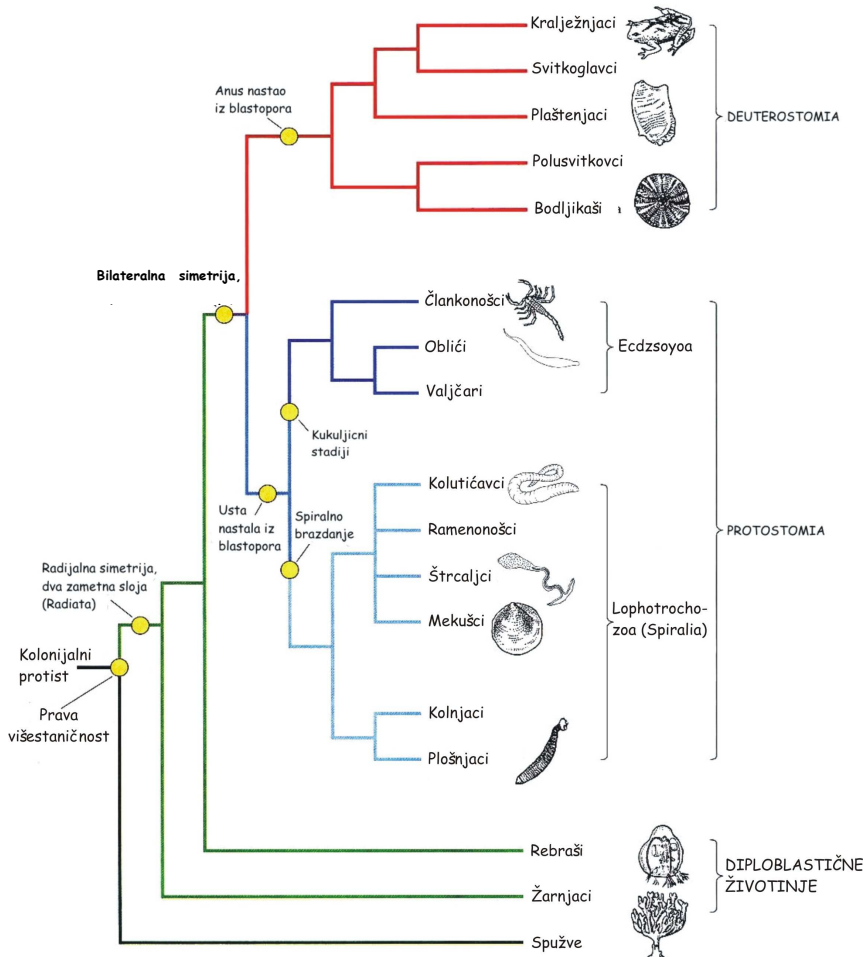


EMBRIOLOGIJA MORSKOG JEŽINCA

OBILJEŽJA CARSTVA METAZOA (ANIMALIA)

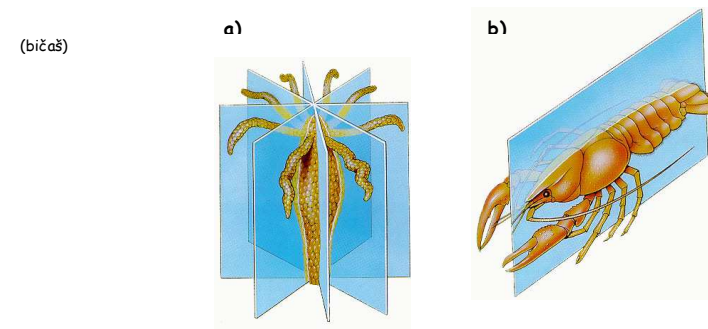


Slika 1. Klasifikacijsko stablo carstva Metazoa.

Prema filogenetskom stablu, sve višestanične životinje pripadaju carstvu **Animalia** ili **Metazoa**. Jedno od najbitnijih obilježja u klasifikaciji višestaničnih životinja je rani embrionalni razvoj, na temelju kojeg je vidljiva njihova evolucijska povezanost i prema kojemu su životinje podijeljene u tri velike skupine (Slika 1):

1. Diploblastične životinje - Radiata
 2. Protostomia («prvousti»)
 3. Deuterostomia («drugousti»)
- } Bilateralia

U embrionalnom razvoju **diploblastičnih životinja** (Radiata) javljaju se dva zametna sloja - ektoderm i endoderm, ali nema pravog mezoderma. U ovu skupinu pripadaju žarnjaci (Cnidaria) i rebraši (Ctenophora) (Slika 1). Kroz tijelo odraslih pripadnika ovih skupina može se provući više ravnina simetrije pa kažemo da su radijalno simetrični (Slika 2a). Stoga se i nazivaju Radiata.

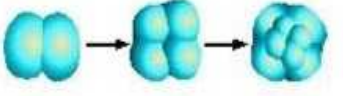
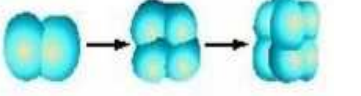


Slika 2. (a) Radijalna simetrija. (b) Bilateralna simetrija.

Protostomične i **deuterostomične** životinje imaju bilateralnu simetriju što znači da im se kroz tijelo može provući samo jedna ravnina simetrije (ravnina koja dijeli tijelo na dvije zrcalne polovice - lijevu i desnu, Slika 2b) i dobro razvijena sva tri zametna

sloja: ektoderm, endoderm i mezoderm (tj. triploblastični su). Zbog karakteristične bilateralne simetrije ove dvije skupine se još zajedno nazivaju i Bilateralia. Osnovne razlike Protostomia i Deuterostomia navedene su u Tablici 1.

Tablica 2. Osnovne razlike Protostomia i Deuterostomia.

Protostomia:	Deuterostomia:
<p>Spiralno brazdanje</p>  <p>Determinirano brazdanje:</p> <p>4-stanični embrij uklonjena jedna blastomera razvoj u potpunosti zaustavljen</p>	<p>Radijalno brazdanje</p>  <p>Nedeterminirano brazdanje:</p> <p>4-stanični embrij uklonjena jedna blastomera dviije normalno razvijene ličinke</p>
<p>Usta: Nastaju od blastopora gastrule.</p>	<p>Usta: Ne nastaju iz blastopora (iz njega nastaje anus) već se otvaraju kasnije na drugom dijelu gastrule (Slika 8).</p>
<p>Najznačajniji predstavnici: mekušci, kolutičavci, člankonošci, i dr.</p>	<p>Najznačajniji predstavnici: bodljikaši i svitkovci (uključujući kralježnjake)</p>

Razlike Protostomia i Deuterostomia su prvenstveno vezane uz karakteristični tijek uzastopnih staničnih dioba u ranom embrionalnom razvoju, odnosno **brazdanje**. U ranom embrionalnom razvoju Deuterostomia, stanice se nalaze točno jedna iznad ili jedna kraj druge. Takvo brazdanje se naziva **radijalno**. Kod Protostomia se stanice nastale diobama ne smještaju točno jedna iznad druge već se pomiču za 45° ulijevo ili udesno, pa govorimo o **spiralnom** brazdanju.

Determinirano brazdanje je još jedna značajka embrionalnog razvoja Protostomia. To znači da je sudbina svake stanice unaprijed određena od najranijih embrionalnih stadija. Npr. već je u dvostaničnom stadiju određeno iz koje će stanice nastati lijeva, a iz koje desna strana životinje i ako se jedna od te dvije stanice eksperimentalno ukloni, embrio će uginuti. Nasuprot tome, kod Deuterostomia je brazdanje **nedeterminirano** tj. ako razdvojimo prve dvije stanice nastale diobom zigote razvit će se jednoljajčani blizanci (jer te stanice još nisu predodređene i svaka zadržava potencijal da se iz nje razvije čitav organizam).

Posljednja bitna razlika između embrionalnog razvoja kod Proto- i Deuterostomia jest u mjestu gdje se na embriju otvaraju usta (Tablica 1) (vidi detaljnije dalje u tekstu - poglavlje «Rani embrionalni razvoj»).

EMBRIONALNI RAZVOJ MORSKOG JEŽINCA

Od svih beskralježnjaka morski ježinci, odnosno skupina u koju spadaju - bodljikaši (Echinodermata), su najbližiji srodnici kralježnjaka, a time i ljudi (Slika 1). Bodljikaši i viši kralježnjaci su međusobno vrlo različiti promatramo li opću građu i tjelesno ustrojstvo kod te dvije skupine. Međutim, promatramo li embrionalni razvoj, ustanovit ćemo da postoje velike sličnosti u ranim fazama razvoja.

Upravo zbog toga što je rani embrionalni razvoj morskih ježinaca vrlo sličan ranom embrionalnom razvoju ljudi i drugih kralježnjaka (stadiji od oplodnje do gastrulacije gotovo su identični), ježinci se često koriste kao modelni organizam. Embrionalni razvoj ježinaca predstavlja odličan model za provođenje različitih biokemijskih, toksikoloških, ekoloških i molekularno-bioloških studija zbog sljedećih prednosti:

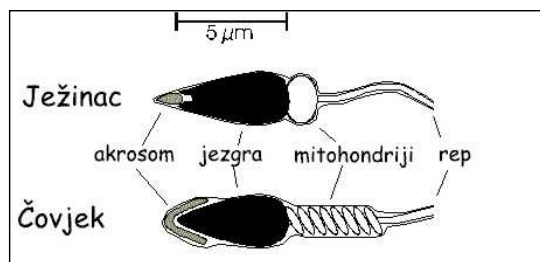
- lako prikupljanje velikih količina gameta
- vanjska oplodnja (odvija se u morskoj vodi) - predstavlja veliku prednost pred korištenjem sisavaca (npr. štakora) kao modelnih organizama kod kojih se oplodnja i embrionalni razvoj odvijaju unutar organizma

- jajne stanice većine vrsta morskih ježinaca su prozirne što omogućuje lako praćenje samog embrionalnog razvoja
- embrionalni razvoj je sinkroniziran (pri konstantnoj temperaturi embriji u akvariju napreduju podjednakim tempom!)

OPLODNJA (FERTILIZACIJA)

Oplodnja (fertilizacija) je spajanje (fuzija) dvaju haploidnih spolnih stanica (gameta, n) u diploidnu zigotu ($2n$). Diobama zigote (embrionalni razvoj) nastat će nova jedinka s genetičkim materijalom koji potječe od oba roditelja. Sam proces oplodnje uključuje četiri glavna događaja:

1. kontakt i prepoznavanje spermija i jajne stanice
2. regulacija ulaska spermija u jajnu stanicu (zahvaljujući mehanizmima za sprečavanje polispermije, jajnu stanicu može oploditi samo jedan spermij)
3. fuzija jezgara spermija i jajne stanice (kariogamija) = nastaje zigota, odnosno zametak (embrij)
4. aktivacija metabolizma u citoplazmi zigote kako bi mogao započeti razvitak novog organizma (stanične diobe)



Slika 3. Usporedba građe i veličine spermija ježinca i čovjeka.

Spolne stanice ježinaca:

Spolne stanice (gamete) ježinaca su otprilike jednake veličine i oblika kao ljudske (Slike 3 i 4). Promjer jajne stanice morskog ježinca je između 100 i 150 μm , a dimenzije

spermija bez repa su 1 x 5 μm .

Spermij:

Spermij morskog ježinca (Slika 3) je građen od glave, vrata i repa. U **glavi** spermija smještena je haploidna jezgra i **akrosomalni mjehurić (akrosom)** koji se nalazi na samom vrhu glave spermija (Slika 3). Nastao je iz Golgijevog aparata, a sadrži enzime koji razgrađuju proteine i šećere te na taj način razgrađuju vanjske ovojnice jajne stanice tijekom oplodnje. Akrosom spermija ježinca je puno manji od akrosoma ljudskog spermija (Slika 3) i to je jedina značajna razlika. Spermij čovjeka ima puno veći akrosom, jer je potrebno puno više akrosomalnih enzima za prodiranje kroz zonu pellucidu ljudske jajne stanice (Slika 4).

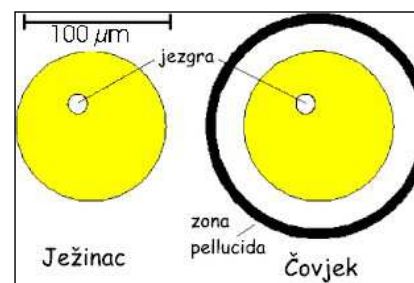
U **vratu** spermija se nalaze centrosom, mikrotubuli i mitohondriji, koji zajedno čine **aksonemu** - glavni pokretački motor spermija. Cijelom dužinom **repa** spermija protežu se mikrotubuli koji omogućuju pokretanje. Spermiji plivaju spiralnim rotiranjem repa pa se, kada udare u tvrdnu površinu, kao što je jajna stanica, nastave rotirati oko svoje osi.

Jajna stanica:

Jajna stanica ježinca (Slika 4 i 5) uz haploidnu jezgru unutar citoplazme sadrži i sav materijal potreban za početni rast i razvitak novog organizma: proteine, ribosome, tRNA, mRNA, zaštitne enzime, itd. Kod ježinca, mejoza je u trenutku oplodnje u potpunosti završena. Za razliku od toga, kod čovjeka i većine drugih sisavaca, u trenutku oplodnje (odnosno prodora spermija) mejoza II još nije završena. Sekundarna oocita

koja se izbacuje iz Graafova folikula zakočena je u metafazi II (haploidna stanica s dvostrukim kromosomima).

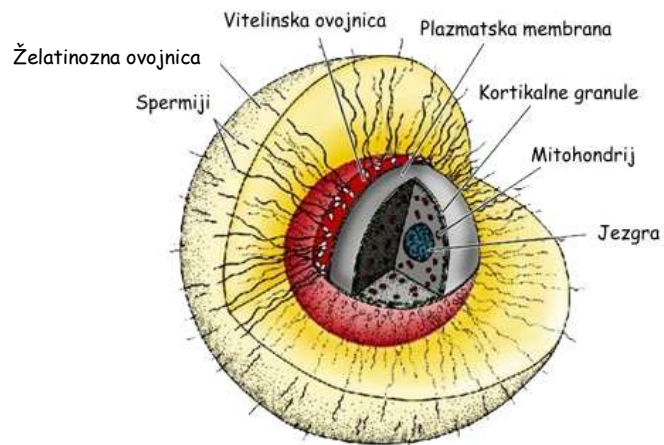
Stanična membrana jajne stanice obavijena je izvana **vitelinskom ovojnicom** (Slika 5,



Slika 4. Usporedba građe i veličine jajne stanice ježinca i čovjeka.

označena crveno) koja sadrži osam različitih glikoproteina i zadužena je za prepoznavanje između spermija i jajne stanice (jajnu stanicu može oploditi samo spermij iste vrste). Vitelinska membrana ljudske jajne stanice tvori poseban debeli omotač nazvan zona pellucida (Slika 4).

Uokolo vitelinske membrane jajne stanice morskog ježinca nalazi se još i debela **želatinozna ovojnica** (Slika 5), koja služi za privlačenje i aktivaciju spermija. Jajne stanice ježinca su jednoliko ispunjene žumanjcem (**izolecitalna jaja**). Osim toga, za razliku od primjerice ptica, imaju malo žumanjka (**alecitalne ili mikrolecitalne jajne stanice**), kao i jajašca sisavaca i npr. kopljače.



Slika 5. Jajna stanica morskog ježinca tijekom oplodnje.

Interakcija spermija i jajne stanice:

Interakcija između spermija i jajne stanice općenito se odvija u sljedeća tri osnovna koraka:

1. kemoatrakcija spermija ka jajnoj stanici zahvaljujući topivim molekulama koje izlučuje želatinozna ovojnica jajne stanice

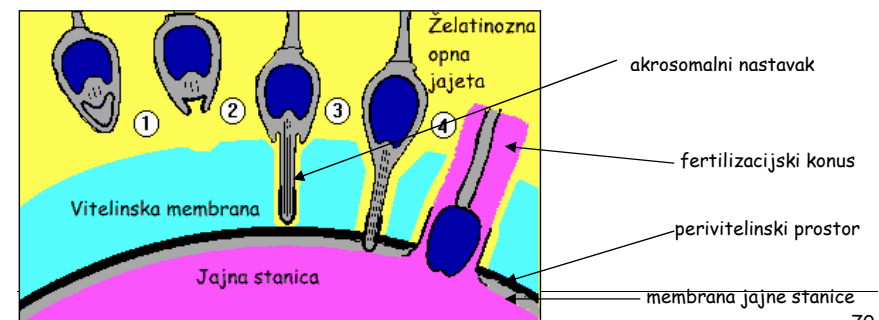
2. akrosomalna reakcija
3. fuzija membrana jajne stanice i spermija

Kemoatrakcija:

Odrasle jedinke morskih ježinaca su odvojenog spola, slabo su pokretne i imaju vanjsku oplodnju. To znači da je oplodnja moguća jedino ako mužjaci i ženke sinkronizirano ispuste gamete u morsku vodu. To usklađivanje vremena ispuštanja gameta je regulirano vremenskim uvjetima, temperaturom vode, mjesečevim mijenama te plimom i osekom. Vrste koje obitavaju tropska i subtropska toplija mora plodne su tijekom cijele godine, dok je za većinu vrsta umjerenog i sjevernog pojasa specifično da su plodne samo u određenom dijelu godine (hridinski morski ježinac (*Paracentrotus lividus*) - proljeće i jesen). Osim sinkroniziranog ispuštanja gameta određene vrste, da bi došlo do oplodnje potreban je i mehanizam prepoznavanja spermija i jajne stanice u morskoj vodi, jer se u tom trenutku u morskoj vodi mogu nalaziti i spolne stanice drugih vrsta. Jajna stanica privlači spermije **kemoatrakcijom**. U želatinoznoj opni jajne stanice ježinaca nalazi se peptid **resakt** koji se polako ispušta u morsku vodu i na taj način privlači spermije. Osim što ih privlači, resakt djeluje i kao aktivator spermija, odnosno spermiji postaju aktivniji i brže plivaju u prisutnosti veće količine resakta u morskoj vodi.

Akrosomalna reakcija:

Akrosomalna reakcija (Slika 6) kod morskih ježinaca započinje kontaktom spermija sa želatinoznom opnom jajne stanice. Taj kontakt uzrokuje egzocitozu (izbacivanje) akrosomalnog mjehurića spermija i otpuštanje proteolitičkih enzima, koji zatim stvaraju prolaz spermiju do površine jajne stanice.



Slika 6. – Akrosomalna reakcija; prodiranje spermija u jajnu stanicu kod morskog ježinca.

1) Receptori na spermiju dolaze u kontakt sa želatinoznom ovojnicom jajeta, 2) Oslobođanje proteolitičkih enzima iz akrosoma egzocitozom, 3) Nastajanje akrosomalnog nastavka, 4) Formiranje fertilizacijskog konusa, vezanje spermija na površinu jajne stanice i prodiranje jezgre spermija u njezinu citoplazmu.

U drugom dijelu akrosomalne reakcije formira se akrosomalni nastavak kojeg čine aktinske niti. Akrosomalni nastavak na sebi ima protein **bindin** kojim se veže na glikoproteinske receptore vitelinske ovojnice jajne stanice. Ova interakcija je ovisna o vrsti, odnosno svaka vrsta morskih ježinaca ima posebni par bindina i glikoproteinskih receptora. Akrosomalni nastavak i protein bindin omogućuju prolaz spermija kroz vitelinsku ovojnicu jajne stanice iste vrste. Ukoliko ne dođe do podudaranja bindina i glikoproteinskog receptora, spermij ne može proći kroz vitelinsku ovojnicu i ne dolazi do oplodnje.

Spajanje (fuzija) staničnih membrana spermija i jajne stanice:

Nakon formiranja akrosomalnog nastavka i prolaska spermija kroz vitelinsku membranu jajne stanice, mikrovili iz korteksa citoplazme jajne stanice formiraju **fertilizacijski konus** (Slika 6-4). Stvaranje fertilizacijskog konusa omogućuje spajanje (fuziju) stanične membrane jajne stanice sa staničnom membranom spermija i konačan prodor jezgre i centriola spermija u jajnu stanicu.

Sprečavanje polispermije:

Nakon što jedan spermij uđe u jajnu stanicu, stanična membrana te jajne stanice više ne dopušta prolaz drugih spermija. Kada ne bi postojali mehanizmi za sprečavanje ulaska drugih spermija, došlo bi do **polispermije** (više od jednog spermija bi oplodilo jednu jajnu stanicu). U tom slučaju bi se unutar jajne stanice našla minimalno triploidna kromosomska garnitura ($3n$), odnosno triploidna jezgra, što bi dovelo do pogubnih posljedica za razvoj embrija. Došlo bi do nepravilnog formiranja diobenog vretena i nepravilne raspodjele kromosoma u predstojećim intenzivnim mitotskim diobama. To bi u konačnici dovelo nepravilnog embrionalnog razvoja i smrti embrija.

Zbog toga jajna stanica ježinaca ima dva mehanizma za sprečavanje polispermije:

1. Brza blokada polispermije:

Brza blokada polispermije se postiže mijenjanjem električnog potencijala stanične membrane jajne stanice. Koncentracije različitih iona u jajnoj stanici, poput Na^+ i K^+ , značajno se razlikuju od njihovih koncentracija u okolnoj morskoj vodi. U morskoj vodi ima jako puno Na^+ iona, dok ih je u citoplazmi jajne stanice relativno malo. S K^+ ionima je obratno - njih je više u jajnoj stanici nego izvan nje. Stanična membrana održava ovakvo stanje sprečavajući ulazak Na^+ iona u stanicu, odnosno izlazak K^+ iz nje. Zbog svega ovoga postoji stalna razlika u naboju s dvije strane membrane - membranski potencijal u mirovanju, koji iznosi oko -70 mV (unutrašnjost stanice je negativno nabijena u odnosu na njezinu okolinu).

Oko 20 milisekundi nakon oplodnje jajne stanice prvim spermijem, njezin membranski potencijal se promijeni i postane pozitivan, oko 20 mV. Uzrok takvoj *depolarizaciji membrane* je ulazak pozitivno nabijenih iona kalcija (Ca^{2+}) u jajnu stanicu. Depolarizacija onemogućava prodiranje drugih spermija u jajnu stanicu.

Mehanizam depolarizacije počinje s enzimom sintazom dušikovog oksida (engl. *Nitric Oxide Synthase*, NOS) koji se nalazi u citoplazmi spermija. NOS se aktivira uslijed kontakta spermija i želatinozne ovojnice jajne stanice i katalizira nastajanje dušičnog oksida. Nakon fuzije spermija i jajne stanice novonastali dušični oksid ulazi u citoplazmu jajne stanice i aktivira ulazak kalcijevih iona (Ca^{2+}). Nadalje, kalcijevi ioni aktiviraju ponovo NOS koji je prisutan i u citoplazmi jajne stanice i na taj način nastaje sve više dušičnog oksida, sve više kalcija itd. Tako nastaje **val kalcijevih iona** koji se širi od mjesta kontakta jaja i spermija po površini čitavog jajeta. Val kalcijevih iona je zapravo val depolarizacije membrane jajne stanice.

Međutim, ovakva brza blokada polispermije je prolazna i traje tek oko minute. Stoga je potreban još jedan mehanizam blokade polispermije - kortikalna reakcija.

2. Spora blokada polispermije:

Kalcijevi ioni uzrokuju fuziju kortikalnih granula (smještenih u korteksu jajne

stanice neposredno uz plazmatsku membranu) s plazmatskom membranom jajne stanice i otpuštanje sadržaja granula u perivitelinski prostor (prostor između membrane jajne stanice i vitelinske membrane). Taj proces se naziva **kortikalna reakcija**. Posljedica otpuštanja sadržaja kortikalnih granula je stvaranje **fertilizacijske membrane** uslijed bubrenja želatinoznog, mukopolisaharidnog sloja. Fertilizacijska membrana okružuje jajnu stanicu u obliku tanke opne. Stvaranje fertilizacijske membrane označava sporu blokadu polispermije.

Nakon stvaranja fertilizacijske membrane, spajaju se haploidna jezgra spermija sa haploidnom jezgrom (pronukleusom) jajne stanice. Dolazi do **fuzije jezgara**, odnosno do oplodnje, a nakon toga započinju prve diobe novostvorene zigote ($2n$).

RANI EMBRIONALNI RAZVOJ

Embrionalni razvoj morskog ježinca počinje jednom oplodnom jajnom stanicom



, a završava preobrazbom ličinke pluteusa u mladog ježinca

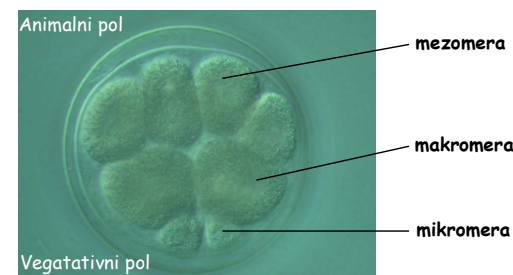


Neposredno nakon oplodnje, započinje tzv. **brazdanje** zigote - serije mitotičkih diobi tijekom kojih se volumen citoplazme jajne stanice dijeli u mnogobrojne manje stanice (dakle, dolazi do povećanja broja stanica ali ne i povećanja ukupne veličine embrija). Stanice nastale procesom brazdanja nazivaju se *blastomere*.

Za zigotu morskog ježinca karakteristično je **radijalno** (Tablica 1) **potpuno brazdanje**. Potpuno (ili totalno) brazdanje znači da se brazda čitava zigota, budući su jajne stanice izolecitalne (jednoliko ispunjene žumanjcem).

Prve dvije diobe su meridijalne, što znači da se zigota brazda u smjeru polova i sve četiri nastale blastomere su jednake veličine (**4-stanični stadij**). **Treća dioba** je ekvatorijalna, odnosno okomita u odnosu na prve dvije čime nastaje osam jednakih blastomera: četiri gornje blastomere koje označavaju animalni pol i četiri donje blastomere koje označavaju vegetativni pol (**8-stanični stadij**). **Četvrta dioba** se u potpunosti razlikuje od prve tri diobe zbog toga što se blastomere animalnog pola

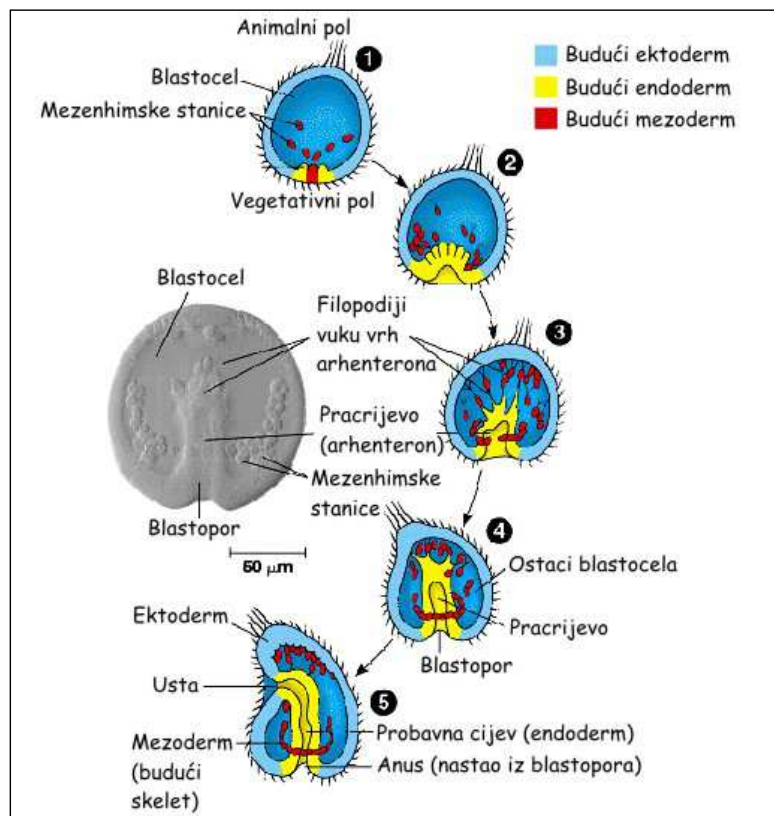
brazdaju drugačije od blastomera vegetativnog pola. Gornje četiri blastomere brazdaju se meridijalno u osam jednakih stanica koje se nazivaju *mezomere*. Donje četiri blastomere brazdaju se ekvatorijalno i *nejednoliko* čime nastaju četiri velike stanice nazvane *makromere* i četiri male stanice nazvane *mikromere*. Dakle, **16-stanični stadij** embrija (Slika 7) označavaju stanice diferencirane prema veličini u mezomere, makromere i mikromere, a to je bitno za kasnije stvaranje zametnih listića odnosno gastrulaciju.



Slika 7. 16-stanični stadij embrija.

Daljnijim diobama blastomera nastaje **32-stanični**, a zatim 64-stanični stadij embrija. 64-stanični stadij embrija ima oblik kugle koju čini veliki broj gusto pakiranih stanica (puna kugla). Taj stadij embrija naziva se **morula**.

Kada embrij dosegne 128-stanični stadij (sedma dioba), iz morule nastane **blastula**. Ona ima oblik šuplje kugle i sve blastomere su jednake veličine. Šupljina unutar blastule naziva se **blastocel**.



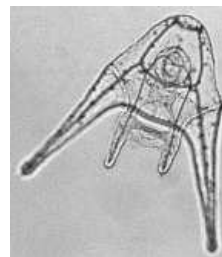
Slika 8. Gastrulacija kod morskog ježinca.

U stadiju blastule (nakon desete diobe) mladi embrij (zametak) započinje po prvi puta sintezu vlastitih proteina (do sada je u mitotičkim diobama koristio proteine jajne stanice). Većina stanica blastule dobije trepetljike (cilije) na vanjskim membranama, pa blastula postaje trepetljikava i počinje se rotirati unutar fertilizacijske membrane. Neposredno nakon toga, stanice vegetativnog pola (tamo gdje su se u 16-staničnom stadiju nalazile mikromere) počinju rasti u debljinu formirajući vegetativnu ploču. Stanice animalnog pola luče tzv. «hatching» enzim koji omogućuje razgradnju fertilizacijske ovojnice. Mladi embrij izlazi iz fertilizacijske ovojnice, postaje slobodno-plivajuća blastula i započinje samostalan život.

Iz blastule procesom *gastrulacije* nastaje **gastrula** (Slika 8), razvojni stadij u kojem se pojavljuju zametni listići - ektoderm, mezoderm i endoderm. Gastrulacija je proces prilikom kojega dolazi do izrazito koordiniranog premještanja stanica blastule. Prvo se pojedine stanice vegetativne ploče produljuju i kontrahiraju duge, tanke nastavke - filopodije, odjeljuju se od jednosloja i počinju migrirati (ingresija) u blastocel (Slika 8-1,2,3). Te stanice su porijeklom mikromere i one će graditi primarni mezoderm (mezenhim), odnosno skelet ličinačkog stadija morskog ježinca. Nadalje, dolazi do invaginacije (uvrtanja) dijela stanica u unutrašnjost blastule u području vegetativne ploče. Time nastaje pracrijevo (arhenteron) koje se na površinu gastrule otvara otvorom - blastoporom. Iz blastopora kod morskog ježinca (kao i kod svih Deuterostomia) nastaje crijevni otvor (anus), a usta se otvaraju naknadno na udaljenom dijelu gastrule (Slika 8-5).

Na početku se gastrula sastoji od dva zametna listića (diploblastična gastrula);

ektoderm je izvana, a endoderm iznutra. Mezoderm čine jedino stanice primarnog skeleta (mikromere). Endoderm omeđuje šupljinu pracrjeva (iz kojeg će se kasnije razviti probavni trakt). Kasnije se između ekto- i endoderma stvara treći zametni listić - mezoderm, te gastrula postaje triploblastična.



Slika 9. Ličinka pluteus stara 5 dana.

Zadnji stadij gastrule naziva se prizma stadij. U prizma stadiju gastrula ima potpuno formirano crijevo i usta i može se samostalno hraniti (jede sitne planktonske alge).

Valja napomenuti da se razvojni stadij u kojem je tek počela gastrulacija (pojavio se blastopor, ali se još nisu otvorila usta) već naziva gastrulom (iako sam proces gastrulacije još nije završio).

Produljivanjem gastrule razvija se ličinka **dipleurula** koja je tipična za sve bodljikaše. Ona je bilateralno simetrična (tijelo joj se može podijeliti zamišljenom uzdužnom ravninom simetrije na dva simetrična dijela). Na površini tijela mjestimice ima

trepetljike pomoću kojih pliva.

Iz dipleurule se u ježinaca vremenom razvija slobodnoplivajuća ličinka **pluteus** (Slika 9), koja u usporedbi s dipleurulom, ima mnogo duže nastavke optočene trepetljikama. Potpuno razvijena ličinka pluteus ima šest dugih nastavaka. Ličinka raste tijekom perioda od 4 - 6 tjedana do nekoliko mjeseci (ovisno o vrsti), tijekom kojih se hrani planktonskim algama. Pred kraj ličinačkog razdoblja počinju se razvijati skeletne pločice odraslog ježinca, zbog kojih pluteus polako tone prema dnu. Na kraju dolazi do **preobrazbe (metamorfoze)** ličinke pluteusa u mladog ježinca. Sama metamorfoza je složeni proces, ali traje vrlo kratko, svega jedan sat i označava konačan prelazak na bentonski način života i pentaradijalnu simetriju. Mladi ježinac odmah izgleda poput odrasle životinje iako nije veći od 1 mm.

Neke od faza razvoja morskog ježinca prikazane su na sljedećim sličicama:



Pojava mikromera - četvrta dioba.



Slobodnoplivajuća blastula izlazi iz fertilizacijske membrane (ovojnice).



Gastrulacija - iz blastopora nastaje anus, a usta se otvaraju na drugom dijelu gastrule.



Stadij prizme. Embrij se počinje sam hraniti.



Mlađa ličinka pluteus stara oko 3 dana.



Starija ličinka pluteus, stara oko tjedan dana.



Nakon nekoliko mjeseci nastupa preobražaj iz ličinke u mladu odraslu jedinku -

metamorfoza.



Mladi ježinac.

OSNOVNE ZNAČAJKE MORSKIH JEŽINACA (razred ECHINOIDEA)

KLASIFIKACIJA

Morski ježinci, Echinoidea, pripadaju odjeljku (koljenu, Phylum) Echinodermata (bodljikaši). Među bodljikaše, uz morske ježince, ubrajamo i zvjezdaste, trpove, zmijače i stapčare. Sve skupine su isključivo morske životinje, imaju vanjsku oplodnju, ličinački planktonski stadij i bentoske odrasle jedinke.

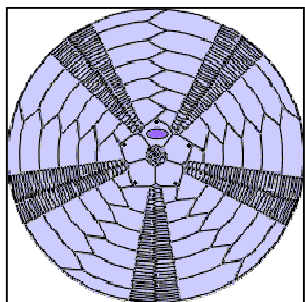
Razlikujemo dva reda razreda Echinoidea:

1. red Regularia ili pravilnjaci
2. red Irregularia ili nepravilnjaci

Pravilni morski ježinci imaju kuglasti oblik tijela i usta se nalaze točno u središtu čahure, što je ujedno i njihov najkarakterističniji oblik. Nepravilni morski ježinci imaju spljoštenu čahuru i usta se ne nalaze u središtu osi tijela, već su pomaknuta na jednu stranu što im daje nepravilan izgled. Imaju srcoliki ili pločasti oblik.

TJELESNA GRAĐA

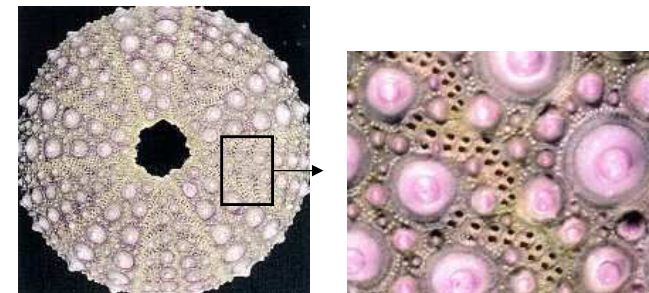
Tijelo odraslog morskog ježinca čini ovalna ili kuglasta čahura. Usta se nalaze na donjoj strani, koja se zbog toga naziva oralna strana. Suprotna oralnoj, gornja strana čahure naziva se aboralna. Od oralne do aboralne strane proteže se oralno-aboralna os tijela. Čahura je spljoštena i na oralnoj i na aboralnoj strani, čine ju mnogobrojne pločice, organizirane u nizovima koje se protežu s oralne prema aboralnoj strani (Slika 10).



Slika 10. Čahura morskog ježinca, aboralna strana.

Odrasli morski ježinci su pentaradijalni, a to znači da kroz njihovo tijelo možemo povući pet zamišljenih ravnina simetrije (ravnina koje dijele tijelo

na dva jednaka, simetrična dijela) (Slika 10). (Za razliku od odrasle jedinke, ličinka pluteus ima bilateralnu simetriju.) Tih pet ravnina simetrije koje prolaze kroz tijelo morskog ježinca nazivaju se zrake i na njima se nalaze ambulakralne nožice (vidi dalje u tekstu). Između zraka nalazi se 5 međuzraka.



Slika 11. Čahura ljubičastog morskog ježinca, *Strongylocentrotus purpuratus*.

Nadalje, tijelo morskog ježinca prekriveno je mnogobrojnim, dužim i kraćim, pokretnim bodljama. Bodlje su pričvršćene za pločice skeleta, izlaze između pojedinih pločica ili se nalaze na posebnim kvržicama na skeletu (Slika 11). Bodlje služe kao zaštita i za pokretanje životinje.



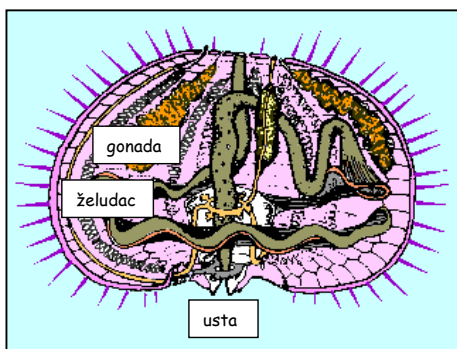
Na samoj sredini aboralne strane životinje nalazi se analni otvor. Oko njega je 5 pločica, a na svakoj je mala rupica - to je 5 gonopora, otvora kroz koje se prazne gonade (spolne žlijezde). Ovalna pločica na jednoj od 5 gonopornih ploča je sitasta (prošupljena) i naziva se madreporna ploča. Kroz nju se posebni sustav cjevčica u unutrašnjosti ježinca (ambulakralni ili vodožilni sustav) puni vodom. Nožice pomoću kojih se ježinac kreće i opipava svoju okolinu su zapravo vanjski izdanci ambulakralnog sustava cjevčica. Te tzv. ambulakralne nožice izlaze iz tijela kroz otvore na tvrdj vapnenoj ljušturi. One su, uz pokretne bodlje, glavno sredstvo pokretanja ježinaca. Iako se ambulakralne nožice pojedinačno gledano čine slabim i neučinkovitim, njihov velik broj nadomješta malene dimenzije.

Na oralnoj strani nalazi se 5 pari busenastih škrga koje okružuju usta, koja se



nalaze točno u središtu čahure. U ustima se nalazi složena vapnena valjkasta tvorevina sa 5 zubića i pridruženim mišićima - žvakalo ili „Aristotelova svjetiljka“. Ime je dobila po grčkom filozofu Aristotelu koji je prvi opisao ježince u svojim spisima. Na usta se nastavlja probavna cijev koja se sastoji od jednostavnog

želuca i crijeva (Slika 12). Ježinci se hrane morskim algama, mrtvom ribom, i drugim sličnim organskim ostacima koje nađu na morskom dnu.



Slika 12. Unutrašnja građa ježinca.

Najveći dio unutrašnjosti tijela zauzima 5 gonada (Slika 12), koje se nalaze u gornjoj, aboralnoj strani čahure. Gonade su vrećastog ili grozdastog oblika. Za vrijeme sezone razmnožavanja, gonade mogu sačinjavati i do 80% unutrašnjeg volumena ježinca. Svaka gonada se otvara svojim zasebnim kanalom na aboralnoj strani otvorom gonoporom. Kod morskih ježinaca spolovi su odvojeni, odnosno postoje mužjaci i ženke.

Nemaju mozak, ni bilo kakve veće nakupine živčanog tkiva. Umjesto toga, imaju živčane stanice organizirane u prstenove i mreže ispod kože.

EKOLOGIJA

Danas je poznato i opisano oko 950 vrsta morskih ježinaca, koji nastanjuju različita morska staništa od obalnog pojasa plime i oseke, pa sve do dubokomorskih staništa (do 5000 m dubine). Pravilni morski ježinci nastanjuju kamenita morska dna, dok

nepravilni morski ježinci većinom žive zakopani u pješčanim dnima.

Najveća poznata vrsta s promjerom čahure od čak 18 cm je crveni morski ježinac (*Strongylocentrotus franciscanus*), koja nastanjuje obalno područje Aljaske, zapadne obale Kalifornije i Japana.

U Jadranskom moru živi oko 20 vrsta ježinaca. Jedna od najkarakterističnijih vrsta je hridinski ježinac (*Paracentrotus lividus*) koji živi u litoralnom, obalnom području (do 32 m dubine, ali najčešće u pojasu od 1 do 6 m dubine) obale. Boja bodlji hridinskog ježinca varira od smeđe, zelene, ljubičaste do crvenkaste. Uzgaja se, kao i mnoge druge vrste, na «morskim farmama» radi gonada, koje se smatraju velikim specijalitetom (poput kavijara, u Japanu nazvan «uni»). Međutim, u Hrvatskoj je u prirodnim staništima hridinski ježinac zaštićena vrsta prema Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 7/06 i NN 99/09).

Druga česta vrsta, stanovnik obalnog hridinastog dna (do 10 m) Jadranskog litorala je *Arbacia lixula*, polukuglasti crni ježinac koji ima vrlo mnogo dugih, crnih bodlji duljine promjera čahure.

Na pjeskovitom i hridinastom dnu dubine 10 do 30 m obitava i ljubičasti ježinac (*Sphaerechinus granularis*). Ljubičasti ježinac ima čahuru promjera do 13 cm, a bodlje su mu kratke (dugačke do 2 cm), tamnoljubičaste boje sa izrazito bijelim vrhovima.

Zadatak 1. Promatranje oplodnje i embrionalnog razvoja ježinaca

Životinjski materijal: spolno zreli morski ježinci

Reagensi:

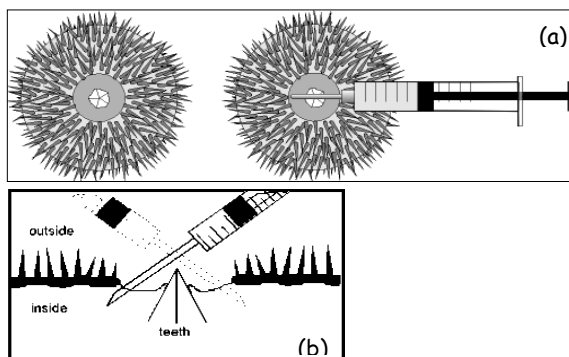
- 0,5 M otopina kalijevog klorida, KCl (3,73g KCl u 100 mL destilirane vode)
- morska voda

Pribor:

- graduirane šprice s iglom
- Pasteurove pipete, plastične
- 1,5 mL kivete
- lijevak, 100 mL
- mikroskopi i predmetna stakalca
- posuda s ledom
- menzura (20 mL, 50 mL)
- staklene posude nešto manjeg promjera nego što je promjer ženke ježinca
- Petrijeve posudice
- Erlenmeyerove tikvice
- predmetna i pokrovna stakalca
- gaza

Postupak:**1. Sakupljanje spolnih stanica**

U špricu uvucite 0,5 M otopinu kalijevog klorida (KCl) i injicirajte ju ježincu između zubiju i tvrdog vanjskog skeleta (Slika 13). Volumen injicirane otopine KCl-a ovisi o veličini životinje: injicirajte oko 0,05 mL otopine po centimetru promjera ježinca *na*



svaku stranu životinje (Slika 13). Iglu zabodite u mekani dio životinje između usta i egzoskeleta (čahure). Bitno je da se otopina uštrca u tjelesnu šupljinu životinje, a ne u usta odnosno probavni trakt.

Slika 13. Način injiciranja otopine kalijevog klorida u ježinca; (a) pogled odozgo, (b) pogled sa strane.

Otopina kalijevog klorida će potaknuti kontrakciju gonada, a time i izlučivanje spolnih stanica (pod uvjetom da ih u životinji *ima*). Nakon toga kroz nekoliko sekundi nježno tresite ježinca kako bi se otopina KCl-a homogeno rasporedila u njegovoj unutrašnjosti.

Sada okrenite životinju, stavite ju na Petrijevu zdjelicu (usta prema dolje) i pažljivo promatrajte vršnu (aboralnu) stranu ježinca. Nakon jedne do nekoliko minuta početak će se pojavljivati gamete - jajašca ili spermiji ovisno o spolu životinje. Ježinci nemaju uočljiva vanjska spolna obilježja, pa ćemo spol odrediti prema vrsti gameta koje

izluče. Ukoliko životinja počne izlučivati mliječnobijelu tekućinu - to je sperma i radi se o mužjaku. Žensku jedinku ćemo prepoznati po jajnim stanicama koje su crvenkasto-narančaste boje.

Mušjak:

Injiciranog mužjaka postavite na suhu Petrijevku ustima prema dolje (nikako ga nemojte staviti pod vodu). Nakon jedne do dvije minute vidjet ćete kako se na površini ježinca pojavljuje mliječnobijela tekućina - sperma. Sakupite ju pipetom i pohranite u kiveticu volumena 1,5 mL. (Morska voda aktivira spermije i smanjuje im vrijeme života sa nekoliko dana na nekoliko minuta!). Kivetice sa pohranjenom spermom stavite u posudu s ledom (hladna temperatura produljuje život spermija).

Ženka:

Na vrh staklene posude promjera nešto manjeg od promjera ženke ježinca postavite injiciranu ženku ustima prema gore. Napunite posudu do vrha morskom vodom lijevući je preko životinje. Ženka neće ispustiti jajašca ukoliko nije u kontaktu s morskom vodom. Narančasto-crvekasta jajašca će padati u morsku vodu i taložiti se na dno posude. Iako može potrajati od 10 do 30 minuta dok ženka ne izluči sva jajašca, već za nekoliko minuta biti će dovoljno jajašaca da započnete s radom.

Promatranje spermija

Stavite jedva vidljivu kapljicu sperme u 1 do 2 mL morske vode. Kapnite kapljicu tako pripremljene suspenzije sperme na predmetno stakalce i pokrijte pokrovnicom. Promatrajte spermije pod malim i velikim povećanjem.

Promatranje jajašaca

Stavite kapljicu suspenzije jajašaca na predmetno stakalce (ne trebate koristiti pokrovnicu!) i promatrajte pod malim i velikim povećanjem. Kolika je veličina jajašaca u usporedbi sa spermijem?

2. Oplodnja (fertilizacija)

Kako bi omogućili što uspješniju fertilizaciju, a time i embrionalni razvoj, potrebno je pripremiti odgovarajuću suspenziju jajnih stanica i spermija:

1. **Jajne stanice:** Prvo treba profiltrirati sakupljene jajne stanice kroz gazu u novu čistu čašu. Filtriranje je potrebno kako bi uklonili svu nečistoću (izmet, slomljene bodlje). Nakon filtriranja, prelijte suspenziju jajnih stanica u menzuru i pričekajte 5 - 10 minuta da se jajne stanice slegnu na dno. Trebamo napraviti 1% suspenziju jajnih stanica, odnosno trebamo ih resuspendirati u određenom volumenu morske vode ovisno o očitanoj volumenu (npr. 1 mL jajnih stanica stavimo u 99 mL morske vode).
2. **Spermiji:** Za uspješnu oplodnju je neophodna optimalna koncentracija (razrjeđenje) sperme. Preniska koncentracija sperme će rezultirati premalim brojem oplodjenih jajašaca. To je ipak bolji slučaj nego kad je koncentracija sperme previsoka, što uzrokuje polispermiju. Iako kod ježinaca postoje mehanizmi za sprečavanje polispermije oni ponekad, osobito pri vrlo visokim koncentracijama spermija, zakažu. Dakle, potrebno je jajašcima dodati pravilnu količinu spermija kako bi se sva jajašca oplodila i nakon oplodnje uslijedio normalan embrionalni razvoj. Uzmite 5 μ l «suhe» sperme i stavite je u 15 mL morske vode (1/3000 razrjeđenje). Pola mililitra takve suspenzije spermija dovoljno za oplodnju 100 mL 1% suspenzije jajašaca.

Nakon što ste pripremili suspenzije jajnih stanica i spermija, uzmite po kapljicu priređenih suspenzija jajašaca i spermija i pomiješajte te dvije kapljice na predmetnom stakalcu. Promatrajte proces oplodnje pod mikroskopom (veliko povećanje). Iako je to previše sperme za pravilan razvoj, embriji se ionako vjerojatno neće razviti pod mikroskopom iz mnogo drugih razloga (preveliko zagrijavanje zbog isijavanja žarulje, preparat će se isušiti itd.). Ipak, na ovaj način ćete moći vidjeti stvaranje **fertilizacijske membrane**.

Zatim u čašu sa 300 mL 1% suspenzije jajnih stanica dodajte 1,5 mL priređene

suspenzije spermija. Ta količina spermija trebala bi biti dovoljna za oplodnju svih jajnih stanica u čaši. Prilikom dodavanja sperme obavezno miješajte suspenziju jajnih stanica kako bi se sperma i jajne stanice jednoliko rasporedili! Jednu minutu nakon dodavanja sperme u čašu stavite jednu kap pod mikroskop kako bi provjerili da li je oplodnja 90-100%. Ne zaboravite zabilježiti vrijeme kada ste krenuli sa oplodnjom!

3. Embrionalni razvoj ježinca

Razrijeđene kulture embrija se drže u morskoj vodi na treskalici koja omogućuje lagano miješanje vode (cilj je osigurati dovoljno prozračivanje za normalan razvoj embrija).

Brzina razvoja ovisi o vrsti i posebno o temperaturi (diobe su brže na višim temperaturama). Primjeri brzine razvoja za tri vrste morskih ježinaca dani su u Tablici 2.

Tablica 3. Vrijeme potrebno za postizanje određenih faza razvoja kod tri vrste morskih ježinaca.

Vrsta	prva dioba	druga dioba	blastula	gastrula	ličinka pluteus
<i>Lytichinus pictus</i> (18°C)	90'	2,5 sati	24 sata	2 dana	5 dana
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (12°C)	120'	3 sati	24 sata	2 dana	5 dana
<i>Arbacia punctulata</i> (23°C)	50 - 70'	80' - 110'	5 - 6 sati	12 - 15 sati	24 sata

Nacrtajte sljedeće razvojne faze morskog ježinca:

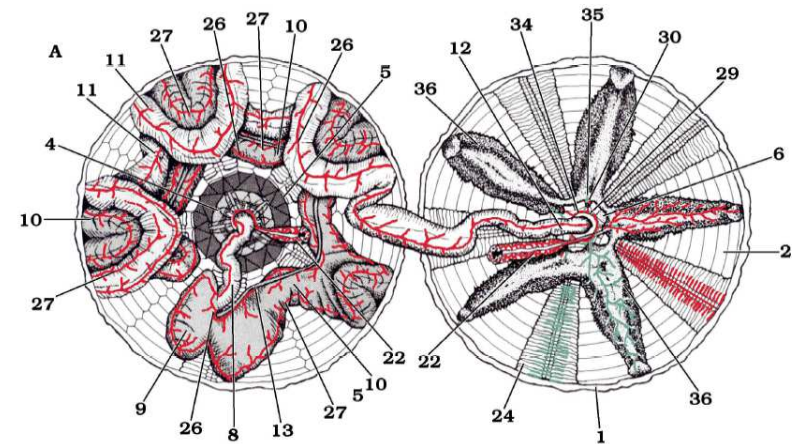
- | | |
|---|---------------------|
| 1. neoplođena jajna stanica | 6. morula |
| 2. zigota | 7. blastula |
| 3. prva dioba (dvostanični stadij) | 8. gastrula |
| 4. druga dioba (četverostanični stadij) | 9. pluteus |
| 5. treća dioba (osmerostanični stadij) | 10. odrasli ježinac |

→ Kraj svakog crteža napišite nakon koliko vremena se pojavila određena faza!

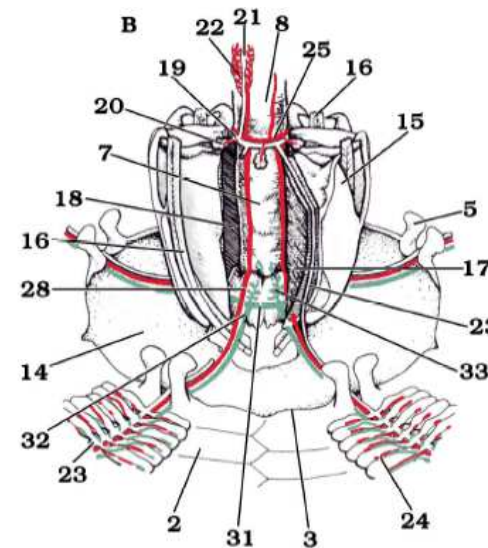
Zadatak 2.

Odgovorite na sljedeća pitanja:

1. Zbog čega je jajašce toliko veće od spermija?
2. Morske struje lako odnesu spermije. Kako se jaja i spermij pronadu u morskoj vodi?
3. Zašto ježinci imaju vanjsku oplodnju? Koje su prednosti vanjske, a koje unutrašnje oplodnje?
4. Što bi se dogodilo kada bi se jedna od stanica iz 2-, 4- ili 8-staničnog stadija razvoja morskog ježinca uklonila ili oštetila?
5. Što bi se dogodilo kada bi se dvije stanice nastale prvom diobom zigote razdvojile i ostavile da se dalje samostalno razvijaju?

DODATAK: ANATOMIJA MORSKOG JEŽINCA

A. Oralna strana lijevo,
aboralna strana desno



- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Rub čahure | 32. Radijalni živac |
| 2. Interambulakralna ploča | 33. Unutrašnja oralna živčana ploča |
| 3. Usno polje ili peristom | 34. Aboralni živčani prsten |
| 4. Aristotelova svjetljika | 35. Živci gonada |
| 5. Aurikula | 36. Gonade |
| 6. Madreporna ploča | |
| 7. Ždrijelo | |
| 8. Jednjak | |
| 9. Želudac | |
| 10. Prednje crijevo | |
| 11. Stražnje crijevo | |
| 12. Rektum | |
| 13. Siphon (Nuscrijevo) | |
| 14. Peristomalna membrana | |
| 15. Piramida | |
| 16. Zub | |
| 17. Mišići žvačnog aparata | |
| 18. Vezivno tkivo | |
| 19. Prstenasta cijev | |
| 20. Polijev mjehurić | |
| 21. Kamena cijev | |
| 22. Aksijalna žlijezda | |
| 23. Radijalna cijev | |
| 24. Ambulakralna pločica | |
| 25. Oralni krvožilni prsten | |
| 26. Unutarnji krvni zaton | |
| 27. Vanjski krvni zaton | |
| 28. Radijalni krvožilni sinus | |
| 29. Aboralni krvožilni prsten | |
| 30. Kanal gonadne krvne žile | |
| 31. Okusni živčani prsten | |