

# Izražaj serotoninskih receptora 5-HT tijekom normalnog i poremećenog razvoja kralježničke moždine i ganglija u čovjeka

---

**Punda, Hrvoje**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:502132>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**HRVOJE PUNDA, dr. med.**

**IZRAŽAJ SEROTONINSKIH RECEPTORA 5-HT TIJEKOM  
NORMALNOG I POREMEĆENOG RAZVOJA KRALJEŽNIČKE  
MOŽDINE I GANGLIJA U ČOVJEKA**

**DOKTORSKI RAD**

**SPLIT, 2024.**

Medicinski fakultet Split  
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju  
Mentorica: prof. dr. sc. Mirna Saraga Babić

# SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	3
1. UVOD .....	1
1.1. Neurulacija .....	2
1.1.1. Primarna neurulacija .....	2
1.1.2. Sekundarna neurulacija.....	3
1.2. Razvoj i oblikovanje središnjeg živčanog sustava .....	4
1.3. Procesi razvojne reorganizacije.....	5
1.4. Poremećaji procesa neurulacije.....	5
1.5. Kralježnička moždina.....	8
1.5.1. Histološka diferencijacija kralježničke moždine .....	8
1.5.2. Uloga stanične proliferacije i apoptoze tijekom razvoja kralježničke moždine .....	10
1.5.3. Diferencijacija neurona i glija stanica u kralježničkoj moždini tijekom razvoja.....	12
1.6. Spinalni (dorzalni) gangliji .....	12
1.6.1. Razvoj i diferencijacija spinalnih ganglija.....	12
1.7. Serotonin .....	13
1.7.1. Sinteza serotonina u živčanom sustavu čovjeka .....	15
1.7.2. Razvoj serotoninskih receptora u čovjeka i njihove projekcije u kralježničkoj moždini....	16
1.7.3. Poremećaji u radu serotoninskih receptora .....	18
1.7.4. Oblici oštećenja kralježničke moždine i serotoninski receptori .....	19
1.8. Histološke osobitosti ožiljka nakon povrede kralježničke moždine i funkcionalne posljedice...	20
1.9. Primjena radioloških metoda u praćenju razvoja i oštećenja središnjeg živčanog sustava .....	23
1.10. Terapijske mogućnosti regeneracije oštećene kralježničke moždine.....	25
2. CILJEVI I HIPOTEZE .....	27
2.1. Ciljevi istraživanja.....	28
2.2. Hipoteza .....	28
3. METODE I MATERIJALI.....	29
3.1. Biološki materijali .....	30
3.2. Postupci .....	30
3.3. Protokol.....	32

3.4. Statistički postupci .....	33
3.5. Elektronska mikroskopija.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Normalni razvoj kralježničke moždine čovjeka između 5. i 10. tjedna razvoja (oboјano Hemalaunom i Eozinom) .....	35
4.2. Razvoj kralježničke moždine u ljudskog fetusa sa spinom bifidom starog 9. tjedna.....	36
4.3. Izražaj serotoninskih receptora (sr1, sr2, sr3) u kralježničkoј moždini čovjeka tijekom razvoja (imunofluorescentno boјanje) .....	38
4.4. Koekspresija serotoninskih receptora s biljezima živčanih stanica (pgp) i glija stanica (GFAP) (metoda dvostruke fluorescencije).....	43
4.5. Izražaj serotoninskih receptora u području ispod rascjepa kralježničke moždine uzrokovanog spinom bifidom (imunofluorescencija i dvostruka imunofluorescencija).....	45
4.6. Izražaj biljega proliferacije Ki-67 i apoptotskog biljega kaspaze-3 u krovnoj ploči normalnog fetusa i fetusa sa spinom bifidom.....	47
4.7. Izražaj serotoninskih receptora u spinalnim (dorzalnim) ganglijima tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom .....	49
4.8. Ko-ekspresija serotoninskih receptora s pgp u normalnih i malformiranih fetalnih spinalnih ganglija.....	51
4.9. Elektronska mikroskopija stanica spinalnih ganglija (polu-tanki rezovi i ultrastrukturalna analiza) .....	52
5. RASPRAVA .....	55
5.1. Razvoj serotoninskih receptora tijekom rane diferencijacije ljudske kralježničke moždine .....	56
5.2. Izražaj serotoninskih receptora u malformiranom humanom fetusu s cervikalnom spinom bifidom.....	57
5.3. Značenje proliferacije i apoptoze u oblikovanju kralježničke moždine i spinalnih ganglija tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom.....	59
5.4. Izražaj serotoninskih receptora u spinalnim ganglijima tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom .....	60
6. ZAKLJUČCI.....	62
7. SAŽETAK.....	64
8. SUMMARY .....	67
Title: Expression of serotonin 5-HT receptors during the normal and disturbed development of human spinal cord and ganglia .....	68
9. LITERATURA.....	70
10. ŽIVOTOPIS .....	81

## POPIS OZNAKA I KRATICA

SHH	Sonic hegehog protein
PAX3	Paired box 3 gen
NDT	poremećaji neuralne cijevi (engl. <i>Neural tube defects</i> )
NF200	panneuronalni intermedijarni filament (engl. <i>Panneuronal intermediate filament</i> )
5-HT	5-hidroksitriptamin
SNARE	( engl. <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor</i> )
SERT	( engl. <i>Serotonine transporter</i> )
MAO	monoamine oksidaza (engl. <i>Monoamine oxidase</i> )
SP	supstancija P (engl. <i>Supstance P- 11 amino acid peptide</i> )
ACTH	adrenokortikotropni hormone
GABA	Gamma-aminobutyric acid
MMP	Matrix metaloproteinaze
EGFR	epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>Epidermal growth factor</i> )
sc	kralježnička moždina (engl. <i>Spinal cord</i> )
vz	ventrikularna zona
iz	intermedijarna zona
mz	marginalna zona
f	ploča dna (engl. <i>Floor plate</i> )
r	krovna ploča (engl. <i>Roof plate</i> )
l	lumen
c	kokcigealni ostatak (engl. <i>Coccygeal remnant</i> )
cv	kokcigealni kralježak (engl. <i>Coccygeal vertebra</i> )
se	epitel kože (engl. <i>Skin epithelium</i> )
dg	dorzalni ili spinalni ganglij (engl. <i>Dorsal ganglion</i> )
v	prednji rogovi (engl. <i>Ventral horns</i> )
i	intermedijarni rogovi (engl. <i>Intermediate horns</i> )
d	dorzalni rogovi (engl. <i>Dorsal horns</i> )
e	ependimski sloj
no	notokord

sr1	serotoninski receptor 1
sr2	serotoninski receptor 2
sr3	serotoninski receptor 3
PFA	paraformaldehid
Pgp9.5	biljeg neurona
GFAP	biljeg glija stanica (engl. <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )
DAPI	biljeg staničnih jezgara (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)
Caspase-3	biljeg stanične apoptoze
Ki-67	biljeg stanične proliferacije
n	neuroni
nf	živčana vlakna (engl. <i>Nerve fibers</i> )
ct	vezivno tkivo (engl. <i>Connective tissue</i> )
nu	jezgra (engl. <i>Nucleus</i> )
d	tamnija citoplazma (engl. <i>Dark cytoplasm</i> )
RER	hrapava endoplazmatska mrežica (engl. <i>Rough endoplasmic reticulum</i> )
G	Golgijevo tijelo
m	mitohondriji
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
TUNEL	biljeg stanične smrti (engl. <i>terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) nick-end labelling</i> )
AChE	acetylcholinesterase
NgR	Nogo-66 receptor

## **1. UVOD**



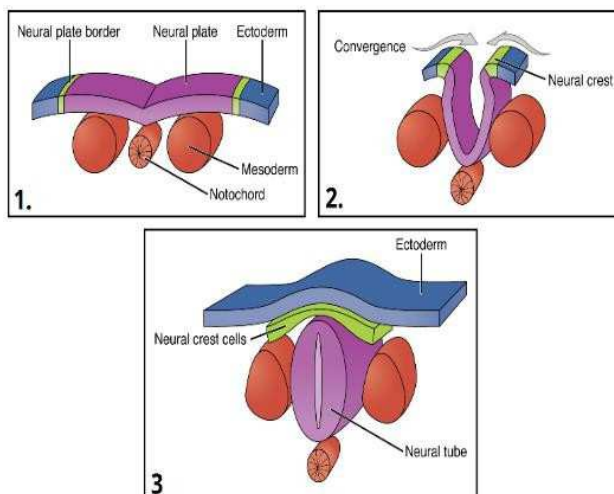
## 1.1. Neurulacija

Središnji živčani sustav (lat. *systema nervosum centrale*) razvija se iz površinskog epitela ektodermalnog podrijetla. Razlika između primarnog i sekundarnog mehanizma embrionalnog razvoja očituje se u razlici između primarne i sekundarne neurulacije (1).

### 1.1.1. Primarna neurulacija

Početak 3. tjedna razvoja, pod utjecajem bjelančevina koje izlučuju stanice notokorda poput chordina (kojeg kontrolira CHRD gen), noggina (NOG), follistatin (FST) i Wingless i Int-1 (WNT3) na stražnjoj površini zametnog štita zadeblja središnji dio ektoderma te nastaje ravna neuralna ploča. Tijekom daljnjeg razvoja, bočni se rubovi neuralne ploče uzdignu oblikujući neuralne nabore, čijim spajanjem u medijalnoj liniji nastane neuralnu cijev.

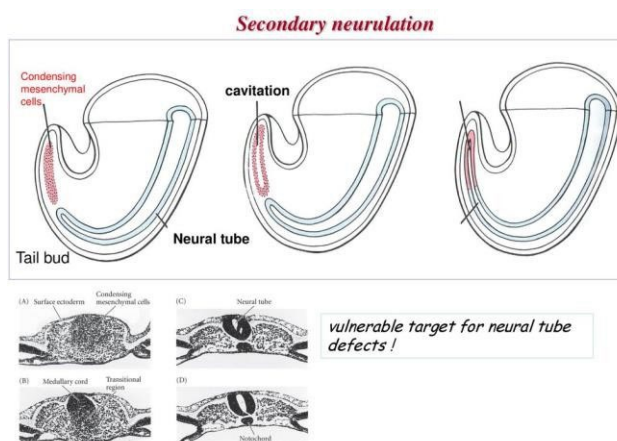
Neuroektodermalne stanice na rubu nabora odvajaju se od ostatka neuroektoderma tvoreći neuralni greben (budući periferni živčani sustav) (Slika 1). Kranijalni i kaudalni krajevi neuralne cijevi postepeno se zatvaraju, te tako nastaje prednji otvor neuralne cijevi ili neuroporus anterior koji se zatvara se 25. dana razvoja i stražnji otvor ili neuroporus posterior, koji se zatvara nešto kasnije tj. 27. dana. U početku stijenku neuralne cijevi izgrađuju stanice jednoslojnog nediferenciranog neurepitela. Jezgre ovih stanica položene su u više redova, čineći višeredni epitel od kojeg se staničnom proliferacijom razvijaju sve živčane stanice (neuroni) i potporne (glija) stanice u središnjem živčanom sustavu (2-4). Nakon zatvaranja kaudalnog neuroporusa, primarna neuralna cijev proteže se do drugog sakralnog kralješka. Preostali sakralni i kokcigealni somiti kao i kaudalni dio kralježničke moždine razvijaju se tijekom procesa sekundarne neurulacije.



Slika 1. Oblikovanje neuralne cijevi procesom primarne neurulacija. Preuzeto iz: <https://teachmeanatomy.info/the-basics/embryology/central-nervous-system> Stadiji primarne neurulacije: 1. neuralna ploča, 2. neuralni žlijeb, 3. neuralna cijev

### 1.1.2. Sekundarna neurulacija

Sekundarna neuralna cijev nastaje iz pluripotentnih stanica repnog pupoljka, u kojem se postepeno pojavljuju šupljine koje stvaraju lumen (kavitacija). Stanice repnog pupoljka diferenciraju se u kaudalne somite, sekundarnu neuralnu cijev, notokord i repno crijevo. Ove strukture postepeno nestaju (regrediraju) mehanizmom stanične smrti, koji dovodi do nestajanja repa u čovjeka (5-10). Sekundarna neuralna cijev spaja se s primarnom u području tzv. prijelazne zone (Slika 2).



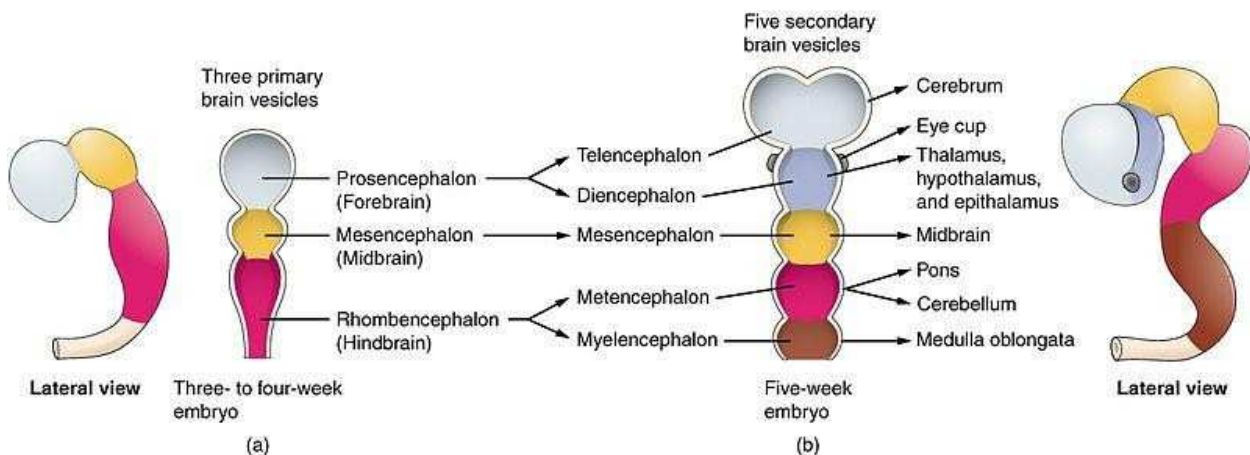
Slika 2. Oblikovanje neuralne cijevi procesom sekundarne neurulacije. Preuzeto iz: <https://radiologykey.com/embryology-and-brain-development/> Stadiji sekundarne neurulacije (od lijevo prema desno): repni pupoljak (kondenzacije mezenhima), kavitacija, spajanje s primarnom neuralnom cijevi

## 1.2. Razvoj i oblikovanje središnjeg živčanog sustava

Pod utjecajem Sonic hedgehog proteina (Sonic Hedgehog Signaling molecule ili SHH) koje izlučuju notokord i ploča dna kralježničke moždine, dolazi do diferencijacije različitih dijelova neuralne cijevi. U ventralnom dijelu nastaju motorni neuroni, u dorzalnom se dijelu diferenciraju osjetni neuroni, a između njih nastaju interneuroni. Dorzalni dio neuralne cijevi diferencira se pod utjecajem koštanog morfogenetskog proteina (engl. bone morphogenetic protein ili BMP) signala iz mezenhima i aktivacije paired box 3 (PAX3) gena (11, 12).

Histološke građe središnjeg živčanog sustava uspostavlja se tijekom histogeneze, proces koji uzrokuje tri promjene u embrionalnoj neuralnoj cijevi: a) rast cjelokupnog središnjeg živčanog sustava, b) rast pojedinih dijelova neuralne cijevi što dovodi do promjene njezinog oblika (morfogeneza) i c) razvoj privremenih embrionalnih ili fetalnih zona.

Važno razdoblje za promjenu oblika neuralne cijevi je pojava moždanih mjehurića. Prvo se pojave tri primarna moždana mjehurića tj. prosencephalon (prednji mozak), mesencephalon (srednji mozak) i rhombencephalon (stražnji mozak).



Slika 3. Nastanak moždanih mjehurića. Preuzeto iz: system, *teachmeanatomy.info*. Podjela neuralne cijevi na primarne, sekundarne moždane mjehuriće i njihove derivate.

U 5. tjednu razvoja, daljnjom podjelom prosencephalona i rhombencephalona nastaje pet sekundarnih moždanih mjehurića tj. telencephalon (buduće moždane polutke) i diencephalon (međumozak), metencephalon (budući most i mali mozak) i myelencephalon (buduća produžena moždina), dok mesencephalon ostaje nepodijeljen, dok od preostalog (kaudalnijeg) dijela neuralne cijevi nastaje kralježnička moždina. Šupljine moždanih mjehurića tj. moždane komore (četvrta moždana komora nalazi se u rhombencefalonu, treća u diencefalonu, dok se lateralne

moždane komore nalaze u polutkama velikog mozga) povezane su sa središnjim kanalom kralježničke moždine (13). U šupljini mezencefalona nalazi se aqueductus mesencephali Sylvii (Slika 3).

Histogeneza središnjeg živčanog sustava uključuje procese proliferacije tj. umnažanje stanica, migracije tj. putovanje stanica prema ciljnom području, diferencijacije morfološki različitih tipova neurona, diferencijacije funkcionalno specifičnih tipova neurona, procesa razvoja sinapsi (sinaptogeneza) te posljedične uspostave specifičnih neuronskih krugova (3).

### **1.3. Procesi razvojne reorganizacije**

Tijekom razvoja, ustroj središnjeg živčanog sustava se nekoliko puta promijeni. Tako nastaju embrionalne i fetalne zone, koje su privremenog karaktera i nema ih u odraslom mozgu. Isto tako, neke vrste neurona i glija stanica postoje samo tijekom razvoja mozga, gdje imaju specifične funkcije. U početku se stanice, aksoni i sinapse u središnjem živčanom sustavu prekomjerno stvaraju, da bi tijekom daljnjeg razvoja velik dio njih propao procesom apoptoze, povlačenjem ili premještanje aksona ili prekobrojnih dendrita, nestanakom privremenih sinapsi, te promjenom neurotransmiterskog fenotipa neurona.

### **1.4. Poremećaji procesa neurulacije**

Čine ih poremećaji kralježnice i kralježničke moždine koji nastaju tijekom gastrulacije te primarne ili sekundarne neurulacije.

Poremećaji neurulacijskih procesa mogu dovesti do različitih oblika poremećenog razvoja i oblikovanja neuralne cijevi.

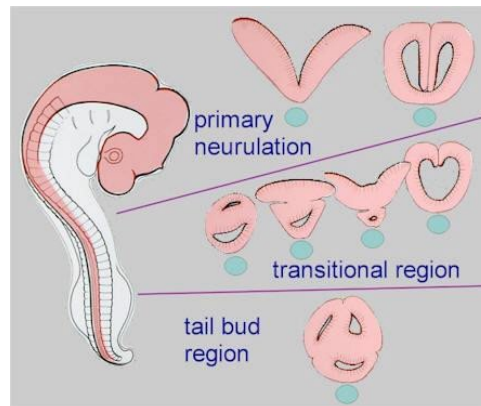
Poremećaji razvoja neuralne cijevi (engl. Neural tube defects ili NTD) mogu se podijeliti u:

1/ Otvorene, kod kojih je živčano tkivo izloženo na površini tijela. Tu spadaju poremećaji primarne neurulacije (craniorachischisis, anencephaly i meningomyelocele).

2/ Zatvorene, kod kojih je živčano tkivo prekriveno kožom. To su postneurulacijski defekti koji nastaju nakon zatvaranja kranijalnog i kaudalnog neurporusa tj. tijekom sekundarne neurulacije (hydrocephalus, Arnold-Chiary malformacija, sindrom uklještene kralježnice).

3/ Diplomyelia ili udvostručenje kralježničke moždine, koje može biti posljedica promjena u kranijalnom dijelu kralježnice (poremećaj savijanja), kaudalnom dijelu (poremećaj

rekanalizacije) ili u prijelaznoj zoni (nepravilno spajanje kranijalnog s kaudalnim dijelom kralježničke moždine) (Slika 4)



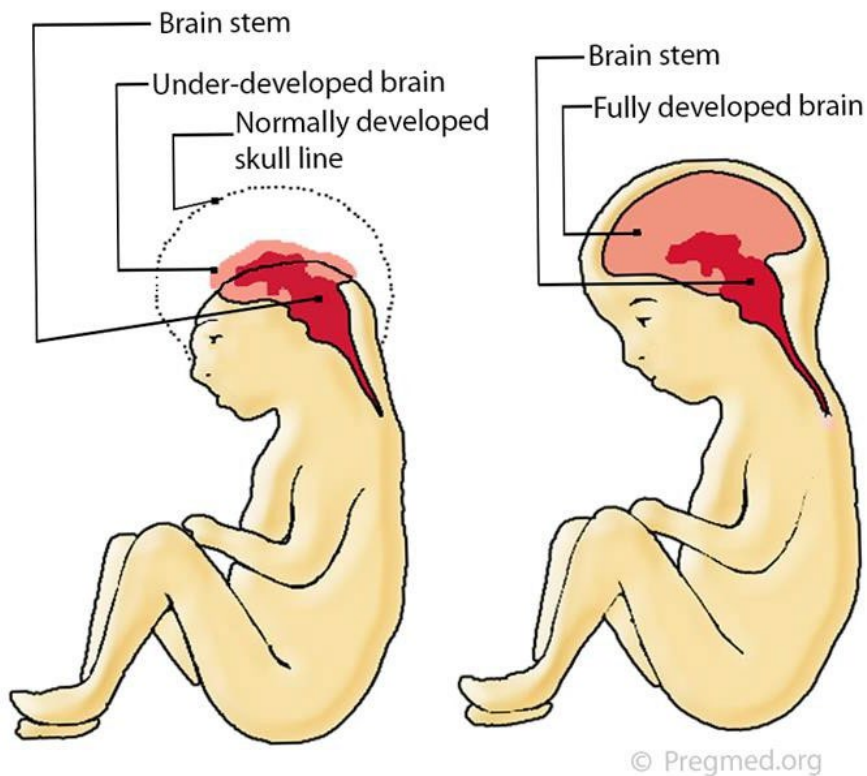
Slika 4. Primarna i sekundarna neurulacija te prijelazna zona. Preuzeto iz: *bionalogy.com, neural tube defects htm*. Različiti oblici poremećaja razvoja neuralne cijevi: histološki izgled poremećaja primarne neurulacije, prijelazne zone i sekundarne neurulacije.

Anencefalija i spina bifida čine 97% svih NDT-a. Ove anomalije najčešće su posljedica međusobnog djelovanja gena i čimbenika okoliša. U dijagnostici koristi se ultrazvuk (nakon 12 .gestacijskog tjedna) te povišene vrijednosti A-fetoproteina u serumu (14).

Spina bifida je poremećaj zatvaranja lukova kralježnice s pridruženim oštećenjem neuralne cijevi (kralježničke moždine). Unapređenjem radioloških tehnika napravljena je nova, složenija podjela rascjepa (15). Pokazano je da promjene na tkivu kralježničke moždine variraju ovisno o mjestu analize: dok je na mjestu rascjepa živčano tkivo zamijenjeno vezivnim tkivom s krvnim žilama (engl. *area cerebrovasculosa*), u niže položenim područjima oštećenje živčanog tkiva je manjeg opsega i uglavnom zahvaća slojeve u lateralnoj stjeci kralježničke moždine te poremećaj u razvoju krovne ploče (8, 16).

Istraživanja na pokusnim životinjama pokazala su da u području zahvaćenom rascjepom postoje poremećaji apoptoze i nekroze (17). Prethodna istraživanja na ljudskoj kralježničkoj moždini tijekom razvoja pokazala su apoptotski oblik stanične smrti u kranijalnim dijelovima kralježničke moždine (primarna neurulacija), dok su kaudalni dijelovi nestajali procesom masivne stanične smrti, koji ne odgovara apoptozi, nego nekrozi (18) (Slika 5).

## Newborn Having Anencephaly Fully Developed Newborn



Slika 5. Normalni i poremećeni razvoj neuralne cijevi. Preuzeto iz [fetalhealthfoundation.org/fetal-syndromes/anencephaly](http://fetalhealthfoundation.org/fetal-syndromes/anencephaly). Usporedba novorođenčeta s anencefalijom i spinom bifidom (lijevo) i zdravog djeteta (desno). Kod anencefalije sa spinom bifidom mozak je slabo razvijen, a nedostaju kosti lubanjskog svoda, a u području vrata spinalni nastavci se dorzalno nisu spojili.

## 1.5. Kralježnička moždina

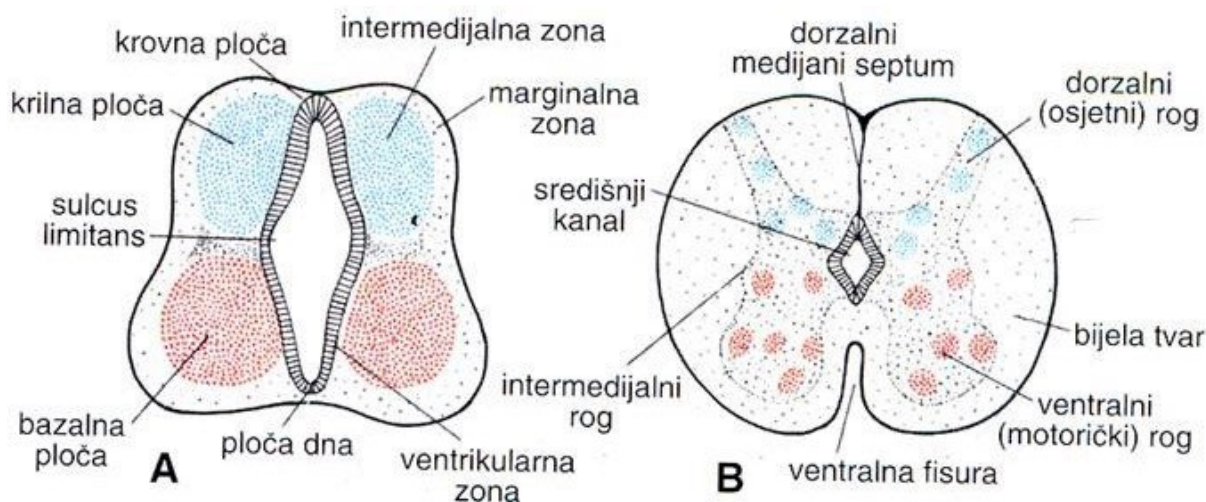
### 1.5.1. Histološka diferencijacija kralježničke moždine

Tijekom diferencijacije kranijalnog dijela kralježničke moždine (nastalog primarnom neurulacijom) diferencira se nekoliko slojeva u lateralnoj stijenci: ventrikularna zona u kojoj stanice proliferiraju, intermedijarna zona u kojoj se stanice diferenciraju (buduća siva tvar) i marginalna zona (buduća bijela tvar), koja sadrži nastavke neurona koji oblikuju ventralne, lateralne i dorzalne funikule.

Tijekom histološke diferencijacije kranijalnog dijela kralježničke moždine diferenciraju se bazalne ploče i krilne (alarne) ploče, međusobno povezane ventralnom i dorzalnom pločom, koja čini krov središnjega kanala. Iz bazalne ploče razvijaju se veći ventralni rogovi sa somatomotornim neuronima, dok se u lateralnom rogu smještaju preganglionarni visceromotorni (vegetativni) neuroni. Alarna (krilna) ploča daje dorzalne rogove, u kojima se nalaze jezgre osjetnih neurona. Granicu između motoričkih i osjetnih područja čini granični žlijeb (sulcus limitans). Funkcionalno grupiranje srodnih neurona u odijeljene rogove koje je prisutno tijekom embrionalnog razvoja, nalazi se i u odrasloj kralježničkoj moždini, pa siva tvar kralježničke moždine poprima oblik leptira. Rastom aksona kroz marginalnu zonu uspostavljaju se njihove veze s drugim dijelovima živčanog sustava. Ependimski epitel nalazi se na unutrašnjoj površini neuralne cijevi okružujući središnji kanal. U sredini prednjeg i stražnjem dijela kralježničke moždine, tanki dijelovi oblikuju *ploču dna i krovnu ploču*, koje ne sadržavaju neuroblaste, nego samo živčana vlakna koja prelaze s jedne na drugu stranu kralježničke moždine. Iz bazalnih ploča nastat će prednji rogovi s motornim neuronima, a iz krilne ploče stražnji rogovi s osjetnim neuronima. Motorni i osjetni neuroni povezuju se s većim ili manjim brojem interneurona.

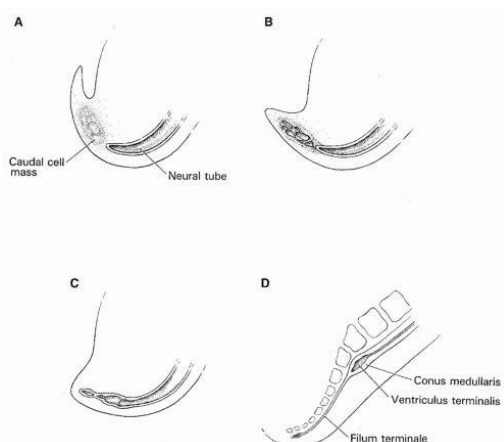
Neuroni u intermedijarnom rogu pripadaju simpatičkom autonomnom sustavu (T1-T12; L2-L3). Nakon stvaranja različitih neurona, nastaju i potporne stanice (glioblasti), koje se postepeno diferenciraju u astrocite, oligodendroglija stanica (stvaraju mijelin) i mikroglija stanice (13) (Slika 6).





Slika 6. Preuzeto iz Sadler: Langmanova medicinska embriologija, Živčani sustav.

Tijekom diferencijacije kaudalnih dijelova kralježničke moždine, ne postoje pravilni slojevi koji su svojstveni kranijalnom dijelu. Umjesto toga, nastaje nepravilan sloj višerenog neuroepitela koji okružuje uski, često nepravilan lumen. Rastom tijela embrija, kaudalni dijelovi kralježničke moždine rastom zaostaju u odnosu na koštani dio kralježnice, što se naziva ascensus medullae spinalis. U odraslih ljudi se kaudalni kraj kralježnične moždine (conus medullaris) nalazi u razini tijela lumbalnih kralježaka L1 i L2. Na tom mjestu se conus medullaris naglo sužuje, oblikujući dio kralježničke moždine bez živčanih stanica (filum terminale), dok se živčani aksoni izdužuju u obliku konjskog repa te nastaje cauda equina (6, 13) (Slika 7).



Slika 7. Preuzeto iz: [radiologykey.com](http://radiologykey.com), Congenital anomalies of the spine. A. repni pupoljak, B. kavitacija, C. regresija i uspinjanje kralježničke moždine (stanična smrt), D. Nastanak konusa terminalisa i filum terminale.

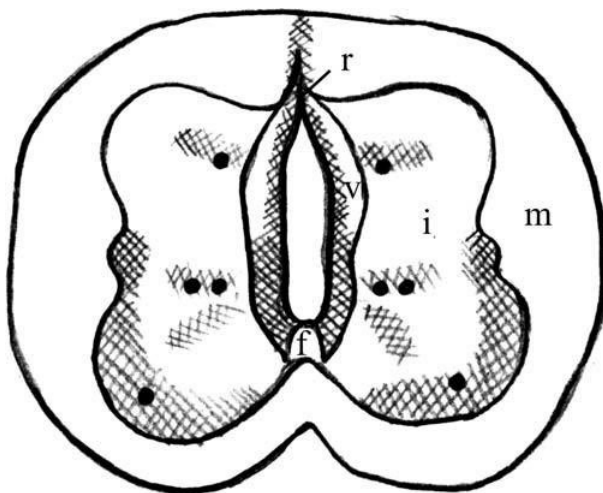


### **1.5.2. Uloga stanične proliferacije i apoptoze tijekom razvoja kralježničke moždine**

Proces neurulacije započinje umnažanjem neuroepitelnih stanica tj. staničnom proliferacijom, koja se može dokazati primjenom biljega Ki-67 (19). Dok u kranijalnom dijelu kralježničke moždine proliferacija ima ventro-dorzalni smjer i osigurava zadebljanje njezine lateralne stijenke, u kaudalnom dijelu proliferacija je nepravilno raspoređena oko središnjeg kanala.

Nakon proliferacije, slijedi diferencijacija stanica i pojava primarne cilija, koja kontrolira proliferaciju te je prisutna na površini stanica samo između staničnih ciklusa (tj. kada stanica nije u fazi proliferacije) (20,21).

Apoptoza je genetski kontrolirani oblik stanične smrti koji je tijekom razvoja uključen u mnogobrojne procese poput oblikovanja organa, uklanjanja prekobrojnih stanica te regresije kaudalnog dijela kralježničke moždine u okviru nestajanja repa (22-24). Smatra se da postoje barem tri oblika stanične smrti koji se međusobno razlikuju po morfološkim osobitostima: apoptoza, autofagna degeneracija i ne-lizosomalna degeneracija (24). U ljudskoj kralježničkoj moždini opisani su različiti oblici stanične smrti tijekom razvoja. Dok u kranijalnom dijelu prevladava apoptoza, u kaudalnom dijelu je uočen autofagni oblik masivne stanične smrti (Slika 8). Tako je utvrđeno da se uklanjanje neurona tijekom razvoja može vidjeti u svim rogovima kralježničke moždine: motornim neuronima u ventralnom rogu, autonomnim neuronima u intermedijarnom rogu i osjetnim neuronima u dorzalnom rogu. Apoptotske stanice najčešće se prikazuju imunohistokemijskim metodama za dokazivanje kaspaze-3 ili Fas liganda, te primjenom obilježavanja 3'OH-krajeva DNA fragmenata fluoreceinom označenih nukleotida (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP and labeling ili TUNEL) metode (24).



Slika 8. Stanična smrt u kralježničkoj moždini. Preuzeto iz: *Vilović i suradnici, Cell death in developing human spinal cord. Anat&Embryol, 2006, 211:1-9.* Shematski prikaz kralježničke moždine u 9. tjednu razvoja: ventrikularna zona (v), intermedijarna zona (i), marginalna zona (m), ploča dna (f), krovna ploča (r). Apoptotske stanice su prikazane kao tamne točke unutar sive tvari kralježničke moždine.

### **1.5.3. Diferencijacija neurona i glija stanica u kralježničkoj moždini tijekom razvoja**

Tijekom razvoja ljudske kralježničke moždine iz neuroepitela se prvo diferenciraju živčane stanice (neuroni), a potom i glija stanice. Postoji veliki broj biljega kojim se mogu obilježiti različite vrste neurona i glija stanica. Među ključnim biljezima su oni za intermedijarne filamente, koji se pokazuju smjer diferencijacije stanica kralježnične moždine. Već tijekom ranog embrionalnog razvoja (u 5. tjednu), u kralježničkoj moždini se mogu uočiti različiti neuroni, npr. motorni neuroni, pozitivni na biljeg NF200 (panneuronalni intermedijarni filament), koji se prvo uočavaju u prednjim rogovima, a zatim u marginalnoj zoni (25). Glija stanice, koje se razvijaju nešto kasnije, pozitivne su na intermedijarne filamente poput vimentina i GFAP-a (glijalni fibrilarni kiseli protein), a prvo se pojavljuju u radijalnoj gliji (21).

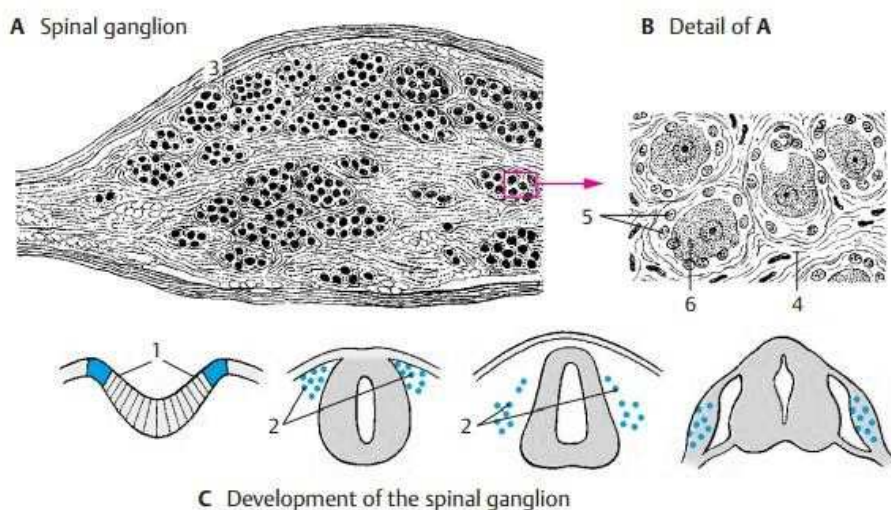
## **1.6. Spinalni (dorzalni) gangliji**

### **1.6.1. Razvoj i diferencijacija spinalnih ganglija**

Tijekom procesa neurulacije, stanice neuralnog grebena odvajaju se od rubova neuralne cijevi, grupiraju se i migriraju, smještajući se neposredno uz neuralnu cijev te oblikuju tako spinalne ganglije. U području kranijalne neuralne cijevi (primarna neurulacija), spinalni gangliji protežu se od vratnog do sakralnih (križnih) kralježaka, dok u području sekundarne neurulacije (najkaudalnija područja) spinalnih ganglija nema (21). Već u 5. tjednu embrionalnog razvoja čovjeka, uočava se početna diferencijacija neurona za bol (nociceptora) i dodir (mehanoreceptora). Urastanje dorzalnih korjenova spinalnih ganglija u kralježničku moždinu te izrastanje eferentnih nastavaka spinalnih živaca (motornih neurona) prema perifernim organima, omogućuje prijenos osjetnih informacija prema i od središnjeg živčanog sustava (21). Uz živčane stanice, gangliji sadrže i satelitske stanice te krvne žile uložene u vezivno tkivo (26) (Slika 9). Makrofagi te T i B limfociti također se nalaze u ganglijima (27). U početku su neuroni iste veličine ali se od 6. tjedna počinju se razlikovati na male, srednje velike i velike. Neuroni spinalnih ganglija se pseudounipolarni, okruženi satelitskim stanicama čiji se broj povećava tijekom razvoja. Vjeruje se da satelitske stanice sudjeluju u imunološkom odgovoru (28). Istraživanja na ljudskim ganglijima pokazala su značajne razlike u imunoreaktivnosti u odnosu na životinjske spinalne ganglije. Usprkos velikim sličnostima između ljudskih i životinjskih

ganglija, istraživanja ljudskih ganglija su ključna za prijenos translacijskih istraživanja u praksu i primjenu stečenih znanja u mogućoj terapiji na pacijentima (29).

Imunohistokemijska istraživanja diferencijacije neurona i glija stanica tijekom razvoja ganglija u čovjeka pokazala su rani razvoj neurona primjenom biljega NF200 (za sve vrste neurona), dok su se podtipovi neurona (osjetni, motorni) pokazali nešto kasnije, tijekom daljnje diferencijacije ganglijskih stanica (21). Stanice koje su u ganglijima intenzivno proliferirale tijekom ranog razvoja pripadaju najvjerojatnije skupini stanica neuralnog grebena (pozitivne su na biljege nestin i S100). Stanice pozitivne na GFAP upućuju na razvoj Schwannovih i satelitskih stanica. Slično kralježničkoj moždini, diferencijacija stanica ganglija imala je ventro-dorzalni smjer, tj. prvo su se diferencirali prednji, ventralni dijelovi ganglija, a zatim i ostali (30).



Slika 9. Razvoj spinalnih ganglija. Preuzeto iz: [https://www.brainkart.com/article/Spinal-Ganglion-and-Posterior-Root---Spinal-Cord\\_14758/](https://www.brainkart.com/article/Spinal-Ganglion-and-Posterior-Root---Spinal-Cord_14758/). A Organizacija spinalnog ganglija, B (detalj od A). Pseudounipolarni neuroni, satelitske stanice i vezivo, C. nastanak i migracija stanica neuralnog grebena u spinalni ganglij.

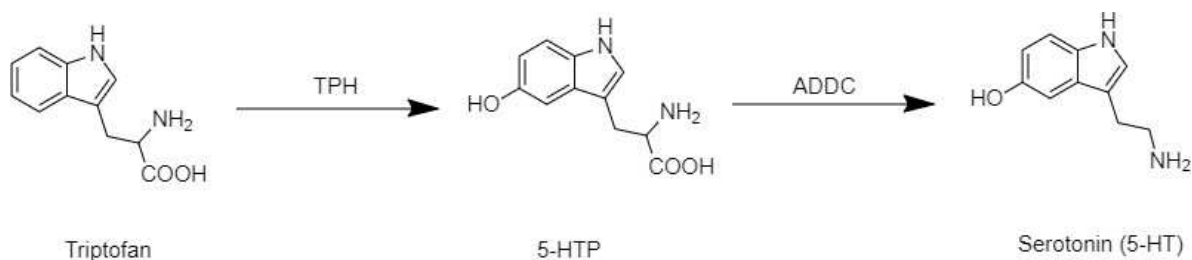
## 1.7. Serotonin

Serotonin nastaje iz aminokiseline triptofana u dvije faze, tj. prvo se triptofan hidroksilira u 5-hidroksitriptofan, a zatim dekarboksilira triptofan dekarboksilazom u serotonin (5-hidroksitriptamin) (Slika 10). Serotonin se može vezati za 13 različitih G-protein vezanih

receptora i nekoliko ionskih kanala. Serotoninski receptori su podijeljeni u sedam tipova (5-HT1 do 5-HT7), sam serotonin je raširen po čitavom tijelu te se može pronaći u mozgu, plućima i

gastrointestinalnom sustavu. U središnjem živčanom sustavu, serotonin je neurotransmiter koji je uključen u brojne mehanizme i ponašanja, uključujući apetit, spavanje, agresivnost i slično. Tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava, serotonin osim što obavlja funkciju neurotransmitera, također kontrolira i razvoj serotoniniski 5-HT neurona. Kako se serotonin pojavljuje rano tijekom embrionalnog razvoja, smatra se da utječe na razvoj, oblikovanje i organizaciju središnjeg živčanog sustava. Tako u ljudskom mozgu razvoj serotoniniskog sustava započinje već u 5. tjednu razvoja, te mu razina raste do druge godine života, a zatim počinje opadati. U djece je koncentracija serotonina znatno veća nego u odraslih. U štakora, razvoj serotoniniskog sustava započinje 12. dan gestacije, a maksimalnu razinu doseže 21. postnatalnog dana (31-33).

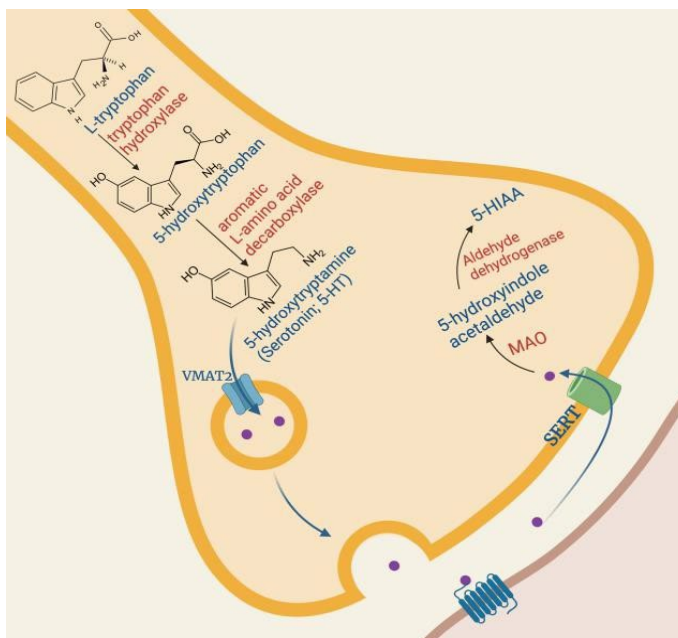
Serotonin u mozgu proizvode serotonergični neuroni čija su tijela grupirana u devet jezgara rafe, koje su podijeljene u dvije skupine: rostralnu skupinu i kaudalnu skupinu. Serotonergični neuroni iz kaudalne skupine jezgara rafe projiciraju svoje aksone prema kralježničkoj moždini i moždanom deblu. Neuroni rostralne skupine jezgara rafe projiciraju aksone prema dijelovima kore velikog mozga, koji obnašaju funkcije poput sluha, njuha, vida i dodira. Također se projiciraju u područja kore s višim funkcijama kao što su mišljenje, pamćenje i govor, (33).



Slika 10. Sinteza serotonina iz triptofana. Preuzeto iz: <https://brainstuff.org/blog/how-is-serotonin-synthesized-raphe-nucleus>

### 1.7.1. Sinteza serotonina u živčanom sustavu čovjeka

Većina serotonina u središnjem živčanom sustavu se sintetizira u tijelima neurona, a zatim pohranjuje u aksonskim završecima presinaptičkih neurona. Serotonin se prvenstveno u sintetizira u područjima srednjeg mozga i mosta. Nakon sinteze, serotonin se pohranjuje u mjehurićima koji priliježu na presinaptičku staničnu membranu uz pomoć tri membranska proteina (tzv. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors ili SNARE proteini), od koji se jedan (sinaptobrevin) nalazi se na samoj membrani mjehurića, dok se druga dva (Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa ili SNAP-25 i sintaksin) nalaze na staničnoj membrani. Prisutnost kalcija u blizini aktivnog mjesta omogućuje povezivanje stanične membrane neurona i membranae mjehurića, uzrokujući početak procesa egzocitoze serotonina u sinapštičku (sinaptobrevin) nalazi se na samoj membrani mjehurića, dok se druga dva (Synaptosomal-pukotinu(3U sinaptičkoj pukotini serotonin se može vezati na receptore postsinaptičkog neurona ili se može vratiti na autoreceptore na presinaptičkoj membrani. Vezanjem na autoreceptore, blokira se otpuštanje serotonina na presinaptičkom neuronu. Ponovni unos serotonina u citosol presinaptičkog neurona kontrolira membranski unositelj 5-TH (SERT). Enzim monoamin oksidaza (MAO) metabolizira 5-HT ili ponovno ga skladišti u mjehuriće (33, 35-37) (Slika 11).



Slika 11. Sinteza i razgradnja serotonina. Preuzeto iz: Poian et al. Cureus 2023, 15(5): e38897. DOI 10.7759/cureus.38897. Sintetizirani 5-HT ulazi u mjehuriće pomoću transportera VMAT, iz

mjehurića se oslobađa u sinaptičku pukotinu, a dio se vraća u presinaptički završetak uz pomoć transportera SERT.

### **1.7.2. Razvoj serotoninskih receptora u čovjeka i njihove projekcije u kralježničkoj moždini**

Istraživanja neuropeptida i neurotransmitera tijekom razvoja čovjeka pokazala su da se oni prisutni već tijekom najranijih razvojnih faza, te da njihova interakcija ima važnu ulogu u oblikovanju središnjeg živčanog sustava. Serotoninska mreža neurona jedna je od najranijih koje se pojavljuju tijekom razvoja. U nezrelom mozgu, serotonin ima ulogu čimbenika rasta koji utječe i na proliferaciju i na smrt neurona. Na normalan razvoj serotoninskih receptora mogu utjecati drugi neurotransmiteri i neuromodulatori. Promjene u razini serotonina također se mogu povezati s poremećajima u prehrani, povećanim stresom i primjenom droga i alkohola (33). Pokazalo se da dopamin ima negativan utjecaj na razvoj serotoninskih receptora, dok supstancija P i ACTH potiču njihov rast.

5-HT<sub>1a</sub> receptor pripada grupi neurotransmitera koji se mogu nazvati prolaznim tj. on je tijekom razvoja prisutan samo u određenom vremenskom razdoblju, a zatim se njegova koncentracija sve više smanjuje. On djeluje poticajno na rast serotoninskih neurona kao i na neurone u ciljnim područjima. Nedostatak ovog receptora povezuje se s razvojem Alzheimerove bolesti, a prisutan je kod Downovog sindroma (38). Također se pokazalo da ovaj receptor utječe na adenil ciklazu, aktivira kanale za kalij, a inhibira kanale za kalcij. Općenito se smatra da on ima inhibitorno djelovanje tj. da smanjuje neuronsko okidanje (prijenos signala) (35).

5-HT<sub>1b</sub> receptor se pojavljuje u mozgu prvenstveno u bazalnim ganglijima, a djeluje kao autoreceptor u kontroli oslobađanja mjehurića sa serotoninom. U velikim koncentracijama nalazi se u koroidnom spletu, dok je u drugim područjima varijabilno zastupljen u niskim koncentracijama.

5-HT<sub>2</sub> receptor je široko rasprostranjen u mozgu, prvenstveno u moždanoj kori. Ne pojavljuje se prolazno tijekom razvoja, nego se pojavljuje postnatalno i zatim postepeno raste. Ovaj receptor prvenstveno potiče (ekscitira) neurone, a nalazi se u postsinaptičkim područjima projekcijskih neurona i inhibitornih interneurona.

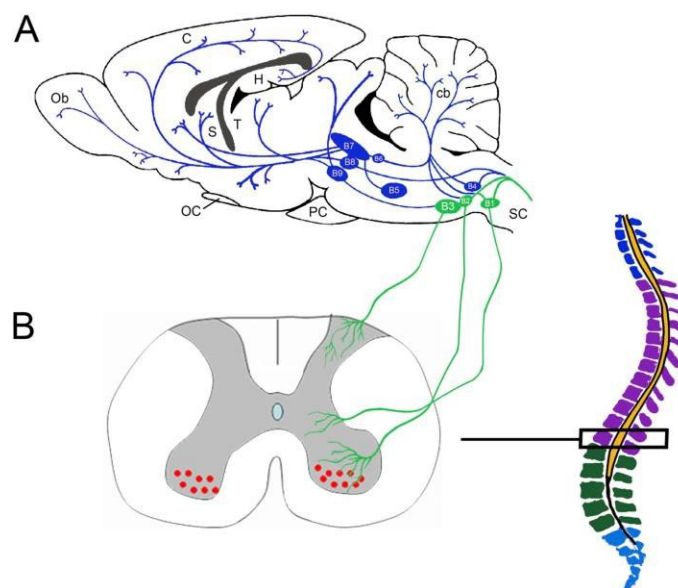
5-HT<sub>3</sub> je ionski kanal koji prvenstveno transportira kalij. Ograničeno je raspoređen u živčanom sustavu, a nalazi se prvenstveno u kralježničkoj moždini i hipokampusu te na još nekim drugim mjestima. Ima inhibitorno djelovanje na razvoj serotoninskih neurona. Ovaj receptor je

neselektivni kationski kanal, koji uzrokuje brzu depolarizaciju membrane. Presinaptički 5-HT<sub>3</sub> receptori uzrokuju oslobađanje neurotransmitera, dok postsinaptički 5-HT<sub>3</sub> receptori povećavaju aktivnost i projekcijskih neurona i inhibitornih interneurona.

Navedeni serotonininski receptori pokazuju značajne razlike u izražaju genskih profila, ovisno o njihovom anatomskom položaju i razvojnoj liniji (39). Uz to, 5-HT neuroni pokazuju značajne razlike u neurofiziološkoj aktivnosti unutar iste jezgre.

Tijekom embrionalnog razvoja, 5-HT aksoni prvo se pojavljuju u vratnom (cervikalnom) području, a zatim se postepeno proširuju prema torakalnim i lumbalnim segmentima (33, 35, 36, 40-42).

Kaudalne projekcije 5-HT receptora međusobno se ne preklapaju, nego završavaju u specifičnim poljima na različitim razinama kranio-kaudalne osi kraljezničke moždine. Tako raphe magnum prvenstveno daje dorzalne projekcije koje inerviraju lamine I i II u stražnjim rogovima, dok 5-HT projekcije u prednjim rogovima dolaze iz raphe obscurus. Projekcije 5-HT receptora iz raphe pallidus inerviraju intermedijarni rog kraljezničke moždine (43). Dok se u ventralnom i intermedijarnom rogu 5-HT projekcije oblikuju klasične sinapse (aksodentritične i aksosomatične) s motornim neuronima, dorzalne 5-HT projekcije ne oblikuju klasične sinapse, nego neurotransmiter difundira kroz međustanični prostor prije nego dosegne ciljni receptor. Funkcionalno, 5-HT receptori u kraljezničkoj moždini moduliraju motorne, osjetne i autonomne funkcije ali i druge neurotransmitterske sustave, uključujući glutamatne i GABA (41). (Slika 12).





Slika 12. Serotoninska inervacija središnjeg živčanog sustava. Preuzeto iz: *F.E. Perrin i H.N. Noristani: Serotonergic mechanisms in spinal cord injury. Exp Neurol 2019; 318: 174-191.* Serotoninska inervacija središnjeg živčanog sustava. A- Rostralne (plavo) i kaudalne (zelene) 5-HT projekcije. B. 5-HT inervacija kralježničke moždine u sva tri roga kralježničke moždine (zeleno), motorni neuroni (crveno).

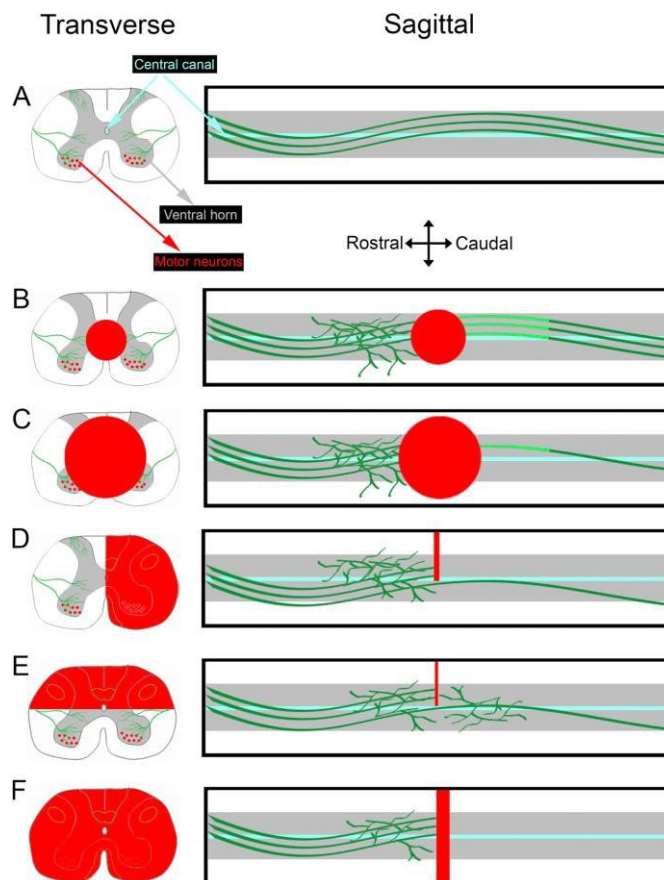
### 1.7.3. Poremećaji u radu serotoninskih receptora

Poremećaj u radu serotoninskih receptora smatra se uzrokom različitih psihičkih bolesti poput shizofrenije, depresije, dječjeg autizma i opsesivno kompulzivnog poremećaja. Istraživanja su pokazala vezu između niske razine serotonina i agresivnog ponašanja te suicidalnih misli (44). Također je pokazano da s jedne strane agonizam 5-HT<sub>1A</sub> receptora može djelovati povoljno na navedene poremećaje, dok suprotno od navedenog agonizam 5-HT<sub>2A</sub> receptora u miševima ima nepovoljan utjecaj. U ljudi je djelovanje još složenije, te agonizam može utjecati i smirujuće i anksiogeno, dok antagonizam djeluje opuštajuće (anksiolitički). Povišena razina stresa može biti okidač za otpuštanje serotonina u mozgu. Pokazalo se da su učinci 5-HT<sub>2A</sub> vrlo ovisni o vanjskim uvjetima djelovanja na sinapse (45). Aktivacija postsinaptičkih 5-HT<sub>1A</sub> receptora može djelovati nepovoljno na kognitivne sposobnosti i učenje, dok s druge strane aktivacija 5-HT<sub>2A</sub> receptora povećava sposobnost učenja (46). Osim navedene uloge serotonina u različitim oblicima ponašanja, novija istraživanja pokazuju da tijekom embrionalnog razvoja serotonin može djelovati kao čimbenik rasta. Ova uloga serotonina omogućena je prisutnošću različitih serotoninskih receptora, od kojih neki indirektno potiču rast neurona (5-HT<sub>1a</sub>), dok drugi djeluju inhibitorno na razvoj serotoninskih neurona (5-HT<sub>3</sub>) (33). 5-HT serotoninski neuroni pokazuju složeno modulatorno djelovanje na bol, kako u poticanju tako i u smanjenju bolne senzacije (47). Na sličan način 5-HT može pomagati ili smanjivati motoričke funkcije.

Istraživanja su pokazala da serotonin osim u području psihijatrije i neurologije zbog svojih djelovanja u okviru središnjeg živčanog sustava, također ima važno djelovanje i u ostalim organskim sustavima poput probavnog, krvožilnog, dišnog, mokraćnog i endokrinog sustava. Stoga treba očekivati da će primjena odgovarajućih lijekova koji djeluju na jedan od serotoninskih receptora imati efekte i izvan ciljanog organskog sustava, npr. uzimanje antidepresiva utječe i na pokretljivost crijeva i na srčanu funkciju (48).

#### 1.7.4. Oblici oštećenja kralježničke moždine i serotoniniski receptori

Prijenos serotonina u kralježničkoj moždini od presudnog je značenja u moduliranju motornih, osjetnih i autonomnih živčanih funkcija. Nakon povrede kralježničke moždine, živčana vlakna ispod mjesta oštećenja degeneriraju, a stupanj oštećenja je proporcionalan težini i obimu oštećenja. Iznad mjesta oštećenja 5-HT neuroni bujaju i niču, neovisno o težini oštećenja. Mnogobrojna istraživanja pokazuju da povećana aktivnost serotoniniskih 5-HT receptora potiče bujanje aksona i u neoštećenom središnjem živčanom sustavu. Štoviše, serotonin ima pro-regenerativnu ulogu kod oštećenja neurona te pospješuje funkcionalni oporavak nakon povrede kralježničke moždine. 5-HT modulira aktivnost motoričkih neurona ovisno o razini uzduž kranio-kaudalne osi kralježničke moždine na kojoj se serotonin oslobađa, kao i o specifičnom smještaju receptora unutar kralježničke moždine (49). (Slika 13).



Slika 13. Serotoniniska inervacija nakon različitih povreda kralježničke moždine. Preuzeto iz:

F.E. Perrin i H.N. Noristani: Serotonergic mechanisms in spinal cord injury. *Exp Neurol* 2019; 318: 174-191.

A. 5-HT aksoni i zdravoj kralježničkoj moždini i njihov odgovor na B. blagu

ozljedu (kontuziju), C. tešku ozljedu, D. lateralnu hemisekciju, E. dorzalnu hemisekciju, F. kompletnu sekciju. Vidi se bujanje aksona iznad mjesta povrede.

Istraživanja na pokusnim životinjama pokazala su različite oblike oštećenja kralježničke moždine. U slučajevi blažih i težih oblika nagnječenja kralježničke moždine, uočava se povećana aktivnost 5-HT neurona iznad mjesta oštećenja. Pri tome, kod lakšeg se oštećenja kralježničke moždine povećana aktivnost uočava već dva dana nakon povrede, dok se kod težih oblika nagnječenja porast aktivnosti 5-HT pojavljuje dva tjedna nakon povrede. Kod lateralne hemisekcije, koja uključuje odstranjenje jedne strane kralježničke moždine, aktivnost 5-HT neurona povećava se tjedan dana nakon povrede (50). Slično navedenom, aktiviranje 5-HT neurona vidi se nakon 8 dana u slučaju dorzalne hemisekcije tj. uklanjanja cijelog stražnjeg dijela kralježničke moždine, kao i kod potpunog prekida kontinuiteta kralježničke moždine (38, 40, 51-57). U svim navedenim slučajevima pokazano je da serotoninski neuroni kaudalno od oštećenja degeneriraju, dok se kranijalno od oštećenja povećava gustoća serotoninskih 5-HT neurona. U slučaju nepotpunog prekida kralježničke moždine, popravak oštećenja je posljedica nicanja aksona iz preostalih sačuvanih neurona ili regeneracije iz oštećenih neurona. Sličan oblik regeneracije neurona dokazan je i kod moždanog infarkta i neurodegenerativnih bolesti (58,59). Mogući mehanizmi regeneracije uključuju izlučivanje čimbenika rasta i b - integrina (60) ili odsustvo sinapsi, koje djeluje poticajno na regeneraciju (61).

U čovjeka, oštećenje kralježničke moždine uzrokuje promjene i motoričkih i osjetnih funkcija, što u pacijenata može dovesti do značajnih tjelesnih i psihičkih poremećaja. Kod primarnog oštećenja kralježničke moždine, vanjska sila uzrokuje pritisak, istezanje i slična djelovanja na kralježničku moždinu. Kod sekundarnog oštećenja, koje se nadovezuje na primarno, dolazi do upalnih procesa u oštećenom području. Upala je rezultat migracije mikroglija stanica, limfocita i neutrofila u mjesto povrede s pratećim oštećenjem barijere krv-kralježnička moždina i oslobađanjem različitih citokina i interleukina (63).

### **1.8. Histološke osobitosti ožiljka nakon povrede kralježničke moždine i funkcionalne posljedice**

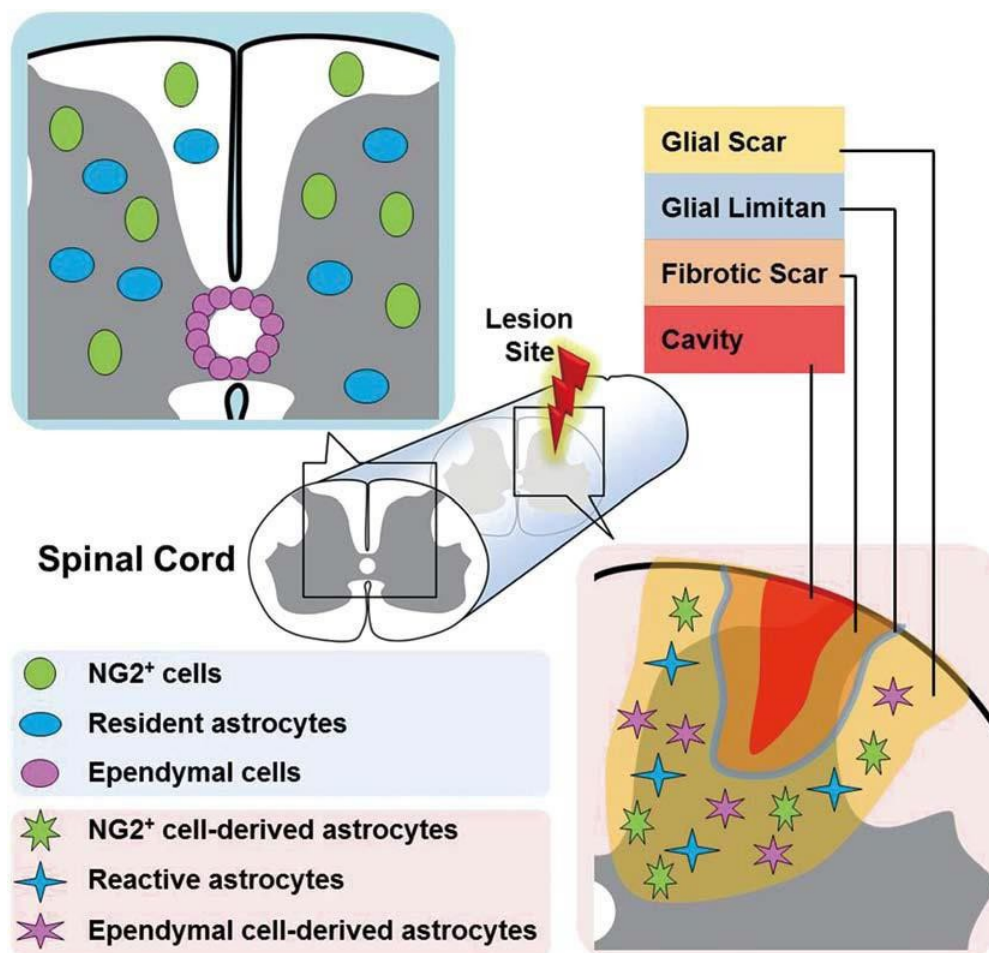
Oštećenje kralježničke moždine povezano je s poremećajem u mikro-strukturi kralježničke moždine, praćeno ograničenom regeneracijom i nepotpunim funkcionalnim oporavkom u odraslih jedinki. Nakon teške povrede kralježničke moždine, dolazi do bujanja i transformacije astrocita u tzv. reaktivne astrocite, koji se morfološki i genetički značajno mijenjaju. Oni su glavna komponenta glijalnog ožiljka, koji uz astrocite sadrži i ostale stanice moždine kao i krvne

stanice (iz oštećenih krvnih žila). Glijalni ožiljak predstavlja zapreku regeneraciji aksona u kralježničkoj moždini zbog svoje nepravilne organizacije, kao i prisustva međustanične tvari poput hondroitin sulfat proteoglikana, koje izlučuju reaktivni astrociti. Ožiljno tkivo u sredini sadrži fibrozni ožiljak s fibroblastima i nakupljenim kolagenom. Na površini se nalazi glijalna granična membrana, koja odvaja fibrozni od glijalnog dijela ožiljka. Glijalni ožiljak nastaje kao posljedica glioze, u kojoj se nalazi mreža nastavaka reaktivnih astrocita oblikujući tako fizičku barijeru rastu aksona nakon povrede (63). Reaktivni astrociti također pojačano izlučuju komponente međustanične tvari, od kojih je najvažniji pripadnici obitelji hondroitinsulfat proteoglikana (neurocan, versican, bravican), koji inhibiraju izrastanje aksona i progenitora oligodendrocita, a također kontroliraju aktivnost mikroglije (64, 65). Stanice u području glijalnog ožiljka potiču iz područja iznad povrede i pokazuju povećanje izražaja citoskeletnih proteina, kao i stanice koje useljavaju iz udaljenih područja (npr. ependimske stanice i neuroregenerativne ili NG<sup>+</sup> stanice).

Istraživanja na različitim životinjskim modelima pokazala su da nakon povrede kralježničke moždine dolazi do značajnih molekulskih promjena koje dovode do nastanka glijalnog ožiljka (npr. BMP, MMP, EFGR itd).

U akutnoj i subakutnoj fazi, glijalni ožiljak odvaja oštećeno tkivo kralježničke moždine od barijere krv-kralježnička moždina, nastaje upalni odgovor i masivna stanična degeneracija (66), dok kronični ožiljak ima štetni učinak kao dugotrajna fizička i kemijska barijera rastu aksona (Slika 14).

Neki istraživači navode postojanje triju zona unutar ožiljka, tj. fibrozna, stanična (celularna) i zona aksona. Fibrozna zona nastaje urastanjem pije mater u oštećeno područje, dok celularnu zonu čine mlade Schwannove stanice koje urastaju iz dorzalnih ganglija i sudjeluju u mijelinizaciji preostalih aksona (67).



Slika 14. Ožiljak nakon povrede kralježnice. Preuzeto iz Ji.MinYuan i Cheng He The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull.* 2013 Aug; 29(4): 421–435. Shematski prikaz stanica koje izgrađuju glijalni ožiljak kod povrede kralježničke moždine.

U pokusnih životinja je nakon povrede uočeno naticanje aksona i njihova degeneracija, koje su bile praćene demijelinizacijom. Također su uočene promjene u aksoplazmi, te djelomične paranodalne abnormalnosti mijelina (68).

Nakon povrede kralježničke moždine, najizraženije su motoričke smetnje (hodanje), koje su naročito izražene kod povrede cjelokupne kralježničke moždine. Istraživanja na bolesnicima su pokazala su prateće pojave smanjenje sive tvari u primarnom motornom korteksu, medijalnom prefrontalnom području i u cingulumu te u malom mozgu. Također su uočena oštećenja kortikospinalnog i kortikopontinog puta. Navedene promjene mogu negativno utjecati na oporavak nakon povrede (69). Nakon prvog vala oštećenja, koji se očituje mišićnom paralizom i odsustvom odgovora na osjetnu stimulaciju, pojavljuje se ograničen ali značajan spontani oporavak oštećenja. Ovaj je oporavak posljedica unutrašnjih pokretača oporavka, poput bujanja.

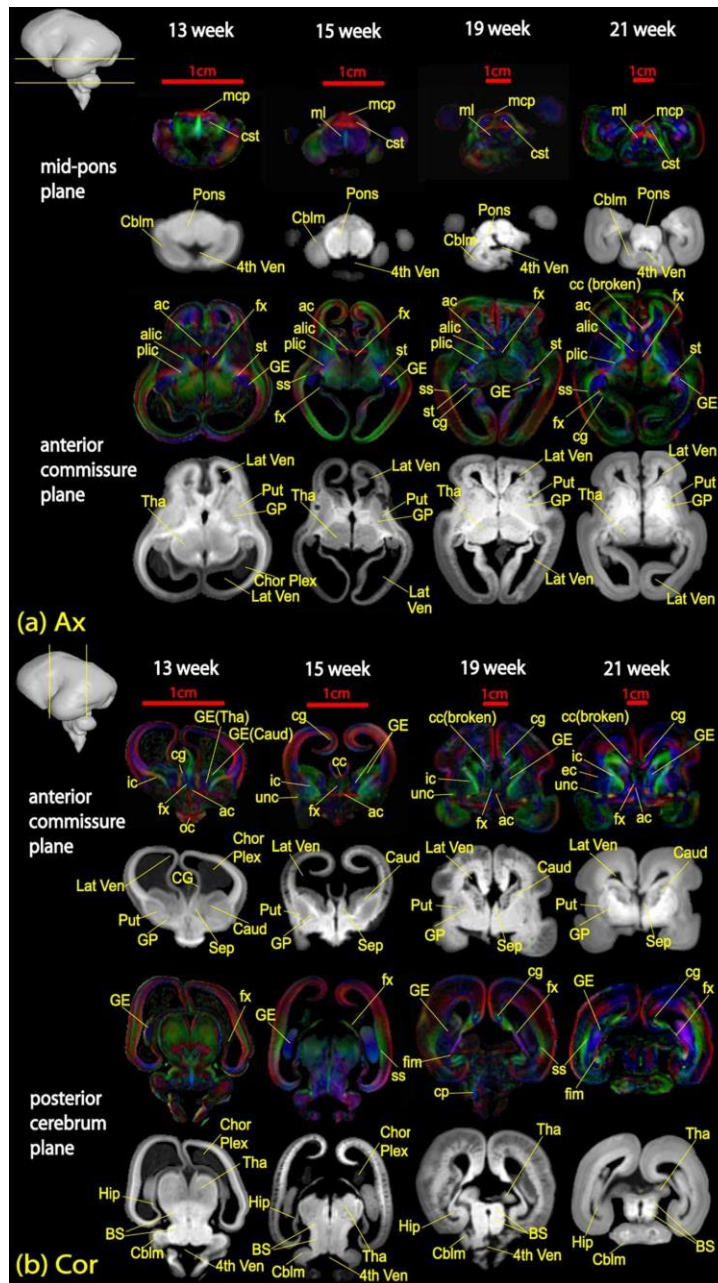
neoštećenih aksona u kralježničkoj moždini u cilju uspostavljanja novih veza oko i kroz mjesto oštećenja. Iako ovaj spontani oporavak ima značajan udio u oporavku nakon ozljede, u nekim slučajevima može nastati pretjerano i nekontrolirano bujanje aksona (70). Istraživanja su pokazala da oštećenja kralježničke moždine dovode do promjena u perifernom živčanom sustavu (gangliji i periferni živci). Uočeno je da dok neuroni u središnjem živčanom sustavu ne mogu regenerirati, oni u perifernom živčanom sustavu regeneriraju zahvaljujući aktivaciji RAG (engl. regeneration-associated gene) gena. Nakon povrede kralježničke moždine, unutar spinalnih ganglija, neki neuroni pokazuju bujanje perifernog i centralnog nastavka (71, 72).

### **1.9. Primjena radioloških metoda u praćenju razvoja i oštećenja središnjeg živčanog sustava**

Magnetska rezonancija (MR) je važna metoda u praćenju razvoja i slikovnog trodimenzionalnog prikaza središnjeg živčanog sustava. Naime, iz serijskih presjeka neuralne cijevi može se dobiti trodimenzionalna slika embrija u različitim ravninama. Također je moguće povećanjem MR slika uočiti velike strukturne anomalije (ukoliko su prisutne) (73). Primjenom difuznog tenzijskog prikaza (DTI) mogu se pratiti važna zbivanja u razvoju mozga tijekom drugog trimestra intrauterinog razvoja, kada se uspostavljaju važni moždani putovi. Također su uočene promjene u povećanju bazalnih ganglija i drugih jezgara u mozgu koja se razvijaju tijekom posljednje trimestra razvoja. U usporedbi s klasičnim histološkim rezovima, primjena ove metode omogućuje bolju trodimenzionalnu rekonstrukciju i kvantifikaciju promjena unutar ljudskog mozga tijekom razvoja (74) (Slika 15).

Primjena MR omogućuje prepoznavanje promjena u mozgu koje su povezane sa shizofrenijom. Kod takvih pacijenata uočava se smanjeni neuropil (neuroglija) i povećana količina neurona, vidi se i smanjeni volumen u temporalnom i frontalnom režnju (75). Kod disleksije, može se uočiti distopija neurona te poremećaj moždane arhitekture u različitim područjima mozga (76). Razvoj mozga je dugotrajan proces, posebice sinaptogeneza i mijelinizacija, koje se nastavljaju u razdoblje tijekom puberteta.

Primjenom istih metoda mogu se pratiti terapijski učinci nakon oštećenja središnjeg živčanog sustava.



Slika 15. Usporedba histoloških rezova s magnetskom rezonancijom. Preuzeto iz: Hao Huang i sur. Anatomical Characterization of Human Fetal Brain Development with Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging (2009).

## 1.10. Terapijske mogućnosti regeneracije oštećene kraljezničke moždine

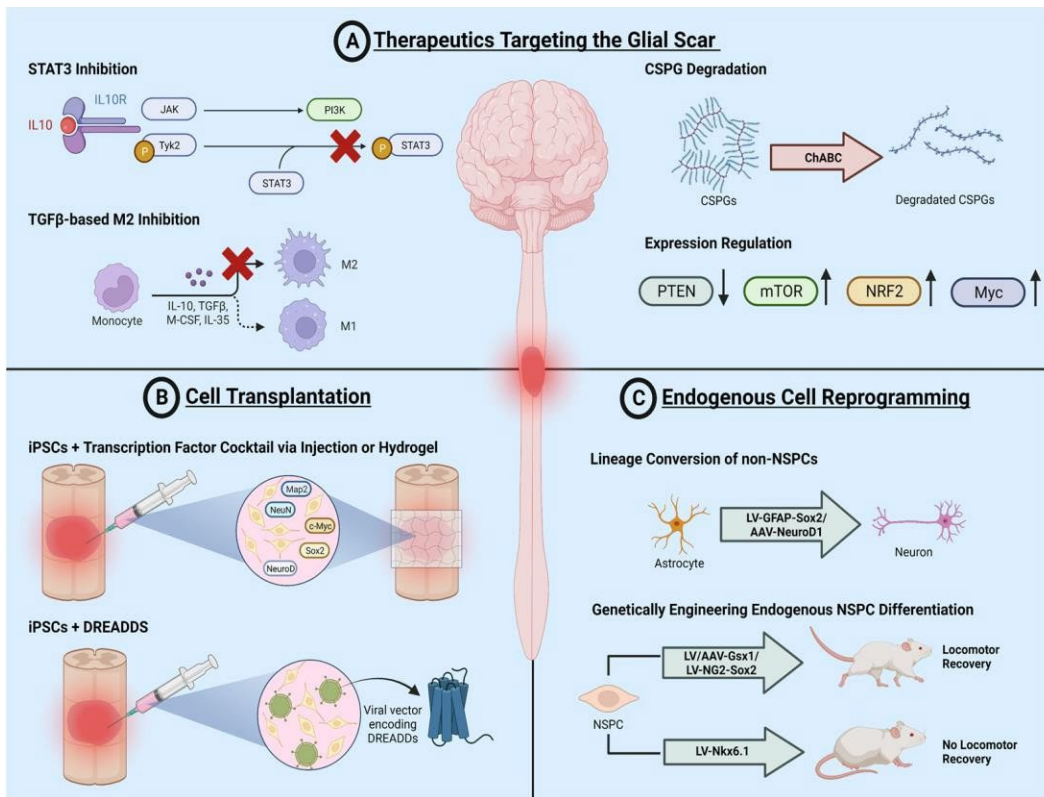
Istraživanja na pokusnim životinjama su pokazala da samo dugotrajna primjena prekursora 5-HT (5-HTP) ili samog 5-HT, u kombinaciji s još nekim drugim lijekovima ili elektrostimulacijom može dovesti do poboljšanja motoričkih funkcija nakon povrede kraljezničke moždine (77).

Jedna od terapijskih metoda istraživanih u štakora s povrijeđenom kraljezničkom moždinom uključuje transplantiranje tkiva rafe u oštećeno područje, što potiče re-inervaciju u 5-HT ciljnim područjima i popravljaju motoričku funkciju nakon povrede (78).

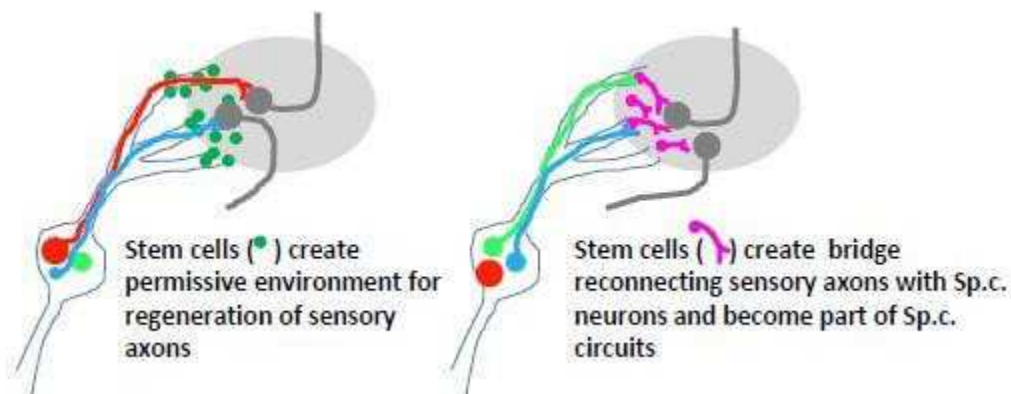
Neka istraživanja su primjenjivala istovremenu staničnu transplantaciju i primjenu poticanja unutrašnjih pro-regenerativnih puteva kao što je to podizanje razine cikličkog AMP, neurotropina i hondroitinaze (79). Međutim, jedino je primjena lijeka koji potiču rapamicin (mTOR) signalni put dovela do nicanja aksona ispod mjesta oštećenja (80). Novija istraživanja pokazala su značajan napredak u terapijskom pristupu liječenja oštećenja kraljezničke moždine. To uključuje primjenu neuroprotektivnih lijekova poput glukokortikoida (djeluju protuupalno), blokatora ionskih kanala (npr. rilurola) te primjenu raznih drugih tehnika poput drenaže cerebrospinalne tekućine i hipotermije (81). Također je istraživana primjena neuroregenerativnih čimbenika poput inhibitora Rho-rock i anti NOGO te neuroregenerativni postupci kao što je terapija matičnim stanicama, multipotentnim progenitorskim stanicama, te primjena glija stanica iz njušnjog područja (82, 83). Kod povrede kraljezničke moždine, često nije dovoljna samo primjena matičnih stanice, nego se dodaje različite pomoćne tvari poput kolagena, laminina, fibronektina i umjetnih biomaterijala (84). Od novijih tehnika, treba istaknuti primjenu miRNA-126, primjenu epiduralne elektrostimulacije (EES) te primjenu sučelja mozga i računala kojom se namjere iz mozga nastoje prenijeti na periferiju (85-87). Većina terapija primjenjuje se na pokusnim životinjama, a neke i na čovjeku, od kojih svaka ima i neke svoje nedostatke (88) (Slika 16). U terapiji se posebno ističe rapamicin, za kojeg se smatra da povećava autofagiju i Akt signalni put, smanjujući tako staničnu smrt što ima neuroprotektivnu ulogu nakon povrede kraljezničke moždine (89).

Uz navedene terapijske pristupe, moguće je djelovati na pridružene promjene u spinalnim ganglijima transplantacijom matičnih stanica u područje ganglija, koje može potaknuti regeneraciju samih osjetnih neurona (čija tijela leže u ganglijima) ili interneurona u kraljezničkoj moždini (90) (Slika 17).





Slika 16. preuzeto iz Clifford i sur.: Najnovija stanični i molekularni pristup liječenju povreda kralježničke moždine. A. Terapija glijalnog ožiljka, B. transplantacija stanica, endogeno stanično reprogramiranje



Slika 17. Preuzeto od Aldskogius i Kozlova, 2021. Transplantacija matičnih stanica u područje spinalnih ganglija. Regeneracija osjetnih neurona spinalnih ganglija (lijevo), regeneracija interneurona u kralježničkoj moždini.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

## **2.1. Ciljevi istraživanja**

Ciljevi istraživanja su primjenom dvostruke imunofluorescencije na normalnom i patološki promijenjenom tkivu kraljezničke moždine čovjeka tijekom razvoja istražiti:

- 1/ izražaj serotoninskih receptora (5-HT1, 5-HT2 i 5-HT3) u kraljezničkoj moždini tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja čovjeka.
- 2/ izražaj istih serotoninskih receptora u spinalnim ganglijima tijekom ranog razvoja čovjeka.
- 3/ izražaj navedenih serotoninskih receptora u kraljezničkoj moždini i ganglijima ljudskog fetusa s cervikalnim rascjepom.
- 4/ promjene izražaja serotoninskih receptora tijekom regeneracije dijela kraljezničke moždine ispod mjesta oštećenja.
- 5/ ultrastrukturalne osobitosti stanica spinalnih ganglija

## **2.2. Hipoteza**

Rezultati našeg istraživanja trebali bi pokazati promjene u raspodjeli i intenzitetu serotoninskih receptora tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razvoja središnjeg živčanog sustava u čovjeka. Njihova raspodjela mogla bi ukazati na ulogu u prijenosu osjeta bola, te u motoričkim aktivnostima i procesima pod kontrolom autonomnog dijela živčanog sustava. Usporedbom normalnog izražaja s onim u patološki promijenjenoj kraljezničkoj moždini fetusa s rascjepom, razmotrit će se mogući mehanizmi koji sudjeluju u cijeljenju kraljezničke moždine nakon povrede.

### **3. METODE I MATERIJALI**

### 3.1. Biološki materijali

Parafinski blokovi ljudskih embrionalnih i fetalnih kralježničkih moždina pripadaju arhivi Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Splitu. Ukupan broj ispitanih uzoraka razvojnih stadija bubrega je 16. Embrionalno i fetalno tkivo prikupljeno je nakon spontanih abortusa i tubarnih trudnoća uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC-a Split i Medicinskog fakulteta u Splitu (klasa: 003-08/16-03/0001, broj: 2181-198-03-04-16-0024). Dob zametaka je procijenjena između 5. i 10. razvojnog tjedna na temelju podataka o posljednjoj menstruaciji te mjerenjem udaljenosti tjeme-zadak (Carnegie sustav) te je samo dobro očuvano i morfološki ispravno tkivo korišteno u istraživanju. Također je korišteno tkivo malformiranog fetusa s rascjepom starosti 9. tjedana. Izrazito vrijedni i teško dostupni ljudski materijali koje smo koristili u ovom istraživanju imaju neprocjenjivu važnost (posebice zbog značajnih razlika u izražaju serotoninskih receptora nađenih na pokusnim životinjama), ali posredno i limitiran broj uzoraka.

### 3.2. Postupci

#### Priprema tkiva kralježničke moždine za histološku analizu:

Tkivo je fiksirano u 4% PFA (paraformaldehid) u 0.1 M PBS-a preko noći, nakon čega slijedi ispiranje PBS-om, dehidracija tkiva kralježničke moždine u uzlaznoj seriji otopina etanola (70%, 95%, 100%, 100%) te ksilenu. Tkivo je uklopljeno u parafinske blokove, mikrotomom izrezano na serijske rezove debljine 5 µm te postavljeno na predmetna stakalca.

Kao priprema za histološko bojanje, stakalca su priređena standardnim postupkom deparafiniranja u ksilolu (3x5'), rehidracije u seriji otopina etanola rastućih koncentracija (100% 10', 100% 10', 95% 5', 70% 5') i ispiranja u vodi (5').

#### Hematoksilin-eozin bojanje:

Hematoksilin-eozin bojanje svakog desetog reza služi za potvrdu stadija (starosti) embrija i očuvanosti tkiva. Uzorci su prvotno inkubirani u otopini hematoksilina u trajanju od 15', ispirani u vodi te zatim prebačeni u otopinu eozina (4-5'). Uslijedilo je dehidriranje serijom rastućih otopina

etanola i ksilenom. Uzorci su prekriveni Canada balsamom i pokrovnim stakalcem, te proučavani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51, Tokyo, Japan).

### Imunofluorescencijsko bojanje

Uzorci su kuhani u citratnom puferu (pH=6.2) 30' koristeći kuhalo za vodu te ohlađeni na sobnu temperaturu. Nakon ispiranja tkiva u PBSu, uzorci su odvojeni PAP pen-om te prekriveni Protein blok otopinom u trajanju od 20', kako bi se spriječilo nespecifično bojanje tkiva. Uzorci su inkubirani s primarnim protutijelima u vlažnoj komori preko noći (Tablica 1). Nakon ispiranja PBS-om nanosena su sekundarna protutijela (Tablica 2) i inkubirana u vlažnoj komori u mraku, jedan sat.

Nakon ispiranja PBS-om, nanosena je boja za jezgre 4,6-damidino-2- phenylindole ili DAPI (2'). Uzorci su uklopljeni u Immu-mount medij i prekriveni pokrovnim stakalcem.

Kontrola za specifičnost je bila izuzimanje primarnog protutijela iz procedure bojanja.

Uzorci su pregledani na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX61, Tokyo, Japan) koristeći digitalnu kameru DP71 (mikrofotografije zabilježene sa softverom Olympus Cella) te digitalnu kameru DS-Ri2 (softver NIS-Elements F). Korišteni su objektivni povećanja 10x, 40x i 100x. Mikrofotografije su obrađene i preklopljene uz pomoć Adobe Photoshop softvera (Adobe, San Jose, CA, USA) te analizirane pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Tablica 1. Primarna protutijela:

Anti-5HT1A Receptor antibody	ab227165	zec	1:100	Abcam
SR-2A (A-4)	sc-166775	miš	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.
5-HT3A receptor antibody	GTX54151	zec	1:100	GeneTex
PGP9.5 Monoclonal Antibody (BH7)	480012	miš	1:500	Invitrogen
anti-GFAP antibody	ab53554	koza	1:100	Abcam
anti-GFAP (2E1)	sc-33673	miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc.,
anti-Ki-67	M7240	miš	1:100	DAKO
caspase-3 antibody	AF835	zec	1:1500	R&D System, Inc.

Tablica 2. Sekundarna protutijela:

Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure Anti-Mouse IgG (H+L)	715-545-150	magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 AffiniPure Anti-Goat IgG (H+L)	705-545-003	magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories

TUNEL metoda (terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) nick-end labelling) služi za dokazivanje fragmentacije DNA koja je karakteristična za apoptozu. Tijekom procedure, na deparafinizirane i rehidrirane rezove djelovalo se proteinazom K kroz 30 minuta, dodao se 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu. Tdt enzim je zatim bio blokiran djelovanjem pufera kroz 1sat na temperaturi od 37C, te je reakcija vizualitirana djelovanjem kompleksa streptavidin–biotin–peroxidase complex i diaminobenzidina.

### 3.3. Protokol

Hodogram istraživanja proveden je kako slijedi:

1. Pretraživanje literature
2. Definiranje hipoteze
3. Određivanje ciljeva
4. Ustroj istraživanja
5. Odabir materijala za analizu: embrionalno i fetalno tkivo kralježničke moždine čovjeka (Imunohistokemijsko i imunofluorescencijsko bojanje uzoraka)
7. Analiziranje mikrofotografija (svjetlosni, fluorescencijski)
8. Prikaz, statistička obrada i tumačenje rezultata
9. Izrada izvornog znanstvenog rada

### 3.4. Statistički postupci

#### Semikvantitativna metoda

Tri autonomna istraživača su odabranim protutijelima pripisivali sljedeće kategorije jakosti intenziteta: odsutnost reaktivnosti (-); slaba reaktivnost (+/-); blaga reaktivnost (-), umjerena reaktivnost (++) i jaka reaktivnost (+++).

#### Statističke metode

Histogrami intenziteta fluorescencije za crveni i zeleni fluorescencijski kanal su dobiveni programom ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Ekspresija različitih serotoninskih receptora je kvantificirana kao površina ispod krivulje (area under the curve – AUC) histograma intenziteta fluorescencije. Površina ispod krivulje je izračunata u programu GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad, La Jolla, CA, USA).

Statistička analiza te 95% interval pouzdanosti za usporedbu prostorno-vremenskog izražaja serotoninskih receptora provedena je ANOVA testom s post hoc analizom Tukey test, razina značajnosti  $p = 0.05$ . Izražaj serotoninskih receptora tijekom razvoja je analizirana vršcima (peak) koristeći t-test.

Za analizu dinamike ekspresije i trendova različitih proteina u razvoju koristili smo linearne i nelinearne modele regresije, također u GraphPad programu (GraphPad Prism 8.3).

### 3.5. Elektronska mikroskopija

Nakon fiksacije, uzorci spinalnih ganglija isprani su u PBS-u , postfiksirani u 1% osmijevom tetrosidu kroz 1 sat. Za dehidraciju su korišteni alkoholi različite gradacije te je tkivo uklopljeno u smoli LX112. Polu-tanki rezovi debljine 1 $\mu$ m obojeni su Toluidinskim modrilom. Ultra-tanki rezovi debljine 0,05  $\mu$ m su dodatno kontrastirani uranil acetatom i olovnim citratom. Uzorci su pregledani i analizirani elektronskim mikroskopom (Zeiss 902 A).



## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Normalni razvoj kralježničke moždine čovjeka između 5. i 10. tjedna razvoja (oboјano Hemalaunom i Eozinom)**

U 5. tjednu embrionalnog razvoja, na poprečnom presjeku kroz kranijalni dio kralježničke moždine vide se početni znakove diferencijacije neurona, smještenih u prednjem dijelu vrlo tanke intermedijarne zone, neposredno uz tanku rubnu zonu. U ovom razvojnom razdoblju još ne postoji jasna granica između ventrikularne zone, koja sadrži stanice koje proliferiraju, i intermedijarne zone, u kojoj se neuroni počinju diferencirati. Krovna ploča i ploča dna tek se počinju razvijati u središnjim prednjim i stražnjim dijelovima kralježničke moždine. Spinalni gangliji sastoje se od relativno malih nakupina ganglijskih stanica u fazi diferencijacije, koje su smještene obostrano uz kralježničku moždinu (Slika 18a).

Tijekom 6. razvojnog tjedna, diferencijacija kralježničke moždine dalje napreduje pa se u njezinoj lateralnoj stijenci pojavljuju tri karakteristične zone (ventrikularna, intermedijarna i rubna-marginalna), a krovna ploča i ploča dna se jasno prepoznaju.

U 7. i 8. razvojnom tjednu, u lateralnoj stijenci kralježničke moždine vide se tri dobro diferencirane zone: ventrikularna zona, koja je tanja straga nego sprijeda (ukazujući na bržu diferencijacije prednjeg dijela kralježničke moždine); intermedijarna zona koja sadrži neurone koji se diferenciraju i oblikuju sivu tvar (prednje, intermedijarne i stražnje rogove); te marginalna zona koja sadrži aksone neurona koji oblikuju bijelu tvar kralježničke moždine.

Krovna ploča i ploča dna dobro su razvijene, kao i bilateralno smješteni spinalni gangliji. (Slika 18b).

U 9. i 10. tjednu razvoja, tri se zone se jasno raspoznaju u lateralnoj stijenci kralježničke moždine. Ventrikularna zona je sada tanja i oblikuje sloj ependimskih stanica, dok su intermedijarna i marginalna zona zadebljale zbog uznapredovale diferencijacije neurona. Krovna ploča i ploča dna su zadebljale na račun marginalne zone, dok spinalni gangliji napreduju u procesu diferencijacije i posljedičnog povećanja mase (Slika 18c).

U 8. tjednu razvoja, u prijelaznoj zoni kralježničke moždine (spojno područje kranijalnog i kaudalnog dijela kralježničke moždine) vide se dva nepravilna, međusobno okomita lumena koji su nastali spajanjem dijelova kralježničke moždine nastalih tijekom primarne i sekundarne neurulacije (Slika 18d).

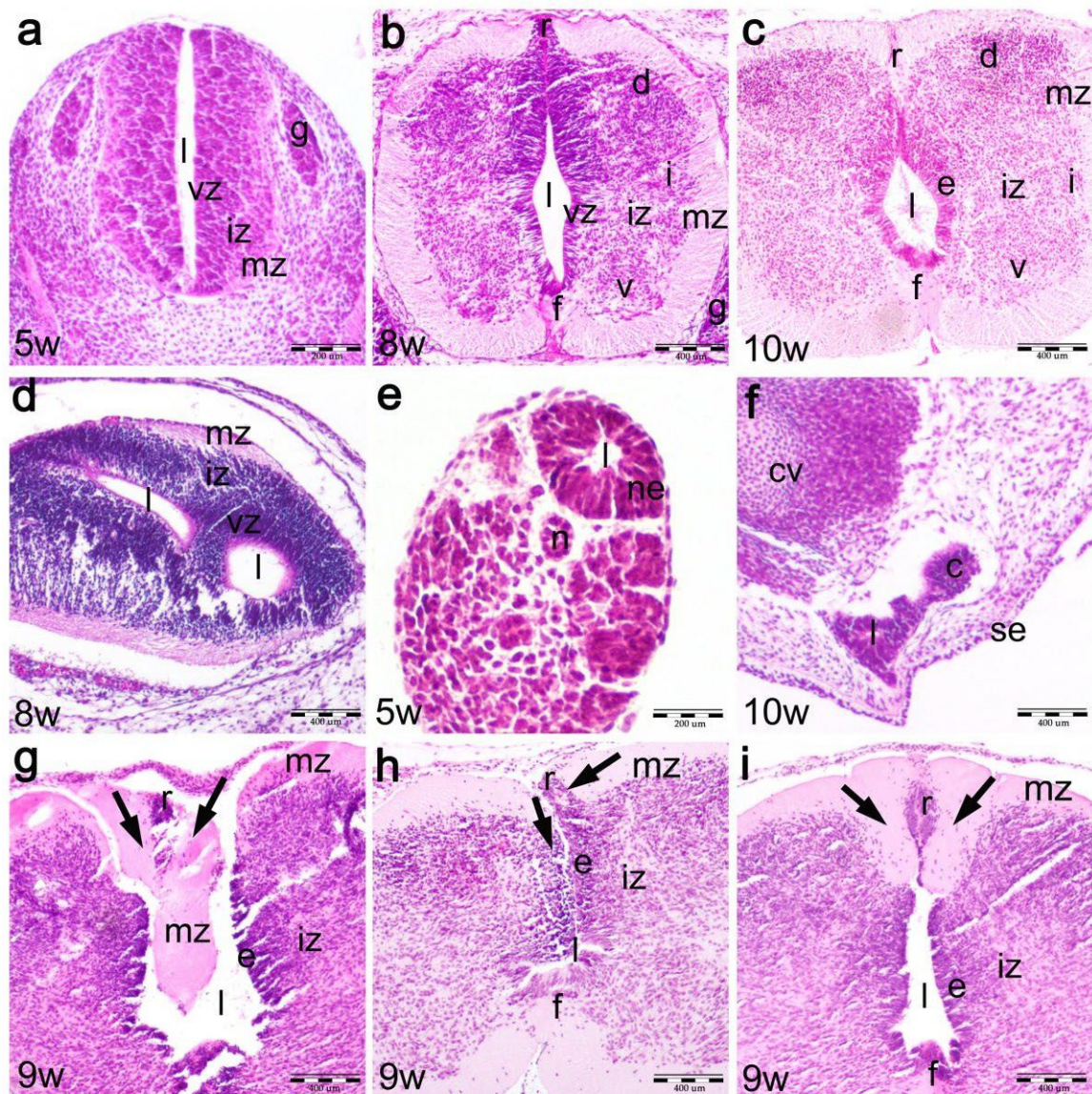
Dio kralježničke moždine koji je nastao kao derivat sekundarne neurulacije u repnom području, tijekom 5. razvojnog tjedna pokazuje nepravilan lumen okružen neuroepitelnim stanicama (Slika

18e). Tijekom daljnjeg razvoja, ovaj dio kralježnične moždine postepeno regredira i postaje cauda equine i filum terminale na najkaudalnijem kraju kralježničke moždine. U 10. tjednu razvoja, ostaci sekundarne neuralne cijevi tj. kralježničke moždine mogu se naći u obliku tzv. kokcigealnog ostatka, koji izgleda kao nepravilan i isprekidani lumen smješten između kokcigealnih kralježaka i epitela kože (Slika 18f).

#### **4.2. Razvoj kralježničke moždine u ljudskog fetusa sa spinom bifidom starog 9. tjedna**

U vratnom području fetusa sa spinom bifidom (dysraphia) kralježnička moždina je promijenjena u smislu zamjene živčanog tkiva vezivom i krvnim žilama (area cerebrovasculosa).

U područjima ispod cervikalnog rascjepa (spinae bifidae), stražnji dio kralježničke moždine (krovna ploča) postepeno se zatvara uzduž kranio-kaudalne osovine tijela fetusa. Neposredno ispod područja rascjepa, u potpunosti nedostaje normalno oblikovanje krovne ploče. Umjesto toga, pretjerano razvijen marginalni sloj prodire poput klina u središnji kanal kralježničke moždine, zatvarajući tako prostor između stražnjih stjenki kralježničke moždine. Uz navedene promjene, nepravilnosti svih triju zona se mogu primjetiti u lateralnoj stijenci kralježničke moždine (Slika 18g). Na još kaudalnije položenim presjecima, vidi se savijanje stražnjih dijelova kralježničke moždine u cilju zatvaranja krovne ploče. U tom području lateralne stijenke kralježničke moždine izgledaju asimetrično (Slika 18h). U područjima kralježničke moždine koja su još udaljenija (kaudalnija) od cervikalno rascjepa, krovnu ploču čini hipertrofična marginalna zona koja u sredini sadrži proširenje ventrikularne zone (ependimskih stanica). Na tim razinama presjeka kroz kralježničku moždinu, bočna (lateralna) stijenka izgleda simetričnije nego u kranijalnim područjima (Slika 18i).



Slika 18 Histološki rezovi prikazuju normalni razvoj kralježničke moždine čovjeka (5-10 tjedana) i ljudskog fetusa sa spinom bifidom starosti 9 tjedana (obojeno Hemalaunom i Eozinom). Razvoj kranijalnog dijela ljudske kralježničke moždine (sc) između 5-6 tjedna (a), 7-8 tjedna (b), i 9-10 tjedna (c), prijelazne zone u 8. tjednu (d) i kaudalne kralježničke moždine u 5. (e) i 10. tjednu (f): ventrikularna zona (vz), intermedijarna zona (iz), marginalna zona (mz), ploča dna (f), krovna ploča (r), lumen (l), koccigealni ostatak (c), koccigealni kralježak (cv), epitel kože (se), spinalni ganglij (dg), prednji rogovi (v), intermedijarni rogovi (i), stražnji rogovi (d), endodimski sloj (e) i notokord (n). Torakalni dio kralježničke moždine u fetusa sa spinom bifidom starosti 9 tjedana (kranio-kaudalni smjer) (g-i). Vide se abnormalnosti oblikovanja krovne ploče (strelice). Povećanje X20, mjerilo 200 um (a, e); povećanje x10, mjerilo 400nm (b-d, f-i).

### **4.3. Izražaj serotoninskih receptora (sr1, sr2, sr3) u kralježničkoj moždini čovjeka tijekom razvoja (imunofluorescentno bojanje)**

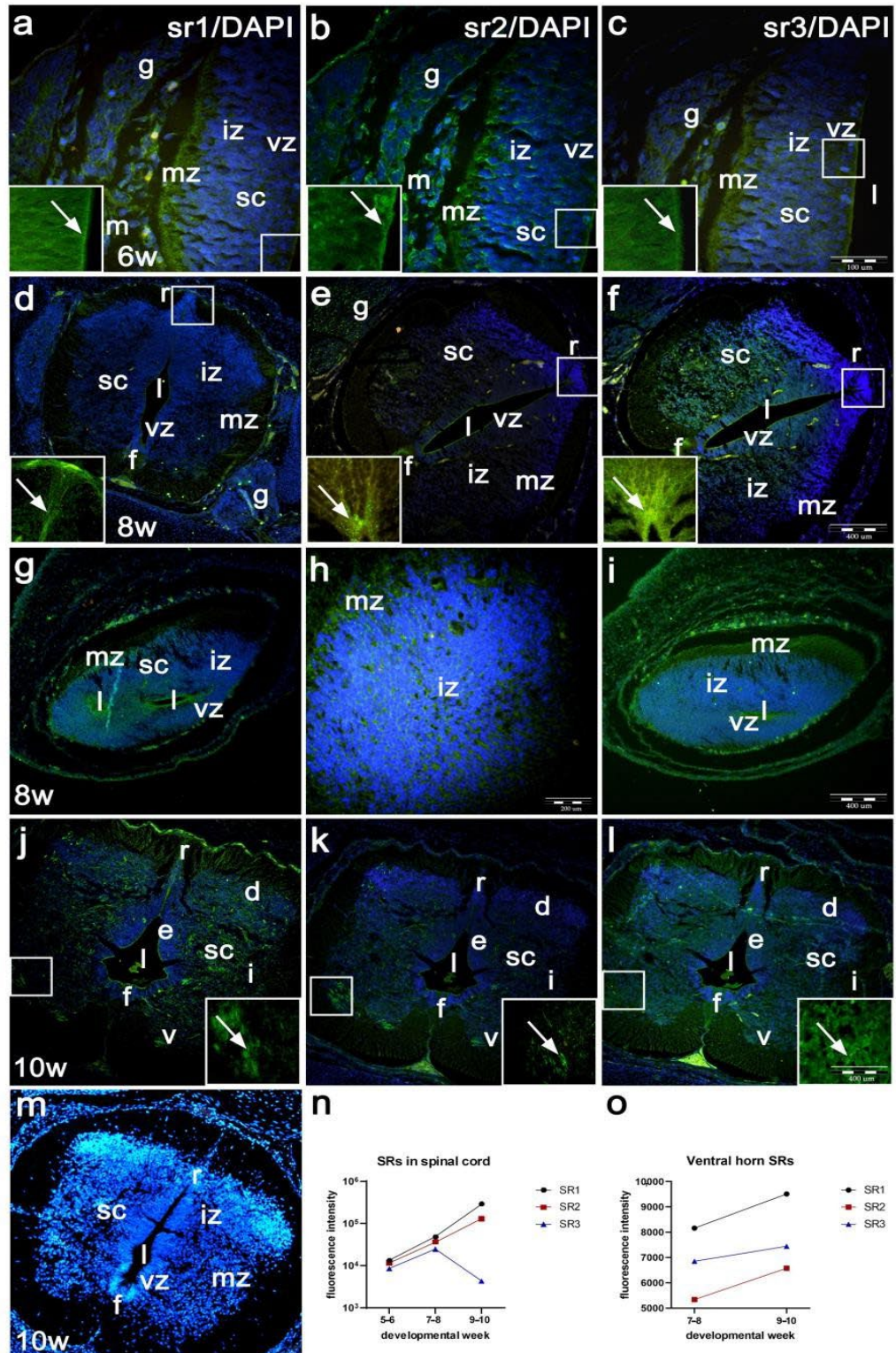
U 5. i 6. tjednu razvoja, umjereni izražaj serotoninskog receptora 1 (sr1) vidi se u kralježničkoj moždini, i to prvenstveno u ventrikularnoj zoni i vanjskom dijelu intermedijarne zone (Slika 19a). Tijekom istog razvojnog razdoblja, izražaj serotoninskog receptora 2 (sr2) pokazuje nešto nižu razinu izražaja nego sr1. Izražaj sr2 vidi se čitavom širinom bočne stijenke kralježničke moždine (Slika 19b). Serotoninski receptor 3 (sr3) tijekom 5. i 6. tjedna pokazuje najslabiji izražaj u odnosu na sr1 i sr2, a proteže se kroz bočnu stijenku kralježničke moždine (Tablica 3, Slika 19c). U 6. tjednu, a posebno tijekom 7. i 8. razvojnog tjedna, izražaj sr1 povećava se u prednjim dijelovima intermedijarne zone (prednjim rogovima koji sadrže motorne neurone), kao i u području krovne ploče i ploče dna (Tablica 3, Slika 19d). Tijekom istog razdoblja, sr2 pokazuje smanjeni izražaj u bočnoj stijenci kralježničke moždine ali je zato veći intenzitet izražaja u krovnoj ploči i ploči dna u odnosu na sr1 (Slika 19e). Tijekom 7. i 8. tjedna razvoja, izražaj sr3 najjači je u krovnoj ploči i ploči dna, kao i u prednjim rogovima kralježničke moždine (Slika 19f). U 8. tjednu razvoja, u prijelaznoj zoni vidi se izražaj sr1 oko međusobno okomitih, spojenih lumena kralježničke moždine (ventrikularna zona), koji su nastali spajanjem kranijalnog i kaudalnog dijela kralježničke moždine. Isti se izražaj vidi i u vanjskom dijelu nepravilne marginalne zone (Slika 19g). Izražaj sr2 je slabiji od sr1, ali se proteže kroz čitavu bočnu stijenku kralježničke moždine, dok sr3 pokazuje slabiji izražaj nego sr1 i sr2 (Slika 19h, i). Tijekom 9. i 10. tjednu razvoja, sr1 pokazuje blagi izražaj u marginalnoj zoni, umjereni izražaj u krovnoj ploči i ploči dna, te snažan izražaj u ventralnim, intermedijarnim i dorzalnim rogovima intermedijarne zone (Slika 19j). U usporedbi sa sr1, sr2 pokazuje isti obrazac izražaja, ali je nešto blaži u području svih tiju rogova (Slika 19k). Izražaj sr3 je u odnosu na sr1 i sr2 nešto blaži u svim opisanim područjima kralježničke moždine (Tablica 3, Slike 19i,o).

Isječci koji prikazuju veća povećanja izražaja serotoninskih receptora u ventrikularnoj i intermedijarnoj zoni kralježničke moždine (isječak Slike 19a-c), u području krovne ploče (Slika 19d-f) i ventralnih rogova (Slika 19j-l) ukazuju na razlike u intenzitetu i izražaju između pojedinih serotoninskih receptora. Razlike povezane s motorinim neuronima u prednjim rogovim kralježničke moždine pokazuju da izražaj sr1 ima obilježje gustih, grubih zrnaca smještenih oko motornih neurona (isječak slike 19j, o), dok je izražaj sr2 u obliku manje gustih zrnaca (isječak Slike 19k, o). Izražaj sr3 je blag i rahlo raspoređen oko motornih neurona

(isječak Slike 19j, o).

Negativna kontrola (dobivena isključivanjem primarnih protutijela iz procedure) za sva tri serotoniniska receptora (sr1, sr2, sr3) pokazuje odsustvo signala, dok bojanje s DAPI-jem pokazuje karakteritično plavo obojenje jezgara stanica (Slika 19m).





Slika 19. Imunofluorescenijsko obojenje krlježničke moždine čovjeka tijekom razvoja različitim serotoninskim receptorima (sr1, sr2, sr3). Izražaj serotoninskih receptora (strelice u isječcima), sr1 (a), sr2 (b), sr3 (c) u 5-6 tjednu, u 7-8 tjednu (d-f), prijelazna zona u 8. tjednu (g-i) i u 10. tjednu kranijalnog dijela kralježničke moždine (j-l). Kontrolno obojenje kralježničke moždine stare 10. tjedana primjenom samo sekundarnih protutijela i DAPI obojenja jezgara (m): mezenhim (m),

ventrikularna zona (vz), intermedijarna zona (iz), marginalna zona (mz), ploča dna (f), krovna ploča (r), lumen (l), spinalni ganglij (dg), prednji rogovi (v), intermedijarni rogovi (i), stražnji rogovi (d), ependimski sloj (e). Isječci prikazuju veliko povećanje izražaja serotoninskih receptora u motornim neuronima sr1 (j), sr2 k) i sr3 (l), X100. Intenzitet signala serotoninskih receptora sr1, sr2 i sr3 kao izmjereni sveukupni signal (n), te razlike odgovarajućih signala u motornim neuronima (o). Povećanje X40, mjerilo 100 um (a-c); povećanje X10, mjerilo 400 um (d-g, j-m); povećanje x20, mjerilo 200 um (h).



Tablica 3. Izražaj serotoninskih receptora u kralježničkoj moždini tijekom razvoja metodom semikvantifikacije

RAZVOJNI TJEDNI	DIJELOVI KRALJEŽNIČKE MOŽDINE	sr1	sr2	sr1
5	vz	+/++	+/++	+/-
	iz	+/++	+/++	+/-
	mz	+/-	+/++	+/-
6	vz	+/++	+/++	+
	iz	++	+/++	+
	mz	+	+	+/-
	rp	+/++	++	+/++
	fp	+/++	++	+/++
7 and 8	vz	+/++	+/++	++/+++
	iz - vh	++	+	++
	iz - ih	+	+	+
	iz - dh	+	+	+
	mz	+	+	+
	rp	++	++/+++	+++
	fp	++	++/+++	+++
9 and 10	el	++	++	++
	iz - vh	+++	++/+++	++
	iz - ih	+++	++/+++	++
	iz - dh	+++	++	++
	mz	+	+	+
	rp	++	++	++
	fp	++	++	++

Kazalo: Ventrikularna zona (vz), intermedijarna zona (iz), marginalna zona (mz), krovna ploča (r), ploča dna (f) prednji rogovi (vh), inermedijarni rogovi (ih), stražnji rogovi (dh), endimski sloj (e). Slab izražaj (+/-); blagi izražaj (+), umjereni izražaj (++); jak izražaj (+++)

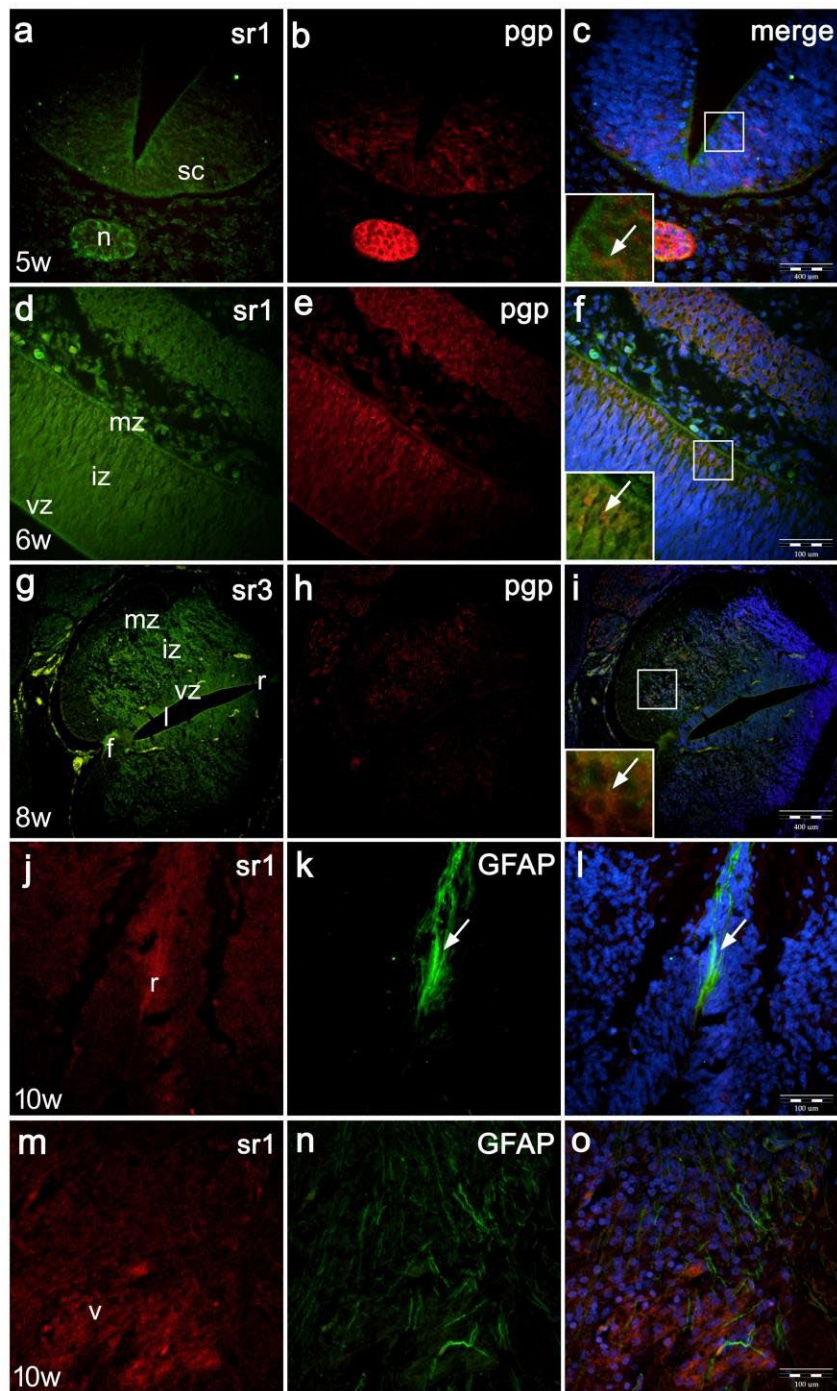
#### **4.4. Koekspresija serotoninskih receptora s biljezima živčanih stanica (pgp) i glija stanica (GFAP) (metoda dvostruke fluorescencije)**

U 5. tjednu embrionalnog razvoja, slab izražaj sr1 receptora vidi se u ventrikularnoj i marginalnoj zoni kralježničke moždine. Sr1 je vrlo slabo izražen u intermedijarnoj zoni, ali zato vrlo snažno u susjednom notokordu (Slika 20a). Pan-neuronalni marker živčanih stanica (pgp) oboji neuroblaste u intermedijarnoj zoni, kao i vrlo snažno notokord (Slika 20b). Plavo obojenje s bojom DAPI, pokazuje gusto poredane jezgre u lateralnoj stijenci kralježničke moždine.

Koekspresija sr1 i pgp vidi se u neuroblastima intermedijarne zone, kao i u notokordu (Slika 20c). Na uzdužnom presjeku kroz kralježničku moždinu u 6. razvojnom tjednu, izražaj sr1 je povećan u vanjskim dijelovima intermedijarne zone u usporedbi s ranijim razvojnim stadijima (Slika 20d). Pgp jako oboji najviše diferencirane neuroblaste u vanjskom dijelu intermedijarne zone (Slika 20e). Ko-lokalizacija izražaja DAPI (Slika 20f) s biljezima pgp i sr1 vidi se u vanjskom dijelu intermedijarne zone (Slika 20f).

U 8. razvojnom tjednu, izražaj sr3 receptora postaje jači u lateralnoj stijenci kralježničke moždine od izražaja sr1 i sr2, dok je u krovnoj ploči i ploči dna izražaj sr3 receptora izrazito jak (Slika 20g). Na manjim povećanjima, izražaj sr3 je slabije izražen, dok u intermedijarnoj zoni oboji neuroblaste (Slika 20h). Ko-lokalizacija izražaja DAPI obojenih jezgara stanica sa sr3 i pgp biljezima je prisutna u neuroblastima prednjih rogova kralježničke moždine (Slika 20i). U

10. tjednu razvoja, bojanje s GFAP biljegom za glija stanice pokazuje reaktivnost u lateralnoj stijenci kralježničke moždine, krovnoj ploči i ploči dna. U krovnoj ploči, i sr1 (Slika 20j) i GFAP (Slika 20k) imaju snažan izražaj. Oni-kolokaliziraju s DAPI obojenjem jezgara u krovnoj ploči (Slika 20l).



Slika 20. Dvostruka imunofluorescencija različitih serotoninских receptora s pan-neuronalnim biljegom (pgp) i glijalnim fibrilarnim proteinom (GFAP) u ljudskoj kralježničkoj moždini tijekom razvoja. Kralježnička moždina (sc) u 5. razvojnom tjednu (a-c), 6. tjednu (d-f), 8. tjednu (g-i), 10. tjednu (j-o): ventrikularna zona (vz), intermedijarna zona (iz), marginalna zona (mz), ploča dna (f), krovna ploča (r), lumen (l), prednji rogovi (v), intermedijarni rogovi (i), stražnji rogovi (d), notochord (n). U 5. tjednu vidi se slaba ko-lokalizacija sr1 (a) i pgp (b) (isječak u c) s DAPI obojenjem jezgara (c) u neuroblastima intermedijarne zone (strelica) i u notokordu. Slična ko-lokalizacija sr1/pgp vidi se u vanjskom dijelu intermedijarne zone (strelica) u 6. tjednu (d-f). U 8. razvojnom tjednu, sr3 (g) ko-lokalizira s pgp (h) u prednjim rogovima (motorni neuroni) (isječak u i) intermedijarne zone (g-j). U 10. tjednu razvoja, ko-lokalizacija sr1/GFAP uočava se u krovnoj ploči (strelica) kralježničke moždine (j-l), dok je odsutna u motornim neuronima prednjih rogova

(m-o). Povećanje X10, mjerilo 400um (a-i), povećanje X40, mjerilo 100 um (j- o).

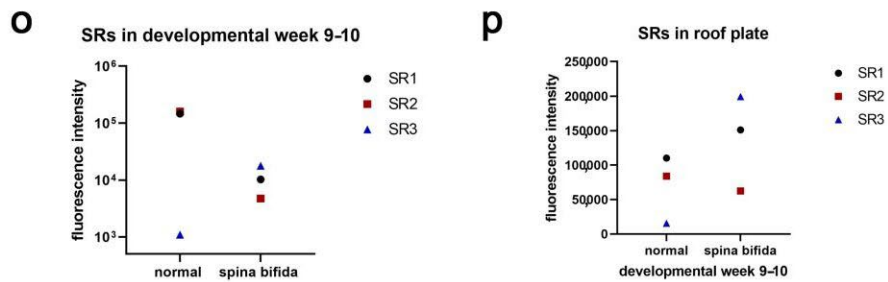
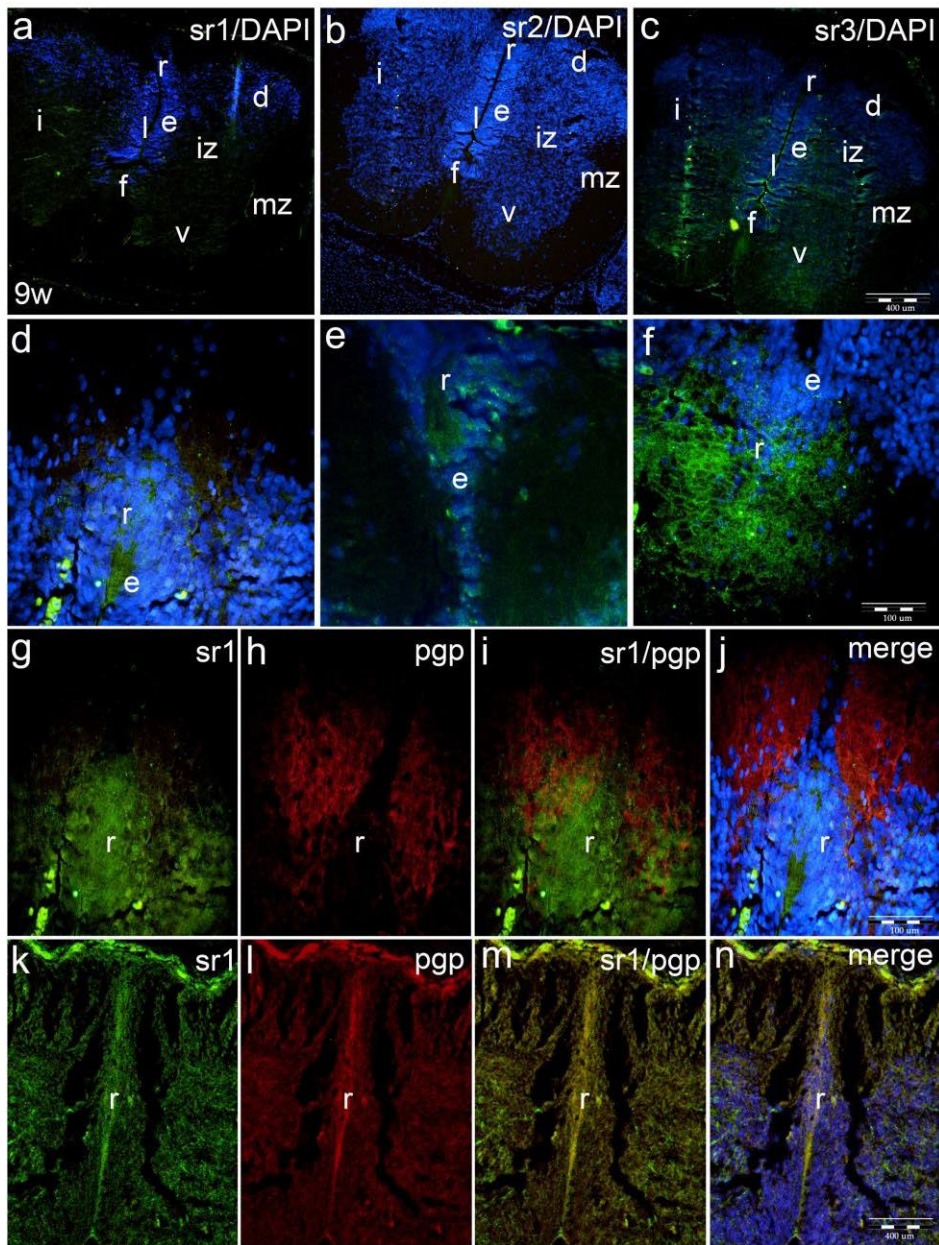
U 10. tjednu razvoja, u prednjim rogovima kralježničke moždine vidi se snažan izražaj sr1 biljega oko motornih neurona (Slika 20m), dok je izražaj GFAP prisutan u obliku radijalne glije (astrociti) koja se proteže od endodimskih stanica do vanjske površine kralježničke moždine (Slika 20n). Kod preklapanja DAPI boje za jezgre sa biljezima za sr3 i GFAP o, ko-lokalizacija nedostaje (Slika 20o).

#### **4.5. Izražaj serotoninskih receptora u području ispod rascjepa kralježničke moždine uzrokovanog spinom bifidom (imunofluorescencija i dvostruka imunofluorescencija)**

Torakalni dio kralježničke moždine u fetusa s cervikalnim rascjepom (spinom bifidom) pokazuje različite vrste histoloških promjena, posebno u području krovne ploče. Imunohistokemijsko bojanje sa sr1 i sr2 biljezima općenito pokazuje manji intenzitet reaktivnosti u usporedbi s normalnom kralježničkom moždinom istog razvojnog stadija (Slika 21 a, b). Nasuprot navedenom, izražaj sr3 biljega je znatno snažniji ukralježničkoj moždini fetusa sa spinom bifidom nego u kralježničkoj moždini normalnog fetusa iste starosti (Slika 21c). Na poprečnim presjecima, uočljiva je znatna razlika u morfološkom izgledu krovne ploče kralježničke moždine fetusa sa spinom bifidom i zdravog fetusa iste dobi (vidi Sliku 21j-l).

Izražaj sr1 u krvnoj ploči je jači nego kod normalne kralježničke moždine, što je djelomično posljedica nepravilnog izgleda stražnjeg (dorzalnog) dijela kralježničke moždine (Slika 21d). Nasuprot navedenog, izražaj sr2 je manji nego izražaj sr1 i u normalnog fetusa i u fetusa sa spinom bifidom (Slika 21e). U krovnoj ploči fetusa sa spinom bifidom, sr3 pokazuje snažniji signal u usporedbi s normalnim fetusom, kao i u odnosu na sr1 i sr2 u malformiranom fetusu (Slika 21f). Dvostruka imunofluorescencija sr1 (Slika 21g) i biljega pgp (Slika 21h) uglavnom je pokazivala odsustvo ko-lokalizacije, osim uzduž ruba ventrikularne zone (Slika 21i); dok sr1 ko-lokalizira sa neuroepitelnim (ependimskim) stanicama u području hipertrofične krovne ploče, pgp izražaj svojstven je marginalnoj zoni (aksonima neurona) (Slika 21 g-j).

Kontrolni uzorci krovne ploče u normalnih ljudskih fetusa pokazivali su manji signal sr1 (Slika 21l) i pgp biljega (Slika 21l) u usporedbi sa krovnom pločom fetusa sa spinom bifidom, a naveden biljezi su djelomično ko-lokalizirali uz rub endodimskih stanica (Slika 21m) te s biljegom za jezgre DAPI. Statističke razlike u intenzitetu općeg izražaja sr1, sr2 i sr3, kao i njihovih signal u području krovne ploče vide se na slici 21o, p.



Slika 21. Imunofluorescencijsko bojanje torakalnog dijela kralježničke moždine u fetusa sa spinom bifidom primjenom sr1, sr2 i sr3i dvostruka imunofluorescencija s pgp.



Ukupni signal sr1 (a), sr2 (b), i sr3 (c) pokazuje razlike u intenzitetu (o) kad se uspoređi s normalnom kralježničkom moždinom. Kazalo: kralježničke moždine (sc), ependimske stanice (e), intermedijarna zona (iz), marginalna zona (mz), ploča dna (f), krovna ploča (r), lumen (l), prednji rogovi (v), intermedijarni rogovi (i), stražnji rogovi (d). U krovnoj ploči vide se razlike u intenzitetu signala sr1 (d), sr2 (e) i sr3 (f).

Dvostruka imunofluorescencija krovne ploče u fetusu sa spinom bifidom (g-j) pokazuje samo usko područje ko-lokalizacije sr1/pgp. Kontrolni uzorak normalne kralježničke moždine (k-n): vrlo tanko područje ko-lokalizacije sr1/pgp. Povećanje X10, mjerilo 400 um (a-c), povećanje X40 (d-n), mjerilo 100 um.

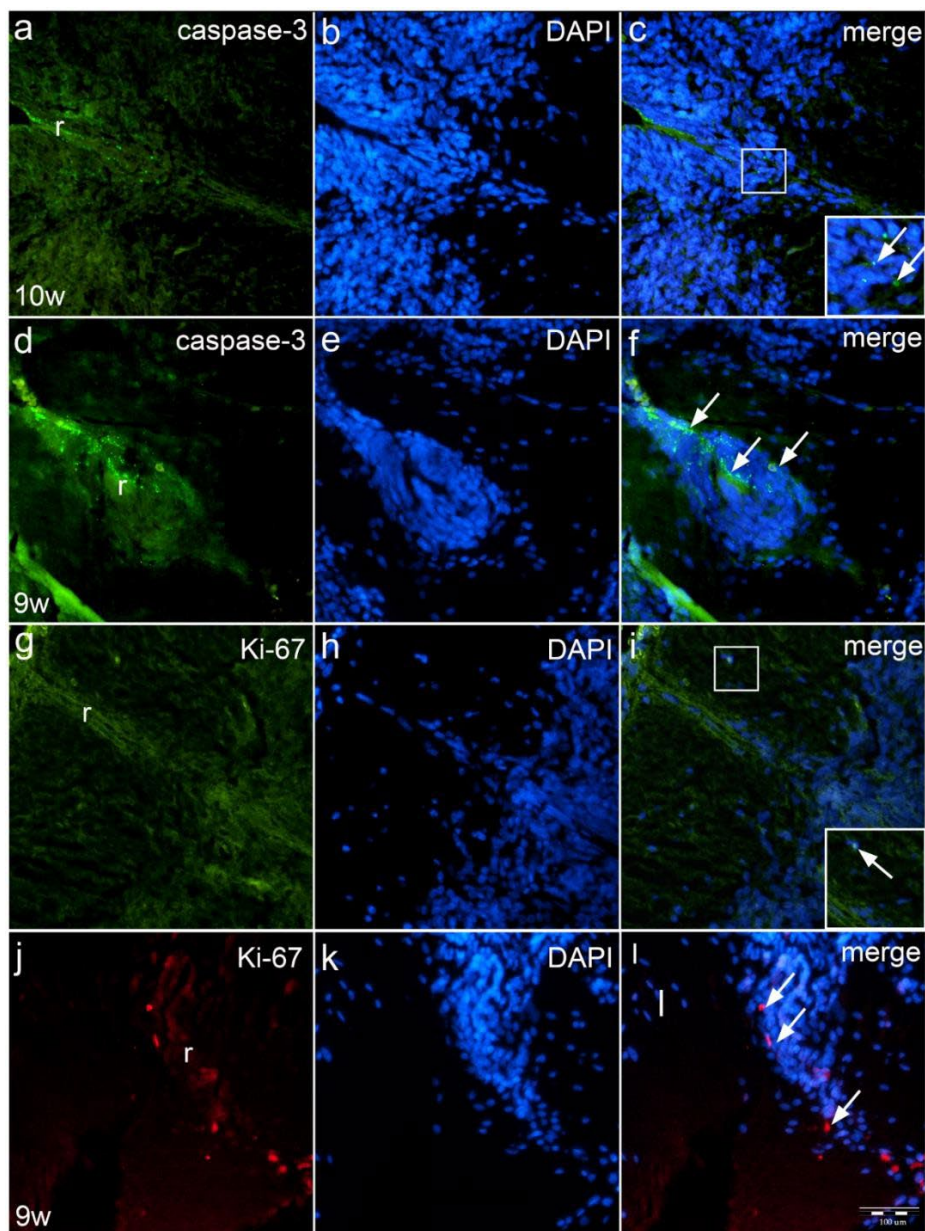
#### **4.6. Izražaj biljega proliferacije Ki-67 i apoptotskog biljega kaspaze-3 u krovnoj ploči normalnog fetusa i fetusa sa spinom bifidom**

U normalnom ljudskom fetusu starosti 10 tjedna, kaspaza-3 pozitivne stanice vide se u dorzalnom dijelu kralježničke moždine, gdje sudjeluju u oblikovanju krovne ploče (Silka 22a). Apoptotske stanice uglavnom se pojavljuju u obliku apoptotskih tjelešaca, koja su poredana uzduž krovne ploče (isječak Slike 22b). Prikaz jezgara plavom DAPI bojom, prikazuje prisustvo jezgara uzduž središnje linije dorzalnog dijela kralježničke moždine (Slika 22b). Preklapanje obojenja kaspazom-3 i DAPI, prikazuje točan položaj apoptotskih stanica u središnjem dijelu dorzalne kralježničke moždine (Slika 22c).

U fetusu sa spinom bifidom, torakalni dio kralježničke moždine ima vrtložasti izgled stanica u području krovne ploče. Mnogobrojne apoptotske stanice i apoptotska tjelešca vide se u krovnoj ploči (Slika 22d), a okružuju DAPI obojene jezgre u krovnoj ploči (Slika 22f).

U normalnog fetus starosti 10 tjedana, Ki-67 pozitivne stanice (Slika 5g) rijetko se nalaze u području krovne ploče (Slika 22g). Jezgre obojene DAPI bojom imaju normalnu morfologiju u području krovne ploče (Slika 22h), dok je ko-lokalizacija Ki-67 i DAPI prisutna u jezgrama stanica koje proliferiraju (isječak Slike 22i).

Ki-67 pozitivne stanice uočene su u hipertrofičnoj krovnoj ploči kralježničke moždine fetusa sa spinom bifidom (Slika 22j). DAPI obojenje jezgara pokazuje morfološki različitu organizaciju jezgara u krovnoj ploči fetusa sa spinom bifidom (Slika 22k) u usporedbi sa zdravim fetusom (Slika 22l).



Slika 22. Imunofluorescentno bojanje krovne ploče normalnog ljudskog fetusa i fetusa sa spinom bidifom apoptotskim biljekom kaspazom-3 i proliferacijskim biljekom Ki-67. Izražaj kaspaze-3 u apoptotskim stanicama (strelice) u krovnoj ploči (r) normalnog fetusa starosti 10 tjedana (a-c) ima pravilan raspored (strelice) u odnosu na nepravilan raspored kaspaza-3 pozitivnih stanica (strelice) u krvnoj ploči (r) fetusa sa spinom bificom (d-f). U normalnog fetusa, Ki-67 pozitivne stanice se rijetko vide (g-h), dok su u fetusa sa spinom bificom Ki-67 stanice (strelice) nepravilno raspoređene u krovnoj ploči (r) (j-l). Povećanje X40, mjerilo 100µm (a-l).

#### **4.7. Izražaj serotoninskih receptora u spinalnim (dorzalnim) ganglijima tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom**

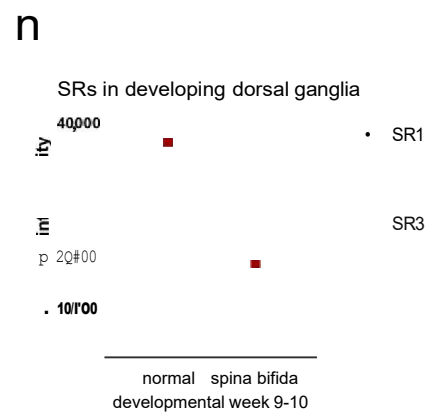
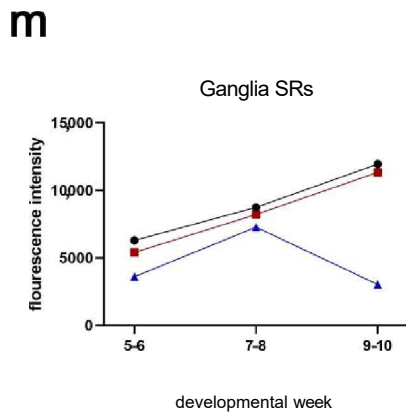
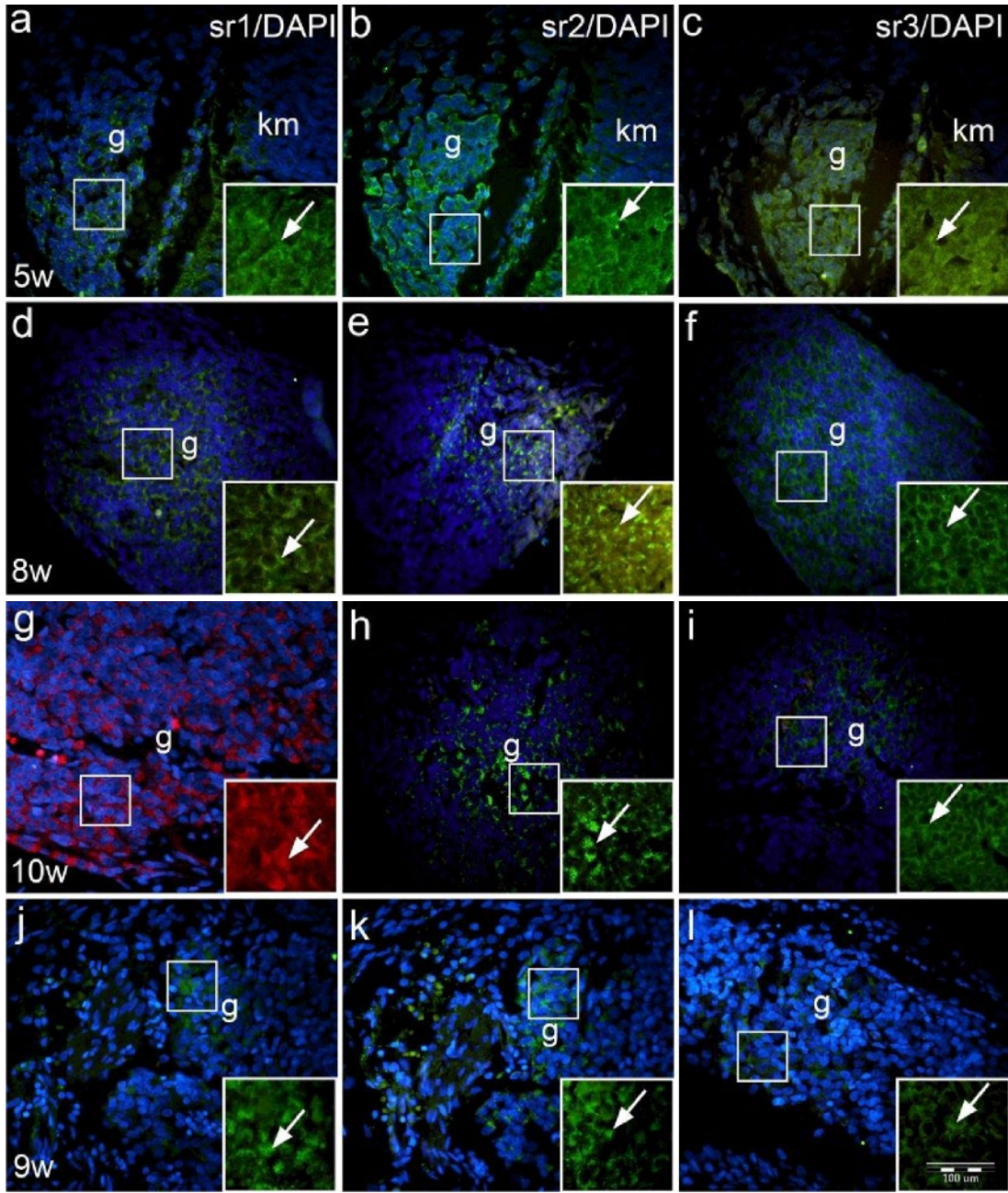
U 5. tjednu razvoja, dorzalni gangliji leže uz lateralne strane kralježničke moždine. Sr1 pokazuje blagi izražaj u nekim ganglijskim stanicama (Slika 23a), dok sr2 pokazuje umjereni izražaj (Slika 23b). Izražaj sr3 je slabiji od izražaja sr1 i sr2 (Tablica 4, Slika 23c, m).

Tijekom daljnjeg razvoja, dorzalni se gangliji povećavaju. U 8. razvojnom tjednu, većina ganglijskih stanica pokazuje umjereni do jak izražaj sr1 (Slika 23d), dok je signal sr2 (Slika 23e) jači od sr1. Izražaj sr3 je jači nego u ranijim razvojnim stadijima, ali intenzitet signal je manji nego za sr1 i sr2 (Slika 23f, m).

U 10. tjednu razvoja, dorzalni gangliji su još veći i oblikuju ovalne structure na obje strane kralježničke moždine. Većina ganglijskih stanica pokazuje umjereni do jak signal sr1 (Slika 23g), dok je izražaj sr2 i dalje umjeren (Slika 23h). S druge strane, izražaj sr3 ostaje i dalje slab u odnosu na ranije razvojne stadije, kao i u odnosu na intenzitet signala sr1 i sr2 u 10. tjednu (Slika 23i, m).

U fetusa sa spinom bifidom, spinalni gangliji nemaju ovalan oblik, nego imaju segmentirani izgled. U usporedbi s normalnim ganglijima iste starosti, svi serotonski receptori pokazuju smanjeni intenzitet signala. Sr1 i sr2 su umjereni izraženi u nekim ganglijskim stanicama (Slika 23j,k), dok je signal sr3 izuzetno slab i pojavljuje se samo u maloj populaciji ganglijskih stanica (Tablica 4, Slika 23l, n).





Slika 23. Imunohistokemijsko bojanje serotoninskih receptora sr1, sr2 i sr3 u spinalnim ganglijima tijekom normalnog razvoja te u fetusa sa spinom bifidom.

U 5. razvojnom tjednu, izražaj sr1, sr2 i sr3 je različit u spinalnim ganglijima normalnog embrija (a-c, m). U 8. tjednu (d-f) i 10. tjednu (g-i), signal sr1 i sr2 se povećava (m), dok se sr3 smanjuje nakon 8. tjedna (m). U fetusa sa spinom bifidom starosti 9. tjedana, sr1 i sr2, a posebno sr3 pokazuju niski intenzitet signala u ganglijskim stanicama (j-l, n). Kazalo: spinalni ganglij (g), izražaj sr1, sr2 i sr3 (strelice u isječcima). Povećanje X40, mjerilo 100 um (a-l).

#### 4.8. Ko-ekspresija serotoninskih receptora s pgp u normalnih i malformiranih fetalnih spinalnih ganglija

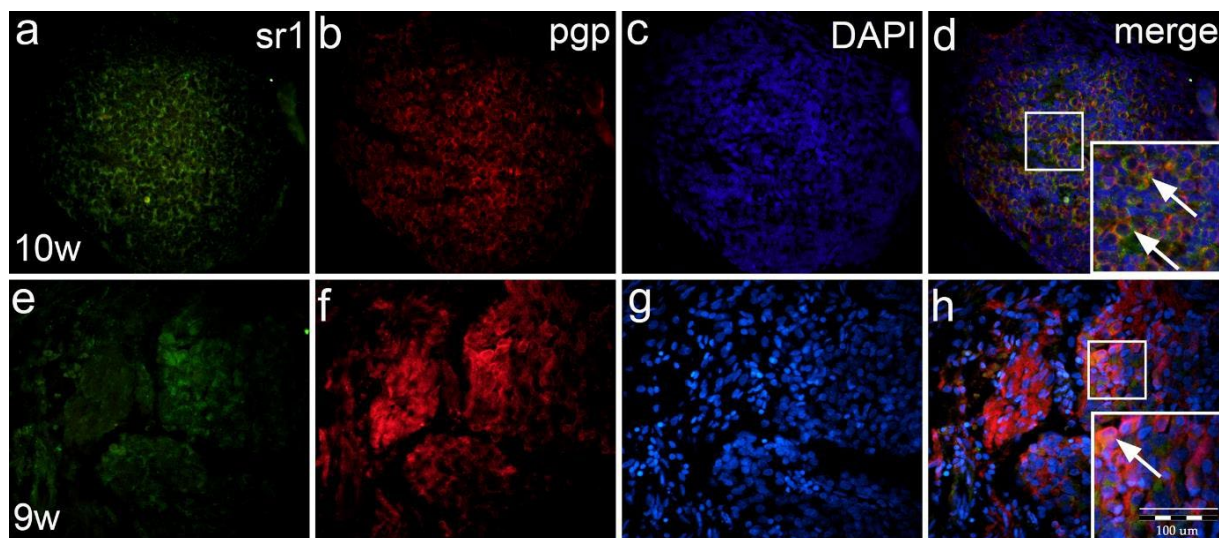
U 9. tjednu razvoja, sr1 pokazuje umjereni do jak izražaj u gotovo svim stanicama spinalnog ganglija (Slika 24a), dok većina ganglijskih stanica također pokazuje izražaj neuronalnog biljega pgp (Slika 24b). Ko-lokalizacija sr1 i pgp biljega s jezgrinim DAPI biljegom (Slika 24c) pokazuje da većina ganglijskih stanica ima istovremeni citoplazmatski izražaj sr1 i pgp biljega (isječak Slike 24d).

U spinalnim ganglijima ljudskog fetusa sa spinom bifidom starosti 9 tjedana, sr1 je slabije izražen u usporedbi s normalnim ganglijem iste starosti (Slika 24e). Pgp biljeg oboji tijela neurona i živčana vlakna (Slika 24f), dok DAPI oboji jezgre ganglijskih i Schwannovih stanica (Slika 24g). Nakon preklapanja slika, ko-lokalizacija sr1 i pgp biljega vidi se u većini, ali ne u čitavoj populaciji ganglijskih stanica (isječak Slike 24h).

Tablica 4 Izražaj serotoninskih receptora u spinalnim ganglijima tijekom razvoja primjenom semikvantifikacije

Razvojni tjedni	sr1	sr2	sr3
5-6	++	+	+/-
7-8	++/+++	++	+/+++
9-10	++/+++	++	++
9 (cervikalna spina bifida)	+ /+++	+ /+++	+/-

Kazalo: Slab izražaj (+/-); blagi izražaj (+), umjereni izražaj (++); jak izražaj (+++)

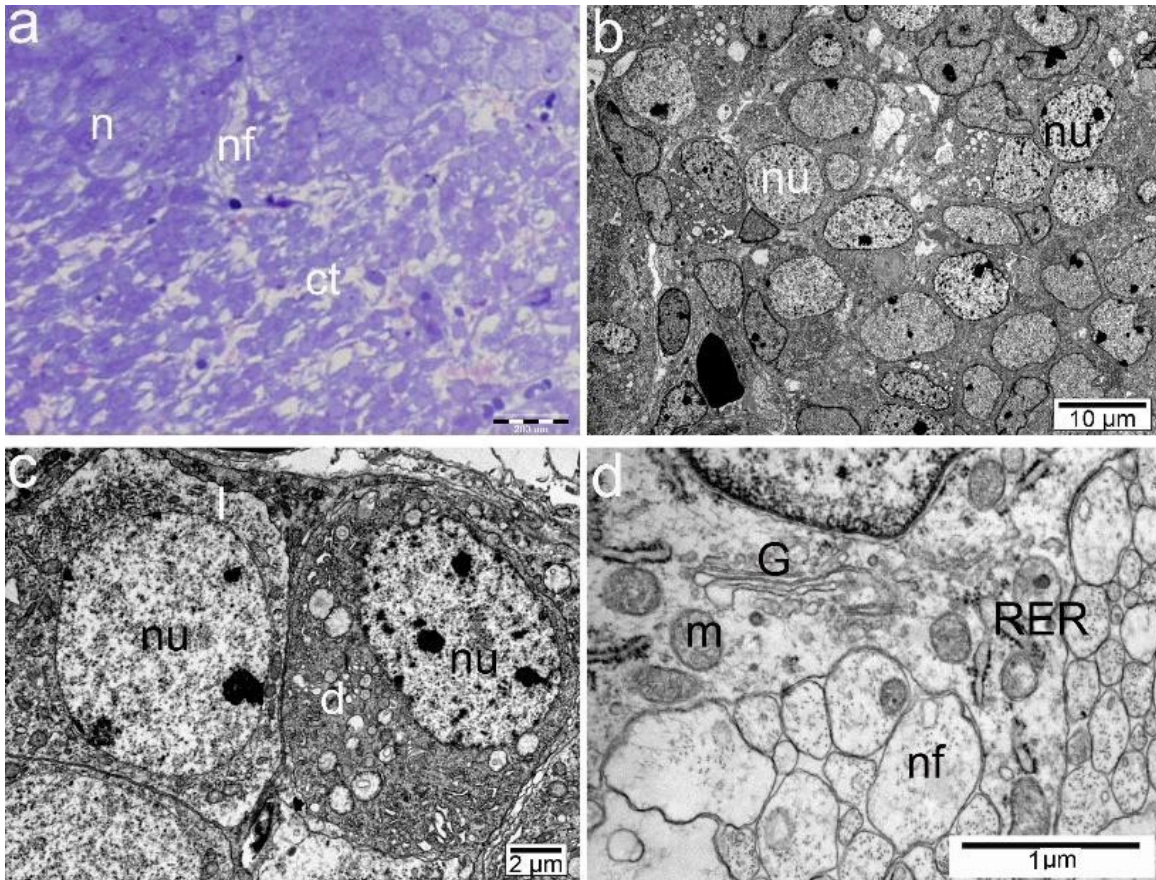


Slika 24. Dvostruka imunofluorescencija u spinalnim ganglijima normalnog fetusa i fetusa sa spinom bifidom primjenom biljega serotoninskih receptora i pgp biljega. U normalnog ljudskog fetusa stosti 10. tjedana, većina ganglijskig stanica spinalnih ganglija pokazuje izražaj sr1 (a) i pgp (b) biljega. Ko-lokalizacija sr1/pgp s DAPI jezgrinom bojom (c) pokazuje njihov paralelni izražaj (strelice u isječku) u većini ganglijskih stanica (d). U fetusa sa spinom bifidom (9 tjedana starosti), vidi se slabi izražaj sr1 samo u nekim ganglijskim stanicama (e). Ko-lokalizacija s biljezima pgp (f) i DAPI (g), pokazuje njihov paralelni izražaj (strelica u isječku) u samo nekim ganglijskom stanicama (h). Povećanje X40, mjerilo 100um (a-h).

#### 4.9. Elektronska mikroskopija stanica spinalnih ganglija (polu-tanki rezovi i ultrastrukturna analiza)

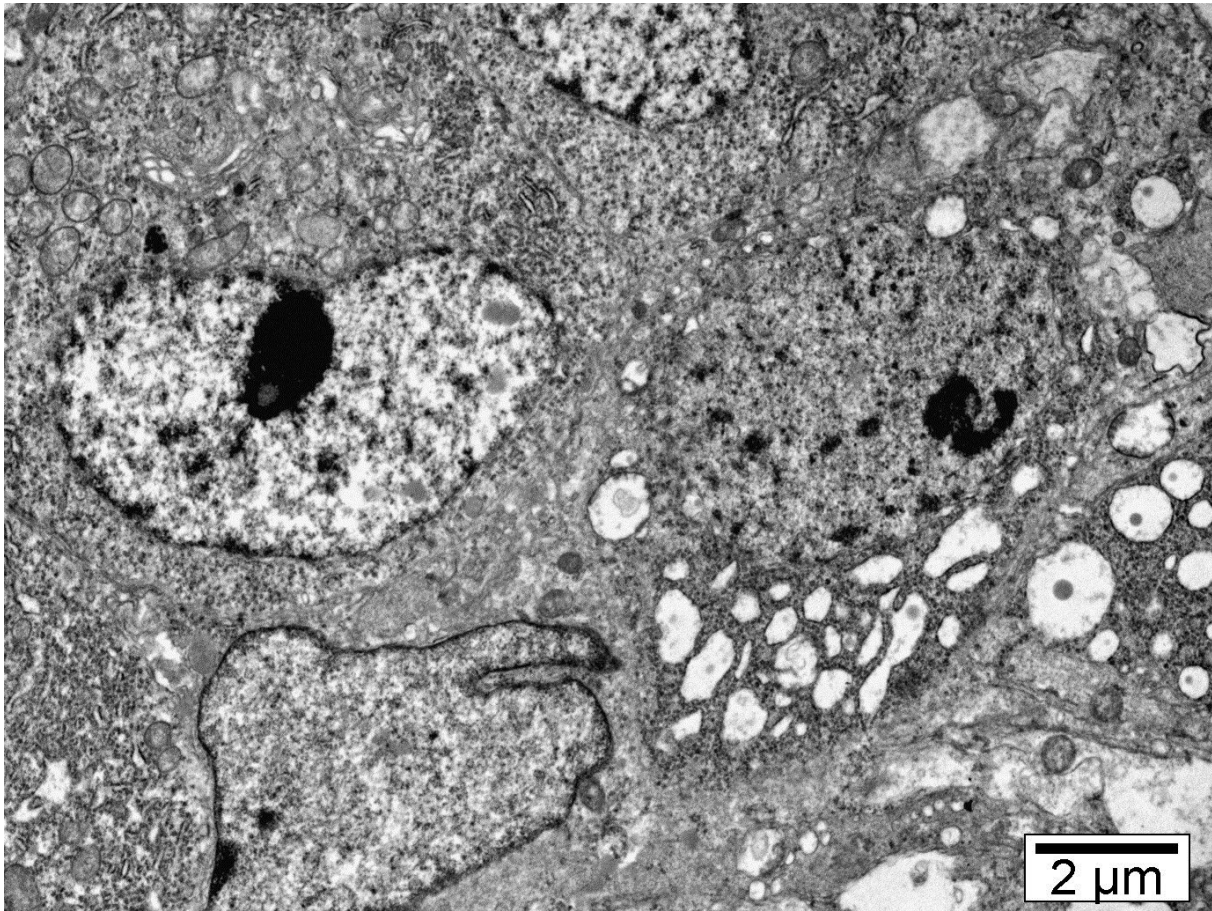
U 8. tjednu embrionalnog razvoja, polu-tanki rez kroz spinalni ganglij pokazuje živčane i glija stanice, živčana vlakna te vezivno tkivo s krvnim žilama (Slika 25a). Na manjim povećanjima, elektronsko mikroskopski se uočavaju dvije vrste živčanih stanica, od kojih jedne imaju svjetlu citoplazmu i blijedu jezgru s izraženim nukleolusom, dok su druge stanice s nešto tamnijom citoplazmom (Slika 25b). Veća povećanja pokazuju prisustvo mitohondrija i hrapave endoplazmatske mrežice u citoplazmi neurona (Slika 25c). U gangliju se uočavaju i živčana vlakna, smještena između živčanih stanica (Slika 25d).





Slika 25 Elektronskomikroskopske slike spinalnih ganglija tijekom razvoja (8. tjedan). Toluidinskim modrilom obojeni polu-tanki rez kroz spinalne ganglije pokazuje njegovu organizaciju: neurone (n), živčana vlakana (nf) i vezivno tkivo (ct) (a). Elektronska mikroskopija (b-c) pokazuje rezlike u izgledu živčanih stanica: jezgre (nu) s izraženim jezgricama, svjetlija (l) i tamnija (d) citoplazma. Veće povećanje (d) pokazuje hrapavu endoplazmatsku mrežicu (RER), Golgijevo tijelo (G) i mitohondrije (m) u citoplazmi neurona, te živčana vlakna (nf). Mjerilo: 200  $\mu\text{m}$  (a), 10  $\mu\text{m}$  (b), 2  $\mu\text{m}$  (c) i 1  $\mu\text{m}$  (d).

Unutar stanične populacije ganglijskih stanica, uz aktivne neurone i glija stanice mogu se naći i stanice koje su krenule u smjeru stanične smrti. Takve stanice imaju vakuoliziranu citoplazmu i jezgru na čijoj površini se gube obrisi stanične i jezgrine ovojnice (Slika 26).



Slika 26. Elektronskomikroskopska slika ganglija tijekom razvoja (8. tjedana). Vidi se stanica s vakuoliziranom citoplazmom i odsustvaom stanične i jezgrine ovojnice (desno). Mjerilo: 2µm.

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Razvoj serotoninskih receptora tijekom rane diferencijacije ljudske kralježničke moždine

Naše je istraživanje pokazalo da se već tijekom ranih stadija ljudskog razvoja, izražaj sr1 receptora može naći u ventrikularnoj zoni i vanjskom dijelu intermedijarne zone kralježničke moždine. U usporedbi sa sr1 receptorom, sr2 i sr3 su pokazivali nešto slabiji izražaj, koji se ravnomjerno protezao kroz lateralnu stijenku kralježničke moždine. Ovakav izražaj sr1 receptora ukazuje na njegovu ulogu u proliferaciji neuroepitelnih stanica u ventrikularnoj zoni i istovremenom poticanju diferencijacije neuroblasta u intermedijarnoj zoni. Tijekom daljnjeg razvoja kralježničke moždine, intenzitet izražaja serotoninskih receptora povećavao se prvo u području motornih neurona u prednjim rogovima, a zatim, s nešto slabijim intenzitetom i u intermedijarnim i dorzalnim rogovima kralježničke moždine koji sadržavaju autonomne i osjetne neurone. Ko-lokalizacija serotoninskih receptora s biljezima živčanih stanica uočena je u sva tri roga intermedijarne zone, ukazujući tako na ulogu serotonina u diferencijaciji različitij vrsta neurona (motornih, autonomnih i osjetnih). Ipak, tijekom kasnijih razvojnih stadija, izražaj sr2 i sr3 prvenstveno se povećavao u područjima krovne ploče i ploče dna. U tim područjima su sr2 i sr3 ko-lokalizirali s biljezima glija stanica, ukazujući na važnost ovih dvaju receptora u oblikovanju središnjih dijelova prednjih i stražnjih područja kralježničke moždine. Tijekom 10. razvojnog tjedna, sveukupni izražaj sr1 i sr2 receptora se povećavao, dok se izražaj sr3 receptora smanjivao. Naše je istraživanje ukazalo na razlike u lokalizaciji, intenzitetu izražaja i razvojnoj ulozi triju serotoninskih receptora tijekom normalnog razvoja kralježničke moždine u čovjeka. Prethodna istraživanja, koja su uglavnom provedena na pokusnim životinjama, također su pokazala moguću ulogu serotonina kao čimbenika rasta važnog u razvoju mozga u sisavaca, te njegovo djelovanje na proliferaciju i diferencijaciju neurona. Štoviše, intenzitet metabolizma serotonina bio je veći u živčanom tkivu tijekom razvoja nego u bilo kojem kasnijem razdoblju života. Uz to, dokazano je da i drugi čimbenici poput supstancije P, ACTH i dopamina mogu utjecati na razvoj serotoninskih neurona. Tako je dopamin inhibitorno djelovao na serotoninske neurone, do su supstancija P i ACTH imali poticajno (stimulatorno) djelovanje (33). U ljudskim embrijima, neuroni pozitivni na AChE, supstanciju P i enkefaline, dokazani su u svim područjima intermedijarne zone kralježničke moždine, upućujući na moguće modulatorno djelovanje neuropeptida na kolinergične aktivnosti autonomnog sustava (91).

Analiza izražaja serotoninskih receptora u pokusnih životinja pokazala je da se sr1 receptor pojavljivao u većoj količini samo tijekom specifičnih razvojnih razdoblja, a zatim bi se postepeno smanjivao. S druge strane, sr2 uopće nije bio prisutan tijekom embrionalnog razvoja pokusnih životinja, što je u suprotnosti s našim nalazima na ljudskim embrijima. Za sr3 receptor je pokazano da ima inhibitorno djelovanje na razvoj serotoninskih neurona u pokusnih životinja (33). Istraživanja na kasnijim fazama fetalnog razvoja čovjeka (između 21. i 32. tjedna) pokazala se da su receptori sr1 i sr2 imali pojačani izražaj tijekom razvoja talamusa, dok je imunoreaktivnost za sr3 i sr6 bila odsutna i u samim tijelima živčanih stanica i u vlaknima serotoninskih neurona (92). Upravo suprotne rezultate dalo je naše istraživanje na ranijim stadijima ljudskih embrija i fetusa, u kojem je pokazana važnost izražaja sr3 receptor u krovnoj ploči i ploči dna tijekom oblikovanja kralježničke moždine (93).

Općenito su istraživanja na ljudskim uzorcima vrlo rijetka, a ona su pokazala rani izražaj različitih neurotransmitera i peptida u ljudskom središnjem živčanom sustavu tijekom embrionalnih i fetalnih razvojnih faza, uključujući i serotonin i serotoninske receptore. Mnogi od tih neurotransmitera i peptide, slično kao i serotonin, smanjivali su se tijekom normalnog ili abnormalnog razvoja kao posljedica odumiranja stanica (stanične smrti) ili zbog nekih drugih uzroka (94). Slično našim istraživanjima, pokazano je da serotoninski neuroni u produženoj moždini šalju svoje bulbospinalne aksone u sve rogove kralježničke moždine inervirajući tako motorne, autonomne i osjetne neurone kao i respiratorne jezgre. U kralježničkoj moždini, serotoninski receptori su uglavnom lokalizirani na aksonskim završecima. Benarroch i suradnici (35) su izvijestili da sr1 receptori imaju inhibitorno djelovanje i smanjuju neuronalni prijenos (depolarizaciju), dok sr2 prvenstveno imaju poticajno (ekscitacijsko) djelovanje. Za sr3 receptore se smatra da su neselektivni kationski kanali koji uzrokuju brzu depolarizaciju neurona. Za aktivaciju serotoninskih receptora je pokazano da uzrokuje opće povećanje aktivnosti (ekscitabilnosti) motornih neurona kroz modulaciju nekoliko vrsta ionskih kanala.

## **5.2. Izražaj serotoninskih receptora u malformiranom humanom fetusu s cervikalnom spinom bifidom**

Histološka analiza fetusa s cervikalnom spinom bifidom razotkrila je različite oblike morfoloških promjena uzduž torakalnog dijela kralježničke moždine, smještene kaudalno od njezinog vratnog dijela zahvaćenog rascjepom. Promjene su obuhvaćale odstupanja u oblikovanja kralježničke



moždine, počevši od promjena u smislu hipertrofične marginalne zone do omatanja jedne od lateralnih stjenki kralježničke moždine preko njezine druge polovine. Na svim razinama presjeka, promjene krovne ploče imale su drugačiji izgled u odnosu na krovnu ploču normalnog fetusa iste starosti. Uz značajne promjene u oblikovanju krovne ploče, kralježnička moždina malformiranog fetusa pokazivala je niže razine intenziteta signala sr1 i sr2, te višu razinu signala sr3 u usporedbi s normalnom kralježničkom moždinom. Nepravilnosti u oblikovanju i raspodjeli signala serotoninskih receptora bile su svojstvene području krovne ploče, u kojem je signal sr3 bio jači od signala sr1 i sr2. Uz navedeno, uočili smo odsustvo ko-lokalizacije serotoninskih receptora i pan-neuronalnog biljega (koje inače postoji u normalnoj kralježničkoj moždini), povećano prisustvo proliferirajućih stanica kao i povećano nakupljanje apoptotskih stanica u morfološki promijenjenoj krovnoj ploči malformiranog fetusa.

Na temelju gore navedenih nalaza, smatramo da bi povećana proliferacijau u području krovne ploče mogla biti posljedica pokušaja zatvaranja dorzalnog dijela kralježničke moždine, dok bi apoptoza trebala omogućiti preoblikovanje abnormalne krovne ploče.

Analiza životinjskih modela pokazala je da su povrede kralježničke moždine bile povezane s različitim odstupanjima u projekcijama serotoninskih receptora, što je ovisilo o vrsti i težini povrede, te životinji koja je korištena u istraživanju. Slično rezultatima našeg istraživanja na humanim fetusima, u kralježničkoj moždini štakora neposredno ispod mjesta oštećenja kralježničke moždine, imunoreaktivnost serotoninskih receptora bila je smanjena u odnosu na normalnu kralježnicu, dok su promjene bile manjeg intenziteta u kaudalnijim područjima tj. u područjima udaljenijim od mjesta oštećenja (95, 96). Nakon povrede kralježničke moždine, aksoni serotoninskih neurona obično degeneriraju kaudalno od mjesta povrede, dok se kranijalno od tog oštećenja aksoni bujaju, bez obzira na vrstu povrede. Pokazano je da aktivacija specifičnih receptora može povećati aktivnost serotoninskih neurona i tako pospješiti oporavak nakon povrede kralježničke moždine (54, 55). S druge strane, nakon povrede kralježničke moždine, bujanje aksona serotoninskih neurona može biti inhibirano prisutnošću mijelin-inhibirajućih proteina koji se vežu na Nogo-66 receptor (NgR) na serotoninskim neuronima, i tako spriječiti regeneraciju oštećene kralježničke moždine.

Kod malformiranog ljudskog fetusa sa spinom bifidom, dorzalni dio kralježničke moždine bio je teško oštećen, a u području kaudalno od tog oštećenja uočili smo bujanje aksona u pokušaju zatvaranja otvorene krovne ploče. Sličan proces uočen je u slučaju dorzalne hemisekcija na mišu i umjerene ozljede (kontuzije) u štakora (97, 98). Naime, zbog većeg izražaja pan-neuronalnog

biljega koji je antagonist NgR, bujanje aksona serotoninskih neurona bilo prisutno ispod mjesta oštećenja (99). Slično se može postići genskom delecijom NgR u miševa, koja omogućuje regeneraciju aksona serotoninskih neurona preko mjesta oštećenja čak i nakon potpunog presijecanja kralježničke moždine (100).

Jedan od glavnih znakova povrede kralježničke moždine je spasticitet, koji može biti posljedica međudjelovanja nekoliko mehanizama, uključujući i povredu aksona serotoninskih neurona koji inerviraju motorne neurone. Povećana podražljivost motornih neurona može biti posljedica aktivacije protoka kalcijevih iona, koja je uzrokovana djelovanjem sr2a receptora, nakon koje slijedi kompenzatorno povećana regulacija sr2b i sr2c receptora. Nakon povrede kralježničke moždine, smanjenje aktivnosti sr1 receptora doprinosi neprekidnoj depolarizaciji motornih neurona tijekom spazma (35). Misli se da modulacija podražljivosti motornih neurona pod utjecajem serotoninskih receptora ovisi o količini oslobođenog neurotransmitera i specifičnom položaju serotoninskih receptora unutar kralježničke moždine (49). U miševa je transplantacija iz rafe jezgara (B1, B2, B3) dovela do re-inervacije specifičnih ciljnih područja, a neuroni koji su nastali od transplantata uspjeli su preživjeti i integrirati se unutar kralježničke moždine domaćina (101-103).

### **5.3. Značenje proliferacije i apoptoze u oblikovanju kralježničke moždine i spinalnih ganglija tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom**

Mnogobrojni radovi na pokusnim životinjama, kao i manji broj radova na ljudskim embrijima i fetusima ukazali su na važnost stanične proliferacije u rastu kralježničke moždine i zadebljanju njezinog lateralnog zida te zatvaranju stražnjeg dijela neuralne cijevi tj. oblikovanja krovne ploče (18, 19). Tijekom diferencijacije i oblikovanja neuralne cijevi u čovjeka, pokazana je značajna uloga stanične smrti, koja se razlikovala u kranijalnim dijelovima kralježničke moždine u odnosu na njezin kaudalni dio. Tako je pokazano da se u kranijalnom dijelu (nastaje tijekom primarne neurulacije) pojavljuje apoptotski oblik stanične smrti, dok je za kaudalni dio (nastaje tijekom sekundarne neurulacije) svojstvena masivna stanična smrt, koja dovodi do regresije kaudalnog dijela kralježničke moždine (9, 18).

U našem istraživanju, pokazali smo važnost obaju procesa tj. i proliferacije i stanične smrti u pokušaju zatvaranja i oblikovanja krovne ploče na mjestu kaudalno od spine bifide (torakalno područje). Istraživanja na životinjama su pokazala da postoje neke zajedničke promjene u

kralježničkoj moždini nakon povrede, a uključuju paranodalne mijelinske abnormalnosti, tj. degenerativne i demijelinizacijske promjene koje smanjuju provodljivost i podražljivost živčanih vlakana. Elektronska mikroskopija ukazala je na nepravilnu staničnu membranu neurona i smanjenje promjere aksona, te abnormalnosti mijelina u živčanih vlaknima nakon povrede (68). Naša elektronsko-mikroskopska istraživanja na ljudskim spinalnim ganglijima tijekom razvoja pokazala su prisustvo apoptotskih stanica, prvenstveno apoptoze neurona. U pilećih embrija također je bila prisutna apoptotska smrt Schwannovih stanica tijekom normalnog razvoja, kao i u oštećenim motornim neuronima (104).

U razvojnim poremećajima poput spine bifide u ljudskog embrija, tako i kod pokušaja oporavka kralježničke moždine nakon povrede, uočene su neka zajedničke karakteristike. To uključuje povećanje proliferaciju astrocita s posljedičnim stvaranjem glijalnog ožiljka te proliferacije oligodendrocita u pokušaju remijelinizacije oštećenih vlakana. Ovi su procesi posljedica pokušaja „popravka“ oštećenog područja. Nakon proliferacije slijedi programirana stanična smrt (apoptoza) koja nastoji uspostaviti takav oblik zahvaćenog područja koji je što sličniji normalnom oblikovanju (93, 105).

#### **5.4. Izražaj serotoninskih receptora u spinalnim ganglijima tijekom normalnog razvoja i u fetusa sa spinom bifidom**

Tijekom analiziranih faza razvoja ljudskih embrija i fetusa, spinalni gangliji su se postupno povećavali, dok je izražaj serotoninskih receptora imao specifični vremenski uzorak. Naj snažniji izražaj u spinalnim ganglijima imao je sr1, a izražaj sr1 i sr2 postupno povećavao tijekom diferencijacije ganglija. Izražaj sr3 je uglavnom bio slabiji od izražaja sr1 i sr2, ali je sr3 imao vrhunac intenziteta između sedmog i osmog tjedna razvoja. U našem istraživanju, serotoninski receptori su uglavnom ko-lokalizirali s biljegom neurona u živčanim stanicama spinalnih ganglija. U fetusa sa spinom bifidom starog 9. tjedana, uočili smo abnormalnosti oblikovanja ganglija, kao i smanjen intenzitet signala svih serotoninskih receptora u odnosu na njihov intenzitet u zdravim ganglijima. Prethodna istraživanja na različitim pokusnim životinjama dovela su do značajno različitih rezultata. Tako je ukupan broj serotoninskih neurona varirao u spinalnim ganglijima ovisno o vrsti životinje koja se analizirala i razini istraživog ganglija uzduž kranio-kaudalne osovine kralježničke moždine. Serotoninski neuroni prepoznati su kao ključna stanična subpopulacija tijekom razvoja spinalnih ganglija, posebno sr5a i sr5b receptori

koji su pronađeni isključivo tijekom embrionalnog razvoja (106). Drugi različiti podtipovi serotoninskih receptora koji su bili prisutni u spinalnim ganglijima odraslih, imali su važnu ulogu u prijenosu senzoričkih osjeta, a većina velikih i malih neurona u spinalnim ganglijima pripadali su serotoninskim neuronima (107, 108).

## **6. ZAKLJUČCI**

- 1/ Tijekom ranog razvoja čovjeka i procesa primarne neurulacije uočen je blag ili umjeren izražaj sva tri serotoniniska receptora (sr1, sr2 i sr3) u neuroblastima kralježničke moždine i spinalnih ganglija.
- 2/ Tijekom daljnjeg razvoja, sazrijevanja neurona pratilo je povećanje izražaja serotoniniskih receptora prvo u motornim neuronima ventralnih rogova, a zatim i u autonomnim i osjetnim neuronima intermedijarnih i dorzalnih rogova.
- 3/ Opisani uzorak izražaja sr ukazao je na važnost sr1 prvenstveno u diferencijaciji neurona, dok su sr2 i sr3 imali ulogu u kontroli oblikovanja ploče dna i krovne ploče.
- 4/ U ljudskim ganglijima tijekom razvoja, sr1 i sr2 imali ulogu u sazrijevanju neurona tijekom cijelog ispitivanog razdoblja, dok je povećani izražaj sr3 opažen u ganglijima samo tijekom ograničenog vremenskog razdoblja.
- 5/ Kod abnormalnog ljudskog fetusa sa spinom bifidom, osim poremećaja u oblikovanju slojeva kralježničke moždine i područja krovne ploče, ukupni izražaj sr bio je slabiji u kralježničkoj moždini i ganglijima u usporedbi s normalnim fetusom, dok su područja krovne ploče pokazala povećani izražaj sr3.
- 6/ U području krovne ploče, uočena je povećana prisutnost apoptotskih i proliferirajućih stanica, koje su vjerojatno služile u pokušaju zatvaranja i oblikovanja dorzalnog dijela kralježničke moždine u fetusa sa spinom bifidom.
- 7/ Naša studija ukazala je na obrazac izražaja serotoniniskih receptora koji je specifičan upravo za kralježničku moždinu i spinalne ganglije čovjeka tijekom razvoja, te na vezu njihovog poremećenog izražaja s abnormalnim procesom neurulacije u ljudskom fetusu sa spinom bifidom.
- 8/ Mehanizam zatvaranje krovne ploče uključuje aktivnost sr3 kao i proliferaciju glijalnih stanica (prvenstveno astrocita i oligodendrocita) u dorzalnog dijelu kralježničke moždine.

## **7. SAŽETAK**

**Ciljevi:** Izražaj 5-HT (serotoninskih) receptora (sr) je analiziran tijekom ranog razvoja čovjeka u kralježničkoj moždini i ganglijima 16 ljudskih plodova (starih 5-10 tjedana), te u 9-tjednom fetusu sa spinom bifidom.

**Materijali i metode:** Histološki uzorci tkiva ljudskog embrija i fetusa pripadaju Arhivskoj zbirici ljudskih embrija, pohranjenoj u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Korištenje ljudskog materijala odobrila su Etička povjerenstva KBC Split i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Imunohistokemijskom metodom dokazani su receptori na serotonin- pozitivnim stanicama (sr1, sr2 i sr3s), stanicama u proliferaciji (primjenom biljega Ki-67), kao i apoptotskim stanicama (primjenom kaspaza-3 i TUNEL metoda). Dvostruka imunofluorescencija korištena je za ko-lokalizaciju sr biljega s biljekom proteinskog gena peptida (pgp) 9.5 specifičnog za neurone te s GFAP biljekom za glijalne stanice. Također su korišteni elektronska mikroskopija i statistička mjerenja, uključujući semi-kvantifikaciju i izražaj različitih proteina kvantificiranih kao površina ispod krivulje (AUC) histograma intenziteta florescencije.

**Rezultati:** Nakon procesa primarne neurulacije (pn), u kranijalnoj kralježničkoj moždini postupno se diferenciraju karakteristične zone kao što su ventrikularna zona (vz), intermedijarna zona (iz) i rubna (marginalna) zona (mz), kao i krovna ploča (r) i ploča dna (f) u području središnje linije. Imunohistokemijskim metodama uočeni su umjereni izražaj sr1 i sr2 i blagi izražaj sr3 receptora u neuroblastima kralježničke moždine i spinalnim ganglijima tijekom najranijih faza razvoja. Tijekom daljnjeg razvoja, izražaj sr1 postupno se povećavao prvo u motornim neuronima, a zatim i u autonomnim i osjetnim neuronima, dok su se izražaji sr2 i sr3 snažno povećavali u ploči dna i krovnoj ploči. Koekspresija biljega sr/pgp 9.5 bila je svojstvena razvoju neurona, dok je ko-lokalizacija izražaja sr/GFAP biljega uočena u krovnoj ploči. U ganglijima se ekspresija sr3 povećala samo tijekom ograničenog razvojnog razdoblja, dok je intenzitet sr1 i sr2 izražaja rastao tijekom cijelog istraživanog razdoblja. Kod malformiranog fetusa s cervikalnom spinom bifidom, poremećaji dorzalnog dijela kralježničke moždine (krovne ploče) uočeni su u područja kralježničke moždine kaudalno od njezinog cervikalnog rascijepa, dok su se gangliji činili veći nego u normalnog fetusa. U kralježničkoj moždini i ganglijima malformiranog fetusa, morfološke abnormalnosti pratio je slabiji izražaj sr1 i sr2 te jači izražaj sr3 u odnosu na normalni fetus iste dobi. Abnormalna morfologija krovne ploče uključivala je višak apoptotskih i proliferirajućih stanica i povećani izražaj sr3. Elektronska mikroskopija spinalnih ganglija u 10. tjednu razvoja pokazala je postojanje dvaju morfoloških oblika neurona



(svijetle i tamne stanice) te apoptotičkih stanica, kojima je bila svojstvena vakuolizacija organela i dezintegracija stanične membrane.

**Zaključci:** Naši rezultati ukazuju na postojanje obrasca izražaja sr koji je specifičan za ljudsku vrstu, važnost sr1 u diferencijaciji neurona te sr2 i sr3 u kontroli morfogeneze krovne ploče tijekom normalnog i poremećenog razvoja. Također smo pokazali važnost proliferacije glija stanica poput astrocita i oligodendrocita, kao načina zatvaranja krovne ploče u području kralježničke moždine ispod cervikalnog rascjepa u malformiranog fetusa sa spinom bifidom.

## **8. SUMMARY**

**Title: Expression of serotonin 5-HT receptors during the normal and disturbed development of human spinal cord and ganglia**

**Objectives:** We analyzed the expression of 5-HT (serotonin) receptors (sr) during early human development in the spinal cord and ganglia of 16 human conceptuses (5-10-weeks old), and in the 9-week fetus with spina bifida.

**Materials and methods:** Histological samples of human embryonic and fetal tissue belong to the Archive Collection of human embryos, stored in the Department of Anatomy, Histology and Embryology, School of Medicine University of Split. The use of human material was approved by the Ethical Committees of the University Hospital in Split and School of Medicine in Split. The immunohistochemical method was used to detect receptors of serotonin-positive cells (sr1, sr2 and sr3s), proliferating (Ki-67) cells, as well as apoptotic cells (caspase-3 and TUNEL method). Double immunofluorescence was used for co-localization of sr markers with protein gene peptide (pgp) 9.5 marker for neurons, and with GFAP, marker for glial cells. The electron microscopy and statistical measurements, including semi-quantification and expression of different proteins quantified as the area under the curve (AUC) of fluorescence intensity histograms were used as well.

**Results:** Following the primary neurulation process (pn), the cranial spinal cord gradually developed characteristic layers such as ventricular zone (vz), intermediate zone (iz) and marginal zone (mz), as well as roof (r) and floor plate (f) areas in the midline. By using immunohistochemical method, we found moderate (sr1 and sr2) and mild (sr3) expression in the neuroblasts of the spinal cord and ganglia during earliest developmental stages. During further development, gradual increase in sr1 expression characterized the motoneurons, as well as autonomic and sensory neurons, while strong increase in sr2 and sr3 expression was observed in the floor and roof plates. While the developing neurons were characterized by co-expression of sr/pgp 9.5, sr/GFAP co-localization was observed in the roof plate. In the ganglia, sr3 expression increased during limited developmental period, while expression of sr1 and sr2 increased throughout the investigated period. In malformed fetus with cervical spina bifida, aberrations of dorsal part of the spinal cord (roof plate) characterized the areas of the spinal cord caudal to its cervical dysraphyc part, while ganglia appeared larger than in normal fetus. In the spinal cord and ganglia of malformed fetus, morphological abnormalities were accompanied by weaker sr1 and sr2, and stronger sr3 expression. In the roof plate of abnormal fetus, we found the excess of

apoptotic and proliferating, cells as well as an increased sr3 expression. Electron microscopy of the 10th week spinal ganglia revealed existence of two morphological types of neurons (light and dark cells) and apoptotic cells, characterized by vacuolization of organelles and disintegration of cell membrane.

**Conclusions:** Results of our study point to the human-species specific expression pattern of sr, importance of sr1 in neuronal differentiation, and sr2 and sr3 in the control of the roof plate morphogenesis, both during normal and disturbed embryonic development. We also suggest importance of astrocyte and oligodendrocytes proliferation as a mode of closing of the roof plate area under the cervical spina bifida in malformed fetus.

## **9. LITERATURA**

1. Mitrečić D. Razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjih mutanata splotch i truncate (disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2006.
2. Kandel ER, Koester JD, Mack SK, Siegelbaum SA. Principles of neural science. 6 izd. Mc Graw Hill, 2021.
3. Judaš M, Kostović I. Temelji neuroznanosti. (Internet). Zagreb: MD; 1997, (pristupljeno 12.03.2024.) Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:136919>
4. Fitzgerald MJT, Fitzgerald M. Spinal cord. In Human Embryology, Saunders WB (Ed): Bailliere Tindall, London, UK, 1994; pp 55-8.
5. Griffith CM, Wiley MJ, Sanders EJ. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anatomy and embryology* 1992, 185, 101-113, doi:10.1007/BF00185911.
6. Nieuwsteijn RA, Hartwig NG, Vermeij-Keers C, Valk J. Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology* 1993, 48, 21-31, doi:10.1002/tera.1420480106.
7. Saraga-Babic M, Sapunar D, Wartiovaara J. Variations in the formation of the human caudal spinal cord. *Journal fur Hirnforschung* 1995, 36, 341-7.
8. Saraga-Babic M, Krolo M, Sapunar D, Terzic J, Biocic M. Differences in origin and fate between the cranial and caudal spinal cord during normal and disturbed human development. *Acta neuropathologica* 1996, 91, 194-9, doi:10.1007/s004010050413.
9. Sapunar D, Vilovic K, England M, Saraga-Babic M. Morphological diversity of dying cells during regression of the human tail. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2001,183, 217-22, doi:10.1016/S0940-9602(01)80220-X.
10. Fallon JF, Simandl BK. Evidence of a role for cell death in the disappearance of the embryonic human tail. *The American journal of anatomy* 1978, 152, 111-129, doi:10.1002/aja.1001520108.
11. Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A. Neural induction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:411-33.
12. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 2005;282(1):1-13
13. Sadler TW, Langman J. Medical embryology. 12th ed./ T.W. Sadler. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2012.
14. Verity C, Firth H, French-Constant C. Congenital abnormalities of the central nervous

- system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Mar;74 Suppl 1(Suppl 1):i3-8.
15. Chellathurai A, Kathirvelu G, Mukkada PJ, Rajendran K, Ramani R. Spinal Dysraphisms: A New Anatomical-Clinicoradiological Classification. *Indian J Radiol Imaging*. 2022 Jan 11;31(4):809-29.
  16. O'Rahilly R, Müller F. Somites, spinal Ganglia, and centra. Enumeration and interrelationships in staged human embryos, and implications for neural tube defects. *Cells Tissues Organs*. 2003;173(2):75-92.
  17. Chen Y, Su D, Sun X, Gui W. Open spina bifida characterisation in a dog foetus. *Vet Med Sci*. 2023 Nov;9(6):2452-7. doi: 10.1002/vms3.1266.
  18. Vilović K, Ilijić E, Glamoclija V, Kolić K, Bocina I, Sapunar D, i sur. Cell death in developing human spinal cord. *Anat Embryol (Berl)*. 2006;11(1):1-9.
  19. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*. 2002;115(1):97- 105.
  20. Vukojevic K, Janjic T, Saraga-Babic M. Developmental patterns of Ki-67, Oct-4 and  $\alpha$ -tubulin proteins expression in the human spinal cord. *Acta Histochem*. 2014;6(4):619-26.
  21. Vukojevic K, Filipovic N, Tica Sedlar I, Restovic I, Bocina I, Pintaric I, i sur. Neuronal differentiation in the developing human spinal ganglia. *Anat Rec (Hoboken)* 2016, 299, 1060-72, doi:10.1002/ar.23376.
  22. Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989 Jun;2(6):1525-34.
  23. Oppenheim RW. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci*. 1989;12(7):252-5.
  24. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;181(3):195-213.
  25. Restović I, Bočina I, Vukojević K, Kero D, Filipović N, Raonić J, Vučinić J, Vukmirović F, Vučković L, Saraga-Babić M. Time course and expression pattern of the neuronal markers in the developing human spinal cord. *Int J Dev Neurosci*. 2019;74:1-10. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.02.001.
  26. Pannese E. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1981;65:1-111.
  27. Makker PG, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, Park SB, Goldstein D, Moalem-Taylor G. Characterisation of Immune and Neuroinflammatory

Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. PLoS One. 2017 Jan 26;12(1):e0170814.

28. Sharma H, Ji E, Yap P, Vilimas P, Kyloh M, Spencer NJ, i sur. Innervation Changes Induced by Inflammation in the Murine Vagina. Neuroscience. 2018;372:16-26.

29. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D. Human Dorsal Root Ganglia. Front Cell Neurosci. 2019;13:271.

30. Vukojevic K, Petrovic D, Saraga-Babic M. Nestin expression in glial and neuronal progenitors of the developing human spinal ganglia. Gene Expr Patterns. 2010;10(2-3):144-51.

31. Yew DT, Chan WY, Luo CB, Zheng DR, Yu MC. Neurotransmitters and neuropeptides in the developing human central nervous system. A review. Biological signals and receptors 1999, 8, 149-59, doi:10.1159/000014586.

32. Hung AS, Tsui TY, Lam JC, Wai MS, Chan WM, Yew DT. Serotonin and its receptors in the human CNS with new findings - a mini review. Current medicinal chemistry 2011, 18, 5281-8, doi:10.2174/092986711798184253.

33. Whitaker-Azmitia PM, Clarke C, Azmitia EC. Localization of 5-HT1A receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glial interactions and psychoactive drug mechanism of action. Synapse 1993, 14, 201-205, doi:10.1002/syn.890140303.

34. Best J, Nijhout HF, Reed M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. Theor Biol Med Model. 2010;7:34. doi: 10.1186/1742-4682-7-34.

35. Benarroch EE. Medullary serotonergic system: organization, effects, and clinical correlations. Neurology 2014, 83, 1104-1111, doi:10.1212/WNL.0000000000000806.

36. Taniwaki T, Schwartz JP. Somatostatin enhances neurofilament expression and neurite outgrowth in cultured rat cerebellar granule cells. Brain research. Developmental brain research 1995, 88, 109-116, doi:10.1016/0165-3806(95)00090-z.

37. Poian LR, Chiavegatto S. Serotonin Syndrome: The Role of Pharmacology in Understanding Its Occurrence. Cureus. 2023;15(5):e38897. doi:10.7759/cureus.38897.

38. Middlemiss DN, Palmer AM, Edel N, Bowen DM. Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in normal and Alzheimer brain. J Neurochem. 1986;46(3) 993-6., doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb13069.x.



39. Okaty BW, Freret ME, Rood BD, Brust RD, Hennessy ML, deBairos D, i sur. Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron* 2015, 88, 774-791, doi:10.1016/j.neuron.2015.10.007.
40. Ma W, Liu QY, Jung D, Manos P, Pancrazio JJ, Schaffner E, i sur. Central neuronal synapse formation on micropatterned surfaces. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1998; 111: 231–43.
41. Ballion B, Branchereau P, Chapron J, Viala D. Ontogeny of descending serotonergic innervation and evidence for intraspinal 5-HT neurons in the mouse spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002;137:81–8.
42. Xia Y, Chen D, Xia H, Liao Z, Tang W, Yan Y. Serotonergic projections to lumbar levels and its plasticity following spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 2017;649:70-7. doi: 10.1016/j.neulet.2017.04.013. Epub 2017 Apr 8.
43. Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:9-34; discussion 34-5. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb16870.x.
44. Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol.* 2017 Sep;31(9):1091-1120. doi: 10.1177/0269881117725915. Epub 2017 Aug 31.
45. Anastasio NC, Stutz SJ, Fink LH, Swinford-Jackson SE, Sears RM, DiLeone RJ, I sur. Serotonin (5-HT) 5-HT<sub>2A</sub> Receptor (5-HT<sub>2AR</sub>):5-HT<sub>2CR</sub> Imbalance in Medial Prefrontal Cortex Associates with Motor Impulsivity. *ACS Chem Neurosci.* 2015 ;6(7):1248-58. doi: 10.1021/acchemneuro.5b00094. Epub 2015 Jul 7.
46. Ogren SO, Eriksson TM, Elvander-Tottie E, D'Addario C, Ekström JC, Svenningsson P, i sur. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. *Behav Brain Res.* 2008 16;195(1):54-77. doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.023.
47. Viguiier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. *Eur J Pharmacol.* 2013;716(1-3):8-16. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.074.
48. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009;60:355-66. doi: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
49. Perrier JF, Cotel F. Serotonergic modulation of spinal motor control. *Curr Opin Neurobiol.* 2015;33:1-7. doi: 10.1016/j.conb.2014.12.008.
50. Saruhashi Y, Matsusue Y, Fujimiya M. The recovery of 5-HT transporter and 5-HT

- immunoreactivity in injured rat spinal cord. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129(9):1279-85. doi: 10.1007/s00402-008-0754-z.
51. Festoff BW, Nelson PG, Brenneman DE. Prevention of activity-dependent neuronal death: Vasoactive intestinal polypeptide stimulates astrocytes to secrete the thrombin-inhibiting neurotrophic serpin, protease nexin I. *J. Neurobiol.* 1996; 30: 255–266.
52. Gimenez y Ribotta M, Privat A. Biological interventions for spinal cord injury. *Curr. Opin. Neurol.* 1998; 11: 647–54.
53. Gimenez y Ribotta M, Sandillon F, Privat A. Influence of hypergravity on the development of monoaminergic systems in the rat spinal cord. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1998; 111: 147–57.
54. Hains BC, Fullwood SD, Eaton MJ, Hulsebosch CE. Subdural engraftment of serotonergic neurons following spinal hemisection restores spinal serotonin, downregulates serotonin transporter, and increases BDNF tissue content in rat. *Brain Res.* 2001; 913: 35–46.
55. Yakovlev A, Cabelguen JM, Orsal D, Gimenez y Ribotta M, Rajaofetra N, Drian MJ, i sur. Fictive motor activities in adult chronic spinal rats transplanted with embryonic brainstem neurons. *Exp. Brain Res.* 1995; 106: 69–78.
56. Perrin FE, Noristani HN. Serotonergic mechanisms in spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2019; 318: 174–191.
57. Magnuson DS, Lovett R, Coffee C, Gray R, Han Y, Zhang YP, i sur. Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat. *J Neurotrauma.* 2005;22(5):529-43. doi: 10.1089/neu.2005.22.529.
58. Harkany T, Abrahám I, Kónya C, Nyakas C, Zarándi M, Penke B, i sur. Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neurosci.* 2000;11(4):329-82. doi: 10.1515/revneuro.2000.11.4.329.
59. Harkany T, O'Mahony S, Keijser J, Kelly JP, Kónya C, Borostyánkoi ZA, i sur. Beta-amyloid(1-42)-induced cholinergic lesions in rat nucleus basalis bidirectionally modulate serotonergic innervation of the basal forebrain and cerebral cortex. *Neurobiol Dis.* 2001;8(4):667-78. doi: 10.1006/nbdi.2001.0398.
60. Hawthorne AL, Hu H, Kundu B, Steinmetz MP, Wylie CJ, Deneris ES, Silver J. The unusual response of serotonergic neurons after CNS Injury: lack of axonal dieback and enhanced sprouting within the inhibitory environment of the glial scar. *J Neurosci.* 2011

- ;31(15):5605-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6663-10.2011.
61. Chen SH, Wu CC, Tseng WL, Lu FI, Liu YH, Lin SP, i sur. Adipose-derived stell cells modulate neuroinflammation and improve functional recovery in chronic constriction injury in rat schiatic nerve. *Front Neurosci*, 2023, doi.org/10.3389/fnins.2023.1172740.
62. Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, i sur. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*. 2017;80(3S):S9-S22. doi: 10.1093/neuros/nyw080.
63. Yuan YM, He C. The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull*. 2013;29(4):421-35. doi: 10.1007/s12264-013-1358-3.
64. Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, i sur. NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol*. 2009;9:32. doi: 10.1186/1471-2377-9-32.
65. Siebert JR, Osterhout DJ. The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. *J Neurochem*. 2011;119(1):176-88. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07370.x. Epub 2011 Aug 16.
66. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):146-56. doi: 10.1038/nrn1326.
67. Zhang SX, Huang F, Gates M, Holmberg EG. Scar ablation combined with LP/OEC transplantation promotes anatomical recovery and P0-positive myelination in chronically contused spinal cord of rats. *Brain Res*. 2011;1399:1-14. doi: 10.1016/j.brainres.2011.05.005. Epub 2011 May 31.
68. Smith PM, Jeffery ND. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain Pathol*. 2006 Apr;16(2):99-109. doi: 10.1111/j.1750-3639.2006.00001.x.
69. Wrigley PJ, Gustin SM, Macey PM, Nash PG, Gandevia SC, Macefield VG, i sur. Anatomical changes in human motor cortex and motor pathways following complete thoracic spinal cord injury. *Cereb Cortex*. 2009 Jan;19(1):224-32. doi: 10.1093/cercor/bhn072. Epub 2008 May 14.
70. Farrell SF, Cowin G, Pedler A, Durbridge G, Sterling M. Spinal cord injury is not a feature of chronic whiplash-associated disorder: a magnetic resonance spectroscopy study. *Eur Spine J*. 2020 Jun;29(6):1212-18. doi: 10.1007/s00586-020-06407-6.
71. Zavvarian MM, Hong J, Fehlings MG. The Functional Role of Spinal Interneurons

Following Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci.* 2020 May 18;14:127. doi: 10.3389/fncel.2020.00127.

72. Chariker JH, Gomes C, Brabazon F, Harman KA, Ohri SS, Magnuson DSK, i sur. Transcriptome of dorsal root ganglia caudal to a spinal cord injury with modulated behavioral activity. *Sci Data.* 2019 Jun 7;6(1):83. doi: 10.1038/s41597-019-0088-4.

73. Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, Uwabe C, Kose K, Matsuda Y, i sur. Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI). *Am J Med Genet A.* 2007 Dec 15;143A(24):3121-6. doi: 10.1002/ajmg.a.31994.

74. Huang H, Xue R, Zhang J, Ren T, Richards LJ, Yarowsky P, i sur. Anatomical characterization of human fetal brain development with diffusion tensor magnetic resonance imaging. *J Neurosci.* 2009 Apr 1;29(13):4263-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2769-08.2009.

75. Goldman-Rakic PS, Selemon LD. Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1997;23(3):437-58. doi: 10.1093/schbul/23.3.437.

76. Galaburda AM, Sherman GF, Rosen GD, Aboitiz F, Geschwind N. Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann Neurol.* 1985 Aug;18(2):222-33. doi: 10.1002/ana.410180210.

77. Azam B, Wienecke J, Jensen DB, Azam A, Zhang M. Spinal Cord Hemisection Facilitates Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Cells to Produce Serotonin in the Subchronic but Not the Chronic Phase. *Neural Plast.* 2015;2015:549671. doi: 10.1155/2015/549671. Epub 2015 Oct 4.

78. Sławińska U, Majczyński H, Djavadian R. Recovery of hindlimb motor functions after spinal cord transection is enhanced by grafts of the embryonic raphe nuclei. *Exp Brain Res.* 2000 May;132(1):27-38. doi: 10.1007/s002219900323.

79. Kanno H, Pressman Y, Moody A, Berg R, Muir EM, Rogers JH, i sur. Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2014 Jan 29;34(5):1838-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2661-13.2014.

80. Ohtake Y, Li S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. *Brain Res.* 2015 Sep 4;1619:22-35. doi: 10.1016/j.brainres.2014.08.064. Epub 2014 Sep 1.

81. Kafka J, Lukacova N, Sulla I, Maloveska M, Vikartovska Z, Cizkova D. Hypothermia

- in the course of acute traumatic spinal cord injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2020;80(2):172-178.
82. Fehlings MG, Kim KD, Aarabi B, Rizzo M, Bond LM, McKerracher L, *i sur*. Rho Inhibitor VX-210 in Acute Traumatic Subaxial Cervical Spinal Cord Injury: Design of the SPinal Cord Injury Rho INhibition InvestiGation (SPRING) Clinical Trial. *J Neurotrauma*. 2018 May 1;35(9):1049-1056. doi: 10.1089/neu.2017.5434. Epub 2018 Mar 1.
83. Reshamwala R, Shah M, St John J, Ekberg J. Survival and Integration of Transplanted Olfactory Ensheathing Cells are Crucial for Spinal Cord Injury Repair: Insights from the Last 10 Years of Animal Model Studies. *Cell Transplant*. 2019 Dec;28(1\_suppl):132S-159S. doi: 10.1177/0963689719883823. Epub 2019 Nov 15.
84. Wang Y, Xie C, Wang P, Wang X, Wang C, Xun X, *i sur*. An elastic gel consisting of natural polyphenol and pluronic for simultaneous dura sealing and treatment of spinal cord injury. *J Control Release*. 2020 Jul 10;323:613-623. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.042. Epub 2020 May 5.
85. Huang JH, Xu Y, Yin XM, Lin FY. Exosomes Derived from miR-126-modified MSCs Promote Angiogenesis and Neurogenesis and Attenuate Apoptosis after Spinal Cord Injury in Rats. *Neuroscience*. 2020 Jan 1;424:133-145. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.043.
86. Ghorbani M, Shahabi P, Karimi P, Soltani-Zangbar H, Morshedi M, Bani S, *i sur*. Impacts of epidural electrical stimulation on Wnt signaling, FAAH, and BDNF following thoracic spinal cord injury in rat. *J Cell Physiol*. 2020 Dec;235(12):9795-9805. doi: 10.1002/jcp.29793.
87. Jarosiewicz B, Sarma AA, Bacher D, Masse NY, Simeral JD, Sorice B, *i sur*. Virtual typing by people with tetraplegia using a self-calibrating intracortical brain-computer interface. *Sci Transl Med*. 2015 Nov 11;7(313):313ra179. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7328.
88. Clifford T, Finkel Z, Rodriguez B, Joseph A, Cai L. Current Advancements in Spinal Cord Injury Research-Glial Scar Formation and Neural Regeneration. *Cells*. 2023 Mar 9;12(6):853. doi: 10.3390/cells12060853.
89. Li XG, Du JH, Lu Y, Lin XJ. Neuroprotective effects of rapamycin on spinal cord injury in rats by increasing autophagy and Akt signaling. *Neural Regen Res*. 2019 Apr;14(4):721-727. doi: 10.4103/1673-5374.247476.

90. Aldskogius H, Kozlova EN. Dorsal Root Injury-A Model for Exploring Pathophysiology and Therapeutic Strategies in Spinal Cord Injury. *Cells*. 2021 Aug 25;10(9):2185. doi: 10.3390/cells10092185.
91. Luo CB, Zheng DR, Guan YL, Shen WZ, Liu YG, Yew DT. Localization of acetylcholinesterase positive neurons and substance P and enkephalin positive fibers by histochemistry and immunohistochemistry in the sympathetic intermediate zone of the developing human spinal cord. *Neuroscience* 1990, 39, 97-102, doi:10.1016/0306-4522(90)90224-r.
92. Wai MS, Lorke DE, Kwong WH, Zhang L, Yew DT. Profiles of serotonin receptors in the developing human thalamus. *Psychiatry research* 2011, 185, 238-242, doi:10.1016/j.psychres.2010.05.003.
93. Punda H, Mardesic S, Filipovic N, Kosovic I, Benzon B, Ogorevc M, i sur. Expression Pattern of 5-HT (Serotonin) Receptors during Normal Development of the Human Spinal Cord and Ganglia and in Fetus with Cervical Spina Bifida. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 7;22(14):7320. doi: 10.3390/ijms22147320.
94. Hung AS, Tsui TY, Lam JC, Wai MS, Chan WM, Yew DT. Serotonin and its receptors in the human CNS with new findings - a mini review. *Curr Med Chem*. 2011;18(34):5281-8. doi: 10.2174/092986711798184253.
95. Hayashi Y, Jacob-Vadakot S, Dugan EA, McBride S, Olexa R, Simansky K, i sur. 5-HT precursor loading, but not 5-HT receptor agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats. *Experimental neurology* 2010, 221, 68-78, doi:10.1016/j.expneurol.2009.10.003.
96. Holmes GM, Van Meter MJ, Beattie MS, Bresnahan JC. Serotonergic fiber sprouting to external anal sphincter motoneurons after spinal cord contusion. *Experimental neurology* 2005, 193, 29-42, doi:10.1016/j.expneurol.2005.01.002.
97. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003, 23, 4219-4227.
98. Wang X, Duffy P, McGee AW, Hasan O, Gould G, Tu N, i sur. Recovery from chronic spinal cord contusion after Nogo receptor intervention. *Annals of neurology* 2011, 70, 805-821, doi:10.1002/ana.22527.
99. Hirokawa T, Zou Y, Kurihara Y, Jiang Z, Sakakibara Y, Ito H, i sur. Regulation of

- axonal regeneration by the level of function of the endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS. *Scientific reports* 2017, 7, 12119, doi:10.1038/s41598-017-12449-6.
100. Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 2004, 44, 439-451, doi:10.1016/j.neuron.2004.10.015.
101. Rajaofetra N, Passagia JG, Marlier L, Poulat P, Pellas F, Sandillon F, i sur. Serotonergic, noradrenergic, and peptidergic innervation of Onuf's nucleus of normal and transected spinal cords of baboons (*Papio papio*). *The Journal of comparative neurology* 1992, 318, 1-17, doi:10.1002/cne.903180102.
102. Privat A, Mansour H, Geffard M. Transplantation of fetal serotonin neurons into the transected spinal cord of adult rats: morphological development and functional influence. *Progress in brain research* 1988, 78, 155-166, doi:10.1016/s0079-6123(08)60278-2.
103. Privat A, Mansour H, Rajaofetra N, Geffard M. Intraspinal transplants of serotonergic neurons in the adult rat. *Brain research bulletin* 1989, 22, 123-129, doi:10.1016/0361-9230(89)90136-6.
104. Ciutat D, Calderó J, Oppenheim RW, Esquerda JE. Schwann cell apoptosis during normal development and after axonal degeneration induced by neurotoxins in the chick embryo. *J Neurosci.* 1996 Jun 15;16(12):3979-90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03979.1996.
105. Yuan J, Zeng L, Sun Y, Wang N, Sun Q, Cheng Z, i sur. SH2B1 protects against OGD/R-induced apoptosis in PC12 cells via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018 Sep;18(3):2613-2620. doi: 10.3892/mmr.2018.9265. *Epub* 2018 Jul 9.
106. Brumovsky, P.R. Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase--an intriguing association with implications for sensation and pain. *Pain* 2016, 157, 314-320, doi:10.1097/j.pain.0000000000000381.
107. Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience letters* 2003, 337, 119-122, doi:10.1016/s0304-3940(02)01256-9.
108. Maeshima T, Ito R, Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Shutoh F, i sur. The cellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. *Brain research* 1998, 797, 118-124, doi:10.1016/s0006-8993(98)00360-6.

## **10. ŽIVOTOPIS**



## OSOBNNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Hrvoje Punda

Datum rođenja: 22.01.1989.

e-mail: [hpunda@gmail.com](mailto:hpunda@gmail.com)

## OBRAZOVANJE

1995–2003 Osnovna škola Spinut , Split (Hrvatska)

2003–2007 Srednja škola IV. Gimnazija Marko Marulić, Split (Hrvatska)

2007–2013 Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer Medicina, doktor medicine

2014–2022 Medicinski fakultet sveučilišta u Splitu, Poslijediplomski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima

## RADNO ISKUSTVO

15/08/2013–15/02/2014 Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije, liječnik pripravnik

08/11/2014– Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, Klinički bolnički centar Split, specijalist radiologije

## OSTALA ZNANJA I VJEŠTINE

Engleski jezik, aktivno znanje (C2)

## ČLANSTVA

2014. Hrvatska liječnička komora

## ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

Hrvoje Punda, Snježana Mardešić, Natalija Filipović. Expression Pattern of 5-HT (Serotonin) Receptors during Normal Development of the Human Spinal Cord and Ganglia and in Fetus with Cervical Spina Bifida, International journal of molecular sciences, 2021 Jul 7;22(14):7320. doi:10.3390/ijms22147320.

Ante Punda, Vladimir Bedeković, Ana Barić, Mirko Kontić, Zaviša Čolović, Lucija Vanjak Rogošić, Hrvoje Punda. RET EXPRESSION AND ITS CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGIC DATA IN PAPILLARY THYROID CARCINOMA, Acta clinica Croatica, 2018 Dec;57(4):646-652. doi: 10.20471/acc.2018.57.04.06.

Ante Punda, Ana Barić, Zaviša Čolović, Mirko Kontić, Hrvoje Punda. Effect of Methimazole Therapy on Thyroid Pathohistology That May Mimic Thyroid Malignancy, Acta clinica Croatica, 2020, Jun;59(Suppl 1):146-148. doi: 10.20471/acc.2020.59.s1.19.

Adela Arapović, Ante Punda, Dubravka Brdar, Vesna Čapkun, Diana Bajo, Daniela Veljačić, Hrvoje Punda. Types of Parenchymal Changes Diagnosed on DMSA Scans of Kidneys Affected

by Different Grades of Vesicoureteral Reflux, Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2021 Mar  
1:27:e929617.doi:10.12659/MSM.929617

Zaviša Čolović, Petar Ivanišević, Cristian Bulat, Ana Barić, Mirko Kontić, Hrvoje Punda.  
Treatment Approach to Follicular Thyroid Carcinoma Tumor Thrombus in the Internal Jugular Vein and Brachiocephalic Vein. Acta clinica Croatica, 2020 Jun;59(Suppl 1):149-152. doi:  
10.20471/acc.2020.59.s1.20.