

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ZEBRICA (*Danio rerio*) KAO MODEL ZA REGENERACIJU
ORGANA I TKIVA

ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AS A MODEL FOR REGENERATION
OF ORGANS AND TISSUE

SEMINARSKI RAD

Nicol Kolar
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Duje Lisičić

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. REGENERACIJA.....	1
1.2. ZEBRICA (<i>DANIO RERIO</i>)	1
2. REGENERACIJA REPNE PERAJE KOD ZEBRICE	2
2.1. STRUKTURA PERAJA.....	2
2.2. STANIČNI I MOLEKULARNI MEHANIZMI REGENERACIJE REPNE PERAJE	3
3. REGENERACIJA SRCA ODRASLE ZEBRICE	5
3.1. STRUKTURA SRCA ODRASLE ZEBRICE	5
3.2. STANIČNI I SIGNALNI MEHANIZMI REGENERACIJE SRCA ODRASLE ZEBRICE	6
4. REGENERACIJA MOZGA I LEĐNE MOŽDINE KOD ODRASLE ZEBRICE	7
4.1. STRUKTURA MOZGA I LEĐNE MOŽDINE ODRASLE ZEBRICE.....	7
4.2. STANIČNI I SIGNALNI MEHANIZMI REGENERACIJE MOZGA I LEĐNE MOŽDINE KOD ODRASLE ZEBRICE	8
5. PRIMJENA NA ČOVJEKA	10
6. ZAKLJUČAK.....	11
7. LITERATURA	12
8. SAŽETAK.....	16
9. SUMMARY	16

1. UVOD

1.1. REGENERACIJA

Regeneracija je proces u kojem se nadomještaju strukture koje su oštećene ili izgubljene, reaktivacijom razvoja u postembrionalnom dijelu života (Sunderland, 2010., Gilbert, 2010.). Za inicijalizaciju regeneracije je bitan lokalni odgovor, odnosno interakcije između oštećenog tkiva i donjeg sloja tkiva (King i Newmark, 2012.). Interakcije između tkiva se događaju pomoću parakrinih faktora poput Wnt (*wingless-type*) obitelji, *Headgehog* obitelji, TGF- β (*transforming growth factor beta*) superobitelji (Gilbert, 2010). Osim toga parakrini faktori potiču dalje u procesu regeneracije staničnu proliferaciju i diferencijaciju rezidentnih matičnih stanica (Hodgkinson i sur., 2016.). U regeneraciji još sudjeluju i razni tipovi stanica poput progenitorskih stanica, pluripotetnih matičnih stanica, mezenhimskih stanica. Tip stanica koji sudjeluje u regeneraciji ovisi o tipu oštećenog tkiva i vrsti organizma u kojem se događa regeneracija (Baddour i sur., 2012, Johnston i sur., 2016.). Nemogućnost ljudi da regeneriraju određene dijelove tijela je rezultirala velikom željom za razumijevanjem mehanizama regeneracije u organizmima koji imaju tu mogućnost. Trenutno se regeneracija proučava na nekoliko modelnih organizama poput hidre i planarije koji mogu regenerirati cijele dijelove tijela i na vodozemcima i ribama koji mogu regenerirati izgubljene privjeske, odnosno udove (Gilbert, 2010., King i Newmark, 2012.).

1.2. ZEBRICA (*DANIO RERIO*)

Zebrica (*Danio rerio*) je jedna od najvažnijih model organizama u genetici, razvojnoj biologiji, neurofiziologiji i biomedicini zbog svoje veličine, lakog i jeftinog uzgoja (Hill i sur., 2005.). Posebno je dobar model proučavanje razvoja organa i njihovu regeneraciju jer ima organe građene od samo nekoliko stanica, organi poput peraja, srca, središnjeg živčanog sustava, gušterače, bubrega i kosti imaju mogućnost regeneracije te ima slične organe i tipove stanica kao sisavci. (Nüsslein-Volhard i sur., 2002., Goessling i North, 2014., Rubinstein, 2003.). Zebrica je slatkovodna riba koja prebiva u rijekama Indije, Pakistana i drugim područjima Azije. Pripada porodici Cyprinidae. To je mala riba čije tijelo je fuziformnog oblika i bočno spljošteno, prosječne duljine 5 centimetara i svijetlo sivog obojenja (slika 1.). Specifična obilježja ove vrste su nepotpuna bočna pruga koja se proteže do baze trbušne peraje, dva para mirisnih vrećica i pet do sedam tamnoplavih horizontalnih pruga koje se protežu od operkuluma do repne peraje (Kinth i sur., 2013., Lawrence, 2007., Spence i sur., 2008.).



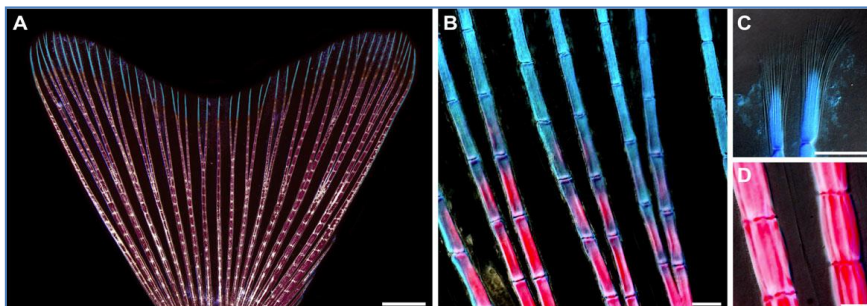
Slika 1. Jedinka vrste *Danio rerio*, ženskog spola. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.livescience.com>.

Zebrice konzumiraju širok spektar bentoskih i planktonskih rakova te crve i ličinke insekata (Spence i sur., 2007.). Razmnožavanje im ovisi o svjetlosnim ciklusima i cirkadijarnim ritmovima (Kolb i sur., 2018.), mrijeste se u malim skupinama i imaju prozirne embrije (Lawrence, 2007.).

2. REGENERACIJA REPNE PERAJE KOD ZEBRICE

2.1. STRUKTURA PERAJA

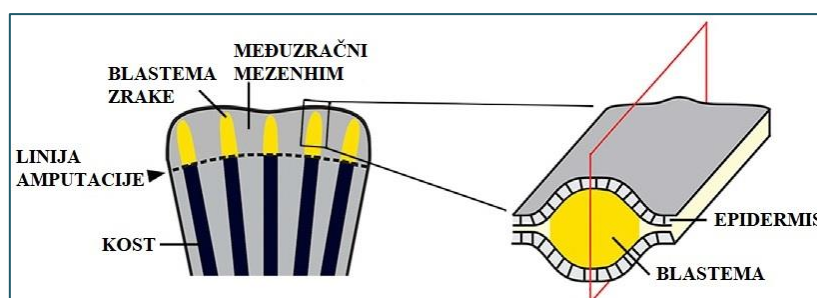
Zebrica ima dva seta parnih peraja, prsne i trbušne i tri neuparene peraje, leđnu, podrepnu i repnu. Struktura peraja se sastoji do egzoskeleta i endoskeleta. Egzoskelet je građen od koštanih zraka dermalnog porijekla koje su ligamentima povezane s endoskeletom. Endoskeleton je građen od skupa endohondralnih kostiju koje nisu vidljive jer se nalaze unutar tijela (Akimenko i sur., 2003.). Repna peraja zebrice se sastoji od 18 koštanih zraka koje se proksimalno sastoje od koštanog dijela, *lepidotrichia* kojeg stvaraju osteroblasti, a distalno od mekih filamenata, *actinotrichia* kojeg stvaraju ACF (*actinotrichia forming cells*) stanice (slika 2.). Krvne žile i živčana vlakna su skrivene unutar *lepidotrichia* (Akimenko i sur., 2013., Pfefferli i Jaźwińska, 2015., Durán i sur., 2011.). Ako je amputacijom repne peraje zahvaćen endoskelet smanjenja je mogućnost regeneracije peraje (Shao i sur., 2009.), dok ako je amputacijom repne peraje samo zahvaćen egzoskelet, peraja se lako regenerira, bez naznaka nastanka defekata čak i nakon višestrukih amputacija (Azevedo i sur., 2011.).



Slika 2. Kostur repne peraje zebrice (A-D). Pod (A) prikazana je cijela struktura repne peraje obojena s *Alcian* plavo i *Alizarin* crveno radi vizualizacije kostura. Pod (B) i (D) prikazane su *lepidotrichia* povezane mekim tkivom. Pod (C) prikazani su poput češlja snopovi *actinotrichia*. Preuzeto i prilagođeno iz Pfefferli i Jaźwińska, 2015.

2.2. STANIČNI I MOLEKULARNI MEHANIZMI REGENERACIJE REPNE PERAJE

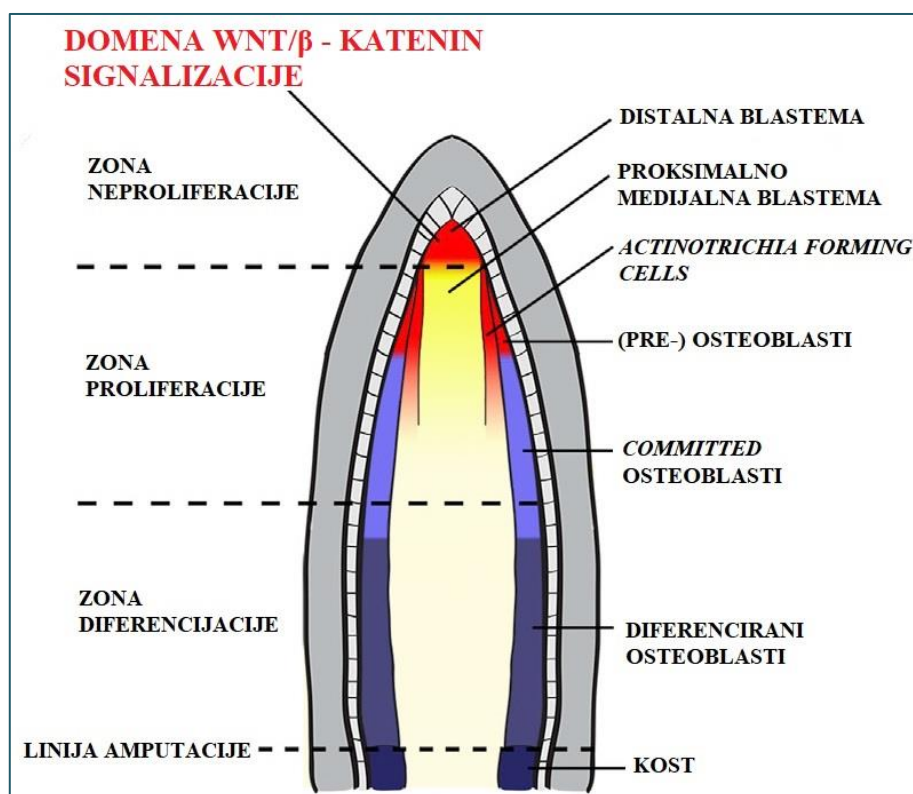
Regeneracija amputirane repne peraje ide u tri faze: upala i zarastanje rane, formiranje blasteme putem dediferencijacije i regenerativni rast (Watson i Kwon, 2015.). U prvoj fazi tanak sloj epidermalnih stanica migrira kako bi prekrrio ranu. Taj proces ne uključuje staničnu proliferaciju. Kontinuiranom staničnom migracijom nastaje višeslojni epidermis rane koji ju u potpunosti zatvori. Prilikom faze zarastanja rane u epidermalnim stanicama rane eksprimira se rani marker regeneracije repne peraje β -katenin i njegova ekspresija održava se i u ostalim fazama. U prvo fazi regeneracije β -katenin omogućava stanica-stanica interakciju i time olakšava staničnu migraciju (Poss i sur., 2003., Wehner i sur., 2014.). Završni proces vitalnog značaja u regeneraciji u prvoj fazi je signalizacija između bazalnog epidermalnog sloja rane i temeljnog blastema koji se sastoji od mezenhimalnih stanica (slika 3). Za to je važna ekspresija gena *lef1*. Gen *lef1* je nepohodan za epitelno-mezenhimalnu interakciju tijekom razvoja kralježnjaka, a u ovom završnom procesu smatra se da ima uloga u identifikaciji, proliferaciji i signalizaciji iz epidermalnih stanica bazalnog sloja (Poss i sur., 2003., Whitehead i sur., 2005., Wehner i sur., 2014.).



Slika 3. Prikaz važnih struktura repne peraje u regeneraciji. Preuzeto i prilagođeno od Wehner i sur., 2014.

Druga faza regeneracije repne peraje je formiranje blasteme. Blastema je visoko proliferirajuće tkivo koje se formira na mjestu rane i sadrži nediferencirane stanice (Pfefferli i Jaźwińska, 2015.). Nastanak blasteme je događaj koji razlikuje regeneraciju od embriogeneze. Blastema se formira ispod epidermisa rane, a iznad svake zrake peraje. Blastemu formiraju stanice slične fibroblastima koje se nalaze neposredno uz mjesto amputacije i migriraju distalno prema vrhu zrake peraje. Uz migraciju, u tim stanicama se stimulira i proliferacija (Poss i sur., 2003.). Za formiranje blasteme i proliferaciju potrebna je β -katenin – ovisna Wnt signalizacija. Apikalni dio blasteme djeluje kao uzvodni organizator regeneracije kroz signalni put Wnt koji regulira epidermalni uzorak, proliferaciju stanica blasteme i sazrijevanje osteoblasta, indirektno preko sekundarnih signala poput Fgf (*fibroblast growth factor*) i BMP (*bone morphogenetic protein*) (Wehner i sur., 2014.).

Treća faza regeneracije repne peraje je regenerativni rast koji se inicira nakon što je formirana blastema (Wehner i sur., 2014.). U ovoj fazi blastema je podijeljena na proksimalnu i distalnu blastemu. Distalna blastema, neproliferativna blastema, se sastoji od stanica sa sporim staničnim ciklusom i djeluje kao signalni centar uključen u održavanje visoko proliferirajućeg i dediferencirajućeg stanja proksimalne blasteme. U proksimalnoj blastemi se održava proliferacija progenitora osteoblasta pomoću *Notch* signala koji osim proliferacije, sprječava njihovu diferencijaciju u stanice skeletogene linije (Grotek i sur., 2013.). Za diferencijaciju osteoblasta potreban je pad razine *Notch* signala u proksimalnoj blastemi (Münch i sur., 2013.) i prisustvo Wnt/ β – katenin signala (Stewart i sur., 2014.). Wnt/ β – katenin signalizacija je ograničena na distalnu blastemu, progenitore osteoblasta i ACF stanice (Wehner i Weidinger, 2015.). Wnt/ β – katenin signal iz ACF stanica potiče diferencijaciju osteoblasta (Wehner i sur., 2014.). Prvi korak u diferencijaciji osteoblasta je putovanje pre – osteoblasta iz proksimalne blasteme u zonu diferencijacije (slika 4.) (Münch i sur., 2013.). Međutim, Wnt/ β – katenin ne potiče direktno diferencijaciju osteoblasta, već indirektno preko BMP signala. BMP signala je glavni signal za formiranje kosti. Geni *bmp2b* i *bmp4* jedni su od glavnih gena koji se ekspimiraju tijekom skeletogeneze i reguliraju (Watson i Kwon, 2015.).



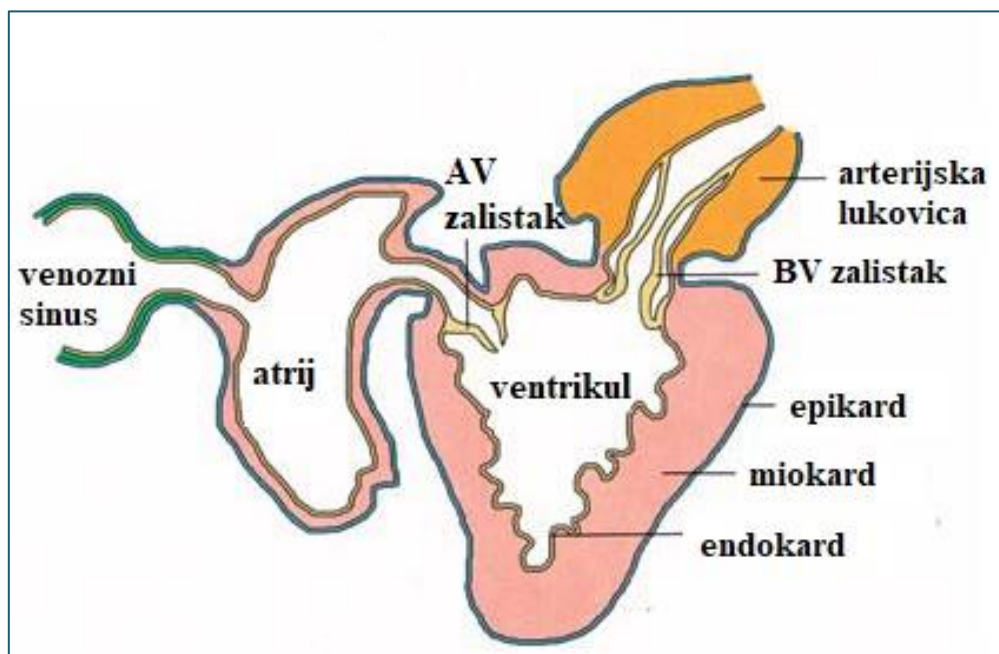
Slika 4. Shematski prikaz domena djelovanja Wnt/ β – katenin signalizacije.

Preuzeto i prilagođeno iz Wehner i sur., 2014.

3. REGENERACIJA SRCA ODRASLE ZEBRICE

3.1. STRUKTURA SRCA ODRASLE ZEBRICE

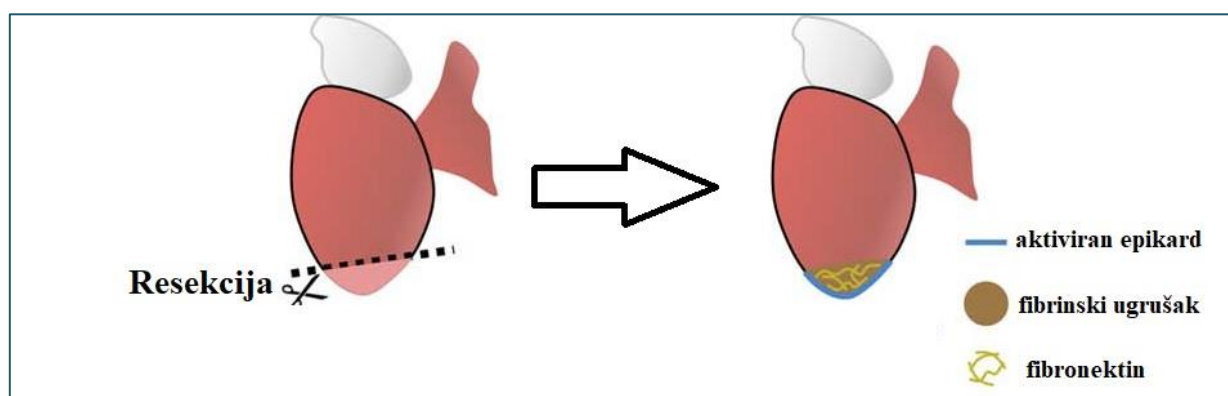
Kod odrasle zebrice srce je smješteno anteriorno u središnjoj tjelesnoj šupljini i ventralno od jednjaka. Sastoji se od jednog atrija i jednog ventrikula. Kroz srce prolazi samo venska krv koja se pročišćuje u škrigama. Deokisgenirana venska krv prvo ulazi u venozni sinus čiji zid je veoma tanak i uglavnom se sastoji od kolagenskog vezivnog tkiva. Potom prolazi kroz sinus atrijski zalistak u atrij. Zid atrija je tanak i mišićav te tanki trabekuli (mesnati grebeni) formiraju labavo mrežasto tijelo unutar šupljine atrija. Kontrakcijom atrija i dilatacijom ventrikula krv se tjera kroz atrio ventrikularni zalistak u ventrikul (slika 5.). Ventrikul ima puno deblji zid od atrija. Vanjski sloj zida je građen od kompaktnog mišića, dok je unutrašnji sloj spužvasti s brojnim trabekulima. Kontrakcijom ventrikula stvara se relativno visok tlak i krv se pumpa u atrijsku lukovicu i iz srca ventralnom aortom krv odlazi u tijelo (Menke i sur., 2011., Poon i Brand, 2013.). Mnoštvo stanica izgrađuje srce zebrice, neke od tih stanica su kardiomiociti koji imaju glavnu ulogu u provođenju kontrakcije srca, epikardijalne stanice koje formiraju tanki epikard oko srčanih komora, endokardijalne endotelne stanice koje formiraju endokard koji je u izravnom kontaktu s krvi i vaskularne endotelne stanice koje oblažu unutarnji sloj krvnih žila (Tahara i sur., 2016.).



Slika 5. Shematski prikaz anatomije srca odrasle zebrice. Preuzeto i prilagođeno iz Poon i Brand, 2013.

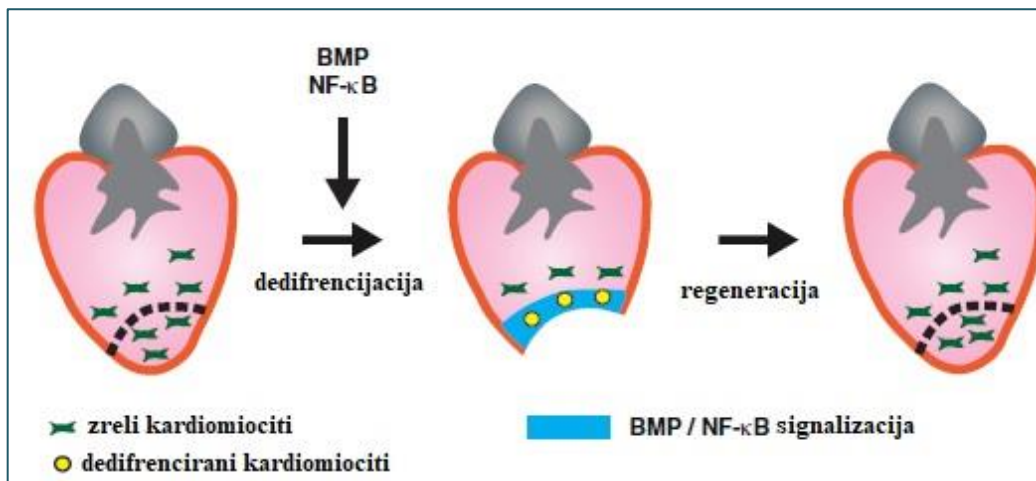
3.2. STANIČNI I SIGNALNI MEHANIZMI REGENERACIJE SRCA ODRASLE ZEBRICE

Zebrice mogu oporaviti svoje srce nakon višestrukih ozljeda pomoću regeneracije izgubljenih kardiomiocita i to bez stvaranja permanentnog ožiljka. Iako se i epikard i endokard mogu regenerirati, veće je zanimanje za regeneraciju kardiomiocita (Sehring i sur., 2016.). Uklanjanje do 20% ventrikule srca odrasle zebrice stimulira akutni regeneracijski odgovor koji se sastoji od nekoliko faza. Prvo se formira krvni ugrušak na mjestu ozljede da zatvori ventrikul i zaustavi krvarenje. Krvni ugrušak kasnije sazri u fibrinski ugrušak (slika 6.). Epikard se aktivira re-ekspresijom embrionskih markera i doprinosi novoj vaskularizaciji kardiomiocita koji idu u regeneraciju (Bournele i Beis, 2016.).



Slika 6. Resekcija vrha ventrikula korištenjem mikroškara. Preuzeto i prilagođeno iz Tahara i sur., 2016.

Kardiomiociti koji okružuju mjesto ozlijede ulaze u proces ograničene dedifrencijacije. U tome procesu kardiomiocitima se smanji i disorganizira struktura sarkomere, smanji gustoća mitohondrija i olabavi stanična adhezija (Tahara i sur., 2016.). Dedifrencijaciju kardiomiocita potiču BMP signali i miokardijalni NF – kappa B signali (slika 7.) (Sehring i sur., 2016.). BMP signalizacija se aktivira u rezidentnim kardiomiocitima na granici ozlijede. On potiče ponovni ulazak kardiomiocita u stanični ciklus (Wu i sur., 2016.). NF- κ B signalizacija aktivira se u kardiomiocitima koji okružuju mjesto ozlijede i reaktivira razvojne programe u kardiomiocitima induciranjem ekspresije kardiogenog transkripcijskog faktora *gata4* čija povećana ekspresija je znak dedifrencijacije. Osim toga, NF- κ B signali omogućuju interakciju između kardiomiocita i epikardijalnih stanica koja je potreban za koordiniranu regeneraciju (Karraa i sur., 2015., Sehring i sur., 2016.). Nakon diferencijacije dolazi do diobe postojećih kardiomiocita u mjestu ozlijede i nastaju novi kardiomiociti. Proliferacija postojećih kardiomiocita je usmjerena RA (retinočna kiselina) signalima kojeg luče epikard i endokard (Bournele i Beis, 2016.). Uz RA signale za proliferaciju kardiomiocita su potrebni i *Notch* signali. *Notch* signali su nepohodni za aktivaciju epikarda i endokarda. Potiču epikard i endokard na lučenje parakrinih signala koji potiču diobu kardiomiocita (Zhao i sur., 2014.).

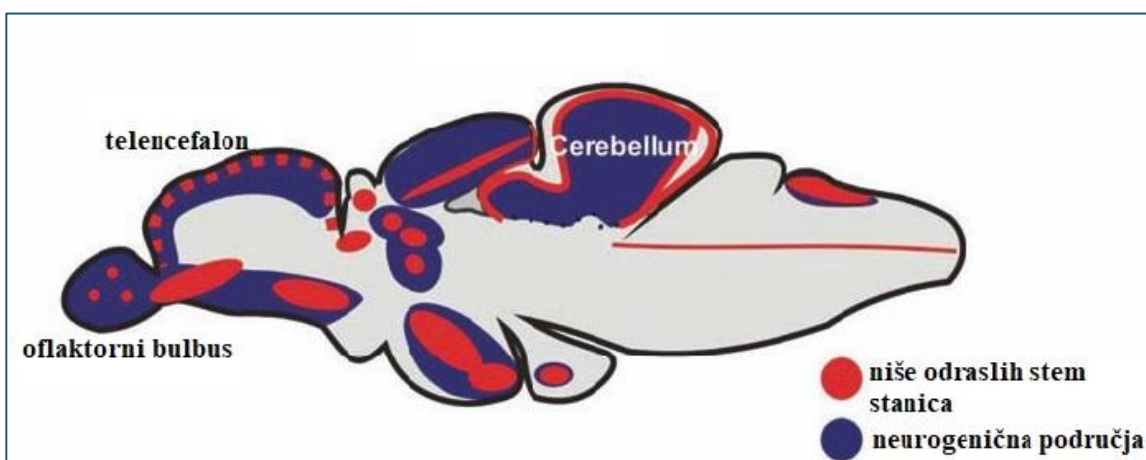


Slika 7. Kardiomiociti locirani na granici rane u ozlijeđenom srcu dediferenciraju se i ponovno ulaze u stanični ciklus pod utjecajem BMP i NF-κB signala. Izgubljeni miokard je zamijenjen rediferenciranim kardiomiocitima. Preuzeto i prilagođeno iz Sehring i sur., 2016.

4. REGENERACIJA MOZGA I LEĐNE MOŽDINE KOD ODRASLE ZEBRICE

4.1. STRUKTURA MOZGA I LEĐNE MOŽDINE ODRASLE ZEBRICE

Mozak zebrice je podijeljen u pet regija: telencefalom, diencefalom, mezencefalom, metencefalom i mijelencefalom. Telencefalom je odgovaran za njuh, memoriju, reproduktivno ponašanje, prehrambeno ponašanje i vizualizaciju boja. Olfaktorni organ je povezan direktno s telencefalomom preko olfaktornog bulbusa. Diencefalom je podijeljen na tri komponente: epitalamus koji se sastoji od epifize i *saccus dorsalis*. Epifiza je neuroendokrini struktura osjetljiva na svjetlo, ima ulogu u regulaciji reprodukcije, rastu i sezonskim migracijama. Mezencefalom je relativno velik i anatomski podijeljen na optički tektum i tegmentum. Metencefalom ili cerebelum ima dvije komponente: vestibulolateralni režanj i *corpus cerebelli*. Cerebelum je važan za ravnotežu i koordinaciju propriocepcije (slika 8.) (Roberts i Ellis, 2001., Menke i sur., 2011.).

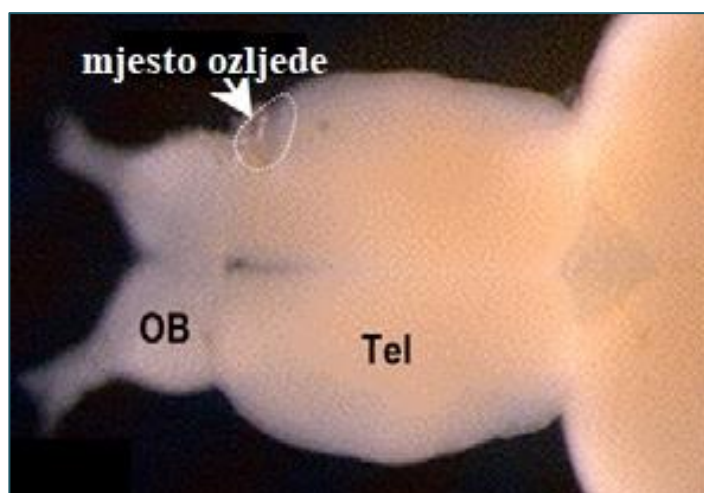


Slika 8. Shematski prikaz dijelova mozga zebrice. Preuzeto i prilagođeno iz Kizil i sur., 2011.

Leđna moždina kod zebrice se proteže kroz cijelo tijelo i završava endokrinom strukturom urofizom. Siva i bijela tvar su vidljivo razdvojeni u leđnoj moždini. Iz dorzalnog i ventralnog korijena izlaze brojni veliki motoneuroni. Kod zebrice nisu razdvojeni motorički i senzorički neuroni (Roberts i Ellis, 2001.). Mozak i leđna moždina izgrađeni su od neurona. Uz neurone bitne stanice živčanog sustava su Schwannove stanice koje sudjeluju u mijelinizaciji perifernih živaca, oligodendrociti koji sudjeluju u mijelinizaciji središnjeg živčanog sustava, radijalne glija stanice koje su neuroepitelni progenitori središnjeg živčanog sustava i mikroglija stanice koje su visoko specijalizirani fagociti čija uloga je zaštita središnjeg živčanog sustava (Lyons i Talbot, 2015.).

4.2. STANIČNI I SIGNALNI MEHANIZMI REGENEREACIJE MOZGA I LEĐNE MOŽDINE KOD ODRASLE ZEBRICE

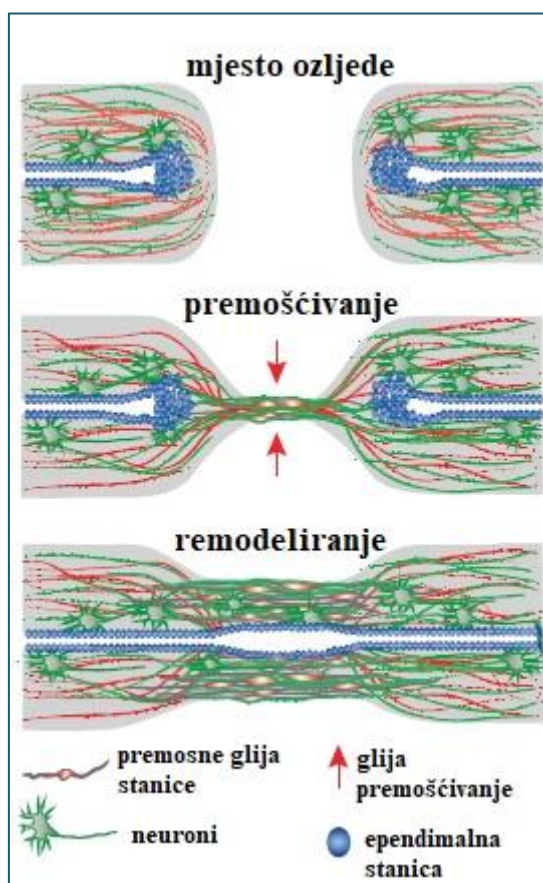
Zebrica nakon traumatične ozljede mozga u području telecefalona (slika 9.) može povratiti strukturu tkiva i zamijeniti izgubljene neurone nakon neurogenog djelovanja ventrikularno smještenih radijalnih glija stanica. Prvi odgovor na ozljedu mozga kod zebrice je aktivacija imunoloških stanica. Leukociti iz krvotoka i mikroglija stanice prisutne u tkivu mozga nakupljaju u oštećenom tkivu i luče interleukin 8 i faktore nekroze tumora – α kako bi modulirali okoliš. Dodatna uloga ovog imunološkog odgovora je pojačati proliferaciju radijalnih glija progenitorskih stanica lučenjem leukotriena C4 (Kyritsis i sur., 2012.). Uz leukotriene C4, za proliferaciju progenitorskih stanica potrebna je i Fgf signalizacija (Kizil i sur., 2011.). Proliferacija se stimulira u telecefalon ventralnoj zoni i u područjima oko ozljede (Kishimoto i sur., 2011.). Proliferacijom nastaje neuroblast koji migrira na mjesto ozljede i tamo se diferencira u zrele neurone (Kroehne i sur., 2011.).



Slika 9. Prikaz mjesta ozljede mozga zebrice. Tel označava telencefalon, OB označava oflaktorni bulbus.

Preuzeto i prilagođeno iz Kishimoto i sur., 2011.

Ozljeda leđne moždine kod zebrice se može spontano popraviti. Prvi korak regeneracije leđne moždine je upala. Ne-neuralne stanice, odnosno fibroblast slične stanice invadiraju mjesto lezije i formiraju kompleksni ekstracelularni matriks (ECM) koji je esencijalan za regeneraciju aksona. Formiranje ECM-a kontroliraju Wnt/ β – katenin signali uglavnom aktivni u fibroblast sličnim stanicama (Wehner i sur., 2017.). Nakon inicijalne upale, dolazi do proliferacije endodimalnih stanica. To su glija stanice koje oblažu centralni kanal leđne moždine i kao odgovor na ozljedu luče neuralni stem stanični marker *Nestin* (Guo i sur., 2011.). Uz proliferaciju endodimalnih stanica, dolazi i do proliferacije okolnih glija stanica. Njihovu proliferaciju potiče CTGF, multifunkcionalan protein koji utječe na aktivnost brojnih signalnih puteva. CTGF stvaraju ventralne endodimalne stanice (Mokalled i sur., 2016.). Novonastale glija stanice migriraju na mjesto lezije i tamo se diferenciraju u bipolaran oblik. Diferencijacija glija stanica je regulirana Fgf signalima koji je aktivan u samim glija stanicama na mjestu lezije. Diferencirane glija stanice su veoma izdužene i formiraju glija most (slika 10.). Zadnja faza regeneracije leđne moždine je remodeliranje stanica na mjestu lezije što rezultira spajanjem centralnog kanala i aksonogenezom preko lezije (Goldshmit i sur., 2012.).



Slika 10. Shematski prikaz procesa regeneracije leđne moždine kod zebrice. Preuzeto i prilagođeno iz Mokalled i sur., 2016.

5. PRIMJENA NA ČOVJEKA

Znanstvenike već dugo zanima zašto kapacitet regeneracije u organima poput srca, mozga i udova je smanjen kod evolucijski viških kralježnjaka. Iako su neka istraživanja poput otkrića somatskih matičnih stanica sugerira da tkivo odrasle osobe možda ima latentan, odnosno skriveni kapacitet za regeneraciju ili nuklearno kloniranje gdje se transplantira jezgra somatske stanice u oocitu i rekonstruirati cijeli organizam, pokazuje da jezgra somatske stanice se može "pogurati" natrag u totipotetno stanje, najavila napredak, ultimativni cilj regeneracije cijelog tkiva ili organa je daleko. Jedan od argumenata zašto je to tako je drugačiji broj i stanja matičnih/progenitorskih stanica kod sisavaca i zebrice. Također je predloženo da zebrice imaju aktivne matične/progenitorske stanice u nekoliko organa i zato kroz cijeli životni vijek rastu. Gubitak konstantnog rasta kod sisavaca je možda uzrokovan evolucijskom prednošću smanjivanjem rizika od tumora i zato postoji stroga kontrola proliferacije stanica, što istovremeno znači smanjena regenerativna mogućnost. Osim toga, zebrice ne stvaraju ožiljke. Ožiljci kod sisavaca služe za zatvaranje rana i sprječavanje nastanka daljnjeg oštećenja. Međutim, ožiljak stvara nepovoljan okoliš za regeneraciju organa zbog viška granuliranog tkiva i neorganiziranih kolagenskih naslaga u tkiva ožiljka (Tanaka, 2003., Shi i sur., 2015.). Neki signalni putevi koje se javljaju u regeneraciji peraje kod zebrice, javljaju se i kod sisavca za razvoj udova. Jedan primjer toga je Shh (*sonic hedgehog*) signal koji sudjeluje u regulaciji diferencijacije koštanih stanica. Kod zebrice, Shh posreduje formiranje kosti preko Bmp2 čija egzogena ekspresija rezultira ektopičnim razvojem kosti. Slično tomu, tijekom razvoja udova miša, mezodermalno izvedene stanice stvaraju malu izbočinu koja je pokrivena epidermalnim stanicama (pupoljak). Distalni dio pupoljka se zove apikalni ekotodermalni greben, a posterioran dio se zove zona polarizirajuće aktivnosti. U toj zoni je aktivna Shh signalizacija koja je nepohodna za anteriorno – posteriorno formiranje uzoraka. Ona omogućuje te efekta indirektno preko Bmp2. Ovaj primjer pokazuje potencijal da razumijevanjem regeneracije peraje kod zebrice može unaprijediti naše razumijevanje osteogeneze i ubrzati otkriće terapije regeneracije kosti (Watson i Kwon, 2015.). Kod regeneracije leđne moždine zebrice, Fgf signalizacija potiče diferencijaciju radijalnih glija stanica u bipolarni oblik i time omogućuje premošćivanje nastale lezije. Stoga je postavljeno pitanje, može li Fgf signalizacija isti događaj potaknuti u astrocitima primata *in vitro* (Goldshmit i sur., 2012.)? Astrociti su glija stanice koje su potpora živčanom sustavu i slične su radijalnim glija stanicama zebrice (Lyons i Talobot, 2015.).

Dobiveni rezultati u istraživanju Goldshmit i sur., 2012. pokazali su da Fgf signali posreduju proliferaciji i migraciji asterocita i najvažnije uzrokuju morfološke promjene koje generiraju bipolarnu morfologiju stanice koja podsjeća na bipolarni oblik radijalne glija stanice. Ovime se pokazalo da postoji mogućnost da se može potaknuti regeneracija aksona kod sisavaca nakon ozljede leđne moždine (Goldshmit i sur., 2012.). Regeneracija srca kod zebrica je moguća zbog prisustva brojnih kardiomiocita koji su mononuklearni (Kikuchi, 2014.). U svome radu, Bersell i sur., 2009., su pokazali da mala populacija mononuklearnih kardiomiocita u srcu odraslog miša može proliferirati u prisustvu faktora rasta i time su poduprijeli tezu da je mononuklearnost preduvjet za proliferaciju kardiomiocita. Ovakav zaključak može pomoći u otkrivanju kako reaktivirati endogeni regenerativni kapacitet u ljudskom srcu (Kikuchi, 2014.).

6. ZAKLJUČAK

Regenerativna medicina će nam jednog dana omogućiti da zamijenimo, promijenimo ili regeneriramo ljudske stanice, tkiva ili organe. Proučavanjem procesa regeneracije kod modela organizama poput zebrice omogućeno nam je da budemo korak bliže tome cilju. Zebrica kao model za regeneraciju ima prednost nad ostalim modelima zbog svog lakog uzgoja, slične građe organa i sličnih tipova stanica kao sisavci. Razumijevanje staničnih i signalnih putova koji sudjeluju u regeneraciji organa zebrice je od iznimne važnosti za razvoj terapijskih metoda koji će omogućiti popravak oštećenog organa kod ljudi.

7. LITERATURA

- Akimenko, M.A., Marí-Beffa, M., Becerra, J., Géraudie, J. (2003) Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics* 226:190-201.
- Azevedo, A.S., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G., Saude, L. (2011) The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS One* 6:e22820.
- Baddour, J.A., Konstantinos, S., Panagiotis A.T. (2012) Organ Repair and Regeneration: An Overview. *Birth Defects Research* 96:1-29.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., Kühn, B. (2009) Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138, 257–270.
- Bournele, D., Beis, D. (2016) Zebrafish models of cardiovascular disease. *Heart Failure Reviews* 21:803-813.
- Durán, I., Marí-Beffa, M., Santamaría, J.A., Becerra, J., Santos-Ruiz, L. (2011) Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Development Biology* 354:160-172.
- Gilbert, S.F. (2010) Cell-Cell Communication in Development. U: *Development Biology*, 9th Edition. Ed. S.F. Gilbert, Sinauer Associates, Sunderland, pp. 85.
- Gilbert, S.F. (2010) Regeneration. U: *Development Biology*, 9th Edition. Ed. S.F. Gilbert, Sinauer Associates, Sunderland, pp. 560-570.
- Goessling, W., North, T.E. (2014) Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. *Disease Model Mechanisms* 7:769-776.
- Goldshmit, Y., Sztal, T.E., Jusuf, P.R., Hall, T.E., Nguyen-Chi, M., Currie, P.D. (2012) Fgf-Dependent Glial Cell Bridges Facilitate Spinal Cord Regeneration in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience* 32:7477-7492.
- Grotek, B., Wehner, D., Weidinger, G. (2013) Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development* 140:1412-1423.
- Guo, Y., Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R.P., Hao, A., Schachner, M. (2011) Transcription Factor Sox11b is Involved in Spinal Cord Regeneration in Adult Zebrafish. *Neuroscience* 172:329-341.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005) Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences* 86:6-19.
- Hodgkinson, C.P., Bareja, A., Gomez, J.A., Dzau, V.J. (2016) Emerging Concepts in Medicine and Biology. *Circulation Research* 118:95-107.

- Johnston, A.P.W., Scott, Y.A., Carr, M.J., Mahmud, N., Storer, M.A., Krause, M.P., Jones, K., Paul, S., Kaplan, D.R., Miller, F.D. (2016) Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell* 19:433-448.
- Karaa, R., Knechtb, A.K., Kikuchib, K., Poss, K.D. (2015) Myocardial NF- κ B activation is essential for zebrafish heart regeneration. *PNAS* 43: 13255–13260.
- King, R.S., Newmark, P.A. (2012) The cell biology of regeneration. *Journal of Cell Biology* 196:553-562.
- Kinth, P., Mahesh, G., Panwar, Y. (2013) Mapping of Zebrafish Research: A Global Outlook. *Zebrafish* 4:510-517.
- Kikuchi, K. (2014) Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem Cell Research* 13:542–555.
- Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K. (2012) Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease Models & Mechanisms* 5:200-209.
- Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., Brand, M. (2011) Adult Neurogenesis and Brain Regeneration in Zebrafish. *Development Neurobiology* 72:429-461.
- Kolb, A., Hildebrandt, F., Lawrence, C. (2018) Effects of Diet and Social Housing on Reproductive Success in Adult Zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 0:1-9.
- Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., Brand, M. (2011) Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* 138:4831-4841.
- Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Itzsche, A., Brand, M. (2012) Acute Inflammation Initiates the Regenerative Response in the Adult Zebrafish Brain. *Science* 338:1353-1356.
- Lawrence, C. (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269:1-20.
- Lyons, D.A., Talbot, W.S. (2015) Glial Cell Development and Function in Zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7:a020586
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A. (2016) Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39:759-775.
- Mokalled, M.H., Patra, C., Dickson, A.L., Endo, T., Stainier, D.Y.R., Poss, K.D. (2016) Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science* 354:630-634.

- Münch, J., González – Rajal, A., de la Pompa, J.L. (2013) Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult zebrafish fin regeneration. *Development* 140:1402-1411.
- Nüsslein-Volhard, C., Gilmour, D.T., Dahm, R. (2002) Introduction: zebrafish as a system to study development and organogenesis. U: *Zebrafish*. Ed. C. Nüsslein-Volhard i R. Dahm, Oxford Press, New York, pp. 4.
- Pfefferli, C., Jazwińska, A. (2015) The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration* 2:72-83.
- Poon, K.L., Brand, T. (2013) The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. *Global Cardiology Science & Practice* 4:10-28.
- Poss, K.D., Keating, M.T., Nechiporuk, A. (2003) Tales of regeneration in Zebrafish. *Development Dynamics* 226:202-210.
- Roberts, R.J., Ellis, A.E. (2001) The anatomy and physiology of teleosts. U: *Fish Pathology*, 3rd Edition. Ed. R. J. Roberts, W. B. Saunders, Philadelphia, SAD, pp. 12-54.
- Rubinstein, A.L. (2003) Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 6:218-223.
- Sehring, I.M., Jahn, C., Weidinger, G. (2016) Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration? *Current Opinion in Genetics & Development* 40:48–56.
- Shao, J., Qian, X., Zhang, C., Xu, Z. (2009) Fin regeneration from tail segment with musculature, endoskeleton, and scales. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Development Evolution* 312:762-769.
- Shi, W., Fang, Z., Li, L., Luo, L. (2015) Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Science China Life Sciences* 58:343-351.
- Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F., Smith, C. (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 71:304-309.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83:13-34.
- Sunderland, M.E. (2010) Regeneration: Thomas Hunt Morgan's Window into Development. *Journal of the History of Biology* 43:325-361.
- Stewart, S., Gomez, A.W., Armstrong, B.E., Henner, A., Stankunas, K. (2014) Sequential and Opposing Activities of Wnt and BMP Coordinate Zebrafish Bone Regeneration. *Cell Reports* 6:482-498.

- Tanaka, E.M. (2003) Regeneration: If They Can Do It, Why Can't We? *Cell* 113:559-562.
- Tahara, N., Brush, M., Kawakami, Y. (2016) Cell Migration During Heart Regeneration in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 245:774–787.
- Watson, C.J., Kwon, R.Y. (2015) Osteogenic programs during zebrafish fin regeneration. *BoneKEY Reports* 4:745.
- Wehner, D., Cizelsky, W., Vasudevaro, M.D., Özhan, G., Haase, C., Kagermeier-Schenk, B., Röder, A., Dorsky, R.I., Moro, E., Argenton, F., Kühl, M., Weidinger, G. (2014) Wnt/ β -Catenin Signaling Defines Organizing Centers that Orchestrate Growth and Differentiation of the Regenerating Zebrafish Caudal Fin. *Cell Reports* 6:467-481.
- Wehner, D., Tsarouchas, T.M., Michael, A., Haase, C., Weidinger, G., Reimer, M.M, Becker, T., Becker, C.G. (2017) Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nature Communications* 8:126.
- Wehner, D, Weidinger, G. (2015) Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends in Genetics* 31:336-343.
- Whitehead, G.G., Shinji, M., Ching – Ling, L., Keating, M.T. (2005) *fgf20* Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science* 310:1957-1959.
- Wu, C-C., Kruse, F., Vasudevarao, M.D., Junker, J.P., Zebrowski, D.C., Fischer, K., Noël, E.S., Grün, D., Berezikov, E., Engel, F.B., van Oudenaarden, A., Weidinger, G., Bakkers, J. (2016) Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Development Cell* 36:36-49.
- Zhao, L., Borikova, A.L., Ben-Yair, R., Guner-Ataman, B., MacRae, C.A., Lee, R.T., Burns, C.G., Burns, C.E. (2014) Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *PNAS* 4:1403-1408.

URL: <https://www.livescience.com>

8. SAŽETAK

Regeneracija je proces u kojem se nadomještaju strukture koje su oštećene ili izgubljene, reaktivacijom razvoja u postembrionalnom dijelu života. Ograničeni regenerativni kapacitet kod ljudi potaknuo je veliku želju za razumijevanjem mehanizama regeneracije korištenjem model organizama. Jedan od najvažnijih model za regeneraciju je zebrića (*Danio rerio*). Ona je mala tropska riba podrijetlom iz Azije, cijenjena kao model zbog svog lakog uzgoja i sličnosti organa sa sisavcima. Regeneracija organa zebriće uvijek započinje upalom. U regeneraciji repne peraje, srca, mozga i leđne moždine sudjeluju brojne stanice poput kardiomiocita, glija stanica, epidermalnih stanica i signalni putevi poput *Notch* signala, BMP signala, Fgf signala. Potpunim razumijevanjem staničnih i molekularnih mehanizama regeneracije organa zebriće moguće je otkriće terapijske metode za popravka oštećenih organa kod ljudi.

9. SUMMARY

Regeneration is process in which structures that are damaged or lost are replaced by reactivating development at postembryonic part of life. Limited regenerative capacity in humans has stimulated a great desire to understand regeneration mechanisms by using model organisms. One of the most important regeneration model is zebrafish (*Danio rerio*). It is a small tropical fish originating from Asia, valued as a model for its easy breeding and similar structure of organs with mammals. Regeneration of zebrafish organs always starts with inflammation. Numerous cells, such as cardiomyocytes, glia cells, epidermal cells are involved in regeneration of caudal fin, heart, brain and spinal cord. Also in regeneration of this organs are involved signal pathways such as Notch signal, BMP signal, Fgf signal. Complete understanding of cellular and molecular mechanisms involved in zebrafish organs regeneration allows discover of therapeutic methods for repairing damaged organs in humans.