

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

REGENERACIJA U PLOŠNJAKA
FLATWORM REGENERATION

SEMINARSKI RAD

Stela Jelenić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RAZLOZI PROUČAVANJA REGENERACIJE U VIRNJAKA	2
2.1. Sposobnost regeneracije	2
2.2. Anatomija i ponašanje	3
2.3. Uzgoj u laboratoriju i molekularne metode	4
3. POLARNOST	6
3.1. Polarnost pojedinih osi	6
4. NEOBLASTI	8
4.1. Karakterizacija neoblata	9
4.2. Mehanizam regeneracije	10
5. ULOGA DIFERENCIRANIH TKIVA U REGENERACIJI VIRNJAKA	11
6. ULOGA REAKTIVNIH OBLIKA KISIKA U REGENERACIJI VIRNJAKA	12
7. REGENERACIJA U METILJA I TRAKAVICA	12
8. BUDUĆNOST ISTRAŽIVANJA	14
9. ZAKLJUČCI	15
10. LITERATURA	16
11. SAŽETAK	17
12. SUMMARY	18

1. UVOD

Regeneracija je stoljećima fascinirala biologe i njeno proučavanje ima bogatu povijest u eksperimentalnoj biologiji. Najraniji poznati opis regeneracije datira iz oko 350. godine pr. Kr. u kojem je Aristotel opisao regeneraciju repa guštera. U 17. stoljeću prirodoslovci su proučavali dvije paradigme u embriologiji: preformacionizam, po kojem su životinje potpuno formirane prilikom začeća i vremenom samo rastu i epigeneza po kojoj se organizmi tijekom embriogeneze razvijaju iz nediferenciranih stanica. Upravo je detaljnije proučavanje regeneracije krajem 17. stoljeća doprinijelo prihvaćanju epigeneze kao ispravne paradigme (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

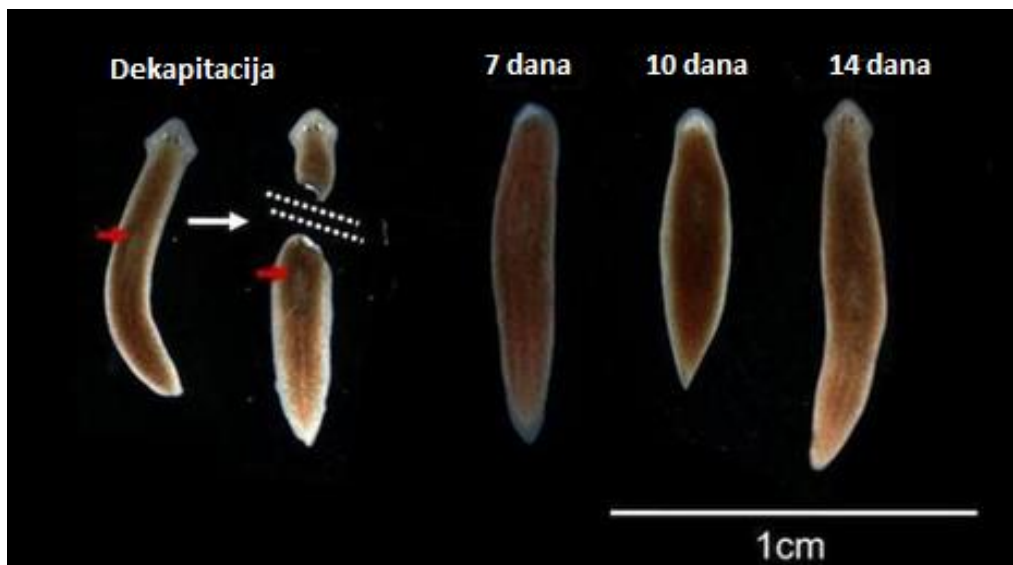
Plošnjaci (Platyhelminthes) su bilateralno simetrične životinje iz skupine beskralješnjaka čiji su najpoznatiji predstavnici virnjaci, metilji i trakavice (Matoničkin 1998). Iako je znatna sposobnost regeneracije zabilježena u svim razredima plošnjaka, ona je najizraženija i najbolje istražena u virnjaka (razred Turbellaria). U 19. stoljeću znanstvenik Dalyell opisao ih je kao „gotovo besmrtni pod rubom noža“ što opisuje njihovu iznimnu sposobnost regeneracije cijelog tijela nakon ozljede (Karami i sur. 2015). Metilji (Trematoda) i trakavice (Cestoda) se uglavnom ne koriste za proučavanje regeneracije, a glavni razlog je što su paraziti pa je puno teže raditi istraživanja na njima. Osim toga imaju slabiju sposobnost regeneracije od virnjaka (Hart 1968).

U zadnjih nekoliko godina znanstvenici su počeli intenzivno proučavati regeneraciju. Razvitak metoda u molekularnoj biologiji omogućio je značajan napredak u razumijevanju ovog procesa. Otkriveno je mnogo gena odgovornih za sam proces, a trenutno se radi na razumijevanju regulacije tih gena i pronalaženju novih (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Jedan od glavnih modelnih organizama u istraživanju regeneracije je virnjak *Schmidtea mediterranea*, zbog jednostavnog uzgoja u laboratoriju i nevjerojatne sposobnosti regeneracije. Osim za proučavanje samog procesa regeneracije, znanstvenici pokušavaju primijeniti dobivena znanja u brojnim područjima koja se tiču ljudskog života i zdravlja. Tako se upravo virnjaci (iako su beskralješnjaci) koriste za istraživanja u regenerativnoj medicini, proučavanje starenja i razvoja tumora (Perrigue i sur. 2015). Također, proučavanjem regeneracije znanstvenici pokušavaju napraviti model za razumijevanje neuroloških poremećaja poput Parkinsonove bolesti (Karami i sur. 2015). Bolje poznavanje regeneracije u metilja i trakavica može omogućiti proizvodnju novih lijekova protiv bolesti izazvanih tim parazitima (Brehm 2009).

2. RAZLOZI PROUČAVANJA REGENERACIJE U VIRNJAKA

2.1. Sposobnost regeneracije

Slično kao što je vinska mušica odličan model za proučavanje genetike zbog velikog broja potomaka i kratkog generacijskog vremena, tako su i virnjaci odličan model za proučavanje regeneracije zbog iznimne sposobnosti regeneracije tijekom starenja ili nakon ozljede (Karami i sur. 2015). Primjerice, nakon amputacije nekog dijela tijela, virnjak se može potpuno regenerirati za samo 1-2 tjedna, a osim toga virnjaci su u skupini malobrojnih životinja koje mogu u potpunosti regenerirati živčani sustav (Slika 1). Prema Morganu, proces takve regeneracije može se podijeliti u 2 dijela: epimorfoza tj. ponovna izgradnja tkiva *de novo* i morfalskija tj. integracija novo stvorenih tkiva s već postojećim. Ovako regenerirana jedinka ima zadržane normalne proporcije i funkcije organa (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).



Slika 1. Fotografije regeneracije virnjaka vrste *Schmidtea mediterranea* 7, 10 i 14 dana nakon dekapitacije (Shomrat i Levin 2013).

Virnjaci također imaju i sposobnost fiziološke regeneracije što znači da čak i u odsustvu ozljede dolazi do značajne proliferacije i diferencijacije stanica da bi se zamijenila stara tkiva. Ova sposobnost se u svakoj jedinci može zadržati desetljećima, a pri tome iznimno rijetko dolazi do razvoja tumora (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Zbog toga proučavanje fiziološke

regeneracije može pomoći u donošenju zaključaka o starenju i tumorigenezi (Perrigue i sur. 2015).

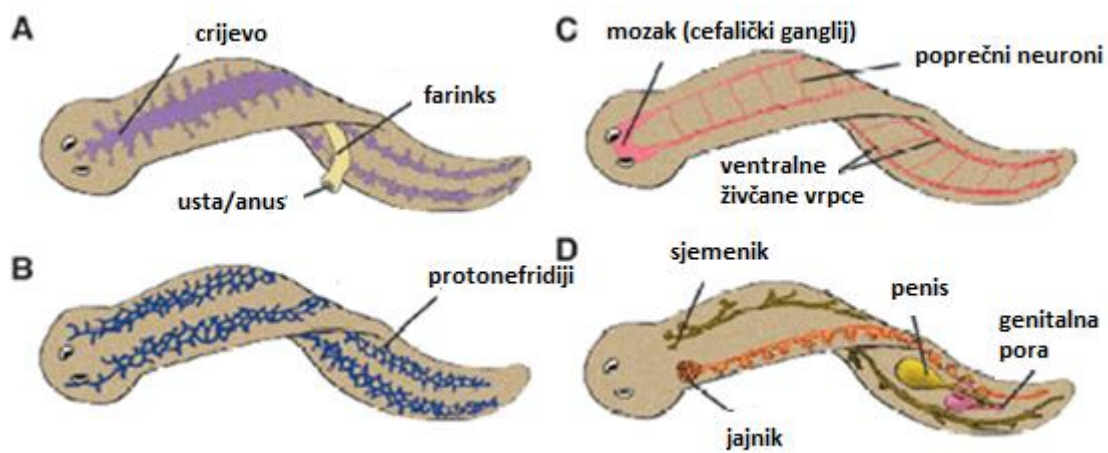
2.2. Anatomija i ponašanje

Anatomija i ponašanje virnjaka su dovoljno složeni da bi se mogli napraviti kvalitetni eksperimenti i konstruirati dobri modeli za razumijevanje složenih procesa u kralješnjaka (Karami i sur. 2015). Virnjaci su bilateralno simetrične i protostomične životinje jednostavne građe. Također su triploblastični što znači da im se tkiva razvijaju iz sva tri zametna listića (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Najčešće žive slobodno, uglavnom u kopnenim vodama i moru te imaju jednostavan životni ciklus (Matoničkin 1998).

Virnjaci, kao i ostali predstavnici plošnjaka, nemaju unutarnji ni vanjski skelet, već potpuno tkivo koje čini mezodermalni parenhim kojim je ispunjen cijeli unutrašnji prostor shizocela (Matoničkin 1998). Mišići uglavnom služe za održavanje oblika i cjelovitosti tijela, ali i za pokretanje (Cebria 2016). Pokretanju pomaže i trepetljikavi epitel na ventralnoj strani. Probavilo čini slijepo crijevo koje se proteže cijelim tijelom i mišićna cijev ili farinks pomoću koje jedu i izbacuju neprobavljene tvari. Za osmotsku regulaciju im služe protonefridiji koji su homologni bubrezima u kralješnjaka (Matoničkin 1998). Živčani sustav sastoji se od dva cefalička ganglija koja se nalaze anteriorno i dvije paralelne živčane vrpce koje se ventralno pružaju duž tijela (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Imaju receptore za dodir, reoreceptore (služe za primanje podražaja o brzini strujanja vode), statociste (organe za ravnotežu) i fotoreceptore. Također mogu osjetiti kemijski gradijent određenih tvari, te električno i magnetno polje. Sve te informacije se integriraju u mozgu (cefaličkim ganglijima) gdje se zatim donosi odluka o načinu ponašanja (Shomrat i Levin 2013). Postoje spolne i nespodne linije virnjaka, a većina spolnih su hermafroditi. Dišni sustav nije razvijen, već do izmjene plinova dolazi kroz površinu tijela (Matoničkin 1998). Osnovna shema anatomije virnjaka prikazana je na slici 2.

Zabilježena su neka složena ponašanja virnjaka. Primjerice, uočena je negativna fototaksija, pri čemu je cijelo tijelo osjetljivo na svjetlost (Matoničkin 1998). Posebno su zanimljivi odgovori na promjene broja jedinki u populaciji. Zabilježeno je da se virnjaci mogu podijeliti ukoliko se populacija značajno smanjila. Također uočeni su slučajevi kanibalizma kada su

populacije znatno narasle (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Prije 50ak godina otkriveno je da se virnjaci mogu trenirati da naprave neke jednostavne zadatke. Daljnjim istraživanjem je utvrđeno da virnjaci mogu pamtiti određene uvijete kojima su bili izloženi i ponašati se u skladu s njima. Primjerice, mogu zapamtiti koji put trebaju odabrati da dođu do hrane ako imaju izbor i hrana se uvijek nalazi na istom mjestu. Novija istraživanja čak pokazuju da u nekim slučajevima pamćenje može ostati i nakon dekapitacije i ponovne regeneracije mozga (Shomrat i Levin 2013).



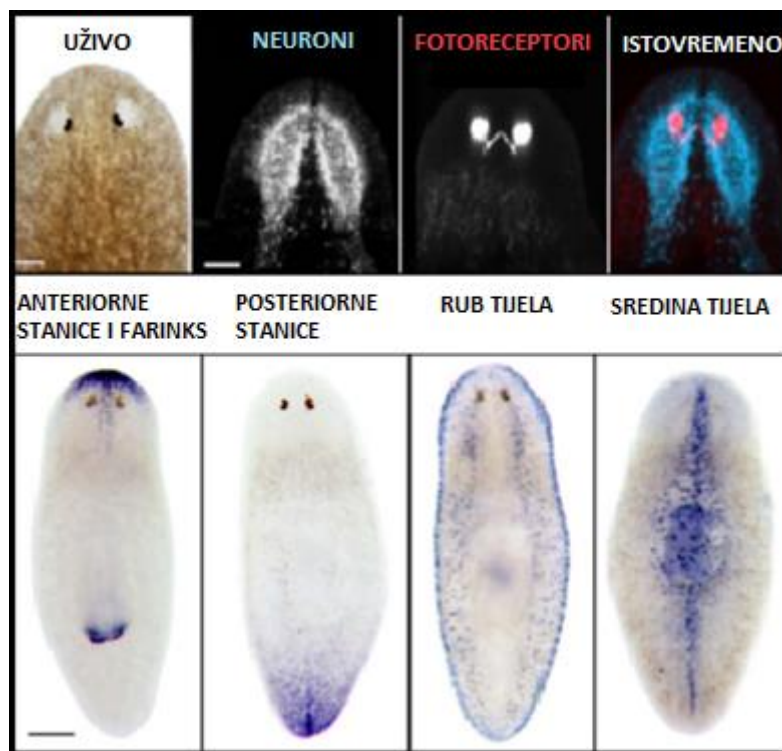
Slika 2. Shema anatomije virnjaka. A – probavni sustav, B – sustav za osmoregulaciju, C – živčani sustav, D – spolni sustav.

(<http://planaria.stowers.org/publications/Current%20Biology.pdf>)

2.3. Uzgoj u laboratoriju i molekularne metode

Uzgoj virnjaka u laboratoriju prilično je jednostavan. Najčešće se koristi vrsta *Schmidtea mediterranea*, uglavnom nespolni soj čija je veličina 1-8 mm. Životinje žive u vodi točno definiranog sastava soli i temperature 20°C. Hrane se uglavnom jednom tjedno telećom jetrom, a u većini slučajeva uzgajaju se u mraku. Generacijsko vrijeme nespolnih sojeva je desetak dana (Pirotte i sur. 2015).

U posljednja dva desetljeća razvijene su nove molekularno-biološke metode koje su značajno poboljšale mogućnosti vizualizacije tkiva virnjaka te nam omogućuju promatranje staničnih i molekularnih događaja tijekom regeneracije. Moguće je detektirati promjene u ekspresiji gena ili funkciji proteina što omogućuje praćenje morfološke i stanične dinamike za vrijeme regeneracije (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Znanstvenici su uspjeli razviti metode pomoću kojih mogu odvojeno vizualizirati regeneraciju različitih organa ili primjerice anteriornog i posteriornog dijela životinje (Slika 3). U te svrhe najčešće se koriste hibridizacije *in situ* kojima se vizualiziraju specifični markeri direktno u tkivu (Hubert i sur. 2015).



Slika 3. Vizualizacija pojedinačnih populacija stanica u tkivu virnjaka označavanjem specifičnih markera (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Veliku ulogu u napretku metoda za proučavanje regeneracije u virnjaka imalo je sekvenciranje genoma vrste *Schmidtea mediterranea*. To je omogućilo analizu gena bioinformatičkim metodama te razvoj metode temeljene na RNA interferenciji koja je omogućila karakterizaciju funkcije gena (*eng. High-throughput RNAi screening*). Za identifikaciju i izolaciju pojedinačnih populacija stanica koristi se metoda temeljena na fluorescentnom obilježavanju specifičnih markera pojedinih tipova stanica (FACS, *eng.*

Fluorescence activated cell sorting). Stanice koje proliferiraju označavaju se pomoću bromdeoksiuridina (BrdU), a ekspresija pojedinih gena može se pratiti izolacijom i identifikacijom mRNA raznim metodama (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

3. POLARNOST

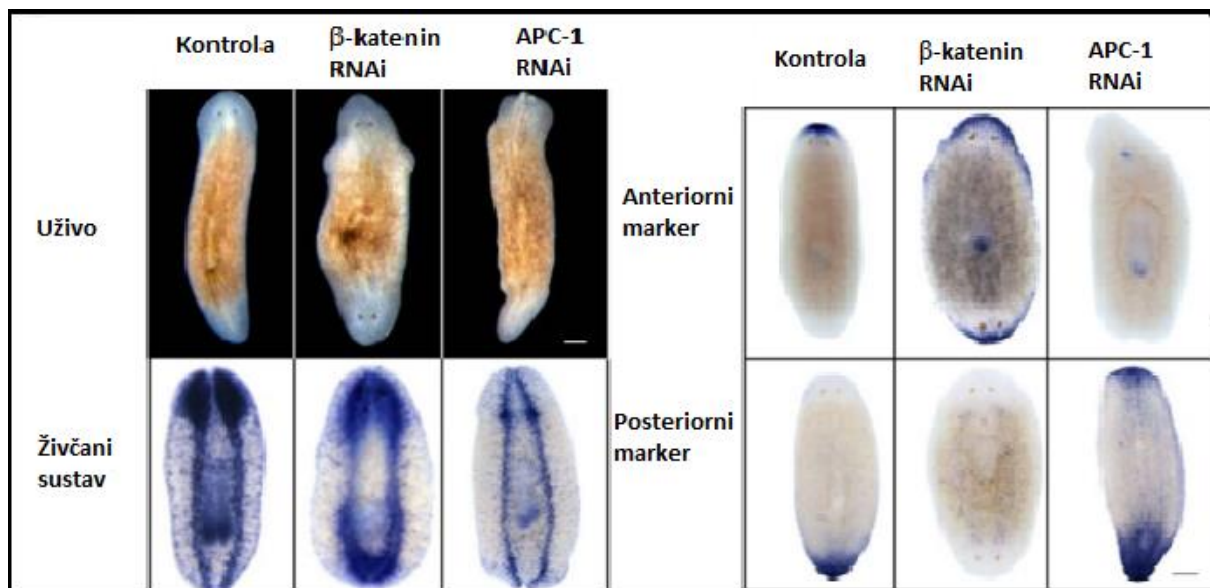
Pojam polarnosti u regeneraciji označava činjenicu da se iz ozljede na anteriornoj strani tijela razvija glava, a na posteriornoj strani rep (Karami i sur. 2015). Prirodoslovci su tijekom povijesti imali mnogo teorija kako dolazi do polarnosti, međutim Morganova teorija se brojnim pokusima pokazala najbližoj istini. On je primijetio da nešto u samom tkivu određuje u kojem se dijelu tijela nalazi ozlijeda i što se treba regenerirati na njenom mjestu, a to nešto nazvao je polarnost. Pretpostavio je da mehanizam polarnosti zapravo čini gradijent neke tvari duž osi tijela, i za dokaz te teorije poslužio mu je sljedeći eksperiment: vrlo tanki komadići tijela virnjaka regenerirali su se u životinje s dvije glave ili dva repa. Dakle, ova pojava bi se mogla objasniti pretpostavkom da su ti komadići bili premali da bi se mogao razviti gradijent neke tvari (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Tijekom regeneracije virnjaci zadržavaju polarnost sve tri osi: anteriorno-posteriorne (A/P), dorzo-ventralne (D/V) i medijalno-lateralne (M/L). Pokusi tijekom 20. stoljeća su pokazali da kontakt tkiva iz različitih dijelova tijela (npr. transplantacija) dovodi do abnormalne regeneracije uključujući i stvaranje ektopičkih osi (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Nedavna istraživanja su pokazala da neuroni i mišićne stanice eksprimiraju gene za pozicijsku kontrolu (PGCs, *eng. positional control genes*) koje zatim stanice zaslužne za regeneraciju mogu detektirati. U današnje vrijeme otkriveno je mnogo molekula odgovornih za uspostavljanje polarnosti, međutim još uvijek nisu pronađene brojne komponente niti razjašnjeni svi procesi (Karami i sur. 2015).

3.1. Polarnost pojedinih osi

Polarnost A/P osi najduže je istraživana zbog jasnog razlikovanja glave i repa virnjaka. Prvi eksperimenti osnivali su se na heteromorfozi tj. izazivanju abnormalne regeneracije određenim kirurškim zahvatima. Osim navedenog Morganovog pokusa, radili su se i pokusi transplantacije

primjerice anteriornog tkiva na posteriorni kraj životinje pri čemu bi došlo ili do abnormalne regeneracije ili razvitka novog virnjaka koji je zadržao A/P os transplantiiranog komadića tkiva. Zanimljivo je otkriće da je Wnt/ β -katenin put, koji je uključen u brojne razvojne procese, također jedan od odgovornih puteva za zadržavanje polarnosti A/P osi. Utišavanjem gena odgovornih za pozitivnu regulaciju gena toga puta došlo je do regeneracije glave iz posteriornog dijela tijela. Suprotno tome, pojačavanje ekspresije gena Wnt/ β -katenin puta dovelo je do regeneracije repa s anteriornih ozljeda (Slika 4). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da postoji gradijent aktivnosti β -katenina koji određuje poziciju u tijelu i tako regulira regeneraciju glave odnosno repa. Ovaj put je također značajan za fiziološku regeneraciju jer čak i u neozlijeđenih virnjaka dolazi do anteriorizacije ukoliko se on blokira (Gurley i sur. 2008). Otkrivena su još dva paralelna puta za održavanje ove polarnosti od kojih je jedan *Hedgehog*, također odgovoran za razvojne procese mnogih životinja (Karami i sur. 2015).



Slika 4. Vizualizacija markera živčanih stanica te anteriornog i posteriornog kraja tijela nakon utišavanja gena za β -katenin i inhibitora sinteze β -katenina (APC-1) metodom interferencije RNA (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Da bi se proučavala polarnost D/V osi, napravljen je pokus u kojem je komadić tkiva transplantiран u normalnoj ili obrnutoj orijentaciji. Virnjacima kojima je tkivo bilo transplantiранo u normalnoj orijentaciji je ono normalno zaraslo. Međutim, kada je tkivo bilo transplantiранo u suprotnoj orijentaciji došlo je do nenormalnog zarašćivanja, a nedavnim

ponavljanjem pokusa se ustanovilo da su stanice oko eksplantata eksprimirale markere za rub tijela. U nekim slučajevima je čak došlo do formiranja ektopičkog tijela. Takvi rezultati ovog pokusa naveli su znanstvenike na zaključak da bi kontakt dorzalnog i ventralnog tkiva, koji se prirodno događa prilikom ozlijede, mogao biti ključan „okidač“ za početak regeneracije. Za održavanje D/V polarnosti također je pronađeno nekoliko puteva s brojnim važnim faktorima. Jedan od njih je BMP put (proteini toga puta spadaju u faktore rasta tj. citokine, a nalazimo ih također i u ljudi). Puno je još prostora za istraživanje kako D/V polarnost funkcionira (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Za istraživanje polarnosti M/L osi napravljen je eksperiment u kojem je tijelo virnjaka zarezano s jedne strane, ali tako da ga se presječe samo do polovice. Neke životinje su jednostavno zarasle, dok je kod drugih došlo do udvostručenja M/L osi. Ovaj pokus još uvijek nije ponovljen koristeći molekularne metode, međutim metodama RNA interferencije otkriveni su određeni putevi potrebni za održavanje M/L polarnosti (Slit/netrin je jedan od njih i također je važan za razvojne procese) (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Iako je postignut veliki napredak u razumijevanju polarnosti u regeneraciji, ostalo je još mnogo neodgovorenih pitanja, primjerice, događa li se uspostavljanje svih triju osi simultano ili postoji određeni redosljed? Također, može li jedna os biti određena neovisno od ostale dvije? Pošto je uočeno da se određeni faktori odgovorni za polarnost jednaki ili slični onima uključenim u embrigenezu, je li moguće da su ta dva procesa nekako povezana (Elliott i Sánchez Alvarado 2013 i Karami i sur. 2015)?

4. NEOBLASTI

Histološkim analizama svjetlosnim mikroskopom krajem 19. stoljeća biolozi su opisali skup parenhimskih, nediferenciranih stanica koje su okruglastog oblika, velikog omjera jezgre i citoplazme te stalno proliferiraju (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Tijekom godina mijenjali su se nazivi tih stanica, a konačno je usvojen naziv neoblasi, koji je dala Harriet Randolph da bi nazvala slične stanice u glistama (Karami i sur. 2015). Godinama znanstvenici nisu mogli ustanoviti jesu li te stanice trajno nediferencirane ili nastaju dediferencijacijom iz već diferenciranih stanica. Otkriće da ionizirajuće zračenje može preferencijalno ubiti neoblasi, dok ostale stanice ostaju intaktne, omogućilo je brojne eksperimente kojima su se utvrdile karakteristike neoblasi (Slika 5). Kako su životinje uvijek uginule nakon ozračivanja

dovoljnog da uništi sve neoblaste, postalo je jasno da su upravo neoblasi stanice koje omogućuju regeneraciju i da ne mogu nastati dediferencijacijom (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).



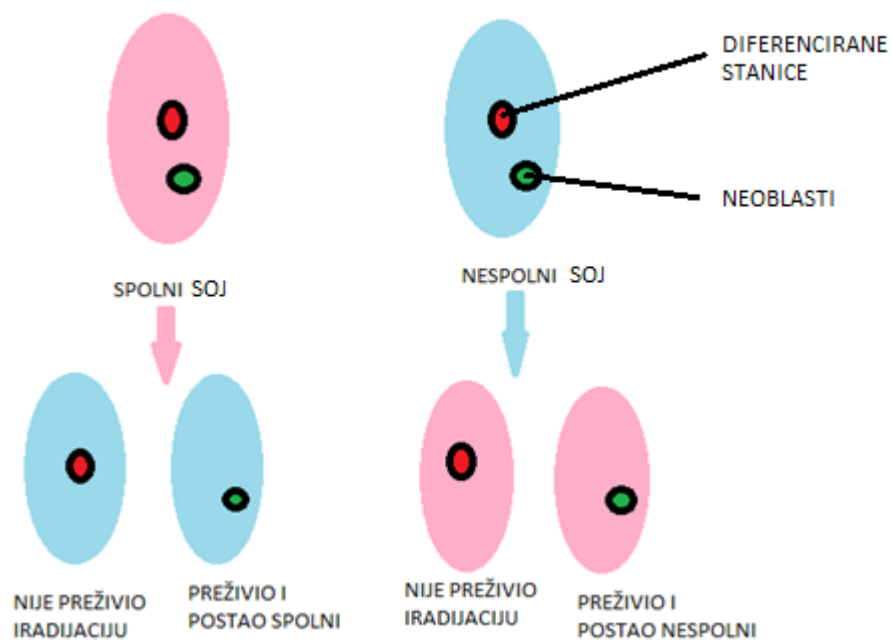
Slika 5. Utjecaj ionizacijskog zračenja na morfologiju virnjaka vrste *Schmidtea mediterranea* 1, 3, 5, 7 i 10 dana nakon zračenja (Karami i sur. 2015).

4.1. Karakterizacija neoblasta

Pokusom u kojem su se dijelovi tijela virnjaka štitili od zračenja olovnim blokom, pokazano je da je vrijeme potrebno za regeneraciju proporcionalno udaljenosti ozlijede od zaštićenog dijela tijela gdje su neoblasi ostali vijabilni. Tako su znanstvenici zaključili da neoblasi mogu migrirati. Zapanjujuće je bilo otkriće da je samo jedan neoplast, koji je bio unesen u virnjaka prethodno ozračenog letalnom dozom ionizacijskog zračenja, dovoljan za njegovu regeneraciju i preživljavanje. Napravljeni su i pokusi u kojima su neoblasi i diferencirane stanice iz spolnih linija uneseni u ozračene virnjake nespolne linije i obrnuto. Samo oni virnjaci u koje su uneseni neoblasi su preživjeli, a pri tome su dobili spolnost i kariotip neoblasta (Slika 6). Ovim pokusima znanstvenici su dokazali da su neoblasi populacija totipotentnih matičnih stanica koje mogu migrirati (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Znanstvenici su pronašli brojne genetičke markere za neoblaste koji su im omogućili praćenje tih stanica. Otkriveno je da su neoblasi jedine stanice koje se dijele u virnjacima i da čine oko 20% svih njihovih stanica. Iako se do nedavno vjerovalo da su neoblasi homogena

populacija stanica jer nisu uočene razlike u morfologiji, razvojem modernih metoda utvrđeno je da postoje značajne razlike na molekularnoj razini. To ukazuje na mogućnost da nisu svi neoblasti pluripotentni već da postoje određene vrste koje imaju ograničenu moć diferencijacije (Pirotte i sur. 2015). Usavršavanjem metoda mikroskopije uočena je i određena morfološka razlika između nekih populacija neoblasta. Još uvijek nije sasvim razjašnjeno dolazi li do te heterogenosti zbog neke početne diferencijacije neoblasta ili postoje trajno odvojene različite populacije (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).



Slika 6. Shema eksperimenta transplantacije diferenciranih stanica i neoblasta iz spolnih sojeva u nespolne i obratno (Prilagođeno prema tekstu, Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

4.2. Mehanizam regeneracije

Metodama koje su omogućile praćenje pojedinačnih stanica te označavanje i vizualizaciju stanica različitog podrijetla otkriven je osnovni mehanizam regeneracije nakon ranjavanja. Tijekom prve faze dolazi do globalne masovne proliferacije neoblasta koja se događa unutar 6 sati od ranjavanja. Druga faza je povećana proliferacija u blizini ozlijede tj. u blizini blasteme. Blastema je masa nepigmentiranih i novo-diferenciranih stanica iz koje kreće regeneracija tkiva. Neoblasti se diferenciraju dok migriraju prema blastemi, a u blastemu ulaze kao već

diferencirane stanice (Cebrià 2016). Kako pojačana proliferacija neoblata započinje udaljeno od mjesta ozljede, potvrđuje se teorija da sama rana daje signal za početak pojačane proliferacije. Do sada je otkriveno oko 200 gena uključenih u funkcioniranje neoblata, čijom mutacijom ili utišavanjem dolazi do defektne regeneracije (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Mnogi od tih gena i neki signalni putevi u neoblastima su vrlo konzervirani i nalazimo ih čak i u ljudi. S druge strane, neki od njih su ortolozi gena embrionalnog razvoja u drugim životinjama (Karami 2015).

5. ULOGA DIFERENCIRANIH TKIVA U REGENERACIJI VIRNJAKA

Za bolje razumijevanje regeneracije znanstvenici su se uglavnom fokusirali na proučavanje neoblata, dok se diferencirano tkivo smatralo dijelom mikrookoliša koji naprosto okružuje neoblata i štiti ih od vanjskih utjecaja. Međutim, kako regeneracija nakon amputacije zahtjeva ne samo stvaranje novog tkiva, već i njegovu integraciju sa starim tkivom te zadržavanje proporcija tijela, uočeno je da bi diferencirana tkiva mogla imati bitnu ulogu. Tek razvojem molekularnih metoda postalo je moguće promatrati ulogu samo diferenciranih stanica tj. znanstvenici su mogli odgovorno tvrditi da pri tome nije došlo do interferencije neoblata (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Nakon ozračivanja ionizacijskim zračenjem dovoljnim da se unište svi neoblata u jedinci, napravljena je amputacija. Unatoč tome što nije bilo neoblata, došlo je do ekspresije „ranih gena ranjavanja“ jednako kao i u intaktnim jedinkama. Osim toga uočena je jednaka stopa apoptoze, koja se smatra potrebnom za početak regeneracije, u ozračenim i intaktnim jedinkama. Novijim istraživanjima je pokazano da su geni za kontrolu pozicije (PCGs) eksprimirani u 96-99% svih mišićnih stanica uključujući i farinks (Cebrià 2016). Ova istraživanja pokazuju da neoblata uopće nisu potrebni u najranijim fazama regeneracije. Međutim, otprilike 4 dana nakon amputacije u ozračenim jedinki dolazi do promjene ukupne ekspresije gena u odnosu na intaktne jedinke jer ne može doći do uspješne regeneracije i nakon nekog vremena takve jedinke ugibaju (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Na temelju ovih opažanja napravljen je model prema kojem mišićne stanice, eksprimirajući različite kombinacije gena za kontrolu pozicije, daju pozicijsku informaciju neoblastima koji se zatim diferenciraju u potrebna tkiva (Cebrià 2016).

6. ULOGA REAKTIVNIH OBLIKA KISIKA U REGENERACIJI VIRNJAKA

Reaktivni oblici kisika (ROS) često imaju dvojaku ulogu u organizmima: s jedne strane mogu značajno oštetiti makromolekule u stanicama, a s druge strane mogu služiti kao signal u stanicama. Kako je nedavno uočena važna uloga ROS-ova u regeneraciji žabe i zebrice, znanstvenici su odlučili provjeriti imaju li sličnu ulogu i u virnjacima. Uočen je nagli porast koncentracije ROS-ova u stanicama virnjaka nakon ranjavanja, neovisno o poziciji ozlijede. Također je utvrđeno da nedostatak ROS-ova onemogućuje stvaranje normalne blasteme pri čemu nema utjecaj na proliferaciju neoblata već na njihovu diferencijaciju. Smanjen udio ROS-ova nije imao učinak na zatvaranje rane tj. moglo je doći do kontakta različitih tkiva i „paljenja“ početnih koraka regeneracije. Da bi se ustanovilo u kojem trenutku su ROS-ovi potrebni za nastavak regeneracije, njihov nastanak je inhibiran u različitim vremenskim razmacima od ranjavanja. Ispostavilo se da iako reaktivni oblici kisika nastaju samo nekoliko minuta nakon amputacije, potreba za njima kao signalima za uspješnu regeneraciju javlja se nakon više od 24 sata. Uočeno je da nedostatkom ROS-ova također dolazi do promjena u održavanju polarnosti, međutim još uvijek nije razjašnjeno je li razlog direktno manjak ROS-ova ili abnormalna diferencijacija te nepravilna regeneracija živčanog sustava. U svakom slučaju, nedvojbeno je zaključeno da reaktivni oblici kisika imaju ključnu ulogu u pravilnoj regeneraciji virnjaka (Pirotte i sur. 2015.).

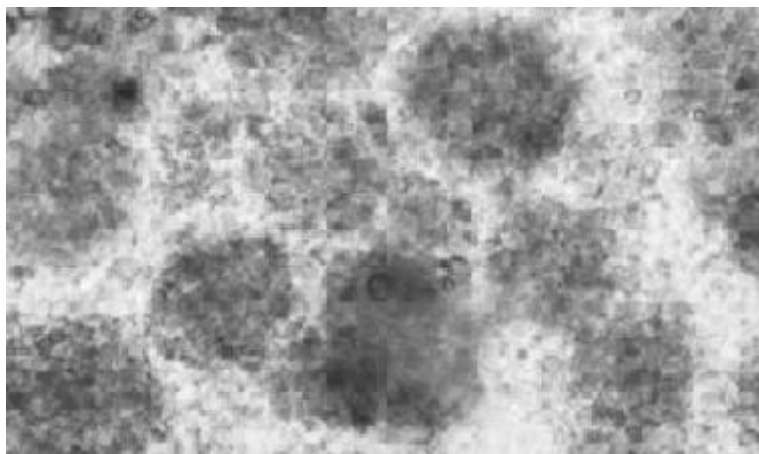
7. REGENERACIJA U METILJA I TRAKAVICA

Regeneracija se puno manje istraživala u trakavicama i metiljima, prije svega jer su unutarnji paraziti i jer imaju složen životni ciklus koji se sastoji od više različitih oblika i dolazi do izmjene domaćina. Međutim, u posljednje vrijeme znanstvenici su počeli sve više proučavati regeneraciju upravo u ovim životinjama jer ih je zanimalo imaju li i one sličnu sposobnost regeneracije kao i virnjaci, obzirom da su vrlo srodne.

Metilji su plošnjaci koji žive kao vanjski ili unutrašnji nametnici. Najčešće su im primarni domadari kralješnjaci u kojima se metilji razmnožavaju spolno, dok su međudomadari uglavnom mekušci (Matoničkin 1998). Metilji vrste *Schistosoma mansoni* mogu u ljudskom

organizmu živjeti i razmnožavati se desetljećima. To je navelo znanstvenike na razmišljanje da vrlo vjerojatno imaju dobru sposobnost regeneracije tijekom cijelog života. Nedavnim istraživanjem potvrđeno je da posjeduju stanice slične neoplastima. One su slične morfologije, također često proliferiraju i mogu se diferencirati u derivate svih zametnih listića. Također je otkriveno da metilji mogu modulirati svoj rast obzirom na reakciju imunološkog odgovora domadara te da se mogu regenerirati ukoliko su izloženi sub-letalnim dozama lijekova (Collins i sur. 2013).

Trakavice su unutarnji nametnici iz razreda plošnjaka koji najčešće žive u probavilu kralješnjaka. Sposobnost regeneracije je utvrđena u vrsti *Spirometra mansonioides* unošenjem fragmenata tijela u miševu, međutim ona je ograničena zbog toga što su se samo iz fragmenata koje su imale skoleks mogle razviti normalne trakavice (Hart 1968). Detaljnija istraživanja regeneracije na molekularnoj razini omogućena su otkrićem neoplastima sličnih stanica u trakavicama i prilagođavanjem metode uzgoja tih stanica *in vitro* (Slika 7). Na taj način pronađeni su brojni geni odgovorni za regeneraciju u trakavica, međutim još uvijek je teško proučavati mogućnosti regeneracije trakavica *in vivo* (Brehm 2009).



Slika 7. Mikrofotografija kulture neoplastima sličnih stanica *in vitro*; stanice su kultivirane iz vrste *Echinococcus multilocularis* (Brehm 2009).

Iako metilji i trakavice nisu dobri modeli za proučavanje regeneracije kao virnjaci, njihovu regeneraciju je vrijedno istraživati najviše zbog mogućnosti stvaranja novih, efikasnijih lijekova za suzbijanje bolesti koje uzrokuju. Čak više od 200 milijuna ljudi širom svijeta pati od bolesti koju uzrokuje samo jedna vrsta metilja, *Schistosoma mansoni*, dok je broj pogođenih

bolestima zbog ostalih metilja i trakavica teško procijeniti (Collins i sur. 2013). Osim toga, vrlo je zanimljiv evolucijski aspekt. Znanstvenici vjeruju da su se paraziti razvili iz slobodno živućih predaka i vremenom izgubili brojne organe i organske sustave (primjerice trakavice uopće nemaju probavni sustav). Zanimljivo je da su metilji i trakavice ipak zadržali sposobnost regeneracije koja im vjerojatno značajno poboljšava preživljavanje obzirom da se moraju boriti protiv imunološkog sustava domaćina, a u novije vrijeme često i utjecaja lijekova koji ih ubijaju (Brehm 2009).

8. BUDUĆNOST ISTRAŽIVANJA

Iako je u posljednjih nekoliko godina zabilježen značajan napredak u razumijevanju procesa regeneracije u plošnjaka, mnogo je toga što je ostalo neotkriveno. Najviše je nepoznanica ostalo u vezi regulacije gena tijekom regeneracije. Znanstvenici pretpostavljaju da dinamika kromatina mora imati veliku ulogu u globalnom transkripcijskom odgovoru potrebnom za normalnu diferencijaciju neoblasta, međutim taj aspekt još uvijek nije dovoljno istražen. Da bi se upotpunila regulatorna mreža gena, potrebno je pronaći još puno transkripcijskih faktora i otkriti njihova mjesta vezanja u genomu. Također je potrebno poboljšati staničnu rezoluciju da bi se proučio efekt gena koji imaju različite vremenske i prostorne uloge tijekom regeneracije. Za pokuse *in vivo* potrebno je razviti nove metode označavanja pojedinih stanica, a nove metode su također potrebne za proučavanje posttranskripcijskih i posttranslacijskih modifikacija na razini pojedinačnih stanica (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Još uvijek nije sasvim razjašnjeno je li regeneracija samo na neki način rekapitulacija embriogeneze ili su mehanizmi tih dvaju procesa potpuno različiti. Potrebno je utvrditi jesu li embrionalne stanice funkcionalno različite od neoblasta i kako i kada nastaju neoblasti tijekom embrionalnog razvoja. Kako još uvijek nije u potpunosti otkrivena regulacija gena tijekom regeneracije, postoji mogućnost da se na toj razini regeneracija i embriogeneza preklapaju, kada se radi o uspostavljanju polarnosti osi. Kako većina organizama (uključujući sisavce) ima veliku moć regeneracije tijekom ranog embrionalnog razvitka, znanstvenici se nadaju da će ukoliko nađu poveznice između ova dva procesa u virnjacima i otkriju kako se sposobnost regeneracije može zadržati i u odraslih jedinki, moći poboljšati sposobnost regeneracije drugih organizama, moguće i ljudi (Elliott i Sánchez Alvarado 2013).

Zbog toga što se količina informacija prikupljenih o regeneraciji jako povećala, potrebno je osmisliti računalnu metodu koja će ih sve objediniti i povezati u jednu cjelinu. Znanstvenici Lovo i Levin napravili su program u koji su unijeli sve pronađene podatke iz literature o regeneraciji virnjaka uključujući molekularne produkte, njihovu regulaciju te vremensko-topološke (morfološke) rezultate eksperimenata. Njihov cilj je bio sistematizirati znanja o regeneraciji u virnjacima i pokušati pomoći u predviđanju postojanja određenih genskih produkata koji nedostaju tako da uspoređuju sljedove nukleotida gena koji imaju slične funkcije u drugim organizmima. Ove metode su još uvijek u stadiju testiranja i njihova se vrijednost će se tek pokazati kroz vrijeme (Lobo i Levin 2015).

9. ZAKLJUČCI

Virnjaci su se pokazali kao iznimno dobri organizmi za proučavanje regeneracije *in vivo*. Njihova nevjerojatna moć regeneracije koja uključuje čak i potpunu regeneraciju živčanog sustava još uvijek fascinira znanstvenike. Mnogo je metoda razvijeno da bi se mogli razumjeti svi procesi uključeni u regeneraciju i dobiveno je puno novih informacija u zadnjih 20ak godina. Unatoč tome, mnogo novih metoda će se morati razviti da bi se odgovorilo na još neodgovorena pitanja. Iako biolozi vjeruju da će detaljnijim istraživanjima regeneracije na virnjacima moći poboljšati regenerativna svojstva drugih organizama (prije svega ljudi), nije sasvim sigurno hoće li takvi eksperimenti uspjeti. Naime, otkriveno je da virnjaci nemaju centrosome te da im oni nisu potrebni za diobu stanica (Elliott i Sánchez Alvarado 2013). Još uvijek su jedine životinje kod kojih je takva pojava zabilježena i nije sigurno je li tako fundamentalna razlika u diobi stanica na neki način povezana s njihovom iznimnom sposobnošću regeneracije.

10. LITERATURA

- Brehm K, 2009. *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology* 137,537–555.
- Cebrià F, 2016. Planarian body-wall muscle: regeneration and function beyond a simple skeletal support. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:8 10.3389.
- Collins J, Wang B, Lambrus B, Tharp M, Iyer H, Newmark P, 2013. Adult somatic stem cells in the human parasite, *Schistosoma mansoni*. *Nature* 494(7438): 476–479.
- Elliott S, Sánchez Alvarado A, 2013. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2(3): 301–326.
- Gurley KA, Rink JC, Sánchez Alvarado A, 2008. β -catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319:323–327.
- Karami A, Tebyanian H, Goodarzi V, Shiri S, 2015. Planarians: an *in vivo* model for regenerative medicine. *International Journal of Stem Cells* Vol. 8, No. 2.
- Lobo D, Levin M, 2015. Inferring regulatory networks from experimental morphological phenotypes: a computational method reverse-engineers planarian regeneration. *PLoS Comput Biol* 11(6):1004295.
- Matoničkin I, Habdija I, Primc-Habdija B, 1998. Beskralješnjaci - biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb.
- Perriguel P, Najbauer J, Jozwiak A, Barciszewski J, Aboody K, Barish M, 2015. Planarians as a model of aging to study the interaction between stem cells and senescent cells *in vivo*. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases* 5: 30052.
- Pirotte N, Stevens A, Fraguas S, Plusquin M, Van Roten A, Van Belleghem F, Paesen, Ameloot M, Cebrià F, Artois T, Smeets K, 2015. Reactive oxygen species in planarian regeneration: an upstream necessity for correct patterning and brain formation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 392476.
- Shomrat T, Levin M, 2013. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration. *The Journal of Experimental Biology* 216, 3799-3810.
- <http://planaria.stowers.org/publications/Current%20Biology.pdf>

11. SAŽETAK

Plošnjaci (Platyhelminthes) su skupina životinja koje pokazuju iznimnu sposobnost regeneracije, a uglavnom je zadržavaju tijekom cijelog života. Među njima virnjaci (Turbellaria) imaju najmoćniju i najistraženiju regeneraciju. Mogu regenerirati sva tkiva, uključujući i cefaličke ganglije što je vrlo rijetka pojava među životinjama. S druge strane, metilji (Trematoda) i trakavice (Cestoda) nemaju toliko izraženu sposobnost regeneracije, međutim kao unutrašnji paraziti često izazivaju bolesti u ljudi i domaćih životinja pa se njihova regeneracija istražuje u svrhu razvijanja novih i efikasnijih lijekova.

U ovom radu obrađene su osnovne teme vezane uz regeneraciju u plošnjaka, prije svega o regeneraciji virnjaka. Virnjaci su postali modelni organizmi za proučavanje regeneracije jer su jednostavni za uzgajanje, imaju jednostavan životni ciklus i postoje dobro razvijene metode za manipulaciju ekspresije gena, vizualizaciju specifičnih stanica i tkiva te za praćenje morfološke i stanične dinamike. Velik napredak zabilježen je u karakterizaciji stanične osnove regeneracije – neoblata, otkrivanju mehanizma stvaranja polarnosti različitih osi, pronalaženju uloge diferenciranih tkiva te uloge reaktivnih oblika kisika u regeneraciji virnjaka. Otkriveno je mnogo gena koji sudjeluju u ovom procesu, međutim regulacija istih još uvijek nije dovoljno istražena. Uz regulaciju postoji još mnogo neodgovorenih pitanja u vezi regeneracije plošnjaka što otvara brojne mogućnosti za buduća istraživanja.

12. SUMMARY

Flatworms (Platyhelminthes) are phylum of animals that have extraordinary ability of regeneration, which they keep during the whole life. Among them, planarians (Turbellaria) have the most powerful and the most explored regeneration. They can regenerate all the tissues including the ganglia and this is very rare in nature. On the other hand, flukes (Trematoda) and tapeworms (Cestoda) do not have such powerful ability of regeneration, but as they are parasites, they often cause human diseases or diseases of domestic animals. Because of that, scientists are studying their regeneration for the purpose of finding new, more efficient medicines.

In this essay the basic topics about flatworm regeneration, especially in planarians, have been presented. Planarians have become the model organism for studying regeneration because they are easily bred in a laboratory, they have simple life cycle and there are some advanced methods for gene expression manipulation, visualization of specific cells and tissues and tracking of morphological and cellular dynamics. There was a big improvement in characterization of neoblasts – the cellular agents of regeneration, finding mechanisms of polarity in different body axes, determining the role of differentiated tissues and the role of reactive oxygen species in planarian regeneration. A lot of genes that are expressed in the regeneration process have been discovered. However, their regulation has not still been studied enough. Beside regulation, there are plenty of unanswered questions about regeneration of flatworms, and so there are still numerous opportunities for future research in this field.