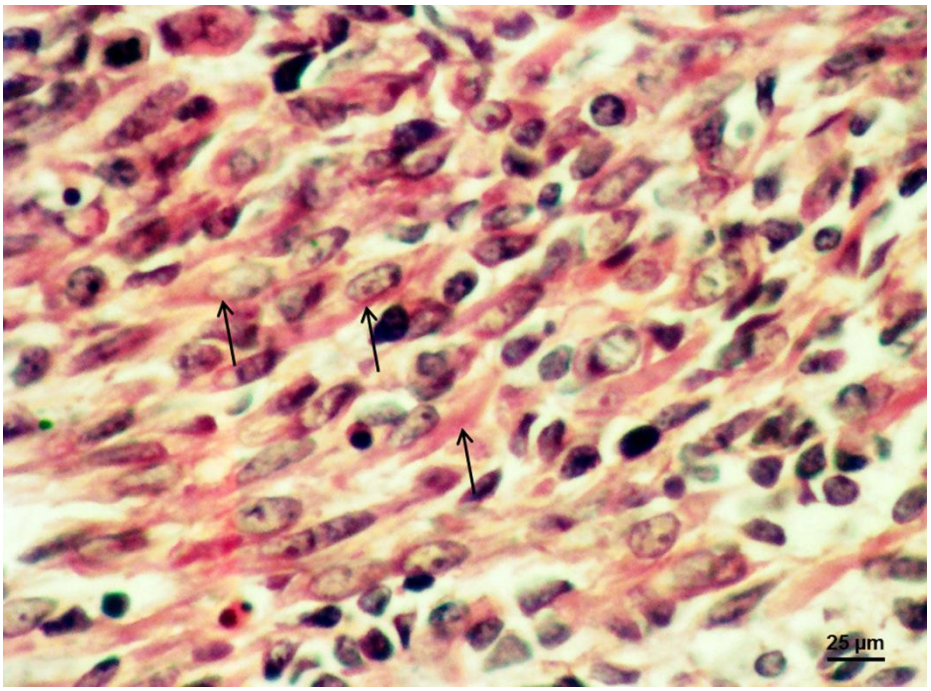
5.2.2.3. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA HIPOTERMIJI

Eksplantati 13 i 14 dana starih zametaka nakon dvotjedne kulture *ex vivo* na hipotermiji analizirani su na klasičnu svjetlosnu mikroskopiju, a samo kod 14 dana starih eksplantata i imunohistokemijskim bojanjem detektirana je ekspresija signala PCNA, iz pokusa sa i bez seruma, 5 µM 5-azaC u MEM-u sa i bez dodatka 22,6 µM PBN-a.

U svim pokusima na hipotermiji postignuta je diferencijacija jednaka onoj u paralelnim pokusima na dugotrajnoj normotermiji. Prednji pupoljci udova nešto su napredniji u stupnju diferencijacije u odnosu na stražnje. Održana je organizacija tkiva, slijed diferencijacije i veličina centralne zone propadanja u oba pupoljka uda kao na normotermiji (vidi 5.2.1.4.). Maksimum diferencijacije vidljiv je u kulturi sa serumom i gotovo odgovara kasnom stadiju razvoja pupoljka uda *in vivo* (vidi 1.1.2.). U ostalim pokusima nađen je niži stupanj diferencijacije tkiva tj. elementi ranog stadija razvoja pupoljka uda *in vivo* (vidi 1.1.2.). Prikazuje se hrskavica na bazi

pupoljka udova, miotube (Slika 28.) i orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel na površini, s naznakama početka generaliziranog propadanja svih tkiva i apoptotičkih stanica u subepitelnom mezenhimu u prednjim pupoljcima udova. Dodatak antioksidansa PBN-a u kulturu potaknuo je diferencijaciju zrakastih osnova u vršku pupoljka uda, vidljivo je povećao rast eksplantata i ublažio procese staničnog propadanja.

PCNA pozitivne stanice sa smeđim jezgrama (Slika 29.) detektirane su u hrskavičnom tkivu i okolnom perihondriju, u bazalnom sloju orožnjelog mnogoslojnog pločastoj epitela, mišićnim stanicama i po kojoj stanici mezenhima u bazi pupoljka uda. U prednjim pupoljcima udova PCNA pozitivni signal čini se gušćim u odnosu na stražnje. Plave jezgre (obojane hemalaunom) koristili smo za negativnu internu kontrolu.



Slika 28. Miotube (⟶) u prednjem pupoljku uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* u MEM-u na hipotermiji (kontrola bez seruma). HE, x400.

Slika 29. Ekspresija PCNA u perihondriju i hrskavičnim osnovama u prednjem pupoljku uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* u MEM-u na hipotermiji (kontrola bez seruma). DAB, kontrastirano hemalaunom, x200. ⟶ = PCNA-pozitivne jezgre hondrocita; ⟶ = PCNA-pozitivne jezgre u perihondriju; ● = centralna zona propadanja.

5.2.3. HIPERTERMIJA I EPIGENETSKI LIJEKOVI

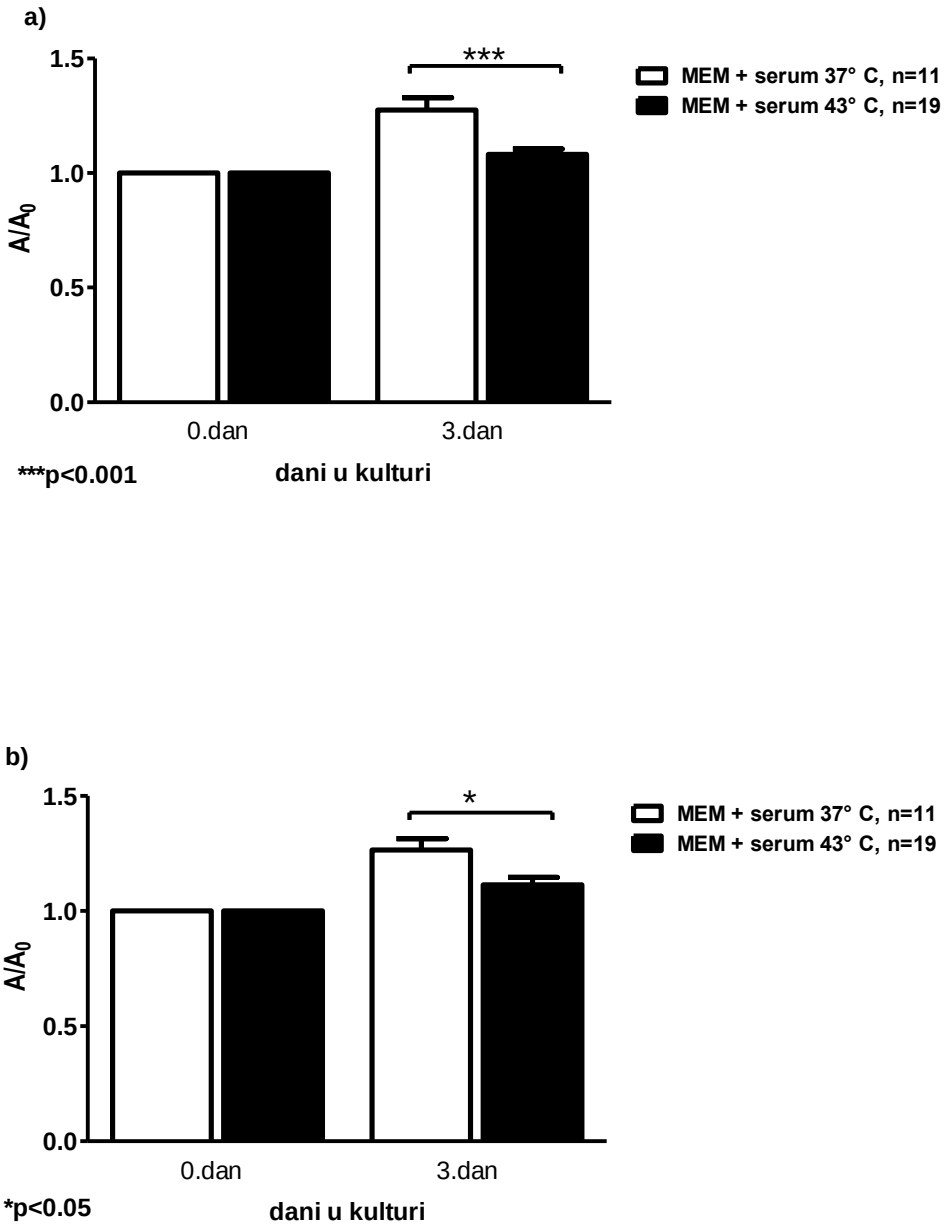
5.2.3.1. HIPERTERMIJA U KULTURI SA SERUMOM I BEZ SERUMA

U svrhu istraživanja utjecaja kratkotrajne hipertermije na razvoj eksplantata pupoljaka udova *ex vivo*, eksplantati su nakon izolacije stavljeni 15 minuta na 43 ºC te potom kultivirani 3 dana na 37 ºC. Kultivirani su u serumu ili u mediju bez seruma (MEM). Na njima su analizirani rast i stanična proliferacija.

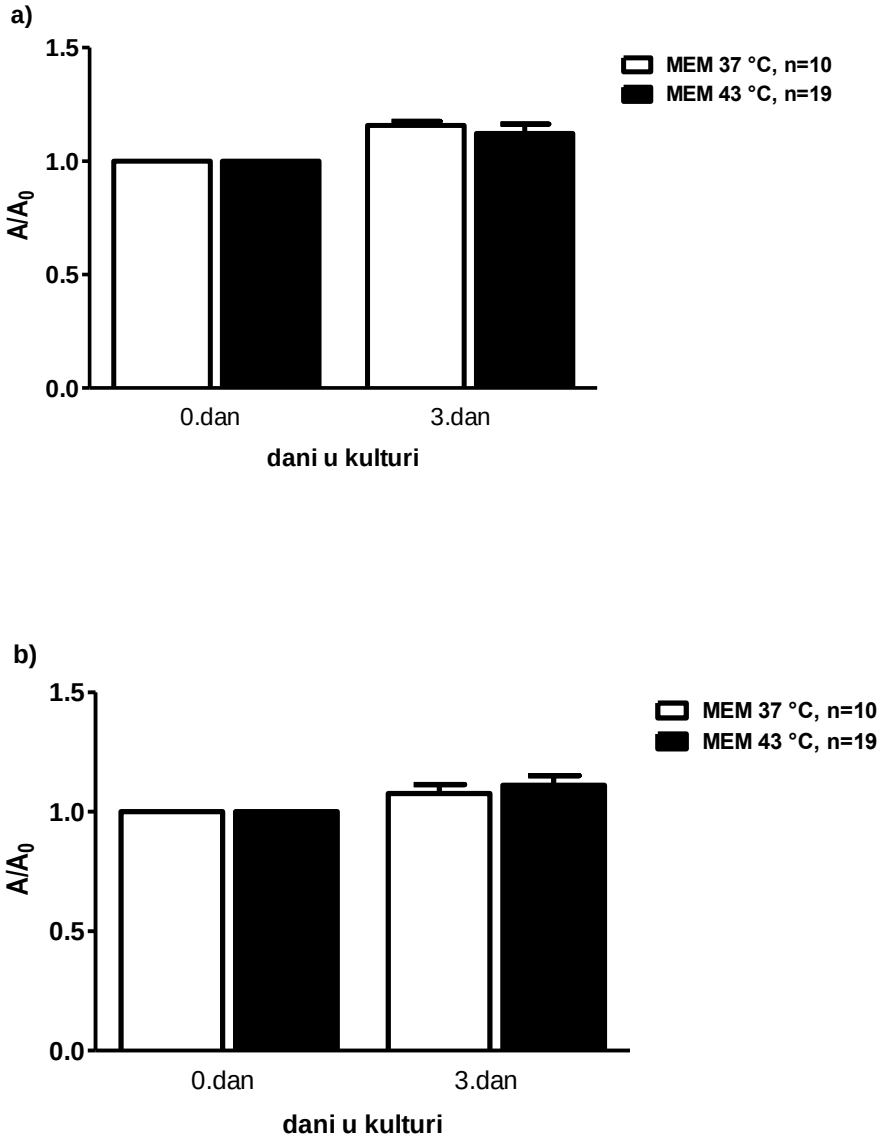
5.2.3.1.1. Rast eksplantata udova u uvjetima kratkotrajne hipertermije

U kulturama sa serumom, i kod prednjih i kod stražnjih pupoljaka udova tretman kratkotrajnom hipertermijom značajno je smanjio rast eksplantata u usporedbi sa kontrolnima kultiviranima u serumu na 37 ºC (Slika 30.). Smanjenje rasta bilo je izraženije kod prednjih udova ($p<0.005$).

U kulturama bez seruma, rast je inhibiran i u kontroli, pa hipertermijom tretirani eksplantati nisu više bili značajno različiti po veličini od kontrolnih kultiviranih na 37 ºC (Slika 31.).



Slika 30. Rast eksplantata 14 dana starog štakorskog zametka u kulturi *ex vivo* uz dodatak 50% štakorskog seruma u uvjetima kratkotrajne hipertermije od 43 °C 15 min primijenjene prvi dan kulture *ex vivo*. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 31. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starog štakorskog zametka u uvjetima bez seruma uz primijenjenu kratkotrajnu hipertermiju od 43 °C 15 min na prvi dan kulture *ex vivo*. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.3.1.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima u uvjetima kratkotrajne hipertermije

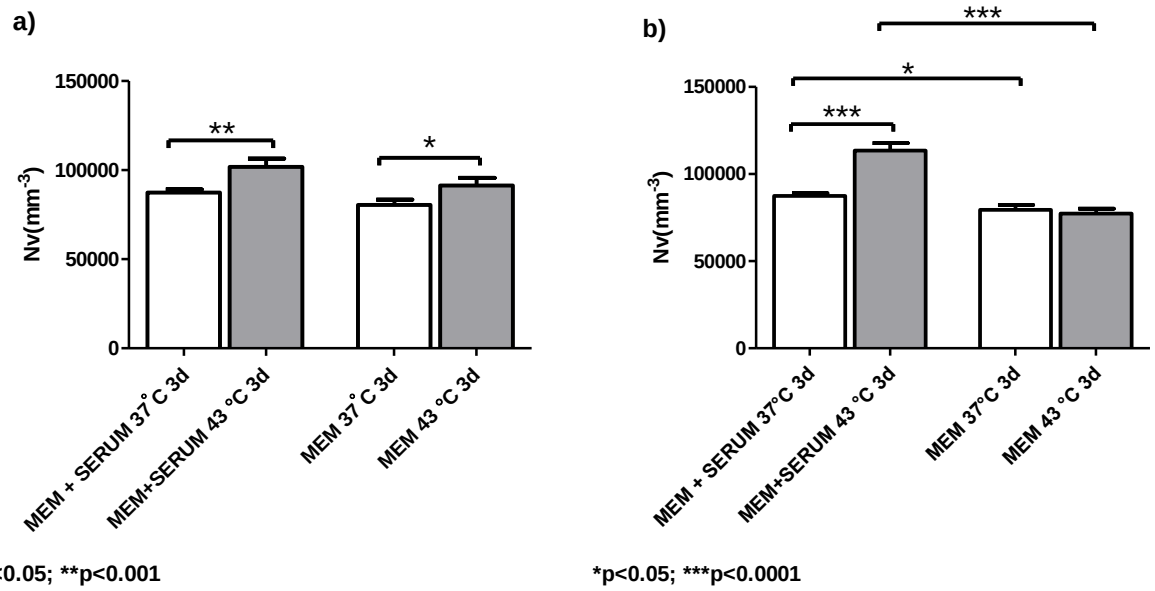
Numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica određena je u prednjim i stražnjim eksplantatima tretiranih kratkotrajnom hipertermijom od 43 ºC 15 minuta, kultiviranih u mediju sa serumom ili bez seruma. Rezultati su potom uspoređeni sa odgovarajućim kontrolama na 37 ºC ovisno o korištenom mediju. Također,

analizirana je i ovisnost stanične proliferacije u eksplantatima o sastavu medija u trodnevnoj kulturi.

U kulturama sa serumom (Slika 32.), analiza je pokazala da je 15-minutni tretman hipertermijom pozitivno utjecao na staničnu proliferaciju, budući da je numerička gustoća PCNA biljega značajno veća kod hipertermijom tretiranih prednjih i stražnjih eksplanatata ($p<0.001$). Izostanak seruma djelomično smanjuje ovaj pozitivni utjecaj (Slika 32.). Tako prednji eksplantati kultivirani u MEM-u i tretirani hipertermijom od 15 min na 43 ºC ostaju značajno veći od kontrole, iako je statistička značajnost razlike manja ($p<0.05$). Kod stražnjih pupoljaka udova, izostanak seruma poništava ovu razliku te se numerička gustoća PCNA pozitivnih stanica vraća na razinu one u kontrolnoj skupini kultiviranoj na 37 ºC u MEM-u.

Ukoliko se promatra ovisnost sastava medija na staničnu proliferaciju nakon 3 dana kulture, i ovdje se javlja različit odgovor kod prednjih i stražnjih pupoljaka udova. Kod prednjih, na normotermiji i hipertermiji, numerička gustoća PCNA-pozitivnih stanica ne ovisi o mediju (Slika 32a.), jer nema značajne razlike u ekspresiji PCNA između eksplantata kultiviranih sa serumom ili samo u MEM-u.

Stražnji pupoljci udova pokazuju pak ovisnost o sastavu medija u trodnevnoj kulturi. Tako stražnji eksplantati kultivirani samo u MEM-u imaju značajno manju



Slika 32. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima pupoljaka udova 14 dana starog štakorskog zametka nakon 3 dana kulture *ex vivo* u mediju sa serumom ili bez seruma, na 37 °C i na 43 °C. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

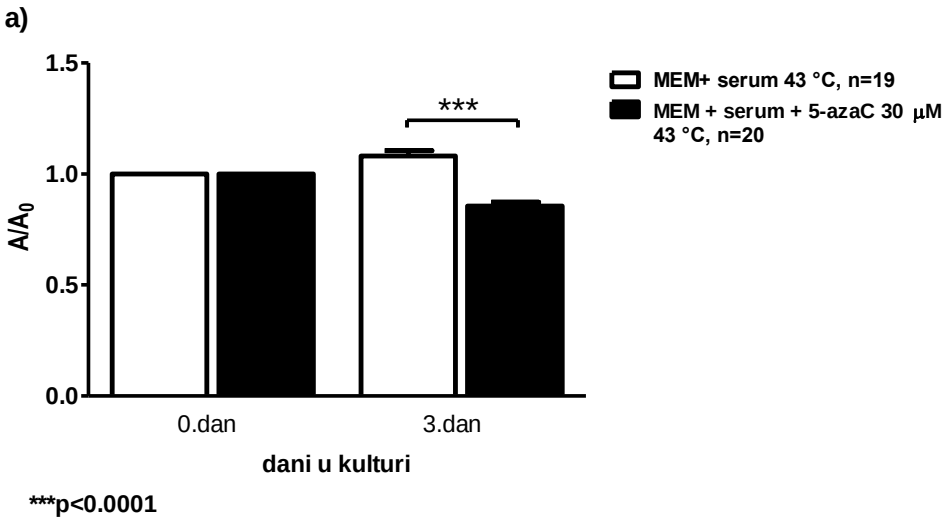
gustoću PCNA signala od onih kultiviranih u mediju sa serumom. Ako uspoređujemo samo hipertermijom tretirane eksplantate (Slika 32b.), ova značajnost razlike se još i povećava ($p<0.0001$).

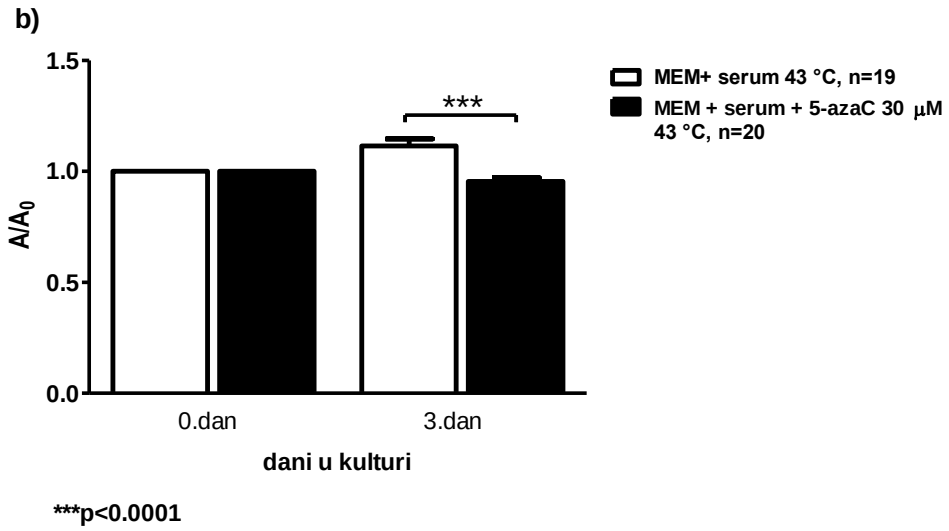
5.2.3.2. HIPERTERMIJA I 5-AZACITIDIN

U svrhu istraživanja djelovanja epigenetskih lijekova u kombinaciji sa promjenom temperature, eksplantati su tretirani sa 5-azacitidinom u kulturama sa serumom (30 μM) i bez seruma (5 μM). Na početku kulture izloženi su ujedno kratkotrajnoj hipertermiji od 43 ºC 15 minuta te potom tri dana kultivirani na 37 ºC.

5.2.3.2.1. Hipertermija i 5-azacitidin u kulturi sa serumom

U eksperimentima gdje je istraživan utjecaj 5-azacitidina napravljeni su eksperimenti gdje je na izolirane pupoljke prednjih i stražnjih udova kultivirane u mediju sa serumom uz dodatak 5-azacitidina (30 μM) primijenjena kratkotrajna hipertermija od 43 ºC 15 minuta. Nakon 3 dana kulture opaženo je da je kratkotrajna hipertermija izrazito smanjila rast prednjih i stražnjih eksplantata (Slika 33.). Tako su prednji i stražnji eksplantati tretirani hipertermijom u mediju sa 5-azacitidinom značajno manji od kontrolnih tretiranih hipertermijom u kulturama sa serumom ($p<0.0001$). Također, kad hipertermijom i 5-azacitidinom tretirane eksplantate usporedimo sa skupinama tretiranima sa 5-azacitidinom na 37 ºC, oni su značajno manji i od njih ($p<0.0001$, slika 51.).



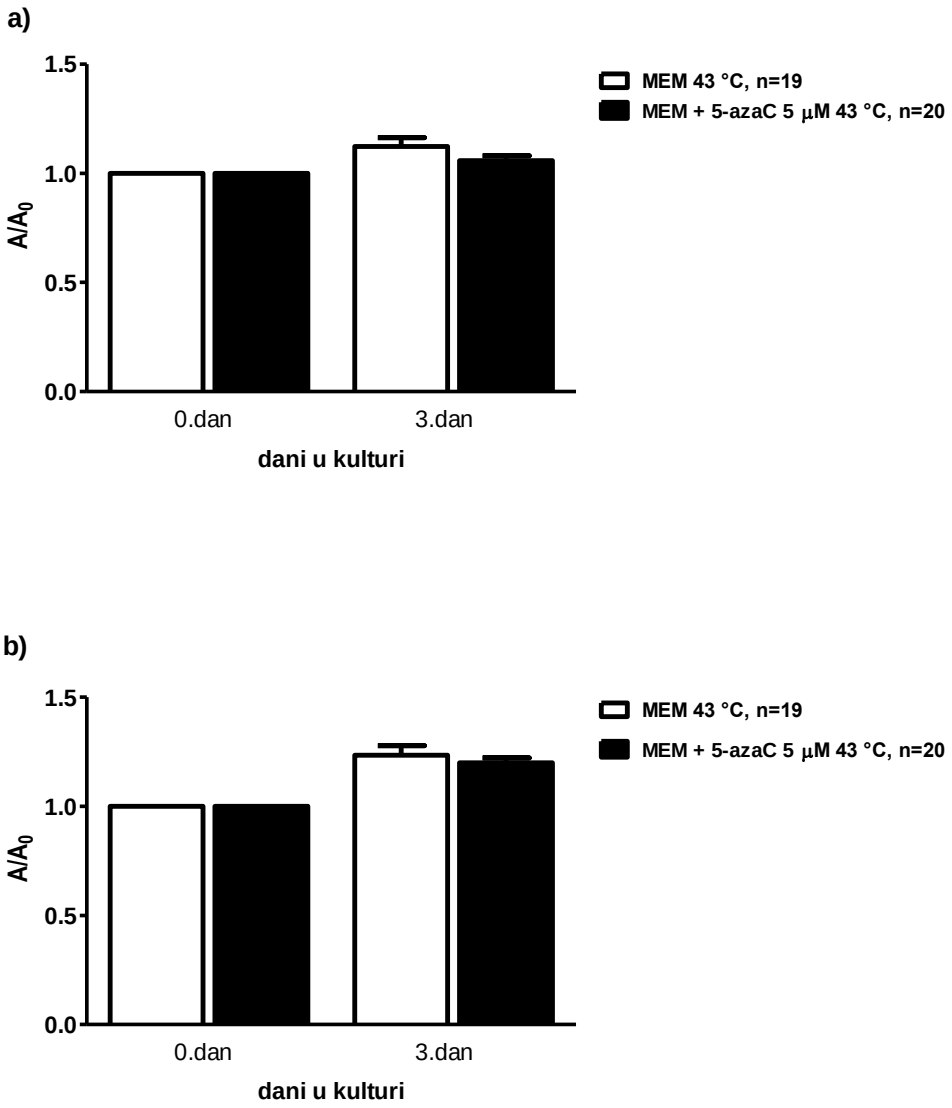


Slika 33. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u mediju sa serumom i 30 μM 5-azacitidina u uvjetima kratkotrajne hipertermije od 43 °C 15 min primijenjene prvi dan kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.3.2.2. Hipertermija i 5-azacitidin u kulturi bez seruma

Kombinirani utjecaj hipertermije i epigenetskog lijeka 5-azacitidina proučavan je i u kulturama u mediju bez seruma, gdje je dodano 5 μM 5-azacitidina, a eksplantati prednjih i stražnjih pupoljaka udova izloženi kratkotrajnoj hipertermiji.

Nakon 3 dana, 5-azacitidinom i hipertermijom tretirani eksplantati bili su manji od onih tretiranih samo hipertermijom u MEM-u, no statistički neznačajno (Slika 34.).

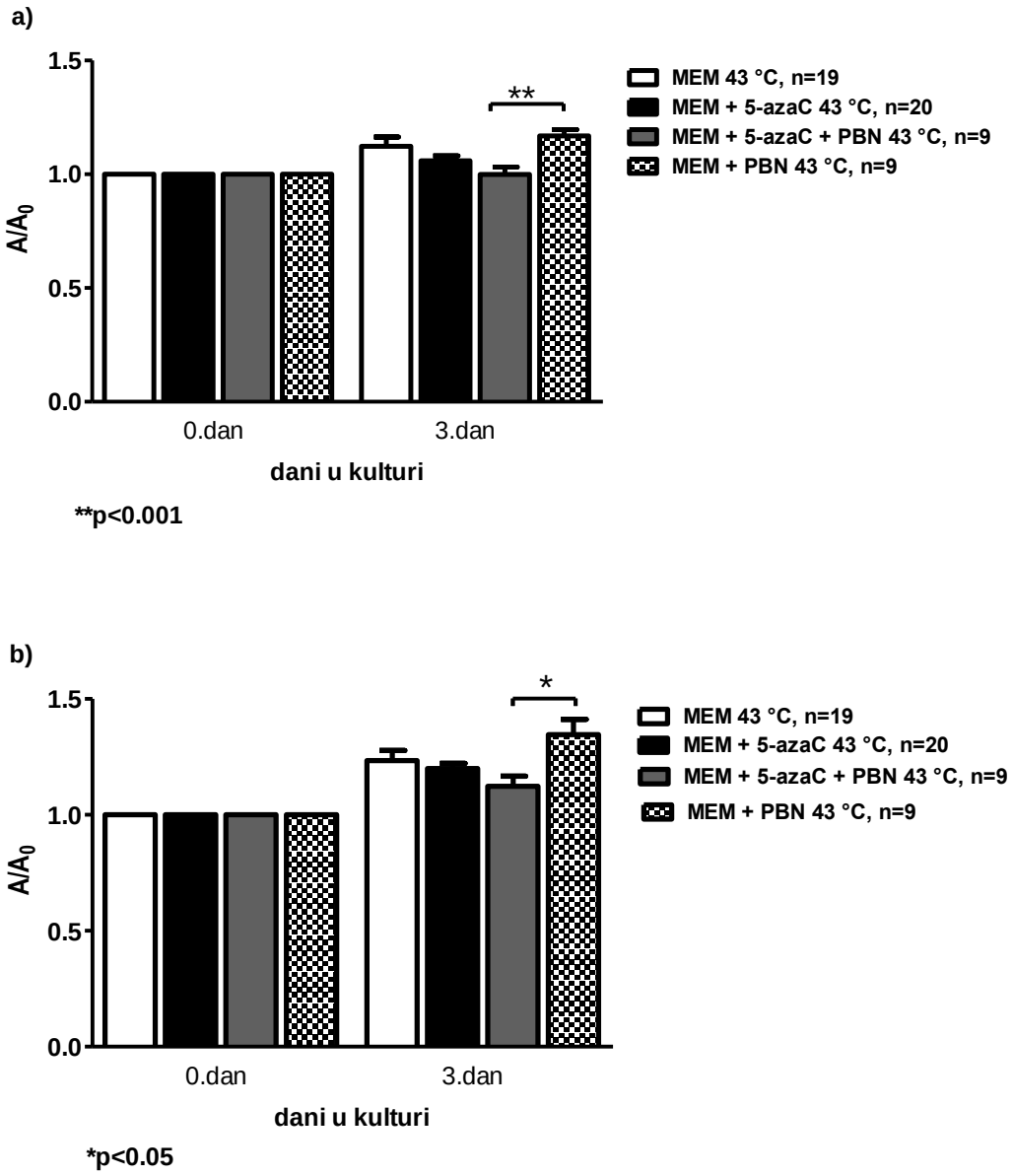


Slika 34. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka u MEM-u sa 5 μM 5-azacitidina u uvjetima kratkotrajne hipertermije *ex vivo*. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati.

5.2.3.2.3. Hipertermija, 5-azacitidin i PBN u kulturi bez seruma

Kratkotrajna hipertermija od 43 ºC 15 minuta napravljena je i u trodnevnim kulturama u mediju bez seruma sa dodatkom 5 μM 5-azacitidina i 22,6 μM PBN-a. Ovdje je dodatak PBN-a u medij sa 5-azacitidinom uz primijenjenu hipertermiju čak dodatno smanjio rast eksplantata 3. dana kulture koji su bili značajno manji od onih

kultiviranih samo u PBN-u (Slika 35.). Smanjenje je jače izraženo kod prednjih eksplantata ($p<0.001$). Eksplantati kutivirani u PBN-u i tretirani hipertermijom bili su veći od kontrolnih u MEM-u, no ne značajno.



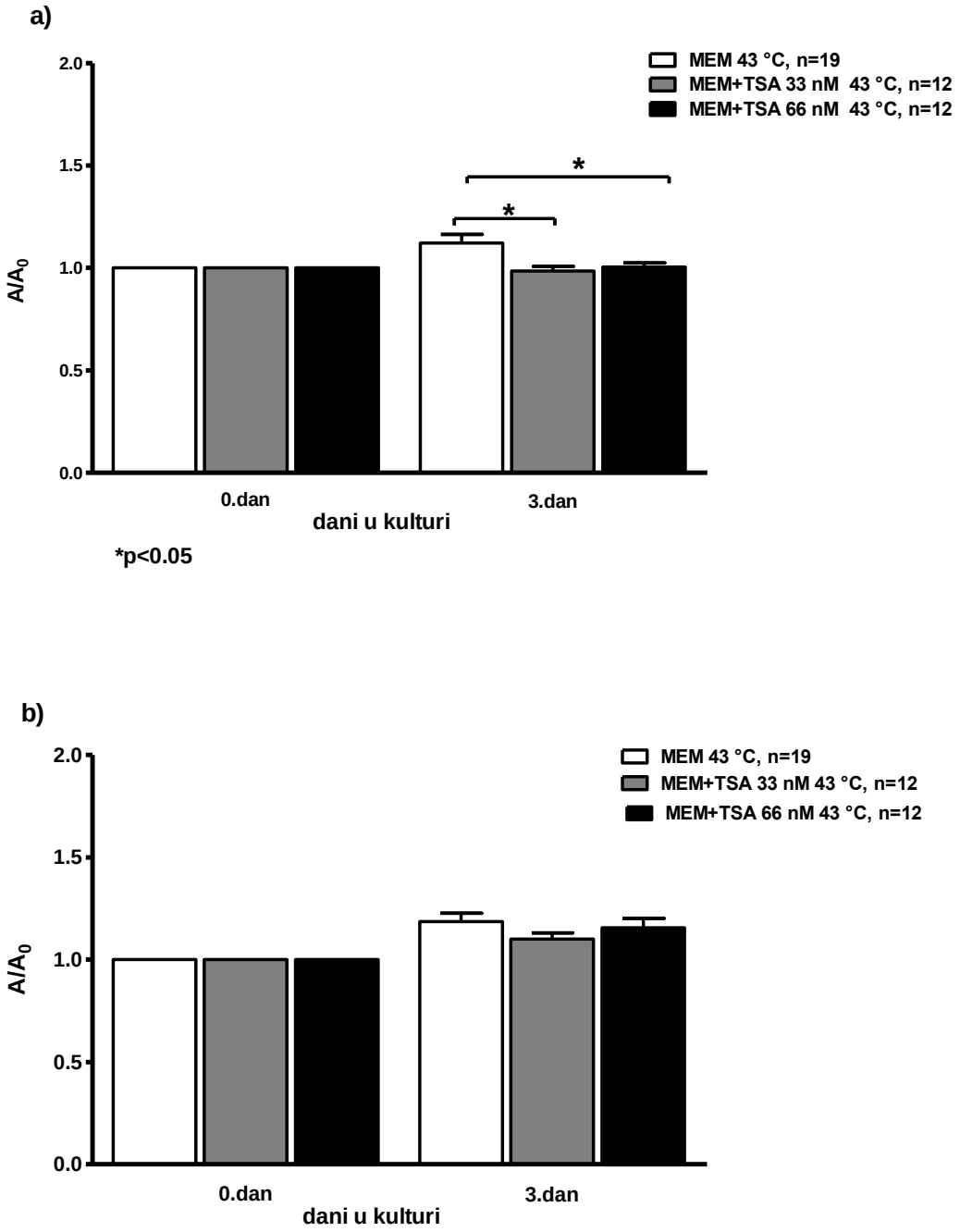
Slika 35. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u uvjetima kratkotrajne hipertermije u mediju s 5-azacitidinom i/ili PBN-om. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.3.3. HIPERTERMIJA I TRIHOSTATIN A

5.2.3.3.1. Rast eksplantata udova u kulturi sa trihostatinom A u uvjetima kratkotrajne hipertermije

U eksperimentima gdje je proučavan utjecaj trihostatina A na *ex vivo* razvoj prednjih i stražnjih pupoljaka udova 14 dana starih zametaka, analiziran je i utjecaj kratkotrajne povišene temperature kultiviranja. Hipertermija je primijenjena na početku kulture u dozi 15 minuta na 43 °C, a eksplantati su ostavljeni kulturi 3 dana.

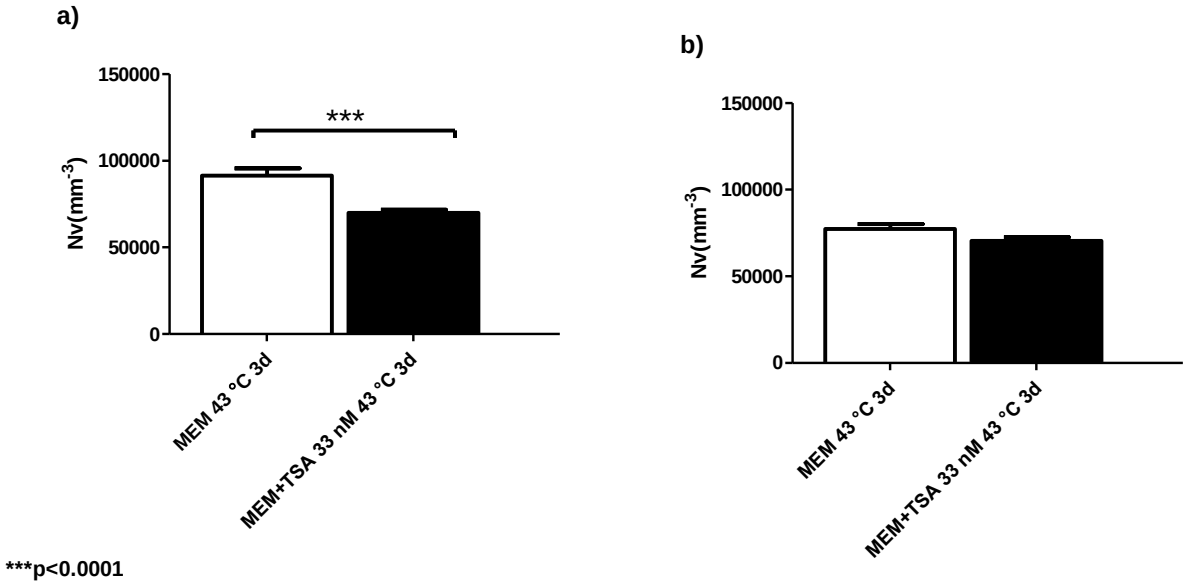
Ukoliko je uz TSA u dozama 33 nM ili 66 nM dodana i kratkotrajna hipertermija, poništava se pozitivan utjecaj trihostatina A (Slika 36.) opažen na normotermiji 3. dana kulture (Slika 8.), gdje je dodatak TSA u medij poboljšao rast. Eksplantati su manji od onih kultiviranih samo u MEM-u uz kratkotrajnu hipertermiju, a značajnost razlike u odnosu na kontrolu opažena je samo kod prednjih eksplantata ($p<0.05$). Također, kod prednjih i stražnjih pupoljaka udova ovdje nije bilo značajnosti razlike u rastu u ovisnosti o koncentraciji trihostatina A, kao što je bilo kod prednjih pupoljaka udova na normotermiji.



Slika 36. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka u trodnevnoj kulturi *ex vivo* u mediju bez seruma sa trihostatinom A uvjetima kratkotrajne hipertermije od 43 °C 15 min primijenjene prvi dan kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.3.3.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima pupoljaka udova u kulturi sa trihostatinom A u uvjetima kratkotrajne hipertermije

Proliferativna aktivnost u eksplantatima tretiranima hipertermijom i trihostatinom A prati rezultate rasta. Tako je nakon 3 dana kulture, ekspresija PCNA-pozitivnih stanica smanjena u eksplantatima tretiranima hipertermijom uz dodatak trihostatina A u medij, u komparaciji s onima tretiranima samo hipertermijom u MEM-u (Slika 37.). Ipak, statistička značajnost razlike postoji samo kod prednjih udova ($p<0.0001$).



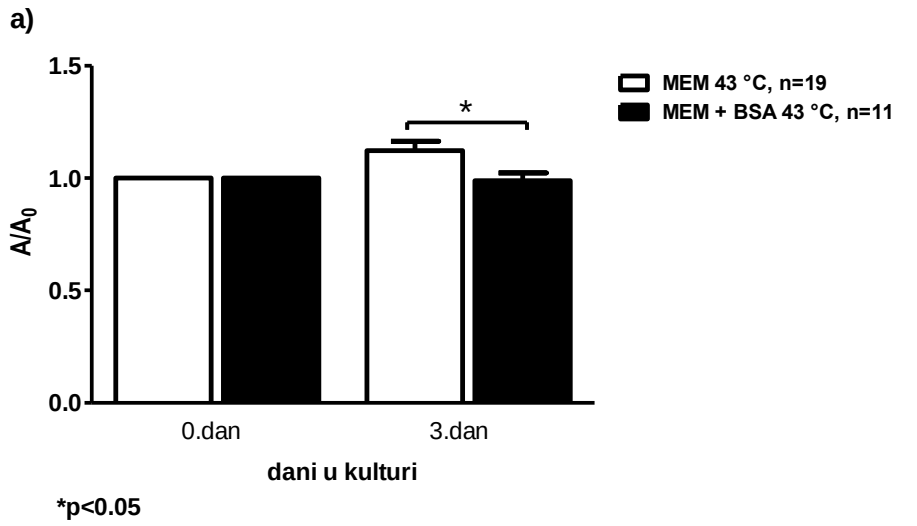
Slika 37. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka nakon 3 dana kulture *ex vivo* u mediju sa dodatkom 33 nM trihostatina A i uz tretman kratkotrajnom hipertermijom od 43 °C 15 minuta. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

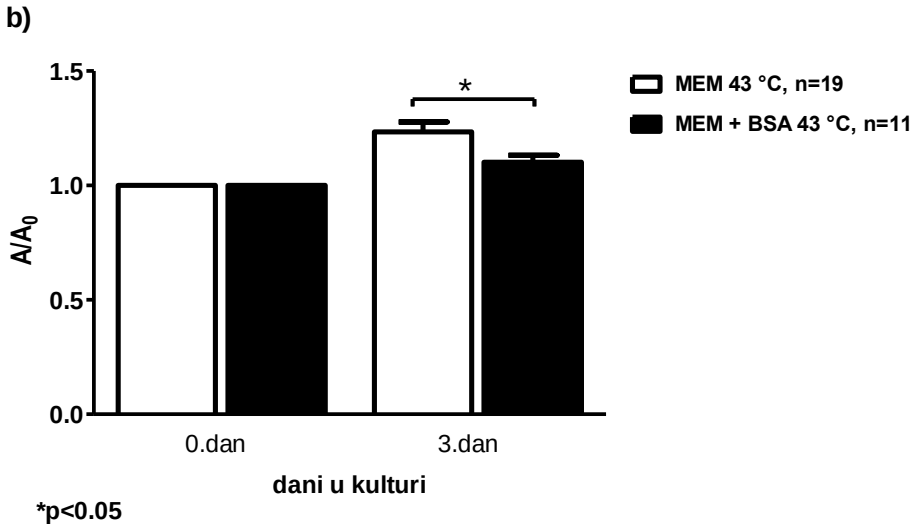
5.2.3.4. HIPERTERMIJA I BSA U KULTURI BEZ SERUMA

U eksperimentima gdje se proučavao utjecaj BSA na razvoj prednjih i stražnjih pupoljaka udova *ex vivo* napravljeni su i eksperimenti gdje su uz dodatak BSA u medij, eksplantati stavljeni na temperaturu od 43 ºC 15 minuta te poslije kultivirani 3 dana na 37ºC.

5.2.3.4.1. Rast eksplantata udova u kulturi sa BSA u uvjetima kratkotrajne hipertermije

Nakon tri dana pokazalo se da temperaturni šok zajedno sa BSA značajno smanjuje rast (Slika 38.) i prednjih i stražnjih eksplantata ($p<0.05$), slično kao i na 37 ºC (Slika 9.).

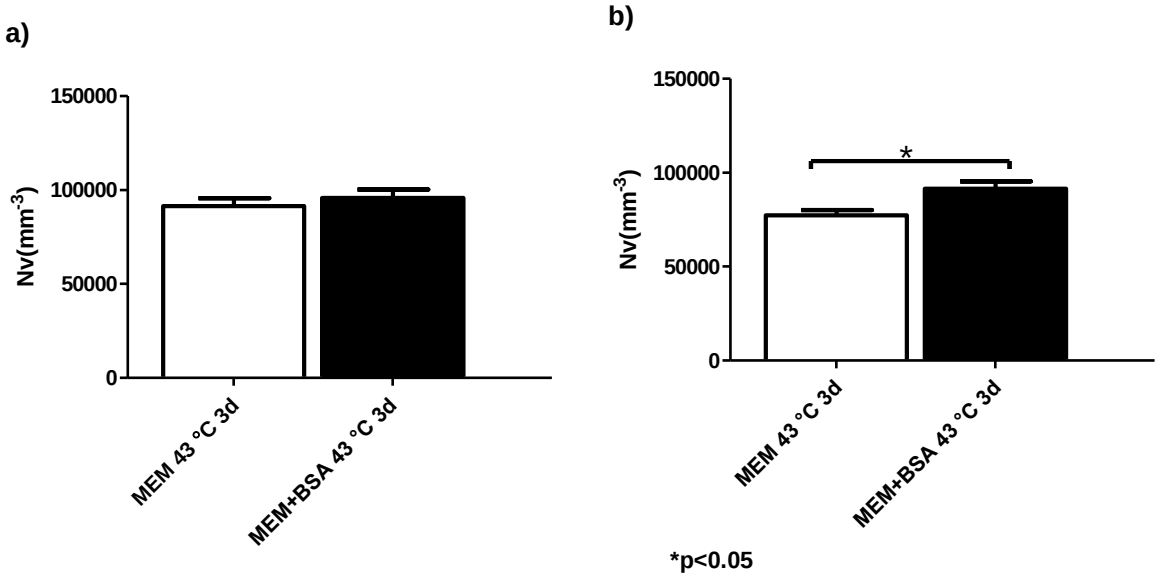




Slika 38. Rast eksplantata pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka kultiviranih 3 dana *ex vivo* u mediju bez seruma, sa dodatkom BSA, uz tretman 15 minuta na 43 °C na početku kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.3.4.2. Ekspresija PCNA u eksplantatima udova u kulturi sa BSA u uvjetima kratkotrajne hipertermije

Stereološka analiza ekspresije PCNA pokazala je da hipertermija uz dodatak BSA u medij čak poboljšava proliferativnu aktivnost jer je numerička gustoća PCNA signala veća u eksplantatima i prednih i stražnjih pupoljaka udova tretiranim BSA i hipertermijom (Slika 39.). Ipak, statistički značajno povećanje opaženo je samo kod stražnjih pupoljaka udova ($p<0.05$).



Slika 39. Numerička gustoća (Nv) PCNA u eksplantatima pupoljaka udova 14 dana starih štakorskih zametaka nakon 3 dana kulture *ex vivo* u mediju bez seruma i dodatkom BSA uz tretman kratkotrajnom hipertermijom od 43 °C 15 minuta. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

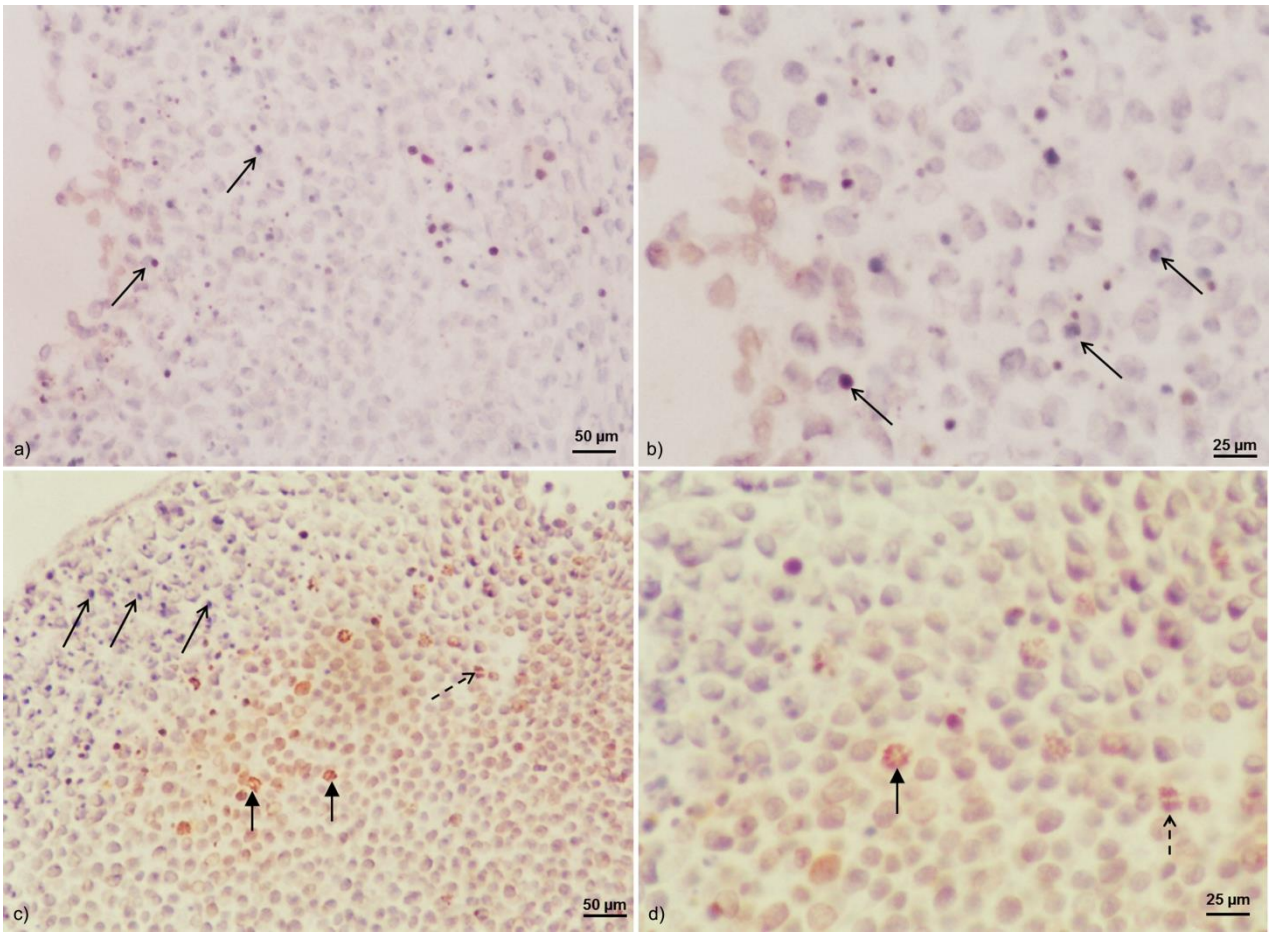
5.2.3.5. DIFERENCIJACIJA PUPOLJAKA UDOVA U KULTURI *EX VIVO* NA HIPERTERMIJI

Nakon trodnevne kulture *ex vivo* na hipertermiji eksplantati 14 dana starih zametaka iz više pokusa (osnovni mediji /vidi 4.4./, 30 μM 5-azaC u serumu i 33 nM TSA u MEM-u) analizirani su na klasičnu svjetlosnu mikroskopiju, a imunohistokemijskim bojanjem detektirana je ekspresija proliferacijskog biljega PCNA

(potencijal proliferacije). Signal acetiliranog histona H3 (H3K9ac) analiziran je u eksplantatima iz pokusa s HDACi tj. 33 nM TSA u MEM-u i u mediju bez seruma.

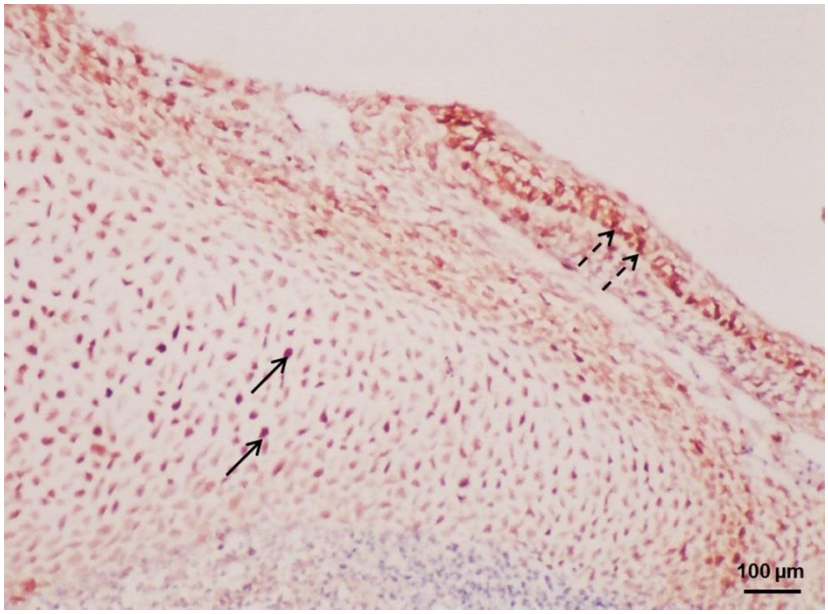
U svim pokusima zadržana je osnovna histomorfologija eksplantata jednaka za prednje i stražnje uzorke. Stražnji pupoljci udova su čini se nešto nezreliji jer u uzorcima više prevladava nediferencirani mezenhim i nezreli dvoslojni epitel. Generalno u oba pupoljka uda diferencijacija odgovara ranom stadiju razvoja *in vivo* (vidi 1.1.2.) i nešto je bolja naspram istovrsnih pokusa na normotermiji. Pupoljak uda prekriva orožnjeli mnogoslojni pločasti epitel s vršno uraslim epitelnim tračcima. Vidljiva su zrakasta zgusnuća mezenhima. Na bazi pupoljka uda hrskavične osnove okružuje perihondrij, naznačene su osnove zglobova i vidljive su miotube, osim u pokusu s 5-azacitidinom i MEM-om. Vaskulogeneza je prisutna u svim pokusima, osim u pokusu s 30 μM 5-azaC u serumu i bez seruma. Centralno se nalazi zona propadanja (nekroze) s piknotičkim jezgrama, dominira u pupoljcima udova kultiviranih s MEM-om i 5-azacitidinom. U mediju bez seruma diferencijacija je nižeg stupnja. U pokusima s 5-azacitidinom vidljivo je da je generaliziranoj nekrozi koja je ustanovljena nakon 3 dana, prethodila oskudnija diferencijacija (dvo- do četveroslojni epitel i manja osnova hrskavice na bazi pupoljka). Apoptotičke stanice (Slika 40.a-c) nađene su u mezenhimu na vrhu stražnjih pupoljaka udova subepidermalno i u interdigitalnim regijama u svim skupinama, a najizraženije u MEM-u.

Nađen je PCNA pozitivan signal (smeđe obojenje) u hondrocitima, pojedinim stanicama perihondrija, veziva i bazalnih slojeva orožnjelog mnogoslojnog pločastog epitela (Slika 41.) u svim pokusima na hipertermiji, osim u pokusu s 30 μM 5-azaC u serumu u kojem nema ekspresije jer je tkivo nekrotizirano. Negativni signal prikazan je plavim obojenjem (hemalaun) u obliku negativne interne kontrole.

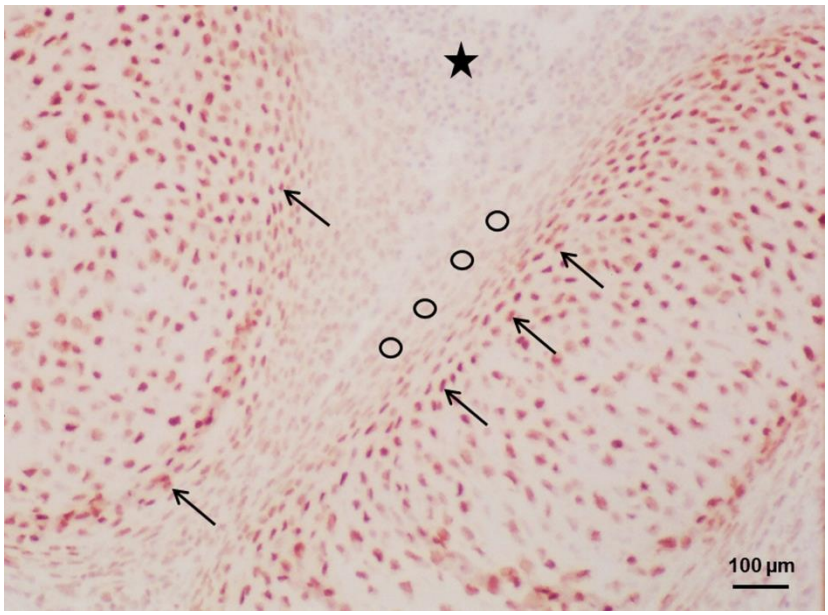


Slika 40. (a-d). Ekspresija H3K9ac u stanicama mezenhima stražnjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog u MEM-u *ex vivo* na hipertermiji (kontrola bez seruma). DAB, kontrastirano hemalaunom, x200 a) i c); x400 b) i d). ⟶ = apoptotičke stanice; - - → = stanica u anafazi pozitivna na H3K9ac; ⟶ = stanica u profazi pozitivna na H3K9ac.

U trodnevnoj kulturi s 33 nM TSA ekspresija acetiliranog histona H3 (H3K9ac) u obliku smeđeg obojenja prikazala se u hondrocitima (Slika 42.). U kontroli bez seruma pronađena je oskudnija ekspresija, H3K9ac pozitivni signal nađen je u potkovasto formiranom subepidermalnom mezenhimu tj. u nediferenciranim mezenhimalnim mitotičkim stanicama različitih faza staničnog ciklusa (Slika 40.c-d) koje zaostaju nakon diferencijacije hrskavice na periferiji pupoljka uda (Towers i Tickle, 2009). Za negativnu internu kontrolu upotrjebljene su plavo obojane jezgre (hemalaun).



Slika 41. Ekspresija PCNA u bazalnom sloju mnogoslojnog pločastog epitela, u hrskavičnim stanicama i ponekoj vezivnoj stanici u stražnjem pupoljku uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* s 33nM trihostatinom A na hipertermiji. DAB, kontrastirano hemalaunom, x100. ⟶ = ekspresija PCNA u bazalnom sloju epitela; - - → = PCNA-pozitivni hondrociti.



Slika 42. Ekspresija H3K9ac u stanicama hrskavice prednjeg pupoljka uda 14 dana starog štakorskog zametka kultiviranog *ex vivo* s 33nM trihostatinom A na hipertermiji. DAB, kontrastirano hemalaunom, x100. ⟶ = PCNA - pozitivne stanice u zoni apozicijskog rasta; ○ = perihondrij; ★ = centralna zona propadanja.

5.2.4. USPOREDBA REZULTATA PROMJENE TEMPERATURE I EPIGENETSKIH LIJEKOVA

U ovom poglavlju uspoređena je površina eksplantata prednjih i stražnjih pupoljaka udova 3. dana kulture obzirom na promjenu temperature u različitim medijima kultiviranja i epigenetskih lijekova u kombinaciji s promjenom temperature.

5.2.4.1. UTJECAJ MEDIJA I PROMJENE TEMPERATURE

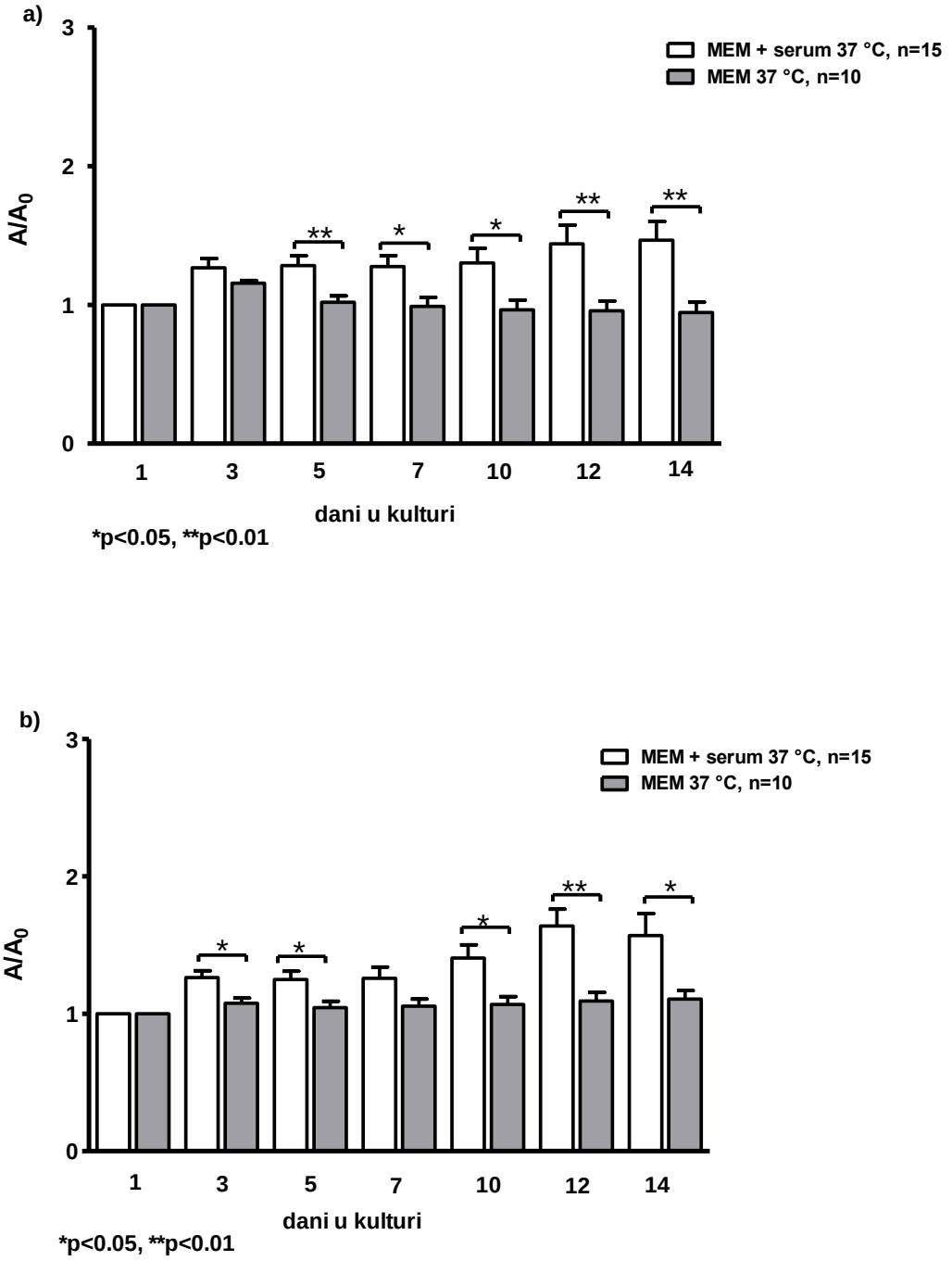
U ovom poglavlju uspoređen je zasebno utjecaj izostanka seruma u dvotjednoj kulturi pupoljaka udova, te zasebno utjecaj promjene temperature kultiviranja.

5.2.4.1.1. Utjecaj seruma

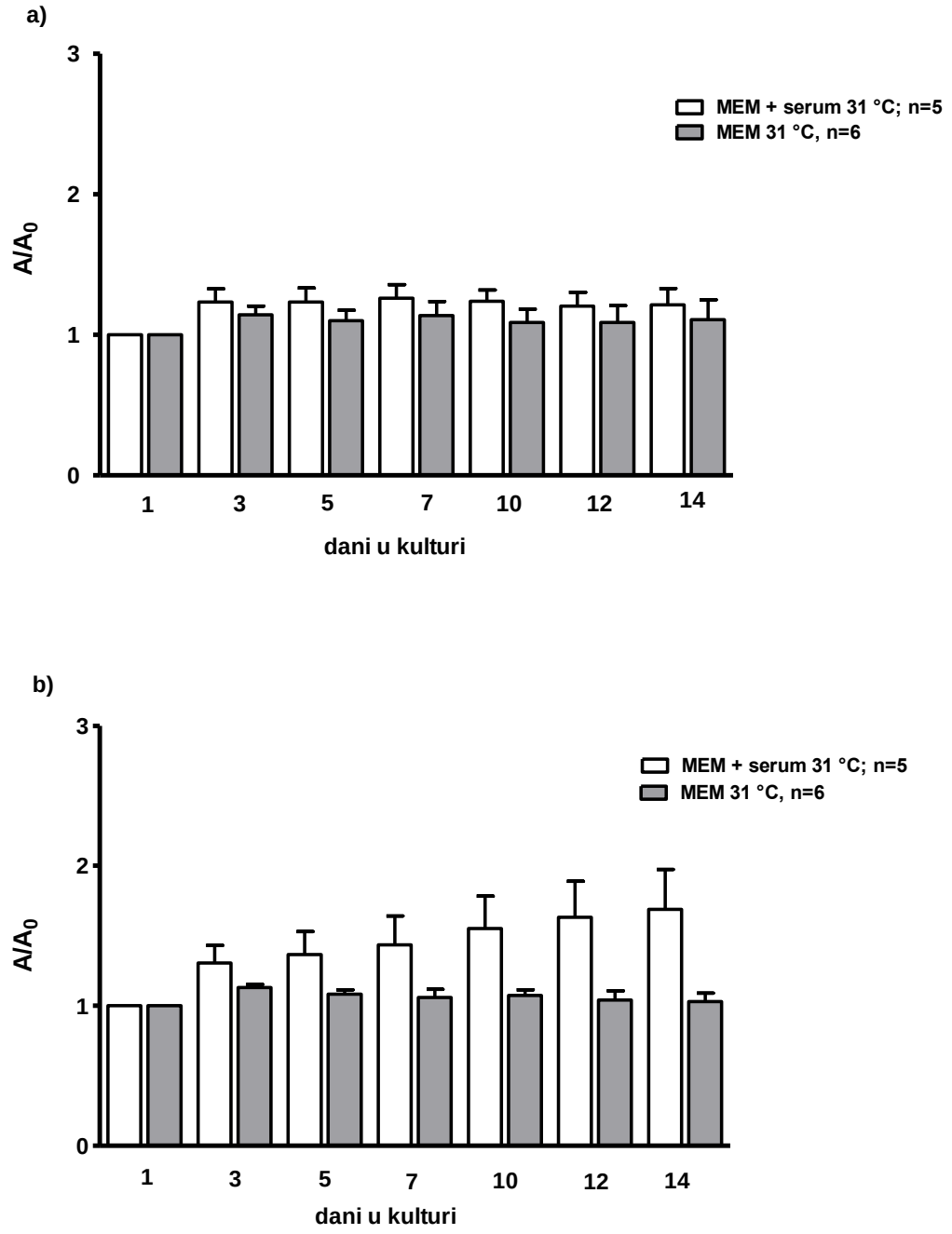
U ovoj disertaciji eksplantati pupoljaka udova kultivirani su u mediju sa serumom i u mediju bez seruma. Ako se gleda promjena temperature kultiviranja, utjecaj seruma je drukčiji. Naime na normotermiji, prednji i stražnji eksplantati kultivirani samo u MEM-u značajno su manji već od prvog tjedna kulture od onih kultiviranih u serumu (Slika 43.). Značajna razlika na normotermiji kod prednjih udova započinje od 5., a kod stražnjih udova od 3. dana kulture.

Na hipotermiji, utjecaj seruma je manji jer prednji i stražnji eksplantati kultivirani u MEM-u na 31 ºC manji su od onih kultiviranih u serumu na 31 ºC, no razlika nije značajna (Slika 44.).

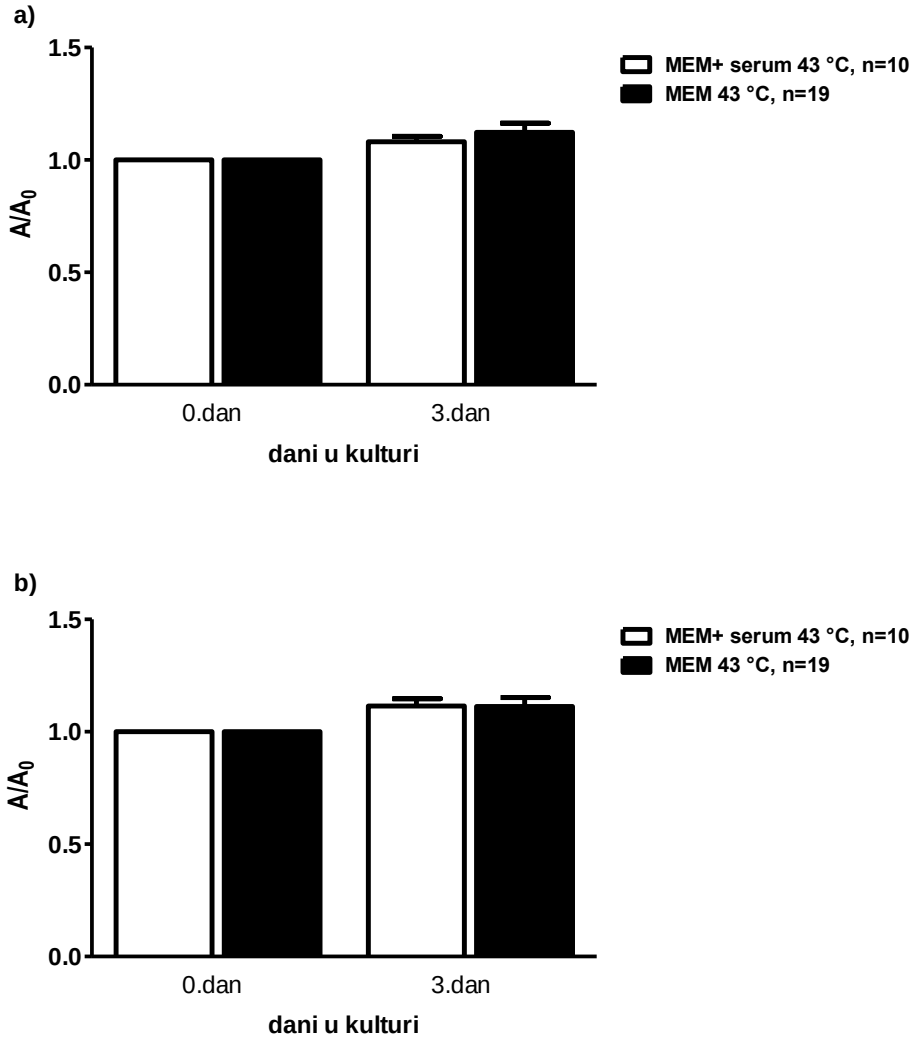
U kulturi koja je trajala tri dana i gdje je primijenjena kratkotrajna hipertermija od 43 ºC 15 minuta, utjecaj seruma nije značajan, jer nema razlike u rastu ako su eksplantati kultivirani u uvjetima bez serum (Slika 45.), što je i očekivano s obzirom na razliku rasta 3. dana na normotermiji (Slika 43.).



Slika 43. Rast eksplantata na normotermiji u mediju sa serumom i samo u MEM-u. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 44. Rast eksplantata na hipotermiji u mediju sa serumom i samo u MEM-u. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 45. Rast eksplantata s početnom kratkotrajnom hipertermijom u mediju sa serumom i samo u MEM-u. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.4.1.2. Utjecaj DMSO

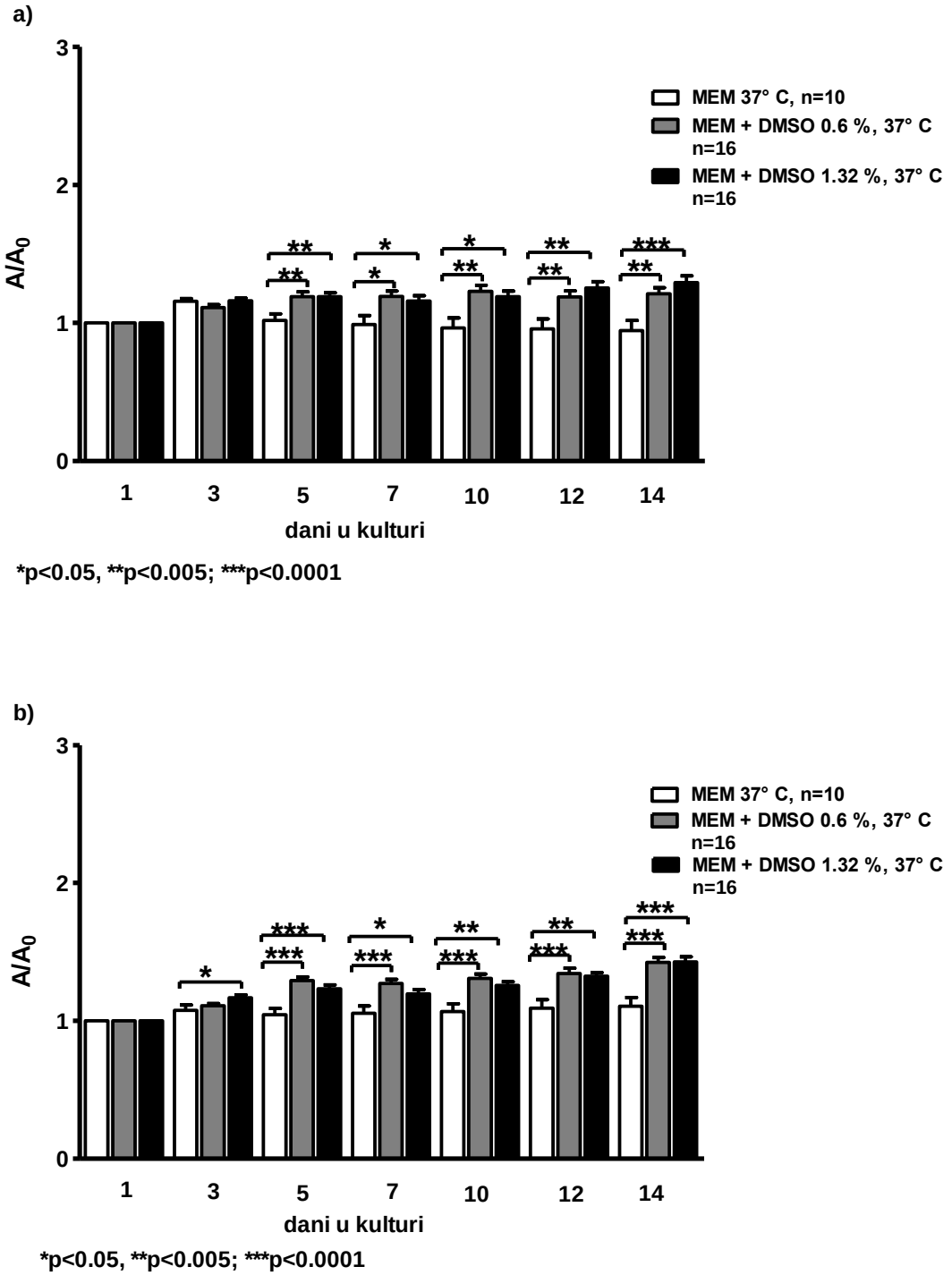
Istražen je i mogući utjecaj dimetil sulfoksida (DMSO) na rast pupoljaka udova u dugotrajnoj kulturi. Istraživane su dvije koncentracije DMSO: 0.6% i 1,32 % DMSO koji je otopljen u MEM-u kao mediju. Prednji i stražnji pupoljci udova kultivirani u DMSO uspoređeni su sa kontrolom koja je kultivirana samo u MEM-u.

Kod prednjih pupoljaka udova, dodatak DMSO u medij za kulturu značajno je poboljšao rast eksplantata koji su bili značajno veći od onih kultiviranih bez DMSO, i

to kod obje koncentracije (Slika 46a). Značajnost ove razlike u odnosu na kontrolu utvrđena je 5. dana kulture i nastavila se u drugom tjednu s tendencijom povećanja.

Kod stražnjih pupoljaka udova, dodatak DMSO također je poboljšao rast eksplantata i to počevši od 3. dana kulture za koncentraciju DMSO od 1,32% (Slika 46b). Značajnost razlike u rastu u odnosu na kontrolu kultiviranu u MEM-u veća je eksplantata kultiviranih u 0.6% DMSO. Također eksplantati kultivirani u 0.6% DMSO čine se veći od onih kultiviranih u 1.32% DMSO tijekom skoro cijele kulture (od 5. dana) , iako nije utvrđena statistički značajna razlika.

Dodatno, analizom rasta 3. dana u mediju sa DMSO u trodnevnoj kulturi, gdje je promijenjena i kratkotrajna hipertermija od 43 ºC 15 minuta u usporedbi s kontrolom tretiranom sa hipertermijom u MEM-u, opažen je sličan rezultat kao na normotermiji u slučaju prednjih pupoljaka udova, a kod stražnjih je nestala značajna razlika u rastu koja je dobivena na normotermiji kod koncentracije DMSO od 1,32% (vidi 5.2.4.1.4.).



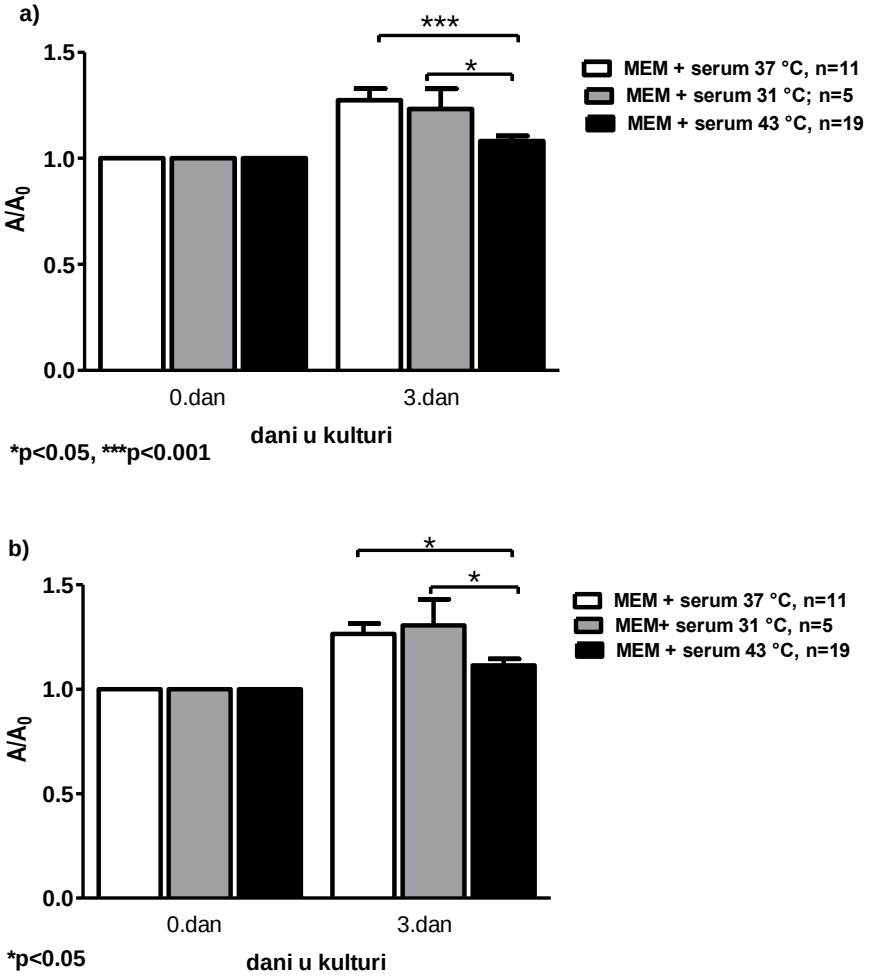
Slika 46. Rast eksplantata kultiviranih u MEM-u na normotermiji uz dodatak DMSO u koncentracijama 0,6% i 1,32%. Kontrolni eksplantati kultivirani su samo u MEM-u. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati.

5.2.4.1.3. Utjecaj promjene temperature medija

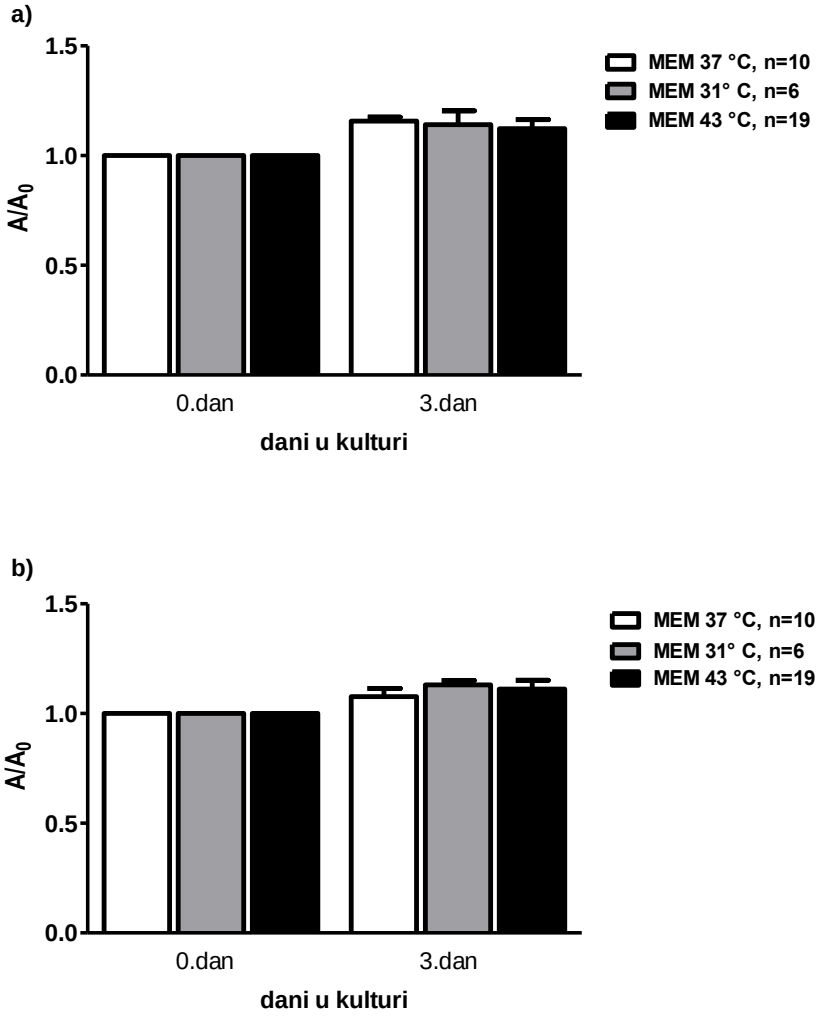
U ovom dijelu analiziran je utjecaj promjene temperature 3. dana kulture kao čimbenika rasta te su zasebno analizirane kulture sa serumom i bez seruma.

U kulturama sa serumom utjecaj promjene temperature je izraženiji nego u kulturama bez seruma (Slika 47.). U mediju sa serumom, kratkotrajna hipertermija značajno je smanjila rast eksplantata nakon 3 dana, dok hipotermija nije utjecala na rast. Smanjenje je bilo izraženij kod prednjih pupoljaka udova. Eksplantati tretirani hipotermijom bili su kao i kontrola značajno veći od onih tretiranih hipertermijom ($p<0.05$).

U uvjetima bez seruma ovaj negativni utjecaj povišene temperature je izostavljen. Treći dana kulture hipotermijom i hipertermijom tretirani eksplantati slične su površine kao i eksplantati na normotermiji (Slika 48.).



Slika 47. Usporedba rasta u ovisnosti o promjeni temperature u MEM-u sa serumom 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. ANOVA.



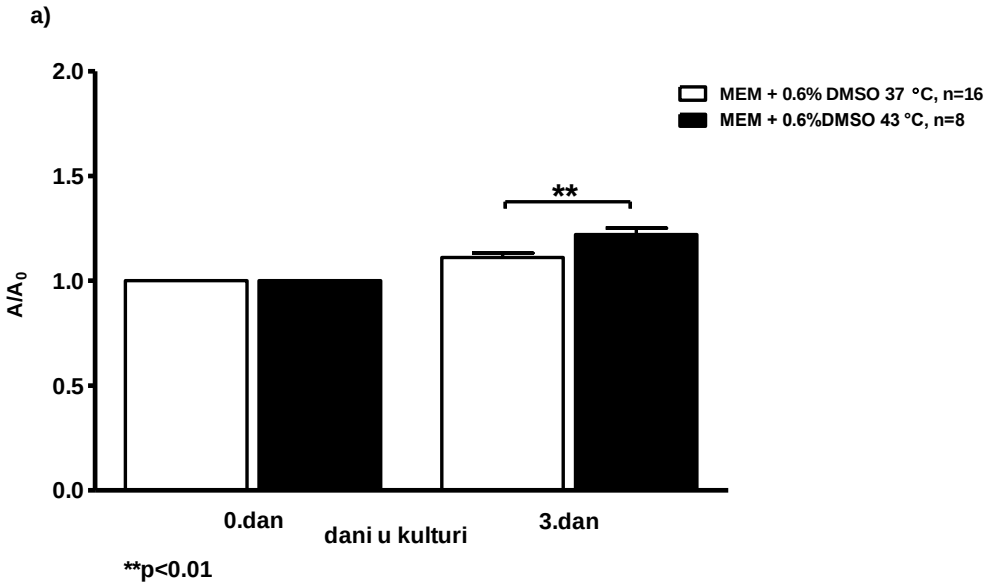
Slika 48. Usporedba rasta u ovisnosti o promjeni temperature u MEM-u 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. ANOVA

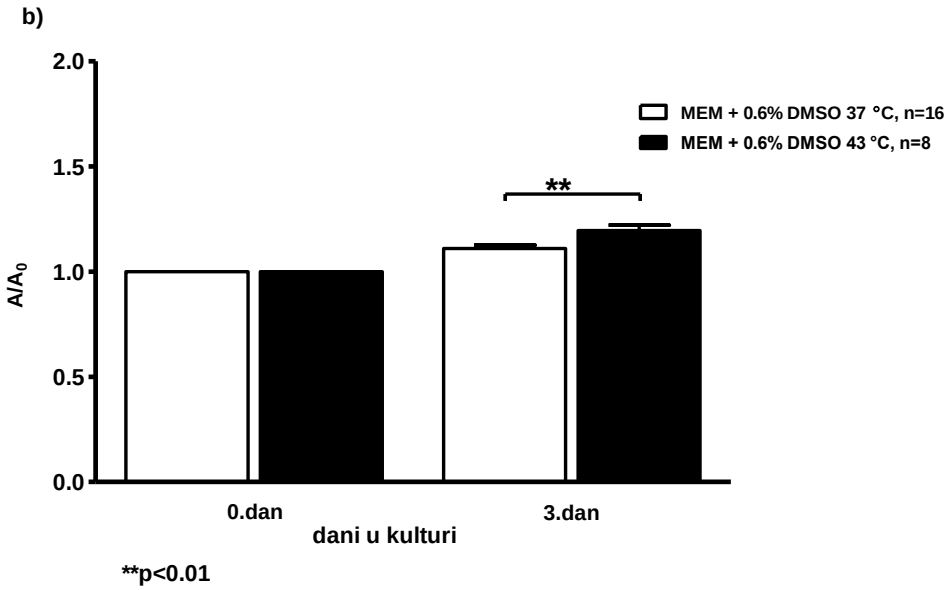
5.2.4.1.4. Utjecaj promjene temperature medija sa DMSO

U ovom poglavlju uspoređen je rast eksplantata pupoljaka udova u mediju sa koncentracijama 0.6% i 1,32 % DMSO na normotermiji i na hipertermiji. Analiza rasta pokazuje da kod koncentracije DMSO od 0.6% u mediju prednji i stražnji eksplantati pupoljaka udova koji su ujedno tretirani i kratkotrajnom hipertermijom od 43 ºC 15 minuta značajno bolje rastu od onih na normotermiji (Slika 49.) u istom mediju ($p<0.01$).

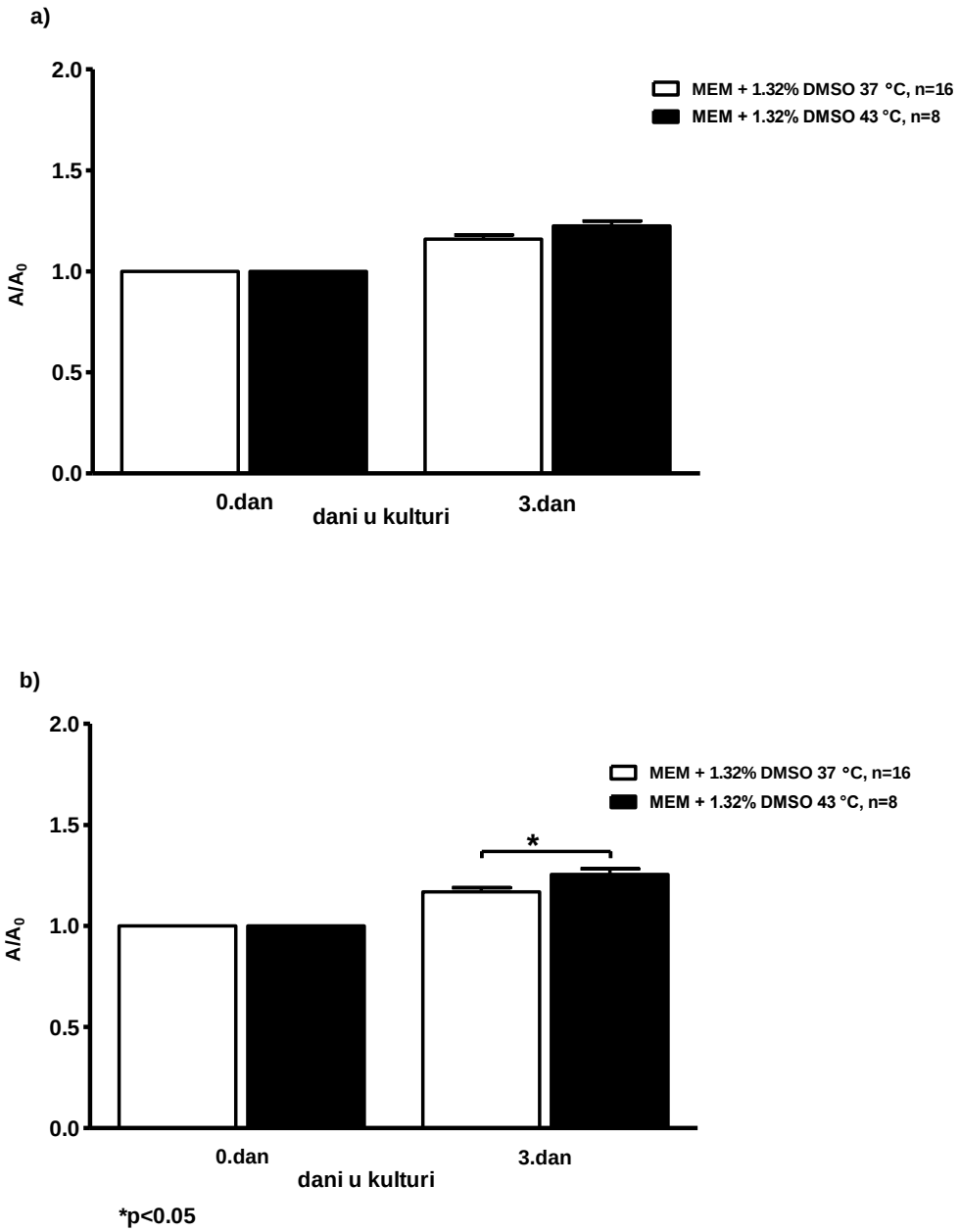
Ipak, kod koncentracije DMSO od 1,32% u mediju, razlika u rastu se smanjuje, jer eksplantati prednjih pupoljaka udova više nisu statistički značajno veći od onih na

normotermiji, dok stražnji eksplantati ostaju veći (Slika 50.), no statistička značajnost se smanjuje ($p<0.05$).





Slika 49. Rast eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u MEM-u sa dodatkom 0.6% DMSO uz primijenjenu kratkotrajnu hipertermiju. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.



Slika 50. Rast eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u MEM-u sa dodatkom 1,32% DMSO uz hipertermiju. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

5.2.4.2. UTJECAJ 5-AZACITIDINA I PROMJENE TEMPERATURE

Eksperimenti sa 5-azacitidinom dodanim u medij sa serumom i bez seruma napravljeni su na normotermiji, hipertermiji i hipotermiji te je ovdje uspoređen rast 3. dana kulture na sve tri temperature u medijima sa 5-azacitidinom.

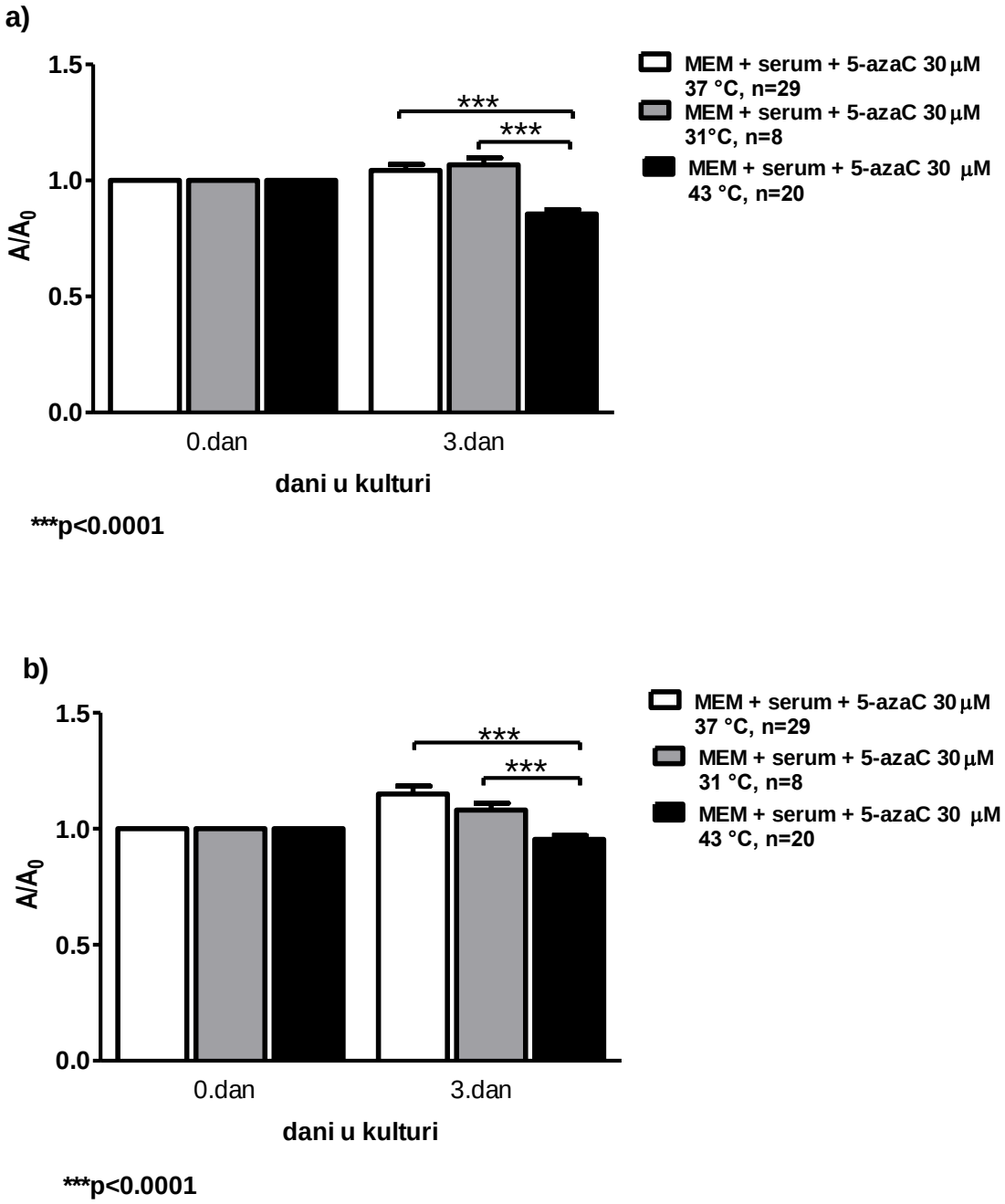
U mediju sa serumom i 30 μM 5-azacitidina kratkotrajna hipertermija drastično je smanjila rast 5-azacitidinom (Slika 51.) tretiranih prednjih i stražnjih eksplantata ($p<0.0001$) u usporedbi s onima na normotermiji i hipotermiji. Hipotermija nije imala efekt u 5-azacitidinom tretiranim skupinama.

U uvjetima bez seruma gdje je u medij dodano 5 μM 5-azacitidina, negativan utjecaj hipertermije kod prednjih eksplantata u mediju bez seruma se gubi jer su eksplantati tretirani hipertermijom i 5-azacitidinom (Slika 52.) čak značajno veći od kontrolnih ($p<0.05$), dok eksplantati stražnjih udova ne pokazuju značajnu razliku. Hipotermija uz 5-azacitidin nije imala efekt na rast u usporedbi s tretiranima na normotermiji. Ipak usporedbom s hipertermijom i 5-azacitidinom tretiranim eksplantatima hipotermija uz 5-azacitidin je bolje djelovala na rast nego kratkotrajna hipertermija (Slika 52.) ($p<0.001$).

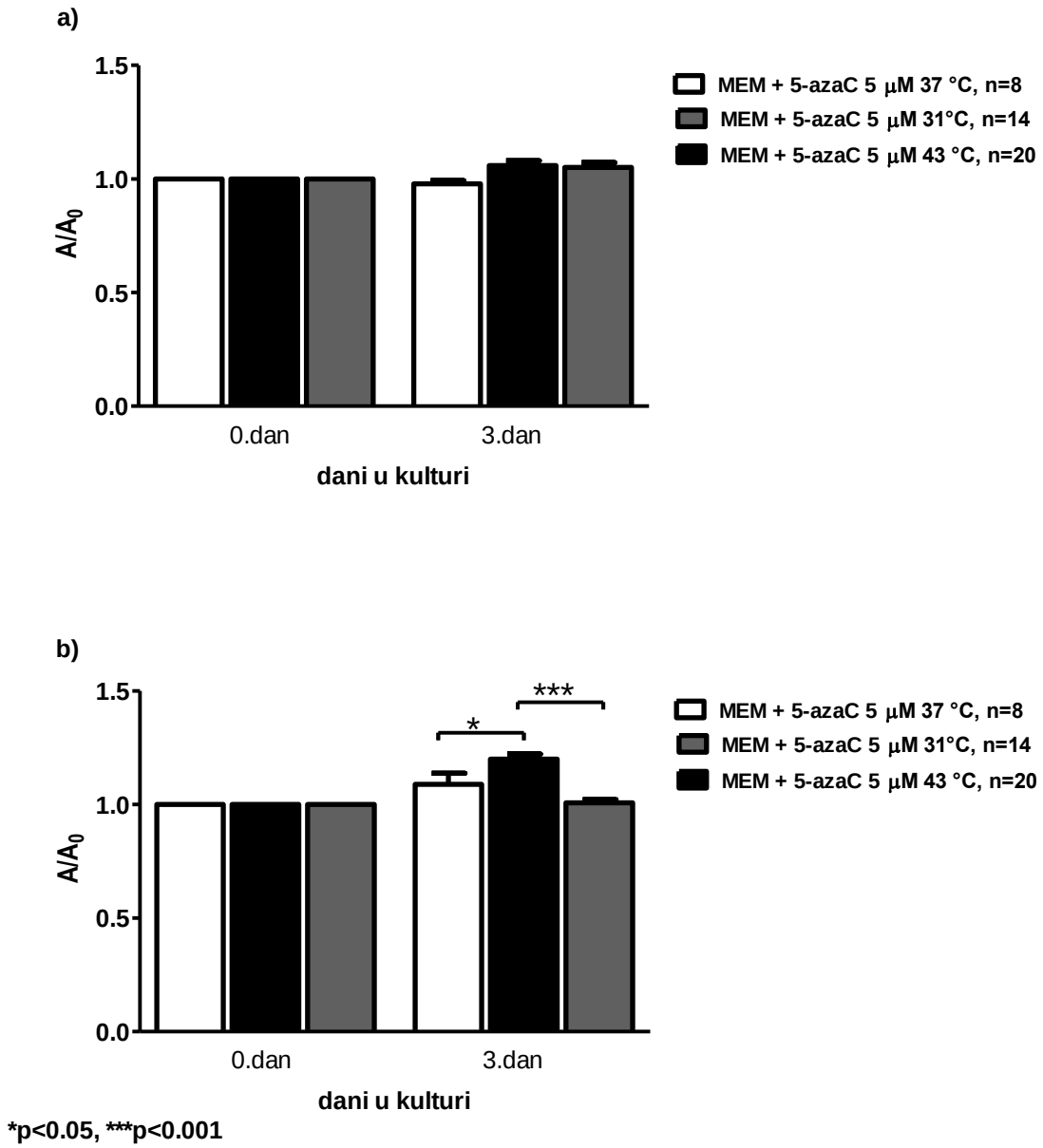
5.2.4.3. UTJECAJ TRIHOSTATINA A I PROMJENE TEMPERATURE

Kod analize utjecaja trihostatina A usporedili smo eksperimentalne skupine zasebno ovisno o koncentraciji trihostatina u mediju. Tako su uspoređeni eksplantati tretirani sa 33 nM trihostatina A na 37 i 43 °C, te oni tretirani sa 66 nM trihostatina A na 37 i 43 °C.

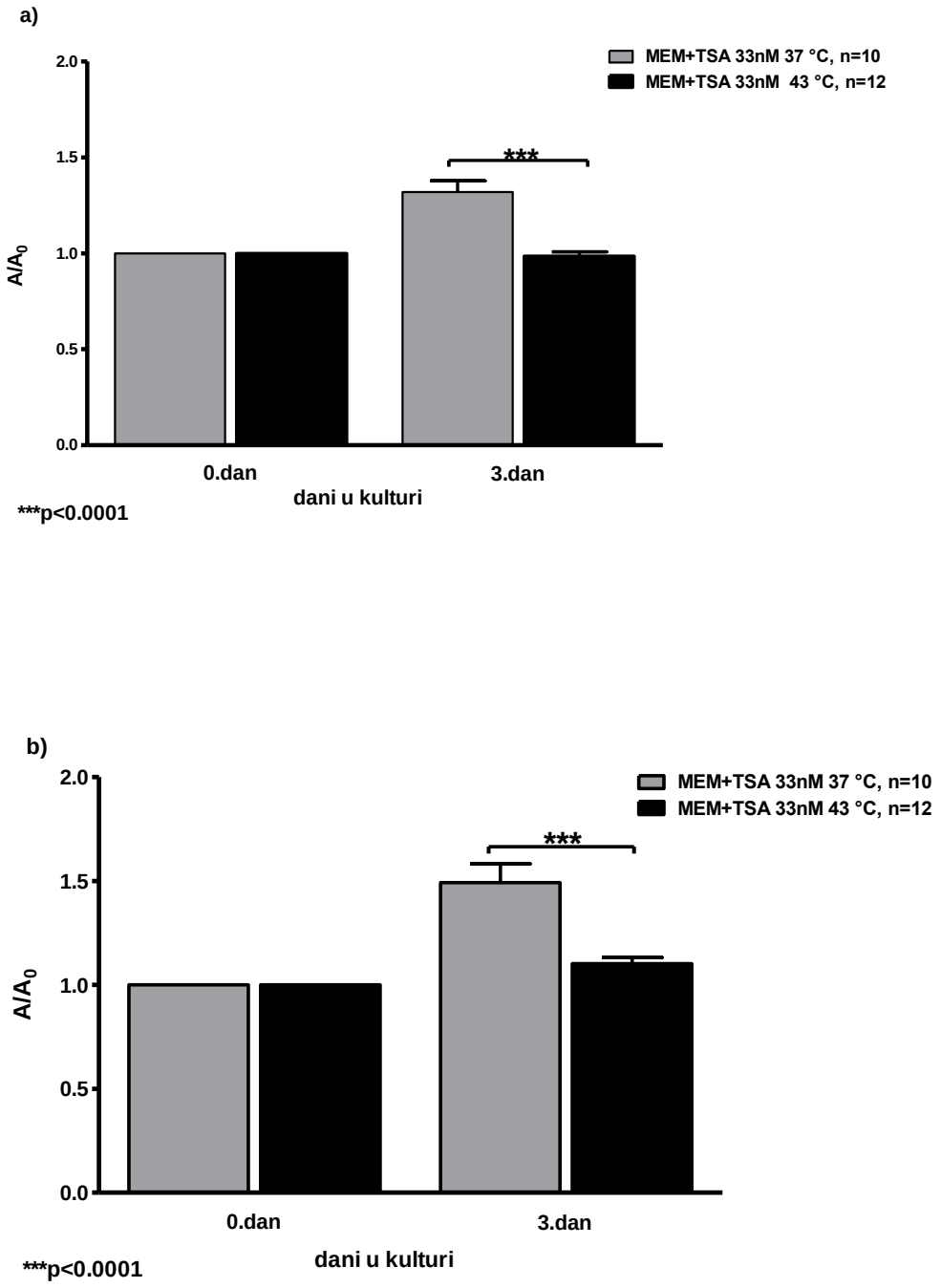
Izgleda da kod koncentracije trihostatina A od 33 nM u mediju (Slika 53.), promjena temperature prema hipertermiji poništava pozitivan učinak trihostatina A na rast i kod prednjih i stražnjih pupoljaka udova ($p<0.0001$).



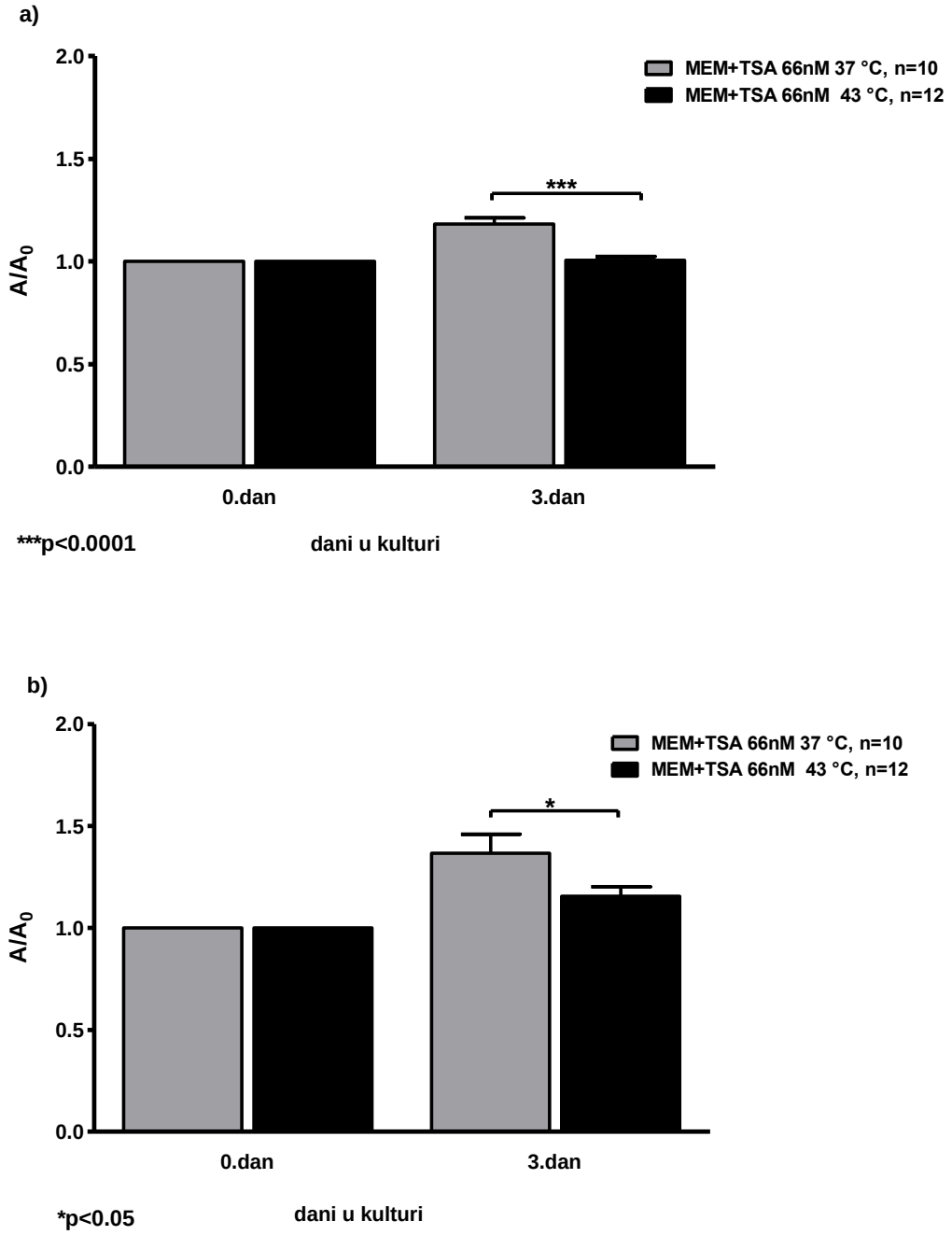
Slika 51. Usporedba rasta eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u mediju sa serumom i 30 µM 5-azacitidina 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. ANOVA.



Slika 52. Usporedba rasta eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u MEM-u i 5 μM 5-azacitidina 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. ANOVA.



Slika 53. Usporedba rasta eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u mediju sa 33 nM trihostatina A 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

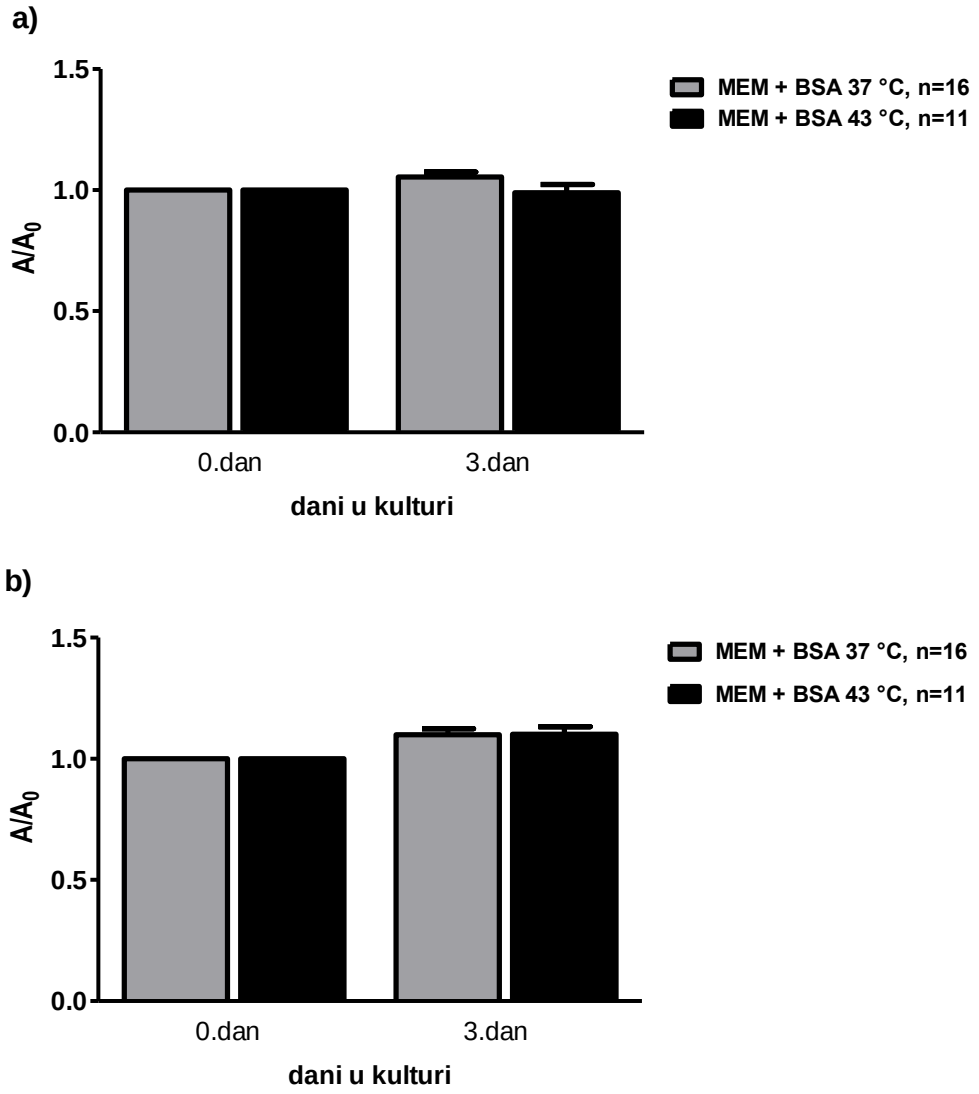


Slika 54. Usporedba rasta eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u mediju sa 66 nM trihostatina A 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji udovi. Studentov t-test.

Ako je u medij dodano 66 nM trihostatina A i primijenjena kratkotrajna hipertermija (Slika 54.), to je također poništilo pozitivan učinak trihostatina A na rast, no s nešto manjom značajnosti razlike kod stražnjih pupoljaka udova ($p<0.05$).

5.2.4.4. UTJECAJ BSA I PROMJENE TEMPERATURE

U eksperimentima sa BSA, gdje je dodatak BSA u kulturama bez seruma na normotermiji negativno utjecao na rast eksplantata, kratkotrajna hipertermija nije značajno promijenila taj učinak. Eksplantati tretirani hipertermijom i BSA nisu se značajno razlikovali od onih tretiranih na 37 ºC (Slika 55.).



Slika 55. Usporedba rasta eksplantata u ovisnosti o promjeni temperature u mediju sa BSA 3. dana kulture. a) prednji eksplantati. b) stražnji eksplantati. Studentov t-test.

6. RASPRAVA

U ovom radu uspostavljen je eksperimentalni *ex vivo* model kulture pupoljaka udova štakora starih 14 dana i testirana je njegova učinkovitost u istraživanju razvoja udova u zametku sisavaca pod utjecajem temperaturnih promjena i epigenetskih lijekova što je bio i glavni cilj disertacije.

U zametku, normalni razvoj je definiran koordinacijom različitih procesa, kao što su rast, diferencijacija, morfogeneza i stanična smrt. Među uhodanim eksperimentalnim sustavima koji istražuju ove parametre razvoja su *in vitro* modeli razvoja koji zbog izdvojenosti iz mačinog organizma (*ex vivo*) bolje otkrivaju direktni učinak vanjskih čimbenika na razvojne parametre. U *in vitro* modelu razvoja zametka gdje se mogu precizno mijenjati vanjski utjecaji (npr. točnost u primjeni određene temperature), moguća je uspješna reprodukcija pokusa, a bilo kakva genetska ili eksperimentalna manipulacija (Fernandez-Teran i Ros, 2008), uključujući i kompletni poremećaj formiranja udova, neće utjecati na preživljavanje zametka. Za istraživanje razvoja udova bez utjecaja drugih struktura zametka na razvoj u kulturi *in vitro* izolirani pupoljci udova su do sada bili kultivirani samo 3-6 dana (Freidman, 1987; De Valck i Luyten, 2001).

U modelu koji je testiran u ovoj disertaciji eksplantati pupoljaka udova 14 dana starih zametaka kultivirani su *ex vivo* na granici zraka i medija od 3 dana do dva tjedna, što je u skladu sa našim prethodnim rezultatom u kojem je otkriveno da i nakon dva tjedna kulture stanice eksplantata pupoljaka udova zadržavaju sposobnost proliferacije i diferencijacije (Mužić i sur., 2013). U takovom modelu istraženi su efekti fizikalnih i kemijskih agensa na razvoj pupoljaka udova. Istraženi su hipertermija i hipotermija te epigenetski lijekovi (demetilitajuće sredstvo 5-azacitidin i HDAC inhibitor trihostatin A) s početnom pretpostavkom da će imati negativno djelovanje na razvoj *ex vivo* radi toga jer i u drugim modelima razvoja remete njegovo odvijanje (vidi Uvod). U ovdje prikazanim rezultatima otkrivena su različita odstupanja u razvojnim parametrima pod utjecajem vanjskih faktora što upućuje na vrijednost modela u otkrivanju embriotoksičnosti i teratogenosti fizikalnih faktora i novih epigenetskih terapija.

U uspostavljenom modelu kulture pupoljaka udova kroz dva tjedna, praćen je rast eksplantata putem mjerenja promjera eksplantata tijekom kulture i normiranjem površine eksplantata prema početnoj vrijednosti izmjerenoj prilikom izolacije nultoga

dana, koja se pokazala validnom za analizu rasta (Mužić i sur., 2013). Uz rast, u disertaciji je stereološki analizirana i proliferacijska sposobnost eksplantata nakon *ex vivo* kulture korištenjem biljega proliferacije PCNA koji se upotrebljava u eksperimentalnim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima embrionalnih stanica u proliferaciji (Szabat i Rauvala, 1996; Katušić i sur., 2004; Katušić, 2008; Bulić-Jakuš i sur., 2001; Muskhelishvili i sur., 2003; Marinović-Kulišić i sur., 2011; Sobočan, 2009; 2011). Što se tiče razvoja udova, ekspresija PCNA signala također je pokazana u kulturama cijelog zametka štakora, te analizirajući samo podatke za apendikularni skeletni sustav, zametka starog 10 dana, opažena je u sklerotomu rostralnih somita (Breen i sur., 1999), a u zametku starom 15 dana ekspresija PCNA pogodna za kvantitativnu analizu u pupoljcima prednjih i stražnjih udova (Sobočan, 2009). Razlike u proliferacijskoj sposobnosti stanica eksplantiranih i kultiviranih udova detektirane su provođenjem stereološke analize ekspresije putem analize numeričke gustoće (Nv) PCNA-pozitivnih stanica (Marić i sur., 2004). Na kraju je analizirana diferencijacija tkiva u eksplantatima nakon *in vitro* kulture te nakon naknadne transplantacije *in vivo*.

Normotermija. Nakon dva tjedna kulture utvrđeno je da na uobičajenoj normotermiji tj. na 37 °C eksplantati pupoljaka i prednjih i stražnjih udova značajno bolje rastu u prisustvu 50% štakorskog seruma u mediju nego u kemijski definiranom Eaglovom MEM-u bez ikakvih proteina, što se slaže s rezultatima u dvotjednom modelu kulture gastrulirajućeg zametka (tri zametna listića) štakora (Bulić-Jakuš i sur., 1990). Ukoliko se izostavi serum, ukupni rast se značajno smanjuje, najprije kod stražnjih (od 3. dana) a potom kod prednjih udova (od 5. dana), a to smanjenje je prisutno do kraja kulture. Nakon dva tjedna proliferacijska sposobnost (Nv PCNA) je također značajno manja u obje vrste eksplantata. Ipak, u mediju bez proteina i u ovom modelu bila je moguća diferencijacija hrskavice i epidermisa što se poklapa sa rezultatima kultivacije gastrulirajućeg zametka štakora koji je također bio proveden na granici zraka i tekućine u čistom MEM-u (Škreb i Bulić, 1987). Prema tome, za proces diferencijacije hrskavice i epidermisa iz nezrelih pupoljaka udova, ni ovdje nisu presudni najbolji metabolički uvjeti sa serumom koji omogućavaju najbolji ukupni rast.

U trodnevnoj kulturi pupoljaka udova sa dodatkom BSA kao jedinog proteina, ukupni rast je čak bio manji, ali je proliferacijska sposobnost stanica značajno veća u usporedbi s onom u čistom MEM-u pa je moguće da je u međuvremenu dio stanica

propao (nekrozom ili apoptozom). Također je već trećeg dana otkrivena diferencijacija miotuba koja se u mediju bez proteina otkrila tek nakon dva tjedna. U dvotjednim kulturama gastrulirajućih zametaka dodatak BSA u MEM je pak značajno poboljšao rast i diferencijaciju miotuba, a naknadnom transplantacijom je utvrđena odlična daljnja diferencijacija mezodermalnih derivata (Bulić-Jakuš i sur., 1990; Belovari i sur., 2001).

U kultiviranim pupoljcima udova (MEM sa serumom ili čisti MEM) nismo otkrili diferencijaciju živčanog tkiva, ali nakon naknadne transplantacije u eksplantatima prethodno kultiviranima u mediju sa serumom otkriven je snop živčanih vlakana. Ovo znači da je bio sačuvan razvojni potencijal za naknadni razvoj živčanog tkiva u najboljim metaboličkim uvjetima *in vivo*. To se poklapa sa rezultatima naknadne transplantacije kultiviranog zametka štakora (faza gastrulacije) gdje je diferencijacija živčanog tkiva napredovala, ali je postotak različitih derivata SŽS-a bio značajno bolji u transplantatima prethodno kultiviranima u medijima sa serumom ili nekim proteinskim dodatkom (Belovari i sur., 2001).

Hipotermija. U disertaciji je u ovom modelu po prvi puta istraživana hipotermija kao fizikalni agens. Za potrebe eksperimenta definirana je hipotermija u termostatu za 6 ºC manje od normalne tjelesne temperature štakora (Germain i sur., 1985). Uvjeti eksperimentalne hipotermije u radu odgovarali su definiciji hipotermije tj. nižoj temperaturi tijela u trbušnoj šupljini od 35 ºC (Gilbert-Barness, 2010). Zadana temperatura u kulturi iznosila je 31 ºC što se klasificira kao umjerena hipotermija (Brown i sur., 2012) i predstavlja najnižu primijenjenu temperaturu od dosad istraženih dugotrajnih i kratkotrajnih kultura hipotermije u kulturi pupoljaka udova (Trumpp i sur., 1992), te također nižoj i od testirane temperature u kulturi s kombinacijom hipotermije i potencijalnog teratogena uopće (Smoak i Sadler, 1991).

Eksplantati štakorskih pupoljaka udova na hipotermiji su kultivirani dugotrajno, kroz dva tjedna. Ovakva, dugotrajna hipotermija od 31 ºC općenito u kulturi organotipičnog modela pupoljaka udova štakorskog zametka nije nikada istraživana. Naime, dosadašnja rijetka istraživanja hipotermije na tkivima zametka u *in vitro* uvjetima provedena su na modelu kulture cijelog zametka miša (Smoak i Sadler, 1991) i pilića (Peterka i sur., 1996), te kulturi pupoljaka udova pilića (Trumpp i sur., 1992). Humane stanice koštane srži (Shui i Scutt, 2001) i stanična kultura osteoblasta (Takaoki i sur., 2004) istražene su u uvjetima hipotermije.

Rezultati na našem modelu kulture pupoljaka udova pokazuju da dugotrajna hipotermija od 31 ºC nije imala značajan negativan utjecaj na ukupan rast eksplantata udova ni u kulturama sa serumom niti u kulturama bez seruma (Eaglov MEM) u usporedbi s kontrolama na normotermiji, pa izgleda da za postizanje optimalnog rasta tijekom dva tjedna nije presudna uobičajena normotermija koja se općenito primjenjuje u inkubatorima za *in vitro* kulture (37 ºC). Ipak, proliferacijska sposobnost stanica nakon 2 tjedna hipotermije se čini manja i u prednjih i stražnjih eksplantata kultiviranih u serumu, ali sa značajnošću samo u prednjih udova. Smanjenje proliferacijske sposobnosti čini se u skladu s pokusima na stanicama koštane srži gdje se pokazalo da nešto blaža hipotermija (33 ºC) smanjuje proliferaciju (Shui i Scutt, 2001). U uvjetima bez seruma (MEM) sposobnost proliferacije stanica na hipotermiji je pak značajno veća u eksplantatima stražnjih udova. Ovo je teško komentirati radi razlike u metaboličkoj kvaliteti medija i obzirom na to da stražnji udovi u trenutku eksplantacije malo zaostaju u razvoju za prednjim udovima (Rugh, 1968). Također, u njima nakon kulture prevladava nediferencirani mezenhim nad diferenciranom hrskavicom. Treba istaknuti da se na hipotermiji gubi negativan učinak izostanka seruma na rast čitavih eksplantata, ali je i dalje prisutno značajno smanjenje proliferativne sposobnosti (Nv PCNA) u slučaju izostanka seruma (kultiviranje samo u MEM-u) u prednjim eksplantatima, a u stražnjim je proliferativna sposobnost stanica čak veća od one u mediju sa serumom na 31 ºC. Hlađenje kulture stanica slične osteoblastima MC3T3-E1 tijekom 1 minute na 4 ºC potaknulo je ekspresiju gena (c-fos) uključenog u aktivaciju staničnog ciklusa (Takaoki i sur., 2004). Ovaj rezultat pokazuje da parametar ukupnog rasta i proliferativna sposobnost stanica na kraju perioda kultivacije u ovom modelu ipak nisu uvijek u apsolutnoj korelaciji kao što je to prije pokazano (Mužić i sur., 2013).

Razlika u diferencijaciji na hipotermiji u ovom radu nije ustanovljena, pa izgleda da uobičajena normotermija nije presudna niti za optimalnu diferencijaciju. Naši rezultati poklapaju se s istraživanjima drugih utoliko što je i *in vitro* model kulture cijelog zametka miša (10 dana starosti) iskazao minimalnu osjetljivost ranog stadija pupoljka udova na hipotermiju. Na kratkotrajno (24 sata) izlaganje hipotermiji od 32 ºC, dokazan je samo zaostatak rasta ranog stadija pupoljka udova, bez dismorfoloških promjena. Druga testirana temperatura od 35 ºC/24 sata nije bila

teratogena za rani stadij pupoljka uda (Smoak i Sadler, 1991). Ipak, ovdje se radilo o kraćoj hipotermiji od naše dvotjedne.

Na čitavim zamecima pilića testirani su pragovi dugotrajne hipotermije do 9 dana kulture (Peterka i sur., 1996). Prvi prag od 31 ºC usmrtio je sve zametke zbog defekata SŽS, drugi na 32 ºC kod preživjelih uzrokovao je malformacije (mikroftalmija, defekti trbušne stijenke, regresija kaude i hiperlordoza), dok je u trećem na 33 ºC bilo zametaka i bez malformacija, ali snižene težine. Kako se ovdje radilo o čitavim zamecima, možemo reći da su izolirani pupoljci udova puno otporniji na sniženje temperature od čitavih zametaka, pa nismo primjetili potpuno propadanje na hipotermiji kao u čitavim zamecima u kojima je razvoj daleko kompleksniji i u kojima se razvijaju tkiva poput živčanog koje nije pronađeno u našem sustavu, a ovdje nismo istraživali ostatni potencijal za diferencijaciju. Dugotrajna temperatura od 33 ºC u kulturi *in vitro* kroz 10 dana na staničnoj liniji humanih stanica koštane srži, gotovo je inhibirala biljeg alkalnu fosfatazu i mineralizaciju vanstaničnog matriksa (Shui i Scutt, 2001). Animalne i humane studije pokazale su smanjenje ukupnog broja i histomorfološke promjene alotransplantiranih zrelih hondrocita nakon čuvanja u uvjetima hipotermije od 4-6 ºC u kulturi dužoj od 20 dana (Malinin i sur., 2006).

Hipertermija. U ovom modelu je primijenjena kratkotrajna hipertermija kao jedan od mogućih modulatora razvoja u *ex vivo* uvjetima. Na modelu kulture cijelog zametka, zaostajanje u razvoju i povećana ekspresija HSP, pojavila se već pri povišenju od 1,5 ºC iznad normalne temperature u inkubatoru kulture štakora *in vitro* (Barnett i sur., 1990). Naša pretpostavka je bila da će kratkotrajna hipertermija možda negativno djelovati u ovom modelu kulture pupoljaka udova jer je to pokazano na čitavim zamecima koji su izloženi istom tretmanu (43 ºC 15 minuta) i razvili malformacije (Mirkes, 1985). S druge strane u dvotjednoj *in vitro* kulturi zametnog štita štakora kratkotrajni tretman hipertermijom od 15 minuta može čak i poboljšati rast (Katušić, 2008). Istraživanje u kulturi organa izoliranih kostiju metatarzusa stopala tek okoćenih miševa pokazalo je također da kosti bolje rastu u uvjetima hipertermije nego li u uvjetima hipotermije. Kako se radilo o modelu *ex vivo* izolirane kosti u kojemu je isključen utjecaj cirkulacije, pokazalo se da temperatura direktno modulira rast stanica i ekstracelularnog matriksa hrskavice netom po ekspoziciji, a ne tkivna perfuzija ili sistemski hormonalni odgovor. Time je dan važan doprinos

razumijevanju Allenovog pravila prema kojemu su uši, udovi i repovi životinja iz hladnije klime kraći od onih koji žive u toplijim predjelima (Serrat i sur., 2008).

U našem modelu kratkotrajna hipertermija primijenjena je jednokratno na početku kuture (43 ºC 15 minuta), a kulture pupoljaka udova su trajale 3 dana, da se čim prije ustanovi direktan učinak kratkotrajnog tretmana na ukupan rast i proliferaciju, koji bi se možda izgubio nakon 2 tjedna. Otkrili smo da se ekspresija H3K9ac tj. acetiliranog histona H3 nakon trodnevne kulture sa hipertermijom u čistom MEM-u javlja u mitotičkim stanicama mezenhima, a u susjednom području je nađena masivna apoptoza. Hiperacetilacija histona H3 (Cimini i sur., 2003) u mitozi onemogućava razdvajanje sestrinskih kromatida i uzrokuje oštećenja segregacije kromosoma, pa bi bilo moguće da te stanice propadaju apoptozom radi onemogućavanja fiksiranja mutacija (opasnost od tumorigeneze). Za razliku od hipotermije, u kulturama sa serumom nakon 3 dana kratkotrajna hipertermija imala je značajno negativan utjecaj na rast eksplantata oba pupoljka udova, a slično je bilo i u kulturama sa BSA kao jedinim proteinom u MEM-u. U uvjetima bez seruma i proteina u MEM-u taj utjecaj hipertermije nije se mogao otkriti vjerojatno zbog samog negativnog učinka izostanka seruma na rast koji je pokazan kako u dosadašnjim istraživanjima (Bulić-Jakuš i sur., 1990) tako i ovdje na normotermiji. No proliferacijska sposobnost (Nv PCNA) nakon 3 dana u hipertermijom tretranim kulturama je čak značajno bolja i u kulturama sa serumom i bez seruma u MEM-u i u MEM-u sa BSA. Ovakvi rezultati razlikuju se od onih dobivenih na kratkotrajnim kulturama zametaka gdje je hipertermija inhibirala rast i proliferaciju. Tako zameci stari 10 dana kultivirani na povišenoj temperaturi od 42 ºC u trajanju od 15 minuta ne pokazuju promjenu u ekspresiji PCNA nakon 5, 8 ili 18 sati, ali pokazuju smanjenje broja mitotičkih figura nakon 5 sati (Breen i sur., 1999). Kratkotrajna hipertermija uzrokovala je smanjenje diobe stanica vjerojatno zbog smrti stanica i negativnog utjecaja hipertermije na ravnotežu procesa proliferacije i apoptoze tijekom morfogeneze (Breen i sur., 1999). Par godina kasnije to je opet pokazano u kulturi cijelog zametka miša starog 9 dana inkubiranih na 43 ºC kroz 13 minuta, gdje se također 5 sati od izlaganja povećao se broj biljega apoptoze (pocijepana kaspaza-3 i TUNEL) u odnosu na kontrolu (Umpierre i sur., 2001). Na modelu kulture zametka štakora starog 9,5 dana i hipertermije, pak nije bilo razlike u ekspresiji PCNA prema kontroli (Katušić, 2008), no ovdje je kultura trajala puna dva tjedna.

I ovdje se, kao i na normotermiji nakon 3. dana opaža negativan utjecaj izostanka seruma na rast i proliferaciju kod obje vrste eksplantata, što potvrđuje važnost dodatka 50% štakorskog seruma za razvoj udova *in vitro*, slično kao i u kod kulture gastrulirajućeg zametka (Bulić-Jakuš i sur., 1990; Katušić, 2008).

Što se tiče diferencijacije, u našem modelu se odvija čak i malo bolje pod hipertermijom slično kao i u modelu sa zametnim štitom (Katušić, 2008).

Temperatura i epigenetski lijekovi. Koristeći uspostavljeni model razvoja pupoljaka udova *ex vivo* pokazali smo učinke udruženog djelovanja temperature i epigenetskog lijeka. Ovo se slaže sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da kombinacija topline s drugim fizikalnim i medikamentoznim agensima interferira s razvojem zametka, smanjujući ili potičući učinak. Naime, neteratogene doze slijedećih agensa uzrokuju malformacije fetusa sinergističkim teratogenim djelovanjem s hipertermijom: vitamin A, arsen, olovo, alkohol, endotoksin, röntgen i posebice ultrazvuk s naglaskom na oprez kod ultrazvučnog pregleda febrilnih majki (Edwards, 2006; Katušić, 2008). Hipertermija je pokazala da može djelovati i protektivno pa je nađeno da hipertermija anulira djelovanje kadmija kao teratogena (Kapron i Trasler, 1997). Termoprotektivno u kombinaciji s hipertermijom djeluju folati, antioksidansi - glutation ili vitamin E i antipiretici (acetilsalicilna kiselina). Acetilati zbog inhibicije ciklooksigenaze i sinteze prostaglandina će djelovati termoprotektivno samo kod već započetog upalnog odgovora, dok korištenje prije razvoja hipertermije ometa stanični odgovor na toplinski šok (Edwards, 2006).

Normotermija i 5-azacitidin. Uspostavljeni model dvotjedne *ex vivo* kulture pupoljaka udova primjenjen je u istraživanju teratogenosti 5-azacitidina. U kulturama pupoljaka udova u serumu, doza od 30 μM 5-azaC na normotermiji nakon 3 dana kulture značajno je smanjila rast eksplantata prednjih udova kao i proliferativni kapacitet u eksplantatima obaju udova. Slično je pokazano i u kulturama bez seruma, gdje je doza od 5 μM također značajno smanjila rast nakon 3 dana kulture. Ovdje su primjenjene različite koncentracije embriotoksičnog 5-azaC (Škreb i sur., 1993; Bulić-Jakuš i sur., 2001) tj. u kulturi bez seruma i proteína primijenjena je niža koncentracija da se ne ugrozi vijabilnost U dvotjednoj kulturi u uvjetima bez seruma 5-azacitidin čak značajno poboljšava rast u drugom tjednu kulture, no samo kod stražnjih pupoljaka udova koji su u trenutku izolacije nezreliji (Rugh, 1968). Dosadašnja istraživanja pokazala su da je kritičan period za razvoj malformacija

udova 12. do 14. dan gestacije pri *in vivo* primjeni 5-azacitidina (Sinčić i sur., 2002; Sobočan, 2009), što je potvrđeno i u našem istraživanju na pupoljcima udova *ex vivo* 13. dana starih zametaka štakora (Mužić i sur., 2013). U 15 dana starih zametaka (Sobočan, 2009) 5-azaC djelovao je antiproliferativno, a do kraja trudnoće (E20) razvile su se teške malformacije udova (adaktilija i oligodaktilija). Navode se malformacije prstiju kao što su sindaktilija (koštana i kožna), brahidaktilija, ektrodaktilija i ametatarzija u dozama od 0,4 – 0,7 mg/kg 5-azaC (Kurishita i Ihara, 2008) u jedinom istraživanju utjecaja 5-azacitidina na razvoj eksplantata pupoljka udova štakora, pored našeg (Mužić i sur., 2013). Istraživanje na primarnim humanim hondrocitima otkrilo je da je 5-azaC promijenio signalizaciju u stanici i omogućio sazrijevanje zglobne hrskavice (Zuscik i sur., 2004).

U našem sustavu 5-azacitidin na normotermiji nije djelovao na diferencijaciju koja je također napredovala u naknadnim transplantatima.

Hipotermija i 5-azacitidin. U kulturama sa serumom, hipotermija uz 5-azacitidin nakon 3 dana nije značajno utjecala na rast kao na normotermiji, dok je u kulturama bez seruma pojačala negativni učinak 5-azacitidina pa su eksplantati bili značajno manji. Hipotermija primijenjena uz 5-azaC također je značajno smanjila proliferativnu sposobnosti stanica u kulturama sa serumom i bez seruma. Prema tome, čini se da se u kulturama bez seruma bolje iskazao antiproliferativni učinak 5-azaC poznat i iz drugih *in vitro* sustava (Montesano i sur., 2013).

Gotovo da i ne postoje studije o kombiniranom učinku hipotermije i potencijalnog teratogenog agensa. Smoak i Sadler istraživali su teratogeni učinak udružene hipotermije i hipoglikemije u modelu cijelog zametka miša (9 dan stari u fazi neurulacije), koji često kohabitiraju pri hiperinzulinemiji. Hipotermija je djelovala protektivno na učinak hipoglikemije i smanjila dismorfološke promjene (Smoak i Sadler, 1991). Intervencije u medij kulture na niskim temperaturama, utjecale se na svojstva stanica u kulturi. Tako je promjena medija osteohondralnog tkiva štakora utjecala je na smanjenje histoloških deformacija, analiziranih nakon 7 dana krio prezervacije (Onuma i sur., 2009). Par godina kasnije ista grupa autora, poboljšala je kvalitetu istoga tkiva nakon tri tjedna čuvanja na 4 ºC dodatkom alogenog seruma u medij. Smatraju da su serumski antioksidansi (vidi 1.4.) i snažni osmolarni agensi zaslužni za očuvanje hondrocita, posebno albumin s objedinjenim svojstvima (Onuma i sur., 2012). Slično, dodatak derivata borne kiseline ljudskim matičnim

stanicama zametka zuba, čuvanih do 72 sata u hladnim uvjetima, poboljšao je diferencijaciju osteoblasta i hondroblasta u odnosu na kontrolu (Demirci i sur., 2014).

Hipertermija i 5-azacitidin. Kada smo uz 5-azacitidin primijenili kratkotrajnu hipertermiju od 43 ºC 15 minuta, nakon 3 dana kulture opaženo je njeno sinergističko značajno negativno djelovanje na rast, no samo u kulturama sa serumom. Drastično smanjenje ukupnog rasta nakon kratkotrajno primijenjene hipertermije odraz je kompromitiranog preživljenja, jer su nakon 3 dana eksplantati bili potpuno nekrotični. Znači da je u mediju sa serumom, u kojemu je na normotermiji rast najbolji, kombinacija povišene temperature i epigenetskog lijeka izazvala aditivni efekt dvaju teratogenih agensa koji kada djeluju samostalno ne izazivaju takav drastičan efekt. Budući da su po svojoj metaboličkoj vrijednosti kulture sa serumom najsličnije *in vivo* uvjetima, moguće je da bi ovakva kombinacija hipertermije i 5-azacitidina mogla također *in vivo* imati značajan negativni učinak što je važno znati radi izbjegavanja ovakvih efekata u humanoj trudnoći.

U kulturama sa 5-azaC u mediju bez seruma hipertermija nije pokazala takav efekt, diferencijacija se odvila normalno, a proliferacija stražnjih udova je bila čak i značajno veća nego u normotermiji i hipotermiji.

5-azacitin i PBN na različitim temperaturama. Kombinirani utjecaj epigenetskih lijekova i hipotermije u kulturi do sada nije bio istražen, ali nije istražena ni kombinacija hipotermije i antioksidansa, te kombinacija hipotermije, epigenetskog lijeka i antioksidansa koju smo ovdje proveli. Naime, otkriveno je da antioksidansi mogu ublažiti toksičnost epigenetskih lijekova pa je pokazan i njegov protektivni učinak na razvoj u kombinaciji s 5-azacitidinom (Sobočan, 2011) gdje je poboljšao rast cijelog zametka štakora *in vivo*. Međutim pozitivan predtretman s PBN pokazao je tkivnu specifičnost, tako u hrskavici nije nađeno povećanje proliferacije, dok je u parenhimu jetre ona bila uvećana. Protektivni učinak antioksidansa PBN-a u prethodnim radovima ukazuje na to da 5-azaC vjerojatno djeluje na povećanu proizvodnju slobodnih radikala, koja ne mora biti podjednaka u svim tkivima i organima. Objašnjenje se povezuje s avaskularnim tkivom hrskavice i nedostatkom krvne perfuzije (Sobočan, 2011). Tkivna specifičnost proizvodnje ROS molekula potvrđena je distribucijom radioaktivnog derivata talidomida u *in vivo* pokusu (Schmahl i sur., 1996), a poznato je da je teratogenost talidomida vezana uz alteraciju intracelularnih redoks procesa (Hansen i sur., 2002; Vargesson, 2009;

Hansen i Harris, 2013; Tiboni i Ponzano, 2014). Naime, akumulacija radiofarmaka favorizirala je udove u odnosu na druge embrionalne regije. U drugome istraživanju s talidomidom (Parman i sur., 1999) pozitivan predtretman s PBN-om pokazao je i specifičnost vezano uz vrstu sisavaca, što je kasnije dokazano varijabilnošću generiranja ROS molekula u stanicama pupoljaka udova po vrstama (Hansen i sur., 2002). Pupoljci udova nekih glodavaca, uključujući štakora, neosjetljivi su na djelovanje talidomida, vjerojatno zbog boljeg redoks statusa i manje količine slobodnih intracelularnih ROS molekula. Za sada se još ne zna koji je mehanizam primarne neosjetljivosti, bolji redoks potencijal, nedostatak selektivnog transporta ili vezivanje talidomida u embrionalnim udovima glodavaca.

Visoka koncentracija ROS povezana je s apoptozom u interdigitalnim regijama pupoljka uda (Schnabel i sur., 2006). U fiziološkoj morfogenezi uda endogena retinoična kiselina inducira apoptozu i povećava koncentraciju ROS (Schnabel i sur., 2006). Važnost ROS za morfogenezu uda, potvrđuje pokus u kojem se dodatkom antioksidansa u kulturu smanjila apoptoza i regresija interdigitalnog mezenhima (Salas-Vidal i sur., 1998; Schnabel i sur., 2006).

Nadalje, prema novijim studijama za razvoj su važni i oksidacijski procesi (Filomeni i Ciriolo, 2006) i njihov odnos naspram rasta stanice, diferencijacije i apoptoze tijekom embriogeneze. U normalnom embrionalnom razvoju više je staničnih reakcija i molekula ovisno o kisiku (vidi 1.4). Potvrđeno je da finalni produkti niza fizioloških oksidacijskih reakcija, odnosno reaktivne molekule kisika ili slobodni kisikovi radikali, indirektno i direktno sudjeluju u skoro svim staničnim signalnim putevima (Covarrubias i sur., 2008; Hernández-García i sur., 2010; Montagna i sur., 2014). Ove spoznaje otvorile su put istraživanjima ROS-a u embrionalnom razvoju. Dokazano je da neki ROS posreduju u intrastaničnoj komunikaciji (Owusu-Ansah i Banerjee, 2009) tijekom razvoja, a parakrina komunikacija ROS-a (Covarrubias i sur., 2008) potvrđena je na stanicama (Lim i sur., 2014) srca *Drosophile* (vidi 1.4.).

U kulturi zametaka štakora (troslojni zametni štit) na granici tekućine i zraka, PBN je poboljšavao rast u MEM-u u kojem nedostaju proteini koji bi je štitili od slobodnih radikala (Liu i sur., 2012). Na normotermiji u našem modelu razvoja pupoljaka udova u MEM-u sa PBN-om nije opažena značajna pozitivna razlika u rastu odnosu na MEM pa se ovaj model čini otpornijim na ROS.

Dodatak PBN-a u medij s 5-azacitidinom nije imao protektivni učinak u odnosu na 5-azacitidinom tretirane eksplantate što se tiče ukupnog rasta, no na hipotermiji su 5-azacitidinom i PBN-om tretirani eksplantati bili 3. dana kulture značajno veći od tretiranih samo sa 5-azaC, pa se može govoriti o protektivnom učinku ovog antioksidansa u uvjetima hipotermije u mediju bez seruma. Na hipertermiji, PBN primijenjen uz 5-azaC u MEM-u nije imao značajan učinak na rast a eksplantati su preživjeli kao i ostali eksplantati u mediju bez seruma. U uvjetima normotermije i hipotermije PBN poboljšava diferencijaciju hrskavičnog i mišićnog tkiva što je pokazano i u kulturama mioblasta (Hansen i sur., 2007).

Trihostatin A i normotermija. U disertaciji je po prvi puta u kulturama pupoljaka udova istražen i učinak epigenetskog lijeka trihostatina A (TSA) koji je zbog svog djelovanja - inhibicije histonskih deacetilaza (HDACi) opisan i kao potencijalni teratogen (Schuman, 2010). Trihostatin A istraživan je u kulturama bez seruma, gdje je dodan u koncentracijama 33 nM, odnosno 66 nM. Naši rezultati ukazuju da trihostatin A značajno poboljšava ukupni rast eksplantata tijekom dva tjedna kulture na normotermiji u obje koncentracije, što je pokazano za HDACi u *in vivo* studijama (Nervi i sur., 2001). No usprkos tome, nakon 2 tjedna kulture taj se učinak transformira u negativni efekt na preživljenje jer su eksplantati bili potpuno nekrotični. Dakle, ovaj specifični model dugotrajne kulture pupoljaka udova pokazao se dobrim za proučavanje teratogenosti TSA koji se ne može vidjeti kod *in vivo* modela (Nervi i sur., 2001) ili u staničnoj kulturi u istraživanju TSA (Paradis i Hales, 2012).

Trihostatin A i hipertermija. Kada je uz TSA primijenjena i kratkotrajna hipertermija, pozitivan učinak TSA na rast nakon 3 dana izostaje kod obje koncentracije, te su eksplantati čak i značajno manji od onih tretiranih samo hipertermijom. Smanjenje rasta u hipertermijom i TSA tretiranim eksplantatima ima za posljedicu i značajno smanjenje proliferativne sposobnosti (Nv PCNA) u odnosu na kontrolu. S druge strane u hipertermiji je hiperacetilacija histona H3 (H3K9ac) obilnija pod utjecajem trihostatina A nego u kontrolama bez trihostatina A što upućuje na to da je trihostatin A u ovom modelu iskazao svoju aktivnost inhibitora histonske deacetilaze (HDACi). Dakle, 3. dana kulture TSA uz hipertermiju pokazuje drukčiji teratogeni efekt nego na normotermiji jer smanjuje rast i proliferativnu sposobnost, iako eksplantati preživljavaju trodnevni tretman. Da li je moguće da prežive i do kraja dvotjedne kulture, trebalo bi dalje istražiti. Što se tiče diferencijacije izostao je razvoj

skeletnog mišića (miotuba) za koje se zna da su osjetljive na epigenetsku regulaciju u razvoju (Hupkes i sur., 2011).

Otapalo dimetil sulfoksid (DMSO) u širokoj je upotrebi za otapanje supstanci netopljivih u vodi, služi i za krioprezervaciju različitih tipova stanica. Za DMSO se zna da pokazuje biološki aktivno djelovanje, čini se preko promjene epigenetskog statusa (hiper- i hipometilacija DNA) za razliku od TSA koji acetilira histone. Dodatak 0.02-1.0% DMSO u kulturi *in vitro* potaknuo je epigenetske modifikacije i povećao razinu DMNT3 ekspresije usporedno s povećanjem doze što je uzrokovalo anomalije razvoja embrioidnih tjelešaca (Iwatani M i sur., 2006).

Kako je trihostatin A korišten u eksperimentima otopljen u otapalu DMSO, dodatno je istražen i mogući utjecaj većih koncentracija samog otapala DMSO na razvoj pupoljaka udova. Istraživane su dvije koncentracije DMSO (0.6% i 1,32%) dodane u medij za kulturu (MEM). DMSO u mediju poboljšao je ukupni rast obaju eksplantata u dvotjednoj kulturi u kulturi bez seruma u usporedbi s kontrolama u MEM-u. Nadalje, pokazano je i da povišenje koncentracije nema značajno jači učinak jer je veći rast opažen kod koncentracije od 0.6% DMSO.

Rezultati ovog istraživanja mogli bi biti od važnosti za moguću primjenu u liječenju bolesti koštano-zglobnog sustava primjenom hipertermije, hipotermije ili tkivnog inženjerstva, posebice poznavajući svjetski javnozdravstveni problem kroničnih bolesti sustava za kretanje (Terzic i sur., 2013; Terzic i Nelson, 2013). Regenerativna rehabilitacija (Perez-Terzic i Childers, 2014) novi je pojam u fizikalnoj medicini i rehabilitaciji. Novim načinima regenerativnog liječenja i primjenom u praksi bavi se cijeli suplement zadnjeg broja *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* (11/2014), kao i drugi časopisi (Ambrosio i sur., 2010). Za dobro dizajniranje strategija regenerativne medicine potrebno je detaljno poznavanje razvojnih parametara (proliferacija, diferencijacija), a isto tako i poznavanje razvojnog potencijala koji se može još dodatno iskazati tek nakon transplantacije *in vivo* te vanjskih čimbenika koji mogu na njih utjecati.

Što se pak tiče novih epigenetskih terapija i temperaturnih promjena, promjene razvojnih parametara koje smo otkrili pod njihovim utjecajem u razvijenom originalnom modelu od značaja je za bolje razumijevanje mogućih teratogenih nuspojava udruženih fizikalnih i medikamentoznih terapija.

7. ZAKLJUČCI

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. U uspostavljenom *ex vivo* modelu pupoljci udova štakora u mediju sa serumom i kemijski definiranim medijima preživljavaju, ukupni rast je podjednak i dobro se diferenciraju u dvotjednoj kulturi na normotermiji (37 ºC) i hipotermiji (31 ºC) što znači da normotermija nije potrebna za optimalno preživljenje, ukupni rast i diferencijaciju.
2. Što se tiče sposobnosti za proliferaciju manja je na hipotermiji u odnosu na normotermiju što znači da za bolju ostatnu sposobnost za proliferaciju nakon dva tjedna kulture treba normotermija.
3. U trodnevnoj kulturi na hipertermiji (43 ºC) je sposobnost za proliferaciju značajno veća, a i diferencijacija čini se nešto boljom i sve to neovisno o mediju (tj. i sa serumom i bez ikakvih proteina u MEM-u) iako je ukupni rast bio smanjen u odnosu na normotermiju. Može se zaključiti da sposobnost za diferencijaciju hrskavice, miotuba i orožnjelog mnogoslojnog pločastog epitela (epidermis) u ovom modelu ne ovisi o optimalnom ukupnom rastu.
4. BSA kao jedini protein u kemijski definiranom mediju bez seruma smanjuje ukupni rast pupoljka udova, ali povećava sposobnost za proliferaciju i to i na normotermiji i na hipertermiji u trodnevnoj kulturi. Diferencijacija je jednaka kao u serumu, bolje nego u MEM-u.
5. 5-azacitidin (DNA demetilirajuće sredstvo) je u serumu smanjio rast, diferencijaciju na svim temperaturama pa se može zaključiti da model daje konzistentan odgovor na teratogeno djelovanje 5-azaC.
6. Na hipertermiji sa 5-azaC smanjen ukupni rast u mediju sa serumom poklapa se s lošim preživljenjem što znači da parametar ukupnog rasta otkriva i negativni utjecaj na preživljenje.
7. U dvotjednoj kulturi u mediju bez seruma na normotermiji sa 5-azaC je ukupni rast posebno u stražnjim pupoljcima udova od trećeg dana nadalje značajno veći.
8. Trihostatin A smanjio ukupni rast, proliferaciju i diferencijaciju (nema miotuba) u trodnevnoj kulturi na hipertermiji, a na normotermiji je ukupni rast bio dobar ali je preživljenje bilo komromitirano u četrnaestdnevnoj kulturi. Može se zaključiti da je model dao dobar odgovor na teratogeno djelovanje trihostatina A (HDACi).

8. SAŽETAK

Cilj disertacije bio je kreiranje *ex vivo* modela razvoja pupoljaka udova sisavca bez utjecaja organizma majke u svrhu istraživanja promjene temperature i epigenetskih lijekova. Pupoljci udova 13 i/ili 14 dana stari izolirani su mikrokirurški iz zametaka štakora *Fisher* i kultivirani od 3 do 14 dana u kulturi organa sa serumom (Eaglov MEM sa 50% štakorskog seruma) ili kemijski definiranim medijima (MEM ili MEM sa definiranim dodacima) na normotermiji (37 ºC), dvotjednoj hipotermiji (31 ºC) i hipertermiji (43 ºC, 15 min, početak kulture). Mjerio se ukupni rast elipsoidnih eksplantata okularnim mikrometrom, a izračunata površina (A) je normirana na dan nasađivanja (A_0). Izračunata je numerička gustoća (Nv) imunohistokemijski detektiranog biljega stanične proliferacije (PCNA). Dio eksplantata transplantiran je pod čahuru bubrega anesteziranih mužjaka. Provedena je klasična svjetlosna mikroskopija i statistička obrada rezultata. U pokusima *ex vivo* otkriven je rast i napredak diferencijacije u hrskavicu, epidermis i miotube, a u transplantatima kultiviranim u serumu na normotermiji iskazao se ostatni potencijal za osifikaciju te diferencijaciju kožnih privjesaka i živaca. Ukupni rast, Nv PCNA i histomorfologija bili su na dvotjednoj normotermiji najbolji u kontrolama sa serumom, a najslabiji u čistom MEM-u. Na hipertermiji se iskazao negativni utjecaj na ukupni rast i to u trodnevnim kulturama sa serumom, ali je Nv PCNA bio značajno veći i u serumu i MEM-u. U dvotjednoj hipotermiji ukupan rast se nije razlikovao niti ovisno o mediju, a nije bio različit niti od onog na normotermiji. Ipak, Nv PCNA je bio značajno veći u serumu na kontrolnoj normotermiji. Epigenetski lijek 5-azacitidin u odnosu na kontrole smanjivao je rast i diferencijaciju na svim temperaturama osim na dvotjednoj normotermiji u MEM-u (5μM), gdje je rast prednjih pupoljaka čak značajno veći. Nv PCNA je značajno manji u MEM-u sa serumom pod utjecajem 5-azaC. U dugotrajnoj hipotermiji u MEM-u 5-azaC smanjuje Nv PCNA. U hipertermiji je uzrokovao nekrozu u trodnevnoj kulturi sa serumom (30μM). Trihostatin A (33nM) u MEM-u je povećao ukupni rast na normotermiji, ali bez mogućnosti preživljenja tijekom 14 dana, a smanjio rast, Nv PCNA i diferencijaciju na hipertermiji (nema miotuba). TSA je smanjio Nv PCNA na hipertermiji u trodnevnoj kulturi. U razvijenom originalnom modelu dokazan je specifičan utjecaj temperaturnih promjena i epigenetskih lijekova na parametre razvoja udova, posebno na preživljenje, ukupan rast i proliferacijski potencijal što je od značaja za bolje razumijevanje mogućih nuspojava udruženih fizikalnih i medikamentoznih terapija.

9. SUMMARY

Effects of temperature changes and epigenetic drugs on *ex vivo* rat limb bud development

Vedrana Mužić, 2015

The aim of the thesis was to create an *ex vivo* model of the mammalian limb bud development for research of temperature changes and epigenetic drugs without the influence of the maternal organism. 13 and/or 14 days old limb buds were microsurgically isolated from *Fisher* rat embryos and cultured from 3 to 14 days in culture with serum (Eagle's MEM with 50% rat serum) or chemically defined media (MEM, or MEM with defined supplements) at normothermia (37 ºC), the two-week hypothermia (31 ºC) and hyperthermia (43 ºC, 15 min applied at the beginning of culture). The overall growth of ellipsoidal explants was measured with an ocular micrometer, and the calculated area (A) was standardized on the day of plating (A_0). The numerical density (Nv) of the mmunohistochemically detected marker of cell proliferation (PCNA) was assessed. Part of explants was transplanted under the kidney capsule of anaesthetized males. A classical light microscopy and statistical analysis of the results was performed. *Ex vivo* experiments revealed the growth and progress of differentiation into cartilage, epidermis and myotubes, while grafts of explants previously cultured in serum at normothermia expressed the residual potential for ossification and differentiation of skin appendages and nerves. Overall growth, Nv PCNA and histomorphology in the two-week normothermia conditions were the best in controls with serum and most affected in pure MEM. On hyperthermia, significant negative impact on the overall growth in the three-day cultures with serum was discovered, but Nv PCNA was significantly higher in both the serum supplemented and MEM culture conditions. In the two-week hypothermia overall growth did not differ depending on the media, or of normothermia. However, Nv PCNA was significantly lower than in the control with serum at normothermia. Epigenetic drug 5-azacytidine in comparison to controls reduced the growth and differentiation at all temperatures except at two-week normothermia in MEM (5μM), where the growth of the front limb buds was even significantly higher. NvPCNA was significantly lower in MEM with serum under the influence of 5-azaC. In prolonged hypothermia in MEM, 5-azaC reduces Nv PCNA while at hyperthermia it caused

necrosis in the three-day culture with serum (30µM). Trichostatin A (33nM) in MEM increased overall growth at normothermia, but without the possibility of survival for 14 days and also decreased growth, Nv PCNA and differentiation (no myotubes) at hyperthermia. TSA reduced Nv PCNA in a three-day culture at hyperthermia. In the original model that was established specific influences of temperature changes and epigenetic drugs on the parameters of the limb development, especially on survival, overall growth, and proliferative potential were discovered. That is of importance for a better understanding of possible side-effects of combined physical and pharmacological therapy.

10. POPIS LITERATURE

1. Abart J, Brinkler G, Irlbacher W, Grebmeier J. Temperature and heart rate changes in MRI at SAR levels of up to 3W/kg. U: Abstracts of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Berkeley, CA: International Society for Magnetic Resonance in Medicine;1989:str. 998.
2. Abramowicz JS**,** Barnett SB, Duck FA, Edmonds PD, Hynynen KH, Ziskin MC*.* Fetal Thermal Effects of Diagnostic Ultrasound. J Ultrasound Med 2008; 27:541–559.
3. Adcock IM, HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents, Br J Pharmacol 2007;150: 829–831.
4. Ali-Khan SE, Hales BF. Caspase-3 mediates retinoid-induced apoptosis in the organogenesis-stage mouse limb. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2003;67(10):848-60.
5. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW i sur. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87:171.
6. Ambrosio F, Wolf SL, Delitto A i sur. Phys Ther 2010;90(12):1807-18014.
7. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2012;11(5):384-400.
8. Artal R, O'Toole M, White S. Guidelines of the American Collage of Obstetricians and Gynecologis for exersice during pregnancy and postpartum period. Br J Sports Med 2003;37:6-12.
9. Asakura H. Fetal and neonatal thermoregulation. J Nippon Med Sch 2004;71:360–370.
10. Asanami S, Shimono K. Species-level differences between mice and rats in regards to micronucleus induction with the hypothermia-inducing drug haloperidol. Mutat Res 2009;676(1-2):102-5.
11. Asanami S, Shimono K, Kaneda S. Transient hypothermia induces micronuclei in mice. Mutat Res 1998;413:7-14.
12. Asanami S, Shimono K. High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. Mutat Res 1997;390:79-83.

13. Avila AM, Burnett BG, Taye AA i sur. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. J Clin Invest 2007;117(3):659-71.
14. Barnett SB, Walsh DA, Angles JA. Novel approach to evaluate the interaction of pulsed ultrasound with embryonic development. Ultrasonics 1990;28:166-170.
15. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. Osteoarthritis Cartilage 2012;20(5):339-49.
16. Boldin M, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem 1995;270:7795–7798.
17. Belovari T, Stević N, Gajović S, Kostović-Knezević L. Differentiation and developmental potential of rat post-implantation embryo without extra-embryonic membranes cultured *in vitro* or grafted *in vivo*. Anat Histol Embryol 2004;33(2):90-95.
18. Belovari T, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Marić S, Ježek D, Vlahović M. Differentiation of Rat Neural Tissue in a Serum-free Embryo Culture Model Followed by *In vivo* Transplantation. CMJ 2001;42(6):611-617.
19. Benjamin SA, Powers BE, Hahn FF, Kusewitt DF. Radiation and Heat. U: Haschek WM, Rousseaux CG, ur. Handbook of Toxicologic Pathology (Second edition). London: Academic Press Limited, 2002, str. 589-90.
20. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature. 1987;326(6112):515-517.
21. Breen JG, Claggett TW, Kimmel GL, Kimmel CA. Heat shock during rat embryo development *in vitro* results in decreased mitosis and abundant cell death. Reprod Toxicol 1999;13(1):31-9.
22. Brinsmade AB, Rubsaamen H. Zur teratogenetischen Wirkung von unspezifischen Fieber auf den sich etwickelnden Kaninchemembryo. Beitr Path Anat 1957;117:154-164.
23. Brown DJ, Brugger H, Boyd J, Paal P. Accidental hypothermia. The New England Journal of Medicine 2012;367(20):1930–1938.

24. Buckiová D, Kubínová L, Soukup A, Jelínek R, Brown NA. Hyperthermia in the chick emryo: HSP and possible mechanisms of developmental defects. Int J Dev Biol 1998;42:737-740.
25. Bulić-Jakuš F. Epigenetika u reprodukciji i razvoju. Paediatr Croat 2013;57:312-317.
26. Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Vlahović M, Katušić A, Marinović-Kulišić S, Šerman Lj, Ježek D. Survival of rat embryonic parts after ectopic transplantation. Acta Clin Croat 2005;44:211-215.
27. Bulić-Jakuš F, Strahinić-Belovari T, Marić S i sur. Chemically defined protein-free *in vitro* culture of mammalian embryos does not restrict its developmental potential for differentiation od skin appendages. Cells Tissues Organs 2001;169:134-143.
28. Bulić-Jakuš F, Vlahović M, Crnek V, Šerman D. Model kulture *in vitro* zametka štakora u razvojnom stadiju najosjetljivijem na vanjske teratogene faktore. U: Pokusni modeli u biomedicini, M Radačić, I Bašić, D Eljuga ur., Medicinska naklada, Zagreb, 2000, str.215-222.
29. Bulic-Jakus F, Vlahovic M, Juric-Lekic G, Crnek-Kunstelj V, Serman D. Gastrulating rat embryo in a serum-free culture model: Changes of development caused by teratogen 5-azacytidine. Atla-Alternatives to Laboratory Animals 1999;27:925-933.
30. Brent RL. The effects of embryonic and fetal exposure to X-ray, microwaves and ultrasound. Clin Obstet Gynecol 1983;26(2):484-510.
31. Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82(10):3262-3266.
32. Chambers CD. Risks of hyperthermia associated with hot tub or spa use by pregnant women. Birth Defects Res Part A: Clinical and Molecular Teratology 2006;76(8):569-573.
33. Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix RJ, Jones KL. Maternal fever and birth outcome: a prospective study. Teratology 1998;58:251-257.
34. Chen CH, Du F, Xu J, i sur. Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. Theriogenology 2013;79(9):1284-1293.
35. Chen Y, Zhao X. Shaping limbs by apoptosis. J Exp Zool 1998;282:691-702.

36. Chen WP, Bao JP, Hu PF, Feng J, Wu LD. Alleviation od osteoarthritis by Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in experimental osteoarthritis, Mol Biol Rep 2010;37(8):3967-3972.
37. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2008;151(1):10-27.
38. Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L, Degrassi F. Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. Mol Biol Cell 2003;14(9):3821-3833.
39. Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A molecular approach. 6. izd. Washington DC, Sunderland (Massachussets): ASM Press, Sinauer Associates; 2013, str. 221.
40. Corsi KA, Schwarz EM, Mooney DJ, Huard J. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. J Orthop Res 2007;25(10):1261-1268.
41. Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? Dev Biol. 2008;320(1):1-11.
42. Cockroft DL. A comparative and historical review of culture methods for vertebrates. Int J Dev Biol 1997;41(2):127-37.
43. Dahn RD, Fallon JF. Interdigital regulation of digit identity and homeotypic transformation by modulated BMP signaling. Science 2000;289:438-441.
44. Darmon M, Nicolas JF, Lamblin D. 5-Azacytidine is able to induce the coversion of teratocarcinoma-derived mesenchymal cells into epithelial cells. EMBO J 1984;3:961-967.
45. Demirci S, Doğan A, Şişli B, Sahin F. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. Cryobiology. 2014;68(1):139-146.
46. De Rujiter AJ, van Gennip AH, Caron HN i sur. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J 2003;370(Pt 3):737-749.
47. De Valck D, Luyten FP. Caspase inhibition supports proper gene expression in *ex vivo* mouse limb cultures. Cell Death and Differentiation 2001;8:985-994.
48. Doblas S, Saunders D, Tesiram Y i sur. Phenyl – tert – butyl – nitrone induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. Free Radic Biol Med 2007;44:63-72.

49. Doerksen T, Trasler JM. Developmental exposure of male germ cell to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. Biol Repor 1996;55:155-162.
50. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. Molecular Reproduction and Development 1997;46**:**138–145.
51. Edwards JL, Hansen PJ. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. Biology of Reproduction 1996;55:340–346.
52. Edwards MJ. Review: Hyperthermia and fever during pregnancy. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2006;76(7):507-516.
53. Edwards MJ, Saunders RD, Shiota K. Effects of heat on embryos and foetuses International Journal of Hyperthermia 2003;119(3):295-324.
54. Edwards MJ, Walsh DA, Li Z. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. In J Dev Biol 1997;41:345-358.
55. Edwards MJ. Hyperthermia and birth defects [editorial]. Cornell Vet 1993;83:1–7.
56. Edwards MJ. Hyperthermia as a teratogen: a review of experimental studies and their clinical significance. Teratog Carcinog Mutagen 1986;6:563–582.
57. Edwards MJ, Beatson J. Effects of lead and hyperthermia on prenatal brain growth of guinea pigs. Teratology 1984;30:413-421.
58. Edwards MJ, Wanner RA, Mulley RC. Growth and development of the brain in normal and heat-retarded guinea pigs. Neuropathol Appl Neurobiol 1976;2:439-450.
59. Edwards MJ. Congenital malformations in the rat following induced hyperthermia during gestation. Teratology 1968;1:173-177.
60. Edwards MJ. Congenital defects in guinea pigs following induced hyperthermia during gestation. Arch Path 1967;84:42-48.
61. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V i sur. Methods of *in vitro* toxicology. Food Chem Toxicol 2002;40(2-3):193-236.
62. Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G, Allshire RC. Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. Cell. 1997;91(7):1021-1032.

63. Escobedo J, Pucci AM, Koh TJ. HSP25 potects skeletal muscle cells against oxidative stress. Free Radic Biol Med 2004;37(9)1455-1462.
64. Esteller M. Molecular Origins of Cancer, Epigenetics in Cancer. N Engl J Med 2008;358:1148-1159.
65. Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. EMBO J 1997;16:2271–2281.
66. Farnum CE, Lenox M, Zipfel W, Horton W, Williams R. *In vivo* delivery of fluoresceinated dextrans to the murine growth plate: imaging of three vascular routes by multiphoton microscopy. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2006;288(1):91-103.
67. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J i sur. *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADDlike domains. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:7464–7469.
68. Fernandez-Teran M, Ros MA. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. Int J Dev Biol 2008;52(7):857-871.
69. Filomeni G, Ciriolo MR. Antioxidants & Redox Signaling 2006;8(11-12):2187-2192.
70. Flint OP, Orton TC. An *in vitro* assay for teratogens with cultures of rat embryo midbrain and limb bud cells. Toxicol Appl Pharmacol 1984;76(2):383-95.
71. Floyd RA, Kopke RD, Choi CH, Foster SB, Doblas S, Towner RA. Nitrones as therapeutics. Free Radical Biology and Medicine 2008;45:1361-1374.
72. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proc Soc Exp Biol Med 1999;222(3):236-245.
73. Floyd RA**.** Protective action of nitrone based free radical traps against oxidative damage to the central nervous systen. Adv Pharnacol 1997;38:361.
74. Freidman L. Teratological research using *in vitro* systems II. Rodent limb bud culture system. Environ Health Perspect 1987;72:211–219.
75. Futscher BW. Epigenetic changes during cell transformation. Adv Exp Med Biol 2013;754:179-194.
76. Gay SW, Kosher RA. Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor

cells of the chick limb bud: Effect of prostaglandins. Journal of experimental Zoology 2005;232(2):317-326.

77. Gay SW, Kosher RA. Uniform cartilage differentiation in micromass cultures prepared from a relatively homogeneous population of chondrogenic progenitor cells of the chick limb bud: effect of prostaglandins. J Exp Zool 1984;232(2):317-326.
78. Geng Y, Li L, Dong Y, Liu X, Li XH, Ning W. Impaired elastin deposition in Fstl1/- lung allograft under the renal capsule. PLoS One 2013;8(11):e81368.
79. Germani MA, Webster WS, Edwards MJ. Hyperthermia as a teratogen: parameters determining hyperthermia-induced head defects in the rat. Teratology 1985;31:265-272.
80. Gilbert SF. Ur. Developmental Biology. 8. izd., Sauderland: Sinauer Assocites Inc.;2006, str. 505-527.
81. Gilbert RD, Schröder H, Kawamura T, Dale PS, Power GG. Heat transfer pathways between fetal lamb and ewe. J Appl Physiol (1985) 1985;59(2):634-638.
82. Gilbert-Barness E. Teratogenic Causes of Malformations. Annals of Clinical & Laboratory Science 2010;40:99-144.
83. Glucksman A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol Rev 1951;26:59–86.
84. Green AR, Ashwood T, Odergren T, Jackson DM. Nitrones as neuroprotective agent sin cerebral ischaemia, with particular reference to NXY– 059. Pharmacol Ther 2003;100:195-214.
85. Graham JM Jr, Edwards MJ, Edwards M. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. Teratology 1998;58:209-221.
86. Gregoretti IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. J Mol Biol 2004;338:17–31.
87. Grobstein C. Intra-ocular growth and differentiation of clusters of mouse embryonic shields cultured with and without primitive endoderm and in the presence of possible inductors. J Exp Zool 1952;119(3):355–379.

88. Grobstein C. Intra-ocular growth and differentiation of the mouse embryonic shield implanted directly and following *in vitro* cultivation. J Exp Zool 1951;116(3):501-525.

89. Gurrieri F, Everman DB. Clinical, genetic, and molecular aspects of splithand/foot malformation: An update. Am J Med Genet Part A 2013;161A:2860–2872.

90. Handschel JG, Depprich RA, Kübler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U. Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. Head Face Med 2007;3:4.

91. Hansen JM, Harris C. Redox control of teratogenesis. Reprod Toxicol 2013;35:165-79.

92. Hansen JM, Klass M, Harris C, Csete M. A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis—implications for regeneration in aged muscle. Cell Biol Int. 2007;31(6): 546–553.

93. Hansen JM, Harris KK, Philbert MA, Harris C. Thalidomide modulates nuclear redox status and preferentially depletes glutathione in rabbit limb versus rat limb. J Pharmacol Exp Ther 2002;300(3):768-776.

94. Hardy JD. Physiology of temperature regulation. Physiol Rev 1961;41:521–606.

95. Haro E, Delgado I, Junco M i sur. Sp6 and Sp8 Transcription Factors Control AER Formation and Dorsal-Ventral Patterning in Limb Development. PLoS Genet 2014;10(8): e1004468.

96. Haschek WM, Rousseaux CG ur. Handbook of Toxicologic Pathology. 2. izd. London: Academic Press Limited, 2002, str. 930.

97. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. Epigenomics 2010;2:657–669.

98. Hemmatazad H, Rodrigeus H, Huber LC i sur. Anti-Destrucitve Effects of Trichostatin A (TSA) Are Partly Mediated trough Altered Expression od Histone Deacetylase 7 (HDAC7). Arthritis Rheum 2009;60(10):733.

99. Hendrick AG, Stone GW, Hendrickson RV, Matayoshi K. Teratogenic effects of hyperthermia in the bonnet monkey (Macaca radiata). Teratology 1979;19:177-182.

100. Heng BC, Haider HK, Sim KW E, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage *in vitro*. Cardiovascular Research 2004;62:34-42.

101. Hernández-García D, Wood CD, Castro-Obregón S, Covarrubias L. Reactive oxygen species: A radical role in development Free Radic Biol Med 2010;49(2):130-143.
102. Hezroni H, Tzchori I, Davidi A, i sur. H3K9 histone acetylation predicts pluripotency and reprogramming capacity of ES cells. Nucleus 2011;2(4):300-309.
103. Houghton PE. Validation of an experimental model od fetal limb growth and development: practical applications for the study of fetal defects associated with therapeutica agents in pregnant women. In vitro Cell Dev Biol-Animal 1999;35:599-605.
104. Huber LC, Distler JHW, Moritz F i sur. Trichostatin A Prevents the Accumulation of Extracellular Matrix in a Mosue Model od Bleomycin-Induced Skin Fibrosis, Arthritis & Rheumatisam, 2007;56(8):2755-2764.
105. Hupkes M, Jonsson MK, Scheenen WJ i sur. Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. FASEB J 2011;25(11):3861-72.
106. Ideno H, Shimada A, Kamiunten T i sur. Search for Conditions to Detect Epigenetic Marks and Nuclear Proteins in Immunostaining of the Testis and Cartilage. Journal of Histology 2014;(2014):Article ID 658293, 8 pages.
107. Iezzi S, Di Padova M, Serra C i sur. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. Nat Med 2006;12(10):1147-1150.
108. Iida T, Suetake I, Tajima S i sur. PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. Genes Cells. 2002;7(10):997-1007.
109. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y i sur. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. Stem Cells 2006;24(11):2549-2556.
110. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. Cell 1997;88:347–354.
111. Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. Science 1988;240(4858):1544-1546.
112. Jiricny J. MutLalpha: at the cutting edge of mismatch repair. Cell 2006;126(2):239-41.
113. Jurić-Lekić G, Švajger A. Lentoid formation in ectopic grafts of lentectomized eyes of rat foetuses. Cell Differ Develop 1989;27:225-232.

114. Kališnik M. Temelji stereologije. Acta stereol 1985;4:1-148.
115. Kang HG, Ku HO, Jeong SH, Cho JH, Son SW. Evaluation of embryotoxic potential of olaquindox and vitamin a in micromass culture and in rats. Toxicol Res 2010;26(3):209-216.
116. Kaplan LD, Ionescu D, Ernsthausen JM, Bradley JP, Fu FH, Farkas DL. Temperature requirements for altering the morphology of osteoarthritis and nonarthritic articular cartilage: *in vitro* thermal aleration of articular cartilage. Am J Sports Med 2004;32(3):688-692.
117. Kapron CM, Trasler DG. Genetic determinants of teratogen-induced abnormal development in mouse and rat embryos *in vitro.* Int Dev Biol 1997;41:337-344.
118. Karmodiya K, Krebs AR, Oulad-Abdelghani M, Kimura H, Tora L. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. BMC Genomics 2012;13:424.
119. Katušić A. Primjena 5-azacitidina tijekom gestacije štakora inducira apoptozu u fetalnom testisu. Doktorska disertacija. PMF Sveučilišta u Zagrebu, 2010.
120. Katušić A. Utjecaj hipertermije na razvoj zametnog štita štakora u dvotjednoj kulturi *in vitro*. Magistarski rad. PMF Sveučilišta u Zagrebu, 2008.
121. Katusić A, Jurić-Lekić G, Jovanov-Milosević N i sur. Development of the fetal neural retina *in vitro* and in ectopic transplants *in vivo*. Coll Antropol 2008;32(1):201-207.
122. Katušić A, Šerman Lj, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Vlahović M, Kratochwil K. The expression of proliferating cell nuclear antigen and retinoblastoma protein in transplated fetal rat lacrimal gland. Acta Clin Croat 2004;43(2): 211-215.
123. Kaur K, Yang J, Eisenberg CA, Eisenberg LM. 5-azacytidine promotes the transdifferentiation of cardiac cells to skeletal myocytes. Cell Reprogram 2014;16(5):324-330.
124. Kilham L, Ferm VH. Exencephaly in fetal hamsters following exposure to hyperthermia. Teratology 1976;14:323-326.
125. Kistler A. Limb bud cell cultures for estimating the teratogenic potential of compounds. Validation of the test system with retinoids. Arch Toxicol 1987;60(6):403-414.

126. Kistler A, Howard WB. Testing of retinoids for teratogenicity *in vitro*: use of micromass limb bud cell culture. Methods Enzymol 1990;190:427-33.

127. Kochhar DM. Embryonic limb bud organ culture in assessment of teratogenicity of environmental agents. Teratog Carcinog Mutagen 1982;2(3-4):303-312.

128. Komashko VM, Farnham PJ. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. Epigenetics 2010;5(3):229-40.

129. Konieczny SF, Emerson CP Jr. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. Cell 1984;38(3):791-800.

130. Köhler T, Pröls F, Brand-Saberi B. PCNA in situ hybridization: a novel and reliable tool for detection of dynamic changes in proliferative activity. Histochem Cell Biol 2005;123(3):315-327.

131. Krausova T, Peterka M. Teratogenic and lethal effects of 2-24h hyperthermia episodes on chick embryos. J Ther Bio 2007;32:193-202.

132. Krejcí J, Uhlírová R, Galiová G, Kozubek S, Smigová J, Bártová E. Genome-wide reduction in H3K9 acetylation during human embryonic stem cell differentiation. J Cell Physiol 2009;219(3):677-687.

133. Kreshover SJ, Clough OW. Prenatal influences on tooth development. II. Artificially induced fever in rets. J Dent Res 1953;32(4):565-577.

134. Kuida K, Zheng TS, Na S i sur. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature 1996;384:368–372.

135. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. Cell 2004;117(6):721-733.

136. Kurishita A, Ihara T. Dose-related induction of digital malformation in rats by 5-azacytidine: description of the defects. Congenital Anomalies 2008;29(2):59-71.

137. Lakhani SA, Masud A, Kuida K i sur. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. Science 2006;311(5762):847-851.

138. Lander HM. An essential role of free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J 1997;11:118-124.

139. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation J Cell Mol Med 2008;12(3):743-761.

140. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease. Cell 1997;91:479–489.

141. Llano-Diez M, Gustafson AM, Olsson C, Goransson H, Larsson L. Muscle wasting and the temporal gene expression pattern in a novel rat intensive care unit model. BMC Genomics 2011;12(1):602.

142. Lecyk M. The effect of hypothermia applied in the given stages of pregnancy on the number and form of vertebrae in the offspring of white mice. Experientia 1965;21(8):452-453.

143. Lee J, Mirkes PE, Paik DJ, Kim WK. Effects of maternal hyperthermia on myogenesis-related factors in developing upper limb. Birth Defects Res A Clin Molec Terat 2009;85(3):184-192.

144. Lee NK, Choi YG, Baik JY i sur. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. Blood 2005;106,852–859.

145. Lee KK, Tang MK, Yew DT, Chow PH, Yee SP, Schneider C, Brancolini C. gas2 is a multifunctional gene involved in the regulation of apoptosis and chondrogenesis in the developing mouse limb. Dev Biol 1999;207:14–25.

146. Lessmöllmann U, Hinz N, Neubert D. *In vitro* system for toxicological studies on the development of mammalian limb buds in a chemically defined medium. Arch Toxicol 1976;36(2):169-176.

147. Levak-Švajger B, Knežević V, Švajger A. Development of separated germ layers of rodent embryos on ectopic sites: a reappraisal. Int J Dev Biol 1991;35(3):177-189.

148. Levak-Švajger B, Škreb N. Intraocular differentiation of rat egg cylinders. J Embryol Exp Morphol 1965;13(3):243-253.

149. Levitt D, Dorfman A. Control of chondrogenesis in limb-bud cell cultures by bromodeoxyuridine. Proc Natl Acad Sci USA 1973;70(8):2201-2205.

150. Li J, Stouffs M, Serrander L i sur. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. Mol Biol Cell 2006;17(9):3978–3988.

151. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. J Biol Chem. 2000;275(33):25665-25671.

152. Lim HY, Wang W, Chen J, Ocorr K, Bodmer R. ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. Cell Rep 2014;7(1):35-44.

153. Lim SO, Gu JM, Kim MS i sur. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. Gastroenterology 2008;135(6):2128-2140,2140.e1-8.

154. Liu SY, Chen CL, Yang TT i sur. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. Apoptosis 2012;17(11):1156-69.

155. Liyanage VR, Jarmasz JS, Murugeshan N, Del Bigio MR, Rastegar M, Davie JR. DNA modifications: function and applications in normal and disease States Biology (Basel). 2014;3(4):670-723.

156. Lyon R, Liu XC, Meier J. The effects of therapeutic vs. high-intensity ultrasound on the rabbit growth plate. Journal of Orthopaedic Research 2006;21(5):865-871.

157. Macaulay JH, Randall NR, Bond K, Steer PJ. Continuous monitoring of fetal temperature by noninvasive probe and its relationship to maternal temperature, fetal heart rate, and cord arterial oxygen and pH. Obstet Gynecol 1992;79:469–474.

158. Mackowiak PA, Wasserman SS, Levine MM. A critical appraisal of 98.6 degrees F, the upper limit of the normal body temperature, and other legacies of Carl Reinhold August Wunderlich. JAMA 1992;268:1578–1580.

159. Majka J, Burgers PM. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2004;78:227-260.

160. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S i sur. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 1999;103:697–705.

161. Malinin T, Temple HT, Buck BE. Transplantation od Osteochondral Allografts After Cold Storage. J Bone Joint Surg Am 2006;88:762-770.

162. Marić S, Bulić-Jakuš F, Ježek D, Jurić-Lekić G, Kos M, Vlahović M. Expression of the proliferating cell nuclear antigen and protein products of tumor supressor genes in the human foetal testis. Andrologia 36:1-7, 2004.

163. Marinovic-Kulisic S, Juric-Lekic G, Vikic-Topic M i sur. 5-azacytidine enhances proliferation in transplanted rat fetal epiglottis. Front Biosci (Elite Ed) 2011;3:581-590.

164. Martin P. Tissue patterning in the developing mouse limb. Int J Dev Biol 1990;34:323 -336.

165. McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. Gene 2011;474(1-2):1-11.

166. Mellette HC, Hutt BK, Askovitz SI, Horvath SM. Diurnal variations in body temperatures. J Appl Physiol 1951;3:665–675.

167. Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88(5):1958–1962.

168. Menegola E, Di Renzo F, Broccia ML i sur. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2005;74(5):392-8.

169. Minetti GC, Colussi C, Adami R i sur. Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. Nat Med 2006;12(10):1147-50.

170. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978;121(6):2228-2234.

171. Mirkes PE, Little SA. Teratogen-induced cell death in postimplantation mouse embryos: differential tissue sensitivity and hallmarks of apoptosis. Cell Death Diff 1998;5:592–600.

172. Misaki K, Morinobu A, Saegusa J i sur. Histone deacetylase inhibition alters dendritis cells to assume a tolerogenic phenotype and ameliorates arthritis in SKG mice. Arthritis Research & Therapy 2011;13(3):R77.

173. Miura M. Detection of chromatin-bound PCNA in mammalian cells and its use to study DNA excision repair. J Radiat Res 1999;40(1):1-12.

174. Miyajima T, Kotake Y. Spin traping agent phenyl N-tert butyl nitrone inhibits induction of nitric oxide synthase in enditoxin induced shock in mice. Biochem Biopys Res Comm 1995;215(1):114-121.

175. Miyajima T, Kotake Y. Optimal time and dosage of phenyl N–tert–butyl nitrone (PBN) for the inhibition of nitric oxyde synthase induction in mice. Free Radical Biol Med 1997;22(3):463-70.

176. Mokrý J, Němecek S. Immunohistochemical detection of proliferative cells. Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove. 1995;38(3):107-13.

177. Montagna C, Di Giacomo G, Rizza S i sur. S-nitrosoglutathione reductase deficiency-induced S-nitrosylation results in neuromuscular dysfunction. Antioxid Redox Signal 2014;21(4):570-587.

178. Montesano A, Luzi L, Senesi P, Terruzzi I. Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. Int J Biol Sci 2013;9:391-402.

179. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG ur. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 9. izd. Philadelphia: Saunders; 2011, str. 371-380.

180. Morton JP, Kayani AC, McArdle A, Drust B. The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. Sports Med 2009;39(8):643-662.

181. Mottola MF, Vanderspan D, Schachter CL, VanHeest J, Tanguay RM. Cellular accumulation of heat shock protein (Hsp) 72i in fetuses of trained rats. Cell Stress & Chaperones 2007;12(2):101-105.

182. Mozzetta C, Minetti G, Puri PL. Regenerative pharmacology in the treatment of genetic diseases: the paradigm of muscular dystrophy. Int J Biochem Cell Biol 2009;41(4):701-710.

183. Mufti G, List AF, Gore SD, Ho AY. Myelodysplastic syndrome. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003:176-99.

184. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. Histochem Cytochem 2003;51(12):1681-1688.

185. Mužić V, Katušić Bojanac A, Jurić-Lekić G i sur. Epigenetic drug 5-azacytidine impairs proliferation of rat limb buds in an organotypic model-system *in vitro*. Croat Med J 2013;54(5):489-495.

186. Nadolney CH, Chernoff N, Dixon RL, Khera KS, Krowke R, Leonov BV, Neubert D, Tabacova S. Chapter16 Potential Short-term Tests to Detect Chemicals Capable of Causing Reproductive and Developmental Dysfunction. Bourdeau P, Somers E, Richardson GM, Hickman JR, ur. U: Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. London: SCOPE, John Wiley & Sons Ltd; 1990, str. 276-286.

187. Nakae D. Inhibition by phenyl N–tert–butyl–alpha–phenylnitrone of early phase carcinogenesis int he livers of rats on a choline–deficient L amino acid defined diet. Cancer Res 1998;56:4548.

188. Nakamura C, Matsushita I, Kosaka E, Kondo T, Kimura T. Anti-arthritic effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor and the low-intensity ultrosound in the presence of microbubbles in human rheumatoid synovial cells. Rheumatology 2008;47:418-424.

189. Narver HL, Kong L, Burnett BG i sur. Sustained improvement of spinal muscular atrophy mice treated with trichostatin A plus nutrition. Ann Neurol 2008;64(4):465-470.

190. Nervi C, Borello U, Fazi F, Buffa V, Pelicci PG, Cossu G. Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. Cancer Res 2001;61(4):1247-9.

191. Ngo-Muller V, Muneoka K. Influence of FGF4 on digit morphogenesis during limb development in the mouse. Dev Biol 2000;219(2):224-236.

192. Nicholas JS. Experiments on developing rats. I. Limits of foetal regeneration; behavior of embryonic material in abnormal environments. Anat Rec 1934;58(4):387-411.

193. Nicholas JS. Experiments on developing rats. IV. The growth and differentiation of eggs and egg-cylinders when transplanted under the kidney capsule. J Exp Zool 1942;90(1):40-72.

194. Nicholson TM, Uchtmann KS, Valdez CD, Theberge AB, Miralem T, Ricke WA. Renal capsule xenografting and subcutaneous pellet implantation for the evaluation of prostate carcinogenesis and benign prostatic hyperplasia. J Vis Exp. 2013 Aug 28;(78).

195. Neubert D, Blankenburg G, Chahoud I i sur. Results of *in vivo* and *in vitro* studies for assessing prenatal toxicity. Environ Health Perspect. 1986;70:89-103.

196. Neubert D, Krowke R. Effect of thalidomide-derivatives on limb development in culture. Prog Clin Biol Res 1983;110 Pt A:387-397

197. Northman MR, Garg P, Baitin DM, Burgers PMJ, Scherbakova PV. A novel function of DNA polymerase δ regulated by PCNA. EMBO J 2006;25(18) 4316-25.

198. Onuma K, Urabe K, Naruse K, Uchida K, Itoman M. Allogenic serum improves cold preservation of osteochondral allografts. Clin Orthop Relat Res 2012;470(10):2905-2914

199. Onuma K, Urabe K, Naruse K, Park HJ, Uchida K, Itoman M. Cold preservation of rat osteochondral tissues in two types of solid organ preservation solution, culture medium and saline. Cell Tissue Bank;10(1):1-9.

200. Otali D, Stockard CR, Oelschlager DK i sur. Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition. Biotech Histochem 2009;84(5):223-47.

201. Otsu K, Fujiwara N, Harada H. Organ cultures and kidney-capsule grafting of tooth germs. Methods Mol Biol 2012;887:59-67.

202. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. Nature. 2009;461(7263):537-541.

203. Paradis FH, Hales BF. Exposure to valproic acid inhibits chondrogenesis and osteogenesis in mid-organogenesis mouse limbs. Toxicol Sci 2013;131(1):234-241.

204. Parivar K, Kouchesfehani H., Boojar MMA, Hayati RN. Organ culture studies on the development of mouse embryo limb buds undef EMF influence. Int J Radiat Biol 2006;82(7):445-464.

205. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. Nat Med 1999;5(5):582-585.

206. Pennycuik PR. The effects of acute exposure to high temperature on prenatal development in the mouse with particular reference to secondary vibrissae. Aust J Biol Sci 1965;18:97-113.

207. Perez-Terzic C, Childers MK. Regenerative rehabilitation: a new future? Am J Phys Med Rehabil. 2014;93(11Suppl3):S73-78.

208. Peterka M, Peterková R, Likovský Z. Teratogenic and lethal effects of long-term hyperthermia and hypothermia in the chick embryo. Reprod Toxicol 1996;10(4):327-332.

209. Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. Nature 2005;436(7049):428-433.

210. Pillitteri A, ur. Maternal and Child Health Nursing: Care of the Childbearing and Child Rearing Family. Lippincott: Philadelphia;1992, str. 25

211. Power GG. Biology of temperature: the mammalian fetus. J Devel Physiol 1989;12:295-304.

212. Primmett DR, Stern CD, Keynes RJ. Heat shock causes repeated segmental anomalies in the chick embryo. Development 1988;104(2):331-339.

213. Piersma AH. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. Toxicol Lett 2004;149(1-3):147-53.

214. Prosperi E. The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work The FASEB Journal 2006;20:833-837.

215. Raj K, Mufti GJ. Azacytidine (Vidaza(R)) in the treatment of myelodysplastic syndromes. Ther Clin Risk Manag 2006;2:377-88.

216. Rajan KT. Human organ culture: applications in the screening of teratogenic drugs. Exp Embryol Teratol 1974;1(0):65-89.

217. Randall CL, Anton RF, Becker HC. Role of alcohol-induced hypothermia in mediating the teratogenic effects of alcohol in C57BL/6J mice. Alcohol Clin Exp Res 1988;12(3):412-416.

218. Raspopovic J, Marcon L, Russo L, Sharpe J. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. Science 2014; 345(6196):566-570.

219. Ritchie HE, Ababneh DH, Oakes DJ, Power CA, Webster WS. The teratogenic effect of dofetilide during rat limb development and association with drug-induced bradycardia and hypoxia in the embryo. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2013;98(2):144-53.

220. Rugh R. Chapter 5 Organogeny. U: Rugh R ur.The mouse - Its reproduction and development. Minneapolis: Burgee Publishing Company; 1968, str. 209-212,299.

221. Roach HI. New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. J Bone Miner Res 1997;12(5):795-805.

222. Robertson NJ, Fairchild PJ, Waldmann H. Ectopic Transplantation of Tissues Under the Kidney Capsule. *U*: Paul J. Fairchild, ur. Methods in Molecular Biology,

Immunological Tolerance, Methods and Protocols Part III, Volume 380, Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007, str. 347-353.

223. Robinson JF, Verhoef A, Piersma AH. Transcriptomic analysis of neurulation and early organogenesis in rat embryos: an *in vivo* and *ex vivo* comparison. Toxicol Sci 2012;126(1):255-66.

224. Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Ganan Y, Santesteban E, Hurle JM. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. Nat Cell Biol 1999;1:125-126.

225. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA and histone lysine methylation. Biochim Biophys Acta 2014;1839(12):1362-1372.

226. Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Introduction. U: Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD, ur. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 1–4.

227. Sakatani M, Yamanaka K, Kobayashi S, Takahashi M. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in *in vitro* early stage bovine embryos. J Reprod Dev 2008;54(6):496-501.

228. Salaün J, Salzgeber B, Guénet JL. The differentiation of repeated epilation (Er/Er) mouse mutant skin in organ culture and in grafts. Anat Embryol (Berl). 1986;174(2):195-205.

229. Salas-Vidal E, Lomelí H, Castro-Obregón S, Cuervo R, Escalante-Alcalde D, Covarrubias L. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. Exp Cell Res 1998;238:136–147.

230. Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. Curr Drug Metab 2007;8(4):383-93.

231. Saunders JW Jr, Gasseling MT. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. Dev Biol 1962;5:147–178.

232. Schmahl W, Török P, Kriegel H. Embryotoxiticity of 5-azacytidine in mice: Phase- and dose-specifity studies. Arch Toxicol 1984;55:143-147.

233. Schnabel D, Salas-Vidal E, Narváez V i sur. Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support a function of ROS in interdigital cell death. Dev Biol 2006;291:291–299.

234. Schroder HJ, Power GG. Engine and radiator: fetal and placental interactions for heat dissipation. Exp Physiol 1997;82:403-414.

235. Schumann J. Teratogen screening: state of the art. Avicenna J Med Biotechnol 2010;2(3):115-121.

236. Senesi P, Luzi L, Montesano A, Terruzzi I. DNA demethylation enhances myoblasts hypertrophy during the late phase of myogenesis activating the IGF-I pathway. Endocrine. 2014;47(1):244-254.

237. Serrat AM, King D, Lovejoy CO. Temperature regulates limb length in homeotherms by directly modulating cartilage growth. PNAS 2008;105(49):19348-19353.

238. Serrat MA, Williams RM, Farnum CE. Temperature alters solute transport in growth plate cartilage measured by *in vivo* multiphoton microscopy. J Appl Physiol (1985) 2009;106(6):2016-2025.

239. Serrat AM. Allen's Rule Revisited: Temperature Influences Bone Elongation During a Critical Period of Postnatal Development. Anat Rec (Hoboken) 2013;296(10):1534-1545.

240. Shankar S, Srivastava RK. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis". Adv Exp Med Biol 2008;615:261–298.

241. Shepard TH, Lemire RJ, ur. Catalog of Teratogenic Agents. 11. izd. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2004.

242. Sheth R, Grégoire D, Dumouchel A i sur. Decoupling the function of Hox and Shh in developing limb reveals multiple inputs of Hox genes on limb growth. Development 2013;140:2130-2138.

243. Shiota K. Induction of neural tube defects and skeletal malformation in mice following brief hyperthermia in utero. Biol Neonate 1988;53:86-97.

244. Shui C, Scutt A. Mild Heat Shock Induces Proliferation, Alkaline Phosphatase Activity, and Mineralization in Human Bone Marrow Stromal Cells and Mg-63 Cells *In vitro*. J Bone Miner Res. 2001;16(4):731-741.

245. Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Subcapsular transplantation of tissue in the kidney. Cold Spring Harb Protoc 2014(7):737-740.

246. Sincic N, Herceg Z. DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. Curr Opin Oncol 2011;23:69-76.

247. Sincic N, Vlahovic M, Bulic-Jakus F, Serman L, Serman D. Acetylsalicylic acid protects rat embryos from teratogenic effects of 5-azacytidine. Period Biol 2002;104:441-4.

248. Skreb N, Solter D, Damjanov I. Developmental biology of the murine egg cylinder. Int J Dev Biol 1991;35(3):161-176.

249. Smith AU. The effects on fetal development of freezzing pregnant hamster (*Mesocricetus auraus*). J Embryol Exp Morphol 1957;5:311-323.

250. Smith EL, Kanczler JM, Oreffo RO. A new take on an old story: chick limb organ culture for skeletal niche development and regenerative medicine evaluation. Eur Cell Mater 2013;26:91-106; discussion 106.

251. Smoak IW, Sadler TW. Hypothermia and protective effects on the development of mouse embryos *in vitro*. Teratology 1991;43:635-641.

252. Sobočan N. Ekspresija nuklearnog antigena proliferirajućih stanica u štakorima tretiranim teratogenom (5-azacitidin) i antioksidansom (PBN). Sveučilište u Zagrebu, PMF. Magistarski rad; 2009.

253. Sobočan N. Utjecaj PBN-a (N-tert-butil- α-fenilnitron) na razvoj placente i štakorskoga zametka tretiranih 5-azacitidinom *in vivo* i *in vitro*. Sveučilište u Zagrebu, PMF. Doktorska disertacija; 2011.

254. Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. Nature 1970;227(5257):503-504.

255. Spencer PJ, Gollapudi BB, Waechter JM Jr. Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia. Toxicol Sci 2007;97(1):120-127.

256. Spielmann H, Genschow E, Brown NA i sur. Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests. Altern Lab Anim. 32(3):245-74, 2004

257. Strahinić T. Diferencijacija štakorskog zametka u izotransplantatu nakon prethodne kulture *in vitro* u mediju bez seruma. Magistarski rad. PMF Sveučilišta u Zagrebu, 1995.

258. Sturm K, Tam PP. Isolation and culture of whole postimplantation embryos and germ layer derivatives. Methods Enzymol 1993;225:164-190.

259. Suzuki T. How is digit identity determined during limb development? Dev Growth Differ 2013;55(1):130-138.

260. Szabat E, Rauvala H. Role of HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) in proliferation arrest in cells of the developing rat limb and its expression in the differentiating neuromuscular system. Dev Biol 1996;178(1):77-89.

261. Škreb N, Crnek V. Tissue differentiation in ectopic grafts after cultivation of rat embryonic shields *in vitro*. J. Embryol exp Morph 1977;42:127-134.

262. Škreb N, Crnek V. Development of embryo-derived teratomas *in vitro*. In: McKinnel RG, Di Berardino MA, Blumenfeld M, Bergad RD, ur. Differentiation and Neoplasia. Berlin: Springer-Verlag; 1980, str. 283-289.

263. Škreb N, Bulić F. Partial Differentiation of Rat Egg Cylinders in Serum-Free and Protein-Free Medium. Developmental Biology 1987;120:584-586.

264. Škreb N, Bulic-Jakus F, Crnek V, Stepic J, Vlahovic M. Differentiation and growth of rat egg-cylinders cultured in vitro in a serum-free and protein-free medium. Int J Dev Biol 1993;37(1):151-154.

265. Škreb N, Frank Z. Developmental Abnormalities in the Rat Induced by Heat Shock. J Embryol Exp Morphol 1963;11:445-457.

266. Šerman Lj, Vlahović M, Šijan M i sur. Impact of 5-Azacytidine on Placental Weight, Glycoprotein Pattern and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Rat Placenta. Placenta 2007;28 (8-9):803-811.

267. Švajger A, Levak-Švajger B, Škreb N. Rat embryonic ectoderm as renal isograft. J Embryol Exp Morphol 1986;94:1-27.

268. Taberlay PC, Jones PA. DNA methylation and cancer. Prog Drug Res 2011;67:1-23.

269. Tachibana KK, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. J Pathol 2005;205(2):123-129.

270. Takahashi KA, Tonomura H, Arai Y i sur. Hyperthermia for the treatment of articular cartilage with osteoarthritis. International Journal of Hyperthermia 2009;25(8):661-667.

271. Takaoki M, Murakami N, Gyotoku J. C-fos expression of osteoblast-like MC3T3–E1 cells induced either by cooling or by fluid flow. Biol Sci Space 2004;18:181–182.

272. Takayuki I, Shigeyuki S, Ryusuke H, Masahiro I, Yasuhiro B, Minoru O. Effects of passive stretching on muscle injury and HSP expression during recovery after immobilization in rats. Pathobiology 2009;76:253-259.

273. Tang MK, Leung AK, Kwong WH i sur. Bmp-4 requires the presence of the digits to initiate programmed cell death in limb interdigital tissues. Dev Biol 2000;18(1):89-98.

274. Terzic A, Harper CM Jr, Gores GJ, Pfenning MA. Regenerative medicine blueprint. Stem Cells Dev 2013;22Suppl1:20-24.

275. Terzic A, Nelson TJ. Regenerative medicine primer. Mayo Clin Proc 2013;88(7):766-775.

276. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32b, a mammalian homolog of ced-3, is a crmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly-(ADP-ribose) polymerase. Cell 1995;81:801–809.

277. Tiboni GM, Ponzano A. Nitric oxide and teratogenesis: an update. Curr Pharm Des 2014;20(34):5443-5447.

278. Tonomura H, Takahashi KA, Mazda O i sur. Glutamine protects articular chondrocyte from heat stress and NO-induced apoptosis with HSP70 expression. OsteoArthritis and Cartilage 2006;14:545-553.

279. Towers M, Tickle C. Generation of pattern and form in the developing limb. Int J Dev Biol 2009;53:805-812.

280. Trowell, OA. Problems in the maintenance of mature organs *in vitro*. In: La Culture Organotypique, Paris, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, 1961, str. 237-249.

281. Trumpp A, Blundell PA, de la Pompa JL, Zeller R. The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. Genes & Dev 1992;6:14-28.

282. Tuan RS. Biology of Developmental and Regenerative Skeletogenesis. Clinical Orthopaedics and Related Research 2004;427:Supp:105-117.

283. Turing AM. The chemical basis of morphogenesis. Bull Math Biol 1990;52:153–197.

284. Ueda S, Masutani H, Nakamura H i sur. Redox control of cell death. Antioxid. Redox Signal. 2002;4:405–414.

285. Ulberg LC, Sheean LA. Early development of mammalian embryos in elevated ambient temperatures Journal of Reproduction and Fertility 1973;Supp19:155–161.

286. Umar A, Buermeyer AB, Simon JA i sur. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. Cell 1996;87(1):65-73.

287. Umpierre CC, Little SA, Mirkes PE. Co-localization of active caspase-3 and DNA fragmentation (TUNEL) in normal and hyperthermia-induced abnormal mouse development. Teratology 2001;63(3):134-143.

288. Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA. Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. J Biol Chem. 2000;275(22):16810-16819.

289. Vargesson N. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. Bioessays 2009;31(12):1327-1336.

290. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. Mutat Res 2008;659(1-2):40-48.

291. Vlahović M, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Fučić A, Marić S, Šerman D. Change in the placenta and the rat embryo caused by the demethlating agent 5-azacytidine. Int J Dev Biol 1999;43:843-846.

292. Vlahović M, Bulić-Jakuš F, Jurić-Lekić G, Šerman L, Sinčić N, Katušić A. Epigenetic deregulation through DNA demethylation seems not to interfere with the differentiation of epithelia from pregastrulating rat embryos *in vitro*. Acta Dermatovenerol Croat 2008;16(4):183-189.

293. Wadkins CL. Experimental factors that influence collagen calcification *in vitro*. Calcif Tissue Res 1968;2:214–228.

294. Walsh DA, Klein NW, Hightower LE, Edwards MJ. Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development. Teratology 1987;36:181–191.

295. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105(35):12815-1289.

296. Webster WS, Germain MA, Edwards MJ. The induction of microphthalmia, encephalocele and other head defects following hyperthermia during the gestrulation proces sin the rat. Teratology 1985;31:73-82.

297. Webster WS, Edwards MJ. Hyperthermia and the induction of neural tube defects in mice. Teratology 1984;29:417-425.

298. Wei G, Bai X, Esko JD. Temperature-sensitive glycosaminoglycan biosynthesis in a Chinese hamster ovary cell mutant containing a point mutation in glucuronyltransferase I. J Biol Chem 2004;279:5693–5698.

299. Wells PG, Winn LM. Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. Crit Rev Biochem Mol Biol 1996;31:1–40.

300. Wicksell SD. The corpuscle problem. A mathematical study of a biometric problem. Biometrika 1925;17:84-99.

301. Wicksell SD. The corpuscle problem. Second memoir. Case of ellipsoidal corpuscles. Biometrika 1926;18:151-172.

302. Winn LM, Wells PG. Evidence of embryonic prostaglandin H synthase – catalyseg bioactivation and reactive oxygen species mediated oxidation of macromolecules in phenytoin and benzo(a)pyrene teratogenesis. Free Rad Biol Med 1997;22:607-621.

303. Yalçin S, Molayo□lu HB, Baka M, Genin O, Pines M. Effect of Temperature During the Incubation Period on Tibial Growth Plate Chondrocyte Differentiation and the Incidence of Tibial Dyschondroplasia. Poult Sci 2007;86:1772-1783.

304. Yan X, Ehnert S, Culmes M i sur. 5-azacytidine improves the osteogenic differentiation potential of aged human adipose-derived mesenchymal stem cells by DNA demethylation. PLoS One 2014;9(6):e90846.

305. Yang L, Carlson SG, McBurney D, Horton WE Jr. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:31156–31165.

306. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. J Biol Chem 1990;265:17174–17179.

307. Young DA, Lakey RL, Pennington CJ i sur. Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. Arthritis Res Ther 2005;7(3):R503-512.

308. Zakeri ZF, Ahuja HS. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. Mutat Res 1997;396:149 –161.

309. Zhao Y, Sun H, Lu J i sur. Lifespan extension and elevated hsp gene expression in Drosophila caused by histone deacetylase inhibitors Journal of Experimental Biology 2005;208:697-705.

310. Zhao W, Dai F, Bonafede A i sur. Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, affects gene expression patterns during morphogenesis of chicken limb buds *in vivo*. Cells Tissues Organs. 2009;190(3):121-34.

311. Zhu Y, Ren C, Wan X, Zhu Y, Zhu J, Zhou H, Zhang T. Gene expression of Hsp70, Hsp90 and Hsp110 families in normal palate and cleft palate during mouse embryogenesis. Toxicol Ind Health 2013;29(10):915-30.

312. Zhu Y, Zhu J, Wan X, Zhu Y, Zhang T. Gene expression of sHsps, Hsp40 and Hsp60 families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs. Toxicol Lett 2010;193(3):242-251.

313. Ziskin MC, Morrissey. J Thermal thresholds for teratogenicity, reproduction, and development. Int J Hyperthermia. 2011;27(4):374-387.

314. Zuscik MJ, Baden JF, Wu Q, Sheu TJ, Schwarz EM, Drissi H i sur. 5-azacytidine alters TGF-beta and BMP signaling and induces maturation in articular chondrocytes. J Cell Biochem 2004;92(2):316-331.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Rijeci 26. travnja 1976. godine. Diplomirala sam 2001. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Temeljem natječaja „Dekanovi novaci“ 2002. godine zaposlila sam se na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na mjestu znanstvenog novaka u Zavodu za histologiju i embriologiju, i asistenta istoimene Katedre.

Godine 2007. položila sam specijalistički ispit nakon četverogodišnjeg specijalističkog staža iz fizikalne medicine i rehabilitacije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, te se certificirala za Fellow of European Board of Physical and Rehabilitation Medicine. Iste godine u navedenom centru primljena sam u Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedska pomagala, gdje i danas radim na poslovima specijaliste fizikalne medicine i rehabilitacije. Uključena sam u nastavu na Zdravstvenom veleučilištu Zagreb i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 2009. godine. Voditelj sam vježbi longitudinalnog predmeta Temelji liječničkog umijeća i sudjelujem u poslijediplomskom studiju od 2012. godine

Aktivna sam u afirmaciji struke putem članstva u Hrvatskom društvu za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu HLZ, kroz niz funkcija u Upravnom odboru i organizaciju stručnih skupova. Član sam nekoliko fizijatrijsko-rehabilitacijskih stručnih međunarodnih društava.

Autor sam ili koautor više znanstvenih radova indeksiranih u različitim znanstvenim bazama, te nekoliko međunarodnih i domaćih kongresnih sažetaka. Sudjelovala sam u pisanju nastavnih tekstova. Nagrađena sam 2012. godine za najbolji rad međunarodnog kongresa fizikalne i rehabilitacijske medicine.