



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**KARAKTERISTIKE POREMEĆAJA
SINTEZE KOLAGENA UZROKOVANE
PRENATALNOM DEPRIVACIJOM
VITAMINA C KOD ZAMORCA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr Ivan Čapo

Kandidat: asist. dr Milan Popović

Novi Sad, 2022. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Милан Поповић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција):	Проф. др Иван Чапо, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду Центар за патологију и хистологију, Универзитетски клинички центар Војводине
Наслов рада:	Карактеристике поремећаја синтезе колагена узроковане пренаталном депривацијом витамина Це код заморца
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 212 Поглавља 7 Референци 197 Табела 8 Слика 69 Графикона 23 Прилога 0
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Хистологија и ембриологија
Кључне речи / предметна одредница:	дефицит витамина Це; колаген; органогенеза; ембрионални развој; имунохистохемија; хидроокиспролин; експресија гена; заморци
Резиме на језику рада:	<p>Људски организам има способност синтезе колагена, а један од кључних момената у његовој синтези јесте процес хидроксилације аминокиселина пролина и лизина за коју је неопходан витамин Це. У одраслој доби, дефицит витамина Це условиће поремећај синтезе колагена са последичним развојем скорбута. Међутим, које су то последице поремећаја синтезе колагена узроковане дефицитом витамина Це током интраутериног развоја плода још увек су недовољно разјашњене. Коришћењем заморца (<i>Cavia porcellus</i>) као анималног модела који је генетски сличан човеку у погледу синтезе витамина Це, испитан је утицај пренаталне депривације овог витамина на синтезу колагена и анализу промена насталих у процесу органогенезе.</p> <p>Експеримент је дизајниран тако да су методом случајног избора женке подељене у три групе: контролну (К) са седам скотних женки (n=7), и две експерименталне Е I (n=7) и Е II (n=7). У контролној групи све време трајања експеримента до 50-ог дана гестације женке су добијале воду обогаћену витамином Це, док у је Е</p>

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

I групи 10-ог дана гестације женкама укинут витамин Це, а у групи Е II 20-ог гестацијског дана. Оглед је конципиран тако да је депривација витамина Це трајала 30 (Е II), односно 40 дана (Е I). За хистолошку анализу плодови су подвргнути транскардијалној перфузионој фиксацији након које су узоркована ткива (ткиво бубрега, плућа, кости, зуба, плаценте, великог и малог мозга). Ткива су процесуирана по стандардној хистолошкој процедури и бојена имунохистохемијским маркерима. За молекуларну и биохемијску анализу након жртвовања узорковано је по 100 мг ткива од интереса која су ускладиштена на -80°C и чувана до даље анализа. Молекуларна анализа обухватила је одређивање степена експресије гена *Coll1*, *Coll4a1*, и *Slc23a1*, док је биохемијска анализа обухватала одређивање концентрације хидроксипролина, као квантитативне мере количине колагена.

На развој бубрега, пренатални дефицит витамин Це је имао веома велики утицај. Експериментални третман је довео до развоја хипопластичног бубрега, који је и по димензијама и по маси мањи у односу на бубреге контролне групе. Нефрогена зона је знатно шира у бубрезима из групе Е I и Е II, а анализа имуноекспримираности испитиваних маркер говори у прилог успореног сазревања. Експериментални третман је довео до успореног сазревања плућног паренхима. Према ембриолошким фазама плућа су и до две фазе развоја у заостатку, што је самим тим резултовало и смањењем удела будућег „ваздушног“ простора. Имуноекспресија испитиваних маркера потврђује наводе везане за заостајање у развоју. Евидентан је утицај недостатка витамина Це током гестације и на развој скелетне мускулатуре. Анализирајући хистоморфолошке карактеристике уочено је да је велики део мишићних влакана у Е I и Е II групи задржао централну локализацију једара које је уједно већег пречника, што одговара особинама незрелих миотуба. Имунохистохемијским анализама нису утврђене битније разлике између анализираних група. На препаратима зуба плодова заморца се код витамин Це депривираних јединки региструје смањена: густина и дијаметар капилара зубне пулпе, дебљина слоја предентина и дентина; присутно је заостајања у процесу директне осификације алвеоларне кости, као и промене у имуноекспресији анализираних маркера. Пренатални дефицит витамина Це је на коштаном-зглобном систему плодова заморца довео до израженог смањена екстремитета са приступним деформитетима; на хистолошким препаратима је доказано: драстично заостајање у енхондралном окоштавању, код метакарпалне кости дијафиза и метафиза од хрскавичавих острваца без знакова осификације, а међупростор је испуњен еритроцитима; епифиза је нарушена колумнарне организације са доминацијом хипертрофичних хондроцита, док су проксималне фаланге на нивоу хрскавичавог модела са почетним знацима стварања примарног осификационог центра. Анализом количине хидроксипролина у испитиваним ткивима доказано је у групи Е I повећање количине хидроксипролина у узорцима ткива бубрега, попречно-пругастог мишића, великог и малог мозга, плаценте и срца. Док се у узорцима плућа, кости, зуба, хрскавице, плодова овојака и танког црева уочава смањење количине анализираних параметара. У групи Е II веће количине хидроксипролина су регистроване у узорцима бубрега, попречно-пругастог мишића, великог и малог мозга, кости, срца, плаценте и плодова овојака. Са друге стране смањење количине хидроксипролина је уочено у узорцима плућа, зуба, хрскавице, танког црева и слезине. Анализом експримираности гена уочава се да је пренатални дефицит витамина Це довео до повећања експримираности *Coll1* гена у узорцима зуба, малог и великог мозга. Експериментални третман је на узорцима бубрега, плућа и попречно-пругастог мишића довео до смањења степена експримираности

	<p>анализираног гена, док у узорцима коштаног ткива није утврђена промена експресије. Укидање витамина Це је на узорцима малог мозга и кости довело до повећања степена експримираности <i>Coll4a1</i> гена, док је на плућима добијени резултат смањење степена експримираности. Дефицит витамина Це није довео до промена експримираности <i>Coll4a1</i> гена у узорцима бубрега, попречно-пругастог мишића, мозга и зуба. Прекид егзогеног уноса витамина Це током гестације је на експримираност <i>Slc23a1</i> гена имало утицај у виду повећања степена експресије на готово свим анализираним органима (бубрег, плућа, мали и велики мозак, зуб и кост). Једино у узорцима попречно-пругастог мишића није утврђена промена у степену експресије испитивног гена.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	16.05.2018. године
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Milan Popović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr Ivan Chapo, Associate Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Center for Pathology and Histology, University Clinical Center of Vojvodina
Thesis title:	Characteristics of collagen synthesis disorders caused by prenatal vitamin C deprivation in guinea pigs
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages 212 Chapters 7 References 197 Tables 8 Illustrations 69 Graphs 23 Appendices 0
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Histology and embryology
Subject, Key words:	Ascorbic Acid Deficiency; Collagen; Organogenesis; Embryonic Development; Immunohistochemistry; Hydroxyproline; Gene Expression; Guinea Pigs
Abstract in English language:	<p>The human body can synthesize collagen, and one of the key moments in that process is the hydroxylation of the amino acids proline and lysine, for which vitamin C is necessary. In adults, vitamin C deficiency will disrupt collagen synthesis with the consequent development of scurvy. However, the consequences of disorders of collagen synthesis caused by vitamin C deficiency during intrauterine fetal development are still poorly understood. Using guinea pigs (<i>Cavia porcelus</i>) as an animal model that is genetically similar to humans in terms of vitamin C synthesis, the influence of prenatal deprivation of this vitamin on collagen synthesis as well as changes in organ development were investigated.</p> <p>During the experimentation, females were randomly divided into three groups: control (K) with seven pregnant females (n = 7), and two experimental E I (n = 7) and E II (n = 7). In the control group, females received water enriched with vitamin C throughout the experiment until the 50th day of gestation, while in the E I group on the 10th day of gestation, females received vitamin C, and in the E II group on the 20th day of gestation. The experiment was designed so that the deprivation of vitamin C lasted 30 (E</p>

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5Ā – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

II) and 40 days (E I). For histological analysis, fetuses were subjected to transcatheter perfusion fixation followed by tissue sampling (kidney, lung, bone, tooth, placental, cerebellar, and cerebellar tissues). Tissues were processed according to standard histological procedure and stained with immunohistochemical markers. For molecular and biochemical analysis after sacrifice, 100 mg of tissues of interest were sampled and stored at -80 °C and stored until further analysis. The molecular analysis included determining the degree of expression of the *Coll1*, *Coll4a1*, and *Slc23a1* genes, while biochemical analysis included determining the concentration of hydroxyproline as a quantitative measure of collagen content.

Prenatal vitamin C deficiency had a very large effect on kidney development. Experimental treatment led to the development of a hypoplastic kidney, which is smaller in size and weight compared to the kidneys of the control group. The nephrogenic zone is significantly wider in the kidneys from the E I and E II groups, and the analysis of the immunoexpression of the examined markers speaks in favour of delayed maturation. Experimental treatment led to delayed maturation of the lung parenchyma. According to the embryological phases of the lungs, up to two phases of development are lagging behind, which has resulted in a reduction in the share of future "air" space. Immunoexpression of the examined markers confirms the allegations related to developmental delay. The influence of vitamin C deficiency during gestation and on the development of skeletal muscles is evident. Analyzing the histomorphological characteristics, it was noticed that a large part of the muscle fibres in the E I and E II groups retained the central localization of the nucleus, which is also larger in diameter, which corresponds to the characteristics of immature myotubes. Immunohistochemical analyzes did not reveal significant differences between the analyzed groups. In guinea pig tooth preparations, the following is registered in vitamin C-deprived individuals: density and diameter of dental pulp capillaries, the thickness of predentine and dentin layers; there are delays in the process of direct ossification of the alveolar bone, as well as changes in the immunoexpression of the analyzed markers. Prenatal vitamin C deficiency on the skeletal system of guinea pig fruits led to a pronounced reduction of the extremities with present deformities; histological specimens have shown: drastic lag in enchondral ossification, in the metacarpal bone of the diaphysis and metaphysis of cartilaginous islets without signs of ossification, and the interstitial space is filled with erythrocytes; bone epiphysis is disturbed columnar organization with a predominance of hypertrophic chondrocytes, while the proximal phalanges are at the level of the cartilaginous model with the initial signs of the formation of the primary ossification centre. Analysis of the amount of hydroxyproline in the examined tissues showed an increase in the amount of hydroxyproline in samples of kidney, striated muscle, cerebellum, cerebellum, placenta and heart in group E I. While in the samples of lungs, bones, teeth, cartilage, fruit membranes and small intestine, a decrease in the amount of the analyzed parameter is observed. In the E II group, higher amounts of hydroxyproline were registered in samples of the kidney, striated muscle, cerebellum and cerebellum, bone, heart, placenta and amniotic sac. On the other hand, a decrease in the amount of hydroxyproline was observed in samples of the lungs, teeth, cartilage, small intestine and spleen. Analysis of gene expression shows that prenatal vitamin C deficiency has led to an increase in the expression of the *Coll1* gene in the tooth, cerebellar, and cerebral samples. Experimental treatment on kidney, lung and striated muscle samples led to a decrease in the degree of expression of the analyzed gene, while no change in expression was found in bone tissue samples. Deprivation of vitamin C in cerebellar and bone samples led to an increase in the degree of expression of the *Coll4a1* gene, while in the lungs the result was a decrease in the degree of expression. Vitamin C deficiency did not lead to changes in the expression of the *Coll4a1* gene in samples from the kidneys, striated muscle, brain, and teeth. Discontinuation of exogenous vitamin C intake during gestation affected *Slc23a1* gene expression in the form of increased

	expression on almost all analyzed organs (kidney, lung, cerebellum, cerebellum, tooth and bone). Only in the samples of the striated muscle, no change in the degree of expression of the analysed genes was found.
Accepted on Scientific Board on:	16.05.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	
Note:	

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svom dugogodišnjem (sada već porodičnom) mentoru i prijatelju prof. dr Ivanu Čapi, jer bez njegovog zalaganja, znanja i pomoći ova teza ne bi ugledala svetlost dana, niti bi ovako izgledala.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Dušanu Laloševiću na omogućenom neograničenom pristupu Vivarijumu Pasterovog zavoda u Novom Sadu i sprovođenju oglada, kao i veterinarskom tehničaru Đorđu Vukomanoviću na pruženoj pomoći pri sprovođenju eksperimentalnog dela istraživanja.

Dr sci. vet. med. Radomiru Ratajcu, višem naučnom saradniku Naučnog institut za veterinarstvo „Novi Sad“ se zahvaljujem na nesebičnom doniranju ekperimentalnih životinja bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće sprovesti.

Takođe, želim da se zahvalim dr sci. Mileni Rašeti, naučnom saradniku Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na pomoći oko izvođenja spektrofotometrijskih merenja i svim korisnim savetima i sugestijama.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Silvani Andrić, asist. dr Isidori Starovlah i asist. dr Mariji Merdar sa Katedre za fiziologiju životinja, Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na nesebično prenesenom znanju, strpljenu, kolegijalnosti i pruženoj pomoći prilikom pokretanja PCR laboratorije i tumačenju dobijenih rezultata.

Kolagama sa Zavoda za farmaciju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, prof. dr Biljani Božin, doc. dr Nebojši Kladaru i Vladimiru Maskimoviću veliko hvala na pomoći i brojnim međulaboratoriskim pozajmicama.

Veliko hvala asist. dr Natali Rakočević i dr Ognjenu Zurkoviću na nesebičnoj pomoći oko obrade dela materijala.

Dragim „zavodnicima“ Mileni, Jovani, Dragici i Dejanu hvala na prijateljskoj pomoći i ogromnoj svakodnevnoj požrtvovanosti tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja i celokupnog laboratorijskog rada.

Na kraju najveću zahvalnost dugujem svojoj majci, bratu, supruzi i ćerki Lari na razumevanju, strpljenju, pomoći i neizmernoj podršci u svim važnim životnim odlukama.

Mojim „drugim“ roditeljima - Miri i Zoranu, koji su mnogo toga učinili za mene, dugujem neizmernu, nažalost sad već posthumnu zahvalnost i ujedno im ovu doktorsku disertaciju i posvećujem.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kolagen	2
1.1.2. Biosinteza kolagena	5
1.1.3. Struktura kolagena	7
1.1.4. Degradacija kolagena	9
1.1.5. Urođene i stečene bolesti vezivnog tkiva povezane sa kolagenom.....	9
1.1.6. Skorbut	12
1.2. VITAMIN C	15
1.2.1. Fizičko-hemijske osobine vitamina C	15
1.2.2. Izolovanje i sinteza vitamina C	16
1.2.3. Apsorpcija, metabolizam i ekskrecija vitamina C	21
1.2.4. Uloge vitamina C	24
1.3. Zamorac	26
1.4. Embriološki razvoj bubrega	28
1.5. Razvoj pluća	35
1.6. Razviće skeletnih (poprečnoprugastih) mišića	43
1.7. Razvoj zuba - denticija glodara, sličnosti i razlike	47
1.8. Razviće koštanog tkiva	52
1.8.1. Anatomija ekstremiteta zamoraca.....	54
1.8.2. Enhondralno okoštavanje kod zamoraca	54
2. CILJEVI I HIPOTEZE.....	55
3. MATERIJAL I METODE.....	58

3.1. Dizajn eksperimenta i eksperimentalne životinje	59
3.2. Histološka obrada tkiva	62
3.2.1. Transkardijalna perfuziona fiksacija.....	62
3.2.2. Histološka obrada tkiva.....	62
3.2.3. Imunohistohemijsko bojenje preparat	63
3.3. Određivanje količine hidroksiprolina	64
3.4. Analiza genske ekspresije	66
3.5.1. Izolacija RNK.....	66
3.5.2. Reakcija reverzne transkripcije	67
3.5.3. Relativna kvantifikacija iRNK u Real time PCR analizi	67
3.5. Statistička obrada i analiza dobijenih rezultata	69
4. REZULTATI	70
4.1. TOK EKSPERIMENTA I TELESNA MASA OGLEDNIH ŽIVOTINJA	71
4.2. HISTOLOŠKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANIH TKIVA	73
4.2.1. Histomorfološke karakteristike karakteristike bubrega.....	78
4.2.2. Histomorfološke karakteristike pluća.....	94
4.2.3. Histomorfološke karakteristike poprečno-prugastog mišića.....	109
4.2.4 . Histomorfološke karakteristike zuba.....	120
4.2.5 . Histomorfološke karakteristike koštanog tkiva.....	129
4.3. KOLIČINA HISROKSIPROLINA U TKIVU	141
4.3.1. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva bubrega	141
4.3.2. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva pluća	142

4.3.3. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva iz skeletnog mišića	143
4.3.4. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva velikog i malog mozga	144
4.3.5. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva hrskavice, kosti i zuba.....	146
4.3.6. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva placente i plodovih ovojaka	148
4.3.7. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva hrskavice, srca, slezine i tankog creva.....	150
4.4. ANALIZA EKSPRIMIRANOSTI GENA.....	152
4.4.1. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc2 3a1 gena u uzorcima tkiva bubregu	152
4.4.2. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima tkiva pluća.....	154
4.4.3. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima tkiva skeletne muskulature	156
4.4.4. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima tkiva mozga	158
4.4.5. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima tkiva malog mozga	160
4.4.6. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima koštanog tkiva.....	162
4.4.7. Ekspimiranost Coll1, Coll4a1 i Slc23a1 gena u uzorcima zuba.....	164
5. DISKUSIJA.....	166
6. ZAKLJUČCI	184
7. LITERATURA.....	188

1. UVOD

1.1. Kolagen

Vezivno tkivo integriše epitelno, mišićno i nervno tkivo u veće celine (organe i organske sisteme), a ujedno pruža potporu i daje formu ljudskom organizmu. Osnovni elementi vezivnog tkiva su ćelije vezivnog tkiva i ekstracelularni matriks. Ekstracelularni matriks je izgrađen iz osnovne supstance i tri tipa vlakana: kolagenih, elastičnih i retikularnih (1,2).

Kolagen predstavlja glavni strukturni protein kolagenih vlakana koja čine osnovu svih vezivnih tkiva. Do sada je kod kičmenjaka poznato 28 tipova kolagena koji se prema konvenciji obeležavaju rimskim brojevima (I-XXVIII), a svaki je izgrađen iz tri od ukupno 46 različitih polipeptidnih lanaca (α lanaca). Kako je kolagen otkriven i u fosilnim ostacima dinosaurusu *Tyrannosaurus-a rex* starog 68 miliona godina, te se smatra i najstarijim proteinom (3,4).

Zahvaljujući tolikom broju i širokoj rasprostranjenosti kod kičmenjaka, gotovo da ne postoji organ koji ne sadrži kolagena vlakna. Mogu se podeliti na fibrilarne (one koji formiraju vlakanca (fibrile)) i nefibrilarne kolagene. Fibrilarnim kolagenima pripada oko 90% telesnih kolagena. Od nefibrilarnih kolagena pojedini se uduružuju i grade mrežu, dok su ostali (FACIT kolageni) pričvršćeni za fibrilarne. U **Tabeli 1** opisana je detaljna podela, genomska lokalizacija i tkivna distribucija do sada poznatih tipova kolagena (5).

Tabela 1. Tipovi kolagena, lokalizacija u genomu i njihova distribucija u tkivima

Tip	Molekularni sastav	Lokalizacija u genomu	Tkivna distribucija
<i>Fibrilarni kolageni</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31-q22) COL1A2 (7q22.1)	kost, derm, tetive, ligameni, rožnjača
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11-q13.2)	hrskavica, staklaasto telo , kičmeni pršljen
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	koža, zid krvnog suda, retikularna vlakna, pluća, jetra, slezina
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2-q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2) COL11A1 (1p21)	pluća, rožnjača, kost, plodovi ovojci, udružen sa kolagenom I
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A2 (6p21.3) COL11A3=COL2A1	hrskavica, staklasto telo
<i>Kolageni bazalne membrane</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV);\alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36-q37) COL4A4 (2q36-q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	bazalne membrane
<i>Mikrofibrilarni kolageni</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	široko rasprostranjen: dermis, hrskavica, placenta, pluća, krvni sudovi, međupršljenski disk
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	koža, dermalno-epidermalna granica; oralna sluznica, grlić

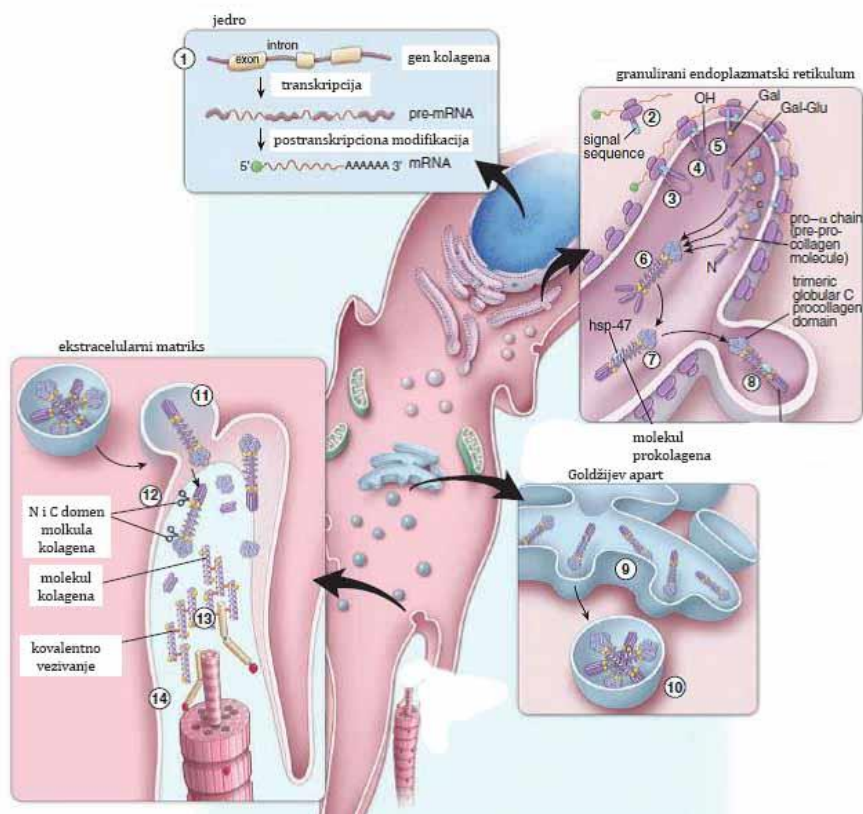
Tabela 1. Tipovi kolagena, lokalizacija u genomu i njihova distribucija u tkivima (nastavak)

Tip	Molekularni sastav	Lokalizacija u genomu	Tkivna distribucija
<i>Kolageni koji formiraju mreže</i>			
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endotelne ćelije, Descemetova membrana
X	$[\alpha 3(\text{X})]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hipertrofisala hrskavica
<i>FACIT kolageni</i>			
IX	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	hrskavica, vitreous humor, rožnjača
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perihondrium, ligamenti, tetive
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	COL9A1 (8q23)	derm, tetive, zid krvnih sudova, placenta, pluća, jetra
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	rabdomiosarkom
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$		kornealni epitel, koža embriona, hrskavica sternuma, tetiva
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	zid krvnih sudova
<i>Transmembranski kolageni</i>			
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1 (10q22)	epiderm, folikul dlake, endomizijum, crevo, pluća, jetra
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermalno–epidermalna granica
<i>Multipleksini</i>			
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasti, glatke mišićne ćelije, bubreg, pankreas,
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasti, amnion, keratinociti
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	COL18A1 (21q22.3)	pluća, jetra
<i>Preuzeto i modificovano iz: Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28;55(12):1531–46.</i>			

1.1.2. Biosinteza kolagena

Kod ljudi najveći deo kolagena sintetišu fibroblasti mada tu mogućnost imaju i osteoblasti, hondroblasti, odontoblasti, retikularne ćelije, Švanove ćelije i glatke mišićne ćelije. Za sintezu kolagena, koja se odvija u ribozomima (granuliranom citoplazmatskom retikulumu) i Goldži aparatu, neophodni su askorbinska kiselina i bakar (1).

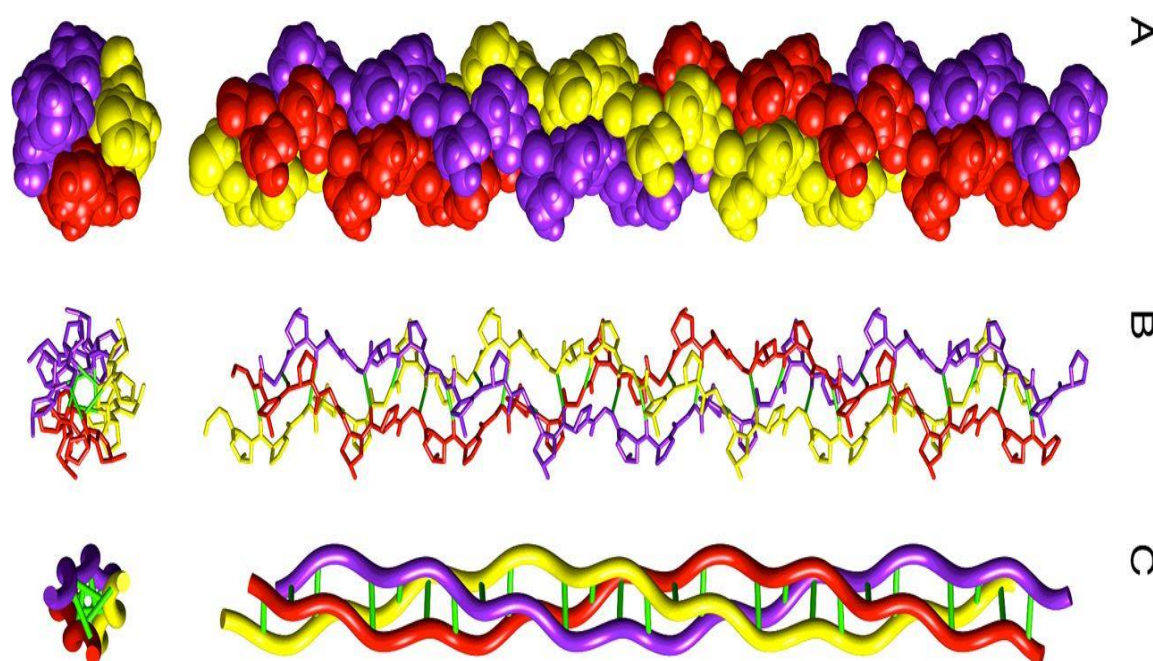
Naime, unutar ćelije nakon translacije informacione RNK (iRNK) u ribozomima granuliranog endoplazmatskog retikuluma (GER) nastaju dve vrste alfa lanaca ($\alpha 1$ i $\alpha 2$ lanaci). Ovi peptidni lanci (poznati kao preprokolagen) oslobađaju se u lumen GCR-a, nakon čega dolazi do hidrosilacije lizina i prolina. Upravo za ovaj proces neodhodan je vitamin C, koji kao kofaktor, zajedno sa enzimima prolin-4-hidrosilaza i lizil hidrosilaza indukuje celu reakciju. U toku ove reakcije za zamenu vodonika (H) sa hidrosilnom grupom (-OH grupom) utroši se po jedan molekul vitamina C. Prokolagena nastaje u GCR-u spajanjem dva alfa-1 lanca i jednog alfa-2 lanca. Nakon spajanja alfa lanaca prokoagen, putem egzocitoze, biva sekretovan izvan ćelije gde pod dejstvom prokolagen peptidaze prelazi u molekul tropokolagena. Više molekula tropokolagena, kovalentnim umrežavanjem rezidua lizina i hidrosilizina (tzv. aldolnom reakcijom), formiraju kolagene fibrile, dok umrežavanjem više kolagenih fibrila nastaju kolagena vlakna (3, 4, 6, 7) (**Slika 1**).



Slika 1. Šematski prikaz biosinteze kolagena: procesi unutar ćelije: 1. Formiranje iRNK u jedru ćelije; 2. Iniciranje sinteze α lanaca u GCR; 3. Sintaza pre pro kolagena; 4 Hidroksilacija prolina i lizina; 5. Glikolizacija hidrokilzil rezidua u GCR; 6. Formiranje trostrukog heliksa prokolagena; 7. Stabilizacija trostrukog heliksa formiranjem vodoničnih i disulfidnih veza između unutar i između lanaca; 8. Transport molekula prokolagena u Goldžijev aparat; 9. Pakovanje molekula prokolagena u sekretorne vezikule; 10. Pomeranje vezikula ka citoplazmatskoj membrani; 11. Egzocitoza molekula prokolagena; 12. Digestija N- i C- domena prokolagenog heliksa; 13. Polimerizacija molekula kolagena u kolagena vlakna kovalentnim ukrštanjem; 14. Inkorporacija drugih kolagena (npr. FACIT) unutar kolagenog vlakna (*Preuzeto i modificovano iz: Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with correlated cell and molecular biology. 7th ed. Lippincott, Williams and Wilkins: Baltimore, 2016: p. 164.*)

1.1.3. Struktura kolagena

Od 1955. godine zahvaljujući odvojenim istraživanjima Rich i North i njihovih saradnika, utvrđena je struktura kolagena koja je i danas priznata. U molekulu kolagena, tri polipeptidna α lanca (**Slika 2**) se međusobno prepliću i na taj način formiraju trostruki desnogiri heliks (8-10).



Slika 2. Različiti prikazi trostrukog heliksa kolagena: A) Prkaz tri polipeptidna lanca u crvenoj, ljubičastoj i žutoj boji; B) Šematski prikaz vodoničnih veza (u vidu zelenih štapića) koji povezuju polipeptidne lance C) Prikaz vodoničnih veza u vidu merdevina (paralelnih na osu heliksa). (Preuzeto i modificovano iz: Bella J. *Collagen structure: new tricks from a very old dog*. *Biochem J.* 2016;473(8):1001-25.)

Svaki od ovih α lanaca se sastoji od ponavljajućih sekvenci aminokiselina u formi tripeptida Glicin-X-Y (Gly-X-Y). Što znači da je svaka treća aminokiselina u lancu glicin (Gly), a da se unutar sekvence na mestima X i Y može naći bilo koja, od 17 drugih, aminokiselina. Kako bi se osigurala stabilnost trostrukog heliksa neophodno je, da se sa udelom od 20%, na preostalim mestima nalazi imino aminokiseline (npr. prolin).

Hidroksiprolin (Hyp) i prolin (Pro) su aminokiseline koje su karakteristične za molekul kolagena. U toku sinteze Pro se može ugraditi i na pozicijama X i Y, a to je dalje praćeno postransalcionom hidroksilacijom Pro na Y poziciji i za rezultat daje nastanak Hyp. Najstabilnija, a ujedno i najčešća aminokisleinska sekvenca u kolagenu je Gly-Hyp-Pro (11-13).

Pod svetlosnim mikroskopom kolagen se uočava u vidu vlakana debljine 1-12 mikrona, koji se spajaju sa susjednim snopovima. Posmatrajući kolagen pod elektronskim mikroskopom uočavaju se tamne i svetle trake koje su rezultat pravilnog rasporeda molekula kolagena unutar kolagenog vlakna. Ovi molekuli su dužine 300 nm i debljine 1,5 nm (14).

Kolageni su najrasprostranjeniji proteini u ljudskom organizmu, tako da preko 35% proteina ljudskog tela zauzima kolagen. Kolagen se u velikoj količini nalazi u hrskavici, tetivama, ligamentima, kostima, međupršljenjskom disku, krvnim sudovima, rožnjači oka, dentinu zuba (3, 7, 15). Najzastupljeniji kolageni, sa udelom od oko 80-90% od ukupnog kolagena, su tip I, II, III i IV. Tip I kolagena se nalazi najviše u kostima, tetivama, ligamentima, dermisu i rožnjači oka. Tip II kolagena je lokalizovan u hrskavici, staklastom telu oka, *nucleus pulposus*-u pršljenova, a tip III u koži, zidu krvnih sudova i retikularnim vlaknima pluća, slezine, jetre i drugih tkiva (5).

Kolagen IV se smatra evolutivno najstarijim kolagenom kod kičmenjaka, a filogenetska distribucija sugeriše da kolagen IV igra ključnu ulogu u prelasku jednoćelijskih organizama u višćelijske životinje (16). Kolagen tipa IV je osnovni skeletni element svake bazalne membrane čineći tako osnovu u koju se ugrađuju strukture kao što su lamin, nidogen, perlekan i drugi (17, 18). U kolagenu tip IV α -

lanci imaju sličnu strukturu, pokazujući 50-70% homologije na nivou amino-kiselina. Lanci $\alpha 1$ i $\alpha 2$ su prvi opisani i nazvaju se još i „klasičnim lancima“ jer su prisutni u svim bazalnim membranama, dok ostali lanci imaju ograničenu distribuciju. Tako da se $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$ lanci mogu uočiti u bazalnim membranama pluća, testisa, oka, kao i u glomerularnoj bazalnoj membrani u bubregu, dok su $\alpha 5$ i $\alpha 6$ lanci prisutni u bazalnim membranama kože, glatkih mišića i bubrega (19-21).

Bazalna membrana predstavlja sloj ekstracelularnog matriksa koji je umetnut između dve vrste tkiva i to vezivnog tkiva i epitela, ili endotela. Na elektronsko-mikroskopskom nivou opisana su tri sloja (lamine) koji se mogu razlikovati kod bazalne membrane a to su: *lamina lucida*, *lamina densa* i *reticularna lamina* (1). Bazalna membrana služi kao potpora epitelnim ćelijama, a takođe i predstavlja filter koji dozvoljava prolaz molekulima određenih dimenzija, naelektrisanja i oblika. Pored navedenog reguliše i ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju kao i migraciju epitelnih ćelija kako u periodu embrionalnog razvića tako i postnatalno (21-26).

1.1.4. Degradacija kolagena

Matriks metaloproteinaze (MMP) su endopeptidaze, zavisne od cinka, uključene u brojne fiziološke i patološke procese u organizmu. Uključene su u apoptozu, ćelijsku migraciju, proliferaciju, angiogenezu, zarastanje rana i implantaciju. Danas je poznato preko 20 vrsta ovih enzima zaduženih za degradaciju komponenata ekstracelularnog matriksa. Enzimi MMP-1, MMP-8 i MMP-13 su zaduženi za degradaciju kolagena I, II i III, dok je kolagen IV supstrat za enzime MMP-2 i MMP-9 (27, 28).

1.1.5. Urođene i stečene bolesti vezivnog tkiva povezane sa kolagenom

Činjenica je da kolageni predstavljaju porodicu proteina koji imaju višestruke funkcije u našem organizmu, a njihov značaj se ogleda i u širokom spektru bolesti koje

nastaju usled abnormalnosti pojedinih tipova kolagena. Danas je poznato oko 40 genetskih bolesti koje su uzrokovane mutacijom gena zaduženih za sintezu kolagena. Ove genetske bolesti dovode do poremećaja u brojnim tkivima i organima, a pogađaju milione ljudi. Neke od njih su predstavljene u **Tabeli 2** (4, 16).

Tabela 2. Bolesti povezane sa mutacijom gena za sintezu kolagena*

GEN	BOLEST
COL1A1	<i>Osteogenesis imperfecta</i>
COL1A2	Ehlers–Danlos syndrome
COL2A1	Spondyloepiphyseal dysplasia, Spondyloepimetaphyseal dysplasia, Achondrogenesis, hypochondrogenesis, Kniest dysplasia, Stickler syndrome
COL3A1	Ehlers–Danlos syndrome
COL4A1	Familial porencephaly, Hereditary angiopathy with nephropathy, aneurysms and muscle cramps syndrome
COL4A3	Alport syndrome
COL4A4	Benign familial haematuria
COL4A5	Alport syndrome
COL4A6	Leiomyomatosis
COL5A1	Ehlers–Danlos syndrome
COL5A2	
COL6A1	Bethlem myopathy
COL6A2	
COL6A3	Ullrich congenital muscular dystrophy
COL7A1	Dystrophic epidermolysis bullosa
COL8A2	Corneal endothelial dystrophies
COL9A1	
COL9A2	Multiple epiphyseal dysplasia
COL9A3	Multiple epiphyseal dysplasia, Autosomal recessive Stickler syndrome
COL10A1	Schmid metaphyseal chondrodysplasia
COL11A2	Stickler syndrome, Marshall syndrome, tospondylomegaepiphyseal dysplasia
COL11A1	Stickler syndrome, Marshall syndrome
COL17A1	Junctional epidermolysis bullosa-other
COL18A1	Knobloch syndrome

*Preuzeto i modifikovano iz: Ricard-Blum S. *The collagen family*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.

1.1.6. Skorbut

Ljudski organizam ima sposobnost sinteze kolagena, a jedan od ključnih momenata u njegovoj sintezi jeste proces hidroksilacije aminokiselina prolina i lizina za koju je neophodan vitamin C. U odrasloj dobi, deficit vitamina C usloviće poremećaj sinteze kolagena sa posledičnim razvojem skorbuta (29-31).

Skorbut predstavlja klinički sindrom koji nastaje usled dužeg nedostatka vitamina C i danas se smatra jednom od najstarijih bolesti poznatoj u ljudskoj istoriji. O skorbutu su prvi zapisi pronađeni još na Ebert-ovom papirusu 1550. godine pre nove ere. Pored opisa bolesti nađen je i preporučen tretman u vidu konzumacije luka i povrća (za koje se danas zna da su bogati vitaminom C) (32). Posebna pažnja mu se poklanja u periodu putovanja moreplovaca u 15. i 16. veku. Na svojim pohodima na Afrički kontinent, u periodu 1460 – 1469 godine, portugalski moreplovac Vasko de Gama primećuje da su se pojedini putnici razboleli, a bolest se manifestovala u vidu otoka ruku, nogu i desni i prolazila je nakon dobijanja svežih zaliha hrane i konzumacije pomorandži. Tada je opisuje kao „*amalati de la boccha*” (engl. *curse of the mouth*) – prokletsvo usta (33,34).

Između 16. i 18. veka opisani su brojni slučajevi ove bolesti. U 18. veku James Lind (oficir Britanske Kraljevske Mornarice) je sproveo prvu kliničku studiju u cilju lečenja skorbuta. Lind je, 8 nedelja nakon napuštanja luke, 20. maja 1747. godine pokušao da izleči 12 bolesnika sa tipičnim simptomima skorbuta i sličnom težinom bolesti. Tokom njegove studije deset od njih dvanaest je svaki dan u periodu od dve nedelje dobijalo: 11 jabukovače dnevno, 3x po 25 kapi eliksira vitriol i pola litra morske vode. Preostala 2 slučaja su svaki dan tokom šest dana, dobijali po 2 pomorandže i 1 limun. Iz prve grupe niko nije izlečen, dok je kod mornara iz druge grupe uočeno poboljšanje (35).

Danas se deficitom C vitamina smatra serumska koncentracija manja od 11,4 $\mu\text{mol/l}$. Prevalenca ovog oboljenja u svetu je različita i varira između 7,1% u SAD, do 73,9% u predelima severne Indije. Kao faktori rizika za nastanak deficijencije navode se upotreba alkohola i cigareta, muški pol, hemodijaliza i loš socio-ekonomski status (36).

Kliničke manifestacije ove bolesti zavise od starosti pacijenta i dužine trajanja deficijencije. Prvi simptomi u vidu umora i letargije obično se javljaju nakon 8 do 12 nedelja od početka smanjenog unosa vitamina C, često su praćeni bolovima u mišićima i opštom slabošću. Glavni znaci skorbuta su hemoragijske manifestacije u vidu krvarenja, purpura, petehija, koje nastaju zbog oštećenja krvnih sudova nakon minimalnih trauma, kao i otežano zarastanje rana (37).

Oticanje i crvenilo desni su jedan od karakterističnih i lako prepoznatljivih znakova. Vremenom desni promene boju i pojavljuju se ulceracije koje krvare. Karakteristično je da kod dece ulceracije nastaju oko novo izraslih zuba. Kao krajnji rezultat je ispadanje zuba, naročito onih sa jednim korenom (38).

Takođe se viđaju subperiostna krvarenja kao i smanjena osteoblastna aktivnost. Što dovodi do usporenog stvaranja osteoida, a kao rezultat toga kod obolelih pacijenata nastaje i osteopenija. Slabljenje koštanih struktura kod dece može rezultovati nastankom metafiznih fraktura (39).

Promene na zglobovima u sklopu skorbuta se kod obolelih manifestuju hemohromatozom, oteklim i bolnim zglobovima. Ovim promenama su naročito podložni zglobovi donjih ekstermiteta i to: zglob kuka, kolena kao i skočni zglob. U težim oblicima dolazi do šepanja i nemogućnosti hoda (40-42).

U eksperimentalnim studijama kod fetusa uočeno je oticanje kostohondralnog spoja, česta subperiostna krvarenja, kao i odvajanje epifizne hrskavice od spongioze na

kostima rebara i udova. U mikroskopskom nalazu je uočen smanjen broj osteoblasta sa neregularnim osteonima (43).

Druge kliničke manifestacije su u vidu krvarenja iz gasterointestinalnog ili ženskog genitalnog sistema, kao i cerebralna krvarenja. Uočavaju se i promene na koži tela u vidu alopecije i stvaranja dlaka u vidu vadičepa, pojava pigmente ihtioze kao i folikularne hiperkeratoze.

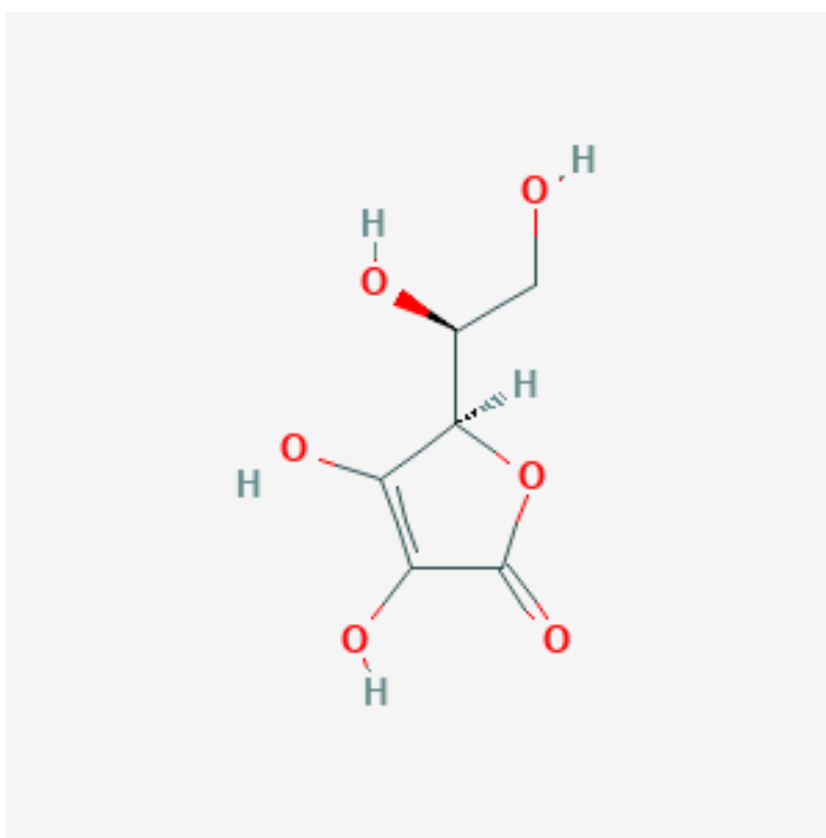
Iako se danas u modernom svetu skorbut pojavljuje relativno retko postoje istraživanja koja govore u prilog da se povećava broj slučajeva sa subklimičkim formama ove bolesti. Bez obzira na široku rasprostranjenost namirnica koje sadrže vitamin C oko 30% odrasle populacije u SAD-u ne unose preporučene dnevne doze. Takođe brojne starije osobe, muškarci koji žive sami, zavisnici od alkohola i deca koja su na restriktivnim dijetama imaju subklimički oblik bolesti sa mogućnošću razvoja skorbuta (42, 44).

Per os suplementacija vitaminom C u količini od 1 g/dan tokom dve nedelje smatra se uobičajenim tretmanom skorbuta. Krvarenja prestaju u roku od 48h, opšte poboljšanje je vidljivo nakon 2 nedelje. Promena načina života i uravnotežena ishrana u vidu povećane konzumacije većih količina voća i povrća je dovoljna za prevenciju ove bolesti (42).

1.2. VITAMIN C

1.2.1 Fizičko-hemijske osobine vitamina C

Vitamin C je kristalna, bezbojna supstanca kiselog ukusa, molarne mase 176 g/mol i gustine 1.694 g/cm³. Prema IUPAC nomenklaturi nosi naziv askorbinska kiselina, a predstavlja (R)-3,4- dihidroksi-5-((S)- 1,2-dihidroksietil)furan-2(5N)-on (Slika 3) (45).



Slika 3. Strukturna formula vitamina C - 2D prikaz (Preuzeto uz modifikaciju sa: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067#section=2D-Structure>)

Lako se rastvara u vodi i metanolu. Otporan je na zamrzavanje, a uništava ga kuvanje, oksidacija i delovanje baza. U prirodi se može naći jedino u *L*- obliku askorbinske kiseline. Ovaj oblik je biološki aktivan, a njegova aktivnost se gubi već pri temperaturi od 60 °C. Kao dobar prirodan izvor vitamina C navode se biljke (naročito

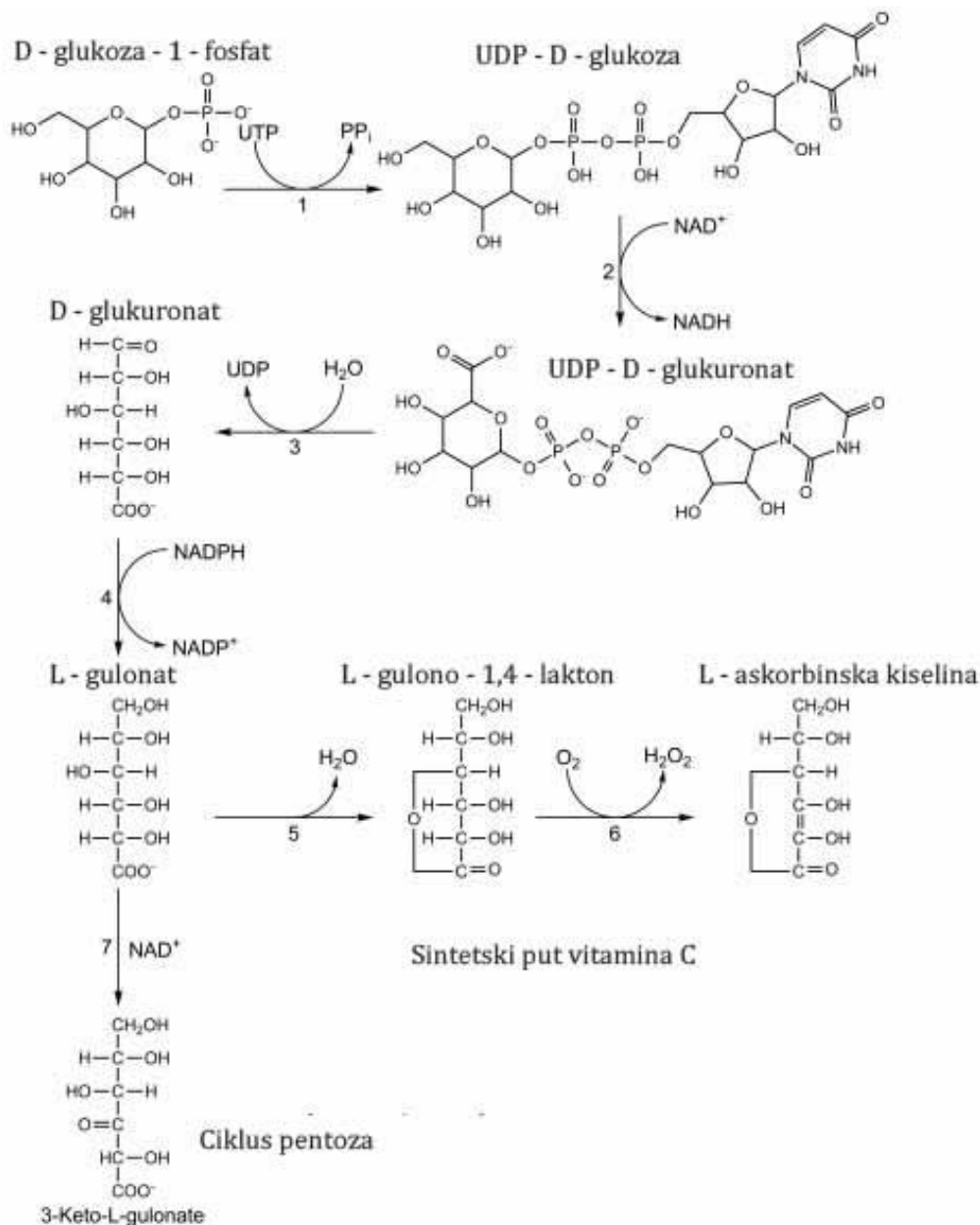
šipak, peršun, paprika, ribizla i druge), kao i prehrambeni proizvodi životinjskog porekla (teleća i goveđa jetra, ostrige, bakalar) (46).

1.2.2. Izolovanje i sinteza vitamina C

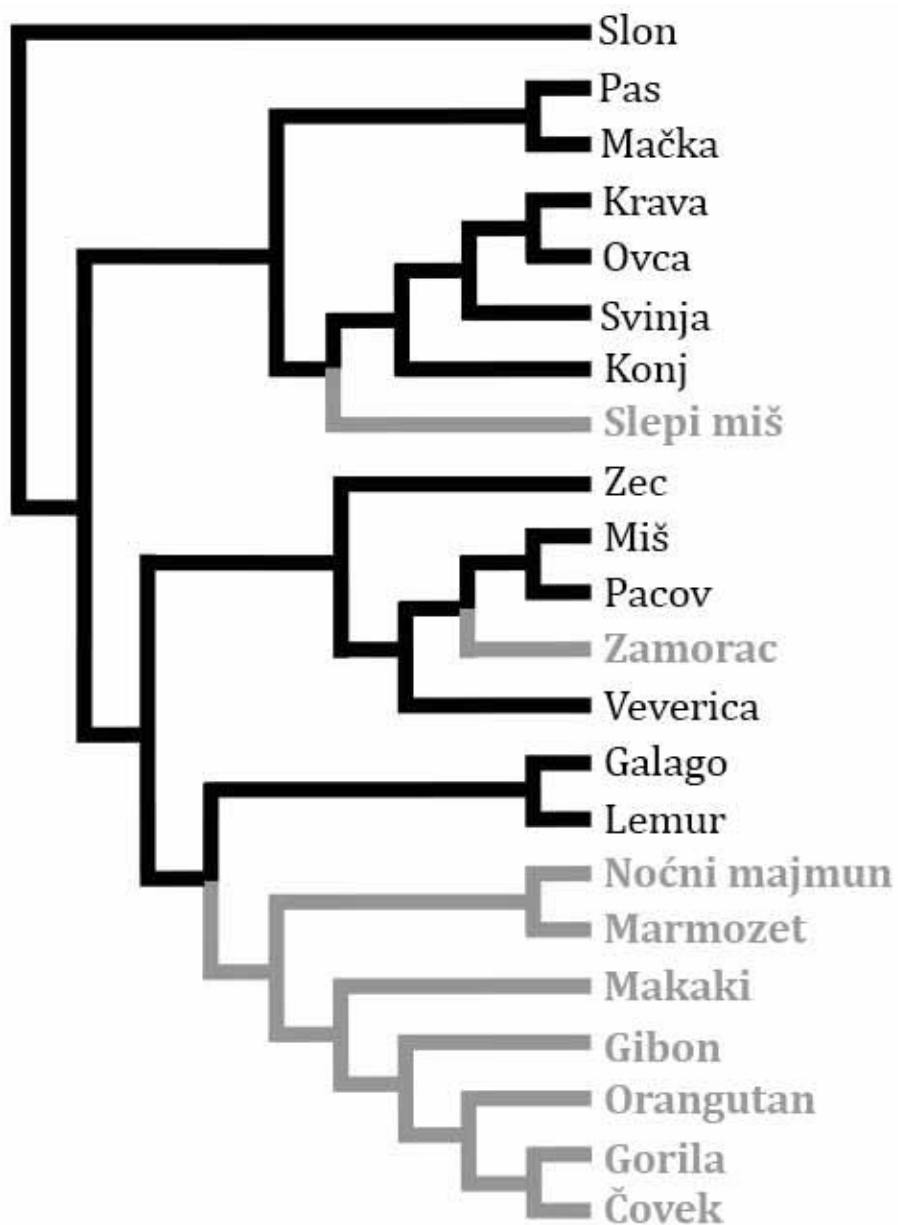
Mnogo godina pre otkrića vitamina C prvi eksperimentalni model razvoja skorbuta izveden je na zamorcima od strane dva norveška istraživača, *Axel Holst*-a i *Theodor Frolich*-a. Ispitujući *beriberi* kod ovaca, upotrebom zamorca kao animalnog modela, uvideli su da se kod njih primenom iste hrane koja je izazvala *beriberi* razvila sasvim drugačija klinička slika. Bio je to skorbut, i prvi opisani ekperimentalni model ove bolesti koja se do tada već sretala kod ljudi. Znalo se da je u osnovi nastanka oboljenja nedostatak neke bitne supstancije, međutim tek u periodu od 1928. do 1930. godine u svojim odvojenim istraživanjima mađarski tim naučnika predvođen *Albert Szent-Gyorgyi*-em i tim *Glen-a King*-a u Pitsburgu su u izolovali vitamin C. Tada je ova izolovana supstanca nazvana heksuronska kiselina, a nešto kasnije zbog pokazanog antiskorbutičnog delovanja dobija naziv askorbinsom kiselinom (47).

Vitamin C se kod živih bića može sintetisati kroz različite biohemijeske puteve. Kvasci sintetišu vitamin C iz *D*-eritroaskorbata i *D*-arabinoze, biljke vitamin C sintetišu iz gvanozin difosfat manoze (*GDP-D*-manoze), dok se kod životinja sintetiše iz uridin-difosfoglukuronata (*UDP- D*-glukuronata, Slika 4) (48-51)

Na prikazani način vitamin C se *de novo* sintetiše iz glukoze u jetri većine sisara. Međutim ljudi, antropoidni primati, zamorci, neke vrsta ptica i riba su evolucijom izgubile sposobnost sinteze vitamina C *de novo* (Slika 5) (31, 30).

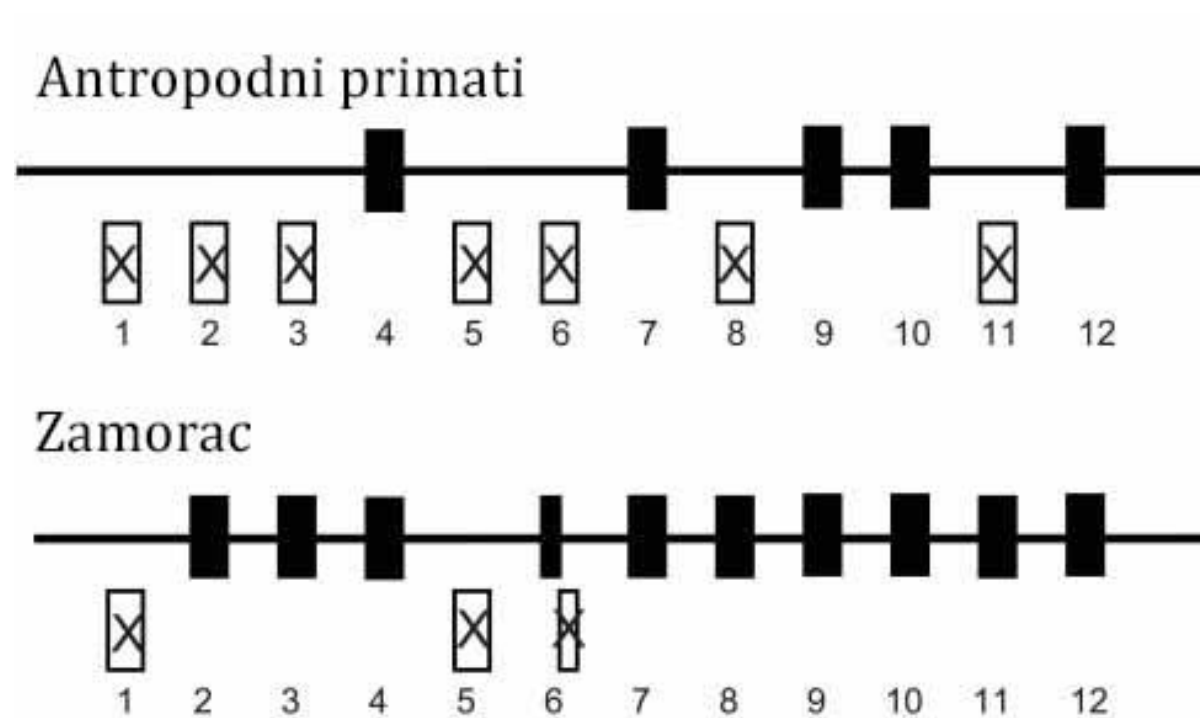


Slika 4. Prikaz biohemijskom puta sinteze vitamina C kod životinja. Brojevi predstavljaju sledeće enzime: 1. UDP-glukoza pirofosforilaza (EC 2.7.7.9), 2. UDP-glukoza dehidrogenaza (EC 1.1.1.22), 3. UDP-glukuronidaza (EC 3.2.1.31), 4. Glukoronat reduktaza (EC 1.1.1.19), 5. Glukonolaktonaza (EC 3.1.1.17), 6. L-gulonolakton oksidaza (GLO, EC 1.1.3.8) (Preuzeto iz: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145266/#R1>).



Slika 5. Mogućnost sinteze vitamina C (filogenetski prikaz): crno označeni rodovi koji imaju mogućnost sinteze vitamina C, dok su sivom bojom predstavljeni oni koji su tu sposobnost izgubili (Preuzeto i modificovano iz: Prasad AB, Allard MW, Green ED. *Confirming the phylogeny of mammals by use of large comparative sequence data sets. Mol. Biol. Evol.* 2008;25:1795–1808)

Kao razlog tome u literaturi se navode promene u sekvenci gena za *L*-gulonolakton-oksidadzu (*Gulo* gena, engl. *Gulono lactone oxidase (GLO)*), enzima koji je neophodan za sintezu 2-keto-*L*-gulonolaktona (prekursora vitamina C). Nishikimi i saradnici su u svojim istraživanjima došli do zaključka da unutar genoma antropoidnih primata i zamoraca postoje sekvence gena slične *GLO* genu. Međutim, zbog brojnih mutacija, one ne kodiraju sintezu funkcionalnog enzima. Naime, *GLO* gen kod antropoidnih primata je izgubio sedam od dvanaest egzona, dok je u genu zamoraca izbrisan prvi i peti egzon, kao i deo šestog egzona (**Slika 6**). Razlog nastanka ovakvih mutagenih promena u sekvenci *GLO* gena, kod pomenutih vrsta, do sada nije utvrđen (29, 52, 53). Na osnovu navedenih podataka došlo se do zaključka da ovi sisari, zarad svog opstanka, moraju hranom unesti adekvatne količine vitamina C.

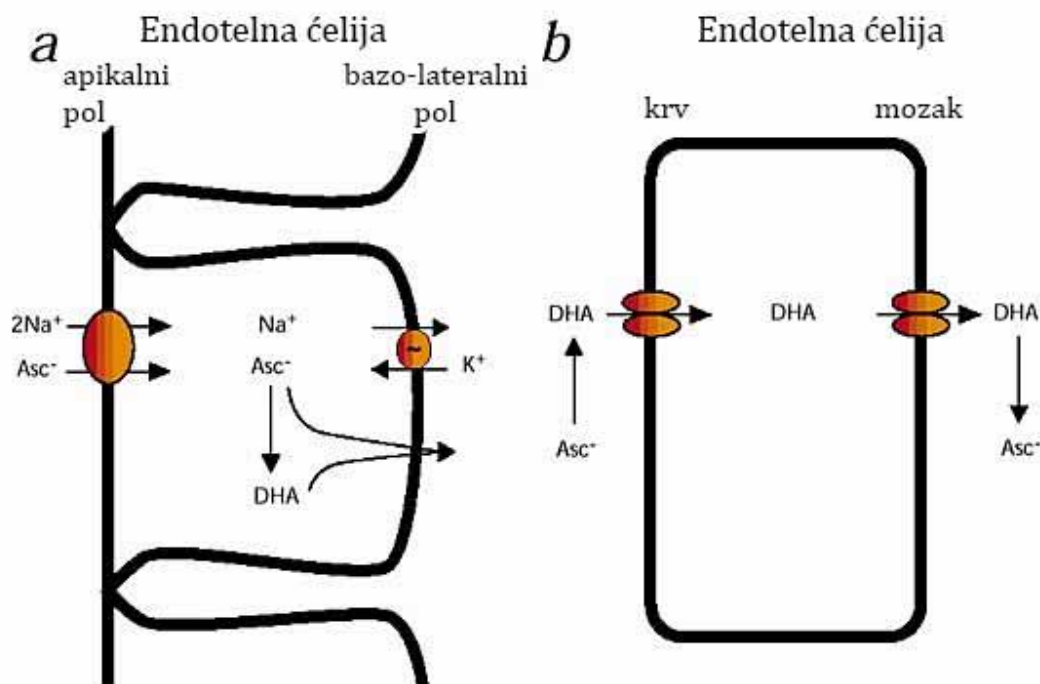


Slika 6. Šematski prikaz strukture GLO gena kod antropoidnih primata i zamorca. Crni pravougaonici predstavljaju egzone koji se i dalje nalaze u genu, dok su belim pravougaonicima sa oznakom X označeni egzoni ili njihovi delovi koji su izbrisani. (Preuzeto i modifikovano iz Drouin G, Godin JR, Pagé B. *The genetics of vitamin C loss in vertebrates. Curr Genomics.* 2011;12(5):371–8.)

1.2.3. Apsorpcija, metabolizam i ekskrecija vitamina C

Kod glodara koji imaju sposobnost sinteze vitamina C (hrčak i pacov) apsorpcija vitamina se odvija u crevima i pasivna je. Međutim kod čoveka i zamorca koji su zavisni od unosa vitamina C hranom, apsorpcija je posredovana natrijum zavisnim aktivnim transportom. Mesto apsorpcije vitamina C je duodenum i početni deo ileuma (54). Apsorpcija se vrši preko glikoproteinskog recetora, a njegova lokalizacija je opisana na apikalnom i bazalnom polu enterocita (55).

Studije su pokazale da se transport vitamina C kroz enterocite odvija preko SVCT1 (SLC23A1) i SVCT2 (SLC23A1) transportera, dok se mehanizam transporta vitamina C iz krvi u centralni nervni sistem razlikuje. Kako askorbinska kiselina nema mogućnost prolaska kroz krv-mozak barijeru, a endotelna ćelija kapilara ne poseduje receptore SVCT1 i SVCT2 transport vitamina C se odvija preko GLUT1 receptora. Odnosno askorbinska kiselina, u tkivnom mikrokruženju, biva oksidovana u dehidroaskorbinsku kiselinu (*DHA*). Ovako nastalu oksidovanu formu GLUT1 receptori prenose, a zatim se u nervnom tkivu, posredstvom *DHA* reduktaze, rekonvertuje u askorbinsku kiselinu (**Slika 7**) (56).



Slika 7. Šematski prikaz transporta vitamina C kroz ćeliju: A) Transport vitamina C kroz epitelnu ćeliju posredovan SLCT; B) transport DHA oksidovane forme vitamina C (Preuzeto iz: Friedman PA, Zeidel ML. Victory at C. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):620-1.)

U dosadašnjoj literaturi navodi se da optimalna dnevna doza vitamina C za zamorca iznosi 10-30 mg/kg, dok su znatno veće koncentracije od 30 do 50 mg/kg potrebne u stanjima kao što su trudnoća i rani period razvoja. Navodi se da i drugi faktori kao što su: pol, starost, količina deponovanog vitamina, ishrana, trudnoća, dojenje, udružene bolesti kao i spoljašnji uslovi mogu da utiču na dužinu početka i izraženost simptoma nedostatka vitamina C (57).

Kod ljudi preporučeni dnevni unos vitamina C zavisi od pola i životnog doba. Sa godinama preporučena koncentracija unosa vitamina C raste od 15 mg dnevno u periodu između 1-3 godine života, pa do 75 mg za žene i 90 mg dnevno za muškarce od 19 godine pa do kraja života. U svakom životnom dobu nešto veće količine vitamina C je

neophodno da unose muškarci (58). Detaljan prikaz preporučenih dnevnih potreba za vitaminom C predstavljen je u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Preporučeni dnevni unos vitamina C

STAROSNA DOB (godine)	ŽENSKI POL mg/dan	MUŠKI POL mg/dan
1-3	15	15
4-8	25	25
9-13	45	45
14-18	65	75
19-30	75	90
31-50	75	90
51-70	75	90
>70	75	90

Vitamin C je hidrosolubilna supstanca, njegova koncentracija u plazmi je strogo kontrolisana bubrežnom ekskrecijom. Naime, kod zdravih ljudi sva količina vitamina C se filtrira u glomerulima bubrega, potom ponovo biva apsorbovana u proksimalnim tubulima preko *SVCT1* transportera (transportera vitamina C). Kod ljudi doza na kojoj je reapsorpcija vitamina C saturisana je između 60-100 mg/dan, dok ona količina koje se unese u višku biva putem mokraće izlučena (59).

1.2.4. Uloge vitamina C

Danas su dokazane mnogobrojne uloge vitamina C. Jedna od uloga koje ima je uloga kofaktora neophodnog za funkcionisanje brojnih enzima. Na taj način učestvuje u procesima biosinteze kolagena kao neophodan kofaktor za tri enzima (prolil-4-hidroksilazu, prolil-3-hidroksilazu, lizin hidroksilazu) zaduženih za hidroksilaciju prolil i lizil rezidua (60). Sintezu L-karnitina vrše enzimi trimetilizin dioksidgenaza i gama-butirotetainska hidroksilaza, a za njihovo funkcionisanje neophodni su askorbinska kiselina i dvovalentno gvožđe (60, 61). U sintezi i konverziji dopamina u norepinefrin vitamin C učestvuje kao donor elektrona za dopamin- β -monooksigenazu (60).

Vitamin C olakšava enteralnu apsorpciju neorganskog *non-hem* gvožđa, učestvuje i u sintezi kortizola i kateholamina, a takođe smanjuje toksičnost redukovane forme elemenata kao što su selen, olovo, kadmijum i nikel (60, 61).

U metabolizmu histamina vitamin C je zajedno sa jonima bakra umešan u procese inhibicije oslobađanja histamina kao i ubrzanja njegove degradacije. Na poboljšanje imunog odgovora deluje stimulišući produkciju interferona i hemotaksiju neutrofila, kao i produkciju antitela IgG i IgM klase (60). Istraživanja su pokazala da kod prehlade u suplementacija vitamina C skraćuje trajanje bolesti za 8% kod odraslih i za 13% kod dece.

Randomizirane studije su pokazale da vitamin C smanjuje seropozitivnost i progresiju atrofije želuca kod pacijenata sa seropozitivnom *H. pylori* infekcijom. Dok topikalna aplikacija vitamina C dovodi do skraćivanja vremena neophodnog za lečenja kožnih promena kod pacijenata sa *Herpes simplex* virusnom infekcijom (62-64).

Vitamin C je snažan antioksidans. Pod fiziološkim uslovima funkcioniše kao potentno redukciono sredstvo koje se efikasno vezuje za slobodne radikale (koji su proizvod normalnog metaboličkog disanja), i tako stvara slabo reaktivni radikal askorbinske kisline (engl. *ascorbyl radical*). Ove reakcije su od izuzetnog značaja za aerobne ćelije (60, 65, 66).

1.3. Zamorac

Zamorac (*Cavia porcellus s. aperea*) ili morsko prase (**Slika 8**) spada u glodare koji zajedno sa kapibarama pripadaju porodici *Caviidae*. Zbog česte upotrebe u naučnim istraživanjima termin „zamorac“ je postao sinonim za eksperimentalni subjekt (67). Prvi put su pripitomljeni pre 3 000 godina od strane Indijanaca u Peruu. Prvobitno su im služili kao hrana ili kao žrtvene životinje u toku verskih rituala (68). Holanđani ih donose na tlo Evrope tek u 16. veku.



Slika 8. Albino zamorac

Zbog svog blagog temperamenta zamorac se u eksperimentima koristi više od 200 godina. Ujedno su i prva životinjska vrsta koja je izvedena i držana u aksenom stanju (*axenetic state*) (69). Međutim u poslednjim decenijama broj publikacija u kojima su kao animalni modeli korišćeni zamorci značajno opada. Zamenjeni su drugim vrstama glodara, miševima i pacovima, koji imaju kraći reproduktivni ciklus, veća legla i danas su brojni modeli uspešno genetski modifikovani. Zamorci su korišćeni u različitim studijama, uključujući anafilaksu, astmu, reakcije preosetljivosti, genetiku, imunologiju, ishranu pa i za istraživanja u svemiru (70).

Zamorci mogu imati dugu ili pak kratku dlaku. Dlaka im može biti mono-, bi- ili trikolorna. Srednjeg su rasta, bez repa, sa 4 prsta na prednjim nogama odnosno 3 na zadnjim. Na svim prstima se nalaze kandže. U svrhu istraživanja najčešće se koriste kratkodlaki beli (*albino*) zamorci. Pošto su socijalne životinje mogu se držati zajedno u

kavezima, u adekvatnim grupa. Neophodno je da temperatura prostorije bude u rasponu od 20 – 26 C, vlažnost vazduha 30 - 70%, provetravanje vazduha 10 - 15 puta na sat, kao i smenu dnevno-noćnog ritma na 12h (71).

Po rođenju zamorci su težine 60 – 100 g i u potpunosti sposobni za samostalan život (*precocial*) – pokretni su, oči su im otvorene, imaju dlaku, a prvobitne zube su im u toku fetalnog razvoja zamenili stalni. Iako im period laktacije traje 12 dana, već prvog dana mogu da jedu čvrstu hranu i piju vodu (72).

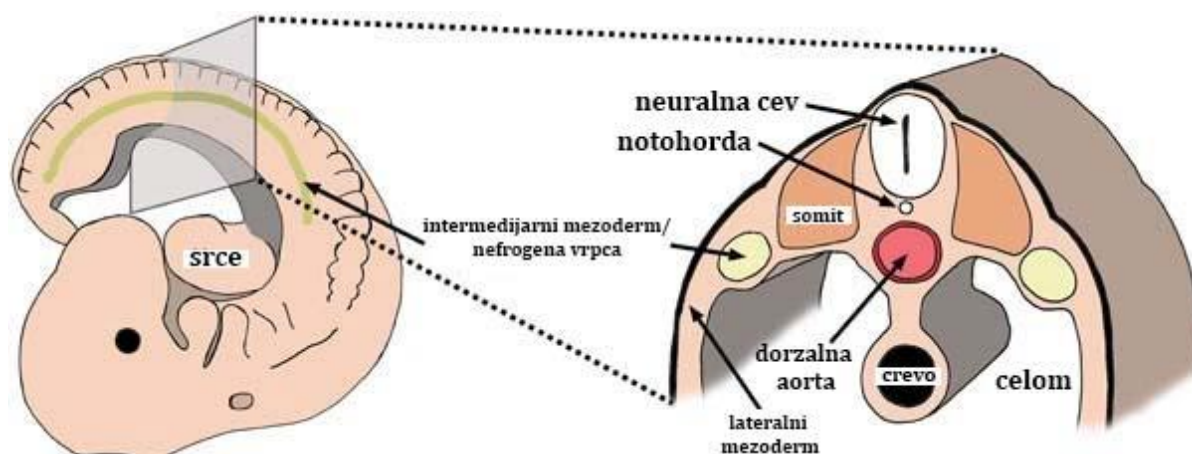
Reproduktivnu zrelost ženke stiču već nakon 4-5 nedelja, dok mužijaci nakon 8 – 10 nedelja. U potpunosti su odrasli u proseku sa 8 - 10 meseci, a životni vek im je i do 8 godina. U toku života mogu da dostignu težinu od 800 do 1 000 g i dužinu do 30 cm. Kod ženki estrusni ciklus traje u proseku 16 dana (13-21 dan), a gestacioni period 59-72 dana i obrnuto je proporcionalan broju fetusa (73). Dug gestacioni period, spontana ovulacija i aktivno sekretujuće žuto telo ih u pogledu reproduktivniog sistema, za razliku od ostalih laboratorijskih životinja, čini najsličnijim čoveku.

Zamorac kao i čovek u potpunosti je zavisn od egzogenog unosa vitamina C. Zbog te svoje genetske sličnosti sa čovekom (koja se ogleda u nemogućnosti sinteze vitamina C) zamorac se, u poređenju sa drugim glodarima, smatra veoma pogodanim modelom za sprovođenje našeg istraživanja.

1.4. Embriološki razvoj bubrega

Bubreg kod sisara predstavlja veoma kompleksan organ sa više od 25 funkcionalno i morfološki različitih ćelija organizovanih tako da omoguće filtraciju, reasorpciju i sekreciju a sve u cilju regulacije homeostaze, krvnog pritiska, broja eritrocita i gustine kostiju kao i eliminacije otpadnih azotnih materija (74).

Histološke karakteristike fetalnih bubrega se u mnogome razlikuju u odnosu na razvijene bubrege kod odraslih. Razlog tome je to što je bubreg organ koji se kontinuirano razvija do samog kraja gestacije. U embrionalnom periodu razvića od primitivne pruge nastaje mezoderm od koga će se kasnije razviti bubreg. Razvoj bubrega kod sisara se odvija u kranio-kaudalnom pravcu diferencijacijom intermedijarnog mezoderma. Intermedijarni mezoderm se nalazi između paraaksijalnog i lateralnog somita, sa kojima gubi vezu i formira urogenitalni nabor (Slika 9) (74, 75).



Slika 9. Prikaz lokalizacije intermedijarnog mezoderma na embrionu miša (Preuzeto uz modifikaciju iz: Davidson AJ. *Mouse kidney development*. In *Stembook* [Internet] 2009 Jan 15. Harvard Stem Cell Institute).

Na urogenitalnom naboru intermedijarnog mezoderma se razlikuju dva dela: 1) nefrogena traka (vrpca) – koja će u budućnosti dati organe urinarnog sistema; i 2) gonadni nabor od kog će se razviti gonade (75).

Postoje tri morfološka oblika u razvoju bubrega, koja se vremenski i prostorno preklapaju, a to su: pronefros, mezonefros i metanefros. Pronefros i mezonefros se smatraju privremenim organima, a njihovo postojanje je neophodno za razvoj definitivnog bubrega odnosno metanefrosa (76)

Kod humanih embriona prvi dokaz o razvoju urinarnog sistema predstavljaju nefrotomi – grupisane mezenhimne ćelije koje se diferenciraju od kranijalnog intermedijarnog mezoderma tj od prvih pet cervikalnih nefrotoma. Pronefros se kod ljudi razvija oko 21-22. dana nakon začeća, dok se kod miša razvija 8. embrionalnog dana. Sastoji se najpre od 7-10 solidnih nakupina ćelija koje se diferenciraju u vezikule a potom kanaliće (77). Medijalni deo kanalića preko otvora (nefrostome) komunicira sa celomskom dupljom, dok se lateralni kraj izdužuje kaudalno i i spaja sa susednim, ispod smeštenim kanalićem, formirajući pronefrosni kanal – primarni mokraćpvpd, koji se izdužuje i otvara u kloaku. Kranijalni deo pronefrosnog kanala, kasnije formirani mezonefros koristiće kao odvodni kanal, sve dok ostale strukture pronefrosa podležu regresiji. (77).

Rani, pronefrosni, razvoj bubrega je pod uticajem retinoične kiseline koja će uticati na ograničenu ekspresiju *Hox 4-11* gena. Pored toga transkripcioni faktori Pax-2 i Pax-8 u intermedijarnom mezodermu indukuju ekspresiju gena *Lim-1* koji je zadužen za agregaciju mezenhimalnih ćelija i stvaranje pronefrosnog duktusa. Kod čoveka ovaj stadijum u razvoju bubrega je privremen i nije funkcionalno aktivan. Kod riba i amfibija,

pronefros je dobro razvijen, te perzistira tokom života i reguliše vodeno-soni balans kao i pH krvi (78).

Sledeći tranzitorni stadijum u razvoju bubrega je mezonefros. Mezoderm nefrogene vrpce tj torakalnih i dela lumbalnih (L1-L3) nefrotoma, prolazi kroz mezenhimno epitelnu transformaciju u toku koje ćelije dobijaju svojstva epitela, a takve, sada epitelne ćelije, stvaraju renalne vezikule koja će se dalje diferencirati u strukture oblika zareza, a potom i latiničnog slova S (79).

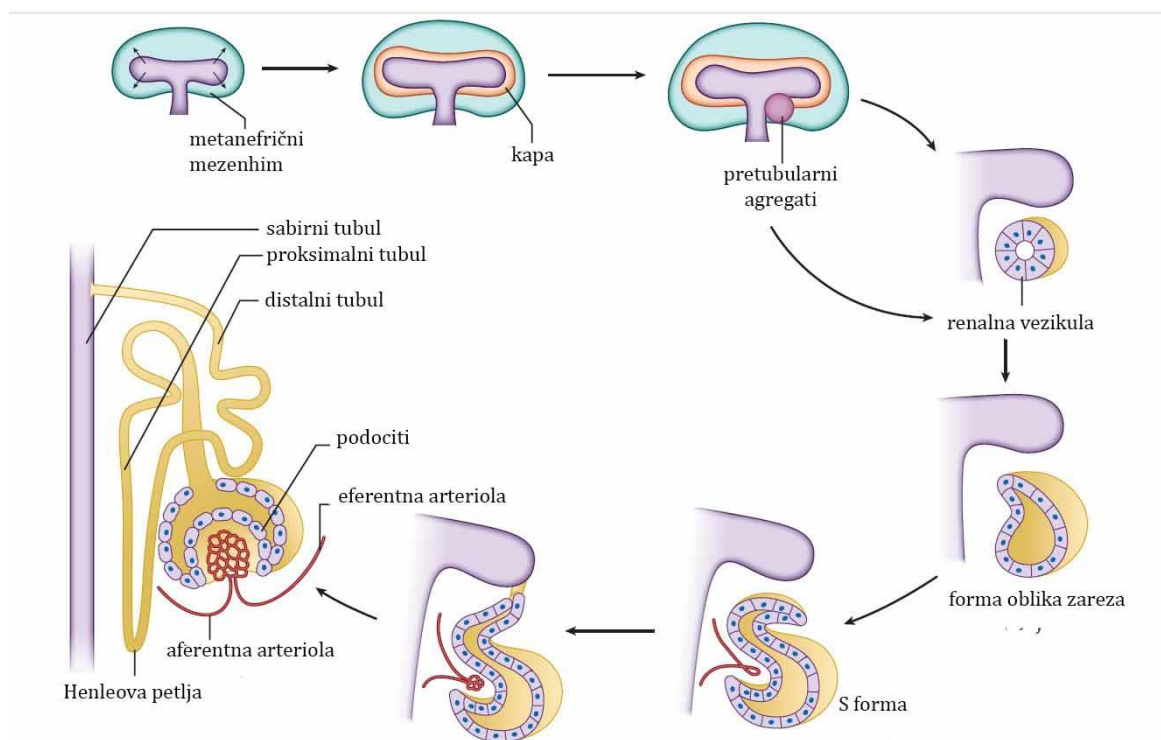
Po formiranju S forme, njezin lateralni kraj dilatira i obrazuje Bowmanovu kapsulu, gde dolazi do urastanja dorzalnih arterija što će rezultirati formiranjem glomerula. Od ostatka S forme, diferenciraju se preostali delovi nefrona – proksimalni tubul, Henleova petlja i distalni tubul, koji se spaja sa primarnim mokraćovodom (Wolff-ovim kanalom). Mezonefros sa ovakvim jednostavnim ali kompletnim nefronom predstavlja prvu ekskretornu jedinicu u bubregu. Kod čoveka ima privremenu i ograničenu funkciju u stvaranju malih količina urina i regulaciji elektrolitske ravnoteže. Degeneracija mezonefrosa ide u kranio-kaudalnom pravcu, i u periodu između 5. i 12. gestacione nedelje mezonefros gubi svoju ekskretornu funkciju (80, 81).

Kod ploda ženskog pola u toku trećeg meseca intauterinog razvoja preostale strukture mezonefrosa iščezavaju (osim zaostatka u vidu Gartner-ove ciste), dok se kod muškaraca, od mezonefrosni kanala, razvijaju *ductus epididymis et ejaculatorius*, kao i *vesiculae semminales* (82).

Razvoj metanefrosa (definitivnog bubrega sisara) počinje u 5. nedelji gestacije kod čoveka, odnosno 10. dana gestacije kod miša. Manifestuje se razvojem ureteralnog pupoljka koji nastaje od kaudalnog dela Wolff-ovog kanala. Kod brojnih vrsta, tokom određenog perioda, moguće je uporedno perzistiranje mezonefrosa (privremenog

bubrega) i metanefrosa. Razvoj metanefrosa se odvija zahvaljujući recipročnom induktivnom uticaju između metanefričnog mezenhima i ureteralnog pupoljka (83).

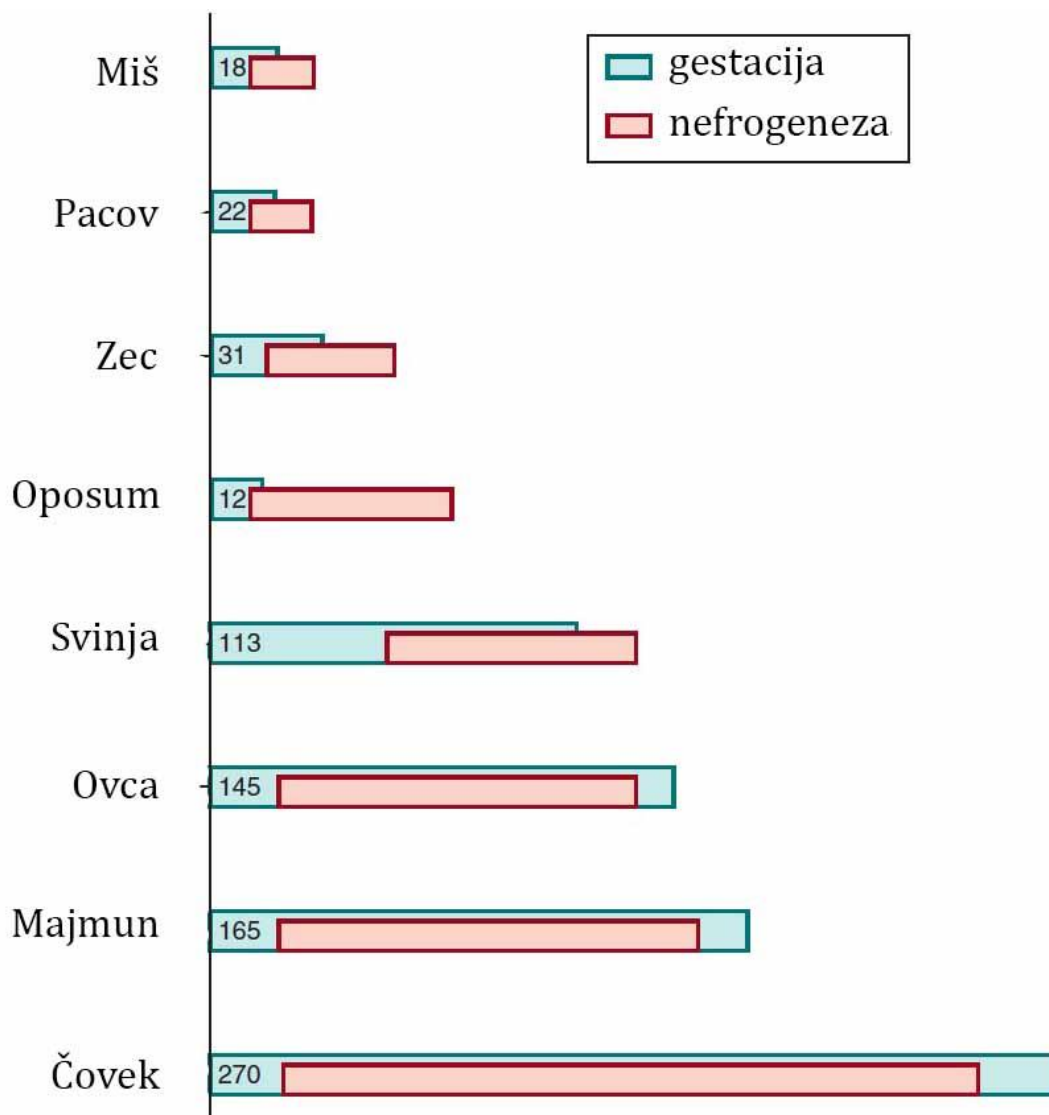
Metanfrični blastem predstavlja preostale nefrotome porekla intermedijarnog mezoderma (lumbalne i sakralne). Čini ga grupa od nekoliko stotina ćelija koje su pod uticajem WT-1 transkripcionog faktora. U sklopu metanefričnog blastema postoje zasebne progenitorne ćelijske populacije koje će kasnije formirati nefrone, stromalnu i vaskularnu komponentu bubrega (84). Metanefrični blastem pod uticajem signala kondenzuje i formira strukturu sličnu kapi (**Slika 10**), koja se razvija i stvara pretubularne agregate čije će ćelije proći kroz proces mezenhimno epitelne transformacije, i sada kao epitelne ćelije, formirati oblik renalne vezikule. Vezikule u procesu nefrogeneze će se dalje diferencirati u stadijum srpaste forme (forme zarez) i S forme (forme oblika latiničnog slova S) i tako započeti stvaranje funkcionalnih nefrona (75) (**Slika 10**). Naime, sferična struktura renalne vezikule, sastavljena od polarizovanih epitelnih ćelija se ubrzo transformiše i gubi simetriju. Ćelije se pomeraju i formiraju zakrivljenu invaginaciju na kojoj se uočava proksimalni („tanki“) segment i distalni „debeli“ kraj sa lumenom u sredini. Ova formacija odgovara morfogenskom stadijumu zarez (srpastoj formi). Dalje pomeranje ćelija ka proksimalnom polu kreiraće još jedan lumen i ovakva razvojna forma nefrona označena je kao latinično slovo S. Epitel koji oblaže unutrašnjost distalnog dela S forme će se diferencirati u podocyte, a iz distalnog lumena nastaju kapilari menzangijuma. Podociti imaju sposobnost stvaranja fibronektina i drugih komponenti bazalne membrane kao što je kolagen IV (76).



Slika 10. Razvoj nefrona: Metanefrični mezenhim se pod uticajem signala kondenzuje, stvarajući strukturu sličnu kapi (narandžasto). Deo ćelija unutar ove strukture se dalje grupiše i formira pretubularne agregate koji podležu transformaciji mezenhima u epitel, formirajući na taj način bubrežnu vezikulu. Vezikula se dalje diferencira u strukture u obliku zareza, a potom u strukturu oblika slova S. Endotelne ćelije migriraju u rasep tela u obliku slova S, što će doprineti formiranju bubrežnih ćelija. Gornji deo S strukture spaja se sa vrhom kanala za ureter (budući kanal za sakupljanje). Od donjeg segmenta S forme nastaću podociti i Bowmanova kapsula. Dok se gornji segment izdužuje i diferencira u: distalni tubuli, a srednji deo u Henleovu petlju i proksimalne tubule. Preuzeto i modifikovano iz: *Moritz KM, Wintour EM, Black MJ, Bertram JF, Caruana G. Factors influencing mammalian kidney development: implications for health in adult life. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2008;196:1-78.*

Od proksimalnog dela S forme nastaje distalni izvijani tubul, središnji centralni deo će se izdiferencirati u proksimalne tubule, Henleovu petlju i distalne prave tubule, dok će se od distalnog dela S forme nastati dilatacija koje je u stvari *Bowman*-ova kapsula razviti bubrežno telašće odnosno glomerul (76). Uraštavanje kapilara u *Bowman*-ovu kapsulu rezultuje nastankom glomerula. Od tog trenutka podociti dalje ne proliferišu, već se diferenciraju u ćelije sa nožicama i sa kapilarima formiraju filtracionu barijeru, glomerularnu bazalnu membranu (GBM) (75, 76).

Tokom grananja ureteralnog pupoljka prvo se formira bubrežna karlica i čašice, a u tom periodu stvaranje nefrona nije primećeno. Dok svako sledeće grananje će rezultovati induktivnim delovanjem na metanefrički blastem i početkom razvoja nefrona. U prve četiri generacije grananja ureteralnog pupoljka nastaju 4 velike čašice, zatim sledeće četiri generacije daju male čašice, a narednih 11 generacija grananja se i daju sabirne tubule (75). Nakon 15. nedelje grananje prestaje ali se nefrogeneza nastavlja. Samo trajanje procesa nefrogeneze među vrstama se razlikuje. Kod mnogih vrsta se odvija postnatalno pa je izložen i uticaju faktora *ex utero* (**Slika 11**). Kod ljudi nefrogeneza počinje u 5. nedelji razvika, najintenzivnija je u period između 18-32. nedelje, a u potpunosti se, prema većini autora, završava u 34-36. nedelji. Nefrogeneza se kod zamorca odvija između 22. i 55. prenatalnog dana (77-84).



Slika 11. Šematski prikaz dužine trajanja nefrogeneze god sisara u poređenju sa dužinom gestacije. Broj u zelenom pravougaoniku označava dužinu gestacije. (Preuzeto uz modifikaciju iz: Matsell DG, Tarantal AF: *Experimental models of fetal obstructive nephropathy. Pediatr Nephrol* 17:470–476, 2002.)

1.5. Razvoj pluća

Bez obzira na životno stanište svi reptili, ptice i sisari razmenu gasova vrše preko pluća. Distalni deo respiratornog sistema (grkljan, dušnik, glavni bronhi, intrapulmonalni bronhi i pluća) razvijaju se iz laringotrahealnog pupoljka (respiratornog divertikuluma), koji nastaje na ventralnoj strani kranijalnog dela prednjeg creva (85). Epitelna komponenta respiratornog sistema je endodermalnog porekla, dok su mišićna, hrskavičava i vezivnotkivna komponenta kao i kapilari pluća poreklom od splanhičnog mezoderma koji okružuje prednje crevo (86).

Tokom organogeneze razvoj pluća prolazi kroz 5 stadijuma razvoja: embrionalni, pseudoglandularni, kanalikularni, sakularni i alveolarni (**Tabela 4**), koji se prema histološkim karakteristikama mogu razlikovati, ali jasne granice između ovih stadijuma ne postoje jer se tokom razvoja stadijumi međusobno nadovezuju i prepliću (87).

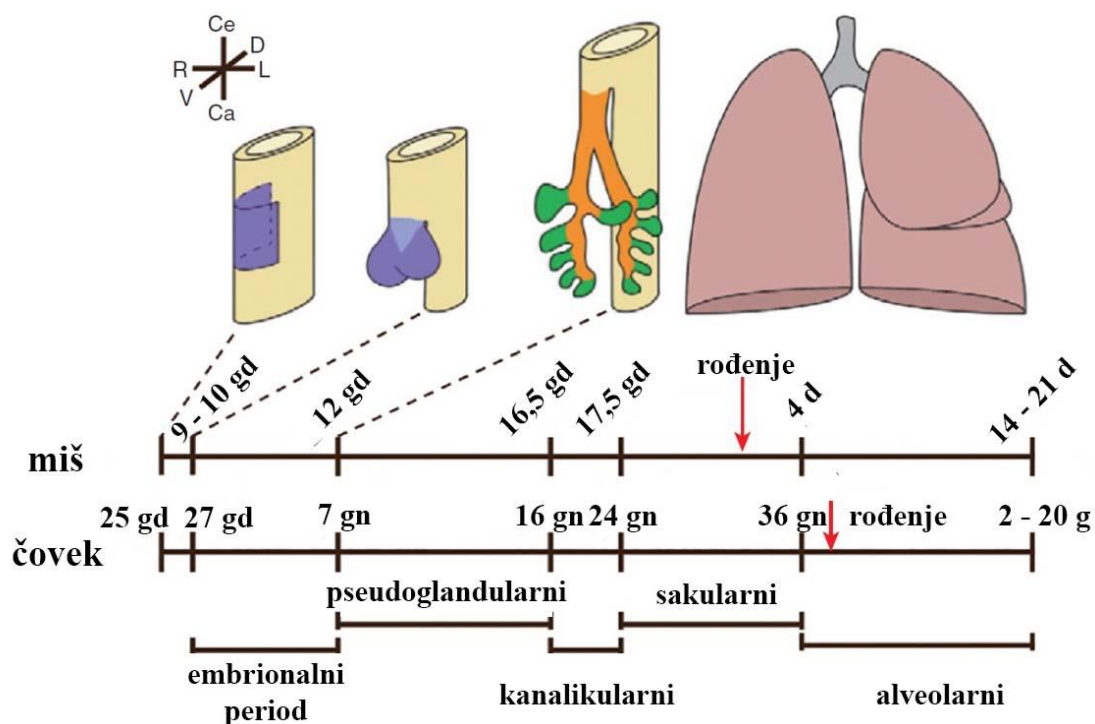
Tokom **embrionalnog stadijuma** razvoja pluća, epitelne ćelije primitivnog respiratornog divertikuluma invadiraju okolni mezenhim i tako formiraju primitivno bronhijalno stablo (88). Kod ljudi 28. dana gestacije respiratorni divertikulum se deli na desni i levi primarni bronhijalni pupoljak od kojih će kasnije nastati desni i levi primarni bronh (**Slika 12**). Od dela koji se nalazi iznad bifurkacije nastaje dušnik i grkljan (89).

Tabela 4. Stadijumi razvoja plućnog parenhima kod različitih vrsta sisara*

Stadijum razvoja	Vrsta	Vremenski period	
		Počinje	Završava se
Embrionalni	Miš	9 ED	12 ED
	Pacov	n	18 ED
	Čovek	3-4 GN	6-8 GN
Pseudoglandularni	Miš	12 ED	16 ED
	Pacov	13 e	18 e
	Čovek	6-8 GN	16 GN
Kanalikularni	Miš	16 e	17 e
	Pacov	18 e	20 e
	Čovek	16 GN	26-28 GN
Sakularni	Miš	17 E	4 PN
	Pacov	21 E	4 PN
	Čovek	26-28	32-36 GN
Alveolarni	Miš	4 PD	36 pd
	Pacov	21E	4 PN
	Čovek	32-36 GN	2-4 godine života

*Preuzeto uz modifikaciju iz L.M. Ernst et al. (eds.), *Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology*, 21 DOI 10.1007/978-1-4614-0019-6_2, Schittny JC. *Development of the lung. Cell Tissue Res.* 2017; 367(3): 427-444.

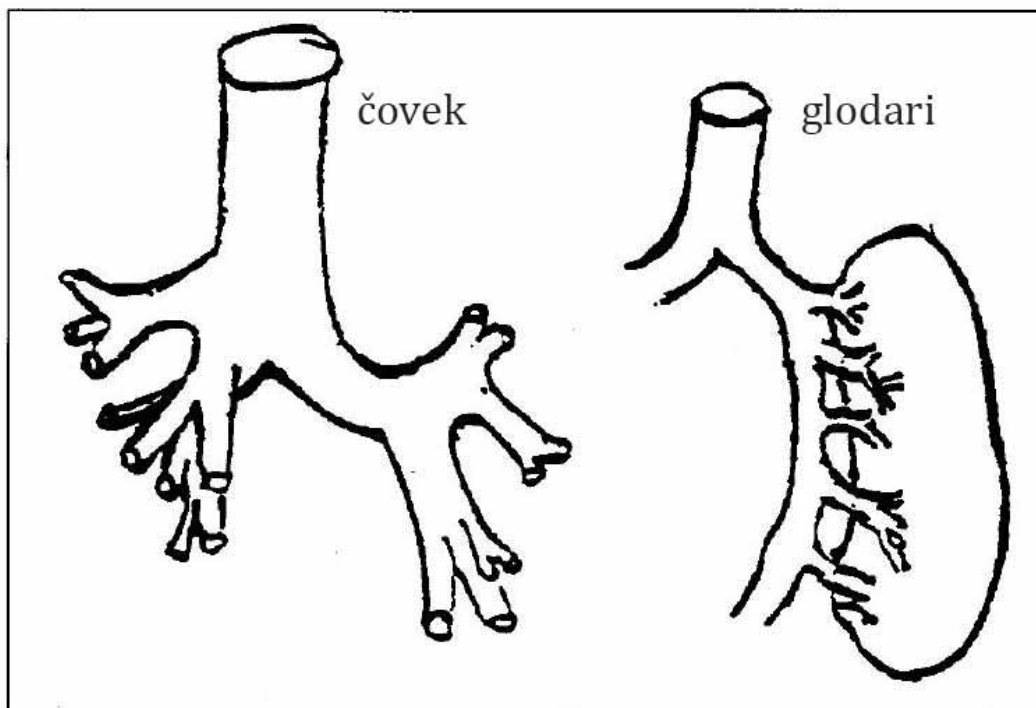
U ovom stadijumu dušnik i bronhijalno stablo u svom zidu ne sadrže hrskavicu i glatki mišić, ali su obloženi nediferentovanim pseudoslojevitim cilindričnim epitelom. Ekstracelularni matriks čini velika količina hijaluronske kiseline, a bazalna membrana epitela se sastoji iz kolagena tip IV, laminina i fibronektina. Okolni mezenhim sadrži ćelije koje će formirati vaskularne pleksuse, glatke mišiće i druge komponente veziva. Na kraju ovog stadijuma parenhim pluća izgledom podseća na tubuloacinarne žlezde (90).



Slika 12. Šema sa uporednim prikazom razvoja pluća kod miša i čoveka. Ca- kaudalno; Ce - cephalic; D-dorzalno; L-levo; R, desno; V- ventralno; gd – dan gestacija; gn – nedelja gestacije; g - godina. Preuzeto uz modifikaciju iz: Plosa E, Guttentag SH. *Lung Development*. In: Gleason CA, Juul SE, editors. *Avery's Diseases of the Newborn*, 10th ed. ELSEVIER: 2018;p. 586-599.e2.

Pseudoglandularni stadijum u razvoju pluća karakteriše formiranje bronhijalnog stabla. U toku ovog stadijuma bronhijalni deo parenhima se dihotomno grana i razvoj sprovodnog dela respiratornog sistema se završava formiranjem terminalnih bronhiola (91).

Plućni parenhim se sastoji iz brojnih epitelnih tubula obloženih pseudoslojevitim trorednim epitelom. Unutar epitela, ćelije su i dalje nediferentovane i sadrže veliku količinu glikogena. U bazalnoj membrani su prisutni kolagen i lamin. Oko tubula se, perpendikularno u odnosu na dužu osovину, u kružnom rasporedu pojavljuju miofibroblasti. Hrskavica u zidu traheje i glavnih bronha nastaje do 10-te, odnosno u segmentnim bronhima do 16-te gestacione nedelje. Međućelijski matriks je izgrađen iz glikozaaminoglikana, proteoglikana, fibronektina, laminina, kolagena I i III (90, 92, 93). Paralelno sa grananjem bronhijalnog stabla se kroz diferencijaciju i organizaciju mezenhima, u sklopu procesa angiogeneze, razvijaju i krvni sudovi pluća. Kod glodara od traheje nastaju dva primarna bronha i tako formiraju viljuškast oblik traheobronhijalnog stabla (podseća na ptičiju kost jadic, engl. *wishbone*, lat. *furcula*) (Slika 13).



Slika 13. Izgled traheobronhijalnog stabla kod čoveka i glodara. (Preuzeto i modificirano iz: Brewer NR, Cruise LJ. *The respiratory system of the guinea pig: Emphasis on species differences. Contemp Top Lab Anim Sci.* 1997;36(1):100-108.)

Bočnim grananjem bronha nastaju intralobularni bronhi, a svi intrapulmonalni sprovodni putevi po histološkim karakteristikama odgovaraju bronhiolama. Kod zamorca postoji samo jedna generacija bronhiola, koja će dalje preći u respiratorne bronhiole, koje na kraju prelaze u alveole (94, 95).

U plućnom parenhima tokom **kanalikularne faze** razvoja dolazi do formiranja plućnih acinusa koji se sastoje od respiratornih bronhiola sa pripadajućim alveolama (96). Unutar intersticijuma dolazi do smanjenja količine okolnog mezenhima i prorastanja krvnih sudova. Na ta način se ostvaruje blizak kontakt kapilara sa budućim alveolama, a sve u cilju formiranjem krv-vazduh (respiratorne) barijere. Epitelne ćelije

se diferenciraju i u perifernim delovima plućnog parenhima (u primitivnim alveolarnim duktusima) uočavaju se pneumociti tipa II. Ove ćelije su osposobljene za stvaranje surfaktanta i fosfolipida, a njihovom diferencijacijom nastaje pneumociti tipa I. Na svim mestima gde se ostvaruje kontakt endotelne ćelije kapilara sa alveolarnom epitelnom ćelijom (pneumocitom tipa I) dolazi do formiranja respiratorne barijere. Pred kraj ove faze sprovodni deo respiratornog sistema je obložen diferentovanim respiratornim epitelom, a u građi zida prisustva je hrskavičava, mišićna i žlezdana komponenta. Respiratorna barijera je dovoljno tanka da podrži razmenu gasova (97-100).

Sledeća faza u embriološkom razvoju plućnog parenhima (**sakularna faza**) se kod ljudi odvija u period od 24-e do 38-e gestacione nedelje. Tokom ove faze intersticijum pluća se redukuje, dolazi do daljeg rasta i razvoja alveolarnih sakulusa i duktusa. Epitelne ćelije se diferenciraju pa pneumociti tip II sve više proizvode surfaktant i pripadajuće proteine A, B, C i D. Količine glikogena unutar ćelija se smanjuju, a mitohondrijalni enzimi pokazuju povećanu aktivnost. Dolazi do smanjenja udaljenosti između pneumocita tip I i mreže kapilara. Kod nedonoščadi je u ovoj fazi moguća razmena gasova na nivou perifernih sakulusa (101).

Poslednji stadijum u razvoju pluća je **alveolarna faza**. Ovaj proces alveolarizacije parenhima je jedinstven za razvoj pluća i kod ljudi se odvija od 36-e nedelje gestacije do druge godine života. Kod glodara, kao što su pacovi, ova faza se odvija od 21-og embrionalnog dana pa do 4-og dana nakon rođenja, dok se kod miša taj proces odvija postnatalno (u periodu između 4-og i 36-og dana) (Tabela 4). Tokom ovog procesa dolazi do formiranja novih pregrada (tzv. sekundarnih septi) unutar postojećih vazdušnih prostora što rezultuje stvaranju alveola i na taj način dolazi do povećanja

površine zadužene za razmenu gasova (102). Postnatalno sazrevanje pluća se dalje nastavlja kroz stadijume alveolarizacije i mikrovaskularne maturacije (103).

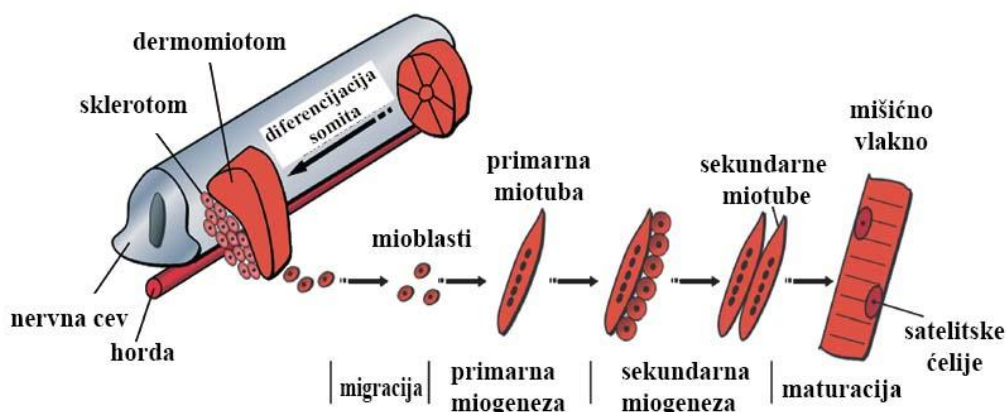
Kod zamorca tkivo plućnog parenhima je izuzetno krhko. Unutar parenhima nedostaje vezivno tkivo pa nema intralobularnih septi niti sekundarnih pojedinačnih lobulacija. Glatki mišić unutar bronhija je najprominentiji kod zamoraca u odnosu na druge vrste, a mišićna vlakna su spiralno postavljena, te zahvaljujući tome bronhije se mogu znatno više zatvoriti (104).

Zamorac se godinama koristi kao model u izučavanju oštećenja plućnog parenhima, astme, hipereaktivnosti, kao i u izučavanju štetnosti brojnih inhalatornih agenasa (virusa, bioloških agenasa, hemijskih sredstava). Brojni nalazi iz ovih studija su ekstrapolirani na čoveka i njihov uticaj na zdravlje.

1.6. Razviće skeletnih (poprečno-prugastih) mišića

Skeletni mišići su mezodermalnog porekla. Razvijaju se iz paraksijalnog mezoderma, kao i aksijalni skelet i dermis kože (86). Paraksijalni mezoderm, sa obe strane neuralne tube i notohorde, počinje progresivno da se segmentiše u parne kružne formacije-somitomere (**Slika 15**). Somitomere se prvo pojavljuju u kranijalnom delu ploda i od prvih sedam somitomera nastaje skeletni mišići glave i vrata. Od osme somitomere pa do kaudalnog dela ploda somitomere se segmentišu u somite koji predstavljaju kondenzate primitivnih mezenihmalnih ćelija. Kod čoveka prvi somiti se pojavljuju oko 20. embrionalnog dana, a do 30. dana bude formirano 42-44 para somita (86). Mezoderm somita se u četvrtoj nedelji gestacije deli na: ventromedijalni deo – sklerotom (od koga će nastati kičmeni pršljenovi i rebra) i lateralni deo – dermomiotom. Ovako nastali dermomiotom je multipotentan i od njega će se razviti skeletni mišići, dermis kože, multilokularno masno tkivo kao i glatki mišić krvnih sudova (86, 105, 106).

Dermomiotom se deli na hipoksijalni i epaksijalni dermomiotom. Unutar somita se delaminacijom ćelija sa krajeva dermomiotoma formira miotom (**Slika 14**). I to prvo u epiaksijalnom dermomiotomu (koji će dati leđne mišiće), pa tek u hipoaksijalnom domenu od koga će nastati međurebarna, abdominalan i muskulatura udova (107).



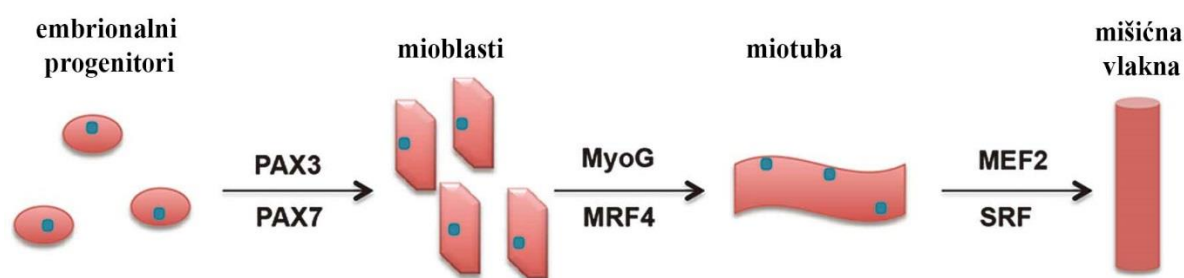
Slika 14. Šematski prikaz razvoja skeletnih mišića kod kičmenjaka (Preuzeto i modificirano iz: Charrasse S, Causeret M, Comunale F, Bonet-Kerrache A, Gauthier-Rouvière C. *Rho GTPases and cadherin-based cell adhesion in skeletal muscle development. J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(4):311-5.)

Kako su somiti u početku epitelne strukture daljim razvojem ploda centralni delovi dermomiota prolaze kroz proces epitelno-mezenhimalne transformacije u toku koga nastaju progenitorne mišićne ćelije. Naime, tokom rane embriogeneze mezenhimalne ćelije se diferenciraju u pre-mioblaste, od koji će nastati mioblasti (**Slika 14**). Mioblastne ćelije su vretenastog oblika sa centralno postavljenim ovalnim jedrom i prominentnim jedarcima. Citoplazma ovih ćelija je granularna i u njoj se uočava prisustvo miofilamenata i desmina (108). U sedmoj nedelji gestacije spajanjem više mioblastnih ćelija nastaju mišićni tubuli (*myotubes*) koji će se kasnije diferencirati u mišićna vlakna.

Tokom razvoja postoje dva tipa mišićnih tubula: primarni mišićni tubuli koji nastaju kao rezultat spajanja više mioblastnih ćelija, i generacija sekundarnih miotubula kojima predhodno formirani primarni miotubuli predstavljaju osnov za nastanak (108, 109.).

Primarne mišićni tubuli nastaju spajanjem krajava dva mioblasta. Na poprečnom preseku jedro je centralno postavljeno sa malo citoplazme i mofibrila periferno postavljenih. Na ovaj način se određuje dužina mišićnog vlakna. Drugi deo procesa, koji se kod ljudi odvija između 11-15. nedelje gestacije) se odnosi na spajanje predhodno opisanog mišićnog tubula sa mioblastima *side by side*. Početkom drugog trimestra dolazi do formiranja sekundarnih miotubula koji u fiziološkom smislu postaju kontraktilni, a njih histološki karakterišu i dalje centralno postavljena jedra. Kasnijim sazrevanjem miotubula u mišićna vlakna broj se sve više povećava, poprečna ispruganost je u citoplazmi uočljiva i sve više ćelija ima jedra postavljena na periferiji, dok se na rođenju u malom procentu (u oko 5% vlakana) može i dalje uočiti centralna lokalizacija jedra (109).

Do sada su poznati brojni faktori koji su zaduženi za regulaciju miogeneze (**Slika 15**). Od velikog značaja za početak ovog procesa je aktivacija Myf5 faktora u novoformiranim somitima. U ovaj proces uključeni su i PAX3 i PAX7, zatim MyoD, kao i one zadužene za diferencijaciju kao što su MyoG (miogenin), Mrf4 i Mef2 (110).



Slika 15. Molekularna regulacija miogeneze - šematski prikaz: Tokom miogeneze, PAX3 i PAX7 se inicijalno aktiviraju u embrionalnim progenitorima. Sa kontinuiranim razvojem embriona, određene embrionalne progenitorske ćelije se diferenciraju u ćelije prekursora mišića koje se nazivaju mioblasti. Kako mioblasti migriraju, eksprimiraju se MioG i MRF4, koji stimulišu mioblaste da se diferenciraju u miotube. Oni zatim deluju sa MEF2 i SRF kako bi aktivirali gene odgovorne za arhitektoniku i funkcionalnost mišićnih vlakana. (*Preuzeto i modificovano iz: Ju H, Yang Y, Sheng A, Jiang X. Role of microRNAs in skeletal muscle development and rhabdomyosarcoma. Mol Med Rep. Jun 1;11(6):4019-24.*)

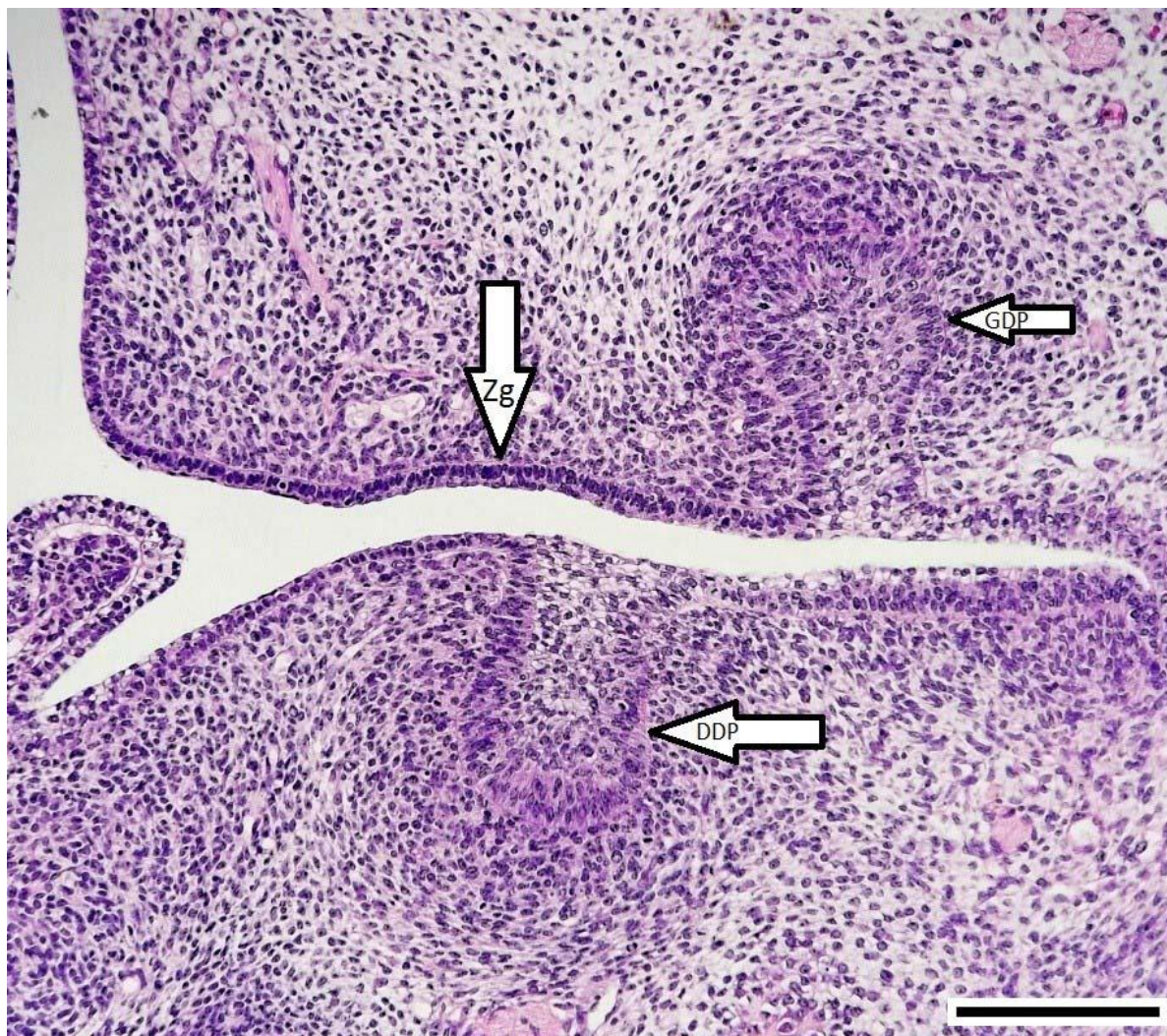
Fetalni period je krucijalan za razvoj skeletnih mišića jer nakon rođenja nema povećanja broja mišićnih vlakana. Tokom života povećanje mišića je rezultat isključivo povećanja dijametra mišićnih vlakana (111).

1.7. Razvoj zuba - denticija glodara, sličnosti i razlike

Istraživanje je sprovedeno na zamorcima te važno je napomenuti sličnosti i razlike između denticije čoveka i glodara. Kod većine sisara postoje dve denticije: mlečna i stalna (112), a kod glodara, samim tim i zamorca, postoji jedna jedinstvena (stalna) denticija (113).

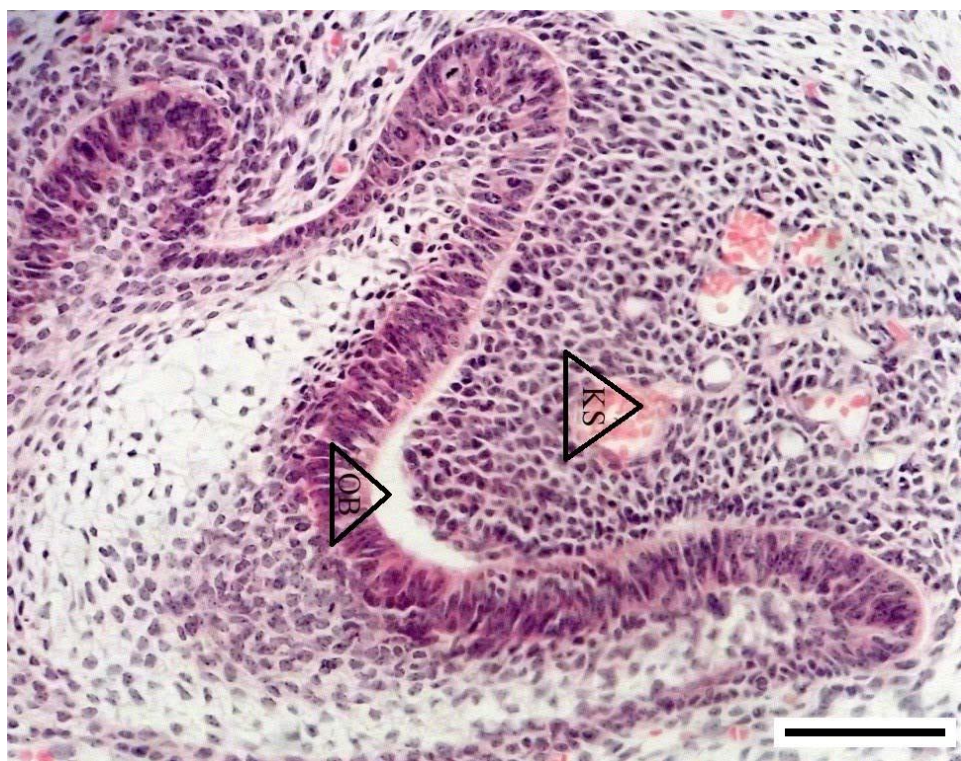
Prvi morfološki znaci razvoja zuba kod miša se uočavaju 11. dana embrionalnog razvića, formiranjem zubne gredice (114). Kod čoveka formiranje zubne gredice se dešava u 6-oj nedelji embrionalnog razvića (115). Nakon potpunog formiranja, gređica zadebljava i vide se prvi zametci zuba koji su sad u stadijumu pupoljka. Kod miša, se ove strukture pojavljuju u 13-om danu embrionalnog razvoja, kod čoveka u 8-oj nedelji embrionalnog razvoja. Na našem eksperimentalnom modelu utvrđeno je da se pojava prvih zametaka kod zamorca uočava 25-og dana embrionalnog razvića. Kod čoveka se tokom ovog stadijuma od zubne gređice odvaja pomoćna zubna gređica, koja će dati zametke za razvoj stalnih zuba. Kod miša i zamorca ne postoji pomoćna zubna gređica jer nemaju stalne zube (114-116).

Kod čoveka, pupoljak se postepeno uvećava i prelazi u stadijum kape u 10-oj nedelji embrionalnog razvića. Epitelne ćelije postaju spoljašnji i unutrašnji gleđni epitel, a mezenhim formira zubnu papile koja će kasnije postati zubna pulpa. Sve navedeno čini gleđni organ. Isti procesi se vide i kod druge dve vrste, kod miša 14-og dana embrionalnog razvoja, a kod zamorca oko 25-og dana embrionalnog razvoja (**Slika 16**).

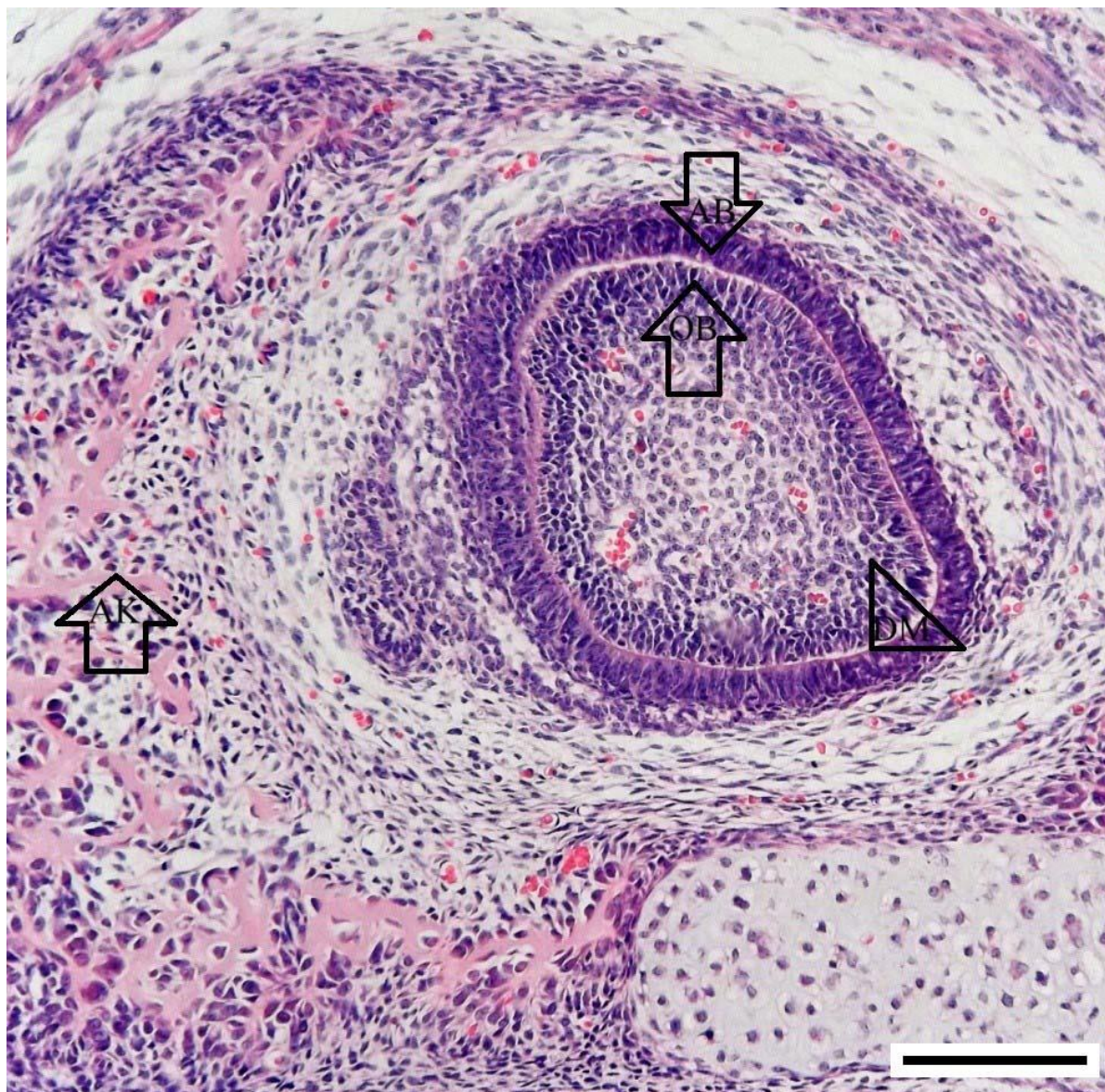


Slika 16. Histološke karakteristike sekutića zamorca 25. dana embrionalnog razvika: Gornji dentalni pupoljak-GDP; zubna gredica-ZG; donji dentalni pupoljak-DDP; HE, x200, *scale bar* 200 μm .

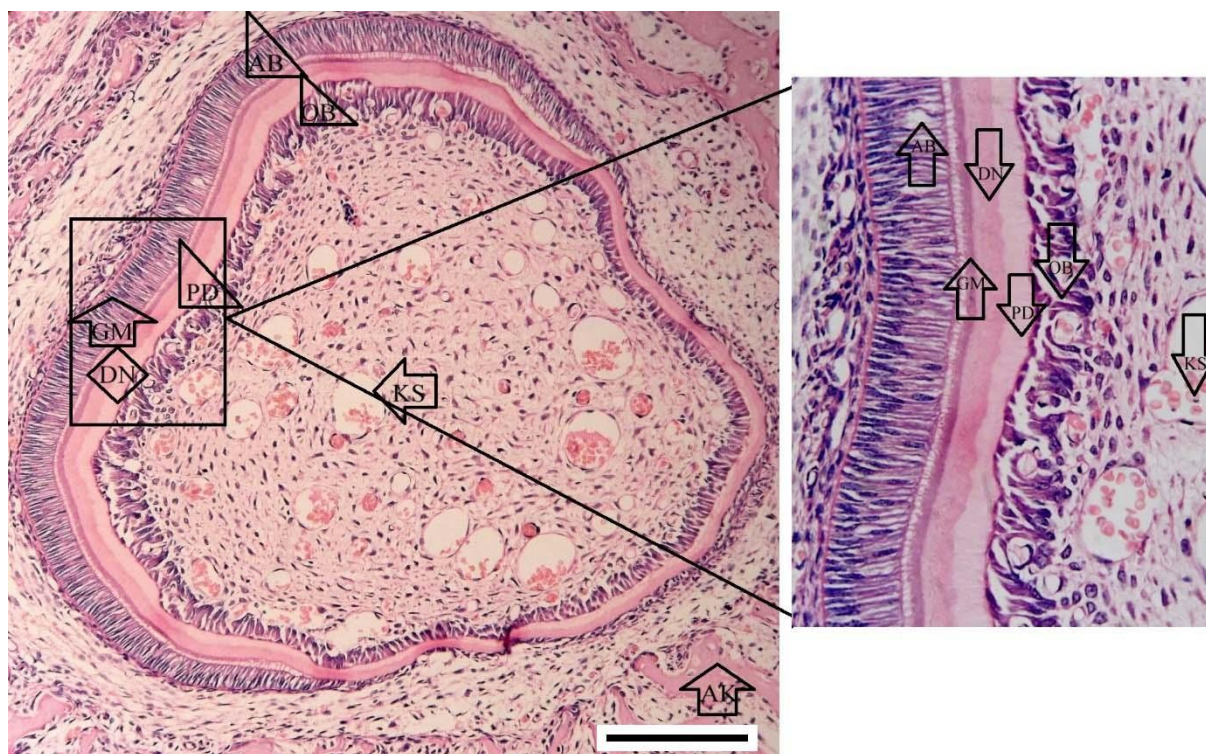
U daljem razvoju zubne papile i glednog organa zub ulazi u stadijum zvona, a potom se potpuno formira zub i tvrda tkiva mineralizuju. Kod čoveka to počinje 14-e nedelje, kod miša 17-og i 18-og dana, a kod zamoraca oko 30-og dana embrionalnog razvoja do rođenja (**Slika 17**). U ovom periodu dolazi do morfoloških promena na ćelijama koje formiraju tvrda zubna tkiva, kao i njegove potporne strukture, a zub postepeno dobija njegov konačan oblik (**Slika 18 i 19**).



Slika 17. Histološke karakteristike donjeg sekutića 30. dana embrionalnog razvika zamorca: krvni sud-KS; odontoblast-OB; HE, x400, scale bar 100 μ m.



Slika 18. Donji sekutić 35. dana embrionalnog razvića zamorca: ameloblast – AB; odontoblast – OB; dentinski matriks – DM; alveolarna kost – AK; HE, x200, *scale bar* 200 μm .



Slika 19. Donji sekutić zamorca 40. dana embrionalnog razvoja: ameloblast – AB; odontoblast – OB; gleđni matriks – GM; dentin – DN; predentin – PD; krvni sudovi – KS; alveolarna kost –AK; HE, x400, *scale bar* 100 μ m.

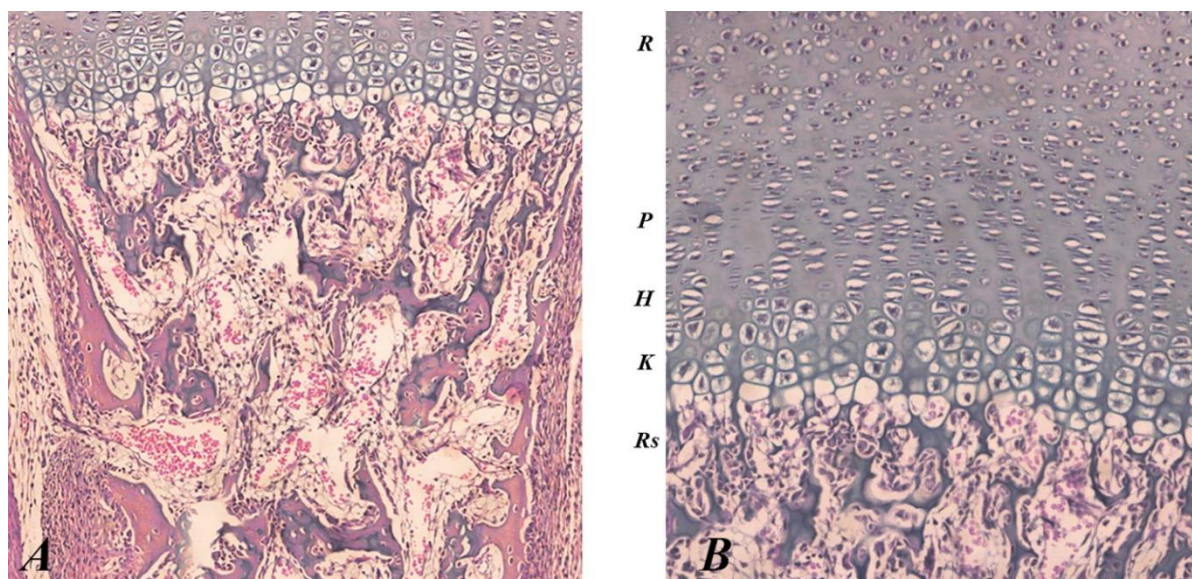
Denticija glodara sadrži tri para molara i jedan par sekutića po vilici, dok je kod ljudi taj broj značajno veći: u jednom kvadrantu su 2 sekutića, 1 očnjak, 2 premolara i 3 molara. Dakle 20 zametaka za mlečne i 32 zametka za stalne zube. Na poziciji gde se ljudima nalaze lateralni sekutići, očnjaci i premolari nalazi se dijastema (116).

1.8. Razviće koštanog tkiva

Histogeneza koštanog tkiva se odvija kroz dva procesa: enhondralne (indirektne) osifikacije i intramembranske (direktne) osifikacije. Podela je uslovljena mehanizmom nastanka koštanog tkiva. Naime, pljosnate kosti nastaju u procesu intramembranskog okoštavanja, a tokom ovog procesa koštano tkivo nastaje direktno od mezenhima. Duge kosti nastaju procesom enhondralne osifikacije, odnosno mezenhim se prvo diferentuje u hijalinu hrskavicu, a na taj način nastaje minijaturni hrskavičavi model budućih kostiju. U narednoj etapi hrskavica degenerise/propada a na njenom mestu i po hrskavičavom modelu formira se definitivna kost od koštanog tkiva (1, 117).

Sam proces okoštavanja prvo počinje u dijafizama, iz primarnog osifikacionog centra (**Slika 20**), šireći se ka epifizama kosti. U epifizama okoštavanje započinje kasnije, a novoformirani osifikacioni centar se naziva sekundarnim (epifiznim). U epifiznoj ploči rasta, u procesu enhondralnog okoštavanja, hondrociti neprekidno stvaraju hrskavičavi matriks koji se zamenjuje koštanim tkivom. Ovakav proces je istovetan kod miša, pacova i čoveka, a može se posmatrati kroz 5 zona prikazanih i opisanih na **Slici 20**. Na ovaj način kost raste u dužinu (1, 117).

Završetak izduživanja kosti histomorfološki odgovara osifikaciji epifiza što se kod miša dešava u 3 mesecu života odnosno u 6 mesecu života kod pacova. Kod čoveka okoštavanje epifize počinje posle rođenja, epifizna ploča okoštava u proseku između 17 i 21 godine života (1,117).



Slika 20. Proces enhondralnog okoštavanja: A) Primarni osifikacioni centar: Koštana manžetna na periferiji, probijena vaskularnim pupoljkom i mešana ostrvca kalcifikovanog osteoida i ispodležeće hrskavice, centralno. **B)** Epifizna ploča rasta: R) zona rezervne hrskavice – sadrži pojedinačne hondroците koji retko proliferišu i minimalne su metaboličke aktivnosti i sekreceije matriksa; P) zona proliferacije - hondroцити su značajnije proliferativne aktivnosti, obrazujući tako kolumne hondroцита. Nešto su krupniji i aktivno sekretuju komponente hrskavičavog matriksa; H) zona hipertrofije - jako uvećani hondroцити koji uz sekreciju matriksa, sintetišu i VEGF, ALP i kolagen tip XI; K) zona kalcifikacije - ALP doprinosi kalcifikaciji hrskavičavog matriksa, a hondroцити podležu apoptozi; Rs) zona resorpcije – dolazi do resorpcijom kalcifikovane hrskavice, ostavljajući manja uzdužna ostrvca hrskavice. Upravo ova ostrvca služe kao osnov za depoziciju osteoida i naknadnu kalcifikaciju; *Alcian blue/alizarin red*, x200.

1.8.1. Anatomija ekstremiteta zamoraca

Kosti prednjeg ekstremiteta su: humerus, radijus, ulna, 8 karpalnih kostiju, 4 metakarpalne kosti i po 3 falange za svaku metakarpalnu kost, osim četvrte, koju distalno nastavljaju 2 falange. Dugim kostima prednjih udova, pridodato je i 9 sezmoidnih kostiju (118).

Zadnji ekstremitet izgrađuju: femur, tibia, fibula, 7 tarzalnih kostiju, 3 metatarzalne kosti i za svaku metatarzalnu kost po 3 falange. Zadnji ekstremiteti broje 8 sezmoidnih kostiju (118).

1.8.2. Enhondralno okoštavanje kod zamoraca

Formirani hrskavičavi model dugih kostiju prednjih i zadnjih udova, uočen je 23. dana gestacije. Primarni osifikacioni centar prvo se javlja na zadnjim ekstremitetima, takođe uočen 23-eg dana, a jasni znaci enhondralnog okoštavanja u oba ekstremiteta su primećeni 33-eg dana gestacije (119). Sekundarni centar osifikacije razvija se prenatalno, i može se uočiti 43-eg dana gestacije. Praćenje hronologije enhondralnog okoštavanja došlo se do zaključka da 13-og dana gestacije udovi nisu bili razvijeni. Već 23-eg dana dokazano je postojanje hrskavičavog modela, deset dana nakon toga (33-eg dana) primećen je početak osifikacije na svim kostima izuzev: karpalnih, metakarpalnih, tarzalnih, metatarzalnih kostiju i falangi. Oko 43-og dana kosti proksimalno od *karpusa/tarzusa* su kompletno osifikovale, dok distalni red karpalnih kostiju, metakarpalne, tarzalne, metatarzalne kosti i falange pokazuju početak okoštavanja. Udovi su upotpunosti okoštali 53-eg dana (119).

2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi sprovedenog istraživanja su:

1. Ispitati i kvantifikovati histomorfološke i imunohistohemijske karakteristike tkiva bubrega, pluća, zuba, kosti, mišića, velikog i malog mozga i placente zamorca u svim ispitivanim grupama i utvrditi postojanje razlika između kontrolne i obe eksperimentalne grupe, kao i između samih eksperimentalnih grupa.
2. Odrediti količinu hidroksprolina u tkivu bubrega, pluća, poprečno-prugastog mišića, zuba, kosti, hrskavice, velikog i malog mozga, srca, slezine, tankog creva, placente i plodovih ovojaka u svim ispitivanim grupama i utvrditi postojanje razlika između kontrolne i obe eksperimentalne grupe, kao i između samih eksperimentalnih grupa.
3. Odrediti stepen eksprimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u tkivu bubrega, pluća, poprečno-prugastog mišića, zuba, kosti, velikog i malog mozga zamorca u svim analiziranim grupama i utvrditi postojanje razlika između kontrolne i obe eksperimentalne grupe, kao i između samih eksperimentalnih grupa.

Hipoteze sprovedenog istraživanja su:

1. Prenatalni deficita vitamina C kod zamoraca ima uticaja na histomorfološke i imunohistohemijske karakteristike ispitivanih tkiva (bubreg, pluća, zub, kost, mišić, mozak i placenta) koji se ogleda u razlikama između kontrolne i obe eksperimentalne grupe, kao i između samih eksperimentalnih grupa.
2. Prenatalni deficita vitamina C kod zamoraca dovodi do razlika u koncentraciji hidroksiprolina u ispitivanim tkivu bubrega, pluća, zuba, kosti, mišića, mozga i placentu u eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolnom kao i do razlika između samih eksperimentalnih grupa.
3. Prenatalni deficita vitamina C kod zamoraca dovodi do razlika u eksprimiranosti *Coll1*, *Coll4a1*, i *Slc23a1* gena u tkivu bubrega, pluća, zuba, kosti, mišića, mozga i placentu u eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolnom kao i do razlika između samih eksperimentalnih grupa.

3. MATERIЈAL I METODE

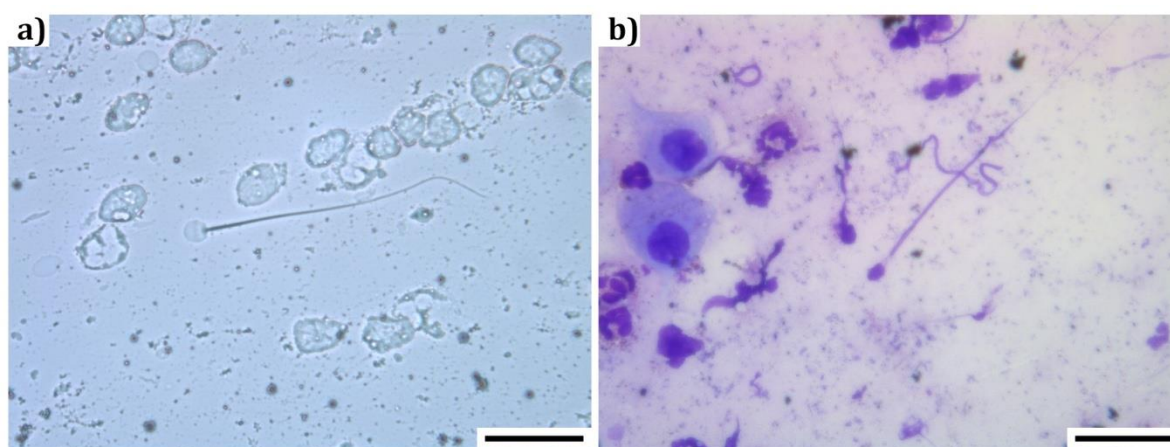
3.1. Dizajn eksperimenta i eksperimentalne životinje

U studiji su korišćene zdrave skotne ženke albino zamoraca (*Cavia porcellus*) iz okota Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“. Tokom trajanja eksperimenta životinje su uzgajane u vivarijumu Zavoda za antirabičnu zaštitu - Pasterovog zavoda u Novom Sadu. Životinje su držane u koritima po sistemu harema (jedan mužijak i tri ili četiri ženke) pri standardnim laboratorijskim uslovima, što podrazumeva 14h svetla i 10h mraka i temperaturu od $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Životinje su imale *ad libitum* pristup hrani i vodi. Dobijale su peletiranu hranu, deklarisanog sastava (**Tabela 5**). Sve eksperimente je odobrio Etički komitet, Univerziteta u Novom Sadu (EK: III-2013-02 i EK: I-2017-01).

Tabela 5. Sastav peletirane hrane korišćene u ogledu

	količina		količina
Vlaga [%]	13,5	Jod (J)	1,0 mg
Sirovi protein [%]	18,5	Selen (Se)	0,21 mg
Vlknaste materije [%]	maks. 12,0	Vitamin A	24 000 IU
Pepeo [%]	maks. 7 0	Vitamin D3	min 3 000 IU
Fosfor (P) [%]	maks. 1:15-1:25	Vitamin E	80 mg
Kalcijum (Ca)	0,6- 7 mg	Vitamin B2	min. 12 mg
Cink (Zn)	0,1 mg	Bakar (Cu)	3 mg
Gvožđe (Fe)	30 mg	Vitamin C	<2,5 mg/kg

Kako estrusni ciklus kod ženki zamorca traje oko 25-27 dana i on obuhvata period od oko 18 dana, kada je ulaz u vaginu zaptiven sluznim čepom, i period koji sledi obično iznosi 5-8 dana u kome je sluzni čep resorbovan kada je i moguće da dođe do oplodjenja (50). Svaki dan tokom ovog perioda uzimani su vaginalni brisevi uz pomoć štapića na kome se nalazi sterilna vata koja će biti natopljena fiziološkim rastvorom. Nalaz spermatozoida u vaginalnom razmazu označavao je nulti dan gestacije odnosno prvi dan začeca jedinke (**Slika 21**).



Slika 21. Prisustvo spermatozoida u vaginalnom brisu ženke: a) nativni preparat; b) MGG; 400x, scale bar 100 µm.

Metodom slučajnog izbora ženke su podeljene u tri grupe: kontrolnu (*K*) sa sedam skotnih ženki ($n=7$), i dve eksperimentalne *E1* ($n=7$) i *E2* ($n=7$). U kontrolnoj grupi sve vreme trajanja eksperimenta do 50-og dana gestacije ženke su dobijale vodu obogaćenu vitaminom C (100 mg/kg, Vitamin C, Galenika), dok je u *E1* grupi 10-og dana gestacije ženkama ukinut vitamin C, a grupi *E2* 20. gestacijskog dana. Tako da je deprivacija vitaminom C trajala 30 dana za grupu *E2*, odnosno 40 dana za grupu *E1*. Na osnovu podataka u dosadašnjim studijama period od početka ukidanja vitamina C pa do pojave prvih simptoma deficita kod zamorca iznosi najmanje 3-4 nedelje, što je razlog odabira

dužine trajanja deprivacije od 30 (E2) i 40 (E1) dana (7,16). Svaka od ženki koja je tokom eksperimenta prevremeno izgubila trudnoću izostavljena je iz studije, a na njeno mesto je uvedena nova ženka pod istim uslovima do postizanja 7 ženki po grupi.

Tačno 50-og dana gestacije ženke su anestetizirane mešavinom za analgesedaciju, a plodovi izvađeni carskim rezom i odredila im se telesna masa. Od ukupno očekivanih 20 plodova po grupi polovina je korišćena za histološku analizu, a preostala polovina jedinki je upotrebljena za molekularne i biohemijske analize.

Za histološku analizu plodovi su podvrgnuti transkardijalnoj perfuzionoj fiksaciji nakon koje će se uzeti za analizu tkivo bubrega, pluća, mozga, kosti (i to *femur* zbog lakog pristupa prilikom preparisanja i poznatog načina okoštavanja), zuba (donji sekutić sa perialveolarnim tkivo jer ga sa sigurnošću možemo ispreparisati) i hrskavice (*processus xiphoideus* zbog poznate količine hrskavice). Tkiva će biti procesuirana po dole opisanoj histološkoj proceduri i obojena imunohistohemijskim markerima navedeni u tekstu ispod (sekcija 3.2.3.).

Za molekularnu i biohemijsku analizu nakon žrtvovanja uzeće se po 100 mg tkiva bubrega, pluća, mozga, kosti (*femur*), zuba (donji sekutić sa perialveolarnim tkivom) i hrskavice (*processus xiphoideus*) nakon čega će biti skladišteni -80°C do dalje analize.

3.2. Histološka obrada tkiva

3.2.1. Transkardijalna perfuziona fiksacija

Tačno 50-og dana gestacije ženke su anestezirane intraperitonealnom aplikacijom 0,5 ml/100 g radnog rastvora za analgosedaciju. Radni rastvora za analgosedaciju se dobija mešanjem 1,0 ml ketamina (100 mg/kg, Ketamidol, Richterpharma) sa 0,5 ml ksilazida (20 mg/kg, Xylased, Bioveta) i 8,5 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl, NATRII CHLORIDI INFUNDIBILE, Hemofarm). Plodovi su Carskim rezom izvađeni i fiksirani na radni stalak. Nakon fiksiranja plodova na radni stalak, otvoren im je grudni koš i uz pomoć specijalno dizajniranog infuzionog sistema izvršena je transkardijalna perfuziona fiksacija. Proces se vrši tako što se nakon uboda igle dimenzije 21 G u vrh srca, kroz arterijski sistem organizama tokom 3 minuta, propusti količina od 50 ml heparinizovanog fiziološkog rastvora. Istog trenutka biće presečena desna pretkomora iz koje će isticati u početku samo krv, a kasnije sa ispiranjem organizma čist fiziološki rastvor. Potom je kroz sistem pušten fiksativ i u narednih 10 minuta organizam je u potpunosti prožet fiksativom. Fiksativ se sastojao od 3% paraformaldehida i 3% glutaraldehida rastvorenog u 0,1 M kakodilatnom puferu (pH 7.4). Na svakih 100 ml pufera dodato je po 1,2 ml dimetilsulfoksida i 0,3 ml 1% CaCl₂.

3.2.2. Histološka obrada tkiva

Nakon perfuzione fiksacije od svake jedinice uzeti su uzorci tkiva bubrega, pluća, zuba, kosti, hrskavice i mozga plodova zamorca i dodatno pohranjeni u fiksativu, u frižideru na 4°C tokom 24h. Uzorci tkiva su dehidrirani rastućim koncentracijama etanola i uz pomoć konzole za kalupljenje kalupljeni u parafinske blokove. Potom su sečeni na mikrotomu (Sakura) pri debljini od 5 µm i bojani standardnim histološkim bojenjem hematoksilin i eozin (H&E).

3.2.3. Imunohistohemijsko bojenje preparata

Pored standardnog bojenja na uzorke tkiva primenjeno je i imunohistohemijsko bojenje. Za imunohistohemijsko bojenje tkiva korišćena su primarna antitela i to: anti-collagen IV (LabVision, MS-375-R7), anti CD31 (Abcam, ab182981), anti-Calbindin D28k (Swant), Anti-Ki67 (LabVision, PA5-19462), Anti MMP-9 (LabVision, RB-9234-R7), Anti SLC23A1(SVCT-1) (Cusabio, CSB-PA887038LA01HU), Anti Osteopontin (LabVision, RB-9097-R7), Anti SMA (RB-9010-R7). Nakon rehidratacije isečaka, sprovela se „retrival“ reakcija koja podrazumeva zagrevanje isečaka u odgovarajućem puferu na 850 W u mikrotalasnoj peći tokom 20 minuta, nakon čega su se na temperaturi od 25°C preparati hladiti u trajanju od 30 minuta. Po završetku hlađenja isečci su isprani četiri puta u puferu (TBS, pH 7,4) i inkubirani 2 sata sa 10% normalnim kozijim serumom radi blokiranja nespecifičnog bojenja. Nakon toga na preparate je aplikovano primarno antitelo, a pločice su ostavljene u frižideru na 4°C preko noći. Sledećeg dana preparati su, na temperaturi od 25°C, inkubirani 15 minuta sa 0,3% H₂O₂ radi eliminisanja aktivnosti endogene peroksidaze, a zatim 1 sat sa HRP (*horseradish peroxidase*) konjugovanim sekundarnim antitelom. Kao hromogen za obeležavanje antitela koristio se 3, 3' diaminobenzidin - DAB hromogen (Abcam, ab64238). Kao kontrastna boja primeniće se Majerov hematoksilin, a preparati nakon bojenja su montirani upotrebom DPX adheziva (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Preparati su analizirani na mikroskopu marke Leica DMLB 100T i fotografisani sa kamerom (Leica MC 190 HD), fotografije dalje analizirane uz pomoć kompjuterskih softvera *Fiji* i *QuPath*.

3.3. Određivanje količine hidroksiprolina

U uzorcima tkiva koncentracija hidroksiprolina je određena pomoću modifikovane Hofmanove metode (120). Metoda je zasnovana na oksidaciji hidroksiprolina iz hidrolizata tkiva, a tako nastalo jedinjenje sa p-dimetilaminobenzaldehidom obrazuje obojeno jedinjenje čija se apsorbanca meri na 560 nm.

Protokol

Uzorci tkiva su do analize čuvani u zamrzivaču na temperaturi -80°C . Nakon odmrzavanja izmerena je masa uzoraka i u tubici od 1,5 ml pomoću klipa je izvršena homogenizacija tkiva sa adekvatnom količinom destilovane vode (na 10 mg tkiva dodato je 100 μl dH₂O). Tako dobijeni homogenat je prebačen u staklenu vialu, gde je na 100 μl homogenata dodato 100 μl koncentrovane hlorovodonične kiseline (12 M HCl, Panreac AppliChem). Viala je, pomoću krimpera, zatvorena aluminijsumskim čepom sa septom i u termobloku je vršena hidroliza uzoraka u trajanju od 3h, na 120°C . Nakon hidrolize dobijeni hidrolizat je prenet u ependorficu od 1,5 ml i centrifugiran 3 min na 10 000 g.

Potom je po 10 μl hidrolizata, iz supernatanta, preneto u bunariće mikrotitar ploče (96 well plate-a). Ploče su dok tečnost ne upari zagrevane u pećnici na temperaturi od 60°C , nako čega je u svaki bunarić radi oksidacije dodato po 100 μl puferisanog Hloramin T reagensa (1,27 g Hloramina T (JT Baker, Deventer, Holandija)) se rastvori u 20 ml dH₂O, a onda razblaži sa 30 ml n-propanolola (Lach:ner, Neratovice, Češka) i 50 ml acetat-citrat pufera (pH 6); pravi se uvek svež neposredno pre upotrebe i inkubirano 5 min na RT. Nakon završetka inkubacionog perioda u bunariće se doda po 50 μl perhlorne kiseline (JT Baker, Deventer, Holandija) i inkubira 5 min na RT.

Nakon čega se 50 μ l reagensa za razvijanje boje - 20% DMAB reagensa (pravi se uvek svež, neposredno pre upotrebe, rastvranjem p-dimethylaminobenzaldehyde (Lach:ner, Neratovice, Češka) u n-propanololu (Lach:ner, Neratovice, Češka)) i inkubira 90 min na 60°C. Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 560 nm na čitaču za mikrotitar ploče (MultiSkan FC, Thermo Scientific). Za svaki uzorak tkiva analiza je rađena u triplikatu, a dobijeni rezultat predstavlja količinu hidroksprolina (μ g) u odnosu na težinu ispitivanog tkiva (μ g hidroksprolina / mg analiziranog tkiva).

3.4. Analiza genske ekspresije

3.5.1. Izolacija RNK

Izvori informacione RNK za analizu su bili adekvatno uzorkovana tkiva bubrega, pluća, zuba, kosti, hrskavice i mozga za sve tri eksperimentalne grupe. Kako bi izolovali RNK uzorci tkiva su lizirani trizolom (TRIzol Reagent, Invitrogen, USA), i to tako što se na 100 mg tkiva doda 1 ml trizola. Tokom lize tkivo je homogenizovano u tubicama klipom/homogenizerom. Tečna i organska faza su razdvojene dodavanjem 0,2 ml hloroforma (Zorka, Šabac) u homogenat. Nakon dodavanja hloroforma tubice su promućkane invertovanjem (okretanjem) 15 sekundi, a potom su inkubirane 2 - 3 minuta na temperaturi od 25°C. Zatim centrifugirane 5 minuta na 12 000 g, na +4°C, a izdvojeni supernatant (koji sadrži RNK) prenet u nove DNAsa-RNAsa free tubice. Na supernatant je dodato 0,5 ml izopropil alkohola (Lach:ner, Neratovice, Češka) kako bi se istaložila RNK. Tubice su inkubirane još 10 minuta na temperaturi od 25°C, pa centrifugirane na 12 000 g, 10 minuta na +4°C. Pipetom je uklonjen supernatant, a RNK koja je ostala kao talog isprana je sa 1 ml 75% etanola (pravi se rastvaranjem apsolutnog etanola u DEPC H₂O) vrtloženjem 5 - 10 s, pa centrifugiranjem na 7 500 g, 10 minuta na +4°C. Potom je uklonjen supernatant, a ono malo etanola što je ostalo upareno je u suvom kupatilu na 30 °C. Tako dobijena RNK rastvorena je u 40-50 µl DEPC H₂O (Ambion, Austin, USA). Radi eliminacije zaostale genomske DNK, urađen je prema uputstvu proizvođača tretman DNA-zom upotrebom Turbo DNA-free™ Kit (Ambion, Austin, USA). Nakon toga je, uz pomoć aparata Qubit 3 fluorimetra (Invitrogen) i adekvatanog kita za RNK (Qubit RNA Broad Range Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), izmerena koncentracija izolovane RNK.

3.5.2. Reakcija reverzne transkripcije

Pošto ovako izolovani molekuli RNK ne mogu da služe kao matrica za PCR (jer Taq polimeraza koristi isključivo jednolančani molekul DNK kao matricu), procesom reverzne transkripcije izolovana iRNK se pretvara u komplementarni DNK lanac (cDNK). Za reakciju reverzne transkripcije korišćen je kit za reverznu transkripciju (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA) i RNasa inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, USA). Količina RNK koja se koristi za ovaj kit mora da bude između 100 ng i 2 µg po reakciji. Ukupan volumen jedne reakcije treba da iznosi 20µl tako da bude 10 µl uzorka i 10 µl master mix-a (Master mix sadrži: 2 µl 10 x RT pufere, 0,8 µl 25 x dNTP Mix (100), 2 µl 10 RT prajmeri, 1 µl MultiScribe reverzna transkriptaza, 1 µl Rnase inhibitor i 3,2 µl Nuclease-free voda).

3.5.3. Relativna kvantifikacija iRNK u Real time PCR analizi

Real time PCR je modifikovana PCR reakcija u kojoj je moguće u „realnom vremenu“ (tj. nakon svakog ciklusa) pratiti amplifikaciju. Reakcija je izvedena na aparatu Real-Time PCR 7500 FST SYS-W/TWR (Applied Biosystems). U standardnim uslovima (50°C / 2 minuta, 95°C / 10 mininuta; i 40 ciklusa, od kojih je svaki bio pri 95°C /15 sekundi, a potom 60°C /1 minut). Specifični prajmeri koji će biti korišćeni su ranije dizajnirani a njihove sekvence su prikazane u **Tabeli 6**. Kao fluorescentna boja koristiće se SYBER Green, uz 2,5 µl cDNK produkta reakcije reverzne transkripcije (prethodno razblaženog) i odgovarajući master miks (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Svaki uzorak iz eksperimentalnih grupa biće rađen u duplikatu. Analiza i vizuelizacija dobijenih rezultata biće urađena u SDS softveru verzija 1.4 (Real-Time PCR 7500 FST, Applied Biosystems).

Tabela 6. Sekvence korišćenih prajmera u RQ PCR analizi

Gen	Sekvenca
Col1	F: ATGTCTAGGGTCTAGACATGTTCA R: CCTTGCCGTTGTGCGCAGACG
Col4a1	F:TATCTCTGGGGACAACATCCG R: R:CATCTCGCTTCTCTCTATGGTG
<i>Slc23A1</i>	F: TACCTGACATGCTTCAGTGG R: CGGCTGCCACCTTGTAAT

Napomena: Dizajniranje prajmera je vršeno pomoću *Primer Express* programa, a tačne sekvence gena dobijene su iz *NCBI* baze podataka.

3.5. Statistička obrada i analiza dobijenih rezultata

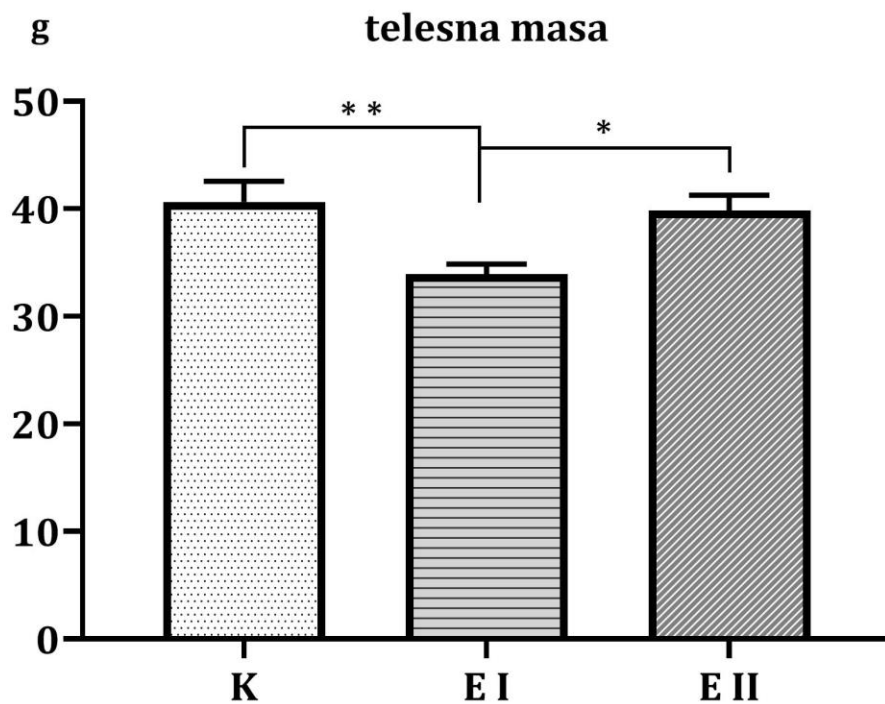
Analizirani rezultati su predstavljeni mikrofotografijama, grafički i tabelarno. Numerički rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm SEM$ od ukupnog broja životinja. Za statističku analizu korišćeni su *One-way ANOVA*. Sve analize su izvedene upotrebom softwera *IBM SPSS Statistics 23*. Za sve statističke analize kao kriterijum statističke značajnosti razlika uzeta je granica verovatnoće $p < 0,05$, odnosno $p < 0,001$.

4. REZULTATI

4.1. TOK EKSPERIMENTA I TELESNA MASA OGLEDNIH ŽIVOTINJA

U toku sprovedenja oglada zabeležena su dva pobačaja i jedan *exitus letalis*. Do pobačaja je došlo kod dve životinje iz grupe kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije, i to jedna ženka je pobacila 42-og dana, a druga 44-og dana gestacije. Letalni ishod je zabeležen kod ženke iz iste grupe, i to 35-og dana nakon ukidanja vitamina C, odnosno 45-og dana gestacije.

Nakon eutanazije skotnih ženki i uzorkovanja plodova, svim fetusima je određena telesna masa. Aritmetička sredina telesne mase fetusa u kontrolnoj grupi iznosi $40,62 \pm 1,93$ g, dok je u drugoj eksperimentalnoj grupi (E II) $39,28 \pm 1,44$ g, odnosno $33,91 \pm 0,92$ grama u prvoj eksperimentalnoj grupi (E I) kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije. Međusobnim poređenjem dobijenih rezultata primenom *ANOVA* statističkog testa utvrđeno je da visoka statistički značajna razlika aritmetičkih sredina telesne mase ploda postoji između kontrolne grupe i grupe E I ($p=0,009$), kao i između grupe E II i grupe E I ($p=0,041$). Razlika u tesnoj masi plodova iz kontrolne i druge eksperimentalne grupe nije dokazana (**Grafikon 1**).



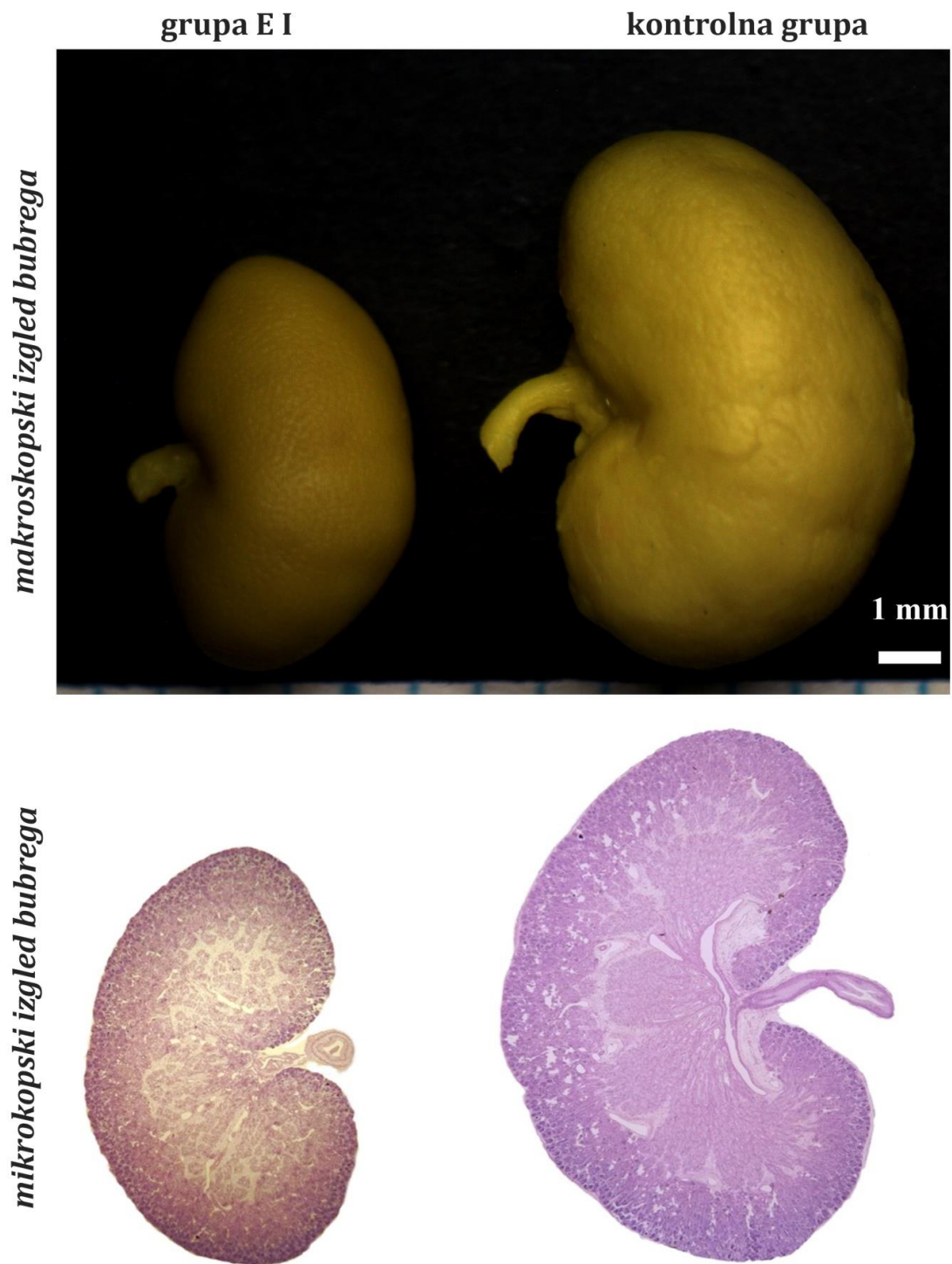
Grafikon 1. Efekti deprivacije vitamina C na tesnu masu fetusa životinja u kontrolnoj i eksperimentalnim grupama. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm SEM. Statistički značajna razlika prikazana je kao * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

4.2. HISTOLOLOŠKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANIH TKIVA

Kvantitativne karakteristike bubrega

Pored prethodno opisanih histomorfoloških karakteristika, uzorkovanim bubrezima kontrolne i obe eksperimentalne grupe izmerena je masa.

Makroskopskim pregledom uočava se da su bubrezi zamorca uobičajnog izgleda, pasuljastog oblika, sa jasnom razlikom u veličini bubrega između onih iz kontrolne i onih iz grupe E I (**Slika 22**). Bubrezi iz kontrolne grupe je znatno veći, prosečnih dimenzija 12 x 7 mm, dok su bubrezi iz E I grupe manji, prosečne dimenzije 6 x 4 mm. Na bubrezima iz sve tri eksperimentalne grupe jasno se uočavaju svi anatomske detalji i to: prednja i zadnja strana (*facies anterior et posterior*), dve ivice: spoljašnja ivica (*margo lateralis*) koja je ispupčena, i unutrašnja ivica (*margo medialis*) udubljena, kao i gornji i donji pol bubrega.



Slika 22. Makroskopski i mikroskopske karakteristike bubrega

Merenjem na analitičkoj vagi utvrđena je masa burega za sve tri eksperimentalne grupe (nakon dehidratacije, a pre kalupljenja), a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 7**. Bubrezi iz obe eksperimentalne grupe su skoro dvostruko lakši u odnosu na one iz kontrolne grupe. Statističkom analizom utvrđeno je postojanje visoke statistički značajne razlike u masi bubrega između kontrolne i E I grupe, kao i između kontrolne i grupe E II ($p < 0,001$). Međusobnim poređenjem E I i E II grupe takođe je dokazana statistički značajna razlika u analiziranom parametru ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Prosečna masa bubrega

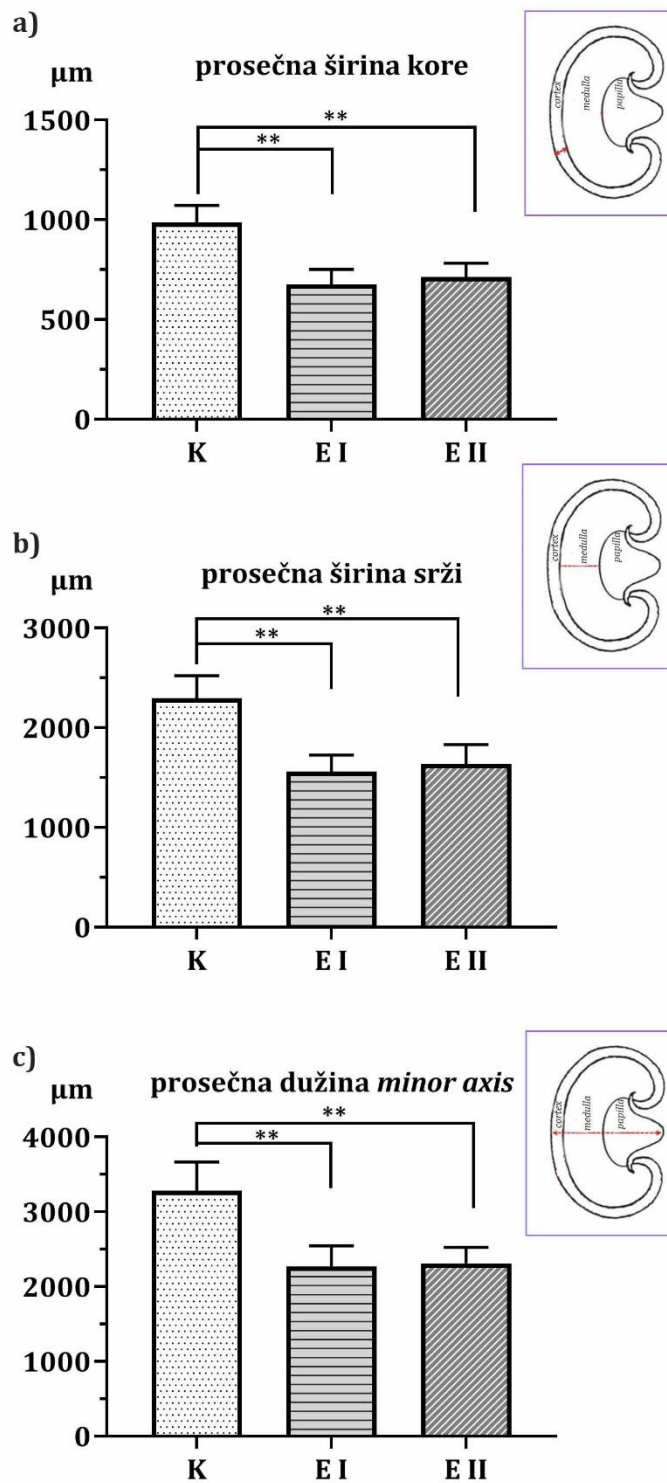
Eksperimentalna grupa	masa (g)
Kontrola	0,137±0,006
E2	0,077±0,005
E1	0,068±0,003

Za potrebna merenja svaki bubrež je presečen kroz karlicu duž svoje uzdužne ose. Isečci su fotografisani na uvećanju od 4x, a uz pomoć kompjuterskog programa *Fiji* na mikrofotografijama bubrežnog parenhima izmerena je širina kore i srži bubrežnog parenhima, kao i dužina manje ose (*minor axis*, deo od kapsule do papilarnog vrha)

Prosečna širina korteksa bubrega zamorca za kontrolnu grupu (K) iznosi $986.29 \pm 86,1 \mu\text{m}$, dok je za grupu E II $711.36 \pm 72,9 \mu\text{m}$, a za grupu E I je $675.17 \pm 75,7 \mu\text{m}$. Visoka statistički značajna razlika postoji između grupe E I i kontrolne, kao i grupe E II i kontrole ($p < 0,001$) (**Grafikon 2a**). Razlika u širini kore između grupa E I i E II nije statistički značajna ($p > 0,05$).

Deo tkiva bubrega koji na preseku odgovara srži, meduli, bubrega najveću širinu ima u kontrolnoj gupi, a najmanju u grupi kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije (grupa E I). Prosečna širina medule bubrega u kontrolnoj grupi (K) iznosi $2295,46 \pm 225,8 \mu\text{m}$, u grupi E I $1560,02 \pm 165,3 \mu\text{m}$, odnosno $1636,92 \pm 195,6 \mu\text{m}$ za bubrege grupe E II. Poređenjem dobijenih vrednosti utvrđeno je da između grupe K i E I, kao i između grupe K i grupe E II postoji visoka statistički značajna razlika za poređeni parameter ($p < 0,001$) (**Grafikon 2b**), dok između eksperimentalnih grupa (E I i E II) nema značajne razlike ($p > 0,05$).

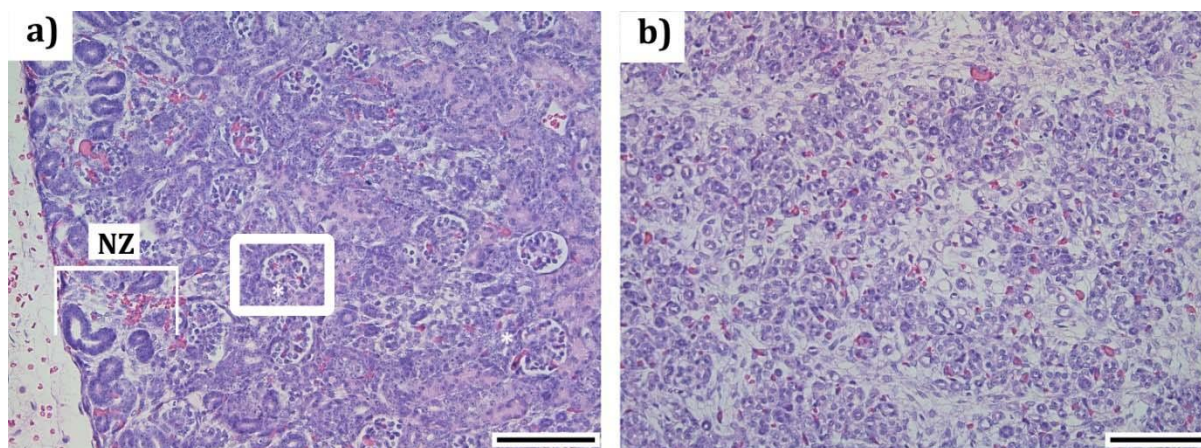
Dužina manje osovine (*minor axis-a*) bubrega u kontrolnoj grupi iznosi $3281,75 \pm 382,4 \mu\text{m}$, u grupi E1 $2271,382,4 \pm 277,0 \mu\text{m}$, a u grupi E2 $2312,095 \pm 209,2 \mu\text{m}$. Statističkom analizom dobijenih podataka utvrđeno je da između grupe K i E I, kao i između grupe K i grupe E II postoji visoka statistički značajna razlika za poređeni parameter ($p < 0,001$) (**Grafikon 2c**), dok između eksperimentalnih grupa (E I i E II) nema značajne razlike ($p > 0,05$).



Grafikon 2. Prikaz rezultata morfometrijske analize bubrežnog parenhima, * $p < 0,001$

4.2.1. Histomorfološke karakteristike bubrega

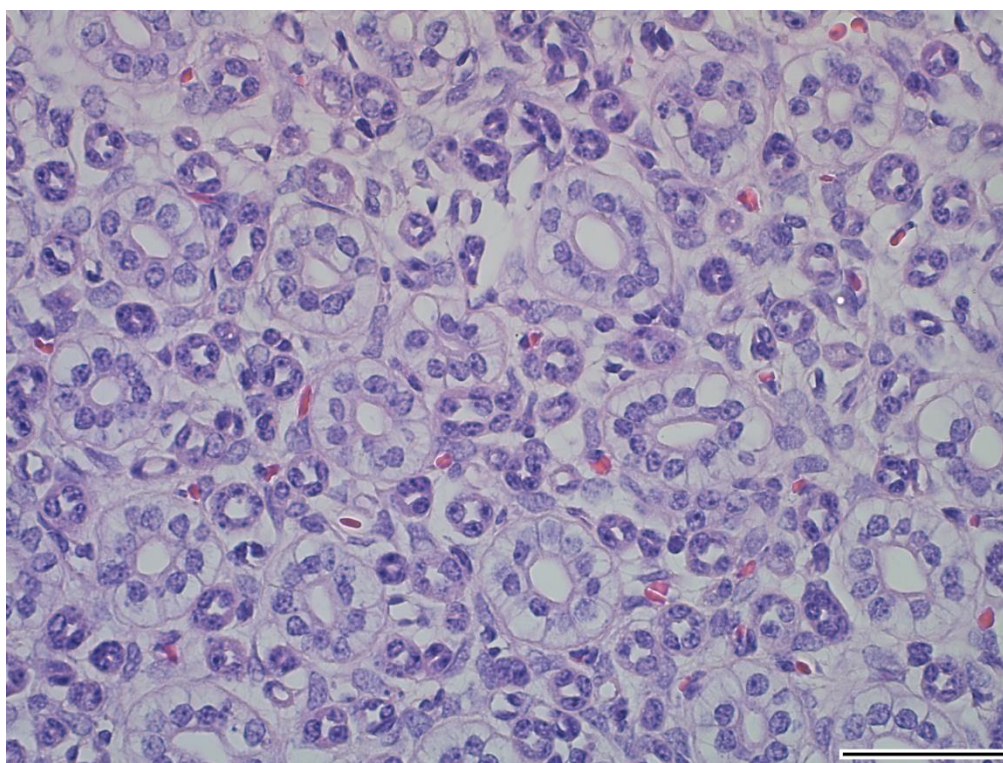
Kontrolna grupa (K) - Na preseku bubrežnog parenhima kod jedinki iz kontrolne grupe razlikuju se spolja postavljena kora (*cortex*) i središnje postavljena srž (*medulla*) bubrega. U spoljašnjoj zoni kore bubrega uočava se tanak sloj nefrogene zone (**Slika 23**). U ovom delu uočavaju se glomeruli u formi vezikule, zarez, S forme.



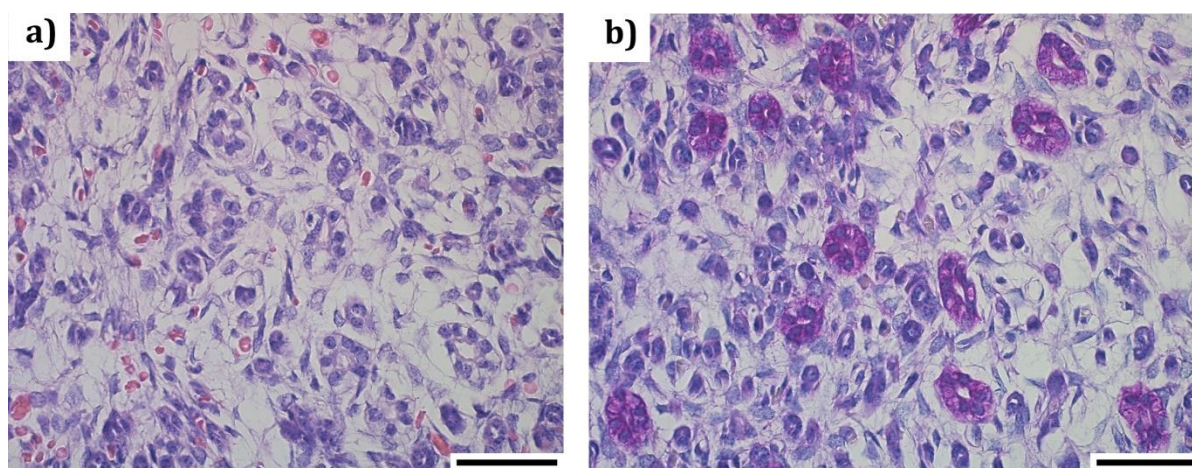
Slika 23. Mikrofotografija bubreg fetusa kontrolne grupe: a) *cortex*; b) *medulla*; NZ – nefrogena zona; uokvirena * zreli glomeruli; H&E, 200x, scale bar 200 μ m.

U delu kore postavljene neposredno uz nefrogenu zonu glomeruli su nezreli (sitniji, slabije razvijenog i nesegmentisanog kapilarnog klupka, obloženi podocitima kubičnog izgleda u skoro kontinuiranom sloju), dok se u delu kore bliže meduli uočavaju zreli glomeruli bubrega, sačinjeni iz kapilarnog klupka koje je okruženo dvolisnom Bowman-ovom kapsulom. Parijetalni list kapsule obložen je prostim pločastim epitelom, dok je visceralni list sačinjen od podocita, učestvuje u filtraciji primarne mokrace i blisko naleže na spoljasnjost kapilara glomerula. Između ova dva lista kapsule uočava se urinarni prostor u kome se sakuplja primarna mokraca. Na samom glomerulu/glomerularnom telascu moguće je razlikovati urinarni i vaskularni pol. U kori bubrega, između glomerula, uočavaju se tubuli nefrona obloženi prostim kockastim epitelom.

Na histološkom preseku unutar medule bubrega uočavaju se nezreli sabirni tubuli koji su obloženi cilindričnim ćelija, blede citoplazme i apikalno postavljenih jedara (**Slika 24**). Tubuli su oivičeni bazalnom membranom i međusobno odeljeni bogato vaskularizovanom mezenhimalnom stromom (**Slika 25a**). Na PAS bojenju na pojedinim sabirnim tubulima unutar citoplazme epitelnih ćelija uočavaju znatne količine PAS pozitivnih nakupina, verovatno glikogena (**Slika 25b**).

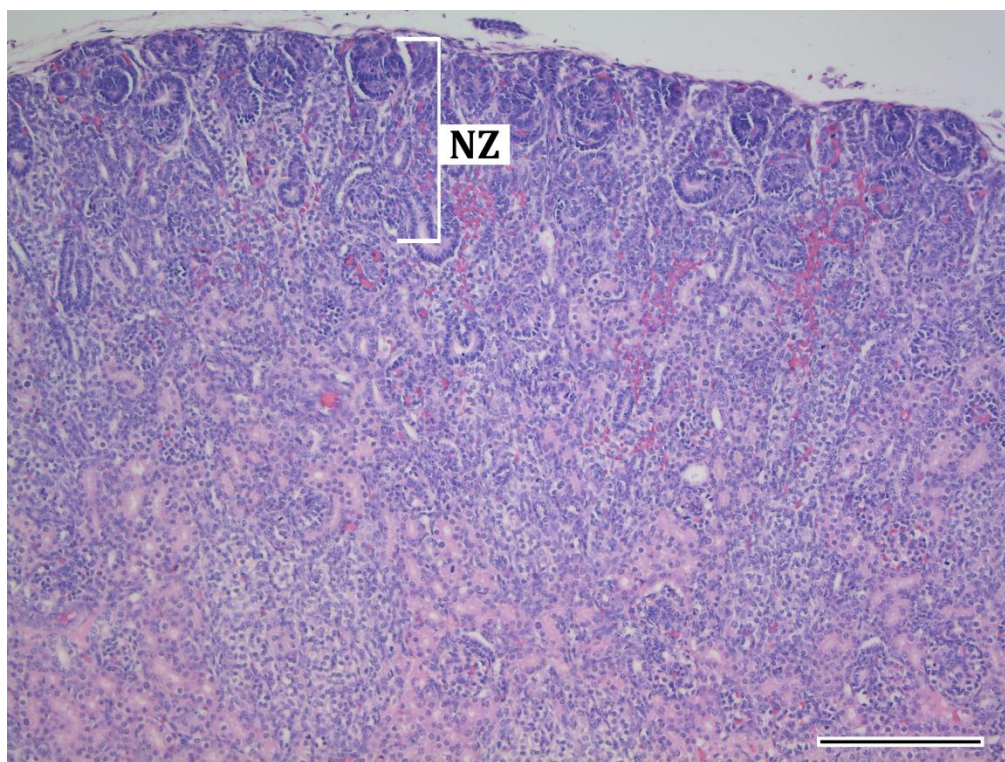


Slika 24. Mikrofotografija fetalnog bubrega kontrolne grupe - sabirni tubuli medule, H&E, 400x, scale bar 100 μ m



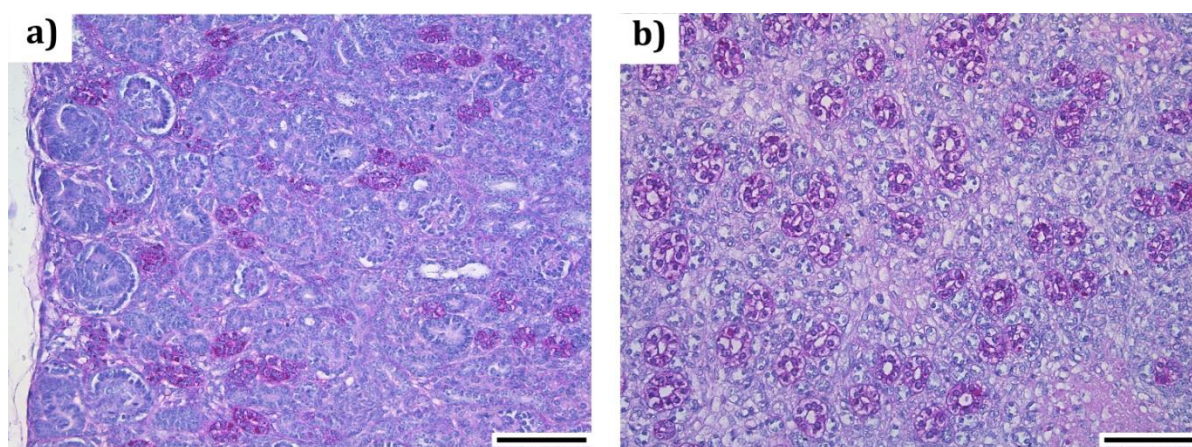
Slika 25. Mikrofotografija fetalnog bubrega kontrolne grupe - srž: a) H&E, 400x, b) PAS, 400x

Eksperimentalna grupa II (E II) - Mikroskopskom analizom histoloških preparata bubrega iz E II grupe u predelu korteksa bubrega uočava se znatno šira zona nefrogeneze (**Slika 26**). U ovom predelu uočavaju se bubrežni glomeruli u svim formama razvoja (vezikule, srpasta forma, S forma). U superficijelnom delu maturacione yone kore uočavaju se glomeruli u ranoj fazi razvoja, dok se u znatno užem delu jukstamedularnog dela maturacione yone kore, postavljene najbliže meduli, nalaze i zrele forme glomerula. Epitelne ćelije pojedinih bubrežnih tubula u zoni kore pokazuju intracitoplazmatske nakupine koje su PAS pozitivne (**Slika 26 a**).



Slika 26. Histološki prikaz kore bubrega fetasa iz E II grupe, H&E, 100x, scale bar 400 μ m; Legenda: NZ – nefrogena zona

Sabirni tubuli unutar medule su obloženi jednim redom cilindričnih ćelija koje naležu na bazalnu membranu. Unutar epitelnih ćelija sabirnih tubula uočava se bleđa citoplazma, i jedra koja su postavljena ka lumenu tubula (apikalno) (**Slika 27b**). Sabirni tubuli su međusobno razdvojeni obilnom količinom rastresite mezenhimalne strome. Unutar citoplazme epitelnih ćelija koje oblažu tubule u meduli bubrežnog parenhima uočava se manja akumulacija PAS pozitivnih nakupina poredeći sa kontrolnom grupom (**Slika 27b**).



Slika 27. Mikrofotografije fetalnog bubrega: prikaz PAS pozitivnih nakupina unutar tubula kore (a) i srži (b), PAS, x200, *scale bar* 200 μm .

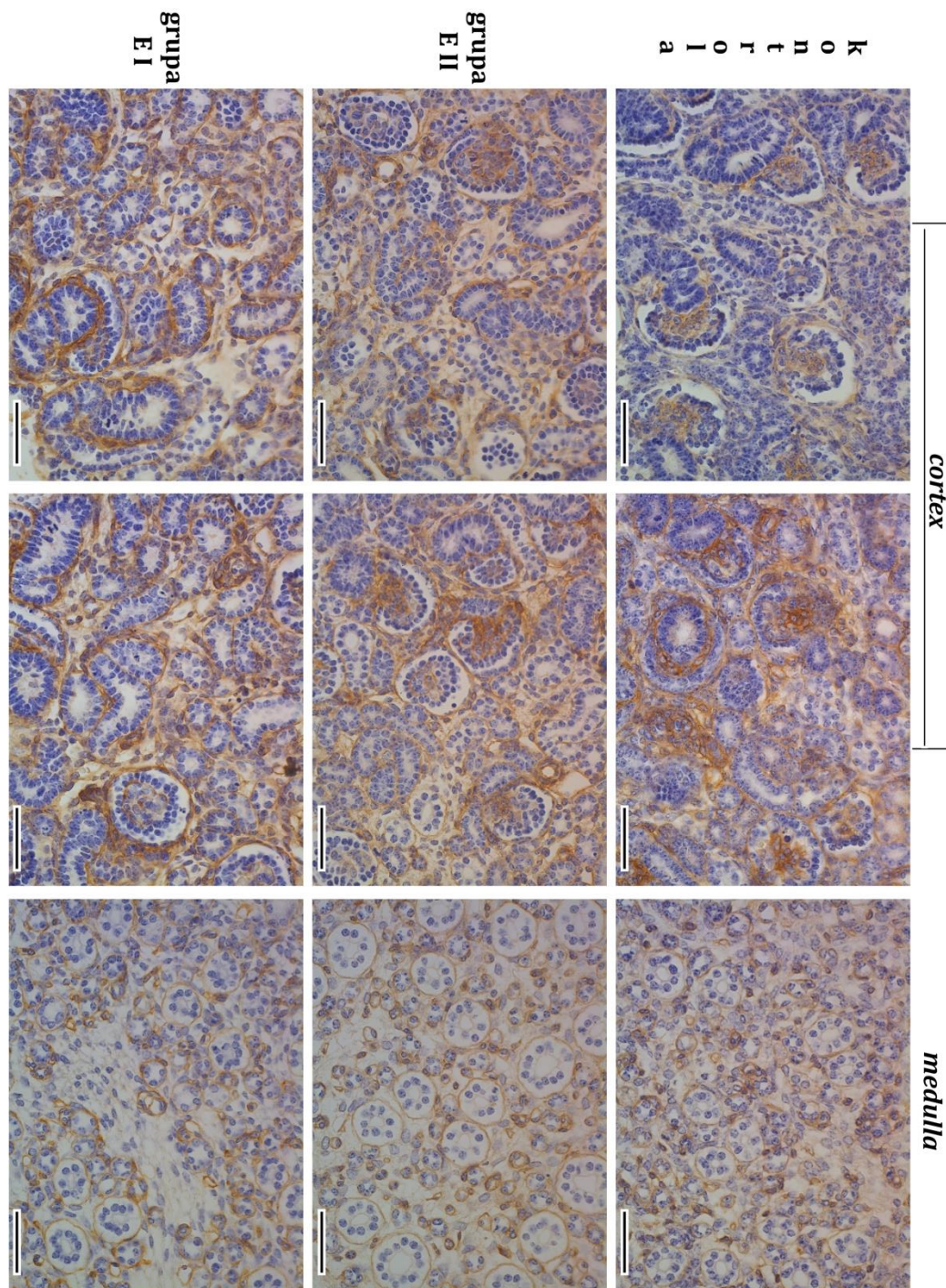
Eksperimetnalna grupa I (E I) - Na histološkim preparatima bubrega u grupi jeduinki kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije zapažaju se znaci lobulacije parenhima. Lobulusi su predstavljeni medularnom piramidom koja je okružena korteksom. Unutar kore bubrega jasno se razlikuju sve razvojne forme glomerula, dok se u potpunosti formirani (zreli) glomeruli se uočavaju u manjem broju. Tubuli koji se nalaze unutar kore su obloženi jednim redom kockastih epitelnih ćelija sa jedrom postavljenim bliže bazalnom polu ili pak u pojedinim tubulima jedra su apikalno postavljena.

Unutar medularne piramide sabirni tubuli su obloženi cilindričnim ćelijama sa apikalno orjentisanim jedrima. Sami tubuli su nešto manjeg dijametra, a međusobno su razdvojeni rastresitim mezenhimalnim tkivom koje je prisutno u nešto većoj količini u odnosu na ostale grupe. Primenom histoheмиjskog PAS bojenja na preparatima bubrežnog parenhima uočavaju se unutar pojedinih tubula, kako u korteksu tako i u meduli.

4.2.2. Imunohistohemijske karakteristike bubrega

Imunoekspresija Collagen IV antigena

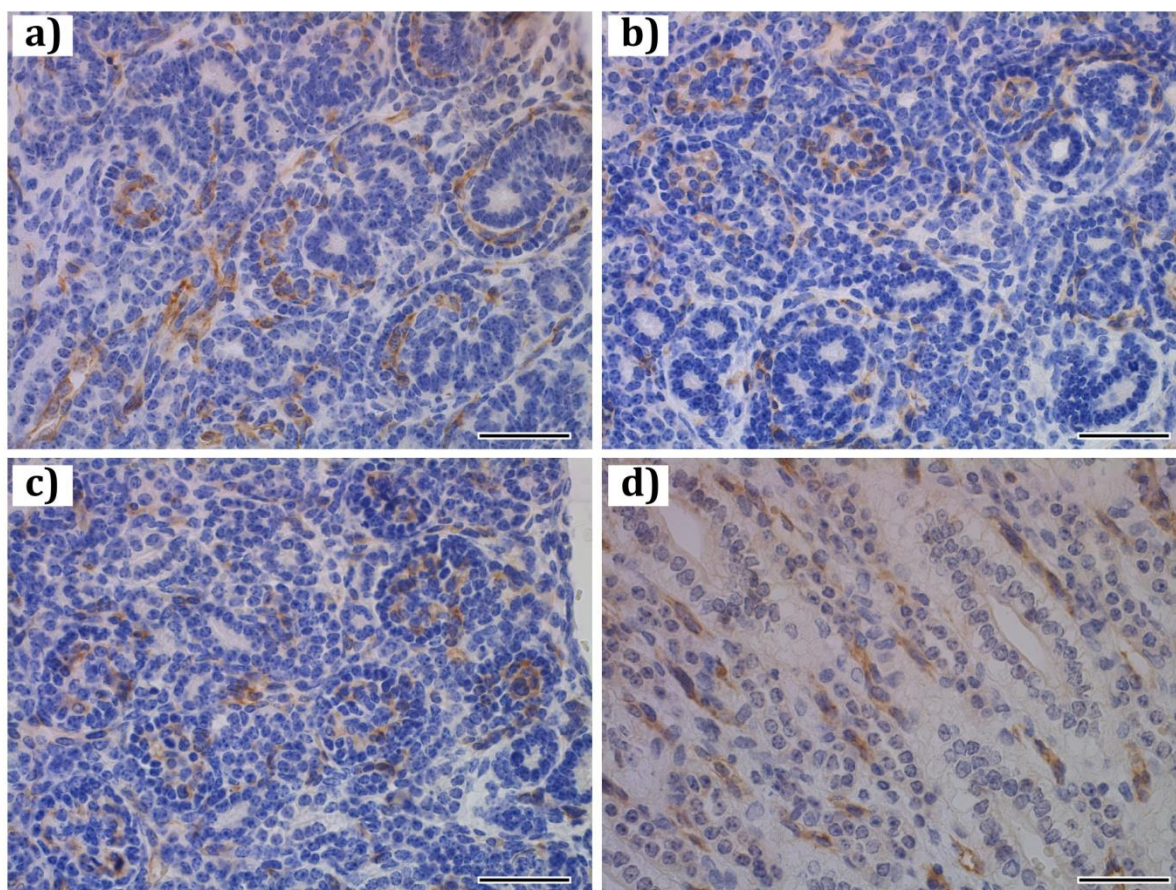
Imunoekspresija *Collagen IV* antigena je prisutna oko nezrelih razvojnih formi i to kao kontinuirano bojenje, dok se kod kasnijih *Collagen IV* pozitivnost lokalizuje u predelu formiranja budućeg kapilarnog klupka bubrežnog telašca (**Slika 28**). Takođe, evidentna je pozitivnost i u predelu Bowman-ove kapsule. (**Slika 28**). Bazalna membrana bubrežnih tubula, kao i sabirnih tubula je takođe pokazala imunopozitivnost na *Collagen IV* antitelo. U predelu kore i medule unutar intersticijuma imunopozitivnost je registrovana na bazalnim membranama krvnih sudova (**Slika 28**).



Slika 28. Imunoekspresija *Collagen IV* antigena na preparatima bubrega fetusa zamorca, x200; scale bar 200 μ m.

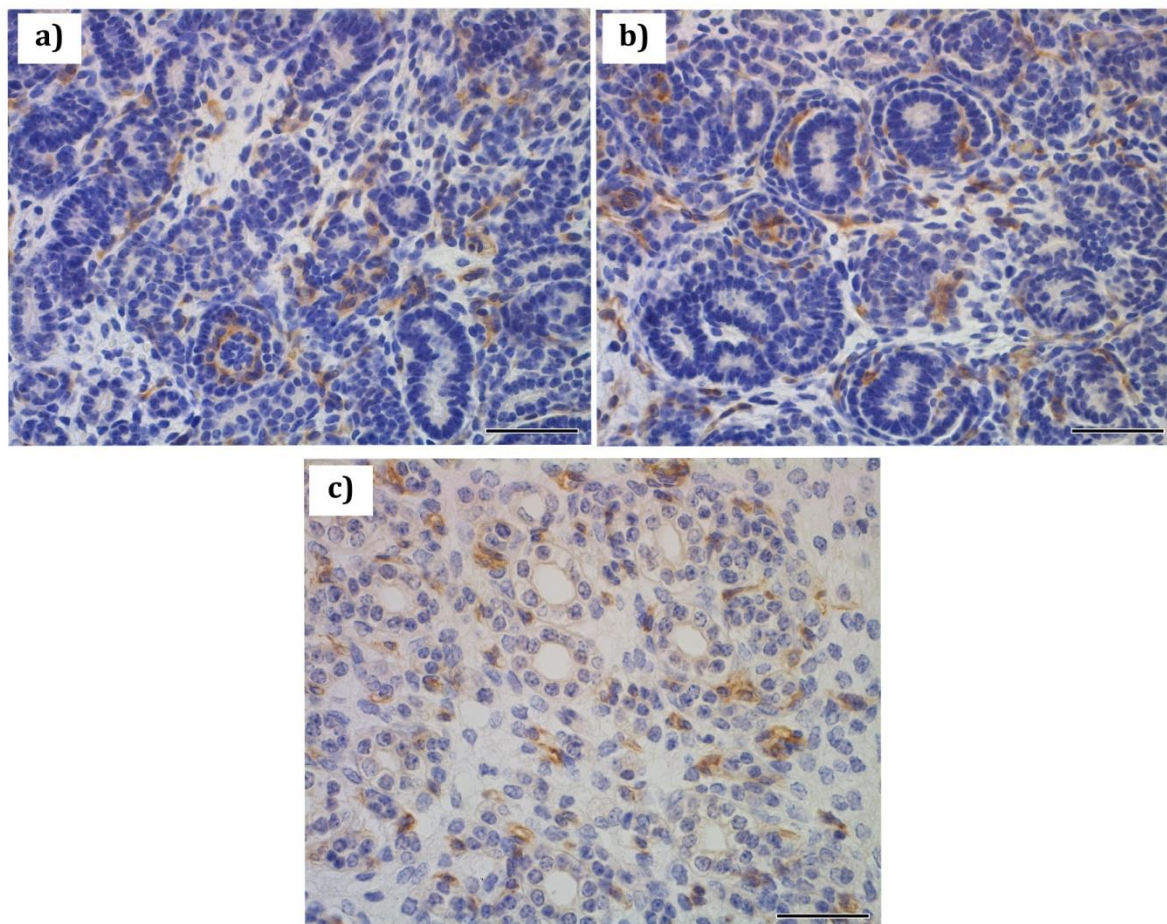
Imunoekspresija CD31 antigena

Analizom preparata bubrežnog parenhima plodova zamoraca iz kontrolne grupe uočava se eksprimiranost CD31 antigena u kori i u meduli bubrega. Unutar kore bubrega evidentni su začeci vaskularizacije pojedinih razvojnih formi glomerula. U razvojnim oblicima bubrežnog telašca, kao što su: oblik zareza, S forma i u ranim fazama razvoja glomerula prisutna je imunoekspresija CD31 antitela (**Slika 29 a-c**). Pored toga, u intersticijumu, kore i medule, registruje se pozitivnost endotelnih ćelija u pripadajućim krvnim sudovima (**Slika 29 d**).



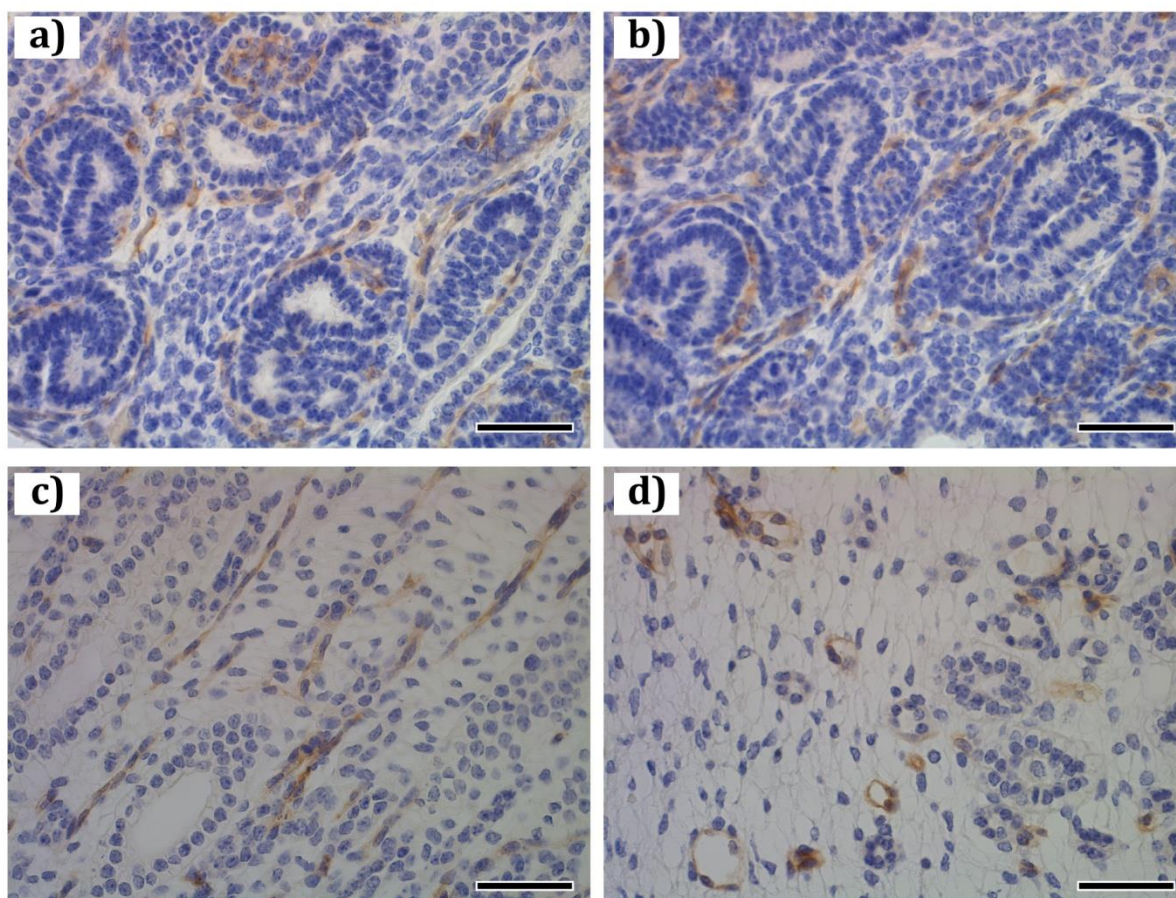
Slika 29. Imunoekspresija CD31 antigena na parenhimu bubrega – kontrolna grupa: a-c) cortex, x200; scale bar 200 μ m; d) medulla; x400; scale bar 100 μ m

U grupi kojoj je vitamin C ukinut 20-og dana gestacije imunoekspresija je prisutna u najranijim tj. najnezrelijim oblicima novoformiranih glomerula. Evidentna je vaskularizacija u S formi, kao i u tek formiranim, nezrelim glomerulima (**Slika 30 a-b**). Takođe endotelne ćelije unutar krvnih sudova intersticijuma kore i medule bubrega pokazuju imunopozitivnost na CD31 antitelo (**Slika 30 c**).



Slika 30. Imunoekspresija CD31 antigena na parenimu bubrega – grupa E II: a-b) cortex, x200, scale bar 200 μ m ; c) medulla, x200, scale bar 200 μ m

Međutim, prenatalni deficit vitamina C u trajanju od 40 dana doveo je do zaostajanja u vaskularizaciji nefrogenih razvojnih formi. Na preparatima burega iz ove grupe imunoekspresija CD31 antigena je evidentirana samo na nezrelim glomerulima (**Slika 31 a-b**), dok su ostale ranije forme bez imunopozitivnosti. Vaskularizacija intersticijuma kore i medule kod E I grupe je jasno prisutna (**Slika 31 c-d**).

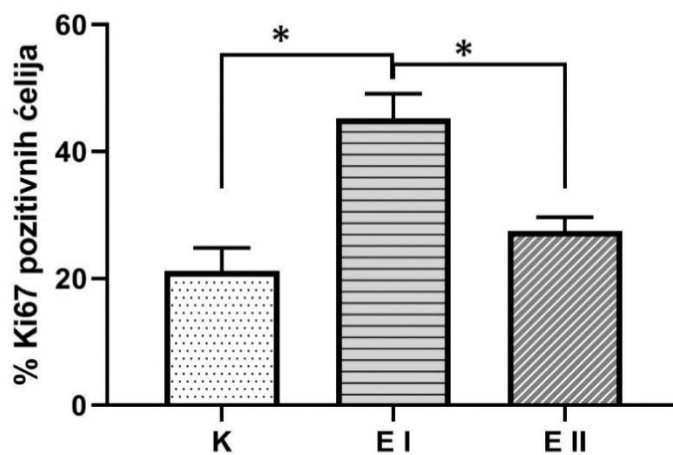


Slika 31. Imunoekspresija CD31 antigena na parenimu bubrega – grupa E I: a-b) cortex, x200, scale bar 200 μ m ; c-d) medulla, x 200, scale bar 200 μ m

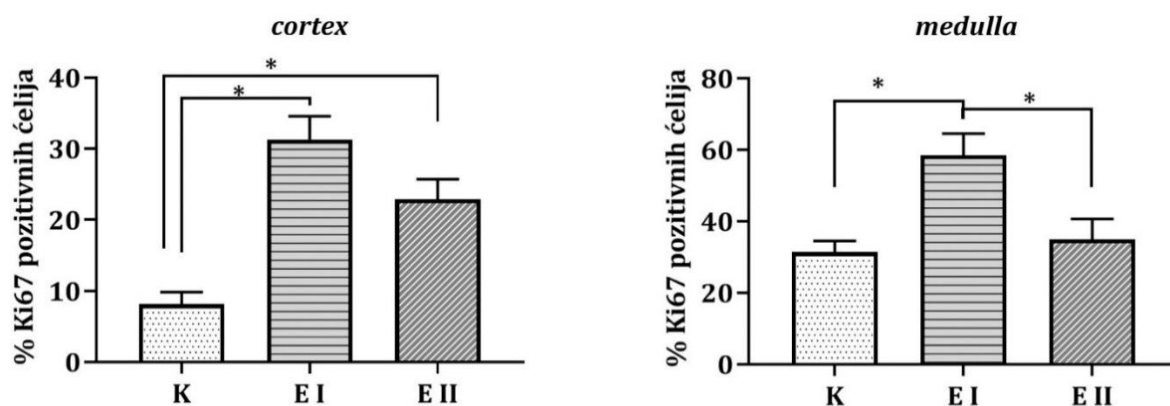
Imunoekspresija Ki67 antigena

Unutar bubrežnog parenhima imunoekspresija Ki67 antigena je uočena u kortikalnom delu, kao i u sabirnim tubulima medule. Procenat Ki67 pozitivnih ćelija na celokupnom bubrežnom parenhimu je najveći u grupi E I ($45,19 \pm 3,91\%$), a najmanji u kontrolnoj ($21,18 \pm 3,64\%$). U grupi kojoj je vitamin C ukinut 20-og dana gestacije iznosi $27,5 \pm 2,18\%$ (**Grafikon 3a**). Statističkom obradom dobijenih podataka dokazano je postojanje visoke statistički značajne razlike između kontrolne grupe i grupe E I, kao i poređenjem dve eksperimentalne grupe (E I i E II). Na **Grafikonu 3b** je takođe prikazana i procentualna zastupljenost Ki67 pozitivnih ćelija zasebno u parenhimu korteksa i medule bubrega.

a)



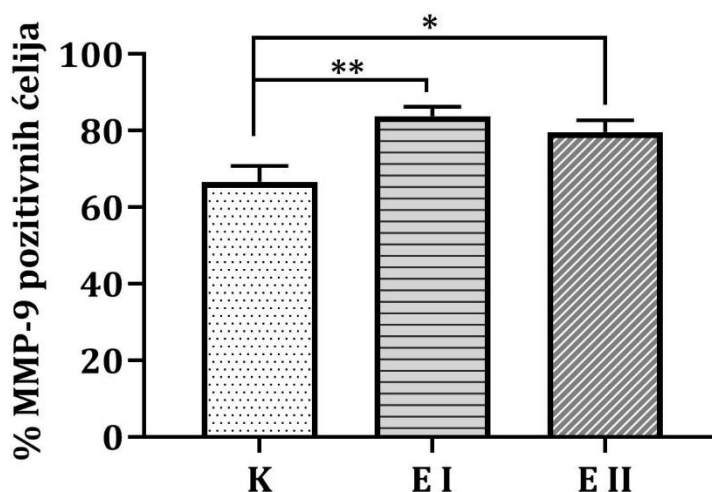
b)



Grafikon 3. Prikaz procentulne zastupljenosti Ki67 pozitivnih ćelija unutar: celokupnog parenhima bubrega (a) i zasebno analizirano unutar kore i srži (b), * $p < 0,05$

Analiza imunoekspresije MMP-9 antigena

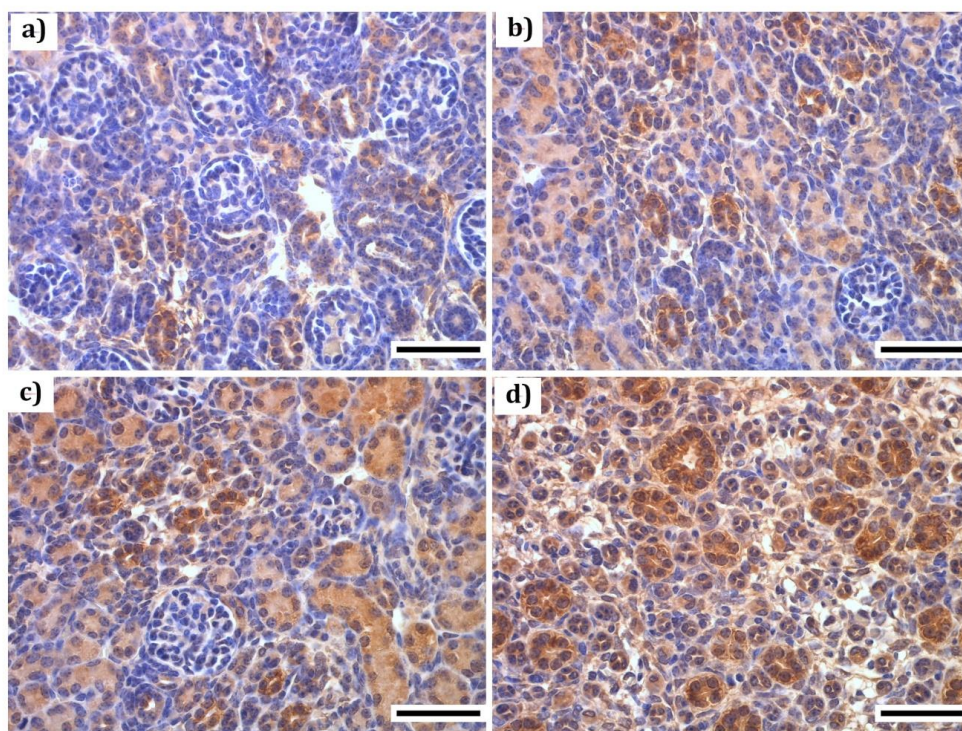
U kontrolnoj grupi utvrđen udeo MMP-9 pozitivnih ćelija od $66,63 \pm 4,16\%$ koji je ujedno i najniži. U E II i E I grupi rezultati govore u prilog povećanja broja ćelije sa prisutnom nuklearnom ekspresijom MMP-9 antigena, tačnije taj procenat u E II grupi iznosi $79,6 \pm 3,08\%$, odnosno u E I grupi $83,79 \pm 2,53\%$. Statističkom obradom dobijenih podataka utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između kontrolne i E II grupe ($p < 0,05$), dok je između kontrolne i grupe kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije ta razlika visoke statističke značajnosti ($p \leq 0,001$) (**Grafikon 4**).



Grafikon 4. Prikaz procentulanog udela MMP-9 pozitivnih ćelija u uzorcima bubrežnog parenihima

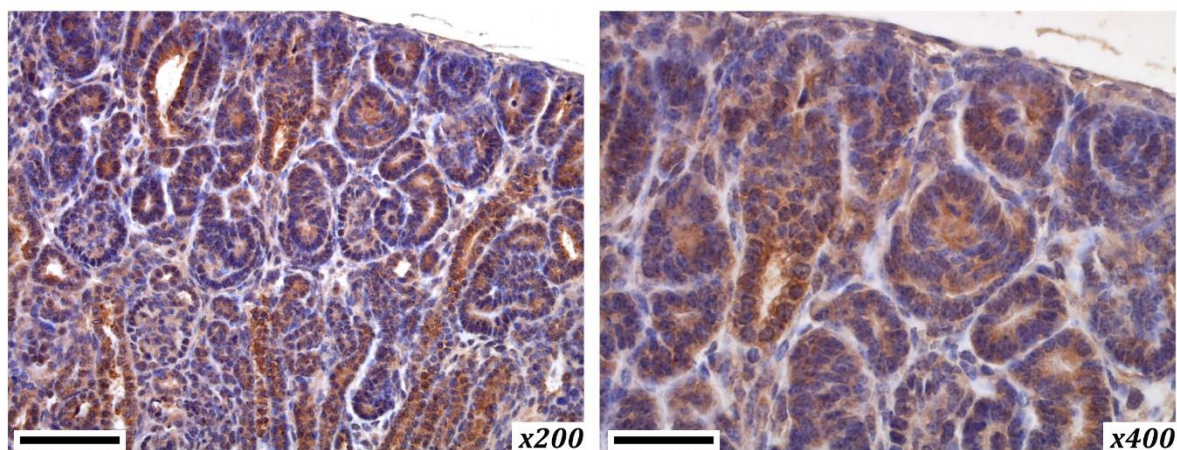
Analiza imunekspresije Slc23a1 antigena

Ekspresija antigena Slc23a1, zaduženog za transport vitamina C, je na preparatima bubrega kontrolne grupe registrovana uglavnom u vidu membranskog i citoplazmatskog bojenja. Strukture koje pokazuju imunopozitivnost su tubuli unutar kore i medule, dok razvojine forme glomerula i glomeruli ostaju imunonegativni na ispitivani marker (**Slika 32**). Imunopozitivnost tubula unutar medule bubrega je uvek difuzna i jakog intenziteta, dok se unutar tubula u kori uočavaju većinom oni čija je imunopozitivnost srednjeg intenziteta, ali se mogu videti, iako retko, i tubuli sa bojenjem jakog intenziteta.



Slika 32. Imunoekspresija Slc23a1 antigena: a-b) cortex, x400, scale bar 100 μ m; c-d) medulla, x400, scale bar 100 μ m

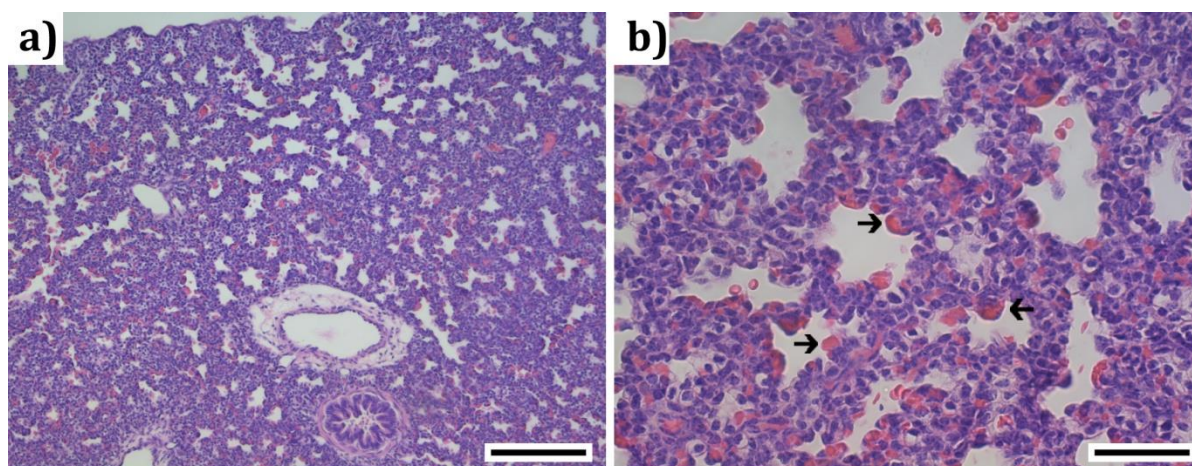
Eksperimentalne grupe pokazuju znatno veću imunoekspresiju Slc23a1 antigena u odnosu na kontrolnu grupu. Pored tubula unutar kore i medule, imunopozitivnost na preparatima bubrežnog parenhima je uočena i u svim razvojnim formama glomerula (Slika 33).



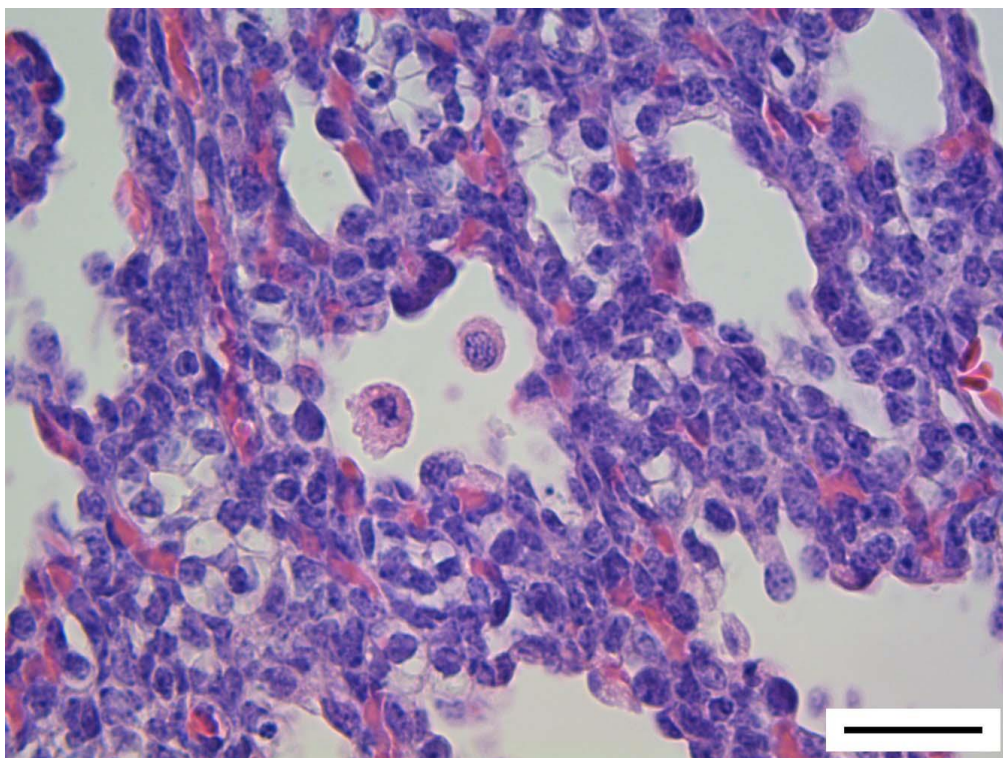
Slika 33. Imunoekspresija Slc23a1 antigena na parenhimu bubrega fetusa iz grupe E I, scale bar 200 μ m i 100 μ m

4.2.2. Histomorfološke karakteristike pluća

Kontrolna grupa (K) – Na histološkim presecima fetalnog plućnog parenhima zamorca iz kontrolne grupe uočavaju se intrapumonalni (sprovodni) vazdušni putevi i saćasti plućni parenhim zadužen za razmenu gasova. Unutar plućnog parenhima vazdušni prostori međusobno razdvojenim septama, koje su nešto tanje u odnosu na one iz ekprerimentalnih grupa (**Slika 34a**). U budućim alveolarnim prostorima uočavaju se “sekundarni grebeni” (engl. *secondary crests*) koje predstavljaju kapilare koji prominiraju u vazdušne prostore (**Slika 34b**). Epitel koji oblaže vazdušne prostore je kubičan ili pločast. U pojedinim vazdušnim prostorima uočavaju se alveolarni makrofagi (**Slika 35**). Sve navedeno govori u prilog da se unutar plućnog parnehima polako stvaraju uslovi za potencijalnu postnatalnu razmenu gasova.

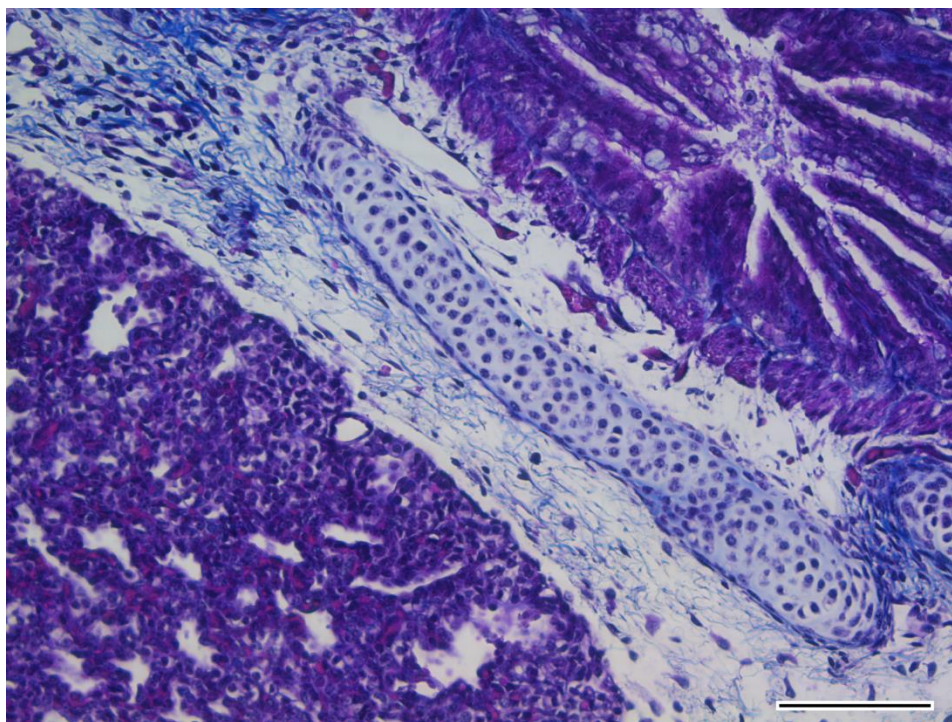


Slika 34. Prikaz plućnog parenhima fetusa zamorca iz kontrolne grupe: a) HE, 100x, *scale bar* 400 μm; b) strelice pokazuju kapilare koji prominiraju u vazdušni prostor aleveola, HE, 200x, *scale bar* 200 μm

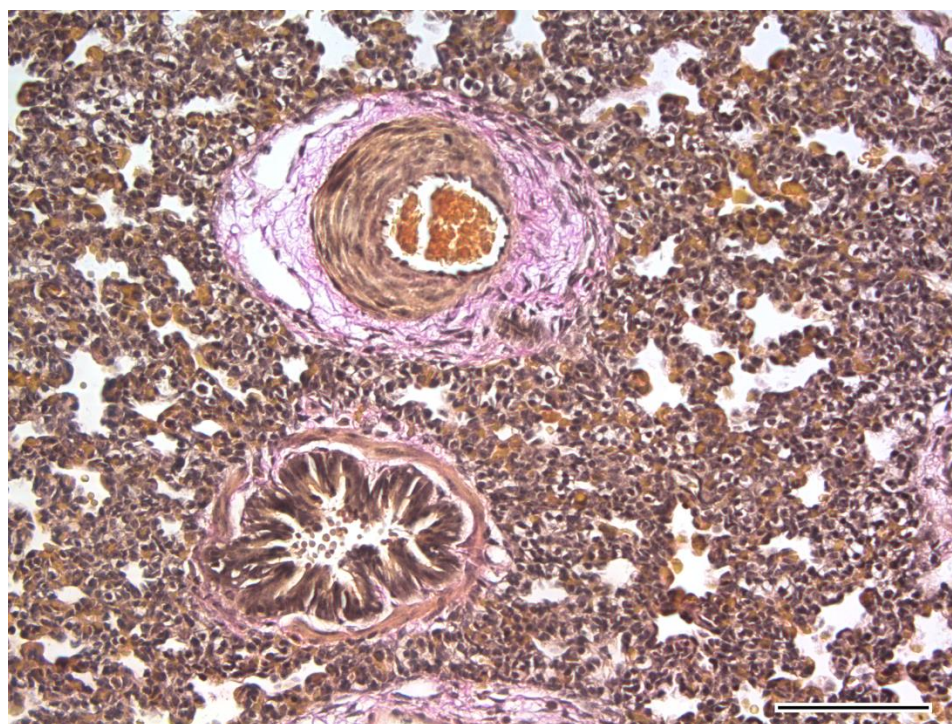


Slika 35. Mikrofotografija alveolarnih makrofaga unutar alveola, HE, 630x, scale 50 μ m

Ogranci intrapulmonalnih vazdušnih puteva (bronhiole) obložene su pseudoslojevitim trorednim/dvorednim cilindričnim epitelom, ispod kojeg se uočavaju kružno orjentisane glatke mišićne ćelije. U zidu većih sprovodnim putevima uočavaju se i ostrvca hijaline hrskavice (**Slika 36**). Hondrociti su pojedinačni, u svojim lakunama, međusobno su odvojeni hrskavičavim matriksom. Veći krvni sudovi i bronhiole okruženi su mladim vezivni tkivom (**Slika 37**).

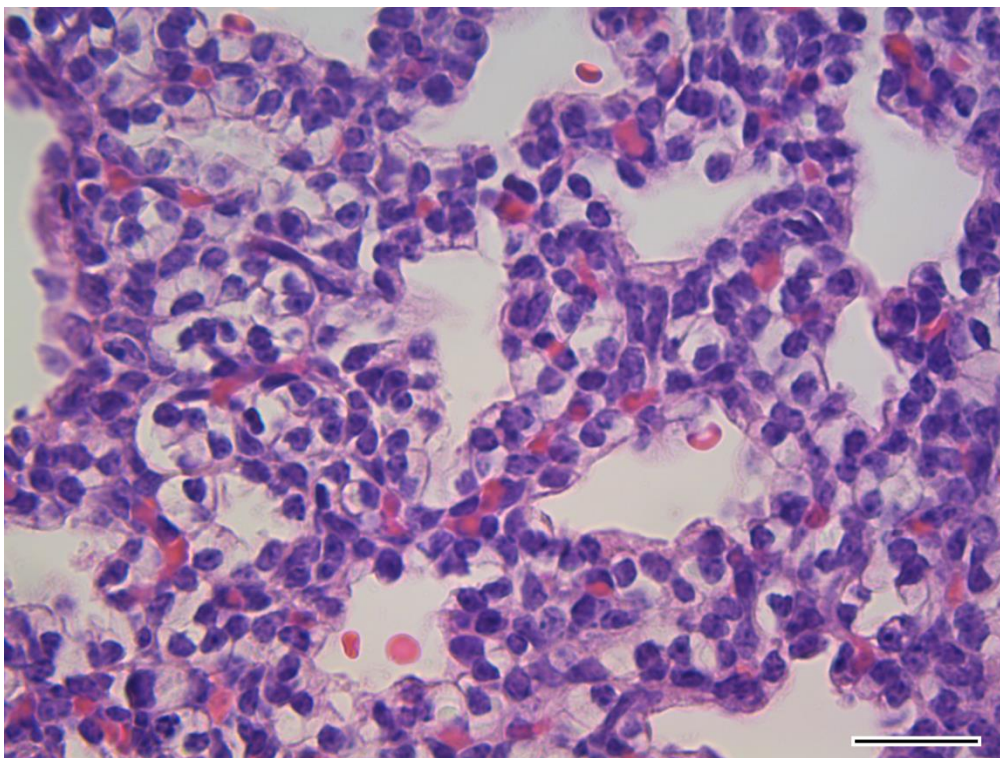


Slika 36. Intrapulmonalni bronh, *Masson trihrom*, 400x, scale bar 100 μ m



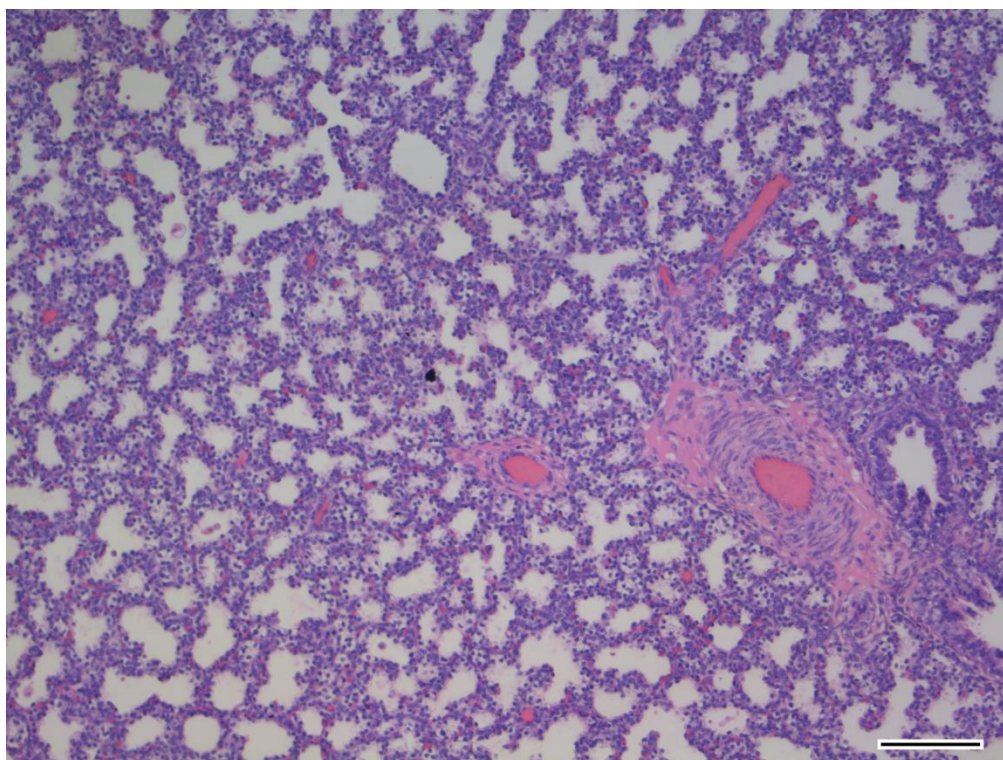
Slika 37. Pluća fetusa zamorca iz kontrolne grupe, *Van Gieson*, 200x, scale bar 200 μ m

U pojedinim segmentima plućnog parenhima uočavaju se vazdušni prostori u obliku tubula koji su obloženi kockastim do nisko cilindričnim epitelom sa prisutnim vakuolama u citoplazmi (**Slika 38**). Plućni parenhim se prema uočenim histološkim karakteristikam nalazi u ranoj sakularnoj fazi razvoja.



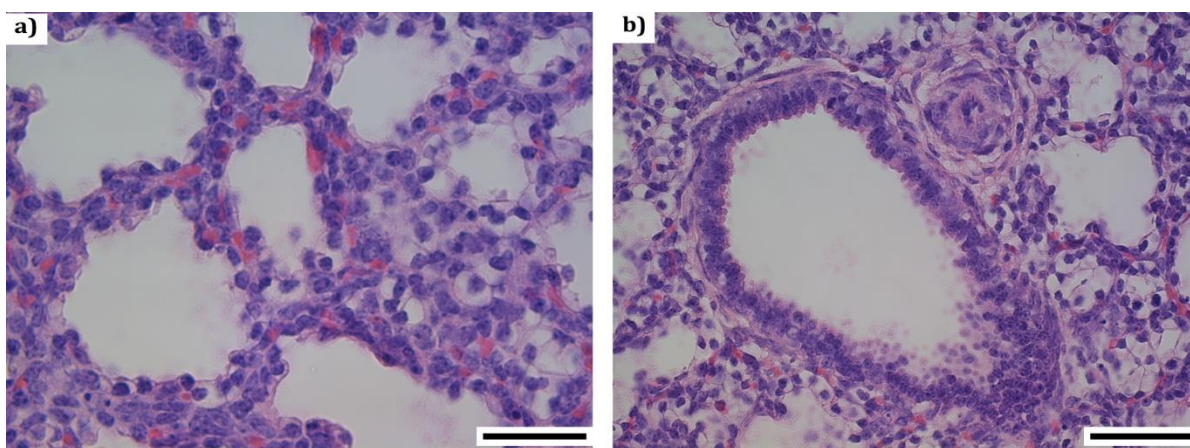
Slika 38. Mikrofotografija tubula plućnog parenhima; HE, 630x, *scale bar* 50 μm

Eksperimentalna grupa II (E II) - Na preparatima plućnog parenhima iz grupe kojoj je vitamin C ukinut 20-og dana gestacije (E II) uočavaju se vrećasti vazdušni prostori obloženi epitelnim ćelijama (**Slika 39**). Epitelne ćelije su pretežno kockastog oblika, sa vakuolama koje su subnuklearno lokalizovane (**Slika 40a**).



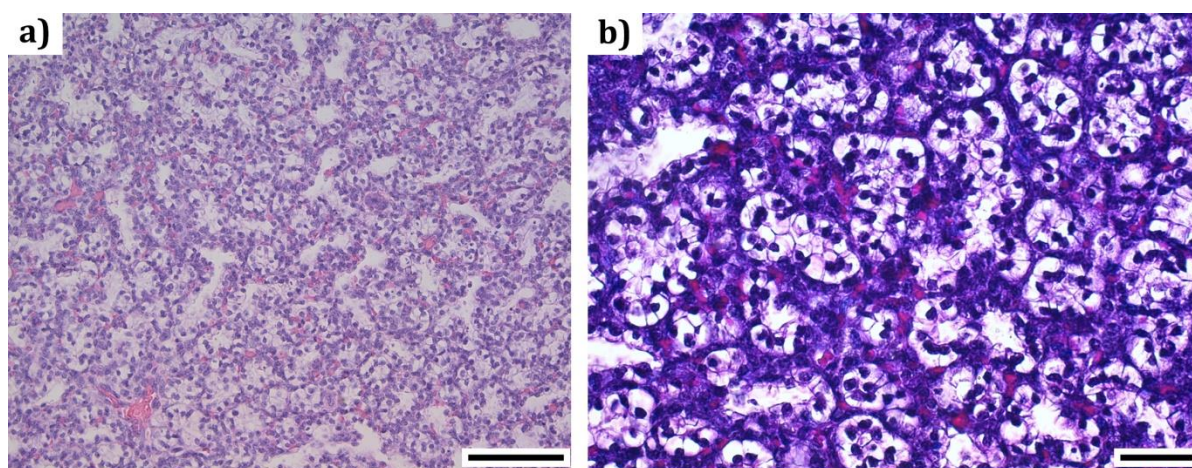
Slika 39. Prikaz histološke građe fetalnog plućnog parenhima iz E II grupe; HE, 50x, scale bar 500 μ m

U pregradama unutar mezenhima koji odeljuje sakuluse, uočavaju se krvni sudovi. U nekim sakulusima uočava se blizak kontak krvnog suda sa pneumocitima što će omogućiti buduću razmenu gasova (**Slika 40a**). Unutar plućnog parenhima krvni sudovi i bronhiole su uobičajajene građe i izgleda (**Slika 40b**). Prema opisanim histološkim karakteristikama plućnog parenhima moglo bi se zaključiti da odgovara kanalikularnoj fazi razvoja pluća.



Slika 40. Mikrofotografija fetalnog plućnog parenhima - grupa E II, HE, 400x, scale bar 100 μ m

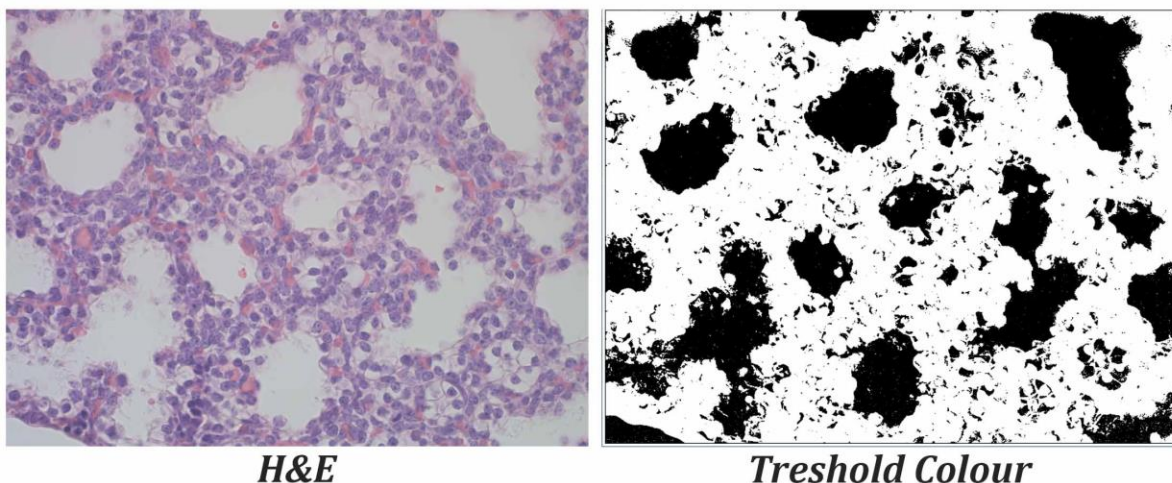
Eksperimentalna grupa I (E I) - Na preparatima se uočavaju gusto raspoređeni tubuli obloženi cilindričnim ćelijama, sa jedrima smeštenim na apikalnom polu (bliže "lumen" tubula) (**Slika 41a**). U citoplazmi ćelija prisutne su subnuklearne vakuole. Tubuli su međusobno odvojeni mezenhimalnim vezivnim tkivom (**Slika 41b**).



Slika 41. Histološka građa plućnog parenhima fetusa iz E I grupe: a) H&E, 400x, *scale bar* 100 μm ; b) *Masson trihrom*, 630x, *scale bar* 50 μm

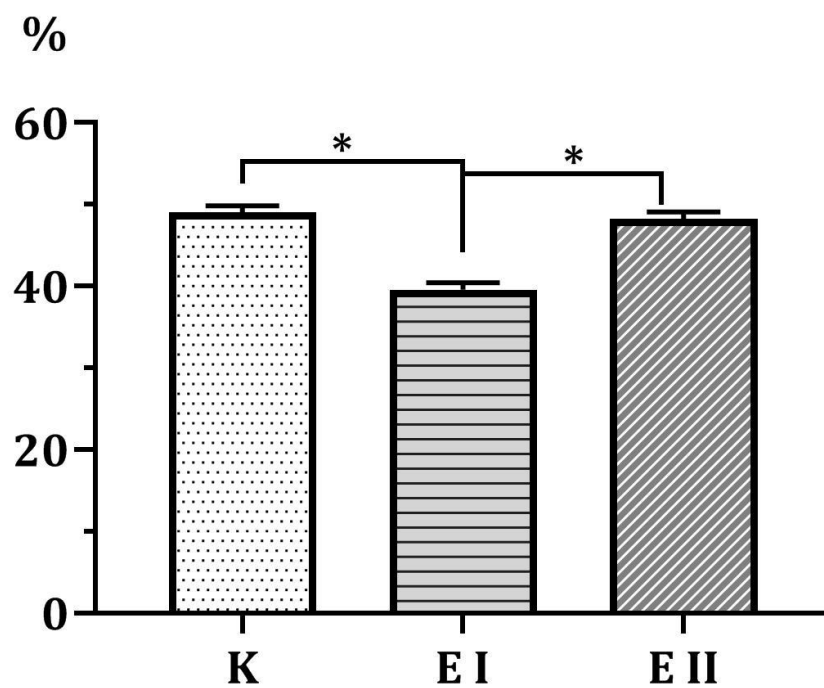
Veći vazdušni putevi (bronhi) obloženi su troredanim prizmatičnim epitelom sa peharastim ćelijama. U građi zida uočavaju se i ostrvca hijaline hrskavice sa pojedinačnim hondrocitima, u svojim lakunama, koji su međusobno razdvojeni hrskavičavim matriksom. Veći krvni sudovi i bronhiole okruženi su mladim vezivnim tkivom. Plućni parenhim prema histološkim karakteristikama odgovara ranom kanalikularnom stadijumu razvoja pluća.

Na mikrofotografijama plućnog parenhima bojenim standardnom hematomksilin – eozin metodom, uslikano je na uveličanju 400x, za sve tri eksperimentalne grupe po 100 nasumično odabranih vidnih polja. U programu *Fiji*, uz pomoć programskog dodatka pod nazivom *Threshold-Colour* (Slika 42), određen je površinski (arealni) procenat koji zauzima alveolarni vazdušni prostor.



Slika 42. Prikaz rada u programu *Fiji*: a) mikrofotografija preparata plućnog parenhima; **b)** izgled mikrofotografije u programu *Fiji* nakon podešavanja parametara i pokretanja pokretanja programskog dodatka – zone crne boje odgovaraju „vazdušnim“ prostorima čiji je procentualni udeo na fotografijama analiziran.

Morfometrijskom analizom dokazano je da se najmanji procenat budućeg alveoranog vazdušnog prostora nalazi u u grupi kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije, a iznosi $39,59 \pm 0,82\%$. Između grupe E II i kontrolne nema velike razlike. Za E II grupu dobijen je udeo od $48,20 \pm 0,88\%$, odnosno $49,03 \pm 0,78\%$ za grupu K. Upotrebom statističkih testova razlika je dokazana između kontrolne i E I grupe ($p < 0,001$), kao i između grupa E I i E II ($p < 0,001$) (**Grafikon 5**).



Grafikon 5. Prikaz procentulanog udela alveolarnog vazdušnog prostora,
* $p < 0,001$

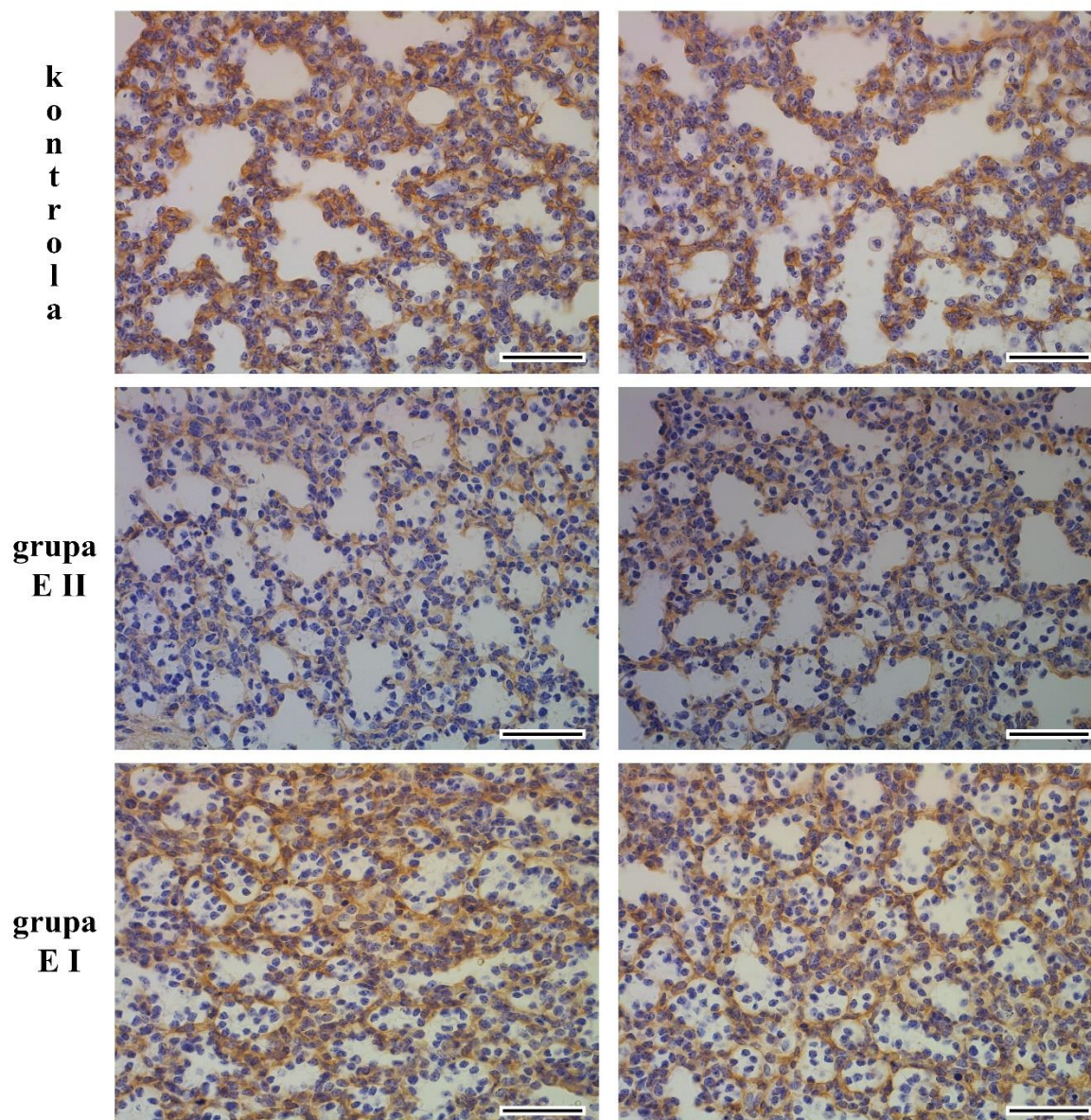
4.2.4. Imunohistohemijske karakteristike karakteristike pluća

Analiza imunoekspresije Collagen IV antigena

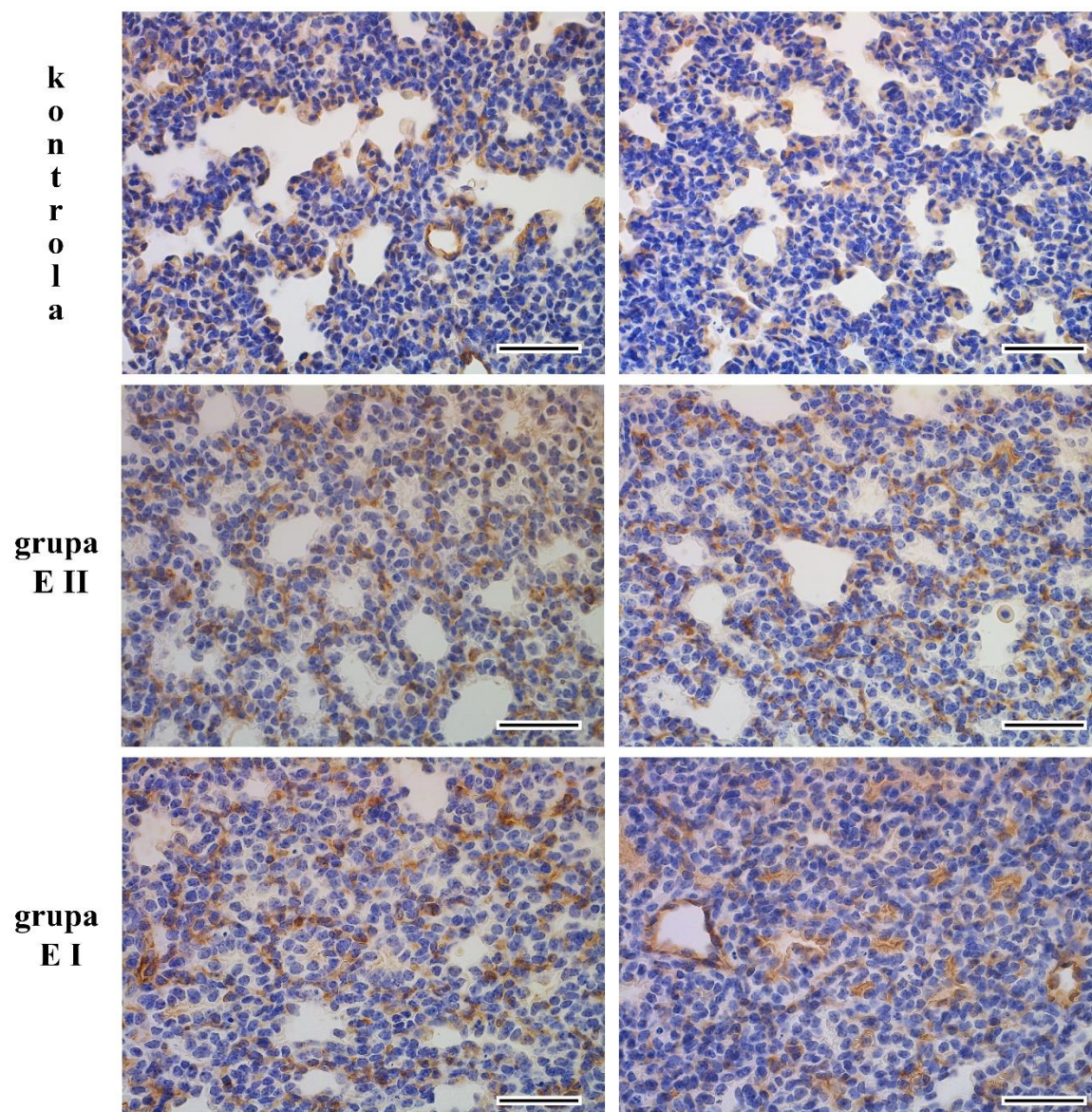
Imunohistohemijskim bojenjem antitelom Collagen IV na preparatima plućnog parenhima u svim analiziranim grupa uočeno je postojanje imunopozitivnosti. Kolagena vlakna se uočavaju unutar mezenhima koji odeljuje buduće alveolarne prostore (**Slika 43**). Takođe, se na preparatima kontrolne gupe registruje imunoekspresija kolagena u bazalnim membranama krvnih sudova kao i u bazalnim membranama kapilara koji formiraju ranije opisane “sekundarne grebene” (**Slika 43**).

Analiza imunoekspresije CD31 antigena

Na preparatima plućnog parenhima kod sve tri eksperimentalne grupe uočava se postojanje imunopozitivnost CD31 antigena. Krvni sudovi su lokalizovani unutar mezenhima, a delom u kontrolnoj grupi prominiraju u alveolarne prostore. Međusobnim poređenem analiziranih grupa stiče se utisak da prenatalni deficit vitamina C dovodi do zaostajanja u kapilarizaciji plućnog parenhima. Naime, unutar grupe E II, a naročito kod fetusa iz kontrolne grupe imunoekspresije CD31 je znatno veći. Na osnovu ovoga može se zaključiti da je vaskulogeneza plućnog parenhima unutar ovih grupa (K i E II) process koji se brže razvija (**Slika 44**).



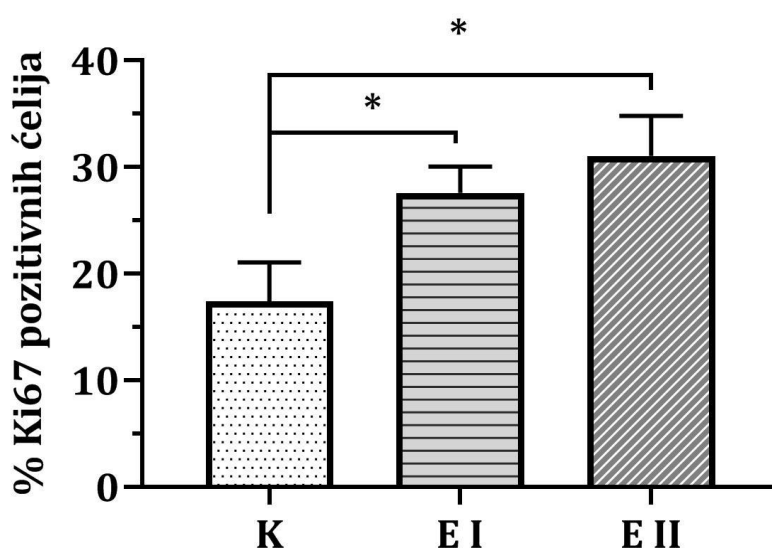
Slika 43. Imunoekspresija Collagen IV antigena na parenhimu fetalnih pluća; 200, scale bar 200 μ m.



Slika 44. Imunoekspresija CD31 antigena na parenhimu fetalnih pluća; x200
scale bar 200 μm.

Analiza imunoekspresije Ki67 antigena

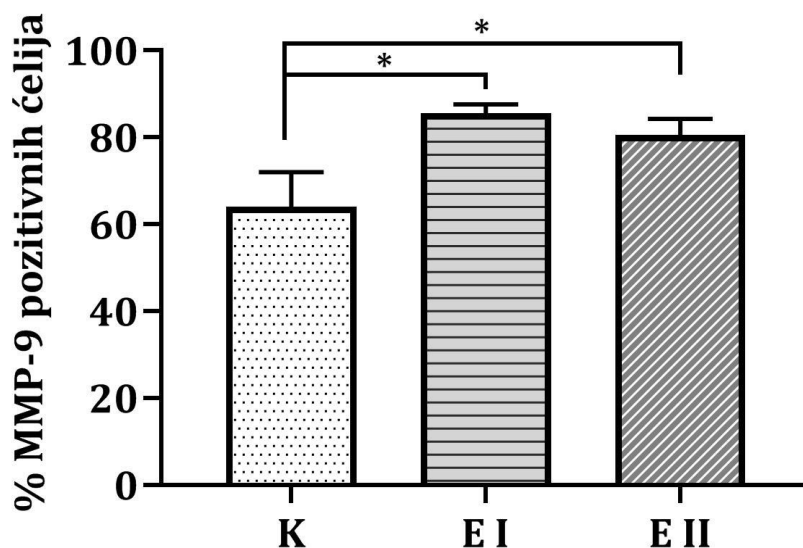
Plućni parenhim je pokazao različit stepen ekspresije Ki67 antigena. Naime, u kontrolnoj grupi procenat ćelija sa nuklearnom ekspresijom Ki67 antigena je najmanji i iznosi $17,37 \pm 3,67\%$. U obe eksperimentalne grupe taj procenat je znatno veći i u grupi E II iznosi $27,6 \pm 2,48\%$. Proliferativna aktivnost, plućnog parenhima, u grupi E I je skoro dvostruko veća u odnosu na kontrolnu grupu, a procenat Ki67 pozitivnih ćelija je $31,05 \pm 3,76\%$ (**Grafikon 6**). Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne i E I grupe ($p \leq 0,05$), kao i između kontrolne i E II grupe ($p \leq 0,05$).



Grafikon 6. Procenat Ki67 pozitivnih ćelija u parenhimu bubrega; * $p < 0,05$

Analiza imunoekspresije MMP-9 antigena

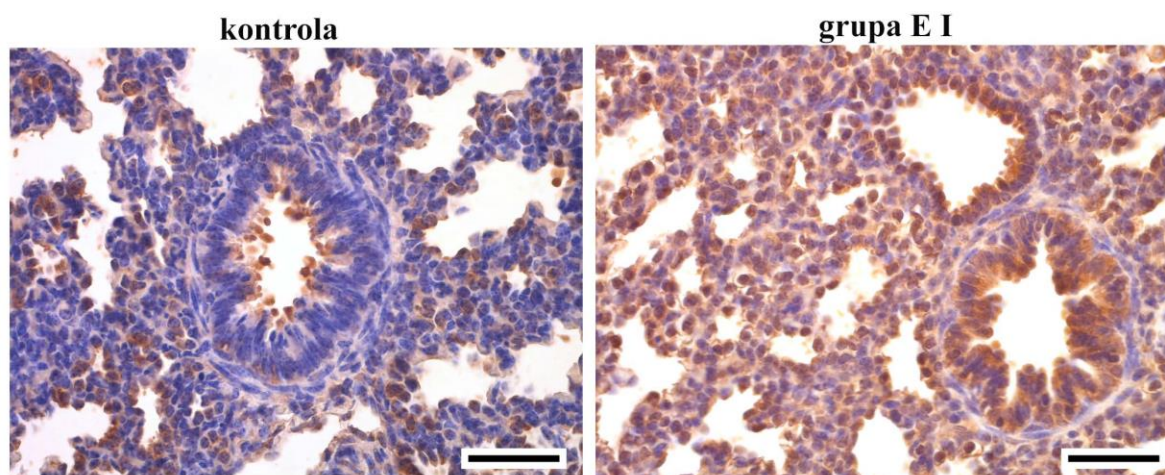
Deficit vitamina C je na ekspresiju MMP-9 antigena na uzorcima plućnog parenhima imao uticaj koji se ogleda u vidu povećanja broja ćelija sa nuklearnom ekspresijom ispitivanog antigena. Procenat MMP-9 pozitivnih ćelija na preparatima plućnog parenhima kod fetusa iz kontrolne grupe je iznosio $63,96 \pm 7,96\%$, dok je u eksperimentalnim grupama znatno veći. U E II grupi taj preocenat iznosi $80,53 \pm 3,69\%$, odnosno $85,49 \pm 2,09$ u uzorima iz E I grupe. Statističkom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između grupe K i E I, kao i K i E II grupe ($p < 0,05$) (Grafikon 7).



Grafikon 7. Prikaz procentulanog udela MMP-9 pozitivnih ćelija u uzorcima plućnog parenhima

Analiza imunoekspresije Slc23a1 gena

Unutar plućnog parenhima imunoekspresija Slc23a1 antigena je evidentna u svim eksperimentalnim grupama s tim da se na preparatima iz kontrolne grupe najmanje uočava, dok se na preparatima iz grupe kojoj je vitamin C ukinut 10. dana gestacije registuje u mnogo većem obimu u vidu difuznog bojenja jakog intenziteta. Opisani obrazac ekspresije je prisutan kako unutar mezenhimalnog tkiva budućih septi, tako i u epitelnom pokrovu intrapulmonalnih vazdušnih puteva (**Slika 45**).

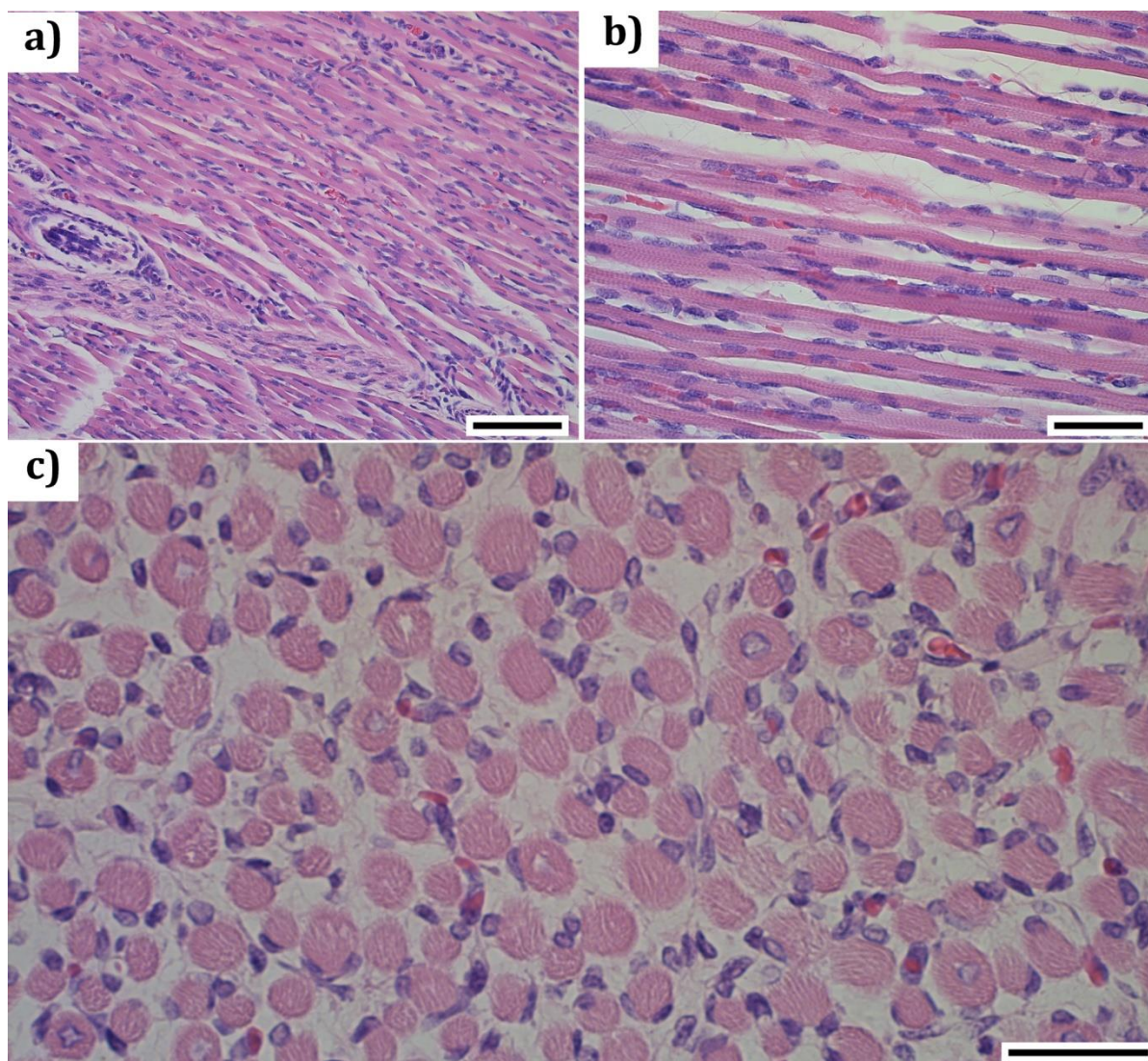


Slika 45. Imunekspressija Slc23a1 unutar plućnog parenhima; x200,

scale bar 200 μm

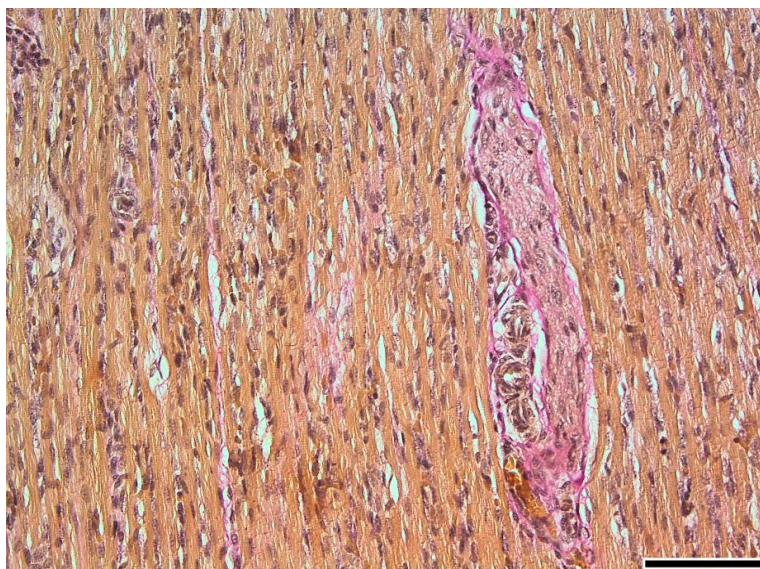
4.2.3. Histomorfološke karakteristike poprečno-prugastog mišića

KONTROLNA GRUPA (K) – Na histološkim preparatima mišića prednje lože buta, zamoraca iz kontrolne grupe, uočavaju se mišićna vlakna ujednačenog promera, organizovana u snopove. Unutar sarkoplazme mišićnih vlakana nalaze se poprečno postavljeni miofibrili što ćelijama daje izgled poprečne ispruganosti (**Slika 46a**). Jedra su u većem broju vlakana izduženog oblika i lokalizovana na periferiji mišićne ćelije ispod sarkoleme, dok su pojedina mišićna vlaknima još uvek zadržala centalnu lokalizaciju jedara (**Slika 46b i 46c**).



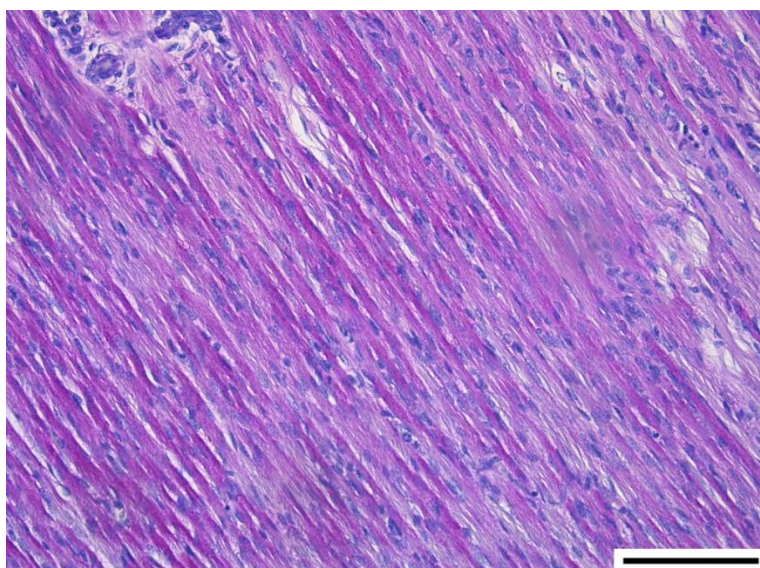
Slika 46. Mikrofotografija poprečno prugastog mišića: a) Uzdužni presek, H&E, x200, *scale bar* 200 µm; b) Uzdužni presek, H&E, x400, *scale bar* 100 µm; c) Poprečni presek mišićnih vlakana, H&E, x630, *scale bar* 50 µm

Između mišićnih vlakana prisutan je i endomizijum izgrađen iz rasteresitog vezivnog tkiva sa krvnim sudovima (**Slika 47**).



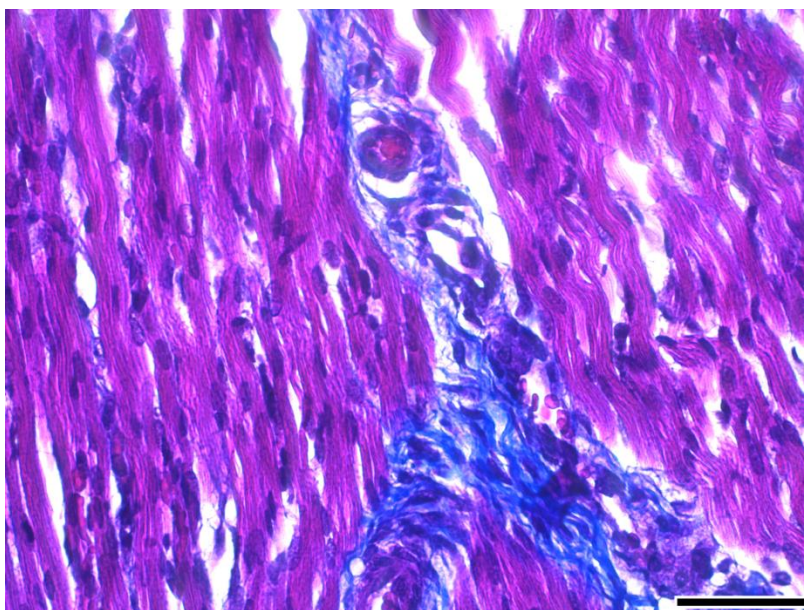
Slika 47. Mikrofotografija skeletnog mišića - poprečni presek, Van Gieson, 200x, scale bar 200 μ m

Na preparatima bojenim PAS histohemijском metodom unutar sarkoplazme određenih mišićnih vlakana se nalazi PAS pozitivni depoi glikogena (**Slika 48**).



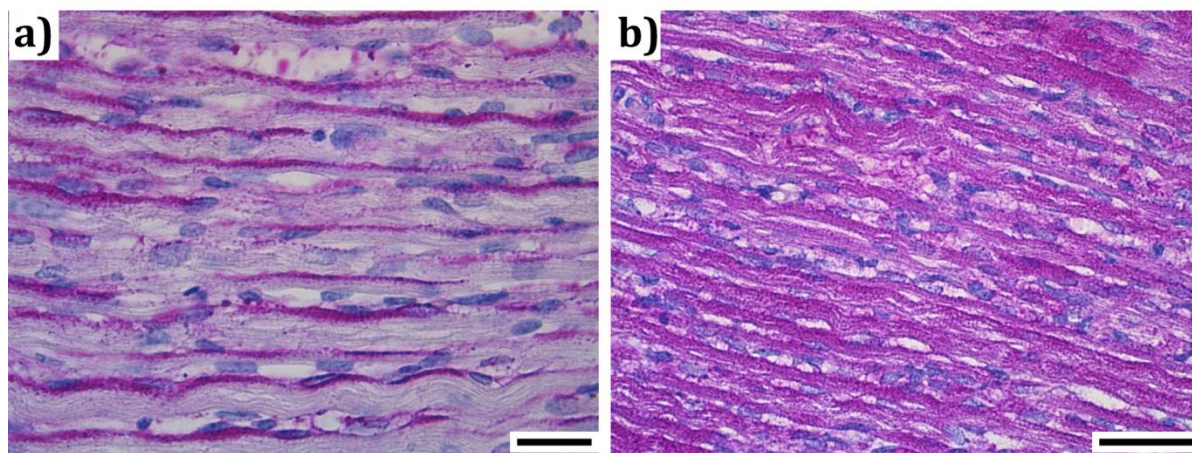
Slika 48. Mikrofotografija oprečnog preseka skeletnog mišića, PAS, 200x, scale bar 200 μ m

Ekeperimentalna grupa II (E II) – U analiziranom materijalu mišića buta grupe jedinki kojoj je vitamin C ukinut 20. dana gestacije, prisutna su mišićna vlakna sa uočljivim poprečnim prugama u sarkoplazmi. U ćelijama se uočavaju krupna jedra koja su pretežno centralno postavljena (**Slika 49**), dok se u manjem broju mišićnih vlakana uočavaju jedra manjih dimenzija i periferne lokalizacije (uz sarkolemu). Oko mišićnih vlakana nalazi se vezivnotkivni omotač – endomizijum.



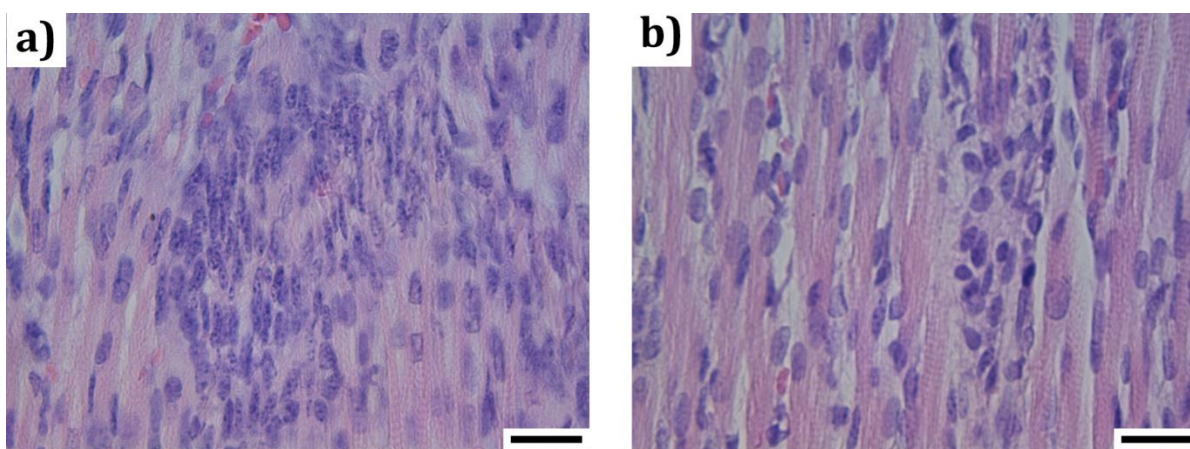
Slika 49. Mikrofotografija poprečnoprugastog mišića iz E II grupe: mišićna vlakna sa jedrom pretežno centralno postavljenim međusobno odvojena vezivnim tkivom , *Masson trihrom*, 400x, *scale bar* 100 μ m

Na histološkim preparatima bojenim PAS metodom u mišićnom tkivu uočavaju se intracitoplazmatske akumulacije PAS pozitivnih granula glikogena. Na pojedinim segmentima tkiva PAS pozitivne granule su lokalizovane rubno na periferiji ćelije (**Slika 50a**). Dok su u drugim mišićnim vlaknim akumulacije raspoređene po celoj sarkoplazmi (**Slika 50b**).

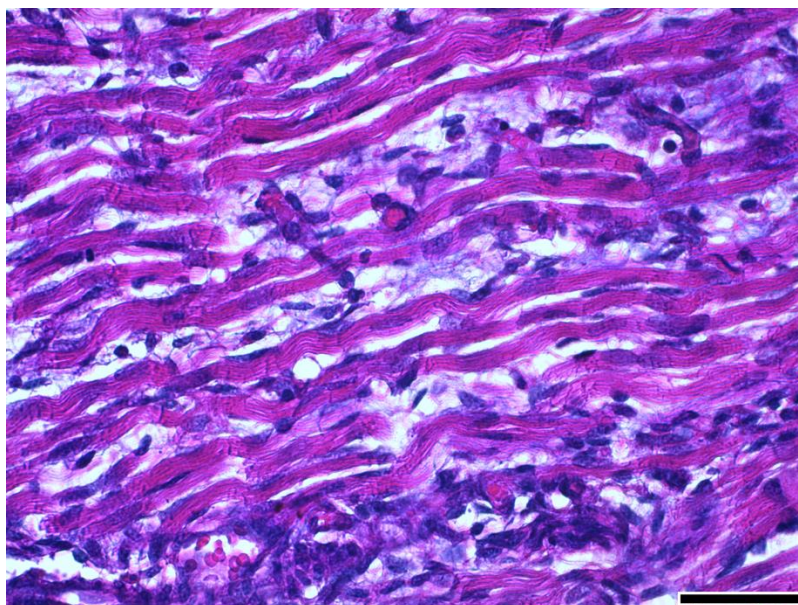


Slika 50. Mikrofotografija poprečno-prugastih mišićnih vlakna (grupa E II): Intracitoplazmatske nakupine PAS pozitivnih granula: a) PAS, x630, *scale bar* 50 μm ; b) PAS, x400, *scale bar* 100 μm

EKSPERIMENTALNA GRUPA (E I) – Poprečna ispruganost skeletnog mišića zamorca iz E I je jasno uočljiva. U citoplazmi miotubula uočavaju se krupna jedra sa uočljivim jedarcima, koja zauzimaju centralno mesto u ćeliji, a samo mali broj mišićnih vlakana sadrži jedra koja su periferno postavljena. Na pojedinim mestima unutar parenhima nalaze se grupice jedara sa uočljivim jedarcima, a granice ćelija kojima ona pripadaju su nejasne (**Slika 51**), dok se u perifernom delu fotografije uočavaju se , jasno formirana mišićna vlakna. Mišićna vlakana su međusobno razdvojena nešto većom količinom vezivnog tkiva (**Slika 52**). Unutar sarkoplazme na preparatima bojenim PAS metodom uočavaju se nakupine PAS pozitivnih granula. Njihova lokalizacija se u pojedinim vlaknima uočava rubno uz sarkolemu, dok se u drugim vlaknima granule raspoređene po celoj citoplazmi.



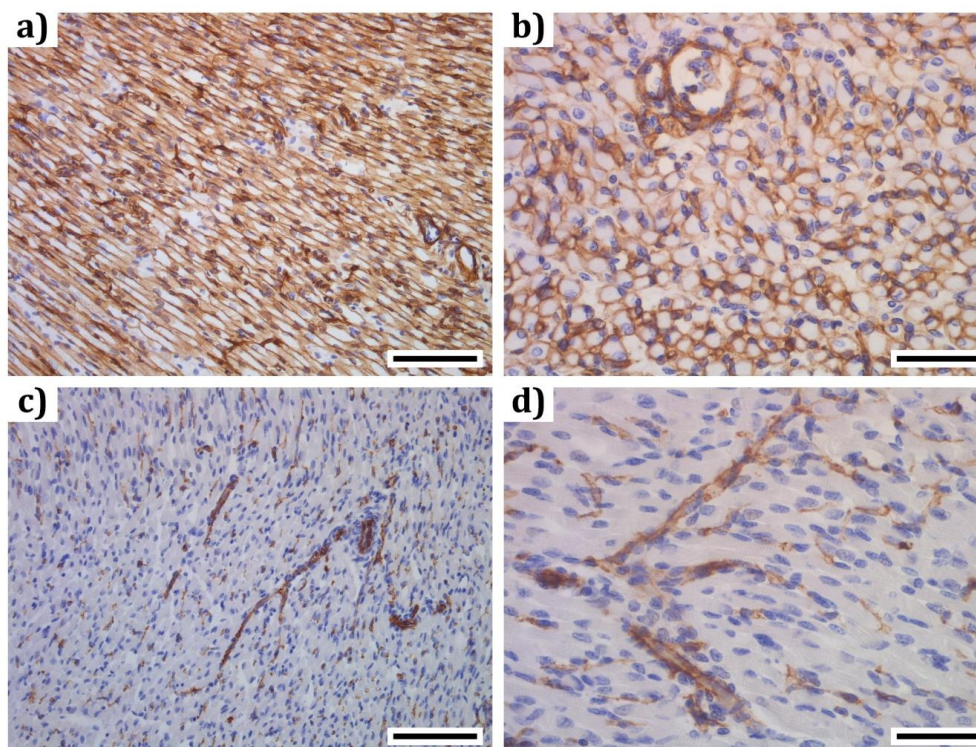
Slika 51. Mikrofotografija uzdužnog preseka skeletnog mišića fetusa zamorca iz E I grupe, H&E, x630, scale bar 50 μ m



Slika 52. Mikrofotografija poprečno-prugaste muskulature mišića buta jedinki iz E I grupe, Masson trihrom, 400x, scale bar 100 μ m

4.2.6. Imunohistohemijske karakteristike karakteristike poprečno-prugastog mišića

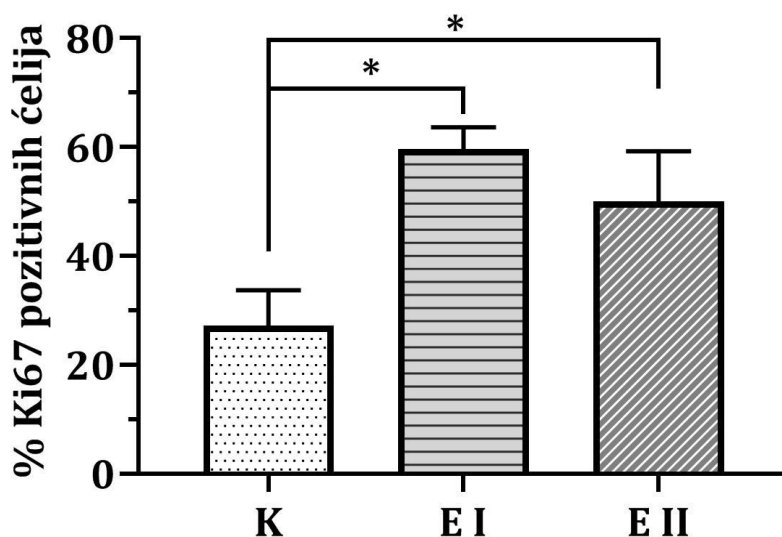
Analizom preparata skeletne muskulature bojenih imunohistohemijskim metodama nisu utvrđene značajni razlike između eksperimentalnim grupama u ekspresiji ispitivanih antigena. Ekspresija kolagen 4 antigena je detektovana u vezivno-tkivnom omotaču (endomizijumu / perimizijumu) kao i u bazalnim membranama pripadajućih vaskularnih struktura (**Slika 53 a i b**). Krvni sudovi endomizijuma u svim analiziranim grupama pokazuju jasnu pozitivnost na CD31 antitelo (**Slika 53 c i d**).



Slika 53. Imunoekspresija Coll IV i CD31 antigena na preparatima poprečno prugastog mišića: a) i b) Coll IV; c) i d) CD31; scale bar 200 μm (a i c), scale bar 100 μm (b i d)

Analiza imunoekspresije Ki67 antigena

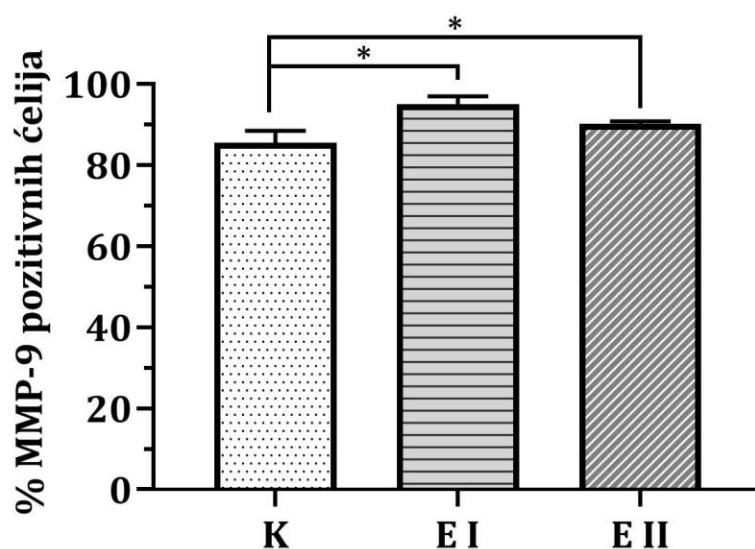
Analizom imunoekspresije Ki67 proliferativnog markera i određivanjem procenta pozitivnih ćelija na uzorcima poprečno-prugaste muskulature u grupi kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije uočene su najviše vrednosti. Procenat Ki67 pozitivnih ćelija u E I grupi iznosi $59,66 \pm 3,99\%$. Za grupu E II te vrednost je $50,05 \pm 9,21\%$, dok u kontrolnoj grupi prosečan broj Ki67 pozitivnih ćelija iznosio $27,16 \pm 6,53\%$ (**Grafikon 8**). Upotrebom statističkih testova dokazano je postojanje statistički značajne razlike između kontrolne i grupe E I, kao i između kontrolne grupe i grupe kojoj je vitamin C ukinut 20-og dana gestacije.



Grafikon 8. Procenat Ki67 pozitivnih ćelija na preparatima poprečno-prugastog mišića, * $p < 0,05$

Analiza imunoekspresije MMP-9 antigena

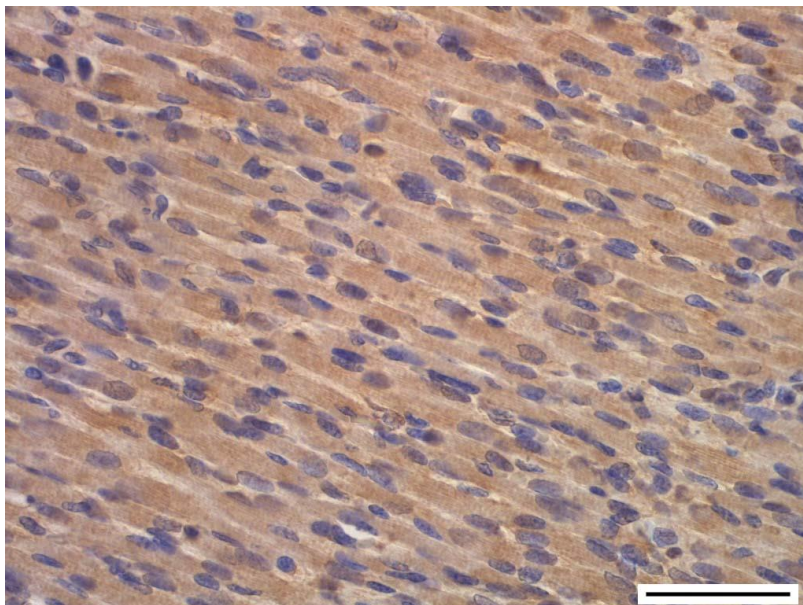
Ekspresija MMP-9 antigena, na preparatima poprečno-prugastog mišića, registrovana je u citoplazmi i u jedrima mišićnih ćelija. Određivanjem procenta mišićnih ćelija sa prisutnom nuklearnom ekspresijom urađen je za sve tri grupe. Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da je deficit vitamin C doveo do povećanja nuklearne ekspresije antigena MMP-9, dok dužina trajanja deprivacije nije imala uticaj na istu. Najveći procenat pozitivnih ćelija registrovan je u grupama E I ($94,97 \pm 2,01\%$) i E II ($90,11 \pm 0,71\%$), dok ju u kontrolnoj grupi iznosio $85,48 \pm 2,95\%$. Međusobnim poređenjem statistički značajna razlika je utvrđena između kontrolne i obe eksperimentalne grupe ($p < 0,05$) (**Grafikon 9**).



Grafikon 9. Prikaz procentulanog udela MMP-9 pozitivnih ćelija u uzorcima poprečno-prugastog mišića

Analiza imunoekspresije Slc23a1 antigena

Na preparatima poporečno prugaste muskulature registruje se citoplazmatska ekspresija Slc23a1 antigena u svim grupama, ali bez evidentnih kvantitativnih i kvalitativnih razlika u imunoekspresiji između analiziranih grupa (**Slika 54**).



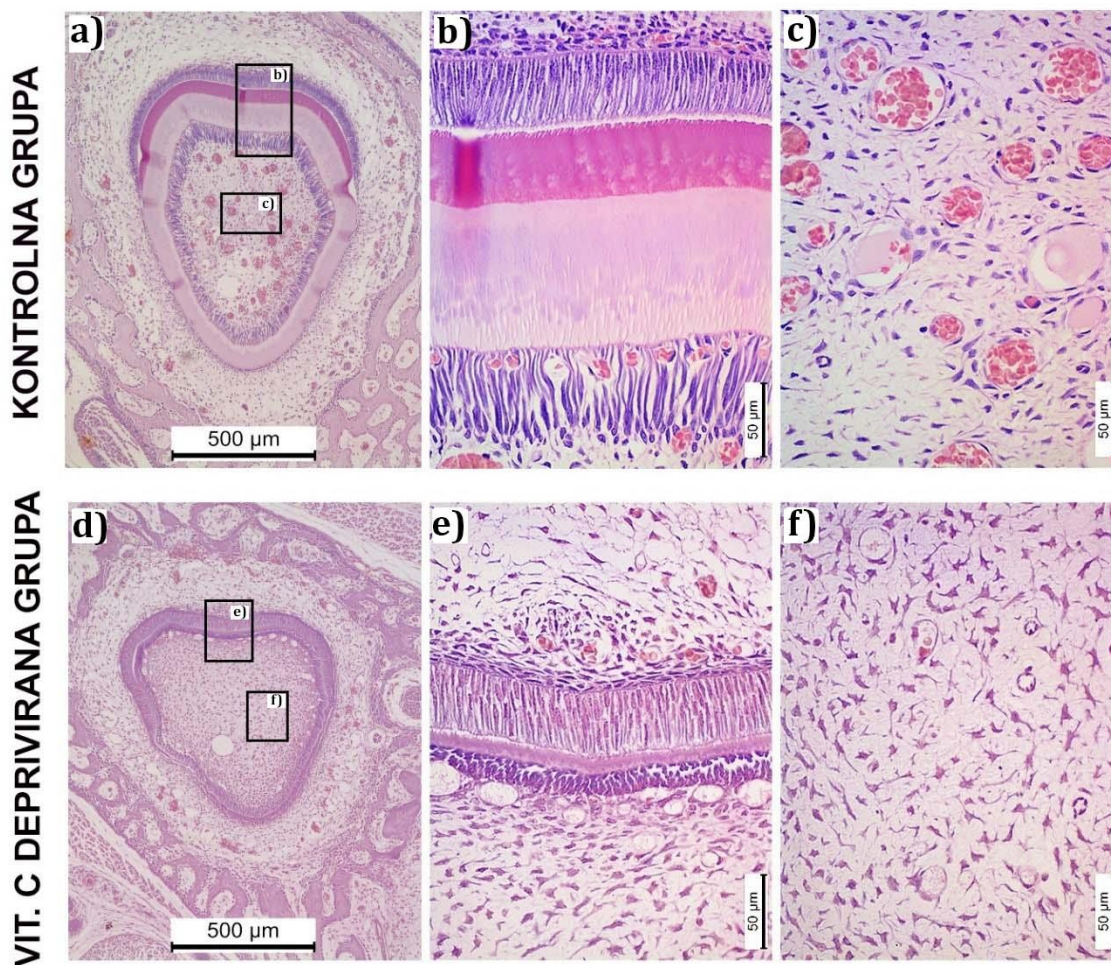
Slika 54. Imunoekspresija Slc23a1 unutar mišičnih vlakana poporečnoprugaste muskulature; x400, scale bar 100 μ m

4.2.4. Histomorfološke karakteristike zuba

Analizom histoloških preparata zuba nisu uočene bitnije histomorfološke ni imunohistohemijske razlike u pogledu uticaja dužine deprivacije vitaminom C na razvoj analiziranih struktura, tako da rezultati vezani za E II grupu u ovom odeljku neće biti prikazani.

Na histološkim preparatima zuba kontrolnih jedinki razvijenost zuba je adekvatna u odnosu na gestacijsku starost. Jasno se uočava dobra razvijenost tvrdih zubnih tkiva (gleđ i dentin) (**Slika 55a i 55b**). Čelije koje formiraju tvrda zubna tkiva, ameloblasti i odontoblasti, su dobro diferentovane (**Slika 55a**). Mezenhim unutar zuba je bogato vaskularizovan, od kog će daljim razvojem nastati zubna pulpa (**Slika 55c**). U neposrednoj okolini nađu se i jasno formirane koštane gredice alveolarnog ležišta zuba (**Slika 55**).

U vitamin C depriviranoj grupi evidentno je učljivo smanjenje debljine sloja dentina, a uz to vidi se i potpuni nedostatak sloja gleđi (**Slika 55d i 55e**). Ameloblasti nisu jasno diferentovani i nije došlo do bazalnog pomeranja jedara, a sloj ćelija odontoblasta je izrazito atrofičan sa ćelijama smanjene gustine i visine (**Slika 55e**). Mezenhim na mestu buduće zubne pulpe je slabo vaskularizovan (**Slika 55f**). Koštane gredice alveolarnog ležišta zuba su slabije razvijene i smanjene su debljine (**Slika 55d**).

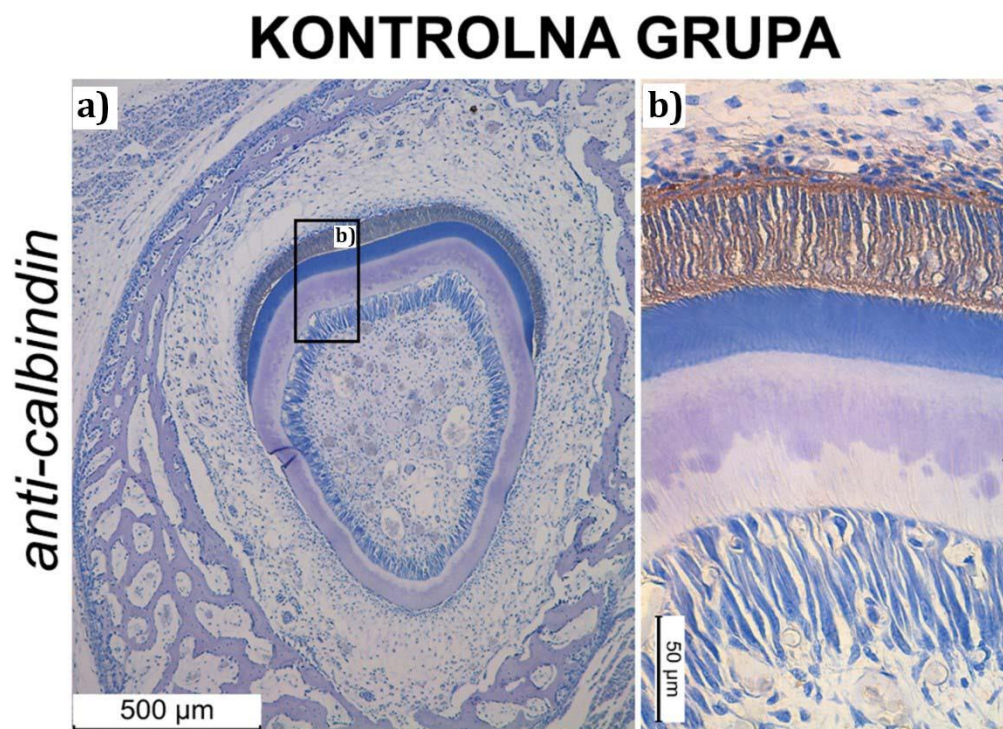


Slike 55. Mikrofotografije mandibule fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana , transverzalni presek zuba u stadijumu zvona : HE; a, d) x200; b, c, e, f) x 400.

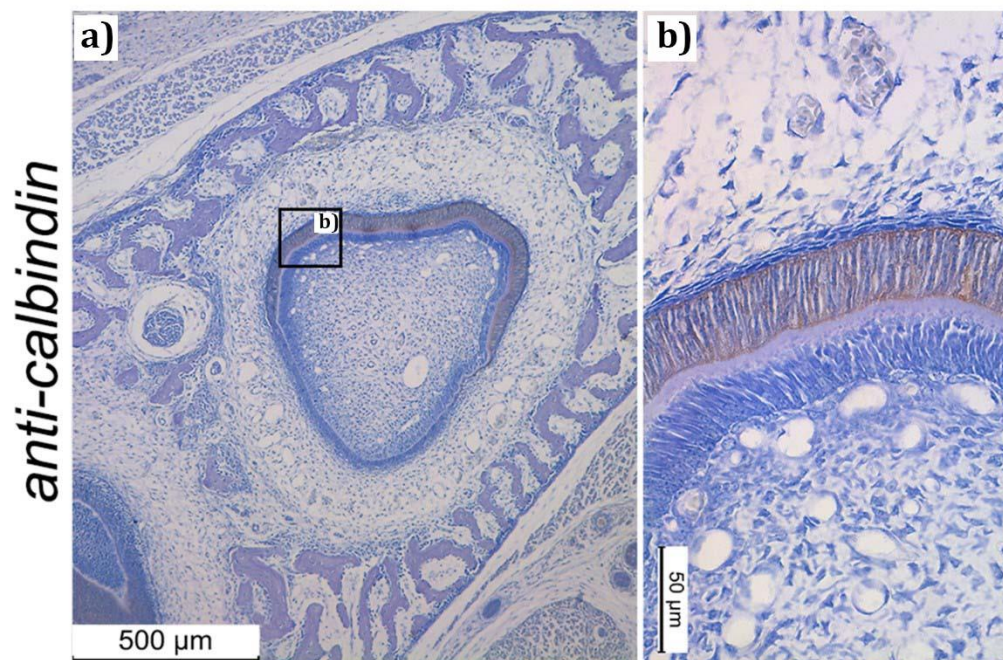
4.2. Imunohistohemijske karakteristike zuba

Na preparatima zuba primenjena su imunohistoheijska bojenja *Calbindin*, *SMA* i *Ostepontin* antitelima.

U kontrolnoj grupi na preparatima bojnim *Calbindin* imunohistohemijskim bojenjem uočava se imunopozitivnost u gleđnom epitelu, odnosno na ameloblastima. Proksimalno postavljene mezenhimalne ćelije takođe su pokazale imunopozitivnost na *calbindin* (**Slika 56**). Za razliku od kontrolne u E I grupi je imunopozitivnost na *calbindin* je u gleđnom epitelu smanjena. Evidentno je da su ameloblasti slabije imunopozitivni na *calbindin* dok je proksimalni mezenhim ostao imunonegativan (**Slika 57**).



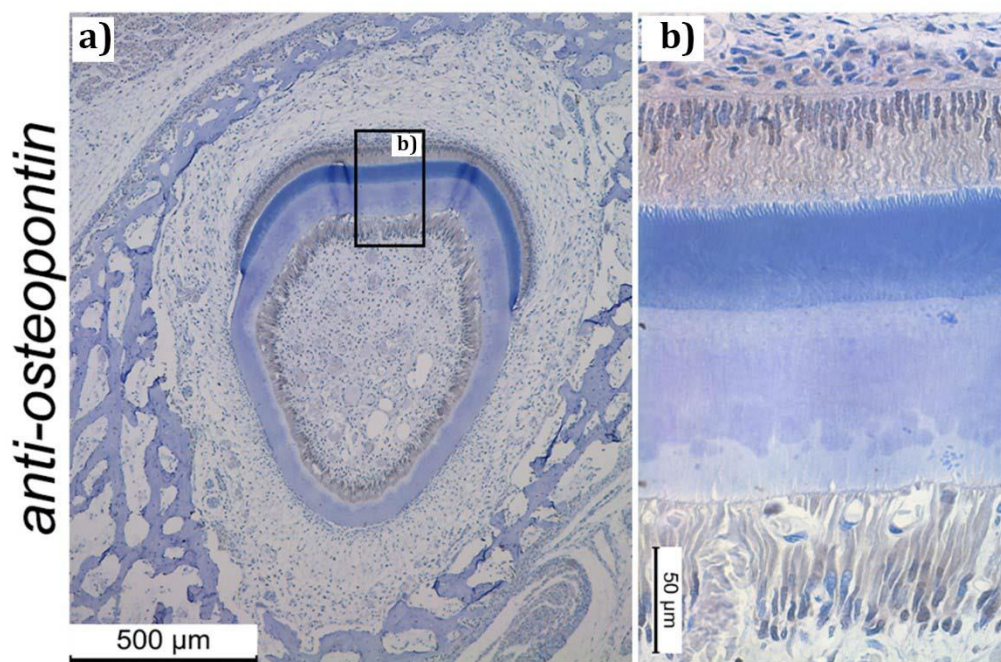
Slika 56. Imunoekspresija Calbindin antigena u kontrolnoj grupi- mandibula fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona: a) x200; b) x400.

VIT. C DEPRIVIRANA GRUPA

Slika 57. Imunoekspresija Calbindin antigena u grupi E I - mandibula fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona; a) x200); b) x400.

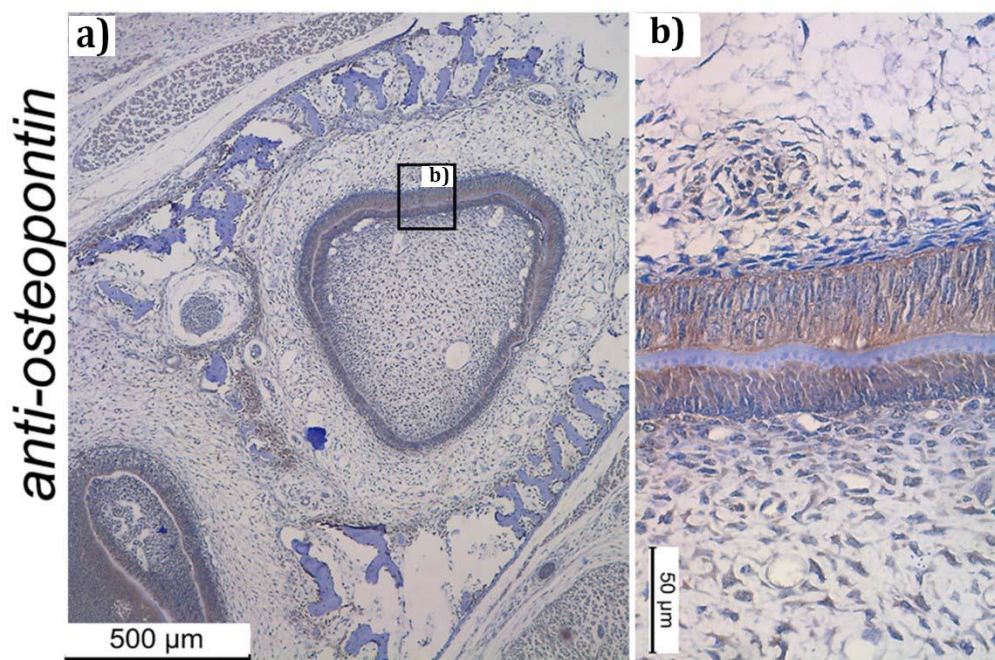
Bojenjem *Ospeopontin* antitelom u kontrolnoj grupi je, u vidu slabe imunopozitivnosti, registrovano u: gleđnom epitelu, ameloblastima i odontoblastnima (Slika 58). Dok je deficiti vitaminom C rezultova pojavom izražene imunopozitivnosti na osteopontin na skoro svim strukturama zuba. Gleđni epitel, ameloblasti, odontoblastni sloj, odontoblasti i mezenhim u okolini koštanih gredica je nedvosmisleno pokazao jasnu imunoekspresiju ispitivanog antigena (Slika 59).

KONTROLNA GRUPA



Slika 58. Imunoekspresija Osteopontin antigena - mandibula fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana (kontrolna grupa) - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona: a) x200; b) x400.

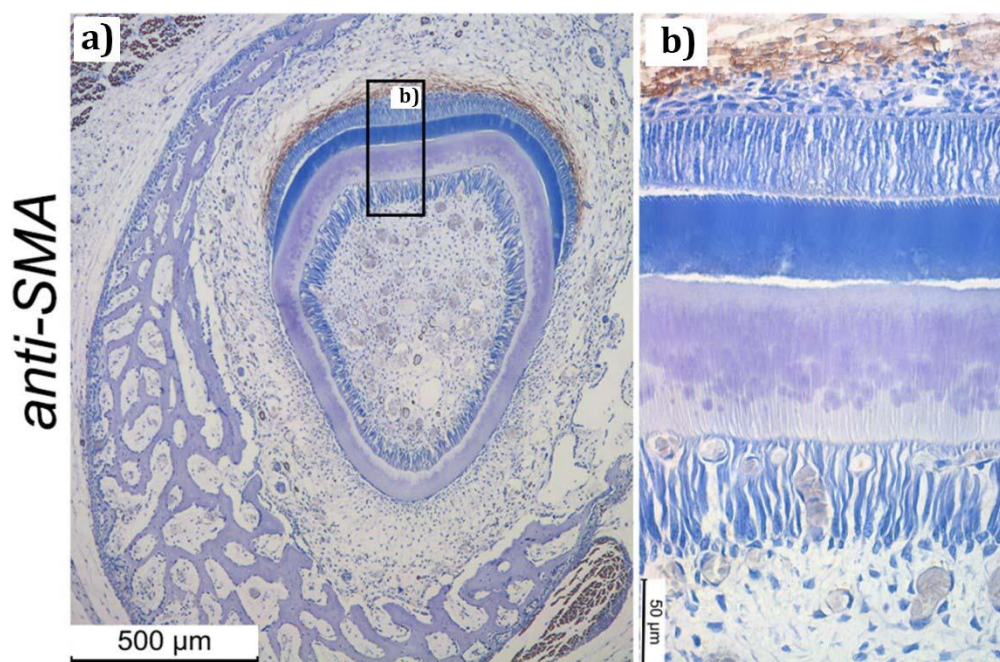
VIT. C DEPRIVIRANA GRUPA



Slika 59. Imunoekspresija Osteopontin antigena - mandibula fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana (grupa E I) - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona: **a)** x200;**b)** x400.

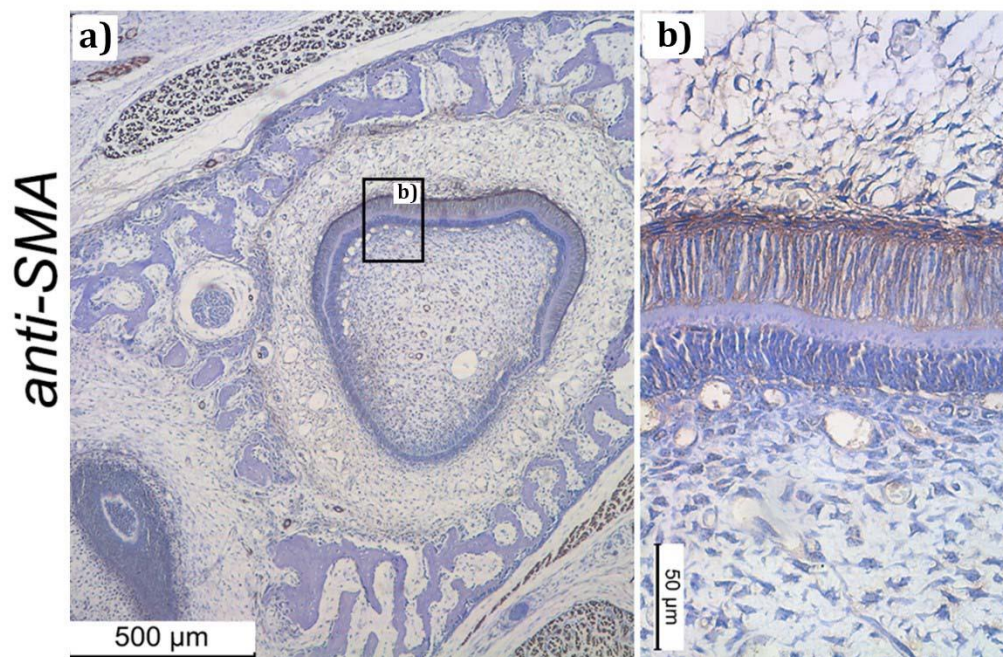
U kontrolnoj grupi proksimalni mezenhim, zvezdaste ćelije u okolini gleđnog epitela, je pokazao imunopozitivnost na SMA (**Slika 60**). U eksperimentalnoj grupi imunopozitivna je bila bazalna membrana gleđnog epitela kao i sami ameloblasti. Uočena je i imunopozitivnost mezenhima lokalizovanog u okolini koštanih gredica, dok je mezenhimno tkivo oko ameloblasta smanjene imunopozitivnosti (**Slika 61**).

KONTROLNA GRUPA



Slika 60. Mandibula fetusa zamorca gestacijske starosti 50 dana (kontrolna grupa) - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona – imunoekspresija SMA antigena: a) x200;b) x400.

VIT. C DEPRIVIRANA GRUPA



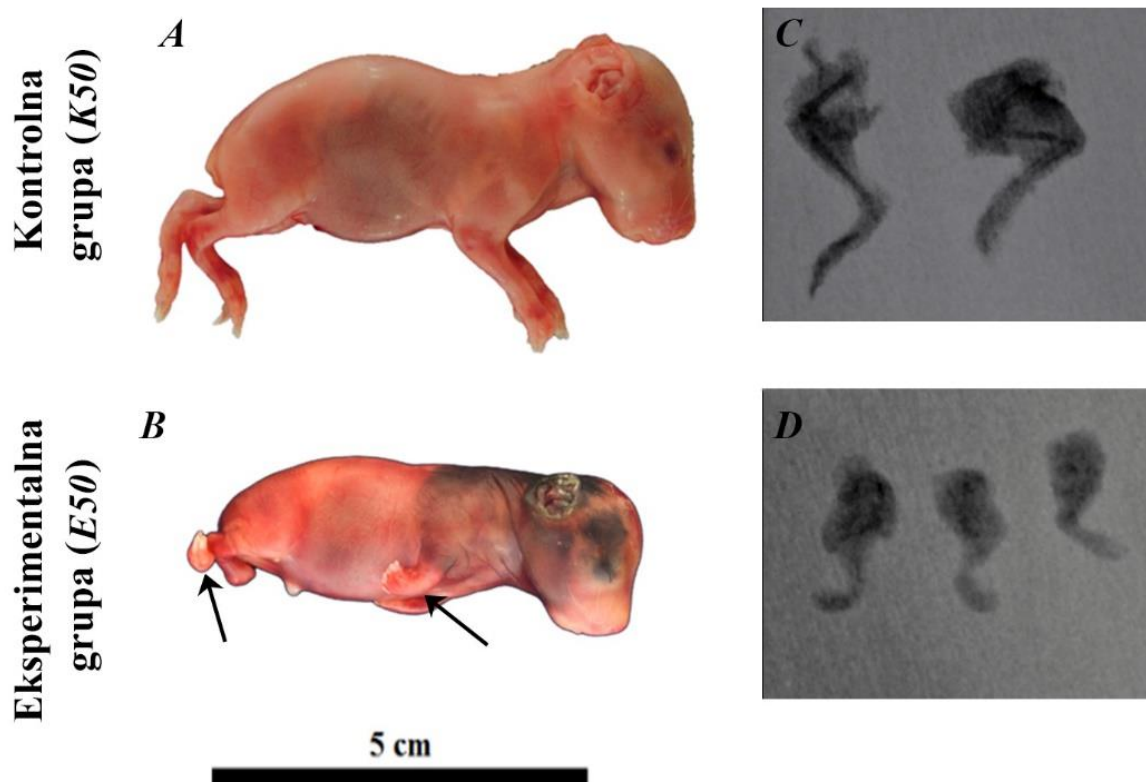
Slika 61. Mandibula fetusa zavorca gestacijske starosti 50 dana (grupa E I) - transverzalni presek donjeg sekutića u stadijumu zvona – imunoekspresija SMA antigena: a) x200; b) x400

4.2.5. Histomorfološke karakteristike koštanog tkiva

Na histološkim preparatima kosti nisu uočene bitnije histomorfološke razlike u pogledu uticaja dužine deprivacije vitaminom C na razvoj analiziranih struktura, pa rezultati vezani za E II grupu u ovom odeljku neće biti zasebno prikazani ako i ovde uvodis termin Vit C deprivirani, negde u u prethodnom odeljku i ovde napomeni da ce se promene u EI i EII grupi obihvatiiti pod opisom >Vit C de privirana grupa.

4.2. Makroskopska i radiološka analiza

Makroskopski, fetusi eksperimentalne grupe značajno su manjih telesnih dimenzija (**Slika 62**). Prisutna su velika područja lividne prebojenosti, koja odgovaraju supkutanim krvarenjima. Ekstremiteti su upadljivo manjih dimenzija i deformisanog izgleda (**Slika 62B**). Na radiografskim snimcima kontrolne grupe uočavaju se senke kalcifikovanog koštanog tkiva, jasnih kontura (**Slika 62C**). Nasuprot tome, snimke udova eksperimentalne grupe karakteriše dominantna mekotkivna senka bez jasnih koštanih kontura, sa tek mestimičnim intenzitetom kalcijuma (**Slika 62D**). Ovakva situacije govori u prilog da u osnovi skraćanja ekstremiteta nisu samo smanjene dimenzije kostiju, već i kompletno zaostajanje procesa okoštavanja.



Slika 62. Makroskopske karakteristike i radiografski snimci prednjih i zadnjih udova kontrolne (A) i eksperimentalne grupe jedinki (B). Udovi zamoraca eksperimentalne grupe su značajno redukovanih dimenzija i deformisanog izgleda (strelice). Radiografski snimci udova kontrolne (C) i eksperimentalne grupe (D). Za razliku od jasnih koštanih senki kontrolne grupe, na snimcima udova eksperimentalnih zamoraca dominira mekotkivna senka.

Histolomorfološke karakteristike metakarpalnih kostiju

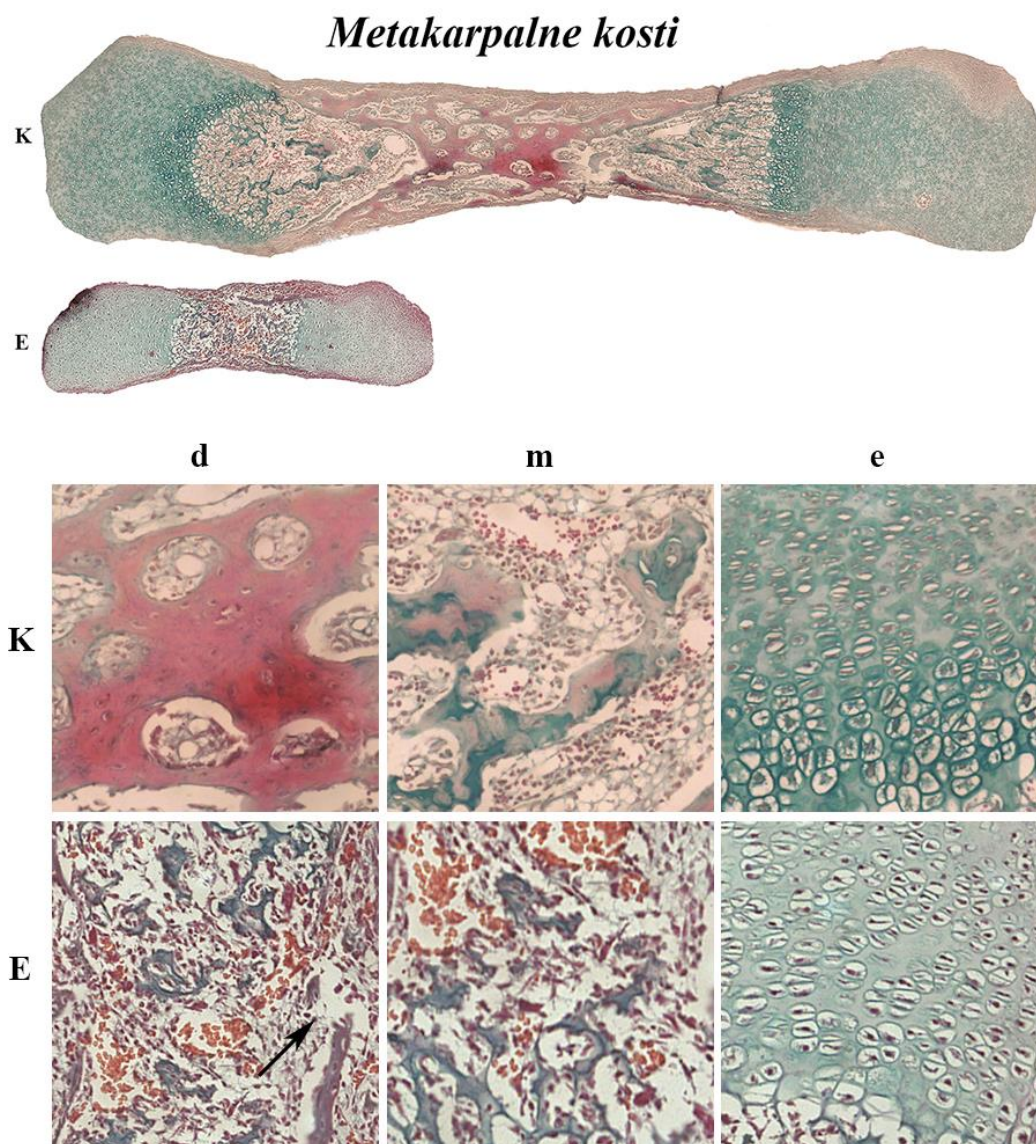
Kako bi se omogućila istovremena vizuelizacija hijaline hrskavice i novostvorene kosti (mineralizovanog matriksa) histološki preparati koštanog tkiva su bojani histohemijskim bojenjem *Alcian blue/alizarin red* (**Slika 63**).

Kod kontrolne grupe zamoraca dijafizu metakarpalnih kostiju izgrađuju centralno formirane koštane trabekule, koje međusobno konfluiraju. *Alizarin red* intenzivno crveno prebojava kalcifikovano koštano tkivo (**Slika 64Kd**). Na nivou metafize prisutna su ostrvca hrskavice. Hrskavičavo tkivo metafize i epifize pokazuje afinitet za *Alcian blue*, te se na preparatima registruje kao plavo prebojena zona. Fokalno prisutne zone crvenog prebojavanja ostrvaca ukazuju na početak deponovanja i kalcifikacije osteoida na površini hrskavice (**Slika 64Km**). Epifizna ploča rasta je pravilne kolumnarne organizacije i jasno diferenciranih zona (**Slika 64Ke**).

Na uzorcima iz E I grupe registruje se dijafiza metakarpalnih kostiju koja je značajno manjih dimenzija. U odnosu na formirane koštane gredice kontrolne grupe, dijafizu (**Slika 64Ed**) i metafizu (**Slika 64Em**) u E I grupi izgrađuju samo retki ostaci prethodnog hrskavičvog modela, bez znakova početka osifikacije. Slabije prebojavanje hrskavičavog tkiva u celini, ukazuje na znatno niži afinitet za *Alcian blue*. Međuprostor ispunjava veća količina eritrocita, dok se i subperiostalno uočavaju nakupine eritrocita iznad kojih je periost blago odignut i prekinut (**Slika 64Ed, strelica**). Epifizna ploča rasta je narušene kolumnarne organizacije. Hondrociti su većih dimenzija (hipertrofični), ali vidno redukovano broja. Lokalizovani su skoro čitavom dužinom epifizne hrskavice (**Slika 64Ee**). Osim u kosti, hemoragije su bile primetne i u okolnom mekom tkivu eksperimentalne grupe zamoraca (**Slika 63E**).



Slika 63. Prednji udovi kontrolne (K) i eksperimentalne (E) grupe zamoraca; Alcian blue/alizarin red, x 20



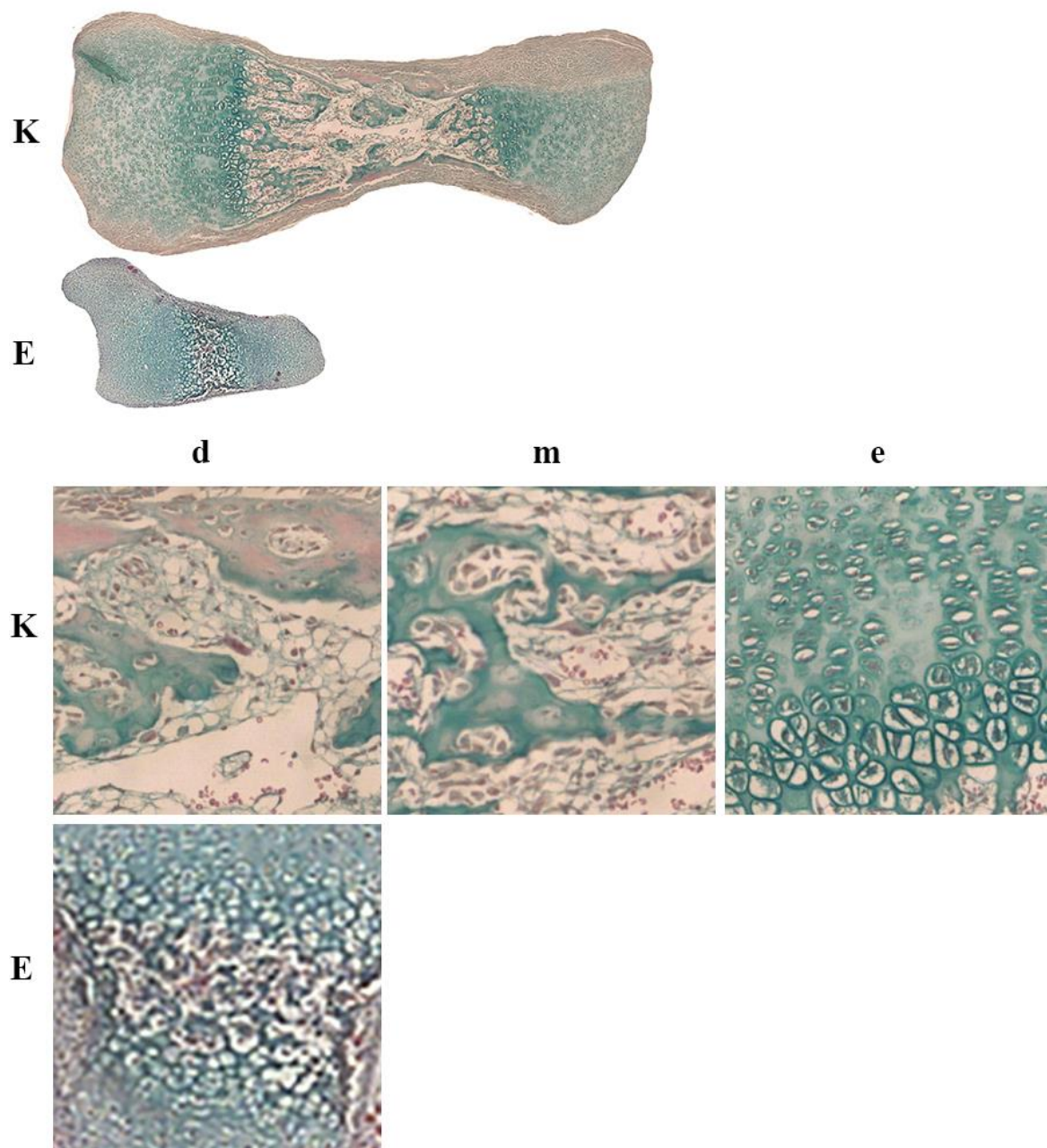
Slika 64. Metakarpalne kosti zamorca kontrolne (K) i eksperimentalne (E) grupe, Alcian&Alizarin, x20; dijafiza (d); metafiza (m); epifiza (e); K: Dijafiza metakarpalne kosti sa formiranim koštanim gredicama (Kd), hrskavičava ostrca metafize sa znacima okoštavanja (Km) i pravilan izgled epifizne ploče rasta (Ke). E: Hrkavičava ostrvca dijafize bez znakova okoštavanja. Međuprostor je ispunjen eritrocitima. Periost je delom odignut i prekinut (strelica) (Ed). Ostaci hrskavice i eritrociti međuprostora metafize (Em). Izgubljena je pravilna kolumnarna organizacija epifizne ploče rasta, a hipertrofični hondrociti uočavaju se čitavom dužinom epifizne hrskavice (Ee).

Histološke karakteristike proksimalnih falangi

Pregledom dijafiza proksimalnih falangi kod zamoraca iz kontrolne grupe registruju se isključivo ostaci hrskavice. Hrskavičavo tkivo je intenzivno prebojeno *Alcian blue* bojom. Fokalno se, unutar plavo obojenih ostrvca hrskavice, uočavaju zone crvenog kalcifikovanog osteoida na površini, ali još uvek bez formiranih koštanih gredica (**Slika 65Kd**). Ostrvca hrskavice metafize su bez znakova okoštavanja (**Slika 65Km**), dok je epifizna ploča rasta pravilne organizacije (**Slika 65Ke**).

Proksimalne falange eksperimentalne grupe zamoraca su u odnosu na kontrolne, drastično manjih dimenzija. Na falangama se uočava tek početak resorpcije hrskavice centralnog dela modela, bez znakova početka osifikacije (**Slika 65Kd**).

Opisane histomorfološke promene na dugim kostiju, potvrđujući radiološki nalaz. Prenatalni deficit vitamin C u trajanju od 40 dana je osnovni etiološki faktor koji je doveo do nastanka makroskopski uočenih deformiteta i histološki potvrđenog signifikantnog zaostajanje procesa okoštavanja hrskavice.

Proksimalne falange

Slika 65. Proksimalne falange zamoraca kontrolne (K) i eksperimentalne (E) grupe, Alcian&Alizarin, x20; dijafiza (d); metafiza (m); epifiza (e); K: Dijafiza proksimalne falange izgrađena od mešovutih ostrvaca - hrskavice sa prisutnim kalcifikovanim osteoidom (Kd), ostrvaca hrskavice metafize bez znakova okoštavanja (Km) i adekvatna organizacija epifizne ploče rasta (Ke). E: Na nivou proksimalne falange, uočava se tek početak resorpcije centralnog dela hrskavičavog modela (Ed).

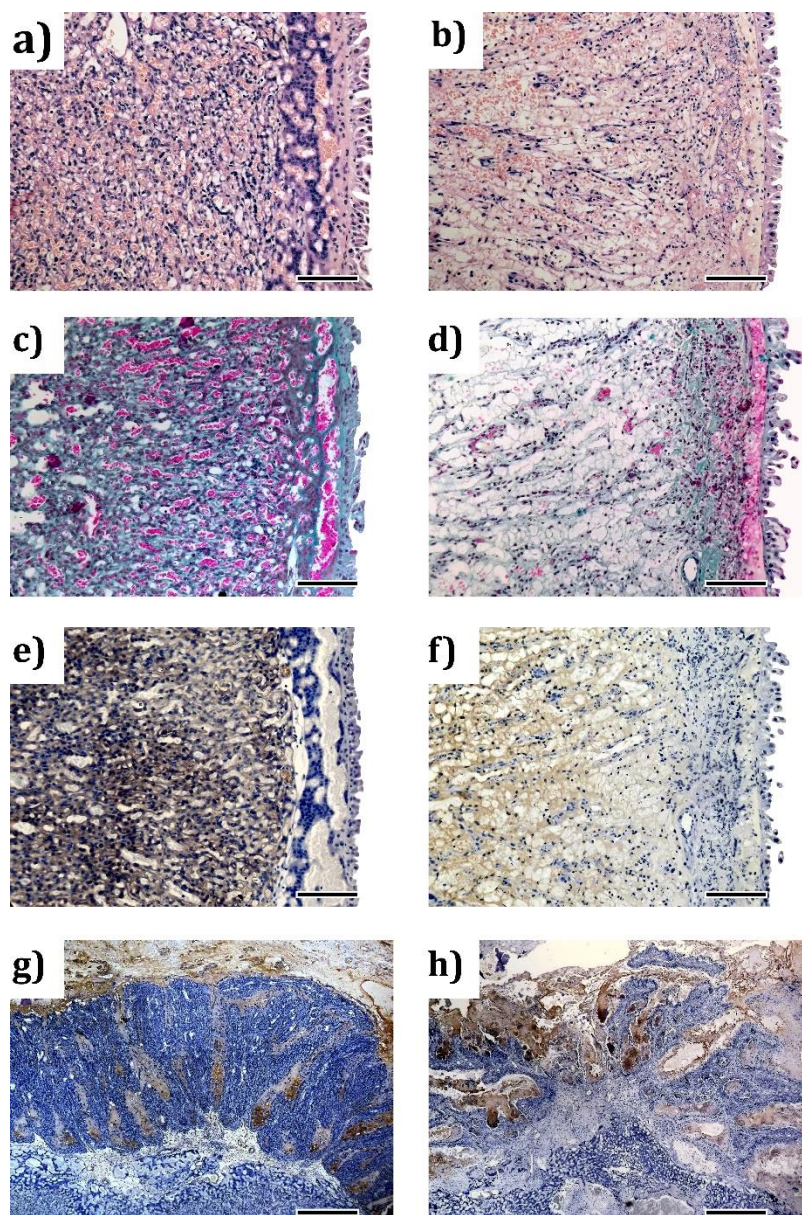
4.2.6. Histološke karakteristike placente

Najveći deo placente zamorca sastoji se od ne-kapilarizovanog i kapilarizovanog sincicijuma. U nekapilarizovanom kompartmentu zrele kontrolne placente razlikujemo marginalni i interlobarni sincicijum. Marginalni sincicijum se nalazi perifernije i sastoji se od trabekularne mreže sincitiotrofoblasta ispunjenih majčinom krvlju. Interlobarni sincicijum je imao istu histološku strukturu, ali je centralnije postavljen između režnjeva kapilarizovanog sincicijuma (lavirint) (**Slika 66, a,c,e**). Kod zrele placente jasno razlikujemo periferni, srednji i centralni deo lavirinta. Tkivo lavirinta predstavlja mrežu veoma tankih sincitioplazmatskih trabekula čiji zid formiraju endotelne ćelije sa bazalnom membranom i jednim slojem ćelija sincitiotrofoblasta (**Slika 66, a,c,e**).

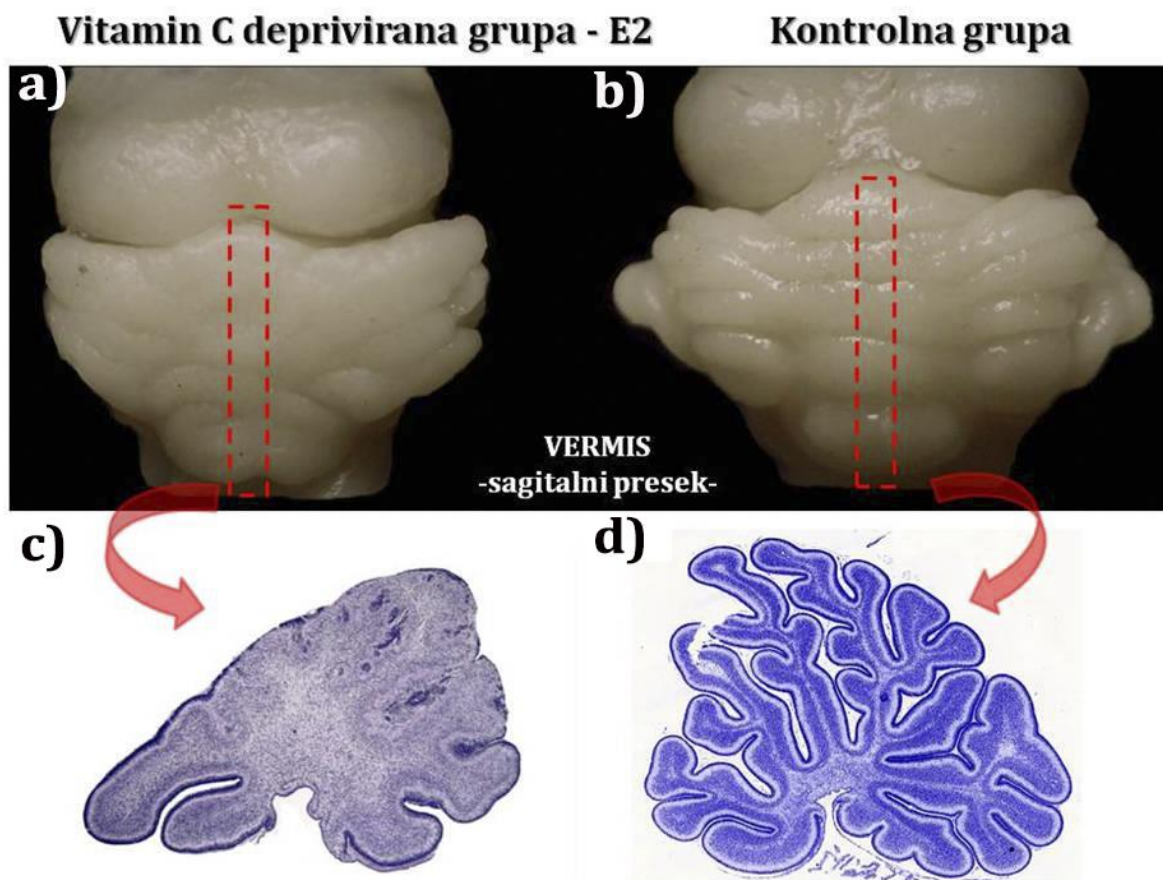
Histomofološke promene glavne placente kod zamorca lišenog vitamina C varirale su po intenzitetu i distribuciji između grupa. U grupi E I registrovana je destrukcija kapilarnog zida uglavnom u perifernom delu lavirinta (**Slika 66, b,d,f**). Zahvaćeni lobuli su se obično nalazili u bazalnom, materinskom delu placente. Oštećene sincitioplazmatske trabekule formirale su prostore nalik na lakune koji su prekriveni tankim slojem rezidualnih sincicijalnih ćelija (**Slika 66, b,d,f**). U E II grupi životinja primećeno je da oštećenje lavirinta izaziva posledično destrukciju interlobarnog i na kraju marginalnog sincicijuma. Destruktivne zone su ili transformisane u fibrinsku masu, koja predstavlja beli infarkt, ili su ispunjene eritrocitima iz krvarećih majčinih krvnih sudova i formiran je crveni infarkt.

Subplacenta u kontrolnoj grupi životinja 50-og dana gestacije je i dalje očuvana bez prisustva degenerativnih procesa. Sastavljen je od mezenhimalnih septa koje su bile okružene lamelama citotrofoblasta (**Slika 66 g**). U placentama iz vitamin C deprivirane grupe uočavaju se ekstenzivne degenerativne promene mezenhimalnog i trofoblastnog

delu subplacente. Lamelarni raspored citotrofoblasta je potpuno izgubljen i zamenjen akumulacijom acidofilnog materijala (**Slika 66 h**).



Slika 66. Histomorfološke karakteristike placente kod zamorca iz kontrolne i E I grupe, x 200, scale bar 200 μ m.

4.2.7. Histološke karakteristike malog mozga

Slika 67. Makroskopski i mikroskopski prikaz promena na malom mozgu

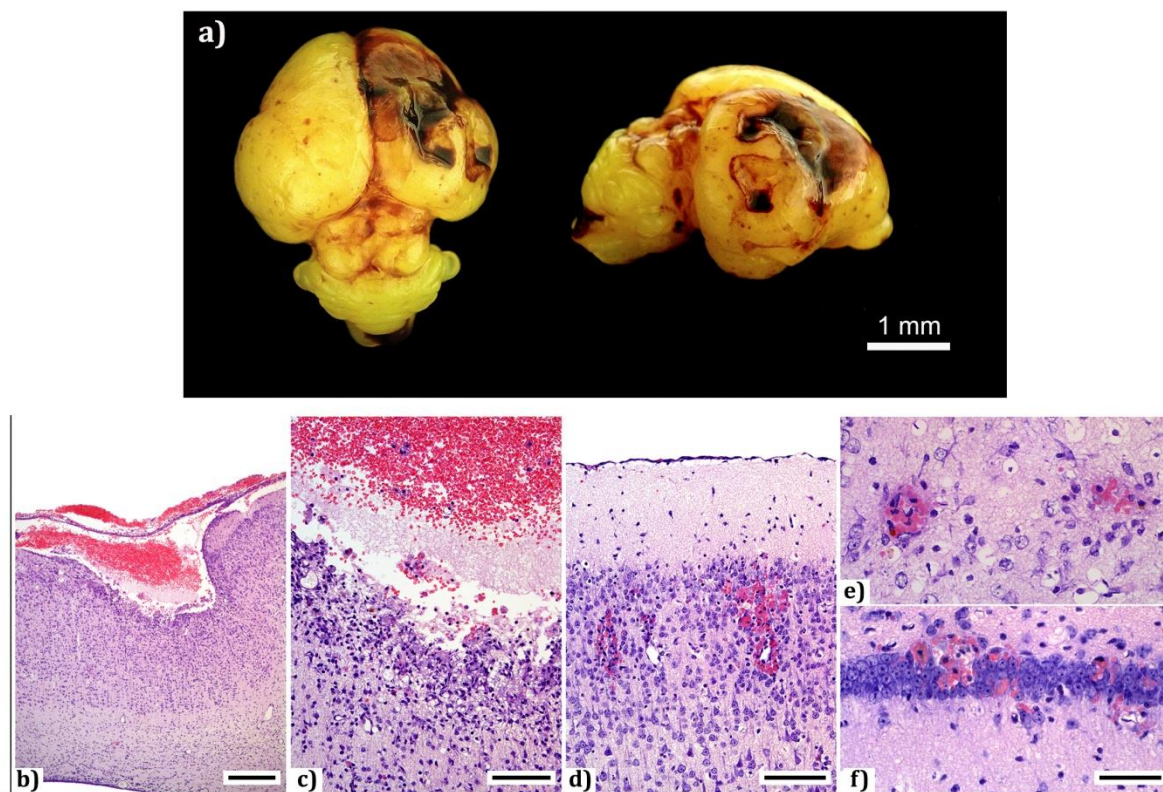
Makroskopskom analizom malog mozga utvrđena je očuvanost cerebelarne građe u kontrolnoj grupi (Slika 67 b) kao i naglašeno zaravnjenje moždane površine uz gubitak folija u eksperimentalnoj grupi (Slika 67 a). Histološkom analizom sagitalnog preseka vermalnog regiona uočava se pravilnost razvoja svih 10 folija sa subfolijama u kontrolnoj grupi (Slika 67 c) i izražena cerebelarna displazija u folijama od II-IX (Slika 67 d).

4.2.8. Histološke karakteristike velikog mozga

Histološkom analizom tkiva velikog mozga u obe eksperimentalne grupe uočava se abnormalnost bazalne membrane krvnih sudova i pijalne membrane. Fokalna, intraparenhimska krvarenja u moždanoj kori, hipokampusu, talamusu, hipotalamusu i malom mozgu (**Tabela 8**) uočena su kod malog broja fetusa iz E I grupe (do 30%). U većini slučajeva radilo se o fokalnom svežem krvarenju sa vidljivim eritrocitima oko malih kapilara u okolnom nervnom tkivu (**Slika 68 d**). Međutim, pronađeni su i hemosiderofagi kao jasan pokazatelj starog krvarenja (**Slika 68 e**). U E II grupi, uočeno je intraparenhimsko krvarenje u svim gore navedenim moždanim strukturama (**Tabela 8**). Kod preko 50% fetusa iz E II grupe registrovano je ekstenzivno, konfluentno subarahnoidno krvarenje koje duboko prodire i razara ispodležeće moždano tkivo, ali bez jasnih komunikacija sa komornim sistemom. U nekim slučajevima, lezija je čak dosegla do VI sloja moždane kore. Histološki ove porencefalne lezije liče na cističnu šupljinu ispunjenu svežom krvlju i ograničenu od okolnog moždanog tkiva sa encefalomalatičnim zidom sastavljenim od degenerisanih neurona, mnogobrojnih makrofaga (penastih histiocita) i povećanog broja glijalnih ćelija (**Slika 68 b-c**).

Tabela 8. Distribucija krvarenja u moždanom tkivu

GRUPA	<i>lokalizacija intraparenhinskog krvarenje</i>				<i>subarahnoidalno krvarenje</i>
	kora	hipokampus	talamus i hipotalamus	mali mozak	
K (n=20)	0	0	0	0	0
E 1 (n=21)	7	6	7	2	0
E 2 (n=19)	19	19	19	19	11

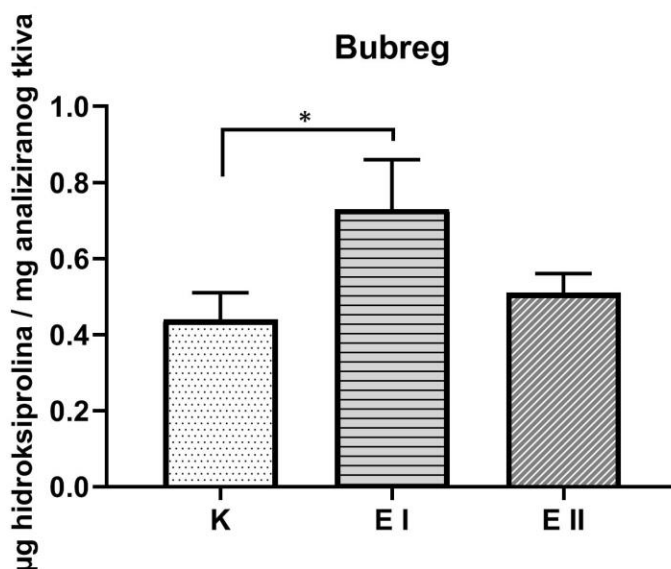


Slika 68. Makroskopske i histološke karakteristike velikog mozga kod zamoraca iz E I grupe: a) makroskopski nalaz; b-f) histološke karakteristike velikog mozga; a: scale bar 300 μm ; c-d: scale bar 100 μm , e-f: scale bar 50 μm

4.3. KOLIČINA HISROKSIPROLINA U TKIVU

4.3.1. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva bubrega

Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva bubrega iz kontrolne grupe iznosila je $0,44 \pm 0,07$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, dok je u E II ta vrednost iznosila $0,48 \pm 0,05$, odnosno $0,73 \pm 0,13$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ u grupi EI. Poređenjem aritmetičkih sredina količine hidroksiprolina između analiziranih grupa statistički značajna razlika je uočena između kontrolne grupe i grupe E I ($p=0,048$), dok razlika između kontrolne i E II grupe i između E II i E I nije statistički značajna (Grafikon 10) ($p \geq 0,05$).

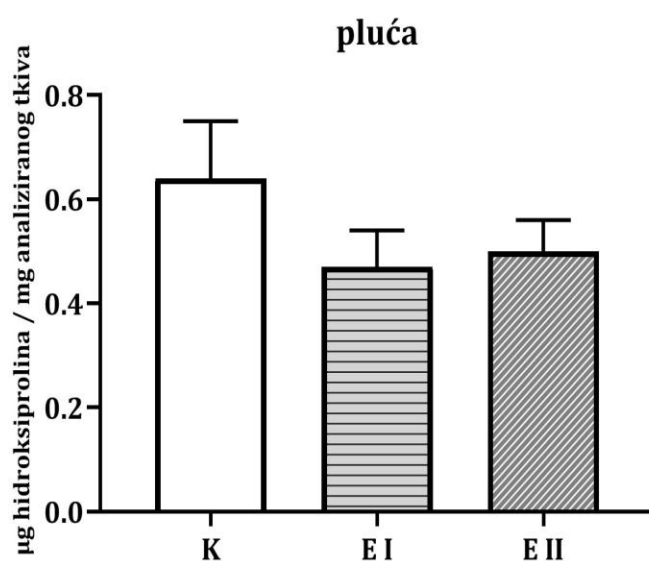


Grafikon 10. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva bubrega

* $p < 0,05$

4.3.2. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva pluća

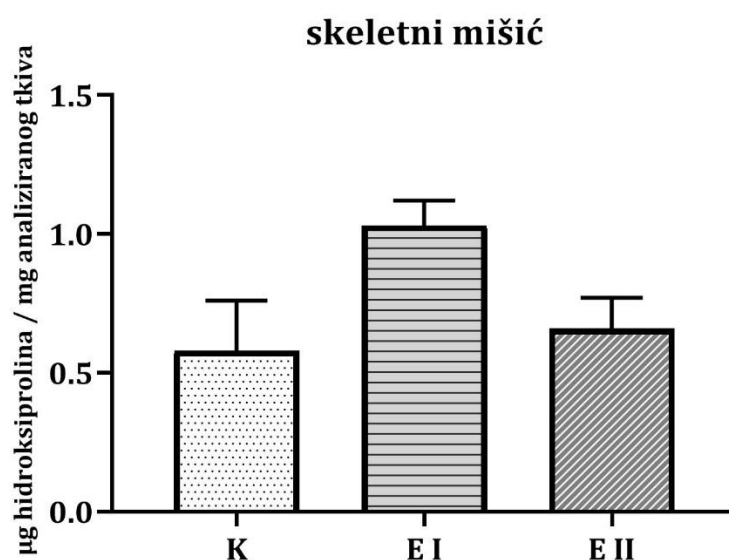
U parnehimu pluća iz kontrolne gupe količina hidroksiprolina iznosila je $0,64 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, u grupi E II $0,49 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a u grupi E I $0,48 \pm 0,07$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva (**Grafikon 11**). Između analiziranih grupa statistički značajna razlika nije dokazana.



Grafikon 11. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva pluća

4.3.3. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva iz skeletnog mišića

Analizom uzoraka skeletnog mišića prosečna količini hidroksiprolina u kontrolnoj grupi je $0,57 \pm 0,18$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, u E II grupi $0,66 \pm 0,11$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a u grupi kojoj je vitamin C ukinut 10-tog dana (E I grupi) $1,03 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 12**). Upotrebom ANOVA statističkog testa razlika između poređenih grupa nije dokazana ($p \geq 0,05$).

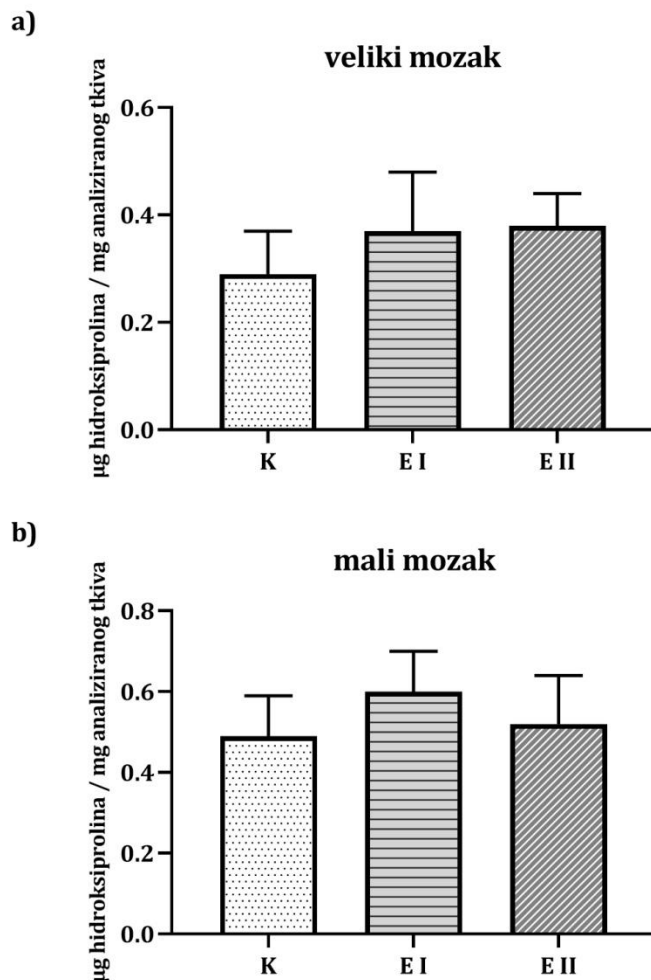


Grafikon 12. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva skeletnog mišića

4.3.4. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva velikog i malog mozga

Veliki mozak fetusa iz kontrolne grupe sadrži $0,31 \pm 0,08$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, u E II grupi $0,35 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, dok je ta vrednost u E I grupi $0,37 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 13**). Između pomenutih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika.

U uzorcima tkiva malog mozga kod kontrolne grupe dobijena je prosečna količina od $0,43 \pm 0,11$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, u drugoj eksperimentalnoj grupi $0,52 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a u E I grupi $0,60 \pm 0,11$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 13**). Međusobnim poređenim rezultata iz različitih eksperimentalnih grupa statistički značajna razlika nije dobijena ($p \geq 0,05$).



Grafikon 13. Grafički prikaz koncentracije hidroksiprolina u uzorcima tkiva velikog i malog mozga

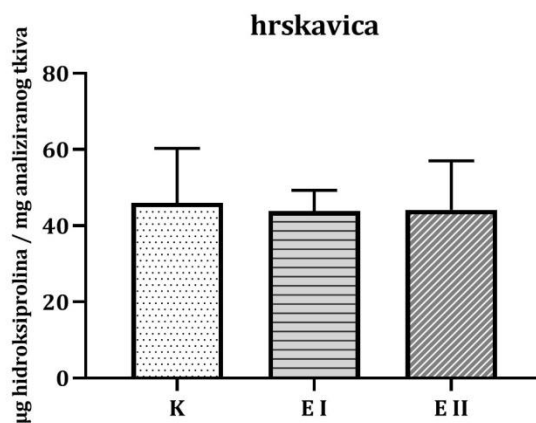
4.3.5. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva hrskavice, kosti i zuba

Za analizu koncentracije hidroksiprolina u hrskavici korišćen je ksifoidni nastavak grudne kosti (*processus xiphoideus*). Prosečna količina hidroksiprolina u kontrolnoj grupi iznosi $46,05 \pm 14,23$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, dok je u E I $43,86 \pm 5,47$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, odnosno $43,14 \pm 12,86$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva u grupi E II (**Grafikon 14a**). Nema statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$).

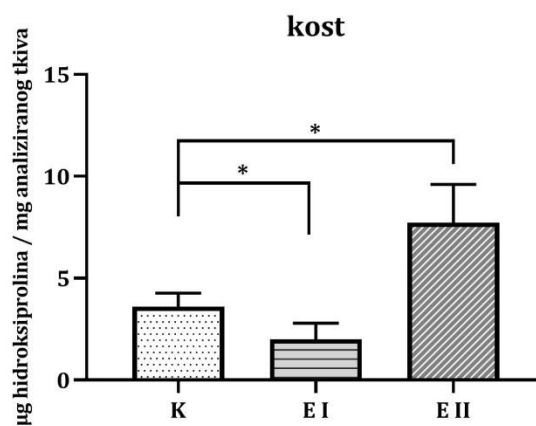
Kod uzoraka koštanog tkiva plodova iz kontrolne grupe hidroksiprolin je $3,18 \pm 1,54$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva. Vrednosti za E II grupu su $7,64 \pm 6,40$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, dok je kod plodova iz E I grupe određena količina od $2,01 \pm 1,76$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva (**Grafikon 14b**). Statističkom analizom dobijenih rezultata nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike među poređenim grupama ($p \geq 0,05$).

U uzorcima zuba u kontrolnij grupi određena je prosečna količina hidroksiprolina u iznosu od $18,40 \pm 2,97$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, dok je u E II grupi $13,56 \pm 3,68$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a u E I $9,85 \pm 0,79$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva (**Grafikon 14c**). Međusobnim poređenjem dobijenih vrednosti nije dokazana statistički značajna razlika ($p \geq 0,05$).

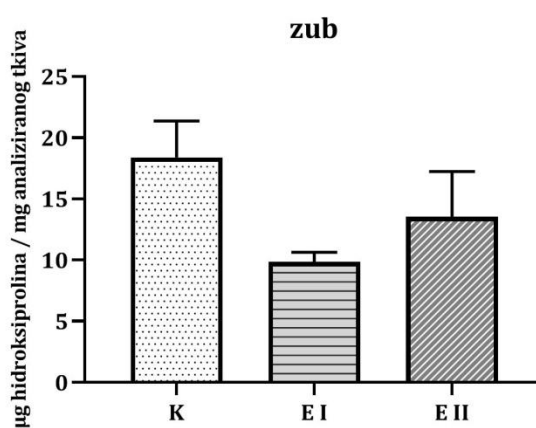
a)



b)



c)



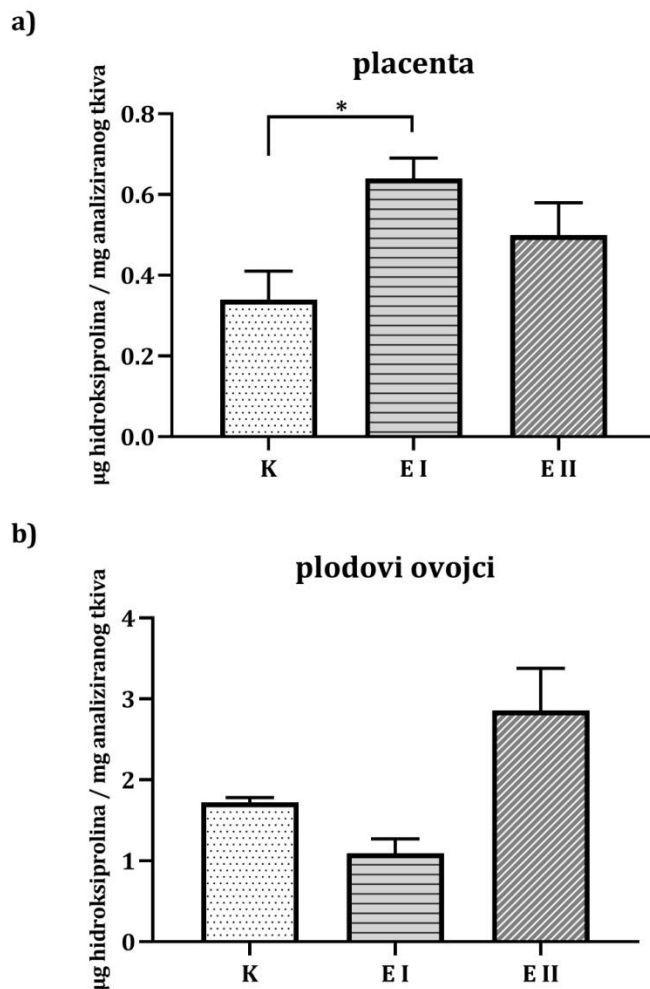
Grafikon 14. Grafički prikaz količine hidroksiprolina u uzorcima tkivahrskavice, kosti i zuba; * $p < 0,05$

4.3.6. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva placente i plodovih ovojaka

Količina hidroksiprolina na uzorcima tkiva, životinja iz kontrolne grupe, placentu je iznosila od $0,34 \pm 0,07$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, dok je u uzorcima plodovih ovojaka ta količina iznosila $1,72 \pm 1,0$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. U prvoj eksperimentalnoj grupi je količina hidroksiprolina u placenti iznosila $0,64 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, odnosno u plodovim ovojcima $1,09 \pm 0,18$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Kod životinja kojima je vitamin C ukinut 20. dana gestacije za uzorke placente dobijeno je $0,50 \pm 0,07$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, a za plodove ovojke $2,86 \pm 0,52$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 15**).

Analizom dobijenih rezultata za uzorke placente utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne i E I grupe ($p=0,049$), dok između ostalih grupa nema statistički značajne razlike.

Statističkom obradom podataka dobijenih za uzorke plodovih ovojaka nije utvrđena statistički značajna razlika između analiziranih grupa ($p \geq 0,05$).



Grafikon 15. Količina hidroksiprolina u placenti i plodovim ovojcima

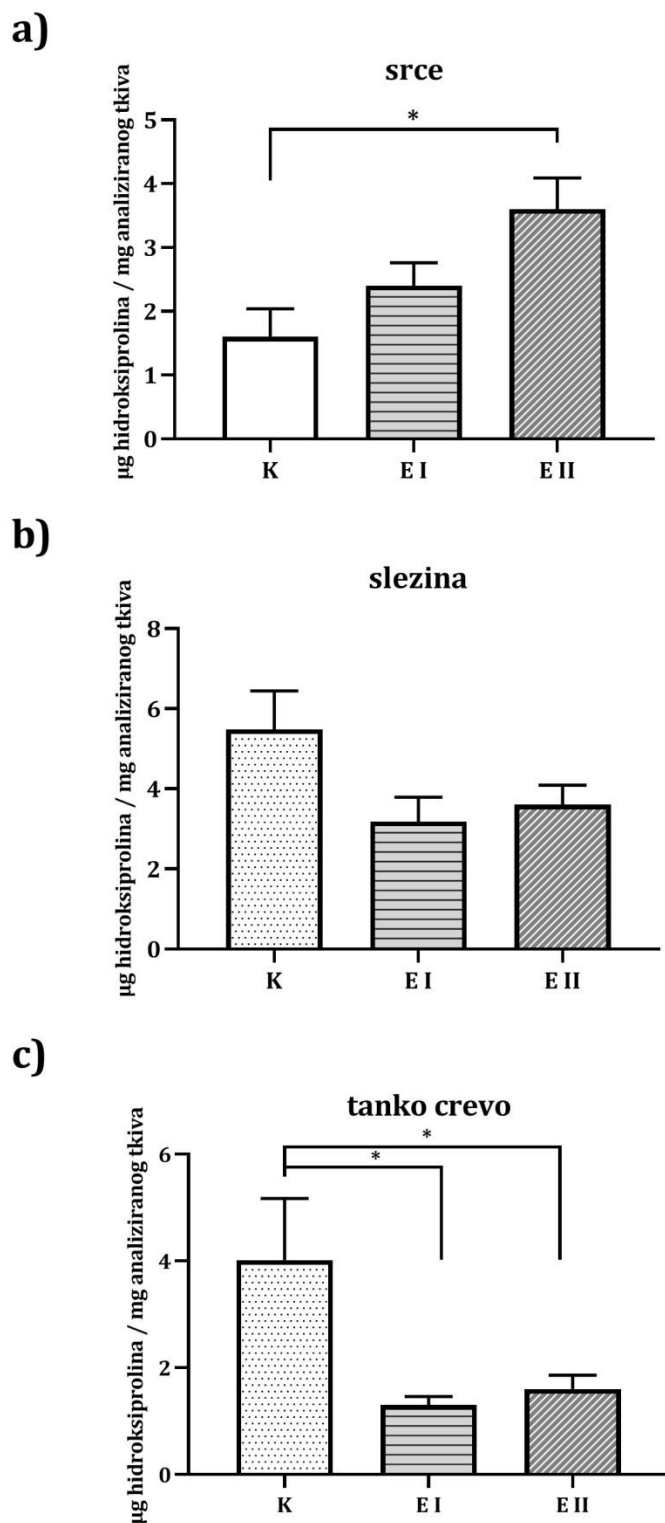
* $p < 0,05$

4.3.7. Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva hrskavice, srca, slezine i tankog creva

Količina hidroksiprolina u uzorcima tkiva srca je za kontrolnu grupu $1,60 \pm 0,44$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, za E I $2,49 \pm 0,36$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva, odnosno $3,29 \pm 0,54$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ za grupu E II (**Grafikon 16a**). Razlika među poređenim grupa nije statistički značajna ($p \geq 0,05$).

Na uzorcima iz slezine u kontrolnoj grupi dobijena je količina hidroksi prolina od $5,49 \pm 0,96$, dok je u E I i E II grupi iznosila $3,61 \pm 0,49$, odnosno $3,18 \pm 0,61$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 16b**). Među poređenim grupama nema statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$).

U kontrolnoj grupi u tankom crevu dobijena je količina od $4,02 \pm 1,15$ μg hidroksiprolina po mg analiziranog tkiva , dok je u prvoj eksperimentalnoj ta količina bila $1,30 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, a u drugoj $1,61 \pm 0,26$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ (**Grafikon 16c**). Analizom uzoraka tankog creva statistički značajna razlika je utvrđena između K i E I grupe ($0,042$), kao i između K i E II grupe ($p=0,040$).



Grafikon 16. Količina hidroksprolina u srcu, slezini i tankom crevu

* $p < 0,05$

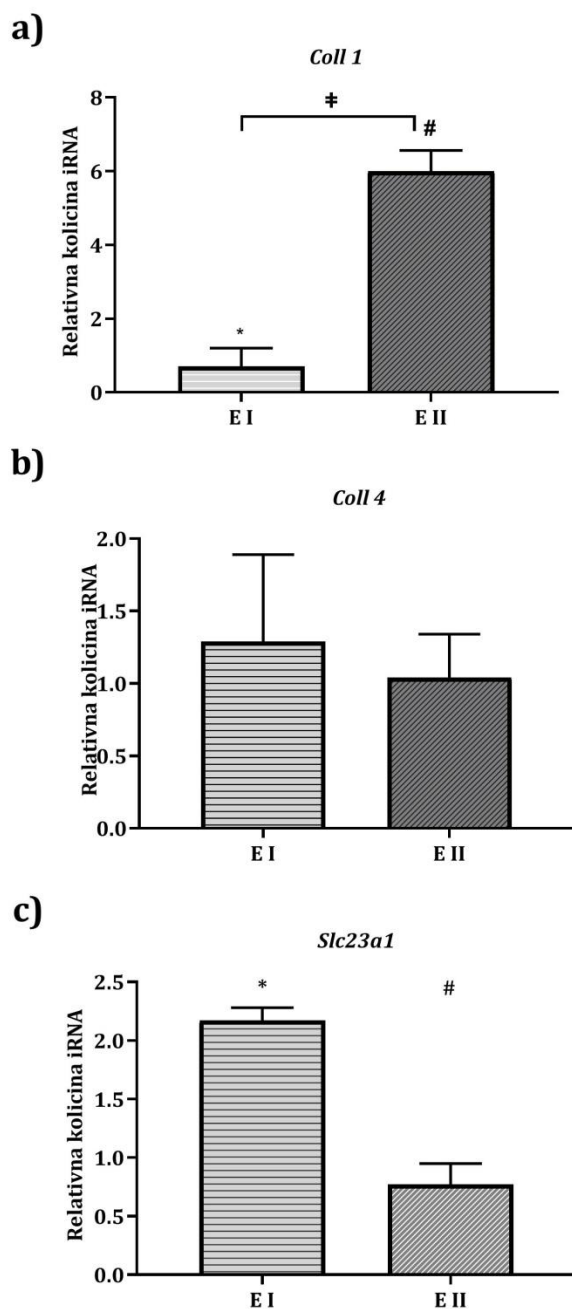
4.4. ANALIZA EKSPRIMIRANOSTI GENA

4.4.1. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc2 3a1* gena u uzorcima tkiva bubregu

Analizom ekspimiranosti gena koji kodira sintezu kolagena 1 (*Coll1*) uočeno je da je u E II grupi došlo do statistički znatnog povećanja ekspimiranosti u odnosu na kontrolnu grupu, dok je ukidanje vitamina C 10. dana gestacije rezultovalo smanjenju stepena ekspimiranosti (**Grafikon 17a**). Između kontrolne i obe eksperimentalne grupe postoji statistički značajna razlika, kao i između grupa E I i E II ($p < 0,05$).

Prenatalna deprivacija vitamina C nije imala uticaj na promenu stepena ekspimiranosti gena za kolagen 4 (*Coll4a1*) u uzorcima tkiva bubrega plodova zamoraca. Razlika između analiziranih grupa nije bila statistički značajna (**Grafikon17b**).

Prenatalni deficit vitamina C rezultovao je statistički značajnim povećanjem stepena ekspimiranosti gena koji kodira sintezu transportera vitamin C (*Slc3a1*) gena u parenhimu bubrega kod grupe kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije. Analizom dobijenih rezultata dokazana je statistički značajna razlika između obe eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,05$) (**Grafikon 17c**).



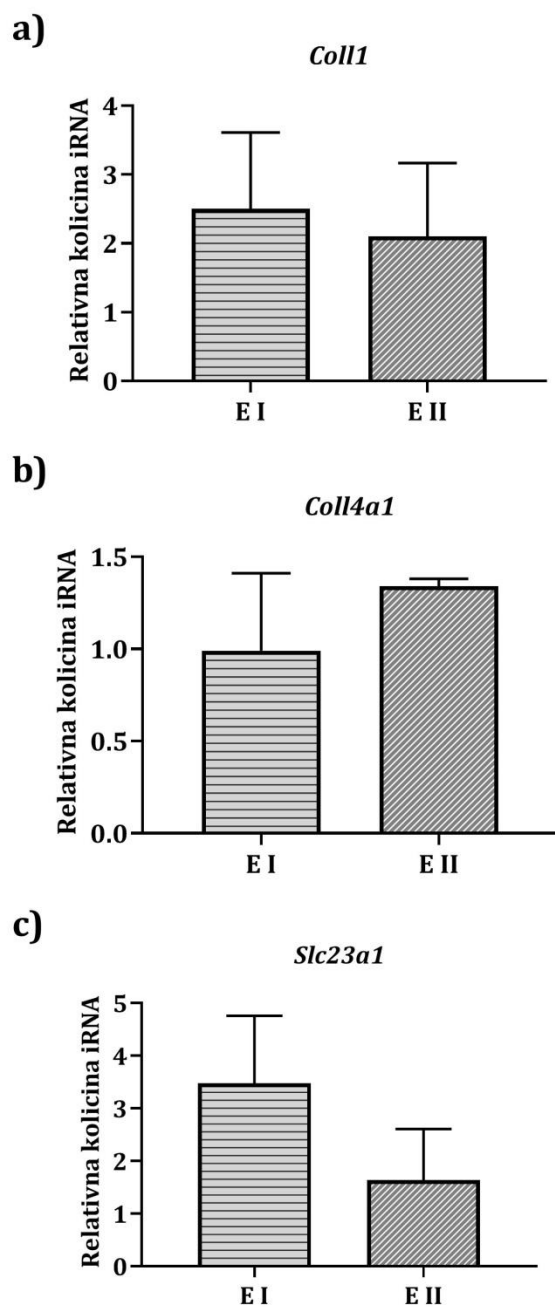
Grafikon 17. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u bubregu. Nakon žrtvovanja, za sve tri eksperimentalne grupe, je uzorkovano tkivo bubrega. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena. * Statistički značajna razlika između K i E I grupe. # Statistički značajna razlika između K i E II grupe. † Statistički značajna razlika između E I i E II grupe. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrednost $p < 0,05$.

4.4.2. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima tkiva pluća

Uočena je statistički značajna razlika u stepenu ekspimiranosti gena *Coll 1*. Ranije ukidanje vitamina C (grupa E I) dovelo je do značajnog smanjenja ekspimiranosti *Coll1* gena u uzorcima tkiva pluća (**Grafikon 18a**). U drugoj eksperimentalnoj grupi registrovan je suprotan efekat. Deficit vitamina C od 20-og dana gestacije rezultovao je u značajnom povećanju stepena ekspimiranosti. Između poređenih grupa uočana je statistički značajna razlika.

Relativna ekspimiranost gena *Coll4a1* je pokazala trend smanjenja ekspimiranosti. U grupi E I je dokazano smanje ekspimiranosti za 65% u odnosu na kontrolu, dok u grupa E II prati trend, ali bez značajnog smanjenja (**Grafikon 18b**). Među poređenim grupama nije dokazana statistički značajna razlika ($p \geq 0,05$).

Duži prenatalni deficit vitamina C nastao (nastao isključivanjem vitamin C iz ishrane 10-og dana gestacije) doveo je do povećanja stepena ekspimiranosti *Slc23a1* gena (**Grafikon 18c**). Statističkom analizom dobijenih podataka, statistički značajna razlika nije dokazana ($p > 0,05$).



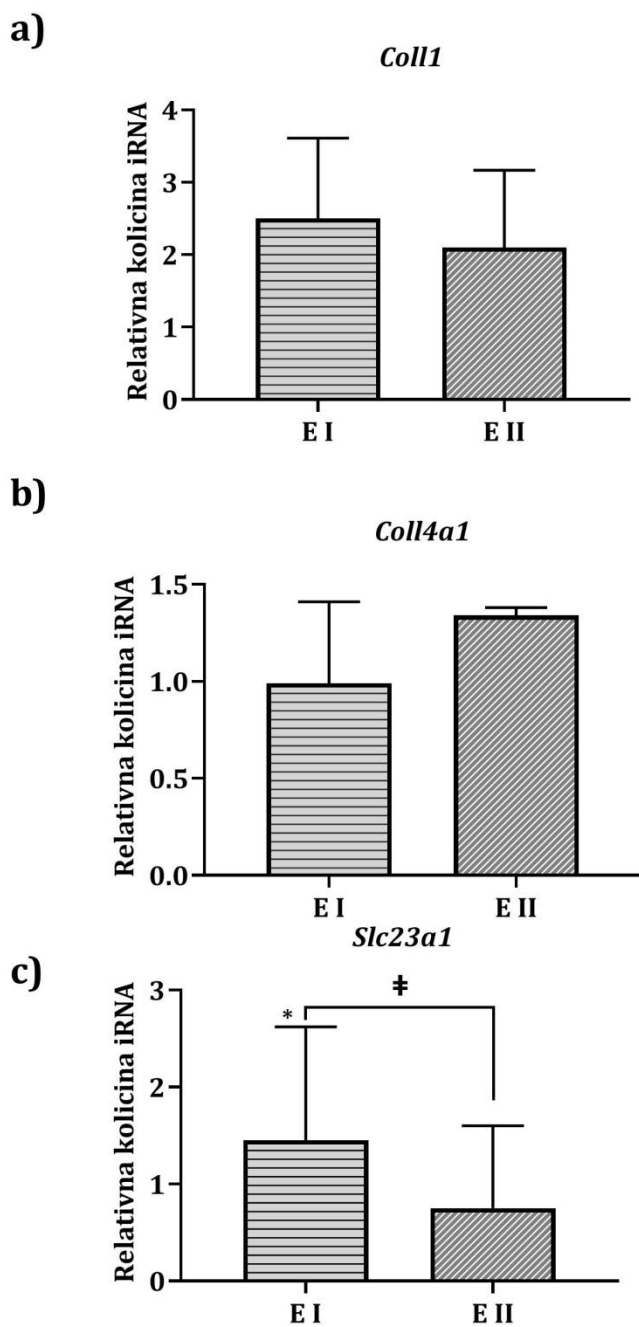
Grafikon 18. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u parenhimu pluća. Nakon žrtvovanja plodova zamorca, za sve tri eksperimentalne grupe, je uzorkovan plućni parenhim. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena. # Statistički značajna razlika između K i E II grupe. † Statistički značajna razlika između E I i E II grupe. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrednost $p < 0,05$.

4.4.3. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima tkiva skeletne muskulature

Ukidanje vitamina C desetog dana gestacije dovelo je do smanjenja stepena ekspimiranosti *Coll1* gena, u uzorcima tkiva poprečno-prugastog mišića. U uzorcima iz E II grupe smanjenje stepena ekspimiranostie analiziranog gena nije utvrđeno. Statističkom analizom pomoću *ANOVA* testa dokazana je visoka statistički značajna razlika u stepenu ekspimirnosti između K i E I grupe, kao i između E I i E II grupe ($p < 0.001$) (**Grafikon 19a**).

Ekspimiranost *Coll4a1* gena je u E II grupi smanjenja, dok nedostatak vitamin C od 10. dana gestacije nije rezultovao promenom stepena ekspimiranost ispitivanog gena. Statističkom obradom dobijenih podataka nije dokazano postojanje statistički značajne razlike između poređenih grupa ($p > 0,05$) (**Grafikon 19b**).

Prenatalna deprivacija vitamina C, u uzorcima tkiva poprečno-prugaste muskulature nije rezultovala promenama u stepenu ekspimiranosti gena *Slc23a1* (**Grafikon 19c**).



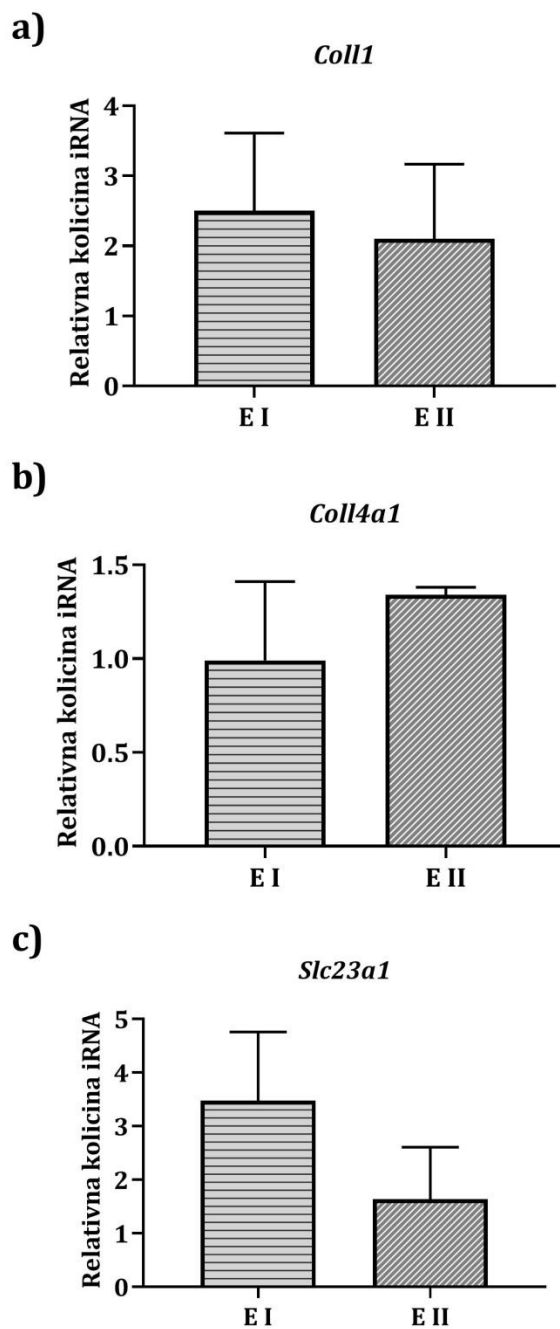
Grafikon 19. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u poprečno-prugastom mišićnom tkivu. Nakon žrtvovanja plodova zamoracae uzorkovan je butni mišić. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena.

4.4.4. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima tkiva velikog mozga

Na analiziranim uzorcima, u obe eksperimentalne grupe, dokazano je povećanje stepena ekspimiranosti *Coll1* gena. Dužina prenatalnog deficit vitamina C nije pokazala statistički značajna razlika u stepenu ekspimiranosti analiziranog gena ($p>0,05$) (**Grafikon 20a**).

Uticaj tretmana na ekspimiranost *Coll4a1* gena u uzorcima tkiva velikog mozga nije dokazan (**Grafikon 20b**). Među poređenim grupama nije registrovana statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Deprivacija vitamin C imala je uticaj na ekspimiranost *Slc23a1* gena, to jest u obe eksperimentalne grupe registrovana je značajna promena stepena ekspimiranosti. Utvrđena razlika nije bila statistički značajna ($p>0,05$) (**Grafikon 20c**).



Grafikon 20. Ekspimiranost *Coll4a1*, *Coll1* i *Slc23a1* gena u parenhimu velikog mozga. Nakon žrtvovanja plodova zamoraca, za sve tri eksperimentalne grupe, je uzorkovan moždani parenhim. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena.

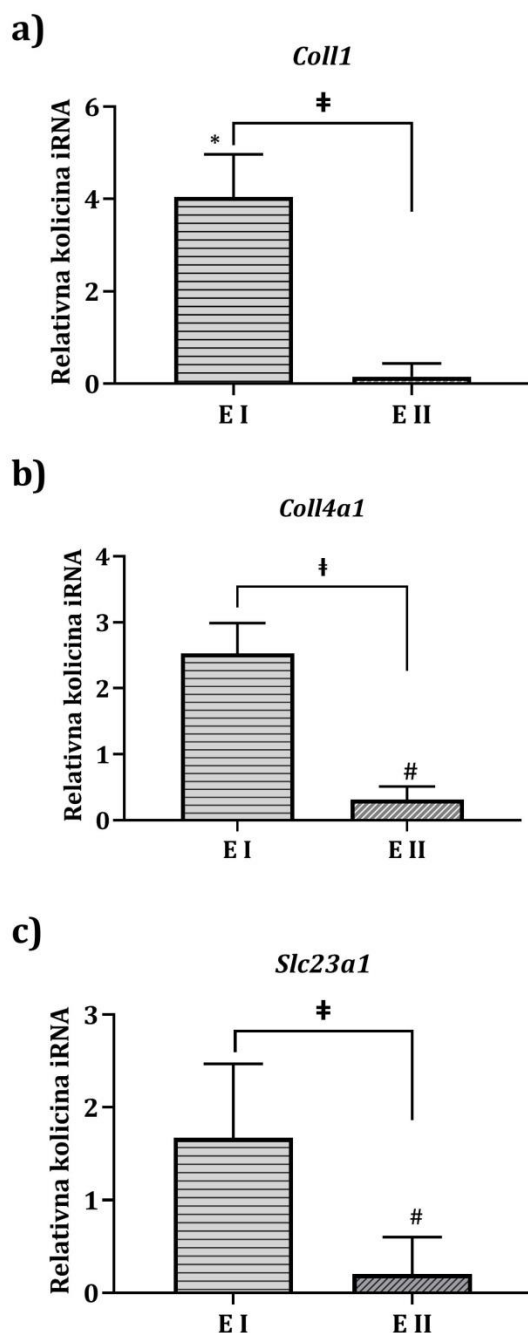
4.4.5. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima tkiva malog mozga

U eksperimentalnim grupama je za sva tri analizirana gena, u uzorcima tkiva malog mozga, tretman imao uticaj na ekspimiranosti. Naime, ranije ukidanje vitamina C dovelo je do značajnog povećanja stepena ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena, dok je na uzorcima iz E II grupe registrovano smanjenje stepena ekspimiranosti svih analiziranih gena (**Grafikon 21**).

Statističkom obradom podataka vezanih za ekspimiranost *Coll1* gena dokazana je statistički značajna razlika između kontrolne i E I grupe ($p < 0,05$), kao i između E I i EII grupe ($p < 0,001$).

Za ekspimiranost *Coll4a1* gena, statistički značajna razlika je dobijena među uzorcima iz K I E II grupe ($p < 0,05$), odnosno između grupa E I i E II ($p = 0,001$).

Analizom dobijenih rezultata vezanih za ekspimiranost *Slc23a1* gena utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između kontrolne i E II grupe i između obe eksperimentalne ($p < 0,05$).



Grafikon 21. Ekspimiranost *Coll4a1*, *Coll1* i *Slc23a1* gena u malom mozgu. Nakon žrtvovanja plodova zamoraca uzeti su uzorci parnhima malog mozga. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena. # Statistički značajna razlika između K i E II grupe. ‡ Statistički značajna razlika između E I i E II grupe. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrednost $p < 0,05$.

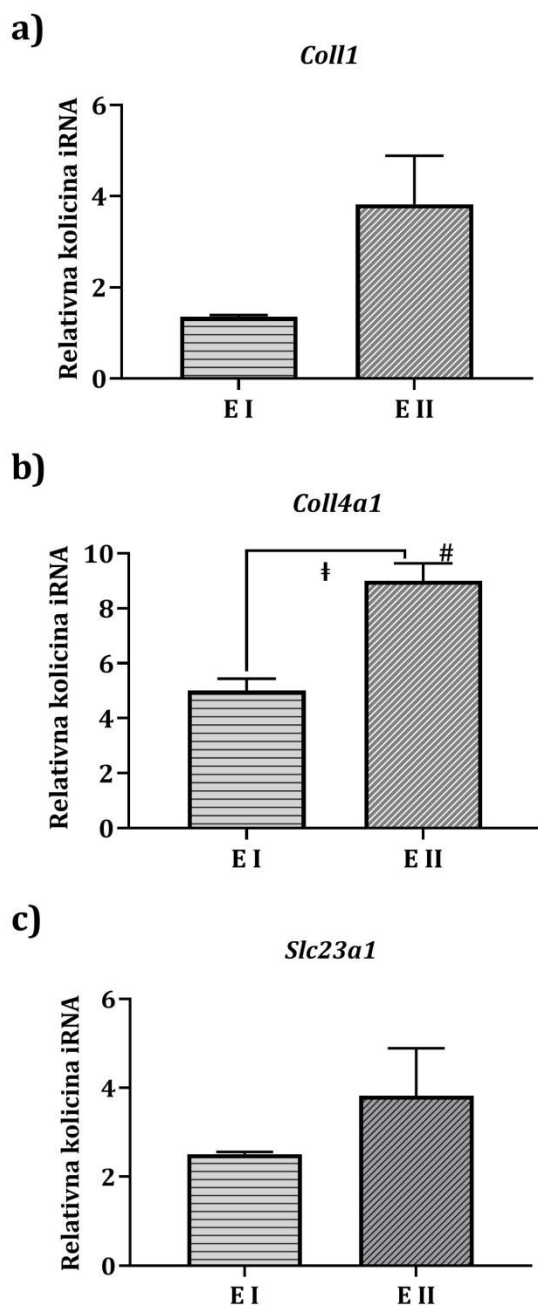
4.4.6. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima koštanog tkiva

Za određivanje profila ekspimiranosti analiziranih gena u koštanom tkivu prilikom žrtvovanja plodova zamoraca uzorkovan je distalni okrajak butne kosti.

Ekspimiranost *Coll1* gena je pokazala da je ukidanje vitamina C 20-og dana gestacije prouzrokovalo povećanje stepena ekspimiranosti, dok prema podacima dobijenim za uzorke E I grupe, rani deficit vitamina C nije doveo do promene stepena ekspimiranosti poređenjem sa kontrolnom grupom. Statistički značajna razlika u ekspresiji analiziranog gena nije dokazana ($p > 0,05$) (**Grafikon 22a**).

Prema dobijenim podaci koji su vezani za ekspimiranost *Coll4a1* gena dokazan je uticaj prenatalne deprivacije vitamina C, odnosno eksperimentalni tretman je kod obe eksperimentalne grupe doveo do povećanja stepena ekspimiranosti analiziranog gena. Ukidanje vitamin C dvadesetog dana gestacije dovelo je do znatno većeg povećanja ekspimiranosti *Coll4a1* gena u poređenju sa E I grupom. Statističkom analizom dokazana je statistički značajna razlika između kontrolne i E II grupe, kao i između grupa E I i E II ($p < 0,05$) (**Grafikon 22b**).

Na uzorcima butne kosti fetusa zamorca prenatalna deprivacija vitamin C je dovela do promena u ekspresiji *Slc23a1* gena. Unutar obe eksperimentalne grupe registrovano je povećanje stepena ekspresije ispitivanog gena (**Grafikon 22c**). Daljom obradom rezultata nije dokazano postojanje statističke razlike između poređenih grupa ($p > 0,05$).



Grafikon 22. Ekspimiranost *Coll4a1*, *Coll1* i *Slc23a1* gena u koštanom tkivu.

Nakon žrtvovanja plodova zamoraca uzorkovan je distalni okrajak butne kosti. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena. * Statistički značajna razlika između K i E I grupe. # Statistički značajna razlika između K i E II grupe. † Statistički značajna razlika između E I i E II grupe.

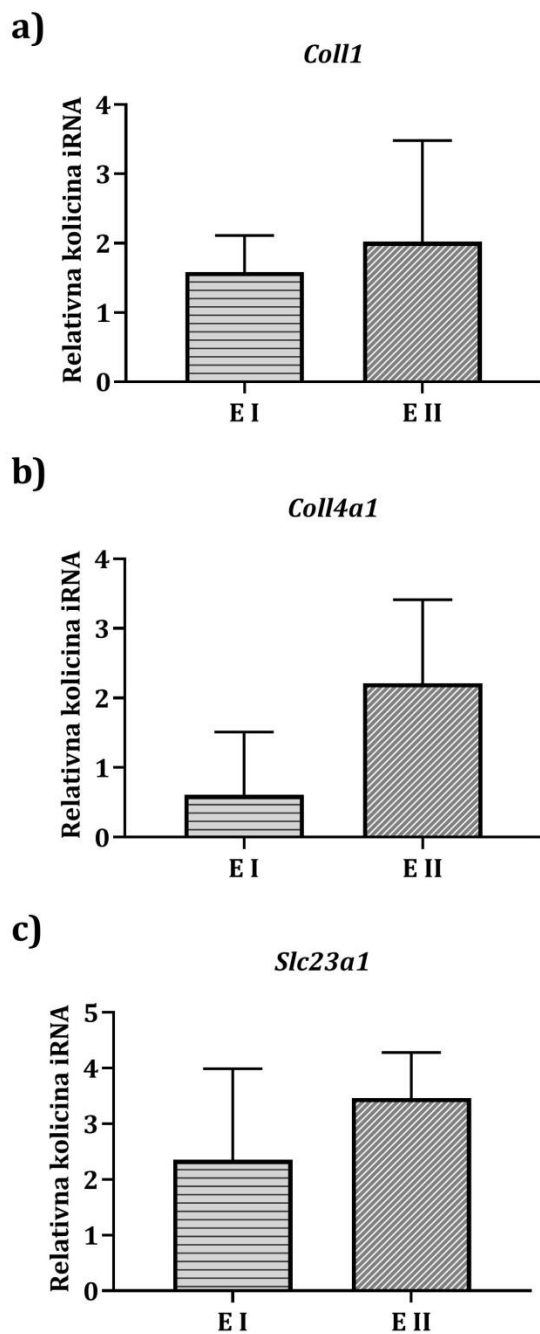
4.4.7. Ekspimiranost *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena u uzorcima zuba

Analiza genske ekspimiranosti vršena je na prikupljenim donjim sekutićima sa pripadajućim perialveolarnim tkivo.

Na analiziranom tkivu deficit vitamina C je kod obe eksperimentalne grupe postigao statistički značajno povećanje stepena ekspimiranost *Coll1* gena (**Grafikon 23a**). Između eksperimentalnih grupa to povećanje nije statistički značajno ($p>0,05$).

Iz podataka vezanih za ekspimiranost *Coll4a1* gena registrovano je da je u E II grupi došlo do trenda povećanja stepena ekspimiranosti, ali statističkom obradom podataka dobijeni rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku ($p>0,05$) (**Grafikon 23b**).

Eksperimentalni tretman je na uzorcima zuba doveo do povećanja stepena ekspimiranosti *Slc23a1* gena. Deprivacija vitamina C od dvadesetog dana gestacije je pokazala veći stepen smanjenja ekspimiranosti analiziranog gena. Obradom dobijenih rezultata nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između grupa ($p>0,05$) (**Grafikon 23c**).



Grafikon 23. Ekspimiranost *Coll4a1*, *Coll1* i *Slc23a1* gena u zubu. Nakon žrtvovanja plodova zamoraca uzorkovan je donji sekutić. Iz tako dobijenog tkiva izolovana je RNK koja je korišćena za analizu relativne ekspimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena.

5. DISKUSIJA

Danas je poznato da postoje brojni genetski faktori i faktori okoline, kao i njihove međusobne interakcije, koji su od velikog značaja za normalan rast, razvoj i zdravlje jedinke (121-123).

Brojni napori su uloženi kako bi se doznalo koji je uticaj ishrane na zdravlje i produktivnost jedinke tokom postnatalnog perioda života. Međutim, uticaj ishrane majke tokom trudnoće, iako je od velikog značaja za normalan razvoj ploda i placente, do sada nije dovoljno istražen. U novijoj literaturi iz brojnih studija proizilaze dokazi koji ukazuju da kod euterijskih sisara ishrana majke tokom gestacije predstavlja jedan od bitnih faktora koji može dovesti do trenutnih i/ili dugoročnih posledica na rast i razvoj ploda, odnosno do intrauterinog zastoja u rastu (124-126).

Treba naglasiti da je ishrana tokom gestacije svuda u svetu i dalje veliki zdravstveni problem, bilo da se radi o zemljama u razvoju (gde je najučestalija malnutricija) ili razvijenim zemljama u kojima je dominantan problem prekomerna ishrana. Poslednjih godina rezultati sprovedenih istraživanja navode da neadekvatna ishrana majke tokom gestacije, bila ona u vidu prekomerne ili nedovoljne količine hrane, ili pak u hrani niskog kvaliteta, može uticati na potomstvo kroz proces poznat pod nazivom fetalno programiranje (123, 127-129). Pomenuti proces podrazumeva da u kritičnom periodu prenatalnog razvoja ploda neki agens iz spoljašnje sredine uzrokuje permanentnu promenu strukture i funkcije pojedinih organa koja će se uočiti tek u kasnijem postnatalnom periodu života, a može imati ozbiljne posledice po razvoj i zdravlje jedinke (121, 130). Pored ishrane majke kao potencijalni uzroci koji bi mogli dovesti do fetalnog programiranja navodi se i vaskularizacija posteljice i brojna patološka stanja uzrokovana metaboličkim i infektivnim bolestima majke (123, 131).

Sam *in utero* razvoj karakteriše brz rast i diferencijacija ćelija, pa stoga plod ima veliku potrebu za odgovarajućim nutritivnim substratom. Adekvatan embriološki razvoj pojedinih organa je neophodan preduslov za pravilnu funkciju kako samog organa, tako i složenih organskih sistema, a samim tim i održavanje normalne homeostaze i opšteg zdravlja jedinke. „Zdrava trudnoća“ uz normalnu porođajnu težinu i odsustvo kongenitalnih anomalija može predvideti zdrav početak života. U našoj studiji, zbog svojih sličnosti sa čovekom u pogledu nemogućnosti sinteze vitamina C, je kao animalni modela korišćen zamorac. U poređenju sa drugim glodarima, kao što su miš i pacov, zamorac ima najduži gestacioni period (69-71 dan, a miš i pacov 19-21 dan). Kako je zamorac sličan čoveku u pogledu razvoja glavnih organskih sistema koji se odvija *in utero*, može služiti kao model za ispitivanje uticaja brojnih faktora na prenatalni razvoj jedinke (132). Fokus sprovedenog istraživanja je bio na ispitivanju uticaja prenatalnog deficita vitamina C na razvoj bubrega, pluća, skeletne muskulature, zuba i kosti uz upotrebu metoda iz domena histologije, imunohistohemije, biohemije i molekularne biologije (genske ekspresije).

Nadekvatna težina ploda na rođenju može se smatrati surogat markerom koji govori u prilog lošoj ishrani majke tokom trudnoće odnosno lošem nutritivnom statusu ploda. Ujedno mala telesna težina i neadekvatan prirast telesne mase ploda tokom gestacije može dovesti do intrauterinog zastoja u rastu (133). Analizirajući podatke, iz naše studije, vezane za telesnu masu fetusa zamoraca jasno je da je ranije ukidanje vitamina C imalo značajan efekat na smanjenje telesne mase ploda. Statističkom obradom podataka dokazana je visoka statistički značajna razlika između kontrolne i E I grupe, kao i između E II i E I grupe. Odnosno plodovi kojima je vitamin C ukinut 10. dana

gestacije imaju u proseku za oko 20% manju telesnu masu u poređenju sa kontrolnom i E II grupom.

Mnogobrojna epidemiološka istraživanja dokazala su nedvosmisleno povezanost intaruterinog zastoja u rastu sa nastankom hroničnih bolesti u postnatalnom periodu života, kako kod ljudi tako i kod životinja (134). Hormonska neravnoteža u vidu povećanog nivo glukokortikoida i renina u plazmi, smanjeni nivoi insulina, hormona rasta, insulinom sličnog faktora rasta-I i hormona štitaste žlezde navode se kao jedni od mogućih scenarija (135). Uticaj malnutricije majke može dovesti i do metaboličkih poremećaja kao što su: otpornost na insulin, dislipidemija, netolerancija na glukozu, gojaznost, dijabetes melitus tipa II (136, 137). Pored navedenih, evidentirani su i kardiovaskularni poremećaji u vidu hipertenzije i ateroskleroze (138, 139).

U sprovedenom istraživanju makroskopskim pregledom jasno je uočeno da je deprivacija vitamina C dovela do razvoja hipoplastičnog bubrega, koji je i po dimenzijama i po masi manji u odnosu na bubrege kontrolne grupe. Takođe je dokazano da dužna prenatalne deprivacije vitammina C utiče na smanjenje mase samog organa.

Tokom ranijih istraživanja utvrđeno je da je kraj nefrogeneze kod humanih fetusa između 32. i 36. nedelje gestacije. Tačnije širina nefrogene zona se smanjuje sa povećanjem gestacijske starosti, da bi u periodu između 32. i 36. gestacijske nedelje u potpunosti nestala i kod terminske novorođenčadi više nije uočljiva (140-144). Čovek se u ovom pogledu razlikuje u odnosu na miša i pacova jer se kod čoveka razvoj bubrega završava *in utero*, dok se kod glodara nefrogeneza završava postnatalno. Istraživanja ukazuju da kod zamorca nefrogeneza zauzima između 35-90% gestacionog perioda, a počinje 22. dana gestacija, da bi se do 55. dana završila (76, 145), što je u potpunosti u skladu sa našim nalazima. U našoj studiji 50. dana gestacije, kod jedinki iz grupe K, u

kori bubrega jasno je prisutan subkapsularno lokalizovan uzani sloj nefrogene zone. Takodje, uočeno je i da su dublji slojevi kore izgrađeni iz glomerula različitog stepena razvoja. Sa druge strane, deficit vitamina C je doveo do usporenog sazrevanja kako korteksa tako i medule bubrega ploda zamorca. Značajno šira nefrogena zona registrovana je kod obe eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom.

U studiji *Márquez* i saradnika, upotrebom PCNA imunohistochemskog markera, proučavan je udeo ćelija u proliferativnoj fazi u bubregu pacova između 2. i 15. postnatalnog dana. Rezultati ove studije govore u prilog da broj PCNA pozitivnih ćelija opada sa starošću jedinke odnosno sazrevanjem organa, kao i da medula sazreva kasnije u odnosu na korteks i papilu (146). Za potrebe naše studije koristili smo Ki67 antite lo kako bismo odredili broj ćelija u fazi proliferacije. U našoj studiji najveća proliferativna aktivnost (% Ki67 pozitivnih ćelija) je dokazana u grupi E I kako u korteksu tako i u meduli. Znatno veći procenat Ki67 pozitivnih ćelija uočen je u meduli bubrega što govori u prilog sporijem sazrevanju.

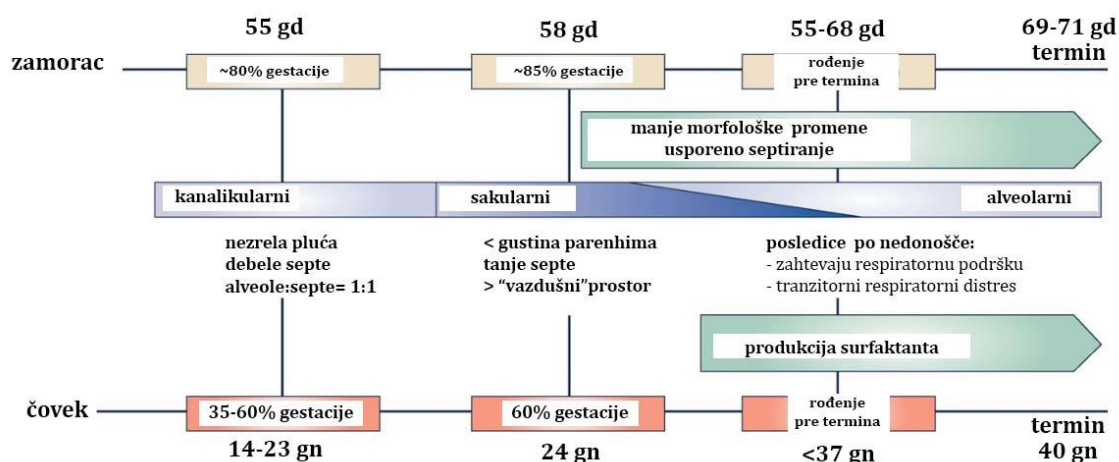
Iako je i dalje nepoznanica da li je vaskularizacija bubrega rezultat vaskulogeneze ili angiogeneze, prvi znaci vaskularizacije nefrogene zone bubrežnog parenhima evidentni su 13. dana gestacije kod miša, odnosno između 8. i 10. nedelje gestacije kod čoveka (147). U sprovedenom istraživanju na preparatima bubrežnog parenhima kod kontrolne grupe registruje se imunopozitivnost na CD31 antigen gotovo u svim nefrogenim razvojnim formama (oblik zarez, S forma) i u tek formiranim, nezrelim glomerulima u superficijelnom delu maturacione zone kore bubrega. Analizirajući eksperimentanu grupu kod koje je u 10. nedelji gestacije izvršena deprivacija vitamina C uočeno je da je imunopozitivnost samanjena i registruje se uglavnom u nezrelim formama glomerula, dok su razvojne nefrogene forme ostale imuno negativne. Slična

zapažanja se navode i u istraživanjima sprovedenim od strane *Dunford Lj* i saradnika, koji su ispitivali uticaj sadržaja proteina u ishrani na vaskularizaciju bubrega fetusa kod ovaca. Tokom ovog eksperimenta sprovedenom na trudnim ovcima, počev od nultog pa do 65. dana, kontrolna grupa je dobijala hranu sa uobičajenom količinom proteina, dok je u eksperimentnoj grupi bila zastupljena ishrana sa niskim sadržajem proteina. Iz dobijenih rezultata došli su do zaključka da je smanjena ekspresija markera CD34 i VEGF u eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolnom, i to posebno u predelu nefrogene zone. Međutim, rekonstrukcijom 2D snimaka, načinjenih mikro-CT tehnikom, u 3D modele u cilju prikazivanja krvnih sudova bubrega, nije uočena promena u makrovaskulaturi između poređenih grupa (148).

Razvoj pluća opisuje se kao dosta komplikovan i dugotrajan proces, a sam plućni parenhim ima ograničen stepen regeneracije te eventualno prenatalno i/ili perinatalno oštećenje a ujedno i neadekvatno sazrevanje mogu dovesti do razvoja loše plućne funkcije i ozbiljnih zdravstvenih problema tokom života (149-153)

Imajuću u vidu dužinu gestacije i činjenicu da su zamorci potrkusci (engl. *precocial*) tj. da se ubrajaju u grupu kičmenjaka koji su već na rođenju razvijeni (imaju telo prekriveno dlakom, oči su im otvorene, imaju sposobnost regulacije telesne temperature i mogu samostalno da se hrane odnosno mogu se snaći sami u okolini), očekivano je da imaju i pluća koja su u potpunosti razvijena odnosno da je alveolarizacija pluća započeta *in utero* (**Slika 69**) (95). Na rođenju histološke karakteristike plućnog parenhima se ne razlikuju od onih kod odraslih jedinki. Na plućnom parenhimu zamorca još se prenatalno uočavaju terminalne i respiratorne bronchiole, što nije slučaj kod drugih glodara. Morfološki gledano pluća zamorca rođenog

nedelju dana pre termina su zrelija u odnosu na neonatalna pluća miša, pacova i čoveka (154).



Slika 69. Uporedni prikaz razvoja pluća kod čoveka i zamorca (Preuzeto uz modifikaciju iz: Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, et al. Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol.* 2018;596(23):5535-69.)

U svom istraživanju Sosenko i saradnici navode da se na histološkim preparatima plućnog parenhima zamoraca 55-og gestacijskog dana uočava nezreli plućni parenhim. U mikroskopskom opisu plućnog parenhima navode prisustvo debelih septi i podjednak odnos (1:1) alveola prema parenhimu što odgovara kanalikularnom stadijumu razvoja pluća. Već 58-og dana gestacije prisutne su veće promene tj. na plućnom parenhimu se uočava smanjenje količine parenhima, samim tim povećanje „vazdušnog“ prostora i znatno smanjenje debljine septi. Daljim razvojem do rođenja uočeno je smanjenje debljine septi i veća septiranost parenhima, kao i postepeno povećanje procenta „vazdušnog“ prostora koji sada iznosi 82,1% (155).

Podaci iz naše studije kada je reč o kontrolnoj grupi, su u potpunosti u skladu sa gore navedenim rezultatima. Prema histomorfološkim osobinama plućni parenhim

kontrolne grupe se nalazi u kanalikularnom, eventulano ranom sakularnom embriološkom stadijumu, a udeo vazdušnog prostora unutar plućnog parenhima iznosi nešto manje od 50%. Prenatalna deprivacija vitamina C je dovela do usporenog sazrevanja plućnog parenhima, što je samim tim rezultovalo i smanjenjem udela „vazdušnog“ prostora. U eksperimentalnim grupama embriološki stadijum razvoja plućnog parenhima je nezreliji u odnosu na kontrolnu, odnosno odgovara pseudoglandularnom ili ranom kanalikularnom stadijumu. Shodno tome procenat „vazdušnog“ prostora je znatno manji, odnosno u grupi E I iznosi nešto više od 39%.

Karakteristika arterijske plućne cirkulacije je da prati grananje bronhijalnog stabla i da se nalazi u njegovoj blizini. Već 34. dana gestacije kod čoveka se formiraju ekstrapulmonalne arterije a potom se 44. dana pojavljuju i lobularne arterije. U mezenhimu plućnog pupoljka registruje se imunopozitivnost mezenhimalnih ćelija na endotelne markere i daljim procesom vaskulogeneze nastaje kapilarni pleksus koji će okružiti plućni pupoljka i stvoriti pre-acinarne arterije. Razvoj krvnih sudova zatim se nastavlja procesom angiogeneze i rezultovaće formiranje intra-acinarnih arterija. Sledeći nastaju krvni sudovi alveolarnih duktusa (posle 25. gestacione nedelje), dok se oko 36. nedelje gestacije beleži nastanak alveolarnih kapilara (156, 157).

U toku razvoja plućnog parenhima dolazi i do promena u broju i lokalizaciji krvnih sudova. Kapilarna mreža u pseudoglandularnom stadijumu nalazi se u okolnom mezenhimu i slabo je razvijena. U kanalikularnom stadijumu razvoja beleži se povećanje vazdušnog prostora ali i povećanje broja kapilara. Kapilari su sve bliže postavljeni alveolarnom epitelu a na taj način formiraju prve krv-vazduh barijere (156, 157). Ovi navodi su skladu i sa našim rezultatima. Zahvaljujući imunopozitivnosti CD31 markera, kod jedinki iz kontrolne grupe registrovano je prisustvo guste kapilarne mreže unutar

plućnog mezenhima, kao i sve bliža lokacija krvnih sudova budućem alveolrnom prostoru. Što se znatno razlikuje u odnosu na uzorke plućnog parenhima iz grupe kojoj je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije. U E I grupi jasno se unutar plućnog mezenhima uočava znatno manji broj CD31 pozitivnih krvnih sudova, kao i nepostojanje “*crescent*” formacija. Zapažene promene govore u prilog da je ekspreimnetalni tretman, odnosno nedostatak vitamina C u ishrani majke, defintivno doveo do usporavanja embriološkog razvoja pluća.

O uticaju ishrane majke na razvoj pluća postoje podaci iz studija sprovedenih na animalnim modelima i to uglavnom na miševima, pacovima i jagnjadima. Za sada u literaturi postoje navodi da retinoidi iz vitamina A regulišu ekspresiju proteina ekstracelularnog matriksa (158), dok je vitamin D uključen u epitelno-mezenhimalne interakcije (159), a predstavlja i bitan faktor u sintezi surfaktanta (160).

Nizak nivo omega-3 masnih kiselina u plazmi, kod odojčadi rođenih pre tridesete nedelje, povećava rizik od nastanka bronhopulmonalne displazije (161). Dokazano je da je uticaj ishrane na rast pluća prisutan i u postnatalnom periodu života, posebno u ranom detinjstvu (162). Navodi se da je nedostatak vitamina E i selena u ishrani trudnica povezan sa povećanim rizikom od nastanka bronhitisa i astme kod potomaka (163, 164),

Istraživanja sprovedena poslednjih godina potvrđuju da i prekomerna ishrana majke tokom trudnoće (što je sve učestalija pojava u razvijenim zemljama) može imati uticaj na razvoj i sazrevanje pluća. Ove navode potvrđuju studije u kojima su kao animalni modeli korišćeni miševi i jagnjad. Primenom ishrane bogate visokim sadržajem masti tokom gestacijskog perioda zabeležen je usporeni embriološki razvoj pluća, izmena u metabolizmu azot oksida i neadekvatna sinteza surfaktanata (165-167).

Rast i razvoj skeletnog mišića predstavlja dosta komplikovan proces koji uglavnom zavisi od interakcije između mišićnih ćelija i mikrokruženja koji ih okružuje. Navodi se da je fetalni period krucijalan za razvoj skeletnih mišića jer nakon rođenja nema povećanja broja mišićnih vlakana. Tokom života povećanje mišića nastaje kao rezultat isključivo povećanja dijametra mišićnih vlakana (113).

U sklopu naše studije analizirana je građa butnog skeletnog mišića zamorca. Evidentan je uticaj nedostatka vitamina C tokom gestacije na razvoj skeletne muskulature plodova zamorca što je u skladu sa literaturnim navodima. Naime, analizirajući histomorfološke karakteristike uočeno je da je veliki deo mišićnih vlakana u E I i E II grupi zadržao centralnu lokalizaciju jedara koje je ujedno većeg prečnika, što odgovara osobinama nezrelih miotuba. Dok je situacija u kontrolnoj grupi drugačija, odnosno miotubule većinski imaju perifernu lokalizaciju jedara, koje je ujedno i manjeg prečnika. Poprečna ispruganost je primećena u svim grupama.

Na trudnim zamorcima je *Ward S* sa saradnicima sproveo eksperiment i analizirao uticaj ishrane majke na razvoj mišića fetusa (*m. biceps brachii* i *m. soleus-a*). Studija je bila koncipirana tako da je kontrolna grupa imala *ad libidum* pristup hrani, dok je u eksperimentalnoj grupi bila dostupna količina od 60% od *ad libidum* porcije. Zabeleženo je da je pri rođenju broj mišićnih vlakana smanjen za 26% u *m. biceps brachii*, a nepromenjen kod *m. soleus - a*. Analizom je utvrđeno da je postojala faza miogeneze kod *m. soleus-a* u kojoj je broj vlakana bio značajno manji od kontrole, međutim deficit je korigovan nastavkom sekundarne hiperplazije vlakana. Vrlo slično kašnjenje pronađeno je i kod *m. biceps brachii*, ali nastali deficit nije korigovan. Smatralo se da je razlika između ova 2 mišića povezana sa relativnim proporcijama primarnih

vlakana u mišićima, pri čemu na razvoj primarnih vlakana očigledno pothranjenost *in utero* nema uticaja (168).

U literaturi su dostupni podaci iz istraživanja sprovedenih na svinjama. Deficit proteina u ishrani majke, tokom gestacije, kod ploda je doveo do smanjenja broja mišićnih vlakana, smanjenja procenta nemasne mase i povećanju masnih depoa (169). Takođe, istraživanja sprovedena na pacovima su dokazala da nizak nivo proteina u ishrani majke tokom gestacije utiče na smanjenje broja i gustine mišićnih vlakana (170). Dok su eksperimenti sprovedeni na odraslim zamorcima kojima je izazvan deficit vitamin E i selen rezultovali nastankom nekroze mišića. Naime ovakvo stanje onemogućilo je zamorcima da stoje i da se kreću, a samim tim i da se hrane i piju vodu (171).

Kod preživara neuhranjenost i prekomerna ishrana negativno utiču na performanse rasta potomaka smanjenjem sekundarnih mišićnih vlakana i mišićne mase, posebno u ranoj i srednjoj fazi gestacije (172). Nedostatak hranljivih materija u ishrani majke u kasnoj fazi gestacije kod fetusa ovaca smanjuje veličinu mišićnih vlakana, ali ne i njihov broj (173).

Sam endomizijum (vezivni omotač koji obavija mišićna vlakna) nije pokazao posebne razlike, između analiziranih grupa, u pogledu imuno ekspresije ispitivnih markera. Naime, imunopozitivnost na kolagen 4, laminin i CD31 je primećena u svim grupama, tako da uticaj deficita vitamina C na ovu strukturu nije dokazan.

Matriks metaloproteinaze su cink zavisne endopeptidaze prisutne ne samo kod kičmenjaka već i kod beskičmenjaka i biljaka (174). Zadužene su za remodelovanje kako ekstracelularnog tako i intracelularnog matriksa (175), a odavno su poznate njihove

uloge u brojnim procesima kao što su organogeneza, ćelijska proliferacija, tumorogeneza, involucija uterusa, angiogeneza, regeneracija, zarastanje rana i brojne druge (176, 177).

Utvrđeno je da pojedini podtipovi matriks metaloproteinaza (npr. MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-13) mogu imati nuklearnu lokalizaciju i to u mozgu, dojci, srcu, epitelnim ćelijama (178).

U našem istraživanju upotrebom antitela MMP-9 na preparatima bubrega, pluća i poprečnoprugastog mišića dominantno je registrovana nuklearna imunoekspresija ovog antigena. Određivanjem broja ćelija sa pozitivnom nuklearnom ekspresijom antigena MMP-9, uočeno je da je za sva tri organa najveći procenat MMP-9 pozitivnih ćelija registrovan u grupama kojima je vitamin C ukinut 10-og dana gestacije (E I grupi), a najniži u kontrolnoj grupi. Dužina trajanje deprivacije je jedino dovela do statistički značajne razlike u broju MMP-9 pozitivnih ćelija na preparatima bubrega, a za uzorke pluća i skeletnog mišića nije dokazana razlika između E I i E II grupe. Najveći broj MMP-9 pozitivnih ćelija je registrvan u E I grupi na preparatima skeletne muskulature (skoro 95%, a grupa K – 85%), a najniži procenat na preparatima bubrežnog parenhima (grupa E I – skoro 84%, a grupa K oko 67%). Na uzorcima plućnog parenhima u kontrolnoj grupi evidentiran je udeo MMP-9 pozitivnih ćelija od 63%, dok je u E I grupi taj procenat dostigao skoro 84%.

Prema navodima iz studija sprovedenih *in vivo* i *in vitro*, može se reći da su MMP-2 i MMP-9 prisutni u prvim fazama embriogeneze bubrega. Potrebno je napomenuti da je MMP-9 neophodan za razvoj bubrega jer štiti mezenhimale ćelije i stimuliše grananje i morfogenezu bubrega oslobađanjem *SCF* faktora (engl. *Stem Cell Factor*) (179-181).

Rezultati istraživanja *Zimowska*-e i saradnika ne samo da potkrepljuju naše dokaze o nuklearnoj ekspresiji MMP-9 antigena, već i sugerišu da je kod skeletnih mioblasta ovakva ekspresija povezana sa kontrolom S faze ćelijskog ciklusa. Naime, na *in vitro* istraživanju sprovedenom na ćelijskoj kulturi unutar jedara ćelija koje su u mitozu dokazana je nuklearna lokalizacija MMP-9 (upotrebom tehnika imunohistohemije ili zimografije). Što nameće pitanje da li je njihova lokalizacija povezana sa replikacijom DNK? (182).

Rezultati iz naše studije govore u prilog da se nuklearna lokalizacija MMP-9 može pronaći ne samo kod miofibroblasta u fazi proliferacije, već i tokom embriološkog razvoja plućnog parenhima i bubrega. U svakom slučaju nuklearna lokalizacija, tačan mehanizam ulaska u jedro i funkcija nuklearno eksprimirane MMP-9 nisu do sada razjašnjene što svakako ostavlja dosta prostora za dalja istraživanja na tu temu.

Aktuelana tema istraživanja poslednjih godina jeste povezanost nuklearne ekspresije MMP-a sa indukcijom apoptoze. Međutim treba naglasiti da mehanizam nastanka apoptoze indukovane upravo nuklearnom lokalizacijom ovog proteina još uvek nije razjašnjen. Kao jedan od potencijalnih načina navodi se mogućnost razgradnje nuklearnih proteina od strane MMP-a i samim tim indukovanje apoptoze (183). Istraživanja govore u prilog tome da nuklearna lokalizacija MMP-2 i MMP-9 indukuje neurodegeneraciju tako što izaziva apoptozu neurona i oksidativna oštećenja DNK (184, 185). Povećana nuklearna ekspresija MMP-9 je evidentirana i u epitelnim ćelijama atrofičnih renalnih tubula i to u procesu fibroze (186).

Od ranije je poznato da skorbut, kod odraslih jedinki zamoraca, ima uticaj na morfologiju zubnih tkiva a samim tim i stvaranju zubnog dentina. Naime, uloga kolagena u razvoju zuba je bitna zbog mineralizacije matricisa koji u sebi sadrži veliku količinu finih kolagenih vlakana (187). Tokom procesa mineralizacije tvrdih zubnih tkiva prvo se

stvara organski matriks, a potom se istaloži kalcijum hidroksi apatit. Calbindin je intracelularni kalcijum vezujući solubilni protein, te se on javlja na mestima gde se javlja i kalcijum. Istraživanja ukazuju na njegovu pozitivnost kod ameloblasta, kao i okolnih ćelija, odontoblasta i fibroblasta budućeg periodontalnog ligamenta (188).

Iz svega gore navedenog proizilazi da je formiranje zuba usporeno. Ovome u prilog govori i smanjena ekspresija Calbindin antitela, u grupi vitamin C deficitarnih životinja, na ćelijama koje formiraju gleđ (slika 57). Dentin se stvara u talasima za koje kolagena vlakna čine osnovu za mineralizaciju, stvaranje predentina a potom i dentina (189, 190). Takođe uočava se stepen retardacije ćelija koje će formirati tvrda zubna tkiva, uvećanje i zgusnuće ameloblasta odnosno skraćivanje odontoblasta (189,190), što dovodi do usporenog stvaranja, odnosno izostanka tvrdih zubnih tkiva, dentina i gleđi. Ameloblasti i odontoblasti eksperimentalne grupe pokazuju pojačanu imunopozitivnost na Osteopontin (slika 59) što može govoriti u prilog tome da su ćelije zakasnele u razvoju, pa samim tim izostaje i mineralizacija tkiva koje luče. Sa druge strane u kontrolnoj grupi ove ćelije su formirane i dobro diferencirane a vezivno tkivo koje luče je već dobro razvijeno i mineralizovano (slika 58).

Dokazano je da deficit vitamina C utiče i na peridontalni ligament. U svom istraživanju *Oriá RB* sa saradnicima navodi da kod zamoraca iz grupa bez vitaminske suplementacije dolazi do smanjenja srednje debljine parodontalnog ligamenta i to kroz sve njegove ekstenzije - od nivoa alveolarnog grebena pa do njegovog apikalnog procesusa (191).

Vitamin C povezan je i sa različitim putevima stimulacije osteoplastne aktivnosti (192). Te izostankom ovog vitamina dolazi do usporene aktivnosti osteoblasta što se i ispoljava smanjenom debljinom i razvijenosti koštanih gredica. Imajući u vidu nalaze

naše studije koji govore da se kod eksperimentalne grupe javlja pojačana imunopozitivnost osteoblasta na osteopontin u odnosu na kontrolnu grupu, može se pretpostaviti da su osteoblasti pojačano aktivni jer dolazi do usporene mineralizacije koštanih gredica.

Deprivacija vitamina C posledično će dovesti i do smanjene vaskularizacije u zubnoj pulpi što u prilog daje smanjen dijametar i brojnost krvnih sudova u vidljivom polju kao i njihovo grupisanje prema lingvalnoj površini (190).

Pregledom trenutno dostupne literature pronalazi se mali broj studija koje su na animalnim modelima vitamin C zavisnih jedinki istraživale uticaj prenatalne deprivacije vitamina C na razvoj koštano-zglobnog sistema ploda.

Analizom tibije u ekspreimetnu koji je podrazumevao ukidanje vitamina C 20. dana gestacije i prateću restrikciju unosa vitamina C u trajanju od 15 dana, dokazane su promena koje su veoma slične našim rezultatima. Naime u ovoj studiji opisuje se smanjenje veličine i broja trabekula, količine osteoida i broja osteoblasta na njihovoj površini. U predelu epifizne ploče redukovan je broj hondrocita i narušena kolumnarna organizacija, a takodje zabeležen je i smanjen afinitet epifizne hrskavice za *Alcian blue* (192).

Wegger i saradnici su sprovodili istraživanja na svinjama sa naslednom nemogućnošću stvaranja vitamina C (*OD pigs*). U ovoj studiji primena vitamina C je ukidana u vremenskom intervalu od 24-og do 38-og dana tokom različitih perioda gestacije. Autori opisuju fetuse bez morfoloških malformacija, međutim okoštavanje je ozbiljno poremećeno. Uočeno je oticanje kostohondralnog spoja, česta subperiostna krvarenja, kao i odvajanje epifizne hrskavice od spongioze na kostima rebara i udova,

dok je u mikroskopskom nalazu uočen smanjen broj osteoblasta sa neregularnim osteonima (194).

Rezultati naše studije pokazuju pojavu deformiteta na zglobovima, ozbiljniji stepen zaostajanja osifikacije, prisustvo subperiostalnih hemoragija i prekida periosta. Jasno je da su navedene promene unutar naše studije intezivnije i verovatno predstavljaju rezultata ranije restrikcije i dužeg trajanja deprivacije vitamina C (od 10-og do 50-og. dana gestacije).

U prošlosti je uticaj deficita vitamina C, u postnatalnom periodu života, proučavan i na adultnim zamorcima. *Kipp* i saradnici su, tokom ekspreimenta koji je trajao u vremenskom intervalu od 19-og do 21-og dana (odnosno do gubitka 10% telesene mase jedinke), došli do rezultata koji pokazuju da je kod životinja kojima je ukinut vitamin C skorbut doveo ne samo do smanjenog unosa hrane i gubitka telesne mase već i do značajnih razlika u građi kosti. Koštana gustina femura je u eksperimntalnoj grupi bila i do 30% niža u odnosu na jedinke iz kontrolne grupe. Takođe, debljina epifizne ploče, debljina i broj trabekulala su značajno manje kod skorbutičnih jedinki, dok je trabekularni razmak veći (195).

Hidroksiprolin je neesencijalna amino kiselina bitna za sintezu kolagena i njegovu termodinamičku stabilnost, a tradicionalno se koristi za njegovu kvantifikaciju. Najčešće korišćen metod, koji smo i mi u našoj studiji primenili, jeste kolorimetrijski test zasnovan na reakciji oksidovanog hidroksiprolina sa p-dimetilaminobenzaldehidom (*DMAB*; Erlihov reagens; 120).

U studiji iz 1970. godine *Rivers J* i saranici navode da je koncentracija hidroksiprolina kod fetalnog tkiva zamorca bila značajno niža u odnosu na kontrolnu

grupu. Deficit vitamina C ovoj studiji izazvan je u vremenskom peridu od 20-og dana pa do 35-og dana gestacije kada su ženke i žrtvovane (193).

Istraživanja *Parsons K* i saradnika, sprovedenog na miševima koji su zavisni od egzogenog unosa vitamina C usled modifikacije u pogledu nedostatka enzima gulonolakoton oksidaze (*Gulo*^{-/-} jedinke), pokazalo je da je nedostatak vitamina C uticao na količinu hidroksiprolina u koži i prolaktinom stimulisanjoj mlečnoj žlezdi. Naime, *Gulo*^{-/-} jedinke su imale statistički značajno veće količine hidroksiprolina u odnosu na jedinke iz kontrolne grupe (196). Što je slučaj i u većini organa analiziranih u našoj studiji. U uzorcima pluća, hrskavice, kosti, zuba, plodovih ovojaka, tankog creva i slezine dobijene su manje količine hidroksiprolina u grupi EI u odnosu na kontrolnu. Suprotno navednom, odnosno deficit vitamina C je doveo do povećanja količine hidroksiprolina u uzorcima bubrega, skeletnog mišića, malog i velikog mozga, placente i srca.

U sprovedenom istraživanju analiza eksprimiranosti *Coll1*, *Coll4a1* i *Slc23a1* gena je urađena u uzorcima tkiva bubrega, pluća, poprečno-prugastog mišića, velikog i malog mozga, kosti i zuba.

Pretraživanjem dostupne literature nismo uspjeli da pronađemo studije koje su se bavile ekspresijom analiziranih gena i uticajem deficita nutritivnih faktora tokom prenatalnog perioda na iste. *Mahmoodian F* sa svojim saradnicima dokazao je da ukidanje vitamina C u trajnju od 2 nedelje kod odraslih zamoraca rezultuje smanjenjem ekspresije kolagena tipa IV i elastina, ali ne i laminina. U sprovedenom istraživanju kao uzorak za RNA ekstrakciju korišćeni su krvni sudovi i to: plućne i koronarne arterije kao i descedentni deo aorte. Takođe, koncentracije serumskog kolagena 4 govore u prilog da je i ukupna proizvodnja ovog proteina takođe smanjena usled nedostatka vitamina C (197). Sve navedeno ukazuje da je deficit vitamina C imao uticaj ne samo na vaskularni

sistem već i sigurno i na sva ostala tkiva. Rezultati naše studije pokazuju da ekspimiranost *Coll4a1* gena u uzorcima pluća, poprečno-prugaste muskulature i malog mozga su u skladu sa podacima *Mahmoodian* –a i saradnika (197). Za razliku od toga povećanje ekspimiranosti *Coll4a1* gena je dokazano u uzorcima kosti i zuba, a bez promene u ekspimiranosti pokazuju podaci dobijeni u uzorcima bubrega i mozga.

Poređenjem imunoekspresije i genske ekspresije dobili smo potpuno poklapanje jedino kod transportera vitamina C. Dokazana je značajna razlika u imunoekspresiji i ekspimiranosti gena transportera zaduženog za unos vitamina C u ćeliju između E I i kontrole grupe. Obe metode su dokazale povećanje kod grupe E I.

Jasno je da je deficit vitamina C imao uticaj na ekspimiranost analiziranih gena i da su statistički značajne razlike pokazane. Međutim, ekspimiranost gena u našoj studiji u analiziranim tkivima je različita i nije moguće utvrditi neku zakonitost, niti obrazac ekspresije. Takođe, individualne razlike unutar samih eksperimentalnih grupa u ekspimiranosti analiziranih gena postoje i velike su. Naime, sve navedeno u narednom periodu ostavlja dosta prostora za brojne ponovne eksperimentne i detaljnije analize u cilju razjašnjenja i razotkrivanja novonastalih istraživačkih problema i nejasnoća.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u sprovedenom istraživanju mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Upotrebom histomorfoloških i imunohistohemijskih metoda dobijeni su sledeći najvažniji rezultati:

- a) Na razvoj **bubrega**, prenatalni deficit vitamina C je imao veoma veliki uticaj. Eksperimentalni tretman je doveo do razvoja hipoplastičnog bubrega, koji je i po dimenzijama i po masi manji u odnosu na bubrege kontrolne grupe. Nefrogena zona je znatno šira u bubrezima iz grupe E I i E II, a analiza imunoekspresije analiziranih markera govori u prilog usporenog sazrevanja.
- b) Prenatalna deprivacija vitamina C je dovela do usporenog sazrevanja **plućnog** parenhima. Prema embriološkim fazama pluća kasne u razvoju i do dve faze razvoja, što je samim tim rezultovalo i smanjenjem udela budućeg „vazdušnog“ prostora. Imunoekspresija ispitivanih markera potvrđuje navode vezane za zaostajanje u razvoju.
- c) Evidentan je uticaj nedostatka vitamina C tokom gestacije i na razvoj **skeletne muskulature**. Analizirajući histomorfološke karakteristike uočeno je da je veliki deo mišićnih vlakana u E I i E II grupi zadržao centralnu lokalizaciju jedara koje je ujedno većeg prečnika, što odgovara osobinama nezrelih miofibrila. Imunohistohemijskim analizama nisu utvrđene bitnije razlike između analiziranih grupa.
- d) Na preparatima **zuba** plodova zamorca kod vitamin C depriviranih jedinki registruje se smanjena: gustina i dijametar kapilara zubne pulpe, debljina sloja predentina i dentina; prisutno je zaostajanje u procesu direktne

osifikacije alveolarne kosti, kao i promene u imunoekspresiji analiziranih markera.

- e) Prenatalni deficit vitamina C je na **koštano-zglobnom sistemu** plodova zamoraca doveo do izraženog smanjenja ekstremiteta sa prisutnim deformitetima; na histološkim preparatima je dokazano: drastično zaostajanje u enhondralnom okoštavanju, kod metakarpalne kosti dijafiza i metafiza od hrskavičavih ostrvaca bez znakova osifikacije, a međuprostor je ispunjen eritrocitima; epifiza je narušene kolumnarne organizacije sa dominacijom hipertrofičnih hondrocita, dok su proksimalne falange na nivou hrskavičavog modela sa početnim znacima stvaranja primarnog osifikacionog centra.

2. Analizom količine hidroksiprolina u analiziranim tkivima dobijeni su sledeći rezultati za ispitivane eksperimentalne grupe poređenjem u odnosu na kontrolnu grupu:

a) U grupi E I povećanje količine hidroksiprolina evidentirano je u uzorcima tkiva bubrega, poprečno-prugastog mišića, velikog i malog mozga, placente i srca. Nasuprot tome, u uzorcima pluća, kosti, zuba, hrskavice, plodovih ovojaka, tankog creva i hrskavice uočava se smanjenje količine analiziranog parametra.

b) U grupi E II veće količine hidroksiprolina su registrovane u uzorcima bubrega, poprečno-prugastog mišića, velikog i malog mozga, kosti, srca, placente i plodovih ovojaka. Sa druge strane, smanjenje količine hidroksiprolina je uočeno u uzorcima pluća, zuba, hrskavice, tankog creva i slezine.

3. Analizom eksprimiranosti *Coll1*, *Coll4a1*, i *Slc23a1* gena uočene su velike individualne razlike unutar samih grupa, pa stoga nije utvrđen jasan obrazac u pogledu eksprimiranosti ispitivanih gena.
- a) Prenatalni deficit vitamina C doveo je do povećanja eksprimiranosti *Coll1* gena u uzorcima zuba, malog i velikog mozga. Eksperimentalni tretman je na uzorcima bubrega, pluća i poprečno-prugastog mišića doveo do smanjenja stepena eksprimiranosti analiziranog gena, dok u uzorcima koštanog tkiva nije utvrđena promena ekspresije.
 - b) Ukidanje vitamina C je na uzorcima malog mozga i kosti dovelo do povećanja stepena eksprimiranosti *Coll4a1* gena, dok je na plućima dobijeni rezultat smanjenje stepena eksprimiranosti. Deficit vitamina C nije doveo do promena eksprimiranosti *Coll4a1* gena u uzorcima bubrega, poprečno-prugastog mišića, mozga i zuba.
 - c) Prekid egzogenog unosa vitamina C tokom gestacije je na eksprimiranost *Slc23a1* gena imalo uticaj u vidu povećanja stepena ekspresije na gotovo svim analiziranim organima (bubreg, pluća, mali i veliki mozak, zub i kost). Jedino u uzorcima poprečno-prugastog mišića buta nije utvrđena promena u stepenu ekspresije ispitivnog gena.

7. LITERATURA

1. Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with correlated cell and molecular biology. 7th ed. Lippincott, Williams and Wilkins: Baltimore, 2016;156-74.
2. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas and Text of Histology. 6th ed. Lippincott, Williams and Wilkins: Baltimore, 2014;58-67.
3. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. J Biol Chem. 2006;281:3494–3504
4. Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(1):a004978.
5. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28;55(12):1531-46.
6. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. Trends Genet. 2004;20:33-43.
7. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. 1995;64:403-34.
8. Rich A, Crick FHC. The structure of collagen. Nature. 1955;176:915–916
9. Cowan PM, McGavin S, North ACT. The polypeptide chain configuration of collagen. Nature. 1955;176:1062–1064.
10. Rich A, Crick FHC. The molecular structure of collagen. J Mol Biol. 1961;3:483–506.

11. Beck K, Chan VC, Shenoy N, Kirkpatrick A, Ramshaw JAM, Brodsky B. Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4273–8.
12. Privalov PL. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv Protein Chem.* 1982;35:1-104.
13. Bella J, Brodsky B, Berman HM. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure.* 1995;3(9):893-906.
14. Singh I. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology with Color Atlas. 4th ed. New Delhi: Jaypee; 2004. pp. 58–9.
15. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;20:33-43.
16. Fidler AL, Boudko SP, Rokas A, Hudson BG. The triple helix of collagens - an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *J Cell Sci.* 2018;131(7). pii: jcs203950.
17. Hudson B, Reenders S, Tryggvason K: Type IV collagen: Structure, gene organization and role in human diseases: Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem.* 1993;268:26033–6.
18. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med.* 2003;348:2543–56.
19. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: Beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2514–27.

20. Kefalides NA, Aiper R, Clark CC. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol.* 1979;61:167-228.
21. Farquhar MG. The glomerular basement membrane. A selective macromolecular filter. In *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. E. D. Hay, editor. Plenum Publishing Corp., New York. 1981;335-78.
22. Martinez-Herandez A. The basement membrane in the microvasculature. In *Microcirculation. Current Physiologic, Medical, and Surgical Concepts*. R. M. Effros, H. Schmid-Sliónbein, and J. Ditzel, editors. Academic Press, New York. 1981;125-46.
23. Roll FJ, Madri JA, Alberto J, Furthmayr H. Codistribution of Collagen types IV and AB2 in basement membranes and mesangium of the kidney. *J Cell Biol.* 1980;85(3):597-616.
24. Yaoita H, Foidart JM, Katz SJ. Localization of the collagenous component in skin basement membrane. *J Invest Dermatol.* 1978;70(4):191-3.
25. Sano J, Fujiwaza S, Sato S, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yajima G, Nagai Y. AB (type-V) and basement membrane (type-IV) collagens in the bovine lung parenchyma: electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Biomed Res.* 1981;2(1):20-9.
26. Laurie GW, Leblond CP, Courml I, Martin GR. Immunohistochemical evidence for the intracellular formation of basement membrane collagen (type IV) in developing tissues. *J Histochem Cytochem.* 1980;28:1267-74.

27. Han S, Makareeva E, Kuznetsova N, DeRidder AM, Sutter MB, Losert W, Phillips CL, Visse R, Nagase H, Leikin S. Molecular mechanism of type I homotrimer resistance to mammalian collagenases. *J Biol Chem* 2010; 285:22228–76.
28. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2010 .
29. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for Lascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*. 1994;269:13685–8.
30. Nishikimi M, Yagi K: Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem*. 1996;25:17–39.
31. Lodish H, Berk A, editors. *Molecular cell biology* [monograph on the internet]. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000 [cited 2017 Mar. 21]. dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/>.
32. Major RH. *A history of medicine*. Illinois: Springfield; 1954. p. 51
33. Greenle WB. *The Voyage of Pedro Alvares Cabral to Brazil and India*. London: Haklyut Society; 1958. p. 65.
34. Ravenstein EG. *A journal of the first voyage of Vasco da Gamma, 1477–99*. London: Hakluyt Society, 1898; 20–11, 35, 9, 89, 93, 124.
35. Baron JH. Sailors' scurvy before and after James Lind-a reassessment. *Nutr Rev*. 2009;67(6):315-32.

36. Maxfield L, Crane JS. Vitamin C Deficiency (Scurvy) [Updated 2019 Jan 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493187/>
37. Pimentel L. Scurvy: historical review and current diagnostic approach. *Am J Emerg Med.* 2003;21(4):328-32.
38. Wols HD1, Baker JE. Dental health of elderly confederate veterans: evidence from the Texas State Cemetery. *Am J Phys Anthropol.* 2004;124(1):59-72.
39. Brickley M, Ives R. Vitamin C deficiency scurvy. In: Brickley M, Ives R ed. *The bioarchaeology of metabolic bone disease.* Elsevier; 2010. p. 41-74.
40. Pangan AL, Robinson D. Hemarthrosis as initial presentation of scurvy. *J Rheumatol.* 2001;28(8):1923-5.
41. Ratanachu-Ek S, Sukswai P, Jeerathanyasakun Y, Wongtapradit L. Scurvy in pediatric patients: a review of 28 cases. *J Med Assoc Thai.* 2003;86 Suppl 3:S734-40.
42. Fain O. Musculoskeletal manifestations of scurvy. *Joint Bone Spine.* 2005 Mar;72(2):124-8.
43. Wegger I, Palludan B. Vitamin C deficiency causes hematological and skeletal abnormalities during fetal development in swine. *J Nutr.* 1994;124(2):241.
44. Akikusa JD, Garrick, Nash MC. Scurvy: Forgotten but not gone. *J Paediatr Child Health.* 2003;39:75-7.
45. Hacisevki A. An overview of ascorbic acid biochemistry. *Journal of the Faculty of Pharmacy of Ankara.* 2009;38:233-55.

46. Padh H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutrition Reviews*. 1991;49(3):65-70.
47. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AM, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care*. 2014;18(4):460.
48. Hancock RD, Galpin JR, Viola R. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2000;186:245–50.
49. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam. Horm*. 2001;61:241–66.
50. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J*. 2007;274:1–22.
51. Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Clarke SG. *Arabidopsis VTC2* Encodes a GDP-l-Galactose Phosphorylase, the Last Unknown Enzyme in the Smirnoff-Wheeler Pathway to Ascorbic Acid in Plants *J Biol Chem*. 2007;282:18879–85.
52. Nishikimi M, Kawai T, Yagi K. Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *J Biol Chem*. 1992;267:21967-72.
53. Ohta Y, Nishikimi M. Random nucleotide substitutions in primate nonfunctional gene for L-gulono- γ -lactone oxidase, the missing enzyme in L-ascorbic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1472:408–11.
54. Czyzowska A. Vitamin C. Reference Module in Food Sciences. 2015;1–8.

55. Boyer JC, Campbell CE, Sigurdson WJ, Kuo SM. Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(1):150-6.
56. Friedman PA, Zeidel ML. Victory at C. *Nat Med.* 1999;5(6):620-1.
57. Harkness JE, Wagner JE. *Biology and medicine of rabbits and rodents.* 5th ed. Philadelphia:Lea & Febiger; 1977. p. 45-57.
58. Institute of Medicine (US); Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.* Washington: National Academies Press; 2000. p. 95-185.
59. Sato P, Udenfriend S. Scurvy-prone animals, including man, monkey, and guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 1978;187(1):158-62.
60. Combs Jr GF, McClung JP. Vitamin C. In: Combs Jr GF, McClung JP, editors. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.* Elsevier; Academic Press; 2017. p. 243-95.
61. Rebouche CJ. Ascorbic-acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6):S1147-52.
62. Douglas RM, Hemilä H, D'Souza R, Chalker EB, Treacy B. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 42004: CD000980.pub2

63. Sasazuki S, Sasaki S, Tsubono Y, Okubo S, Hayashi M, Kakizoe T, Tsugane S. The effect of 5-year vitamin C supplementation on serum pepsinogen level and *Helicobacter pylori* infection. *Cancer science*. 2003;94(4):378-82.
64. Hamuy R, Berman B. Treatment of Herpes simplex virus infections with topical antiviral agents. *Eur J Dermatol*. 1998;8(5):310-9.
65. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1569:1-9.
66. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, et al. A family of mammalian Na-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*. 1999;399:70-5
67. Pritt S. Taxonomy and history. In: *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Academic Press. 2012. p. 563-74.
68. Morales E. *The guinea pig: healing, food, and ritual in the Andes*. Tucson: Univ Ariz Press. 1995.
69. Wagner JE, Foster HL. Germfree and specific pathogen-free. In *The biology of the guinea pig*. Academic Press. 1976. p. 21-30.
70. Nirah H, Shomer, Holcombe H, Harkness JE. Biology and diseases of guinea pigs. In: *Laboratory animal medicine*. ed, James G. Fox, Lynn C. Anderson, Glen M. Otto, Kathleen R. Pritchett-Corning, Mark T. Whary, 3rd ed. Academic Press. 2015. p. 247-283.
71. National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press; 2010.

72. Kaiser S, Krüger C, Sachser N. The guinea pig. In: The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. 2010;8:380-98.
73. Gresham VC, Haines VL. Management, Husbandry, and Colony Health. In The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Academic Press. 2012 p. 603-19.
74. Little MH. Improving our resolution of kidney morphogenesis across time and space. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;32:135-43.
75. Nikolić I, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D, Mihailović D. Embriologija čoveka: tekst i atlas, 6. izdanje DATA STATUS 2015
76. Moritz KM, Wintour-Coghlan M, Black JM, Bertram JF, Caruana G. Factors Influencing mammalian kidney development: implications for health in adult life. *advances in anatomy embryology and cell biology, Berlin. Heidelberg:Springer;2008. p. 1-9.*
77. Čukuranović R, Vlajković S. Age related anatomical and functional characteristics of human kidney. *Facta universitatis-series: Medicine and Biology, 2005;12.2:61-9.*
78. Drummond IA, Majumdar A. The pronephric glomerulus. In: Vize PD, Woolf AS, Bard JBL. *The kidney from normal development to congenital disease. San Diego: Academic Press; 2003. p. 61-73.*
79. Sariola H. Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Curr Opin Nephrol Hypertens; 2002;11:17-21.*

80. Sainio K. Development of the mesonephric kidney. In: Vize PD, Woolf AS, Bard JBL, editors. The kidney: from normal development to congenital disease. London: Academic Press; 2003. p. 75–86.
81. Ludwig KS, Landmann L: Early development of the human mesonephros. *Anat Embryol (Berl)*. 2005;209:439–47.
82. Carlson BM: Urogenital system. In *Human embryology and developmental biology*, ed 4. Philadelphia. 2009. Mosby, pp 403–36.
83. Davies JA. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. *Acta Anat (Basel)*. 1996;156(3):187-201.
84. Matsell DG, Tarantal AF: Experimental models of fetal obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2002;17:470–6.
85. Singh V. Textbook of clinical embryology. 2nd ed. Elsevier; 2017. Chapter 16, Respiratory system; p. 176-82.
86. Sadler TW, Langman J. Langman's essential medical embryology. Baltimore/Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 273
87. Kreiger PA. Lung. In: *Color atlas of fetal and neonatal histology*. Springer, New York, NY pp. 21-35.
88. Larsen W: *Human embryology*, Philadelphia, 2001, Churchill Livingstone.
89. Del Riccio V, van Tuyl M, Post M: Apoptosis in lung development and neo natal lung injury. *Pediatr Res* 55:183–189, 2004.

90. Crouch E, Mecham RP, Davila RM, et al: Collagens and elastic fiber proteins in lung development. In McDonald JA, editor: Lung growth and development, New York, Marcel Dekker, Inc 1997.p 327-64.
91. Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, et al: The branching programme of mouse lung development. *Nature*. 2008;453:745-50,
92. Sannes PL, Wang J: Basement membranes and pulmonary development. *Exp Lung Res*. 1997;23:101-8.
93. Bucher U, Reid L: Development of the intrasegmental bronchial tree: the pattern of branching and development of cartilage at various stages of intrauterine life. *Thorax*. 1961;16:207-18.
- 94.. Crosfill ML, Widdicombe JG. Physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. *J Physiol*. 1961;158:1-14
95. Brewer NR, Cruise LJ. The Respiratory System of the Guinea Pig: Emphasis on Species Differences. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 1997;36(1):100-108.
96. Burri PH: Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In: McDonald JA, editor. Lung growth and development, New York, Taylor & Francis. 1997.p. 1-36.
97. Williams MC, Mason RJ: Development of the type II cell in the fetal rat lung. *Am Rev Respir Dis*. 1977;115:37-47.
98. Hilfer SR: Development of terminal buds in the fetal mouse lung. *Scan Electron Microsc*. 1961;1387-401.

99. Chi EY. The ultrastructural study of glycogen and lamellar bodies in the development of fetal monkey lung. *Exp Lung Res.* 1985;8:275–89.
100. Ten Have-Opbroek AA, Otto-Verberne CJ, Dubbeldam JA: Ultrastructural characteristics of inclusion bodies of type II cells in late embryonic mouse lung. *Anat Embryol (Berl).* 1990;181:317–23.
101. Wert SE. Normal and abnormal structural development of the lung. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology.* 5th ed. Elsevier;2017. p.627-41.e3.
102. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(2):L246–54.
103. Lewin G, Hurtt ME. Pre- and Postnatal Lung Development: An Updated Species Comparison. *Birth defects research.* 2017;109(19):1519-1539. doi:10.1002/bdr2.1089.
104. Wagner JE, Manning PJ. *The biology of the guinea pig.* Academic Press: New York, 1976; p 1-4.
105. Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 2000;48:225-68.
106. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16:525-32.
107. Kalcheim C, Ben-Yair R. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15:371-80.

108. Romero NB, Mezmezian M, Fidziańska A. Main steps of skeletal muscle development in the human: morphological analysis and ultrastructural characteristics of developing human muscle. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1299-310.
109. Ernst LM, Ruchelli ED, Carreon CK, Huff DS, editors. *Color Atlas of Human Fetal and Neonatal Histology.* Springer Nature; 2019.
110. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 2003;202:59-68.
111. Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod.* 2004;71(6):1968-73.
112. Roncević I. Digestivni sistem. U: Nikolić I, Radenković G, Todorović V. *Embriologija.* Data status; 2007. p.192-206.
113. Depew M, Tucker A, Sharp P. Appendix 1 Descriptive Dental Development. In: *Mouse Development patterning, morphogenesis and Organogenesis.* Academic press; 2002. p. 454-6.
114. Rossant J, Tam PL. *Mouse Development – Patterning, Morphogenesis and Organogenesis.* Toronto: Academic Press; 2002.
115. Nikolić IR, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D. et al. *Embriologija čovek tekst i atlas.* 3rd ed. Beograd: Data Status; 2007.
116. Avery J. K, Chiego D. J. *Essentials of Oral Histology and Embryology.* 3rd ed. New York: Elsevier Inc; 2006.

117. Anđelković Z, Somer Lj. Hrskavica i kost. U: Anđelković Z, urednik. Histologija. Niš: Impressum; 2009.
118. Manning, PJ, Wagner, JE, Harkness, JE. Biology and diseases of guinea pigs. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editors. Laboratory Animal Medicine. New York: Academic Press; 1984. p. 149-81.
119. Mohammed SF. Development of fore and hind limbs bone of guinea pig (*Cavia Cutleri*) during pre and postnatal period [dissertation]. Baghdad: University of Baghdad; 2014. Available from: https://www.researchgate.net/publication/317901697_Development_of_fore_and_hind_limbs_bone_of_guinea_pig_Cavia_Cutleri_during_pre_and_postnatal_period
120. Hofman K, Hall B, Cleaver H, Marshall S. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Anal Biochem.* 2011;417(2):289-91.
121. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Pub Health Nutr.* 2001;(2b):611-24.
122. Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim Sci.* 2006;84(9):2316-37.
123. Simmons R. Epigenetics and maternal nutrition: nature v. nurture. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2011 Feb;70(1):73-81.
124. George LA, Uthlaut AB, Long NM, Zhang L, Ma Y, Smith DT, Nathanielsz PW, Ford SP. Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have

- differential effects on fetal growth and organ development. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8(1):1-1.
125. Ford SP, Long NM. Evidence for similar changes in offspring phenotype following either maternal undernutrition or overnutrition: potential impact on fetal epigenetic mechanisms. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011;24(1):105-11.
126. Ge W, Hu N, George LA, Ford SP, Nathanielsz PW, Wang XM, Ren J. Maternal nutrient restriction predisposes ventricular remodeling in adult sheep offspring. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013 Jul 1;24(7):1258-65.
127. King JC. The risk of maternal nutritional depletion and poor outcomes increases in early or closely spaced pregnancies. *J Nutr*. 2003b;133(5 Suppl 2): 1732S-6S.
128. Redmer DA, Wallace JM, Reynolds LP. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domest Anim Endocrinol*. 2004 Oct 1;27(3):199-217.
129. Yates DT, Macko AR, Nearing M, Chen X, Rhoads RP, Limesand SW. Developmental programming in response to intrauterine growth restriction impairs myoblast function and skeletal muscle metabolism. *J Pregnancy*. 2012 Jul 31;2012.
130. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp*. 1991;156, 38-50.
131. King JC. The risk of maternal nutritional depletion and poor outcomes increases in early or closely spaced pregnancies. *J Nutr*. 2003a;133(5 Suppl 2): 1732S-6S.

132. Briscoe TA, Rehn AE, Dieni S, Duncan JR, Wlodek ME, Owens JA, et al. Cardiovascular and renal disease in the adolescent guinea pig after chronic placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:847—55.
133. Szostak-Wegierek D, Szamotulska K, Szponar L. Influence of maternal nutrition on infant birthweight. *Ginekol Pol.* 2004;75(9):692-8.
134. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod.* 1997;2(2):105-12.
135. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 2005;85(2):571–633.
136. Levin BE. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Phil Trans R Soc B.* 2006;361(1471):1107–21.
137. Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Experimental IUGR and later diabetes. *J Intern Med.* 2007;261(5):437–452.
138. Gale CR, Jiang B, Robinson SM, Godfrey KM, Law CM, Martyn CN. Maternal diet during pregnancy and carotid intima-media thickness in children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1877–82
139. Szostak-Wegierek D. Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. *Int J Womens Health.* 2014;6:647-56.
140. ML FF, Dos Santos AM, Cavellani CL, Rossi RC, Corrêa RR, Dos Reis MA, de Paula Antunes Teixeira V, da Cunha Castro EC. Histochemical and immunohistochemical

- study of the glomerular development in human fetuses. *Pediatric Nephrology* (Berlin, Germany). 2007;23(2):257-62.
141. Kumar K, Pillay VV. Estimation of fetal age by histological study of kidney. *Med Sci Law*. 1999;36:226–30.
142. Gasser B, Mauss Y, Ghnassia JP. A quantitative study of normal nephrogenesis in the human fetus: its implication in the natural history of kidney changes due to low obstructive uropathies. *Fetal Diagn Ther*. 1993;8:371–384.
143. Shimada K, Matsumoto F, Tohda A, Ureda M. Histological study of fetal kidney with urethral obstruction and vesicoureteral reflux: a consideration on the etiology of congenital reflux nephropathy. *Int J Urol*. 2003;10:518–24.
144. Hume R, Coughtrie MW, Burchell B. Differential localization of UDP-glucuronosyltransferase in kidney during human embryonic and fetal development. *Arch Toxicol*. 1995;69:242–7.
145. Welling LW, Evan AP, Gattone VH 2nd, Rollins S, Saunders R, Kaskel FJ, et al. Correlation of structure and function in developing proximal tubule of guinea pig. *Am J Physiol*. 1989;256, F13—7.
146. Marquez MG, Cabrera I, Serrano DJ, Sterin-Speziale N. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. *Anat Embryol (Berl)*. 2002;205:431-40.
147. Gomez RA, Norwood VF, Tufro-McReddie A. Development of the kidney vasculature. *Microsc. Res. Tech*. 1997;39:254–260.

148. Dunford LJ, Sinclair KD, Kwong WY, Sturrock C, Clifford BL, Giles TC, Gardner DS. Maternal protein-energy malnutrition during early pregnancy in sheep impacts the fetal ornithine cycle to reduce fetal kidney microvascular development. *FASEB J*. 2014;28(11):4880-92.
149. Berry CE, Billheimer D, Jenkins IC, Lu ZJ, Stern DA, Gerald LB, et al. A Distinct Low Lung Function Trajectory from Childhood to the Fourth Decade of Life. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:607–12.
150. Belgrave DCM, Granell R, Turner SW, Curtin JA, Buchan IE, Le Souëf PN, et al. Lung function trajectories from pre-school age to adulthood and their associations with early life factors: a retrospective analysis of three population-based birth cohort studies. *Lancet Respir Med*. 2018;6(7):526-34.
151. Bui DS, Lodge CJ, Burgess JA, Lowe AJ, Perret J, Bui MQ, et al. Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life. *Lancet Respir Med*. 2018;6(7):535-44.
152. Bush A. Lung Development and Aging. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 Suppl 5:S438-S446 .
153. Joss-Moore LA, Albertine KH, Lane RH. Epigenetics and the developmental origins of lung disease. *Mol Genet Metab*. 2011;104(1-2):61-6.
154. Lechner AJ, Banchemo N. Advanced pulmonary development in newborn guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Am J Anat*. 1982;163(3):235-46.

155. Sosenko IR, Frank L. Lung development in the fetal guinea pig: surfactant, morphology, and premature viability. *Pediatr Res.* 1987;21(5):427-31.
156. Schittny JC, Burri PH. Development and growth of the lung. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM (eds) *Fishman's pulmonary diseases and disorders*, vol 1. McGraw-Hill, New-York, 2008 pp 91–114.
157. Hislop A. Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatr Respir Rev.* 2005;6:35–43.
158. Massaro D, Massaro GD. Lung development, lung function, and retinoids. *N Engl J Med.* 2010;362:1829–31.
159. Lykkedegn S, Sorensen GL, Beck-Nielsen SS, Pilecki B, Duelund L, et al. Vitamin D depletion in pregnancy decreases survival time, oxygen saturation, lung weight and body weight in preterm rat offspring. *PLoS ONE.* 2016;11: e0155203.
160. Chen, L.; Wilson, R.; Bennett, E.; Zosky, G.R. Identification of vitamin D sensitive pathways during lung development. *Respir Res.* 2016;17:47.
161. Martin CR, Dasilva DA, Cluette-Brown JE, Dimonda C, Hamill A, Bhutta AQ, et al. Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities. *J Pediatr.* 2011;159:743–9.e1-2.
162. Harding R.; DeMatteo R. The influence of nutrition on lung development before and after birth. In: *The Lung*, 2nd ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2014; pp. 349–68.

163. Devereux G, Turner SW, Craig LCA, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, et al. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:499–507.
164. Devereux G, McNeill G, Newman G, Turner S, Craig L, Martindale S, et al. Early childhood wheezing symptoms in relation to plasma selenium in pregnant mothers and neonates. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2007;37:1000–8.
165. Mayor RS, Finch KE, Zehr J, Morselli E, Neinst MD, Frank AP, et al. Maternal high-fat diet is associated with impaired fetal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309:L360–8.
166. Grasemann C, Herrmann R, Starschinova J, Gertsen M, Palmert MR, Grasemann H. Effects of fetal exposure to high-fat diet or maternal hyperglycemia on L-arginine and nitric oxide metabolism in lung. *Nutr Diabetes*. 2017;7:e244.
167. Lock MC, McGillick EV, Orgeig S, McMillen IC, Mühlhäusler BS, Zhang S, Morrison JL. Differential effects of late gestation maternal overnutrition on the regulation of surfactant maturation in fetal and postnatal life. *J Physiol*. 2017;595: 6635–52.
168. Ward SS, Stickland NC. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve*. 1991;14(3):259-67.
169. Rehfeldt C, Lefaucheur L, Block J, Stabenow B, Pfuhl R, Otten W, Metges CC, Kalbe C. Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. *Eur J Nutr*. 2012;51(2):151-65.

170. Mallinson JE, Sculley DV, Craigon J, Plant R, Langley-Evans SC, Brameld JM. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br J Nutr.* 2007;98(2):292-9.
171. Hill KE, Motley AK, Li X, May JM, Burk RF. Combined selenium and vitamin E deficiency causes fatal myopathy in guinea pigs. *J Nutr.* 2001;131(6):1798-802.
172. Du M, Tong J, Zhao J, Underwood KR, Zhu M, Ford SP, et al. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J Anim Sci.* 2010;88: E51-60.
173. Greenwood PL, Slepatis RM, Bell AW, Hermanson JW. Intrauterine growth retardation is associated with reduced cell cycle activity, but not myofiber number, in ovine fetal muscle. *Reprod Fertil Dev.* 1999;11: 281-91.
174. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:3-19.
175. Sinha SK, Asotra K, Uzui H, Nagwani S, Mishra V, Rajavashisth TB. Nuclear localization of catalytically active MMP-2 in endothelial cells and neurons. *Am J Transl Res* 2014;6:155-62.
176. Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M et al. Intricate functions of matrix metalloproteinases in physiological and pathological conditions. *J Cell Physiol* 2016;231:2599-621.
177. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2011; 278: 16-27.

178. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 2012; 47: 27–58.
179. Lelongt B, Trugnan G, Murphy G, Ronco PM. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 1997; 136(6): 1363–73.
180. Arnould C, Lelièvre-Pégorier M, Ronco P, Lelongt B. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(10): 2171–80.
181. Bengatta S, Arnould C, Letavernier E, Monge M, de Préneuf HM, Werb Z, et al. MMP9 and SCF protect from apoptosis in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(4):787–97.
182. Zimowska M, Swierczynska M, Ciemerych MA. Nuclear MMP-9 role in the regulation of rat skeletal myoblasts proliferation. *Biol Cell* 2013; 105: 334–344.
183. Xie Y, Mustafa A, Yerzhan A, Merzhakupova D, Yerlan P, N Orakov A, Wang X, Huang Y, Miao L. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. *Cell Death Discov.* 2017;14;3:17036.
184. Kimura-Ohba S, Yang Y. Oxidative DNA damage mediated by intranuclear MMP activity is associated with neuronal apoptosis in ischemic stroke. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 6927328,
185. Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY et al. Increased

- intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010;112: 134–49.
186. Tsai JP, Liou JH, Kao WT, Wang SC, Lian JD, Chang HR. Increased expression of intranuclear matrix metalloproteinase 9 in atrophic renal tubules is associated with renal fibrosis. *PLoS One* 2012; 7: e48164.
187. Bird TA, Spanheimer RG, Peterkofsky B. Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C supplemented guinea pigs. *Arch Biochem Biophys.* 1986; 246:42-51
188. Tomoyuki O, Seikou S, Satoshi W, Takashi O. Relationship of vitamin D with calbindin D9k and D28k expresion in ameloblasts. *Arch Oral Biol.* 2008;(53)117-123.
189. Boyle P. The effect of ascorbic acid defficiency on enamel formation in theeth of guinea pigs. *Am J Pathol.* 1938. p. 843-848.
190. Crampton EW. The growth of the odontoblasts of the incisor tooth as a criterion of vitamin C intake of the guinea pig. *J Nutr.* 1947;33(5):491-504.
191. Oriá RB, Costa CM, Santos Tde J, Vieira CM. Pharmacological, morphological and behavioral analysis of motor impairment in experimentally vitamin C deficient guinea pigs. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(1):25-33.
192. Vojinović J, Vojinović O, Milin J, Tatić E. *Biologija zuba.* Naučna Knjiga Beograd: Impresum; 1986. p. 52-79.
193. Rivers JM, Krook L, Cormier SA. Biochemical and histological study of guinea pig fetal and uterine tissue in ascorbic acid deficiency. *J. Nutr.* 1970;100: 217–27.

194. Wegger I, Palludan B. Vitamin C deficiency causes hematological and skeletal abnormalities during fetal development in swine. *J Nutr.* 1994;124(2):241.
195. Kipp DE, McElvain M, Kimmel DB, Akhter MP, Robinson RG, Lukert BP. Scurvy results in decreased collagen synthesis and bone density in the guinea pig animal model. *Bone.* 1996;18(3):281-8.
196. Parsons KK, Maeda N, Yamauchi M, Banes AJ, Koller BH. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(6):E1131-9.
197. Mahmoodian F, Peterkofsky B. Vitamin C deficiency in guinea pigs differentially affects the expression of type IV collagen, laminin, and elastin in blood vessels. *J Nutr.* 1999;129(1):83-91.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Карактеристике поремећаја синтезе колагена узроковане пренаталном депривацијом витамина Це код заморца
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Завод за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду б) Завод за антирабичну заштиту - Пастеров завод, Нови Сад в) Центар за медицинско-фармацеутска истраживања и контролу квалитета (ЦЕМФИК), Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске студије, Клиничка медицина, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Експериментално истраживање у ком су као анимални модел коришћене здраве скотне женке албино замораца (<i>Cavia porcellus</i>). Методом случајног избора женке су подељене у три групе: контролну (К) са седам скотних женки (n=7), и две експерименталне Е I (n=7) и Е II (n=7). У контролној групи све време трајања експеримента до 50-ог дана гестације женке су добијале воду обогаћену витамином Це (100 мг/кг), док је у Е I групи 10-ог дана гестације женкама укинут витамин Це, а групи Е II 20. гестацијског дана. Тако да је депривација витамином Це трајала 30 за групу Е II, односно 40 дана за групу Е I. Тачно 50-ог дана гестације женке су анестезиране мешавином за аналгоседацију, а плодови извађени царским резом и одредила им се телесна маса. Од укупно очекиваних 20 плодова по групи половина је коришћена за хистолошку анализу, а преостала половина јединки је употребљена за молекуларне и биохемијске анализе.
<i>1.2 Врсте података</i> а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: **бубрега, плућа, скелетне мускулатуре, великог и малог мозга, зуба, кости и плаценте.**

ђ) снимци, фотографије: **микрофотографије хистолошких препарата бојених стандардни и имунохистохемијским методама бојења.**

е) текст, **литературни изводи.**

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека **.xlsx**

б) SPSS фајл, датотека **.sav**

с) PDF фајл, датотека **.pdf**

д) Текст фајл, датотека **.doc, .docx**

е) JPG фајл, датотека **.jpg**

ф) Остало, датотека **.psd**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли **Велики број варијабли.**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **Велики број мерења.**

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, Експериментално истраживање спроведено на лабораторијским животињама, хистолошка и имунохистохемијска анализа узоркованих ткива, спектрофотометријска мерења и молекуларна анализа експресије гена.

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, **Прикупљање података анализом доступне литературе.**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
 - б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
 - в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и поређењем са литературним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Упоредом добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третмани чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса : <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) **Да**
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Одобрила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Универзитета у Новом Саду под бројем ЕК: III-2013-02 (за 2013. годину) и ЕК: I-2017-01 (за 2017. годину).

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално - без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Милан Поповић

milan.popovic@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Милан Поповић

milan.popovic@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Милан Поповић

milan.popovic@mf.uns.ac.rs
