

Eksperimentalni modeli proučavanja rane embriogeneze sisavaca

Ljiljana Kostović-Knežević, Srećko Gajović i Tatjana Belovari

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Stručni rad

UDK 611.013

Prispjelo: 25. kolovoza 1999.

Razvojna biologija u Hrvatskoj ima 50-godišnju tradiciju zahvaljujući njenom osnivaču prof. dr. Nikoli Škrebu, te velikom broju njegovih suradnika i učenika. Istraživanja su bila usmjerena na kritična razdoblja razvoja u ranoj embriogenezi sisavaca (miš, štakor). Razrađenim postupcima izolacije zametnih listića te, potom, transplantacije istih na ektopična mjesta domaćina (korioalantoisna membrana, prednja očna komora, bubrežna čahura) dobiveni su teratomi, koji su omogućili posredno proučavanje razvojnih sposobnosti nediferenciranog presatka. Postupci kulture zametaka in vitro i transplantacije in vivo pokazali su stabilnost diferencijacije. U potrazi za genima koji upravljaju embrionalnim razvojem, primijenio se postupak genske zamke, kojim se mogu otkriti novi geni s ograničenim uzorkom ekspresije.

Ključne riječi: embriogeneza sisavaca, eksperimentalni modeli proučavanja

Od Aristotela (384-322. prije Krista) do danas razvoj je sisavaca bio predmetom znatizelje i brojnih istraživanja. U početku je embriologija bila samo opisna i zasnivala se na proučavanju razvoja nižih vrsta. Unatoč dugoj povijesti istraživanja u području embriologije, i danas se zna mnogo više o razvoju nižih životinja, kao što su ježinci, kukci, žabe i ptice, nego što se zna o razvoju sisavaca, posebno čovjeka. Jedan od najvažnijih razloga leži u nepristupačnosti intrauterinog razvoja zametka sisavaca. Zbog toga se klasična embriologija čovjeka služi rezultatima istraživanja drugih srodnih znanstvenih disciplina, kao što su razvojna biologija, genetika i, posljednjih desetak godina, molekulska biologija.

Razdoblje prepoznatljive i međunarodno prihvaćene "zagrebačke škole" razvojne biologije započelo je ranih 50-tih godina zahvaljujući prof. dr. Nikoli Škrebu, te velikom broju njegovih suradnika i učenika, čijom zaslugom je započelo eksperimentalno istraživanje rane embriogeneze, posebice ranog postimplantacijskog razdoblja. Metodološki pristup rješavanju problema rane embriogeneze vršen je na modelu sisavaca (miš, štakor). Istraživanja su u početku bila usmjerena na određivanje kritičnog razdoblja ranog razvoja s obzirom na djelovanje teratogenih čimbenika. Proučavana su ključna događanja tijekom ranog razvoja: proliferacija, determinacija, migracija, indukcija, citokemijska diferencijacija i biološka smrt stanica. Rezultati tih istraživanja pokazali su da je najkritičnije razdoblje ranog razvoja doba prvog morfogenetskog zbivanja (19). To je razdoblje gastrulacije, tj. diferencijacije zametnih listića (slika 1). Prije tog stadija osnova zametka pokazuje učinak "sve ili ništa" ("all or none"). To znači da djelovanje teratogenog čimbenika u najranijim razvojnim stadijima dovodi do uništenja zametka ili se nastavi normalni razvoj (24).

PRIMARNI I SEKUNDARNI RAZVOJ ZAMETKA

Rani razvoj zametka kralješnjaka odvija se na dva različita načina: primarni ili indirektni i sekundarni ili direktni (10,13,14). Primarni ili indirektni razvoj se odvija u kranijalnom dijelu zametka i obuhvaća gastrulaciju i formiranje zametnih listića, koji čine osnovu za daljnji razvoj embrionalnih struktura. Gastrulacija započinje pojavljivanjem primitivne pruge na

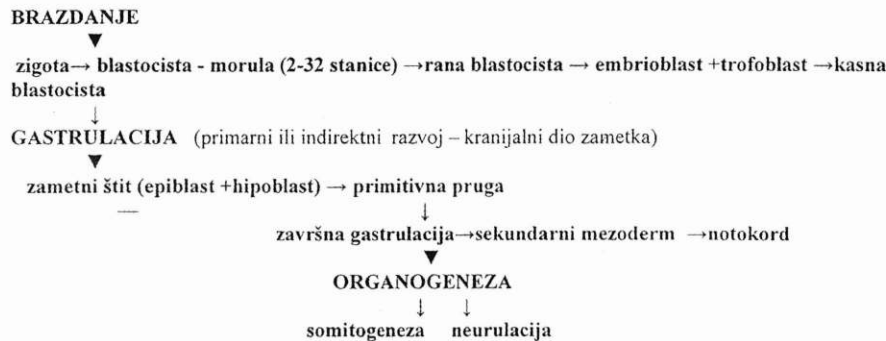
površini epiblasta za vrijeme dvoslojnog zametnog štita. Stanice epiblasta migriraju kroz primitivnu prugu prema unutra, što se naziva invaginacija. Tako epiblast mehanizmom gastrulacije postaje izvorom svih triju zametnih listića u ranom zametku (ektoderma, mezoderma i endoderma).

Sekundarni ili direktni razvoj odvija se u zametku kaudalno od primarnog nakon završene gastrulacije (3,11). Obuhvaća stvaranje embrionalnih struktura neposredno od nediferenciranih mezenhimske stanice, bez prethodnog stvaranja zametnih listića. Mezenhimske stanice, koje su osnova za sekundarni razvoj embrionalnih aksijalnih struktura repa, podijeljene su u dvije odvojene skupine stanica: moždinski tračak i repni tračak.

Od moždinskog tračka nastaje neuralna cijev, a od repnog tračka chorda dorsalis i repno crijevo (15,26,6). Moždinski tračak, repni tračak, neuralna cijev i repno crijevo podliježu propadanju i nestaju, dok je chorda dorsalis (notokord) jedina sekundarno nastala struktura zametka čiji su promijenjeni ostaci prisutni i u odraslih sisavaca (6,8).

TRANSPLANTACIJA IN VIVO

Rezultati istraživanja pokazali su različite razvojne sposobnosti zametaka ovisno o njihovu razvojnom stadiju: prije stvaranja mezoderma ili nakon njegove diferencijacije. Razrađen je postupak odvajanja zametnih listića, te potom transplantacije istih na ektopična mjesta domaćina (korioalantoisna membrana, prednja očna komora, bubrežna čahura). Nakon određenog vremena dobiveni su teratomi koji su histomorfološki pretraživani kako bi se dobio uvid u njihovu građu. Ti su pokusi omogućili da se posredno ispituju razvojne sposobnosti još nediferenciranog presatka (zametnih listića) s obzirom na stupanj razvoja. Dobiveni rezultati istraživanja dali su odgovore na pitanja o sposobnosti ili nesposobnosti diferencijacije u različite vrste tkiva pojedinačnih zametnih listića, ili udruženih u različitim međusobnim kombinacijama (22,25,23,27). Proučavanjem transplantiranih djelomično diferenciranih stanica, npr. embrionalnih stanica mrežnice u mozak štakora, pokazalo se da ganglijske stanice mrežnice, putem aksona, uspostavljaju vezu s mozgom domaćina (4). Metodom transplantacije se istražuju i nove terapijske mogućnosti, kao npr. presađivanje pigmentnog epitela kod nekih bolesti oka (12).



SLIKA 1

Kratki prikaz ključnih zbivanja tijekom embriogeneze

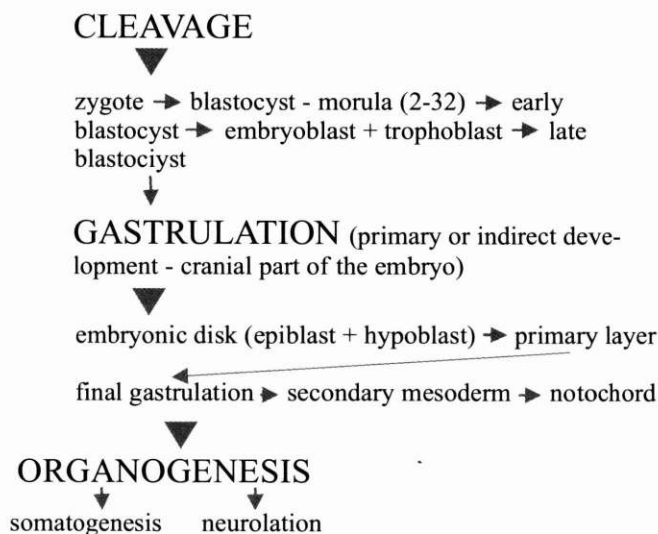


FIGURE 1.

Overview of the early developmental events during embryogenesis

KULTURA IN VITRO

Novi horizonti u razvojnoj biologiji otvorili su se u trenutku kada su se mogle različite vrste stanica sisavaca kultivirati u laboratoriju in vitro tehnikom kulture organa i stanične kulture. Zato se embrionalni razvoj i njegovi regulacijski mehanizmi proučavaju metodom kulture in vitro, metodom transplantacije in vivo i kombinacijom tih dviju metoda.

Kulture in vitro predstavljaju jednostavne, ponovljive sustave koji omogućuju preživljavanje, rast i diferencijaciju stanica, tkiva organa ili čitavih zametaka. Upotreba medija bez seruma, kada se u kemijski određenim medijima može precizno proučavati utjecaj određene aktivne tvari na staničnoj i molekularnoj razini, čini ih pogodnim za proučavanje, kako normalnih razvojnih procesa i čimbenika koji ih reguliraju, tako i tumorski promijenjena tkiva (1). Međutim, kultiviranje zametaka u mediju bez seruma nepovoljno utječe na njihovo preživljavanje i rast, te ograničava samu diferencijaciju (20,21).

UDRUŽENA METODA KULTURE IN VITRO I TRANSPLANTACIJE IN VIVO

Metoda udruživanja kulture in vitro i transplantacije in vivo pokazala se povoljnom za proučavanje stabilnosti diferencijacije (20). Istraživanja su pokazala da se u takvom pokusnom sustavu može utjecati na razvojnu sposobnost određenih tkiva. Uvođenjem kemijski definiranih medija, dokazano je da štakorski zametak može preživjeti u nepovoljnim uvjetima. Dodavanjem određenih tvari u medij za kultiviranje, može se utjecati na razvojnu sposobnost zametka. Tako, npr. transferin bez željeza, može sačuvati razvojnu sposobnost embrionalnih stanica za živčano, mišično i hrskavično tkivo in vitro i omogućiti da dođe do izražaja in vivo (17,18)

MOLEKULSKE METODE ISTRAŽIVANJA U RANE EMBRIOGENEZE

U posljednjih 10 godina molekularna biologija je omogućila pristup istim problemima novim postupcima. To su, u prvom redu, postupci kloniranja gena, stvaranje transgeničnih životinja, dobivanje i uzgoj embrionalnih matičnih stanica, polimerazna lančana reakcija, te in situ hibridizacija. Unošenjem gena u eksperimentalne životinje, najčešće miševe, dobivaju se transgenični miševi koji pokazuju posebni genetski manjak, što omogućuje proučavanje njihova fenotipa i u razvoju i u odraslih (2, 9).

GENSKA ZAMKA

U potrazi za genima koji upravljaju embrionalnim razvitkom, primijenio se postupak genske zamke. Na taj se način mogu otkriti novi geni s ograničenim uzorkom ekspresije. Pritom su se koristile embrionalne matične stanice dobivene od embrionalnog čvorića blastociste, koje se mogu održavati generacijama u kulturi. Tako uzgojene embrionalne matične stanice mogu se pridružiti osnovi zametka na stadiju morule ili blastociste i zajednički nastaviti normalni embrionalni razvoj, te se razviti do odrasle životinje. Prije pridruživanja moruli, embrionalne matične stanice se promijene ubacivanjem umetka DNK, koji sadrži primač prekranja neposredno ispred gena za beta-galaktosidazu (lacZ) i za otpornost neomicin (neoR) kojima je odstranjen promotor. Geni, ubačeni na taj način, aktivni su samo unutar drugog mišjeg gena, koji je na taj način "uhvaćen" u gensku zamku (16). Tako se putem ubačenog umetka može odrediti uhvaćeni gen, te pokazati njegov uzorak ekspresije tijekom embrionalnog razvitka. Ubacivanje umetka DNK može izazvati

promjenu fenotipa miša, što ukazuje na moguću ulogu uhvaćenog gena. Cilj je istraživanja u dobivenih linija miševa postupkom genske zamke dobiti nove gene s ograničenim uzorkom ekspresije tijekom embrionalnog razvoja (5, 7).

GENI KOSENIC I LOBEL

Kosenic i lobel su geni važni za razvoj zametka, te njihova promjena uzrokuje poremećaj razvoja. Oni su do sada nepoznati geni koji su nastali postupkom genske zamke. Istraživanja su pokazala da su izraženi tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava i srca (7)

MIŠJE MUTANTE BRACHYURY, SPLOTCH I TRUNCATE

Proučavanje mutiranih sojeva miševa sa poremećajima razvoja omogućava da se na osnovu pokusa, koji je napravila sama priroda, zaključuje o zakonitostima normalnog razvoja. Zajedničko svojstvo ovih spontano nastalih linija miševa je promijenjeni kaudalni dio zametka. Brachyury ima promijenjen T gen, sploch sadrži promijenjen Pax-3 gen, dok je kod truncate miševa gen nepoznat. Imajući u vidu normalne parametre morfogenetskih zbivanja tijekom sekundarnog razvoja kaudalnog dijela zametka, proučavanje ovih linija miševa doprinijet će razumijevanju poremećaja razvoja čovjeka (6,8).

Primjenom ovih eksperimentalnih modela u istraživanju zakonitosti razvoja doprinosi se odgovoru na veliku zagonetku embriologije: kako od jednostavne oplodene jajne stanice nastane nešto toliko složeno, kao što je ljudsko biće. Poznavanjem normalnih parametara razvoja čovjeka, omogućuje se i razumijevanje anomalija razvoja i prirođenih bolesti.

LITERATURA

1. Barnes D, Sato G. Serum-free cell culture a unifying approach. *Cell* 1980; 22: 649-55.
2. Bradley A, Evans M, Kaufman M H, Robertson E. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-6.
3. Criley BB. Analysis of the embryonic sources and mechanisms of development of posterior levels of chick neural tubes. *J Morph* 1969; 128: 465-502.
4. Dixon G, Jerwie Sefton A. Ganglion cell survival in embryonic rabbit retina transplanted to the midbrain of neonatal rats. *Exp Brain Res* 1991; 86: 182-9.
5. Gajović S, Chowdhury K, Gruss P. Genes Expressed after Retinoic Acid-Mediated Differentiation of Embryoid Bodies Are Likely to Be Expressed during Embryo Development. *Exp Cell Res* 1998; 242: 138-43.
6. Gajović S, Kostović-Knežević Lj, Švajger A. Origin of the notochord in the rat embryo tail. *Anat Embryol* 1989; 179:305-10.
7. Gajović S, Muro AF, Chowdhury K, Voss AK, Thomas T, Kostović-Knežević Lj, Baralle FE, Gruss P. Analysis of three mouse genes identified by gene trap. *EMBO Fellows Meeting. Heidelberg* 1977:35.
8. Gajović S. Razvitak i propadanje kaudalnog dijela crijeva zametka sisavaca. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1990.
9. Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes W C. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 1989; 244: 463-5.
10. Holmdahl DE. Primitivstreifen beziehungsweise die Rumpfschwanzknospe im Verhältnis zur Körperentwicklung. *Z Kikrosk Anat Forsch* 1935; 36: 409-40.
11. Jelinek R, Seichert V, Klika E. Mechanism of morphogenesis of caudal neural tube in the chick embryo. *Folia Morphol (Prague)* 1969; 17: 355-67.
12. Lahiri-Munir D, Zhang BX, Stepkowski SM, Li T, Garcia CA. Transplantation of allogenic retinal pigment epithelium under kidney capsule. *Transpl Proc* 1993; 25: 1017--8.
13. Peter K. Die Genese Des Endoderms bei den Wirbeltieren. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 1941; 33: 285-369.
14. Peter K. Die zweifache Entwicklung des Wirbeltierkörpers in finaler erhaltungsneller Betrachtung. *Z Mikrosk Anat Forsach* 1951; 57: 393-401.
15. Schoenwolf GC. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat* 1984; 169: 361-76.
16. Shirai M, Miyashita A, Ishii N, Itoh Y, Satokata I, Watanabe YG, Kuwano R. A gene trap strategy for identifying the gene expressed in the embryonic nervous system. *Zool Sci* 1996; 13: 277-83.
17. Strahinić T, Jurić-Lekić G, Bulić-Jakuš F. Transferrin supports Differentiation of neural tissue in grafts of early rat embryos pre-cultivated in serum-free medium. *Period Biol* 1996, 98; 273.
18. Strahinić T. Diferencijacija štakorskog zametka u izotransplantatu nakon prethodne kulture in vitro u mediju bez seruma: Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1995.
19. Škreb N, Bijelić N. Effects of X-rays on rat embryo during mesoderm formation. *Nature* 1962; 193: 292-3
20. Škreb N, Bulić F. Partial differentiation of rat egg cylinders in serum-free and protein-free medium. *Dev Biol* 1987; 120: 584-6.
21. Škreb N, Crnek V. Tissue differentiation in ectopic grafts after cultivation of rat embryonic shields in vitro. *J Embryol Exp Morph* 1977; 42: 127-34.
22. Škreb N, Frank Z. Developmental abnormalities in the rat induced by heat shock. *J Embryol Exp Morphol* 1963; 11: 445-57.
23. Škreb N, Švajger A, Levak-Švajger B. Growth and differentiation of rat egg-cylinders under the kidney capsule. *J Embryol Exp Morphol* 1971; 25: 47-56.
24. Škreb N, Švajger A, Levak-Švajger B. Developmental potentialities of the germ layers in mammals.: Embryogenesis in Mammals, CIBA Found. Symp. 40, New Series Elsevier, Excerpta Medica, 1976; 27-45.
25. Škreb N, Švajger A. Histogenetic capacity of rat and mouse embryonic shields cultivated in vitro. *Roux Arch Dev Biol* 1973; 173: 228-34.
26. Švajger A, Kostović-Knežević Lj, Bradamante Ž, Wrischer M. Tail gut formation in rat embryo. *Roux Arch Dev Biol* 1985; 194: 429-32.
27. Švajger A, Levak-Švajger B, Kostović-Knežević Lj, Bradamante Ž. Morphogenetic behaviour of the rat embryonic ectoderm as a renal homograft. *J Embryol Exp Morph* 1981; 65: 243-67.

EXPERIMENTAL MODELS IN THE RESEARCH OF THE EARLY EMBRIOGENESIS

Ljiljana Kostović-Knežević, Srećko Gajović and Tatjana Belovari
Medical Faculty, University of Zagreb
Medical Faculty, University "J. J. Strossmayer" of Osijek

ABSTRACT

The period of continuous and internationally recognized research in developmental biology began in Croatia in the early fifties. It was initiated by Nikola Škreb and continued by his coworkers. His research was focused to the analysis of the early postimplantation rodent embryo with special attention on the crucial period of gastrulation. The next step was the analysis of growth and histological differentiation after transfer of embryos and separated germ layers to ectopic sites (kidney capsule, anterior chamber of the eye, chorioalantoic membrane). The potential of early rat embryo to grow and differentiate was shown using a method of organ culture in vitro. After establishing molecular methods and identification of genes involved in the development, the same developmental problems are investigated in a new way. One of them is the gene trap procedure, which utilises the possibility to select trapped genes active during embryogenesis.

Key words: experimental models, mammalian embryogenesis, research