Mehanizam regeneracije neurona u mozgu riba

Drk, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:888051

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Sara Drk

Mehanizam regeneracije neurona u mozgu riba

Završni rad

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

MEHANIZAM REGENERACIJE NEURONA U MOZGU RIBA

Sara Drk

Rad je izrađen na: Odjelu za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku; Zavod za biokemiju i ekofiziologiju bilja

Mentor: Doc.dr.sc. Senka Blažetić

Kratki sažetak završnog rada: U ovom završnom radu proučava se proces regeneracije neurona u mozgu riba koštunjača, ponajviše vrsta *Apteronotus leptorhynchus* i *Danio rerio*, koja se događa zbog nanošenja ozljede. Za neuralnu regeneraciju bitan je i proces neurogeneze, odnosno stvaranja novih neurona u mozgu, a sam mehanizam uključuje nekoliko procesa koji se opisuju u ovom radu. To su uklanjanje oštećenih stanica na mjestu ozljede, stanična proliferacija kojom nastaju nove stanice, migracija novih stanica do mjesta ozljede, njihov opstanak i diferencijacija u zrele neurone na mjestu ozljede te njihovo uključivanje u postojeće neuralne krugove. Bližim upoznavanjem mehanizma regeneracije kod riba, postoji mogućnost razumijevanja zašto su ti mehanizmi odsutni kod sisavaca i mogu li se potaknuti čime bi se omogućila terapija trauma mozga i neurodegenerativnih bolesti kod ljudi.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: neurogeneza, regeneracija, lezija, matične stanice, koštunjače

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova nacionalne i sveučilište knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

MECHANISM OF NEURON REGENERATION IN FISH BRAIN

Sara Drk

Thesis performed at: Department of biology, J.J. Strossmayer University in Osijek, Subdepartment of biochemistry and plant ecophysiology

Supervisor: Senka Blažetić, PhD, Asst.Prof.

Short abstract: In this bachelor thesis we look into the process of neuron regeneration in the brain of teleost fish, mostly species *Apteronotus leptorhynchus* and *Danio rerio*, that happens after injury implication. Important for the regeneration is the process of neurogenesis, which is generation of new neuron sin the brain, and the mechanism itself includes a few processes described in this thesis. Those are elimination of damaged cells in the injury site, cell proliferation by which new cells are created, migration of new cells to the injury site and their survival and differentiation into mature neuron sin the injury site, and finally their integration into existing neural network. With closer examination of these mechanisms in fish, there is a possibility of understanding why are those mechanisms absent in mammalian brain and can they be introduced, which would make therapy for brain trauma and neurodegenerative disease in humans possible.

Original in: Croatian

Key words: neurogenesis, regeneration, lesion, stem cells, teleost fish

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OSNOVNI DIO 4
2.1. Razvoj novih stanica u mozgu koštunjača 4
2.1.1. Spontana proliferacija stanica 4
2.1.2. Proliferacija stanica potaknuta traumom 6
2.1.3. Migracija i usmjeravanje novonastalih stanica 6
2.1.4. Uloga apoptotičke smrti stanica 11
2.1.5. Opstanak novih stanica 12
2.1.6. Neuralna diferencijacija 13
2.2. Neuralna Regeneracija 14
2.2.1. Paradigma lezija 15
2.2.2. Uklanjanje oštećenih stanica 17
2.2.3. Zamjena oštećenih s novim neuronima 18
2.2.4. Migracija i diferencijacija novih stanica nakon ozljede 19
2.2.5. Molekularni pogled na neuralnu regeneraciju 20
3. ZAKLJUČAK 22
4. LITERATURA 23

1. UVOD

Neurogeneza je proces stvaranja živčanih stanica iz neuralnih matičnih i neuralnih progenitorskih stanica najizraženija u prenatalno doba kad se razvija mozak. Neuralne matične stanice su samoobnavljajuće i multipotentne, te iz njih nastaju neuralne progenitorske stanice koje se diferenciraju u ciljne stanice – neuroblaste i glioblaste (Alenzi i Bahkali, 2011; Temple, 2001).

Donedavno je bilo prihvaćeno mišljenje da se živčane stanice kralježnjaka ne mogu obnavljati, odnosno da sinteza neurona prestaje nakon rođenja. Upravo je ta pretpostavka imala utjecaj na liječenje bolesti ili ozljeda mozga jer se smatralo da su oštećene stanice nepovratno izgubljene(Gajović, 2012). 60-tih godina je Joseph Altman, koristeći timidinsku autoradiografiju na štakorima, osigurao dokaze da je ta pretpostavka netočna i da u mozgu sisavaca nastaju novi neuroni. Neuralne matične stanice se mogu aktivirati i nadomjestiti propale neurone diferencijacijom(Altman, 1962).

Od tada, otkriveno je da se proces odvija i kod drugih skupina životinja, vodozemaca, gmazova, ptica i riba. Ovakva adultna neurogeneza razlikuje se između skupina životinja. Kod viših kralježnjaka, odnosno sisavaca, broj novonastalih neurona je puno manji u odnosu na ukupan broj neurona u mozgu i do neurogeneze dolazi samo u dvije regije u mozgu: subgranularnoj zoni dentatne vijuge hipokampusa i u subventrikularnoj zoni koja okružuje lateralne ventrikule (uglavnom u prednjem dijelu ventrikula) (Altman, 1969). Neuralne matične stanice u subventrikularnoj zoni daju neuralne progenitorske stanice koje zatim migriraju do *bulbus olfactorius* i tamo diferenciraju u neurone. Te neuralne matične stanice su dijelom zaslužne za nastajanje novih neurona za mjesta ozljede mozga (Kishimoto i sur., 2012).

Sposobnost regeneracije odraslog mozga ide u nekoliko koraka: proliferacija neuralnih progenitorskih stanica i njihova migracija do oštećenih mjesta u mozgu, diferencijacija u ciljne stanice neurone, mogućnost opstanka i integracije u neuralne krugove. U mozgu sisavaca, djelotvornost takve regeneracije je iznimno mala(Arvidsson i sur., 2002).Nakon ozljede mozga, iako dolazi do pojačane proliferacije neuralnih matičnih stanica, naposljetku je ta neurogeneza nedovoljna i nastaje glijalni ožiljak. Oni popunjavaju praznine nastale oštećenjem mozga i inhibiraju rast aksona i mijelinizaciju(Fawcett i Asher, 1999).

Kod nižih kralježnjaka, anamniota, neprestano nastaju novi neuroni u brojnim područjima mozga. Ventrikularna zona telencefalona kod gmazova, ptica i riba je područje velike neurogeneze. Odličan primjer je zebrica, *Danio rerio*. U ventrikularnoj zoni telencefalona nastaju progenitorske stanice, slične onima iz subventrikularne zone lateralnih ventrikula kod sisavaca koje migriraju do *bulbus olfactorius* (Kishimoto i sur., 2012).

Zebrice imaju neuralnu regeneraciju nakon ozljede u središnjem živčanom sustavu, za razliku od sisavaca. Nakon ozljede, dolazi do pojačane proliferacije neuralnih matičnih stanica, ali ne nastaje glijalni ožiljak pa novonastale stanice mogu popuniti praznine na oštećenim mjestima(Kishimoto i sur., 2012).

Kao posljedica neurodegenerativne bolesti i odumiranja velikog broja stanica, kod sisavaca je proliferacija matičnih stanica znatno smanjena što uzrokuje veliki gubitak mase mozga(Kizil, 2018). Primjer su amiloidoze, točnije skupina različitih bolesti koje uzrokuje nakupljanje ß ploča nepravilno smotanog (toksičnog) proteina amiloida u tkivima, pa i u mozgu (uzrokuje Alzheimerovu bolest kod ljudi). U slučaju amiloidoze kod sisavaca proliferacija neuralnih matičnih stanica je smanjena(Merlini i Belloti, 2012). Iako i kod zebrice nakupljanje amiloida uzrokuje slične simptome, razlika je u proliferaciji matičnih stanica koja je pojačana i nastanku novih neurona koji opstaju unatoč toksičnosti(Bhattarai i sur., 2017). Zbog velike adultne neurogeneze i neuralne regeneracije nakon ozljede, nastoje se identificirati mehanizmi ovih procesa, što bi u konačnici dovelo do razjašnjavanja nepostojanja tih procesa kod sisavaca i do liječenja ozljeda ili neurodegenerativnih bolesti kod ljudi.

Zebrica, *Danio rerio*, (Slika 1.) je najčešće korišten model za istraživanja neurogeneze i neuralne regeneracije. Poznata je po mogućnosti regeneracije različitih tkiva, uključujući i moždano. Zebrice su praktične kao model jer je njihovo održavanje i uzgajanje lako i jeftino maju velik broj potomaka. Pristup njihovim embrijima je jednostavan jer se ličinka razvija izvan tijela majke(Dahm i Geisler 2006).



Slika 1. Danio rerio, zebrica (Izvor Web1)

Nakon što je dokazano konstantno nastajanja novih živčanih stanica u mozgu odraslih riba, bilo je potrebno otkriti mehanizme nastanka i dalji put novonastalih stanica. Za to je bio potreban prigodan model. 1991. Maler i sur. su objavili atlas mozga Gymnotiformes. Time je znanstvenicima bilo omogućeno otkrivanje točnih mjesta i zona proliferacije u mozgu koštunjača. Mnoga istraživanje se provode i na vrsti *Apteronotus leptorhynchus* (Slika 2.) koja je vrlo istražena zbog električnog karaktera i ponašanja i upravo je po toj vrsti Maler izradio atlas(Maler i sur., 1991.).



Slika 2. *Apteronotus leptorhynchus* (Izvor Web 2)

2. OSNOVNI DIO

2.1. Razvoj novih stanica u mozgu koštunjača

Proliferacija stanica je uzastopno umnažanje stanica i nastajanje novih. Ona se u mozgu spontano događa neprestano, ali može biti i potaknuta ozljedom ili bolešću.

2.1.1. Spontana proliferacija stanica

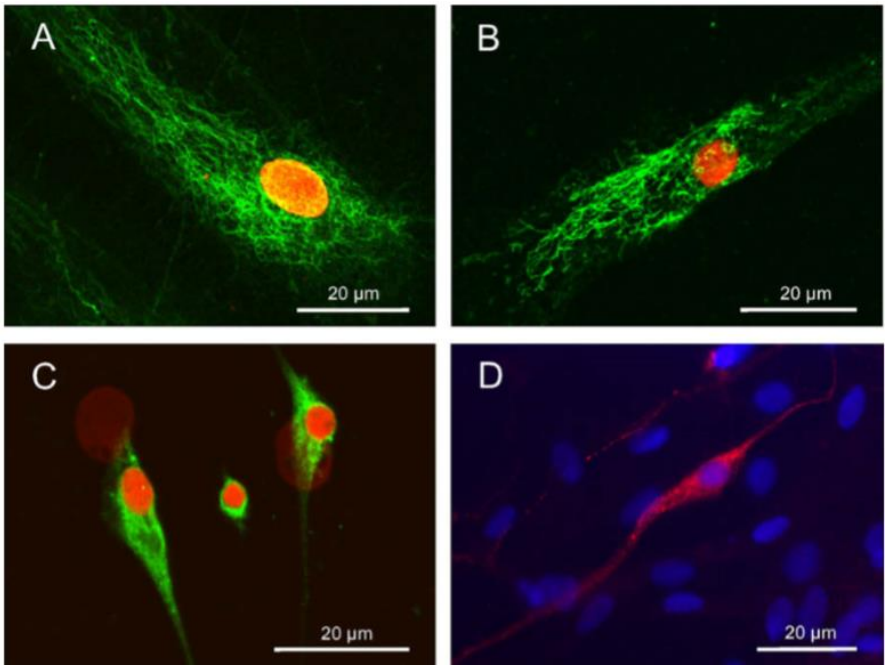
Kvantitativna analiza uzorka za staničnu proliferaciju u mozgu riba *Apteronotus* temelji se na inkorporaciji timidinskog analoga 5-bromo-2'-deoksiuridina (BrdU) u novo sintetiziranu DNA u mitozi. BrdU je ustvari marker mitotički aktivnih stanica mozga. Unosi se intraperitonalno (u trbušnu šupljinu) i traje 2h kod *Apteronotus leptorhynchus* i 30min kod zebrice i tu tom vremenu se inkorporira u novu DNA nastalu u S fazi mitoze (Zupanc, 1999).

Kod *A. leptorhynchus* kvantitativna analiza pokazuje da u proteklom vremenu od 2h nastaje 100 000 stanicu u cijelom mozgu. Kod zebrice, u 30min nastaje 6000 novih stanica. To je 0,2% i 0,06% od ukupnog broja stanica u mozgu obje vrste. Oko 25% (*A.leptorhynchus*), odnosno 40% (zebrica) novih stanica nastaje u telencefalonu, diencefalonu, mesencefalonu i rombencefalonu. Ostalih 75% (*A. leptorhynchus*), odnosno 60% (zebrica)potječe iz cerebeluma(Zupanc i Horsche, 1995; Hinsh i Zupanc 2007).

Nasuprot tome, kod sisavaca je stopa proliferacije znatno niža. U subventrikularnoj zoni odraslih miševa u jednom danu nastaje 30 000 novih stanica, odnosno 0,03% od ukupno 110 milijuna stanica u mozgu(Lois i Alvarez-Buylla, 1994).U hipokampusu odraslih štakora broj novih stanica iznosi 9000 dnevno, odnosno 0,003% od ukupno 330 milijuna (Cameron i McKay, 2001).

U mozgu većine odraslih koštunjača, većina mitotičnih stanica se nalazi u velikim koncentracijama u malim, definiranim regijama mozga – zone proliferacije. Te zone se nalaze na površini ili blizu površine ventrikula u mozgu. Neke zone (uglavnom u cerebelumu) ne pokazuju direktnu povezanost s ventrikulima, jer većina njih potječe s područja koja su na površini ventrikula u embrionalnom razvoju, ali zbog izvrnutog razvoja mozga riba u embriogenezi, ti ventrikuli nestaju ili translociraju (Pouwels, 1978).

Zone proliferacije sadrže matične stanice čije se osobine mogu pratiti uzgojem u kulturi. Izoliranjem tih stanica i njihovim uzgojem 3-4 dana u kulturi, proliferacijom nastaju neurosfere. Može se potaknuti i njihova diferencijacija (Slika 3.) u neurone i glijalne stanice koristeći laminin (nekolageni glikoprotein bazalne membrane) (Hinsch i Zupanc, 2006).

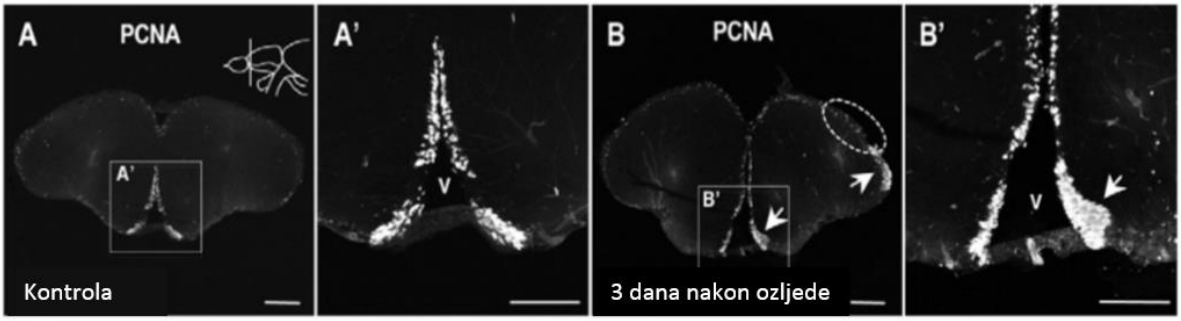


Slika 3. Stanice nastale iz neuralnih matičnih stanica izoliranih iz mozga *A. leptorhynchus*. Potaknuta je diferencijacija koristeći laminin na neurosferama. 24h nakon kultivacije, počinje diferencijacija u različite stanice: A) GFAP-imunoreaktivne astrocite. B) vimentin-pozitivne stanice. C) Stanice koje eksprimiraju Hu protein D) MAP2-imunopozitivne stanice. (preuzeto i prilagođeno iz Hinsch i Zupanc, 2006)

U zonama proliferacije nastaju nove stanice. U rostralnom cerebelumu, kojeg čine *cropus cerebelli* i *valvula cerebelli*, najviše stanica nastaje u molekularnom sloju. U kaudalnom dijelu cerebeluma, koji čini *eminentia granularis*, najveća proliferacija je izražena u specifičnom granularnom sloju *eminentia granularis pars medialis*(Zupanc i Clint, 2003).

2.1.2. Proliferacija stanica potaknuta traumom

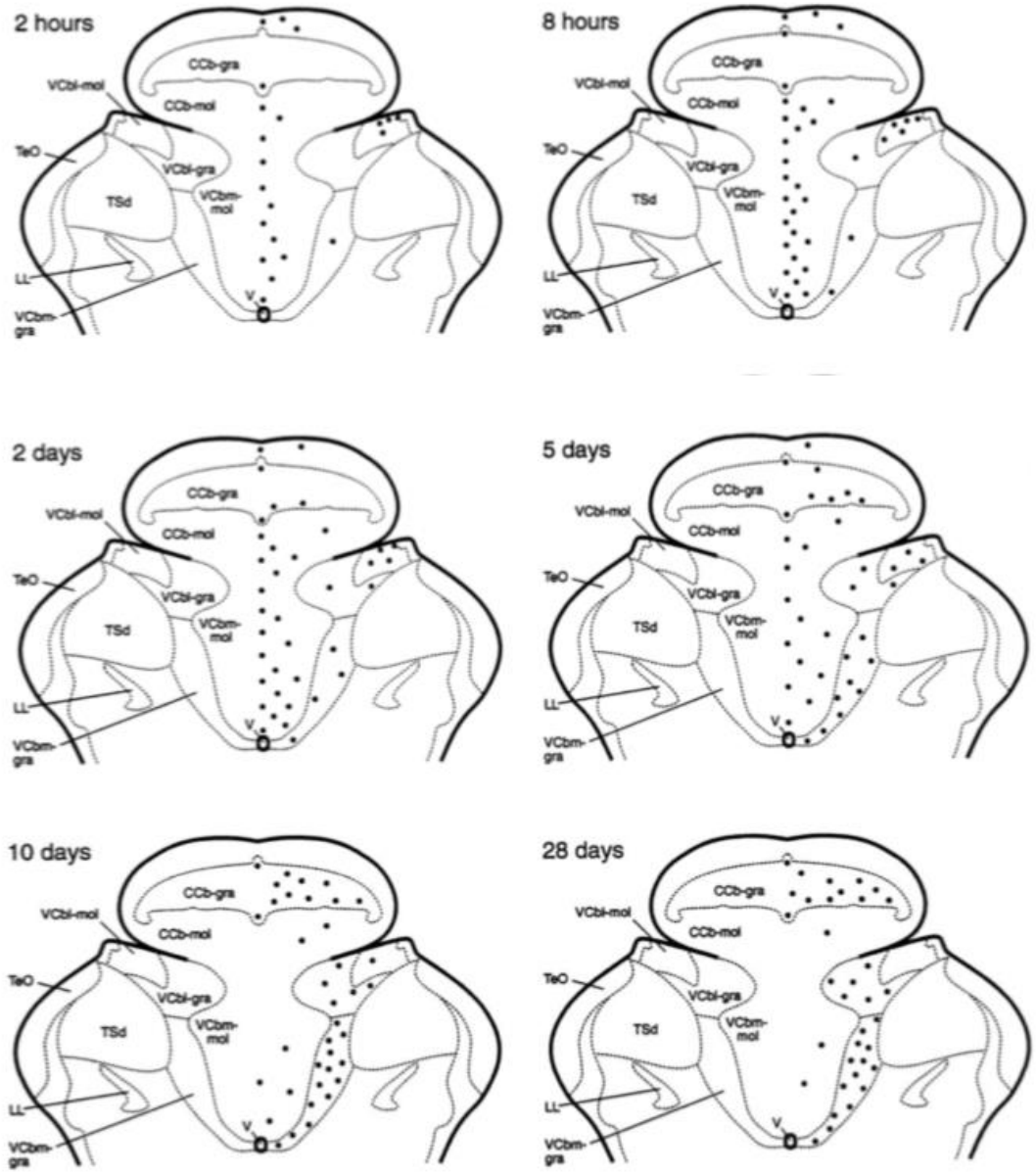
Proliferacija može biti potaknuta i ozljedom mozga. Kishimoto i sur. (2012) su proučavali proliferaciju stanica na telencefalonu zebrice nakon traume. Proliferaciju stanica proučavali su u vremenu od 3 do 21 dan nakon ozljede. Stanice u mitozi su identificirane po ekspresiji antigena PCNA (Slika 4.). Njihov broj je porastao u telencefalonu i u susjednim regijama do 7. dana. Nadalje se njihov broj smanjivao do stabilnih količina novih stanica u 21 danu. Time se pokazalo da se ozljedom potiče proliferacija stanica na mjestu ozljede i na susjednim mjestima (Kishimoto i sur., 2012).



Slika 4. Proliferacija stanica potaknuta ozljedom telencefalona zebrice. Detekcija antigena PCNA. Istočkano zaokruženi dijelovi ukazuju na mjesto ozljede. A) kontrola. A') kontrola, uvećano. B) 3 dana nakon ozljede. B') 3 dana nakon ozljede, uvećano. Strelice ukazuju na pojačanu proliferaciju. Uočava se pojačana proliferacija stanica u blizini mjesta ozljede i u ventrikularnoj zoni telencefalona (V). (preuzeto i prilagođeno iz Kishimoto i sur., 2012)

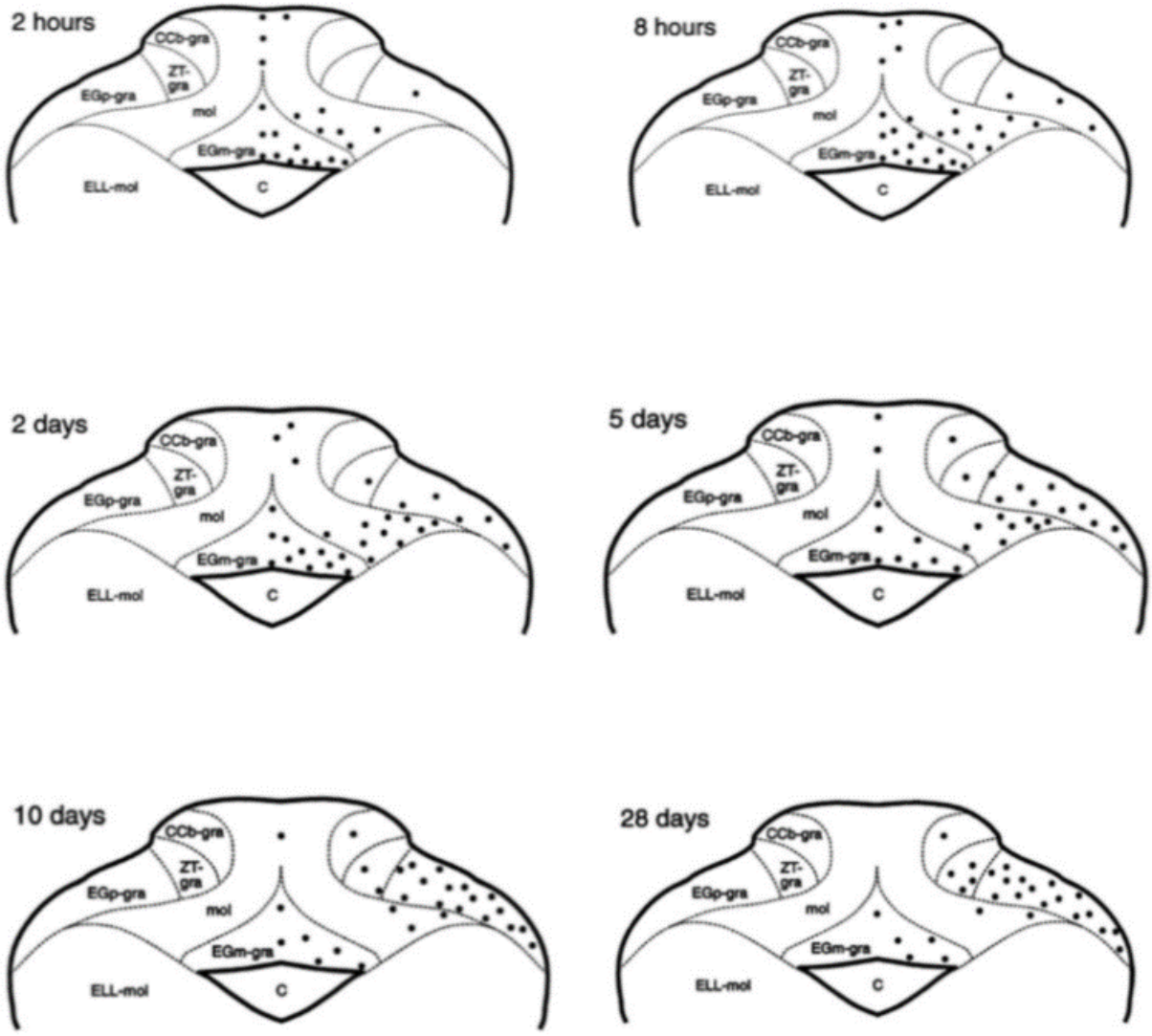
2.1.3. Migracija i usmjeravanje novonastalih stanica

A. leptorhynchus novo sintetizirane stanice migriraju od mjesta nastanka do ciljnih mjesta koja se nalaze u 3 odsjeka cerebeluma (Zupanc i sur., 1996) (Slika 5). To su slojevi granularnih stanica u *corpus cerebelli* i u *valvula cerebelli pars lateralis* i *pars medialis* (Zupanc i Clint, 2003).



Slika 5. *A.* leptorhynchus. Generacija u rostralnom cerebelumu i distribucija novih stanica, označenih s BrdU, prikazanih kao crne točke. Prikazana distribucija i gustoća novih stanica 2h, 8h, 2 dana, 5 dana, 10 dana i 28 dana nakon unošenja BrdU. *CCb-gra* – granularni sloj strukture *cropus cerebelli*; *CCb-mol* – molekularni sloj strukture *cropus cerebelli*; *VCbl-gra* – granularni sloj strukture *valvula cerebelli pars lateralis*; *BCbl-mol* – molekularni sloj strukture *valvula cerebelli pars lateralis*; *VCbm-gra* – granularni sloj strukture *valvula cerebelli pars medialis*; *VCbm-mol* – molekularni sloj strukture *valvula cerebelli pars medialis* (preuzeto i prilagođeno iz Zupanc i sur., 1996).

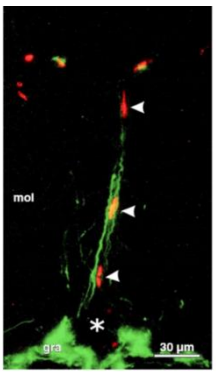
Većina stanica nastala u *eminentia granularis pars medialis* migrira kroz susjedni molekularni sloj do drugog granularnog sloja – *eminentia granularis pars posterior* (Slika 6). Većina novonastalih stanica uspijeva migrirati do ciljnog odredišta unutar 10 dana od inkorporacije BrdU(Zupanc i Clint, 2003; Zupanc i sur., 1996).



Slika 6. Adultna neurogeneza u kaudalnom cerebelumu vrste *A. leptorhynchus*. Nove stanice su označene s BrdU, prikazane kao crne točke. Prikazana distribucija i gustoća novih stanica 2h, 8h, 2 dana, 5 dana, 10 dana i 28 dana nakon unošenja BrdU. *EGm-gra* – granularni sloj strukture *eminentia granularis pars medialis*. *EGp-gra* – granularni sloj strukture *eminentia granularis pars posterior; mol* – molekularni sloj strukture *corpus cerebelli*(preuzeto i prilagođena Zupanc i sur., 1996).

Putevi migracije kod *A. leptorhynchus* i kod zebrice imaju neke zajedničke osobine, poput migracije novonastalih stanica iz proliferacijskih zona u molekularnom sloju *corpus cerebelli* i *valvula cerebelli* u granularne slojeve (Zupanc i sur., 2005), ali se i razlikuju. Razlika je u putu migracije stanica iz kaudalnog cerebeluma. Kod zebrice, stanice nastale u granularnom sloju strukture *lobus caudalis* (analog *eminentia granularis pars medialis*) ne migriraju. Dok 70% stanica iz *eminentia granularis pars medialis* migrira, 30% ne migrira i takvo ponašanje pokazuju i stanice iz *lobus caudalis* zebrice. Nedostatak migriranja najvjerojatnije postoji zbog činjenice da je količina novonastalih stanica u *lobus caudalis* puno manja nego u drugim proliferacijskim zonama zebrice, u odnosu na količinu novonastalih stanica u *eminentia granularis pars medialis* kod *A. leptorhynchus*(Zupanc i sur., 2005). Razlika u proliferaciji tih dviju struktura vjerojatno postoji zbog dovođenja električne energije u granularni sloj strukture *eminentia granularis pars posterior* kod Gymnotiformes (*A.leptorhynchus*) (Sas i Maler, 1987), čega nema kod zebrice.

Migraciju stanica iz zone proliferacije do ciljnih odredišta potpomažu radijalna glijalna vlakna (Zupanc i Clint 2003). Ona tvore dvije populacije – jedna imunopozitivna za glijalne fibrilarne kisele proteine (*Glial fibrillary acidic protein* – GFAP), druga za vimentin. Distribucija ovih dviju populacija se donekle razlikuje. Moguće je da radijalna glijalna vlakna u toku svog razvoja, najprije eksprimiraju vimentin, a dok se njegova ekspresija postupno smanjuje, povećava se količina GFAP-a(Voigt, 1989). U sva tri odjeljka cerebeluma, obje populacije radijalnih glijalnih vlakana ocrtavaju put novonastalih stanica dok migriraju. Pretpostavka da radijalna glijalna vlakna potpomažu migraciju novonastalih stanica još je podržana rezultatima eksperimenta gdje se koristilo označavanje s BrdU i GFAP (Slika 7.).

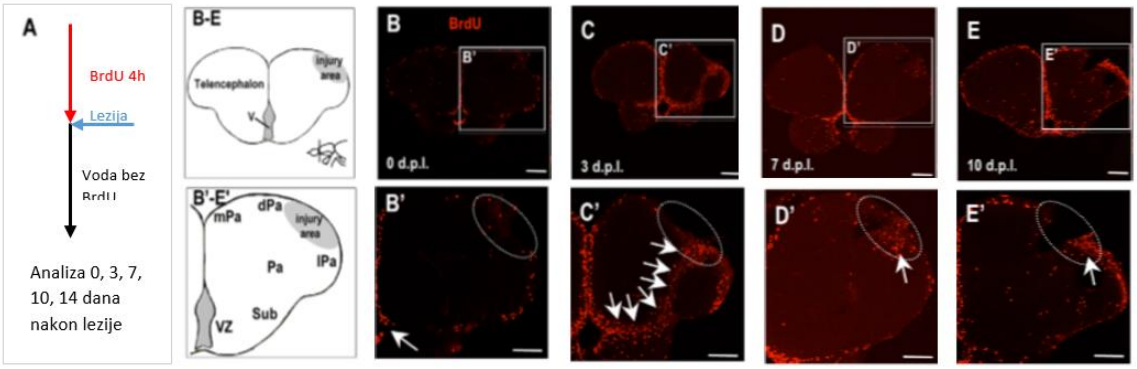


Slika 7. Radijalna glijalna vlakna vode nove stanice u cerebelumu vrste *A. leptorhynchus*. 2 dana nakon unošenja BrdU. Crvena boja i strelice prikazuju nove stanice označene s BrdU, zelena boja prikazuje radijalna glijalna vlakna označena s GFAP. Nove stanice i radijalna glijalna vlakna su jedna do drugih. (preuzeto i prilagođeno iz Zupanc 2001).

Dva dana nakon inkorporacije BrdU, riba se žrtvuje, stanice označene s BrdU se pokazuju u apoziciji s radijalnim glijalnim vlaknima označenima s GFAP (Gheteu i Zupanc 2001).

Kishimoto i sur. (2012) su osim proliferacije nakon ozljede u telencefalonu zebrice, proučavali i migraciju neuralnih progenitorskih stanica na ciljna mjesta. U normalnim uvjetima, ventrikularna zona telencefalona konstantno opskrbljuje *bulbus olfactorius* novim stanicama. Označavanjem s BrdU, mogli su pratiti migraciju stanica iz ventrikularne zone telencefalona do mjesta ozljede. Odmah nakon ozljede, velik broj stanica uočen je u ventrikularnoj zoni telencefalona. 3 dana nakon ozljede, stanice su uočene u regijama *subpallium* i *pallium* telencefalona, koje čine poveznicu ventrikularne zone telencefalona s mjestom ozljede. U sljedećim danima, broj označenih stanica se smanjuje u ventrikularnoj zoni telencefalona, te u *subpallium* i *pallium*. Sve je više označenih stanica u mjestima u blizini mjesta ozljede(Slika 8).

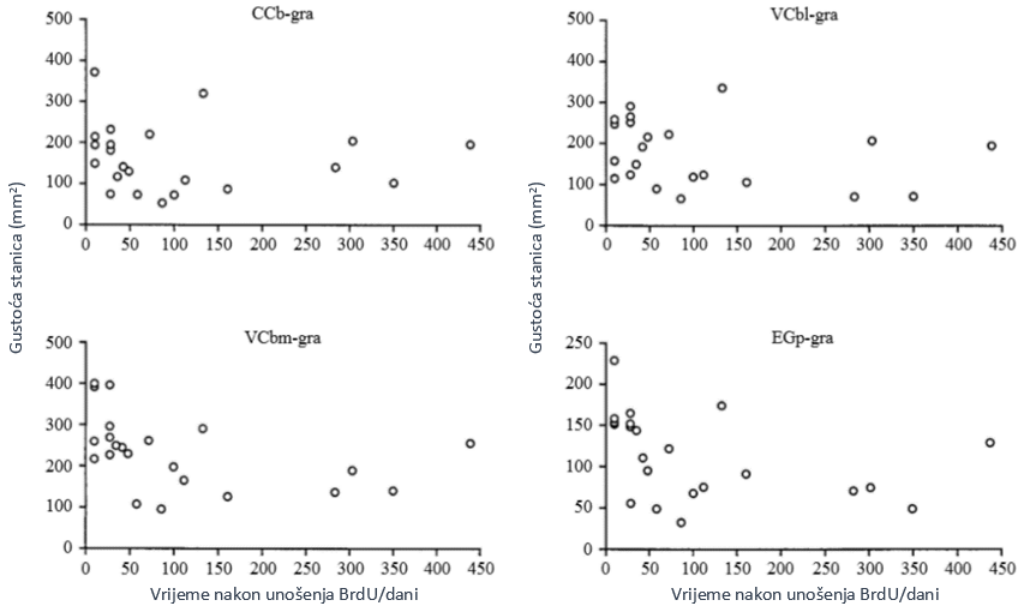
Broj stanica označenih s BrdU se s vremenom smanjio u ventrikularnoj zoni telencefalona jer su migrirale u mjesto ozljede preko puta koji uključuje *subpallium* i *pallium*.



Slika 8. Distribucija stanica označenih s BrdU u telencefalonu s ozljedom. A) ribe su držane u vodi s BrdU 4 sata, zatim je stvorena lezija, analiza u više navrata. B-E) sekcija mozga u kojima se analizirala količina BrdU-označenih stanica 0, 3, 7 i 10 dana nakon lezije. Strelice prikazuju mjesta velike količine BrdU-označenih stanica. Istočkano zaokružene regije prikazuju mjesto ozljede. B'-E') bliža snimka; VZ – ventrikularna zona telencefalona; Sub – *subpallium;* Pa –*pallium;* (preuzeto i prilagođeno iz Kishimoto i sur., 2012).

2.1.4. Uloga apoptotičke smrti stanica

Nakon dolaska na ciljna mjesta u cerebelumu, gustoća novih stanica se smanjuje za oko 50% u vremenu 4-7 tjedana nakon njihovog nastanka (Slika 9.)(Zupanc i sur. 1996; Zupanc, 1999). To se pripisuje apoptotičkoj smrti stanica – procesu programirane smrti stanica kod mnogostaničnih organizama te ona nije posljedica neke traume i strogo je regulirana.



Slika 9. Gustoća stanica označenih s BrdU kroz vrijeme nakon unošenja BrdU u granularnim slojevima 4 odjeljka cerebeluma vrste *A. leptorhynchus*. CCb-gra – granularni sloj strukture *corpus cerebelli* VCbl-gra – granularni sloj strukture *valvula cerebelli pars lateralis;* VCbm-gra – granularni sloj strukture *valvula cerebelli pars medialis;* EGp-gra – granularni sloj strukture *eminentia granularis pars posterior* Novosintetizirane stanice najviše migriraju u te 4 regije. Nakon 4-7 tjedana (25-50 dana) nakon generacije stanica njihova gustoća se smanjuje, nakon čega broj stanica ostaje relativno stalan. (preuzeto i prilagođeno iz Zupanc, 1999).

Navedeni princip eliminacije stanica je pretpostavljen zbog rezultata eksperimenta u kojem su markirani 3'-OH krajevi DNA metodom TUNEL (eng. *terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*) koja detektira lomove DNA tijekom apoptoze (Gavrieli i sur., 1992). Primjenom TUNEL metode na mozgu *A. leptorhynchus* primjećuje se velik broj stanica u apoptozi u granularnim slojevima triju odjeljaka cerebeluma, dok je u molekularnim slojevima apoptoze malo(Soutschek i Zupanc, 1996).

Iz toga se zaključuje da je apoptotička smrt stanica mehanizam regulacije broja novonastalih stanica nakon što se one nađu na ciljnim područjima u cerebelumu.

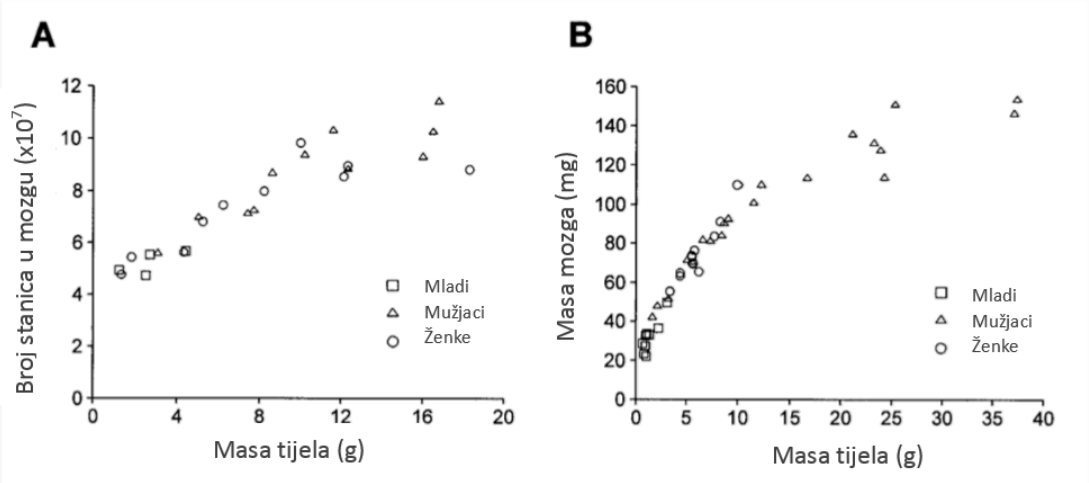
2.1.5. Opstanak novih stanica

Pitanje vijeka novonastalih stanica proučen je kod dvije vrste – *A. leptorhynchus* i zebrice, *Danio rerio*.

U mozgu *A. leptorhynchus* sve nove stanice koje nisu eliminirane apoptozom, nastavljaju funkcionirati cijeli životni vijek ribe. To potvrđuju eksperimenti u kojima je upotrjebljen BrdU koji traje do 440 dana, a to je duljina vremena polovine odraslog života vrste (Zupanc i sur., 1996). Uz dugoročno preživljavanje stanica, zajedno sa konstantnim nastajanjem novih stanica, dolazi do trajnog rasta cijele moždane mase (osim kod starijih riba) što je usporedno s rastom cijelog tijela vrste(Slika 10.).Dok se masa tijela poveća s 1g na 16g, broj stanica mozga se udvostruči; s $5x10^7$ na $1x10^8$(Zupanc i Horschke, 1995; Zupanc, 2001).

Nove stanice zebrice u velikom broju regija u mozgu pokazuju dugoročno preživljavanje od najmanje 292 dana, dok je njihov životni vijek oko 3,5 godina (Zupanc i sur., 2005). ovih 292 dana pokriva četvrtinu cijelog životnog vijeka.

I u mozgu sisavaca je uočeno dugoročno preživljavanje novih stanica – u granularnom sloju hipokampusa odraslog miša, novi neuroni preživljavaju oko 11 mjeseci, odnosno polovinu životnog vijeka miša (Kempermann i sur., 2003).



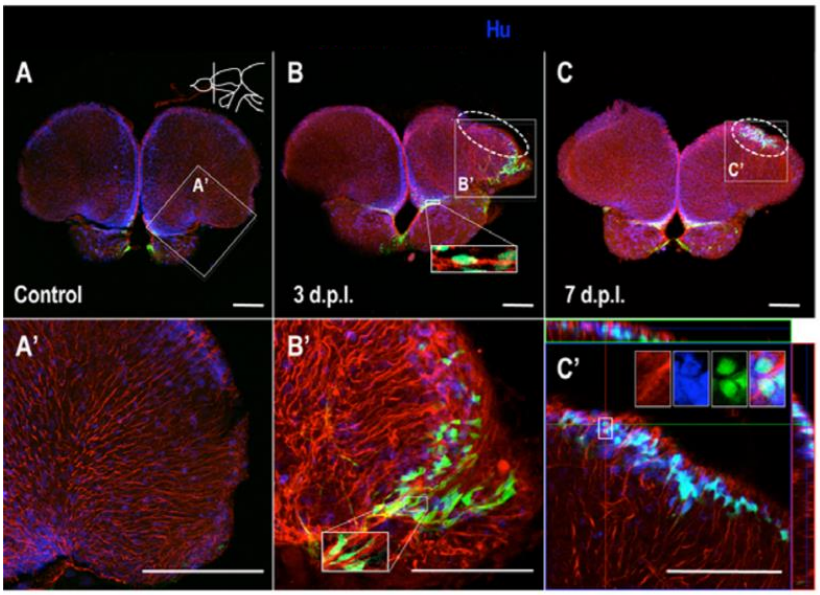
Slika 10. A) ukupan broj stanica u mozgu i B) masa mozga naprema masi tijela *A. leptorhynchus*.
(preuzeto i prilagođeno iz Zupanc, 2001)

2.1.6. Neuralna diferencijacija

Za otkrivanje diferenciranja novih stanica kod zebrice, provedena su istraživanja koja koriste dvostruko označavanje kombinacijom anti-BrdU imunohistokemije i imunobojanjem neuron-specifičnog protein Hu. rezultati dokazuju da 9 mjeseci nakon unošenja BrdU, oko 50% svih novih stanica eksprimira protein Hu (Zupanc i sur., 2005; Hinsch i Zupanc, 2007). Te nove stanice su obilne u dorzalnom telencefalonu, ali postoje i u drugim regijama mozga.

50% svih stanica označenih s BrdU, nakon 7-10 mjeseci nalazi se u granularnom sloju *corpus cerebelli* i *valvula cerebelli pars lateralis* i *pars medialis*. Prema tome se može zaključiti da nove stanice diferenciraju u granularne stanice. To je dokazano označavanjem kombinacijom BrdU i neuronalnog praćenja na *A. leptorhynchus*(Zupanc i sur., 1996) i na zebrici (Zupanc i sur., 2005). Granularne stanice su retrogradno praćene od granularnog sloja do molekularnog sloja, što znači da su ugrađene u postojeće neuralne mreže neurona cerebeluma.

Kishimoto i sur. (2012) istražili su i diferencijaciju novih stanica u mjestu ozljede. Morfologija stanica koje su migrirale se razlikovala od onih koje su u regijama oko mjesta ozljede. Stanice u migraciji, koje se nalaze uz radijalna glijalna vlakna, izduženog su oblika, dok su stanice u ozlijeđenim regijama okrugle što bi značilo da više ne migriraju već da su stale kako bi mogle diferencirati. Za praćenje diferencijacije tih novih stanica, pratila se ekspresija proteina Hu. Većina novih stanica u ventrikularnoj zoni telencefalona i u migratornom putu ne eksprimira Hu, dok većina novih stanica u mjestu ozljede izražava Hu protein (Slika 11). Sve to ukazuje na to da nove stanice koje migriraju nisu zrele i dok se nađu u regijama kod mjesta ozljede diferenciraju u zrele neurone.



Slika 11. Mozak zebrice, *Danio rerio*. Nove stanice diferenciraju u neurone na mjestu ozljede. A-C) detektira se protein Hu označen plavom bojom, A) kontrola, B) 3 dana nakon lezije, C) 7 dana nakon lezije, A'-C') bliže snimke. Mjesto ozljede je istočkano zaokruženo. Većina stanica pozitivnih na Hu se nalazi u mjestu ozljede.
(preuzeto i prilagođeno iz Kishimoto i sur., 2012).

2.2. Neuralna Regeneracija

Proces adultne neurogeneze, koji je prethodno opisan i predstavlja generaciju neurona u netaknutom mozgu, blisko je povezan s fenomenom neuralne regeneracije. To je sposobnost da se zbog ozljede ili neurodegenerativne bolesti, oštećeni ili izgubljeni neuroni zamjene novim neuronima koji su tada aktivno uključeni u neuralne krugove u mozgu. Regeneracija neurona također predstavlja razliku između riba i sisavaca, pošto je kod sisavaca vrlo ograničena i nakon ozljede dolazi do velikih gubitaka(Zupanc, 2001).

Zebrica, *Danio* rerio, ima mogućnost obnavljanja svih tkiva. U središnjem živčanom sustavu, do regeneracije dolazi u retini, optičkom živcu, leđnoj moždini i cerebelumu (Maler i sur., 1991). Regeneracija centara ljudskog mozga pomoću matičnih stanica je cilj mnogih znanstvenika jer bi se time omogućila terapija neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove, amiotrofične lateralne skleroze, kao i terapija nakon ozljeda mozga ili moždanog udara. Kod zebrice je jako izražena adultna neurogeneza i u usporedbi sa sisavcima je raširena na puno više područja u mozgu. Kod *A. leptorhynchus* regeneracija neurona je intenzivno proučavana na leđnoj moždini i cerebelumu.

2.2.1. Paradigma lezija

Lezije su abnormalne promjene ili oštećenja tkiva uzrokovane ozljedom ili bolešću. Lezije u različitim strukturama središnjeg živčanog sustava (SŽS) se vrše na više načina:

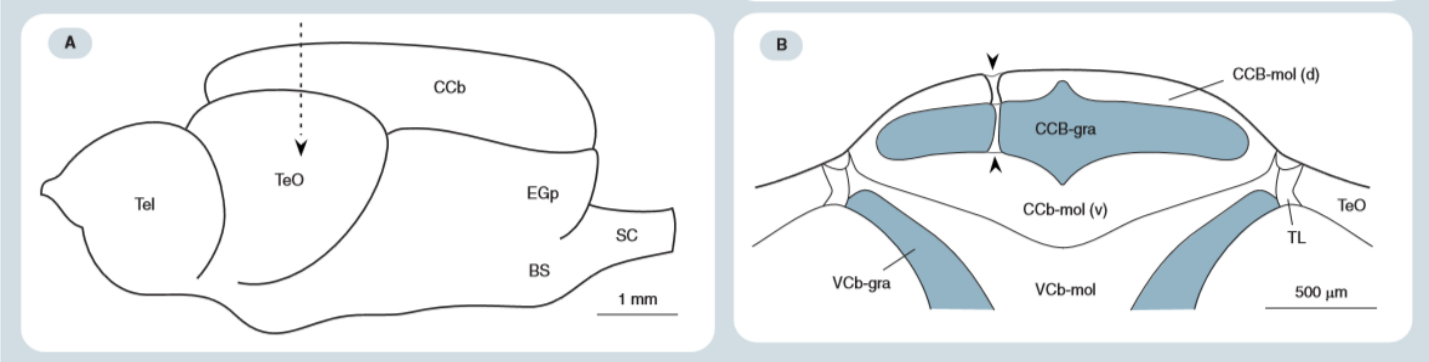
1) Kirurško stvaranje lezija
2) Lasersko stvaranje lezija
3) Stvaranje lezija svjetlošću
4) Kemijsko odstranjivanje tkiva
5) Transgena ekspresija toksičnih proteina
6) Transgeno tkivno-specifično odstranjivanje

Svaka od ovih tehnika je pogodna za određenu strukturu SŽS-a ili više njih. (Fleish i sur., 2010)

2.2.1.1. Regeneracija cerebeluma *A. leptorhynchus*

Uzrokovanjem lezija na cerebelumu vrste *A. leptorhynchus* izučava se regeneracija mozga. Paradigma lezija vidi prednost u tome što se *corpus cerebelli* nalazi na vrhu mozga i prekriva ostale dijelove mozga, osim telencefalona.

Lezije na cerebelumu se vrše kirurški, odnosno probodom preko lubanje anestezirane ribe sa sterilnom iglom, te se time ne oštećuju ostali dijelovi mozga. Ubod u cerebelum dubok je oko 1mm i obuhvaća i molekularni i granularni sloj *corpus cerebelli*(Slika 12) (Zupanc i sur., 1998; Zupanc, Zupanc, 2006b).

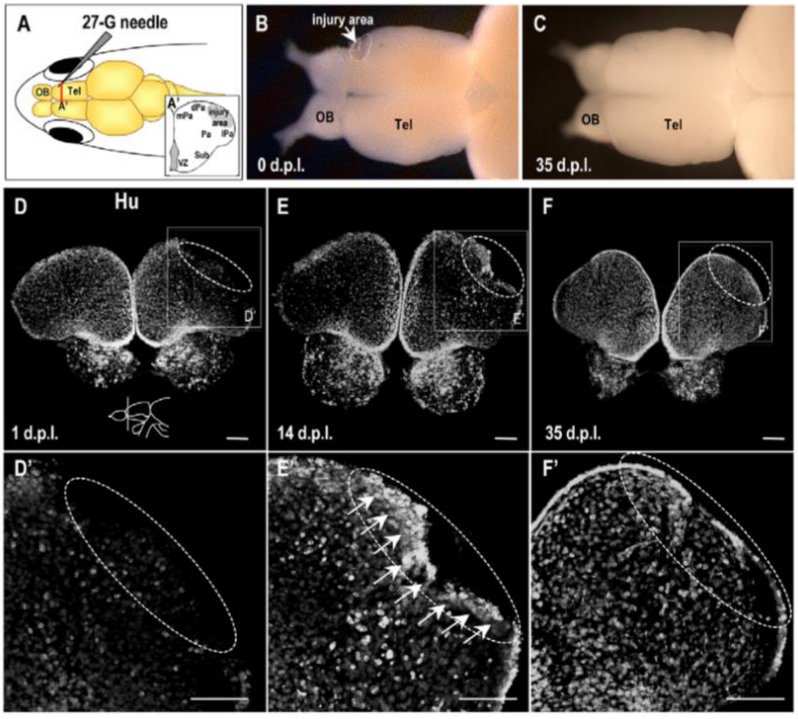


Slika 2. A) postrani pogled na mozak *A. leptorhynchus*. CCb – *corpus cerebelli* se nalazi da vrhu mozga i prekriva sve osim telencefalona (Tel), pa se lezije lako vrše na tom dijelu mozga bez oštećenja drugih dijelova. B) poprečan prerez kroz *corpus cerebelli* napravljen na mjestu koje prikazuje strelica na slici A), strelice na slici B) prikazuju mjesto lezije, proteže se preko molekularnog sloja dorzalnog dijela (CCB-mol(d)) i granularnog sloja (CCB-gra) (Zupanc, Zupanc, 2006b)

Bojanjem po Nisslu pokazalo se da prvotni put uboda igle postaje sve manji kroz vrijeme i nakon nekoliko tjedana nestaje. To ukazuje na brzo obnavljanje neurona nakon lezije (Zupanc i sur., 1998).

2.2.1.2. Regeneracija telencefalona zebrice

Kishimoto i sur. (2012) razvili su model ozljede telencefalona kod odrasle zebrice. Da bi uzrokovali traumatičnu ozljedu mozga, koristili su 27-inchnu iglu kojom su proboli dorzoventralnu domenu jedne hemisfere telencefalona. Prateći ekspresiju Hu proteina, proučavali su zamjenjuju li se neuroni u vremenu od 1 do 35 dana nakon lezije. Nakon 1 dana uočava se gubitak neurona na mjestu ozljede. Nakon 14 dana na mjestu ozljede dolazi do ekspresije Hu proteina, odnosno postoje stanice koje ga eksprimiraju, a istovremeno se sama lezija smanjuje. Nakon 35 dana uočava se znatni oporavak dijela na kojem je bila lezija i regeneracija stanica(Slika 13). Prema tome, telencefalon zebrice se može regenerirati.



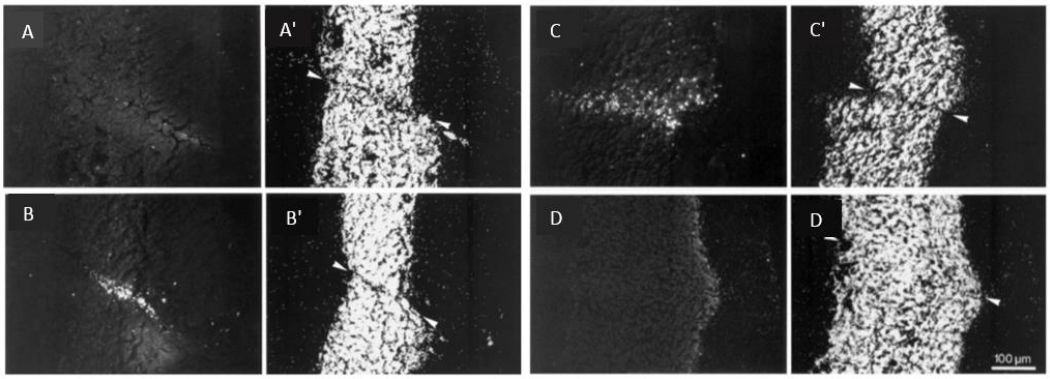
Slika 13. Oporavak telencefalona mozga zebrice. A) prikaz stvaranja lezije, B) 0 dana nakon lezije, C) 35 dana nakon lezije, primjećuje se smanjenje ozljede. Mjesto lezije je istočkano zaokruženo. D-F) detektira se protein Hu, D)1 dan nakon lezije, E) 14 dana nakon lezije, F) 35 dana nakon lezije. D'-F') bliže snimke, strelice prikazuju nakupljene protein Hu-pozitivne stanice na mjestu ozljede.
(preuzeto i prilagođeno iz Kishimoto i sur., 2012).

Čini se da je taj veliki potencijal regeneracije kod ove dvije vrste posredovan s dva procesa: eliminacijom oštećenih stanica (Zupanc i sur., 1998) i zamjenom tih s novih stanicama.

2.2.2. Uklanjanje oštećenih stanica

Brza eliminacija oštećenih stanica apoptozom je bitan proces u obnovi oštećenih tkiva (Zupanc i sur., 1998). Upravo je to razlika u funkciji apoptoze razlikuje između riba i sisavaca. Kod sisavaca se osim apoptoze događa i nekroza koja je češći način umiranja stanica nakon lezija (Kerr i sur., 1987). Dovodi do upale u mjestu ozljede čime je potaknuta daljnja nekroza i nastaju šupljine bez stanica u mozgu (Zhang i sur., 1997). Nastaju i ožiljci koji okružuju te šupljine i onemogućuju srastanje živčanih vlakana pa i migraciju novosintetiziranih stanica u mjesto lezije.

U vrste *A. leptorhynchus*, već nakon 5 min nakon nanošenja ozljede na cerebelumu prepoznaju se prve stanice koje su u apoptozi. Nakon 30 min, broj stanica u apoptozi je maksimalan. Nakon 2 dana se apoptoza smanjuje, do 20. dana kad se stabilizira na minimalnim razinama(Zupanc i sur., 1998). (Slika 14.)



Slika 14. A-D) Stanice označene metodom TUNEL na mjestu lezije, A'-D') stanica označene s DAPI obrnutim bojanjem,
A-A') 5 min nakon unošenja TUNEL-a, B-B') 30 min, C-C') 1 dan, D-D') 20 dana. Strelice označavaju mjesto lezije. U prvih 30 min broj TUNEL-pozitivnih stanica se povećava, nakon 1 dana još njihov broj je još uvijek visok, do 20 dana se smanjuje do minimuma. (preuzeto i prilagođeno iz Zupanc i sur., 1998)

Za razliku od nekroze, koju karakterizira upala oštećenog tkiva na mjestu ozljede, apoptozu karakterizira smanjenje stanica, kondenzacija i stvaranje čestica okruženih membranom koje druge stanice uklanjaju. Upravo je zbog toga apoptoza kao proces za eliminaciju oštećenih stanica bitna komponenta za veliku moć regeneracije u ove vrste.

Ipak, mora postojati proces koji bi spriječio nekontroliranu i nezaustavljivu apoptozu svih stanica nakon ozljede. Može biti da to omogućuje calbindin-D_{28k} signalizacija. Ovaj vitamin D-ovisan kalcij-vezujući protein postupno se sve više eksprimira u granularnim neuronima u regijama okolnim mjestu lezije u vremenu od 16h do 7 dana nakon ozljede (Zupanc i Zupanc 2006a). On djeluje puferski na slobodni intracelularni Ca^{2+} (njegova se koncentracija povećava nakon ozljede mozga).

Mikroglija, oblik makrofaga specifičan za živčane stanice i dio imunološkog sustava, služe za uklanjanje svih oštećenih stanica. 3 dana nakon stvaranja lezije, gustoća mikroglija na tom mjestu se povećava (Zupanc i sur., 2003). Nakon 10-ak dana nakon lezije je ta gustoća najveća, a nakon 1 mjesec se stabilizira na minimalnim razinama. Takav porast u gustoći mikroglija nakon stvaranja lezije znači da su mikroglija zaslužne za uklanjanje ostataka stanica nakon apoptoze.

2.2.3. Zamjena oštećenih s novim neuronima

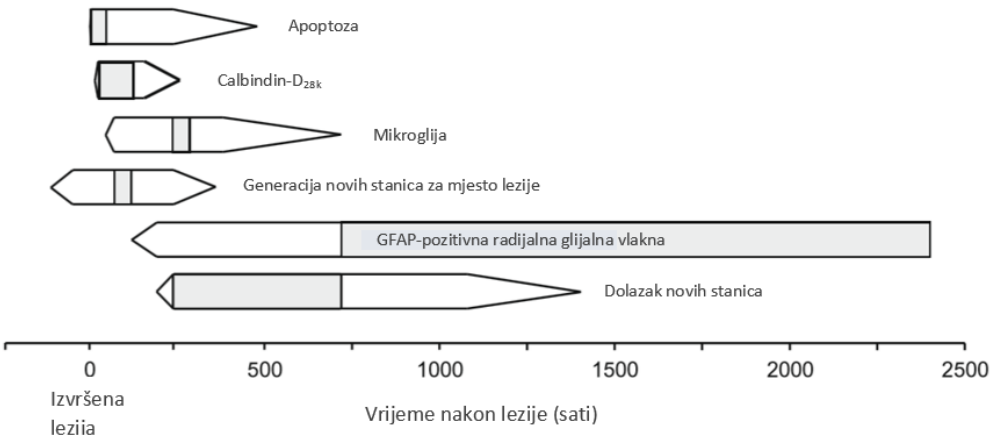
Još jedan bitan proces u obnavljanju oštećenog tkiva mozga je zamjena stanica uklonjenih apoptozom s novosintetiziranim stanicama. Te nove stanice nastaju nakon ozljede u proliferacijskim zonama koje se aktiviraju nakon lezije, i nastaju konstantno u proliferacijskim zona diljem mozga (Zupanc i Ott, 1999). Proliferacija nije strogo regulirana i najviše novih stanica se sintetizira 5 dana nakon lezije. To je zbog induktivnog efekta uzrokovanog ozljedom. Osim toga, u obnovi oštećenog tkiva ulogu imaju i stanice koje su sintetizirane prije same ozljede. Označavanjem BrdU, dokazano je da te stanice mogu biti stare i do 2 dana prije lezije (Zupanc i Ott, 1999). Upravo ta mogućnost da i prije sintetizirane stanice sudjeluju i regeneraciji tkiva ukazuje na povezanost neurogeneze, odnosno stalne stanične proliferacije, i neuralne regeneracije. Time je sama regeneracija ubrzana i to pruža ribama prednost u obnovi tkiva nakon ozljede.

2.2.4. Migracija i diferencijacija novih stanica nakon ozljede

Iz zona proliferacije, nove stanice moraju migrirati do mjesta lezije. Kao što je već spomenuto, u migraciji im pomažu radijalna glijalna vlakna. 8 dana nakon lezije, gustoća radijalni glijalnih vlakana se znatno poveća u usporedbi s gustoćom u netaknutom mozgu (Clint i Zupanc 2001). Radijalna glijalna vlakna se prepoznaju morfološki i imunohistokemijskim GFAP bojanjem. Proces migracije preko radijalnih glijalnih vlakana se nakon ozljede uočava isključivo na strani mozga gdje je ozljede i najviše u blizini ozljede, što se prepoznaje po gustoći GFAP. 2 dana nakon, povećava se i gustoća novih stanica u navedenim područjima. Proporcionalnost porasta gustoće radijalnih glijalnih vlakana i gustoće novih stanica, te njihovo pojavljivanje zajedno ukazuje na već spomenuto, da radijalna glijalna vlakna vode i usmjeravaju nove stanice prema mjestu ozljede.

Vimentin u radijalnim glijalnim vlaknima u mjestu lezije se sve više eksprimira 15 dana nakon lezije i ostaje u velikim količina do 100 dana. Vlakna koja eksprimiraju GFAP se uglavnom nalaze u regijama udaljenijima od lezije od onih koje eksprimiraju vimentin, a većina novih stanica u mjesto lezije dolazi prije eksprimiranja vimentina. Zbog toga se smatra da vimentin ne potpomaže migraciji novih stanica do mjesta lezije, već da ima ulogu u diferencijaciji, razvoju, rastu dendrita itd. (Clint i Zupanc 2002).

Cijeli proces i svi događaji regeneracije neuralnih stanica nakon lezije sažeto su prikazani na slici 15.



Slika 15 Shematski prikaz događaja uključenih u regeneraciju neuralnih stanica na mjestu ozljede mozga. 1. apoptoza stanica na i u blizini mjesta lezije. 2. ekspresija calbindin-D_{28k}. 3. povećanje gustoće mikroglija. 4.generacija novih stanica koje odlaze na mjesto ozljede, stanice generirane prije ozljede su također uključene u proces. 5. povećanje gustoće GFAP-pozitivnih radijalnih glijalnih vlakana na i u blizini mjesta lezije. 6. dolazak novih stanica na mjesto lezije. Osjenčana područja prikazuju vrhunac svakog događaja. Prije osjenčanih područja su razdoblja povećanja efekta događaja, a nakon su područja smanjenja. (preuzeto i prilagođeno iz Zupanc, 2008)

Dokazano je da su barem dio novih stanica, koje zamjenjuje oštećene neurone, cerebelarne granularne stanice – koje su ujedno i tip stanica uništene nanošenjem ozljede (Zupanc i Ott, 1999). Koristilo se označavanje s BrdU i neuronalno retrogradno praćenje i pokazalo se su novi granularni neuroni stvorili aksone i da se protežu od granularnog sloja do molekularnog sloja u *corpus cerebelli*, što sugerira da su se nove stanice uključile u postojeće neuralne krugove u cerebelumu.

2.2.5. Molekularni pogled na neuralnu regeneraciju

Sve do sada navedene procese u neuralnoj regeneraciji pokreće i njima upravlja velik broj molekularnih signala. Otkrivanjem koji su to signali dolazi se do spoznaje kako fenomen regeneracije mozga postoji kod riba, a ne i kod sisavaca, te koji su molekularni faktori koji sprječavaju regeneraciju mozga kod sisavaca.

2.2.5.1. Identifikacija jednog proteina povezanog s regeneracijom

U nedavnoj povijesti, za otkrivanje molekularnih mehanizama regeneracije neurona koristio se pristup gdje se izabire jedan protein i proučavaju se promjene u njegovoj učestalosti i gustoći nakon nanošenja ozljede na mozgu. Biranje proteina koji će se pratiti temelji se na bar jednoj od tri teze: 1) protein koji sudjeluje u neuralnoj regeneraciji kod jedne vrste možda sudjeluje u regeneraciji neke druge vrste. 2) protein koji sudjeluje u regeneraciji nekih tkiva možda sudjeluje u regeneraciji nekih drugih tkiva, uključujući i neuralnog. 3) protein koji usmjerava određene korake u embriološkom ili adultnom razvoju netaknutih organizama može imati funkciju u regeneraciji. Prema tim tezama su identificirani proteini povezani s regeneracijom u *corpus cerebelli* kod vrste *A. leptorhynchus*. (Zupanc, 2008)

Od njih, najistraženiji je neuropeptid somatostatin, hormon koji sudjeluje u regulaciji hormona rasta tako što ga inhibira. Proučavanjem somatostatina i njegove uloge u regeneraciji cerebeluma saznalo se da mali broj stanica pokazuje imunoreaktivnost na somatostatin u netaknutom mozgu. Ali se nakon 1 dana broj tih stanica povećao u području mjesta lezije, a nakon 2 dana je u maksimumu (Zupanc, 1999). U periodu 5-10 dana nakon lezije, njihov se broj smanjuje do minimalne vrijednosti.

Nadalje, radijalne glijalne stanice koje u netaknutom mozgu ne pokazuju imunoreaktivnost na somatostatin, drastično povećaju njegovu ekspresiju u prvih 12h

nakon ozljede, pa se u sljedećih nekoliko dana ta koncentracija minimalizira (Zupanc i Clint, 2001).

Taj vremenski period, u kojem nastaje velika količina somatostatina, se podudara s periodom kad se nove stanice generiraju. Zbog toga je moguće da somatostatin ima ulogu u regulaciji stanične proliferacije.

Ovakav pristup zahtjeva dostupnost specifičnih antitijela za određivanje obilnosti proteina, što može biti kompliciranо pošto je većina postojećih antitijela usmjerena prema sisavcima pa ne bi bila uspješna za označavanje u tkivima riba. Također, potrebno je često pregledavanje mjesta ozljede u mozgu da bi se ustanovila učestalost proteina, što zahtjeva dosta vremena i napora. Posljedično tome, gotovo je nemoguće identificirati dovoljno velik broj proteina koji bi odražavao složenost tih molekularnih procesa.

2.2.5.2. Identifikacija s-regeneracijom-povezanih proteina većih razmjera

Zbog lošijih strana prethodne metode, razvijen je novi pristup za istraživanje molekularnih mehanizama pri regeneraciji neurona. Tim pristupom je moguće provesti identifikaciju većih razmjera gdje se identificiraju svi proteini uključeni u regeneraciju (Zupanc i Zupanc, 2006b). Ovakav pristup je prikazan na regeneraciji *corpus cerebelli* vrste *A. leptorhynchus* i bazira se na kombinaciji paradigme lezija i analize proteoma.

Analizom cerebelarnog tkiva 3 dana nakon lezije (vrijeme kad je najveća stopa proliferacije stanica za obnovu oštećenog tkiva) (Zupanc i Ott, 1999) otkriveno je da je na 2D gelu za elektroforezu proteina intenzitet proteina znatno drugačiji u 53 od ukupno 800 oznaka proteina. Obzirom da je ispitivanje ograničeno na citosolne proteine i proteine s izoelektričnom točnom 4-7, smatra se da je ukupan broj proteina uključenih u regeneraciju cerebeluma ipak veći od 53, odnosno nadmašuje 100. (Zupanc i sur., 2006.) 24 od navedenih 53 proteina moguće je identificirati metodama: *peptide mass fingerprinting*i *peptide mass spectrometry*/*mass spectrometry fragmentation*.

Ti proteini se dijele u 3 grupe:

1) Prva grupa uključuju citoskeletne proteine bitne za formiranje novih stanica. To su npr. ß-aktin (Ekspresija ß-aktina je povezana s regeneracijom aksona u mjestu lezije) i ß-tubulin (povećanje količine ß-tubulina je povezano s regeneracijom endotelnog tkiva u mjestu lezije). Uključuje i proteine koji posreduju u pravilnom sklapanju tih strukturalnih proteina. Tu spada polipeptidni kompleks 1 koji sadrži šaperone.
2) Druga grupa su proteini koji su vjerojatno uključeni u staničnu proliferaciju, migraciju, i dovođenje energije.
3) Treća skupina je samo jedan protein, cink-finger 2 iz koštane srži. On regulira transkripciju gena drugih proteina i moguće je da je regulator procesa regeneracije. (Zupanc, 2008)

3. ZAKLJUČAK

U usporedbi sa sisavcima, ribe imaju veliku sposobnost kontinuiranog stvaranja novih neurona (adultna neurogeneza) te time i veliku moć regeneracije neuralnog tkiva, odnosno mogućnost obnove oštećenih neurona nakon traume. Neuralna regeneracija se događa preko nekoliko procesa, od uklanjanja oštećenih stanica apoptozom, uz djelovanje mikroglija koje odstranjuju stanične ostatke, i sinteze novih stanica staničnom proliferacijom koje zamjenjuju oštećene stanica, do migracije novih stanica do mjesta oštećenja mozga, uz radijalna glijalna vlakna, i njihovog opstanka i diferencijacije u zrele neurone koji se uključuju u postojeće neuralne krugove.

Ispitivanjem molekularnih mehanizama regeneracije i saznanjem što kod riba potiče i omogućuju takvu veliku sposobnost regeneracije, u budućnosti bi se moglo otkriti zašto ti procesi ne postoje kod sisavaca i mogu li se ikako potaknuti, te bi to uvelike doprinijelo liječenju neurodegenerativnih bolesti i trauma mozga kod ljudi. Dakle, usporedbom procesa regeneracije sisavaca i riba mogli bi se uspostaviti načini za nadilaženje granica tih procesa kod sisavaca.

4. LITERATURA

Alenzi FQB, Bahkali AH. Stem cells: Biology and clinical potential. Afr J Biotechnol 2011;10:19929–40) Stem cells: Biology and clinical potential. Afr. J. Biotechnol.;10:19929–40

Altman, J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science 135:1127–1128

Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. J. Comp. Neurol.;137:433–57.

Ardviddson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke, Nat. Med. 8, 963-970.

Bhattarai, P., Kuriakose Thomas, A., Zhang, Y., Kizil, C. (2017) The effects of aging on Amyloid-β42-induced neurodegeneration and regeneration in adult zebrafish brain, Neurogenesis

Cameron, H.A., McKay, R.D. (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 435:406–417

Clint, S.C., Zupanc, G.K.H. (2001) Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, Apteronotus leptorhynchus: guidance of migrating young cells by radial glia. Dev. Brain Res. 130:15–23

Clint, S.C., Zupanc, G.K.H. (2002) Up-regulation of vimentin expression during regeneration in the adult fish brain. NeuroReport 13:317–320

Dahm, R., Geisler, R. (2006) Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species, Mar. Biotechnol. 8, 329-345.

Fawcett, J., Asher, R. (1999) The glial scar and central nervous system repair. Brain Research Bulletin, Vol. 49, No. 6, pp. 377–391, 1999

Fleish, V., Fraser, B., Allison, W. (2010) Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: Lessons from zebrafish genetics and other fish species. Biochimica et Biophysica Acta 1812:364-380

Gajović, S. (2012) Regeneracija mozga: od neuroznanstvene nade do bioetičkog problema. JAHR Vol. 3 No. 5. UDK 616.831:17

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119:493–501

Gheteu, A., Zupanc, G.K.H., (2001) Radial glia in the cerebellum of adult teleost fish: implications for guidance of migrating new neurons. 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, Society for Neuroscience, Washington, DC, Abstract 692.1

Hinsch, K., Zupanc, G.K.H. (2007) Generation and long-term persistence of new neuron sin the adult zebrafish brain; a quantitative analysis. Neuroscience 146:679-696.

Hinsch, K., Zupanc, G.K.H. (2006) Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. J. Neurosci. Meth. 158:75-88

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H. (2003) Early determination and long-term persistence of adult generated new neurons in the hippocampus of mice. Development 130:391–399

Kerr, J.F.R., Searle, J., Harmon, B.V., Bishop, C.J. (1987) Apoptosis. In: Potten CS (eds) Perspectives on mammalian cell death. Oxford University Press, Oxford, p.p. 93–128

Kishimoto, N., Shimizu, K., Sawamoto, K. (2012) Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. Dis Model Mech. 2012:5(2): 200–9

Kizil, C. (2018) Mechanisms of Pathology-Induced Neural Stem Cell Plasticity and Neural Regeneration in Adult Zebrafish Brain. Current Pathobiology Reports 6:71–77

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science 264:1145–1148

Maler, L., Sas, E., Johnston, S., Ellis, W. (1991) An atlas of the brain of the electric fish Apteronotus leptorhynchus. J. Chem. Neuroanat. 4, 1–38

Merlini, G., Belloti, V. (2003) Molecular Mechanisms of Amyloidosis. N. Engl. J. Med. 349:583-96.

Pouwels, E. (1978a) On the development of the cerebellum of the trout, Salmo gairdneri: I. Patterns of cell migration. Anat. Embryol. 152:291–308

Sas, E., Maler, L. (1987) The organization of afferent input to the caudal lobe of the cerebellum of the gymnotid fish Apteronotus leptorhynchus. Anat. Embryol. 177:55–79

Soutschek J, Zupanc GKH (1996) Apoptosis in the cerebellum of adult teleost fish, Apteronotus leptorhynchus. Dev Brain Res 97:279–286

Temple, S. (2001) The development of neural stem cells. Nature;414:112–7.

Voigt T (1989) Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. J Comp Neurol 289:74–88

Zhang Z, Krebs CJ, Guth L (1997) Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. Exp. Neurol. 143:141–152

Zupanc, G.K.H. (2008) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish, Journal of Physiology – Paris 102:357-373

Zupanc, G.K.H. (2001) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. Brain Behav. Evol. 58:250–275

Zupanc, G.K.H. (1999) Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. J. Exp. Biol. 202:1435–1446

Zupanc, G.K.H., Clint, S.C. (2003) Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. Glia 43:77–86

Zupanc, G.K.H., Clint, S.C., Takimoto, N., Hughes, A.T.L., Wellbrock, U.M., Meissner, D. (2003) Spatio-temporal distribution of microglia/macrophages during regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, Apteronotus leptorhynchus: a quantitative analysis. Brain Behav. Evol. 62:31–42

Zupanc, G.K.H., Hinsch, K., Gage, F.H. (2005) Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. J. Comp. Neurol. 488:290–319

Zupanc, G.K.H., Horschke, I., (1995) Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish; a quantitative mapping study. J. Comp. Neurol. 353:213-233

Zupanc, G.K.H., Horschke, I., Ott, R., Rascher, G.B. (1996) Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. J. Comp. Neurol. 370:443–464

Zupanc, G.K.H., Kompass, K.S., Horschke, I., Ott, R., Schwarz, H. (1998) Apoptosis after injuries in the cerebellum of adult teleost fish. Exp. Neurol. 221–230

Zupanc, G.K.H., Ott, R. (1999) Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. Exp. Neurol. 160:78–87

Zupanc, G.K.H., Zupanc, M.M. (2006b) New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. Regenerative Med. 1. 207-216.

Zupanc, M.M., Wellbrock, U.M., Zupanc, G.K.H. (2006) Proteome analysis identifies novel protein candidates involved in regeneration of the cerebellum of teleost fish. Proteomics 6, 667-696.

Zupanc, M.M., Zupanc, G.K.H. (2006a) Upregulation of calbindin-D_{28k} expression during regeneration in the adult fish cerebellum. Brain Res. 1095:26-34

Web 1 www.arkive.org

Web 2 www.fishbase.de