

# Regeneracija zebrice (Danio rerio, F. Hamilton, 1822)

---

Miljković, Frane

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:568389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

REGENERACIJA ZEBRICE (*Danio rerio*, F.  
HAMILTON, 1822)

REGENERATION OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*,  
F. HAMILTON, 1822)

SEMINARSKI RAD

Frane Miljković

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

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

Zagreb, 2016

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. NAČINI OZLJEDE ORGANA KOD ZEBRICE .....	2
3. REGENERACIJA ORGANA U ZEBRICE .....	3
3.1 REGENERACIJA PERAJE.....	4
3.2 REGENERACIJA SRCA.....	6
3.3 REGENERACIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA .....	8
3.4 REGENERACIJA JETRE.....	10
4. BUDUĆNOST ISTRAŽIVANJA.....	12
4.1 REDUCIRANI REGENERATIVNI POTENCIJAL U VIŠIH KRALJEŽNJAKA .....	12
4.2 RAZLIČITA REGULACIJA RAZVOJA ORGANIZMA I REGENERACIJE.....	13
4.3 ULOGA UPALE I MIJELOIDNIH STANICA (MAKROFAGA) U REGENERACIJI .....	14
5. ZAKLJUČCI I PERSPEKTIVE .....	14
6. LITERATURA .....	16
7. SAŽETAK .....	17
8. SUMMARY.....	17

# 1. UVOD

Regeneracija je obnova mase, strukture i funkcije organa te je kao proces neophodan za život životinja pa tako i za ljudsko zdravlje. Nažalost, sposobnost regeneracije očito opada evolucijskim napretkom. Hidre, plošnjaci i niži kralježnjaci, poput repaša i pravih koštunjača, imaju veliki regenerativni kapacitet za gotovo sve organe. Sisavci, uključujući i ljude, imaju varijabilni regenerativni potencijal ovisno o kojem se organu radi. Organi se mogu po njihovom regenerativnom potencijalu podijeliti u tri tipa: oni s visokim i konstantnim regenerativnim kapacitetom, npr. koža i krv, oni koji se mogu dobro regenerirati nakon ozljede, npr. jetra, skeletni mišići i kosti, i oni koji imaju mali regenerativni potencijal, npr. živčano tkivo, srce i udovi. U slučaju ozljede ovih organa s najslabijom regenerativnom mogućnošću kod ljudi može doći do ozbiljnih posljedica koje vode do teških socijalno – ekonomskih problema. Zato je razvoj metoda kojim bi se poboljšala mogućnost regeneracije takvih organa oduvijek interesantan znanstvenicima i ulaže se veliki trud i napor u znanstvena istraživanja i kliničke testove. Zasadu postoje dva različita pristupa tom problemu. Jedan je istraživanje matičnih stanica koje bi se mogle iskoristiti kao terapijske stanice. Iako su već provedena klinička istraživanja još se raspravlja i istražuje terapijski efekt i mehanizam takvog liječenja. Druga strategija se temelji na istraživanju pogodnih životinjskih modela za regeneraciju te razumijevanju staničnih i molekularnih mehanizama regeneracije kako bi se to znanje primijenilo na ljudskom organizmu u nastojanju razvoja novih načina liječenja. Ovaj pristup bi mogao potaknuti endogenu regenerativnu sposobnost organa čime bi se smanjila ograničenost sposobnosti regeneracije prisutne u sisavaca (Shi i sur. 2015).

Zebrica je odnedavno postala vrlo popularan model u prije spomenutim istraživanjima, ponajprije zbog svoje jače regenerativne sposobnosti u odnosu na miševе i ljude. Zebrice su slatkovodne ribe koje žive u slivovima rijeka porijeklom iz istočne Indije. Često se drže i kao kućni ljubimci a u laboratorij ih je uveo 1970-ih godina George Streisinger, genetičar koji je prvi klonirao kralježnjaka, upravo zebricu (Gamberling i sur. 2013). Nakon još nekoliko značajnih genetičkih istraživanja i boljeg upoznavanja njezinog genoma, zebrica je postala izrazito popularan životinjski model. Nekoliko karakteristika čine ju odličnim modelnim organizmom: velika reproduktivna moć i veliki broj potomaka, brzi izvanmaterični razvoj koji je povoljan za laka opažanja i manipulacije, optička transparentnost koja omogućuje primjenu metoda za *in vivo* praćenje promjena u vremenu, imaju mali genom i sklone su mutagenezi. Veliki broj organa zebrice, pogotovo onih koji se teško regeneriraju u sisavaca npr. središnji

živčani sustav, srce i udovi, mogu se uspješno regenerirati (Shi i sur. 2015). Zbog svih navedenih razloga zebrica je idealni modelni organizam za proučavanje staničnih i molekularnih događaja organogeneze i regeneracije. U zadnje vrijeme zebrice se koriste kao modelni organizmi i u drugim aspektima biologije npr. ponašanju životinja, istraživanju matičnih stanica i raznih bolesti (Gamberling i sur. 2013).

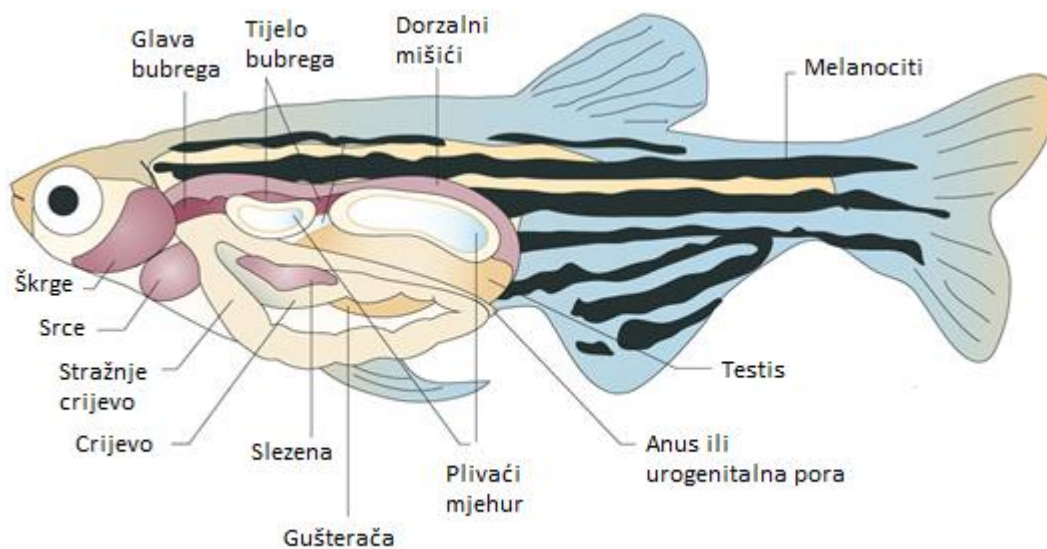
## 2. NAČINI OZLJEDE ORGANA U ZEBRICE

Različite se metode koriste za ozljeđivanje ili uklanjanje organa zebrica u svrhu poticanja regeneracije, od operacijskih zahvata uklanjanja dijela organa do ciljanog ubijanja određene vrste stanica. Svaka metoda ima svoje prednosti i mane. Operativni zahvati se uglavnom vrše na organima koji su lako dostupni npr. peraja, jetra i mozak. Takvi zahvati su poprilično jednostavni i lako izvodljivi, međutim nisu precizni i ponovljivi. Različit položaj i ozbiljnost ozljede obično daju različite rezultate npr. preveliko oštećenje reznjeva jetre kod odraslih jedinki rezultira brzom smrću. Kod fizičkog ozljeđivanja se mogu primjeniti i laseri ponajprije ako se radi o mrežnici ili odnedavno čak i o srčanom mišiću. Kemijsko ozljeđivanje se temelji na toksičnosti nekih kemijskih spojeva za točno određene organe. Ta metoda se najčešće koristi za jetru i mozak jer je poznato više toksičnih spojeva za te organe. Nedostatak tih spojeva su neželjene nuspojave koje je nemoguće zaobići čak i kada se koristi prava doza. U posljednje vrijeme kombinacija genetički modificiranih organizama i kemijskih spojeva postaje najraširenija metoda. Osnovno načelo takvih pristupa je proizvodnja transgeničnih organizama koji imaju tkivno specifičnu ekspresiju određenog proteina koji u permisivnim uvjetima dozvoljava ciljano uništavanje stanica koje ga proizvode. Nekoliko vrsta ovakvih proteina se razvilo u te svrhe npr. toksin Diphtheria A te bakterijski toksini Kid i Killer Red. Razvio se novi pristup kako bi se toksični faktori inducirali samo u trenutku u kojem mi to želimo. Koristi se bakterijski enzim nitroreduktaza (*eng. nitroreductase*, NTR) koji katalizira reakciju pretvorbe antibiotika metronidazola (Mtz) u citotoksični produkt. Dakle ako se NTR kazeta stavi pod kontrolu tkivno specifičnog promotora i uspješno se proizvede transgenična linija, ciljana stanična smrt je moguća u bilo kojem trenutku jednostavno dodatkom Mtz-a. Kako NTR u različitim staničnim tipovima ima različitu efikasnost potrebno je dobro prilagoditi i testirati metodu prije pokusa. Iako svaka od ovih metoda ima svojih nedostataka

različite kombinacije bi mogle donijeti značajan napredak u istraživanju regeneracije koristeći zebricu kao modelni organizam (Shi i sur. 2015).

### 3. REGENERACIJA ORGANA U ZEBRICE

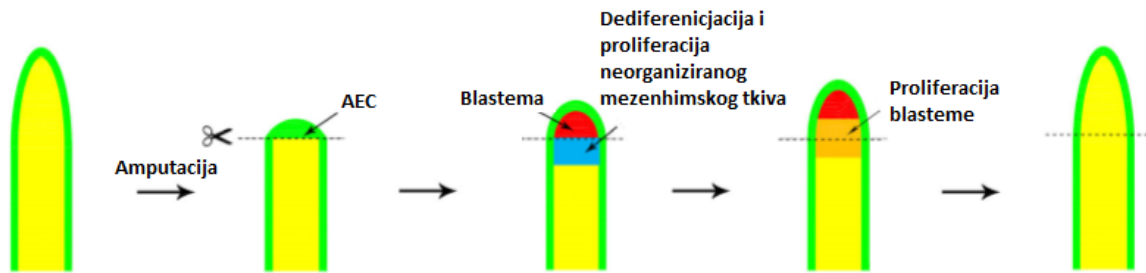
Zebrica ima sposobnost regeneracije velikog broja organa. Većinu organa zebrice možemo naći i u sisavcima npr. mozak, srce, jetra, slezena, gušterača, mokraćni mjehur, crijeva, bubrezi, sjemenici i jajnici (Slika 1) (White i sur. 2013). Istraživanja su provedena na gotovo svim važnim organima poput peraja, srca, središnjeg živčanog sustava, jetre, gušterače, bubrega i kostiju (Shi i sur. 2015.). Pomoću ovih istraživanja bitno se produbilo razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama regeneracije organa, a neki od njih biti će razjašnjeni u sljedećim poglavljima.



**Slika 1.** Shema anatomije odrasle zebrice (White i sur. 2013).

### 3.1 REGENERACIJA PERAJE

Peraje zebrice su kompleksni privjesci koji se brzo i pouzdano mogu regenerirati nakon amputacije. Glavne regenerativne jedinice su brojne žbice dermalnih kostiju koje su obložene osteoblastima. Koštane žbice su cilindrične i šuplje s dvije konkavne polužbice koje oblažu unutrašnje mezenhimalno tkivo koje je inervirano, vaskularizirano i primarno se sastoji od fibroblasta. Regeneracija peraja, posebno repne peraje je posebno proučavana zbog svoje jednostavne građe i mogućnosti jednostavne manipulacije i brze regeneracije. Istraživanja su pokazala da je pri amputaciji repne peraje kod odrasle jedinke zebrice potrebno otprilike dva do tri tjedna da se ona u potpunosti regenerira, a u ličinke samo tri dana (Poss i sur. 2003). Cijeli proces regeneracije se može podijeliti u četiri faze. Prva faza je zacijeljivanje rane, ona se inicira odmah nakon ozljede. Najvažnija struktura, apikalna epidermalna kapa (*eng. apical epidermal cap*, AEC) se brzo formira migracijom neproliferativnih lateralnih epitelnih stanica preko rane. AEC je nužna struktura za formiranje blasteme, osnovne stanične organizacije za poticanje i početak regeneracije peraje. Druga faza, formacija blasteme, se odvija tako što se neorganizirane mezenhimalne stanice ispod AEC dediferenciraju i proliferiraju. Signali iz epiderme u rani su značajni za ovaj proces. Nastanak blasteme je glavni pokazatelj regeneracije jer takvu strukturu ne nalazimo u fiziološkim uvjetima. Blastema je akumulirana masa pluripotentnih progenitorskih stanica koje mogu stvoriti različite stanične linije u tkivu koje se regenerira. Blastema se može dalje podijeliti na proksimalnu i distalnu blastemu na temelju brzine proliferacije i ekspresije gena *msxb*, ključnog markera blasteme. Nakon nastanka blasteme počinje treća faza - regenerativno izrastanje, koje je karakterizirano ekstenzivnom proliferacijom stanica proksimalne blasteme. Novonastale stanice se brzo rasporede u prikladne lokacije kako bi obnovile tkiva pomoću novih mezenhimalnih stanica i fibroblasta. Kada novonastala peraja naraste do izvorne dužine počinje posljednja faza - terminacija regeneracije (Slika 2). Signali i mehanizmi koji pokreću ovu fazu su još uvijek nepoznati (Shi i sur. 2015).



**Slika 2.** Shema procesa regeneracije amputirane peraje (Shi i sur. 2015).

Novija istraživanja pokazuju da su izvor inicijacije regeneracije peraje obližnji osteoblasti. Smatra se da bi se i druge koštane strukture, uključujući i lubanju, mogle regenerirati dediferencijacijom osteoblasta. Ova istraživanja nam pomažu u razumijevanju procesa obnove kostiju nakon ozljede što bi svakako moglo biti korisno znanje i kod liječenja ljudi. Većina molekularnih mehanizama ovih staničnih događaja je razjašnjeno i kao glavni signalni put izdvojio se otprije dobro poznati Wnt signalni put. Taj put je vrlo bitan i tokom ranog razvoja organizma, organogeneze i tumorigeneze. Značaj Wnt puta kod regeneracije peraje u zebrice je otkriven pomoću proučavanja njegove mete, koja se eksprimira snažno u epitelu rane vrlo brzo, već dvanaest sati nakon amputacije. Uvođenjem inhibitora Wnt signalnog puta Dkk1 ili nadekspresijom Wnt5b uz toplinski šok blokira se regeneracija peraje. Daljnja istraživanja su pokazala da je Wnt5b signal potreban za specifikaciju blastemskog mezenhima i bazalnog epitelnog sloja. Ekspresija Dkk inducirana toplinskim šokom rezultirala je defektima u blastemi i promjenom ekspresije *lef1* i *msxb* što je dovelo do blokiranja regenerativnog izrastanja. Daljni dokazi koji podupiru prijašnje tvrdnje su dobiveni korištenjem nekoliko različitih kemijskih spojeva koji inhibiraju Wnt put. Još jedan signalni put za kojeg se zna da sudjeluje u regeneraciji peraje je Fgf put koji djeluje nizvodno od Wnt. Utišavanjem Fgf puta se smanji regenerativna sposobnost peraje, a mutant uopće ne može inicirati regeneraciju. Retinoična kiselina (eng. *retinoic acid*, RA) i *hedgehog* signalni put (Hh) se također povezuju s bitnim ulogama u regeneraciji peraje, posebno u strukturiranju regeneriranog tkiva. Nedavno su se bolje razlučile točne uloge Wnt, Fgf, RA i Hh signalnih puteva radom Daniel Wehnera i suradnika, koji pokazuje da su Wnt signali u neproliferativnoj distalnoj blastemi potrebni za proliferaciju stanica u proksimalnoj blastemi i da u tom procesu

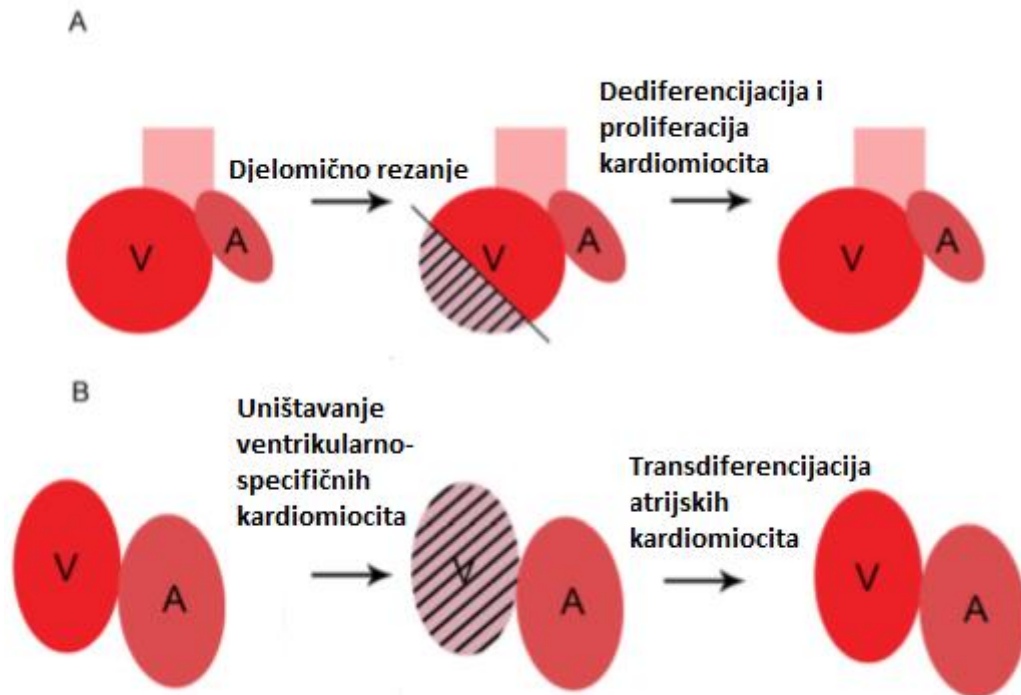


sudjeluju i Fgf i Bmp signalni putevi koji kontroliraju strukturiranje epiderma. Dok RA i Hh signali utječu na samu proliferaciju stanica u blastemi. Noviji interes postoji i za male nekodirajuće RNA molekule koje bi mogle imati regulatornu ulogu u regeneraciji peraje. Nekoliko grupa znanstvenika je već pokazalo da miR-203 i miR-133 sudjeluju u regulaciji regeneracije peraje kontrolirajući Wnt i Fgf signalne puteve. Osim toga pokazano je da se umanjenom aktivnošću Dicer-a, ključnog enzima u sintezi miRNA molekula, smanjuje regenerativna sposobnost peraje. Dodatna istraživanja su pokazala i da je potrebna nadregulacija autofagije u zoni regeneracije za uspješnu regeneraciju kaudalne peraje zbog spriječavanja stanica za ulazak u apoptozu. Sva ova istraživanja su uvelike proširila naše znanje o staničnim i molekularnim događajima regeneracije peraje u zebrice (Shi i sur. 2015).

### 3.2 REGENERACIJA SRCA

Za razliku od sisavaca, srce odrasle zebrice se nakon ozljede može regenerirati. Ta činjenica je privukla pažnju znanstvenika koji su ispočetka uglavnom proučavali srčani zalistak. Zalistak kod odrasle zebrice je sastavljen od tri različite vrste mišića: primordijalnih, trabekularnih i kortikalnih. Različitim načinima ozljeđivanja, praćenjem nastanka novih staničnih linija i transplantacijama se otkrio izvor regeneriranog srčanog tkiva. Obično se srčani zalistak samo djelomično ozljeđuje operativnim zahvatom. Smatra se da su izvor većine regeneriranog miokarda kardiomiocite, ali ne i epikard ili stanice nastale iz njega. Daljnja istraživanja su pokazala da tijekom prvih 30 dana nakon ozljede kortikalni mišići služe kao glavne komponente za rekonstrukciju mišićnog zida. Nakon 60 dana kada je tkivo u potpunosti obnovljeno, primordijalni mišići također poprimaju bitnu ulogu u procesu regeneracije, međutim kortikalni mišići i dalje zadržavaju najvažniju ulogu. Zanimljivo je da konačni raspored aktivnosti tih mišićnih slojeva kod regeneracije potpuno suprotan onom koji se odvija kod embrionalnog razvoja srca (Sehring i sur. 2016). Dominantni mehanizam kod regeneracije srca je dediferencijacija kardiomiocita jer oni stvaraju strukturne promjene u tkivu nakon ozljede. Regenerirajući miociti počinju eksprimirati gata4, gen koji je esencijalan za razvoj srca. Takve dediferencirane kardiomiocite snažnom proliferacijom dalje služe kao izvor stanica koje podupiru regeneraciju tkiva (Slika 3A). Tijekom tog procesa stanice

epikarda pokazuju funkciju generacije novih vaskularnih komponenti. Za razliku od operativne metode, druga istraživanja koristila su metodu transgeničnih linija te su tako dijelove srca oštetili u stadiju ličinke. U takvim okolnostima se transdiferencijacija stanica pokazala ključnim mehanizmom. Ovaj model je koristio transgeničnu liniju u kojoj se nitroreduktaza specifično eksprimirala u ventrikularnim mišićima pod kontrolom tkivno specifičnog promotora. Tretiranjem ličinkama s Mtz-om znanstvenici su uništili sve stanice ventrikularnog mišića i tako zaključili da nove ventrikularne kardiomiocite nastaju iz područja koje je blizu atrioventrikularnog kanala i da su se proširile preko cijele komore kako bi se obnovio ventrikularni miokard. Praćenjem staničnih linija došli su do zaključka da atrijske kardiomiocite preuzimaju ulogu stanica ventrikularnog mišića i migriraju u ozljeđeno područje da bi obnovili izgubljeni ventrikularni mišić (Slika 3B). Ova transdiferencijacija stanica iz atrijskih u ventrikularne je indirektno regulirana endokardom preko Notch signalnog puta. Međutim ovaj fenomen transdiferencije je opažen samo u ličinkama kojima je srce jako oštećeno. Da li bi se isti fenomen mogao dogoditi i u odraslih riba treba još istražiti. Opažena je esencijalnost nekoliko molekula u regeneraciji srca. Dinamično taloženje ekstracelularnog matriksa je potrebno za stvaranje novog miokarda u ventrikularnom zidu. Tokom proliferacije kardiomiocita grupe faktora različitih molekularnih puteva zajedno rade kako bi se osigurao integritet procesa regeneracije. Ti faktori mogu imati pozitivne ili negativne uloge. RA, Tgf, Pdgf, Hh, inzulinu sličan faktor rasta i Jak – Stat signalni put pozitivno utječu na proliferaciju kardiomiocita. Prije spomenuti Notch signalni put ima i pozitivnu i negativnu ulogu te tako služi kao balansirajući faktor između aktivacije i inhibicije, što je vrlo bitno za uspješnu regeneraciju srca. Također se istražio utjecaj okolišnih faktora, pogotovo količine kisika. Rezultati su pokazali da niske razine kisika koje se pojavljuju kod zatajenja srca nakon ozljede uspješno potiču kardiomiocite na proliferaciju. Suprotno tome, hiperoksični uvjeti inhibiraju proliferaciju. Ta regulacija je posredovana transkripcijskim faktorima koji su hipoksijom inducirani. Nedavno je pokazano da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> služi kao signal epikardu i miokardu da pripreme srce na regeneraciju. Jedan od negativnih regulatora je MAPK signalni put čija aktivacija suprimira regeneraciju srca. Nedavno je pronađeno da miR-133 koja je povezana i s regeneracijom peraje također ima bitnu ulogu u regeneraciji srca. To istraživanje je pokazalo da miR-133 potiskuje regeneraciju srca (Shi i sur. 2015)



**Slika 3.** Shema dvaju modela regeneracije kada se ventrikul različito ozljedi (Shi i sur. 2015).

### 3.3 REGENERACIJA SREDIŠNJEG ŽIVČANOG SUSTAVA

Središnji živčani sustav (*eng. central nervous system, CNS*) se sastoji od različitih vrsta neurona. Njegov regenerativni kapacitet je vrlo slab u sisavaca. Međutim, u zebrice postoji kontinuirana neurogeneza i regeneracija tog sustava. Istraživanja CNS-a u zebrice se mogu podijeliti na tri polja: istraživanje odraslih neurona u mozgu - pogotovo u telencefalonu nakon fizičkog ozljeđivanja, zatim proučavanje obnove leđne moždine ili aksona nakon sakaćenja i regeneracija mrežnice (fotoreceptora). Prihvaćeno je da snažna regenerativna sposobnost CNS-a u zebrice postoji zbog stalno proliferirajućih matičnih ili progenitorskih stanica i permisivne okoline. Kako bi se bolje razumjela regeneracija neurona najčešće se koristi metoda fizičkog ozljeđivanja telencefalona. Ovom metodom i korištenjem Cre/loxP sustava za praćenje staničnih linija pronađeno je da ventrikularne radijalne glia progenitorske stanice reagiraju na ozljedu proliferacijom i tako generiraju neuroblaste koji onda migriraju na mjesto ozljede. Zbog toga mozak odrasle zebrice ima veliki potencijal za obnovu neurona endogenim matičnim/progenitorskim stanicama. Ono što je trebalo istražiti jest kako te

matične/progenitorske stanice postanu proliferativne. Novija istraživanja su pokazala da te neuronske progenitorske stanice iz različitih regija imaju i različitu sposobnost za proliferaciju. U samoj migraciji progenitorskih stanica sudjeluje Notch signalni put (Ghosh i Hui 2016). Međutim, istraživanja regeneracije mozga u zebrice su tek u početnoj fazi i još je mnogo toga ostalo za objasniti.

Sljedeće polje proučavanja je regeneracija aksona. Kod zebrice je dokazano da se optički živac i leđna moždina mogu vrlo dobro regenerirati nakon operativnog zahvata ali rezultati su varijabilni za različite vrste aksona. Pomoću istraživanja temeljenih na proučavanju ponašanja životinje, koja vjerno prikazuju regeneraciju aksona nakon ozljede, zaključeno je da se optički živac obnovi za 28-35 dana nakon ozljeđivanja, a s optičkim živcem povezani sinaptički rearanžmani se potpuno obnove nakon 3 mjeseca. Regeneracija leđne moždine traje 42 dana. Nekoliko vanjskih i unutrašnjih faktora se smatra bitnima u ovom procesu ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se njihove uloge bolje razlučile. Kod regeneracije moždine ependimo-radijalne glija stanice stvaraju mostove kako bi povezale razdijeljenu moždinu. Tokom tog procesa inhibitorne molekule poput nekih proteoglikana i inhibitornih molekula povezanih s mijelinom, koje su normalno prisutne u sisavaca, se ne pojavljuju kod zebrice. Umjesto toga faktori koji potiču rast aksona se snažno eksprimiraju npr. kontaktini, P0, L1 slične molekule, GAP-43 i alfa-1 tubulin. Pravilno povezivanje aksona preko većih udaljenosti je također zanimljiva pojava vrijedna istraživanja. Smatra se da putevi degeneracije i ostale signalne molekule (kao prije spomenuti proteoglikani tenascin-R i epirini) sudjeluju u tom navođenju, ali mehanizam je još uvijek nerazjašnjen i zahtjeva daljnja istraživanja. Nedavno se provelo istraživanje na posteriornom lateralnom linijskom živcu kako bi se lakše mogao pratiti proces regeneracije aksona. To istraživanje je pokazalo da regenerirajući aksoni prate put koji su prethodno postavili originalni živčani ogranci. Također je otkriveno da faktori koji promoviraju regeneraciju, a inducirani su prvom ozljedom, kod druge ozljede induciraju regeneraciju (Shi i sur. 2015).

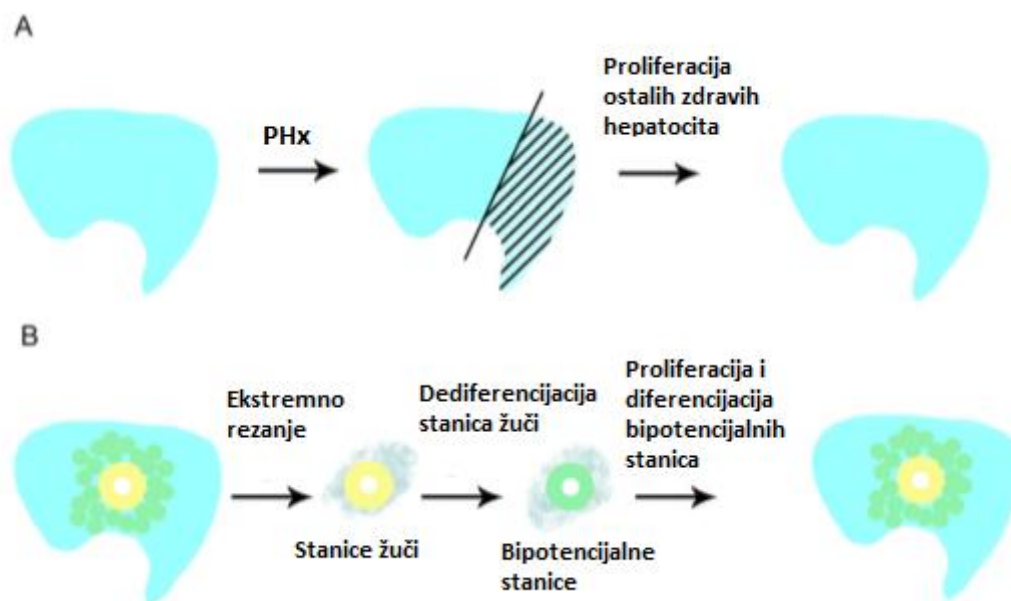
Mrežnica se nalazi u stražnjem dijelu oka i relativno je jednostavan i pristupačan dio CNS-a. Sastoji se od šest vrsta živčanih stanica i jedne vrste glija stanica koje nalazimo u tri različita gradivna sloja. Upravo zbog svoje jednostavnosti i lakoće manipulacije mrežnica služi kao značajan eksperimentalni sistem za istraživanje regeneracije CNS-a. Oštećeni neuroni su uzrok sljepila povezanog s bolestima mrežnice poput makularne degeneracije, retinitis pigmentoze i glaukoma. Zbog toga znanstvenici s posebnim interesom istražuju mrežnicu na raznim modelima poput zebrice, ne bi li pronašli lijek za te ozbiljne bolesti.

Nažalost sisavci nisu sposobni regenerirati mrežnicu. Međutim, zebrice su sposobne za to i u kombinaciji s modernim genetičkim alatima čine savršeni modelni organizam za proučavanje tog procesa. Pretpostavlja se da će se znanje o regeneraciji mrežnice kod zebrice uspješno moći prenijeti i na sisavce. Müllerove glija stanice se nalaze u mrežnici, a njihove uloge su komunikacija s neuronima, održavanje strukture mrežnice i praćenje staničnog okoliša, sudjelujući tako u održavanju homeostaze i zaštiti neurona. Müllerove glija stanice na ozljedu odgovaraju hipertrofijom i aktivacijom citoskeletnih gena npr. glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (*eng. glial fibrillary acidic protein, Gfap*) i vimentinom. Rijetko se u sisavaca Müllerove glija stanice dijele nakon ozljede mrežnice, a kada se to dogodi obično dolazi do fibroze i stvaranja glijalnih ožiljaka. Zanimljivo je da i u zebrice Müllerove glija stanice odgovaraju na ozljedu hipertrofijom i stvaranjem Gfap proteina. Međutim, taj glijalni odgovor je praćen događajem reprogramiranja koji dozvoljava Müllerovim glija stanicama da poprime svojstva retinalnih matičnih stanica. Kako Müllerove glija stanice prelaze iz tipičnog glijalnog odgovora u regenerativni odgovor još nije razjašnjeno, ali pretpostavlja se da bi to mogla biti glavna razlika zbog koje je sposobnost regeneracije mrežnice u riba bolja nego u sisavaca. Promjena svojstva Müllerovih glija stanica i poprimanje osobina matičnih stanica je povezana s velikim promjenama u ekspresiji gena koje se moraju dogoditi prije same proliferacije i regeneracije. Ove promjene u ekspresiji gena su popraćene parcijalnim reprogramiranjem cijelog genoma zebrice, a karakterizirano je promjenama u metilaciji DNA i aktivaciji gena povezanih s multipotencijom. Reprogramirane jezgre migriraju unutar stanice procesom koji se naziva interkinetička jezgrina migracija. Posljedica toga procesa je asimetrična dioba, takvom diobom nastaju retinalne progenitorske stanice koje imaju sposobnost regeneracije svih bitnijih vrsta neurona u mrežnici. Važnost procesa interkinetičke jezgrine migracije još nije istraživana ali moguće je da je glavni pokretač zapravo promjena gradijenta raznih kemijskih faktora koji utječu na proliferaciju i diferencijaciju tih stanica kroz cijelu mrežnicu (Wan i Goldman 2016).

### 3.4 REGENERACIJA JETRE

Za razliku od dosad spomenutih organa, jetra se može regenerirati kako kod zebrice tako i kod sisavaca. Kada se mišu ukloni 2/3 jetre ona je sposobna potpuno se regenerirati. Međutim, potrebno je još istraživati kako bi se bolje razumjeli stanični i molekularni

mehanizmi tog procesa. Istraživanja koja su naročito doprinijela napretku u razumijevanju tog procesa su upravo rađena na zebrici, pogotovo kada se radi o potencijalnim kemijskim spojevima koji bi poticali regeneraciju jetre (Gemberling i sur. 2013). Postoji nekoliko različitih načina ozljeđivanja jetre koja se mogu koristiti u istraživanjima. Parcijalna hepatektomija (*eng. partial hepatectomy*, PHx) tj. uklanjanje 2/3 jetre se najčešće koristi kod zebrice i taj model sugerira da kao snagu za regeneraciju jetra koristi hepatocyte ostatka jetre (Slika 3A). Signalni putovi i neki enzimi koji su poznati po ulozi u procesu regeneracije su npr. topoizomeraza 2a, Wnt, Fgf, i Bmp. Nedavno se kemijskim pretraživanjem zaključilo da prostaglandin E2 (PGE2) ima hepatoprotektivni učinak i da tako smanjuje oštećenje jetre, a ta je funkcija posredovana interakcijom PEG2 i Wnt signalnog puta. Kada se odrasla ribica nakon parcijalne hepatektomije tretira inhibitorom S-nitrozoglutationom, koji je zapravo kemijski spoj nastao interakcijom dušikovog monoksida (NO) i glutationa (NO je poznata signalna molekula u svim višim organizmima) dolazi do pojačane stanične proliferacije i regeneracije. Pronalazak PEG2 i NO signalne inetrakcije kod regeneracije jetre daje jednu potpuno novu perspektivu za kliničko liječenje pacijenata. Da bi razumjeli regeneraciju jetre kada su većina ako ne i svi hepatociti izgubljeni znanstvenici su koristili metodu ozljeđivanja jetre pomoću ranije spomenutih NTR kazeta kako bi uništili hepatocyte još u stadiju ličinke. Ta istraživanja su jasnije pokazala izvor i kretanje novih hepatocita. Naime stanice žučnih kanala i uključujući i velike kolangiocyte mogu transdiferencirati u hepatocyte i dati veliki doprinos regeneraciji jetre nakon ekstremnog gubitka hepatocita (Slika 3B). Ovaj proces zahtjeva Notch signalizaciju. Da li postoje i drugi izvori koji doprinose regeneraciji jetre, pitanje je na koje tek treba odgovoriti. Sva ova istraživanja otkrivaju mogućnost korištenja endogene stanične transdiferencijacije kod liječenja velikih oštećenja jetre kod sisavaca (Shi i sur 2015).



**Slika 4.** Shema dvaju modela regeneracije jetre kada se ona različito ozljedi (Shi i sur. 2015).

## 4. BUDUĆNOST ISTRAŽIVANJA

### 4.1 REDUCIRANI REGENERATIVNI POTENCIJAL U VIŠIH KRALJEŽNJAKA

Znanstvenike je oduvijek zanimalo zašto se regenerativni kapacitet općenito smanjio u evolucijski mlađim kralježnjacima, a pogotovo kapacitet organa kao što su mozak, srce i udovi. Iako neki ključni faktori još uvijek nisu razjašnjeni postoji nekoliko hipoteza temeljenih na do sada prikupljenim informacijama. Jedna ideja se temelji na razlici u broju i stanjima matičnih/progenitorskih stanica kod sisavaca i zebrice. Također je predloženo da zebrice imaju aktivne matične/progenitorske stanice u nekoliko organa i zato kroz cijeli život mogu rasti. U mozgu su im matične/progenitorske stanice šire raspoređene, što podržava regeneraciju kada je potrebno. Gubitak konstantnog svojstva rasta kod sisavaca je možda uzrokovan evolucijskom prednošću smanjivanja rizika od tumorigeneze. Iz tog razloga postoji stroga kontrola proliferacije stanica što istovremeno znači smanjenu regenerativnu

sposobnost. Još jedno objašnjenje je nedostatak ožiljaka kod zebrica. Ožiljci sisavcima služe za zatvaranje rana i sprječavanje nastanka daljnjeg oštećenja. Međutim ožiljak stvara nepovoljan okoliš za regeneraciju organa jer postoji višak granuliranog tkiva i neorganiziranih kolagenskih naslaga u tkivu ožiljka. I drugi vanjski okolišni faktori uključujući i ekstracelularni matriks bi mogli biti odgovorni. Primjerice kod pacijenata s kroničnim zatajenjem jetre i fibrozom prekomjerna akumulacija proteina ekstracelularnog matriksa značajno smanjuje proliferativni kapacitet hepatocita što rezultira visokom stopom smrtnosti. Slično tome, smanjena obnova aksona može biti uzrokovana nepovoljnim okolišem za rast koji sadrži komponente ekstracelularnog matriksa koji inhibiraju rast kao što su neki proteoglikani i molekule koji inhibiraju rast, a produkt su mijelina ili mijelinskih ostataka. Stanični unutrašnji mehanizmi koji reguliraju plastičnost stanice bi mogli također utjecati na regeneraciju, a konačni utjecaj bi mogao ovisiti o kombinaciji unutrašnjih i vanjskih faktora. Kako bi doznali više o samim mehanizmima potrebno je provesti detaljna i iscrpna istraživanja (Shi i sur. 2015).

## 4.2 RAZLIČITA REGULACIJA RAZVOJA ORGANIZMA I REGENERACIJE

Je li regeneracija rekapitulacija ontogeneze? To je kontroverzno pitanje na koje još treba pronaći pravi odgovor. Iako nekoliko molekularnih mreža signalnih puteva, posebice Wnt, Notch, Hh i Bmp igraju nezamjenjive uloge u razvoju i u regeneraciji, veliki broj novijih istraživanja ipak pronalazi razlike u tim procesima. Primjerice uloga gata3 kod zacjeljenja ubodne rane telencefalona i kod ozljede repne peraje te specifična ekspresija KLF6/7 kod obnove aksona nisu prisutni u organogenezi tih organa. Postoje li posebne molekule esencijalne za regeneraciju pitanje je na koje je prijeko potrebno odgovoriti kako bi bolje razumjeli proces regeneracije (Shi i sur. 2015).



### 4.3 ULOGA UPALE I MIJELOIDNIH STANICA (MAKROFAGA) U REGENERACIJI

U prošlosti se mislilo da ozljedom inducirana akutna upala utječe negativno na regeneraciju. Međutim taj stav je osporen novijim radom Nikosa Kvrstisa i suradnika, koji je dokazao da akutna upala potrebna za dovoljan porast proliferacije neuralnih progenitorskih stanica i neurogenezu koja slijedi u odraslih jedinki zebrica nakon ozljede mozga. Upalom induciran cisteinil leukotrienski signalni put je ključan u tom procesu. Rezultati ovog istraživanja nalažu da se preispita uloga upalnog procesa u regeneraciji. Uloga leukocita postala je zanimljiva tema istraživačima koji se bave regeneracijom. Smatralo se da neutrofili ne utječu toliko ili čak sprječavaju regeneraciju, iako su neka istraživanja pokazala da mogu promicati regeneraciju aksona u optičkom živcu nakon ozljede pomoću jake ekspresije onkomodulina. Makrofagi su se puno više proučavali kao potencijalni faktori u regeneraciji. Istraživanja su pokazala da makrofagi, pogotovo M2 makrofag, stvaraju regenerativne ožiljke nakon ozljede. Nedavno su se istražile funkcije makrofaga i neutrofila u regeneraciji organa u zebrice. Ta istraživanja su pokazala da neutrofili negativno utječu na regeneraciju peraje. Međutim, makrofagi pozitivno utječu na regeneraciju peraja nakon amputacije kod ličinaka i kod odraslih (Shi i sur. 2015).

## 5. ZAKLJUČCI I PERSPEKTIVE

Zebrice imaju prednost nad ostalim modelima kralježnjaka kod proučavanja regeneracije zbog relativne lakoće uzgoja i raznolikosti faktora kojima se može manipulirati. Potpuno iskorištavanje svih novih tehnologija na zebrici će pojačati osnove za istraživanja regeneracije. Jedan nedostatak zebrice kao modelnog organizma je bila nemogućnost stvaranja uvjetnih *loss-of-function* alela. U posljednjih nekoliko godina nukleaze cinkovih prstiju i novije transkripcijskim faktorima slične efektorske nukleaze (*eng. transcription activator-like effector nucleases*, TALEN) i CRISPR-Cas sistemi su pomogli usmjerenoj mutagenezi. Nedavno je opisan sustav koji omogućuje indukciju mjesno specifične homologne rekombinacije u embrijima zebrice koristeći TALEN. Dvolančani lomovi DNA omogućuju inkorporaciju injiciranih kratkih DNA oligotidnih sekvenci niskom frekvencijom

u somatskim i u germinativnim stanicama. Korištenjem ove tehnologije stvorene su uvjetne *knock-out* mutacije alela insercijom dva kompatibilna loxP mjesta ciljajući gen od interesa. Upravo ovo omogućuje proučavanje tkivno specifičnih individualnih genskih produkata tokom regeneracije (Gemberling i sur. 2013). No to je tek početak priče, ostaje još puno prostora za napredak i razvoj tih metoda.

Razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama regeneracije organa je ključno za razvoj novih terapijskih modela nakon ozljeda i oštećenja organa. Značajan napredak je napravljen opsežnim istraživanjima koristeći razne modelne organizme. Međutim, još smo daleko od potpunog i dubokog razumijevanja. Snažni regenerativni kapacitet zebrice u kombinaciji s nekoliko jedinstvenih prednosti tog modelnog organizma značajno doprinosi istraživanjima na ovom području. Daljnja istraživanja će proširiti naše znanje i napokon omogućiti ljudima razvoj metoda koje bi mogle inducirati endogeni potencijal stanica da regeneriraju oštećeni organ nakon ozljede. Korak bliže tome nas vode i nova metodološka postignuća, npr. prije spomenute TALEN i CRISPR/cas9 metode. Možemo očekivati da će se mehanizmi regeneracije organa potpuno razotkriti i razumjeti u budućnosti.

## 6. LITERATURA

- Gemberling M, Bailey T. J, Hyde D. R, Poss K. D, 2013. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics : TIG*, 29(11), 10.1016/j.tig.2013.07.003. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>
- Ghosh S, Hui SP, 2016. Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis. *Neural Plast.* 2016;2016:5815439. doi: 10.1155/2016/5815439
- Poss K. D, Keating M. T, Nechiporuk, A, 2003. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.*, 226: 202–210. doi:10.1002/dvdy.10220V
- Sehring IM, Jahn C, Weidinger G, 2016. Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration? *Curr Opin Genet Dev.* 2016 Jun 25;40:48-56. doi: 10.1016/j.gde.2016.05.011
- Shi WC, Fang ZB, Li L, Luo LF, 2015. Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Sci China Life Sci*, 2015, 58: 343–351, doi: 10.1007/s11427-015-4838-z
- Wan J, Goldman D, 2016. Retina regeneration in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* 2016 Jun 6;40:41-47. doi: 10.1016/j.gde.2016.05.009
- White R, Rose K, Zon L, 2013. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nature Reviews Cancer* 13, 624–636. doi:10.1038/nrc358

## 7. SAŽETAK

Ograničeni regenerativni kapacitet nekoliko organa u sisavaca, kao što su središnji živčani sustav, srce i udovi čine liječenje teških bolesti vrlo teškim. Zato je razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama regeneracije organa od velikog znanstvenog i kliničkog interesa. Veliki napredak je već napravljen nakon iscrpnih istraživanja napravljenih pomoću različitih modelnih organizama. Nažalost još nam nedostaje znanja kako bi dostigli zadani cilj. Nedavno je zebrića postala popularni modelni organizam za regeneraciju. Razlog tomu je njezin veliki regenerativni kapacitet, posebno onih organa koji se slabo regeneriraju u sisavaca. Osim toga imaju još neke karakteristike koje su zgodne za istraživanje regeneracije organa. Ovaj rad je osvrst na dosadašnji napredak na području regeneracije organa zebriće, posebno regeneracije peraje, srca, CNS-a i jetre. Također se diskutiraju razlozi zbog kojih je regenerativni kapacitet kralježnjaka smanjen, uloge upalnog procesa tokom regeneracije i razlike između organogeneze i ontogeneze.

## 8. SUMMARY

The limited regenerative capacity of several organs, such as central nervous system (CNS), heart and limb in mammals makes related major diseases quite difficult to recover. Therefore, knowledge of the cellular and molecular mechanisms underlying organ regeneration is of great scientific and clinical interests. Tremendous progression has already been made after extensive investigations using several model organisms for decades. Unfortunately, distance to the final achievement of the goal still remains. Recently, zebrafish became a popular model organism for the deep understanding of regeneration based on its powerful regenerative capacity, in particular the organs that are limitedly regenerated in mammals. Additionally, zebrafish are endowed with other advantages good for the study of organ regeneration. This review summarizes the recent progress in the study of zebrafish organ regeneration, in particular regeneration of fin, heart, CNS, and liver. There are also discussions about reasons of the reduced regenerative capacity in higher vertebrates, the roles of inflammation during regeneration, and the difference between organogenesis and regeneration.