Razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjih mutanata splotch i truncate

Mitrečić, Dinko

Doctoral thesis / Disertacija

2006

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:324494

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

Središnja medicinska knjižnica

Mitrečić, Dinko (2006) *Razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjih mutanata splotch i truncate [Development of the caudal part of splotch and truncate mouse embryos].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

http://medlib.mef.hr/179/

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Dinko Mitrečić

Razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjih mutanata *splotch* i *truncate*

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurogenetiku i genetiku razvoja Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Zahvaljujem voditelju ovog rada prof. dr. Srećku Gajoviću, koji mi je svojim izvornim zanosom za otkrivanjem novih spoznaja, brojnim idejama i dosljednošću, pokazao ulaz u neodoljiv svijet znanosti.

Posebno zahvaljujem prof. dr. Ljiljani Kostović-Knežević, čija iskrena nesebičnost u prenošenju iskustva i znanja unosi stabilnost u moj rad, te omogućuje da se trenutne ideje i grubi rezultati pretvore u sustavno obrađene vrijednosti.

Zahvalnost dugujem i ing. med. lab. dg. Iris Elezović, koja je strpljivo i precizno izradila histološke preparate, te ing. med. lab. dg. Sandri Mavrić, na koju se s povjerenjem mogu osloniti u pripremi pokusa, te izvođenju lančane reakcije polimeraze.

Konačno, najviše dugujem svojoj obitelji, kćeri Lauri Dini, supruzi, sestri i roditeljima, bez čijeg razumijevanja ovaj rad nikada ne bi bio završen. Vjerujem da vrijeme koje nismo proveli zajedno može biti nadoknađeno ljubavlju.

U Zagrebu, 2006.

Dinko Mitrečić

SADRŽAJ

Popis kratica…….……..…6
.

1. **UVOD**……..……7

1.1. Razvoj zametka u sisavaca…….……..…7

1.1.1. Gastrulacija i nastanak zametnih listića……..….9

1.1.2. Diferencijacija zametnih listića……..……11

1.2. Primarni i sekundarni mehanizam razvoja…….……...13

1.2.1. Razvoj kaudalnog dijela zametka……..….13

1.2.2. Primarna i sekundarna neurulacija…….....14

1.2.3. Primarni i sekundarni razvoj notokorda……..……....16

1.2.4. Primarni i sekundarni razvoj repnog crijeva……..…..17

1.3. Poremećaji razvoja kaudalnog dijela zametka…….…..19

1.3.1. Poremećaji razvoja neuralne cijevi……19

1.4. Proučavanje uloge gena u sisavaca……21

1.4.1. Miš kao pokusni model u genetici sisavaca……22

1.4.2. Određivanje uloge gena pomoću genetski promijenjenih miševa…...22

1.5. Mišje linije *splotch* i *truncate*……24

1.5.1. Mišja linija *splotch*…….……...…...24

1.5.1.1. Porodica *Pax* gena……25

1.5.1.2. Waardenburgov sindrom……...26

1.5.2. Mišja linija *truncate*……27

1.5.2.1. Gen *Noto*……...28

2. HIPOTEZA, CILJ I SVRHA RADA……30

3. UZORCI I POSTUPCI…….…..31

3.1. Postupci sa životinjama…….….31

3.1.1. Parenje životinja……..31

3.1.2. Žrtvovanje životinja……...….31

3.1.3. Izolacija zametaka……...31

3.1.4. Određivanje stadija zametka……...…32

3.2. Postupci sa tkivima i DNA……...…….33

3.2.1. Izolacija DNA i genotipizacija zametaka……...…….…33

3.2.2. Izrada histoloških preparata i morfološka analiza zametaka……...…....34

4. REZULTATI…….…..35

4.1. Razvoj B6 zametka miša……35

4.1.1. Zametak miša star 9 dana u kaudalnom dijelu ima otvorenu neuralnu cijev koja se nastavlja u primitivnu prugu……35

4.1.2. U zametku miša starom 10,5 dana pojavljuje se osnova repa……...38

4.1.3. U kaudalnom dijelu zametka miša starog 11,5 dana odvija se sekundarni mehanizam razvoja……..41

4.1.4. Zametak miša star 12,5 dana obilježen je odumiranjem repnog crijeva ...44

4.2. Razvoj mišjeg zametka *splotch*……..48

4.2.1. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze omogućuje prepoznavanje *splotch* zametaka prije pojave morfoloških promjena….48

4.2.2. Otvorena neuralna cijev (spina bifida) u *splotch* zametaka nastaje u području prijelaza primarne u sekundarnu neurulaciju……51

4.2.3. Aksijalne strukture repa *splotch* zametka starog 11,5 dana stapaju se u području repnog pupoljka……58

4.2.4. *Splotch* zametak star 12,5 dana ima poremećenu građu repnog pupoljka i osnove repa…….59

4.3. Razvoj mišjeg zametka *truncate*……64

4.3.1. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze omogućuje prepoznavanje *truncate* zametaka……64

4.3.2. *Truncate* zameci imaju poremećen razvoj notokorda……...…..67

4.3.3. Poremećena građa notokorda u *truncate* zametka povezana je s poremećenim razvojem repnog pupoljka……...69

4.3.4. Poremećena neurulacija i somitogeneza u *truncate* zametka povezana je s poremećenim razvojem notokorda……..71

5. **RASPRAVA**……76

5.1. Razvoj B6 zametka miša……...76

5.1.1. Kaudalni dio zametka miša razvija se sekundarnim mehanizmom razvoja……76

5.1.1.1. Repni pupoljak je ishodište struktura koje se razviju sekundarnim mehanizmom razvoja zametka……...…78

5.1.1.2. Neuralna cijev u kaudalnom dijelu zametka miša
nastaje sekundarnom neurulacijom……....80

5.1.2. Zbivanja tijekom razvoja kaudalnog dijela zametka miša
odgovaraju onima tijekom razvoja kaudalnog dijela zametka štakora…84

5.2. Razvoj mišjeg zametka *splotch*…….85

5.2.1. Otvorena neuralna cijev (spina bifida) u *splotch* zametaka
nastaje u području spoja primarne i sekundarne neuralne cijevi……...85

5.2.2. Mogući uzroci nastanka spine bifide…….….87
5.2.2.1. Dorzalna zavijenost osnove repa u *splotch* zametaka……..…87
5.2.2.2. Poremećaj savijanja neuroepitela……....88
5.2.2.3. Opsežno odumiranje stanica…….……...89

5.2.3. Poremećaji repnog pupoljka i aksijalnih struktura
repa u *splotch* zametaka…….…89

5.2.3.1. Odsječci sa spinom bifidom nemaju poremećen razvoj
notokorda, repnog crijeva i somita…….….90
5.2.3.2. *Splotch* zametak star 12,5 dana ima poremećenu
građu repnog pupoljka i osnove repa…….…90

5.3. Razvoj mišjeg zametka *truncate*……92

5.3.1. *Truncate* zameci imaju poremećen razvoj notokorda…….92
5.3.2. Mogući uzroci nastanka poremećaja razvoja notokorda…….94
5.3.2.1. Poremećaj diferencijacije repnog pupoljka……...….94
5.3.2.2. Poremećaj kaudalnog produljivanja notokorda……...95
5.3.2.3. Poremećaj diferencijacije CNH…….……..95
5.3.3. Poremećena neurulacija i somitogeneza u *truncate* zametka
povezana je s poremećenim razvojem notokorda……96
5.3.4. Uloga gena u razvoju kaudalnog notokorda *truncate* zametka……....100

6. ZAKLJUČCI…….….102

7. SAŽETAK…….…..104

8. SUMMARY……..…105

9. POPIS LITERATURE……...106

10. ŽIVOTOPIS……118

POPIS KRATICA

BMP4 - bone morphogenetic protein 4

B6 - C57BL/6NCrl

Chrd - chordin

CNH - kordoneuralni spoj, engl. chordoneural hinge

DLHP - dorzolateralne točke savijanja, engl. dorsolateral hinge points

EDN3 - endotelin 3

EDNRB - endotelin-B receptor

Ems - empty spiracles

Fgf - fibroblast growth factor

Flh - floating head

Foxa2 - forkhead box A2

Fst - follistatin

Gnot - gnot homeodomain protein

HGP - Projekt ljudskog genoma, engl. Human Genome Project

KOMP - Projekt onemogućavanja mišjih gena, engl. Knockout Mouse Project

MHP - središnja točka savijanja, engl. median hinge point

MITF - microphthalmia-associated transcription factor

Myf - myogenic factor

Myo - myogenin

Nog - noggin

Noto - notochord homolog (Xenopus laevis)

NTF3 - neurotrophin 3

Pax3 - paired box gene 3

SHH - sonic hedgehog

SOX10 - sex determining region Y-box 10

Stam2 - signal transducing adaptor molecule 2

TGFB1 - transforming growth factor, beta 1

Trp53 - transformation related protein 53

VER - ventralni ektodermalni greben, engl. ventral ectodermal ridge

Wnt1 - wingless-related mouse mammary tumor virus integration site 1

Wnt3a - wingless-related mouse mammary tumor virus integration site 3A

WS - Waardenburgov sindrom

1. UVOD

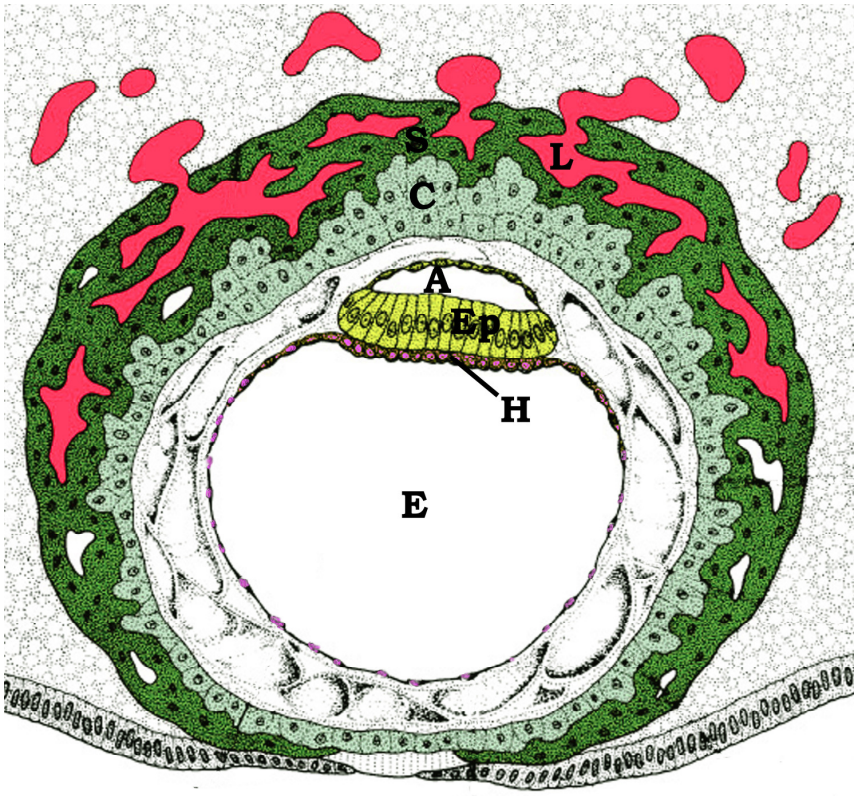
Jedan od osnovnih zahtjeva koji se postavljaju pred živa bića je opstanak vlastite vrste, što se postiže na dva načina: brojem potomaka ili njihovom vrsnoćom (1,2). Prva faza evolucije obilježena je nastankom vrsta koje se održavaju velikim brojem potomaka. Stopa njihovog preživljavanja je mala, a veliki broj omogućuje da neki od njih spolno sazriju i održe vrstu. Pojavom ptica, a osobito sisavaca, priroda je razvila drugačiji način prilagodbe: dugotrajna briga o manjem broju potomaka omogućuje da mnogi od njih dožive odraslu dob. Razredu sisavaca, kao najvišoj točki evolucijskog razvoja, svojstveni su usavršeni krvožilni i dišni sustav, te pojava dlake, čime je omogućena toplokrvnost. Zbog toga se takve vrste mogu bolje prilagoditi promjenama temperature okoline. Proizvodnja mlijeka u mliječnim žlijezdama omogućila je stalno dostupnu i po sastavu idealnu hranu za mladunčad, a smanjena je ovisnost o izvoru hrane u vrijeme dok se brinu o mladima (3). Jedan od ključnih evolucijskih skokova postignut je razvojem živčanog sustava (4,5). Sisavci imaju razvijenije osjete, i posebno ih brzo obrađuju u većem mozgu. Usavršeni živčani sustav omogućuje pamćenje, a time i učenje. Stoga sisavci postaju spretniji, brži i napredniji od svih ostalih vrsta. Istovremeno s razvojem mozga, pojavile su se i nove potrebe. Budući da je za razvoj živčanog sustava potrebno duže vrijeme razvoja zametka s osiguranim kisikom i hranjivim tvarima, umjesto u jajetu, zametak se razvija u maternici. Danas postoji gotovo 5000 različitih vrsta sisavaca, u koje ubrajamo i čovjeka.

1.1. Razvoj zametka u sisavaca

Razvoj zametka sisavaca je iznimno složen proces, tijekom kojeg se od oplođene jajne stanice stvaraju prostorno usklađeni i funkcionalno povezani tkiva i organi. To se postiže nizom morfogenetskih zbivanja koji uključuju umnažanje, migraciju, diferencijaciju, te smrt stanice.

Razvoj zametka započinje spajanjem spermija i jajne stanice. Novostvorena oplođena jajna stanica ili zigota počinje se mitotski dijeliti, tako da su stanice kćeri sve manje, a njihov broj se povećava. Novonastala nakupina stanica oblikuje morulu. Potom dolazi do zbijanja (kompakcije) stanica morule što uključuje pojavu prvih međustaničnih spojeva i polarizaciju stanica. U bazalni dio stanice se smješta jezgra, dok se na suprotnom, apikalnom kraju razvijaju mikrovili. Nakupljanjem tekućine koja razmiče međustanične prostore u središnjem

dijelu morule, nastaje šupljina blastocel, a nastala tvorba naziva se blastocista. Na stadiju blastociste se po prvi put razlikuju dvije populacije stanica: embrionalni čvorić, koji će dati osnovu za daljnji razvoj zametka, te trofoblast, od kojeg će se razviti embrionalne ovojnice. Trofoblast svojom aktivnošću omogućuje implantaciju, t.j. ukapanje blastociste u endometrij maternice (6) (sl.1).

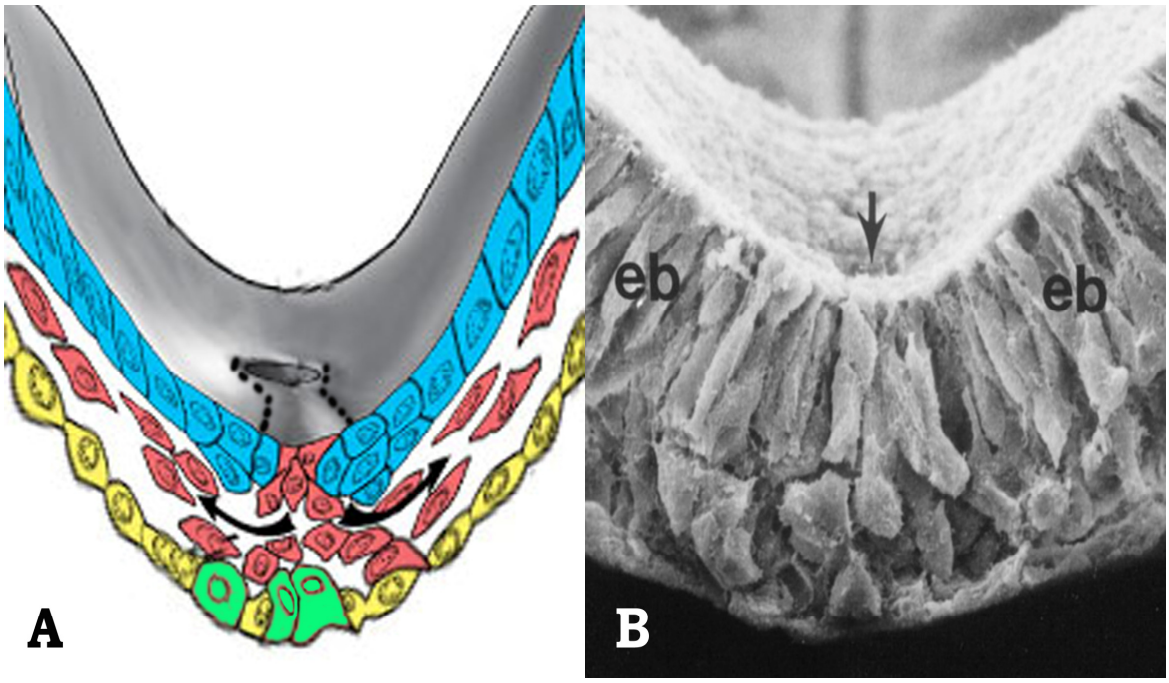


Slika 1: Shematski prikaz ljudske blastociste oko 12. dana razvoja. Stanice embrioblasta su se podijelile na dvije populacije: epiblast (Ep) i hipoblast (H). Unutar epiblasta se vidi amnionska šupljina (A), a unutar hipoblasta egzocelomska (E) šupljina. Stanice trofoblasta oblikuju citotrofoblast (C) i sinciciotrofoblast (S). Na ovom stadiju započinje prodiranje majčine krvi iz sinusoidnih kapilara endometrija u lakune trofoblasta (L). Prilagođeno prema Langman: Medical Embriology (6).

1.1.1. Gastrulacija i nastanak zametnih listića

Tijekom implantacije embrionalni čvorić poprima plosnati oblik i tvori zametni štit. Na njemu se razlikuju dva sloja stanica, gornji epiblast, te donji hipoblast. U zametka miša, štakora i drugih glodavaca epiblast i hipoblast su savijeni, pa se umjesto pojma zametni štit rabi naziv zametni cilindar, koji se sastoji s unutarnje strane od epiblasta, a s vanjske od hipoblasta (7) (sl. 2). Epiblast i hipoblast sudjeluju u gastrulaciji, jednom od najvažnijih događaja u ranom razvoju zametka obilježenim prvom seobom (migriranjem) stanica. Stanice epiblasta počinju migrirati prema središnjoj ravnini, gdje nastaje udubljenje - primitivna pruga. Nakon što stanice dosegnu primitivnu prugu, one počinju ponirati u nju, te se istovremeno izdužuju i podvlače pod epiblast i sele prema lateralno. Dio ovih stanica razmiče hipoblast i na tom mjestu tvore novi sloj stanica – endoderm. Ostale iseljene stanice epiblasta smještaju se između epiblasta i hipoblasta, gdje oblikuju novi središnji sloj – mezoderm. Tako od iseljenih stanica epiblasta nastaju novi zametni listići: mezoderm i endoderm, a od preostalih stanica epiblasta nastaje ektoderm. Od hipoblasta koji je razmicanjem ustupio mjesto endodermu nastaje žumanjčana vreća. Tijekom gastrulacije se na kranijalnom kraju primitivne pruge oblikuje zadebljanje - primitivni čvorić. Dio stanica epiblasta, koje poniru kroz primitivni čvorić u središnjoj ravnini, migrira prema kranijalno do mjesta gdje se dodiruju ektoderm i endoderm, bez umetanja mezoderma (prekordalna ploča). Ove stanice oblikuju notokord, koji predstavlja primitivni skelet zametka.

Uzajamnim međudjelovanjem triju zametnih listića (ektoderma, mezoderma i endoderma) nastaju tkiva i organi zametka. Kako se zametni štit izdužuje, primitivni čvor i primitivna pruga se sve više povlače prema kaudalnom kraju zametnog štita, dok potpuno ne nestanu. To predstavlja kraj oblikovanja triju zametnih listića, što znači i kraj gastrulacije (6).



Slika 2: Gastrulacija u miša. **A.** Shematski prikaz gastrulacije. Dio stanica epiblasta (plavo), koji se u miša nalaze s unutarnje strane zametnog cilindra, ponire kroz primitivnu prugu, podvlači se pod ostale stanice epiblasta i oblikuje mezoderm (crveno). Dio iseljenih stanica razmiče stanice hipoblasta (žuto), te oblikuje endoderm (zeleno). **B.** Na scanning elektronskomikroskopskoj snimci vidljivo je poniranje stanica epiblasta (eb) kroz područje primitivne pruge (strelica). Prilagođeno prema Langman: Medical Embriology (6).

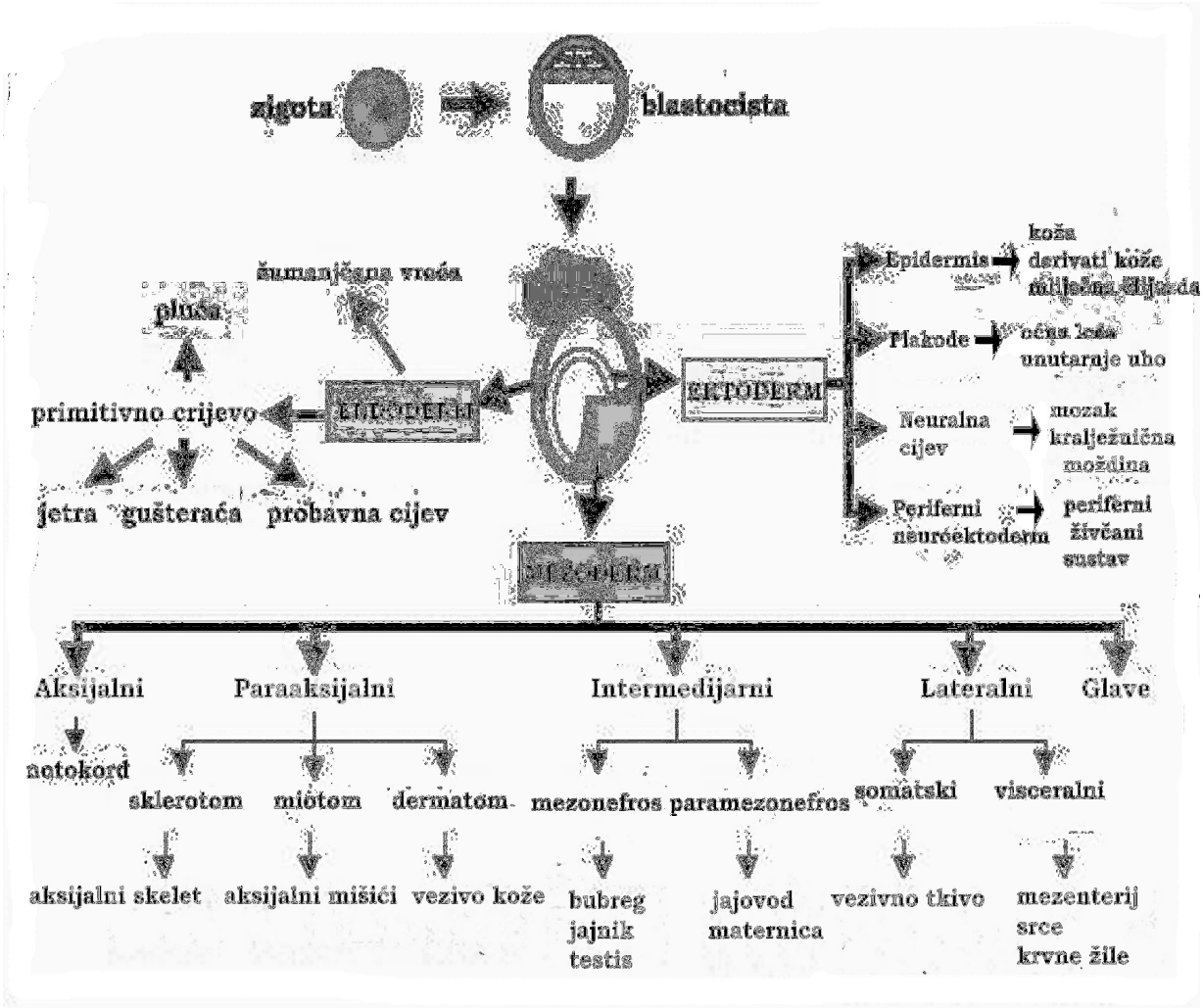
1.1.2. Diferencijacija zametnih listića

Dva osnovna derivata ektoderma su živčani sustav i koža (6,8) (sl.3). Još na stadiju dvoslojnog zametnog štita, epiblast, a kasnije i mezoderm, izlučuju bjelančevine BMP4 (bone morphogenetic protein 4) i TGFB1 (transforming growth factor, beta 1). One na ektoderm djeluju tako da potiču njegovu diferencijaciju u kožu i derivate kože. Induktivnim signalima bjelančevina CHRD (chordin), NOG (noggin) i FST (follistatin) u kranijalnom dijelu zametka, te FGF (fibroblast growth factor) i WNT1 (wingless-related mouse mammary tumor virus integration site 1) u kaudalnom dijelu zametka, primitivni čvorić i notokord se suprotstavljaju takvom utjecaju na ektoderm, te potiču razvoj neuralne cijevi, koja čini osnovu živčanog sustava. Taj proces se naziva neurulacija (6,8). Neurulacija započinje proliferacijom i diferencijacijom stanica ektoderma u središnjoj crti, koje potom oblikuju neuralnu ploču. Neuralna ploča se nabire u neuralni žlijeb, koji spajanjem svojih rubova daje neuralnu cijev.

Stanice srednjeg zametnog listića, mezoderma, daju osnovu za razvoj mišićnokoštanog, krvožilnog i urogenitalnog sustava (6,9) (sl.3). One se u ranoj fazi razvoja zametka intenzivno umnažaju, te duž zametka sa svake strane notokorda oblikuju dva krila mezoderma, koja se podijele od medijalno prema lateralno na paraaksijalni mezoderm, intermedijarni mezoderm, te bočne ploče. Paraaksijalni mezoderm se pod utjecajem notokorda podijeli u niz pravilnih nakupina stanica – somita. Somiti se potom podijele na sklerotom, od kojeg nastaju kosti trupa, miotom, koji daje osnovu za skeletne mišiće i dermatom, koji je osnova vezivnog tkiva (dermisa) kože. Sklerotom nastaje pod utjecajem induktivnih signala SHH (sonic hedgehog) iz notokorda i ploče dna neuralne cijevi, dok na miotom i dermatom djeluju bjelančevine iz obitelji WNT i NTF3 (neurotrophin 3) koje izlučuje dorzalni dio neuralne cijevi. Intermedijarni mezoderm daje osnovu za nefrotome i nefrogeni tračak, od kojih će se razviti osnove bubrega i spolnog sustava. Stvaranjem intraembrionalnog celoma bočne ploče se razdvoje u parijetalni i visceralni list. Parijetalni list se zajedno s ektodermom razvija u ventralnu i lateralnu stjenku tijela. Visceralni list s endodermom sudjeluje u izgradnji probavnog i dišnog sustava.

Od endoderma nastaje primitivno crijevo koje čini osnovu probavnog sustava (6,10) (sl. 3). U početku probavna cijev široko komunicira sa žumanjčanom vrećom, dok se kasnije ova komunikacija suzi na ductus omphalomesentericus. Endoderm daje osnovu za pokrovni i

žljezdani epitel probavnog i dišnog sustava, štitnu žlijezdu, epitelna tjelešca, epitel bubnjišta, tonzile, timus, jetru, gušteraču, te epitel mokraćnog mjehura.



Slika 3: Prikaz derivata tri zametna listića.

1.2. Primarni i sekundarni mehanizam razvoja

Razvoj mišjeg zametka, kao i zametaka drugih kralješnjaka, odvija se različito u kranijalnom i kaudalnom dijelu (11-16). Kranijalni dio zametka razvija se gastrulacijom, što znači da embrionalne strukture nastaju indirektno, preko zametnih listića, što se naziva primarnim ili indirektnim mehanizmom razvoja. Za razliku od primarnog ili indirektnog mehanizma razvoja, u kaudalnom dijelu zametka prisutan je sekundarni ili direktni mehanizam razvoja. Tijekom sekundarnog mehanizma razvoja, strukture u kaudalnom dijelu zametka nastaju bez stvaranja zametnih listića, direktno od nediferenciranih mezenhimskih stanica smještenih u samom vrhu repa zametka (repni pupoljak).

Završetak oblikovanja triju zametnih listića i nestanak primitivne pruge predstavlja kraj gastrulacije. Međutim, kaudalni dio zametka nastavlja rasti u duljinu. Budući da je gastrulacija završila, postavilo se pitanje podrijetla i načina nastanka stanica i struktura kaudalnog dijela zametka. Na temelju opisanih morfogenetskih zbivanja toga područja nastale su dvije međusobno suprotstavljene teorije. Holmdahl je 1925. godine predložio model sekundarnog razvoja zametka, koji za razliku od primarnog, ne uključuje razvoj tkiva i organa putem gastrulacije i zametnih listića, već direktno iz nediferenciranog mezenhima repnog pupoljka (11). Ovom modelu je suprotstavljen Pasteelsov model iz 1943. godine, prema kojem se kaudalne strukture zametka razvijaju kao produžetak struktura nastalih tijekom gastrulacije (17). Morfološka istraživanja rađena na zamecima štakora (14,15), miša (16) te prisutnost multipotentnih stanica u repnom pupoljku (18), podržavaju Holmdahlov model, dok su istraživanja izražaja gena pokazala da repni pupoljak nije homogena tvorba (19-22), što podržava Pasteelsov model. Tako je ova dvojba i dalje neriješena.

1.2.1. Razvoj kaudalnog dijela zametka

Repni nabor u miša se oblikuje kod 8,5 dana starih zametaka, dok se sama osnova repa počinje izdvajati kod 10 dana starih zametaka (30-35 somita, Theiler stadij 16). Početak razvoja repa obilježen je nestankom primitivne pruge i stvaranjem repnog pupoljka. Stanice

repnog pupoljka potječu od ostataka primitivne pruge i primitivnog čvorića, te stanica iseljenih iz kaudalnog dijela neuralnog žlijeba i kaudalnog dijela mezodermalnog celomskog epitela (22). Diferencijacijom stanica repnog pupoljka nastaju dva tračka stanica: dorzalni – moždinski i ventralni – repni tračak (14-16). Diferencijacijom moždinskog tračka nastaje sekundarna neuralna cijev, dok se repni tračak podijeli na dorzalnu nakupinu stanica, koja oblikuje notokord, te na ventralnu, od koje nastaje repno crijevo. Tako se diferencijacijom repnog pupoljka oblikuju tri aksijalne strukture repa: neuralna cijev, notokord i repno crijevo, dok se paraaksijalno razvijaju somiti (14-16).

1.2.2. Primarna i sekundarna neurulacija

Razlika između primarnog i sekundarnog mehanizma embrionalnog razvoja vidi se najbolje na razlici između primarne i sekundarne neurulacije (12,23,24). Primarna neurulacija se odvija u kranijalnom dijelu zametka. Pod utjecajem već spomenutih bjelančevina CHRD, NOG, FST i WNT3 koje izlučuju stanice notokorda, središnji dio ektoderma zadebljava, pa nastaje ravna neuralna ploča. Lateralni rubovi tako nastale neuralne ploče uzdignu se i čine neuralne nabore, dok središnje udubljenje oblikuje neuralni žlijeb. Osnovni mehanizam kojim se od neuralne ploče oblikuje neuralna cijev jest savijanje stjenki oko dvije točke zakretanja: ventralni dio neuralne ploče je pričvrsnim spojevima vezan uz priležeće tkivo, uključujući i notokord, te tako omogućuje zakretanje oko središnje točke savijanja (engl. median hinge point, MHP), odnosno oblikovanje neuralnog žlijeba u obliku slova „V“. Dorzolateralno područje neuralnih nabora priliježe uz površinski ektoderm, te je tako omogućeno zakretanje oko dorzolateralnih točki savijanja (engl. dorsolateral hinge points, DLHP), odnosno zatvaranje neuralnog žlijeba u neuralnu cijev (slovo „V“ u slovo „O“). Prvo se spajanje dogodi u kranijalnoj trećini osnove zametka, da bi se potom zatvaranje neuralnog žlijeba istovremeno odvijalo u kranijalnom i kaudalnom smjeru. Ovim načinom se u cijelom kranijalnom i srednjem dijelu zametka oblikuje primarna neuralna cijev (6,25). Neuralna cijev čini osnovu za razvoj kralježnične moždine, dok njeno kranijalno proširenje u obliku moždanih mjehurića čini osnovu za razvoj mozga.

Kada se neuralni nabori uzdignu, neuroektodermalne stanice na rubu nabora se počinju odvajati od ostatka neuroektoderma tvoreći neuralni greben. Stanice neuralnog grebena

oblikuju osjetne i autonomne ganglije, srž nadbubrežne žlijezde, vezivno tkivo glave i vrata, Schwanove stanice, melanocite, te stanice moždanih ovojnica (6,26).

Za daljnji razvoj i konačnu diferencijaciju stanica neuralne cijevi, potrebni su induktivni signali iz okolnih struktura. Notokord izlučuje bjelančevinu SHH koja djeluje na ventralni dio neuralne cijevi. Pod njezinim utjecajem dolazi do diferencijacije neuroektoderma i razvitka ploče dna: stjenka neuralne cijevi na tom je mjestu mnogo tanja od prosječne debljine stjenke neuralne cijevi, jezgre stanica su izduženije od onih u ostatku neuralne cijevi i smještene bazalno, te na tom mjestu nema razvoja neurona (27).

Ploča dna pod utjecajem notokorda počinje također izlučivati SHH koji djeluje na susjedna područja neuralne cijevi. Ovisno o koncentraciji ove molekule područja neuralne cijevi različito udaljena od ploče dna se različito diferenciraju. Tako se neposredno uz ploču dna počinju razvijati motoneuroni. Postepeni pad koncentracije SHH prema dorzalnoj strani neuralne cijevi omogućuje aktivaciju transkripcijskih čimbenika svojstvenih dorzalnom dijelu neuralne cijevi kao što je PAX3 (paired box 3). Ova informacija o položaju u prostoru omogućuje da se u dorzalnim dijelovima neuralne cijevi razviju neuroni osjetnog puta, te interneuroni, a u ventralnom dijelu motorni neuroni kralježnične moždine. Na taj način gradijent SHH određuje dorzo-ventralnu diferencijaciju neuralne cijevi. Osim niske koncentracije bjelančevine SHH, dorzalni dio neuralne cijevi je pod utjecajem visoke koncentracije BMP, kojeg izlučuje okolni mezenhim (28,29).

Za razliku od primarne neurulacije, kojom nastaje primarna neuralna cijev, nastanak sekundarne neuralne cijevi obilježen je diferencijacijom stanica repnog pupoljka (16,18,23). Od dorzalnog dijela repnog pupoljka odvaja se nakupina stanica koja se naziva moždinski tračak. U moždinskom tračku dolazi do preraspodjele stanica, od otvorenog smještaja stanica svojstvenog mezenhimu repnog pupoljka u zatvoreni smještaj stanica, svojstven epitelu. Tijekom ove mezenhimsko-epitelne preobrazbe stanice počinju zrakasto okruživati novostvorenu središnju šupljinu. Na njima se razlikuje apikalni kraj koji graniči sa središnjom šupljinom i bazalni kraj uz koji se počinje stvarati bazalna lamina. Uspostavom apikobazalne polarizacije, te stvaranjem međustaničnih spojeva i bazalne lamine, stanice dobivaju obilježja neuroepitela.

Iako se pretpostavlja da je granica između primarne i sekundarne neuralne cijevi u području lumbosakralne regije, opisani mehanizmi direktnog i indirektnog razvoja imaju za posljedicu nastanak neprekinute neuralne cijevi u kojoj nije moguće morfološkim kriterijima razlikovati ova dva dijela neuralne cijevi. Jedino je kod ptica prolazno u razvoju prisutna prijelazna zona preklapanja primarne i sekundarne neuralne cijevi, u kojoj se neuralna cijev oblikuje spajanjem šupljina primarne i sekundarne neuralne cijevi (20).

1.2.3. Primarni i sekundarni razvoj notokorda

Prisustvo notokorda (lat. chorda dorsalis) predstavlja osnovnu osobinu nadkoljena *chordata* (svitkovci), kojem pripadaju svi kralježnjaci (koljeno *vertebrata*). To je prvi skelet zametka, koji čvrstoćom omogućuje rast u duljinu, te predstavlja jednu od prvih struktura zametka. U nižih kralješnjaka notokord je trajna struktura, dok je u viših kralješnjaka prisutan samo tijekom razvoja zametka. U odraslih oblikuje nucleus pulposus intervertebralnih diskova. Osim mehaničke uloge, notokord je izvor brojnih induktivnih signala. Normalan razvoj neuralne cijevi (središnjeg živčanog sustava) ovisi o čimbenicima koje izlučuju stanice notokorda, smještene ventralno uz neuralnu cijev (6).

Tijekom gastrulacije primarni notokord nastaje iseljavanjem stanica epiblasta iz primitivnog čvorića smještenog na kranijalnom kraju primitivne pruge (6). Ove stanice se iseljavaju prema kranijalno dok ne dosegnu prekordalnu ploču. Na početku, zajedno sa stanicama hipoblasta, čine krov pracrijeva, no kako se hipoblast zamjenjuje novostvorenim endodermom, notokord postaje nezavisni tračak stanica. Ovaj tračak se pruža od primitivnog čvorića do orofaringealne membrane, koja je mjesto spoja između ektoderma i endoderma. Stanice iseljene iz epiblasta pridodaju se stanicama notokorda u razvoju, pa se notokord produžuje prema kaudalnom kraju zametka. Tijekom kranijo-kaudalnog savijanja zametka i stvaranjem nabora glave, savija se i kranijalni dio notokorda, koji ima važnu ulogu pri stvaranju kosti baze lubanje. Ostali dio notokorda sudjeluje u diferencijaciji sklerotoma koji će stvoriti kosti kralježnice.

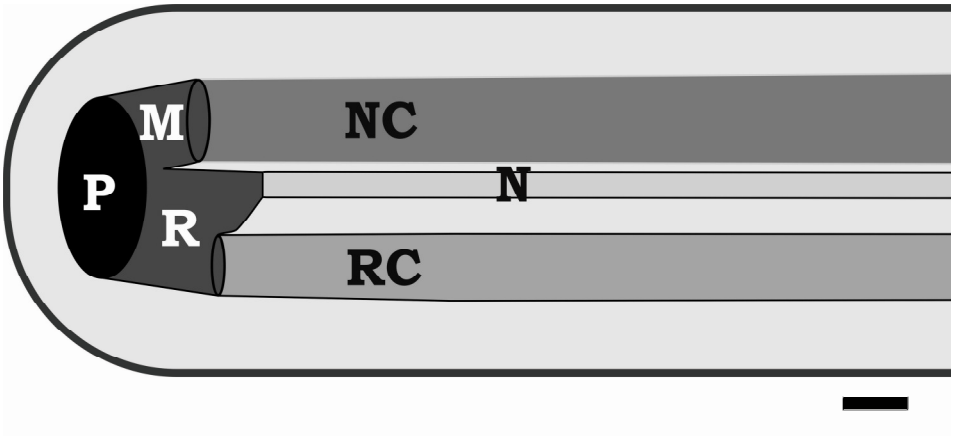
U kaudalnom dijelu zametka notokord se razvija od središnjeg dijela repnog pupoljka (14,16). Stanice repnog pupoljka, koje ne stvaraju moždinski tračak, udružuju se u nakupinu stanica smještenu ventralno od moždinskog tračka, nazvanu repni tračak. Sekundarni notokord

nastaje odvajanjem tračka stanica od dorzalnog dijela repnog tračka, čiji ostatak predstavlja osnovu za repno crijevo. Novostvorene stanice imaju značajke istovjetne onima koje ima primarni notokord u tijelu zametka: velike međustanične prostore, proširene cisterne Golgijevog aparata, mitohondrije u uskom kontaktu s cisternama hrapave endoplazmatske mrežice, te velike nakupine glikogena (15).

1.2.4. Primarni i sekundarni razvoj repnog crijeva

Primarno crijevo je osnova za razvoj cijelog probavnog sustava i nastaje od endoderma. Tijekom gastrulacije endoderm nastaje od iseljenih stanica epiblasta koje razmiču stanice hipoblasta i smještaju se uz rub žumanjčane vreće. Tako nastali krov pracrijeva je u početku ravna ploča, široko otvorena prema žumanjčanoj vreći. Tijekom rasta i produljavanja zametka, veza s žumanjčanom vrećom se sve više suzuje. Endoderm postepeno poprima oblik žlijeba, te se njegovim zatvaranjem oblikuje primitivno crijevo. Komunikacija s žumanjčanom vrećom preostaje samo u srednjem dijelu primitivnog crijeva i naziva se ductus omphalomesentericus. Proksimalni i distalni završeci primitivnog crijeva (bukofaringealna i kloakalna membrana) su jedina dva mjesta u zametku gdje je endoderm u dodiru s ektodermom.

Daljnjim rastom zametka, te nastankom repa, primitivno crijevo se bez prekida nastavlja distalno od kloakalne membrane u osnovu repa. Taj se dio crijeva naziva repno crijevo. Ono se razvija mehanizmom sličnim sekundarnoj neurulaciji i uključuje mezenhimsko-epitelnu preobrazbu (15,16). Mezenhimske stanice repnog pupoljka oblikuju repni tračak, čiji je dorzalni dio osnova za notokord. Stanice u ventralnom dijelu repnog tračka oblikuju rozetu, unutar koje se pojavljuje šupljina i stječu epitelna svojstva. Stanice postaju apikobazalno polarizirane, na njihovom apikalnom kraju se pojavljuju mikrovili, dok se na bazalnom kraju stvara bazalna lamina. Repno crijevo kao privremena struktura ubrzo nestaje programiranim odumiranjem stanica. Najprije dolazi do odumiranja stanica u proksimalnom dijelu repnog crijeva, čime se gubi veza repnog crijeva s crijevom u tijelu zametka. Proces odumiranja stanica se postepeno širi na cijelo repno crijevo, koje na kraju potpuno iščezne.



Slika 4: Sekundarni mehanizam embrionalnog razvoja. U kaudalnom vrhu zametka se nalazi nakupina nediferenciranih stanica – repni pupoljak (P). Kranijalno, diferencijacijom repnog pupoljka nastaje dorzalna skupina stanica – moždinski tračak (M) i ventralna skupina – repni tračak (R). Stanice moždinskog tračka oblikuju sekundarnu neuralnu cijev (NC), dok se stanice repnog tračka podijele i oblikuju sekundarni notokord (N) i repno crijevo (RC). Crta mjerila - 50 µm.

1.3. Poremećaji razvoja kaudalnog dijela zametka

Iznimno složena zbivanja od oplođene jajne stanice do razvijene jedinke praćena su rizikom nastanka različitih poremećaja. Poremećaji razvoja kaudalnog dijela zametka obuhvaćaju poremećaje razvoja sekundarne neuralne cijevi, notokorda, repnog crijeva i somita.

1.3.1. Poremećaji razvoja neuralne cijevi

Poremećaji razvoja neuralne cijevi obuhvaćaju poremećaje razvoja kralježnične moždine i njenih ovojnica. Ovi poremećaji su često povezani s poremećajima razvoja kralježnice.

Spina bifida je jedan od najčešćih poremećaja razvoja zametka u čovjeka, budući da zahvaća oko 0,1% novorođene djece (30). Posljedica je nezatvaranja neuralne cijevi tijekom prvog mjeseca embrionalnog razvoja i može biti izražena u tri različito teška stupnja (31,32):

1. Spina bifida okulta (s.b. occulta) obilježena je otvorenim kralješcima, dok su kralježnična moždina, ovojnice kralježnične moždine i priležeća koža neoštećeni (sl.5). Većina ih ostaje neotkrivena.

2. Spina bifida cystica je obilježena otvorenim kralješcima kroz koje se izbočuju ili samo ovojnice kralježnične moždine (meningokela, meningocele) ili ovojnice kralježnične moždine sa živčanim tkivom (meningomijelokela, meningomyelocele). U oba slučaja, koža iznad defekta je neoštećena (sl.5). Ovaj defekt je redovito praćen smetnjama u inervaciji odgovarajućih područja tijela.

3. Rahishiza (rachischisis) je obilježena otvorenim kralješcima i defektom kože kroz koje se izbočuju ovojnice kralježnične moždine sa živčanim tkivom. Osim smetnji u inervaciji, defekt kože omogućuje popratne infekcije.

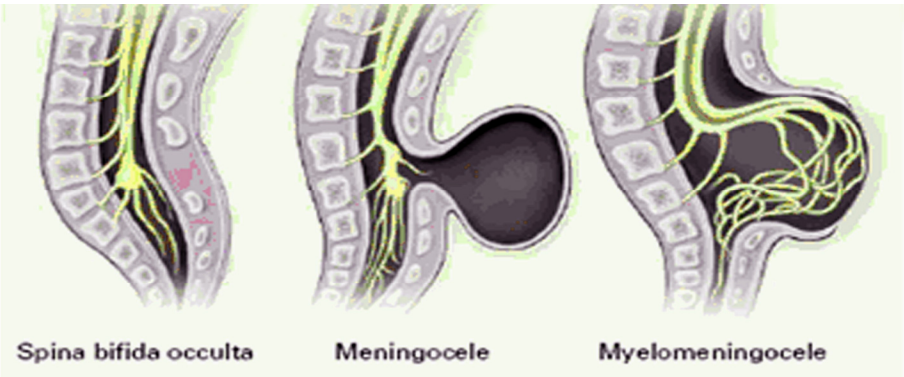
Najčešće mjesto nastanka spine bifide je lumbosakralno područje, za koje je pretpostavljeno da odgovara granici primarnog i sekundarnog procesa razvoja zametka (31-33). Budući da lumbalni živci inerviraju mišiće nogu, a sakralni živci mokraćni mjehur, spolne organe i crijeva, posljedica spine bifide može biti cijeli niz poremećaja: manjak osjeta navedenih područja, slabost regionalnih mišića, inkontinencija i impotencija (31,34).

Spinu bifidu moguće je dokazati ultrazvukom nakon 18. tjedna razvoja ljudskog fetusa. Na postojanje spine bifide ukazuje povišena razina acetilkolinesteraze te alfafetoproteina u krvi trudnice (35).

Uzimanje folne kiseline tri mjeseca prije planiranog začeća i tijekom prva četiri tjedna razvoja zametka smanjuje vjerojatnost nastanka razvojnih poremećaja neuralne cijevi i do 70% (32,36,37).

Nezatvaranje kranijalnog dijela neuralne cijevi uzrokuje anencefaliju (anencephalia), težak poremećaj obilježen nedostatno razvijenim velikim mozgom i lubanjom. Iako osnovne funkcije (disanje, rad srca) mogu biti održani, ovaj poremećaj je redovito praćen pobačajem ili ranom novorođenačkom smrću (32).

Encefalokela (encephalocele) je poremećaj razvoja u kojem zbog djelomičnog nezatvaranja kranijalnog dijela neuralne cijevi postoji otvor na koštanim i kožnim strukturama, kroz koji dolazi do protruzije živčanog tkiva. Većina takvih poremećaja je također nespojiva sa životom, iako se manje encefalokele mogu operativno riješiti (38).



Slika 5 : Tri najčešća oblika spine bifide u lumbosakralnom području. Preuzeto iz (36).

1.4. Proučavanje uloge gena u sisavaca

Pitanje biološke osnove nasljeđivanja, koja se prenosi od roditelja na potomstvo, postavljeno je u samim počecima znanstvenih istraživanja, već u raspravama starovjekovnih filozofa. Prvi odgovori na to pitanje začeti su sredinom 19. st. pokusima Mendela, koji nalazi zakonitosti u načinu nasljeđivanja. Pritom ostavlja otvoreno pitanje prirode tvari koja se prenosi kroz generacije. Griffith pokusima transformacije bakterija dokazuje postojanje materijalne osnove nasljeđivanja, dok Avery konačno pokazuje da je za prijenos svojstava zadužena molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (39). 1954. Watson i Crick objašnjavaju građu DNA, te otkrivaju način na koji ova molekula prenosi poruku (40). Kada je, deseteljeće poslije, razjašnjen genetički kod, postavlja se temeljna dogma genetike: Gen je dio molekule DNA koji se prepisuje u ribonukleinsku kiselinu (RNA), a ova se prevodi u bjelančevinu. Zapis nasljeđa sadržan u DNA nazvan je genotip, a bjelančevine, koje genotip određuje, osnova su ustroja i djelovanja jedinke - fenotipa. Usavršavanje postupka sekvencioniranja DNA omogućuje Projekt ljudskog genoma (engl. Human Genome Project, HGP) koji je pokrenut 1990. godine s ciljem da se sekvencionira cijeli ljudski genom. Zahvaljujući primjeni novih tehnika (lančana reakcija polimeraze, kvaščev umjetni kromosom, automatizacija, minijaturizacija i sl.), ali i sve većem broju uključenih znanstvenika, HGP i tvrtka Celera Genomics su u veljači 2001. istovremeno objavili prvu nepotpunu verziju kompletnog ljudskog genoma (41,42). Najvažniji rezultat ovih napora je podatak da čovjek ima znatno manje gena od procijenjenog broja (od procijenjenih 100 tisuća došlo se do 20-tak tisuća), što je jednako ili čak manje nego u nekim drugim vrstama. Manje od 2% DNA kodira bjelančevine a jedan ljudski gen zbog alternativnog prekrajanja može odrediti više bjelančevina (43).

Ova otkrića potaknula su prijelaz iz ere sekvencioniranja u eru funkcionalne genomike, čiji je osnovni zadatak povezivanje sekvence s točnom ulogom pojedinog gena. Od poznavanja sekvence ljudskog genoma očekuju se barem dvije velike moguće dobiti: sinteza novih lijekova i mogućnost genske terapije dosad neizlječivih bolesti (44-46).

1.4.1. Miš kao pokusni model u genetici sisavaca

Najčešće korišten model za istraživanje genetike sisavaca je miš. Miš je mala, za uzgoj razmjerno jeftina životinja koja se brzo razmnožava, te dijeli oko 95% gena sa čovjekom. Evolucijski čovjeku bliže životinje poput majmuna su neusporedivo skuplje za uzgoj, nije ih moguće imati dovoljan broj za potrebe većine bazičnih istraživanja, a zbog duge životne dobi rezultati bi bili neizvjesni (47,48).

Osim istraživanja na odraslim životinjama, miš je posebno vrijedan u području embriologije. Metodom praćenja vaginalnih čepova, lako se određuju dani trudnoće, te se jednostavno izoliraju zameci određenih razvojnih stadija. Analizom vanjskih obilježja zametaka, te uvidom u tablice u kojima su za svaki stadij navedene određene osobitosti pojedinih stadija, može se vrlo precizno odrediti točna starost zametka (49). Razvoj tkiva i organa miša usporediv je s ljudskim.

1.4.2. Određivanje uloge gena pomoću genetski promijenjenih miševa

Dva su osnovna pristupa kojima možemo ispitivati ulogu nekog gena. Prvi je fenotipski: promatranjem promjena u fenotipu (promjena u izgledu ili djelovanju stanice, organa ili cijelog organizma), njihovim opisivanjem, te potom pronalaženjem gena koji je za te promjene odgovoran. Značajan broj primjera osigurala je sama priroda, spontano stvorivši razne mutante. Djelovanjem raznih mutagenih sredstava, umjetno je stvoren velik broj životinja nosilaca mutiranih gena. Nedostaci ovog pristupa su da mutacije nastaju slučajno, nastala promjena se ne može kontrolirati niti predvidjeti, a mutirani gen se može odrediti tek složenim postupkom pozicijskog kloniranja.

U obrnutom, genotipskom pristupu (engl. reverse genetics) kreće se od gena i poznatog dijela DNA koji zauzima. Mijenjanje aktivnosti ovog gena, promijenit će fenotip, te se na osnovu promjene fenotipa zaključuje o ulozi gena. Dodatna aktivnost gena rezultira dodatnom ulogom (engl. gain of function), a smanjena aktivnost ili potpuno onemogućavanje gena (engl. knockout) dovodi do neispunjenja njegove uloge (engl. loss of function). Sustavnim proučavanjem promjena fenotipa, dolazi se do spoznaje za što je taj gen zadužen. Jedan od najraširenijih i najčešće korištenih postupaka je onemogućavanje gena.

2003. je pokrenut Projekt onemogućavanja mišjih gena (engl. Knockout mouse project, KOMP) kojemu je cilj genetski preinačiti sve mišje gene. Tako će se dobiti banka mutiranih mišjih gena koja će imati za posljedicu uvid u ulogu svih gena u miša. Iako se ljudski geni djelomično razlikuju od mišjih, velika će sličnost između ova dva sisavca doprinijeti razumijevanju ljudskog genskog ustroja, fiziologije i patologije (50).

Posebna vrijednost postojanja genetski promijenjenih miševa očituje se u području embriologije. Naime, eksperimentalnu embriologiju zametaka sisavaca otežava činjenica da se razvoj odvija u maternici, te je zametak teško dostupan istraživaču. Budući da su eksperimentalne manipulacije zamecima sisavca time znatno ograničene, genetski preinačene životinje s različitim razvojnim poremećajima predstavljaju rješenje tog problema. Tako danas postoji niz mutanata s promijenjenim razvojem neke ciljane strukture. Proučavanje posljedica do kojih takav nedostatak vodi omogućava uvid o ulozi te strukture u razvoju zametka.

Mišji mutanti istraživani u ovom radu nastali su spontano i prepoznati su na osnovi promjene fenotipa (fenotipski pristup). Danas je za oba mutanta poznata mutacija koja je odgovorna za te promjene.

1.5. Mišje linije *splotch* i *truncate*

1.5.1. Mišja linija *splotch*

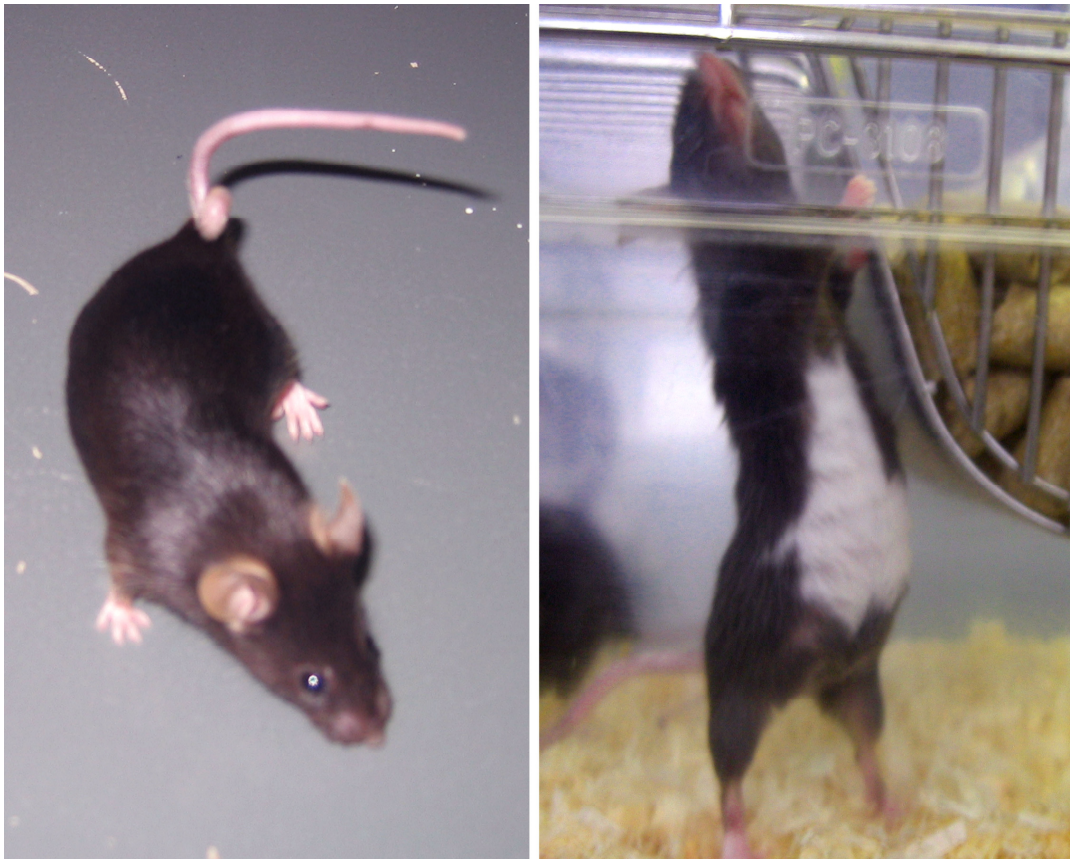
Splotch je prvi put opisan 1947. kao spontano nastali nasljedni poremećaj miševa (51). Miševi su naziv *splotch* dobili po bijeloj pjezi (engl. *splotch*) na trbuhu, koja obilježava heterozigotne nosioce mutacije. *Splotch* homozigoti ugibaju oko 14. dana razvoja mišjeg zametka, tijekom kojeg pokazuju poremećaje u razvoju neuralne cijevi, poremećaje migracije stanica neuralnog grebena, te poremećaje u razvoju somita i srca (52,53). Uzrok tog fenotipa je točkasta mutacija u 3. intronu *Pax3* gena (1. kromosom) koja dovodi do greške u prekrajanju i gubitka 4. egzona, odnosno do prevođenja u kraću i nefunkcionalnu bjelančevinu, kojoj nedostaje *oktapeptid* domena (54). *Splotch* homozigoti u lumbosakralnom području nemaju zatvoren neuralni žlijeb, t.j. neuralna cijev je otvorena (spina bifida), a stanice dorzalnog dijela otvorene neuralne cijevi apoptotički odumiru. U kranijalnom dijelu neuralne cijevi u nekih homozigota nalazi se egzencefalija.

Nedostatak *Pax3* gena u stanicama neuralnog grebena ima za posljedicu poremećaj njihove migracije, što uzrokuje nedostatak simpatičkih i spinalnih ganglija, Schwanovih stanica, melanocita i stanica koje migriraju u srce (56,57). Nepravilan razvoj srca je neposredan uzrok smrti homozigotnih *splotch* zametaka starih oko 13 dana (57,58).

Pokusima u kojima su u *splotch* miševa označene stanice somita, od kojih su neke prekursori za razvoj mišića udova, dokazano je da izostaje njihova migracija u osnove udova. Kada su te stanice presađene u osnovu udova došlo je do normalnog razvoja mišića tog područja. Time se pokazalo da je *Pax3* gen potreban za migraciju, ali ne i za diferencijaciju stanica koje iz somita migriraju u osnovu udova (59). Iako *Pax3* nije izražen u sklerotomu, u *splotch* heterozigotnih miševa postoje poremećaji građe rebara, što ukazuje na postojanje induktivnih *Pax3* signala iz dermomiotoma na sklerotom (60). Pokusima u kulturi stanica pokazano je da je *Pax3* nužan za diferencijaciju neurona perifernog živčanog sustava (61).

1.5.1.1. Porodica Pax gena

Gen *Pax3* dio je porodice *Pax* gena, koja u miša broji do sada otkrivenih 9 članova (62,63). Svi su čimbenici prepisivanja, što znači da utječu na prepisivanje drugih gena. Svi *Pax* geni dijele *paired box* domenu od 384 pb. Uz *paired box* domenu, u različitim *Pax* genima mogu još biti prisutne domene *oktapeptid* i *homeodomena. Paired box* i *homeodomena* su odgovorne za vezanje ovih bjelančevina za DNA. Visoka evolucijska očuvanost, odnosno prisutnost sekvence u gotovo svim živim bićima u skladu je s brojnim ulogama ovih gena u razvoju zametka. Premda se može reći da gotovo svi *Pax* geni sudjeluju u razvoju gotovo svih organskih sustava, ipak postoji podjela po važnosti pojedinih Pax gena u pojedinim organskim sustavima. Tako *Pax1* i *Pax9* prvenstveno upravljaju razvojem koštanog sustava. Mutant *Pax1* nazvan *undulated* jedan je od modela za istraživanje razvoja skeleta. *Pax2* i *Pax8* upravljaju razvojem urogenitalnog sustava, te njihove mutacije sudjeluju u nastanku



Slika 6: *Splotch* miš. Vidljiva je bijela pjega u području trbuha.

tumora i malformacija bubrega. *Pax3* i *Pax7* upravljaju razvojem živčanog i mišičnog sustava, te srca. Mutacija *Pax3* u miša je nazvana *splotch*, a u čovjeka odgovara Waardenburgovom sindromu. *Pax4* i *Pax6* upravljaju razvojem endokrinog dijela gušterače, *Pax5* imunološkog sustava, a *Pax6* oka. *Pax6* mutant se naziva *smalleye*, što u čovjeka odgovara aniridiji.

1.5.1.2. Waardenburgov sindrom

Waardenburgov sindrom (WS) je prvi put opisan 1951. godine kada je uočeno da neka djeca s različitom bojom šarenice oka imaju oslabljen sluh (64). Do danas su opisana 4 tipa Waardenburgovog sindroma (65,66). Tip 1 je autosomno dominantna bolest uzrokovana mutacijom *PAX3* gena u kojoj su prisutni različiti poremećaji razvoja glave, kao što su urođena gluhoća, tipičan izgled lica (široko razmaknute oči - dystopia canthorum, spljošten nos), te poremećena pigmentacija očiju, kože i kose (67). WS tip 2 uzrokuju mutacije različitih gena, od kojih je najčešća mutacija gena *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) (68). Osobe oboljele od WS tip 2 imaju teže oštećen sluh, no malformacije lica su manje od onih u WS tip 1 (66). Tip 3 (Klein-Waardenburg) je težak oblik bolesti kod homozigotnih nosioca promijenjenog *PAX3* gena, što je uz opisane simptome praćen nerazvijenim mišićima ramenog obruča i ruku (69,70). Tip 4 (Waardenburg-Shah) je heterogena bolest uzrokovana mutacijom gena *EDNRB* (endotelin-B receptor), *EDN3* (endotelin 3) ili *SOX10* (sex determining region Y-box 10), čiji simptomi su različiti poremećaji inervacije crijeva (Hirschprungova bolest), pigmentacije, te sluha (71).

1.5.2. Mišja linija *truncate*

Truncate je prvi put opisan 1959. kada se pojavio kao spontano nastao mutant (72). *Truncate* homozigoti žive i pare se, te imaju kratak, kao odsječen rep (engl. *truncate*). Suženje kaudalnog dijela repa se viđa već kod 11 dana starih zametaka. Osnovni poremećaj kod homozigota je nepravilan razvoj notokorda (16,72-74). Notokord je isprekidan i u nekih zametaka ne dopire do vrha repa. Posljedice tog nedostatka očituju se na razvoju koštanog sustava kaudalnog dijela zametka: opisana je mjestimična degeneracija sklerotoma, poremećen razvoj ili nedostatak sakralnih i lumbalnih kralježaka, te sužena zdjelica (72). U nekih jedinki poremećaj građe kaudalnog dijela kralježnice ima za posljedicu pritisak na kralježničnu moždinu, te paralizu stražnjih udova. Poremećaji inervacije uterusa i sužena zdjelica zajedno doprinose smanjenoj plodnosti *truncate* homozigotnih ženki.

Potraga za genom čija mutacija uzrokuje opisani fenotip započela je određivanjem susjednih gena koji se prenose zajedno s njim kao vezano svojstvo (73). Analiza više od osam tisuća miševa u nekoliko generacija doprinijela je pretpostavci da je gen *truncate* smješten u području 6. kromosoma velikom 3,3 cM, što odgovara oko 3,3 Mb. Upotrebom umjetnih bakterijskih kromosoma, te pozicijskim kloniranjem, područje gena *truncate* suženo je na približno 180 kb (74). Područje je u potpunosti sekvencionirano, te je nađeno da sadrži 6 gena. Pomoću programa za predviđanje izgleda bjelančevina otkriveno je da jedan gen sadrži homeodomenu sličnu onoj koju sadrže geni koji u drugim vrstama upravljaju razvojem notokorda (*Flh*, *Cnot*, *Xnot*). Tada je postupkom *in situ* hibridizacije određen izražaj tog novootkrivenog gena, te je pronađeno da je izražen u notokordu. Ipak, za potpuni dokaz da je mutacija ovog gena odgovorna za fenotip *truncate* miša, bilo je potrebno u potpunosti odrediti mutaciju. To je učinjeno sekvencioniranjem novootkrivenog gena u nekoliko *truncate* i kontrolnih miševa. Otkriveno je da je opisani fenotip uzrokovan točkastom mutacijom u području 2. egzona ovog gena, koja dovodi do zamjene fenilalanina cisteinom u prvoj petlji homeodomene. Unatoč činjenici da je mutirana samo jedna aminokiselina, ovakva bjelančevina je nedjelotvorna (74). Sukladno genima koji su u drugim vrstama odgovorni za razvoj notokorda, gen je nazvan *Noto*. Dodatni dokaz da je mutacija *Noto* gena odgovorna za *truncate* fenotip napravljen je onemogućavanjem ovog gena u miša: umjesto 80% *Noto* gena, ubačen je konstrukt sa zelenom flourescentnom bjelančevinom. Analiza ovog miša pokazala je da je fenotip između $noto^{tc/tc}$ i $noto^{GFP/GFP}$ miša gotovo identičan. Time je nedvojbeno pokazano da je mutacija gena *Noto* odgovorna za *truncate* fenotip. Nešto jače izražen fenotip

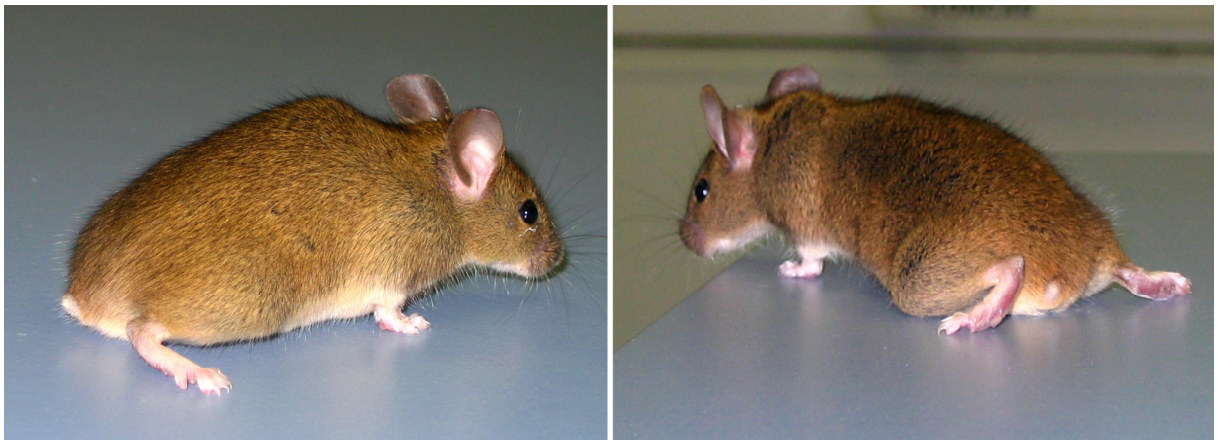
u *Noto*$^{GFP/GFP}$ mišu (veća postnatalna smrtnost i poremećaj notokorda u većem dijelu zametka) pokazala je da je u *truncate* mišu prisutna mala aktivnost NOTO bjelančevine.

1.5.2.1. Gen *Noto*

Analiza izražaja gena *Noto* u miša pokazala je da se gen prvo izražava u području primitivnog čvorića u razdoblju regresije primitivne pruge (zameci stari 7,5 dana). Dan kasnije, izražaj *Noto* se nalazi u kaudalnoj polovici notokorda, gdje je vidljiv do razdoblja do 12,5 dana starosti zametka. Zameci stari 13 dana više ne izražavaju gen *Noto* (74).

Gen *Noto* u miša pripada evolucijski očuvanoj homeobox skupini gena koja upravlja razvojem aksijalnog skeleta. Homologni geni postoje u vinskoj mušici (*Ems*) (75), riba (*Flh*) (76), vodozemaca (*Xnot*) (77) i ptica (*Gnot*) (78). Ipak, dok je u većini kralješnjaka ovaj gen izražen cijelom duljinom notokorda, u sisavaca se izražaj *Noto* ograničava samo na kaudalni dio notokorda. Taj nalaz je sukladan evolucijskom shvaćanju složenosti razvoja živih bića. Po njemu se složenost ustroja postiže povećanjem broja gena i bjelančevina koje sudjeluju u razvoju i fiziološkim procesima. Budući da je razvoj sisavaca složeniji od razvoja vinske mušice, u razvoju svake strukture sudjeluje veći broj gena. Gen *Noto* pripada skupini gena koja se naziva ortolozi, odnosno evolucijski sljednici srodnih gena u jednostavnijim vrstama. Ipak zbog pojave novih gena koji također kontroliraju razvoj nekog dijela tijela, čini se da je gen *Noto* preuzeo manji i specifičniji odsječak. Tako gen *Noto* kontrolira razvoj samo kaudalnog dijela notokorda, što predstavlja dodatni poticaj u proučavanju autonomnih razvojnih zbivanja u kaudalnom dijelu zametka.

Odgovarajući gen *NOTO* se u čovjeka nalazi na 2. kromosomu i za sada nije nađena njegova mutacija koja bi se povezala s nekim fenotipom u ljudi.



Slika 7: *Truncate* miš. Vidljiv je nedostatak repa i nepravilan položaj stražnjih udova.

2. HIPOTEZA, CILJ I SVRHA RADA

Dosadašnja istraživanja embrionalnog razvoja sisavaca pretpostavila su postojanje različitih mehanizama razvoja u kranijalnom i kaudalnom dijelu zametka. Istraživanja rađena na zamecima štakora opisala su razvoj kaudalnog dijela u normalnih zametaka, no nisu se bavila mogućim mehanizmima nastanka različitih poremećaja razvoja. Stoga je **svrha** ovog rada na modelu genetski promijenjenih miševa opisati mehanizme razvoja i međusobne odnose struktura kaudalnog dijela zametka i doprinijeti razumijevanju etiopatogeneze odgovarajućih poremećaja.

Hipoteza ovog rada je da su promjene fenotipa mutiranih miševa *splotch* i *truncate* posljedica nepravilnog razvoja repnog pupoljka, te poremećenog sekundarnog mehanizma razvoja.

Cilj ovog rada bio je opisati razvoj kaudalnog dijela zametka normalnog miša, te ga usporediti s poremećenim razvojem zametka u mutanata *splotch* i *truncate*.

Da bi se postigao opći cilj rada, postavljeni su slijedeći specifični ciljevi:

1. Odrediti slijed zbivanja u razvoju kaudalnog dijela normalnih mišjih zametaka
2. Odrediti slijed zbivanja u razvoju kaudalnog dijela *splotch* i *truncate* zametaka
3. Razjasniti odnos poremećenog razvoja ispitivanih struktura i repnog pupoljka
4. Opisati razvoj notokorda, repnog crijeva i somita uz prisutnost poremećenog razvoja neuralne cijevi u *splotch* zametaka
5. Opisati razvoj neuralne cijevi, repnog crijeva i somita uz prisutnost poremećenog razvoja notokorda u *truncate* zametaka

3. UZORCI I POSTUPCI

U ovom radu upotrijebljeni su mišji zameci soja B6 (C57BL/6NCrl), te zameci mišjih mutanata *splotch* i *truncate* na genetskoj podlozi B6. Ukupno je za pokuse žrtvovano 50 ženki, čime je dobiveno oko 300 zametaka starih između 9 i 12,5 dana.

3.1. Postupci s životinjama

3.1.1. Parenje životinja

Kako bi dobili zametke odgovarajućeg stadija, dvije ili tri ženke stavljene su preko noći u kavez s jednim mužjakom. Svakog jutra pregledana je rodnica ženki kako bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa (engl. vaginal plug). Budući da se ženke pare samo tijekom ovulacije, koja je u miša svakog četvrtog dana, nalaz vaginalnog čepa odgovara početku trudnoće.

3.1.2. Žrtvovanje životinja

Trudne ženke su žrtvovane postupkom cervikalne dislokacije za genetsku i histološku analizu zametaka. Jednom rukom se glava životinje učvrsti u nepomičnom položaju, dok se drugom rukom izvede nagli pokret povlačenja repa. To dovodi do prekida kralježnične moždine u području vrata, te trenutne smrti. Potrebno je naglasiti kako je cervikalna dislokacija, uz usmrćivanje plinom, koje je pogodno za žrtvovanje većeg broja životinja, preporučen postupak eutanazije miševa zbog trenutne smrti eksperimentalne životinje.

3.1.3. Izolacija zametaka

Kako bi se dobili zameci željenog stadija, potrebno je trudnu mišicu žrtvovati u određeni dan. Dan žrtvovanja trudne mišice se računao se od dana kada je nađen vaginalni čep, budući da je taj dan označen kao dan kada je zametak star 0 dana, odnosno 0,5 dana, budući da se miševi pare noću. Tako je moguće lako odrediti dan i dio dana kada treba žrtvovati trudnu ženku. Ženka žrtvovana cervikalnom dislokacijom se položila na kiruršku podlogu i dlaka joj se premazala etilnim alkoholom. Prvim rezom se s donjeg dijela trbušne šupljine odstranila koža,

a drugim rezom mišićna stjenka. Tada se pristupilo trbušnoj šupljini, te su se našli lijevi i desni rog maternice sa zamecima. Rogovi maternice su se odrezali i premjestili u hladni fosfatni pufer PBS (engl. phosphate buffered saline; 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na_2HPO_4, 0,14 mM KH_2PO_4). U puferu su zameci odvojeni od svojih ovojnica. Kranijalni dio zametka je bio premješten u pufer za izolaciju DNA, dok je kaudalni dio zametka bio uronjen u fiksativ. Za dobivanje homozigotnih zametaka linije *splotch* i *truncate*, sparivane su odrasle heterozigotne životinje. Očekivani broj homozigotnih zametaka po Mendelovim zakonima je bio jedna četvrtina homozigotnih zametaka, polovina heterozigotnih zametaka i jedna četvrtina zametaka divljeg tipa. *Splotch* homozigoti stari 11 i 12 dana su bili prepoznati po svojim morfološkim obilježjima - spinom bifidom, egzencefalijom i dorzalno zavijenim vrhom osnove repa. Za potrebe prepoznavanja mlađih homozigotnih *splotch* zametaka, homozigotnih *truncate* zametaka, ali i potvrdu genotipa starijih zametaka razvijena je tehnika genotipizacije reakcijom lančane polimeraze na osnovu DNA izolirane iz kranijalnog dijela zametka. Svim homozigotnim zamecima su kontrole bili zameci iz istog legla kojima je potvrđen genotip divljeg tipa (B6 kontrolni zameci).

3.1.4. Određivanje stadija zametaka

Osim određivanja dobi zametka praćenjem vaginalnih čepova, potvrda dobi dobivena je brojanjem somita, te promatranjem vanjskih osobitosti zametaka. Tako je dob zametka starog 9 dana potvrđena stadijem od 16 do 22 parova somita, te makroskopski vidljivog zatvaranja prednjeg neuroporusa. Zametak star 10,5 dana je imao između 30 i 36 parova somita, zatvoren kaudalni neuroporus, te vidljivu osnovu stražnjih udova. Zametak star 11,5 dana je imao od 40 do 45 parova somita, vidljivo proširenje na završetku prednjeg uda kao osnovu stopala, te dug rep sa repnim pupoljkom koji prosijava kroz vrh repa. Zametak star 12,5 dana je imao više od 45 parova somita, vidljiv početak razvoja prstiju na prednjem udu, te proširenje osnove stopala na završetku stražnjeg uda.

3.2. Postupci s tkivima i DNA

3.2.1. Izolacija DNA i genotipizacija zametaka

Budući da je ovaj rad istraživao morfogenetska zbivanja u kaudalnom dijelu zametka, kranijalni dio zametka je bio iskorišten za dobivanje DNA zametka. Kranijalni dio zametka je uronjen u 200 uL pufera za otapanje (engl. lysis buffer, 50 mM Tris, pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% SDS) kojem je dodana proteinaza K u konačnoj koncentraciji od 100 µg/µl. Uzorak je ostavljen preko noći na +56ºC. Iduće jutro izolirana je DNA: uzorku je dodano 200 µl izopropanola, nakon čega je moguće vidjeti precipitiranu DNA. Nakon centrifugiranja od 20 minuta na maksimalnom broju okretaja, izopropanol se izbaci, a umjesto njega DNA se ispere dva puta sa 70% etilnim alkoholom. Nakon ponovnog centrifugiranja, alkohol se izbaci, a uzorak se ostavi sat vremena da ostatak alkohola potpuno ishlapi. Tako izolirana DNA se otopi u 50 ml sterilne vode.

Genotipizacija zametaka bila je učinjena lančanom reakcijom polimeraze. Reakcija je bila izvedena sa slijedećim parametrima: 200 nM početnica, 1mM dNTP, 2mM MgCl, 1,25 U GoTaq DNA polimeraze (Promega) i oko 1µg DNA, u ukupnom volumenu od 50µl. Temperature reakcija su bile slijedeće: početna denaturacija 94ºC 2 minute, 30 ciklusa koji sadrže denaturaciju na 94ºC, 30 sekundi, ljepljenje početnica na 56ºC kod genotipizacije *splotch* zametaka, odnosno 64ºC kod genotipizacije *truncate* zametaka, 30 sekundi te polimerizaciju na 72ºC, 1 minutu. Završna polimerizacija na 72ºC trajala je 7 minuta. Reakcija se odvijala u stroju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer), a rezultati lančane reakcije polimerazom provjereni su elektroforezom u gelu agaroze. Početnice korištene za genotipizaciju *splotch* i *truncate* zametaka su navedene u tablici 1.

Tablica 1: Popis početnica korištenih za genotipizaciju *splotch* i *truncate* zametaka. Prva dva para početnica korišteni za genotipizaciju linija *splotch* (*D6Gaj12* i *D6Gaj12sp*), odnosno *truncate* (*D6Gaj14* i *D6Gaj14tc*) su specifični za odgovarajuće gene, dok je zadnji par (*D6Gaj13* u liniji *splotch* i *D6Gaj15* u liniji *truncate*) korišten za pozitivnu kontrolu.

Početnica	**Redoslijed nukleotida (5' → 3')**	
splotch	**5`**	**3`**
D6Gaj12	gtgtgcgctcctcttttctccag	aattggacttagtattgttggaacg
D6Gaj12sp	cgtgtgcgctcctctttcgtgtg	aattggacttagtattgttggaacg
D6Gaj13	gctttacagtggggatacat	ttatggcttttaggcaatct
truncate		
D6Gaj14	gcaagagttggagaaggtgtt	ccacacacataaaaaggaggaagc
D6Gaj14tc	gcaagagttggagaaggtgtg	ccacacacataaaaaggaggaagc
D6Gaj15	tctaccaggcccagtcagtc	actgtggggagacacaaagg

3.2.2. Izrada histoloških preparata i morfološka analiza zametaka

Nakon što su izvađeni iz ovojnica, zameci su fiksirani 2 sata u smjesi 1% paraformaldehida i 1% glutaraldehida u 0.1 M fosfatnom puferu, te postfiksirani 1 sat u 1% osmijevom tetroksidu. Nakon ispiranja u PBS puferu, zameci su dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola i uklopljeni u Durcopan (Fluka-Sigma) sintetsku smolu. Ultramikrotomom Reichert-Jung rezani su serijski 1 μm debeli polutanki rezovi, okomiti na dužu osovinu repa, bojani toluidinskim modrilom i analizirani svjetlosnim mikroskopom. Fotografije histoloških preparata učinjene su Olympus AX70 mikroskopom opremljenim Nikon DXM1200 digitalnom kamerom.

4. REZULTATI

Kako bi se usporedio razvoj kaudalnog dijela zametka *splotch* i *truncate* mutanata s razvojem kaudalnog dijela zametka kontrolnog miša, analizirani su poprečni serijski polutanki rezovi repova zametaka. Nastanak i diferencijacija repnih struktura odvija se od baze prema vrhu repa, pa je zbog toga rađena serija rezova u obrnutom smjeru, od vrha prema bazi repa. Ona pokazuje slijed zbivanja koja su se odvijala tijekom razvoja repa. Stoga su rezultati u ovom radu prikazani uvijek od vrha prema bazi repa.

4.1. Razvoj B6 zametka miša

4.1.1. Zametak miša star 9 dana u kaudalnom dijelu ima otvorenu neuralnu cijev koja se nastavlja na primitivnu prugu

Analiza rezova od kaudalnog kraja zametka prema kranijalno pokazala je poput štakorskog zametka na odgovarajućem stadiju, da se u mišjeg zametka starog 9 dana na kaudalnom kraju nalazi primitivna pruga koja kranijalno bez oštre granice prelazi u neuralnu ploču (sl.9A). Prema kranijalno neuralni nabori se počinju približavati, što znači da se neuralni žlijeb zatvara u neuralnu cijev. Na razini gdje se izdižu neuralni nabori, ventralno od neuralnog žlijeba nalazi se kaudalni završetak primitivnog crijeva (sl.9B). Primitivno crijevo je obloženo cilindričnim epitelom, te zauzima petinu površine poprečnog presjeka zametka.

Analizom poprečnih presjeka u kranijalnom smjeru dolazi se do razine na kojoj se nabori neuralnog žlijeba postepeno približavaju, dok se između ventralnog dijela neuralnog žlijeba i primitivnog crijeva pojavljuje zgusnuće stanica (sl.9C). Ta struktura odgovara kaudalnom početku notokorda, kojeg nije moguće potpuno razgraničiti od epitela neuralnog žlijeba i epitela primitivnog crijeva, pa je stoga ova skupina stanica prepoznata kao kordoneuralni spoj (CNH) u zametku miša.

Stjenke neuralnog žlijeba se prema kranijalno (sl.9D-H) počinju sve više približavati, postepeno oblikujući slovo «V». Na ovoj razini se oblikuje i notokord: u smjeru prema kranijalno notokord se odvoji od neuroepitela (sl.9E), a potom se nekoliko rezova dalje odvoji od primitivnog crijeva, te postaje samostalna struktura (sl.9F). U istom odsječku zametka

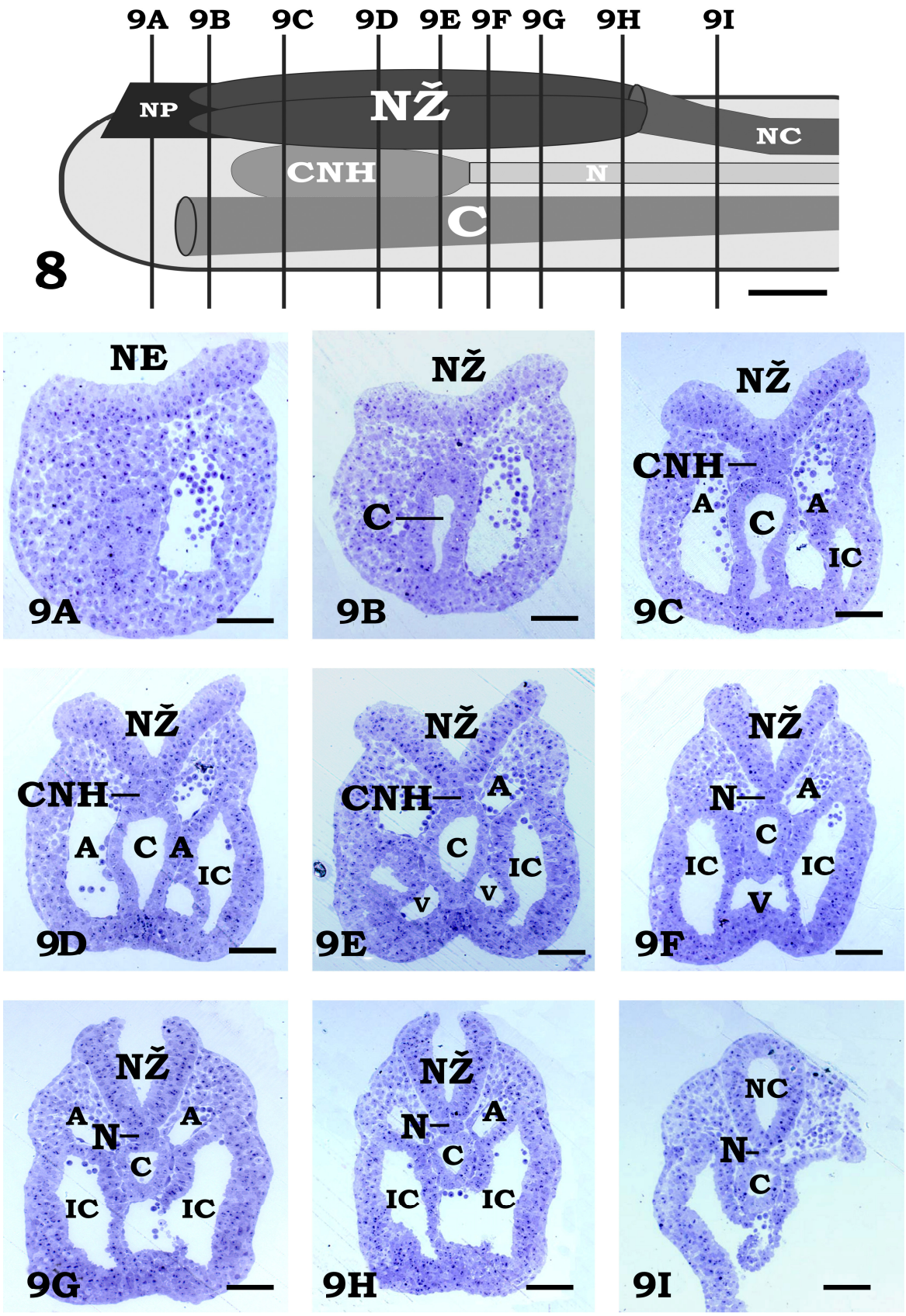
(sl.9C-H) se nalaze lijeva i desna dorzalna aorta, šupljina intraembrionalnog celoma (sl.9C-H), te a. vitellina (sl.9E,F). Prema kranijalno neuralni žlijeb se nastavlja sužavati, da bi se konačno stjenke spojile i oblikovale neuralnu cijev (sl.9I). U odsječku zametka u kojem se neuralna cijev zatvorila nalaze se: neuralna cijev u dorzalnom dijelu, ventralno od nje notokord, ventralno od notokorda primitivno crijevo, te široki prostor međusobno povezanog izvanembrionalnog i embrionalnog celoma (sl.9I).

Osnovno obilježje ovog stadija je prisustvo primitivne pruge na dorzalnoj strani zametka koja kranijalno bez oštre granice prelazi u neuralni žlijeb. Primitivno crijevo i notokord se oblikuju primarnim mehanizmom razvoja zametka. Osnova repa, repni pupoljak i sekundarni mehanizam razvoja na ovom stadiju još uvijek nisu prisutni.

Slika 8: Shema kaudalnog dijela B6 mišjeg zametka starog 9 dana.

Slika 9: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak zametka starog 9 dana **(9A)** prema kranijalno. U dorzalnom dijelu kaudalnog vrha zametka nalazi se neuroektoderm u obliku neuralne ploče (NE). Kranijalno, neuroektoderm prelazi u neuralni žlijeb **(9B-H)**, da bi se zatvorio u neuralnu cijev **(9I)**. Ventralno od neuralnog žlijeba nalazi se kaudalni završetak notokorda u kontaktu sa ventralnim neurepitelom i dorzalnim epitelom repnog crijeva **(9C)**. Dalje prema kranijalno se razlikuje ventralna granica neuroepitela, notokord i repno crijevo **(9F-I)**.

NP – neuralna ploča, NŽ – neuralni žlijeb, NC – neuralna cijev, CNH – kordoneuralni spoj, N – notokord, C – repno crijevo, A – dorzalna aorta, IC – intraembrionalni celom, V – a. vitellina. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 8 i 9: B6 mišji zametak star 9 dana

4.1.2. U zametku miša starom 10,5 dana pojavljuje se osnova repa

Kaudalni kraj zametka se na ovom stadiju sastoji od mezenhima obavijenog jednoslojnim pločastim epitelom površinskog ektoderma. Neposredno ispod epitela nalaze se široko razmaknute mezenhimske stanice, dok se u sredini nalazi gusto zbijena nakupina mezenhimskih stanica. Ova nakupina stanica odgovara repnom pupoljku (sl.11A,B). Većina krvnih žila tog područja nalazi se izvan repnog pupoljka u rahlo raspoređenom mezenhimu koji ga okružuje (sl.11A-C). Prema kranijalno se iz repnog pupoljka oblikuje sekundarna neuralna cijev: dorzalni dio repnog pupoljka se zgušnjava, da bi se unutar njega pojavila šupljina (sl.11C, strelica), koja se prema kranijalno proširuje (sl.11D).

Ventralno od oblikovane šupljine sekundarne neuralne cijevi, nalazi se druga nakupina zgusnutih stanica (sl.11C-F). Odsječak u kojem se razlikuju dvije skupine stanica predstavlja mjesto gdje je dorzalno smještena sekundarna neuralna cijev i ventralno repni tračak (sl.11E,F). Prema bazi u ventralnom dijelu repnog tračka dolazi do promjena u izgledu i položaju stanica: stanice se izdužuju i raspoređuju centralno simetrično. Oblikuje se rozeta koja je izgrađena od nediferenciranih mezenhimskih stanica, koje su se preoblikovale u polarizirane epitelne stanice. Tako se postepeno oblikovala šupljina sekundarnog repnog crijeva (sl.11F,G). U istom odsječku ventralni epitel, koji pokriva kaudalni dio zametka zadebljava, te oblikuje ventralni ektodermalni greben (sl.11E-I). On se prepoznaje kao zadebljanje ektoderma smješteno s ventralne strane osnove repa zametka, a odgovara apikalnom ektodermalnom grebenu u osnovi udova. Prema kranijalno, repni se tračak se jasno razlikuje kao samostalna tvorba, u čijem je ventralnom dijelu otvoren lumen budućeg repnog crijeva, dok zgusnuće stanica na dorzalnom dijelu repnog tračka odgovara budućem notokordu (sl.11G). Prema kranijalno dolazi do oblikovanja notokorda (sl.11G-I): postepeno se odvaja dorzalna grupa stanica repnog tračka, kontakt između dorzalnog i ventralnog dijela repnog tračka se sužava, da bi se neposredno pred razdvajanje mogle razlikovati epitelne stanice koje pripadaju repnom crijevu od stanica koje pripadaju notokordu. Stanice koje izgrađuju notokord su gusto razmještene i oblikuju pravilnu okruglu nakupinu s oštrim granicama prema okolnom tkivu. Na ovaj su način od repnog tračka nastale dvije tvorbe: dorzalno se nalazi notokord, a ventralno repno crijevo.

U smjeru baze repa od dorzalno prema ventralno nalaze se oblikovane sve tri aksijalne strukture repa: neuralna cijev, notokord i repno crijevo (sl.11I). U odsječku repa u kojem se

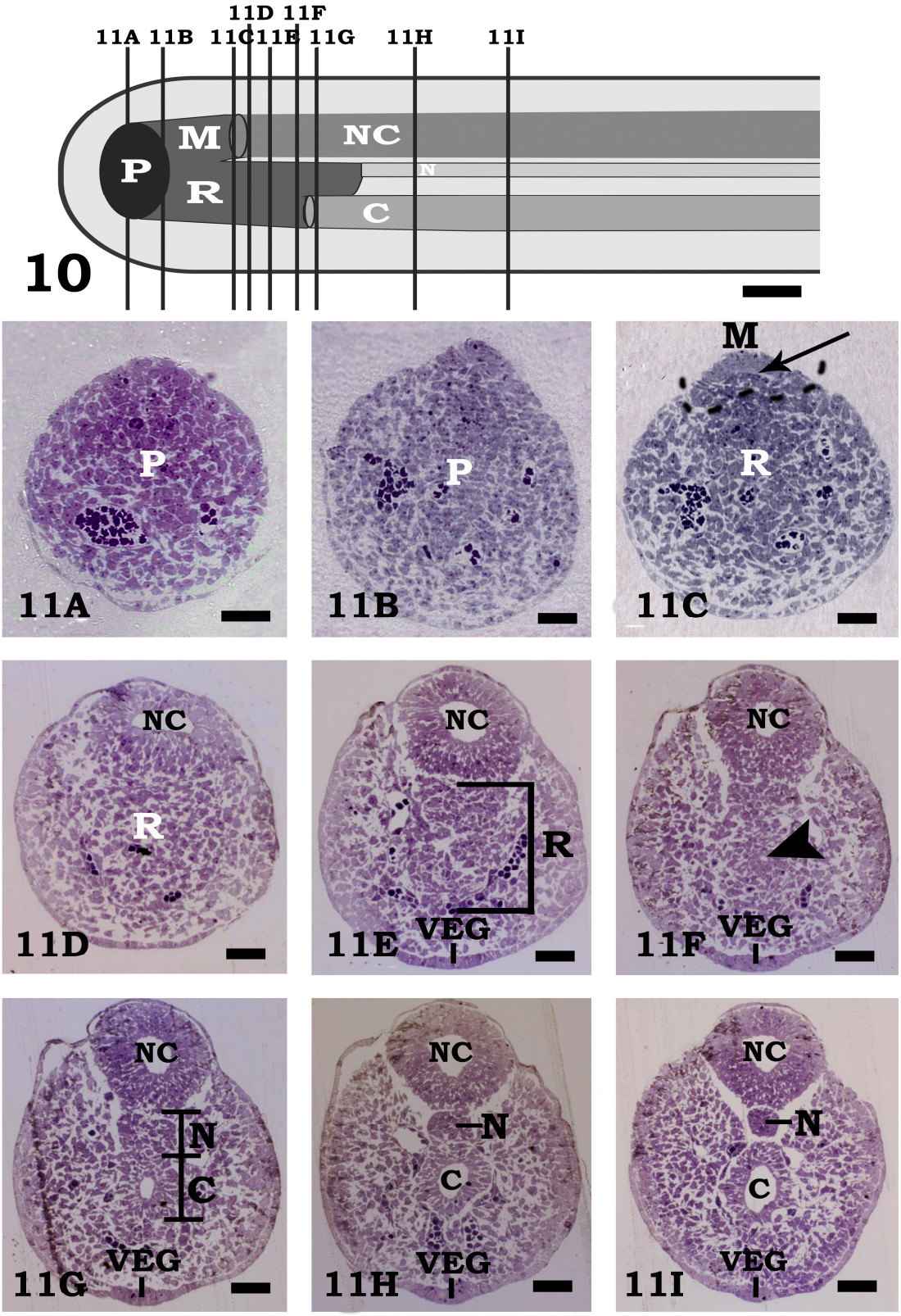
pojavio notokord neuralna cijev se izdužuje u dorzo-ventralnom smjeru. Sve tri strukture se protežu cijelom duljinom osnove repa i nastavljaju na iste strukture smještene unutar tijela zametka.

Osnovno obilježje ovog stadija je produljivanje zametka kaudalno od kloakalne membrane i pojava osnove repa. Po prvi put se u vrhu zametka nalazi repni pupoljak. Aksijalne strukture kaudalnog dijela zametka, sekundarna neuralna cijev, notokord i repno crijevo su u kontinuitetu s repnim pupoljkom, što odgovara sekundarnom mehanizmu razvoja zametka.

Slika 10: Shema kaudalnog dijela B6 mišjeg zametka starog 10,5 dana.

Slika 11: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak zametka starog 10,5 dana **(11A)** prema kranijalno. U kaudalnom vrhu zametka **(11A,B)** nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Kranijalno, repni pupoljak se dijeli na moždinski i repni tračak **(11C)**, te se u moždinskom tračku otvara šupljina sekundarne neuralne cijevi **(11C, strelica)**. Usporedo s oblikovanjem sekundarne neuralne cijevi, ventralni dio repnog pupoljka oblikuje repni tračak **(11C-F)**. Prema kranijalno se unutar repnog tračka počinje otvarati šupljina repnog crijeva **(11F, vrh strelice)**. Potom se repni tračak razdvoji na dvije strukture, te oblikuje sekundarni notokord i repno crijevo **(11G-I)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo, strelica – početak otvaranja šupljine sekundarne neuralne cijevi, vrh strelice – početak otvaranja šupljine repnog crijeva. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 10 i 11: B6 zametak star 10,5 dana

4.1.3. U kaudalnom dijelu zametka miša starog 11,5 dana odvija se sekundarni mehanizam razvoja

U vrhu repa mišjih zametaka starih 11,5 dana nađen je mezenhim repnog pupoljka okružen jednoslojnim pločastim epitelom (sl.13A). Prema bazi repa dorzalni dio repnog pupoljka se dodatno zgušnjava, te se može pratiti oblikovanje moždinskog tračka (sl.13B): u dorzalnom dijelu repnog pupoljka stanice se izdužuju i simetrično preraspodjeljuju, te tako postepeno oblikuju rozetu. Prema kranijalno cilindrične stanice koje okružuju šupljinu čine višeredni cilindrični epitel, te se uspostavlja granica prema repnom tračku. Time je završeno oblikovanje sekundarne neuralne cijevi (sl.13C). Na ovom stadiju oblikovanje sekundarne neuralne cijevi završava u njenom dorzalnom dijelu, dok je ventralni neuroepitel na toj razini neoštro odvojen od ventralnog dijela repnog pupoljka. Taj odsječak repa u 11,5 dana starih zametaka odgovara kratkom osječku u 9,5 i 10,5 dana starim zamecima gdje su povezani ventralni neuroepitel, notokord i dorzalni epitel repnog crijeva.

U kratkom odsječku kranijalno od onog u kojem se oblikovala sekundarna neuralna cijev, stanice ventralno od neuralne cijevi i dalje grade repni tračak (sl.13C). Kranijalno, u repnom tračku dolazi do preraspodjele stanica, te se oblikuje rozeta sa središnjim lumenom. Usporedo s nastajanjem lumena budućeg repnog crijeva, dolazi do postepenog odvajanja dorzalne grupe stanica repnog tračka (sl.13D-F). Najprije dolazi do sužavanja površine kontakta između dorzalnog i ventralnog dijela repnog tračka, da bi se neposredno pred razdvajanje mogle razlikovati epitelne stanice koje će izgrađivati repno crijevo od stanica koje će izgrađivati notokord. Stanice koje izgrađuju notokord su gusto razmještene i oblikuju pravilnu okruglu nakupinu s oštrim granicama prema okolnom tkivu.

U jednom od četiri zametka ovog stadija nađeno je podvostručenje kaudalnog dijela repnog crijeva. Repni tračak se podijelio na tri dijela. Prvo se u ventralnom dijelu otvara šupljina (sl.13I), a zatim prema kranijalno i u središnjem (sl.13J). Tako se oblikuju dvije šupljine repnog crijeva. Usporedo s otvaranjem središnje šupljine, dorzalni dio repnog tračka se odvaja i oblikuje notokord (sl.13J). Dva repna crijeva se ne odvoje, već se prema kranijalno spoje u jedno repno crijevo (sl.13J-L). Tako se i u ovom slučaju oblikuju tri aksijalne strukture repa, od dorzalno prema ventralno: neuralna cijev, notokord i repno crijevo. Sve tri strukture se nastavljaju na odgovarajuće strukture u tijelu zametka.

Proksimalno od razine na kojoj su se oblikovale tri aksijalne strukture repa dolazi do zgušnjavanja stanica paraaksijalnog mezenhima. Lateralno, ispod površinskog epitela oblikuje se dermomiotom, građen od gustog sloja stanica polukružnog oblika. Prostor između dermomiotoma i neuralne cijevi, odnosno notokorda, ispunjava sloj rahlo raspoređenih stanica – sklerotom. Prema bazi repa pojavljuje se sloj svijetlih stanica s medijalne strane dermomiotoma, koje će se izdvojiti i postati miotom.

Osnovno obilježje ovog stadija je dugačka osnova repa u kojoj se strukture razvijaju sekundarnim mehanizmom razvoja. U vrhu se nalazi repni pupoljak, a moždinski i repni tračak su jasno ograničeni. Od moždinskog se tračka oblikuje sekundarna neuralna cijev, a od repnog notokord i repno crijevo. Po prvi put se u repu nalaze dobro diferencirani somiti. Sve tri aksijalne strukture se nastavljaju u odgovarajuće strukture u tijelu zametka.

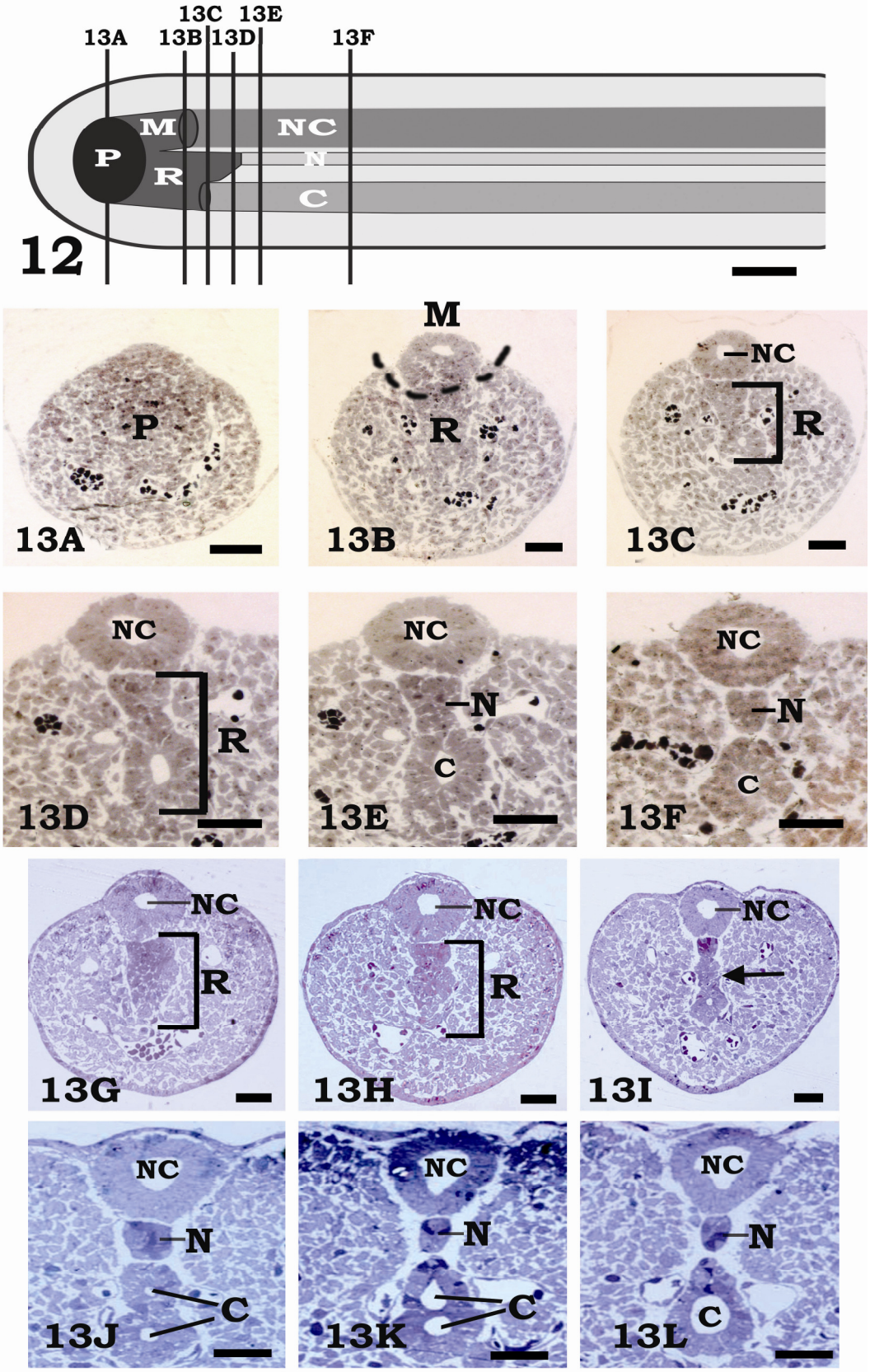
Slika 12: Shema kaudalnog dijela B6 mišjeg zametka starog 11,5 dana.

Slika 13: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu repa od kaudalnog kraja zametka **(13A)** starog 11,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Kranijalno, u dorzalnom dijelu repnog pupoljka se otvara šupljina **(13B)** sekundarne neuralne cijevi. Usporedo, ventralni dio repnog pupoljka oblikuje repni tračak **(13B-D)**. Prema kranijalno se repni tračak razdvaja na dvije strukture, te se oblikuju sekundarni notokord i repno crijevo **(13F)**.

U jednog zametka se, nakon što se oblikuje repni tračak **(13G,H)**, od središnjeg dijela repnog tračka odvaja dodatna nakupina stanica **(13I, strelica)**. Kranijalno središnji dio repnog tračka oblikuje dodatnu šupljinu repnog crijeva **(13J)**, koja se spaja s ventralnom šupljinom repnog crijeva **(13K)**. I u ovom slučaju se oblikuje normalna osnova repa sa sekundarnom neuralnom cijevi, notokordom i repnim crijevom **(13L)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo, strelica – oblikovanje dodatne šupljine repnog crijeva. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 12 i 13: B6 zametak star 11,5 dana

4.1.4. Zametak miša star 12,5 dana obilježen je odumiranjem repnog crijeva

U usporedbi s dan mlađim zamecima, u kaudalnom dijelu 12,5 dana starih mišjih zametaka prisutno je nekoliko manjih razlika. U vrhu repa se nalazi mezenhim repnog pupoljka (sl.15A,B) koji se prema bazi repa dijeli na moždinski i repni tračak (sl.15C). Za razliku od dan ranijeg stadija zametka, kod 12,5 dana starih zametaka odsječak repa s oblikovanim moždinskim i repnim tračkom je vrlo kratak (sl.15C). Naime, gotovo na istoj razini na kojoj se uočavaju dva tračka, može se pratiti oblikovanje notokorda, kao samostalne nakupine stanica između moždinskog tračka i ventralnog dijela repnog tračka (sl.15D-F). Na istoj razini gdje se po prvi put jasno uočava nakupina stanica, koja će se kranijalno odvojiti i oblikovati notokord, odvija se i oblikovanje neuralne cijevi (sl.15D-G). Stanice se razmještaju oko šupljine i poprimaju osobine polariziranog epitela. Kranijalno se nalaze neuralna cijev i repno crijevo, te notokord kao samostalna struktura.

Razvoj paraaksijalnog mezenhima se odvija na isti način i na istoj razini repa kao i u dan mlađih zametaka, pa u 12,5 dana starih zametaka postoji veći dio repa u kojem su već oblikovane aksijalne strukture okružene nesegmentiranim mezenhimom.

Sekundarna neuralna cijev i notokord se bez prekida nastavljaju u odgovarajuće strukture u trupu zametka. Za razliku od njih, repno crijevo je prisutno samo u distalnom dijelu repa. U srednjem dijelu repa vidljivo je sužavanje šupljine (sl.16B) i piknotičke jezgre epitelnih stanica svojstvene odumiranju stanica apoptozom (sl.16C-E). U bazalnom dijelu repa crijevo je potpuno zatvoreno (sl.16C-E) i potom potpuno nestaje (sl.16F), tako da se ne nastavlja na crijevo u trupu zametka.

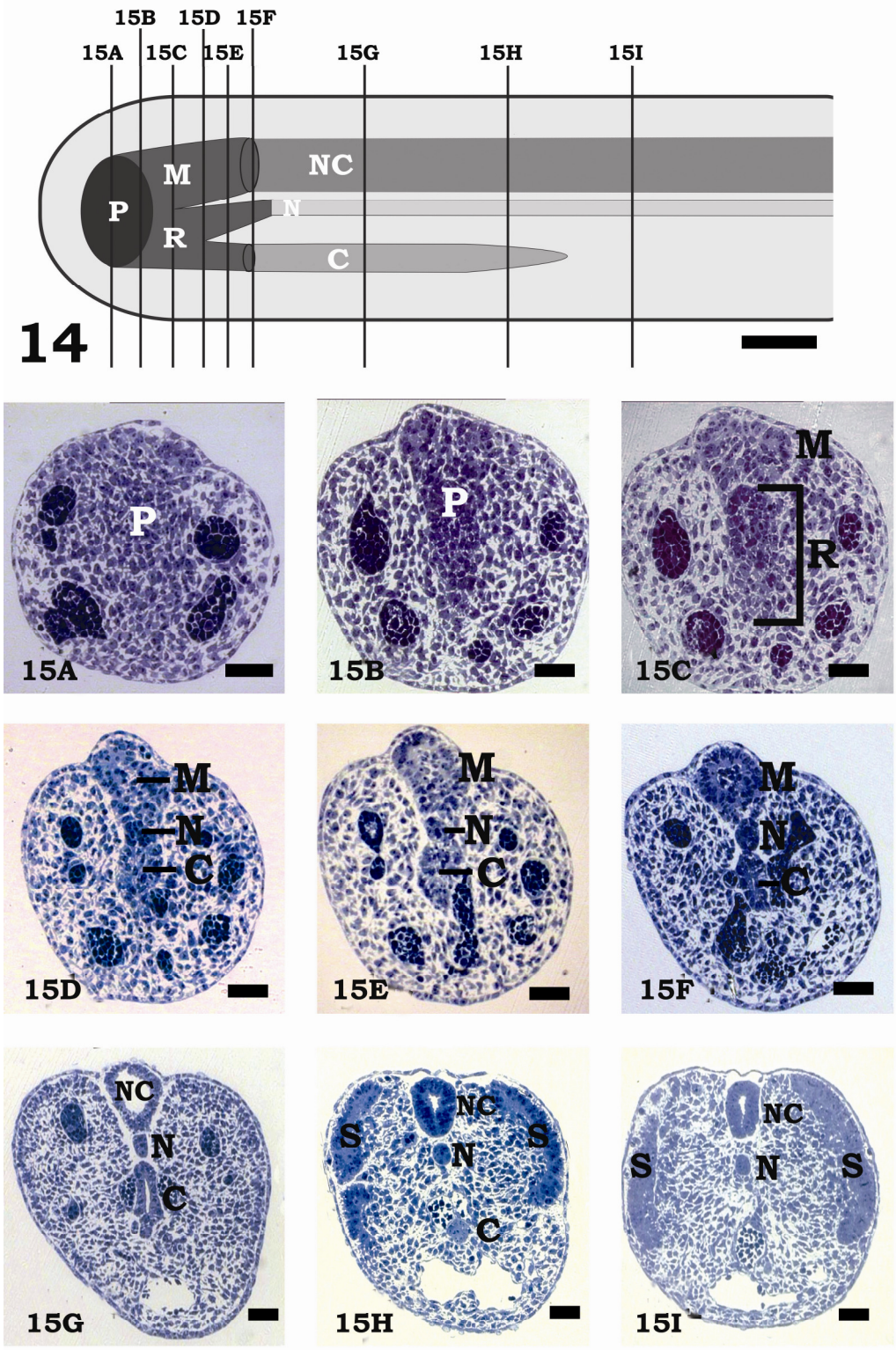
Kaudalni dio mišjih zametaka starih 12,5 dana razvija se sekundarnim mehanizmom razvoja. U odnosu na dan mlađi stadij, prisutno je nekoliko manjih razlika: oblikovanje notokorda i sekundarne neuralne cijevi se odvija u gotovo istom odsječku, a repno crijevo propada u srednjoj trećini repa, pa je njegov kontinuitet sa stražnjim crijevom izgubljen.

Slika 14: Shema kaudalnog dijela B6 mišjeg zametka starog 12,5 dana.

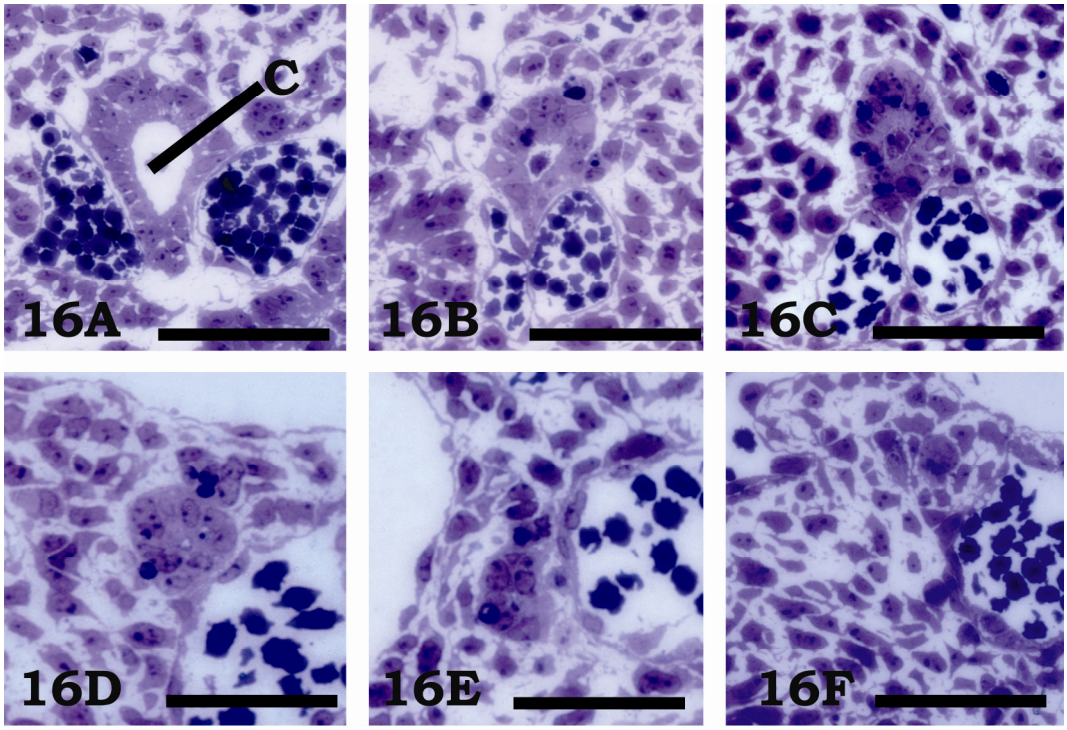
Slika 15: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu repa od kaudalnog kraja zametka **(15A)** starog 12,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa **(15A,B)** nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Kranijalno **(15C)**, repni pupoljak se podjeli na dvije skupine stanica: dorzalnu – moždinski tračak (M) i ventralnu – repni tračak (R). Za razliku od dan mlađeg stadija, oblikovanje sekundarne neuralne cijevi, notokorda i repnog crijeva se odvija u kraćem odsječku repa **(15D-G)**. Najprije se uspostave jasne granice notokorda **(15E)**, potom se kranijalno oblikuju šupljine sekundarne neuralne cijevi i repnog crijeva **(15G)**. Prema kranijalno, dolazi do zatvaranja šupljine repnog crijeva.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 14 i 15: B6 zametak star 12,5 dana



Slika 16: Odumiranje repnog crijeva u B6 zametaka starih 12,5 dana

Slika 16: Odumiranje repnog crijeva u B6 zametka starog 12,5 dana.

Već u srednjem dijelu repa vidljivo je sužavanje šupljine **(16B)** i piknotičke jezgre epitelnih stanica karakteristične za odumiranje stanica apoptozom **(16C-E)**. U bazalnom dijelu repa nedostaje šupljina crijeva **(16C-E)**, a potom nestanu i preostale stanice **(16F)**, tako da se repno crijevo ne nastavlja na crijevo trupa zametka.

C – repno crijevo. Crta mjerila – 50 µm.

4.2. Razvoj mišjeg zametka *splotch*

Splotch mutanti su u dosadašnjim radovima opisani kao zameci s poremećajem neurulacije, koji se očituje kao otvorena neuralna cijev – spina bifida i egzencefalija. U skladu s postavljenim ciljevima rada, ovo je istraživanje trebalo opisati razvoj kaudalnog dijela *splotch* zametaka, odnos poremećene neurulacije i razvoja repnog pupoljka, kao i razvoj ostalih struktura zametka.

4.2.1. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze omogućuje prepoznavanje *splotch* zametaka prije pojave morfoloških promjena

Odrasli *splotch* miševi se održavaju kao heterozigotna linija, budući da homozigotni zameci odumiru oko 14. dana razvoja. U ovom radu su korišteni zameci stari od 9 do 12,5 dana razvoja. Homizigotni zameci stari 11,5 i 12,5 dana, dobiveni parenjem heterozigota, prepoznaju se po otvorenoj neuralnoj cijevi u području repa (spina bifida) i glave (egzencefalija). Budući da zametke mlađih stadija nije moguće prepoznati po morfološkim osobitostima (otvorena neuralna cijev je dio normalnog razvoja živčanog sustava), uspostavljen je test genotipizacije zametaka.

Genotipizacija *splotch* zametaka se osniva na postojanju točkaste mutacije na kraju 3. introna gena *Pax3*. Sintetizirane su slijedeće početnice: početnica u 3' smjeru koja odgovara normalnoj sekvenci, druga početnica u 3' smjeru koja odgovara mutiranoj, *splotch* sekvenci, te zajednička početnica u 5' smjeru.

Dobiveni produkt lančane reakcije polimeraze je i s normalnom i sa *splotch* početnicom identične veličine (419 pb), pa je lančana reakcija polimeraze rađena u dva kruga. U prvom krugu je umnožena sekvenca samo s kontrolnom početnicom, dok je u drugom korištena *splotch* početnica. U slučaju da je zametak na oba alela imao normalnu sekvencu, produkt umnažanja bio je prisutan samo u prvom krugu, a ukoliko se radilo o homozigotu za *splotch* mutaciju, produkt je bio prisutan samo u drugom krugu. Heterozigot je dao produkt u oba kruga lančane reakcije polimerazom.

Pax3 sekvenca *Splotch Pax3* sekvenca

gtgtgcgctcctctttctcca gtgtgcgctcctctttcgtgtg

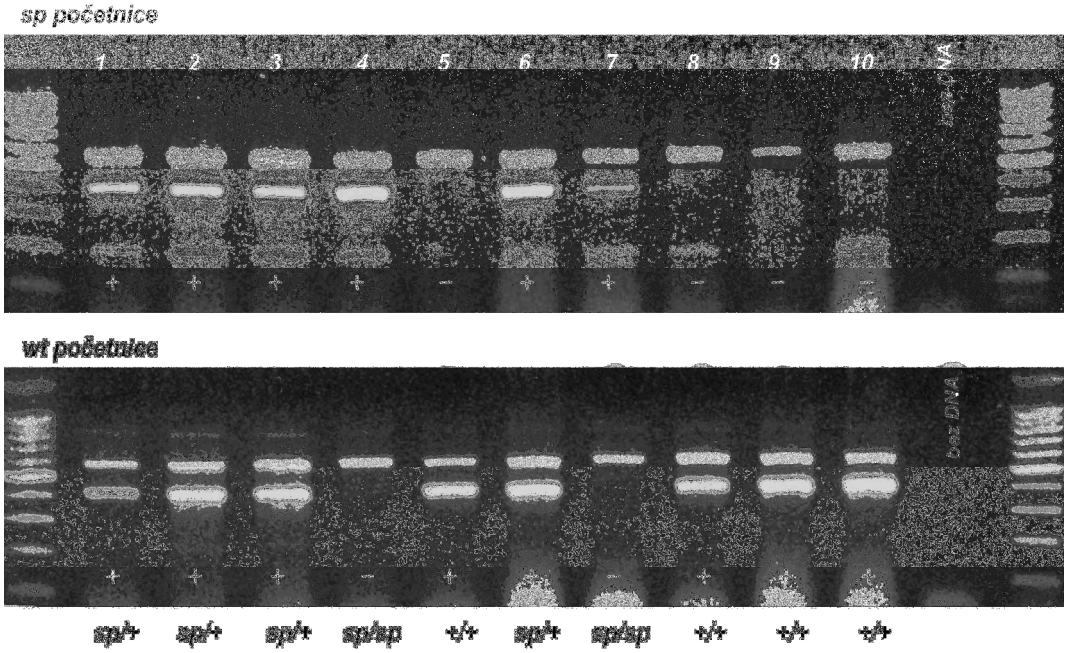
tcgtgtgcgctcctctttxxxxxxTGAGTTCTATCAGCCGCATCCTGAGGAAAATTTGGAAAAG
GAGAAGAGGAGGAGGCGGATCTAGAAAGGAAGGAAGCAGAAGAAAGCGAGAA
AAAGGCTAAACACAGCATCGATGGCATCCTGAGTGAGCGAGgtaagagggcccagtgggcc
gcgcgctgagatttgtggtctgcgcaaccgcaggccagcagtggctcatctcagagctcacctccggcttaggttagagggaaggac
attcaagtgaaaggccagagaggtacttggcgttaaaaaatcttctctattctaatttttattttaatttcctgacgagcaaatccagcgtttcc
tatatgatcggcccagtgctgtacctctgagccacgttccaacaatactaagtccaatttat

Slika 17: Sekvenca završetka 3. introna, 4. egzona (velika tiskana slova) i početka 4. introna *Pax3* gena. *Splotch* mutacija obuhvaća završetak 3. introna, gdje su postavljene početnice za genotipizaciju. Početnica u suprotnom smjeru je unutar 4. introna gena *Pax3*.

Kao kontrola da je reakcija genotipizacije svakog uzorka uspješno provedena, korišten je dodatni par početnica svojstven drugom genu na drugom kromosomu (*D6Gaj13*, gen *Stam2*, 2. kromosom, 600 pb). Rezultat genotipizacije vjerodostojan je samo uz prisutnost umnoženog DNA odsječka dobivenog ovim kontrolnim parom početnica.

Pouzdanost genotipizacije je provjerena na odraslim životinjama ili na zamecima kojima je na osnovu fenotipa moguće pretpostaviti genotip. Svi odrasli miševi sa pjegom na trbuhu su prepoznati kao *splotch* heterozigoti, dok su svi zameci s vidljivom spinom bifidom prepoznati kao *splotch* homozigoti.

Ovako uspostavljen postupak genotipizacije *splotch* zametaka omogućuje jednostavno i pouzdano razlikovanje *splotch* homozigota, heterozigota i normalnih zametaka. Posebna vrijednost postupka je što se istraživanje *splotch* mutanata ne ograničava na stadije s očekivanim vidljivim morfološkim osobitostima, jer je lančanom reakcijom polimeraze moguće genotipizirati svaki zametak, bez obzira na stadij razvoja.



Slika 18: Genotipizacija *splotch* mišjih zametaka.

Splotch je označen točkastom mutacijom unutar 3. introna *Pax3* gena. U prvom krugu lančane reakcije polimerazom koriste se *splotch* početnice (*D6Gaj12sp*, dobiveni produkt je veličine 419 pb), dok se u drugom krugu koriste početnice koje odgovaraju normalnoj *Pax3* sekvenci (*D6Gaj12*, dobiveni produkt je isto 419 pb). U oba kruga se koriste kontrolne početnice u *Stam2* genu (*D6Gaj13,* 600 pb). U ovom primjeru genotipizacija je otkrila zametke koji su imali prisutne umnožene DNA odsječke samo *splotch* početnicama (linije 4 i 7), te su prepoznati kao *splotch* homozigoti. Zameci divljeg tipa su imali prisutne umnožene DNA odsječke samo u drugom krugu lančane reakcije (uzorci 5,8,9,10), dok su heterozigotni zameci imali umnožene DNA odsječke u obje reakcije (uzorci 1,2,3,6).

4.2.2. Otvorena neuralna cijev (spina bifida) u *splotch* zametaka nastaje u području prijelaza primarne u sekundarnu neurulaciju

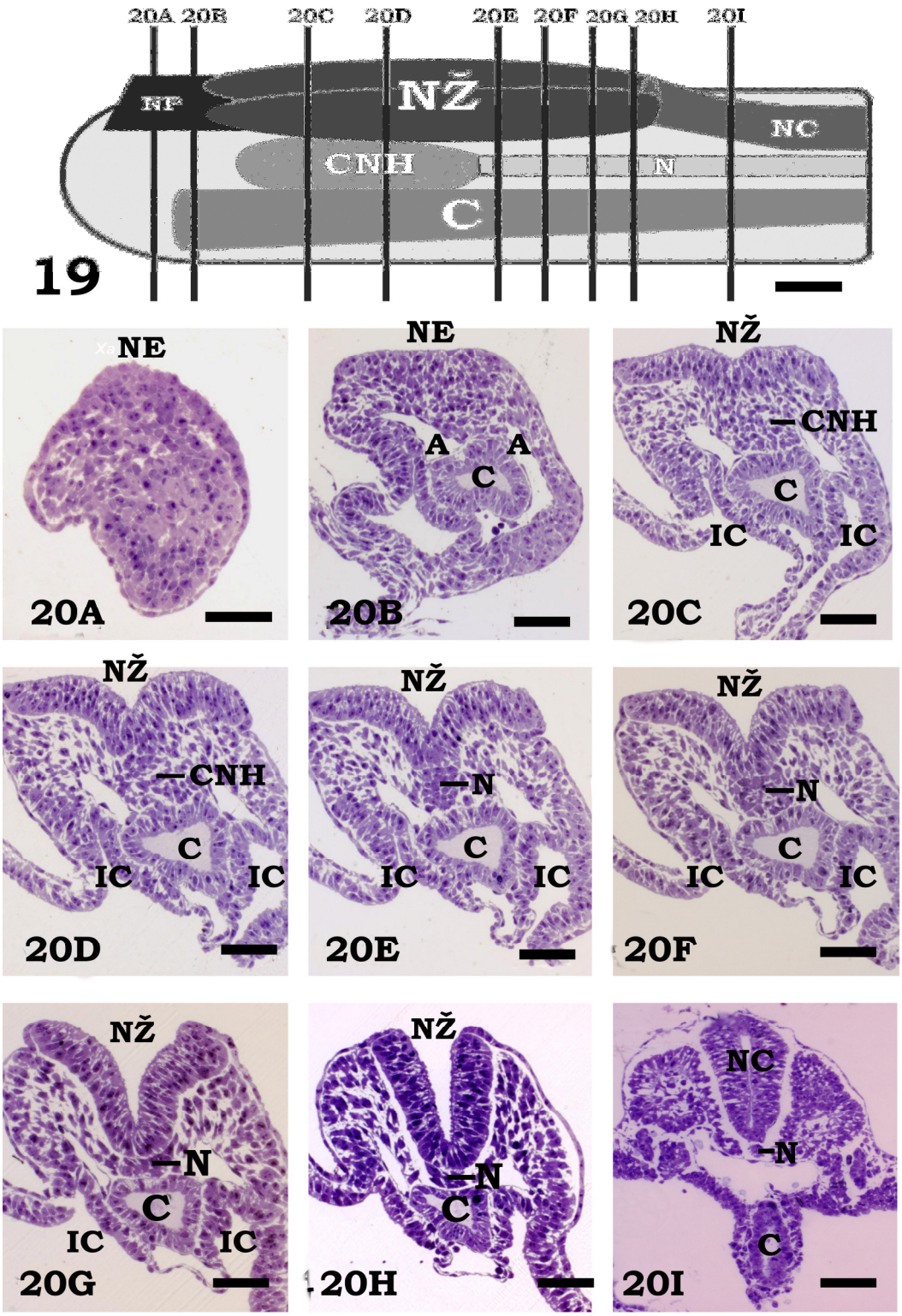
Kao prilog odgovoru na pitanje kada nastaje spina bifida u u *splotch* mutanata, izolirani su zameci na stadiju u gdje je prisutna samo primarna neurulacija (9 dana, 16-22 somita) do onih gdje je prisutna samo sekundarna neurulacija (12,5 dana, 45-58 somita).

Splotch zametak star **9 dana** (16-22 somita) se ne razlikuje od kontrolnog zametka iste starosti. Na dorzalnoj strani kaudalnog završetka zametka nalazi se zgusnuće stanica koje odgovara kaudalnom završetku neuralne ploče (sl.20A,B). U ventralnom dijelu nalaze se ogranci krvnih žila (lijeva i desna dorzalna aorta), te kaudalni dio primitivnog crijeva. Ventralno od neuralne ploče se pojavljuje zgusnuće stanica, od kojeg će prema kranijalno nastati notokord (sl.20C-I). Kao i u kontrolnih zametaka, teško je odrediti da li od ove skupine stanica nastaje i dio ventralnog neuroepitela, odnosno dorzalnog epitela repnog crijeva, što se naziva kordoneuralni spoj. U istom odsječku kaudalnog dijela zametka se prati približavanje stjenki neuralnog žlijeba, odnosno oblikovanje neuralne cijevi (sl.20C-I).

Slika 19: Shema kaudalnog dijela *splotch* mišjeg zametka starog 9 dana.

Slika 20: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *splotch* zametka starog 9 dana **(20A)** prema kranijalno. U usporedbi s odgovarajućim kontrolnim zametkom, nisu nađene nikakve fenotipske osobitosti. U dorzalnom dijelu kaudalnog vrha zametka nalazi se neuroektoderm u obliku neuralne ploče **(20B,NE)**. Kranijalno, neuroektoderm prelazi u neuralni žlijeb **(20B-H)**, da bi se zatvorio u neuralnu cijev **(20I)**. Ventralno od neuralnog žlijeba nalazi se kaudalni završetak notokorda u kontaktu sa ventralnim neurepitelom i dorzalnim epitelom repnog crijeva **(20C)**. Dalje prema kranijalno se razlikuje ventralna granica neuroepitela, notokord i repno crijevo **(20E-I)**.

NP-neuralna ploča, NŽ – neuralni žlijeb, NC – neuralna cijev, CNH – kordoneuralni spoj, C – repno crijevo, N – notokord, A – dorzalna aorta, IC – intraembrionalni celom. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 19 i 20: Splotch zametak star 9 dana

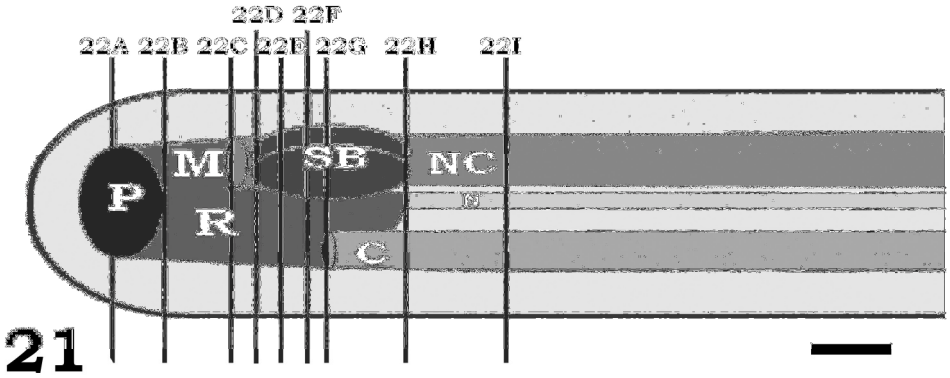
Vrh osnove repa *splotch* zametka starog **10,5 dana** (30-36 somita) građen je od rahlog mezenhima, dok površinu pokriva jednoslojni pločasti epitel (sl.22A). Prema kranijalno se postepeno u dorzalnom dijelu stanice zgušnjavaju, radijalno raspoređuju, te oblikuju moždinski tračak (sl.22B). Tako oblikovan moždinski tračak se niti po nastanku, niti po izgledu ne razlikuje od moždinskog tračka u kontrolnog zametka iste starosti, pa se zaključuje da je proces sekundarnog razvoja očuvan u ovom dijelu i na ovom stadiju razvoja *splotch* zametaka. Ipak, za razliku od kontrolnog zametka, normalna šupljina sekundarne neuralne cijevi se može pratiti u kratkom odsječku prema kranijalno (sl.22C). Postepeno se dorzalni neuroepitel stanjuje (sl.22D), da bi se dalje prema kranijalno neuralna cijev otvorila, te se stvara spina bifida (sl.22E-H). Na ovom stadiju u kontrolnih zametaka nema otvorene neuralne cijevi, kaudalni neruoporus je zatvoren, a na ovoj razini nalazi se sekundarna neuralna cijev nastala opisanim procesom sekundarne neurulacije.

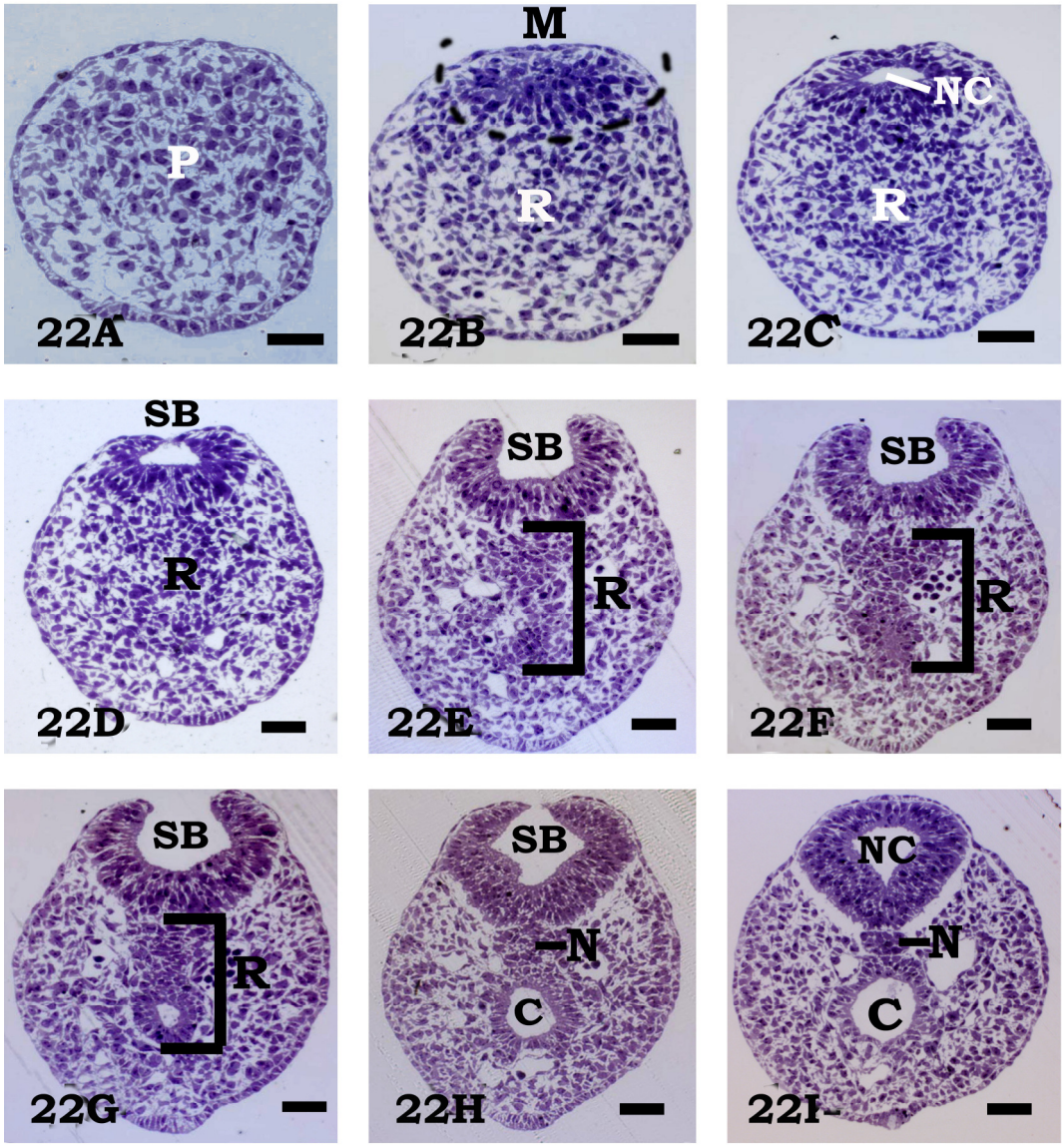
U *splotch* zametaka se ventralno od otvorene neuralne cijevi nalazi zgusnuće stanica koje odgovara repnom tračku u kontrolnog zametka (sl.22B-G). Repni tračak je izdužen u dorzo-ventralnom smjeru, te se razlikuje njegov gusti dorzalni dio kao notokorda i rjeđi ventralni dio koji se postepeno preoblikuje i tvori šupljinu repnog crijeva (sl.22G-I). Otvaranje šupljine repnog crijeva usporedivo je s onim u kontrolnom zametku. Postepeno odvajanje notokorda i repnog crijeva se ne razlikuje od istovjetnog procesa u normalnog zametka niti po morfološkim obilježjima, niti po odsječku repa, niti po duljini odsječka u kojem se zbiva. Opisano oblikovanje repnog crijeva i notokorda odvija se u odsječku repa sa spinom bifidom. Otprilike u istom odsječku repa na kojem se notokord odvaja kao samostalna struktura nabori otvorene neuralne cijevi se približavaju, da bi se prema kranijalno spojili (sl.22I). Tako se prema kranijalno ponovno oblikuje neuralna cijev.

Slika 21: Shema kaudalnog dijela *splotch* mišjeg zametka starog 10,5 dana.

Slika 22: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *splotch* zametka starog 10,5 dana **(22A)** prema kranijalno. U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Kao i u kontrolnom zametku, u dorzalnom dijelu repnog pupoljka se nalazi početak oblikovanja moždinskog tračka **(22B)**, te sekundarne neuralne cijevi **(22C)**. Za razliku od kontrolnog zametka, kranijalno se otvara šupljina neuralne cijevi i oblikuje se spina bifida **(22D-H)**. Usporedo s postojanjem spine bifide, ventralni dio repnog pupoljka oblikuje repni tračak **(22B-G)**. Otprilike u istom odsječku u kojem se otvorena neuralna cijev zatvara, te se ponovno uspostavlja normalna morfologija neuralne cijevi, repni tračak se razdvoji na dvije strukture: kranijalni dio repnog tračka oblikuje notokord, a ventralni repno crijevo **(22H,I)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, SB – spina bifida, NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo. Crta mjerila – 50 µm.





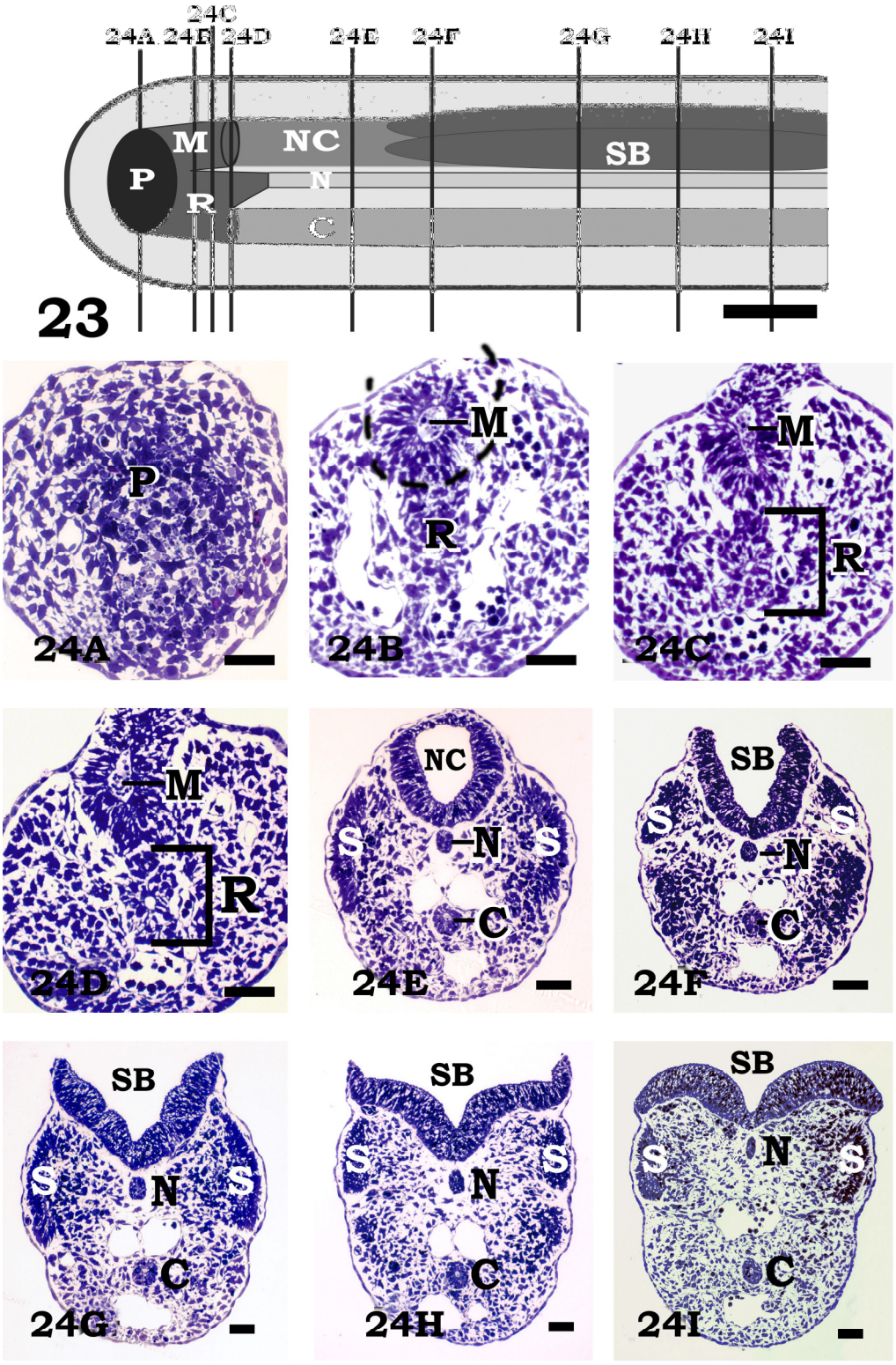
Slike 21 i 22: Splotch zametak star 10,5 dana

U *splotch* zametaka starih **11,5 dana** poremećaj neurulacije smješten je prema bazi zametka, što odgovara prijelazu kaudalne u srednju trećinu repa. Prema proksimalno dolazi se do razine gdje se dorzalni dio neuroepitela stanjuje (sl.24E). Na prijelazu srednje u treću trećinu repa šupljina neuralne cijevi se otvara (sl.24F). Otvorena neuralna cijev tog područja ima oblik slova V (sl.24G) Takav oblik je posljedica normalne morfologije medioventralnog dijela neuralne cijevi, dok stjenke dorzalne polovice nisu zatvorene. Kut između lateralnih stjenki neuralne cijevi odgovara onome u normalnih zametaka, što dovodi do zaključka da je očuvana središnja točka zatvaranja. Prema kranijalno, stjenke neuralne cijevi se razmiču, te je kut između otvorenih stjenki sve veći. Usporedo sa razmicanjem neuralnih nabora, neuroepitel jednoliko zadebljava. U središnjem dijelu spine bifide, stjenka otvorene neuralne cijevi ima slijedeći izgled (sl.24H): ventralni dio neuralne cijevi je normalne građe i prisutna je središnja točka zatvaranja, dok se lateralne stjenke razmiču i položene su prema lateralno pod kutem od 90 stupnjeva u odnosu na ventralni dio. Krajnje dorzalni dio otvorene neuralne cijevi usmjeren je prema dorzalno i položen je također pod kutem od 90 stupnjeva u odnosu na lateralne stjenke. Prisutnost dvaju dijelova neuralnih nabora (krajnjeg ventralnog i krajnjeg dorzalnog) koji s većinom stjenke neuralne cijevi čine kut od 90 daje spini bifidi tog područja izgled vitičaste zagrade. Proksimalno, spina bifida ponovno mijenja oblik (sl.24I): nestaje kut između krajnjeg dorzalnog i lateralnog dijela neuralnih nabora, pa krajnji dorzalni dio prati vanjski oblik repa. I kod ovog oblika spine bifide krajnji ventralni dio je očuvao normalnu građu (ploča dna je prisutna). Otvorena neuralna cijev nastavlja se u tijelo zametka.

Slika 23: Shema kaudalnog dijela *splotch* mišjeg zametka starog 11,5 dana.

Slika 24: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *splotch* zametka starog 11,5 dana **(24A)** prema kranijalno. U vrhu osnove repa nalazi se repni pupoljak **(24A)**. Kranijalno, u dorzalnom dijelu repnog pupoljka oblikuje se moždinski tračak **(24B-D)** i pojavljuje lumen sekundarne neuralne cijevi. Usporedo s oblikovanjem moždinskog tračka, ventralni dio repnog pupoljka oblikuje repni tračak **(24B-D)**. Prema kranijalno se repni tračak razdvoji na dvije strukture, te se oblikuju sekundarna neuralna cijev, sekundarni notokord i repno crijevo **(24E)**. Paraaksijalni mezenhim oblikuje somite **(24E)**. Prema kranijalno se nalazi otvorena neuralna cijev – spina bifida, koja se može pratiti sve do u lumbosakralno područje zametka **(24F-I)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo, SB – spina bifida. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 23 i 24: Splotch zametak star 11,5 dana

Analizom razvoja zametaka *splotch* miša najranija morfološka razlika u odnosu na razvoj normalnog zametka nađena je na stadiju 23-36 somita, što odgovara 10-10,5 dana starim zamecima. Dok je u kontrolnim zamecima iste starosti kaudalna neuralna cijev zatvorena, u *splotch* zametaka se nalazi spina bifida. Obzirom da se na ovom stadiju konačno oblikovanje notokorda i repnog crijeva odvija kaudalno od odsječka u kojem je ponovno neuralna cijev normalne morfologije (sl.22H,I), može se zaključiti da se spina bifida u *splotch* zametaka starih 10,5 dana nalazi između odsječaka repa u kojima nastaju moždinski tračak i sekundarni notokord. U dan starijih *splotch* zametaka spina bifida se nalazi na prijelazu srednje u kaudalnu trećinu repa. Na temelju rezultata koji pokazuje da se prva otvorena neuralna cijev nalazi u 10,5 dana starih *splotch* zametaka, kao i dokaza da se otvorena neuralna cijev redovito nalazi proksimalno od odsječka gdje se oblikuje moždinski tračak, može se zaključiti da je mjesto nastanka spine bifide u *splotch* zametaka područje spoja primarne i sekundarne neuralne cijevi.

4.2.3. Aksijalne strukture repa *splotch* zametka starog 11,5 dana stapaju se u području repnog pupoljka

Splotch zameci stari 10,5 i 11,5 dana, kao i zameci kontrolnih miševa, u samom vrhu repa imaju gustu nakupinu homogenog mezenhima – repni pupoljak, okruženu rahlim mezenhimom (sl.24A). Prema bazi, repni se pupoljak izdužuje. U dorzalnom dijelu repnog pupoljka se uočava preraspodjela mezenhimskih stanica: stanice se izdužuju i simetrično raspoređuju, oblikujući kružnu tvorbu – rozetu moždinskog tračka (sl.24B-D). Prema kranijalno, stanice koje su bile u središtu rozete ugrađuju se u njenu stjenku, tako da se stvara šupljina buduće neuralne cijevi. Prema kranijalno se slično zbiva u ventralnom dijelu repnog tračka, gdje se postepeno oblikuje repno crijevo (sl.24C,D). Uz dorzalni dio budućeg repnog crijeva se nalazi grupa stanica koja se prema kranijalno postepeno odvaja. I u *splotch* zametaka starih 10,5 i 11,5 dana odvijaju se ista morfogenetska zbivanja kao i u kontrolnih zametaka: u kaudalnom dijelu repa oblikuje se dorzalno sekundarna neuralna cijev, dok se u ventralnoj polovici repa nalazi repni tračak. Istovremeno s oblikovanjem repnog crijeva, dolazi do odvajanja notokorda (sl.24C,D).

Proksimalno, dolazi do zgušnjavanja paraaksijalnog mezenhima i formiranja somita (sl.24E). Oblikovanje somita je bilo identično onome u kontrolnog miša. Može se zaključiti da je građa repnog pupoljka ovih stadija normalna.

Cijelom dužinom repa, notokord, somiti i repno crijevo su normalne građe. Izgled repnog pupoljka i mehanizam sekundarnog razvoja zametka na ovom stadiju su očuvani. Budući da nije nađena razlika u izgledu notokorda, somita i repnog crijeva u dijelu repa gdje je neuralna cijev normalna, kao ni u dijelu gdje je neuralna cijev otvorena, zaključuje se da usprkos poremećenoj neurulaciji, sekundarni razvoj ostalih aksijalnih, ali i paraaksijalnih struktura, na ovom stadiju nije promijenjen.

4.2.4. *Splotch* zametak star 12,5 dana ima poremećenu građu repnog pupoljka i osnove repa

Splotch mišji zametak star 12,5 dana (45-58 parova somita) razlikuje se od kontrolnih zametaka divljeg tipa i od dan mlađih zametaka *splotch* miša. Stanice u kaudalnoj trećini repa nisu gusto zbijene, već se između njih nalazi dosta slobodnog međustaničnog prostora. Repni pupoljak se oblikovao, ali je u usporedbi s kontrolom, i ovdje zgusnuće mezenhima slabije izraženo (sl.26A). Budući da su međustanični prostori široki, teško je odrediti oštre granice između struktura osnove repa. Prateći rezove od vrha osnove repa prema kranijalno dolazi se do razine, gdje se repni tračak odvaja od skupine stanica, koje će oblikovati neuralnu cijev (sl.26B). Dalje prema kranijalno se repni pupoljak podjeli na dorzalnu i ventralnu skupinu stanica. Na toj razini postoje tri skupine stanica koje po svom položaju odgovaraju stanicama koje u kontrolnom zametku oblikuju neuralnu cijev, notokord i repno crijevo, no, njihov je izgled nepravilan.

U 12,5 dana starih *splotch* zametaka nije moguće precizno odrediti razinu oblikovanja moždinskog tračka. Dorzalna skupina stanica, koja odgovara nediferenciranim stanicama moždinskog tračka, nepravilna je oblika i nema oštre granice prema okolnom mezenhimu (sl.26B-C). Šupljina je nepravilna i neuroepitel je nejednolike debljine. U kaudalnoj trećini repa 12,5 dana starih *splotch* zametaka mjestimično se nalaze odsječci osnove repa, gdje se u području neuralne cijevi stanice podjele na dvije skupine (sl.26C), koje se ponovno spoje i

oblikuju neuralnu cijev (sl.26D). Na rezovima bliže bazi repa oblikuje se pravilna neuralna cijev s ravnomjernom debljinom stjenke i prisutnom pločom dna (sl.26F).

Notokord se kao samostalna struktura izdvojena iz repnog tračka nalazi svega nekoliko rezova proksimalno od vrha repa, t.j. udaljenost između odvojenog notokorda i repnog pupoljka je mala (sl.26C). Usprkos ranom odvajanju od osnove za repno crijevo, oblik i veličina notokorda su nepravilni. Na nekim razinama notokord je građen od nekoliko stanica, dok je ponegdje dvostruko veći od onog u kontrolnog zametka. U kratkom odsječku izmjenjuju se različiti oblici: od pravilno okruglog, izduženog do nepravilnog poligonalnog. Stanice koje će kranijalno oblikovati notokord prolazno oblikuju šupljinu. Nakon što postigne normalan oblik i veličinu, notokord je normalnog izgleda i bez prekida cijelom dužinom repa.

Nakon odvajanja dorzalnog dijela repnog tračka u samostalnu tvorbu notokorda, preostaje ventralna skupina stanica koja postepeno oblikuje repno crijevo. Na ovom stadiju *splotch* zametaka nije moguće naći razinu gdje se oblikuje rozeta repnog crijeva. Umjesto pravilnog otvaranja šupljine, repno crijevo od mjesta nastanka prema bazi repa na nekoliko mjesta oblikuje šupljine, koje gubi nekoliko puta. Stjenka repnog crijeva je neravnomjerne debljine.

Poput neuralne cijevi, tek se na proksimalnim razinama oblikuje repno crijevo u vrlo kratkom dijelu repa. Ono proksimalno izgubi šupljinu, te nestane kao i kod kontrolnih zametaka.

Na istoj razini kao i u dan mlađeg zametka, t.j. na prijelazu srednje u distalnu trećinu repa nalazi se područje otvorene neuralne cijevi (sl.26G-I). Za razliku od dan mlađeg stadija gdje se otvaranje odvijalo postupno, ovdje je prijelaz između potpuno zatvorene u otvorenu neuralnu cijev vrlo oštar. Distalno od razine na kojoj se nalazi otvorena neuralna cijev, njen oblik je normalan, s prisutnom pločom dna i normalnom debljinom neuroepitela. Svega par rezova proksimalno nalazi se potpuno otvorena neuralna cijev, čije stjenke prate oblik repa. Neuroepitel je zadebljan i cijelom dužinom spine bifide je prisutno odumiranje stanica. Izgled otvorene neuralne cijevi sličan je spini bifidi koja se nalazi u krajnjem proksimalnom dijelu otvorene neuralne cijevi u dan mlađeg zametka. Otvorena neuralna cijev se nastavlja u trup zametka.

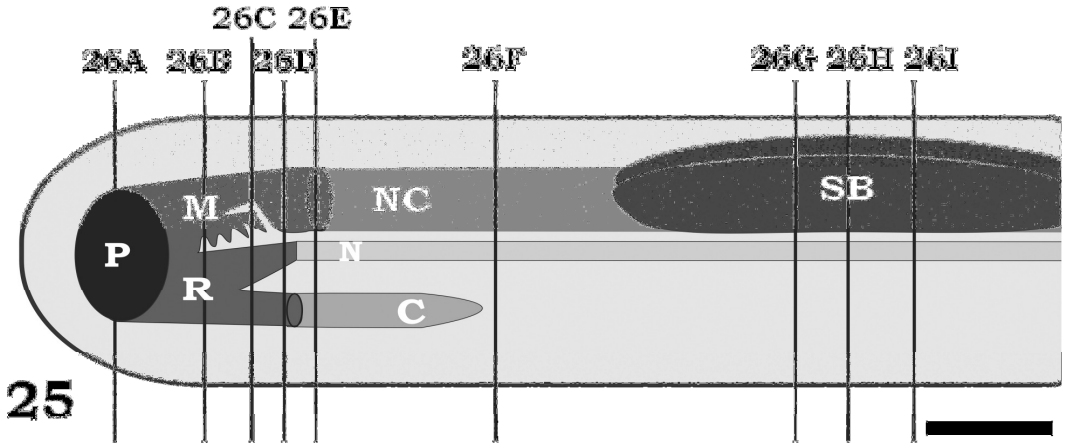
Osnovno obilježje splotch zametaka starih 12,5 dana jest poremećen izgled repnog pupoljka, te poremećen razvoj svih aksijalnih struktura zametka.

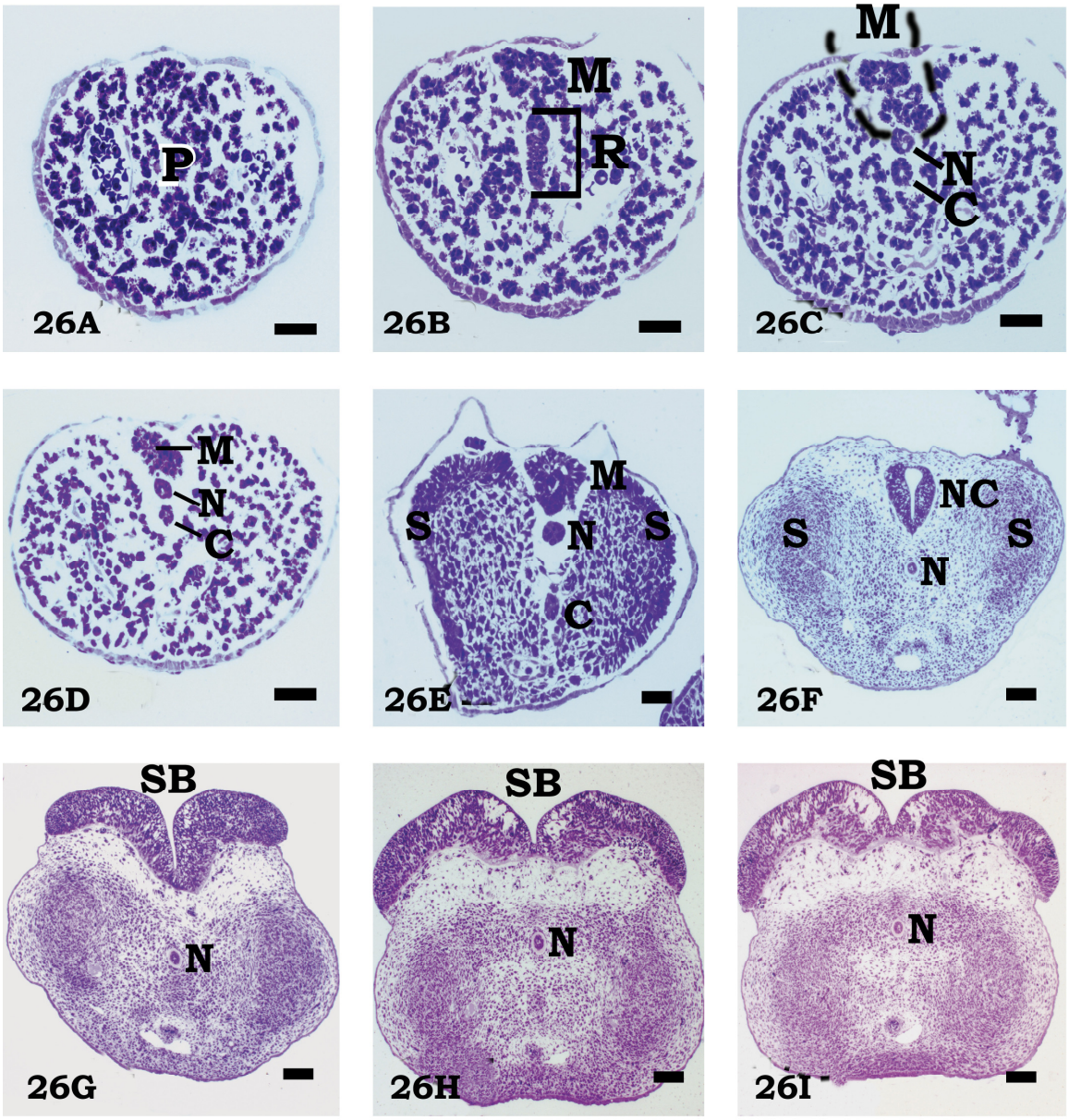
Slika 25: Shema kaudalnog dijela *splotch* mišjeg zametka starog 11,5 dana.

Slika 26: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *splotch* zametka starog 12,5 dana **(26A)** prema kranijalno.

Poprečni serijski rezovi kroz osnovu repa od kaudalnog kraja **(26A)** prema kranijalno. U kaudalnom vrhu zametka **(26A)** nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Kranijalno **(26B)**, repni pupoljak se podjeli na dvije skupine stanica: dorzalnu – moždinski tračak (M) i ventralnu – repni tračak (R). Za razliku od dan mlađeg stadija, oblikovanje ovih skupina stanica praćeno je nastankom višestrukih nakupina stanica moždinskog tračka **(26C)**. Moždinski tračak se u *splotch* zametaka ovog stadija proteže u kranijalnom smjeru sve do odsječka repa, gdje su potpuno oblikovani notokord, repno crijevo i somiti **(26E)**. Normalno oblikovana sekundarna neuralna cijev nastaje bliže bazi zametka za razliku od kontrolnog mišjeg zametka **(26F)**. Kranijalno se nalazi otvorena neuralna cijev koja se nastavlja u trup zametka **(26G-I)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, SB – spina bifida, N – notokord, C – repno crijevo, S – somiti. Crta mjerila – 50 µm.





Slike 25 i 26: Splotch zametak star 12,5 dana

U skladu s postavljenim ciljevima rada, ovo je istraživanje opisalo razvoj kaudalnog dijela *splotch* zametaka. Za razliku od 9 dana starih zametaka koji se ne razlikuju od zametaka kontrolnog miša, *splotch* zameci stari 10,5 dana imaju spinu bifidu. Budući da se početak ovog poremećaja nalazi u području neuralne cijevi koja se počinje oblikovati sekundarnim mehanizmom razvoja, može se zaključiti da spina bifida u *splotch* zametka nastaje u području spoja primarne i sekundarne neurulacije. Budući da je nastanak svih struktura u kaudalnom dijelu zametka jednak onome u kontrolnog miša, proizlazi da je građa repnog pupoljka normalna, a sekundarni mehanizam razvoja očuvan. Ipak, poremećen izgled cijelog kaudalnog dijela zametka u *splotch* zametaka starih 12,5 dana ukazuje na negativan utjecaj spine bifide na sva tkiva kaudalno od mjesta poremećaja. Budući da je razvoj svih struktura zametka starih 10,5 i 11,5 dana usporedo sa spinom bifidom bio normalan, zaključak je da prisustvo otvorene neuralne cijevi ne utječe na normalan razvoj okolnih struktura osnove repa.

4.3. Razvoj mišjeg zametka *truncate*

Mišja linija *truncate* izabrana je za istraživanje mehanizama morfogeneze osnove repa, jer je u nje primarno poremećen razvoj notokorda. Istraživanje razvoja zametka ovog mutanta trebala je odgovoriti na slijedeća pitanja: koji je slijed zbivanja u razvoju *truncate* zametka, kakav je odnos poremećenog razvoja notokorda i repnog pupoljka, te kakav je odnos poremećenog razvoja notokorda i razvoja ostalih struktura kaudalnog dijela zametka.

4.3.1. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze omogućuje prepoznavanje *truncate* zametaka

Odrasli *truncate* heterozigotni miševi ne mogu se razlikovati od miševa divljeg tipa, stoga se odabir nosilaca mutacije može učiniti isključivo prepoznavanjem homozigotnih miševa, koji imaju malformacije repa. Iako su homozigoti plodni, pare se slabo, pa se linija ne može održati isključivo međusobnim parenjem homozigota. Zato se homozigoti pare s miševima divljeg tipa, da bi se u njihovom potomstvu dobili svi heterozigoti, a potom se u slijedećoj generaciji heterozigoti pare međusobno da bi se opet dobili homozigoti, koji se mogu prepoznati u leglu. Ovakav način parenja je spor, a ima i nedostatak što se homozigotni zameci dobivaju isključivo parenjem dvaju homozigota. Kako bi omogućili da se linija *truncate* održava sparivanjem heterozigota, te genotipizaciju zametaka koji su dobiveni međusobnim parenjem heterozigota, uspostavljen je test genotipizacije *truncate* miševa.

Genotipizacija *truncate* zametaka temelji se na točkastoj mutaciji unutar 2. egzona gena *Noto*. Sintetizirane su slijedeće početnice: jedna u 3' smjeru koja odgovara normalnoj sekvenci, te jedna koja odgovara mutiranoj, *truncate* sekvenci. U 5' smjeru je korištena jedna zajednička početnica.

Budući da je produkt i sa normalnom i sa *truncate* početnicom identične veličine (312 pb), lančana reakcija polimeraze je rađena u dva kruga. U prvom krugu je umnožena sekvenca samo s kontrolnom početnicom, dok je u drugom korištena *truncate* početnica. U slučaju da je zametak na oba alela imao normalnu sekvencu, umnožen DNA odsječak je bio prisutan samo u prvom krugu, a ukoliko se radilo o homozigotu za *truncate* mutaciju, umnožen DNA

odsječak je bio prisutan samo u drugom krugu. Heterozigot je dao umnožen DNA odsječak u oba kruga lančane reakcije polimerazom.

Noto sekvenca

GCAAGAGTTGGAGAAGGTGT**T**

Truncate Noto sekvenca

GCAAGAGTTGGAGAAGGTGT**G**

GCTGCAAGAGTTGGAGAAGGTGT**X**TGCAAAGCAGCACAACCTGGTGGGGAAGG
AGAGAGCCCAGCTGGCTGCCAGGCTGCACCTGACGGAGAATCAGGTGAGAGCAG
GGACGAGGCTCAGGCTGTGTAGGGGGCATCTGATACCCTTGTAGTAAGGGATGG
GAAGATGATATGACCTTTTTCCTCTGAGCTAGGATGATGAGGAGAGAGCCCCCCC
TTTTTAAAAACACATTCCCTATGTAATATTCCTATCGGGAGTCACATTATAAACAT
AACCAAAGGTTCCTCTAGTGCTTCCTCCTTTTTATGTGTGTGGGTTGCATATGTGC
ATATATGTTTTTGCATGTGTGTAGGCACACACATGTGTGTAAGTATGTGTGTATGT
GTGGGGCCTGAGGTTG

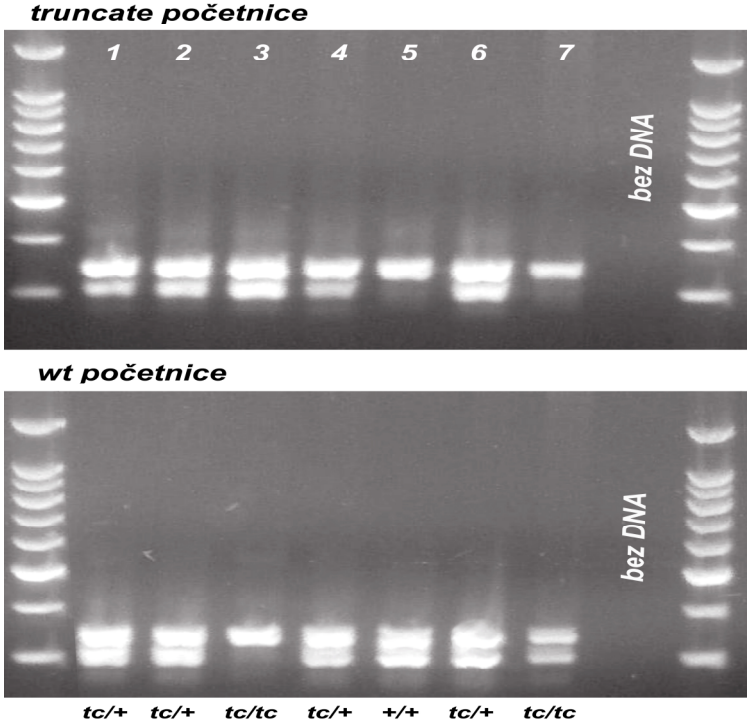
Slika 27: Sekvenca 2. egzona gena *Noto*. Truncate mutacija obuhvaća zamjenu timina gvaninom, te su na tom mjestu postavljene početnice za lančanu reakciju polimerazom. Početnica u suprotnom smjeru je 312 pb dalje.

Kao kontrola da je reakcija genotipizacije svakog uzorka uspješno provedena, korišten je dodatni par početnica svojstven drugom genu (*D6Gaj15*, gen *Nol1*, 6. kromosom, 348 pb). Rezultat genotipizacije vjerodostojan je samo uz prisutnost umnoženog DNA odsječka dobivenog ovim kontrolnim parom početnica.

Pouzdanost genotipizacije je provjerena na odraslim životinjama ili na zamecima kojima je na osnovu fenotipa moguće pretpostaviti genotip. Svi odrasli miševi bez repa, te zameci s vidljivim suženjima repa su prepoznati kao *truncate* homozigoti.

Ovako uspostavljen postupak genotipizacije *truncate* zametaka omogućuje prepoznavanje *truncate* homozigota, heterozigota i normalnih zametaka, što do sada nije bilo moguće, budući da ne postoje jasni morfološki kriteriji za prepoznavanje *truncate* zametaka. Drugim riječima, uvođenjem ovog postupka moguće je sparivati odrasle heterozigotne životinje, te u istom leglu dobiti zametke sva tri genotipa. Time se postignulo da je homozigotnom zametku

kontrola heterozigot ili divlji tip dobiven iz istog legla, dakle, zametak jednako star, što je važno za morfološke analize.



Slika 28: Genotipizacija *truncate* mišjih zametaka.

Truncate je označen s točkastom mutacijom unutar 2. egzona gena *Noto*. U prvom krugu lančane reakcije polimerazom koriste se *truncate* početnice (312 pb), dok se u drugom krugu koriste početnice koje odgovaraju normalnoj *Noto* sekvenci (312 pb). U oba kruga se koriste kontrolne početnice u *Nol1* genu (348 pb). U ovom primjeru genotipizacija je otkrila zametke koji su imali prisutne umnožene DNA odsječke samo u prvom krugu (uzorci 3 i 7), te su prepoznati kao *truncate* homozigoti. Zameci divljeg tipa su imali prisutne umnožene DNA odsječke samo u drugom krugu lančane reakcije (uzorak 5), dok su heterozigotni zameci imali umnožene DNA odsječke u obje reakcije (uzorci 1,2,4 i 6).

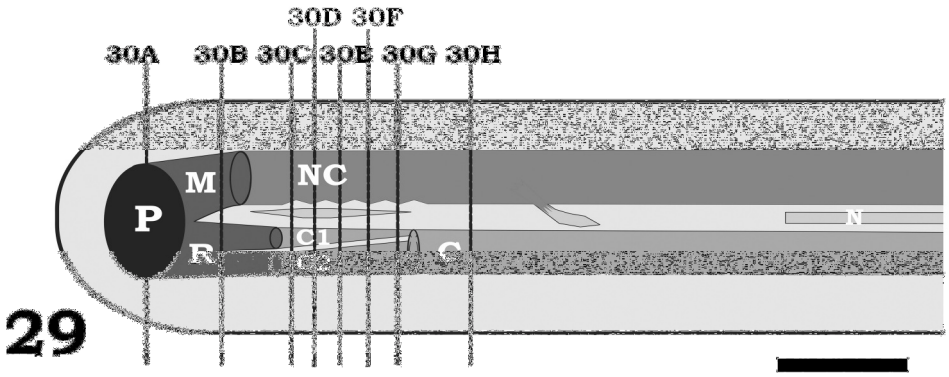
4.3.2. *Truncate* zameci imaju poremećen razvoj notokorda

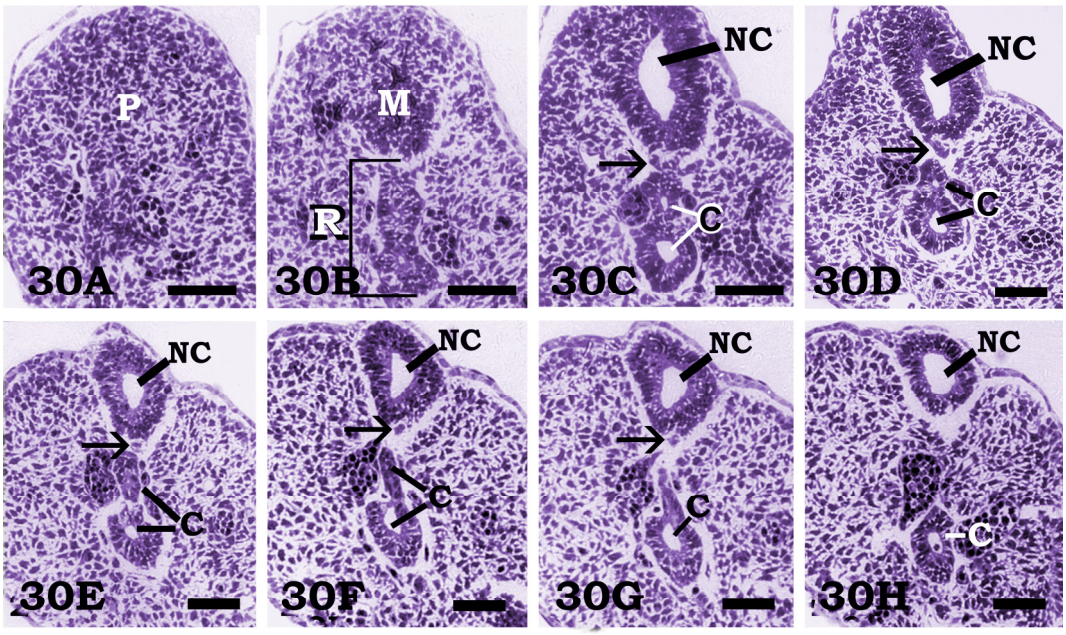
Istraživanje notokorda na serijskim poprečnim rezovima *truncate* zametaka starih 11,5 i 12,5 dana pokazalo je da je notokord isprekidan u cijelom kaudalnom dijelu (sl.29-34). Broj nađenih odsječaka varira od jednog do pet (tablica 2). Distalni završeci odsječaka notokorda obilježeni su postepenim smanjivanjem broja stanica koje grade notokord, tako da na distalnim krajevima notokord završava tračkom od nekoliko stanica (sl.30C-G). Za razliku od distalnog kraja, proksimalni kraj notokorda je zadebljan i redovito završava oštrim prekidom. Notokord u 11,5 i 12,5 dana starih *truncate* zametaka varira u promjeru i obliku. U nekim dijelovima repa zadebljava, da bi se u nekima stanjio, te se iz pravilno oblog oblika mijenja u nepravilan poligonalan oblik. Općenito, notokord je u *truncate* zametaka tanji od notokorda u normalnih zametaka.

Većina odsječaka notokorda dodiruje epitel neuralne cijevi (sl.30D). Redovito je distalni kraj notokorda taj koji se naslanja na neuroepitel. Na nekim mjestima notokord bez prekida prelazi u epitel stjenke neuralne cijevi (sl.34G). Za razliku od distalnih krajeva, proksimalni su krajevi redovito odvojeno od neuralne cijevi i smješteni ventralno od nje, na mjestu gdje se nalazi neprekinuti notokord u miša divljeg tipa. U većini istraživanih osnova repa se notokord odvojio od stjenke neuroepitela, postepeno se pomicao prema ventralno i povećavao u promjeru, prema bazi se smjestio u sredinu repa, te na par rezova prema proksimalno nestao (sl.32C-F).

U jednom proučavanom *truncate* zametku starom 11,5 i u jednom starom 12,5 dana notokord je potpuno nedostajao u osnovi repa (sl.34J).

Na osnovu nalaza potpunog ili djelomičnog nedostatka, poremećenog izgleda ili smještaja notokorda, te na osnovi činjenice da je poremećen razvoj ostalih struktura zametka nađen samo u područjima gdje je poremećen razvoj notokorda, zaključeno je da je u truncate zametaka primarno poremećen razvoj notokorda.





Slike 29 i 30: Truncate zametak star 11,5 dana

Slika 29: Shema kaudalnog dijela *truncate* mišjeg zametka starog 11,5 dana.

Slika 30: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *truncate* zametka starog 11,5 dana **(30A)** prema kranijalno.

Umjesto oblikovanja notokorda i repnog crijeva, repni tračak (R) oblikuje dvije šupljine repnog crijeva (C) **(30B-D)**. Prema kranijalno, dorzalna šupljina repnog crijeva nestaje **(30E-H)**. Kaudalni završetak notokorda (strelica) nema kontakt s repnim tračkom, već je povezan s ventralnim neuroepitelom **(30C-G)**. Dalje prema kranijalno nestaje **(30H)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, C – repno crijevo, strelica – kaudalni završetak notokorda. Crta mjerila – 50 µm.

Tablica 2: Većina odsječaka notokorda u *truncate* zametaka završava u kontaktu s neuralnom cijevi. Somiti su normalno razvijeni, bez morfoloških osobitosti (-) ili su spojeni u medijanoj liniji (+).

Analizirani zameci		Ukupan broj odsječaka notokorda u repu	Kaudalni završetak notokorda spojen s neuralnom cijevi	Kaudalni završetak notokorda dodiruje neuralnu cijev	Kaudalni završetak notokorda smješten u sredini repa	Somiti spojeni u medijanoj liniji
11,5 dana stari zameci	tc1	3	1	1	1	+
	tc2	5	4	0	1	+
	tc3	2	1	1	0	-
	tc4	0	0	0	0	+
	tc5	2	0	1	1	-
	tc6	1	0	1	0	-
	tc7	2	1	1	0	+
	tc8	2	1	1	0	-
	tc9	1	0	1	0	+
12,5 dana stari zameci	tc10	1	0	1	0	-
	tc11	5	1	3	1	-
	tc12	0	0	0	0	+
	tc13	3	2	1	0	-
	tc14	1	1	0	0	+
	tc15	3	1	2	0	+

4.3.3. Poremećena građa notokorda u *truncate* zametka povezana je s poremećenim razvojem repnog pupoljka

Odgovor na pitanje kakav je nastanak kaudalnog dijela notokorda, te da li je očuvan sekundarni mehanizam razvoja, dobiven je detaljnim opisivanjem morfologije repnog pupoljka u *truncate* zametaka starih 11,5 i 12,5 dana.

Na oba ova stadija, kao i u zametaka kontrolnog miša, nađena je u vrhu repa nakupina zgusnutog mezenhima – repni pupoljak, okružena rahlim mezenhimom (sl.30A,34A). Prema bazi, repni se pupoljak dodatno izdužuje i dijeli na dva tračka stanica: dorzalni – moždinski i ventralni – repni tračak. Na istoj razini se u repnom tračku zajedno sa stvaranjem šupljine

repnog crijeva otvara još jedna mala šupljina. Ovo je jedna od najvećih razlika između normalnog i *truncate* zametka: dorzalni dio repnog tračka u *truncate* zametka se nikada ne diferencira kao u zametaka divljeg tipa u notokord. Umjesto notokorda, stanice dorzalnog dijela repnog tračka oblikuju dodatnu šupljinu repnog crijeva (sl.30B-D,34C-D). Tako su na toj razini prisutni moždinski tračak i dvije šupljine repnog crijeva. Prema bazi, dorzalna šupljina repnog crijeva postaje sve manja, sve dok se u potpunosti ne zatvori (sl.30G,34D). Tako u kratkom odsječku repa na mjestu dorzalne šupljine repnog crijeva postoji mala skupina stanica vezana uz ventralni lumen repnog crijeva. Dorzalna skupina stanica se smanjuje i prema bazi repa u potpunosti nestane (sl.30H,34E). Na taj način od dvije šupljine repnog crijeva nastaje jedna.

Budući da se pojedini odsječci notokorda nalaze i u kaudalnoj trećini osnove repa, bilo je potrebno odrediti gdje je njihov kaudalni završetak. Prateći završni kaudalni odsječak notokorda, nađeno je da se kaudalni kraj notokorda nastavlja u malu skupinu stanica prisutnu između dorzalne (dodatne) šupljine repnog crijeva i neuralne cijevi (sl.30C-G). Kod svih istraživanih repova *truncate* miša bilo je nemoguće sa sigurnošću utvrditi da li neke od tih stanica pripadaju neuralnoj cijevi, dorzalnom dijelu dorzalnog repnog crijeva ili su potpuno neovisne. Razlozi zbog kojih je bilo nemoguće odrediti mjesto njihovog točnog početka su bili slijedeći: u tim je dijelovima repa ventralna granica neuralne cijevi neoštra - stanice koje oblikuju stjenku nisu u pravilnom rasporedu i različite su veličine. Dorzalna šupljina repnog crijeva se na istoj razini spaja s ventralnom i pomalo nestaje, pa je bilo nemoguće precizno odrediti jasnu dorzalnu granicu repnog crijeva. Kaudalni kraj tračka stanica koji se nastavlja na notokord građen je od svega dvije do pet stanica koje su mjestimice u dodiru s neuralnom cijevi, a mjestimice s repnim crijevom.

U zametaka starih 12,5 dana nađeni su osim poremećaja razvoja repnog pupoljka sličnih onima u zametaka starih 11,5 dana i slijedeći dodatni poremećaji.

U jednoj osnovi repa nađena su dva notokorda, jedan uz drugi (sl.34H). Serijski rezovi od vrha prema bazi repa pokazali su da se prvo razvio jedan notokord ventrolateralno, potom prema bazi repa još jedan, simetrično u odnosu na prvi. Dva notokorda su se spojila u jedan, koji se protezao prema bazi repa i poput ostalih odsječaka notokorda u jednom dijelu repa je nestao.

U jednom zametku je nađena grupa stanica u medijanoj liniji između notokorda i repnog crijeva (sl.34I). Vjerojatno se radi o ostatku drugog repnog crijeva, koji se nije do kraja spojio s ventralnim repnim crijevom.

Budući da je poremećen razvoj notokorda osnovno obilježje razvoja kaudalnog dijela *truncate* zametaka, za pretpostaviti je da je u osnovi ovog poremećaja poremećan razvoj repnog pupoljka. Zaista, nastanak sekundarnog notokorda u *truncate* zametaka koji je vezan uz ventralni neuroepitel ili njegov potpuni nedostatak u kaudalnoj trećini osnove repa, uz poremećen razvoj repnog crijeva, potvrdili su pretpostavku da je u *truncate* zametaka poremećen mehanizam sekundarnog razvoja.

4.3.4. Poremećena neurulacija i somitogeneza u *truncate* zametka povezana je s poremećenim razvojem notokorda

Osim notokorda, u *truncate* zametka nađene su promjene i u okolnim repnim strukturama. Poremećaji razvoja nađeni su samo u dijelovima repa u kojima je nedostajao notokord. Neuralna cijev u ovim područjima mijenja oblik. Umjesto pravilno ovalnog nađeni su nepravilni oblici, s nepravilnom ili izgubljenom šupljinom (sl.32B-F). U najvećem broju odsječaka repa bez notokorda nedostaje ploča dna. Morfološki kriteriji za ploču dna bili su: ventralni dio neuralne cijevi koji je 3 puta tanji od ostalih dijelova stjenke, radijalno i bazalno položene jezgre, te nedostatak budućih korjenova kralježnične moždine toga područja (27). U nekim slučajevima, u cijeloj stjenci neuralne cijevi nađene su brojne odumrle stanice. One su imale zgusnut kromatin, te odvojene dijelove stanica poput mjehurića koji predstavljaju ostatke raspadnutih stanica tijekom odumiranja, što su značajke apoptoze.

U bazalnim dijelovima repa, u kojima nedostaje notokord, neuralna cijev je povećanog promjera, stjenka je zadebljana, a šupljina izrazito uska. Smještaj osnova spinalnih ganglija je poremećen. Umjesto uz dorzalni, nalaze se uz ventralni rub neuralne cijevi, a ponekad su spojeni u medijanoj liniji (sl.32E,F).

Nedostatak notokorda u kaudalnom dijelu osnove repa rezultira spojenim somitima u medijanoj liniji (sl.32B-F). U nekim slučajevima, dolazi do dorzo-ventralne inverzije somita, tj. dermomiotom je smješten ventromedijalno. Nedostatak notokorda u bazalnim dijelovima

repa ne utječe na morfologiju somita (sl.34K). Somiti su u ovom području spojeni samo u zamecima u kojima notokord nedostaje u cijelom repu.

Kao i u prethodnom stadiju u zametaka starih 12,5 dana nedostatak notokorda je praćen poremećajima u razvoju neuralne cijevi i somita. Neuralna cijev gubi normalan izdužen oblik, te joj nedostaje ploča dna. Osobitost ovog stadija je izdužena neuralna cijev u latero-lateralnom, umjesto u dorzo-ventralnom smjeru. Neuroepitel je obilježen brojnim odumiranjem stanica.

U nekim slučajevima nedostatak notokorda u distalnim dijelovima repa praćen je odumiranjem stanica, te nalazom dijelova osnove repa u kojima neuralna cijev u potpunosti nedostaje (sl.34J). Umjesto neuralne cijevi, cijelom širinom osnove repa se nalaze spojeni somiti.

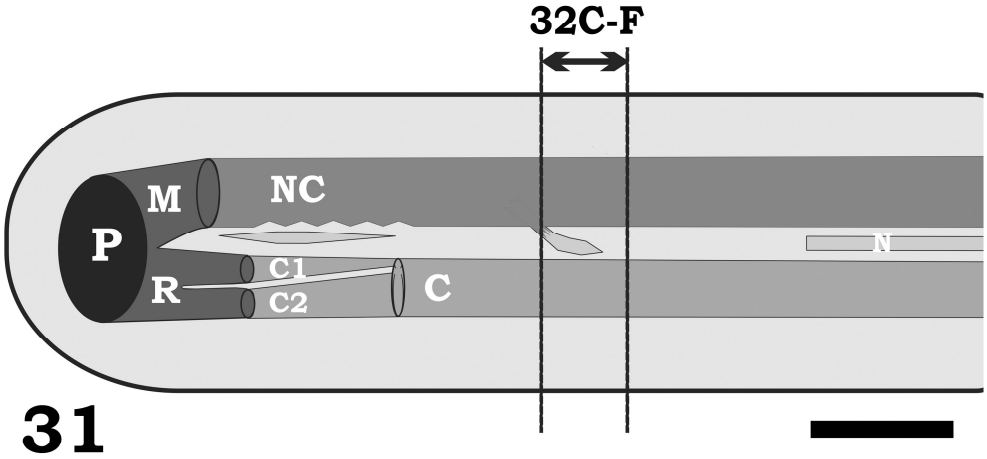
Budući da je poremećena neurulacija i somitogeneza u *truncate* zametaka nađena samo u odsječcima u kojima nedostaje notokord, može se zaključiti da je poremećen razvoj notokorda negativno utjecao na razvoj opisanih struktura.

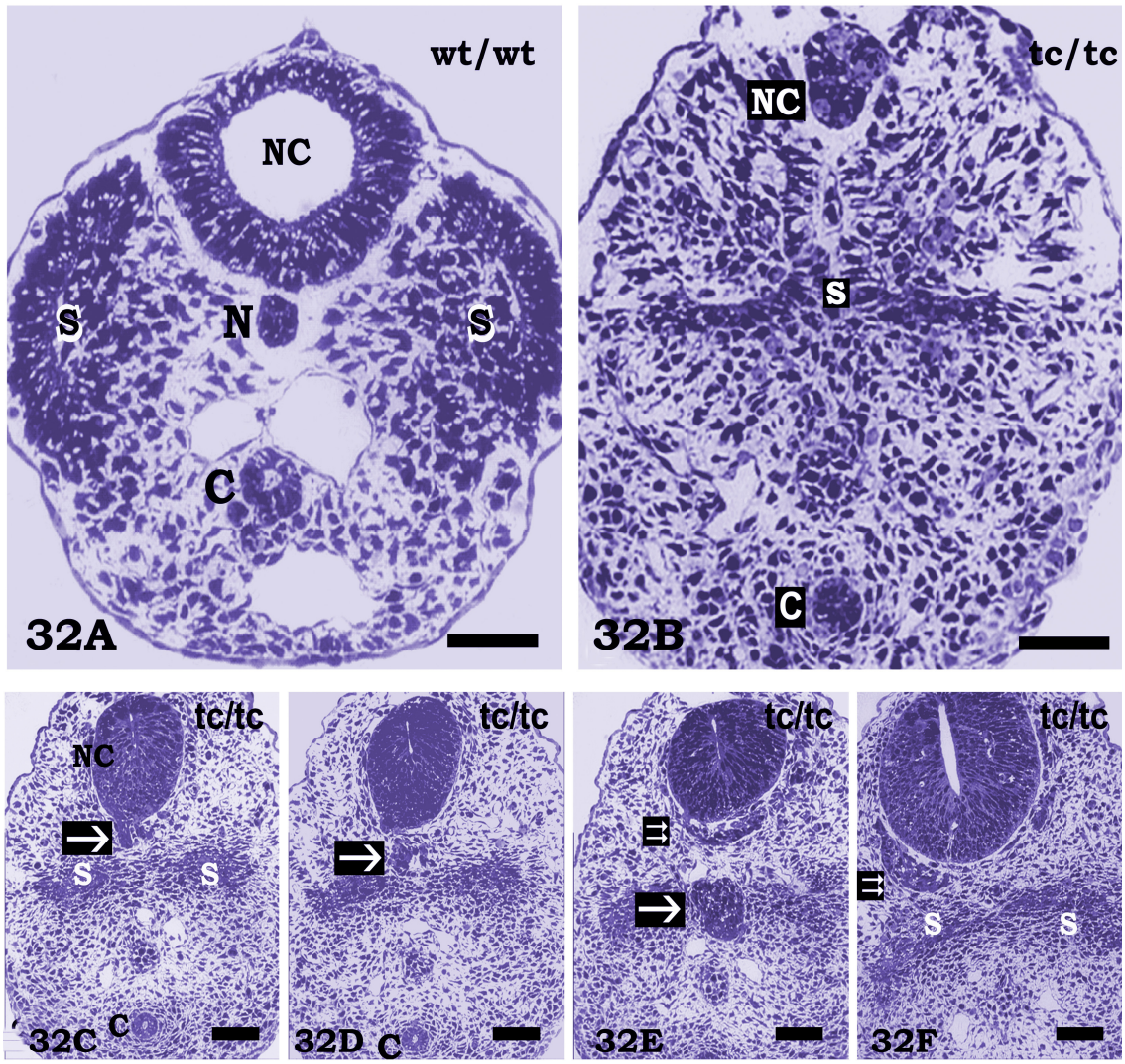
Slika 31: Shema kaudalnog dijela *truncate* mišjeg zametka starog 11,5 dana.

Slika 32: Usporedni prikaz presjeka kroz kaudalni dio normalnog **(32A)** i *truncate* **(32B)** zametka. Vidljivi su nedostatak notokorda (N) i somiti spojeni u medijanoj liniji (S). Neuralna cijev (NC) je smanjenog promjera, nema šupljinu i u stjenci se vide stanice koju odumiru.

Kranijalno od odsječka zametka u kojima je vidljiv kontakt notokorda i neuralne cijevi **(32C)** nalazi se migracija stanica koje grade notokord prema ventralno **(32D,E)**. Dalje prema kranijalno notokord nestaje **(32F)**. Također je vidljiva osnova spinalnih ganglija spojena u medijanoj liniji **(32E,F)**.

NC – neuralna cijev, N – notokord, C – repno crijevo, S – somiti, strelica – stanice koje se odvajaju od neuralne cijevi i migriraju prema ventralno, dvostruka strelica – osnova spinalnih ganglija spojenih u medijanoj liniji. Crta mjerila – 50 µm.





Slike 31 i 32: Truncate zametak star 11,5 dana

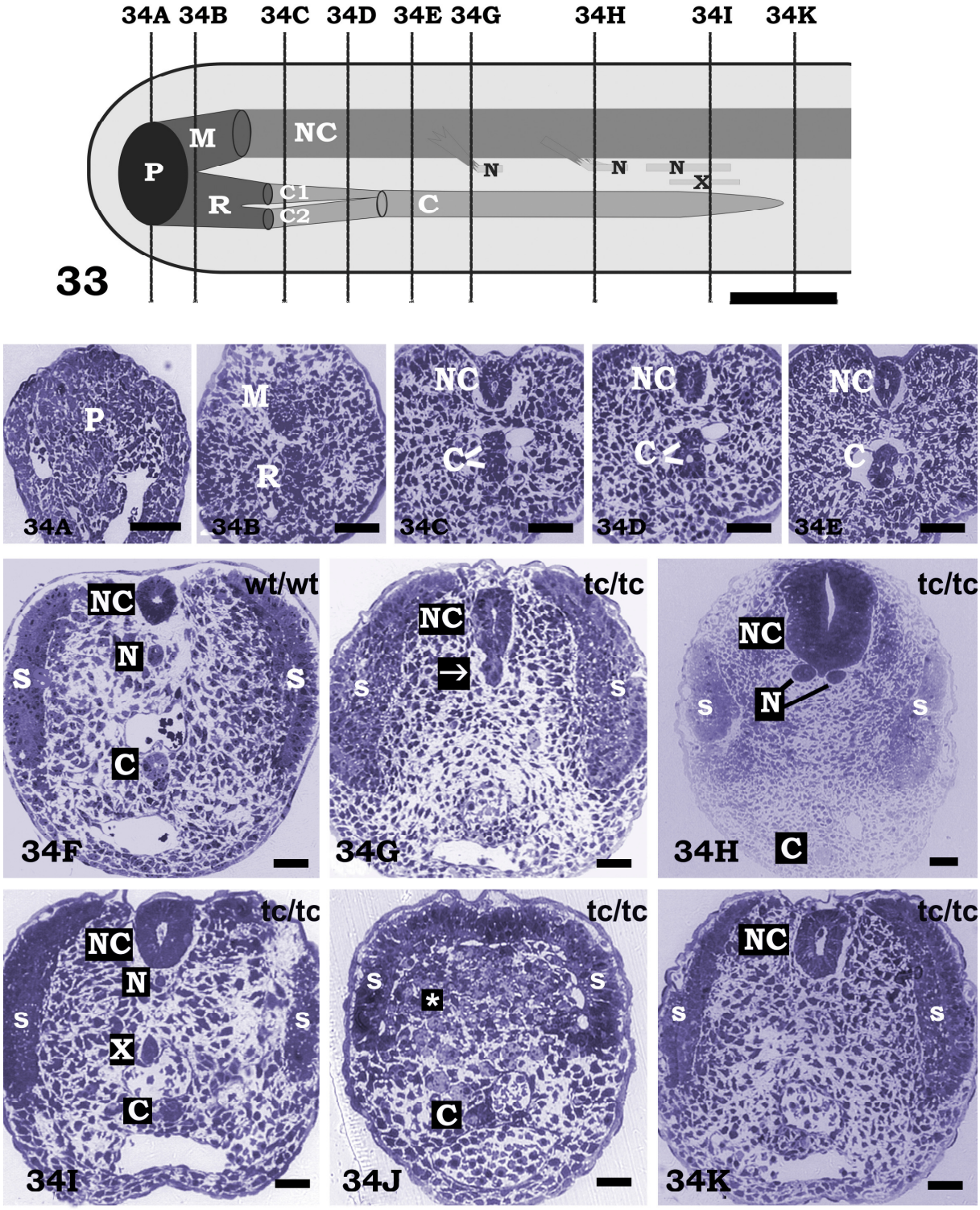
Slika 33: Shema kaudalnog dijela *truncate* mišjeg zametka starog 12,5 dana.

Slika 34: Poprečni serijski rezovi kroz kaudalni završetak *truncate* zametka starog 12,5 dana **(34A)** prema kranijalno.

U samom vrhu zametka nalazi se repni pupoljak, koji se prema kranijalno podjeli na moždinski i repni tračak **(34B)**. Usporedivo s dan mlađim *truncate* zametkom, repni tračak ne oblikuje notokord. Umjesto notokorda, dorzalni dio repnog tračka oblikuje dodatni lumen repnog crijeva **(34C,D)**. Dalje prema kranijalno, dva se lumena spajaju u jedan **(34E)**. Za razliku od dan mlađeg zametka, *truncate* zametak star 12,5 dana u kaudalnom vrhu nema notokord.

U usporedbi s normalnim mišjim zametkom **(34F)**, *truncate* mišji zametak star 12,5 dana pokazuje različite poremećaje razvoja: kaudalni završetak notokorda u kontaktu s ventralnim neuroepitelom **(34G)**, dva notokorda **(34H)**, dodatnu skupinu stanica između notokorda i repnog crijeva **(34I)**, potpuni nedostatak neuralne cijevi i notokorda sa somitima spojenima u medijalnoj liniji **(34J)**, te neodostatak notokorda uz očuvanu morfologiju ostalih struktura **(34K)**.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak, NC – neuralna cijev, C – repno crijevo, N – notokord, strelica – kontakt neuralne cijevi i notokorda, X – dodatna nakupina stanica između notokorda i repnog crijeva, zvjezdica – sklerotom somita spojenih u medijanoj liniji. Crta mjerila – 50 µm.



Slike 33 i 34: Truncate zametak star 12,5 dana

5. RASPRAVA

5.1. Razvoj B6 zametka miša

5.1.1. Kaudalni dio zametka miša razvija se sekundarnim mehanizmom razvoja

Razvoj zametka u kralješnjaka označen je istodobnim odvijanjem različitih morfogenetskih procesa. Iako postoje manje razlike u načinu oblikovanja kaudalnih struktura, u svih proučavanih vrsta postoji dvojba oko načina nastanka i diferencijacije stanica tijekom produljivanja zametka. Budući da je oko 10. dana razvoja zametka miša (30 somita) zatvaranje kaudalnog neuroporusa završeno i da na tom stadiju u kaudalnom dijelu zametka više ne postoji neuralna ploča, za pretpostaviti je da i u miša postoje dodatni morfogenetski procesi koji omogućuju razvoj neuralne cijevi u kaudalnom dijelu. Ista pretpostavka vrijedi i za ostale strukture kaudalnog dijela zametka: notokord, repno crijevo i somite (12,13,79-81).

Jedan od osnovnih ciljeva ovoga rada bio je utvrditi da li su mehanizmi razvoja kaudalnog dijela zametka miša različiti u odnosu na njegov kranijalni dio. Budući da postoje dokazi da se u kaudalnom dijelu zametka miša neuralna cijev razvija diferencijacijom stanica dorzalnog dijela repnog pupoljka, te da se notokord i crijevo razvijaju iz zajedničke osnove, diferencijacijom stanica ventralnog dijela repnog pupoljka, može se zaključiti da je u razvoju kaudalnog dijela zametka miša prisutan sekundarni mehanizam razvoja.

Ovaj rad, gledano sa stajališta oblikovanja struktura, potvrđuje rezultate istraživanja Holmdahla, koji je proučavao razvoj kaudalnog dijela zametka pileta (11). Neuralna se cijev, nakon završetka primarne neurulacije, nastavlja kao rozeta sve slabije diferenciranih stanica, koja u samom vrhu repa završava kao homogena nakupina mezenhima - repni pupoljak. Budući da su prisutne razlike u stupnju diferenciranosti struktura od baze prema vrhu repa, predložen je model u kojem neuralna cijev u kaudalnom dijelu nastaje diferencijacijom mezenhimskih stanica repnog pupoljka (11). Ovaj rad je potvrdio nastajanje sekundarne neuralne cijevi diferencijacijom iz repnog pupoljka putem moždinskog tračka (23). Obzirom da se do sličnih rezultata došlo proučavanjem razvoja repnog crijeva, te notokorda u

kaudalnom dijelu, potvrđena je pretpostavka da sve aksijalne strukture u kaudalnom dijelu zametka nastaju diferencijacijom iz nediferenciranih mezenhimskih stanica u vrhu repa.

Ovi rezultati ukazuju da se zametak kralješnjaka razvija na dva načina: u kranijalnom se dijelu razvija putem zametnih listića nastalih gastrulacijom, dok se u kaudalnom dijelu razvija iz mezenhima čiji konačni izgled nije određen gastrulacijom. Ipak, Pasteels je proučavanjem razvoja vodozemaca uočio da kaudalni završetak notokorda, ventromedijalni dio neuralne cijevi i prednji dio repnog pupoljka čine zajedničku nakupinu stanica - kordoneuralni spoj (CNH, franc. *charniere chordo-neurale*, engl. *chordo-neural hinge*). Pretpostavio je da je CNH dokaz da su stanice unutar repnog pupoljka već unaprijed predodređene za razvoj u određene strukture, t.j. da se u CNH može vidjeti nastavak gastrulacijom nastalih slojeva (17). Ukoliko je ta tvrdnja točna, stanice u repnom pupoljku ne bi smjele biti pluripotentne, već je njihov položaj posljedica slaganja tri zametna listića prisutnih u kranijalnom dijelu zametka. Novija istraživanja na žabama, pticama i miševima su djelomično potvrdila Pasteelsova opažanja. Repni pupoljak je struktura u kojoj postoje subpopulacije stanica čija se migracija može pratiti od primitivne pruge do u vrh zametka (19-22).

Nalaz specifičnih subpopulacija u kaudalnom završetku zametka ipak ne može odbaciti Holmdahlova opažanja kao netočna. Ovaj rad pokazuje da se u mišjih zametaka starih 11,5 dana, kada je rast kaudalnog dijela tijela najizraženiji, kaudalni završetak notokorda spaja s kaudalnim završetkom repnog crijeva, te da su te dvije populacije stanica odvojene od medularnog tračka. Obzirom da su u vrijeme gastrulacije ove strukture priljubljene jedna uz drugu, te da je ovaj rad pokazao da je kaudalni dio notokorda povezan s neuralnom cijevi i primitivnim crijevom, možemo pretpostaviti da smo uspjeli pokazati morfološki ekvivalent CNH u miša. Tijekom sekundarnog mehanizma razvitka jedan od kandidata za CNH je repni tračak, premda nije povezan sa sekundarnim razvojem neuralne cijevi, već povezuje samo notokord i crijevo. Premda se tijekom razdoblja gastrulacije i primarnog mehanizma razvitka u tijelu može dokazati morfološki ekvivalent CNH u miša, on se ne može dokazati u području osnove repa.

Morfološki gledano, ovaj rad potvrđuje prisutnost specifičnih zbivanja u kaudalnom dijelu zametka, iako je praćenje genskog izražaja i označavanje stanica dokazalo da se zbivanja započeta gastrulacijom nastavljaju u kaudalni dio zametka (21,22).

Prilog tvrdnji da se kaudalni dio zametka razvija drugačijim mehanizmima od kranijalnog je prisutnost niza poremećaja opisanih samo u kaudalnom dijelu zametka. (spina bifida, sindromi kaudalne disgeneze i ageneze) (34,36,37,82). Druga skupina dokaza o posebnim morfogenetskim zbivanjima prisutnima u kaudalnom dijelu zametka temelji se na genima koji su dokazano izraženi samo u tom dijelu (npr. *T*, *Foxa2, Noto*) (74,83,84). Onemogućavanje tih gena ima za posljedicu poremećaje razvoja kaudalnog dijela zametka. To potvrđuju i mutanti istraživani u ovom radu: u *splotch* zametaka je spina bifida prisutna u kaudalnom dijelu, a u *truncate* zametaka je poremećen razvoj notokorda prisutan samo u kaudalnom dijelu zametka.

5.1.1.1. Repni pupoljak je ishodište struktura koje se razviju sekundarnim mehanizmom razvoja zametka

Jedan je od osnovnih ciljeva ovog rada bio opisati razvoj repnog pupoljka u zametka miša, te odrediti njegovu ulogu u razvoju kaudalnih struktura zametka. Završetak primarne neurulacije u kaudalnom dijelu zametka miša (9,5 dana, 28 somita) praćen je pojavom repnog pupoljka kao skupine stanica u kaudalnom završetku koja odgovara ostatku primitivne pruge i primitivnog čvorića (23). Taj nalaz je usporediv sa onima u štakorskih (14,15) i pilećih zametaka (20,85). Morfološki dokazi postepenim praćenjem sve starijih stadija pokazuju kontinuitet nediferenciranih stanica repnog pupoljka do postupno sve diferenciranijih struktura moždinskog i repnog tračka s diferenciranim stanicama koje oblikuju neuralnu cijev, notokord i crijevo. Repni pupoljak je uvijek bio prisutan, bez obzira na poremećaje razvoja pojedinih struktura u *splotch* i *truncate* miševa. Iako je sekundarni mehanizam razvoja u nekim slučajevima poremećen, slijed diferencijacije od repnog pupoljka prema razvijenim strukturama proksimalnog dijela zametka je uvijek prisutan.

Većina je dosadašnjih morfoloških studija na glodavcima (14,15,16,18) i Xenopusu (86) pokazala da je repni pupoljak nakupina nediferenciranih stanica. Stanice uzete iz bilo kojeg dijela repnog pupoljka trebale bi se diferencirati u bilo koju od struktura kaudalnog dijela zametka. To je djelomično potvrđeno pokusima gdje se kaudalni dio jednog zametka presađivao u razne dijelove kaudalnog dijela drugog zametka istog ili različitog stadija

(20,22,87). Stanice repnog pupoljka su se diferencirale u tkiva porijekla sva tri zametna listića.

Tumačenje da je repni pupoljak ishodište struktura koje se razvijaju sekundarnim mehanizmom embrionalnog razvoja suprostavlja se istraživanjima koja su u nekih vrsta (ribe, vodozemci, ptice) pokazala postojanje kordoneuralnog spoja, kao nakupine stanica koje se kranijalno diferenciraju u dno neuralne cijevi, notokord i krov repnog crijeva (86,88,89). Pokusi s označavanjem stanica u kaudalnom dijelu zametka miša su pokazali da i u sisavaca postoji mala nakupina stanica koja odgovara CNH u nižih kralješnjaka (90). Čini se da svi kralješnjaci imaju evolucijski sačuvano morfogenetsko zbivanje: stanice iz CNH migriraju kaudalno, u sam vrh kaudalnog mezenhima, da bi se u kasnijim fazama razvoja vraćale kranijalno i oblikovale aksijalne i paraksijalne strukture. Rezultati istraživanja su pokazali da je područje repnog pupoljka suženo na sam vrh kaudalnog mezenhima (repni pupoljak u užem smislu) (90). Dokazano je da se kranijalni dio repnog pupoljka može diferencirati u bilo koji dio kaudalnog dijela zametka, a da kaudalni mezenhim više ne posjeduje to svojstvo. Stoga je predložena podjela po kojoj se kaudalni dio zametka dijeli od kranijalno prema kaudalno na tri osnovna područja (91):

Područje 1) odgovara prelasku kaudalnog završetka neuralne cijevi u ono što je u ptica i vodozemaca opisano kao CNH. CNH sadrži stanice koje potječu iz primitivnog čvorića i oblikuju notokord. Ostatak CNH potječe od primitivne pruge, pa oblikuje ploču dna neuralne cijevi, somite, ali je odgovaran i za migraciju stanica u sam vrh osnove repa, gdje se razvija u kaudalni mezenhim. Opisana sposobnost repnog pupoljka da inducira razvoj dodatne osnove repa (engl. *primitive inducer activity*) posljedica je induktivnih signala iz CNH. Pluripotentne stanice se nalaze upravo u ovom području. Ovaj rad nije mogao niti potvrditi, niti odbaciti postojanje CNH u mišjih zametaka. U 9-9,5 dana starim zamecima ventralni neuroepitel, budući notokord i dorzalni epitel repnog crijeva su priljubljeni, no, na osnovu izgleda stanica je teško potvrditi da se radi o zajedničkoj strukturi. Nedvojbeno je da je zajednička struktura nađena u obliku repnog tračka, koji je kao ishodište notokorda i repnog crijeva prisutan u starijim mišjim zamecima.

Područje 2) odgovara onome što je morfološki opisano kao moždinski tračak. On je izvor stanica za razvoj cijele neuralne cijevi, osim ploče dna, koja, po nekim istraživačima, ima zajedničku osnovu s notokordom i dijelom repnog crijeva. Porijeklo sekundarne nuralne cijevi

u tom području je dvostruko: ili uvrtanjem primarne neuralne cijevi, ili diferencijacijom iz repnog pupoljka. Ovaj rad pokazuje da je neuralna cijev u kaudalnom dijelu zametka nastala diferencijacijom i preraspodjelom stanica koje se nastavljaju na one smještene u dorzalnom dijelu repnog pupoljka.

Područje 3) odgovara repnom pupoljku. Cambrey i Wilson (90) su pokazali da je većina stanica tog područja usmjerena prema razvoju paraksijalnih struktura kaudalnog dijela zametka. Manji dio tih stanica se ipak razvije u sve tri aksijalne strukture u samom vrhu repa. Stoga je zaključeno kako dio repnog pupoljka posjeduje stanice koje pokazuju pluripotentna svojstva.

Ovaj je rad pokazao postojanje repnog pupoljka, kao nakupine nediferenciranih stanica u kaudalnom vrhu mišjeg zametka starih 10-12,5 dana. Sve strukture u kaudalnom dijelu mišjeg zametka se razvijaju u kontinuitetu sa repnim pupoljkom. Jasni dokazi za postojanje CNH u miša nisu nađeni. Ipak, ostaje otvoreno pitanje postojanja CNH u miša kao prolazne tvorbe prisutne oko 9. dana razvoja zametka.

5.1.1.2. Neuralna cijev u kaudalnom dijelu zametka miša nastaje sekundarnom neurulacijom

Za razliku od primarne neurulacije, koja je definirana kao morfogenetsko zbivanje gdje se neuroektoderm zatvara u neuralnu cijev, pitanje podrijetla neuralne cijevi u kaudalnom dijelu zametka još je uvijek predmet rasprave. Jedan od osnovnih zadataka ovog rada bio je opisati nastanak neuralne cijevi u kaudalnom dijelu zametka miša. Analiza serijskih rezova između 9 i 12,5 dana starih zametaka pokazuje da se nakon oblikovanja kaudalnog završetka primarne neuralne cijevi, kaudalno od nje nalazi nakupina stanica preostalih od primitivnog čvorića i pruge. Nakon što se primarna neuralna cijev zatvori i oblikuje kaudalni neuroporus, daljnji rast zametka u duljinu praćen je produljivanjem neuralne cijevi. Kaudalno od kaudalnog neuroporusa nalazi se sve uža šupljina neuralne cijevi koja je obložena manje diferenciranim stanicama. Konačno, neuralna cijev završava nakupinom stanica koje nemaju lumen, te nediferenciranim mezenhimom – repnim pupoljkom. Iz ovog nalaza proizlazi osnovno

pitanje: da li je kaudalni dio neuralne cijevi nastao produljivanjem i izrastanjem iz primarne neuralne cijevi ili je nastao diferencijacijom iz kaudalnog završetka zametka – repnog pupoljka. Drugim riječima, da li je kaudalni dio neuralne cijevi (sekundarna neuralna cijev) nastao morfološkim preslagivanjem primarne neuralne cijevi u sve nepravilniju strukturu prema vrhu zametka ili je kaudalni dio neuralne cijevi nastao de novo, diferencijacijom pluripotentnog mezenhima. Da bi se odgovorilo na ovo pitanje potrebno je odrediti granicu između primarne i sekundarne neurulacije. Kod miša, ali i čovjeka postoji problem što u tom području, u tom razdoblju, nema somita. Ipak, ukoliko se zamisli da se nakon 25. para somita, somiti nastavljaju u jednakim razmacima, kaudalni neuroporus bi došao na razinu zamišljenog 31. somita, što bi odgovaralo kranijalnoj polovici sakralnog područja. Dakle, granica između primarne i sekundarne neurulacije je u sakralnom području (somit 31, odgovara kralješku S2) (92,93). Identičan odgovor bi se dobio ukoliko bi se granica između primarne i sekundarne neurulacije smjestila u područje prolaznih višestrukih šupljina neuralne cijevi, kao što je to slučaj u ptica. Postojanje višestrukih šupljina neuralne cijevi u ptica ide u prilog pretpostavci o postojanju izvora živčanog tkiva u vrhu zametka. Sukladno svim spoznajama, nemoguće je naći razlog da primarna neuralna cijev svojim produljivanjem oblikuje nekoliko šupljina u kaudalnom dijelu.

Oblikovanje sekundarne neuralne cijevi obilježeno je manjim razlikama među različitim vrstama: kod riba cijelom dužinom tijela, kao i u kaudalnom dijelu urasta neuroektoderm u mezenhim, te se postupno u toj nakupini stanica stvara šupljina. Stoga kod riba ne postoji primarna i sekundarna neurulacija. U ptica i čovjeka se istovremeno oblikuje primarna i sekundarna neuralna cijev, pa je prolazno prisutna zona preklapanja ovih morfogenetskih procesa, s višestrukim šupljinama neuralne cijevi. Ovaj rad je potvrdio da se kod glodavaca (miš, štakor) sekundarna neuralna cijev neposredno nastavlja na primarnu bez zone preklapanja.

Analize izražaja različitih gena za koje se pretpostavljalo da bi mogli biti specifični za razvoj sekundarne neuralne cijevi nisu dokazale gen čiji bi izražaj označavao oštru granicu primarnog i sekundarnog mehanizma embrionalnog razvoja. Ovaj rad je pokazao da mutacija gena *Pax3* ima za posljedicu otvorenu neuralnu cijev u kaudalnom dijelu zametka, no *Pax3* se izražava i u kranijalnom dijelu. Slično je i s genom *Noto*. Takav se nalaz može objasniti na dva načina: ukoliko razvoj zametka shvatimo kao kontinuirano zbivanje, bez dramatične promjene u kranijalno-kaudalnom smjeru bilo na genskoj, bilo na morfološkoj razini, za

očekivati je da se većina gena koji su izraženi tijekom primarnog mehanizma oblikovanja zametka nastavljaju izražavati u tom području. Drugo objašnjenje bilo bi da se neki geni izražavaju tijekom gastrulacije (npr. *Foxa2*), a zatim u kaudalnom dijelu zametka, što bi odgovaralo modelu «alternativne gastrulacije», odnosno sekundarnom mehanizmu embrionalnog razvoja koji ima i brojna zajednička svojstva s primarnim mehanizmom embrionalnog razvoja.

Budući da je teško odrediti granicu primarne i sekundarne neurulacije i podrijetlo pojedinačnih stanica u zoni preklapanja, istraživan je potencijal, morfološki izgled i izražaj gena u području repnog pupoljka. Ukoliko je repni pupoljak «genski resetiran», sekundarni mehanizam razvoja bi bio lako objašnjiv. Ipak, čini se vjerojatnijim da je sekundarna neurulacija «sekundarna» prvenstveno po svojem položaju i posebnim morfogenetskim zbivanjima, a da je potencijal stanica koje je oblikuju zadan gastrulacijom.

Budući da je područje koje se razvija sekundarnim mehanizmom embrionalnog razvoja obilježeno nastankom specifičnih i razmjerno čestih poremećaja, posebnu pozornost izaziva istraživanje nastanka kaudalne neuralne cijevi u čovjeka. U ljudskih zametaka su tijekom sekundarne neurulacije nađene višestruke šupljine neuralne cijevi, kao u ptica (94). Kaudalno se područje može podijeliti u tri odsječka: kranijalna trećina je označena kontaktom neuralne cijevi i notokorda, što podsjeća na CNH. U srednjem području dolazi do promjene izgleda neuralne cijevi u moždinski tračak, dok se ventralno nalazi nakupina mezenhima. U vrhu zametka se nalazi početak moždinskog tračka, te repni pupoljak. Da li neuralna cijev u kaudalnom dijelu zametka nastaje produljivanjem neuralne cijevi iz kranijalnog dijela ili se dio struktura u čovjeka razvije diferencijacijom iz repnog pupoljka vrlo je teško odgovoriti. Usporedbom s dosadašnjim istraživanjima na mišu i piletu, nađene strukture u čovjeka se zbog malog broja uzoraka nisu mogle istraživati u tako preciznim vremenskim razmacima. Nakupina mezenhima u srednjoj trećini kaudalnog vrha ljudskog zametka izgleda poput repnog tračka. Postoji mogućnost da dio notokorda nastane diferencijacijom iz nakupine mezenhima ventralno od moždinskog tračka. Također nema dokaza da moždinski tračak u čovjeka nastaje preslagivanjem primarne neuralne cijevi, kao niti da se notokord odvaja od zajedničke osnove sa neuralnom cijevi. Ukoliko bi se zanemareni repni pupoljak uzeo kao mogući izvor kranijalnih struktura, razvoj kaudalnog dijela u čovjeka bi se mogao tumačiti jednako onome u miša, s iznimkom višestrukih šupljina neuralne cijevi, koji su se do sada smatrali osobitošću ptica.

Pokusi na modelima prepelica-pile (91,95,96) pokazali su da primitivni čvorić i pruga, odnosno CNH kao njihov ostatak u kaudalnom dijelu, oblikuju ploču dna, notokord i dorzalni epitel repnog crijeva. Time je pitanje diferencijacije repnih struktura u kranijalnom smjeru nadopunjeno još jednim: ukoliko ploča dna i notokord dijele isto porijeklo, postoje li uopće induktivni signali notokorda prema ventralnom neuroepitelu (95-98)? Pokusi koji su branili model indukcije notokord-ploča dna temeljili su se na tri grupe dokaza: 1) ektopični notokord inducira ektopičnu ploču dna, 2) odstranjenje notokorda, kao i onemogućenje *Shh* ima za posljedicu nerazvijanja ploče dna i 3) nekoliko važnih signalnih molekula (npr. *Shh*) se prvo izražava u notokordu, a onda u neuroepitelu, gdje gradijent tih molekula određuje dorzo-ventralnu diferencijaciju neuralne cijevi. Ipak, u novije vrijeme postoje dokazi koji govore protiv navedenog: 1) ektopična ploča dna također inducira ektopičnu ploču dna, što možda govori o ostatku aktivnosti „organizatora“, a ne o fiziološkoj važnosti notokorda kao induktora, 2) ukoliko su ploča dna i notokord u razvoju tako čvrsto priljubljeni, što posebno vrijedi za CNH u sekundarnom mehanizmu razvoja, nemoguće je odstraniti nokord, a da se ne odstrani i osnova za ploču dna i 3) razlika u vremenu izražaja u notokordu i ploči dna može biti posljedica njihovog smještaja u novom okolišu. Dodatne činjenice o utjecaju notokorda na ventralni neuroepitel donose podaci dobiveni iz pokusa u kojima se osim analize izgleda ploče dna promatrao proces neurulacije. Činjenica da se odstranjen neuroektoderm u kulturi može samostalno zatvoriti u neuralnu cijev govori u korist intrinzičnih svojstava tih stanica da oblikuju cijev, čak i u nedostatku induktora. Ipak, nedostatak notokorda in vivo ima za posljedicu nedostatak središnje točke savijanja (MHP) Isto tako, zanimljivo je da *Shh* nije potreban da bi se oblikovala središnja točka savijanja, što govori u prilog nepoznatog čimbenika koji uzrokuje njen nastanak. Postojanje mutanata koji imaju izoliran poremećaj ploče dna ili notokorda govore u korist neovisne diferencijacije ove dvije populacije stanica, iako se morfološka obilježja razvoja tih struktura u promijenjenom mikrookruženju razlikuju od onih u normalnih životinja.

5.1.2. Zbivanja tijekom razvoja kaudalnog dijela zametka miša odgovaraju onima tijekom razvoja kaudalnog dijela zametka štakora

Dosadašnja detaljna istraživanja morfologije kaudalnog dijela zametka i diferencijacije repnog pupoljka načinjena su na štakoru. Postojanje brojnih mišjih mutanata s poremećajem razvoja repa zahtijevalo je provjeru da li morfološki odnosi utvrđeni kod štakora odgovaraju onima kod miša. Ovaj cilj ostvaren je usporedbom dobivenih rezultata tijekom izrade ove disertacije te rezultata iz literature koji su opisali razvoj štakorskog zametka. Uspoređeni su različiti stadiji miševa visoko srođenog soja C57Bl/6 i štakora visoko srođenog soja Fisher, te je pokazano da su u miša prisutna sva morfogenetska zbivanja kao u štakora (tablica 3).

Tablica 3: Usporedni prikaz istraživanih zbivanja u razvoju zametka miša i odgovarajućih zbivanja u razvoju zametka štakora.

Zbivanje u razvoju kaudalnog dijela zametka	Stadij zametka miša	Stadij zametka štakora
Na kaudalnom kraju zametka se nalaze primitivna pruga koja se nastavlja u neuralni žlijeb, te zajednička osnova repnog crijeva, notokorda i ventralnog neuroepitela.	9 dana (16-22 somita)	10,5 (19-21 somita)
U vrhu osnove repa se po prvi put nalazi repni pupoljak iz kojeg se diferenciraju sve aksijalne strukture tog dijela zametka.	10,5 (30-36 somita)	12 (35-38)
Osnova repa se produljuje i u njoj se pojavljuju somiti.	11,5 (40-45 somita)	13 (42-45)
Odumiranje stanica prisutno je u proksimalnom dijelu osnove repa, te se repno crijevo više ne nastavlja na crijevo u tijelu zametka.	12,5 (više od 45 somita)	14 (više od 45)

5.2. Razvoj mišjeg zametka *splotch*

Jedan od osnovnih zadataka ovog rada bio je opisati razvoj zametka u *splotch* miševa. Uspostavljena tehnika genotipizacije omogućila je da se mutirani zameci prepoznaju i prije vidljivih morfoloških osobitosti, te da se tako prouči početak nastanka poremećaja neurulacije u *splotch* zametaka. Posebna je pozornost posvećena razvoju struktura koje nisu primarno zahvaćene mutacijom gena *Pax3*. To je doprinijelo razumijevanju međuodnosa u razvoju različitih struktura u kaudalnom dijelu repa.

Osnovni poremećaj nađen kod *splotch* zametaka jest spina bifida. Usporedbom s odgovarajućim stadijem kontrolnih zametaka, otvorena neuralna cijev je vidljiva već kod 10,5 dana starih *splotch* zametaka u kaudalnoj trećini repa. Pažljivim promatranjem se vidi da je otvorena neuralna cijev praćena zadebljanjem neuroepitela, te da je vrh osnove repa u kojem postoji spina bifida zakrivljen u dorzalnom smjeru. Prvo pitanje bilo je kako izgleda sekundarni mehanizam razvoja u *splotch* zametaka.

5.2.1. Otvorena neuralna cijev (spina bifida) u *splotch* zametaka nastaje u području spoja primarne i sekundarne neuralne cijevi

Izolacijom različitih stadija *splotch* zametaka može se pratiti prijelaz stadija s prisutnom primitivnom prugom (9,5 dana starosti) u onaj gdje nastaje repni pupoljak (10 dana starosti), odnosno gdje se počinje oblikovati rep zametka (10,5 dana starosti). Vrh zametka se razvija jednako kao u kontrolnog miša, a sekundarna neurulacija se odvija otvaranjem rozete moždinskog tračka. Otvorena neuralna cijev se nalazi u odsječku repa smještenog između odsječka gdje se oblikuju notokord i repno crijevo i odsječka u kojem se diferencira moždinski tračak. Nalaz spine bifide u proksimalnom području sekundarnog oblikovanja aksijalnih struktura repa donosi pretpostavku da se početak nastanka poremećaja neurulacije u *splotch* zametaka nalazi u području spoja između primarne i sekundarne neuralne cijevi. Ovaj nalaz nije u suprotnosti s predloženim modelom istraživanja neurulacije u pileta (12,79) i miševa (90) po kojemu se neuralna cijev nastala kaudalno od nestale primitivne pruge smatra heterogenom po svom podrijetlu: kranijalni dio nastaje produljivanjem iz primarne neuralne

cijevi, dok se dio vrha osnove repa diferencira u kratki odsječak svih aksijalnih struktura, pa tako doprinosi nastanku kaudalnog dijela neuralne cijevi. Neodgovoreno pitanje u ovakvom shvaćanju nastanka sekundarne neuralne cijevi jest točna granica između neuralne cijevi nastale produljivanjem i one nastale iz moždinskog tračka. Sukladno ovome, nastanak spine bifide u *splotch* zametka se može objasniti s dvije teorije:

1) poremećaj produljivanja primarne neuralne cijevi ima za posljedicu spinu bifidu, dok je kaudalni kraj neuralne cijevi nastao diferencijacijom repnog pupoljka normalan. Kako rep raste tako se i jedno i drugo područje povećavaju. Zaista, u 11,5 i 12,5 dana starih zametaka postoji značajan dio neuralne cijevi u kaudalnom dijelu repa koji je normalan.

2) Spina bifida nastaje u području neuralne cijevi koja potječe od stanica u vrhu osnove repa. Iako postoji diferencijacija neuroepitela u smjeru prema tijelu zametka, zbog nekog nedostatka stjenke neuroepitela nikada ne oblikuju šupljinu neuralne cijevi. Zaista, izgled spine bifide od vrha prema bazi repa podsjeća na diferencijaciju neuralne cijevi tijekom primarne neurulacije, t.j. spina bifida u vrhu repa *splotch* zametka izgleda poput neuralne cijevi u zatvaranju u tijeku rane normalne neurulacije u tijelu zametka, dok spina bifida u bazi repa izgleda poput kasne faze normalne neurulacije, u kaudalnom dijelu zametka.

Uzevši u obzir činjenicu da je početak spine bifide u *splotch* zametaka smješten neposredno uz repni pupoljak, pretpostavlja se da je uzrok spine bifide u *splotch* zametaka nekoordiniranost u spajanju neuralne cijevi nastale produljivanjem primarne neuralne cijevi i one nastale diferencijacijom totipotentnih stanica u vrhu osnove repa.

5.2.2. Mogući uzroci nastanka spine bifide

Iako u literaturi postoje različita objašnjenja uzroka nastanka spine bifide, u *splotch* zametaka su tri mogućnosti koje bi svaka posebno ili u kombinaciji s nekom drugom mogle biti uzrokom nezatvaranja neuralne cijevi.

5.2.2.1. Dorzalna zavijenost osnove repa u *splotch* zametaka

Nalaz koji redovito prati *splotch* homozigotne zametke jest osnova repa zavijena u dorzalnom smjeru. Budući da je poremećaj savijanja prvi opisan u mutanta miša *curly tail*, ovaj poremećaj je i objašnjen na *curly tail* modelu (99). U *curly tail* modela se nalazi dio osnove repa savijene u ventralnom smjeru, što otežava zatvaranje neuralne cijevi, dok se dio osnove repa savija u dorzalnom smjeru. Razjašnjene mehanizma nastanka zavijenog repića je doprinijelo razumijevanju nastanka spine bifide. Naime, pokazano je da je u podlozi cijelog razvojnog poremećaja nepravilno umnažanje stanica repnog pupoljka. To ima za posljedicu nejednako brzo razvijanje dorzalnog i ventralnog dijela repića, te savijanje osnove repa. Savijanje osnove repa otežava zatvaranje kaudalnog neuroporusa, te omogućuje nastanak spine bifide. Nalaz dorzalno savijene osnove repa u *splotch* zametaka ukazuje na mogućnost da i u ovog mutanta razlog nezatvaranja neuralnog žlijeba nije u defektu neuroepitela, nego u nekordiniranom rastu različitih slojeva unutar osnove repa. Veza brzine rasta neuroepitela i priležećih tkiva, te zavijenosti zametka možda može objasniti još jednu činjenicu: zašto se u *splotch* zametak uz lumbosakralnu spinu bifidu ponekad nalazi egzencefalija? Iako se ovaj rad ne bavi razvojem kranijalne neuralne cijevi, do sada u literaturi nema objašnjenja kako nastaju izolirani poremećaji neurulacije u kranijalnom i kaudalnom dijelu. Osim pretpostavke kako objašnjenje ove pojave treba tražiti u postojanju kranijalnog i kaudalnog neuroporusa, koji se sporije zatvaraju, moguće je pretpostaviti da na nezatvaranje neuralne cijevi utječe kut koji čine glava i trup zametka, odnosno ventralni zavoj repića i ostatak repića. Može se spekulirati kako je kranijalni dio zametka postavljen u nepovoljnom kutu prema ostatku tijela, pa to doprinosi nezatvaranju neuralne cijevi u području glave zametka.

5.2.2.2. Poremećaj savijanja neuroepitela

Spina bifida u *splotch* zametaka ima drugačiji izgled u različitim dijelovima repa. U svojoj su kaudalnoj trećini stjenke neuralne cijevi otvorene u obliku slova „V“. Usporedbom s normalnom neurulacijom u miša (23,25,100), neurulacija gdje se stjenke savijaju u središnjoj točki savijanja viđa se samo u 9,5 dana starih zametaka. U srednjoj trećini repa spina bifida izgleda poput vitičaste zagrade, što ukazuje na prisutnost središnje i dorzolateralne točke savijanja, što je osobitost 10 dana starih zametaka. U kranijalnoj trećini osnove repa spina bifida je građena od debelog neuroepitela koji deformira izgled stijenki, pa nije moguće tvrditi sa sigurnošću da su u tom području prisutne samo dorzolateralne točke savijanja. Budući da je srednji dio osnove repa razvijeniji (stariji) od kaudalnog, ta dva oblika neurulacije (različite kombinacije MHP i DLHP) podsjećaju na normalnu neurulaciju uz dvije bitne razlike: 1) nalaz je prisutan u osnovi repa, gdje se stupanj diferencijacije tkiva odvija u suprotnom smjeru od zatvaranja neuralnog žlijeba u tijelu zametka i 2) prisutnost MHP i DLHP u 11,5 dana starih zametaka govori u prilog usporenom razvoju neuroektoderma, sa kašnjenjem od 2 dana u odnosu na normalni razvoj. Ovaj je nalaz moguće komentirati u okviru pitanja da li uopće postoji sekundarna neurulacija ili je neuralna cijev nastala kaudalno od primitivne pruge samo produžetak primarne neuralne cijevi. Ukoliko se promatra otvorena neuralna cijev u *splotch* zametaka od vrha repa prema tijelu, izmjenjivanje oblika spine bifide podsjeća na oblike neuralnog žlijeba u zatvaranju od razine 4. somita prema kaudalno, što se u normalnom razvoju događa u razdoblju od 8,5 do 10,5 dana razvoja. Drugim riječima, u osnovi repa *splotch* zametaka se vidi promjena u zatvaranju neuralne cijevi od vrha prema tijelu zametka. Upravo na to upućuje teorija sekundarnog mehanizma razvoja: diferencijacija od repnog pupoljka prema kranijalno. Činjenica da se spina bifida u *splotch* zametaka nikada ne zatvori kao i da ti zameci ugibaju, ne umanjuje neobičnost ovog opažanja. Štoviše, moglo bi se zaključiti da se u repu *splotch* zametka odvija sekundarna neurulacija da bi nadoknadila ono što nije uspjela primarna. Zbog nepoznatog uzroka koji zahvaća i jedan i drugi mehanizam, ni jedna ni druga neurulacija ne uspijevaju oblikovati normalnu neuralnu cijev.

5.2.2.3. Opsežno odumiranje stanica

Programirano odumiranje stanica prisutno je u razvoju svih struktura. Rezultati dobiveni pokusima u kojima se istraživala neurulacija pokazuju da spina bifida može nastati i zbog viška ili manjka odumiranja stanica. Pokusi u kojima se blokirala apoptoza su pokazali da je programirana smrt stanica nužna za zatvaranje neuralne cijevi, jer su normalni zameci kojima je blokirana apoptoza razvili spinu bifidu (101). Istovremeno, blokiranje apoptoze onemogućavanjem funkcije *Trp53* u *splotch* zametaka je imalo iznenađujuću posljedicu: *splotch* homozigotni zameci nisu razvili spinu bifidu (55). To je dovelo do pretpostavke da je uzrok spine bifide u *splotch* zametaka nedostatak signala *Pax3* koji ima ulogu inhibitora apoptoze posredstvom gena *Trp53*. Iako u ovom radu apoptoza nije posebno istraživana, u područjima gdje je neuroepitel zadebljan prisutan je veliki broj stanica s piknotičnim i fragmentiranim jezgrama, što su morfološka obilježja odumiranja stanica. Proučavanje spine bifide u *splotch* zametka pokazuje jasno regionalni ograničen poremećaj neurulacije. Ako je neurulacija normalna, a apoptoza ta koja uzrokuje spinu bifidu, teško se može objasniti zašto su zahvaćena samo opisana područja.

5.2.3. Poremećaji repnog pupoljka i aksijalnih struktura repa u *splotch* zametaka

Osnovna hipoteza ovog rada je bila da se poremećaj razvoja kaudalnih struktura u *splotch* i *truncate* mutanata može povezati s nekim oblikom poremećaja diferencijacije repnog pupoljka.

Analiza *splotch* zametaka starih 11,5 dana, a to je dob kada je u kontrolnim zamecima sekundarni mehanizam razvoja jasno uočljiv, pokazala je da se u vrhu osnove repa *splotch* zametaka nalazi zgusnuće mezenhima koje odgovara repnom pupoljku. Repni pupoljak se ni po svojem položaju, ni po izgledu stanica ne razlikuje od onog u kontrolnih miševa. Kranijalno se u dorzalnom području razvija rozeta moždinskog tračka i sekundarna neuralna cijev, dok se ventralno nalazi spojeni kaudalni završetak notokorda i repnog crijeva, koji oblikuju repni tračak. Drugim riječima, nastanak kaudalnih struktura u osnovi repa 11,5 dana starih *splotch* zametaka se ne razlikuje od nastanka odgovarajućih struktura u kontrolnih miševa. Tako se dokazalo da je prisutan mehanizam sekundarnog razvoja zametka u *splotch* mutanata. Budući da je spina bifida nađena u području spoja primarne i sekundarne

neurulacije, moguće je pretpostaviti da je mehanizam sekundarnog razvoja zametka bio poremećen na samom svom početku. Isto tako, moguće je pretpostaviti da je poremećen razvoj kaudalnog dijela neuralne cijevi koji nastaje produljivanjem primarne neuralne cijevi.

5.2.3.1. Odsječci sa spinom bifidom nemaju poremećen razvoj notokorda, repnog crijeva i somita

Jedan od ciljeva ovoga rada bio je opisati razvoj notokorda, repnog crijeva i somita uz prisutan poremećeni razvoj neuralne cijevi. Cilj je postignut usporedbom odsječaka repa u kojima je neuralna cijev normalnog izgleda s onima gdje je prisutna spina bifida, te s odgovarajućim odsječcima u kontrolnim zamecima. Svi dobiveni rezultati su pokazali da su notokord, repno crijevo i somiti uz prisutnost spine bifide normalnog izgleda, te su nađeni u očekivanom dijelu osnove repa. Ovo navodi na zaključak da spina bifida nema neposredni negativni utjecaj na izgled ili položaj opisanih struktura.

5.2.3.2. *Splotch* zametak star 12,5 dana ima poremećenu građu repnog pupoljka i osnove repa

Za razliku od dan mlađih *splotch* zametaka ili kontrolnih zametaka iste starosti, *splotch* zameci stari 12,5 dana pokazuju poremećenu građu cijelom duljinom osnove repa. Iako u samom vrhu zametka postoji nakupina stanica koja odgovara repnom pupoljku, razvoj kaudalnog dijela zametka je poremećen. Sekundarna neuralna cijev ne nastaje diferencijacijom iz jasno oblikovanog moždinskog tračka. U *splotch* zametaka dorzalna skupina stanica ne oblikuje pravilnu okruglu strukturu. Otvaranje šupljine unutar sekundarne neuralne cijevi je skokovito. U kratkom odsječku se šupljina otvori, da bi se opet zatvorila. Stanice koje je grade mjestimično se odvajaju, migriraju i nestaju, uz odumiranje stanica. Sličan poremećaj se vidi i kod repnog tračka, gdje postoji nepravilnost u oblikovanju notokorda i repnog crijeva. Iako se na prijelazu kaudalne u srednju trećinu osnove repa uspostavlja normalna morfologija, nekoliko rezova prema kranijalno se nalazi otvorena neuralna cijev.

Opisani rezultati otvaraju pitanje uzroka poremećaja razvoja kaudalnog dijela *splotch* zametka starog 12,5 dana. Da bi se odgovorilo na to pitanje potrebno je točno odrediti poremećaj. Za razliku od *truncate* zametka, u ovom stadiju *splotch* zametka nije moguće govoriti o specifičnom poremećaju sekundarnog mehanizma razvoja. U *splotch* zametka starog 12,5 dana ne postoji izolirani poremećaj neke strukture, njeno nepravilno odvajanje ili oblik, već je kompletno tkivo u kaudalnom dijelu zametka poremećenog izgleda. Najbolji dokaz za ovu tvrdnju je izgled nediferenciranog okolnog vezivnog tkiva, koje, iako ne sudjeluje u nastanku specifičnih struktura također pokazuje pojačano odumiranje stanica i povećane međustanične razmake (102). Također, usprkos očiglednom poremećaju razvoja kaudalnog dijela zametka, u *splotch* zametku starom 12,5 dana ne nastaje niti jedna prekobrojna struktura, niti neka struktura nedostaje. Konačan dokaz za to je postojanje kratkog odsječka repa s normalnom morfologijom.

Opisani rezultati su u prilog tvrdnji da u *splotch* zametaka starih 12,5 dana ne postoji specifičan poremećaj sekundarnog mehanizma razvoja, koji bi promijenio razvoj neke specifične strukture, kao što je to slučaj u *truncate* zametku, kod kojeg se svi poremećaji mogu objasniti poremećajem nastanka kaudalnog notokorda. Čini se da je kaudalni dio *splotch* zametka starog 12,5 dana poremećen tako što je na razvoj svih struktura djelovao određeni negativan utjecaj. Ako se uzme u obzir da je za poremećaje nađene u *splotch* zametaka starih 12,5 dana potreban određeni vremenski period, čimbenik koji je utjecao na njihov nastanak mogao bi biti prisutan u dan mlađih *splotch* zametaka. Budući da je poremećena kaudalna trećina repa zametka u *splotch* zametaka starih 12,5 dana, a u 11,5 dana starih zametaka je potpuno normalna, jedini poremećaj dokazan ovim istraživanjem 11,5 dana starih zametaka jest spina bifida. Mogući drugi uzroci propadanja kaudalnog dijela *splotch* zametaka su za sada upitni. Jedan od njih se nalazi u činjenici da *splotch* homozigoti odumiru dva dana nakon ovdje opisanog poremećaja, a razlog odumiranja je još uvijek predmet rasprave. Čini se da je poremećaj cirkulacije zbog poremećenog razvoja srca, zbog manjka stanica neuralnog grebena, razlog odumiranja ovih zametaka. U svjetlu tih saznanja, odumiranje kaudalnog dijela repa *splotch* zametka bi se moglo objasniti smještajem na periferiji poremećenog krvožilnog sustava.

5.3. Razvoj mišjeg zametka *truncate*

5.3.1. *Truncate* zameci imaju poremećen razvoj notokorda

Osnovni poremećaj nađen u *truncate* zametaka jest nepravilan razvoj kaudalnog dijela notokorda. Ovisno o dijelu i stadiju razvoja, nađene su slijedeće promjene:

a) mjestimičan nedostatak notokorda

Notokord je u *truncate* zametaka isprekidan. Prosječan broj odsječaka je dva, a neki su zameci u kaudalnom dijelu imali i do pet odsječaka notokorda (tablica 2). Uočeno je da je kaudalni završetak odsječaka notokorda redovito u kontaktu s neuroektodermom, za razliku od kranijalnog završetka notokorda, koji je odvojen od drugih struktura. Sličan je fenotip dobiven odstranjenjem primitivnog čvorića i priležećeg endoderma, te njihovom zamjenom primitivnim čvorićem i endodermom srodne vrste (pokusi pile-prepelica) (91). Notokord u torakalnom dijelu tijela završava proširenjem. Kaudalno postoji područje s nedostatkom notokorda, a notokord nastao iz transplantiranog čvorića se ponovno nalazi u vrhu zametka. Ovi pokusi potvrđuju model kojem je kralješnjacima tijekom embrionalnog razvoja zajednička migracija stanica iz područja primitivnog čvorića u kaudalni završetak zametka (103). Produljenje notokorda u kralješnjaka nastaje umnažanjem stanica postojećeg primarnog notokorda, kao i dodavanjem stanica koje iz ostataka primitivnog čvorića nadopunjuju kaudalni kraj notokorda. Istovremeno, dio stanica primitivnog čvorića naseljava kaudalni vrh zametka, te ima sposobnost stvaranja novih stanica notokorda u kaudalnom odsječku zametka. Zanimljivo je da je kaudalnom završetku notokorda za dodavanje stanica primitivnog čvorića potrebna prisutnost neprekinutog endoderma (91). Objašnjenje dobivenog fenotipa je slijedeće: prekid endoderma je spriječio produljivanje notokorda dodavanjem stanica na njegov kaudalni završetak, dok su transplantirane stanice primitivnog čvorića uspješno migrirale u kaudalni vrh zametka i izgradile notokord u tom području.

b) nepravilan položaj notokorda

Notokord je u svom kaudalnom početku redovito priljubljen uz ventralni epitel neuralne cijevi. Kontakt notokorda i neuroepitela je u nekim zamecima nađen i u proksimalnim dijelovima repa. Za razliku od normalnog zametka, u *truncate* miša usporedo s promjenom izgleda notokorda, dolazi do promjene njegova položaja u dorzo-ventralnom smjeru, tako da je u nekim odsječcima repa notokord bliži neuralnoj cijevi, a u nekim repnom crijevu. Kontakt notokorda i neuralne cijevi je vidljiv i u pokusima u kojima su u normalni zametak injicirane stanice kojima nedostaje gen *T*. To se objašnjava činjenicom da je gen *T* zadužen za migraciju stanica iz područja primitivnog čvorića u kaudalni dio zametka, te njihovu diferencijaciju u notokord. Stanice koje trebaju izgraditi notokord u *truncate* zametku prisutne su u području repnog pupoljka, što ukazuje na ispravnu migraciju stanica primitivnog čvorića, ali im je diferencijacija poremećena.

c) nepravilan izgled notokorda

Za razliku od notokorda u kontrolnih zametaka, u *truncate* zametaka notokord usporedo s promjenom položaja, mijenja i svoj izgled. U kaudalnom dijelu je redovito građen od svega nekoliko stanica. Povećanje promjera u kranijalnom smjeru je praćeno nepravilnim zadebljavanjem, tako da je nerijetko nađen notokord koji nije pravilno okrugao, već je ovalan. To se posebno odnosi na dijelove zametka u kojima je notokord u kontaktu s neuroektodermom.

5.3.2. Mogući uzroci nastanka poremećaja razvoja notokorda

5.3.2.1. Poremećaj diferencijacije repnog pupoljka

Istraživanja presađivanja dijelova repnog pupoljka pokazala su da repni pupoljak sadrži određenu populaciju pluripotentnih stanica (90,104-106). Diferencijacija repnog pupoljka u kulturi ima za posljedicu razvoj tkiva podrijetla sva tri zametna listića. Ipak, postavlja se pitanje da li je izolirani mezenhim repnog pupoljka dovoljan kao izvor svih struktura kaudalnog dijela zametka ili je za njihovu diferencijaciju potrebna i prisutnost susjednog ektoderma. Pokusi na piletu su pokazali da je za normalnu diferencijaciju svih struktura dovoljna prisutnost ventralnog mezenhima, koja, čini se, nadoknađuje odsutnost ventralnog epitela (ventralnog ektodermalnog grebena), dok, dorzalni mezenhim, kao i sam epitel, nemaju tu sposobnost (105). Kod miša nije moguće dobiti razvijene strukture kaudalnog dijela zametka bez ventralnog ektodermalnog grebena (104), što direktno podsjeća na diferencijaciju udova, gdje je također nužna prisutnost apikalnog ektodermalnog grebena kao induktora susjednog mezenhima (107). Zanimljivo je spomenuti da mutant *brachyury* kojem nedostaje gen *T* nema niti VER, te mu je rep skraćen (108).

Ukoliko repni pupoljak može dati derivate sva tri zametna listića, onda je nastanak repnog crijeva umjesto notokorda realna mogućnost. Ovime bi se u *truncate* mutanta moglo objasniti postojanje kaudalnog odsječka notokorda koji se odvaja od neuroepitela. Drugim riječima, u nedostatku gena *Noto* pluripotentni repni pupoljak nema uputu za oblikovanje kaudalnog dijela notokorda pa te stanice prolazno oblikuju dodatnu šupljinu repnog crijeva. Potrebno je naglasiti da u miša nema cijeli repni pupoljak jednak potencijal za razvoj svih struktura repa (90). Štoviše, pokusi s presađivanjem dijelova kaudalnog završetka zametka pokazali su da je sam mezenhim repnog pupoljka uglavnom usmjeren u razvoj somita. Stanice koje su pokazale pluripotentna svojstva nalaze se više prema kranijalno, u području koje graniči s kaudalnim završetkom primarne neuralne cijevi.

5.3.2.2. Poremećaj kaudalnog produljivanja notokorda

Ukoliko bi se strogo držali Pasteelsove teorije i tvrdili kako su kaudalne strukture zametka nastale kao produžetak kranijalnih dijelova, onda bi nedostatak notokorda u *truncate* miša bio posljedica nepostojanja migracije stanica koje su trebale doći u kaudalni dio i oblikovati notokord. Postojanje dodatnog repnog crijeva bi se moglo objasniti umnažanjem postojeće populacije stanica koje oblikuju repno crijevo. Iako bi se ovom teorijom teško moglo objasniti postojanje isprekidanih odsječaka notokorda, potencijalni odgovor je ponuđen u pokusima s odstranjenjem endoderma. Nedostatak endoderma rezultira prekidom kontinuiteta notokorda (91). Ipak, ova teorija teško može objasniti prisutnost više odsječaka notokorda, kao i poremećen izgled ventralnog neuroepitela i dvostruki lumen repnog crijeva. Čini se da u *truncate* zametka zaista postoji poremećaj u razvoju svih zametnih listića. Dodatni dokaz tvrdnji da u kaudalnom dijelu zametka postoje diferencijacije i da barem neke stanice u svoj razvoj kreću „od početka“ jesu pokusi u kulturi (87,90,106). Ne samo da neke stanice u kaudalnom dijelu zametka pokazuju pluripotentna svojstva, nego se i transplantacijama CNH izaziva stvaranje dodatnog repa, što ukazuje na očuvanu sposobnost (prisutnost) organizatora u tom području. Uzevši sve u obzir, nije prihvatljiva tvrdnja da kaudalni notokord nastaje isključivo produljivanjem strukture nastale kranijalno. Stoga se mora i odbaciti teorija koja ne uključuje poremećaj diferencijacija stanica, odnosno poremećaj sekundarnog mehanizma razvoja u objašnjenju fenotipa *truncate* zametaka.

5.3.2.3. Poremećaj diferencijacije CNH

U pokusima rađenim na vodozemcima (86) i pticama (88) pokazano je da se stanice ventralnog neuroepitela, notokorda i repnog crijeva spajaju u području CNH. Također je pretpostavljeno da bi se u jednoj fazi razvoja moglo govoriti i o CNH u miša (90). Kao što je već opisano u odsječku o repnom pupoljku, iako je na morfološkoj razini pokazano kako u miša kaudalni dio notokorda nastaje u zajedničkoj osnovi s repnim crijevom, odvojeno od osnove neuralne cijevi, u kratkom trenutku razvoja kaudalnog dijela mišjeg zametka mogu se prepoznati stanice koje su nastale od primitivnog čvorića i primitivne pruge, te izražavaju *Foxa2*, a kasnije se u razvoju nalaze u ploči dna, notokordu i u dorzalnom epitelu repnog crijeva. Može se spekulirati da li se radi o jednoj populaciji stanica koje se diferenciraju u navedene strukture ili o tri populacije stanica koje su tu usko priljubljene, budući da se radi o

području koje ukupno sadrži stotinjak stanica (90). Za sada, ovo pitanje u miša ostaje neriješeno, što se ogleda i u raspravama da li je nedostatak ploče dna uzrokovan odstranjenjem notokorda zbog nepostojanja indukcijskih signala ili odstranjenje notokorda uvijek prati i odstranjenje stanica osnove ploče dna.

Truncate nedvojbeno pokazuje poremećaj diferencijacije notokorda (mjestimični nedostatak), ventralnog neuroepitela (neoštre granice ventralnog neuroektoderma, odvajanje stanica) i dorzalnog epitela crijeva (dvostruka šupljina), koji zajedno čine CNH. Budući da su pokusi s označavanjem stanica pokazali da se upravo u tom odsječku repa nalaze stanice s pluripotentnim svojstvima, t.j. stanice koje se diferenciraju u strukture kaudalnog dijela zametka, opravdano je tražiti poremećaj nastanka opisanih struktura u *truncate* zametaka u poremećaju CNH. Zbog kratkog vremenskog razdoblja i veličine zametaka u kojem se može nazrijeti zajedničko porijeklo ventralnog neuroektoderma, notokorda i dorzalnog epitela repnog crijeva, jedini dokaz da takva populacija stanica u miša postoji jest genski izražaj koji se prati od područja organizatora, preko CNH do opisanih struktura. Nedostatak gena *Noto* koji upravlja razvojem notokorda u kaudalnom dijelu zametka ima za posljedicu da se stanice od kojih treba nastati notokord diferenciraju u dodatno repno crijevo ili se ugrade u neuroektoderm. Može se pretpostaviti da stanice kojima nedostaje genska uputa koja bi upravljala njihovom diferencijacijom dolaze pod utjecaj okolnih stanica (109). Također se može pretpostaviti kako stanice ventralnog neureoktoderma i repnog crijeva nakon izostanka notokorda, pokušavaju nadoknaditi manjak *Noto* gena tako da same oblikuju notokord. Takav pokušaj „spašavanja“ je nekoordiniran, pa se „pseudonotokord“ oblikuje samo mjestimično, a ponegdje i dva notokorda, jedan pored drugoga.

5.3.3. Poremećena neurulacija i somitogeneza u *truncate* zametka povezana je s poremećenim razvojem notokorda

Uz isprekidan notokord, kao osnovno obilježje *truncate* zametaka, ovaj mutant pokazuje poremećen razvoj neuralne cijevi i somita. Poremećena neurulacija i somitogeneza se redovito nalaze u područjima gdje nedostaje notokord, iako su nađena područja gdje je notokord isprekidan, a izgled ostalih struktura je normalan.

Poremećena somitogeneza je nađena u obliku poremećenog rasporeda somita. Umjesto normalnog paraaksijalnog položaja, u kaudalnim područjima repa zametka u kojima nedostaje notokord, somiti su spojeni u medijanoj liniji. Štoviše, idući od vrha prema bazi repa moguće je pratiti njihov nepravilan razvoj. Prva diferencijacija mezenhima se događa u središnjoj liniji, pa somiti predstavljaju nakupinu stanica koja je spojena u središnjoj ravnini. Daljnja diferencijacija, smještena bliže tijelu zametka, oblikuje stanice u središtu osnove repa, i to tako da nastaje struktura slična dermomiotomu (nastala mezenhimskoepitelnom pretvorbom u zatvoreni smještaj stanica). Iako nalaz dermomiotoma ne iznenađuje, njegov normalan položaj je dorzolateralno područje somita, a ne ventromedijalni dio somita. Iako se u nekim osnovama repa kranijalno od poremećenog rasporeda somita nalaze stanice koje oblikuju strukture s obilježjima notokorda, ovakav „obrnut“ raspored somita se ne mijenja. Ukoliko se poremećaj kontinuiteta notokorda nađe u bazalnim područjima repa, gdje su somiti već oblikovani, nema promjena njihovog izgleda.

Danas poznajemo mnoge gene uključene u diferencijaciju somita (6,110): notokord izražava *Shh* koji djeluje u medijanoj liniji, potiče izražaj *Pax1* i diferencijaciju stanica u sklerotom. Pod utjecajem gena *Wnt*, a vjerojatno i samog *Pax3*, dorzolateralni dio somita počinje izražavati skupinu gena *Myo* i *Myf*, te *Pax3* koji potiču diferencijaciju dermatoma i miotoma.

Uzevši u obzir navedene činjenice, postavlja se pitanje zašto se u *truncate* zametaka nalazi nepravilan izgled somita:

1) u nedostatku notokorda, odnosno bjelančevine SHH, nema indukcijskog signala koji bi potaknuo izražaj *Pax1*, te diferencijaciju stanica medijane linije u sklerotom
2) u pokusima na piletu u kojima se odstranio notokord, izraženo je odumiranje stanica sklerotoma, te njihov smanjen broj (111)
3) pokazalo se da je u *truncate* zametaka u područjima bez notokorda izražaj *Pax3* gena prisutan u ventralnoj polovici neuralne cijevi, te su stanice medijane linije izložene izražaju *Pax3*, umjesto *Pax1* (112)

Opisani poremećaji oblikovanja somita se slažu s rezultatima u drugih pokusnih modela. Odstranjenje notokorda ili onemogućavanje gena koji sudjeluju u razvoju notokorda imaju za posljedicu poremećaj u razvoju somita. U ovom slučaju se radi o nedostatku indukcijskih signala zaduženih za ventralizaciju somita, odnosno do neravnoteže u dorzo-ventralnoj

indukcijskoj osovini što ima za posljedicu gubitak orijentacije stanica somita. Iznimno je zanimljivo pogledati fenotip somita u područjima *truncate* zametka gdje nedostaju kako notokord, tako i neuralna cijev. Tu su somiti spojeni u medijanoj liniji, nalaze se u dorzalnom području repa, gdje bi normalno bila neuralna cijev, no njihov raspored nije «obrnut». Budući da nedostaju indukcijski signali notokorda, ali i neuralne cijevi, somiti se razvijaju s dermomiotomom na dorzolateralnoj strani i sa sklerotomom medijalno.

Truncate miš je jedinstven model koji pokazuje što se događa s razvojem somita u odsječcima zametka u kojima se prekine kontinuitet notokorda ili se kontinuitet notokorda ponovno uspostavi, što nije slučaj niti u jednom drugom mutantu, niti je takav model moguć u pokusima mehaničkim odstranjivanjem. Ovaj rad jasno pokazuje da nedostatak notokorda nema utjecaj na već oblikovane somite. Nakon početne diferencijacije, somiti se razvijaju neovisno o signalu *Shh*, *Pax3* ili *Pax1*. Potrebno je naglasiti da se ovaj rad bavi i *splotch* mišem, mutantom za *Pax3*. U ispitivanim zamecima nisu nađeni poremećaji razvoja somita. Ovu činjenicu objašnjavaju pokusi koji su pokazali da nedostatak *Pax3* ne utječe na raspored ili diferencijaciju somita, već na njihovu sposobnost migracije (113). Zbog toga stariji *Pax3* zameci ili ljudi koji boluju od Waardenburgovog sindroma imaju slabo razvijenu muskulaturu, posebno u području udova, do kojih stanice imaju dugi put migracije (70).

Drugi poremećaj nađen u *truncate* zametku gdje nedostaje notokord je nepravilan razvoj neuralne cijevi. Opseg poremećaja varira od manjih nepravilnosti oblika stanica neuroektoderma do potpunog nedostatka neuralne cijevi.

Proučavanjem morfogenetskih zbivanja u razvoju truncate zametaka moguće je ukazati kako notokord utječe na razvoj neuralne cijevi:

1) U području sekundarnog mehanizma razvoja, nedostatak notokorda ima negativan utjecaj na razvoj neuralne cijevi. U slučajevima kada notokord postoji kao mali tračak stanica, ventralni dio neuralne cijevi se ne može normalno razviti: oštra granica prema susjednim strukturama nedostaje i neuralna cijev nema jasnu dorzo-ventralnu orijentaciju. Dokaz ovim tvrdnjama je da se neuralna cijev normalno razvije tek u odsječku u kojem je normalno oblikovan i smješten notokord.

2) Ekstreman slučaj nepostojanja neuralne cijevi i notokorda u kaudalnom području može se objasniti propadanjem kaudalnog završetka zametka. Budući da somiti nikada ne dopiru do područja sekundarnog mehanizma razvoja, njihova prisutnost u kaudalnom završetku zametka govori u korist tvrdnje da je kaudalni dio zametka propao. Uostalom, jedna od osnovnih osobina *truncate* miša jest manji ili veći opseg propadanja budućeg lumbosakralnog područja.

3) Nestanak notokorda u području repa u kojem se neuralna cijev već u potpunosti razvila ima slijedeće posljedice: neuroepitel zadebljava, što je izraženo u ventralnom području, gdje se gubi ploča dna, a neuralna cijev postaje okrugla u dorzo-ventralnom smjeru. Ukoliko je odsječak bez notokorda kratak, njegovo ponovno pojavljivanje upostavlja normalnu morfologiju neuralne cijevi. Ukoliko je odsječak bez notokorda dugačak, uočljivo je odumiranje stanica neuroepitela.

Sve navedeno ukazuje na nužnost postojanja notokorda za normalan razvoj neuralne cijevi. U ovom se slučaju može nagađati o razvoju dvije neovisne strukture i njihovom međudjelovanju nasuprot razvoju jedne strukture koja se razdvoji na tri dijela (ventralni neuroepitel, notokord, dorzalni epitel crijeva, kao dijelovi CNH). Ukoliko se priklonimo prvom shvaćanju lako je objasniti poremećaj izgleda neuralne cijevi u nedostatku notokorda, iako se uvjerljivima čine pokusi koji su označavanjem stanica tijekom gastrulacije pokazali da buduća ploča dna i notokord nastaju od iste populacije stanica (90,91,95) Također, u riba postoje mutanti (*no tail*) koji nemaju notokord, no imaju normalan izgled cijele neuralne cijevi, uključujući razvijenu ploču dna (114), te mutanti koji imaju notokord, no nedostaje im ploča dna (115). Ipak, u razvoju mnogih struktura postoje razlike koje je donijela evolucija, pa se opisan nalaz u riba ne mora odnositi i na miša. Ukoliko se priklonimo tumačenju koje prihvaća postojanje CNH u miša, lako bi objasnili područja u kojima nedostaju notokord i ploča dna, te poremećaj građe repnog crijeva. Ipak, masivno odumiranje stanica u neuralnoj cijevi u duljim odsječcima bez notokorda ili nedostatak neuralne cijevi i notokorda uz normalno razvijeno repno crijevo ukazuju na postojanje induktivnih signala notokorda prema neuralnoj cijevi koji su se razvili nakon gastrulacije. Činjenica da se u području sekundarnog mehanizma razvoja ploča dna, notokord i dorzalni epitel repnog crijeva razvijaju zajedno, ne isključuje postojanje induktivnih signala notokorda, osobito u kasnijim stadijima razvoja opisanih struktura.

5.3.4. Uloga gena u razvoju kaudalnog dijela notokorda *truncate* zametka

Opisivanjem fenotipa *truncate* mišjeg mutanta pretpostavljena je uloga gena *Noto* u razvoju zametka. Također, opisani su poremećaji u razvoju struktura koji su posljedica poremećenog razvoja notokorda. Osim svega navedenog, pregledom literature je moguće naći mutante koji pokazuju sličnosti s fenotipom *truncate* miša. Usporedbom različitih fenotipa moguće je dodatno razjasniti ulogu gena *Noto*, kao i pronaći gene koji zajedno s genom *Noto* kontroliraju iste ili komplementarne procese razvoja zametka.

Osnovni poremećaji opisani u razvoju *truncate* miša jesu nedostatak notokorda ili prisutnost dodatne skupine stanica koja je često u kontaktu s ventralnim neuroepitelom. U skladu s tim, homozigoti za gen *Noto* imaju poremećen razvoj skeleta u kaudalnom dijelu zametka. Opisani fenotip je vrlo sličan onom nađenom u mutanata za gen *T* (*brachyury*) (116). Homozigoti za gen *T* odumiru zbog nerazvijenog kaudalnog dijela tijela, dok heterozigoti pokazuju poremećenu građu lumbosakralnog područja, kao što je to slučaj u *truncate* miša. Pokusi s unošenjem stanica kojima nedostaje gen *T* u normalne zametke pokazali su da te stanice počinju oblikovati dodatni notokord, koji je nerijetko spojen sa ventralnim dijelom neuralne cijevi (108). Analiza je pokazala da je gen *T* izražen u primitivnom čvoriću, primitivnoj pruzi, u repnom pupoljku, te u notokordu (117). Vjeruje se da je zadužen za migraciju stanica iz primitivnog čvorića i pruge u repni pupoljak, te njihovu diferencijaciju u notokord i somite. Uzevši u obzir činjenice da fenotip *brachyury* možemo opisati kao jače izražen fenotip *truncate*, te da homozigoti za gen *T* prije odumiranja ne pokazuju izražaj gena *Noto*, može se pretpostaviti kako *T* djeluje na izražaj *Noto* u svrhu „fine“ diferencijacije struktura u kaudalnom dijelu zametka. Može se spekulirati kako i u jednom i u drugom mutantu spajanje manjih odsječaka notokorda s ventralnim neuroepitelom odražava dediferencijaciju tih stanica koje se tako vraćaju na ranije faze u razvoju, dok su bile spojene u području primitivnog čvora.

Ukoliko razloge truncate fenotipa pokušamo objasniti poremećajem razvoja struktura koje odgovaraju CNH (ventralni neuroepitel, notokord, dorzalni epitel repnog crijeva), zanimljivo je proučiti gen *Foxa2* koji je u razvoju ograničen na navedene strukture (118,119). Njegova ograničenost na ploču dna, notokord i dorzalni endoderm uzima se kao genetski dokaz postojanja zajedničke populacije stanica ovih struktura, porijekla primitivne pruge i čvorića

(CNH). Homozigoti za *Foxa2* odumiru sredinom trudnoće s potpunim nedostatkom notokorda. Uzevši u obzir činjenicu da homozigoti za *Foxa2* ne izražavaju gen *T*, može se pretpostaviti hijerarhija razvoja notokorda *Foxa2* - *T* - *Noto*: od cijelog zametka (*Foxa2*), preko njegove kaudalne polovice (*T*) do notokorda razvijenog isključivo sekundarnim mehanizmom razvoja (*Noto*).

Budući da je hipoteza ovog rada bila da je fenotip *truncate* miša posljedica poremećenog razvoja repnog pupoljka, zanimljivo je vidjeti postoji li koji mutant sa sličnim fenotipom, a da je nastao mutacijom gena koji je izražen u području repnog pupoljka. U literaturi je opisan mutant *vestigial tail*, kojemu nedostaje gen *Wnt3a*. Homozigoti pokazuju poremećaj razvoja zametka kaudalno od stražnjih udova, uključujući i slabo razvijen repni pupoljak, te višestruke i ektopične šupljine neuralne cijevi (120). Zanimljivo je da se jednak fenotip dobiva tretiranjem trudnih ženki retinoičnom kiselinom (vitaminom A), što uzrokuje smanjenje izražaja gena *Wnt3a* (121). Pretpostavlja se da je sindrom kaudalne ageneze koji nastaje u trudnica koje uzimaju prevelike količine vitamina A (122) uzrokovan smanjenim izražajem *Wnt3a* (121). Ipak, za sada ne postoje radovi koji su pokušali objasniti međuovisnost gena *Wnt3a* i *Noto*.

Ovaj rad je opisao razvoj kaudalnog dijela normalnog mišjeg zametka, te u nedostatku gena *Pax3* i *Noto*. Znanstveni doprinos ovog rada temelji se na opisanim specifičnim morfogenetskim zbivanjima prisutnima u kaudalnom dijelu zametka. Opisani poremećen nastanak neuralne cijevi i notokorda doprinosi razumijevanju razvojnih poremećaja u čovjeka - spine bifide, sindroma kaudalne disgeneze i Waardenburgovog sindroma.

6. ZAKLJUČCI

1. U kaudalnom dijelu zametka miša prisutan je sekundarni mehanizam razvoja.

Ovaj rad je potvrdio da se u 10 dana starih zametaka miša, nakon što završi gastrulacija, u kaudalnom vrhu repa zametka oblikuje repni pupoljak. Diferencijacijom stanica repnog pupoljka oblikuju se sekundarna neuralna cijev, notokord i repno crijevo, koje su u kontinuitetu sa odgovarajućim strukturama u kranijalnom dijelu zametka. Opisana morfogenetska zbivanja u mišu odgovaraju onima opisanim u štakoru.

2. Poremećena neurulacija u *splotch* miševa nije uzrokovana poremećajem građe repnog pupoljka.

Otvorena neuralna cijev (spina bifida) u *splotch* miševa u razvoju nađena je u 10,5 dana starih zametaka. U dan starijih zametaka spina bifida zauzima gotovo trećinu duljine osnove repa. U ovog poremećaja građa repnog pupoljka je normalna, kao i ostale strukture koje se razvijaju sekundarnim mehanizmom razvoja. Iako ovaj rad smješta spinu bifidu u granično područje između primarnog i sekundarnog mehanizma razvoja zametka, čini se da sekundarni mehanizam razvoja zametka u *splotch* miševa nije primarno poremećen.

3. Poremećenu neurulaciju u *splotch* miševa ne prati poremećen razvoj notokorda, repnog crijeva i somita.

Rezultati istraživanja ukazuju da je osnovni poremećaj nađen u *splotch* miševa otvorena neuralna cijev (spina bifida). Iako se radi o značajnom poremećaju razvoja, koji u 11,5 dana starih zametaka zauzima jednu trećinu dužine osnove repa, razvoj susjednih struktura zametka, notokorda, repnog crijeva i somita, nije poremećen.

4. S*plotch* homozigoti stari 12,5 dana osim spine bifide imaju poremećen razvoj cijelog kaudalnog dijela zametka.

U 12,5 dana starih *splotch* zametaka je nađena poremećena građa cijelog kaudalnog dijela zametka. Ovaj rad pokazuje da se ne radi o poremećaju sekundarnog mehanizma razvoja, već da se cijeli kaudalni dio zametka razvija poremećeno. Pretpostavlja se da je uzrok poremećene građe kaudalnog dijela *splotch* zametka starog 12,5 dana spina bifida, koja se javlja u 10,5 dana starih zametaka.

5. Poremećen razvoj notokorda u *truncate* miševa praćen je poremećenim razvojem repnog pupoljka, pa stoga i nepravilnim sekundarnim mehanizmom razvitka.

Osnovni poremećaj nađen u *truncate* zametaka jest poremećen razvoj notokorda, što se očituje ili kao mjestimični nedostatak notokorda ili poremećen izgled i položaj. Ishodište ovog poremećaja se nalazi u diferencijaciji repnog pupoljka tijekom sekundarnog mehanizma razvoja zametka. Notokord u *truncate* zametaka ne nastaje iz zajedničke osnove s repnim crijevom, što je slučaj u kontrolnih zametaka, već se odvaja od ventralnog neuroepitela. Umjesto notokorda, dorzalni dio repnog tračka oblikuje dodatni lumen repnog crijeva. Poremećaj notokorda u *truncate* zametaka posljedica je primarnog poremećaja sekundarnog mehanizma razvoja zametka.

6. Poremećen razvoj notokorda u *truncate* miševa uzrokuje poremećen razvoj neuralne cijevi i somita.

Uz poremećenu građu ili mjestimični nedostatak notokorda, u *truncate* mišjih zametaka poremećen je izgled susjednih struktura: neuralne cijevi i somita. U područjima neuralne cijevi gdje nedostaje notokord, nedostaje ploča dna i njena dorzo-ventralna orijentacija. Budući da se ponovnim pojavljivanjem notokorda u susjednom odsječku uspostavlja normalna morfologija neuralne cijevi, zaključuje se da je poremećen razvoj neuralne cijevi u *truncate* zametaka uzrokovan poremećenim razvojem notokorda. Poremećaj građe somita koji su spojeni u medijanoj liniji nalazi se također u odsječcima zametka gdje nedostaje notokord, što potvrđuje induktivni utjecaj notokorda na razvoj neuralne cijevi i somita.

7. SAŽETAK

Razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjih mutanata *splotch* i *truncate*

Razvoj kaudalnog dijela zametka kralješnjaka odvija se nakon završetka gastrulacije i nestanka primitivne pruge sekundarnim mehanizmom razvoja, tijekom kojeg strukture osnove repa nastaju od nediferenciranih stanica repnog pupoljka. Kaudalni dio zametka poremećen je u mišjih mutanata *splotch* i *truncate*. U *splotch* miševa mutiran je gen *Pax3*, što ima za posljedicu otvorenu neuralnu cijev (spina bifida) i poremećaj migracije stanica neuralnog grebena. U *truncate* miševa mutiran je gen *Noto*, gdje je poremećen razvoj notokorda. Hipoteza ovog istraživanja bila je da je fenotip mutiranih miševa *splotch* i *truncate* posljedica nepravilnog razvoja repnog pupoljka, te poremećenog sekundarnog mehanizma razvoja. Cilj rada bio je usporediti razvoj kaudalnog dijela zametka visoko srođenog soja C57Bl/6 s poremećenim razvojem mutanata *splotch* i *truncate.* Građa mišjih zametaka starih od 9 do 12,5 dana proučavana je svjetlosnom mikroskopijom serijskih polutankih rezova obojanih toluidinskim modrilom. U zamecima C57Bl/6 miševa sekundarni mehanizam razvoja obuhvaća postupnu diferencijaciju stanica repnog pupoljka, koje se dijele na moždinski tračak od kojeg nastaje sekundarna neuralna cijev, i repni tračak od kojeg nastaje notokord i repno crijevo. Poremećena neurulacija u *splotch* zametaka nije praćena poremećajem građe repnog pupoljka, osim u *splotch* zametaka starih 12,5 dana, gdje dolazi do sveobuhvatnog poremećaja razvoja osnove repa kaudalno od spine bifide. Spina bifida u *splotch* zametaka nastaje na prijelazu iz primarne u sekundarnu neuralnu cijev. U *truncate* zametaka djelomično nedostaje notokord. Diferencijacija repnog pupoljka je poremećena, te se notokord umjesto od repnog tračka odvaja od ventralne strane sekundarne neuralne cijevi. Dorzalni dio repnog tračka umjesto notokorda oblikuje dodatni lumen repnog crijeva. Nedostatak notokorda u osnovi repa povezan je s poremećajem razvoja susjednih struktura, neuralne cijevi i somita. Opisana morfogenetska zbivanja doprinose razumijevanju razvojnih poremećaja u čovjeka - spine bifide, sindroma kaudalne disgeneze i Waardenburgovog sindroma.

8. SUMMARY

Development of the caudal part of *splotch* and *truncate* mouse embryos

Development of the caudal part of vertebrate embryo occurs when gastrulation is completed and after the regression of the primitive streak. Tail structures form directly from the tail bud blastema, by secondary body development. The caudal part of the body is malformed in *splotch* and *truncate* embryos. *Splotch* is caused by mutation of *Pax3* gene and it is characterized by the open neural tube (spina bifida) and defective neural crest migration. *Truncate* is mutant of *Noto* gene, characterized by defective development of the notochord. The hypothesis of this study was that the phenotype of *splotch* and *truncate* mutants resulted from defective tail bud and secondary body development. The aim of this work was to describe development of the caudal part of C57Bl/6 embryos and to compare it to those of *splotch* and *truncate*. Morphology of 9-12.5 days old embryos was investigated by light microscopy using semithin toluidin stained histology sections. The secondary body development in the caudal part of the mouse embryo included gradual differentiation of the tail bud. Tail bud divided and formed the medullary cord and the tail cord. The medullary cord differentiated in the neural tube and the tail cord differentiated in the notochord and the tail gut. Defective neurulation in *splotch* embryos was not accompanied by defective tail bud morphology, except in 12.5 days old embryos, when complete morphology of the tail, caudal from spina bifida, was disturbed. Spina bifida in *splotch* embryos developed at the primary and secondary neural tube boundary. In *truncate* embryos notochord was partially missing. Differentiation of the tail bud was disturbed and the notochord did not develop from the tail cord, but from ventral neuroectoderm. Dorsal part of the tail cord, instead of the notochord, formed additional tail gut. Lack of the notochord was accompanied by disturbed development of the neighboring structures, the neural tube and the somites. Described morphogenetic processes which lead to secondary neural tube and notochord malformations contribute to understanding of human birth defects – spina bifida, caudal disgenesis syndrome and Waardenburg syndrome.

9. POPIS LITERATURE

1. Sakai S, Harada Y. Production of offspring using current income and reserves: size-number trade-off and optimal offspring size. Journal of Theoretical Biology 2005;233:65-73.

2. Mappes T, Koskela E. Genetic basis of the trade-off between offspring number and quality in the bank vole. Evolution Int J Org Evolution 2004;58(3):645-50.

3. Dall SR, Boyd IL. Evolution of mammals: lactation helps mothers to cope with unreliable food supplies. Proc Biol Sci 2004;271(1552):2049-57.

4. Ioffe ME. Brain mechanisms for the formation of new movements during learning: the evolution of classical concepts. Neurosci Behav Physiol 2004;34(1):5-18.

5. Roth G, Dicke U. Evolution of the brain and intelligence. Trends Cogn Sci 2005;9(5):250-7.

6. Sadler TW. Langman´s Medical Embriology. 9th edition. Lippincot Williams & Wilkins; 2004.

7. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. 2.izd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

8. Chang C, Hemmati-Brivanlou A. Cell fate determination in embryonic ectoderm. J Neurobiol 1998;36(2):128-51.

9. Burke AC, Nowicki JL. A new view of patterning domains in the vertebrate mesoderm. Dev Cell 2003;4(2):159-65.

10. Tam PP, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. Curr Opin Genet Dev 2003;13(4):393-400.

11. Holmdahl DE. Experimentelle Untersuchungen uber die Lage der Grenze zwischen primarer and sekundarer Korperentwicklung beim Huhn. Anat. Anz 1925;59:393-396.

12. Handrigan GR. Concordia discors: duality in the origin of the vertebrate tail. J Anat 2003;202(Pt 3):255-67.

13. Muller F, O'Rahilly R. The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. Cells Tissues Organs 2004;177(1):2-20.

14. Gajović S, Kostović-Knežević Lj, Švajger A. Origin of the notochord in the rat embryo tail. Anat Embryol 1989;179:305-310.

15. Gajović S, Kostović-Knežević L, Švajger A. Morphological evidence for secondary formation of the tail gut in the rat embryo. Anat Embryol 1993;187:291-297.

16. Mitrečić D, Kostović-Knežević L, Gajović S. Morphological features of tail bud development in truncate mouse mutants. Cells Tissues Organs 2004;178(1):23-32.

17. Pasteels J. Proliferations et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des Vertebres. Arch Biol 1943;54:2-51.

18. Griffith CM, Wiley MJ, Sanders EJ. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. Anat Embryol 1992;185:101-113.

19. Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, De Robertis EM. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the Xenopus tailbud derive from the late blastopore lip. Development 1993;119:991-1004.

20. Catala M, Teillet MA, Le Douarin NM. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chicken chimaera system. Mech Dev 1995;51:51-65.

21. Gofflot F, Hall M, Morris-Kay GM. Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure. Dev Dyn 1997;210:431-445.

22. Wilson V, Beddington RSP. Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. Mech Of Dev 1996;55:79-89.

23. Schoenwolf GC. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. Am J Anat 1984;169(4):361-76.

24. Lowery LA, Sive H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. Mech Dev. 2004;121(10):1189-97.

25. Colas JF, Schoenwolf GC. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. Dev Dyn 2001;221(2):117-45.

26. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behavior. Int J Biochem Cell Biol 2004;36(2):173-7.

27. Van Straaten HWM, Hekking JWM. Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient embryo. Anat Embryol 1991;184:55-63.

28. Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A. Neural induction. Annu Rev Cell Dev Biol 1999;15:411-33.

29. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Dev Biol 2005;282(1):1-13.

30. Mitchell LE. Epidemiology of neural tube defects. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2005;135(1):88-94.

31. Inagaki T, Smith JL, Walker ML, Schoenwolf GC. Neural tube defects. Methods Mol Biol 2000;136:161-6.

32. Dias MS, Partington M. Embryology of myelomeningocele and anencephaly. Neurosurg Focus 2004;16(2):E1.

33. Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. Nat Rev Genet 2003;4(10):784-93.

34. Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. Curr Probl Pediatr 2000;30(10):313-32.

35. Brennand DM, Jehanli AM, Wood PJ, Smith JL. Raised levels of maternal serum secretory acetylcholinesterase may be indicative of fetal neural tube defects in early pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 1998;77(1):8-13.

36. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. N Engl J Med 1999;341(20):1509-19.

37. Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina bifida. Lancet 2004;364(9448):1885-95.

38. Tubbs RS, Wellons JC 3rd, Oakes WJ. Occipital encephalocele, lipomeningomyelocele, and Chiari I malformation: case report and review of the literature. Childs Nerv Syst 2003;19(1):50-3.

39. Avery OT, MacLeod, CM, McCarty, M. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. J. Exp. Med 1944;79: 137–158.

40. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953;171:737-738.

41. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J et al. A physical map of the human genome. Nature 2001;409:934–941.

42. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. Science 2001;291:1304–1351.

43. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-45.

44. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS; US National Human Genome Research Institute. A vision for the future of genomics research. Nature. 2003;422(6934):835-47.

45. Houdebine LM. Animal transgenesis: recent data and perspectives. Biochimie 2002;84(11):1137-41.

46. Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. Nat Rev Genet. 2001;2(10):756-68.

47. Hrvatski sabor. Zakon o dobrobiti životinja. Narodne novine 1999;19.

48. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? Gene Ther 2004;11 Suppl 1:S64-6.

49. Anderson KV, Ingham PW. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. Nat Genet. 2003;33:285-93.

50. The comprehensive knockout mouse project consortium. The knockout mouse project. Nature Genetics 2004;36(9):921-924.

51. Russell WL. Splotch, a new mutation in the house mouse. Genetics. 1947;32:102.

52. Wehr R, Gruss P. Pax and vertebrate development. Int J Dev Biol 1996;40(1):369-77.

53. Copp AJ. Genetic models of mammalian neural tube defects. Ciba Found Symp. 1994;181:118-34.

54. Epstein DJ, Vogan KJ, Trasler DG, Gros P. A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(2):532-6.

55. Pani L, Horal M, Loeken MR. Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. Genes Dev 2002;16(6):676-80.

56. Serbedzija GN, McMahon AP. Analysis of neural crest cell migration in Splotch mice using a neural crest-specific LacZ reporter. Dev Biol 1997;185(2):139-47.

57. Epstein JA, Li J, Lang D, Chen F, Brown CB, Jin F, Lu MM, Thomas M, Liu E, Wessels A, Lo CW. Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos. Development 2000;127(9):1869-78.

58. Conway SJ, Henderson DJ, Kirby ML, Anderson RH, Copp AJ. Development of a lethal congenital heart defect in the splotch (Pax3) mutant mouse. Cardiovasc Res. 1997;36(2):163-73.

59. Daston G, Lamar E, Olivier M, Goulding M. Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. Development. 1996;122(3):1017-27.

60. Henderson DJ, Conway SJ, Copp AJ. Rib truncations and fusions in the Sp2H mouse reveal a role for Pax3 in specification of the ventro-lateral and posterior parts of the somite. Dev Biol 1999;209(1):143-58.

61. Koblar SA, Murphy M, Barrett GL, Underhill A, Gros P, Bartlett PF. Pax-3 regulates neurogenesis in neural crest-derived precursor cells. J Neurosci Res 1999;56(5):518-30.

62. Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. Trends Genet. 2002;18(1):41-7.

63. Mansouri A, Goudreau G, Gruss P. Pax genes and their role in organogenesis. Cancer Res. 1999;59(7 Suppl):1707s-1709s.

64. Waardenburg PJ. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. Am J Hum Genet 1951;3(3):195-253.

65. Tachibana M, Kobayashi Y, Matsushima Y. Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. Pigment Cell Res 2003;16(5):448-54.

66. Nayak CS, Isaacson G. Worldwide distribution of Waardenburg syndrome. Ann Otol Rhinol Laryngol 2003;112(9 Pt 1):817-20.

67. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. J Med Genet 1997;34(8):656-65.

68. Morell R, Spritz RA, Ho L, Pierpont J, Guo W, Friedman TB, Asher JH Jr. Apparent digenic inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) and autosomal recessive ocular albinism (AROA). Hum Mol Genet 1997;6(5):659-64.

69. Klein, D. Albinisme partiel (leucisme) avec surdi-mutite, blepharophimosis et dysplasie myo-osteo-articulaire. Helv. Paediat. Acta 1950;5:38-58.

70. Hoth CF, Milunsky A, Lipsky N, Sheffer R, Clarren SK, Baldwin CT. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). Am J Hum Genet 1993;52(3):455-62.

71. Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, Sheth PN, Joshi NC, Ambani LM. White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. J Pediatr. 1981;99(3):432-5.

72. Theiler K. Anatomy and development of the truncate (boneless) mutation in the mouse. Am J of Anat 104;1959:319-343.

73. Pavlova MN, Clark AM, Gossler A. High-resolution mapping of the truncate (tc) locus on mouse chromosome 6. Mamm Genome 1998;10:843-5.

74. Abdelkhalek HB, Beckers A, Schuster-Gossler K, Pavlova MN, Burkhardt H, Lickert H, Rossant J, Reinhardt R, Schalkwyk LC, Muller I, Herrmann BG, Ceolin M, Rivera-Pomar R, Gossler, A. The mouse homeobox gene Not is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation. Genes Dev 2004;18(14):1725-36.

75. Lichtneckert R, Reichert H. Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. Heredity 2005;94(5):465-77.

76. Talbot, W.S., Trevarrow, B., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, G., Postlethwait, J.H., Jowett, T., Kimmel, C.B., and Kimelman, D. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. Nature 1995;378:150–157.

77. Yasuo, H. and Lemaire, P. Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in Xenopus gastrulae. Development 2001; 128:3783–3793.

78. Knezevic V, Mackem S. Activation of epiblast gene expression by the hypoblast layer in the prestreak chick embryo. Genesis 2001;30(4):264-73.

79. Catala M. Genetic control of caudal development. Clin Genet. 2002;61(2):89-96.

80. Tucker AS, Slack JM. Tail bud determination in the vertebrate embryo. Curr Biol. 1995;5(7):807-13.

81. Schoenwolf GC. Morphogenetic processes involved in the remodeling of the tail region of the chick embryo. Anat Embryol 1981;162:183-197.

82. DeSesso JM, Scialli AR, Holson JF. Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. Am J Med Genet. 1999;87(2):143-62.

83. Weinstein DC, Ruiz i Altaba A, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. Cell 1994;78(4):575-88.

84. McGhee JD. Homologous tails? Or tales of homology? Bioessays. 2000;22(9):781-5.

85. Uehara M, Ueshima T. Studies of neural tube development in the chicken embryo tail. Anat Embryol 1988;179(2):149-55.

86. Davis RL, Kirschner MW. The fate of cells in the tailbud of Xenopus laevis. Development 2000;127:255-267.

87. Tam PP. The histogenetic capacity of tissues in the caudal end of the embryonic axis of the mouse. J Embryol Exp Morphol. 1984;82:253-66.

88. Catala M, Teillet MA, De Robertis EM, Le Douarin NM. A spinal cord fate map in the avian embryo: while reegressing, Hensen`s node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. Development 1996;122:2599-2610.

89. Melby AE, Warga RM, Kimmel CB. Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. Development 1996;122(7):2225-37.

90. Cambray N, Wilson V. Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. Development. 2002;129(20):4855-66.

91. Le Douarin NM, Teillet MA, Catala M. Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. Int J Dev Biol 1998;42(7):909-16.

92. Muller F, O'Rahilly R. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. Anat Embryol 1987;176(4):413-30.

93. Muller F, O'Rahilly R. The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. Cells Tissues Organs 2004;177(1):2-20.

94. Saitsu H, Yamada S, Uwabe C, Ishibashi M, Shiota K. Development of the posterior neural tube in human embryos. Anat Embryol 2004;209(2):107-17.

95. Teillet MA, Lapointe F, Le Douarin NM. The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(20):11733-8.

96. Le Douarin NM, Halpern ME. Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. Curr Opin Neurobiol 2000;10(1):23-30.

97. Placzek M, Dodd J, Jessell TM. Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. Curr Opin Neurobiol 2000;10(1):15-22.

98. Dodd J, Jessell TM, Placzek M. The when and where of floor plate induction. Science 1998; 282(5394):1654-7.

99. Van Straaten HWM, Copp AJ. Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. Anat Embryol 2001;203(4):225-37.

100. Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. Development 2002;129(10):2507-17.

101. Weil M, Jacobson MD, Raff MC. Is programmed cell death required for neural tube closure? Curr Biol 1997;7(4):281-4.

102. Vilovic K, Sapunar D, Ilijic E, Mimica MD, England MA, Saraga-Babic M. Morphological characteristics of dying cells in axial structures of developing human embryos. Cells Tissues Organs 2001;169(4):347-54.

103. Sausedo RA, Schoenwolf GC. Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos. Anat Rec. 1994 May;239(1):103-12.

104. Hall BK. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. Cells Tissues Organs 2000;166(1):6-14.

105. Liu C, Knezevic V, Mackem S. Ventral tail bud mesenchyme is a signaling center for tail paraxial mesoderm induction. Dev Dyn. 2004;229(3):600-6.

106. Tam, PP, Tan, SS. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and the tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. Development 1992;115:703-715.

107. Guo Q, Loomis C, Joyner AL. Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. Dev Biol 2003;264(1):166-78.

108. Wilson V, Manson L, Skarnes WC, Beddington RS. The T gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. Development 1995;121(3):877-86.

109. Saxen L. Secondary induction. Nature Encyclopedia of life sciences 2001;Epub 1-6.

110. Kalcheim C, Ben-Yair R. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. Curr Opin Genet Dev 2005;15(4):371-80.

111. Sanders EJ, Parker E. Ablation of axial structures activates apoptotic pathways in somite cells of chick embryo. Anat Embryol 2001;204:389-398.

112. Dietrich S, Schubert FR, Gruss P. Altered Pax gene expression in murine notochord mutants: the notochord is required to initiate and maintain ventral identity in the somite. Mech Dev 1993;44(2-3):189-207.

113. Schubert FR, Tremblay P, Mansouri A, Faisst AM, Kammandel B, Lumsden A, Gruss P, Dietrich S. Early mesodermal phenotypes in splotch suggest a role for Pax3 in the formation of epithelial somites. Dev Dyn 2001;222(3):506-21.

114. Halpern ME, Ho RK, Walker C, Kimmel CB. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation. Cell 1993;75(1):99-111.

115. Hatta K, Kimmel CB, Ho RK, Walker C. The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. Nature 1991;350(6316):339-41.

116. Beddington RS, Rashbass P, Wilson V. Brachyury--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. Dev Suppl. 1992;:157-65.

117. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. Nature 1990;343(6259):657-9.

118. Dufort D, Schwartz L, Harpal K, Rossant J. The transcription factor HNF3beta is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis. Development 1998;125(16):3015-25.

119. Klingensmith J, Ang SL, Bachiller D, Rossant J. Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. Dev Biol 1999;216(2):535-49.

120. Takada S, Stark KL, Shea MJ, Vassileva G, McMahon JA, McMahon AP. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. Genes Dev. 1994 ;8(2):174-89.

121. Shum AS, Poon LL, Tang WW, Koide T, Chan BW, Leung YC, Shiroishi T, Copp AJ. Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. Mech Dev. 1999 Jun;84(1-2):17-30.

122. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S, Milunsky A. Teratogenicity of high vitamin A intake. N Engl J Med. 1995 Nov 23;333(21):1369-73.

10. ŽIVOTOPIS

Dinko Mitrečić je rođen 29.01.1976. u Zagrebu. Osnovnu školu, Opću gimnaziju i Srednju glazbenu školu je završio u Karlovcu. Studij medicine je upisao 1994. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, gdje je i diplomirao 2000. Tijekom studija je nagrađen Rektorovom nagradom za najbolji studentski znanstveni rad. Nakon što je završio jednogodišnji pripravnički liječnički staž na „KBC Zagreb“, 2001. je položio državni ispit. U razdoblju od 2001. do 2004. je završio Znanstveni poslijediplomski studij, smjer Biomedicina, na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, u sklopu kojeg je prijavio doktorsku disertaciju. Od 2001. je zaposlen kao znanstveni novak-asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju, gdje sudjeluje na dva projekta: «Određivanje uloge gena u razvoju živčanog sustava miša», voditeljice prof. Lj. Kostović-Knežević, te «Ekspresija i funkcija proteina jezgrice Nol1 u miša», voditelja prof. dr. S. Gajovića. Područja istraživanja su mu genetika i embriologija miša, a osobito razvoj središnjeg živčanog sustava, te razvoj kaudalnog dijela zametka. Autor je 3 CC indeksirana znanstvena rada, te 15 kongresnih sažetaka. Dinko Mitrečić sudjeluje u nastavi iz slijedećih predmeta: „Histologija i embriologija“, „Biologija stanice“ i „Prije nego što smo se rodili“ za studente Medicinskog fakulteta u Zagrebu, „Histologija“, za studente Visoke zdravstve škole u Zagrebu, te „Morfološke metode istraživanja u stomatologiji“, za studente Poslijediplomskog studija na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu. Redovni je član Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva za elektronsku mikroskopiju, Hrvatske udruge genetskih inženjera, te Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.