

# Uloga čimbenika stanične smrti, stanične proliferacije i diferencijacije tijekom razvoja udova u čovjeka

---

Bečić, Tina

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:517673>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-20**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**TINA BEČIĆ**

**ULOGA ČIMBENIKA STANIČNE SMRTI, STANIČNE  
PROLIFERACIJE I DIFERENCIJACIJE TIJEKOM RAZVOJA  
UDOVA U ČOVJEKA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2018. godina**

**Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju**

**Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu**

**Voditeljica rada: prof. dr.sc. Mirna Saraga – Babić, dr. med.**

*Mojoj majci i obitelji bez čije podrške ovog ne bi bilo.*

*Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mirni Saragi – Babić na nesebičnoj podršci i stručnoj pomoći.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama doc. Darku Keri, doc. Snježani Mardešić i prof. Katarini Vukojević što su bili uz mene svojim znanjem i potporom.*

*Gospođi Asji Miletić se zahvaljujem na naučenim osnovama pripreme preparata.*

*Zahvala svim dragim ljudima i kolegama koji su me bodrili na mom putu do uspjeha.*

## **SADRŽAJ:**

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                                | <b>7</b>  |
| <b>1.1. Embrionalni razvoj udova u čovjeka.....</b>                | <b>7</b>  |
| 1.1.1. Apikalni ektodermalni greben .....                          | 7         |
| 1.1.2. Mezenhimsko – epitelne interakcije u razvoju udova .....    | 9         |
| 1.1.3. Genska regulacija razvoja udova u čovjeka .....             | 12        |
| 1.1.4. Patologija razvoja udova .....                              | 14        |
| <b>1.2. Čimbenici ranog razvoja udova .....</b>                    | <b>16</b> |
| 1.2.1. Čimbenici stanične proliferacije .....                      | 16        |
| 1.2.1.1. Proliferacija .....                                       | 16        |
| 1.2.1.2. Apoptotski i antiapoptotski čimbenici .....               | 16        |
| 1.2.1.3. Fibroblastni čimbenici rasta i njihovi receptori.....     | 19        |
| 1.2.1.4. Transkripcijski čimbenici – MSX1, MSX2 .....              | 21        |
| <b>2. CILJEVI I HIPOTEZE .....</b>                                 | <b>22</b> |
| <b>2.1. Ciljevi istraživanja .....</b>                             | <b>22</b> |
| <b>2.2. Hipoteze istraživanja .....</b>                            | <b>22</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>3.1. Sakupljanje tkiva i određivanje starosti zametka .....</b> | <b>23</b> |
| <b>3.2. Imunohistokemijske metode .....</b>                        | <b>24</b> |
| <b>3.3. Kvantifikacija stanica pozitivnih na Ki-67 .....</b>       | <b>26</b> |
| <b>3.4. Polutanki rezovi i elektronska mikroskopija .....</b>      | <b>26</b> |
| <b>3.5. Dvostruka imunofluorescencija .....</b>                    | <b>26</b> |
| <b>3.6. TUNEL metoda .....</b>                                     | <b>29</b> |

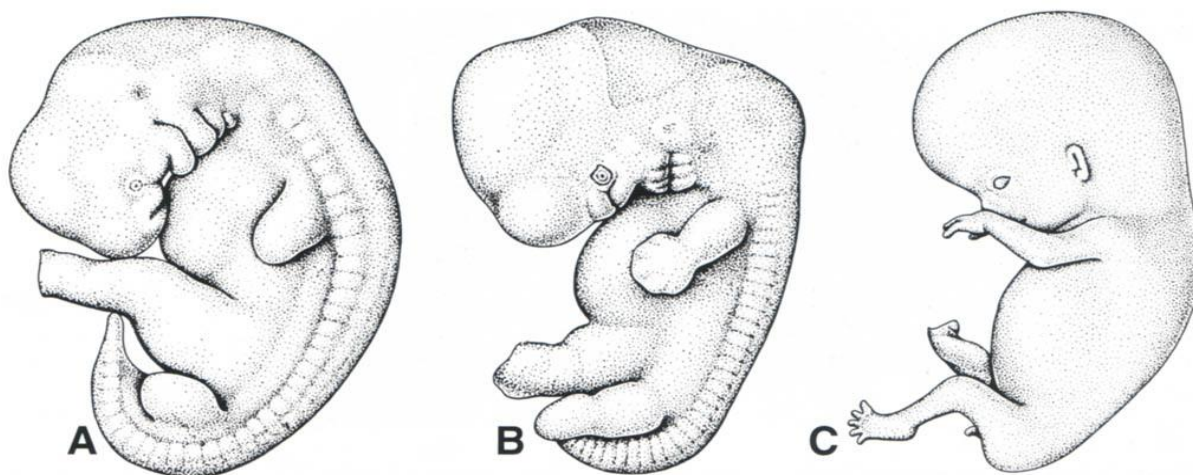
|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                                            | <b>30</b> |
| 4.1. Opće karakteristike razvoja ljudskih udova .....                                               | 30        |
| 4.2. Stanična proliferacija tijekom razvoja udova u čovjeka (Ki-67pozitivne stanice) .....          | 31        |
| 4.3. Statistička analiza proliferirajućih Ki-67 pozitivnih stanica .....                            | 33        |
| 4.4. Kaspaza-3 pozitivne apoptotske stanice tijekom razvoja udova u čovjeka... 34                   |           |
| 4.5. Bcl-2 pozitivne stanice tijekom razvoja udova u čovjeka.....                                   | 36        |
| 4.6. Koekspresija Bcl-2 i Bax tijekom razvoja udova u čovjeka .....                                 | 36        |
| 4.7. Bojanje bjelančevinom AIF i TUNEL metodom tijekom razvoja udova u čovjeka .....                | 38        |
| 4.8. Izražaj FGF2 tijekom razvoja udova u čovjeka .....                                             | 40        |
| 4.9. Izražaj FGFR1 i RIP5 tijekom razvoja udova u čovjeka .....                                     | 41        |
| 4.10. Izražaj MSX-1 i MSX-2 tijekom razvoja udova u čovjeka .....                                   | 43        |
| 4.11. Morfološke i imunohistokemijske osobitosti stanica AEG između 5. i 8. razvojnog tjedna .....  | 45        |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>                                                                            | <b>48</b> |
| 5.1. Uloga stanične proliferacije u razvoju ljudskih udova .....                                    | 48        |
| 5.2. Uloga stanične smrti u razvoju ljudskih udova .....                                            | 49        |
| 5.3. Anomalije uzrokovane poremećajima apoptoze u AEG .....                                         | 50        |
| 5.4. Utjecaj antiapoptotskih Bcl-2 i proapoptotskih BAX bjelančevina na razvoj ljudskih udova ..... | 51        |
| 5.5. Uloga čimbenika rasta i njihovih receptora u razvoju udova čovjeka .....                       | 51        |
| 5.6. Uloga transkripcijskih čimbenika rasta u razvoju udova čovjeka .....                           | 53        |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.7. Kontrola stanične smrti i proliferacije tijekom razvoja udova u čovjeka .... | 54 |
| 6. ZAKLJUČCI .....                                                                | 56 |
| 7. SAŽETAK .....                                                                  | 58 |
| 8. SUMMARY .....                                                                  | 60 |
| 9. LITERATURA .....                                                               | 62 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....                                                               | 78 |

## 1. UVOD

### 1.1. Embrionalni razvoj udova

Tijekom ranog razvoja čovjeka, osnove budućih udova pojavljuju se u obliku izbočina na ventrolateralnoj strani stijenke tijela u 4. razvojnog tjednu. Prvo se razvijaju gornji udovi, a nakon nekoliko dana donji (Slika 1). Pupoljci budućih udova sastoje se od mezenhima koji potječe od parijetalnog lista bočnih ploče i površinskog ektodermalnog epitela (1). U razvoju, mezenhim potiče nadležni ektoderm na stvaranje zadebljanja i oblikovanje signalnog centra poznatog kao apikalni ektodermalni greben (AEG), dok se u dorzalnom dijelu mezenhima udova pojavljuje drugi signalni centar, tzv. zona polarizirajuće aktivnosti (ZPA). Brojne interakcije između grebena i mezenhima utječu na važne razvojne procese poput stanične proliferacije, stanične smrti i diferencijacije tj. na oblikovanje i rast udova (2).



Slika 1. Razvoj udova čovjeka: ljudski plod u petom razvojnog tjednu (A); šestom razvojnog tjednu (B) i osmom razvojnog tjednu (C). Preuzeto iz Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2012; pp 151-61.)

#### *1.1.1. Apikalni ektodermalni greben i njegova uloga u razvoju udova*

Apikalni ektodermalni greben čini zadebljanje epitela koja oblaže distalni dio osnove budućeg uda. Dobro oblikovan AEG predstavlja višeslojni epitel u pilećem embriju i višeredni epitel u embriju miša, prekriven nadležnim peridermom koji se razvija duž dorzo - ventralne osnove pupoljka budućeg uda. AEG predstavlja vrlo dinamičnu strukturu podložnu morfološkim promjenama (Slika 2). Ljudski AEG više nalikuje na mišji, a razvija se u 4.

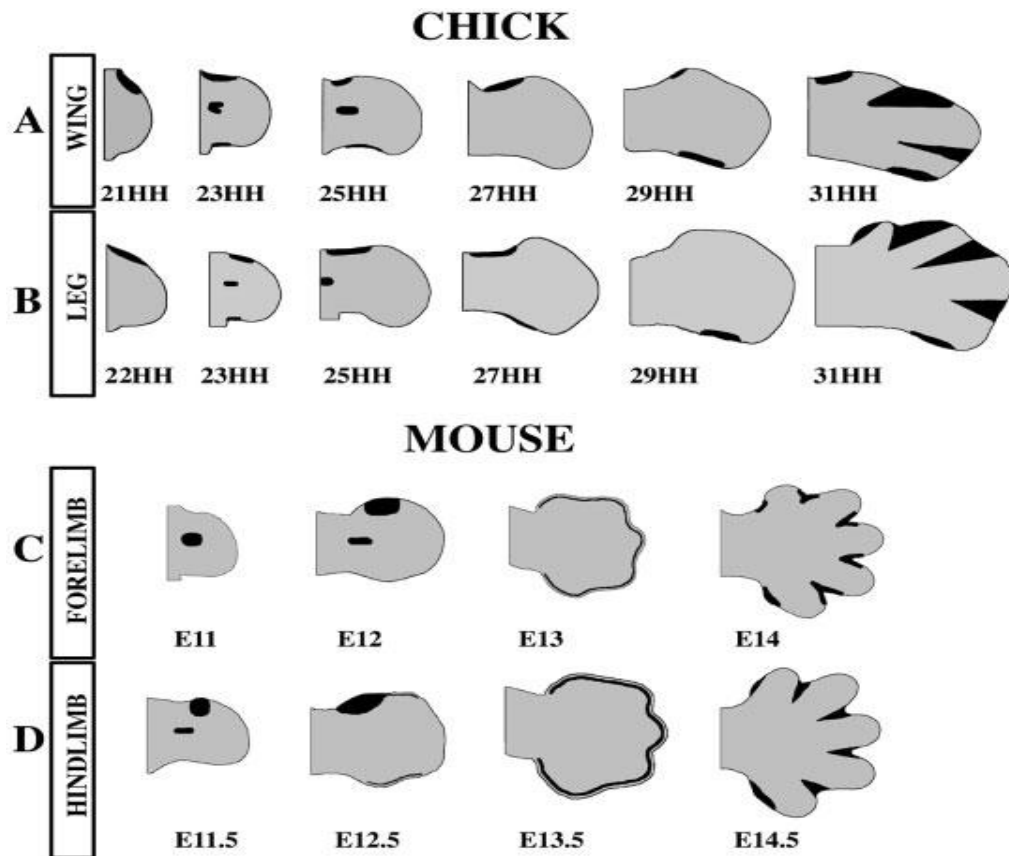


razvojnog tjednu (3). Zadebljanje AEG u pileta započinje u 18. stadiju razvoja, ali dobro oblikovan AEG ne pojavljuje se prije 20. stadija razvoja (4).

Pojam „*zreli AEG*“ označava višeslojni epitel u sisavaca, prisutan na distalnom dijelu pupoljka udova, dok tzv. „*pre-AEG*“ predstavlja raniji stadij razvoja AEG-a, kada njegov oblik nije još u potpunosti definiran (5), a čine ga stanice koje izlučuju Fgf8 (koje još nisu razvile tipičnu morfologiju AEG-a). Proces „*regresije AEG*“ podrazumijeva postepeni nestanak (zaravnavanje) epitela AEG-a. Prvo se regresija odvija u prostorima između prstiju (interdigitalnim prostorima), a potom u području samih prstiju (6). Što je veći broj stanica AEG, to je veća proizvodnja čimbenika rasta. AEG je embrionalna struktura podložna promjenama koje iziskuje određeni prostorno-vremenski obrazac, neophodan za normalno oblikovanje osnove budućeg uda te mogućnost brzog odgovara na podražaj iz mezoderma (7,8). Za razliku od drugih vrsta, AEG u perajama riba brzo prelazi u apikalni nabor i na taj način inhibira signale koji potiču proliferaciju aksijalnog kostura tj. sudbina AEG razlikuje se tijekom razvoja riba i tetrapoda. (9).

Prisutnost AEG je važna za kontrolu stanične smrti, jer otpušta fibroblastne čimbenike rasta (FGF), posebice FGF8 koji štiti mezenhimske stanice u osnovi udova od stanične smrti. Poznato je da je aktivnost koštanih morfogenetskih bjelančevina (bone morphogenetic proteins ili BMPs) potrebna za inhibiciju izražaja FGF8 u AEG-u i za poticanje stanične smrti. U protivnom, aktivacija FGF signalizacije u interdigitalnom tkivu inhibira staničnu smrt, kao što se to događa u slučaju inaktivacije BMP. Negativna regulacija FGF8 u AEG-u mogla bi se povezati s poremećajima stanične smrti. Uz FGF8, FGF2 također ima ključni utjecaj na najranije razvojne faze udova s obzirom da nastaje u AEG-u i djeluju kao signal koji potiče proliferaciju i preživljavanje podležećeg mezenhima (10). Poremećaji izražaja BMP bjelančevina rezultiraju oblikovanjem ektopičnog AER, dok Msx djeluje suprotno od BMP, tj. na indukciju AEG-a. Članovi porodice FGF mogu zamijeniti AER (11,12).

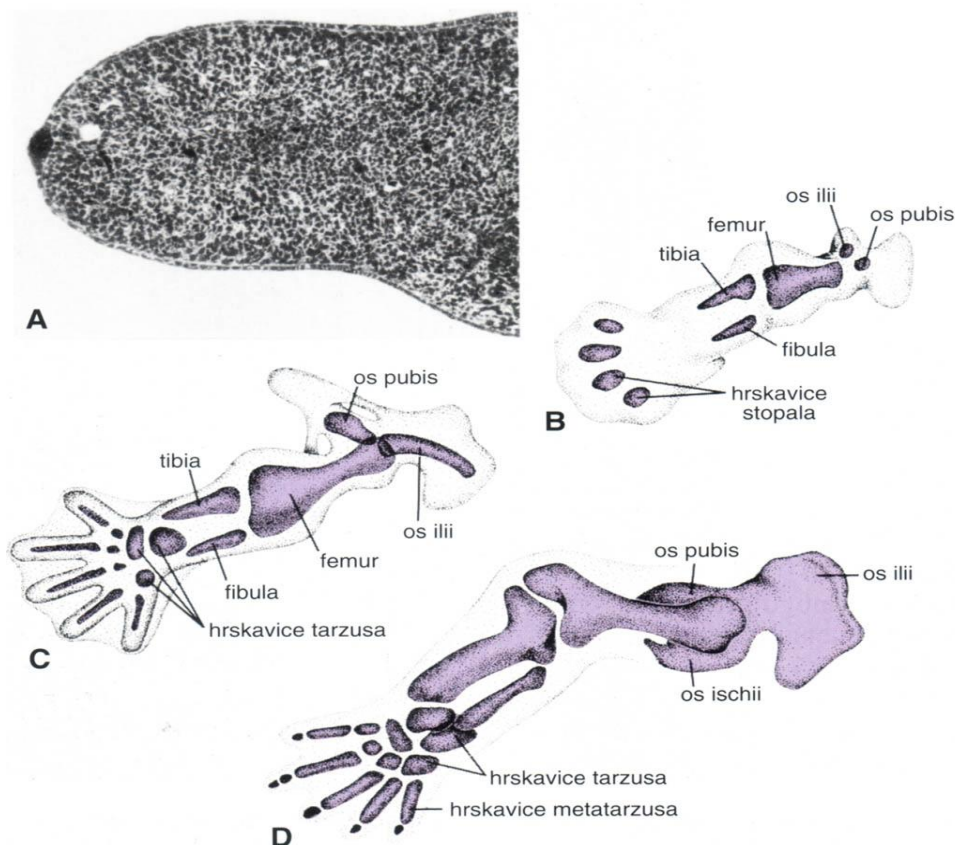
Postoje brojne spontane ili inducirane mutacije koje se događaju tijekom razvoja AEG, a za rezultat imaju različite anomalije udova (13). Ukoliko se AER ukloni u embriju pileta, oblik udova bit će promijenjen, a opseg oštećenja je povezan s razvojnim stadijem u kojem je AEG uklonjen (14). Uz FGF čimbenike, brojni drugi geni mogu biti izraženi u AER, kao što su geni za koneksine (connexin Cx43), p63 i Msx2 (13).



Slika 2. Razlike u razvoju pilećih i mišjih udova. Preuzeto iz MA Fernandez-Teran, JR Hinchliffe and MA Ros. Birth and Death of Cells in Limb Development: A Mapping Study. Developmental dynamics 235:2521–2537, 2006.

### 1.1.2. Mezenhimsko - epitelne interakcije u razvoju udova

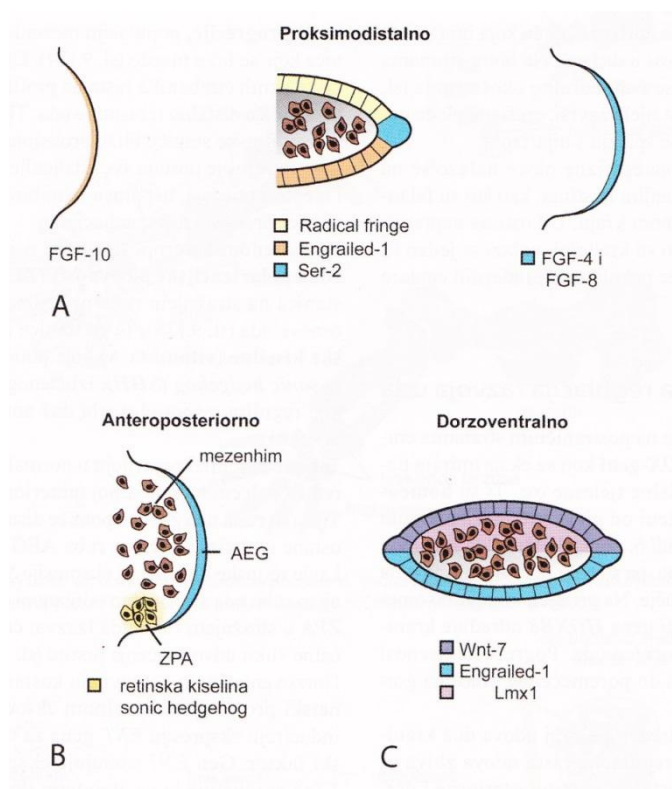
Brojne interakcije između AEG i mezenhima kontroliraju razvojne procese poput stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze tj. oblikovanje i rast udova (15). Za vrijeme oblikovanja (morfogeneze), udovi postepeno prolaze kroz mezenhimsku, hrskavičnu i koštanu fazu (Slika 3). Odvajanje prstiju kod čovjeka odvija se između 6. i 8. razvojnog tjedna (16) zahvaljujući procesu apoptoze u interdigitalnim prostorima (17). Naznake budućih odvajanja prstiju u pileta javlja se u 20. stadiju razvoja (4).



Slika 3. Razvoj ljudskih udova: mezenhimska faza (A,B), hrskavična i koštana faza (C,D). Preuzeto iz Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2012.

Udovi se razvijaju uzduž tri osi: 1/ Anteroposteriorne osi (AP), koja je odgovorna za razvoj udova od palca do petog prsta, a staničnu interakciju kontroliraju stanice iz ZPA, koja izlučuje SHH (*engl. sonic hedgehog*) morfogen; 2/ Interakcija uzduž proksimodistalne osi (PD), koja uključuje razvoj od ramena prema vrhovima prstiju regulirana je pomoću AER, koji izlučuje FGF čimbenike; 3/ dok su interakcije uzduž dorzoventralne osi (DV), koje su odgovorne za razvoj udova od stražnje strane ruku prema dlanovima, primarno kontrolirane putem WNT7 signalne bjelančevine (18). Jasna razlika u razvoju i oblikovanju udova koja postoji među različitim vrstama prvenstveno je kontrolirana različitim izražajem gena smještenih u AEG i ZPA (19) (Slika 4). ZPA je lokalizirana u mezodermu, uzduž stražnjeg ruba pupoljka budućeg uda, a čini ju mala grupa stanica odgovorna je za oblikovanje stražnjeg dijela udova. Harfe i sur. (20) navode da koncentracija i vrijeme izlaganja SHH-u morfogenu kojeg izlučuje ZPA određuju oblik prstiju kod mišjih i pilećih embrija. Što je veća izloženost SHH morfogenu, izraženije je oblikovanje stražnjeg dijela prstiju, a kad se izloženost SHH smanji, prsti se ne oblikuju normalno. Uloga SHH tijekom razvoja prstiju ima dvije faze, pri čemu je prva faza prolazna i sudjeluje u ranoj regulaciji oblikovanje prsta, dok druga, nešto kasnija faza potiče

rast prstiju. Tako transplantirani dijelovi ZPA smješteni u prednjim dijelovima udova dovode do udvostručenja udova zrcalne simetrije. U ranoj fazi razvoja udova, visoka razina SHH u ZPA je određena prisutnošću GLI3 aktivatora, dok je niska SHH aktivnost određena prisutnošću GLI3 represora. Dokazano je da miševi s GLI3 mutacijama te GLI3/SHH mutacijama pokazuju razvojne anomalije udova tj. polidaktiliju sa slabo oblikovanim prstima. Iz navedenog se može zaključiti da ovaj morfogen određuje veličinu i oblik falangi svakog prsta (21).



Slika 4. Utjecaj različitih razvojnih čimbenika na razvoj udova. Preuzeto iz Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2012.

### 1.1.3. Genska regulacija razvoja udova u čovjeka

Temeljna pitanja o molekularnoj podlozi razvoja udova još nisu razriješjena. Novija istraživanja pokazuju da bi Tbx4 i Tbx5 mogle biti ključne molekule u razvoju udova. (22). Retinoična kiselina (retinoid acid ili RA) također ima temeljnu ulogu u razvoju prstiju jer potiče ili inhibira molekularnu ekspresiju stotine ključnih gena uključenih u razvoj udova. Ta kontrola genskog izražaja osigurava kaskadnu gensku regulaciju koja omogućava početak stanične smrti i inhibiciju stanične proliferacije (23).

Procesi stanične smrti i stanične proliferacije igraju ključnu ulogu i oblikovanju udova. Programirana stanična smrt (*engl. programmed cell death PCD*) je genski kontrolirani proces, neophodan tijekom normalnog oblikovanja različitih tkiva i organa te uklanjanje oštećenih stanica. Apoptoza je energetski ovisan oblik stanične smrti koji zahtjeva aktivaciju specifične skupine gena i enzima, uključujući cistein aspartil – specifične proteaze (*engl.caspase*), unutarstanične enzime uključene u završne korake apoptoze udova (24). Do sada je stanična smrt ovisna o kaspazi- 3 pronađena u različitim organizmima kao što su timus, tanko crijevo, bubrezi i neuroni miša, te spinalni gangliji i drugi organi u razvoju čovjeka (25,26,27). Za vrijeme apoptoze, stanice se raspadaju na manje dijelove nazvane apoptotska tjelešca, koja sadrže fragmente jezgre, staničnih organela i citoplazme (28,29). Prva područja apoptoze u mezenhimu, koja se pojavljuju za vrijeme razvoja udova poznata su pod nazivom nekrotizirajuća zona. U kasnijim razvojnim stadijima, stanična smrt se pojavljuje između susjednih prstiju (30) tj. u interdigitalnom prostoru. Usporedba razvoja udova između pileta i miša opisuje razlike u lokaciji apoptotskih stanica unutar osnove udova (31), a nedavne studije upućuju na ulogu stanične smrti ne samo u oblikovanju i regresiji interdigitalnog tkiva, već i u ograničavanju rasta prstiju (32,33) (Slika 5).

Apoptoza tijekom regresije embrionalnog interdigitalnog tkiva i oblikovanja prstiju praćena tzv. staničnim starenjem (34). Starenje je oblik zaustavljanja staničnog ciklusa, najčešće povezan sa tumorskom supresijom. Radi se o normalnom razvojnom mehanizmu, kod kojeg se stanice prestaju dijeliti te počinju stariti i pokazivati izražaj gena p21 i p15. Nedostatak p21 u miševa dovodi do poremećaja u embrionalnom starenju, održavanju i oblikovanju AEG. Konačna sudbina procesa starenja stanica je apoptoza i njihovo uklanjanje posredovano makrofagima. Poznati geni povezani sa starenjem su p53, p21, p16, i p19. Stanice AEG ne proliferiraju i pokazuju visoku razinu gena p21, ali ne i gena p53, dok p16 i p19 nedostaju u udovima. Nedostatak p21 može uzrokovati poremećaj u embrionalnom starenju, obrascu

proliferacije i oblikovanja AEG (35). Prednja i stražnja područja osnove udova određena su različitim Hox genima, koji su izraženi uzduž rostro – kaudalne osi u lateralnom mezodermu različitih životinja. Ovi geni uključni su upozicioniranje udova ili krila u tijekom embrionalnog razvoja svih kralježnjaka i bezkralježnjaka (14).

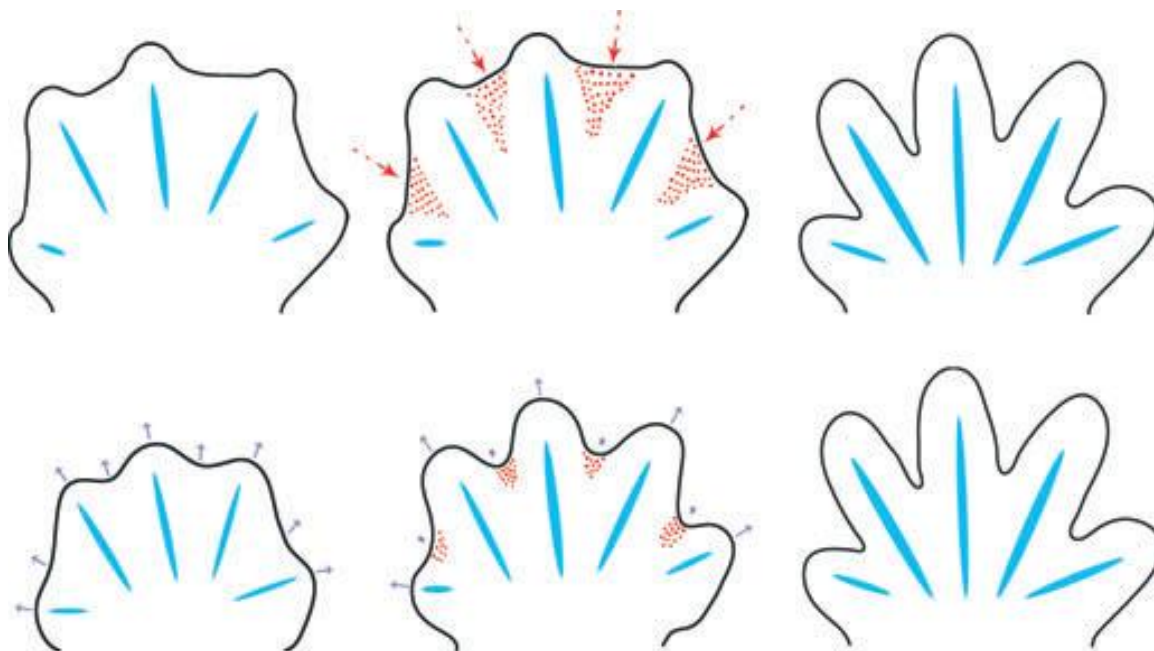
Osim kaspaza-ovisnog puta stanične smrti, u razvoju udova pojavljuje se i apoptoza inducirajući čimbenik (*engl. apoptosis inducing factor ili AIF*), koji do stanične smrti dovodi kaspaza neovisnim putem. AIF je mitohondrijalni čimbenik koji se, jednom otpušten u citoplazmu, prebacuje u jezgru i time potiče kondenzaciju kromatina te razgradnju DNA, čak i u odsutnosti aktivnosti kaspaze. Prekomjerni izražaj katepsina D potiče staničnu smrt u mezodermu udova. Interdigitalne mezenhimalne stanice pokazuju visoku razinu ekspresije katepsina D unutar lizosoma u stadiju neposredno prije stanične smrti (36).

Članovi FGF obitelji imaju ulogu u prostorno – vremenskom pozicioniranju stanica unutar udova tijekom razvoja. Tako Fgf10 koji je izraženu mezodermu potiče površinski ektoderm na izlučivanje Fgf8, koji je bitan u oblikovanju AEG. Postoji pozitivna povratna sprega između Fgf10 i Fgf8, koji međusobno potiču svoj izražaj (37). Uz to, Fgf8, Fgf4, Fgf9 i Fgf17 pokazuju ograničen obrazac izražaja u AEG. Fgf2 je čimbenik rasta koji je izražen i u ektodermu budućeg uda i u podležećem mezodermu. (8).

Izražaj Fgf4 i Fgf8 potiče i održava brzi rast tzv. zone rasta (*engl. progression zone ili PZ*) na vršcima prstiju i štiti lokalne mezenhimske stanice od diferencijacije u hondrocyte (38). Nasuprot tome, tkivo smješteno nešto proksimalnije od PZ (koje nije bilo pod utjecajem AER), kondenzira se i diferencira u smjeru hondrocita pod djelovanjem molekula BMP. (39). S druge strane i retinoidna kiselina (*engl. retinoid acid ili RA*) može potaknuti staničnu smrt i inhibirati diferencijaciju hrskavice. Suprotno djelovanje ima Sox9 gen, koji je ključni gen za hondrogenezu i uključen u TGFβ/Activin signalizaciju u interdigitalnom tkivu, a njegov izražaj svojstven je interdigitalnom tkivu osnove prstiju. Kad je Sox9 gen uklonjen iz nediferenciranih mezenhimalnih stanica pupoljka budućeg uda, u mišjeg embrija ne dolazi do razvoja dijelova skeleta.

Tijekom razvoja, postoji međudjelovanje mnogih gena koji kontroliraju i usmjeravaju rast udova. Tako antagonizam između FGF i RA igra ključnu ulogu u kontroli interdigitalne stanične smrti i rasta udova. Isto tako, antagonizam između RA i transformirajućeg čimbenika rasta -TGFβ/Activin signalizacije u embriju pileta kontrolira staničnu diferencijaciju za vrijeme oblikovanja prstiju. RA potiče staničnu smrt potičući izražaj BMP, koji inhibiraju

izražaj Fgf8. RA je molekula koja interferira s drugim signalnim putevima te regulira prostorno – vremenski izražaj stotine gena uključenih u aktivaciju stanične smrti ili inhibicije stanične diferencijacije (23).



Slika 5. Razlike u oblicima stanične smrti tijekom razvoja i oblikovanja prstiju: masivni oblik stanične smrti u području interdigitalnog kao posljedica eliminacije interdigitalnog tkiva (A). Progresivni oblik stanične smrti kod kojeg se prsti oblikuju kao posljedica različite brzine staničnog rasta i diferencijacije. Preuzeo iz Rocio, Hernandez-Martinez and Luis Covarrubias. Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Develop. Growth Differ.* (2011) 53, 245–258

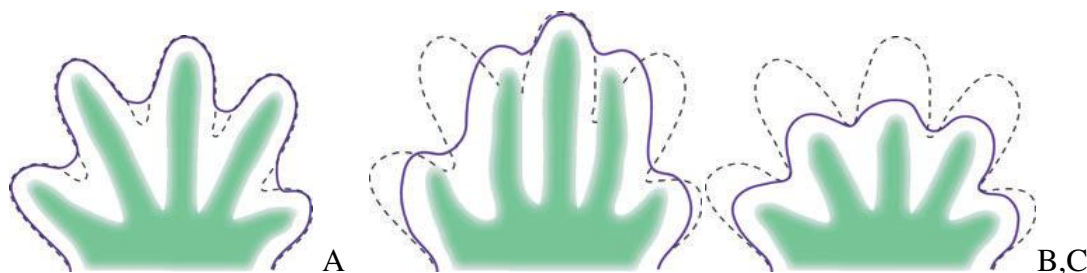
#### 1.1.4. Patološki razvoja udova

Poremećaji gena koji kontroliraju normalni razvoj udova dovode do različitih razvojnih anomalija udova.

Tako su u knock-out miševa bez aktivnih gena odgovornih za razvoj udova opisane anomalije poput sindaktilija, ektrodaktilija (40) ili skraćenje udova (41). S druge strane, inhibicija ili odgađanje apoptoze u AEG pronađena je kod polidaktilije (42).

*Sindaktilija* je jedna od najčešćih nasljednih malformacija udova koja se očituje spajanjem ili fuzijom prstiju na rukama i / ili nogama (Slika 6). Može biti izolirani entitet ili u kombinaciji s više od 300 sindroma. Fenotipski se može očitovati kao unilateralna ili bilateralna, odnosno simetrična ili asimetrična (43), te kutana ili koštana (44). Postoji devet ne – sindromskih sindaktilija s opisanim dodatnim podtipovima. Najčešće se nasljeđuju autosomno dominantno, ali postoje dva oblika koja se nasljeđuju autosomno recesivno i X-vezano (43). Sindaktilija u

sklopu inhibicije interdigitalne stanične smrti prisutna je u miševa s nedostatkom kaspaze- 2, kaspaze- 3, kaspaze- 6, kaspaze- 7, kaspaze- 8 ili kaspaze- 9 (45).

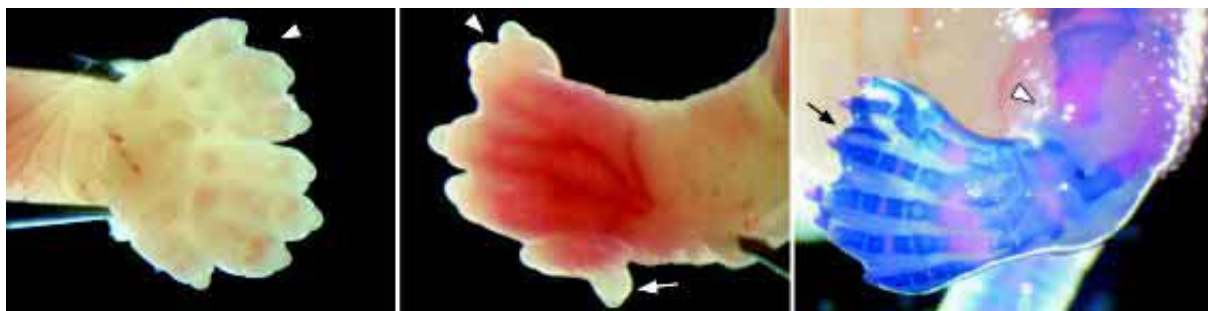


Slika 6. Mehanizmi nastanka anomalija prstiju: normalni razvoja (A), sindaktilija (B,C). Preuzeto iz Rocio Hernandez-Martinez and Luis Covarrubias. Review Article. Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. *Develop. Growth Differ.* (2011) 53, 245–258.

*Ektrodaktilija* ili rascjep dlanova i stopala je rijetka malformacija koja uključuje središnje dijelove dlanova i stopala, a može zahvatiti od jednog pa do sva 4 uda. Udružena je sa sindaktilijom i oligodaktilijom (smanjeni broj prstiju), rjeđe s polidaktilijom (povećani broj prstiju) te najčešće ima izgled poput kliješta jastoga. Prisutna je od rođenja i može biti udružena s drugim anomalijama i sindromima. Ne – sindromni pacijenti imaju autosomno dominantno nasljeđivanje ili X-vezano spolno nasljeđivanje. U pacijenata s pridruženim sindromima, dodatno dolazi do gubitka senzomotornog sluha. Ektrodaktilija je često udružena s aniridijom i Alportovim sindromom (46).

*Polidaktilija* je nasljedna malformacija udova kojoj je svojstveni prekobrojni prsti (više od 5 po udu) (Slika 7). Podijeljena je u 3 glavna fenotipa: preaksijalni, centralni i postaksijalni. Preaksijalna polidaktilija (medijalna polidaktilija) uključuje palac i može se pojaviti u 1 od 4 tipa. Udružena je s poremećajem u *GLI3* (na kromosomu 7p13) i *Shh* (na kromosomu 7q36). Centralna polidaktilija („centralna zraka“ polidaktilija) je udružena sa sindaktilijom i rascjepom nepca, a pojavljuje se u sklopu sindroma. Postaksijalnoj polidaktiliji (lateralna polidaktilija) svojstven je hipoplastični ili u potpunosti nerazvijen mali prst, najčešće bilateralno, a može biti jednostavna ili složena te udružena se s malformacijama stopala. Udružena je s poremećajima u *GLI3* i *PAPA2* i *PAPA3* kao i s *SHH* mutacijama, *MIPOLI* i *PITXI* (42).





Slika 7. Razvojne anomalije udova. Preuzeto iz Isabelle Blanc, Antoine Bach and Benoit Robert. Unusual pattern of Sonic hedgehog expression in the polydactylous mouse mutant Hemimelic extra-toes. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 969-974 (2002).

## 1.2. Čimbenici ranog razvoja udova u čovjeka

### 1.2.1. Čimbenici stanične proliferacije

#### 1.2.1.1. Ki-67-biljeg stanične proliferacije

Za razvoj udova ključan je proces stanične proliferacije. Jedan od biljega stanične proliferacije je Ki-67, jezgrina bjelančevina prisutna u svim fazama staničnog ciklusa osim u 0 fazi (47, 48). Do sada je uloga Ki-67 istraživana u ranom razvoju hipofize (49), bubrega (50) i ganglija (51) čovjeka, dok su slična istraživanja razvoja ljudskih udova u potpunosti nedostatna. Istraživanja u kulturi stanica opisuju abnormalnosti u proliferaciji hondrocita u falangama pilećeg embrija nakon izlaganja deksametazonu (52).

#### 1.2.1.2. Pro-apoptotski i antiapoptotski čimbenici

Programirana stanična smrt ili apoptoza pokazuje dva stanična puta, kaspaza-ovisni i kaspaza neovisni put.

#### Kaspaza-3 ovisna stanična smrt

Apoptoza je energetski ovisan oblik stanične smrti koji zahtjeva aktivaciju specifične skupine gena i enzima, uključujući aspartil – specifične proteaze (kaspaze), unutarstanične enzime uključene u završne korake apoptoze u udovima (53). Do sada kaspaza -3 ovisna stanična smrt je uočena u različitim organima poput timusa, tankog crijeva, bubrega i neurona miševa, kao i u spinalnim ganglijima i drugim ljudskim organima (54,55,56). Do danas, uloga kaspaza – 3 posredovane stanične smrti je analizirana za vrijeme razvoja udova kod miševa (57) i pileta (58), ali ne i kod ljudi.

### **AIF- apoptoza inducirajući čimbenik**

Brojni pro-apoptotski signali koji utječu na mitohondrije i uzrokuju propusnost vanjske mitohondrijske membrane, potičući otpuštanje potencijalnih toksičnih mitohondrijskih bjelančevina. Jedna od tih bjelančevina je apoptoza inducirajući čimbenik ili AIF, filogenetski stari flavoprotein koji se nalazi u mitohondrijskom međumembranskom prostoru. Tijekom proces stanične smrti, AIF se premješta u jezgru gdje se veže za DNA i potiče kaspaza-neovisnu kondenzaciju kromatina (59,60). Prekomjerni izražaj katepsina D udružena je s ovim procesom. AIF je glavni čimbenik koji određuje kaspaza – neovisnu smrt neurona. Uz ovaj proces stanične smrti povezana su dvije proapoptotske bjelančevine koje pripadaju Bcl-2 obitelji, a to su Bax i Bak koji sudjeluju u apoptotskoj propusnosti mitohondrijske membrane. Poremećaj u genu odgovornom za AIF uzrokuje smrt tijekom embrionalnog razvoja jer dovodi do prekida prvog vala kaspaza – neovisne programirane stanične smrti, koja se događa za vrijeme ranog razvoja sisavaca. Fragmentacija DNA, jedna od najstarijih značajki apoptoze pojavljuje se tijekom kaspaza- ovisne stanične smrti (61).

AIF je visoko konzervirana bjelančevina koja predstavlja najstariji razvojni mehanizam stanične smrti (62,63). Do sada je otkriveno da AIF sudjeluje za vrijeme smrti neurona (36), a u čovjeka sa smrću spolnih prastanica tijekom najranijih razdoblja razvoja spolnih žlijezda (64).

### **Tunel –metoda dokazivanja stanične smrti**

Terminal deoksinukleotid transferaza (TdT) deoksiuridin trifosfat (dUTP) biljeg (TUNEL) je metoda korištenja TdT enzima za kovalentno vezivanje zahvaćene forme dUTP na 3' kraju dvostruko ili jednostruko zavijene DNA u stanicama. Pouzdana je i korisna metoda za detektiranje DNA oštećenja i stanične smrti in situ. Normalna svojstva tkiva i uvjeti obrade tkiva utječu na sposobnost TdT enzima da učinkovito obilježava DNA. Može se koristiti za potvrdu DNA oštećenja i apoptozu, kao patološki mehanizam za identificiranje zahvaćenih vrsta stanica te za procjenu učinkovitosti terapijskog liječenja in vivo (65).

### **P19**

Tijekom razvoja udova čovjeka, stanice izvan staničnog ciklusa (neproliferajuće stanice) prikazivale su jaki citoplazmatski izražaj inhibitora staničnog ciklusa p19, dok je njegov pozitivitet bio jako malen u proliferirajućim stanicama unutar epitela i mezenhima udova. Navedeni rezultati sugeriraju važnost ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih

(proliferativnih) čimbenika u kontroli broja stanica u epitelu i mezenhimu osnove udova tijekom razvoja, kao što je već to do sada već bilo dokazano za neke druge razvojne čimbenike (66). Studije o prekomjernom izražaju p19 upućuju na to da, osim što utječe na popravak DNA, p19 može modulirati apoptozu uzrokovanu oštećenjem DNA u stanicama sisavaca (67). Dok moguća uloga p19 do sada nije bila istraživana u osnovama budućih udova, u miševa s deficitom staničnog inhibitora p21 dokazan je nedostatak proliferacije u AEG (35)

## **Bax i Bcl 2**

Bcl-2 obitelj bjelančevina utječe na mitohondrijsku apoptozu regulacijom propusnosti mitohondrijske vanjske membrane (MOMP), što dovodi do aktivacije izvršne kaspaze tj. apoptoze. Anti-apoptotske bjelančevine kao što su BCL-2 i pro-apoptotski čimbenici, BAK i BAX međudjeluju s pro-apoptotskim BCL-2 homologom 3 (BH3) proteinom. Bjelančevina p53 je direktni BAX aktivator (68). Bcl-2 je anti – apoptotska bjelančevina koji štiti stanice od apoptoze blokirajući njihovu post mitotsku diferencijaciju koja vodi u staničnu smrt. Izražena je u fetalnom tkivu, uglavnom u području epitelno – mezenhimske interakcije i stanične kondenzacije (69). Bmf (bcl2 modifying factor) knock – out miševi pokazuju abnormalnosti oblikovanja šapa (70) . Iako je Bcl-2 pronađen u osnovama budućih prstiju miševa za vrijeme njihovog odvajanja (71), miševi bez aktivnosti Bcl-2 gena ne pokazuju nikakve abnormalnosti udova (72). Nasuprot tome, mutanti koji ubrajaju druge članove Bcl-2 obitelji, kao što su Bax i Bak prikazuju perzistiranje interdigitalnog tkiva (73). Bax je također izražen u distalnim dijelovima udova za vrijeme interdigitalne stanične smrti (74).

## **RIP5 (DSTYK)**

RIP5 je član porodice serin/treonin kinaza koji su uključeni u početak apoptoze. Izražen je u staničnim membranama epitela mnogih organa tijekom razvoja i ko-lokalizira sa članovima FGFR (receptor za fibroblastne čimbenika rasta) obitelji u mokraćovodnom pupoljku i mezenhimu metanefrosa i tako čini glavnu odrednicu razvoja ljudskog mokraćnog sustava (75). Kod RIP5 mutanata mnogobrojni organi su promijenjeni, uključujući udove, a taj fenotip dijelom može biti objašnjen neispravnom FGFR signalizacijom koja je ključna za induktivne interakcije i rast udova.

### *1.2.1.3. Fibroblastni čimbenici rasta i njihovi receptori*

Čimbenici rasta fibroblasta (FGF) predstavljaju veliku obitelj bjelančevina, koje potiču rast stanica te sudjeluju u staničnoj diferencijaciji, preživljavanju i pokretljivosti stanica. Kao unutarstanične signalne molekule, ključni su u povezivanju s članovima obitelji drugih manjih signalnih molekula, uključujući Wnt. Odgovorni su za poticanje i regulaciju razvoja brojnih organa u kralježnjaka. Pojavljuju se u dva osnovna oblika- kiseli FGF i bazični FGF (sada definirani kao FGF1 i FGF2). Pripadaju velikoj obitelji od 17 gena, od Fgf1 do Fgf17. Svi članovi ove obitelji dijele značajne aminokiselinske sekvence u središnjem dijelu molekule. Jednom otpušteni iz stanice, FGF se vežu za svoje receptore (FGFR) kao što su sindekan, glipikan ili perlekan na staničnoj površini te uz komponente međustanične tvari (extracellular matrix ili ECM). Vezanje FGF-ova na FGFR receptore olakšava prijenos FGF pri čemu dolazi do transfosforilacije i aktivacije RAS – ovisnog unutarstaničnog signalnog puta. Tijekom razvoja, Fgf2 je prisutan u ektodermu i mezodermu, dok su Fgfr1 i Fgfr2 prisutni samo u mezodermu. Istraživanja na embriju miša i pileta pokazuju da su osnovni mehanizmi oblikovanja udova evolucijski konzervirani. Signali iz AEG su kontinuirano potrebni za proksimo-distalni rast udova, dok je Shh proizveden u stanicama ZPA glavni posrednik polarizirajuće aktivnosti koja regulira oblikovanje uzduž anteroposteriorne osi. WNT7A koji se izlučuje iz dorzalnog ektoderma i djeluje putem svog ciljnog gena Lmx1 u podležećem mezenhimu, igra važnu ulogu u oblikovanju udova uzduž dorzoventralne osi.

Od 17 poznatih FGF gena 4 se eksprimiraju u AER (Fgf2, Fgf4, Fgf8, Fgf9), a dva u podležećem mezenhimu (Fgf2, Fgf10). Pojedini FGF geni čije su bjelančevine izražene u AER, poput FGF2, FGF4 i FGF8 mogu zamjeniti AER u zametku. FGF koji se stvaraju u AER imaju dvije glavne funkcije: prva je poticanje stanične proliferacije i stvaranje novih stanica u mezenhimu pupoljka budućeg uda, a druga važna funkcija je održavanje izražaja Shh bjelančevine u ZPA. Tako gubitak funkcije FGF8 u AER mutirane životinje pokazuje anomalije kostura o oba gornja i donja uda, uključujući gubitak prstiju.

FGF10 je jedan od gena izraženih u mezenhimu distalnog dijela pupoljka udova, koji igra ključnu ulogu u vrlo ranoj fazi razvoja uda, tj. u razdoblju prije pojave AER. FGF10 gen potiče rani rast pupoljka te djeluje preko FGFR2 u kasnijim stadijima razvoja. Nalazi se u mezodermu, dok se FGF8 u nadležećem ektodermu. U miševa, gubitak funkcije FGF4, FGF9, FGF17 nemaju utjecaja na oblikovanje uda (76).

**FGF2** je poput drugih čimbenika rasta mitogeni, angiogeni i neurotrofni faktor, koji je izražen u brojnim tkivima i različitim tipovima stanica tijekom razvoja, uključujući pupoljak budućeg uda. Najbolji dokaz za to su eksperimenti gdje su transplantirane kuglice natopljene FGF2 mogle dijelom zamijeniti signalnu aktivnost AER. Proliferacija mezenhimskih stanica pupoljka budućeg uda postojala je unatoč odsutnosti AER (77).

**FGF8** je čimbenik rasta izražen u čitavom AEG-u. Štoviše, izražaj FGF8 prethodi izražaju drugim čimbenika rasta, što govori u prilog činjenici da FGF8 ima jedinstvenu funkciju u ranom razvoju udova. FGF8 je mitogen koji potječe iz AER i stimulira rast pupoljka budućeg uda (78). Inaktivacija FGF8 u ektodermu tijekom ranog embrionalnog razvoja uzrokuje značajnu redukciju pupoljka budućeg uda, odgađanje izražaja Shh u mezenhimu, te pogrešnu regulaciju FGF4 izražaja s posljedičnom hipoplazijom ili aplazijom specifičnih dijelova skeleta. FGF8 je jedini poznati član FGF obitelji u AEG koji je potreban za normalan razvoj udova (79) kao ključni regulator razvoja udova, koji ne samo da potiče oblikovanje pupoljka budućeg uda nego i održava njegov razvoj. FGF8 služi kao endogeni pokretač oblikovanja udova u pileta, na način na koji potiče i održava razvoj udova i sinergistički djeluje sa određenim morfogenima (kao IHH) koji su važni za hondrogenezu za vrijeme izdužavanja osnova budućih prstiju (80). Eksperimenti koji uključuju primjenu kuglica natopljenih FGF – om u slabinsko područje, potiču proliferaciju mezenhimskih stanica budućeg uda i oblikovanje ektopičnog grebena što vodi u ektopično oblikovanje čitavog uda (81,82). Nasuprot tome, primjena inhibitora FGFR dovodi do reduciranog broja falangi.

## **FGFR1**

Među brojnim čimbenicima uključenim u kontrolu pravilnog razvoja i oblikovanja udova, članovi obitelji fibroblastnih čimbenika rasta (FGF) pokazali su da imaju jako važnu ulogu u staničnoj proliferaciji, migraciji i diferencijaciji (83), a koja se aktivira njihovim vezanjem na receptore obitelji tirozin kinaze (FGFRs) (84). Istraživanja na kock out miševima su pokazala da je FGFR1 gen na vrhu hijerarhije genske regulacije stanične proliferacije i diferencijacije u pupoljku budućeg uda (85).

FGFR1 potiče rast duž proksimodistalne osi, te je neophodan za širenje populacije skeletnih prekursora održavanjem preživljavanja stanica. Utječe na broj prstiju i njihov identitet, vjerojatno preko autonomne stanične regulacije Shh izražaja. Ima višestruku ulogu u indukciji pupoljka budućeg uda, njegovu rastu i oblikovanju (86). Delecija gena za FGFR1 u ranijim razvojnim stadijima (prije pojave zadebljanja mezenhima budućeg uda) rezultira ozbiljnim

razvojnim poremećajima, koji se očituju abnormalnim razvojem AEG, smanjenjem SHH izražaja i odsutnošću većeg dijela skeleta kod autopoda. Nedostatak FGFR1 ne utječe na staničnu proliferaciju, nego potiče staničnu smrt i dovodi do poremećaja u izražaju gena uključenih u apoptozu. FGF/FGFR1 signali igraju važnu ulogu u ranom razvoju udova ali utiču i na kasnije stadije razvoja udova, uključujući stanično preživljavanje i oblikovanje prstiju (87).

Dok miševi s delecijom FGFR1 u pupoljcima budućih udova (88,89) imaju reducirani skelet i promijenjene pupoljke budućih gornjih i donjih udova s nedostatkom prstiju, Shh-cre FGFR1 miševi imaju normalnu veličinu pupoljka budućeg uda, ali nedostatak prstiju (89) FGFR1 je negativan regulator rasta kostiju u duljinu. FGFR2 je izražen u kondenzirajućem mezenhimu ranog stadija razvoja pupoljka budućeg uda, a lokaliziran je u perihondralnom i periostalnom tkivu (90). Za razliku od FGFR2, FGFR1 je odsutan u površinskom epitelu (91).

Mutacije FGFR receptora uzrokuju agenezu ili ozbiljnu dizgenezu bubrega te abnormalnosti udova. FGF signalizacija je potrebna za rast i oblikovanje velikog broja organa kao i udova (92) i vrlo je složena zato što se mnogobrojni ligandi i izoforme receptora preklapaju u prepoznavanju (93,94). Uz to, neadekvatni izražaj FGF i neadekvatna aktivacija FGFR je udružena s različitim patološkim promjenama, poremećenim staničnim rastom i tumorogenezom (ahondroplazija, kraniosinostoza) (95)

#### *1.2.1.4. Transkripcijski čimbenici - MSX 1, MSX 2*

Msx homebox geni kodiraju transkripcijske faktore koji kontroliraju organogenezu i tkivnu interakciju za vrijeme embrionalnog razvoja (96). Msx1 i Msx2 su visoko izraženi geni u AEG-u i podležućem mezenhimu udova, a prisutni od najranijih stadija oblikovanja udova. Ključni su u procesu oblikovanja udova uzduž sve tri osi. Dvostruki mutanti za Msx1 i Msx2 izražavaju ozbiljne poremećaje fenotipa. Mutacije ovih gena očituju se oligodaktilijom ili formiranjem viška prstiju, što se objašnjava u kontekstu poremećaja Bmp signalizacije (97) koja je nadređeni Msx genima, a unutar genske kaskade koja kontrolira razvoj udova (98,99). U normalnom razvojnog uda ekspresija Msx-1 gena zahtjeva prisutnost funkcionalnog AEG u distalnom mezenhimu, što se ne odnosi na Msx-2 (99).

Izmijenjeni izražaj gena koji kodiraju transkripcijske čimbenike Msx-1, Msx-2 dovodi do poremećaja FGFR signalizacije (100). Za vrijeme rane faze razvoja, Msx-1 i Msx2 su normalno prisutni u različitim tkivima, gdje su uključeni u kontrolu nezrelih staničnih

populacija i održavanjem staničnog potencijala. Tako u osnovi budućih udova, Msx-1 i Msx-2 su izraženi u području AEG i podležecem mezenhimu, dok poremećaji njihovog izražaja induciraju oblikovanje ektopičnog AEG-a. Regenerativni potencijal vrhova prstiju također je povezan s izražajem Msx-1 u toj području udova (101). Uz to, oba gena imaju specifičnu ulogu u razvoju glave i vrata te razvoju zuba (102,103,104).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

Cilj istraživanja je primjenom elektronske mikroskopije, imunohistokemijskih metoda i metode dvostruke imunofluorescencije u histološkim rezovima udova čovjeka između 4. i 10. razvojnog tjedna istražiti:

- 1) Prostorno-vremenski slijed proliferacije u područjima budućih falangi i mezenhimu interdigitalnih prostora te epitelu AEG-a, kao i promjene u proliferacijskom indeksu primjenom statističkih metoda.
- 2) Postojanje dvaju putova stanične smrti tj. kaspaza-ovisnog i AIF-ovisnog puta u mezenhimu i epitelu udova tijekom diferencijacije falangi i odvajanja prstiju .
- 3) Raspodjelu i ko-ekspresiju čimbenika BAX i Bcl-2 u pojedinim stanicama osnove udova, kojom se određuje sudbina stanice tj. preživljavanje ili stanična smrt.
- 4) Vremensku i prostornu raspodjelu čimbenika rasta i mogućeg načina na koji oni utječu na rast i diferencijaciju udova.
- 5) Opisati ultrastrukturne osobitosti stanica u proliferaciji i apoptozi u području AEG-a i mezenhima.

### **2.2. Hipoteze istraživanja**

Proliferacija omogućava rast ljudskih udova i prstiju na način koji je specifičan u odnosu na druge vrste. Postoje dva mehanizma stanične smrti tijekom oblikovanja i odvajanja prstiju u čovjeka, kaspaza – 3 ovisni i AIF –ovisni put. Članovi Bcl-2 obitelji kao i čimbenici rasta imaju suprotan učinak na apoptozu i proliferaciju (potiču ili inhibiraju), pa su stoga važni u kontroli normalnog oblikovanja udova.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Sakupljanje tkiva i određivanje starosti zametka

Embrionalno i fetalno tkivo korišteno u ovom istraživanju sakupljeno je i obrađeno uz dopuštenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra u Splitu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a u skladu sa Helsinškom deklaracijom (105). Nakon vanjskog pregleda zametka, svi macerirani i loše očuvani uzorci embrionalnog tkiva isključeni su iz studije. Dob zametka procijenjena je mjerenjem tjeme-zadak i usklađena s Carnegie sustavom određivanja dobi zametka, koja se temelji na morfološkim kriterijima (16). Ukupno je analizirano je 16 normalnih zametaka, od 4. do 10. razvojnih tjedana starosti (gestacijske dobi). Zameci su uzeti iz kolekcije histoloških rezova ljudskih tkiva koja je pohranjena u Zavodu za Anatomiju, histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (Tablica 1). Mikrosekcijom su u embrija starosti 4. i 5. tjedana odvojeni gornji od donjih dijelova tijela te uklopljeni zajedno s udovima, dok su kod starijih embrija i fetusa udovi resecirani tj. odvojeni od ostalih dijelova tijela (trupa). Tkivo je fiksirano u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu (PBS), dehidrirano u pročišćenom etanolu i uklopljeno u parafin. Serijski rezovi debljine 7  $\mu$ m izrezani u poprečnoj ili uzdužnoj ravnini, stavljeni na aminopropil trietoksilanom obrađena predmetna stakalca te analizirani Olympus BX51 svjetlosnim mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan). Svaki 10. rez obojan je hematoksilinom i eozinom u svrhu orijentacije o razini reza i potvrde očuvanosti tkiva.

| Age (weeks) | CRL (mm) | Carnegie stage | No. |
|-------------|----------|----------------|-----|
| 4           | 5        | 12             | 1   |
| 5           | 8        | 15             | 3   |
| 6           | 14       | 17             | 2   |
| 7           | 21       | 20             | 4   |
| 8           | 27       | 22             | 4   |
| 10          | 36       | 27             | 2   |

Tablica 1. Broj i starost embrija korištenih u istraživanju.



### *3.2. Imunohistokemijske metode*

Nakon deparafiniranja, rezovi su uronjeni u 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS kroz 10 minuta zbog sprječavanja aktivnosti endogene peroksidaze, isprani u PBS i kuhani u puferu natrijevog citrata 17 minuta na 95 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, rezovi su inkubirani sa mišjim Ki-67 protutijelom (1:100, M7240, DAKO, Glostrup, Denmark), mišjim protutijelom Bcl-2 (1:50, M70001, DAKO, Glostrup, Denmark) i aktiviranom kaspazom-3 (1:1500, AF835, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 1 sat na sobnoj temperaturi (Tablica 2). Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani sa biotiniziranim sekundarnim protutijelom Streptavidin-Biotin Peroksidaza Sistem (K0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) kroz 30 min, isprani u PBS i bojani diaminobenzidinom (DAB). Rezovi su isprani u destiliranoj vodi, obojeni hematoksilinom i dehidrirani u etanolu i ksilolu. Pozitivna kontrola za Ki-67, Bcl-2 i kaspaza-3 bojenje bili su druga tkiva unutar istog reza za koje je poznato da se specifično oboje navedenim primarnim protutijelima. Obojenje u rezovima nije bilo prisutno u slučaju kad su rezovi bili inkubirani samo sekundarnim protutijelima ili samo s primarnim protutijelima. Slike su dobivene korištenjem digitalne kamere (SPOT Insight, Diagnostic Instruments, USA) stavljene na mikroskop Olympus BX51 i uz upotrebu SPOT softvera

**Tablica 2. Primarna protutijela korištena u istraživanju**

| <b>Protutijelo</b>                             | <b>Domaćin</b> | <b>Razrjeđenje</b> | <b>Proizvođač</b>                    |
|------------------------------------------------|----------------|--------------------|--------------------------------------|
| Ki-67<br>M7240                                 | <b>Miš</b>     | 1:100              | DAKO Glostrup, Denmark               |
| Bcl-2<br>M70001                                | <b>Miš</b>     | 1:50               | DAKO, Glostrup, Denmark              |
| Bcl-2<br>M-0887                                | <b>Miš</b>     | 1:50               | DAKO, Glostrup, Denmark              |
| Bax                                            | <b>Zec</b>     | 1:600              | ChemiconR International, Inc.        |
| kaspaza -3<br>AF835                            | <b>Zec</b>     | 1:1500             | R&D Systems, Minneapolis,<br>MN, USA |
| MSX-1<br>protutijelo<br>ab93287                | <b>Koza</b>    | 1:300              | Abcam, UK                            |
| anti – FGFR1<br>protutijelo ab824              | <b>Miš</b>     | 1:300              | Abcam, UK                            |
| anti-MSX-<br>2/Hox8<br>protutijelo<br>ab190070 | <b>Zec</b>     | 1:300              | Abcam, UK                            |
| anti – p19 INK4d<br>protutijelo<br>ab102842    | <b>Zec</b>     | 1:100              | Abcam, UK                            |
| anti-Ki-67<br>protutijelo<br>ab9260            | <b>Zec</b>     | 1:50               | Abcam, UK                            |
| anti-RIPK5<br>protutijelo<br>ab153997          | <b>Zec</b>     | 1:500              | Abcam, UK                            |
| protutijelo FGF8<br>AF-423-NA                  | <b>Koza</b>    | 1:300              | R&D Systems, Minneapolis,<br>MN, USA |
| FGF2<br>Ab8880                                 | <b>Zec</b>     | 1:500              | Abcam, UK                            |

### *3.3. Kvantifikacija stanica pozitivnih na Ki-67*

Zameci različite starosti tj. razvojnog stadija analizirani su i međusobno uspoređivani u svrhu praćenja promjena u proliferaciji tj. broju Ki-67 pozitivnih stanica u tkivima udova različite razvojne starosti. Za svaki razvojni stadij napravljena je kvantifikacija za 2 gornja i 2 donja uda. Računanje svih serijskih rezova (čitavih udova) napravljeno je za embrije u 6. razvojnog tjednu, dok je za starije razvojne stadije (7. i 8. razvojni tjedan) slikano po 10 slika iz odgovarajućih područja svakog uda. Broj stanica procijenjen je kvantitativno od strane dva neovisna istraživača, a stanice su klasificirane kao negativne (nebojene stanice) ili pozitivne stanice. Brojanja su provedena uzduž histološkog reza pupoljka budućeg uda, uključujući površinski epitel, mezenhim i hrskavicu. DP\_SOFT verzija 3.1 softver korištena je za podjelu svakog reza na kvadrate veličine  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ , pod povećanjem 40x. U svakom od tih kvadrata, izračunat je postotak pozitivnih stanica i prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Podaci su analizirani Mann-Whitney testom, Kruskal – Wallis i Dunn's post hoc testom. Statistički značajna vrijednost je uzeta kao  $P < 0.05$ .

### *3.4. Polutanki rezovi i elektronska mikroskopija*

Svi udovi ili dijelovi udova fiksirani su u 4%-tnom paraformaldehidu u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.2) tijekom 24 sata na 4 °C te su nakon dodatne fiksacije u 2% osmium tetroksidu uklopljeni u LX 112 Embedding kitu (smoli) (Ladd Research, Williston, USA). Polu tanki rezovi (debljine  $1\ \mu\text{m}$ ) obojani su Toluidinskim modrilom. Ultratanki rezovi uzeti iz određenih područja obojani su uranil acetatom i olovnim citratom. Elektronske mikrofotografije su dobivene slikanjem u JEOL 1200 EX mikroskopu (JEOL, Tokyo, Japan).

### *3.5. Dvostruka imunofluorescencija*

Da bismo ispitali prisutnost dvaju primarnih protutijela u istoj stanici, za veći broj protutijela korištena je metoda dvostruke imunofluorescencije (Tablica 3). Rezovi su inkubirani jedan sat sa sekundarnim fluorescentnim protutijelom u tamnoj komori. Za dvostruko imunofluorescencijsko bojanje korišten je kombinacija dvaju primarnih protutijela koja se inkubirala jedan sat, a nakon ispiranja PBS-om, dodala se kombinacija odgovarajućih sekundarnih protutijela i inkubirana također jedan sat. Nakon zadnjeg ispiranja PBS-om, rezovi u uklopljeni u medij za uklapanje (ImmunoMount, Shandon, Pittsburg, PA, USA) i pokriveni pokrovnim stakalcem. Analizirala će se lokalizacija primjenjenih biljega u tkivu.

Stanice koje reagiraju s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su crveno obojenu citoplazmu i plavu jezgru. Stanice koje nisu reagirale s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su DAPI-jem (4',6-diamidino-2-phenylindiole dihydrochloride-DAPI, D1306, invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) plavo obojenu jezgru. Preparati su pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) i slikatn DP71 digitalnom kamerom.

Nakon hlađenja na sobnoj temperature, histološki preparati su bili inkubirani sa slijedećim primarnim protutijelima (odvojeno ili u odgovarajućoj kombinaciji): Bcl-2 i Bax (rabbit anti-mouse 1:600; ChemiconR International, Inc.), kaspaza -3 aktivno zečje protutijelo na čovjeka ili miša (1:1500; AF835, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), kozje monoklonalno MSX-1 protutijelo (1:300; ab93287, Abcam, UK), mišje monoklonalno anti – FGFR1 protutijelo (1:300; ab824, Abcam, UK), zečje poliklonalno anti-MSX-2/Hox8 protutijelo (1:300; ab190070, Abcam, UK), zečje poliklonalno anti – p19 INK4d protutijelo, (1:100; ab102842, Abcam, UK), mišje monoklonalno anti-Ki-67 protutijelo (1:500; ab8880, Abcam, UK), zečje poliklonalno anti-RIPK5 protutijelo (1:500; ab153997, Abcam, UK) i ovčje monoklonalno protutijelo FGF8 (AF-423-NA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Tablica 3). Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi za imunofluorescenciju su inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim protutijelima: (T-862, Jackson Immuno Research Lab., PA, USA, sc-2090, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA and Texas Red, sc-2780, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, Donkey Anti-Goat IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:400; ab150129, Abcam, UK), Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:300; ab150077, Abcam, UK), Donkey Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:400; ab150105, Abcam, UK), Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 594 (1:300; ab150080, Abcam, UK), na 1 st. DNA specifičan floro-flor bisbenzimid, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) je korišten za bojanje jezgre. Rezovi su pripremljeni, osušeni na zraku i pokriveni poklovcima (Immuno-Mount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) (Tablica 3).

**Table 3. Sekundarna protutijela korištena u istraživanju**

| <b>Protutijela</b>                                    | <b>Domaćin</b> | <b>Razrjeđenje</b> | <b>Proizvođač</b>                                   |
|-------------------------------------------------------|----------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
| Fluorescein isotiocyanat – FITC Ap132F (AP132F)       | <b>Koza</b>    | 1:200              | Chemicon, Temecula, CA, USA                         |
| Rodamine AP124R                                       | <b>Koza</b>    | 1:200              | Jackson ImmunoResearch Lab, PA, USA                 |
| Streptavidin Alexa Fluor 488                          | <b>Koza</b>    | 1:500              | Invitrogen Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA   |
| Biotinylated anti-mouse secondary antibody sc 2039    | <b>Koza</b>    | 1:100              | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| Texas Red sc-2780                                     | <b>Koza</b>    | 1:200              | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA |
| Donkey Anti-Goat IgG H&L Alexa Fluor 488 ab150129     | <b>Magarac</b> | 1:400              | Abcam, UK                                           |
| Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (; ab150077, | <b>Koza</b>    | 1:300              | Abcam, UK                                           |
| Donkey Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 488 ab150105    | <b>Magarac</b> | 1:400              | Abcam, UK                                           |
| Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 594 ab150080     | <b>Koza</b>    | 1:300              | Abcam, UK                                           |

Pozitivna unutarnja kontrola na FGF2, FGFR8, FGFR1, MSX-1, MSX-2, Ki67, p19 and RIP5 (DSTYK) bilo je obojenje drugih tkiva u istim rezovima primarnim protutijelima. Bojenje nije primjećeno u rezovima inkubiranim samo sa sekundarnim protutijelima ili ako su bila korištena samo primarna protutijela. Mikrofotografije su slikane s digitalnom kamerom (SPOT Insight, Diagnostic Instruments, USA) koja se nalazi na mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) te uz pomoć SPOT softvera. Slike su preklapane u Cella I Spot Advanced softveru, a fotografije obrađene u Adobe Photoshop CS6.

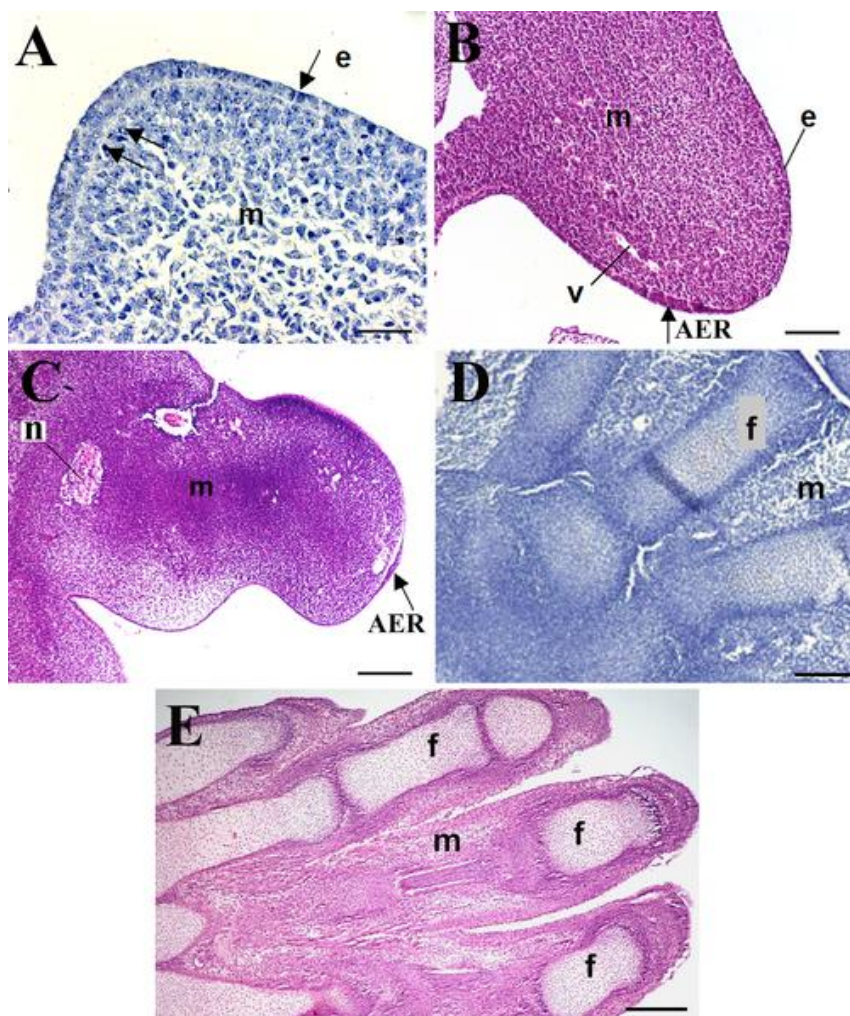
### *3.6. TUNEL metoda*

Za dokazivanje fragmentacije DNA u apoptotskim stanicama, TUNEL metoda (Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem, USA) je kombinirana s bojenjem S ovčjim protutijelom na AIF (1:500; AF5824, R&D Systems, Minneapolis, USA). Nakon inkubacije s navedenim protutijelima, rezovi su bojani s DAPI jezgrenim bojanjem, osušeni na zraku i pokriveni pokrovnim stakalcem (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, USA) te analizirani Olympus BX51 mikroskopom (opremljen digitalnom DP71 kamerom). Mikrofotografije su slikane pomoću Olympus Cella softvera i obrađene u Adobe Photoshopu.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Opće karakteristike razvoja ljudskih udova

U 4. tjednu embrionalnog razvoja čovjeka, na prednjoj stjenci tijela pojavljuju se osnove udova koje čine izbočine izgrađene od središnjeg mezenhima i površinskog jednoslojnog epitela. Epitel pokazuje blago lokalizirano zadebljanje u području budućeg apikalnog ektodermalnog grebena (AEG, *engl. AER*). U 5. razvojnog tjednu, udovi su još u mezenhimskom stadiju razvoja, ali su nešto dulji u odnosu na prethodni tjedan. Središnji dio udova koji je izgrađen od mezenhima pokazuje blago zgušnjavanje stanica, koje čine osnovu budućih hrskavica, dok je marginalna vena smještena u području vrška udova. U ovom razvojnog razdoblju područje AEG je nešto deblje i bolje definirano (Slika 8B).



**Slika 8.** Razvoj ljudskih udova između 4. i 6. razvojnog tjedna. (A) U 4. razvojnog tjednu, ljudski donji udovi se sastoje od središnjeg mezenhima (m) i površinskog ektodermalnog epitela (e) koji pokazuje početno zadebljanje u području apikalnog ektodermalnog grebena. Proliferacijske stanice su uočene u epitelu i mezenhimu (strelice). Polutanki rez, Toluidinsko modri, bar = 25 µm. (B) U 5. razvojnog tjednu gornji udovi sastoje se od

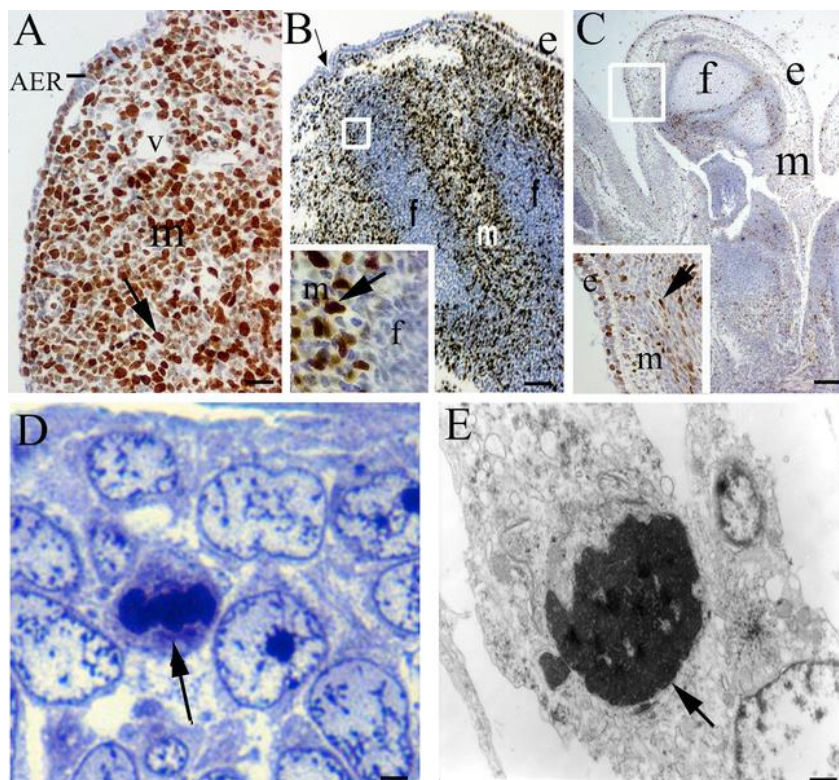
središnjeg mezenhinskog dijela (m) koji sadrži marginalnu venu (v) i nadležnog površinskog epiteal (e). Hematoksilin i eozin bojanje, bar = 100  $\mu$ m. (C) Ljudski donji ud u 6. razvojnog tjednu pokazuje kondenzaciju mezenhima (m) koji sadrži periferni živac (n) u svom proksimalnom dijelu. Površinski epitel je zadebljan (strelica) oblikujući AEG, dok suženje odvaja različite dijelove udova. Hematoksilin i eozin obojenje bar = 250  $\mu$ m. (D) Gornji udovi u 7. razvojnog tjednu pokazuju prisutnost hrskavičnih falangi u budućim prstima (f) koje su odvojene mezenhimom (m). Toluidinsko modrilo, bar = 250  $\mu$ m. (E) U 9. razvojnog tjednu, susjedni prsti (f) sadrže hrskavične falange prekrivene mezenhimom (m). Hematoksilin i eozin obojenje, bar = 250  $\mu$ m.

Tijekom daljnjeg razvoja, zgusnuća mezenhimskih stanica postaju naglašenija, a uzduž osnova udova primjećuju se dva kružna suženja koja odvajaju buduće dijelove udova (podlaktica, nadlaktica, šaka) (Slika 8C). U kasnijim razvojnim stadijima, mezenhimska zgusnuća se prvo se diferenciraju u hrskavicu (Slika 8D), a potom u kosti udova odnosno prstiju. Krajem 9. razvojnog tjedna, razdvajanje prstiju je završeno, falange su oblikovane dok se preostali okolni mezenhim diferencira u tetive, mišiće ili vezivno tkivo (Slika 8E).

#### *4.2. Stanična proliferacija tijekom razvoja udova u čovjeka (Ki-67 pozitivne stanice)*

U 6. razvojnog tjednu, brojne stanice u osnovama (pupoljcima) udova su u procesu diobe (mitoze) tj. postoji veliki broj proliferirajućih Ki-67 pozitivnih stanica, koje se nalaze i u mezenhimu i u površinskom epitelu, uključujući AEG. Proliferirajuće stanice su najbrojnije u mezenhimu ispod površinskog ektoderma, a manje prisutne u središnjim dijelovima osnova udova (Slika 9A). U 7. razvojnog tjednu, proliferacija dobiva pravilniji obrazac u budućim dlanovima i stopalima: u interdigitalnom prostoru proliferirajuće su stanice mnogobrojne, dok su rijetke u područjima diferencijacije hrskavičnih falangi. U tom razvojnog stadiju, početna invaginacija pokrovnog epitela može se uočiti na površini budućih interdigitalnih prostora (Slika 9B). U 8. razvojnog tjednu, proliferacije u osnovi udova je manja u usporedbi sa ranijim stadijima. Hrkavične falange su dobro oblikovane i sadrže malen broj proliferirajućih stanica, dok okolni mezenhim i površinski epitel još uvijek pokazuju intenzivniju proliferacijsku aktivnost (Slika 9C). Polutanki rezovi kroz osnove udova u razvoju pokazuju brojne aktivne mezenhimalne stanice s karakterističnom eukromatskom jezgrom, jasno izraženim nukleolusom i dugim citoplazmatskim nastavcima. Proliferirajuće stanice s karakteristično raspodijeljenim kromosomima vide se u osnovi udova u polutankim rezovima i u elektrotronskom mikroskopu (Slika 9, E).

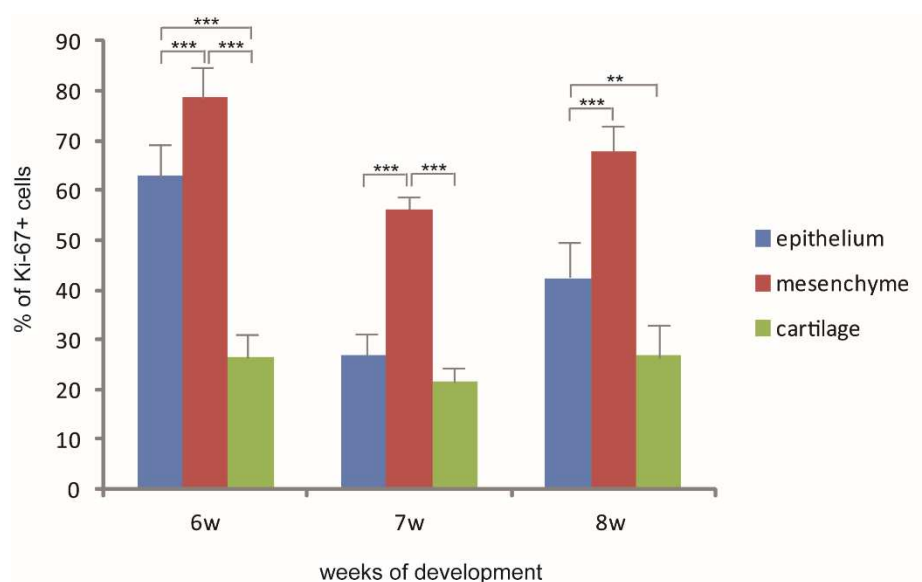




**Slika 9.** Proliferacija u budućim ljudskim udovima. (A) Gornji ud u 6. razvojnog tjednu prikazuje brojne proliferacijske stanice sa smeđe obojenom jezgrom (strelica) pozitivne na Ki-67, koje su raspodijeljene u epitelu, AER i podležecem mezenhimu (m) koji sadrži marginalnu venu (v). Imunohistokemijsko obojenje na Ki-67, bar = 250  $\mu\text{m}$ . (B) Gornji ud u 7. razvojnog tjednu pokazuje relativno nizak broj proliferacijskih stanica pozitivnih na Ki-67 u hrskavičnim falangama prstiju (f) te brojne smeđe obojene proliferacijske stanice u interdigitalnom mezenhimu (m) i epitelu (e). Plitku invaginaciju površinskog epitela (strelica) iznad interdigitalnog mezenhimac predstavlja početak odvajanja prstiju. Velika povećanja pokazuju granicu između mezenhima (m) koji sadržava brojne proliferacijske stanice (velike strelice) i hrskavične dijelove falangi prstiju (f) s jako malo proliferacijskih stanica. Imunohistokemijsko bojenje na Ki-67, bar = 100  $\mu\text{m}$ , umetak bar = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Gornji udovi u 8. razvojnog tjednu pokazuju hrskavične falange prstiju (f) sa rastrkanim proliferacijskim stanicama, dok okolni mezenhim (m) i epitel sadrže više smeđe obojenih Ki-67 proliferativnih stanica (strelice). Uočavaju se duboki interdigitalni prostori koji odvajaju susjedne prste. Velika povećanja pokazuju proliferacijske stanice (strelice) u epitelu (e) i mezenhimu (m). Imunohistokemijsko obojenje na Ki-67, bar = 250  $\mu\text{m}$ , imetak bar = 25  $\mu\text{m}$ . (D) 4. razvojni tjedan, mezenhim gornjih udova s jedinom proliferacijskom stanicom (strelica) koja je smještena između mezenhimskih stanica sa svjetlije obojenom jezgrom. Polutanki rezovi gornjeg uda, bojenje Toluidinskim modrilom, bar = 10  $\mu\text{m}$ . (E) Ultrastruktura proliferacijske stanice (strelica) s tamnim obojenjem jezgre u embriju starom 5 tjedana. TEM, bar = 0,25  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3. Statistička analiza proliferirajućih Ki-67 pozitivnih stanica

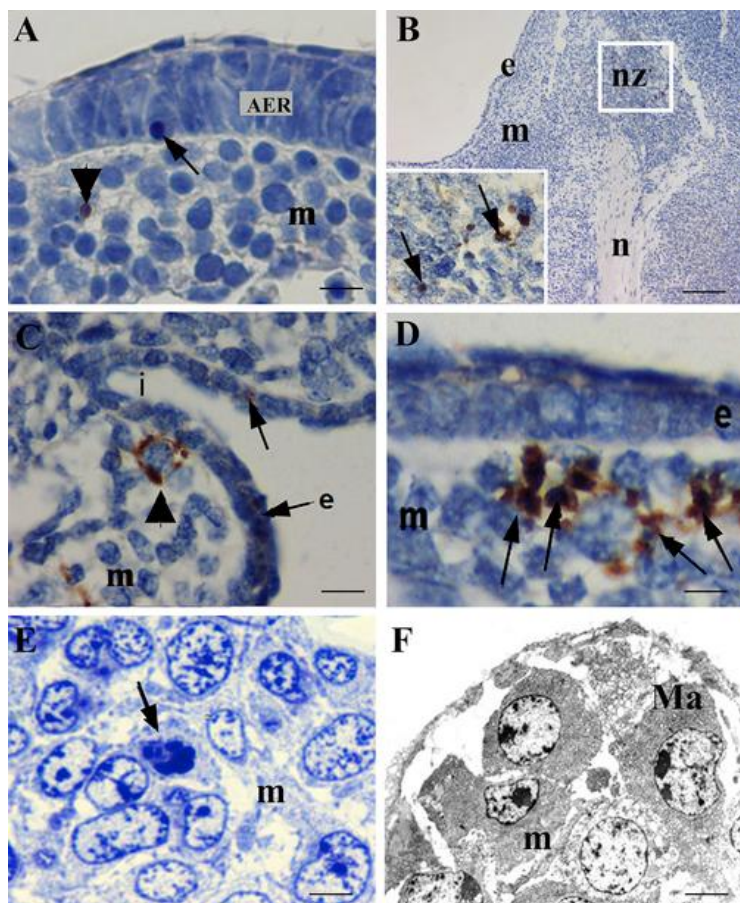
U 6. razvojnog tjednu udio Ki-67 pozitivnih stanica je vrlo visok u osnovi budućih udova. Unutar površinskog epitela, 62% stanica su u stadiju proliferacije uključujući i područje AEG. Mezenhimske stanice pokazuju veći stupanj stanične proliferacije tj. 78% ih je pozitivno na biljeg Ki-67. Proliferacijski indeks je značajno viši u mezenhimu nego u epitelu udova tijekom razvoja. Unutar mezenhima proksimalnih dijelova pupoljaka budućih udova, središnje dijelovi pokazuje karakteristike početne hondrogeneze (diferencijacija hrskavice), s relativno niskim proliferacijskim indeksom od 27%, dok okolni epitel i mezenhim imaju značajno veći proliferacijski indeks nego hrskavica. U području budućih dlanova i tabana, za sada nema znakova ohrskavičenja falangi pa je stoga proliferacija i dalje visoka. U 7. tjednu, proliferacija se smanjuje u svim tkivnim komponentama osnove udova. Dok se u epitelu nalazi 27% proliferirajućih stanica, mezenhimske stanice sadrže 55% stanica koje se dijele. Hrskavično tkivo budućih falangi sadrži 21% Ki-67 pozitivnih stanica. Proliferacija u mezenhimu je značajno veća nego u epitelu i hrskavici. U 8. tjednu, proliferacija epitela raste na 42%, naročito u onim dijelovima epitela koji pokrivaju površinu interdigitalnog prostora. U mezenhimu udio Ki-67 pozitivnih stanica raste na 69% omogućavajući izduživanje prstiju dok je u hrskavičnim falangama 27% proliferirajućih stanica primarno lokalizirano u perihondriju. I u ovom razvojnog stadiju osnove udova, mezenhim pokazuje značajno veći proliferacijski indeks u usporedbi s epitelom i hrskavicom (Slika 10).



**Slika 10.** Raspodjela stanica pozitivnih na Ki-67 u budućim ljudskim udovima između 6. i 8. razvojnog tjedna. Šesti tjedan (6w), sedmi tjedan (7w), osmi tjedan (8w). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Plavi stupac-epitel, crveni stupac-mezenhim, zeleni stupac-hrskavica. Razlika značajnosti (Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc test) je određena kao  $**p < 0.001$ ,  $*** p < 0.0001$ .

#### *4.4. Kaspaza-3 pozitivne apoptotske stanice tijekom razvoja udova u čovjeka*

U 6. razvojnog tjednu, apoptotske kaspaza-3 pozitivne stanice uočene u mezenhimu i u epitelu osnove udova, uključujući AEG. Apoptotske stanice imaju smeđe obojene jezgre dok apoptotska tjelešca sadržavaju smeđe obojene fragmente jezgre okružene dijelovima citoplazme raspadnutih apoptotskih stanica (Slika 11A). U tom stadiju, skupine apoptotskih stanica su najbrojnije u proksimalnim dijelovima mezenhima osnove udova što najvjerojatnije odgovara tzv. nekrotičnoj zoni (Slika 11B). Osim kaspaza – 3 pozitivnih apoptotskih stanica, epitel i mezenhim AEG sadržavaju i tamne, hemalaunom obojene jezgre i jezgrine fragmente koji su kaspaza-3 negativni (Slika 11A, B). U 7. razvojnog tjednu broj kaspaza -3 pozitivnih stanica raste, naročito oko početnih invaginacija pokrovnog epitela i mezenhima smještenih iznad budućih interdigitalnog prostora, označavajući područja odvajanja prstiju. Skupine apoptotskih stanica ili njihovih fragmenata nakupljaju se na površini epitela i u podležecem mezenhimu (Slika 11C). Tijekom daljnjeg razvoja (8.razvojni tjedan), za vrijeme procesa odvajanja prstiju, skupine apoptotskih kaspaza-3 pozitivnih stanica uočene su u mezenhimu izpod površinskog epitela. One su prvenstveno lokalizirane uzduž područja odvajanja prstiju (Slika 11 D). Polutanki rezovi kroz mezenhim osnove udova otkrivaju svijetlu, eukromatsku jezgru mezenhimskih stanica s istaknutim nukleolusom. Pojedinačne apoptotske stanice u mezenhimu imaju heterokromatsku jezgru koja pokazuje znakove fragmentacije (Slika 11E). U elektronskom mikroskopu u blizini apoptotskih stanica uočene su i stanice s istaknutim endoplazmatskim retikulumom, mitohonrijima, Golgijevim tijelom i lizosomima koje vjerojatno predstavljaju makrofage koji fagocitiraju ostatke odumrlih stanica (Slika 11F).

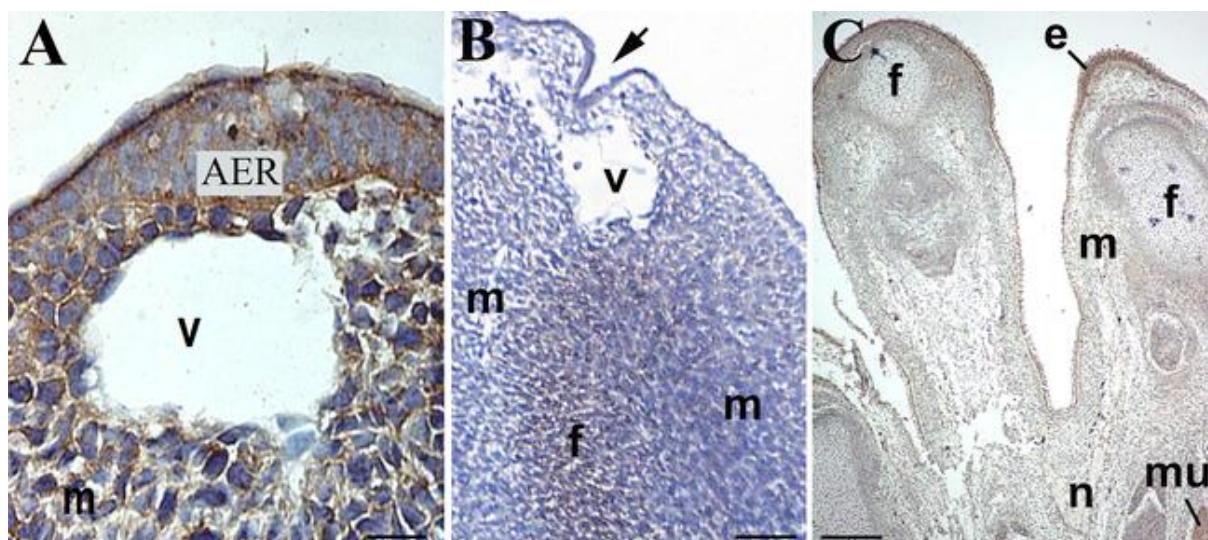


**Slika 11.** Apoptoza u ljudskim udovima tijekom razvoja. (A) Smeđe obojenje stanica pozitivnih na kaspazu – 3 (strelica) vidi se u mezenhimu (m) i AER u 6. razvojnom tjednu u. Neke stanice s plavom jezgrom su kaspaza-3 negativne (strelica). Imunohistokemijsko bojenje na kaspazu-3, bar = 10  $\mu$ m (B). U 6. razvojnom tjednu, skupine kaspaza-3 pozitivnih stanica (strelice) vide se u proksimalnom mezenhimu (m) oblikujući nekrotičnu zonu (nz). Površinski epitel (e) i živac (n). Veća povećanja prikazuju apoptotske stanice (strelice) u nekrotičnoj zoni. Imunohistokemijsko obojenje na kaspazu-3, bar = 250  $\mu$ m, umetak bar = 25  $\mu$ m (C) Nakupljanje kaspaza-3 pozitivnih stanica (strelice) vidi se u epitelu (e) i mezenhimu (m) (strelice) ispod površinskog epitela (e) u području interdigitalne invaginacije (i) u 7. razvojnom tjednu. Imunohistokemijsko obojenje na kaspazu-3, bar = 10  $\mu$ m (D) Brojne apoptotske kaspaza-3 pozitivne stanice (strelice) vide se u mezenhimu (m) gornjih udova ispod interdigitalnog epitela (e) tijekom 8. razvojnog tjedna. Imunohistokemijsko obojenje na kaspazu-3, bar = 10  $\mu$ m (E) Mezenhimske stanice udova (m) imaju svijetlu eukromatsku jezgru, dok apoptotske stanice imaju tamnu i fragmentiranu jezgru (strelica). Polutanki rez kroz mezenhim uda u 6. razvojnom tjednu, bar = 10  $\mu$ m. (F) U 6. razvojnom tjednu mezenhim gornjeg uda (m) sadrži makrofage (Ma), endoplazmatski retikulum, mitohondrije, Golgijeva tjelešca i lizosome. TEM, bar = 0,25  $\mu$ m.



#### 4.5. Bcl-2 pozitivne stanice tijekom razvoja udova u čovjeka

U 6. razvojnog tjednu, izražaj bjelancevine Bcl-2 jako izražen u površinskom epitelu osnove udova, uglavnom u području AEG. Središnji dio mezenhima udova pokazuje slabu ekspresiju Bcl-2, izuzev dio mezenhimskih stanica neposredno ispod epitela AEG, koje su umjereno pozitivne na Bcl-2 (Slika 12A). U 7. razvojnog tjednu, Bcl-2 je umjereno izraženu područjima falangealnih hrskavica dok stanice u interdigitalnom prostoru ne pokazuju pozitivan Bcl-2 signal (Slika 12B). U 8. tjednu razvoja, Bcl-2 bjelancevina jako je izražena u epitelu koji pokriva vrhove prstiju, uglavnom u bazalnim stanicama te u mišićima. Dok Bcl-2 je umjereno izražen u epitelu koji pokriva interdigitalni prostor, njegov izražaj u osnovama falanga i mezenhimu je slab (Slika 12C).

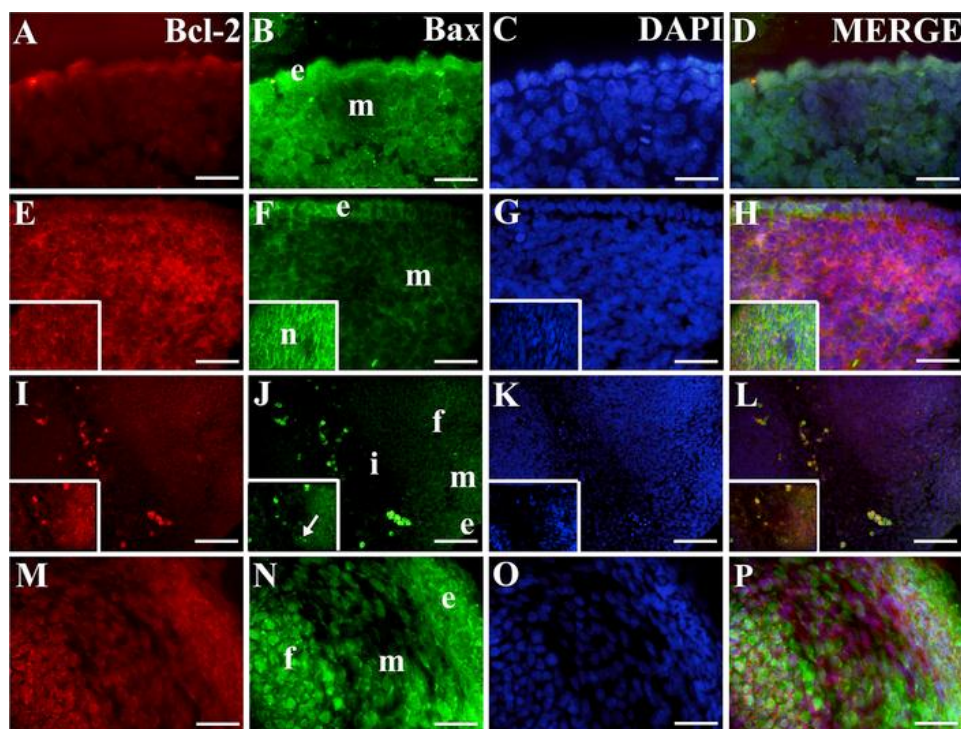


**Slika 12.** Bcl-2 ekspresija za vrijeme razvoja udova. (A) Rez kroz gornji ud u 6. tjednu prikazuje jaki izražaj Bcl-2 u AEG i umjereni izražaj u podležecem mezenhimu (m). Marginalna vena (v). Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2, bar = 10  $\mu$ m (B) U 7. razvojnog tjednu, Bcl-2 je umjereno izražen u falangama budućih udova (f), dok je njegov izražaj odsutan u interdigitalnom mezenhimu (m). Invaginacija površinskog epitela (strelica) uvlači se u podležeci mezenhim s marginalnom venom (v). Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2, bar = 100  $\mu$ m. (C) U 9. razvojnog tjednu, Bcl-2 je jako izražen u epitelu (e) vrhova prstiju, različitim mišićima (mu), dok prsti s hrskavičnim falangama (f), mezenhimom (m) i živcima (n) pokazuju vrlo slabo obojenje na Bcl-2. Imunohistokemijsko bojanje na Bcl-2, bar = 250  $\mu$ m.

#### 4.6. Koekspresija Bcl-2 i Bax tijekom razvoja udova u čovjeka

U 6. razvojnog tjednu, antiapoptotika Bcl-2 bjelancevina (Slika 13A) i proapoptotika BAX bjelancevina (Slika 13B) istovremeno su prisutne u stanicama udova tijekom razvoja, pri čemu se BAX je jako izražen u stanicama površinskog epitela i podležecem mezenhimu. DAPI boja oboji plavo stanične jezgre (Slika 13C). Preklapanje rezova obojenih s Bcl-2 i Bax

biljezima pokazuje dominantni izražaj BAX-a naspram Bcl-2 u svim tkivnim komponentama udova (Slika 13D). U 7. razvojnog tjednu, mezenhim udova pokazuje povećani izražaj Bcl-2 (Slika 13E) i smanjeni izražaj BAX-a u odnosu na raniji razvojni stadij (Slika. 6F), dok su jezgre obojane DAPI-jem plavo (Slika 13G). Preklapanje različitih obojenja, pokazuje dominaciju Bcl-2 u subepitelnom mezenhimu i povećanje izražaja BAX-a u nekim epitelnim stanicama (Slika 13H). U proksimalnom dijelu histološkog reza istog uda, izražaj BAX-a je jak, dok je izražaj Bcl-2 bjelančevine umjeren u područjima gdje živčana vlakna prodiru u udove (isječak slike 13E–H). U 8.razvojnog tjednu, izražaji bjelančevina Bcl-2 (Slika 13I) i BAX (Slika 13J) su umjereni izraženi u područjima falangi, dok je interdigitalnim područjima njihov izražaj jako slab. Uz to, brojne krvne žile mogu se uočiti u raspadajućem interdigitalnom mezenhimu. Preklapanje DAPI bojanja za jezgre (Slika 12K) s obojenjem za BAX i Bcl-2 pokazuje dominaciju izražaja Bcl-2 u falangama i BAX-a u nediferenciranom mezenhimu (Slika 13L). Veće povećanje interdigitalnih područja otkriva brojne stanice jako pozitivne na BAX (Slika 13J isječak) i odsutnost Bcl-2 reaktivnosti (Slika 13I, K, L). U 9. razvojnog tjednu, vrhovi razdvojenih prstiju pokazuju jaki izražaj bjelančevina Bcl – 2 (Slika 13M) i BAX (Slika 13N) u hrskavičnim falangama, površinskom epitelu i podležećem vezivnom tkivu. Jezgre su obojane DAPI-jem plavo (Slika 13O). Preklapanjem različitih obojenja pokazuje se jača izražaj BAX-a u površinskom sloju epitela i hrskavici dok Bcl-2 dominira u subepitelnom vezivnom tkivu (Slika 13P).

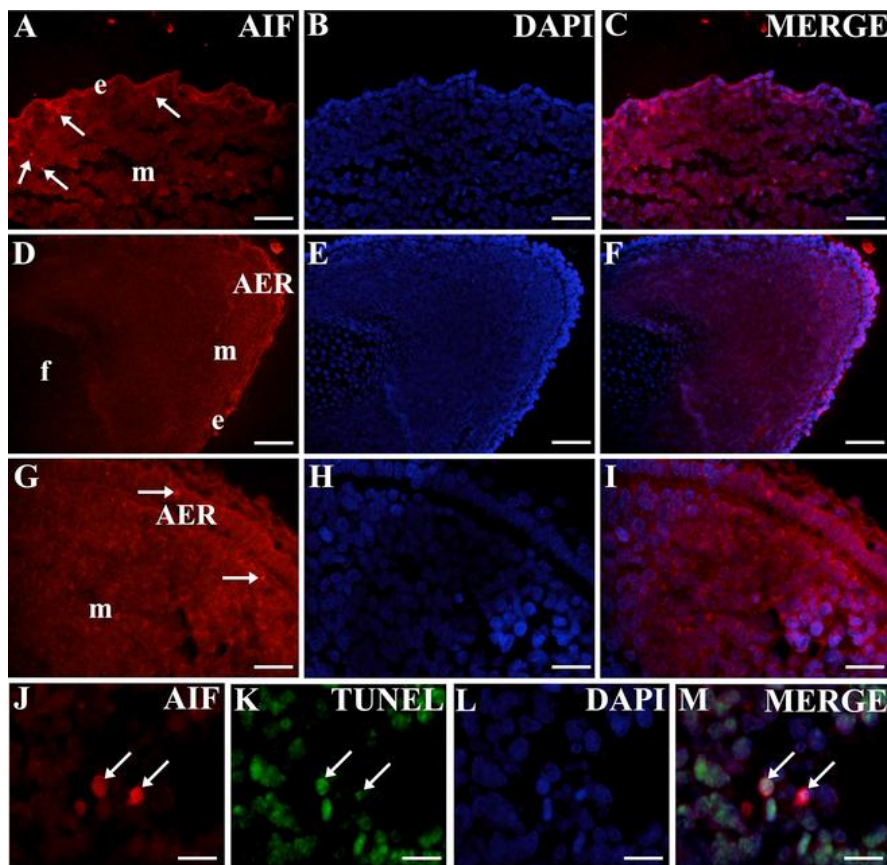


**Slika 13.** Ko-ekspresija Bcl-2 i Bax u osnovama ljudskim udova. (A) U 6. razvojnog tjednu, epitel (e) i mezenhim (m) pokazuju umjereni izražaj Bcl-2. (B) BAX je jako izražen u svim strukturama udova. (C) DAPI boji sve stanične jezgre. (D) Preklapanje A+B+C prikazuje dominirajući izražaj BAX nad Bcl-2. (E) U 7. razvojnog tjednu Bcl-2 je jako izražen u mezenhimu (m) i umjereno izražen u epitelu (e). (F) Bax prikazuje promjenjivu ekspresiju u usporedbi s Bcl-2, osim u živcima (umetnuti dio slike). (G) DAPI boji sve jezgre struktura uda. (H) Preklapanje E+F+G pokazuje dominantni izražaj Bcl-2 u mezenhimu, dok BAX dominira u epitelu i u živcima (umetnuti dio slike). (I) U 9. razvojnog tjednu, Bcl-2 je umjereno izražen u budućim prstima, ali ne i u interdigitalnim prostorima (i) (umetnuti dio slike). (J) BAX je jako izražen u epitelu i mezenhimu na vrhovima prstiju te u nekim stanicama interdigitalnog prostora (umetnuti dio slike). (K) DAPI boji stanične jezgre. (L) Preklapanje I+J+K pokazuju dominantni izražaj BAX u nekim stanicama interdigitalnog mezenhima (strelice). (M) Vrhovi prstiju u 9. razvojnog tjednu pokazuju umjereni izražaj Bcl-2 u epitelu (e), mezenhimu (m) i hrskavici prstiju (f). (N) Sve strukture su jako obojene na BAX (O) DAPI boja jezgre svih tkiva. (P) Preklapanje M+N+O pokazuje dominantnu ekspresiju BAX u epitelu i hrskavici i Bcl-2 u mezenhimu. Dvostuka imunofluorescencija na Bcl-2 i Bax, A-H i M-P bar = 10  $\mu$ m, I-L bar = 25  $\mu$ m.

#### *4.7. Bojanje bjelančevinom AIF i TUNEL metodom tijekom razvoja udova u čovjeka*

U 6. razvojnog tjednu, izražaj AIF-a je umjereno izražen u epitelu i mezenhimu udova tijekom razvoja. Neke stanice pokazuju jaki izražaj AIF-a u površinskom epitelu i u mezenhimu ispod AEG (Slika 14A). DAPI oboji stanične jezgre plavo (Slika 14B). Preklapanje dvaju metoda bojanja pokazuje citoplazmatski izražaj AIF-a u stanicama budućih udova (Slika 14C). U 7. razvojnog tjednu, jaki izražaj AIF-a svojstven je površinskom epitelu i mezenhimu udova tijekom razvoja, dok je njegova odsutnost vidljiva u hrskavičnim falangama prstiju (Slika 14D). DAPI oboji jezgre stanica plavo (Slika 14E). Preklapanje s AIF-om pokazuju citoplazmatsku lokalizaciju AIF-a u stanicama opisanih područja (Slika 14F). U 9. razvojnog tjednu, izražaj AIF-a je najintenzivniji u područjima vrhova prstiju te u nekim epitelnim i mezenhimskim stanicama (Slika 14G). DAPI oboji stanične jezgre plavo (Slika 14H), dok preklapanje s AIF-om pokazuju jaki citoplazmatski izražaj AIF-a u nekim stanicama AEG i podležecg mezenhima (Slika 14I). Dvostruko bojanje AIF-om i TUNEL metodom, u 6. razvojnog tjednu pokazuje samo nekoliko jako AIF pozitivnih mezenhimskih stanica (Slika 14J), i brojne pozitivne TUNEL stanice (Slika 14K). DAPI oboji sve jezgre plavo (Slika 14L), a nakon preklapanja sa AIF i TUNEL metodom bojanja, uočava se ko-ekspresija TUNEL-a u jezgrama i AIF-a citoplazmama istih stanica (Slika 14M).



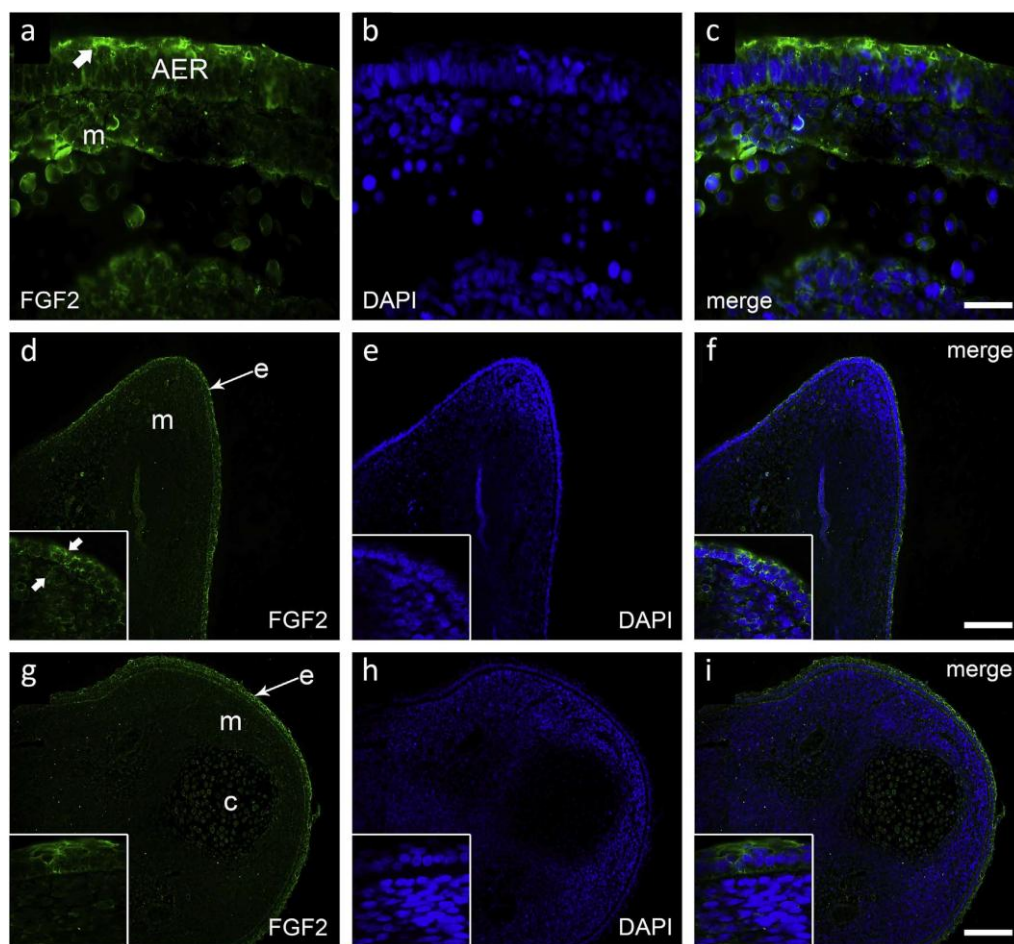


**Slika 14.** Izražaj AIF i TUNEL tijekom razvoja ljudskih udova. (A) Rez kroz gornji ud u 6. razvojnog tjednu pokazuje da je AIF umjereno izražen u epitelu (e) i mezenhimu (m) te jako izražen u nekoliko stanica (strelice). (B) DAPI boji jezgre svih stanica. (C) Preklapanje A+B pokazuje citoplazmatski izražaj AIF. (D) U 7. razvojnog tjednu, izražaj AIF je odsutan u hrskavicama falangi prstiju (f), dok je umjereno izražen u površinskom epitelu (e) i mezenhimu (m). (E) DAPI boji jezgre svih stanica. (F) Preklapanje D+E prikazuje citoplazmatski izražaj AIF. (G) Vrhovi prstiju ljudskih udova u 9. razvojnog tjednu pokazuju jaki izražaj AIF u epitelu (e) i mezenhimu (m). (H) DAPI boji stanične jezgre. (I) Preklapanje G+H pokazuje jaku citoplazmatski izražaj AIF u stanicama na vrhovima prstiju. Imunofluorescencijsko bojanje na AIF i DAPI, A-C bar = 10  $\mu$ m; D-F bar = 25  $\mu$ m; G-I = 10  $\mu$ m. (J) Mezenhim u 6. razvojnog tjednu pokazuje jako pozitivne stanice na AIF (strelice). (K) TUNEL metoda pokazuje staničnu smrt i brojnim mezenhimskim stanicama (strelice). (L) DAPI boji sve jezgre mezenhimskih stanica. (M) Preklapanje J+K+L pokazuje ko-ekspresiju AIF i TUNEL u istim stanicama. Imunofluorescencijsko bojanje na AIF, TUNEL i DAPI, bar = 10  $\mu$ m. *Imunofluorescencija*



#### 4.8. Izražaj FGF2 tijekom razvoja udova u čovjeka

Između 6. i 9. tjedna razvoja, jak izražaj FGF2 svojstven je pokrovnom epitelu i AEG-u osnove budućih udova. Tijekom daljnjeg razvoja, najjači izražaj FGF2 vidi se u području neposredno ispod AEG-a, dok se njegov umjereni izražaj vidi u susjednom mezenhimskom području. Diferencirajući hondrociti također su jako pozitivni na FGF2 bjelančevinu (Slika 15.a-i).

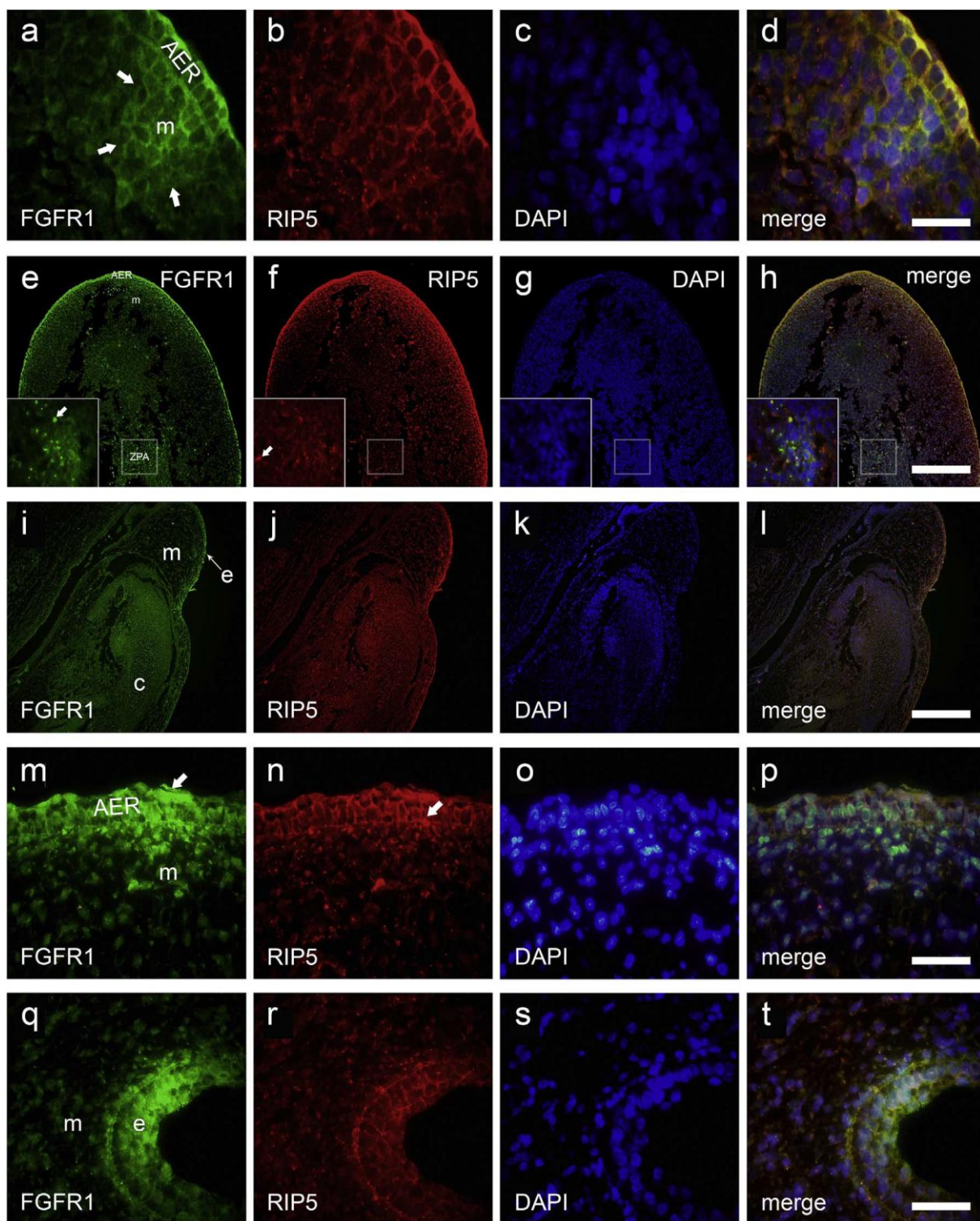


**Slika 14.** a-c. Ljudski udovi u 6. razvojnog tjednu pokazuju jaki citoplazmatski izražaj FGF2 (strelica) u površinskom epitelu, AEG i podležućem mezenhimu (m) (a), dok su jezgre obojene plavo s DAPI (b). Preklapanje dvaju bojanja (c). Imunofluorescencijsko bojanje na FGF2 i DAPI,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). d-f. Ljudski ud u 7. razvojnog tjednu pokazuje jaki izražaj FGF2 (strelica) u površinskom epitelu (e) i nejednaki izražaj u podležućem mezenhimu (m) (inset), dok su jezgre bojane s DAPI plavo (e). Preklapanje dvaju bojanja (f). Imunofluorescencijsko bojanje na FGF2 i DAPI,  $\times 20$  (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ), inset  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). g-i. Ljudski ud u 7. razvojnog tjednu pokazuje jaku citoplazmatski izražaj FGF2 (strelica) u površinskom epitelu i u podležućem mezenhimu (m) (umetak) i u hrskavičnim falangama (c) (g), dok su jezgre bojane s DAPI plavo (h).

Preklapanje dvaju bojenja (i). Imunofluorescencijsko bojanje na FGF2 i DAPI,  $\times 20$  (scale bar=50  $\mu\text{m}$ ), inset  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ).

#### *4.9. Izražaj FGFR1 i RIP5 tijekom razvoja udova u čovjeka*

U 5. i 6. razvojnog tjednu, osnove budućih udova pokazuju jak izražaj FGFR1 i RIP5 u površinskom epitelu, AEG-u i u podležućem mezenhimu zone rasta, gdje izražaj ima ovalni oblik. U mezenhimu koji odgovara području zone polarizirajuće aktivnosti, izražaj FGFR1 i RIP5 je jača u usporedbi s okolnim mezenhimom. Oba područja pokazuju djelomičnu ko-ekspresiju dvaju biljega (Slika 15 a-d, e-h). U 7. tjednu razvoja, jaki izražaj FGFR1 i RIP5 uočava se u površinskom epitelu i hondrocitima hrskavičnih falangi, dok je signal slabiji u vezivnom tkivu budućih prstiju (Slika 15 i-l). U 8. i 9. razvojnog tjednu, vrhovi odvojenih prstiju pokazuju jak izražaj FGFR1 i RIP5 u epitelu i mezenhimu zone rasta. Izražaj FGFR1 je jači nego izražaj RIP5, dok ova dva biljega pokazuju ko-ekspresiju u epitelnim i mezenhimskim stanicama. Isti obrazac ekspresije dvaju biljega svojstven je najdubljem dijelu epitela u interdigitalnoj zoni odvajanja prstiju (Slika 15 m-p, q-t).



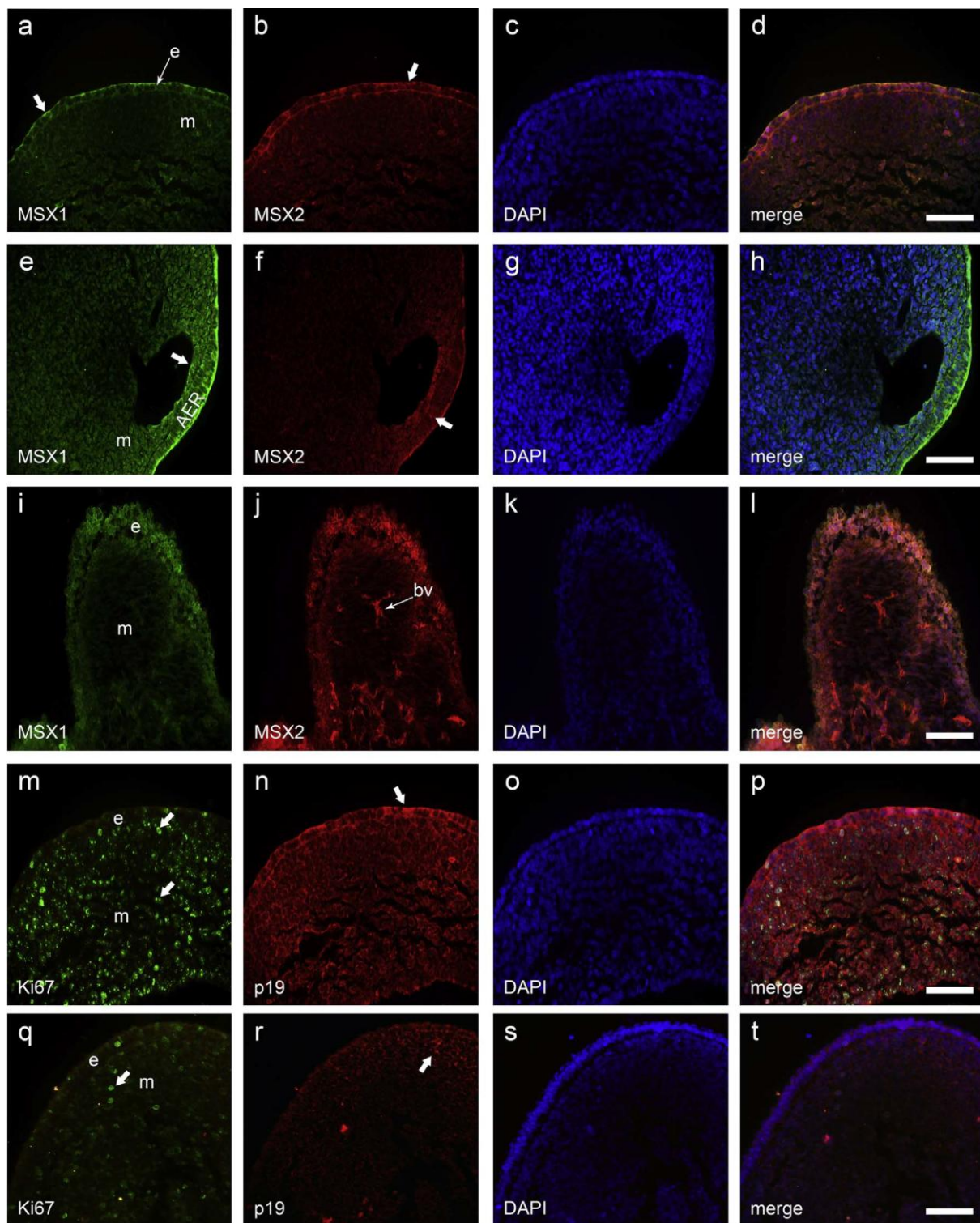
**Slika 15.** a-d. U 6. razvojnog tjednu FGFR1 je jako izražen u AEG, a ovalnog je oblika (ocrtano strelicama) u podležućem mezenhimu (m) (a) dok je izražaj RIP manje intenzivan u istom području (b). Jezgre su bojane s DAPI plavo (c), dok preklapanje različitih bojanja pokazuje djelomičnu ko-ekspresiju FGFR1 i RIP5 (d). Dvostruka imunofluorescencija na FGFR1, RIP5 i DAPI obojenje jezgre,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). e-h. Uzdužni rez kroz ljudski ud u 6. razvojnog tjednu pokazuje izražaj FGFR1 (e) i RIP5 (f) u AEG, mezenhimu (m) i u zoni polarizirajuće aktivnosti (ZPA). Detalji ZPA (umetnuti dio) pokazuju točkastu ekspresiju (strelice) oba

protutijela. Jezgre su bojane s DAPI (g), dok preklapanje različitih obojenja pokazuje djelomičnu ko-ekspresiju primijenjenih protutijela (h). Dvostruka imunofluorescencija FGFR1, RIP2 i DAPI obojenje jezgre,  $\times 20 \mu\text{m}$  (scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ), umetak  $\times 100$  (scale bar =  $10 \mu\text{m}$ ). i-l. Tangencijalni rez kroz ud u 7. razvojnog tjednu, FGFR1 (i) i RIP5 (j) su jako izraženi (strelice) u površinskom epitelu i hrskavicama (c) te slabo u mezenhimu (m). Jezgre su bojane na DAPI (k), preklapanje različitih bojenja (l). Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje na FGFR1, RIP2 i DAPI obojenje jezgre,  $\times 20$  (scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ). m-p. Ljudski vrhovi prstiju u 9. razvojnog tjednu pokazuju jaki izražaj FGFR1 (m) i RIP5 (n) (strelica) u površinskom epitelu (e) i podležem mezenhimu. Preklapanje DAPI obojenja (o) s drugim bojenjima pokazuje ko-ekspresiju dvaju markera, ali dominantnu FGFR1 ekspresiju (p). Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na FGFR1, RIP2 i DAPI obojenje,  $\times 100$  (scale bar =  $10 \mu\text{m}$ ). q-t. Područje najdubljeg dijela interdigitalnog prostora u 9. razvojnog tjednu pokazuje jaki izražaj FGFR1 (q) i RIP5 (r) u površinskom epitelu (e) i njihovu slabu ekspresiju u mezenhimu (m). Preklapanje DAPI obojenja (s) s drugim bojenjima (t) pokazuje ko-ekspresiju dva biljega s dominirajućim izražajem FGFR1. Dvostruka imunofluorescencija na FGFR1, RIP2 i DAPI obojenje jezgre,  $\times 100$  (scale bar =  $10 \mu\text{m}$ ).

#### *4.10. Izražaj MSX-1 i MSX-2 tijekom razvoja udova u čovjeka*

Krajem 4. tjedna razvoja, MSX-1 je umjereno izražen u pokrovnom epitelu, a slabo u podležem mezenhimu, dok je MSX-2 umjereno izražen u epitelu i njegovoj bazalnoj membrani te u mezenhimu. Oba biljega pokazuju ko-ekspresiju u epitelu i mezenhimu osnove udova, izuzevši bazalnu membranu koja je pozitivna samo na MSX-2 (Slika 16. a-d). U 6. razvojnog tjednu, izražaj MSX-1 postaje intenzivniji u epitelu i AEG-u (površinskim stanicama) te podležem mezenhimu, dok se izražaj MSX-2 povećava u površinskim epitelnim stanicama, bazalnoj membrani i podležem mezenhimu. Ko-ekspresija MSX-1 i MSX-2 je uočena u mnogim dijelovima pupoljka budućih udova, ali izražaj MSX-1 je jači (Slika 16. e-h). Izražaj MSX-1 i MSX-2 također je uočen u interdigitalnom tkivu. U 8. razvojnog tjednu, vrhovi prstiju pokazuju jaki izražaj MSX-1 u epitelu, dok mezenhim pokazuje umjereni izražaj. Izražaj MSX-2 je intenzivan u epitelu te endotelu krvnih stanica. Oba biljega pokazuju ko-ekspresiju u osnovama budućih prstiju, izuzevši endotelne stanice krvnih žila koje prikazuju isključivo izražaj MSX-2 (Slika 16. i-l). MSX-1 i MSX-2 pokazuju izražaj i u jezgri i u citoplazmi (Slika 16 i-l), ali je citoplazmatski izražaj intenzivniji (Slika 5), red a-c; redovi MSX-1/DAPI i MSX-2/DAPI).





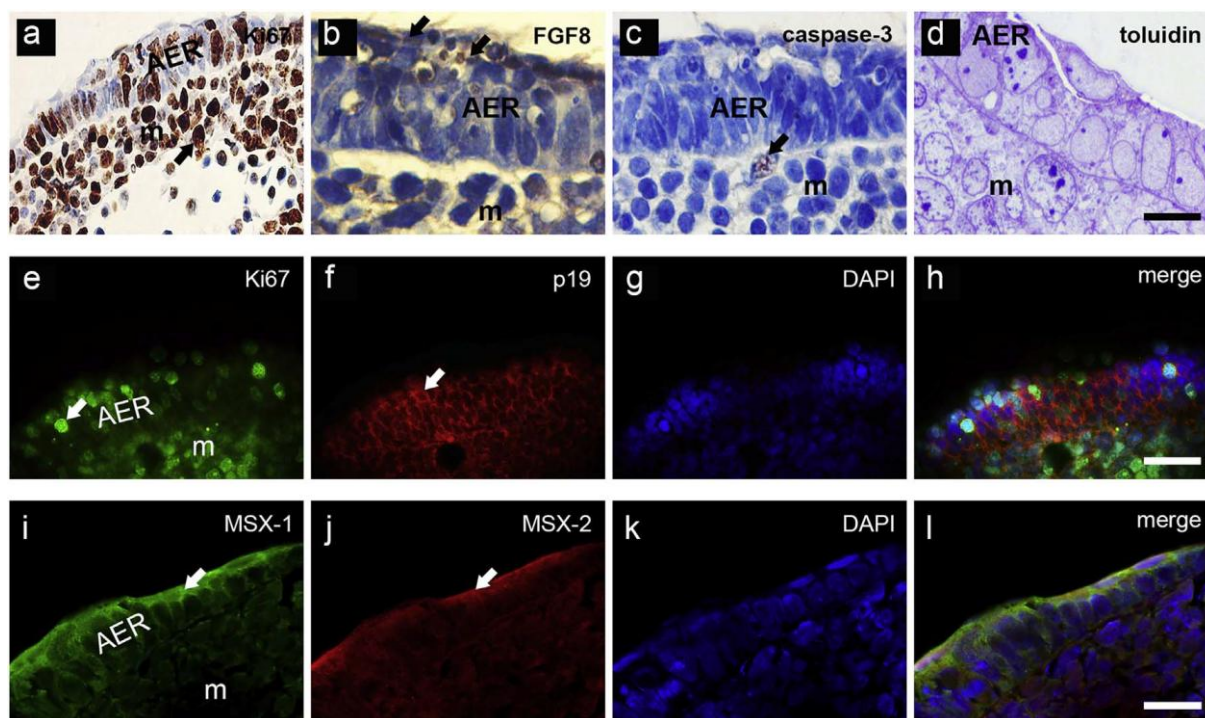
**Slika 16.** a-d. U 4. razvojnog tjednu, MSX-1 je slabo izražen u nekim stanicama (tanke strelice), a istovremeno jako izražen (debela strelica) u drugim stanicama pokrovnog epitela (e) i podležućeg mezenhima (m)(a) dok MSX-2 je umjereno izražen u istim strukturama (b). Preklapanje DAPI obojenja jezgre s drugim bojanjima pokazuje ko-ekspresiju MSX-1/MSX-2 osim u području bazalne membrane (d). Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na MSX-1, MSX-2 i DAPI obojenje,  $\times 40$  (scale bar=25  $\mu\text{m}$ ).

e-h. U 6. razvojnog tjednu jači izražaj MSX-1 (e) i MSX-2 (f) (strelice) vidi se u AEG i mezenhimu (m) u usporedbi s ranijim stadijima. Preklapanje dva protutijela s DAPI obojenjem (g) pokazuje ko-ekspresiju MSX-1 i MSX-2 s dominirajućim izražajem MSX-1 (h). Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na MSX-1, MSX-2 i DAPI obojenje,  $\times 40$  (scale bar=25  $\mu\text{m}$ ). i-l. Vrhovi prstiju u 8. razvojnog tjednu pokazuju umjereni izražaj MSX-1 u epitelu (e) i slabi izražaj u mezenhimu (m)(i), dok je MSX-2 jako izražen u epitelu i stjenkama krvnih žila (bv) (strelice)(j). Preklapanje DAPI obojenja (k) s MSX-1 i MSX-2 obojenjem (l) pokazuje njihovu ko-ekspresiju osim u stjenkama krvnih žila. Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na MSX-1, MSX-2 i DAPI obojenje,  $\times 40$  (scale bar=25  $\mu\text{m}$ ). m-p. U 4. razvojnog tjednu brojne Ki-67 pozitivne proliferacijske stanice (strelice) vide se u epitelu (e) i mezenhimu (m)(m), dok je izražaj p19 (strelice) nejednolik, ali je jako izražen u cijelom pupoljku budućeg uda (n). Preklapanje DAPI obojenja (o) s Ki-67 i p19 obojenjem pokazuje ko-ekspresiju dvaju biljega u stanicama udova (p). Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na Ki-67, p19 i DAPI obojenje,  $\times 40$  (scale bar=25  $\mu\text{m}$ ). q-t. U 7. razvojnog tjednu pozitivnost na Ki-67 (strelica) se smanjuje u epitelu (e) i mezenhimu (m)(q), dok je p19 umjereno izražen (strelice) u oba područja (r). Preklapanje DAPI obojenja (s) sa Ki-67 i p19 obojenjem prikazuje njihov obrnuto proporcionalni izražaj u stanicama tkiva udova (t). Dvostruko imunofluorescencijsko obojenje na Ki-67, p19 i DAPI obojenje,  $\times 40$  (scale bar=25  $\mu\text{m}$ ).

#### *4.11. Morfološke i imunohistokemijske osobitosti stanica AEG između 5. i 8. razvojnog tjedna*

U najranijim stadijima razvoja udova više od 90% njihovih stanica pokazuje znakove diobe tj. proliferacije (smeđe obojenje jezgre na Ki-67) u epitelnim i mezenhimskim dijelovima osnove budućih udova. Nasuprot gore navedenom izražaju Ki-67 u jezgri stanica, p19 pokazuje dominantno citoplazmatski izražaj tijekom ispitivanog razdoblja (Slika. 17, red a-c; red p19/DAPI). U 5. razvojnog tjednu, proliferirajuće stanice protežu se kroz čitavu debljinu epitela AEG-a, uključujući sve slojeve stanica (Slika 17. a). Tijekom istog razvojnog perioda, neke stanice AEG-a pokazuju jaki pozitivitet prema čimbeniku rasta FGF8, dok su druge stanice unutar AEG negativne za isti čimbenik (Slika 17. b). Imunohistokemijskim bojenjem s kaspazom – 3, uočavaju se fagocitirani ostaci kaspaza-3 pozitivnih apoptotskih stanica u citoplazmi makrofaga, koji leže u mezenhimu osnove udova (Slika 17. c). Polutanki rezovi kroz površinski epitel osnove udova i dio stanica AEG u 5. razvojnog tjednu, pokazuju da sve stanice imaju blijedo obojene eukromatske jezgre, a isti tip jezgara primijećen je također i u mezenhimu (Slika 17. d). Metodom dvostruke imunofluorescencije, u 5. razvojnog tjednu stanice apikalnog ektodermalnog grebena pokazuje najjači izražaj p19 u neproliferirajućim

Ki-67 negativnim stanicama, dok proliferirajuće stanice pokazuju slabi izražaj ili odsutstvo citoplazmatskog izražaja bjelančevine p19 (Slika 17. e-h). U 8. razvojnog tjednu, dvostrukom imunofluorescencijom u tkivu osnove udova prikaže se izražaj MSX-1 i MSX-2 u jezgrama i citoplazmama epitelnih stanica AEG-a, kao i u podležecim mezenhimskim stanicama (Slika 17 i-l).



**Slika 17.** a. Ljudski udovi u 5. tjednu razvoja: kroz sve slojeve AEG i u podležecem mezenhimu (m) vidi se jaka proliferacijska aktivnost (strelica). Imunohistokemijsko bojanje na Ki-67 i DAB,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). b. Detalj AEG u 5. razvojnog tjednu pokazuje nejednaki izražaj FGF8 (strelice) u stanicama i slabi izražaj u mezenhimskim stanicama (m). Imunohistokemijsko bojanje na FGF8 i DAB,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). c. Detalj ljudskih udova u 5. razvojnog tjednu prikazuje AEG i prisutnost fagocitiranih apoptotskih dijelova (strelica) u makrofagima smještenih u mezenhimu (m). Imunohistokemijsko bojanje na kaspaza - 3 i DAB,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). d. Polutanki rezovi površinskog epitela u 5. razvojnog tjednu, dijelovi AEG (AER) i mezenhim (m) pokazuju višeslojni epitel AEG koje se sastoji od karakterističnih svijetlo obojenih jezgara s prominirajućim nukleolima. Polutanki rez, Toluidinsko modriilo, 100 (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). e-h. Detalj ljudskog uda u 5. razvojnog tjednu: biljeg proliferirajućih stanica Ki-67 (strelica) izražen je kroz sve slojeve AEG (također i u površinskim stanicama) i u mezenhimu (m)(e), dok p19 pokazuje različit intenzitet izražaja u stanicama AEG (f). Preklapanje DAPI obojenih jezgri (g) s drugima bojanjima (h) pokazuje obrnutu proporcionalnost ko-ekspresiji Ki-67 i p19 u stanicama osnove budućeg uda. Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje na Ki-67, p19 i DAPI obojene jezgre,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ). i-l. Detalj vrhova prstiju u 8. razvojnog tjednu pokazuje jak izražaj (strelice) MSX-1 (i) i umjeren izražaj (strelice) MSX-2 i u stanične jezgri i u citoplazmi stanica AEG i mezenhima (m). Preklapanje

DAPI obojenja (k) s MSX-1 i MSX-2 pokazuje njihovu ko-ekspresiju s dominirajućim MSX-1 obojenjem (l).  
Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje na MSX-1, MSX-2 i DAPI bojenje,  $\times 100$  (scale bar=10  $\mu\text{m}$ ).



## 5. RASPRAVA

Tijekom oblikovanja udova čovjeka kao i u različitim životinjskih vrsta, molekulska kontrola stanične proliferacije i stanične smrti određuje konačni broj prstiju, njihovo oblikovanje te način njihovog odvajanja. Tijekom evolucije, precizna kontrola ovih razvojnih procesa dovela je do velike raznovrsnosti u oblikovanju udova u različitim vrsta, koje su posljedica prilagođavanja jedinki okruženju u kojem pojedine vrste žive (106).

### *5.1. Uloga stanične proliferacije u razvoju ljudskih udova*

Naše istraživanje razvoja udova u čovjeka su, slično istraživanjima na eksperimentalnim životinjama (107), pokazala da je najranijim stadijima oblikovanja ljudskih udova svojstvena intenzivna stanična proliferacija u području površinskog epitela i AEG, te u središnje smještenom mezenhimskom tkivu. Na histološkim presjecima kroz osnove udova, početni znakovi razvoja hrskavice (hondrifikacije) i živčane inervacije uočeni u proksimalnim dijelovima udova, dok su u distalnim dijelovima istih udova (osnovama budućih tabana i dlanova) mezenhimske stanice još bile potpuno nediferencirane. To odgovara prethodno dokazanim principima razvoja udova na eksperimentalnim životinjama, koji se odvija u proksimo-distalnom smjeru. Naime, prijašnje studije na životinjama otkrile da upravo signalizacija iz AEG omogućava PD diferencijaciju pupoljka budućeg uda, stvaranjem brojnih fibroblastnih čimbenika rasta (poput FGF 4, 8, 9 i 17). Oni omogućuju da distalni mezenhim udova ostane u obliku nediferenciranih proliferirajućih stanica kroz određeno razdoblje tijekom razvoja udova (108; 11., 109). Pokazano je da se stanice neposredno ispod AEG (zona rasta) proliferiraju, a zatim se kontinuirano pripajaju stanicama smještenim distalno od hrskavičnih osnova budućih prstiju (koje se engleski nazivaju phalanx forming region ili PFR) omogućujući tako rast udova.

Naša studija pokazala je da se za vrijeme cijelog istraživanog razdoblja visoki proliferacijski indeks u mezenhimu ljuskih udova selektivno mijenjao, ovisno o smjeru diferencijacije pojedinih dijelova udova, omogućujući pri tome procese intenzivnog izduživanja i istodobnog odvajanja prstiju. Do sada su mnogobrojne studije provedene na pokusnim životinjama prvenstveno analizirale utjecaj različitih gena na selektivnu staničnu proliferaciju tijekom oblikovanja udova. Tako je pokazano da signalni putovi WNT i FGF potiču staničnu

proliferaciju, dok odsutnost navedenih signala dovodi do zastoja staničnog ciklusa ili do poticanja diferencijacije hondrocita budućih falangi iz mezenhimskih stanica u osnovama budućih prstiju (110). Za razliku od našeg istraživanja, ni jedna od navedenih studija nije bila usmjerena na analizu prostorno – vremenske razlike u staničnoj proliferaciji unutar osnove udova tijekom razvoja. Tako je naše istraživanje pokazalo da s početkom diferencijacije hrskavica (budućih kostiju udova), proliferacija stanica postaje sve manja, dok stanice koje nisu krenule putem diferencijacije (mezenhim) dugo zadržavaju visoki proliferacijski potencijal.

## *5.2. Uloga stanične smrti u razvoju ljudskih udova*

Područja stanične smrti u udovima različitih životinja prethodno su nazivana nekrotičnom zonom, ali su kasnija istraživanja pokazala da stanice zapravo propadaju procesom apoptoze, a ne nekroze (111). U našem istraživanju je nakupljanje apoptotskih stanica dokazano u mezenhimskom tkivu proksimalnih dijelova udova već za vrijeme najranijih stadija razvoja (5. tjedan). Primjena elektronske mikroskopije i imunohistokemijskog bojenja s kaspazom – 3 kao biljekom stanične smrti, upućuje na to da brojne stanice u ljudskim udovima tijekom razvoja podliježu programiranoj staničnoj smrti (PCD) ili apoptozi. U nešto kasnijim razvojnim stadijima, apoptotske stanice se pojavljuju i u distalnom mezenhimu, što je uočeno i u mišjim udovima (112), oblikujući nakupine u subepitelnom mezenhimu uzduž interdigitalnog prostora (područja odvajanja prstiju). Međutim, stanična smrt u ljudskim udovima nije bila tako masivna kako je to utvrđeno u pilećim embrijima, kod kojih se regresija tkiva smatra ključnim mehanizmom razdvajanja prstiju (113). Opisani obrazac razdvajanja ljudskih prstiju samo djelomično oponaša mehanizme uočene kod drugih sisavaca, pa se tako u miša apoptotske stanice progresivno pojavljuju u interdigitalnom tkivu (114). Genska kontrola apoptoze u interdigitalnim prostorima različitih životinjskih vrsta pokazuje neke razlike u izražaju, ovisno o tome da li su prsti u pojedine vrste povezani plivaćim kožicama (peraja u riba) ili su slobodni (20). Naše je istraživanje pokazalo da uz prisutnost kaspaza – 3 ovisne stanične smrti (apoptoze), u osnovi ljudskih udova postoji i AIF- posredovana stanična smrt koja se također pojavljuje za vrijeme oblikovanja ljudskih prstiju, naročito u najranijim razvojnim stadijima. Naime, u području AEG ljudskih embrionalnih udova primijetili smo i neke kaspaza – 3 negativne stanice, za koje smo potom dokazali da su AIF i TUNEL pozitivne apoptotske stanice. Istraživanja na različitim

pokusnim životinjama također naglašavaju AIF- posredovanu staničnu smrt kao važnog čimbenika razvoja udova (115). Tako se stanična smrt u interdigitalnim prostorima smatra posljedicom koordinirane aktivacije dvaju putova stanične smrti: kaspaza-ovisnog puta i kaspaza-neovisnog puta, koji je posljedica aktivacije lizosomalne degenerativne molekularne kaskade (57). Istraživanja koja uključuju inhibiciju ili odgađanje stanične smrti u ektodermu (epitelu) pokusnih životinja, dovode do proširenje AEG uzrokujući povećanje količine podležeg mezenhima i pojavu polidaktilije (116).

### *5.3. Anomalije uzrokovane poremećajima apoptoze u AEG*

U miševa s dvostrukim AEG-om i posljedičnom polidaktilijom i sindaktilijom donjih udova, nađen je abnormalno širok i ravan AEG koji je bio udružen sa smanjenom apoptozom u interdigitalnim prostorima (117). Ultrastrukturalno, u mezenhimu ljudskih udova primijetili smo stanice s morfološkim osobitostima makrofaga, koje su bile smještene u neposrednoj blizini apoptotskih stanica, a najvjerojatnije imaju ulogu u uklanjanju viška tkiva fagocitozom ostataka odumrlih stanica. Istraživanja na životinjama pokazala su da apoptotske stanice mogu stvarati signal koji potiče regrutiranje makrofaga i fagocitozu apoptotskih stanica ili od strane makrofaga (118) ili od strane obližnjih mezenhimskih stanica koje posjeduju fagocitnu aktivnost (119). Najčešći fiziološki signali koji potiču apoptozu u pupoljku budućeg uda su molekule koštanih morfogenetskih bjelančevina, a koje su također uključene u kontrolu oblikovanja udova i regulacije hrskavične diferencijacije (116).

Dodatno je u eksperimentalnih životinja dokazano da transkripcijski faktor GLI3 određuje broj i vrstu prstiju, suprostavljaajući se djelovanju SHH u obliku koncentracijskog gradijenta (120). Navedeno se pokazano kao važno za oblikovanje prednjih prstiju, ali ne i stražnjih (121). Novija istraživanja na transkripcijskim regulatorima HAND2 i GLI 3 ukazuju na to da bi razvoj udova kod kralješnjaka mogao biti kontroliran 4D dimenzionalnim sustavom, koji objedinjuje pozitivne i negativne regulatorne mehanizme povratne sprege (122).

#### *5.4. Utjecaj antiapoptotskih Bcl-2 i proapoptotskih BAX bjelančevina na razvoj ljudskih udova*

U našoj studiji je antiapoptotska Bcl-2 bjelančevina bila jako izražena u cijelom epitelu, uključujući AEG područje tijekom ranih razvojnih stadija. Tijekom kasnijih razvojnih stadija, tj. razdoblja odvajanja prstiju, početno blaži intenzitet izražaja Bcl-2 postajao je sve jači u mezenhimu budućih falangi, sprječavajući tako staničnu smrt u osnovama budućih prstiju. Kao što je prethodno dokazano na pokusnim životinjama, i ljudski udovi tijekom razvoja pokazuju ko-ekspresiju antiapoptotske Bcl-2 i proapoptotske BAX bjelančevine, ovisno o stupnju razvoja. Tako su Bax  $-/-$  Bak  $-/-$  dvostruki „knockout“ miševi pokazivali prisutnost interdigitalnih plivaćih kožica u području udova (73). Štoviše, u miševa s nedostatkom Bax ili Bak, ili Bim, Bid i Puma nađena je sindaktilija tj. prsti su bili spojeni zato što se interdigitalna stanična smrt nije niti pojavila (114). Sugerirano je da bi interdigitalna stanična smrt mogla biti djelomično kontrolirana članovima Bcl-2 obitelji, a djelomično aktivacijom lizosomskih degenerativnih molekularnih kaskada (106). U našoj studiji, Bcl-2 je bio jako izražen u mezenhimu neposredno ispod AEG tijekom kasnijeg razvoja udova, ukazujući na njegovu moguću ulogu u sprječavanju apoptoze unutar ove osobite stanične populacije (zona rasta), koja je važna za obim rasta i izduživanja prstiju. Naime, sudbina ovih stanica je da se ili diferenciraju ili da odumru, ovisno o signalima koje prime jednom se odmaknu iz zone rasta tj. područja mezenhima neposredno ispod AEG (106). Naši rezultati ukazuju da bi proces oblikovanja ljudskih prstiju tijekom razvoja udova može teći na dva načina: uklanjanjem interdigitalnog tkiva procesom apoptoze koja dovodi do odvajanja prstiju ili/i staničnom proliferacijom mezenhima neposredno ispod AEG, koja omogućava postepeno izduživanje prstiju.

#### *5.5. Uloga čimbenika rasta i njihovih receptora u razvoju udova čovjeka*

Naša analiza izražaja čimbenika rasta FGF2 i FGF8 u ranom razvoju udova u čovjeka pokazala je da su oba čimbenika bila prisutna u stanicama površinskog epitela, uključujući i područje AEG, dok je FGF2 dodatno bio izražen i u podležećem mezenhimu (zoni rasta) i u hrskavicama falangi. Dok su oba čimbenika bila jako izražena u površinskom ektodermu (epitelu) tijekom čitavog istraživog razdoblja, izražaj FGF2 u podležećem mezenhimu i hondrocitima falangealnih hrskavica povećavao se s napredovanjem razvojnog procesa oblikovanja udova, ukazujući na moguću ulogu FGF u rastu prstiju i oblikovanju njihovih hrskavica. Uz to, FGF2 je pokazivao puno jači izražaj u središnjem dijelu mezenhima u

području zone rasta, u usporedbi s lateralnim dijelovima osnove prstiju, gdje je izražaj FGF2 bio znatno slabiji. Sukladno našim rezultatima, istraživanja na udovima pokusnih životinja također su pokazala prisutnost FGF8 isključivo u površinskom ektodermu, za kojeg se vjeruje da se pojavljuje kao odgovor na rani izražaj drugih članova FGF bitelji (poput FGF10) u mezenhimu osnove udova (123).

U našem istraživanju, izražaj FGFR1 bio je sličan izražaju FGF2. Općenito, čimbenici rasta ostvaruju svoj učinak vezujući se na odgovarajuće receptore (FGFR) čime se aktiviraju signalne kaskade koje potiču staničnu proliferaciju, diferencijaciju i stanično preživljavanje (124). Iako je u većine životinjskih vrsta izražaj Fgfr1 bio prisutan jedino u mezenhimu, Fgfr2 je bio izražen i u ektodermu i u mezenhimu osnove budućih udova (124). U našem istraživanju smo primijetili jaki izražaj FGFR1 ne samo u mezenhimu zone rasta, nego i u dijelovima mezenhima koji odgovaraju ZPA, kao i u epitelu AEG na vršcima prstiju, te u epitelu koji pokriva najdublje dijelove interdigitalnih prostora. To govori u prilog činjenici da FGFR1 sudjeluje ne samo u rastu prstiju, već i u njihovom odvajanju. Suprotno rezultatima naših istraživanja, u embriju pileta Fgfr1 je bio prisutan u mezenhimu čitave osnove udova, ali ne i u u površinskom ektodermu za vrijeme početne indukcije i rasta pupoljaka budućih udova (125). Treba naglasiti da se navedeni podaci odnose na ranije razvojne stadije pilećih embrija u odnosu na ljudske uzorke analizirane u ovoj studiji. Općenito, istraživanja na pilećim i mišjim embrijima pokazala su da su osnovni mehanizmi oblikovanja udova evolucijski dobro očuvani, pri čemu je obrazac oblikovanja prilagođen morfološkim i funkcionalnim varijacijama povezanim s okolišnim miljeom, kao npr. u razvoju peraja riba, gdje su za razliku od kralješnjaka (tetrapoda) signali iz AEG u potpunosti isključeni (9). Štoviše, izgleda da čimbenici rasta i drugi morfogeni uključeni u razvoj udova specifično reguliraju različite tipove rasta i oblikovanja udova. Tako su prethodna istraživanja sugerirala da molekule FGF koje izlučuje AEG uglavnom omogućavaju proksimo – distalni rast udova, dok SHH koji nastaje u ZPA regulira antero – posteriorni obrazac razvoja osnove udova (126, 127). Također je pokazano da za vrijeme razvoja, neki članovi FGF obitelji mogu potaknuti nastanak prekobrojnih ektopičnih udova (81, 123), dok poremećeni izražaj molekula FGF ili FGFR1 može dovesti do različitih patoloških stanja i nastanka tumora (128, 129).

### *5.6. Uloga transkripcijskih čimbenika rasta u razvoju udova čovjeka*

Osim fibroblastnih čimbenika rasta, i transkripcijski čimbenik Msx-1 se povezuje s održavanjem zone rasta prstiju i sposobnošću njezine regeneracije (130). U našem istraživanju, citoplazmatski izražaj MSX-1 i MSX-2 nađen je i u epitelu i u podležućem mezenhimu, a oba su čimbenika bila prisutna u istima stanicama (ko-lokalizirala) tijekom čitavog istraživanog razdoblja. MSX-2 je dodatno bio jako pozitivan u stjenkama krvnih žila, te je za razliku od MSX-1 prikazivao izražaj i u citoplazmi i u jezgri. Također smo primijetili da postoji izražaj MSX-2 u perihondriju i hondrocitima hrskavica, što upućuje na njegovu ulogu u hondogenezi i oblikovanju budućih kostiju udova (131), ali vjerojatno i u razvoju krvnih žila. U skladu s nedavnim opsežnim eksperimentalnim istraživanjima na mišjim migrirajućim stanicama, MSX-1 i MSX-2 su pokazivali preklapanje u izražaju tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja, što potvrđuje da ovi čimbenici surađuju tijekom organogeneze, a naročito su uključeni u reguliranje epitelno – mezenhimskih interakcija u osnovama budućih organa (132).

Rezultati studija na pokusnim životinjama koji opisuju anomalije udružene s poremećenim izražajem Msx-1/2, mogu se također objasniti na sličan način. Tako primjerice, ektopični izražaj Msx-1 u dorzalnem ektodermu osnove budućih udova u pileta, uzrokuje nastanak ektopičnog AEG (98) ukazujući da bi Msx-1 mogao biti važan čimbenik u signalnoj kaskadi koštanih morfogenetskih bjelančevina koje su uključene u početno oblikovanje AEG (97). S druge strane, kod Msx -1/2 dvostrukih „knockout“ miševa prednji dio pupoljka budućeg uda i prednja trećina AEG uopće se ne razvijaju, uzrokujući tako agenezu prednjeg dijela mezenhima udova, uključujući i buduće područje palca (133). U prilog rezultatima ove studije govore slična preklapanja izražaja transkripcijskih čimbenika Msx1/2 u područjima epitelno – mezenhimskih interakcija unutar osnova organa u čovjeka, kao i slični obrasci izražaja prethodno opisani u zametku ljudskog zuba (104). Uzimajući u obzir moguće objašnjenje zašto su Msx bjelančevine prvenstveno izražene citoplazmi u odnosu na njihov izražaj u jezgri, treba uzeti u obzir činjenicu da Msx bjelančevine mogu ući u interakciju s homolognim transkripcijskim čimbenicima (kao što su Dlx), a te se interakcije vrlo često dešavaju upravo u citoplazmi (135, 136, 137). Uz to, miješanje čimbenika MSX između dvaju staničnih odjeljaka (citoplazme i jezgre) nedavno je dokazano u tumorogenezi, posebice u studiji o uključenosti MSX-1u nastanku tumora prednjeg režnja hipofize (138).

Stoga, transkripcijske regulacije MSX1/2 na ciljne gene može biti provedena ili direktnim vezanjem na promotorske sekvence ciljnih gena (odgovara jezgrinom MSX1/2 obrascu izražaja) ili indirektno kroz citoplazmatske interakcije s ciljnim genskim aktivatorima (odgovara citoplazmatskom MSX1/2 obrascu izražaja).

#### *5.7. Kontrola stanične smrti i proliferacije tijekom razvoja udova u čovjeka*

Osim na čimbenike rasta, njihove receptore i podređene transkripcijske čimbenika, naše je istraživanje bilo usmjereno na još dva druga čimbenika povezana sa staničnom smrću, popravkom DNA, starenjem i apoptozom. Tijekom razvoja udova čovjeka, stanice izvan staničnog ciklusa (neproliferirajuće stanice) prikazivale su jaki citoplazmatski izražaj inhibitora staničnog ciklusa p19, dok je njegov pozitivitet bio jako malen u proliferirajućim stanicama unutar epitela i mezenhima udova. Navedeni rezultati sugeriraju važnost ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih (proliferativnih) čimbenika u kontroli broja stanica u epitelu i mezenhimu osnove udova tijekom razvoja, kao što je već to do sada već bilo dokazano za neke druge razvojne čimbenike (139). Studije o prekomjernom izražaju p19 upućuju na to da, osim što utječe na popravak DNA, p19 može modulirati apoptozu uzrokovanu oštećenjem DNA u stanicama sisavaca (67). Dok moguća uloga p19 do sada nije bila istraživana u osnovama budućih udova, u miševa s deficitom staničnog inhibitora p21 dokazan je nedostatak proliferacije u AEG (35).

RIP5, čimbenik koji inducira apoptozu, pokazuje dijelomično preklapanje izražaja s FGFR1 u istim stanicama tijekom razvoja udova u čovjeka. Osim toga, za RIP5 je dokazano da je povezan s kaspaza – ovisnim i kaspaza – neovisnim staničnim putovima (140), dakle oba tipa stanične smrti prethodno opažena tijekom razvoja ljudskih udova (139). Rezultati ove studije dodatno potvrđuju moguću ulogu RIP5 kao jednog od važnih čimbenika uključenih u kontrolu normalnog obrasca apoptoze u ljudskim udovima.

Histološka analize ljudskog AEG u osnovi udova tijekom razvoja, pokazala je da se on sastoji od višeslojnog epitela koji sadrži proliferacijske i apoptotske stanice kroz čitovu debljinu epitela. Studije o razvoju udova u različitim životinjskim vrstama pokazale su da je oblikovanje AEG regulirano postepenom aktivacijom specifičnih gena poredanih uduž različitih signalnih kaskada. Prvi histološki znak oblikovanja apikalnog ektodermalnog grebena u osnovi mišjih udova očituje se kao promjena u obliku budućih stanica AEG, i slično kao što smo naveli u ovoj studiji, s pojavom nekoliko slojeva površinskih stanica koje leže na jednom sloju cilindričnih stanica (141). Nasuprot navedenom, AEG u pileta se razvija brže, a sastoji od



jednog sloja cilindričnih bazalnih stanica i jedinog površinskog sloja spljoštenih stanica (142). U mezenhimu neposredno ispod AER dokazana je prisutnost makrofaga koji vjerojatno pridonose fagocitozi apoptotskih stanica (139). Ranije studije također upućuju da su makrofagi smješteni oko AEG već i prije pojave stanične smrti (143), sugerirajući da je primarna funkcija starenja i stanične smrti doprinos staničnoj ravnoteži tkiva (35).

## 6. ZAKLJUČCI

1/ Proliferacija (dokazana biljekom **Ki-67**) omogućuje normalan rast i razvoj udova. Ona se mijenja tijekom razvoja ovisno o stupnju diferencijacije pojedinih struktura koje se formiraju u osnovama udova: u mezenhimu je proliferacija značajno veća nego u epitelu i hrskavici te u kasnijim razvojnim stadijima omogućuje izduživanje prstiju. U hrskavičnim falangama, (osnove budućih kostiju) proliferirajućih stanica je značajno manje i primarno su lokalizirane u perihondriju. Proliferacija stanica u AEG je vrlo intenzivna, kao i u epitelu vršaka prstiju što upućuje na njezinu ulogu u normalno rastu i razvoju udova te izduživanju prstiju.

2/ Stanična smrt važna je tijekom oblikovanja udova u čovjeka, posebice tijekom odvajanja prstiju. Kod čovjeka se pojavljuju dva oblika stanične smrti, **kaspaza-ovisni put** i kaspaza neovisni put tj. **AIF-posredovani oblik stanične smrti**. Da se zaista radi o apoptozi dokazali smo TUNEL metodom. Oba oblika stanične smrti sudjeluju u razdvajanju prstiju te se poremećaji u njihovoj regulaciji povezuju s anomalijama prstiju poput polidaktilije. Uz to, u ljudskim udovima tijekom razvoja dokazali smo prisutnost bjelančevine **p19** kao inhibitora staničnog ciklusa, koja je važna tijekom starenja stanica i modulaciji stanične smrti te tako kontrolira broj stanica u tkivu.

3/ Članice BCL-2 obitelji, bjelančevine **BCL-2** (antiapoptotski čimbenik) i **BAX** (apoptotski čimbenik) tijekom razvoja udova u čovjeka pokazivale su istovremeni izražaj (ko-ekspresiju) u istim stanicama ali se međuođnos njihovog izražaja mijenjao tijekom različitih faza razvoja. Obzirom na mjesta pojavljivanja njihovog izražaja (Bcl-2 u epitelu i mezenhimu vršaka prstiju, a BAX u interdigitalnim prostorima) smatramo da Bcl-2 sprečavajući staničnu smrt omogućuje rast ljudskih udova i izduživanje prstiju, a BAX sudjeluje u odvajanju prstiju.

4/ Fibroblastni čimbenici rasta (**FGF2 i FGF8**) pokazivali su izražaj u epitelu i AEG tijekom cijelog istraživnog razdoblja razvoja udova, a FGF2 je bio prisutan i u mezenhimu te hrskavičnim falangi. Mjesto izražaja FGF upućuje na njihovu ulogu poticanju proliferacije tj. u rastu prstiju i oblikovanju falangi. Obrazac izražaja **FGFR1** ukazuje na njegovu moguću ulogu ne samo u rastu prstiju, već i u njihovom odvajanju.

5/ Transkripcijski čimbenici **MSX-1 i MSX-2** pokazivali su izražaj u epitelu i u podležećem mezenhimu (posebice u zoni rasta), a oba su čimbenika bila prisutna u istima stanicama (ko-lokalizirala). MSX-2 je dodatno bio jako pozitivan u stjenkama krvnih žila te u hrskavičnim

falangama i njihovom perihodriju. Temeljem navedenog, smatra se da bi oba čimbenika mogla sudjelovati u rastu prstiju, a MSX2 dodatno i u razvoju krvnih žila i falangi prstiju.

6/ Elektronsko mikroskopskom analizom uzoraka tkiva ljudskih udova tijekom razvoja dodatno smo morfološki potvrdili stanice u proliferaciji (specifična kondenzacija kromosoma) i apoptozi (zgušnjavanje i fragmentacija jezgre i citoplazme) te prisustvo makrofaga u mezenhimu koji su važni u fagocitozi odumrlih stanica.

## 7. SAŽETAK

Razvoj udova često se koristi kao model za istraživanje načina na koji genski izražaj određuje razlike koje se između pojedinih vrsta pojavljuju tijekom normalnog i poremećenog oblikovanja udova. Usprkos mnogobrojnim istraživanjima provedenim na oblikovanju prstiju u pokusnih životinja, samo je nekoliko istraživanja analiziralo razvoj ljudskih udova ostavljajući tako ovaj problem nerazjašnjenim. U ovoj je studiji razvoj ljudskih udova analiziran u serijskim histološkim rezovima 16 ljudskih zametaka starosti od 4. do 10. razvojnih tjedana, pri čemu su korištene imunohistokemijske metode te metode dvostruke imunofluorescencije i elektronske mikroskopije. Statistički podaci analizirani su Mann–Whitney, Kruskal–Wallis i Dunnovims post hoc testom.

Posebna pažnja posvećena je razvoju prstiju, naročito čimbenicima koji su uključeni u njihovo razdvajanje i izduživanje. Prostorni i vremenski izražaj istraživanih čimbenika važnih za kontrolu stanične proliferacije uključivali su biljega stanične proliferacije Ki-67 i antiapoptotsku bjelančevinu Bcl-2, kao i fibroblastne čimbenike rasta FGF8 i FGF2, njihov receptor FGFR1 te transkripcijske čimbenike MSX-1 i MSX-2. Procesi apoptoze analizirani su primjenom čimbenika kaspaze-3, AIF, BAX, kao i čimbenika povezanih s apoptozom p19 i RIP5. Apoptoza je dodatno dokazana TUNEL metodom.

Tijekom ranog razvoja, ljudski udovi sastojali su se od mezenhimskog središta i površinskog ektoderma s apikalnim ektodermalnim grebenom (AEG). S napredovanjem razvoja, jaka proliferacijska aktivnost postepeno se smanjivala u mezenhimu (od 78% na 68%) i u epitelu (od 62% na 42%), dok je u hrskavicama prstiju proliferacija stalno bila niska (26-27%). Apoptotske stanice pozitivne na kaspazu-3 i AIF bile su svojstvene za mezenhim i AEG tijekom ranih faza razvoja, dok su tijekom razdvajanja prstiju bile prisutne i u mezenhimu između prstiju (interdigitalnom mezenhimu). Intenzivni izražaj Bcl-2 uočen je u AEG, mezenhimu neposredno ispod AEG i u hrskavičnim falangama, dok je izražaj BAX bio svojstven područjima s apoptozom. Na ultrastrukturnoj razini, proliferirajuće stanice su imale prepoznatljive mitotske figure, dok su apoptotske stanice pokazivale fragmentaciju jezgre. Makrofagi su uočeni oko apoptotskih stanica.

Tijekom razvoja, pojačavao se izražaj svih fibroblastnih čimbenika rasta (osim FGF8) u mezenhimu i AEG-u, mezenhimu neposredno ispod grebena (zona rasta) i hondrocitima hrskavica udova. Dok je istovremeni citoplazmatski izražaj (ko-ekspresija) MSX-1 i MSX-2

nađen u epitelu i mezenhimu, p19 je pokazivao snažni citoplazmatski izražaj u ne-proliferirajućim stanicama. Jezgrin izražaj Ki-67 u proliferirajućim stanicama, a djelomično i čimbenika MSX-1 i MSX-2 uočen je u čitavoj osnovi udova. Snažni izražaj p19 i RIP5 bio je prisutan u AEG-u i mezenhimu udova.

Rezultati naših istraživanja pokazuju da intenzivna stanična proliferacija omogućuje rast i izduživanje osnove udova, kao i različiti rast prstiju. Dva puta stanične smrti, kaspaza-3 ovisni i AIF-ovisni put, uključeni su u kontrolu veličine AEG-a i broja stanica u podležećem mezenhimu u najranijim razvojnim stadijima, kao i u proces odvajanja prstiju tijekom kasnijih faza razvoja udova. Prostorni i vremenski izražaj Bcl-2 i BAX u osnovi udova ukazuje na njihovu moguću ulogu u suzbijanju apoptoze i selektivnom poticanju rasta tijekom oblikovanja udova. Obrazac izražaja čimbenika p19 i RIP5 ukazuje na njihovu uključenost u kontroli staničnog starenja i smrti. Nasuprot istraživanjima na životinjama, izražaj FGFR1 u površinskom epitelu i p19 u čitavoj osnovi ljudskih udova mogli bi biti rezultat

razlika u oblikovanju udova između različitih vrsta. Izražaj FGF2 i podređenog mu RIP5 gena, kao i transkripcijskih čimbenika MSX-1 i MSX-2 nije bio specifičan za čovjeka u odnosu na druge vrste. Temeljem prostornog i vremenskog izražaja istraživanih čimbenika tijekom razvoja ljudskih udova, naši rezultati upućuje na ulogu FGF i MSX gena u poticanju stanične proliferacije, rastu udova, izduživanju i odvajanju prstiju, te dodatno na ulogu MSX-2 u kontroli vaskulogeneze. Kaskada međusobno orkestriranih genskih izražaja, uključujući i one analizirane u ovoj studiji, zajednički doprinosi složenom procesu razvoja udova.

## 8. SUMMARY

The limb development has been widely used as a model to investigate how gene expression controls interspecies differences appearing in normal limb morphology and in limb malformations. Despite numerous investigations performed on digit formation of experimental animals, only few investigations analyzed human limb development, thus remaining this problem largely unclear. In the present study, the development of human limbs was analyzed in serial histological sections of 16 normal human conceptuses between the 4<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> developmental weeks by using immunohistochemical and double immunofluorescence methods, and electron microscopy. Statistical data were analyzed by Mann–Whitney test, Kruskal–Wallis and Dunn’s post hoc test.

Special attention was paid to development of fingers, in particular to factors involved in their separation and elongations. Spatiotemporal expression pattern of factors involved in control of cell proliferation included proliferation marker Ki-67 and antiapoptotic marker Bcl-2, as well as fibroblast growth factors FGF8 and FGF2, their receptor FGFR1, and transcription factors MSX-1 and MSX-2. Processes of apoptosis were analyzed by markers to caspase-3, AIF, BAX as well as to apoptosis associated factors p19 and RIP5. Apoptosis was additionally conformed by TUNEL method.

Initially, developing human limbs consisted of mesenchymal core and surface ectoderm with apical ectodermal ridge (AER). During progression of development, strong proliferation activity gradually decreased in the mesenchyme (from 78% to 68%) and in the epithelium (from 62% to 42%), while in the differentiating finger cartilages proliferation was constantly low (26–7%). Apoptotic caspase-3 and AIF—positive cells characterized mesenchyme and AER at earliest stages, while during digit separation they appeared in interdigital mesenchyme as well. Strong Bcl-2 expression was observed in AER, subridge mesenchyme and phalanges, while BAX expression characterized limb areas undergoing apoptosis. Ultrastructurally, proliferating cells showed mitotic figures, while apoptotic cells were characterized by nuclear fragmentation. Macrophages were observed around the apoptotic cells.

Increasing expression of all analyzed growth factors (except FGF8) characterized both the multilayered human apical ectodermal ridge (AER), sub-ridge mesenchyme (progress zone) and chondrocytes in developing human limbs. While cytoplasmic co-expression of MSX-1 and MSX-2 was observed in both limb epithelium and mesenchyme, p19 displayed strong

cytoplasmic expression in non-proliferating cells. Nuclear expression of Ki-67 proliferating cells, and partly of MSX-1 and MSX-2 was detected in the whole limb primordia. Strong expression of factors p19 and RIP5, both in the AER and mesenchyme was observed in human developing limbs.

Our data suggest that intense proliferation enables growth and elongation of human limb primordia, and differential growth of digits. Both caspase-3 and AIF-dependant pathways of cell death control the extent of AER and number of cells in the subridge mesenchyme at earliest developmental stages, as well as process of digit separation at later stages of limb development. Spatio-temporal co-expression of Bcl-2 and BAX indicates their role in suppression of apoptosis and selective stimulation of growth during human limb morphogenesis. Expression pattern of p19 and RIP5 indicates their possible involvement in control of cell senescence and cell death. In contrast to animal studies, expression of FGFR1 in the surface ectoderm and p19 in the whole limb primordia might reflect interspecies differences in limb morphology. Expression of FGF2 and downstream RIP5 gene, and transcription factors Msx-1 and MSX-2 did not show human-specific changes in expression pattern. Based on their spatio-temporal expression during human limb development, our study indicates role of FGFs and MSX genes in stimulation of cell proliferation, limb outgrowth, digit elongation and separation, and additionally MSX- 2 in control of vasculogenesis. The cascade of orchestrated gene expressions including the analyzed developmental factors, jointly contribute to the complex human limb development.

## 9. LITERATURA

1. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 2012; 151-61.
2. Kuhlman J, Niswander L. Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development*. 1997;124:133–39.
3. Milaire J. Aspects of limb morphogenesis in mammals. *Organogenesis*. 1965; 283-300.
4. Todt WL, Fallon JF. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol*. 1984; 80: 21-41.
5. Kimmel RA, Turnbull DH, Blanquet V, Wurst W, Loomis CA, Joyner AL. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev* 2000; 14: 1377-1389.
6. Guo Q, Loomis C, Joyner AL. Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Dev Biol*. 2003; 264:166-178.
7. Dahmann C, Basler K. Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet*. 1999; 15: 320-326.
8. Crossley PH, Minowada G, Macarthur CA, Martin GR. Roles for FGF8 in the induction, initiation and maintenance of chick limb development. *Cell*. 1996; 84: 127-136.
9. Masselink W, Cole JN, Fenyés F, Berger S, Sonntag C, Wood A, Nguyen DP, Choen N, Knopf F, Weidinger G, Hall ET & Currie DP. A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation. *Nature*. 2016; 28: 542-6.
10. Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S, Covarrubias L. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 2009; 136: 3669-3678.



11. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. Fgf4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*. 1993; 75: 579 – 587.
12. Fallon JF, Lopez A, Ros MA, Savage MP, Olwn BB, Simandl BK. Fgf-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*. 1994; 264: 104-107.
13. Fernandez – Teran M, Ros AM. The apical ectodermal ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol*. 2008; 52(7): 857-71.
14. Summerbell D. A quantitative analysis of effect of excision of the AER from the chick limb bud. *J Embryol Exp Morphol*. 1974; 32: 651-660.
15. Kuhlman J, Niswander L. Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development*. 1997; 124: 133–139.
16. Sadler TW, 2009. *Langman's Medical Embryology*, 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland .2012.
17. Zuzarte-Luis V, Hurle JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol*. 2002; 46: 871–876.
18. Niswander L. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *Int J Dev Biol*. 2002; 46: 877–881.
19. VanderMeer JE, Smith RP, Jones SL, Ahituv N. Genome-wide identification of signaling center enhancers in the developing limb. *Development*. 2014; 141: 4194–4198.
20. Carlos I, Lorda – Diez J, Montero A, Garcia – Porrero JA, Hurle JM. Interdigital tissue progression in the developing limb of vertebrates. *Int J Dev Biol*. 2015; 59: 55-62.
21. Suzuki T. How is digit identity determined during limb development. *Development, Growth & Differentiation*. 2012.

22. Tickle C. How the embryo makes a limb: determination, polarity and identity. Review article. *J Anat.* 2015; 227; 418-430.
23. Diaz – Hernandez ME, Rios – Flores AJ, Abarca – Buis RF, Bustamante M, Chimal – Monroy J. Molecular control of interdigital cell death and cell differentiation by retinoic acid during digit development. *J Dev Biol.* 2014; 2: 138 – 157.
24. Zuzarte-Luis V, Hurle JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol.* 2002; 46: 871–876.
25. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997 ; 57: 1605–1613.
26. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* 1993; 262: 695–700.
27. Vukojevic K, Carev D, Sapunar D, Petrovic D, Saraga-Babic M. Developmental patterns of caspase-3, bax and bcl-2 proteins expression in the human spinal ganglia. *J Mol Histol* 2008; 39: 339–349.
28. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 27: 6194–6206.
29. Saraga-Babic M, Lehtonen E, Svajger A, Wartiovaara J. Morphological and immunohistochemical characteristics of axial structures in the transitory human tail. *Ann Anat.* 1994; 176: 277–286.
30. Hernandez-Martinez R, Covarrubias L. Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Dev Growth Differ.* 2011; 53: 245–258.
31. Salas-Vidal E, Valencia C, Covarrubias L. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn.* 2001; 220: 295–306.

32. Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S, Covarrubias L. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 2009; 136: 3669–3678.
33. Salas-Vidal E, Valencia C, Covarrubias L. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn*. 2001; 220: 295–306.
34. Lorda-Diez CI, Garcia-Riart B, Montero JA, Rodriguez-Leon J, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging (Milano)*. 2015; 7 (11): 974–985.
35. Storer M, Mas A, Robert – Moreno A, Pecoraro M, Ortelis MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes MW. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013; 155: 1119 – 1130.
36. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death. *J Cell Sci*. 2002; 15–115 (Pt 24): 4727–4734.
37. Tickle C. Patterning systems – from one end of the limb to the other. *Dev Cell*. 2003; 4:449-458.
38. Vogel A, Rodriguez C, Izpisua – Belmonte JC. Involvement of Fgf8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development*. 1996; 122(6):1737-1750.
39. Laufer E, Dahn R, Orozco OE, Yeo CY, Pisenti J, Henrique D, Abbott UK, Fallon JF, Tabin C. Expression of Radical fringe in limb bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature*. 1997; 386:366-373.
40. Schatz O, Langer E, Ben-Arie N. Gene dosage of the transcription factor Fingerin (bHLHA9) affects digit development and links syndactyly to ectrodactyly. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: 5394–5401.

41. Bashur LA, Chen D, Chen Z, Liang B, Pard R, Murakami S, Zhou G. Loss of *jab1* in osteochondral progenitor cells severely impairs embryonic limb development in mice. *J Cell Physiol.* 2014; 229: 1607-1617.
42. Humayun Ahmed BA, Hossein A, Abdolhasan E, Akbari MR. Genetic Overview of Syndactyly and Polydactyly. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2017; 5(11): 1549.
43. Sajid M. Syndactyly: phenotypes, genetics and current classification. *Eur J Hum Genet.* 2012; 20(8): 817–824.
44. Mitul BK, Avani AS, Parin NP. A Case of Ectrodactyly in a Neonate. *J Clin Neonatol.* 2013; 2(3): 151–152.
45. Zuzarte – Luis V, Montero JA, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC, Hurler JM. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Developmental Biology* 2007; 301: 205-217.
46. Mitul BK, Seta AA, Parin NP. A Case of Ectrodactyly in a Neonate. *J Clin Neonatol.* 2013; 2(3): 151–152.
47. Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods.* 1994; 177: 113–117.
48. Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H. Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods.* 1986; 90: 65–70.
49. Bazina M, Stefanovic V, Bozanic D, Saraga-Babic M. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of developing human pituitary gland. *Acta Histochem.* 2007; 109: 366–376.
50. Carev D, Krnic D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babic M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 627–636.

51. Vukojevic K, Skobic H, Saraga-Babic M. Proliferation and differentiation of glial and neuronal progenitors in the development of human spinal ganglia. *Differentiation*. 2009; 78: 91–98.
52. Cheng X, Chen JL, Ma ZL, Zhang ZL, Lv S, Mai DM, Liu JJ, Chuai M, Lee KK, Wan C, Yang X. Biphasic influence of dexamethasone exposure on embryonic vertebrate skeleton development. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; 281: 19–29.
53. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*. 1997; 57: 1605–1613.
54. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993; 262: 695–700.
55. Vukojevic K, Carev D, Sapunar D, Petrovic D, Saraga-Babic M. Developmental patterns of caspase-3, bax and bcl-2 proteins expression in the human spinal ganglia. *J Mol Histol*. 2008; 39: 339–349.
56. 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: 848–860.
57. Montero JA, Hurle JM. Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis*. 2010; 15: 365–375.
58. Natarajan SK, Becker DF. Role of apoptosis inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell Health Cyto*. 2012; 1 (4): 11–27.
59. Ott M, Herrmann JM. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(6): 767–775.
60. Zuzarte-Luis V, Berciano MT, Lafarga M, Hurle JM. Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis. *Apoptosis*. 2006; 5: 701–715.

61. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis – inducing factor (AIF): key to the conserved caspase – independent pathways of cell death?. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 4727-4734.
62. Aravind L, Koonin EV. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins*. 2002; 1–46 (4): 355–367.
63. Broker LE, Krut FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. 2005; 11 (9): 3155–3162.
64. Vukusic Pusic T, Janjic T, Dujmovic I, Poljicanin A, Soljic V, Saraga-Babic M, Vukojevic K. The involvement of proliferation and apoptosis in the early human gonad development. *J Mol Histol*. 2013;44(1):55-63.
65. Fayzullina S, Martin LJ. Detection and analysis of DNA damage in mouse skeletal muscle in situ using the TUNEL method. *J Vis Exp*. 2014; 16;(94).
66. Becic T, Kero D, Vukojevic K, Mardesic S, Saraga-Babic M. Growth factors FGF8 and FGF2 and their receptor FGFR1, transcriptional factors Msx-1 and MSX-2, and apoptotic factors p19 and RIP5 participate in the early human limb development. *Acta Histochem*. 2018;120(3):205-214.
67. Tavera-Mendoza LE, Wang TT, White JH. p19INK4D and cell death. *Cell Cycle*. 2006;5(6):596-8.
68. Zheng JH, Follis AV, Kriwacki RW, Moldoveanu T. Discoveries and controversies in Bcl-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS Journal*. 2016;283(14):2690-700.
69. LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol*. 1993; 142: 743–753.
70. Hubner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, Flavell RA, Davis RJ. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol Cell Biol*. 2010; 30: 98–105.

71. Novack DV, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol.* 1994; 145: 61–73.
72. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* 1993; 75: 229–240.
73. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.* 2000; 6: 1389–1399.
74. Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S, Covarrubias L. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development.* 2009; 136: 3669–3678.
75. Sanna-Cherchi S, Sampogna RV, Papeta N, Burgess KE, Nees SN, Perry BJ, Choi M, Bodria M, Liu Y, Weng PL, Lozanovski VJ, Verbitsky M, Lugani F, Sterken R, Paragas N, Caridi G, Carrea A, Dagnino M, Materna-Kiryluk A, Santamaria G, Murtas C, Ristoska-Bojkovska N, Izzi C, Kacak N, Bianco B, Giberti S, Gigante M, Piaggio G, Gesualdo L, Vukic DK, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Saraga M, Gucev Z, Allegri L, Latos-Bielenska A, Casu D, State M, Scolari F, Ravazzolo R, Kiryluk K, Al-Awqati Q, D'Agati VD, Drummond IA, Tasic V, Lifton RP, Ghiggeri GM, Gharavi AG. Mutations in *DSTYK* and dominant urinary tract malformations. *N Engl J Med.* 2013; 369(7): 621-629
76. Gail RM. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. Review. *Genes & Development.* 2017; 12: 1571-1586.
77. Ros MA, Lopez-Martinez A, Simandl BK, Rodriguez C, Izpisua Belmonte JC, Dahn R, Fallon JF. The limb field mesoderm determines initial limb bud anteroposterior asymmetry and budding independent of sonic hedgehog or apical ectodermal gene expressions. *Development.* 1996; 122(8): 2319-2330.

78. Mahmood R, Bresnick J, Hornbruch A, Mahony C, Morton N, Colquhoun K, Martin P, Lumsden A, Dickson C, Mason I. A role for FGF8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Current biology*. 1995; 5:797-806.
79. Lewandoski M, Sun X, Martin GR. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature genetics*, 2000.
80. Zhou J, Meng J, Guo S, Gao B, Ma G, Zhu X, Hu J, Xiao Y, Lin C, Wang H, Ding L, Feng G, Guo X, He L. IHH and FGF8 coregulate elongation of digit primordia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 363(3): 513-518.
81. Cohn MJ, Izpisua-Belmonte J, Abud H, Heath JK, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*. 1995; 80(5): 739-746.
82. Kuhlman J, Niswander L. Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge. *Development*. 1997; 124(1): 133-139.
80. Boulet AM, Moon AM, Arenkiel BR, Capecchi MR. The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol*. 2004; 273(2): 361-372.
83. Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO J*. 1998; 17(6): 1642-1655.
84. Stachowiak MK, Stachowiak EK. Evidence-Based Theory for Integrated Genome Regulation of Ontogeny--An Unprecedented Role of Nuclear FGFR1 Signaling. *J Cell Physiol*. 2016; 231(6): 1199-1218.
85. Verheyden M J, Lewandoski M, Deng C, Harfe DB, Sun X. Conditional inactivation of FGFR in mouse defines its role in limb bud establishment, outgrowth and digit patterning. *Development*. 2015; 132: 4235-4245.



86. Cuiling L, Xiaoling X, Nelson DK, Williams T, Kuehn MR, Deng CX. FGFR1 function at the earliest stages of mouse limb development plays an indispensable role in subsequent autopod morphogenesis. *Development*. 2005; 132: 4755-4764.
87. Perantoni AO, Timofeeva O, Naillat F. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development*. 2005;132:3859–3871.
88. Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*. 2004;118:517–528.
89. Verheyden JM, Lewandoski M, Deng C, Harfe BD, Sun X. Conditional inactivation of *Fgfr1* in mouse defines its role in limb bud establishment, outgrowth and digit patterning. *Development*. 2005;132:4235–4245.
90. Yu K, Xu J, Liu Z. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development*. 2003;130:3063–3074.
91. Matthew L, Poulin KMP, Botelho MJ, Tassava RA, Chiu IM. Heterogeneity in the expression of fibroblast growth factor receptors during limb regeneration in newts (*Notophthalmus viridescens*). *Development*. 1993; 119: 353-361.
92. Celli G, LaRochelle JW, Mackem S, Sharp R, Merlino G. Soluble dominant – negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi – organ induction and patterning. *The EMBO Journal*. 1998;6: 1642-1655.
93. Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J*. 1992; 6: 3362-3369.
94. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*. 1993; 60: 1-41.
95. Teve CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal disease. *Genes&Diseases*. 2014; 1: 199-213.

96. Nallasamy S, Li Q, Bagchi MK, Bagchi IC. Msx homeobox genes critically regulate embryo implantation by controlling paracrine signaling between uterine stroma and epithelium. *PLoS Genet.* 2012;8(2).
97. Lallemand Y, Nicola MA, Ramos C, Bach A, Cloment CS, Robert B. Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development.* 2005; 132(13):3003-14.
98. Pizzete S, Abate-Shen C, Niswander L. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development.* 2001; 128(22): 4463-4474.
99. Wang Y, Sassoon D. Ectoderm – mesenchyme and mesenchyme – mesenchyme interactions regulate Msx1 expression and cellular differentiation in the murine limb bud. *Dev Biol.* 1995; 168: 374-382.
100. Celli G, LaRochelle WJ, Mackem S, Sharp R, Merlino G. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO J.* 1998; 17(6): 1642-1655.
101. Reginelli AD, Wang YQ, Sassoon D, Muneoka K. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development.* 1995; 121(4): 1065-1076.
102. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell research.* 2003; 13(6): 429-442.
103. Kero D, Cigic L, Medvedec Mikic I, Galic T, Cubela M, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Involvement of IGF-2, IGF-1R, IGF-2R and TEN in development of human tooth germ - an immunohistochemical study. *Organogenesis.* 2016; 12(3): 152-167.
104. Kero D, Vukojevic K, Stazic P, Sundov D, Brakus SM, Saraga-Babic M. Regulation of proliferation in developing human tooth germs by MSX muscle segment homeodomain proteins and cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d. *Organogenesis.* 2017.

105. Williams JR. The declaration of Helsinki and public health. *Bull. World Health Organiz.* 2008; 86: 650–652.
106. Diaz-Hernandez ME, Rios-Flores AJ, Abarca-Buis RF, Bustamante M, Chimal- Monroy J. Molecular control of interdigital cell death and cell differentiation by retinoic acid during digit development. *J Dev Biol.* 2014; 138–157.
107. Fallon JF, Frederick JM, Carrington JL, Lanser ME, Simandl BK. Studies on a limbless mutant in the chick embryo. *Prog Clin Biol Res.* 1983;110: 33–43.
108. Lu P, Minowada G, Martin GR. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development.* 2006; 133: 33–42.
109. Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature.* 2002; 418: 501–508.
110. Chimal-Monroy J, Abarca-Buis RF, Cuervo R, Diaz-Hernandez M, Bustamante M, Rios-Flores JA, Romero-Suarez S, Farrera-Hernandez A. Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. *IUBMB Life.* 2011; 63: 922–929.
111. Garcia-Martinez V, Macias D, Ganan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurle JM. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci.* 1993; 106 (Pt 1): 201–208.
112. Salas-Vidal E, Valencia C, Covarrubias L. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn.* 2001; 220: 295–306.
113. Hurle JM, Fernandez-Teran MA. Fine structure of the regressing interdigital membranes during the formation of the digits of the chick embryo leg bud. *J Embryol Exp Morphol.* 1983; 78: 195–209.

114. Hernandez-Martinez R, Castro-Obregon S, Covarrubias L. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 2009; 136: 3669–3678.
115. Zuzarte-Luis V, Montero JA, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC, Hurle JM. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev Biol*. 2007; 1–301 (1): 205–217.
116. Zuzarte-Luis V, Montero JA, Rodriguez-Leon J, Merino R, Rodriguez-Rey JC, Hurle JM. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol*. 2004; 272: 39–52.
117. Adamska M, MacDonald BT, Meisler MH. Doubleridge, a mouse mutant with defective compaction of the apical ectodermal ridge and normal dorsal-ventral patterning of the limb. *Dev Biol*. 2003; 255: 350–362.
118. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 964–974.
119. Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*. 2000; 127: 5245–5252.
120. Litington Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 2002; 418: 979–983.
121. Scherz PJ, McGlinn E, Nissim S, Tabin CJ. Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol*. 2007; 308: 343–354.
122. Benazet JD, Zeller R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2009; 1 (4).

123. Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, Araga A, Ohata T, Ishimaru Y, Yoshioka H, Kuwana T, Nohno T, Yamasaki M, Itoh N, Noji S. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*. 1997; 124: (11), 2235–2244.
124. Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev*. 1998; 12 (11): 1571–1586.
125. Walshe J, Mason I. Expression of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech Dev*. 2000; 90 (1): 103–110.
126. Chang DT, Lopez A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, Seldin MF, Fallon JF, Beachy PA. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*. 1994; 120 (11): 3339–3353.
127. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993; 75 (7): 1401–1416.
128. Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis*. 2014; 1 (2): 199–213.
129. Barham G, Clarke NM. Genetic regulation of embryological limb development with relation to congenital limb deformity in humans. *J Child Orthop*. 2008; 2 (1): 1–9.
130. Reginelli AD, Wang YQ, Sassoon D, Muneoka K. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development*. 1995; 121 (4): 1065–1076.
131. Su N, Jin M, Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res*. 2014; 2: 14003.
132. Sun J, Ting MC, Ishii M, Maxson R. Msx1 and Msx2 function together in the regulation of primordial germ cell migration in the mouse. *Dev Biol*. 2016; 417 (1): 11–24.

133. Bensoussan-Trigano V, Lallemand Y, Saint Clément C, Robert B. Msx1 and Msx2 in limb mesenchyme modulate digit number and identity. *Dev Dyn*. 2011; 240 (5): 1190–1202.
134. Ogi H, Suzuki K, Ogino Y, Kamimura M, Miyado M, Ying X, Zhang Z, Shinohara M, Chen Y, Yamada G. Ventral abdominal wall dysmorphogenesis of Msx1/ Msx2 double-mutant mice. *Anat Rec A: Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005; 284 (1): 424–430.
135. Bendale and Abate – Shen 2000 Bendall, A.J., Abate-Shen, C., 2000. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 247 (1–2), 17–31.
136. Davideau JL, Demri P, Hotton D, Gu TT, MacDougall M, Sharpe P, Forest N, Berdal A. Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. *Pediatr Res*. 1999; 46 (6): 650–656.
137. Zhao M, Gupta V, Raj L, Roussel M, Bei M. A network of transcription factors operates during early tooth morphogenesis. *Mol Cell Biol*. 2013; 33 (16): 3099–3112.
138. Mizokami Y, Egashira N, Takekoshi S, Itoh J, Itoh Y, Osamura RY, Matsumae M. Expression of MSX1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2008; 19 (1): 54–61.
139. Becic T, Bilan K, Mardesic S, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Spatiotemporal distribution of proliferation, proapoptotic and antiapoptotic factors in the early human limb development. *Acta Histochem*. 2016; 118 (5): 527–536.
140. Zha J, Zhou Q, Xu LG, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu HB. RIP5 is a RIP homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319 (2): 298–303.
141. Loomis CA, Kimmel RA, Tong CX, Michaud J, Joyner AL. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development*. 1998; 125 (6): 1137–1148.

142. Todt WL, Fallon JF. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol.* 1984; 80: 21–41.

143. Rae F, Woods K, Sasmono T, Campanale N, Taylor D, Ovchinnikov DA, Grimmond SM, Hume DA, Ricardo SD, Little MH. Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r- EGFP transgene reporter. *Dev Biol.* 2007; 308 (1): 232–246.

## 10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Tina Bečić

Datum rođenja: 08. Svibnja 1987.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Adresa: Mažuranićevo šetalište 12, 21 000 Split

Telefon: 098 667 330

E-mail adresa: [tina.becic@gmail.com](mailto:tina.becic@gmail.com)

Obrazovanje:

- Osnovna škola Lučac, Split
- IV gimnazija „Marko Marulić“ (2001-2005)
- Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (2005 - 2012)
- Diplomski rad „Stanična proliferacija tijekom ranog razvoja zuba u čovjeka“ izrađen na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
- Poslijediplomski znanstveni studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (2012-2015)

Radovi:

- Kalibović Govorko D, Bečić T, Vukojević K, Mardešić-Brakus S, Biočina-Lukenda D, Saraga-Babić M. Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. Arch Oral Biol. 2010;55:1007-16.
- Bečić T, Bilan K, Mardešić S, Vukojević K, Saraga-Babić M. Spatiotemporal distribution of proliferation, proapoptotic and antiapoptotic factors in the early human limb development. ACT Hist. 2016;118:527-36.



- Becic T, Kero D, Vukojevic K, Mardesic S, Saraga-Babic M. Growth factors FGF8 and FGF2 and their receptor FGFR1, transcriptional factors Msx-1 and MSX-2, and apoptotic factors p19 and RIP5 participate in the early human limb development. Acta Histochem. 2018 Apr;120(3):205-214.
- Ćićerić M, Fabijanić D, Banić M, Kardum D, Zekanović D, Bonacin D, Bečić T. Utjecaj H.pylori infekcije na vrijednost C-reaktivnog proteina u bolesnika s koronarnom bolešću. Med Jad 2011;41:45-50
- Jukic A, Bozic D, Kardum D, Becic T, Luksic B, Vrsalovic M, Ljubkovic M, Fabijanic D. Helicobacter pylori infection and severity of coronary atherosclerosis in patients with chronic coronary artery disease. Ther Clin Risk Manag. 2017 Jul 27;13:933-938.

Jezici: engleski, francuski

Članstva:

- Od 2012. godine članica Hrvatske liječničke komore i Organizacijskog odbora teniskog turnira liječnika
- Od 2017. godine članica Hrvatskog liječničkog zbora
- Od 2016. godine članica Organizacijskog odbora kardiološkog kongresa Splitski kardiološki đir

Ostalo

12.11.2012. – 12.11. 2013. – Doktorica medicine stažist pri Zavodu za Hitnu medicinu Splitsko – dalmatinske županije. Obavljala poslove u okviru pripravničkog staža.

2014. – 2017. –Doktorica medicine pri Zavodu za hitnu medicinu Splitsko – dalmatinske županije, ispostava Trogir

2016/2017. – Predstavница studenata poslijediplomskih studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Od 22.05.2017. godine na specijalizaciji iz kardiologije u KBC Split.