



Εθνικό και Καποδιστριακό
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ
ΤΟ ZEBRAFISH**

ΔΕΛΗΚΟΥΡΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΑΜ: 225608

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : **DR ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ,**
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: DR ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΕΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ',
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑ ΙΣΙΔΩΡΑ ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

DR ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΕΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ', ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

DR ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Οκτώβριος 2017

Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στους εποπτευόντες Καθηγητές και Ερευνητές, αλλά και σε όλη την ερευνητική ομάδα του ΙΙΒΕΑΑ για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ικανότητα αναγέννησης οργάνων ή εξαρτημάτων μετά από τραυματισμό ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Παρόλο που τα ενήλικα θηλαστικά έχουν περιορισμένο δυναμικό αναγέννησης, τα αμφίβια και οι τελεόστεοι ιχθύες, όπως το zebrafish (*Danio rerio*), μπορούν να αναγεννούν πλήρως πολλά εσωτερικά όργανα και εξαρτήματα. Το ουραίο πτερύγιο του zebrafish έχει οριστεί ως ένα εξαιρετικά επιτυχημένο μοντέλο για τη μελέτη βασικών μηχανισμών αναγέννησης των ιστών. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους σε αυτή τη διαδικασία, όπως τα μακροφάγοι και τα ουδετερόφιλα. Αυτοί είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της φλεγμονής κατά τη διάρκεια της επισκευής των ιστών των θηλαστικών. Για να ξεδιπλωθούν οι μηχανισμοί αναγέννησης, το ουραίο πτερύγιο αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων ενήλικων και προνυμφών zebrafish ακρωτηριάστηκε για να μελετηθεί τελικά το αναγεννώμενο μήκος του ουραίου πτερυγίου, το ποσοστό αναγέννησης, το πρότυπο έκφρασης των ουδετερόφιλων και η πιθανή αλληλεπίδρασή τους.

ABSTRACT

The capacity to regenerate organs or appendages after injury varies widely between species. Although adult mammals have limited regenerative potential, urodele amphibians and teleosts, like the zebrafish (*Danio rerio*), can fully regenerate many internal organs and appendages. The zebrafish caudal fin has emerged as a highly successful model for studying basic mechanisms of tissue regeneration. There are many factors that play distinct roles to that procedure as macrophages and neutrophils. These are key mediators of inflammation that immerge during mammalian tissue repair. To unravel the mechanisms of regeneration, the caudal fin of wild type and transgenic adult and larvae zebrafish was amputated in order to study the regeneration rate, the expression pattern of neutrophils and their possible interaction.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9-47
1.1. Το ζωικό μοντέλο zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	9
1.1.1. Ταξινόμηση zebrafish.....	9
1.1.2. Γεωγραφική εξάπλωση.....	9
1.1.3. Μορφολογία.....	10
1.1.4. Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish.....	12
1.1.5. Αναπαραγωγή.....	14
1.1.6. Διατροφή.....	15
1.2. Ηθική και πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα.....	15
1.2.1. Γενικά.....	15
1.2.2. Ηθικοί Περιορισμοί.....	17
1.2.3. Χρήση του zebrafish ως μοντέλο για την αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου.....	18
1.2.3.1. Γενικά.....	18
1.2.3.2. Πλεονεκτήματα του Zebrafish στην αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου.....	19
1.3. Ουραίο πτερύγιο.....	19
1.3.1. Γενικά-Δομή-Δημιουργία.....	19
1.4. Αναγέννηση ουραίου πτερυγίου.....	21
1.4.1. Αναγέννηση επιμορφικού τύπου.....	22
1.4.2. Δημιουργία του blastema.....	23
1.4.3. Ρυθμιστές κατά την αναγέννηση ουραίου πτερυγίου.....	26
1.4.4. Ανάπτυξη και μορφογένεση του αναγεννώμενου ουραίου πτερυγίου.....	28
1.5. Κύριοι ρυθμιστές της φλεγμονής κατά την αναγέννηση.....	30
1.5.1. Μακροφάγα και ουδετερόφιλα.....	30

1.5.2. Μονοπάτι wnt-β-κατενίνης.....	32
1.6. Ο ρόλος της τελομεράσης στην αναγέννηση και στη γήρανση.....	38
1.7. Δράση της κορτικοτροπίνης ορμόνης (cgh).....	44
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	48
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49-64
3.1. Πειραματόζωα.....	49
3.1.1. Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου.....	49
3.1.2. Διασταυρώσεις και χειρισμός των εμβρύων zebrafish.....	51
3.1.3. Ενήλικα zebrafish.....	53
3.2. Τεχνικές.....	55
3.2.1. Απομόνωση DNA από έμβρυα και ενήλικα zebrafish.....	55
3.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	56
3.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	58
3.2.4. Καθαρισμός προϊόντος PCR.....	60
3.2.5. Διαδικασία συμπίκνωσης.....	60
3.2.6. Γονοτυπική ανάλυση.....	60
3.2.7. Απεικονιστικές μέθοδοι και στατιστική ανάλυση.....	61
3.2.8. Διαδικασία κοπής και σήμανσης ουράς στο Zebrafish κατά την μελέτη αναγέννησης και έκφρασης ουδετερόφιλων.....	61
3.2.9. Μεθοδολογία υπολογισμού δεδομένων κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	62
3.3. ΥΛΙΚΑ.....	63

3.3.1. Διαβίωση του πειραματικού μοντέλου zebrafish.....	63
3.3.2. Διασταυρώσεις και χειρισμός των εμβρύων των zebrafish.....	63
3.3.3. Απομόνωση DNA από έμβρυα και ενήλικα zebrafish.....	64
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65-82
4.1. Παθολογική μορφολογία ενήλικων <i>tert</i>^{-/-} zebrafish.....	65
4.1.1. Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου.....	65
4.2. Δυναμικό αναγέννησης ουραίου πτερυγίου σε <i>tert</i> zebrafish.....	69
4.3. Δυναμικό αναγέννησης ουραίου πτερυγίου σε <i>crh</i> zebrafish.....	75
4.4. Μελέτη της έκφρασης ουδετερόφιλων στο σημείο τραύματος κατά την αναγέννηση.....	79
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	83-94
5.1. Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου <i>tert</i>^{-/-} zebrafish.....	83
5.2. Η έλλειψη της λειτουργικότητας του γονιδίου της τελομεράσης οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα αναγέννησης σε <i>tert</i>^{-/-} zebrafish.....	84
5.3. Ενήλικα <i>crh</i>^{-/-} ψάρια εμφανίζουν μια τάση μείωσης στο δυναμικό αναγέννησης.....	86
5.4. Η έλλειψη της <i>crh</i> ορμόνης σε λάρβες οδηγεί σε συσσώρευση και παραμονή των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος.....	87
5.5. Ο επανειλημμένος ακρωτηριασμός του ουραίου πτερυγίου οδηγεί σε ανάκαμψη του δυναμικού αναγέννησης.....	91
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95-120

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ζωικό μοντέλο zebrafish (*Danio rerio*)

1.1.1 Ταξινόμηση zebrafish

Το zebrafish, αποτελεί τροπικό ψάρι του γλυκού νερού και ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερυγίων, στην τάξη Cypriniformes και στην οικογένεια Cyprinidae (Πίνακας 1). Το zebrafish υπάγεται στο γένος *Danio*, ενώ είναι κοντινό φυλογενετικά και με το γένος *Devario*. Για πολλά χρόνια και μέχρι την επίσημη ένταξή του στο γένος *Danio*, το zebrafish αναφερόταν στην επιστημονική βιβλιογραφία με την ονομασία *Brachydanio rerio*.

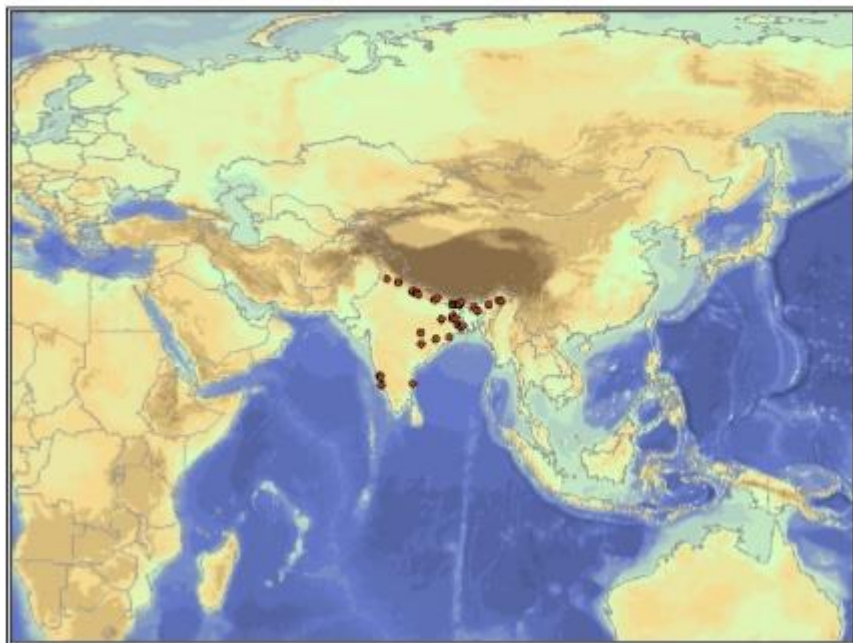
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Ζώα
ΦΥΛΟ	Χορδωτά
ΥΠΟΦΥΛΟ	Σπονδυλωτά
ΥΠΕΡΟΜΟΤΑΞΙΑ	Γναθοστόματα
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Ακτινοπτερύγιοι
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	Τελεόστεοι
ΤΑΞΗ	Κυπρινόμορφοι
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Κυπρινοειδή
ΓΕΝΟΣ	<i>Danio</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>rerio</i>

Πίνακας 1: Η συστηματική κατάταξη του zebrafish (*Danio rerio*).

1.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Το zebrafish είναι ενδημικό είδος σε ποταμούς, χείμαρρους, κανάλια και λίμνες της Βόρειας Ινδίας, του Βορείου Πακιστάν, του Νεπάλ, του Μυανμάρ και του Μπουτάν (Εικόνα 1). Στις περιοχές αυτές μπορεί εκάστοτε να βρεθεί και σε στάσιμα νερά, ιδίως σε ορυζώνες. Δεν καθίσταται για βρώση, παρόλα αυτά έχει βρεθεί και σε πολλές περιοχές του κόσμου ως αλλόχθονο είδος, καθώς διαβεί σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (pH: 6.5-8, θερμοκρασιακό εύρος: 12-39°C, αλατότητα: μεταξύ 0,01-0,8) (Engeszer et al., 2008; Arunachalam et al., 2013). Ο τόπος που ενδημεί (Νότια-Νοτιοανατολική Ασία και Ινδική χερσόνησος θεωρείται γενικά το κέντρο της εξέλιξης των κυπρινοειδών, λόγω του μεγάλου αριθμού ειδών και της ποικιλίας που

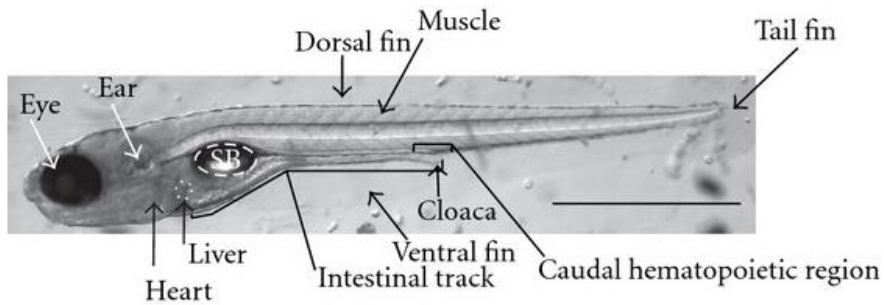
εμφανίζουν (Moyle Peter B. et al).



Εικόνα 1: Γεωγραφική εξάπλωση του zebrafish.

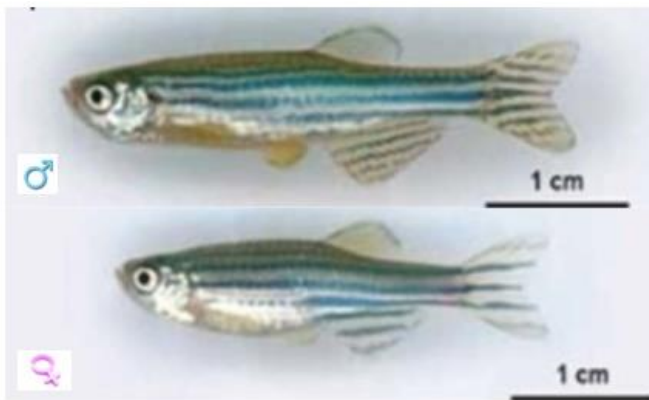
1.1.3 Μορφολογία

Τα άτομα του είδους zebrafish έχουν ατρακτοειδή, πλευρικά πεπτιεσμένο κορμό και το στόμα τους έχει φορά προς τα πάνω. Όσον αφορά το χρωματισμό τους, εμφανίζουν ένα ιδιαίτερο μοτίβο εναλλαγής σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων που εκτείνονται μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου. Στο μοτίβο αυτό, που θυμίζει τις ρίγες της ζέβρας, οφείλει την κοινή του ονομασία, zebrafish ή αλλιώς ψάρι-ζέβρα. Το μοτίβο οφείλεται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα μελανοφόρα (σκούρα μπλε), τα ξανθοφόρα (χρυσά) και τα ιριδοφόρα (ιριδίζοντα) κύτταρα (Parichy DM, 2006). Αρχικά διαμορφώνονται δύο κεντρικές λωρίδες και ακολούθως κατά την ανάπτυξη διατάσσονται οι επόμενες, επάνω και κάτω από τις ήδη υπάρχουσες (McClure, 1999).



Εικόνα: Ανατομία Zebrafish 6 ημερών (Jason R Goldsmith et al.,2012).

Το μέγεθος των zebrafish μπορεί να φτάσει τα 6.4cm, ωστόσο σε συνθήκες αιχμαλωσίας, όπως στο εργαστήριο, σπάνια ξεπερνά τα 4cm. Τα αρσενικά του είδους έχουν σχήμα τορπίλης, με χρυσές-ροζ λωρίδες ανάμεσα στις μπλε, ενώ τα θηλυκά χαρακτηρίζονται από μεγάλες υπόλευκες κοιλίες, ασημένιες αντί για χρυσές λωρίδες και το κίτρινο ραχιαίο πτερύγιο. Επίσης, τα θηλυκά εμφανίζουν μια μικρή γεννητική θηλή μπροστά από το εδρικό πτερύγιο (Εικόνα 3).

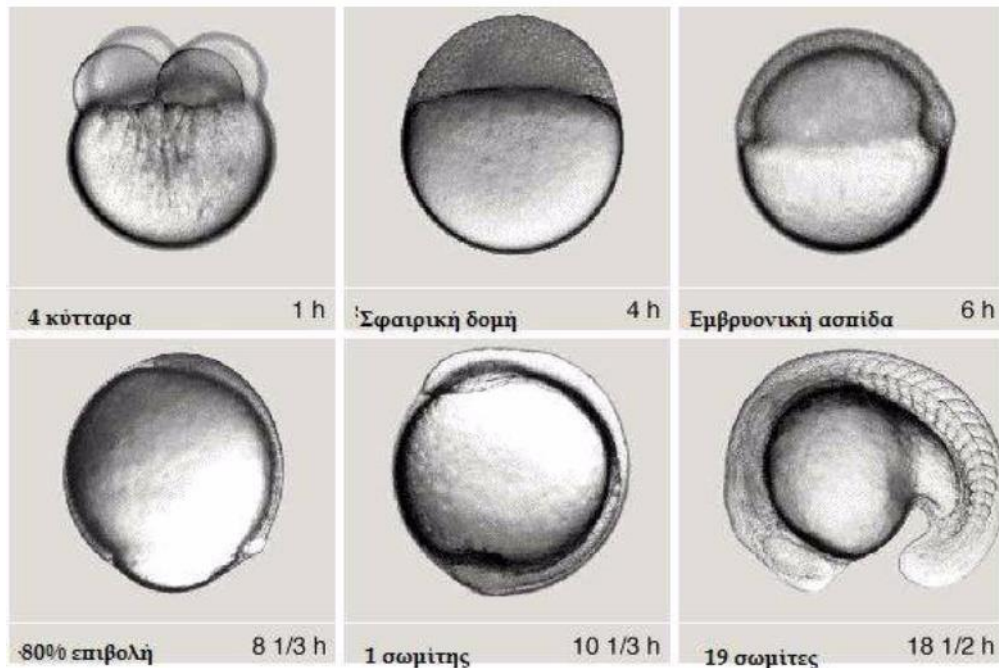


Εικόνα 3: Αρσενικό και θηλυκό άτομο zebrafish. Ανατύπωση (<https://wiki.med.harvard.edu/SysBio/Megason/CollectingEggs>)

Σε αιχμαλωσία μπορεί να ζήσει 2 με 3 χρόνια, ωστόσο, σε ιδανικές συνθήκες, μπορεί να φτάσει και τα 5 χρόνια ζωής.

1.1.4. Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish

Τριανταπέντε λεπτά μετά τη γονιμοποίηση παρατηρείται ο πρώτος κυτταρικός διαχωρισμός (cleavage) και μετά από την πάροδο μίας ώρας μπορεί να παρατηρηθεί το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων (Εικόνα 4). Εάν τα δύο βλαστομερίδια (blastomeres) είναι συμμετρικά και διαφανή, τα αυγά είναι γονιμοποιημένα (Lange et al., 1995). Μετά τις πρώτες αυλακώσεις και σε χρόνο περίπου 2 ωρών μετά τη γονιμοποίηση (στάδιο 6-4 κυττάρων) το έμβρυο εισέρχεται στο στάδιο του βλαστιδίου, καθώς ο βλαστόδισκος σχηματίζει μία σφαιρική δομή. Τα βλαστομερίδια που εφάπτονται στη λέκιθο απελευθερώνουν τους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα σε αυτή, σχηματίζοντας το λεκιθικό συγκυτιακό στρώμα (Yolk Syncytial Layer – YSL). Η αρχή της γαστριδίωσης (gastrulation) λαμβάνει χώρα περίπου 5 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Εντός του βλαστόδισκου υπάρχουν δύο στρώματα κυττάρων: το ανώτερο, που καλείται επιβλάστη, και το κατώτερο, η υποβλάστη. Η επιβλάστη, τροφοδοτεί με κύτταρα την υποβλάστη.

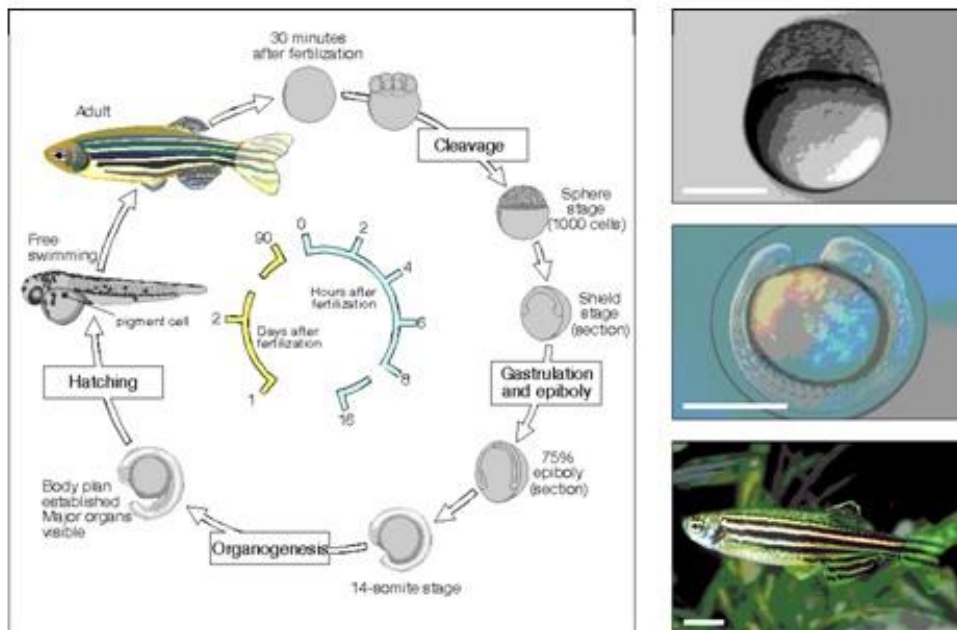


Εικόνα 4: Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του είδους *Danio rerio* (πηγή: Haffter et al., 1996).

Στο χρονικό διάστημα 5 ½ έως 6 ώρες μετά τη γονιμοποίηση σχηματίζεται ο εμβρυικός δίσκος ή η εμβρυονική ασπίδα (μέσω της συνεχούς ροής κυττάρων προς την πρόδρομη ραχιαία πλευρά του βλαστόδισκου, τόσο στην

επιβλάστη, όσο και στην υποβλάστη). Μετά από 9 ώρες αρχίζει ο σχηματισμός του εγκεφάλου. Μετά την πάροδο 12 ωρών έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της γαστριδίωσης. Στο στάδιο αυτό, η κοιλότητα του βλαστιδίου (blastoderm) έχει περικλείσει τη λέκιθο (Liu et al., 2007). Τα κύτταρα που παραμένουν στην επιβλάστη, μετά το τέλος της γαστριδίωσης, αντιστοιχούν στο εξώδερμα, από το οποίο θα προκύψουν οι ιστοί της επιδερμίδας και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Από την υποβλάστη θα προκύψει το μεσόδεμα και το ενδόδεσμα. Κατά το τέλος της γαστριδίωσης παράγεται η νευρική πλάκα, από όπου θα προκύψει το κεντρικό νευρικό σύστημα. Κάτω από τη νευρική πλάκα, εδράζεται η αξονική υποβλάστη, η οποία συνορεύει εκατέρωθεν με την παραξονική υποβλάστη. Στην περιοχή του κορμού, η αξονική και η παραξονική υποβλάστη, θα δώσουν αντίστοιχα τη νωτοχορδή και τους σωμίτες. Μετά ακολουθεί ο σχηματισμός των σωμιτών. Οι σωμίτες σχηματίζονται στο μέσο του σώματος και επιμηκύνονται κατά τον προσθοπίσθιο άξονα. Μετά την πάροδο 19 – 20 ωρών, τα πρώτα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά και είναι δυνατό να παρατηρηθούν οι πρώτες σπασμωδικές κινήσεις του εμβρύου. Στις 22 ώρες η γαστριδίωση έχει ολοκληρωθεί και το έμβρυο εμφανίζει μία πλευρική κάμψη. Ακολουθεί το φυλοτυπικό στάδιο όπου εμφανίζονται τα πρώτα χρωματοφόρα κύτταρα στους οφθαλμούς και στο δέρμα, αναπτύσσεται το κυκλοφορικό σύστημα και είναι εμφανείς οι καρδιακοί χτύποι. Μετά την πάροδο των 36 ωρών από τη γονιμοποίηση, το πρώτο αορτικό τόξο είναι πλήρως σχηματισμένο ενώ είναι ορατό το ουραίο προσαγωγό αγγείο, το οποίο εκτείνεται στο μεγαλύτερο τμήμα της ουράς (Kimmel et al., 1995). Ο σχηματισμός των βασικών εσωτερικών οργάνων (συκώτι, νεφροί, στομάχι), συμπεριλαμβανομένου του καρδιαγγειακού συστήματος, λαμβάνει χώρα στο διάστημα των πρώτων 24 – 48 ωρών. Η εμβρυογένεση έχει ολοκληρωθεί μετά την πάροδο 72 ωρών, όπου οι κινήσεις του εμβρύου είναι αυθόρμητες και έντονες, ενώ στο διάστημα από 48 έως 72 ώρες γίνονται εμφανή και τα χρωματοφόρα κύτταρα και σχηματίζονται οι βραγχιακές σχισμές και τα βραγχιακά τόξα (Liu et al., 2007). Η εκκόλαψη των ιχθύων λαμβάνει χώρα 2-3 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Σε αυτό το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο οι νύμφες έχουν μήκος μέχρι 3.5mm, κολυμπούν ενεργητικά και φέρουν λεκιθικό σάκο, τον οποίο καταναλώνουν μέχρι το τέλος του σταδίου. Στις 5 μέρες, όπου έχει απορροφηθεί ο λεκιθικός

σάκος, έχει ξεκινήσει η εξωτερική σίτιση και η οργανογένεση των βασικών οργάνων έχει ολοκληρωθεί (Scholz et al., 2008).



Εικόνα 5: Βασικά αναπτυξιακά στάδια του zebrafish – αναδημοσίευση (http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/DBNModel.html)

1.1.5. Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγική διαδικασία διαρκεί κάθε χρόνο για 3 με 4 μήνες και πιο συγκεκριμένα από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο. Τα ενήλικα είναι σεξουαλικά ώριμα στους 3 με 4 μήνες, με τα θηλυκά αφήνουν τα αυγά τους τα οποία μπορεί να είναι εκατοντάδες σε αριθμό και τα γονιμοποιούν εξωτερικά τα αρσενικά. Τα αυγά έπειτα γίνονται διαφανή. Τα θηλυκά μπορούν να γεννούν, με διαλείμματα 2-3 ημερών, ως και 500 αυγά ανά 3 με 4 ημέρες σε ιδανικές συνθήκες (Εικόνα 6) (Zebrafish in the World: A Review of Natural History and New Notes from the Field, 2007).



Εικόνα 6: Αυγά Zebrafish.

1.1.6. Διατροφή

Το Zebrafish είναι παμφάγο ζώο. Τρέφεται κυρίως με ζωοπλαγκτόν, έντομα, προνύμφες εντόμων, φυτοπλαγκτόν, αλλά και σκουλήκια και μικρά καρκινοειδή (Spence, Gerlach et al., 2008). Το Zebrafish μπορεί να λάβει εξωγενή τροφή από την 5η μέρα και μετά όπου πρωτοανοίγει το στόμα του. Μέχρι τότε τρέφεται από την λέκιθο. Οι επόμενες 3-4 εβδομάδες είναι και οι πλέον απαιτητικές σε ενέργεια. Οι τροφές τους έχουν μέγεθος 150 – 200 μm και πρέπει να έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες πάνω από 45 – 60%, 6 – 10% σε λίπη και λιγότερο από 5% σε υδατάνθρακες. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, το Zzebrafish μπορεί να τραφεί με τροφές μεγέθους 400 – 600 μm και με περιεκτικότητα σε λίπη 10 – 15% (Spence R. et al., 2008).

1.2. Ηθική και πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα

1.2.1. Γενικά

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, το zebrafish εξελίχθηκε σε ένα ιδανικό *in vivo* μοντέλο έρευνας σε πολλούς κλάδους της βιοϊατρικής επιστήμης. Η ευρεία χρήση του οφείλεται στα σημαντικά πλεονεκτήματα που παρέχει ως πειραματόζωο. τα βασικότερα από τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

1. Τα ενήλικα zebrafish μπορούν εύκολα να διατηρηθούν στο εργαστήριο λόγω του μικρού σχετικά μεγέθους τους, που επιτρέπει την ανατροφή αρκετών ατόμων μέσα σε μικρά ενυδρεία γλυκού νερού .
2. Το κόστος συντήρησης μιας μονάδας zebrafish δεν θεωρείται υψηλό συγκριτικά με το αντίστοιχο κόστος για μια μονάδα θηλαστικών, παρέχοντας τη δυνατότητα διατήρησης μιας τέτοιας μονάδας ακόμα και σε εργαστήρια με λιγότερους οικονομικούς πόρους. Οι διατροφικές απαιτήσεις των ιχθύων και οι απαιτήσεις της συντήρησης μιας εγκατάστασης γλυκού νερού είναι αυτές που καθορίζουν το σχετικά χαμηλό οικονομικό κόστος (Allen and Neely, 2010).
3. Τα ενήλικα άτομα zebrafish γίνονται σεξουαλικά ώριμα ήδη από την ηλικία των 3 μηνών μετά τη γονιμοποίηση και σε ιδανικές συνθήκες είναι ικανά να δώσουν περισσότερους από 200 απογόνους σε κάθε διασταύρωση. Έτσι μπορούμε να έχουμε κάθε εβδομάδα μεγάλο αριθμό εμβρύων για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μας, κάτι που δεν είναι εφικτό χρησιμοποιώντας θηλαστικά όπως το ποντίκι ή το κουνέλι ως πειραματόζωα. Εδώ θα πρέπει να προσθέσουμε ακόμη μια διαφορά που αφορά στους απογόνους: στην περίπτωση του zebrafish τα έμβρυα αναπτύσσονται εκτός του σώματος της μητέρας καθιστώντας εύκολη την *in vivo* παρατήρηση της ανάπτυξής τους (*ex utero*) (Beis and Stainier, 2006).
4. το γονιδίωμα του zebrafish έχει αποκρυπτογραφηθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό του, και διαθέτει υψηλό βαθμό συντήρησης με τα θηλαστικά συστήματα. Τα γονιδιώματα του zebrafish και του ανθρώπου έχουν υψηλή ομολογία (προσεγγίζει το 80%) και περιέχουν ορθόλογα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα και ρυθμιστικά μόρια που ελέγχουν παρόμοιες διαδικασίες στην ανάπτυξη και την ομοίωση, ενώ και αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών έχουν παρόμοια αποτελέσματα σε έμβρυα zebrafish (Strahle and Grabher 2010). Θεωρείται λοιπόν ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη χρήση τεχνικών πρόσθιας (*forward*) και αντίστροφης (*reverse*) γενετικής (Lawson and Wolfe, 2011), καθώς και για τη μελέτη επίδρασης πλειάδας χημικών μορίων στα συστήματα και τα όργανα του εμβρύου (*chemical genetic screen*).

5. Η διαφάνεια των αυγών αλλά και των εμβρύων διευκολύνει την παρατήρηση διαταραχών στην αναπτυξιακή πορεία, οι οποίες αποτελούν ένδειξη τερατογενέσεων (Kammann et al., 2006; Scholz et al., 2008). Επίσης, τα καθιστά εξαιρετικό πειραματικό υλικό για μελέτες *in vivo* πολλών συστημάτων και οργάνων τους (καρδιαγγειακό, νευρικό κλπ.) και τη δυνατότητα χρήσης μη επεμβατικών μεθόδων για τη ζωντανή απεικόνιση (live imaging) δυναμικών φαινομένων του εμβρύου, όπως οι κινήσεις κατά τη γαστριδίωση.
6. Τα όργανα του εμβρύου διαθέτουν μικρό μέγεθος και μπορούν ολόκληρα να παρατηρηθούν με τεχνικές μικροσκοπίας και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού να επιτευχθεί τρισδιάστατη απεικόνισή τους (Beis and Stainier, 2006).
7. Είναι πολύ συνήθης η κατασκευή διαγονιδιακών οικογενειών zebrafish με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών για παρατήρηση συγκεκριμένων ιστών και συστημάτων σε στερεοσκόπιο ή μικροσκόπιο φθορισμού.

1.2.2. Ηθικοί Περιορισμοί

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια κοινή απαίτηση για την αντικατάσταση των πειραμάτων με ζώα για ηθικούς λόγους και για το λόγο αυτό η χρήση αυγών του είδους zebrafish είναι πλέον αποδεκτή (Gellert & Heinrichsdorff, 2001; Lammer et al., 2009). Με τον όρο «έμβρυο» ορίζεται το στάδιο εκείνο που περιλαμβάνει την περίοδο μετά τη γονιμοποίηση όπου σχηματίζεται το ζυγωτό μέχρι την εκκόλαψη. Στο στάδιο ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα έξω από το αυγό αποκαλείται ελεύθερο έμβρυο (Lammer et al., 2009). Συγκεκριμένο πρωτόκολλο ισχύει για ελέγχους με τη χρήση εμβρύων του είδους *Danio rerio* (zebrafish) (OECD, 2006; ISO, 2006). Τα είδη ιχθύων, μπορεί να θεωρούνται σχετικά απλοί οργανισμοί συγκριτικά με τα θηλαστικά. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει στην περίπτωση του γονιδιώματος του zebrafish, το οποίο περιέχει 2 επιπλέον ζεύγη χρωμοσωμάτων (σύνολο 50 χρωμοσωμάτων) πέρα από τα 23 ζεύγη των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων (Hill et al., 2005) και εμφανίζει ομοιοστατικές ομοιότητες με τα θηλαστικά (Liu et al., 2007). Λόγω των βασικών ομοιοτήτων των

σπονδυλοζώων, το zebrafish μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μοντέλο στην έρευνα ασθενειών (Scholz et al., 2008).

1.2.3. Χρήση του zebrafish ως μοντέλο για την αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου

1.2.3.1. Γενικά

Η πρώτη αναφορά για την αναγέννηση της ουράς γράφτηκε από τον Γάλλο Broussonet το 1786 (Broussonet 1786, 1789). Με βάση τα πειράματα με χρυσόψαρα, ο Broussonet ανακάλυψε τη φυσική αναγέννηση και, κυρίως, αναγνώρισε ότι το ουραίο πτερύγιο παρουσιάζει πειραματικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους άλλους τύπους πτερυγίων επειδή αναγεννάνται πιο γρήγορα από τις κοιλιακές, θωρακικές και ραχιαίες επιφάνειες (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015). Το Zebrafish έχει μεγάλη ικανότητα αναγέννησης πολλών δομών, όπως είναι τα πτερύγια. Το ουραίο πτερύγιο τυπικά χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αναγέννησης, αφού μετά τον ακρωτηριασμό ανακτά πλήρως το χαμένο μέρος, έχοντας πλήρη λειτουργικότητα, και αποκαθιστώντας το αρχικό μέγεθος μετά από 7-14 ημέρες. Το αρχικό και τελικό μέγεθος του πτερυγίου αποκαθίσταται πάντοτε ανεξάρτητα από τον αριθμό των φορών που ακρωτηριάζεται, πράγμα που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός αυστηρού μηχανισμού που ρυθμίζει την ανάπτυξη κατά τη διάρκεια αυτής της επιδιορθωτικής διαδικασίας (Gonçalo Miguel Brito, 2011). Η ικανότητα αναγέννησης οργάνων ή εξαρτημάτων μετά από τραυματισμό ποικίλει μεταξύ των ειδών. Παρόλο που τα ενήλικα θηλαστικά έχουν περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης, τα ουροδελή αμφίβια και τελεόστειοι ιχθύες όπως το zebrafish μπορούν επαρκώς να αναγεννήσουν πολλά όργανα και εξαρτήματα του σώματος (Azevedo et al., 2011; Stoic-Cooper et al., 2007a). Το ουραίο πτερύγιο του zebrafish είναι ένα υποσχόμενο και επιτυχημένο μοντέλο για την μελέτη βασικών μηχανισμών ιστικής αναγέννησης. Ακολούθως του μερικού ακρωτηριασμού το πτερύγιο αναγεννάνται πολύ γρήγορα μέσω του σχηματισμού του blastema το οποίο αποτελείται από πολλαπλασιαζόμενα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα (Knopf et al., 2011). Το μονοπάτι wnt-β-κατενίνης είναι ουσιώδους σημασίας για blastema κυτταρικό

πολλαπλασιασμό και για το μοτίβο της υπερκείμενης επιδερμίδας (Daniel Wehner et al., 2013).

1.2.3.2. Πλεονεκτήματα του Zebrafish στην αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου

Το ουραίο πτερύγιο του zebrafish έχει πολλές ιδανικές ιδιότητες χρήσης για πειραματικό σκοπό όσο αναφορά τις μελέτες αναγέννησης. Πρώτον, είναι το μεγαλύτερο εξωτερικό εξάρτημα που βρίσκεται στο οπίσθιο άκρο του σώματος, το οποίο το καθιστά πιο προσβάσιμο για χειρουργική επέμβαση και απεικόνιση. Δεύτερον, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα πτερύγια, εμφανίζει μια μορφολογία με δύο λοβούς που είναι βέλτιστη για την ανάλυση του διαφορετικού ρυθμού αναγέννησης κατά μήκος του μεσο-πλευρικού άξονα. Τρίτον, το πτερύγιο έχει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με το άκρο των αμφίβιων. Παρουσιάζει μια απλούστερη ανατομία, καθώς δεν συμπεριλαμβάνει κάποιους ιστούς, όπως οι μύες και χόνδροι. Τέταρτον, η ολοκλήρωση της αναγέννησης της ουράς επιτυγχάνεται γρήγορα και πιστά μέσα σε 2-4 εβδομάδες, εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία του νερού. Τέλος, οι ακτίνες των πτερυγίων μπορούν να αναγεννηθούν ανεξάρτητα ή μια από την άλλη, όντας έτσι αυτόνομες αναγεννητικές μονάδες και παρέχοντας πολλαπλά πειραματικά αντίγραφα εντός της ίδιας δομής (Nabrit, 1929). Αυτά τα ισχυρά χαρακτηριστικά καθιστούν το ουραίο πτερύγιο ένα ιδανικό μοντέλο για την αντιμετώπιση βασικών θεμάτων που αφορούν την αναγέννηση των οργάνων των σπονδυλωτών.

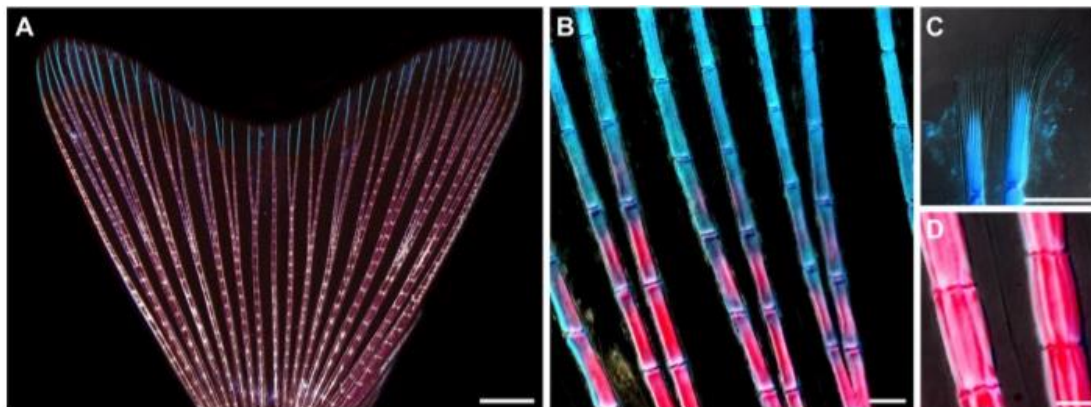
1.3. Ουραίο πτερύγιο

1.3.1. Γενικά-Δομή-Δημιουργία

Το ουραίο πτερύγιο του zebrafish προέρχεται κυρίως από την κοιλιακή πλευρά της προνύμφης. Κατά τη διάρκεια της ενηλικίωσης, αυτό, παραμένει συνδεδεμένο με την σπονδυλική στήλη με τη βοήθεια οστών κοιλιακής προέλευσης, με εξαίρεση τα ραχιαία πτερύγια (Geraudie et al., 1995). Ανατομικά, αυτή η δομή μπορεί να οριστεί ως μια μη μυϊκή δερματική πτυχή η οποία σταθεροποιείται με 16-18 κύριες τμηματοποιημένες και περιστασιακά διχαλωτές ακτίνες που επικαλύπτονται από μαλακό ιστό (Σχήμα 1 A, B). Το

μήκος των τμημάτων αυτών οριοθετείται από τις διατομές των αρθρώσεων (Rolland-Laganetal, 2012). Το δίλοβο σχήμα του ενήλικου πτερυγίου προκύπτει ως αποτέλεσμα ενός μεγαλύτερου αριθμού τμημάτων στις πλευρικές ακτίνες των λοβών σε σύγκριση με τις μεσαίες ακτίνες της σχισμής, παρουσιάζοντας διαφορά περίπου τεσσάρων τμημάτων μεταξύ της μακρύτερης και της βραχύτερης ακτίνας (Goldsmith et al., 2006). Καθώς τα ψάρια μπορούν να αναπτυχθούν καθ 'όλη τη διάρκεια της ζωής τους, τα πτερύγιά τους διατηρούν την ικανότητα να επεκτείνουν το μέγεθός τους κατά την ενηλικίωση. Η ανάπτυξη του πτερυγίου επιτυγχάνεται με τη διαδοχική προσθήκη νέων τμημάτων ακτινών στην άκρη, τα οποία, μόλις σχηματιστούν, μπορούν να γίνουν όλο και πιο παχιά αλλά δεν μπορούν να επιμηκυνθούν (Goldsmith et al., 2006). Έτσι, σε αντίθεση με ένα τετράποδο άκρο με μια σταθερή ακολουθία οστών, που έχει δημιουργηθεί κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ο αριθμός των τμημάτων των ακτινών αυξάνεται ανάλογα με την ανάπτυξη του ζώου. Κάθε πρόσφατα αναπτυγμένο τμήμα ακτινών αναδύεται ως μια απομακρυσμένη μονάδα, αλλά αποκτά μια εγγύς τοποθεσία όσο η επιμήκυνση της ουράς συνεχίζεται (Goldsmith et al., 2006). Αυτά ονομάζονται λεπιδοτρίχια, τα οποία εναποτίθεται κάτω από την επιδερμίδα. Η μεταλλοποιημένη μήτρα στη βάση και οι εύκαμπτες δομές στην άκρη του πτερυγίου παρέχουν μια βέλτιστη αρχιτεκτονική για την υδροδυναμική λειτουργία του πτερυγίου. Η κάθε ακτίνα περιέχει δύο κοίλα οστά σε κάθε πλευρά της πτυχής, που ονομάζονται hemirays. Η διμερής οργάνωση της ακτίνας μπορεί να εκτιμηθεί σε διαμήκη τμήματα (Σχήμα 1A). Τα λεπιδοτρίχια είναι σφικτά καλυμμένα από οστεοβλάστες που εναποθέτουν τη μήτρα για να ρυθμίζουν τη διάμετρο του οστού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ο χώρος μεταξύ των hemirays είναι γεμάτος με συνδετικό ιστό, ο οποίος, σε αντίθεση με το τυπικό χόριο των θηλαστικών, περιέχει πυκνά διασυνδεδεμένους ινοβλάστες (Σχήμα 1B). Στη συνέχεια, οι ακτίνες νευρώνονται και αγγειοποιούνται από τις κεντρικές αρτηρίες (Huang et al., 2003). Οι δια-ακτίνες, οι οποίες διαχωρίζουν τις γειτονικές ακτίνες, στερούνται των σκελετικών κυττάρων και περιέχουν φλέβες ενσωματωμένες σε μεσεγγυματικό ιστό με μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των κυττάρων (Σχήμα 1C). Όλοι μαζί αυτοί οι ιστοί, πρέπει να αναγεννηθούν συντονισμένα για να αποκαταστήσουν το σχήμα και τη λειτουργία του οργάνου και πρέπει να δημιουργηθούν άμεσες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ παρακείμενων ιστών για το συγχρονισμό της ανάπτυξης και της μορφοποίησης (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015).



Σχήμα 1. Ο σκελετός του ουραίου πτερυγίου του zebrafish. (A) - (D) Ολόκληρη χρώση ενός ενήλικου ουραίου πτερυγίου που χρωματίζεται με το Alcian Blue και Alizarin Red για την απεικόνιση του σκελετού. (A) Η μορφολογία της διχαλωτής μορφής του ουραίου πτερυγίου η οποία σταθεροποιείται με 16-18 δομές και μερικές φορές διακλαδισμένες οστικές ακτίνες (χρωματισμένες περιοχές), που ονομάζονται λεπιδοτρίχια, και αλληλοσυνδέονται με μαλακό ιστό (μη χρωματισμένες περιοχές μεταξύ των οστών). Τα τμηματικά περιγράμματα περιέχουν συνδέσμους με τακτικές αποστάσεις κατά μήκος του εγγύς-άπω άξονα (ένα υπόλευκο χρώμα-μοτίβο σε κάθε ακτίνα). Τα οστά αποτελούνται κυρίως από ασβεστοποιημένη μήτρα (magenta), με εξαίρεση τα άπω μέρη που παραμένουν μη μεταλλοποιημένα (κυανό). (B) Μια πιο κοντινή αποτύπωση της απομακρυσμένης περιοχής κατά την οποία παρουσιάζεται μια σταδιακή μείωση του επιπέδου της ασβεστοποίησης κατά μήκος του πτερυγίου. Το μήκος των τμημάτων είναι σχεδόν πανομοιότυπο σε εγγύς (magenta), και απομακρυσμένα (κυανό) μέρη των ακτινών. (C) Οι άκρες των ακτινών υποστηρίζονται από μια δέσμη σχήματος βούρτσας από ακιδωτά σπειρώματα, που ονομάζονται ακτινοτρίχια, τα οποία περιβάλλουν το ακραίο τμήμα της λεπιδοτριχίων και εκτείνονται περαιτέρω περιφερικά πέρα από το άκρο του οστού. (D) Τα εγγύτερα τμήματα των ακτινών είναι τουλάχιστον τρεις φορές ευρύτερα από τα απομακρυσμένα ασβεστοποιημένα τμήματα (σε σύγκριση με το B), αλλά το μήκος τους παραμένει σχεδόν σταθερό. Γραμμές κλίμακας: (A) 1000 μm. (B) - (D) 100 μm (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015).

1.4. Αναγέννηση ουραίου πτερυγίου

Η αναγέννηση μπορεί να οριστεί ως η ανασύσταση ενός χαμένου ή τραυματισμένου ιστού. Πρόκειται για μια ευρεία έννοια που καλύπτει πολλά

διαφορετικά φαινόμενα όπως η φυσιολογική αναγέννηση, αλλαγή της μορφολογίας, η υπερτροφία και η επανορθωτική αναγέννηση. Η φυσιολογική αναγέννηση περιλαμβάνει φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αντικατάσταση των αιματοποιητικών και των επιθηλιακών κυττάρων ή των ορμονικών κύκλων. Η αλλαγή της μορφολογίας, ορίζεται ως η ανακατασκευή της μορφής του οργανισμού με αναδιαμόρφωση του σώματος μετά από σοβαρή βλάβη. Η υπερτροφία συνδέεται με την αντισταθμιστική αύξηση ή αποκατάσταση της μάζας ενός εσωτερικού οργάνου (π.χ. των νεφρών και του ήπατος). Η επανορθωτική αναγέννηση περιλαμβάνει την επιδιόρθωση και την επιμορφική αναγέννηση (Kawakami, 2010) και οδηγεί στην πλήρη ανασύσταση ενός οργάνου ή ιστού με πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους (Poss et al., 2003). Το Zebrafish διατηρεί υψηλό δυναμικό αναγέννησης, ιδιαίτερα όταν συγκρίνεται με τα θηλαστικά, έχοντας τη δυνατότητα να αναγεννά μια ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένων των πτερυγίων, του αμφιβληστροειδούς, του φακού, της καρδιάς και της σπονδυλικής στήλης. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, οι ιστοί των ψαριών με αναγεννητικές ικανότητες δεν σχηματίζουν ποτέ ουλές μετά από τραυματισμό, καθώς υποβάλλονται σε πλήρη διαδικασία ανασύστασης ιστών. Το ουραίο πτερύγιο χρησιμοποιείται συχνότερα για μελέτες αναγέννησης αφού μπορεί εύκολα να υποστεί χειρουργική επέμβαση, και τραυματισμό χωρίς να διακυβεύεται η επιβίωση του οργανισμού (Poss et al., 2003; Poss et al., 2007).

1.4.1. Αναγέννηση επιμορφικού τύπου

Οι δομές των αμφιβίων και των ψαριών αναγεννώνται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται «επιμορφική αναγέννηση», που μερικές φορές ονομάζεται και «πραγματική» αναγέννηση. Αυτό συμβαίνει σε τρία στάδια: (1) επούλωση του τραύματος και σχηματισμός του επιθηλιακού τραύματος, (2) σχηματισμός του αναγεννώμενου blastema, ενός πληθυσμού μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων που είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και τη διαμόρφωση του άκρου / πτερυγίου αναγέννησης, και (3) αναγεννητική ανάπτυξη και αναδιάρθρωση του αναγεννώμενου προτύπου (Akimenko et al., 2003 ;Poss et al., 2003). Η επιμορφική αναγέννηση στο ουραίο πτερύγιο μπορεί να προκληθεί από τραυματισμό, όπως ακρωτηριασμό, και είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία (Kawakami et al., 2010 ; Poss et al., 2003). Η επούλωση του τραύματος ξεκινά με τη μετανάστευση ενός λεπτού επιδερμικού στρώματος

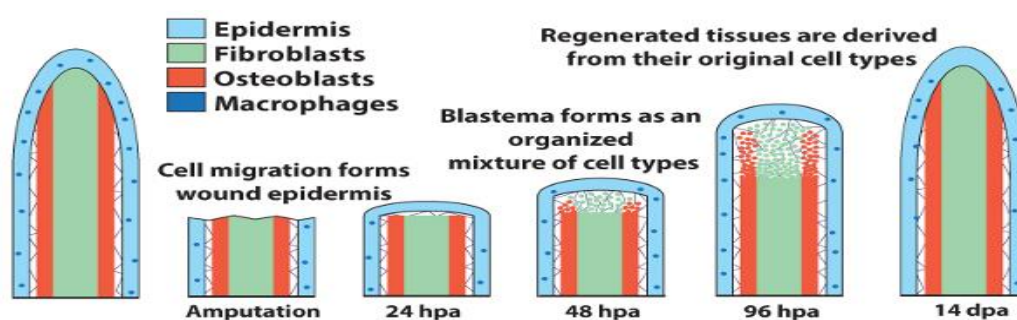
που θα καλύψει το τραύμα μέσα σε 3 ώρες μετά τον ακρωτηριασμό (hρα), αλλά η συνολική επιδερμική συσσώρευση διαρκεί μέχρι και 18hρα, όταν τελικά σχηματίζεται ένα παχύ στρώμα επιδερμικών κυττάρων, που ονομάζεται επιθηλιακό τραύμα. Αυτή, είναι μια κύρια δομή αναγέννησης και ο σχηματισμός της είναι κρίσιμος, αφού έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει διαδικασία αναγέννησης χωρίς αυτήν. Μέχρι τις 18-24 hρα αρχίζει να σχηματίζεται ένα βασικό επιδερμικό στρώμα που αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των σημάτων ανάπτυξης και σχεδίασης, καθώς είναι το όριο μεταξύ του επιθηλιακού τραύματος και του σχηματιζόμενου blastema. Επιπλέον, αυτή η αρχική φάση χαρακτηρίζεται από τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά δεν περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Gonzalo Miguel Brito, 2011). Ο επιμορφικός τύπος αναγέννησης αναφέρεται σε μια «περίπτωση αναγέννησης» κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός του «υλικού» προηγείται της ανάπτυξης του νέου μέρους (Morgan, 1901). Ένας ιστός με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό σχηματίζεται στη θέση του τραυματισμού και τυπικά περιέχει αδιαφοροποίητα κύτταρα. Αυτή η δομή, που ονομάζεται blastema, μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015).

1.4.2. Δημιουργία του blastema

Το blastema είναι μια εξειδικευμένη δομή που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των αδιαφοροποίητων προγονικών κυττάρων, ακολουθούμενη από τη διαφοροποίηση αυτών των προγονικών κυττάρων, αποκαθιστώντας πλήρως τον εκλείποντα ιστό (Εικόνα 7) (Kawakami et al., 2010; Poss et al., 2003). Η προέλευσή της υπήρξε ένα μακροχρόνιο ερώτημα στον τομέα και μέχρι πρόσφατα λίγα ήταν γνωστά για το πώς διαμορφώνεται η συγκεκριμένη δομή. Δύο υποθέσεις προτάθηκαν για την προέλευση του blastema:

Η πρώτη υποθέτει ότι το blastema προέρχεται από βλαστοκύτταρα (ή προγονικά κύτταρα) και η δεύτερη δηλώνει ότι προέρχεται από αποδιαφοροποίηση ή μετα-διαφοροποίηση ώριμων κυττάρων γύρω από την περιοχή του τραύματος. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η μετα-διαφοροποίηση μεταξύ των κυτταρικών γραμμών δεν συμβαίνει κατά την αναγέννηση του

ουραίου πτερυγίου και ότι, ως απόκριση στον ακρωτηριασμό, διαφοροποιημένα οστικά κύτταρα που ονομάζονται σκληροβλάστες (που αντιστοιχούν στους οστεοβλάστες των θηλαστικών) αποκτούν πολλαπλασιαστικό δυναμικό, μεταναστεύουν περιφερικά προς το blastema όπου ενσωματώνονται και αποδιαφοροποιούνται όπου και δημιουργούν το blastema (Sousa, S. et al., 2011; Knopf, F. et al., 2011). Συνεπώς, αυτά τα κύτταρα παραμένουν περιορισμένα εξελικτικά, και έτσι, μετά το σχηματισμό του blastema, μπορούν μόνο να επαναδιαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες (Knopf, F. et al., 2011). Αυτές οι αναφορές παρέχουν νέες γνώσεις που ευνοούν τη δεύτερη υπόθεση που αναφέρθηκε παραπάνω. Το blastema σχηματίζεται μεταξύ 12 και 48 hpa, ακολουθώντας την αρχική διαδικασία επούλωσης του τραύματος. Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται επίσης από μείωση του μήκους του κυτταρικού κύκλου, επιτρέποντας την ταχεία ανάπτυξη του πτερυγίου που διαρκεί 7 με 14 ημέρες για την πλήρη αποκατάσταση (Εικόνα 7) (Gonçalo Miguel Brito, 2011).



Εικόνα 7: Στάδια κατά τη δημιουργία του blastema. Κατόπιν του κοψίματος της ουράς τα επιδερμικά κύτταρα μεταναστεύουν στο σημείο και πραγματοποιούν επούλωση της πληγής (24hpa). Εκεί τα κύτταρα αποδιαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα. Στις 48hpa αυτά τα κύτταρα δημιουργούν το blastema και μετά τις 4-14 ημέρες υπάρχει μια ισορροπία επαναδιαφοροποιημένων προγονικών, πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων που οδηγούν στην τελική αναγέννηση του ιστού (Scott Stewart et al., 2012).

Ακολουθώντας τη δημιουργία του blastema η αναγεννησιακή φάση ανάπτυξης ξεκινά οδηγώντας τελικά στην αποκατάσταση του πτερυγίου μέσα σε 3 εβδομάδες (Daniel Wehner et al., 2013). Έτσι, το blastema το οποίο είναι η βασική δομή της επιμορφικής αναγέννησης, αποτελείται από μία

πολλαπλασιαστική μάζα μεσεγχυματικών κυττάρων που οδηγούν στο σχηματισμό των νέων δομών του πτερυγίου. Η αναγεννώμενη δομή διευρύνεται και παραμένει υπόλευκη μέχρι την τρίτη έως τέταρτη ημέρα. Αρχίζοντας από την τέταρτη έως την έκτη ημέρα, ο λευκός ιστός παραμένει μόνο στην απώτερη περιοχή της ανάπτυξης, ενώ το εγγύς τμήμα του νέου ιστού διαφοροποιείται στην ώριμη πτυχή και αποκτά μελανοκύτταρα. Οι μικροσκοπικές αναλύσεις των αναγεννημένων άκρων αποκάλυψαν την κυτταρική οργάνωση του blastema ως συστάδες αδιαφοροποιητών πολλαπλασιαστικών κυττάρων που καλύπτονται από την επιδερμίδα του τραύματος (Brockes & Kumar 2002, Akimenko et al., 2003, Poss et al., 2003). Μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις στην έρευνα αναγέννησης των άκρων / άκρων ήταν να προσδιοριστεί η προέλευση και το δυναμικό των κυττάρων του blastema.

Το blastema κάνει την εμφάνισή του κατά τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών ακολουθούμενο από αποδιαφοροποιημένους οστεοβλάστες. Συγκεκριμένα, ο πυρήνας του blastema αποτελείται από ένα χαλαρό σύμπλεγμα μεσεγχυματικών κυττάρων, ενώ οι αδιαφοροποίητοι οστεοβλάστες διατηρούν την αρχική κατανομή τους κάτω από την επιδερμίδα του τραύματος, διατηρώντας το πρότυπο των ώριμων οστών στον κορμό. Συνεπώς, οι αποδιαφοροποίητοι μεταναστευτικοί οστεοβλάστες ούτε εισβάλλουν στον δια-ακτινικό ιστό ούτε αλληλεπιδρούν με τα μεσεγχυματικά κύτταρα των οστών. Συμπερασματικά, η ιστολογική αρχιτεκτονική της ανάπτυξης του blastema εμφανίζει αξιοσημείωτο βαθμό χωρικής ιστολογικής οργάνωσης που αναπαράγει το πρότυπο των αρχικών δομών (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015). Παρόλο που το blastema έχει περιγραφεί ως μια μάζα από πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όλη η διαδικασία της αναγέννησης οργάνωνεται σε πολλά διαμερίσματα. Το blastema αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερις περιοχές:

1. Το περιφερικό μέρος που αποτελείται από σπανίως πολλαπλασιαζόμενο blastema, το οποίο χαρακτηρίζεται από την έκφραση *aldh1a2*, που είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει κατά την σύνθεση του ρετινοϊκού οξέος (Mathew et al., 2009; Nechiporuk and Keating et al., 2002).
2. Το κεντρικό μέσο blastema, το οποίο είναι ταχέως πολλαπλασιαζόμενο και που ανταποκρίνεται στην σηματοδότηση Notch (Grotek et al., 2013).

3. Εκείνο που έχει αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των αμφίπλευρων ζωνών, οι οποίες περιέχουν runx2b^+ προγονικούς οστεοβλάστες και το sp7^+ , δεσμευμένους οστεοβλάστες (Brown et al., 2009).

4. Περιοχές οι οποίες είναι ενδιάμεσες των προγονικών οστεοβλαστών και πιστεύεται ότι είναι απαραίτητες για το σχηματισμό μη ανοργανοποιημένων σκελετικών στοιχείων ειδικά για τα πτερύγια ψαριών (Daniel Wehner et al., 2013).

1.4.3. Ρυθμιστές κατά την αναγέννηση ουραίου πτερυγίου

Υπάρχουν πολλά μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, πολλά από τα οποία εμπλέκονται ταυτόχρονα στην αναγέννηση, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), ο Wnt και ο Sonic hedgehog που συμμετέχουν στη δημιουργία του blastema. Επίσης, το επιθηλιακό τραύμα εκφράζει μια πρωτεΐνη σηματοδότησης Shh, η οποία μπορεί να εμπλέκεται στην καθοδήγηση των οστεοβλαστών μέσω της διαδικασίας αναγέννησης (Laforest et al., 1998; Smith et al., 2006; Zhang et al., 2012). Η σηματοδότηση FGF διαμεσολαβεί έναν εξαρτώμενο από τη θέση έλεγχο του ρυθμού ανάπτυξης. Αυτός μπορεί να είναι ο μηχανισμός που δίνει οδηγίες στο κύτταρο σχετικά με τον ρυθμό αναγέννησης ή την ποσότητα του ιστού για αναγέννηση, ένα φαινόμενο που έχει αναφερθεί ως μνήμη θέσης (Lee et al., 2005), που επιτρέπει στον οργανισμό να αναγνωρίζει και να αναγεννά μόνο τις δομές που έχουν αφαιρεθεί με ακρωτηριασμό. Πιστεύεται ότι αυτή η πληροφορία θέσης οδηγεί στην ταχεία καθιέρωση μιας βαθμίδας κατά μήκος του εγγύς απομακρυσμένου άξονα (PD), αμέσως μετά τον ακρωτηριασμό, εξασφαλίζοντας την ανάκτηση των σωστών δομών μετά από απώλεια ή βλάβη. Παρόλα αυτά ο μοριακός μηχανισμός είναι ακόμη ασαφής (Gonzalo Miguel Brito, 2011). Παραμένει μια πρόκληση να κατανοηθεί πώς μια τέτοια αναπτυξιακά ισχυρή δομή μπορεί να σχηματιστεί *de novo* μέσα σε λίγες μέρες από το κορμό του ώριμου οργάνου. Εντός της πρώτης ημέρας, το επιθηλιακό τραύμα παχύνεται και ο συνδετικός ιστός, σε μια απόσταση περίπου 150 μm από το επίπεδο ακρωτηριασμού, υφίσταται αποδιοργάνωση (Nechiporuk & Keating 2002). Οι ινοβλάστες του ενεργοποιημένου μεσεγχύματος στρογγυλεύουν, εκφράζουν πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης ιστού, όπως η tenascin C, και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται (Ja'zwi'nska et al., 2007). Τα

γονίδια πρώιμης αναγέννησης ενεργοποιούνται για να δημιουργήσουν τις δύο βασικές δομές της αναγεννήσεως, το επιθηλιακό τραύμα και το blastema, όπως έχει προαναφερθεί. Ο σχηματισμός του επιθηλιακού τραύματος εξαρτάται σήματα τα οποία προέρχονται από το blastema, όπως είναι το Fgf20a, Sdf1, Igf2b και το ρετινοϊκό οξύ (RA) (Dufourcq & Vríz 2006; Bouzaffour et al., 2009; Chablais & Jazwinska 2010; Blum & Begemann 2012). Η παρεμπόδιση οποιουδήποτε από αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης εμποδίζει τόσο τον σχηματισμό του blastema όσο και την οργάνωση του επιθηλιακού τραύματος. Η αμοιβαία επικοινωνία μεταξύ του επιθηλιακού τραύματος και του μεσεγχύματος είναι επίσης μία από τις προϋποθέσεις για το σχηματισμό του blastema στο άκρο του αμφιβίου (Campbell & Crews, 2008). Το παραπάνω υποδεικνύει ότι υπάρχουν παρόμοιες αρχές για την αναγέννηση δομών και στα σπονδυλωτά. Οι αναλύσεις in situ υβριδοποίησης έδειξαν ότι αρκετά γονίδια, όπως τα *aldh1a2*, *wnt5a*, *fgf3*, οριοθετούν μια ευρύτερη έκταση του μακρινού blastema, συμπεριλαμβανομένων των ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Stoick-Cooper et al., 2007; Stewart et al., 2014). Έχει προταθεί ότι το κορυφαίο τμήμα του blastema ενεργεί ως upstream διοργανωτής της οδού αναδημιουργίας μέσω της σηματοδοτικής οδού Wnt, η οποία ρυθμίζει την επιδερμική διαμόρφωση, τον πολλαπλασιασμό του blastema και την ωρίμανση των οστεοβλαστών, εμμέσως μέσω δευτερευόντων σημάτων, όπως είναι το Fgf και η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών BMP (Wehner et al., 2014). Από την άλλη πλευρά, το εγγύς διαμέρισμα του blastema έχει μια αναγεννητική αποστολή να διατηρήσει υψηλό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την προοδευτική επαναδιαφοροποίησή τους. Πρόσφατα, δύο μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο διεργασιών ρυθμίζεται από το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι (Grotek et al., 2013, Munch et al., 2013). Επίσης, τα ζώα με εκτεταμένη αναγεννητική ικανότητα χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να επανενεργοποιούν ταχέως μια μεγάλη σειρά γονιδίων που εκφράζονται αρχικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η ικανότητά τους να διατηρούν αυτή την πρόσβαση στα αναπτυξιακά προγράμματα στον ενήλικο οργανισμό μπορεί να συσχετίζεται με την πλαστικότητα του επιγενώματός τους (Katsuyama & Paro, 2011).

Οι επιγενετικοί περιορισμοί θα μπορούσαν επίσης να εξηγήσουν γιατί ορισμένα είδη έχουν χάσει την ικανότητα αναγέννησης κατά την εξέλιξη. Αυτό

το θέμα έχει ερευνηθεί πρόσφατα στο πλαίσιο της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου. Βάσει της αξιολόγησης της 5-μεθυλοκυτοσίνης και της 5-υδρομεθυλοκυτοσίνης, έχει προταθεί ότι η πρώιμη φάση της αναγέννησης είναι χαρακτηριζόμενη από μια παροδική απομεθυλίωση του DNA και έκφραση γονιδίων απομεθυλίωσης και επισκευής DNA (Hirose et al., 2013). Η μελέτη των Stewart et al., (2012) έδειξε ότι οι τροποποιήσεις ιστονών σε συγκεκριμένους τόπους μπορεί να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστικός μηχανισμός για την επανενεργοποίηση ενός αναγεννητικού προγράμματος γονιδιακής έκφρασης και για την έναρξη της αναγέννησης. Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα κοινά γονίδια ανάπτυξης και αναγέννησης διατηρούνται σε μια αδρανή / σιωπηλή κατάσταση της χρωματίνης στο ενήλικο ουραίο πτερόγιο του ψαριού. Η απομεθυλίωση του κατασταλτικού σημείου H3K27me3 συμβάλλει στην αναγεννητική απόκριση του ουραίου πτερυγίου μετά τον ακρωτηριασμό. Αρκετά συστατικά του συμπλόκου νουκλεοσωμικής αναδιαμόρφωσης και αποακετυλίωσης (NuRD), όπως τα chd4a, hdac1, rbb4 και mt2, ρυθμίζονται μεταγραφικά με επαγωγή της μεταγραφής στο πολλαπλασιαστικό διαμέρισμα του blastema, όπου τα κύτταρα μεταβαίνουν επίσης σε διαφοροποιημένη κατάσταση. Η χημική αναστολή της αποακετυλάσης της ιστόνης1 (Hdac1) δεν παρεμβαίνει στον αρχικό σχηματισμό του blastema και στην αποδιαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αλλά οδηγεί σε παρεμπόδιση της επαναδιαφοροποίησης των σκελετικών προδρόμων και του σχηματισμού των ακτινοτριχιδίων (Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015).

1.4.4. Ανάπτυξη και μορφογένεση του αναγεννώμενου ουραίου πτερυγίου

Ένα συνεχές ερώτημα στην αναπτυξιακή βιολογία είναι το πώς μπορούν τα αναπτυσσόμενα ζώα να πετύχουν την προδιαγραφόμενη αύξησή τους και μετά να τη διατηρούν. Έχει βρεθεί μια ουσιώδης μετάβαση μεταξύ του ελέγχου της αύξησης κατά την διάρκεια της δημιουργίας του ουραίου πτερυγίου του zebrafish, κατά την οποία συμβαίνει μετάπτωση από αλλομετρική σε ισομετρική αύξηση. Αυτή η μορφολογική μετάβαση ήταν το έναυσμα για να γίνουν περαιτέρω υποθέσεις σχετικά με τις φυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στα μονοπάτια ελέγχου της αύξησης. Έχει βρεθεί ότι τα juvenile ψάρια συνεχίζουν την αλλομετρική ανάπτυξη μέχρι την δημιουργία ενός ώριμου

διχαλωτού σχήματος ουράς. Σε αντίθεση με αυτό η ισομετρική ανάπτυξη ουρών ώριμων και ενήλικων ψαριών σταματάει όταν δεν τρέφονται σωστά (νηστεία) (Matthew I. Goldsmith et al., 2006; Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, 2015). Η συντονισμένη αναλογική ανάπτυξη περιλαμβάνει ελεγχόμενη ρύθμιση μεταξύ αλλομετρικών και ισομετρικών προγραμμάτων, αλλά δεν είναι σαφές τι εκτελεί αυτόν τον έλεγχο. Το ζωικό βασίλειο παρουσιάζει πολλά παραδείγματα παραλλαγών στις συγκεκριμένες διαστάσεις των οργάνων και των μεγεθών των δομών. Αυτή η μεταβλητότητα περιλαμβάνει συντονισμένες μεταβολές στους ρυθμούς ανάπτυξης ιστού, οι οποίες μπορούν είτε να είναι αναλογικές (ισομετρικές) είτε δυσανάλογες (αλλομετρικές) με το υπόλοιπο σώμα. Όπως στα όργανα και στα εξαρτήματα των τετραπόδων, τα πτερύγια του zebrafish αυξάνονται με συγκεκριμένες αναλογίες σχετικές με το μέγεθος του σώματος και οι αναλογίες αυτές ανακτώνται μετά την αναγέννηση (Goldsmith et al., 2003, Iovine and Johnson, 2000). Οι ιστοί αναπτύσσονται αρχικά αλλομετρικά σε σχέση με το μέγεθος του σώματος κατά την πρώιμη νεανική ανάπτυξη (Goldsmith et al., 2006), αλλά η ανάπτυξή τους γίνεται μεταγενέστερα ισομετρική όταν επιτευχθεί το σχήμα των ενήλικων πτερυγίων (Goldsmith et al., 2003; Iovine and Johnson, 2000). Ωστόσο, η μερική απώλεια του πτερυγίου έχει ως αποτέλεσμα την αναγέννηση του ιστού που λείπει από το αρχικό μέγεθος των ενήλικων προκαλώντας αλλομετρική ανάπτυξη, η οποία εξελίσσεται σε ισομετρική ανάπτυξη καθώς οι αναγεννώμενοι ιστοί πλησιάζουν τις αρχικές τους διαστάσεις. Ο ρυθμός της αλλομετρικής αναγεννητικής ανάπτυξης σχετίζεται με την θέση του τραυματισμού (Lee et al., 2005). Η ανάπτυξη και η αναγεννητική αύξηση ρυθμίζονται από τοπικούς παράγοντες όπως οι προσδέτες απελευθέρωσης, τα μόρια προσκόλλησης και οι συνδετικές ουσίες καθώς και οι συστηματικές κυκλοφορούντες ορμόνες (Hoptak-Solga et al., 2008; Lee et al., 2005; Schwartz and Assoian, 2001; Yakar et al., 2002). Αν και έχουν εντοπιστεί αρκετοί μοριακοί παράγοντες και μηχανισμοί που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των ιστών, εξακολουθεί να είναι άγνωστο ποιοι μηχανισμοί εμπλέκονται στο συντονισμό αυτών των φαινομένων για τη δημιουργία σύνθετων δομών σε ακριβείς αναλογικές διαστάσεις και στην αποκατάσταση του κατάλληλου μεγέθους κατά την αναγέννηση (Satu Kujawski et al., 2014). Ο έλεγχος του μεγέθους του οργάνου ή του εξαρτήματος

είναι μια πολύ συντονισμένη και περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς. Αυτά περιλαμβάνουν παράγοντες κυκλοφορίας όπως ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες (IGF) (Stanger et al., 2008). Οι κλασικές μελέτες, μέσω πειραμάτων μεταμόσχευσης σε άκρα σαλαμάνδρας, ήταν οι πρώτες που υποδηλώνουν ότι τα όργανα μπορεί να έχουν εγγενείς πληροφορίες για το τελικό τους μέγεθος, αν και ο υποκείμενος μηχανισμός παραμένει προς ταυτοποίηση (Stanger et al., 2008; Zhao et al., 2011). Τέλος, η πρόσφατα ανακαλυφθείσα οδός Hippo προέκυψε ως ένα ελπιδοφόρο σημείο εκκίνησης για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος και αποδείχθηκε ότι κατά την τελευταία δεκαετία ήταν ένας από τους βασικούς ρυθμιστές της ιστικής ανάπτυξης (Zhao et al., 2011; Mauviel et al., 2011; Gonçalo Miguel Brito, 2011).

1.5. Κύριοι ρυθμιστές της φλεγμονής κατά την αναγέννηση

1.5.1. Μακροφάγα και ουδετερόφιλα

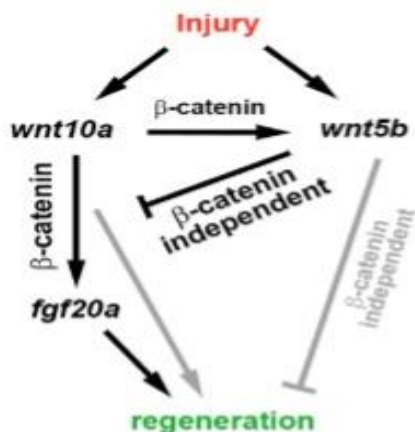
Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, ως βασικοί μεσολαβητές της φλεγμονής, έχουν καθορίσει λειτουργικά σημαντικούς ρόλους στην επισκευή των ιστών των θηλαστικών. Παρόλο που πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι παρόμοια κύτταρα υπάρχουν στα zebrafish και ότι επίσης μεταναστεύουν σε περιοχές τραυματισμού στις λάρβες, είναι ακόμα άγνωστο αν αυτά τα κύτταρα είναι λειτουργικά για την επούλωση πληγών ή την αναγέννηση στα ενήλικα zebrafish. Στα θηλαστικά, διακριτά κύτταρα της φλεγμονώδους αντίδρασης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον προσδιορισμό του επιπέδου αποκατάστασης των τραυματισμένων οργάνων. Το σχετικό χρονικό πλαίσιο της φλεγμονώδους κυτταρικής κίνησης προς και από τα σημεία τραυματισμού είναι παρόμοιο για τα ενήλικα zebrafish και τα θηλαστικά, όπου τα ουδετερόφιλα έλκονται πρώτα προς το τραύμα μέσω της κυκλοφορίας, ακολουθούμενα από τα μακροφάγα. (Sadik et al., 2011; Yoo and Huttenlocher, 2011; Li et al., 2012). Τα δεδομένα παρακολούθησης της πορείας των κυττάρων υποδεικνύουν ότι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα προέρχονται από την κυκλοφορία, ενώ τα περισσότερα μακροφάγα κατοικούν στο περύγιο, σε αντίθεση με τις προνύμφες zebrafish και τα θηλαστικά. Η μείωσή τους στα zebrafish κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ιστών επηρεάζει μόνο τον σχηματισμό πτερυγίων και όχι την ανάπτυξη. Επίσης, δεν έχουν βρεθεί

στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι τα μακροφάγα στα zebrafish ρυθμίζουν την πρόσληψη ή την μετέπειτα διάλυση των ουδετερόφιλων, ενώ τα μακροφάγα έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν αυτές τις κυτταρικές αποκρίσεις σε πληγές των ποντικών (Caillhier et al., 2006). Τα ουδετερόφιλα συμβάλλουν στην αρχική άμυνα κατά των ξένων μικροβίων και η τελική τους αφαίρεση (resolution) είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη αποκατάσταση ιστών (Martin and Feng, 2009; Nonoa και Figueras, 2012). Τα μακροφάγα, τα οποία περιλαμβάνουν διάφορους υποπληθυσμούς υποτύπων M1 ή M2, εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες που μπορούν να προσελκύσουν κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες για να προκαλέσουν είτε επισκευή ιστού είτε σχηματισμό ουλής (Leibovich and Ross, 1975; Serhan and Savill, 2005; Murray and Wynn, 2011). Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα μπορούν να έχουν αποτελεσματική δράση μετά από τραυματισμό, ανάλογα με τον ιστό και τον τραυματισμό (Doni et al., 2003; Walters et al., 2009). Επομένως, είναι προφανές ότι η ρύθμιση της φλεγμονής θα μπορούσε να είναι μια χρήσιμη θεραπευτική προσέγγιση για την αύξηση της επούλωσης των ιστών. Η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης είναι υποψήφια για τη σύνδεση της φλεγμονής και της αναγέννησης στα zebrafish. Ωστόσο, εξακολουθεί να είναι σχετικά ασαφές πώς ενεργοποιείται αυτό το μονοπάτι και πώς η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης επηρεάζει συγκεκριμένα κύτταρα και στάδια της αναγεννητικής διαδικασίας. Είναι σημαντικό ότι το zebrafish μοιράζεται πολλά χαρακτηριστικά με το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένης της ύπαρξης κυττάρων ανάλογων των ουδετερόφιλων, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κύτταρα B και T (Renshaw and Trede, 2012). Στις Zebrafish λάρβες, τα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται ταχέως σε τραύματα μέσω των διάφορων σημείων τραυματισμού και απορροφούν μικρά υπολείμματα νεκρών κυττάρων, όπως και τα αντίστοιχά τους στα θηλαστικά (Renshaw et al., 2006, Mathias et al., 2007 ; Li et al., 2012; Yoo et al. , 2011). Τα μακροφάγα εμφανίζονται σε περιοχές τραύματος αργότερα από τα ουδετερόφιλα, παρουσιάζουν φαγοκυτταρική συμπεριφορά ως απόκριση της βακτηριακής διήθησης και, όπως και στα θηλαστικά, μπορεί να υπάρχουν ως διαφορετικά υποσύνολα διαφορετικής λειτουργίας (Herbomel et al., 1999; Redd et al., 2006; Mathias et al., 2009; Volkman et al., 2010). Αυτές οι μελέτες στις Zebrafish λάρβες δείχνουν ότι αυτά τα φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να συμπεριφέρονται

παρομοίως με τα θηλαστικά μετά από τραυματισμό. Αντιθέτως, η φλεγμονή μπορεί να είναι ένας θετικός ρυθμιστής της νευρωνικής αναγέννησης του zebrafish κατά την τραυματική εγκεφαλική βλάβη (Kyritsis et al., 2012), η οποία είναι αντίθετη με τα ευρήματα στα θηλαστικά (Timothy A. Petrie et al., 2014).

1.5.2. Μονοπάτι wnt-β-κατενίνης

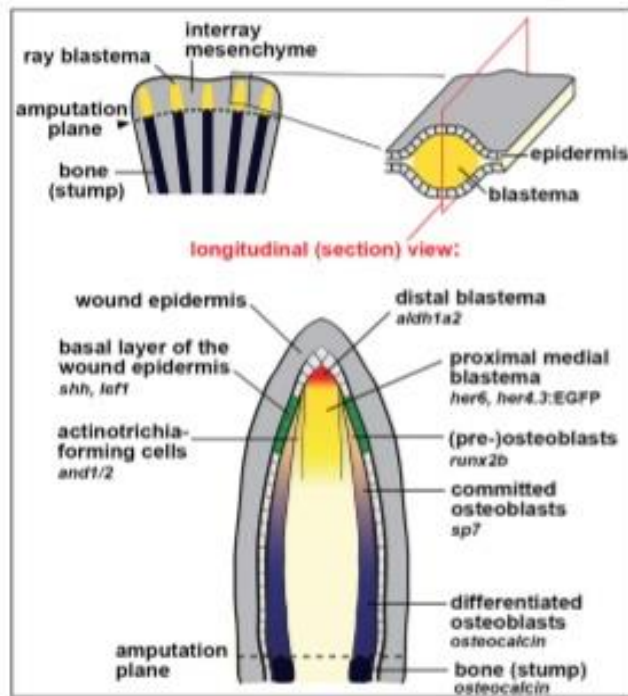
Όπως έχει αναφερθεί και ανωτέρω, η αναγέννηση ιστών ακολουθεί μια επιγενετικής φύσεως διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την δημιουργία προγονικών κυττάρων μέσω επαναπρογραμματισμού διαφοροποιημένων κυττάρων ή μέσω της ενεργοποίησης ήδη υπαρχόντων βλαστικών κυττάρων (Εικόνα 9). Η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης ρυθμίζει τη μοίρα και τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και τη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων στα ενήλικα zebrafish, αλλά η λειτουργική συμμετοχή της στην επιμορφική αναγέννηση δεν έχει σημειωθεί. Επίσης η κανονική σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης απαιτείται για την συντήρηση και την αναγέννηση των οργάνων (Stoick-Cooper et al., 2007; MacDonald et al., 2009). Χρησιμοποιώντας διαγονιδιακές γραμμές ψαριών, η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης φαίνεται να δρα συνεργατικά της σηματοδότησης FGF, η οποία πρόσφατα βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την αναγέννηση των πτερυγίων. Συγκεκριμένα, η αυξημένη σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης είναι επαρκής για την αύξηση της αναγέννησης, καθώς τα πτερύγια της ουράς αναγεννώνται ταχύτερα στα ψάρια τα οποία είναι ετερόζυγα για μια μετάλλαξη της απώλειας της λειτουργίας της *axin1*, η οποία είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της οδού. Παρομοίως, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης από την υπερέκφραση του *wnt8* αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων στο αναγεννώμενο πτερύγιο.



Εικόνα 8 : Μοντέλο σηματοδοτικών γεγονότων που ρυθμίζουν την αναγέννηση πτερυγίων στο zebrafish. Ο τραυματισμός του πτερυγίου της ουράς ενεργοποιεί μέχρι τώρα άγνωστα σήματα που οδηγούν στην προς τα πάνω ρύθμιση των *wnt10a* και *wnt5b*. Η έκφραση *wnt5b* ρυθμίζεται επίσης μέσω της σηματοδότησης Wnt / β -κατενίνης που ενεργοποιείται από το *wnt10a*. Το *wnt10a* ενεργοποιεί μια, εξαρτώμενη από την α -κατενίνη, σηματοδοτική οδό που ρυθμίζει θετικά την έκφραση *fgf20a*, η οποία έχει αποδειχθεί ότι απαιτείται για το σχηματισμό του blastema και την επακόλουθη αναγέννηση (Whitehead et al., 2005). Εκτός από τον ρόλο της στη ρύθμιση της έκφρασης *fgf20a*, η σηματοδότηση Wnt / β -κατενίνης μπορεί επίσης να ρυθμίσει άλλα γονίδια που απαιτούνται για τον σχηματισμό και τον πολλαπλασιασμό του blastema (γκρίζο βέλος). Ο *wnt5b* παράγοντας χρησιμοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι ανεξάρτητο της δράσης της α -κατενίνης, το οποίο δρα ανταγωνιστικά της σηματοδότησης Wnt / β -κατενίνης. Ωστόσο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι αυτοί οι παράγοντες οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από την κατενίνη, εμποδίζουν επίσης την αναγέννηση χωρίς να επηρεάζουν τη σηματοδότηση Wnt / β -κατενίνης (γκρίζο βέλος). Τα βέλη δεν συνεπάγονται άμεσα γεγονότα.

Αντίθετα, η υπερέκφραση του *wnt5b* (Εικόνα 8) μειώνει την έκφραση των γονιδίων στόχων του μονοπατιού Wnt / β -κατενίνης, παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων και αναστέλλει την αναγέννηση των πτερυγίων (Cristi L. Stoick-Cooper1 et al., 2007). Αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την έκφραση προσδετών του Wnt και συστατικών του σηματοδοτικού μονοπατιού της β -κατενίνης σε αναγεννητικά εξαρτήματα αμφιβίων και ψαριών (Caubit et al., 1997a; Caubit et al., 1997b; Poss et al., 2000a). Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί αν η σηματοδότηση Wnt / β -κατενίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην επιμορφική, «αληθινή», αναγέννηση σύνθετων δομών. Επιπροσθέτως, η έκφραση των προσδετών του Wnt και των

παραγόντων της οδού σηματοδότησης της β-κατενίνης έχει αναφερθεί σε αναγεννητικά εξαρτήματα και δομές αμφιβίων και ψαριών (Caubit et al., 1997a; Caubit et al., 1997b; Poss et al., 2000a), υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αναγέννησης.



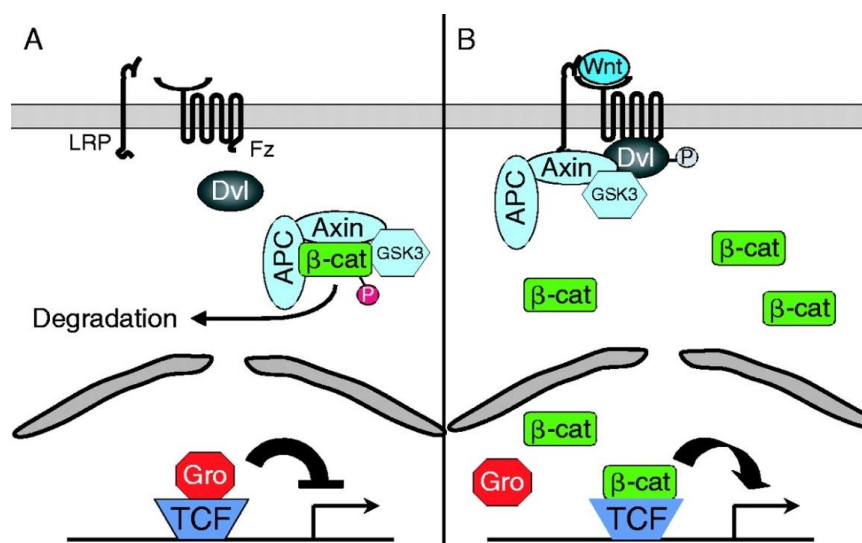
Εικόνα 9: Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης κατά τη διάρκεια του ουραίου πτερυγίου του Zebrafish. (A) Σχετικές ανατομικές δομές και οι περιοχές έκφρασης ενός αναγεννώμενου πτερυγίου κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης.

Το τελικό σημείο της Wnt / β-κατενίνης σηματοδότησης είναι η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων στόχων. Ωστόσο, επειδή η σηματοδότηση Wnt ρυθμίζεται στενά από εξωκυττάρια, κυτταροπλασματικούς και πυρηνικούς αναστολείς, η έκφραση των προσδετών Wnt δεν έχει κατ'ανάγκη ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η βλάβη του πτερυγίου ενεργοποιεί σήματα που επάγουν ταχέως την έκφραση του *wnt10a* και ενδεχομένως άλλων προσδετών του Wnt που ενεργοποιούν την οδό σηματοδότησης της β-κατενίνης. Η φύση αυτών των σημάτων και το εάν αυτοί άμεσα ή έμμεσα ρυθμίζουν την έκφραση των προσδετών του Wnt είναι επίσης άγνωστη. Ένας πιθανός υποψήφιος που θα μπορούσε να ενεργοποιήσει έμμεσα την έκφραση του Wnt είναι η θρομβίνη, η οποία ενεργοποιείται από την

απόκριση επούλωσης του τραύματος (Imokawa και Brockes, 2003; Imokawa et al., 2004 ;Tanaka κ.ά., 1999).

Εκτός από το ρόλο του στον σχηματισμό του blastema, η σηματοδότηση FGF φαίνεται να είναι απολύτως απαραίτητη για την αναγεννητική ανάπτυξη του πτερυγίου, καθώς τα φάρμακα που εμποδίζουν τη σηματοδότηση FGF μπορούν να εμποδίσουν την αναγέννηση των πτερυγίων κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (Poss et al., 2000b). Είναι ενδιαφέρον ότι μια πρόσφατη αναφορά έδειξε ότι τα μόνιμα μυϊκά βλαστοκύτταρα ενεργοποιούνται κατά την αναγέννηση του σώματος της σαλαμάνδρας και ότι οι απόγονοι αυτών των κυττάρων συμμετέχουν στο σχηματισμό του blastema (Morrison et al., 2006). Είναι πιθανό ότι η σχετική συμβολή της απο-διαφοροποίησης και της ενεργοποίησης των υπαρχόντων βλαστικών κυττάρων στο σχηματισμό προγονικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αναγέννησης ποικίλλει μεταξύ οργάνων και οργανισμών, με τα άκρα των αμφιβίων πιθανόν να αντιπροσωπεύουν τη μια άκρη του φάσματος όπου η αποδιαφοροποίηση είναι εξέχουσα και, κατά το άλλο άκρο, οι διαδικασίες όπως η αναγέννηση των μυών ή των οστών των θηλαστικών καθοδηγούνται μόνο από την ενεργοποίηση των υπαρχόντων βλαστικών κυττάρων (Cristi L. Stoick-Cooper et al., 2007). Η σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης μερικώς ρυθμίζει το χρονικό πλαίσιο και το βαθμό ανταπόκρισης των λευκοκυττάρων στα θηλαστικά (French et al., 2004, Ren et al., 2013, Koch et al., 2011) αλλά και τις φλεγμονώδεις διεργασίες. Η ενεργή σηματοδότηση Wnt μπορεί να μετριάσει τη φλεγμονή του πρώιμου σταδίου και να λειτουργήσει ως μοριακός διακόπτης μετάβασης στα μεταγενέστερα στάδια της ανοσοαπόκρισης (resolution). Η ιδέα αυτή μοιράζεται ομοιότητες με την κατάσταση που επικρατεί στα θηλαστικά, όπου η έγκαιρη απομάκρυνση των ουδετερόφιλων μετά το τραύμα είναι ουσιώδης σημασίας για τον τερματισμό της φλεγμονής και την καθυστέρηση της απόπτωσης. Η διαταραγμένη απομάκρυνση των ουδετερόφιλων μπορεί να δημιουργήσει συσσωματώματα των συγκεκριμένων κυττάρων και να διαιωνίσει την ιστική βλάβη (Timothy A. Petrie et al., 2014). Η δραστηριότητα Wnt / β-κατενίνης εμπλέκεται στη δημιουργία και τη διατήρηση των αγγείων (Sadik et al., 2011) του κεντρικού νευρικού συστήματος του zebrafish κατά του οποίου τα κύτταρα sox10, που προέρχονται από την νευρική πλάκα, μεταναστεύουν και πολλαπλασιάζονται (Moro, Ozhan-Kizil et al., 2012).

Κατά την απουσία των προσδετών του Wnt, ο κύριος μετατροπέας σήματος του Wnt, η β κατενίνη, διατηρείται σε χαμηλή συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα μέσω της δράσης ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που περιέχουν Axin, APC και GSK3β, οι οποίες φωσφορυλιώνονται και στοχεύουν την β-κατενίνη ως προς κατακερματισμό στο πρωτεάσωμα. Όταν οι προσδέτες του Wnt δεσμεύονται στο σύμπλεγμα υποδοχέα Fz / LRP, η αποικοδόμηση της β-κατενίνης παρεμποδίζεται μέσω μη κατανοητών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την πρόσληψη Axin στο σύμπλεγμα υποδοχέα και την επακόλουθη αναστολή της καταστροφής του συμπλέγματος β-κατενίνης (Εικόνα 10) (Clevers et al. , 2006).



Εικόνα 10: Περιγραφή της σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης. (A) Απουσία του Wnt, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από ένα σύμπλοκο που περιέχει GSK3. Αυτό στοχεύει την β-κατενίνη ως προς πρωτεϊνολυτική αποικοδόμηση. Στον πυρήνα, τα μέλη των T-κυττάρων (TCF), της οικογένειας που δεσμεύονται πάνω στο DNA, καταστέλλουν τους στόχους του Wnt, σε συνεννόηση με τους συν-κατασταλείς όπως ο Groucho (Gro). (B) Μετά τη δέσμευση του Wnt στους υποδοχείς Fz-LRP, ο συνδυασμός της αλληλεπίδρασης LRP-axin και της φωσφορυλίωσης Dvl (P) παρεμποδίζει το σύμπλεγμα APC-axin-GSK3 για τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης. Η συσσωρευμένη β-κατενίνη εισέρχεται τότε στον πυρήνα, όπου μετατρέπει το TCF σε μεταγραφικό ενεργοποιητή (Ken M. Cadigan and Yan I. Liu, 2006).

Οι σταθεροποιημένες β-κατενίνες μετατοπίζονται στον πυρήνα για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο μεταγραφικού ενεργοποιητή με την οικογένεια των

μεταγραφικών παραγόντων που αποτελούνται από τον T-κυτταρικό παράγοντα / παράγοντα λεμφικής ενίσχυσης (TCF / LEF) (McDonald et al., 2009). Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί την μεταγραφή ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων στόχων, μέσω της αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς ενεργοποιητές, όπως οι CBP / p300 (Bienz and Clevers, 2003), Pygo (Stadel and Basler, 2005) και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Mosimann et al., 2009). Οι προσδέτες του Wnt μπορούν να ενεργοποιήσουν διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, εκ των οποίων το μονοπάτι εξαρτώμενο από την β-κατενίνη είναι το πιο χαρακτηριστικό. Η πρόσδεση του συνδέτη στους υποδοχείς Frizzled και οι συνυποδοχείς Lrp5 / Lrp6 οδηγούν στη σταθεροποίηση και συσσώρευση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης, η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα και μεταβάλλει την μεταγραφή του γονιδίου στόχου μαζί με τους παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας Tcf / Lef (Εικόνα 10) (MacDonald et al., 2009).

Η αναστολή της σηματοδότησης Wnt δύο φορές την ημέρα λίγο πριν από τον ακρωτηριασμό του πτερυγίου και μέχρι τις 4 dpa επηρεάζει πλήρως την αναγέννηση των πτερυγίων. Εντούτοις, εάν τα πτερύγια που δεν αναγεννήθηκαν ακρωτηριαστούν πάλι και η σηματοδότηση του Wnt παραμείνει ανέπαφη, τα πτερύγια μπορούν να αναγεννηθούν πλήρως. Αυτό αποκαλύπτει ότι υπάρχει ένα χρονικό παράθυρο για την έναρξη της αναγέννησης που ενεργοποιείται αμέσως μετά από κάθε ακρωτηριασμό και αυτό εξαρτάται απόλυτα από την σηματοδότηση Wnt / β-κατενίνης. Είναι σημαντικό ότι αυτά τα πειράματα δείχνουν επίσης ότι ο σχηματισμός του blastema δεν εξαρτάται από μια ομάδα προγονικών κυττάρων τα οποία απαιτούν Wnt σηματοδότηση για τη συντήρησή τους. Ενώ αυτά τα δεδομένα δεν αποκλείουν εντελώς τη συμβολή των προγονικών κυττάρων, όμως είναι πιο συμβατό με το εναλλακτικό μοντέλο αναγέννησης που βασίζεται στην αποδιαφοροποίηση. Στην πραγματικότητα, αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται τώρα από τα πρόσφατα ευρήματα που δείχνουν ότι οι ώριμοι οστεοβλάστες αποδιαφοροποιούνται ώστε να σχηματίζουν μέρος του blastema και αναγεννούν το οστό στο ουραίο πτερύγιο zebrafish (Hausenloy DJ et al., 2012). Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, η σηματοδότηση Wnt θα μπορούσε να απαιτηθεί για αποδιαφοροποίηση ή / και επέκταση των αποδιαφοροποιημένων κυττάρων για να σχηματιστεί ένα το blastema. Παρά

την εκπληκτική αυτή ικανότητα αναγέννησης, το οστό εγγύτερα στο επίπεδο του ακρωτηριασμού γίνεται πιο παχύ με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους ακρωτηριασμών. Ενώ μερικοί αποδιαφοροποίητοι οστεοβλάστες μεταναστεύουν περιφερικά για να σχηματίσουν το blastema, είναι απίθανο οι νεοσχηματισμένοι οστεοβλάστες μακριά από το επίπεδο ακρωτηριασμού να συμμετέχουν στον σχηματισμό του blastema. Αντίθετα, πιθανότατα να αντιπροσωπεύουν μια πηγή κυττάρων που αντικαθιστούν εκείνα που κινούνται προς το blastema. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού προκαλεί επίσης αυτά τα κύτταρα να επανενεργοποιήσουν την έκκριση μήτρας, η οποία μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους οδηγεί σε πάχυνση των οστών. Εναλλακτικά, η αύξηση της οστικής μήτρας θα μπορούσε να προκληθεί από μία μη ισορροπημένη αναλογία κυττάρων σχηματισμού οστών και αποικοδόμησης οστών. Είναι ενδιαφέρον ότι ο πρόσφατα αναγεννημένος ιστός του πτερυγίου εμφανίζει μειωμένο πάχος οστού και χώρο μεταξύ των ακτινών, πιθανώς επειδή αυτοί είναι πρόσφατα σχηματισμένοι ιστοί που εξακολουθούν να αναδιαμορφώνονται (Azevedo et al., 2011).

Παραδόξως, οι κύριες λειτουργίες της σηματοδότησης της β-κατενίνης κατά τη διάρκεια της αναγεννητικής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού του blastema και της ωρίμανσης των οστεοβλαστών, προκαλούνται από δευτερεύοντα σήματα. Μια κύρια λειτουργία της σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης κατά τη διάρκεια της αναγέννησης είναι να καθοριστούν τα κέντρα οργάνωσης μέσα στο blastema. Εκεί ρυθμίζει τη δραστηριότητα ενός αριθμού μονοπατιών σηματοδότησης που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το σχηματισμό ιστού σε άλλα διαμερίσματα του πτερυγίου. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του blastema ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της σηματοδότησης β-κατενίνης σε μη πολλαπλασιαζόμενα απομακρυσμένα κύτταρα του blastema και η ωρίμανση των οστεοβλαστών και η επιδερμική σχεδίαση ρυθμίζονται μέσω δραστηριότητας της β-κατενίνης σε γειτονικά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο η αναγέννηση δεν είναι απλώς μια ομοιογενής μάζα προγονικών κυττάρων αλλά είναι ιδιαίτερα οργανωμένη σε ξεχωριστούς τομείς, μερικοί από τους οποίους δρουν ως οργανωτικά κέντρα που ενορχηστρώνουν την αναγέννηση μέσω παραγωγής εκκριτικών παραγόντων (Daniel Wehner et al., 2013).

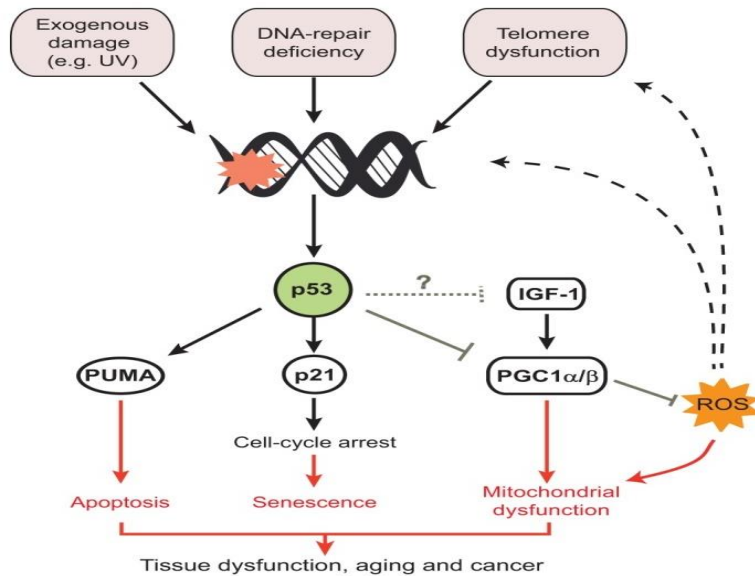
1.6. Ο ρόλος της τελομεράσης στην αναγέννηση και στη γήρανση

Το Zebrafish έχει γίνει ένα ισχυρό μοντέλο για τη διερεύνηση της αναδιαμόρφωσης του ιστού εξαιτίας της ικανότητάς του να αναγεννά πλήρως τραυματισμένα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, του αμφιβληστροειδούς, της καρδιάς και των πτερυγίων, ακόμη και σε ενήλικα στάδια (Gemberling et al., 2013). Αυτή η ικανότητα αναγέννησης μειώνεται με την ηλικία (Kishi et al., 2009) και, σε ορισμένα όργανα, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δραστηριότητα της τελομεράσης (Bednarek et al., 2015; Elmore et al., 2008; Madalena C. Carneiro et al., 2016). Σε πειράματα που έχουν γίνει σε αρουραίους η αντίστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης είναι μια κρίσιμη καταλυτική υπομονάδα του ενζυματικού συμπλόκου της τελομεράσης και ρυθμίζει τη δράση της τελομεράσης, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και της επιβίωσης (Zhang RG et al., 2010; Carlson GD et al., 2002). Επιπρόσθετα, το TERT ρυθμίζει την κατανομή του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , τη μιτοχονδριακή λειτουργία, τον ενεργειακό μεταβολισμό, την έκκριση αυξητικών παραγόντων και την έκφραση αποπτωτικών γονιδίων (Zhou JJ et al., 2007; Hajo 's F., 2008; Okere CO et al., 2004; Naghdi M. et al., 2009; De Lange T. et al., 2005). Έχει αποδειχθεί ότι το TERT παρουσίασε, επίσης, δυναμική έκφραση στην ουλή του νωτιαίου μυελού, παρόμοια με την GFAP, η οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της σοβαρότητας του τραύματος της γλοίας. Επίσης, η παρεμπόδιση της έκφρασης του TERT mRNA απέτυχε να μειώσει σημαντικά τον αριθμό των γλοιακών ουλών, υποδηλώνοντας, έτσι, ότι το TERT δεν είναι το μόνο που συμβάλλει στο σχηματισμό γλοιώδους ουλής (Xu Tao et al., 2013). Παρόλο που η έκφραση τόσο της τελομεράσης όσο και των τελομερών αυξάνονται από τα εμβρυικά μέχρι τα ενήλικα στάδια, αυτά μειώνονται δραστικά στα ηλικιωμένα ψάρια, παρά το γεγονός ότι η δραστηριότητα τελομεράσης εντοπίζεται σε διαφορετικούς ιστούς γερασμένων ψαριών.

Εκτός από την προστασία των τελομερών, η αντίστροφη τρανσκριπτάση της τελομεράσης (TERT) έχει πολλαπλές εξαρτώμενες από το μήκος επιδράσεις, που δεν εξαρτώνται όμως από τα τελομερή, οι οποίες συνδέονται στενά με την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων (Collins K, Mitchell JR, 2002; de Lange T, 2005; Blasco MA, 2005; Meyerson M et

al., 1997). Μερικοί ερευνητές ανέφεραν ότι η διεγερτική και τραυματική εγκεφαλική βλάβη θα μπορούσε να προκαλέσει έκφραση της τελομεράσης στη μικρόγλοια ενεργοποιώντας μια σειρά κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, προωθώντας έτσι το σχηματισμό ουλής (Collins K., 2000). Τα τελομερή είναι συμπλέγματα νουκλεοπρωτεϊνών στο τέλος των χρωμοσωμάτων τα οποία αποτελούνται από επαναλήψεις TTAGGG και αρκετές συσχετιζόμενες πρωτεΐνες (Blackburn EH, 1991). Καθώς η συμβατική DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση αποτυγχάνει να αντιγράψει πλήρως τα άκρα των γραμμικών μορίων, 50- 200 bp επαναλήψεων του τελομερούς DNA χάνονται σε κάθε γύρο της κυτταρικής διαίρεσης. Σε κυτταρικό επίπεδο, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή η γήρανση των κυττάρων συμβαίνουν όταν τα τελομερή φθάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος, θέτοντας σε κίνδυνο την κυτταρική βιωσιμότητα. Η τελομεράση αντισταθμίζει την απώλεια των τελομερών σε εκείνους τους κυτταρικούς τύπους όπου εκφράζεται (Greider CW et al., 1985; Greider CW et al., 1987; Greider CW et al., 1989; Chan SW et al., 2002), αλλά το επίπεδο δραστηριότητάς της στους περισσότερους ιστούς ενηλίκων δεν επαρκεί για να εξουδετερώσει τη «γήρανση» των τελομερών (Collins K et al., 2002). Σε ανθρώπους, η έκφραση της τελομεράσης περιορίζεται κυρίως σε πολύ πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (γεννητικά κύτταρα και προγονικά / βλαστοκύτταρα) σε ενήλικες. Η δραστηριότητα της τελομεράσης εκφράζεται κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Broccoli D et al., 1995; Counter CM et al., 1995; Wright WE et al., 1996) και είναι ιδιαίτερα ανιχνεύσιμη σε αθανατοποιημένα κύτταρα και σε πολλούς ιστούς καρκινικών κυττάρων (Kim NW et al., 1994; Hiyama K et al., 1995; Hiyama E et al., 1995). Αν και τα ανθρώπινα όργανα έχουν περιορισμένη ικανότητα να θεραπεύουν και να αναγεννούν χαλασμένους ή χαμένους ιστούς, το zebrafish διατηρεί αξιοσημείωτες αναγεννητικές ικανότητες στον αμφιβληστροειδή, τα πτερύγια, την καρδιά, το νωτιαίο μυελό και άλλους ιστούς. Επιπλέον, το zebrafish έχει άφθονη τη δραστηριότητα της τελομεράσης σε σωματικούς ιστούς από έμβρυα έως τους ηλικιωμένους ενήλικες (Kishi S et al., 2003; McChesney PA et al., 2005). Τα Zebrafish διαθέτουν ανθρώπινα βραχέα τελομερή που μειώνονται προοδευτικά με την ηλικία, φτάνοντας σε μήκη, σε μεγάλη ηλικία, που παρατηρούνται όταν μεταλλαχθεί η τελομεράση. Ο εκτενής χαρακτηρισμός της καλά διατηρημένης μοριακής και κυτταρικής

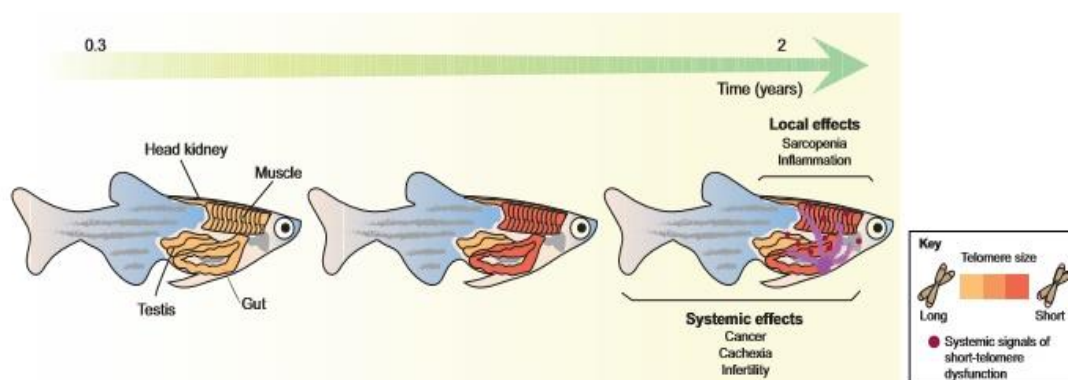
φυσιολογίας του κάνει αυτό το σπονδυλωτό ένα εξαιρετικό μοντέλο για να ξεδιπλωθεί η υποκείμενη σχέση ανάμεσα στη βράχυνση των τελομερών, την αναγέννηση των ιστών, τη γήρανση και την ασθένεια (Madalena C. Carneiro et al., 2016). Τα τελομερή που έχουν βραχυνθεί και είναι σε κρίσιμα μήκη αναγνωρίζονται ως σπασίματα της διπλής έλικας του DNA (DSBs) και ενεργοποιούν μηχανισμούς που συνιστούν αποκρίσεις βλάβης του DNA (DDR) που κορυφώνονται με έναν συγκεκριμένο τύπο διακοπής κυτταρικού κύκλου, που έχει χαρακτηριστεί από τον Hayflick ως «αντιγραφική γήρανση» (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Hayflick and Moorhead, 1961). Τρεις ενδιαφέρουσες πτυχές της βράχυνσης των τελομερών στο zebrafish επιβεβαιώνουν περαιτέρω ότι αυτός ο οργανισμός είναι ένα αποτελεσματικό μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των ανθρώπινων τελομερών: 1. Όπως έχει αναφερθεί και στον άνθρωπο (Daniali et al., 2013), η μείωση των τελομερών συμβαίνει τόσο σε όργανα που έχουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (π.χ. έντερο), όσο και σε όργανα που έχουν χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό (π.χ. μυϊκά κύτταρα) στα zebrafish, ανεξάρτητα από τις διαφορές στους ρυθμούς πολλαπλασιασμού (Carneiro et al., 2016). Τα ROS είναι γνωστό ότι έχουν μια γονοτοξική δράση, ιδιαίτερα σε περιοχές πλούσιες σε G βάσεις, συμπεριλαμβανομένων των τελομερών (Henle et al., 1999; Oikawa et al., 2001). 2. Στο έντερο και το μυϊκό ιστό του zebrafish, η έντονη διάβρωση των τελομερών συμβαίνει μέσα στα πρώτα 1,5 χρόνια, μετά τα οποία δεν μπορεί να ανιχνευθεί καμία σημαντική βράχυνση. Στους ανθρώπους έχει περιγραφεί μια παρόμοια τάση έντονης βράχυνσης κατά τη διάρκεια της εφηβείας, ακολουθούμενη από σταθεροποίηση του μήκους σε μεταγενέστερες ηλικίες (Aubert et al., 2012; Sidorov et al., 2009) και έτσι αυτό θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει την εξάλειψη των κυττάρων με εξαιρετικά βραχιά τελομερή πιθανώς μέσω απόπτωσης. 3. Η συσσώρευση βραχέων τελομερών και βλάβης στα τελομερή με την πάροδο του χρόνου στα zebrafish οδηγεί στην εμφάνιση φαινοτύπων γήρανσης ειδικών για τον κάθε ιστό, όπως η φλεγμονή του εντέρου και των ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως η καχεξία και, κατά εκπληκτικό τρόπο, ο καρκίνος (Carneiro et al., 2016).



Εικόνα 11. Μονοπάτια που διαμορφώνονται υπό τον άξονα των κοντών τελομερών και του p53 (Madalena C.Carneiro et al., 2016).

Η έλλειψη της τελομεράσης στο zebrafish δείχνει, εξαρτώμενη από την p53, πρόωρη γήρανση και μειωμένη διάρκεια ζωής στην πρώτη γενεά, όπως συμβαίνει στους ανθρώπους, αλλά όχι στα ποντίκια, πιθανώς αντανακλώντας το αντίστοιχο μήκος τελομερών που υπάρχουν στα ψάρια και στους ανθρώπους (Εικόνα 11). Μεταξύ αυτών των συμπτωμάτων γήρανσης, η καμπυλότητα της σπονδυλικής στήλης, η εκφύλιση του ήπατος και του αμφιβληστροειδούς και η στειρότητα είναι τα πιο αξιοσημείωτα. Αν και τα έμβρυα της δεύτερης γενιάς πεθαίνουν στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, η αποκατάσταση της δραστηριότητας της τελομεράσης διασώζει το μήκος των τελομερών και την επιβίωση, υποδεικνύοντας ότι η ποσότητα της τελομεράσης είναι κρίσιμη. Περαιτέρω, η p53 επάγεται από την φθορά των τελομερών, οδηγώντας στην αναστολή της ανάπτυξης και απόπτωση (Εικόνα 11). Είναι σημαντικό ότι η γενετική αναστολή του p53 διασφαλίζει τις ανεπιθύμητες επιδράσεις της απώλειας των τελομερών, υποδεικνύοντας ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται λόγω της βράχυνση των τελομερών διατηρούνται εξελικτικά από τα ψάρια στα θηλαστικά. Η μερική διάσωση του μήκους των τελομερών και της μακροζωίας μέσω της αποκατάστασης της δραστηριότητας της τελομεράσης, μαζί με την ικανότητα χημικής διαλογής υψηλής απόδοσης που προσφέρει το zebrafish, δείχνουν τη χρησιμότητα αυτού του μοντέλου για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων ικανών να ενεργοποιήσουν την τελομεράση. Το μήκος των τελομερών στα zebrafish (15-

20 kb) είναι σχετικά παρόμοια με τα ανθρώπινα τελομερή (10-15 kb). Αν και η τελομεράση είναι συστατικά ενεργή σε πολλαπλά όργανα στα zebrafish (Εικόνα 12), αντίθετα με την κατάσταση στους αντίστοιχους ιστούς των θηλαστικών, η έκφραση του mRNA, η δραστικότητα της τελομεράσης και το μήκος των τελομερών, όλα μειώθηκαν δραστικά σε σχεδόν όλους τους ιστούς των ψαριών μετά από 18 μήνες ηλικίας υποδεικνύοντας ότι είναι χρήσιμοι δείκτες για την αξιολόγηση της διαδικασίας γήρανσης στα zebrafish (Anchelin et al., 2011; Xie et al., 2008; Monique Anchelin et al., 2013).



Εικόνα 12: Τα τελομερή βραχύνονται με διαφορετικούς ρυθμούς, προβλέποντας έτσι την τοπική και συστηματική δυσλειτουργία των ιστών κατά τη γήρανση του zebrafish. Φυσιολογικά τα τελομερή βραχύνονται με διαφορετικό ρυθμό σε συγκεκριμένα όργανα του zebrafish (πχ. Έντερο, μύες) αλλά στους όρχις και στα νεφρά παρατηρείται διατήρηση του μήκους των τελομερών. Η μωβ απεικόνιση είναι σήματα δυσλειτουργίας που δημιουργούν ενός περιβάλλον ασθένειας (Madalena C.Carneiro et al.,2016).

Το zebrafish φαίνεται να ρυθμίζουν τα τελομερή τους παρόμοια με τα ποντίκια, τα οποία επίσης έχουν πολύ μακρά τελομερή που δεν φαίνεται να μειώνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ζωής. Η ικανότητα του zebrafish να υποβληθεί σε αναγέννηση πτερυγίων και οργάνων απαιτεί τα κύτταρα που εκτελούν την επισκευή να υποστούν πολλές κυτταρικές διαιρέσεις (Blasco MA et al., 1997). Η τελομεράση στους υδρόβιους οργανισμούς μπορεί να είναι σημαντική για την αναγέννηση των ιστών με βάση τις ακόλουθες παρατηρήσεις:

1) η τελομεράση είναι παρούσα σε μακρόβια είδη αλλά και σε είδη που ζουν λιγότερο 2) αυτά τα είδη έχουν σχετικά βραχεία (ή βραχύτερα) τελομερή, τα οποία θα πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού συσχετιζόμενο με την ανανέωση των ιστών, 3) τα υδρόβια

θηλαστικά, τα οποία δεν είναι ικανά για αναγέννηση, δεν έχουν ανιχνεύσιμη δραστηριότητα της τελομεράσης και 4) η αναγέννηση είναι μια διαδικασία που υπάρχει σε όλα τα είδη των υδρόβιων ζώων εκτός των θηλαστικών.

Όπως και στα θηλαστικά, η “δοσολογία” της τελομεράσης φαίνεται να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την ομοιόσταση του zebrafish. Αυτό υπογραμμίζεται από την παρατήρηση ότι περισσότερο από το 50% των απογόνων (δεύτερης γενιάς ή G2 *tert* - / -), των ψαριών που είναι ομόζυγα για την έλλειψη της τελομεράσης, πεθαίνουν μέσα στην πρώτη εβδομάδα ζωής (Anchelin et al., 2013). Παρόμοια με άλλες ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση, ο καρκίνος εμφανίζεται πρόωρα στα *tert*-/- zebrafish (4 μήνες) που φέρουν τα χαρακτηριστικά φυσιολογικού γήρατος (Carneiro et al., 2016). Τέλος, αν εμφανιστούν όγκοι στα συγκεκριμένα *tert*-/- ψάρια, η ανάπτυξη και η εξέλιξή τους εξαρτάται από την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού συντήρησης των τελομερών. Η εξήγηση είναι ότι οι όγκοι των *tert*-/- zebrafish είναι αποτελεσματικοί στους μηχανισμούς εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) (Bryan et al., 1997). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ALT μηχανισμός επιτυγχάνεται με μηχανισμούς ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) σε τελομερή (Madalena C. Carneiro et al., 2016).

1.7. Δράση της κορτικοτροπίνης ορμόνης (crh)

Η υποθαλαμική υπόφυση του αδενοκορτικοειδούς άξονα (HPA) ρυθμίζει τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά στο στρες και η ορμόνη απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH) που απελευθερώνεται από τον κολπικό πυρήνα του υποθαλάμου είναι ένας κύριος ρυθμιστής του άξονα HPA. Η απόκριση στο στρες περιλαμβάνει πολλαπλές θέσεις δράσης τόσο στο ΚΝΣ όσο και στην περιφέρεια και ο άξονας HPA αντιπροσωπεύει μία από τις βασικές θέσεις για τη ρύθμιση της απόκρισης του στρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης, ένας μικρός πληθυσμός νεύρο-ενδοκρινικών νευρώνων στον κολπικό πυρήνα του υποθαλάμου εκκρίνει την CRH ορμόνη και την arginine vasopressin (AVP) στην κυτταρική πύλη της υποθαλαμικής υπόφυσης. Ενεργώντας στην πρόσθια υπόφυση, η CRH και το AVP ενεργοποιούν την απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) στη γενική κυκλοφορία, η οποία προκαλεί την απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών (GCs) από τον φλοιό των επινεφριδίων. Παρ 'όλα αυτά, με τη βοήθεια συγκεκριμένων διαγονιδιακών

ψαριών αποκαλύφθηκαν οι γενικές χαρακτηριστικές ιδιότητες των crh zebrafish κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο στρες. Σε προνύμφες zebrafish, οι νευρώνες βρίσκονται σε ανώριμη κατάσταση, οπότε οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να αντιμετωπίσουν την ανταπόκριση των ώριμων νευρώνων crh. Οι πρωτογενείς νευρώνες crh υιοθετούν έναν παρόμοιο μηχανισμό προοδευτικής στρατολόγησης κυττάρων ώστε να προσαρμόσουν το μέγεθος της απόκρισης τους στην επικρατούσα απειλή (Brian P. Grone και Karen P. Maruska). Έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την δράση της συγκεκριμένης ορμόνης και της αναγέννησης δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση στο ποντίκι αλλά και στην σαλαμάνδρα. Αρχικά, μετά τον ακρωτηριασμό, η σαλαμάνδρα έχει την αξιοσημείωτη ικανότητα να αναγεννά το άκρο της, και αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αποδιαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Ύστερα από πρωτεωμική ανάλυση τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 1476 πρωτεΐνες είχαν αλλάξει σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών συμμετείχαν 407 πρωτεΐνες στη διαφοροποίηση των κυττάρων εκ των οποίων 212 πρωτεΐνες στη διαφοροποίηση των κυττάρων του δέρματος, των μυοκυττάρων, των νευροκυττάρων, των χονδροκυττάρων και των οστεοκυττάρων και 37 πρωτεΐνες συμμετείχαν σε μονοπάτια σηματοδότησης των BCC, CRH, CXCR4, GnRH, GPCR και IL1, οι οποίες ελέγχουν την διαφοροποίηση και επαναδιαφοροποίηση (Geng X et al., 2014). Συγκεκριμένα, η ορμόνη που απελευθερώνει κορτικοτροπίνη (CRH) ασκεί σημαντικά βιολογικά αποτελέσματα σε πολλαπλούς περιφερικούς ιστούς μέσω παρακρινών / αυτοκρινών ενεργειών. Ινοβλάστες γενετικά ανεπαρκείς σε crh (Crh2^{-/-}) είχαν υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης και αλλάζουν τα πρότυπα έκφρασης της IL-6 και του TGF-β1 σε σύγκριση με τα κύτταρα άγριου τύπου (Crh + / +). Ενδιαφέρον έχει ότι όταν ανθρώπινες πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών εκτέθηκαν στον ανταγωνιστή CRF1 antalarmin, παρουσίασαν αντίστοιχα ευρήματα με εκείνα των κυττάρων Crh^{-/-}, παρουσιάζοντας μεταβληθείσα πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική συμπεριφορά και κατασταλαμένη παραγωγή IL-6. Συμπερασματικά, ο εκφραζόμενος σε ινοβλάστες CRH επιδρά στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την παραγωγή κυτοκίνης, σε διεργασίες που σχετίζονται με την ανταπόκριση του δέρματος σε τραυματισμό. Συμπληρωματικά, οι ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις του CRH μπορεί να περιλαμβάνουν ένα

σημαντικό ρόλο στην αναδημιουργία και την αναγέννηση του επιδερμικού ιστού και τη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι το CRH ρυθμίζει την έκκριση των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1, IL2 και IL-6. Η ανάπτυξη *Crh-deficient* ποντικού έδωσε σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο του ενδογενούς CRH στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και την φλεγμονώδη απόκριση. Τα ποντίκια *Crh-/-* παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση σε δύο πειραματικά μοντέλα τοπικής φλεγμονής. Το CRH και οι υποδοχείς του (CRF1, CRF2) εκφράζονται σε πολλούς περιφερικούς ιστούς και όργανα, συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, όπου έχει διπλή δραστηριότητα, άμεση προφλεγμονώδη και έμμεση αντιφλεγμονώδη. Επιπλέον, έχει υποτεθεί ότι το CRH του δέρματος διαμεσολαβεί στην ενεργοποίηση της απόκρισης του ιστού σε τοπικούς στρεσογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και του τραυματισμού. Η έκφραση της CRH σε ινοβλάστες που έχουν παρθεί από ποντίκια εξαρτάται από τη διαφορετική πηγή ινοβλαστών, την ηλικία ή το στάδιο ανάπτυξης. Και οι δύο τύποι υποδοχέων του CRH, ο CRF1 και ο CRF2 εκφράζονται σε δερματικούς ινοβλάστες και είναι πλήρως λειτουργικοί επειδή είναι ικανοί να συνδέονται με τον προσδέτη με συγκεκριμένο τρόπο και επειδή η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε παραγωγή cAMP. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών στα *Crh-/-* ποντίκια με τους ινοβλάστες σε *Crh + /+* ποντίκια υποδεικνύουν ειδικές επιδράσεις του ενδογενούς CRH σε διάφορους ανεξάρτητους βιολογικούς δείκτες των ινοβλαστών τόσο υπό βασικές συνθήκες όσο και μετά την πρόκληση τραυματισμού *in vitro*. Προηγουμένως δημοσιευμένες μελέτες έχουν δείξει ότι αν και το σύστημα υποδοχέων CRH / CRF εκφράζεται τόσο σε ανθρώπινο δέρμα όσο και σε δέρμα ποντικού και φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην δερματική βιολογία και των δύο, υπάρχουν ειδικές διαφορές που περιλαμβάνουν τον τύπο του κυρίαρχου υποδοχέα που εκφράζεται. Προς έκπληξή μας, ο φαρμακολογικός αποκλεισμός της CRH σε πρωτογενείς ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες προκάλεσε έναν φαινότυπο πολύ παρόμοιο με αυτόν που βρήκαμε στους ινοβλάστες σε ποντίκια *Crh-/-*. Τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν από *Crh-/-* και αγρίου τύπου ποντίκια καθώς και από ανθρώπινους ινοβλάστες υποδηλώνουν ότι το ενδογενές παραγόμενο CRH διαδραματίζει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο σε διάφορες

παραμέτρους της λειτουργίας των ινοβλαστών του δέρματος. Στην ουσία, το πρωταρχικό αποτέλεσμα του ενδογενούς CRH φαίνεται να είναι κατασταλτικό και προ-φλεγμονώδες (Rassouli et al., 2011). Μια ακόμη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε CRH ανεπαρκή ποντίκια δείχνει ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να διεγείρουν τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και να προκαλέσουν αυξημένη έκκριση της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH), της αδρενοκορτικοτροπίνης και των γλυκοκορτικοειδών. Πειραματικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι το CRH μπορεί να ρυθμίσει τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω δύο οδών: ενός αντιφλεγμονώδους, μέσω της κεντρικής απελευθέρωσης του CRH, πιθανότατα μέσω διέγερσης της απελευθέρωσης γλυκοκορτικοειδών και κατεχολαμινών και ενός προφλεγμονώδους, μέσω περιφερικής απελευθέρωσης του CRH (Karalis et al., 1997). Η μελέτη της συγκεκριμένης δράσης του CRH μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών ανταγωνιστών που στοχεύουν δερματικούς ινοβλάστες στην επούλωση πληγών.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει δύο βασικούς στόχους. Ο πρώτος είναι η διερεύνηση του ποσοστού και του μήκους αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου, ύστερα από ακρωτηριασμό, με τη βοήθεια αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων σειρών ενήλικων zebrafish. Ο δεύτερος στόχος είναι η μελέτη της έκφρασης και συσσώρευσης ανοσορυθμιστικών μορίων όπως τα ουδετερόφιλα σε ακρωτηριασμένο ουραίο πτερύγιο κάνοντας χρήση αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων σειρών εμβρύων zebrafish που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα χρωστική στο ενδοθήλιό τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πειραματόζωα

3.1.1. Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου

Τα πειραματόζωα εκτρέφονται και διαβιούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) σε συστήματα ανακύκλωσης και αποστείρωσης γλυκού νερού, σε δοχεία 1, 3, και 10 λίτρων (Εικόνα 13). Το pH κυμαίνεται από 6,5 έως 7,7, η αγωγιμότητα του νερού από 400 έως 700 μS , τα νιτρικά ($< 2.5 \text{ mg/L}$), τα νιτρώδη ($\leq 0.025 \text{ mg/L}$) και το νερό ανακυκλώνεται. Ο κύκλος φωτός είναι 14 ώρες φως και 10 σκοτάδι (9:00 – 23:00 φως). Η θερμοκρασία στα συστήματα κυμαίνεται από 26,50 C έως 29 °C. Σε κάθε μονόλιτρο tank υπάρχουν από 1 έως 3 ψάρια, σε κάθε τρίλιτρο από 3 έως 10 ψάρια και στα tank 5 λίτρων υπάρχουν από 4 έως 12 ψάρια. Η διατήρηση των ψαριών σε πυκνότητες μικρότερες του 1 ψάρι/λίτρο θα προκαλέσει συνήθως προβλήματα λόγω υπερβολικής σίτισης, ενώ παράλληλα προωθεί αντιδράσεις στρες αυξάνοντας τα επίπεδα εκκρινόμενης κορτιζόλης.



Εικόνα 13 : Συστήματα 1 και 2 του νέου ενυδρείου

Όσον αφορά τα έμβρυα, αυτά διατηρούνται από τη στιγμή της συλλογής τους έως και την 5η ημέρα της ζωής τους, σε τριβλία Petri με egg water σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 28°C. Ακολουθως μετά την 5η ημέρα

γονιμοποίησης τα έμβρυα μεταφέρονται στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων, όπου μέχρι την ολοκλήρωση του πρώτου μήνα ζωής τους διατηρούνταν σε δοχεία 1L σε ομάδες που δεν ξεπερνούν τα 25 άτομα με συνεχή εναλλαγή EW και προσθήκη νερού από τα συστήματα των ενήλικων ψαριών. Μετά τη συμπλήρωση του 1ου μήνα ζωής, τα zebrafish τοποθετούνται στα συστήματα παροχής αποστειρωμένου νερού. Το egg water έχει την εξής σύσταση :

4 L απιονισμένο νερό

1,2 γρ. Instant Ocean (άλας)

0,32 γρ. CaSO₄

Η διατροφή είναι πολλή σημαντική καθώς από αυτήν εξαρτάται η υγεία και η παραγωγικότητα του ψαριού. Η διατροφή εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, η σημαντικότερη μεταξύ των οποίων είναι η ηλικία του ψαριού. Τα zebrafish δεν έχουν ανάγκη εξωτερικής τροφής μέχρι και την 5η ημέρα από την γέννηση τους λόγω της λεκίθου που υπάρχει μέχρι αυτό το σημείο. Από την 5η ημέρα και μετά τα ψάρια ταιΐζονται με Paramecia . Όταν φτάσουν τον ένα μήνα περίπου, ταιΐζονται με γαρίδες (Artemia) το πρωί και με ξηρά τροφή Z100 το μεσημέρι. Σε ηλικία 2 μηνών δίνουμε τροφή Z300 ή Z400. Όσον αφορά το πρωτόκολλο που ακολουθείται κατά την διατροφή των ψαριών με γαρίδες είναι το εξής :

ΠΡΩΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΜΕ ARTEMIA:

- Κάνουμε χρήση κάθε μέρα εναλλάξ ενός από τα δύο κωνικά δοχεία εκτροφής Artemia για τάισμα, πάντα κοιτώντας την ημερομηνία.
- Πριν το τάισμα γίνεται έντονη ανάδευση της καλλιέργειας απορρίπτοντας τα κελύφη από τις εκκολαφθέντες κύστεις που έχουν καθιζάνει.
- Απομακρύνουμε την παροχή αέρα από το δοχείο καλλιέργειας και

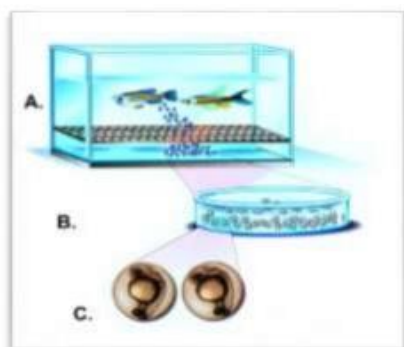
περιμένουμε τουλάχιστον 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των Artemia από τα κελύφη των κυστών

- Ανοίγουμε τη στρόφιγγα και διοχετεύουμε το υγρό της καλλιέργειας σε ένα πλαστικό δοχείο περνώντας το μέσα από το σουρωτήρι για να κρατηθούν οι γαρίδες.
- Ρίχνουμε dH₂O στο σουρωτήρι για να ξεπλύνουμε τις γαρίδες και τις μεταφέρουμε σε ένα κυλινδρικό δοχείο με μαγνήτη στη βάση του. Στο σημείο αυτό, τα κελύφη της γαρίδας που δεν έχουν καθαριστεί καλά από τα προηγούμενα στάδια και εκείνες οι γαρίδες που δεν έχουν εκκολαφθεί κρατούνται μέσα στο δοχείο με τη βοήθεια του μαγνήτη καθώς τα κελύφη έχουν ένα μαγνητικό επίθεμα
- Στη συνέχεια, αφού γίνουν 3-4 πλύσεις με dH₂O μέχρι να καθαριστούν τελείως οι γαρίδες μεταφέρονται σε δυο μικρά πλαστικά δοχεία για τάισμα με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας.
- Συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι αυτό να γεμίσει.
- Ξεπλύνουμε καλά με νερό βρύσης και με τη βούρτσα το κωνικό δοχείο καλλιέργειας και το σουρωτήρι και επιστρέφουμε τον κώνο στην θέση του συμπληρώνοντάς τον με dH₂O.
- Προσθέτουμε αυγά *Artemia* σε σκόνη, περίπου 1,5 καπάκι ενός falcon και περίπου 35 γραμμάρια αλάτι.
- Τέλος επανατροφοδοτούμε με αέρα το σύστημα.
- Το τάισμα γίνεται ως εξής: Στα μονόλιτρα tanks χρησιμοποιούμε μία πιπέτα για 3-4 δοχεία. Στα tanks με λίγα μικρά ψάρια χρησιμοποιούμε μισή πιπέτα, ενώ στα tanks με περισσότερα και μεγάλα ψάρια χρησιμοποιούμε μία πιπέτα.

3.1.2. Διασταυρώσεις και χειρισμός των εμβρύων zebrafish

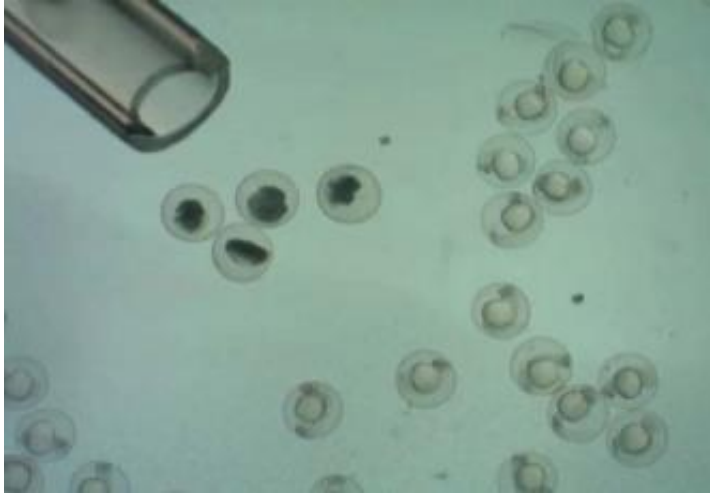
Τα ενήλικα άτομα zebrafish γίνονται αναπαραγωγικά ενεργά από την ηλικία των 3ων μηνών. Από τη φάση αυτή και μετά έχουμε τη δυνατότητα να τα διασταυρώνουμε μια με δυο φορές κάθε εβδομάδα. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά τη διασταύρωση δύο ατόμων zebrafish είναι απλή και έχει ως εξής: • Απομάκρυνση με απόχνη ενός θηλυκού και ενός αρσενικού ατόμου από την αντίστοιχη οικογένεια . • Τοποθέτησή τους σε δοχείο με νερό (V=1L) από το σύστημα του ενυδρείου ως εξής: χρησιμοποιούμε ένα μεταλλικό δίχτυ για να χωρίσουμε το δοχείο σε δύο μέρη (ένα πάνω μέρος και ένα κάτω μέρος) (Εικόνα 14). Το αρσενικό άτομο τοποθετείται στο κάτω μέρος ενώ το θηλυκό

τοποθετείται στο πάνω μέρος. Έπειτα, σκεπάζουμε το δοχείο με ειδικό πλαστικό σκέπαστρο και αφήνουμε τα άτομα για 16 περίπου ώρες με το διαχωριστικό δίχτυ. • Ενώνουμε τα αρσενικά με τα θηλυκά και τα τοποθετούμε στην πάνω μεριά του πλέγματος, ώστε να μην φαγωθούν τα αυγά μόλις αυτά εξέλθουν από το θηλυκό.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση της διασταύρωσης των ατόμων zebrafish. A. Ζευγάρι zebrafish κατά την αναπαραγωγή. B. Συλλογή εμβρύων στο τριβλίο C. Διαφανή έμβρυα στο στάδιο ανάπτυξης σωματιών.

• Τα αφήνουμε για περίπου 3 ώρες για να επέλθει η ωτοκία και η γονιμοποίηση των αυγών από το σπέρμα των αρσενικών (μέσα σε 15 – 20 λεπτά έχει πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση από τη στιγμή που θα εξέλθουν τα αυγά από το θηλυκό). • Τέλος, επιστρέφουμε προσεχτικά τα ψάρια πίσω στα tank όπου ανήκουν. • Στη συνέχεια ακολουθείται μια διαδικασία η οποία αποσκοπεί στην απολύμανση των αυγών και την αποφυγή προσβολής τους από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς που διαβιούν στο νερό. Αυτό ακολουθεί τα εξής βήματα: • Επώαση των αυγών σε bleaching buffer για 5 λεπτά • Ξέπλυμα με EW για 5 λεπτά • Δεύτερη επώαση των αυγών σε bleaching buffer για 5 λεπτά • Δεύτερο ξέπλυμα με EW για 5 λεπτά • Τελευταίο ξέπλυμα με EW για 5 λεπτά. Μετά από τη διαδικασία αυτή αντικαθιστούμε το EW με EW εμπλουτισμένο με μπλε του μεθυλενίου και τοποθετούμε το τριβλίο στον ειδικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C για να για πλήρη ανάπτυξη των εμβρύων. Μετά από 4 ώρες (4 hpf), μπορούμε εύκολα να διαχωρίσουμε τα γονιμοποιημένα από τα μη γονιμοποιημένα αυγά (καθώς και τα νεκρά) στο στερεοσκόπιο χρησιμοποιώντας μια πλαστική πιπέτα Pasteur (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Διαχωρισμός γονιμοποιημένων – μη γονιμοποιημένων εμβρύων στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση

Τα έμβρυα, φυσιολογικά, μέχρι την ηλικία των 3 ημερών βρίσκονται εντός του χορίου το οποίο τους προσφέρει προστασία από διάφορα παράσιτα. Από την τρίτη ημέρα και μετά είναι ικανά πλέον να σπάσουν το τοίχωμα αυτό και να απελευθερωθούν στο νερό. Ωστόσο, λόγω της διαδικασίας καθαρισμού (bleaching) που πραγματοποιείται εντός του εργαστηρίου, το χόριο σκληραίνει σε μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα τα έμβρυα να αδυνατούν να εξέλθουν την κατάλληλη στιγμή και πολλές φορές να εγκλωβίζονται σε αυτό και να πεθαίνουν. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούμε μια πρωτεΐνάση, την προνάση, με τη δράση της οποίας το χόριο μαλακώνει και γίνεται διαπερατό ώστε να σπάει εύκολα είτε από τα ίδια τα έμβρυα είτε από δική μας μηχανική παρέμβαση. Χορηγούμε 120μl διαλύματος προνάσης μέσα στο νερό των εμβρύων (περίπου 25 ml) και την αφήνουμε να δράσει για μια περίπου ώρα. Έπειτα, αφαιρούμε το νερό στο οποίο έχει προστεθεί προνάση και το αντικαθιστούμε με φρέσκο νερό EW με μπλε του μεθυλενίου. Τέλος, σε περίπτωση που θέλουμε να αποφύγουμε τον σχηματισμό μελανοκυττάρων στην επιδερμίδα των εμβρύων (π.χ. όταν χρειαζόμαστε τα έμβρυα για τεχνικές imaging), χρησιμοποιούμε το χημικό PTU (400μl σε 25ml νερού) σε έμβρυα 24 ωρών.

3.1.3. Ενήλικα zebrafish

Τα αγρίου τύπου ενήλικα zebrafish (*Danio rerio*) που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις σειρές **AB** και **TU** (Tübingen).

1. Tg(*kdr1:EGFP*)^{s843}

Τα διαγονιδιακά zebrafish *kdr1:gfp* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε ενδοθηλιακά κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *kdr1* (ή *flk*), το οποίο αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα του ενδοθηλίου (Beis, Bartman et al. 2005). Παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

2. Tg(*cm1c2:GFP*)

Τα διαγονιδιακά zebrafish *cm1c2:gfp* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε μυοκαρδιακά κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *cm1c2*, το οποίο κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και της κοιλίας (Huang, Tu et al. 2003). Παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

3. Tg(*tcf:dsRed*)

Τα διαγονιδιακά zebrafish *tcf:dsRed* εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *tcf*, το οποίο κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό ενδοθηλιακό παράγοντα (Moro, Ozhan-Kizil et al. 2012). Παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

4. Tert

Γενετικά τροποποιημένη σειρά που αφορά μια μη νοηματική μετάλλαξη (T > A) στο γονίδιο της τελομεράσης (*hu3430*) (zfin.org). Η απώλεια της λειτουργίας της τελομεράσης οδηγεί σε προοδευτική βράχυνση των τελομερών και χρωμοσωμική αστάθεια, η οποία καταλήγει στη γήρανση και τον καρκίνο (Monique Anchelin, et al., 2013).

5. Crh

Τα μεταλλαγμένα zebrafish *crhb* έχουν δημιουργηθεί με παροδική αναστολή της μετάφρασης του γονιδίου *crhb* με μικροένεση συμπληρωματικού ολιγονουκλεοτιδίου (*morpholino*) για το mRNA στην

περιοχή του κωδικονίου έναρξης (ATG). Η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του *crhb* με τη μέθοδο CRISPR--Cas9 επηρεάζει την ανάπτυξη της νωτοχορδής, της καρδιάς και των διασωμιακών αγγείων.

3.2. Τεχνικές

3.2.1. Απομόνωση DNA από έμβρυα και ενήλικα zebrafish

Χρησιμοποιούμε έμβρυα στην ηλικία που επιθυμούμε (συνήθως 72 ωρών). Κάθε έμβρυο συλλέγεται ξεχωριστά από το τριβλίο Petri και τοποθετείται μέσα σε erpendorf των 0,5ml. Έπειτα, προσθέτουμε 50μl διαλύματος απομόνωσης του DNA (PCR extraction buffer) και 1μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) στο στεγνό ιστό. Όσον αφορά στην απομόνωση DNA από ενήλικα άτομα η διαδικασία διαφοροποιείται μόνο στον τρόπο απομόνωσης του ιστού. Σε αυτή την περίπτωση τοποθετούμε κάθε άτομο σε ένα δοχείο με νερό στο οποίο έχει προστεθεί Tricaine methanesulfonate 0,4% σε ποσότητα τέτοια ώστε το άτομο να ακινητοποιείται εξακολουθώντας όμως να αναπνέει φυσιολογικά. Αφού το άτομο ακινητοποιηθεί, χρησιμοποιώντας μια λαβίδα το ανασηκώνουμε ελαφρώς και με ένα κατάλληλο ψαλίδι κόβουμε κομμάτι της ουράς ή το μεταφέρουμε σε ένα άλλο τριβλίο με ελάχιστο νερό και κόβουμε με ένα μικρό νυστέρι το κομμάτι της ουράς. Ο ιστός τοποθετείται σε erpendorf χωρητικότητας 0,5ml και σε αυτό προστίθενται 100μl διαλύματος απομόνωσης του DNA και 2μl πρωτεΐνάσης K. Στη συνέχεια τα βήματα που ακολουθούμε είναι κοινά και για τις δύο περιπτώσεις: • 55°C για 4 ώρες: η πρωτεΐνάση K ενεργοποιείται και αρχίζει να διασπά τις πρωτεΐνες διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς. • 98°C για 10 λεπτά: για να αδρανοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Αυτό κυρίως χρειάζεται διότι το DNA που θα απομονωθεί θα χρησιμοποιηθεί για PCR επομένως εάν η πρωτεΐνάση K εξακολουθήσει να είναι ενεργή υπάρχει κίνδυνος να διασπάσει την Ταq πολυμεράση και άρα να μη γίνει πολυμερισμός. • Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C.

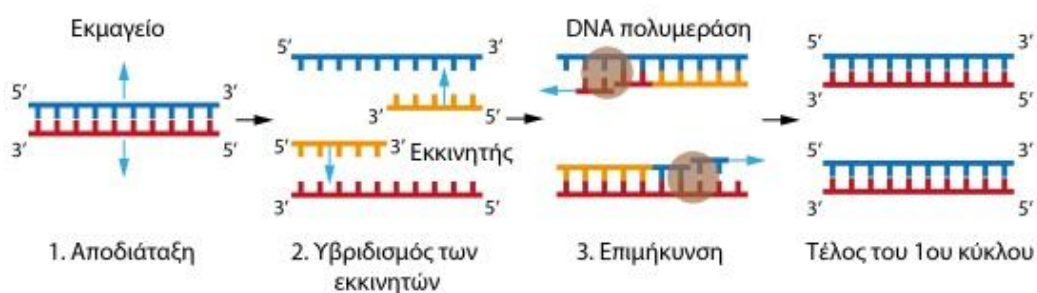
Έπειτα πραγματοποιούμε PCR για να πολλαπλασιάσουμε το κομμάτι που εμπεριέχει τη μεταλλαγή .

3.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια μέθοδο βιοχημείας και μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική της αλληλουχία. Η επιθυμητή αλληλουχία του γονιδίου (ή θραύσματος DNA) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινήτες), όπου το καθένα είναι συμπληρωματικό για μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινήτες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, την DNA πολυμεράση, και τους εκκινήτες, είναι το μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων, τα ιόντα μαγνησίου, καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου. Το ένζυμο DNA πολυμεράση (από το βακτήριο *Thermophilus aquaticus*) που χρησιμοποιείται εξασφαλίζει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μιας μονόκλωνης αλυσίδας DNA, ενώ αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης του DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα βασικά στάδια ενός κύκλου PCR είναι (Εικόνα 16): 1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος: Θέρμανση του μίγματος στους 95 °C για 15 λεπτά, ώστε να αποδιαταχτεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. 2. Υβριδισμός: Μείωση θερμοκρασίας μεταξύ 50-71 °C για 30-60 sec, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινήτων στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο της αλυσίδας. 3. Προέκταση ή επιμήκυνση: Αύξηση θερμοκρασίας στους 72 °C για 1-3 λεπτά, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου και γίνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs). 4. Αποδιάταξη προϊόντων:

Αύξηση θερμοκρασίας στους 95 °C για 30 sec, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν και πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA (Εικόνα 16).

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους, το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στη μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Στην πράξη, 35-39 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο, η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η διάρκεια του εκάστοτε κύκλου εξαρτάται από την ταχύτητα της θερμάντοχης πολυμεράσης που χρησιμοποιείται καθώς και από το μέγεθος του θραύσματος.



Εικόνα 16: Τα στάδια της αντίδρασης PCR.

Το ένζυμο Ταq DNA πολυμεράση (από το βακτήριο *Thermophilus aquaticus*) που χρησιμοποιείται εξασφαλίζει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μιας μονόκλωνης αλυσίδας DNA, ενώ αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης του DNA. Η DNA πολυμεράση για να ξεκινήσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας, χρειάζεται ένα μικρό τμήμα DNA. Συνεπώς, το σημείο στο οποίο θα αρχίσει η αντίδραση καθορίζεται από τους εκκινητές (primers), που υβριδίζονται στις συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες του DNA. Και οι δύο αλυσίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρες, αρκεί να υπάρχει ο κατάλληλος εκκινητής και για τις δύο αλυσίδες. Χρησιμοποιείται, λοιπόν, ένας εκκινητής για την κωδική (sense primer) και ένας για τη μη κωδική αλυσίδα (antisense primer). Τα τελευταία χρόνια, η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε εντός του εργαστηρίου μας ήταν η εξής:

Πραγματοποιείται vortex και spin down των δειγμάτων που βρίσκονται στους - 20 °C. Στη συνέχεια, σε eppendorves-σωληνάκια PCR προσθέσαμε:

DNA	2,5μl
buffer	20μl
Rv Primer	1μl
Fw Primer	1μl
Taq polymerase	0,125μl
dH₂O	0.375μl
Σύνολο	25μl

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες που περιγράφονται στον Πίνακα 2. Στη συνέχεια, ρυθμίσαμε το πρόγραμμα του μηχανήματος της PCR ως εξής:

1. 94 °C για 5 λεπτά.
2. 94 °C για 1 λεπτό.
3. 60 °C για 1 λεπτό.
4. 72 °C για 2 λεπτά.
5. Επανάληψη βημάτων 2-4 39 φορές.
6. 72 °C για 5 λεπτά.
7. Διατήρηση επ' αόριστον στους 4 °C.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Tm (°C)
Crhb_crispr_rv	5'-AGATCTAGGGAAATCGGCCGG-3'	60.5
Crhb_crispr_fw	5'-CCGCCGTATGAATGTAGAGCC-3'	63.2

Πίνακας 2: Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR.

3.2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στην αρχή ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός μορίων γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα παρά σε υγρό, κυρίως για δύο λόγους: Πρώτον, το πήκτωμα καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας – απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον, το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός

καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους του πηκτώματος κινούνται πιο εύκολα, επομένως και γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα μόρια. Οι μικρές διαφορές μεταξύ συγγενών μορίων DNA μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν, γιατί τα περιοριστικά τμήματά τους διαχωρίζονται και εμφανίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Όταν το πήκτωμα βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο, αυτό δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού όταν είναι δεσμευμένο σε διπλοελικωμένο DNA .

Για τον εντοπισμό των δειγμάτων που φέρουν το ζητούμενο τμήμα DNA, χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας δείγμα DNA που γνωρίζουμε ότι φέρει το συγκεκριμένο τμήμα και το οποίο έχει υποβληθεί σε PCR. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται ddH₂O, ενώ ο προσδιορισμός του μεγέθους του ζητούμενου τμήματος DNA γίνεται με τη χρήση ενός DNA δείκτη μοριακού βάρους.

Η διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αгарόζης 1% w/v είναι η εξής:

- Παρασκευή Buffer TAE 1X.
- Ζύγισμα 1gr αгарόζης, τοποθέτηση αυτής σε γυάλινη κωνική φιάλη και προσθήκη 100ml Buffer TAE1X.
- Ανάμιξη και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων ώστε να διαλυθεί η αгарόζη.
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει στους 50-55°C.
- Προσθήκη 8ml βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα της αгарόζης.
- Τοποθέτηση του διαλύματος αгарόζης σε εκμαγείο ηλεκτροφόρησης και πήξη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη Buffer TAE1X στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση δείγματος πραγματοποιείται ως εξής:

- Παρασκευή δείγματος ηλεκτροφόρησης με προσθήκη 2μl δείγματος DNA, 2μl loading dye 6X και 8μl ddH₂O σε eppendorfs.

- Φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης.
- Τοποθέτηση 2-log ladder στο πήκτωμα αγαρόζης.
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε ένταση ρεύματος 50mAmp (τάση 80-120 Volt).

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται σε θάλαμο με λάμπα UV και κάμερα, και φωτογραφίζεται.

3.2.4. Καθαρισμός προϊόντος PCR

Για τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR από τους εκκινητές αλλά και από τα εναπομείναντα νουκλεοτίδια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ExoSAP clean up. Αρχικά, τοποθετήσαμε μέσα σε erpendorf 0,50ml τα εξής συστατικά:

-Προϊόν PCR 15μl

-Ένζυμο Exo1 (20μ/μl) 0,025μl (για διάσπαση των εκκινητών)

-Ένζυμο rSAP (1μ/μl) 0,25μl (για διάσπαση των νουκλεοτιδίων)

-dH₂O 4,725μl

Στη συνέχεια ρυθμίζουμε και ακολουθούμε το εξής πρόγραμμα:

1. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά και 2. Επώαση στους 85°C για 20 λεπτά.

3.2.5. Διαδικασία συμπύκνωσης

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται συμπύκνωση όσων δειγμάτων δεν έχουν εμφανίσει επαρκή ποσότητα DNA μετά τον έλεγχο των μπαντών στο gel αγαρόζης. Αρχικά, μεταφέρουμε τα δείγματά μας σε 1.5 ml tubes και τα συμπυκνώνουμε έως τα 8,5 μl. Τέλος, προσθέτουμε 1.5 μl fw ή rv primer και τα στέλνουμε για γονοτυπική ανάλυση.

3.2.6. Γονοτυπική ανάλυση

Κατά την ανίχνευση ουδετερόφιλων χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακές cph λάρβες, οι οποίες φέρουν μια out of frame μετάλλαξη (group B). Γνωρίζουμε την μεταλλαγμένη και την φυσιολογική ακολουθία. Χρησιμοποιήθηκαν τα

αποτελέσματα του sequencing για την ορθή ταυτοποίηση +/- και +/- crh λαμβών.

Group B:

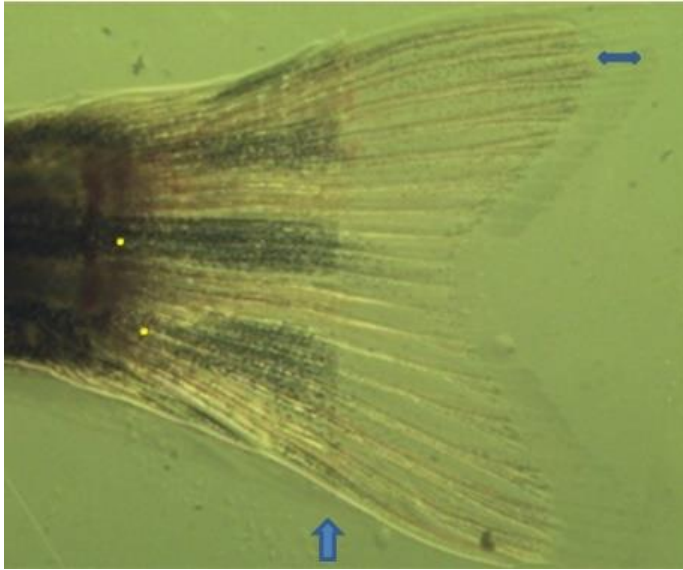
WT: CCGAGCCGGATGAAGTACTCCTCC-----CCAAGCGTGCCAAAACCGGCGGGGACTGCCG
MUT: CCGAGCCGGATGAAGTACTCCAGTAGAGTGCACCAAGCGTGCCAAAACCGGCGGGGACTGCCG

3.2.7. Απεικονιστικές μέθοδοι και στατιστική ανάλυση

Για την παρατήρηση των εμβρύων χρησιμοποιήθηκαν τα στερεοσκόπια Nikon SMZ800, Leica MZ75, Leica EZ4D, το στερεοσκόπιο φθορισμού Nikon WD70 και το οπτικό μικροσκόπιο Zeiss HBO 100. Για τη λήψη φωτογραφιών σε οπτικό στερεοσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν οι κάμερες Digital camera Sony Leica DFC 500 και η ενσωματωμένη κάμερα στο στερεοσκόπιο Leica EZ4D. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η ORCA κάμερα στο ανάστροφο μικροσκόπιο για τη παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών φθορισμού, με μεγέθυνση 5x και 6x, και η επεξεργασία τους μαζί με την επεξεργασία των δεδομένων, έγινε με τα προγράμματα imagej, graphpad prism, excel, LAS AF. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση t-test και χρησιμοποιήθηκε το SEM (standart error mean). Στατιστικώς σημαντική θεωρήθηκε όποια συσχέτιση είχε τιμή p (p-value) < 0,05.

3.2.8. Διαδικασία κοπής και σήμανσης ουράς στο Zebrafish κατά την μελέτη αναγέννησης και έκφρασης ουδετερόφιλων

Κατά τη διαδικασία κοπής, τα 3/4-μισό του ουραίου πτερυγίου ακρωτηριάστηκαν όπως φαίνεται στην εικόνα 17 σε ενήλικα zebrafish, ενώ στις λάρβες έγινε ακρωτηριασμός όπως φαίνεται στην εικόνα 18. Ο ακρωτηριασμός έγινε με χρήση νυστεριού. Την ημέρα 0 έγινε φωτογράφιση ολόκληρης της ουράς πριν την κοπή και μετά από την κοπή. Οι φωτογραφίες σημάνθηκαν με δυο spots και σε κάθε σημείο αναφοράς γινόταν μέτρηση από το spot έως την άκρη του ουραίου πτερυγίου ώστε να καταγραφεί το μήκος της αναγεννώμενης ουράς. Οι μετρήσεις γινόντουσαν ανά 3 ημέρες και διαρκούσαν περίπου ένα μήνα κάθε φορά.



Εικόνα 17: Αναπαράσταση σημείου κοπής του ουραίου πτερυγίου ενήλικων zebrafish, του αναγεννώμενου μήκους αλλά και των spots που έχουν οριστεί ώστε σε κάθε μέτρηση να μπορεί να γίνεται καθορισμός του αναγεννημένου τμήματος.



Εικόνα 18: Αναπαράσταση σημείου κοπής λαρβών zebrafish (72hpf).

3.2.9. Μεθοδολογία υπολογισμού δεδομένων κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Αρχικά, για τον υπολογισμό του αναγεννώμενου μήκους του ουραίου πτερυγίου, από όλες τις τιμές αφαιρέθηκε το κομμάτι από το σημείο που είχε σημειωθεί έως το κομμένο σημείο (αρχικό μέρος), έτσι ώστε η κάθε επόμενη μέτρηση να μην συμπεριλαμβάνει το μη αναγεννώμενο μέρος της ουράς αλλά να δείχνει μόνο το κομμάτι της ουράς που αναγεννάζεται.

Όσο αναφορά τα ποσοστά αναγέννησης, το τελικό μήκος της ουράς στις 36 ημέρες διαιρέθηκε με το αρχικό μήκος της ουράς (πριν τον ακρωτηριασμό) και πολλαπλασιάστηκε με το 100%. Για την διεξαγωγή των τιμών στους συγκεκριμένους πίνακες δεν αφαιρέθηκε το αρχικό κομμάτι από το σημείο που είχε σημειωθεί μέχρι το κομμένο μέρος διότι δεν ήταν απαραίτητο καθώς

υπολογίζουμε το ποσοστό αναγέννησης της κομμένης ουράς σε σχέση με το μήκος της αρχικής ουράς (και οι δυο μετρήσεις συμπεριλαμβάνουν το κομμάτι αυτό).

Στη συνέχεια, θέλοντας να γίνει εκτίμηση της μεμονωμένης αύξησης της ουράς του ουραίου πτερυγίου ανά 3 ημέρες, μετρήθηκε σε κάθε μέτρηση το αναγεννώμενο μήκος της αφαιρώντας κάθε φορά από την επόμενη μέτρηση την προηγούμενη. Για τον συγκεκριμένο υπολογισμό, από τις μετρήσεις της 3^{ης} ημέρας αφαιρέθηκε το μήκος από το σημείο που είχε οριστεί μέχρι και το κομμένο μέρος για να δούμε την μεμονωμένη αύξηση την 3^η μέρα και μετά από την 6^η μέρα αφαιρώ την μέτρηση της 3^{ης} ημέρας ώστε πάλι να φαίνεται η καθαρή αύξηση της ουράς από την 3^η έως την 6^η ημέρα, κ.τ.λ..

3.3. ΥΛΙΚΑ

3.3.1. Διαβίωση του πειραματικού μοντέλου zebrafish

- Άλατα Instant Ocean
- Ξηρά τροφή σε τρία διαφορετικά μεγέθη διαμέτρου των κόκκων: ZM300, ZM100, ZM000 (ZM fish food, <http://www.zmsystems.co.uk>)
- Αφυδατωμένες κύστεις Artemia salina (ZM fish food, <http://www.zmsystems.co.uk>)
- 4 ανάστροφα κωνικά δοχεία του 1 ml για την καλλιέργεια της Artemia salina

- Egg water (EW) η σύσταση του οποίου είναι: 0,3g/L άλατα Instant Ocean, 0,08g/L CaSO₄, αποστειρωμένο νερό (dH₂O)
- EW με μπλε του μεθυλενίου (50ml μπλε του μεθυλενίου σε 10L EW)
- Ειδικός επωαστικός θάλαμος ρυθμισμένος στους 28°C (Lovibond Thermostatic cabinet)

3.3.2. Διασταυρώσεις και χειρισμός των εμβρύων των zebrafish

- Τριβλία Petri
- Buffer καθαρισμού (bleaching buffer): 180ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου 10% (από την εταιρεία Sigma-aldrich) σε 500ml EW.
- Προνάση (pronase- protease from Streptomyces griseus) συγκέντρωσης 20mg/ml (διαλύεται σε dH₂O)
- Διάλυμα 1-φαινυλο 2-θιουρίας (PTU) το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: ζυγίζουμε 125g σκόνης PTU (Sigma-Aldrich) και αναμειγνύουμε με 100ml EW.
- Διάλυμα αναισθητικού Tricaine methanesulfonate 0,4% το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: ζυγίζουμε 4g

σκόνης Tricaine (Sigma-Aldrich) και αναμειγνύουμε με 1L dH₂O. Στη συνέχεια προσαρμόζουμε το pH στην τιμή 7 χρησιμοποιώντας διάλυμα Tris/HCl pH 8,8.

3.3.3. Απομόνωση DNA από έμβρυα και ενήλικα zebrafish

Για την απομόνωση DNA από έμβρυα zebrafish χρησιμοποιήθηκαν:

- Πρωτεΐνάση K 10mg/ml της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Διάλυμα απομόνωσης DNA (lysis buffer): 10mM Tris-HCl pH8, 2mM EDTA, 0.2% TritonX-100, της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Για την απομόνωση DNA από ενήλικα zebrafish (με κόψιμο της ουράς) χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον:

- Χειρουργικό ψαλίδι, λαβίδα και νυστέρι
- Διάλυμα Tricaine methanesulfonate 0,4%.

Για την PCR και τον καθαρισμό του προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν:

- Taq DNA polymerase της εταιρείας NEB
- PCR mix: 10mM dNTPs (της εταιρείας NEB), MgCl₂ 1M, KCl 4M, Tris-HCl pH8,4 1M, 1% Gelatin της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Εκκινητές: κατασκευάστηκαν στην εταιρεία MWG – Biotech AG
- Ένζυμα Exo1 (20μ/μl), SAP (1μ/μl) της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν:

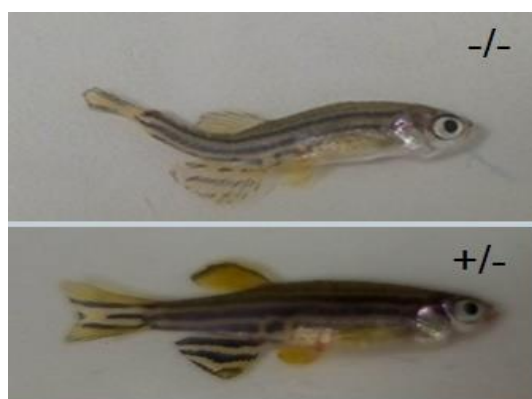
- TAE 50x (242g/L Tris/HCl 8.8, 57.1mL/L οξικό οξύ υπό μορφή πάγου, 100mL/L 0.5M EDTA, της εταιρείας Sigma-Aldrich)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) της εταιρείας Invitrogen
- Αγαρόζη της εταιρείας Sigma-aldrich
- 2-Log DNA Ladder της εταιρείας NEB
- 6X Loading Dye (10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% orange G (της εταιρείας Sigma-Aldrich), 60% glycerol, 60mM EDTA).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Παθολογική μορφολογία *tert*^{-/-} zebrafish

4.1.1 Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου

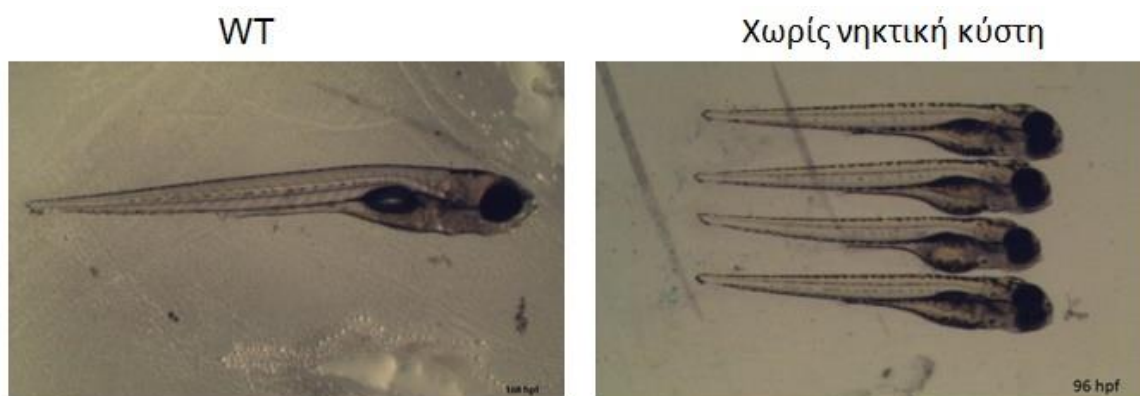
Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ο προσδιορισμός των παθολογικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών μεταλλαγμένων zebrafish που φέρουν μια μετάλλαξη στο γονίδιο της τελομεράσης (*hu3430*) (zfin.org). Ως προς τον τύπο κληρονομικότητας ο φαινότυπος είναι υπολειπόμενος. Ως αρχικό βήμα, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ ενήλικων, ομόζυγων για τον συγκεκριμένο φαινότυπο ατόμων και διασταυρώσεις μεταξύ ενήλικων ομόζυγων για τον συγκεκριμένο φαινότυπο ατόμων μαζί με ετερόζυγων για τον συγκεκριμένο φαινότυπο ατόμων (Εικόνα19). Η παρατήρηση των εμβρύων πραγματοποιήθηκε στις ηλικίες των 72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση (*hpf*), 96*hpf*, 120*hpf*, 144*hpf*, 168*hpf*. Η παρατήρηση της μορφολογίας έγινε στο στερεοσκόπιο με 2x μεγέθυνση. Τέλος, έγινε σύγκριση και καταγραφή του ποσοστού θνησιμότητας, του σοβαρού παθολογικού φαινοτύπου, του καρδιακού οιδήματος και της έλλειψης νηκτικής κύστης μεταξύ των ατόμων G2 γενιάς (Εικόνα 20).



Εικόνα19: Μορφολογία ενήλικων *tert*^{-/-} και +/- ψαριών.

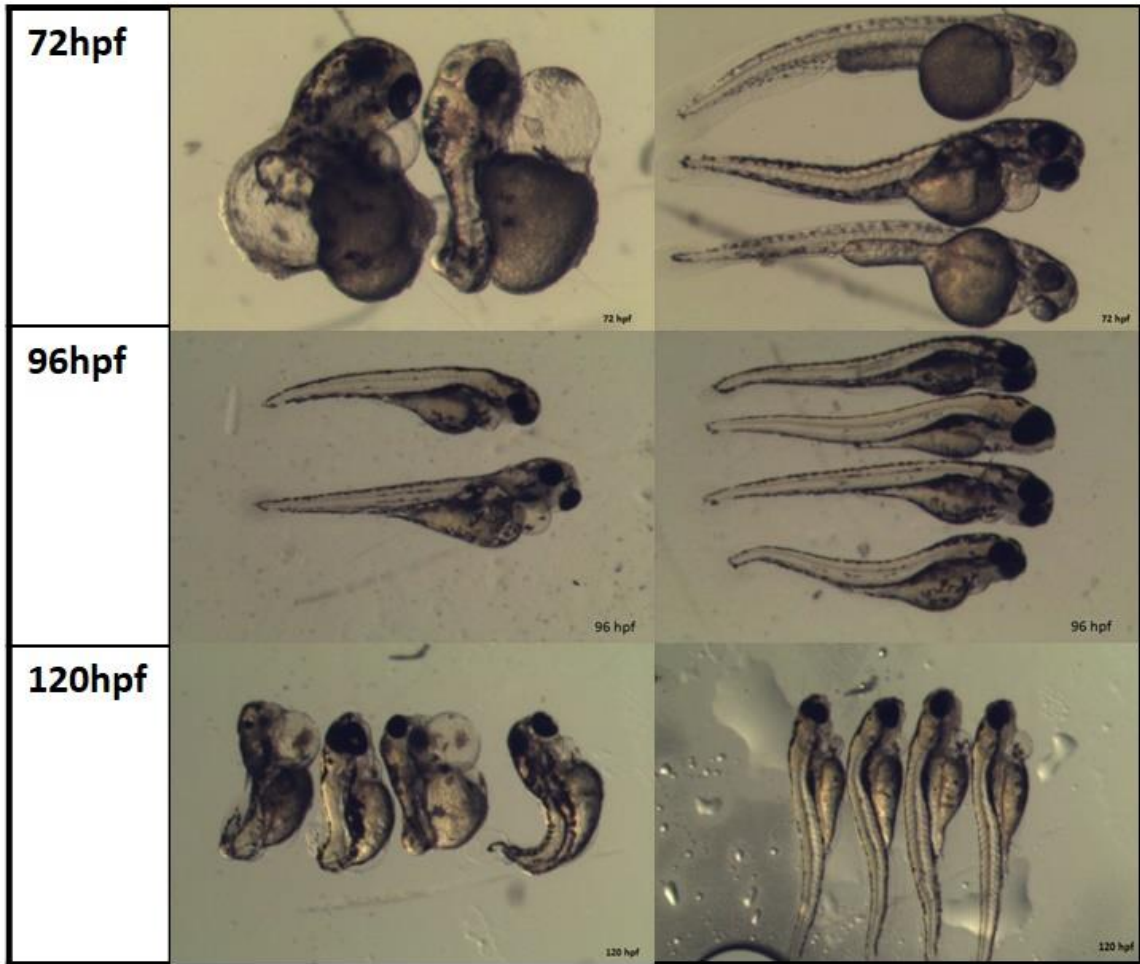
Στην ηλικία των 72*hpf* έως και τις 168*hpf* παρατηρήθηκαν τα εξής ποσοστά των χαρακτηριστικών παθολογικού φαινοτύπου: στα *-/-* παρατηρείται ποσοστό οιδήματος που κυμαίνεται από 15.4%-29.5%, ενώ στα *-/-* x +/- παρατηρείται ποσοστό οιδήματος που κυμαίνεται από 0.4%-20.5%. Στα *-/-* παρατηρείται ποσοστό σοβαρού παθολογικού φαινοτύπου που κυμαίνεται από 4.9%-15.4%, ενώ στα *-/-* x +/- παρατηρείται ποσοστό σοβαρού

παθολογικού φαινοτύπου που κυμαίνεται από 0%-0.9%. Στη συνέχεια μετά τις 72 hpf τα -/- ψάρια εμφανίζουν ποσοστό έλλειψης νηκτικής κύστης που κυμαίνεται από 40.6%-78.5%, ενώ τα -/- x +/- ψάρια εμφανίζουν ποσοστό έλλειψης νηκτικής κύστης που κυμαίνεται από 1.7%-27.6%. Όσο αναφορά το ποσοστό θανάτου, τα -/- ψάρια εμφανίζουν συνολικά μέχρι και τις 168hpf 48.9% θνησιμότητα και τα -/- x +/- ψάρια εμφανίζουν 32.9% θνησιμότητα. Αναλυτικά τα ποσοστά εμφανίζονται στους πίνακες 3,4. Συγκεκριμένα όσο αναφορά τα δεδομένα του πίνακα 3 για τα tert hetero και tert homo στις 72 ώρες, τα ποσοστά οιδήματος εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις. Αυτό εν μέρη μπορεί να εξηγηθεί με το ότι στις 72hpf είναι δύσκολο να καθοριστεί ένας severe φαινότυπος και να διαχωριστεί από έναν με καρδιακό οίδημα, γιατί ο severe φαινότυπος περιλαμβάνει και τον φαινότυπο του οιδήματος και σε ορισμένα ψάρια αναπτύσσεται πλήρως στις 96hpf. Επίσης, όσο αναφορά τα ποσοστά της νηκτικής κύστης στον πίνακα 4 στα tert hetero και αυτά εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι για να γίνει έλεγχος της ύπαρξης, ή μη, της νηκτικής κύστης πρέπει να υπάρχουν στο τριβλίο περίπου 25ml νερό, οπότε μπορεί στις συγκεκριμένες μετρήσεις κάποιες φορές το νερό να ήταν περισσότερο ή λιγότερο από όσο θα έπρεπε και έτσι να εμφανίζονται αυτές οι διακυμάνεις.



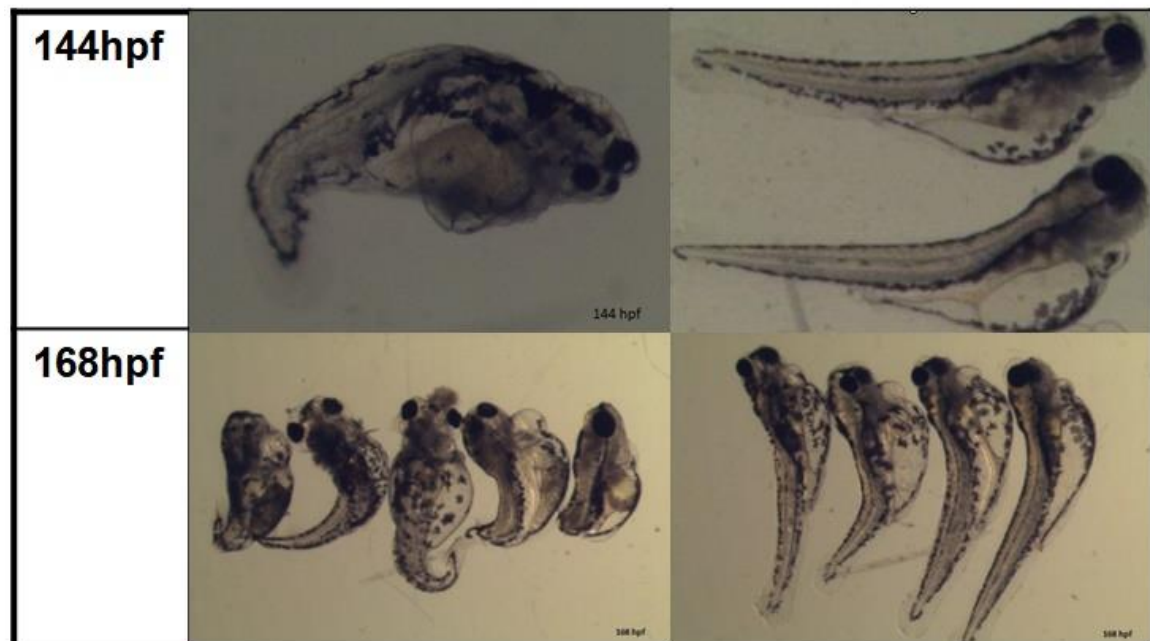
Severe φαινότυπος

Φαινότυπος καρδιακού Οιδήματος

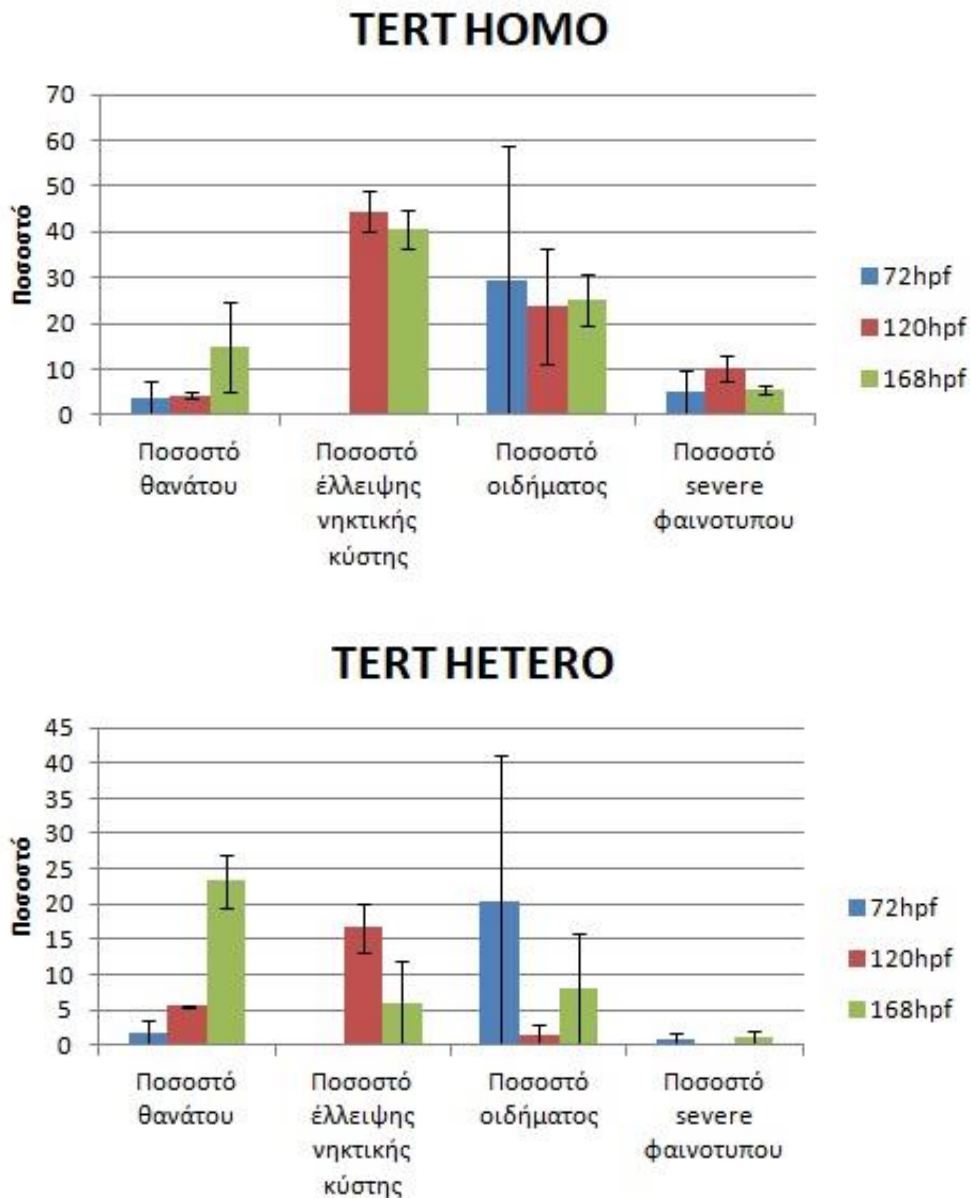


Severe φαινότυπος

Φαινότυπος καρδιακού Οιδήματος

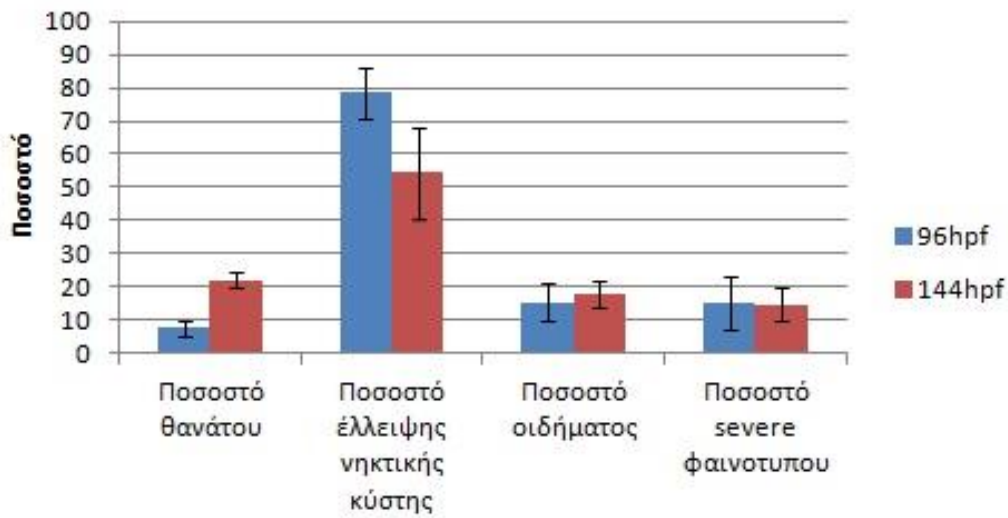


Εικόνα 20: Φωτογραφική απεικόνιση *tert* ^{-/-} και WT εμβρύων ύστερα από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο, σε μεγέθυνση 2x, στις 72, 96, 120, 144, 168 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος IC capture.

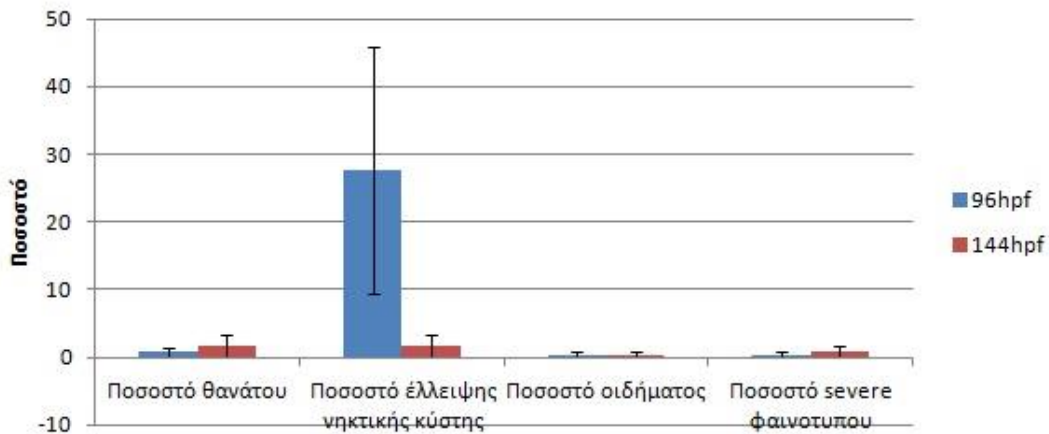


Πίνακας 3: Ποσοστά παθολογικών γνωρισμάτων των *tert* ^{-/-} και *tert* ^{-/-} x ^{+/-} στις 72, 120, 168 hpf. Οι τιμές απεικονίζουν τον μέσο όρο των δεδομένων που συλλέχθηκαν από δυο ξεχωριστά πειράματα χρησιμοποιώντας όμοιες συνθήκες. Οι μετρήσεις των ποσοστών των διαφορετικών παθολογικών γνωρισμάτων έγιναν για τα *tert* ^{-/-} (N=136) και για τα *tert* ^{-/-} x ^{+/-} (N=127). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν τους SEM-μέσους όρους για κάθε πείραμα. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

TERT HOMO



TERT HETERO

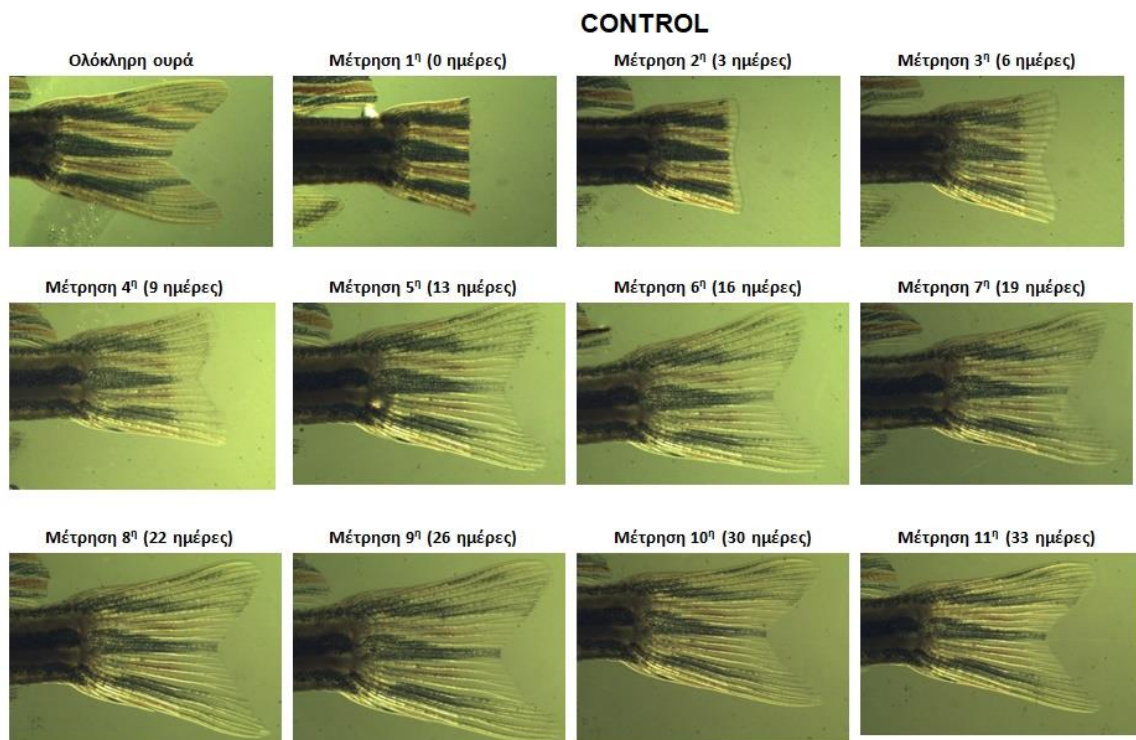


Πίνακας 4: Ποσοστά παθολογικών γνωρισμάτων των *tert* $-/-$ και *tert* $-/-$ \times $+/-$ στις 96 και 144 hpf. Οι τιμές απεικονίζουν τον μέσο όρο των δεδομένων που συλλέχθηκαν από τρία ξεχωριστά πειράματα χρησιμοποιώντας όμοιες συνθήκες. Οι μετρήσεις των ποσοστών των διαφορετικών παθολογικών γνωρισμάτων έγιναν για τα *tert* $-/-$ (N=84) και για τα *tert* $-/-$ \times $+/-$ (N=213). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν τους SEM-μέσους όρους για κάθε πείραμα. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

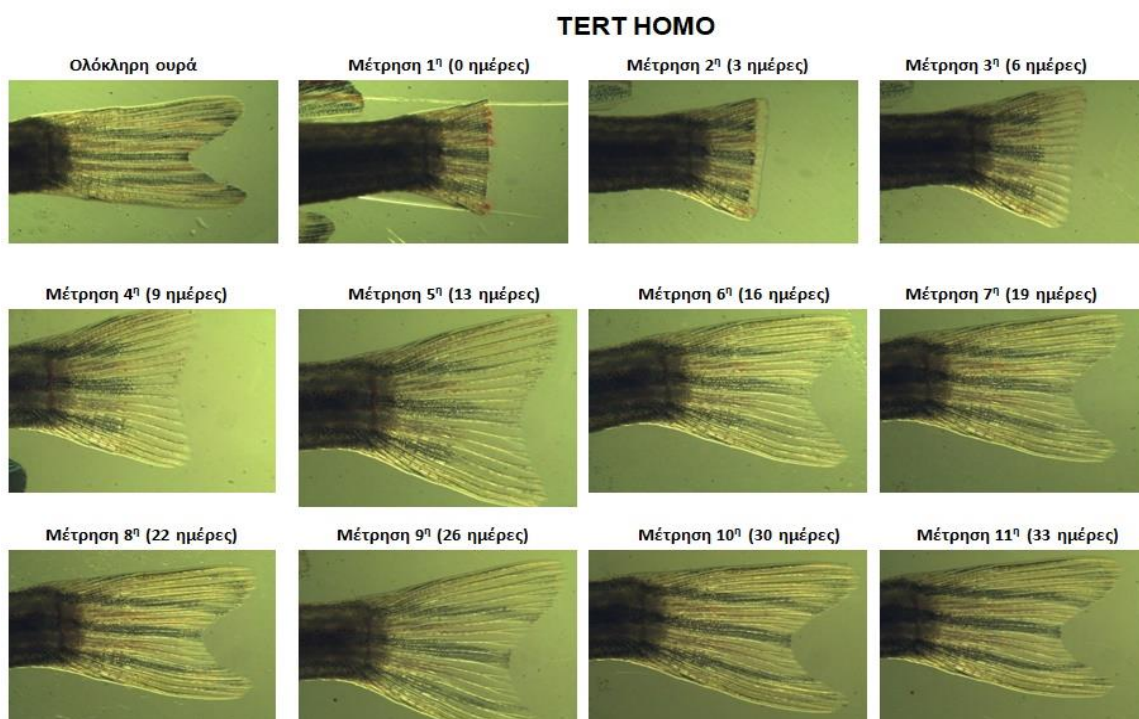
4.2. Δυναμικό αναγέννησης ουραίου πτερυγίου σε ενήλικα μεταλλαγμένα *tert* $-/-$ zebrafish

Όπως έχει προαναφερθεί, το Zebrafish έχει γίνει ένα ισχυρό μοντέλο για τη διερεύνηση της αναδιαμόρφωσης του ιστού εξαιτίας της ικανότητάς του να

αναγεννά πλήρως τραυματισμένα όργανα και εξαρτήματά του. Γι αυτό τον λόγο ένα ακόμη ερώτημα της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να διερευνηθεί εάν μεταλλαγμένα ψάρια που τους λείπει η δραστικότητα της τελομεράσης έχουν την δυνατότητα να αναγεννούν πλήρως το ουραίο πτερυγίο τους ενεργοποιώντας κάποιον εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών ή ενεργοποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αρχικά, σε ενήλικα ψάρια έγινε ακρωτηριασμός του ουραίου πτερυγίου όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Έγινε χρήση ψαριών control, tert -/-, tert +/- και tert -/- που τους είχε γίνει για δεύτερη φορά ακρωτηριασμός του ουραίου πτερυγίου και παρατηρήθηκε αρχικά αν γίνεται αναγέννηση της ουράς σε tert -/- ψάρια (Εικόνα 21,22), και κατά δεύτερο, το μήκος αναγέννησης της ουράς και σύγκριση με τα control και tert +/- ψάρια (Πίνακας 5). Οι επανειλημμένοι ακρωτηριασμοί του ουραίου πτερυγίου πραγματοποιήθηκαν σε ψάρια στα οποία ο δεύτερος ακρωτηριασμός έγινε μετά από 3 μήνες. Αρχικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 21 και 22 τα tert -/- διατηρούν την ικανότητα της αναγέννησης του πτερυγίου εξίσου καλά σε σχέση με τα control. Στις 3 μέρες μετά τον ακρωτηριασμό (dpa) εμφανίζεται ένα λευκό μέρος πάνω από το επίπεδο του ακρωτηριασμού το οποίο περιέχει το blastema, το οποίο, παρά την ομοιόμορφη εμφάνισή του, παρουσιάζει υποδιαίρεσεις σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Στις 6 dpa, η αναγέννηση επεκτείνεται πολύ γρήγορα και ο λευκός ιστός διατηρείται ενώ αρχίζει να εμφανίζει οστικές δομές και χρωματισμό (οι οποίοι είναι οι μακροσκοπικοί δείκτες της επαναδιαμόρφωσης των ιστών). Στις 12 dpa, η αναγέννηση φαίνεται να είναι σε προχωρημένο στάδιο και στις 20 dpa, το μέγεθος του πτερυγίου φτάνει σχεδόν το αρχικό του μέγεθος και σχήμα.

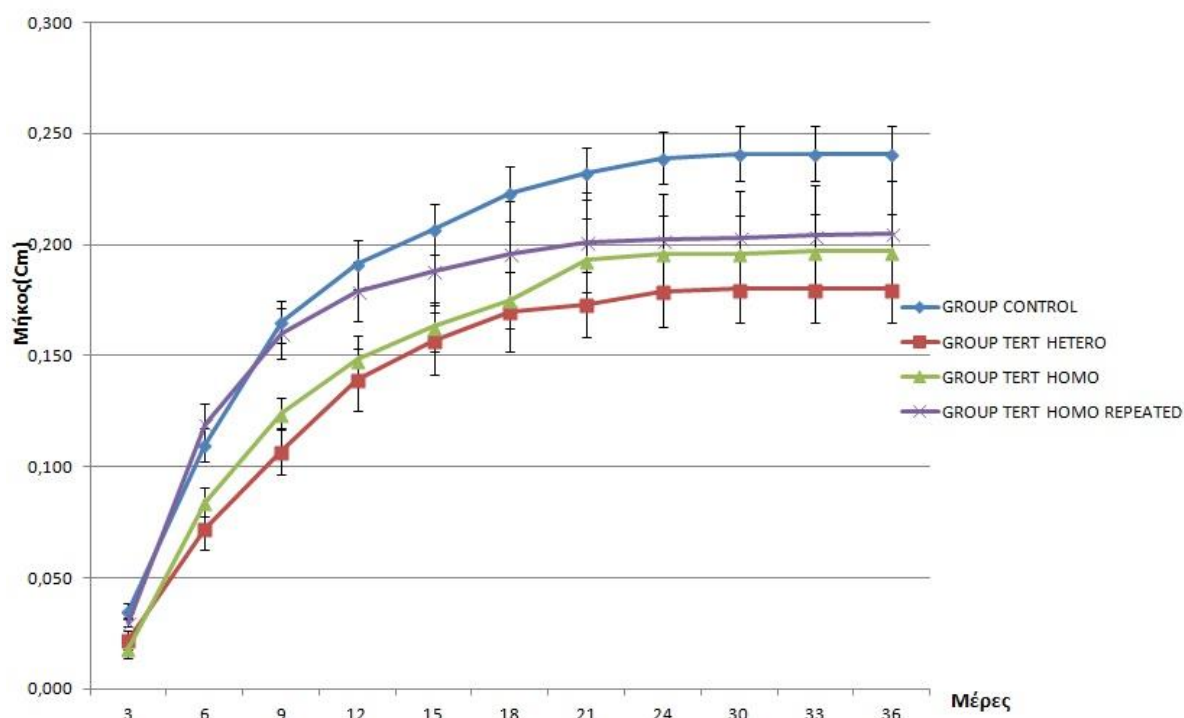


Εικόνα 21: Η διαδικασία της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου σε WT zebrafish (N= 21). Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται ολόκληρη η ουρά πριν τον ακρωτηριασμό. Στη δεύτερη φωτογραφία απεικονίζεται η ουρά μετά τον ακρωτηριασμό. Τέλος, από την 2^η μέτρηση έως και την 11^η μέτρηση φαίνεται η σταδιακή αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 22: Η διαδικασία της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου σε tert $-/-$ zebrafish (N=8). Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται ολόκληρη η ουρά πριν τον ακρωτηριασμό. Στη δεύτερη φωτογραφία απεικονίζεται η ουρά μετά τον ακρωτηριασμό. Τέλος, από την 2^η μέτρηση έως και την 11^η μέτρηση φαίνεται η σταδιακή αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

Αρχικά, έγινε εκτίμηση του μήκους αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5, το υψηλότερο μήκος αναγέννησης συνολικά (αύξηση ουράς καθόλη τη διάρκεια των μετρήσεων) κατέχουν τα control όπως είναι αναμενόμενο, στην συνέχεια, τα tert $-/-$ που τους έχει ξανακοπεί η ουρά, ενώ τις πρώτες 9 ημέρες κατέχουν σχεδόν τον ίδιο ρυθμό αναγέννησης με τα control μετά διατηρούν την δεύτερη θέση αλλά με μικρότερο ρυθμό αναγεννώμενου μήκους.

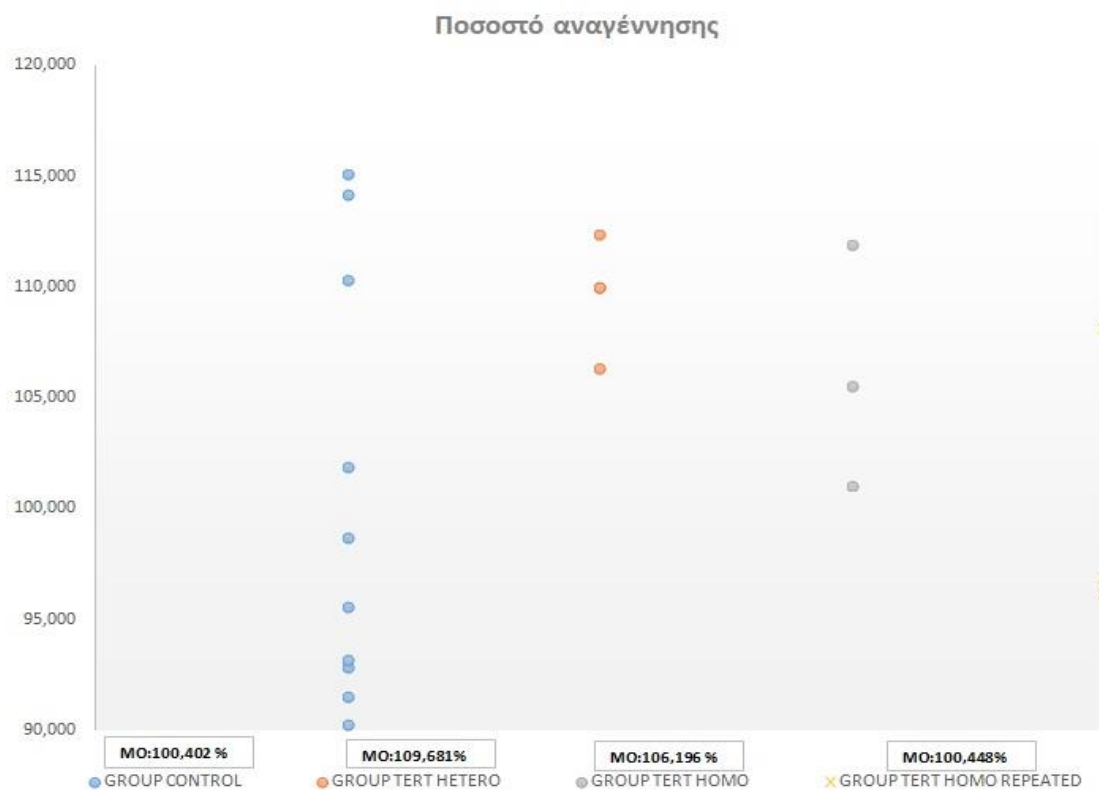


Πίνακας 5: Μήκος αναγεννώμενου ουραίου πτερυγίου. Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται η αύξηση του ουραίου πτερυγίου ανά 3 ημέρες, ξεκινώντας από τις 3 ημέρες έως και τις 36 ημέρες. Συγκεκριμένα, την 3^η, 6^η, 12^η, 18^η ημέρα χρησιμοποιήθηκαν tert $-/-$ (N=8), tert $+/-$ (N=9), WT (N=21) και tert $-/-$ που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=2) και το πείραμα έγινε για n=3 φορές. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν tert $-/-$

(N=5), tert +/- (N=5), WT (N=15) και tert -/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=2) και το πείραμα έγινε για n=2 φορές. P <0.05 για τα control-tert hetero και τα control-tert homo αλλά P >0.05 για τα control-tert homo repeated. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα tert -/- κατέχουν την τρίτη θέση εμφανίζοντας επαρκή επίπεδα αναγέννησης. Τέλος, τα χαμηλότερα επίπεδα αναγέννησης κατέχουν τα tert +/- . Στατιστική σημαντική διαφορά εμφανίζεται μεταξύ των control και των tert hetero και μεταξύ των control και των tert homo αλλά όχι μεταξύ των control και homo repeated.

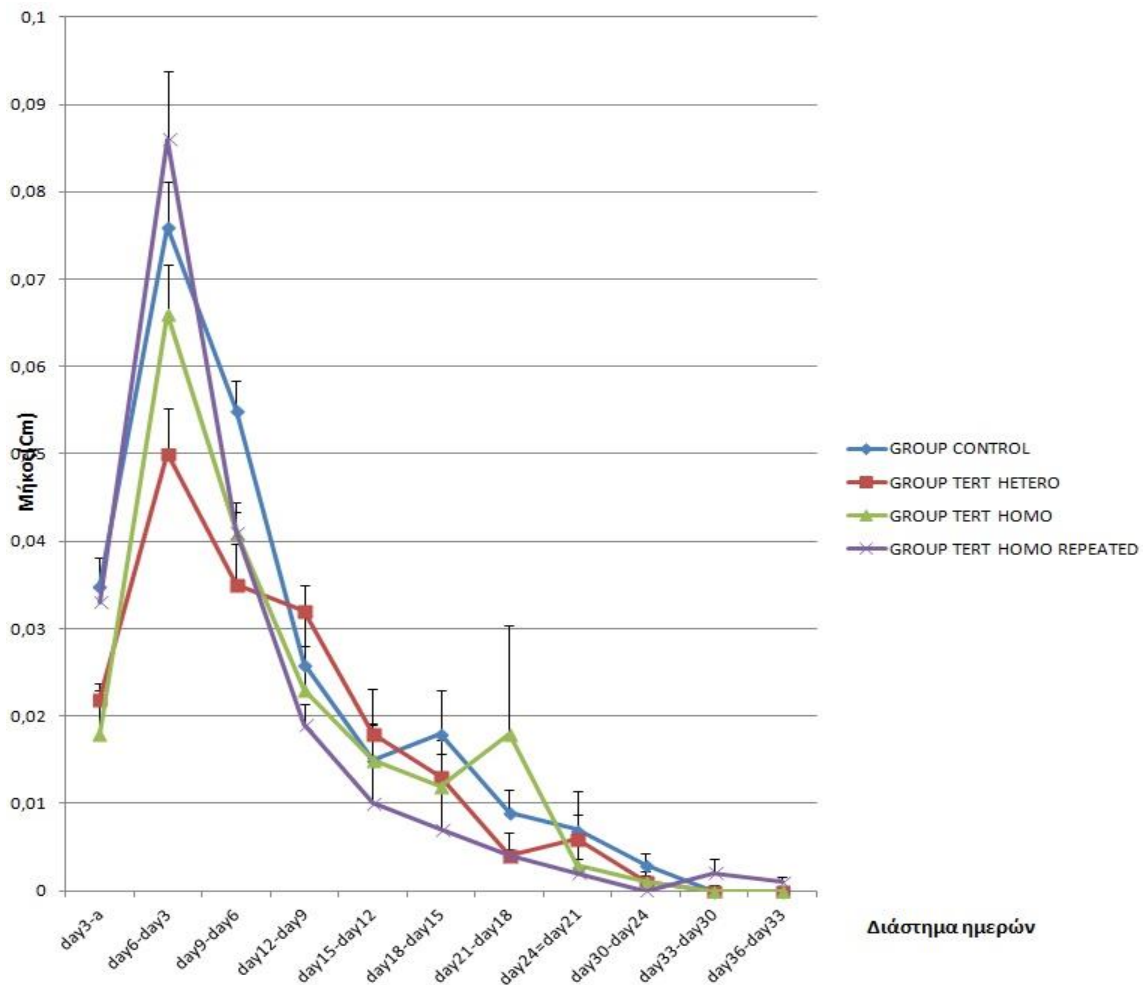
Όσο αναφορά τα ποσοστά αναγέννησης, τα control μαζί με τα tert -/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά εμφανίζουν πλήρη αναγέννηση με μέσο όρο της τάξεως του 100,402% και 100,448% αντιστοίχως, ενώ τα tert -/- και tert +/- εμφανίζουν μια περαιτέρω αύξηση του ουραίου πτερυγίου τους ξεπερνώντας το αρχικό μήκος με μέσο όρο αναγέννησης της τάξεως του 106,196% και 109,681% αντιστοίχως (Πίνακας 6).



Πίνακας 6: Ποσοστό αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου, βασισμένο στην τελευταία μέτρηση του μήκους του αναγεννώμενου του πτερυγίου και στο αρχικό μήκος του

πτερυγίου πριν τον ακρωτηριασμό, σε *tert* $-/-$ (N=3), *tert* $+/-$ (N=4), WT (N=10) και *tert* $-/-$ που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=3). Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση της μεμονωμένης αύξησης της ουράς ανά 3 ημέρες. Στις πρώτες 3 ημέρες παρατηρήθηκε μεγαλύτερο αναγεννώμενο μήκος ουράς από τα control και *tert* $-/-$ που τους έχει ξανακοπεί η ουρά και χαμηλότερο στα *tert* $-/-$ και *tert* $+/-$. Στις 6 ημέρες το μήκος αύξησης της ουράς και στα τέσσερα γκρουπ ήταν εκθετικό (που σημαίνει ότι όσο περνούσαν οι ημέρες το αναγεννώμενο μήκος αυξανόταν εκθετικά) με τα *tert* $-/-$ που τους έχει ξανακοπεί η ουρά να βρίσκονται στην πρώτη θέση, και τα control, τα *tert* $-/-$ και *tert* $+/-$ στην δεύτερη, τρίτη και τέταρτη αντιστοίχως. Μετά τις 6 ημέρες και για τα 4 γκρουπ ψαριών το αναγεννώμενο μήκος σε κάθε μέτρηση μειωνόταν εκθετικά μέχρι που μηδενιζόταν μέχρι τις 36 ημέρες (Πίνακας 7). Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίζεται μόνο μεταξύ των control και των *tert* homo repeated. Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα του πίνακα 5, στον οποίο δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συγκεκριμένων γκρουπ, όσο αναφορά το μήκος του αναγεννώμενου ουραίου πτερυγίου, αλλά εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεμονωμένη αύξηση του μήκους του αναγεννώμενου πτερυγίου στις υπό εξέταση ημερομηνίες (πίνακας 7).

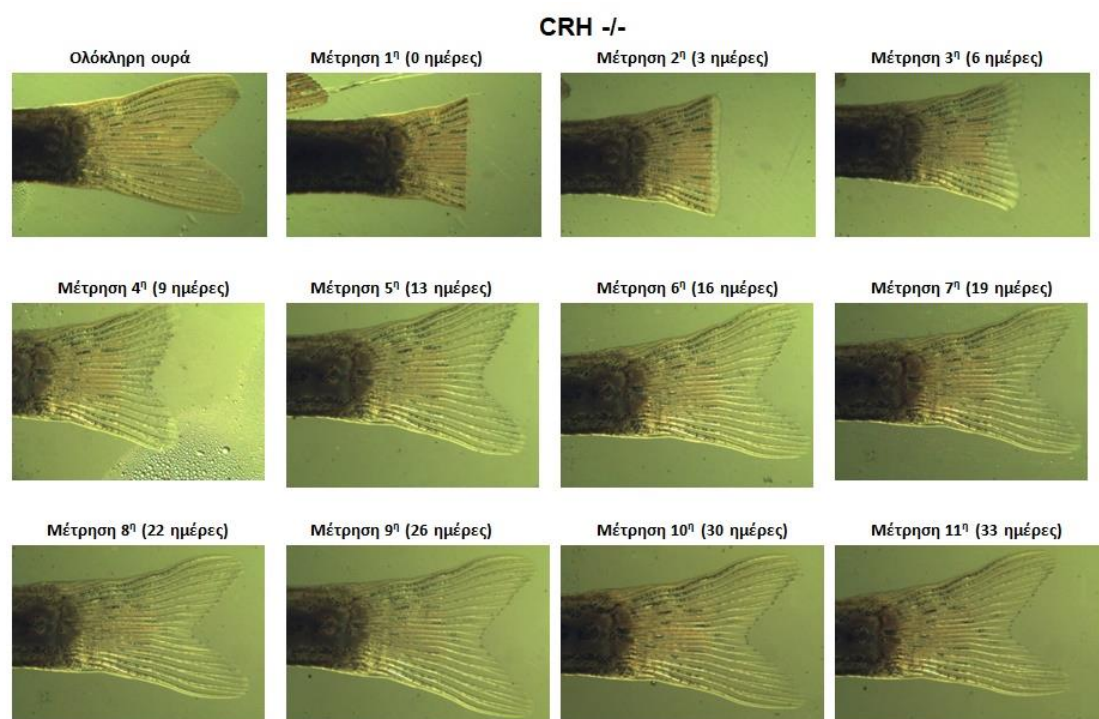


Πίνακας 7: Εκτίμηση της μεμονωμένης αύξησης του ουραίου πτερυγίου ανά 3 ημέρες. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας το μέγεθος της αύξησης της ουράς (σε cm) από την 0 ημέρα έως την 3^η ημέρα, από την 3^η έως την 6^η κλπ., αφαιρώντας κάθε φορά από την επόμενη μέτρηση την προηγούμενη σε tert -/- (N=5), tert +/- (N=5), WT (N=15) και tert -/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=3), για n=2 φορές. P >0.05 για τα control-tert hetero και τα control-tert homo αλλά P <0.05 για τα control-tert homo repeated. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

4.3. Δυναμικό αναγέννησης ουραίου πτερυγίου σε ενήλικα μεταλλαγμένα crh^{-/-} zebrafish

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και συνθήκες κατά την μελέτη αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου σε μεταλλαγμένα ψάρια που τους λείπει η ορμόνη της κορτικοτροπίνης (crh). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα ψάρια control, crh και crh που τους είχε κοπεί για δεύτερη φορά το ουραίο

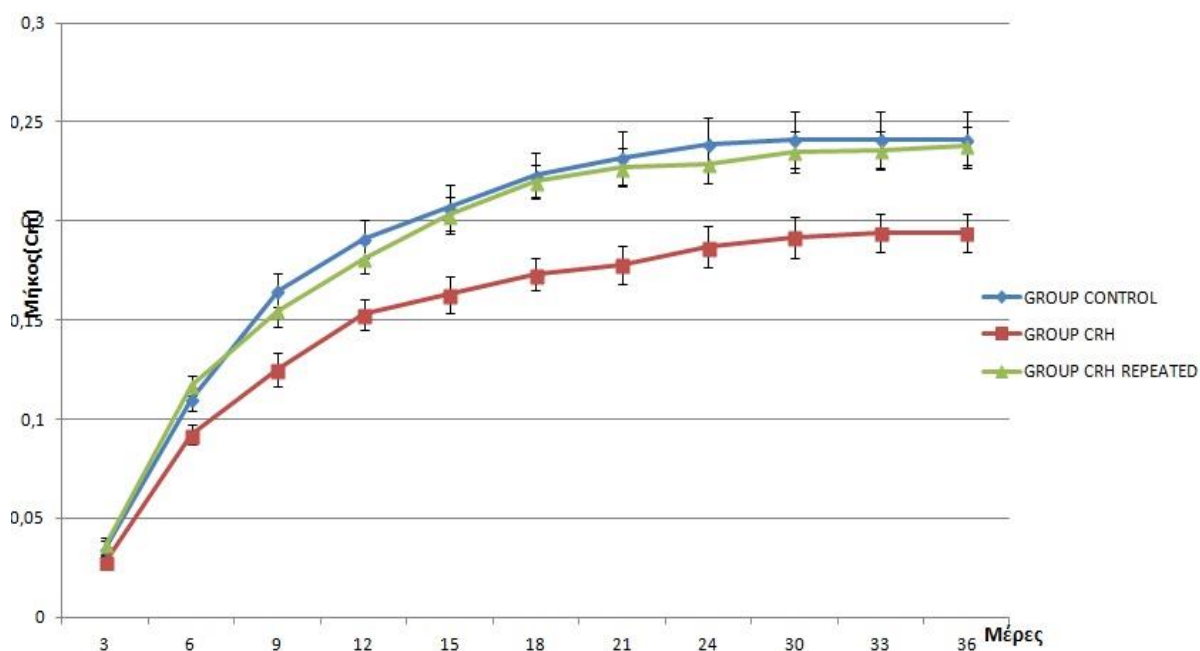
πτερύγιο και θέλαμε να ερευνήσουμε, αρχικά αν γίνεται αναγέννηση της ουράς σε *crh* ψάρια (Εικόνα 21,23), και το μήκος αναγέννησης της ουράς σε σύγκριση με τα control και με *crh* ψάρια που τους είχε κοπεί για δεύτερη φορά το ουραίο πτερύγιο (Πίνακας 8). Οι επανειλημμένοι ακρωτηριασμοί του ουραίου πτερυγίου πραγματοποιήθηκαν σε ψάρια στα οποία ο δεύτερος ακρωτηριασμός έγινε μετά από 2 μήνες και 3 μήνες. Αρχικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 23 τα *crh* διατηρούν την ικανότητα της αναγέννησης του πτερυγίου εξίσου καλά σε σχέση με τα control.



Εικόνα 23: Η διαδικασία της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου σε *crh*-/- zebrafish (N=20). Στην πρώτη φωτογραφία απεικονίζεται ολόκληρη η ουρά πριν τον ακρωτηριασμό. Στη δεύτερη φωτογραφία απεικονίζεται η ουρά μετά τον ακρωτηριασμό. Τέλος, από την 2^η μέτρηση έως και την 11^η μέτρηση φαίνεται η σταδιακή αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

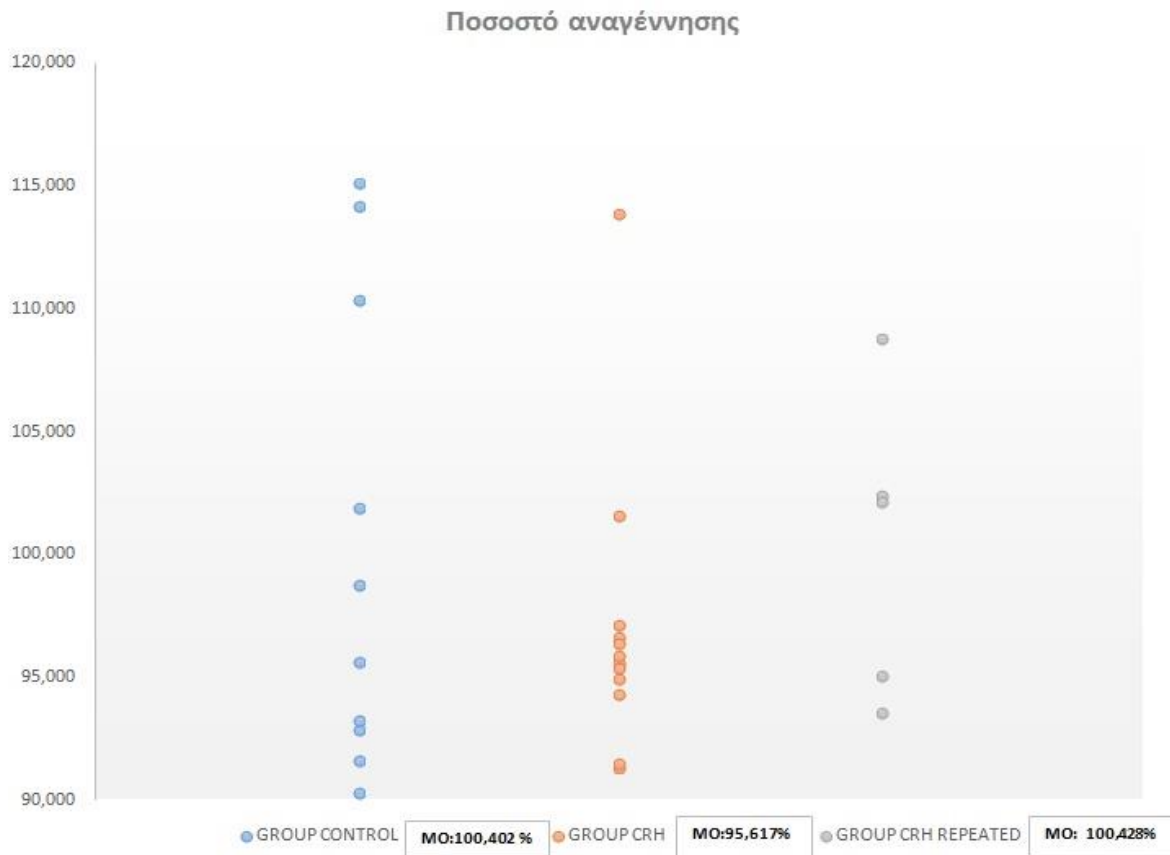
Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στον πίνακα 8, το υψηλότερο μήκος αναγέννησης συνολικά (αύξηση ουράς ανά μέρες) κατέχουν τα control όπως είναι αναμενόμενο και αμέσως μετά τα *crh*-/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά. Τέλος, το χαμηλότερο μήκος φαίνεται να έχουν τα *crh*-/-. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των *crh* -/- και των control η διαφορά δεν είναι οριακά

στατιστικά σημαντική ($p=0.06$) αλλά τα *crh*^{-/-} ψάρια εμφανίζουν μια έντονη τάση μείωσης του αναγεννώμενου μήκους του ουραίου πτερυγίου.



Πίνακας 8: Μήκος αναγεννώμενου ουραίου πτερυγίου. Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται η αύξηση του ουραίου πτερυγίου ανά 3 ημέρες, ξεκινώντας από τις 3 ημέρες έως και τις 36 ημέρες. Συγκεκριμένα, την 3^η, 6^η, 12^η, 18^η ημέρα χρησιμοποιήθηκαν *crh*^{-/-} (N=20), *crh*^{-/-} που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=10) και WT (N=21) και το πείραμα έγινε για n=3 φορές. Για τις υπόλοιπες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν *crh*^{-/-} (N=16), *crh*^{-/-} που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=10) και WT (N=15) και το πείραμα έγινε για n=2 φορές. $P > 0.05$ για τα control-*crh* και τα control-*crh* repeated. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

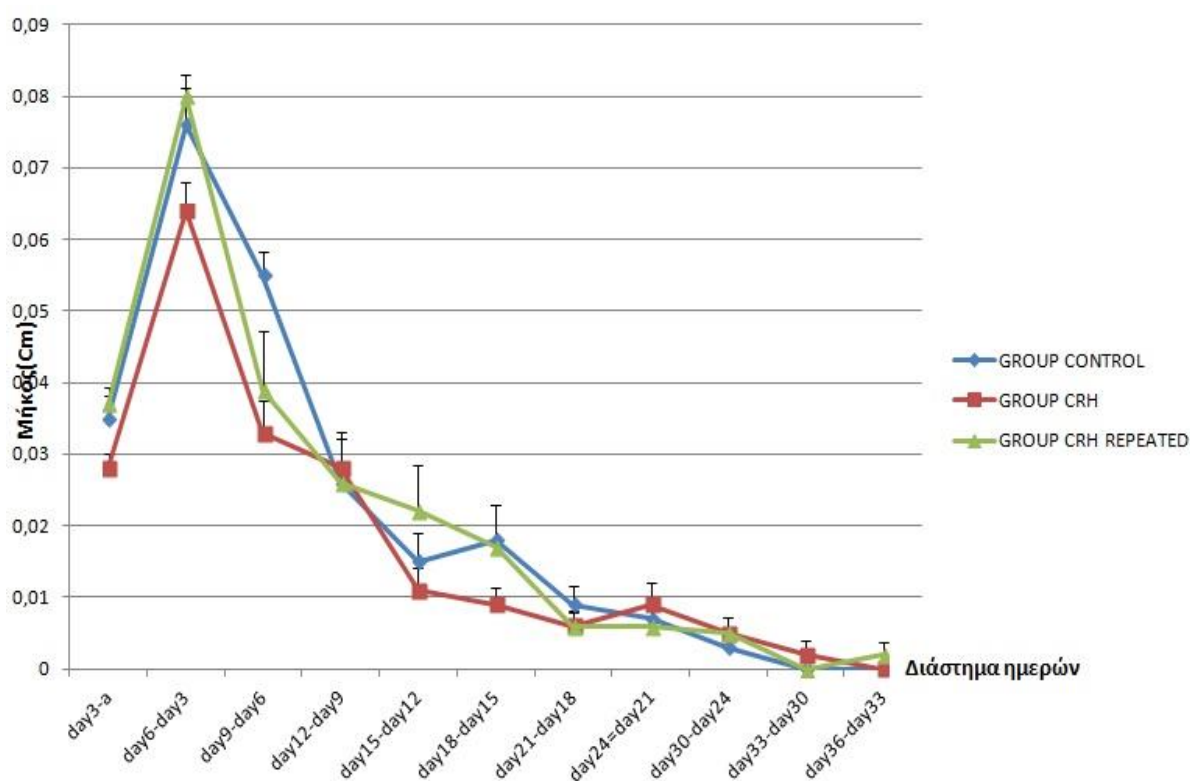
Όσο αναφορά τα ποσοστά αναγέννησης, τα control μαζί με τα *crh*^{-/-} που τους έχει ξανακοπεί η ουρά εμφανίζουν πλήρη αναγέννηση με μέσο όρο της τάξεως του 100,4% και 100,4% αντιστοίχως, ενώ τα *crh*^{-/-} εμφανίζουν μια αύξηση της τάξεως του 95.6% (Πίνακας 9).



Πίνακας 9: Ποσοστό αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου, βασισμένο στην τελευταία μέτρηση του μήκους του αναγεννώμενου του πτερυγίου και στο αρχικό μήκος του πτερυγίου πριν τον ακρωτηριασμό, σε *crh*^{-/-} (n=14), *crh*^{-/-} που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=5) και WT (N=10). Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση της μεμονωμένης αύξησης της ουράς ανά 3 ημέρες (Πίνακας 10). Στις πρώτες 3 ημέρες παρατηρήθηκε μεγαλύτερο αναγεννώμενο μήκος ουράς από τα control και *crh*^{-/-} που τους έχει ξανακοπεί η ουρά και χαμηλότερο στα *crh*^{-/-}. Αναλογιζόμενοι και τα αποτελέσματα του πίνακα 8, όπου τα *crh* που τους έχει ξανακοπεί η ουρά, κατέχουν την δεύτερη θέση στο αναγεννώμενο μήκος της ουράς, στον πίνακα 10 φαίνεται στις πρώτες 6 ημέρες να έχουν μια ραγδαία αύξηση του μήκους της ουράς τους, επαληθεύοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 8, αλλά μετέπειτα, με το πέρας των ημερών, φαίνεται να ακολουθούν το ίδιο μειωμένο πρότυπο αύξησης ουράς με τα υπόλοιπα γκρουπ. Αναλυτικά, στις 6 ημέρες το μήκος αύξησης της ουράς και στα τρία γκρουπ ήταν εκθετικό (που σημαίνει ότι όσο περνούσαν οι ημέρες το αναγεννώμενο μήκος αυξανόταν εκθετικά) με τα *crh*^{-/-}

/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά να βρίσκονται στην πρώτη θέση, τα control στη δεύτερη και τα crh-/- στην τρίτη. Μετά τις 6 ημέρες και για τα 3 γκρουπ ψαριών το αναγεννώμενο μήκος σε κάθε μέτρηση μειωνόταν εκθετικά μέχρι που μηδενιζόταν μέχρι τις 36 ημέρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι καθόλο το πέρασ των ημερών τα crh-/- διατηρούσαν το χαμηλότερο αναγεννώμενο μήκος και τα crh-/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά μαζί με τα control από την 12^η μέχρι και την 21^η μέτρηση εμφάνισαν έναν χαμηλότερο ρυθμό μείωσης του μήκους της ουράς. Επίσης, τα crh-/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά παρόλη της έντονης αναγεννητικής τους ικανότητας, μετά τις 6 ημέρες εμφάνισαν έντονη μείωση του αναγεννώμενου μήκους ακολουθώντας μετά φυσιολογική μείωση όπως ακολουθούσαν και τα υπόλοιπα group ψαριών. Η διαφορά όμως δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική.

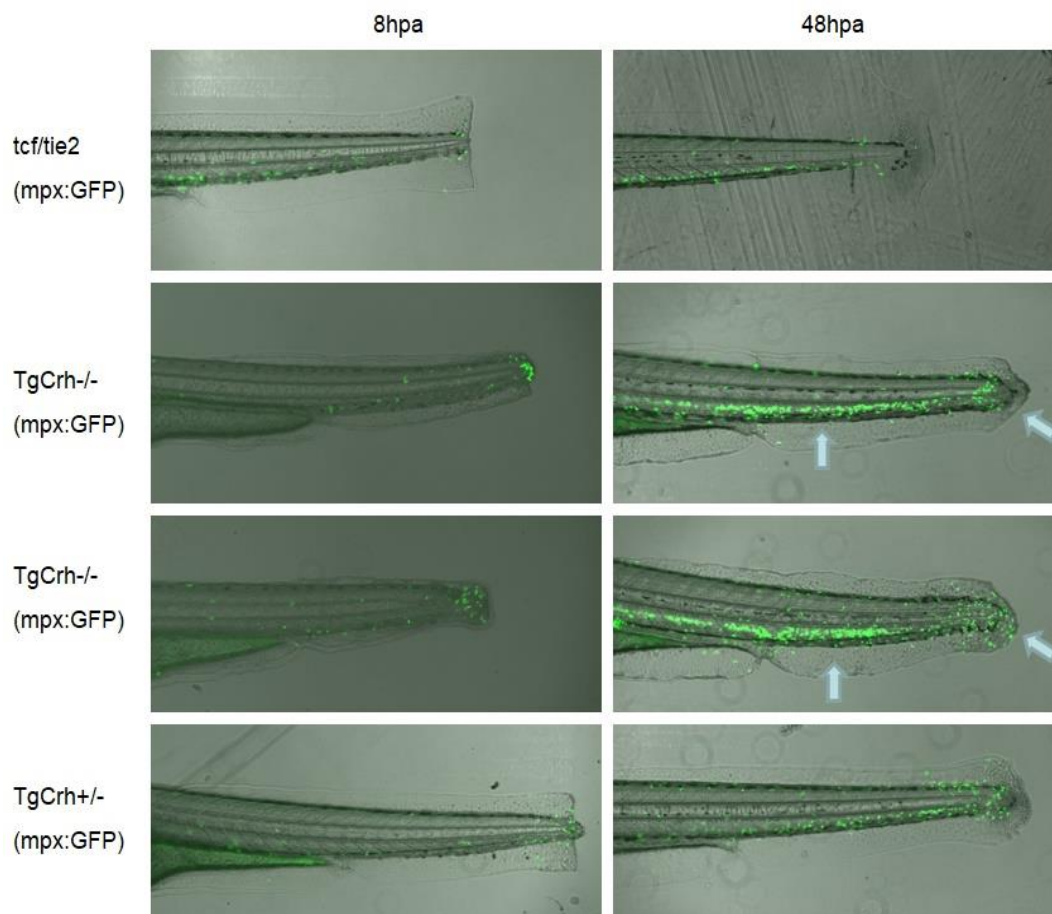


Πίνακας 10: Εκτίμηση της μεμονωμένης αύξησης του ουραίου πτερυγίου ανά 3 ημέρες. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας το μέγεθος της αύξησης της ουράς (σε cm) από την 0 ημέρα έως την 3^η ημέρα, από την 3^η έως την 6^η κλπ., αφαιρώντας κάθε φορά από την επόμενη μέτρηση την προηγούμενη σε crh-/- (N=16), σε crh-/- που τους έχει ξανακοπεί η ουρά (N=10) και WT (N=15), για n=2 φορές. P >0.05 για τα control-crh και τα control-crh repeated. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

4.4. Μελέτη της έκφρασης ουδετερόφιλων στο σημείο τραύματος κατά την αναγέννηση

Η προηγούμενη μελέτη της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου ενήλικων μεταλλαγμένων αλλά και WT ψαριών μας έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης ανοσορυθμιστικών παραγόντων, σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, στο σημείο του τραύματος, όπως είναι τα ουδετερόφιλα. Οι προνύμφες zebrafish είναι διαφανείς, επιτρέποντας την άριστη απεικόνιση των φθορίζοντων πρωτεϊνών σε κυτταρικές διεργασίες *in vivo*. Τα ουδετερόφιλα των zebrafish είναι αναγνωρίσιμα από περίπου 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Lieschke GJ et al., 2001) και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα υπάρχει απομονωμένο από οποιοδήποτε επίκτητο σύστημα, το οποίο δεν ενεργοποιείται μέχρι περίπου τις πρώτες 4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (Tiede NS et al., 2004). Φλεγμονή προκαλείται μετά την τομή της ουράς των προνυμφών του zebrafish, η οποία στη συνέχεια διαλύεται σε παρόμοια χρονική πορεία όπως και στα θηλαστικά. Ως εκ τούτου επιλέξαμε το είδος αυτό ως έναν ιδανικό οργανισμό για τη δημιουργία ενός απλουστευμένου, γενετικά συμβατικού μοντέλου που χρησιμοποιεί φθορίζοντα ουδετερόφιλα για την παρακολούθηση της φλεγμονώδους απόκρισης. Τα ουδετερόφιλα εντοπίστηκαν μέσω *mrx:GFP* λαρβών. Η συγκεκριμένη μελέτη αφορούσε *crh* μεταλλαγμένα ψάρια στο στάδιο των 72-120 hpf. Αρχικά, διασταυρώθηκαν ψάρια *mrx crh+/-* x *crh-/-* και ως control διασταυρώθηκαν ψάρια *tcf/tie2 (mrx)*. Στη συνέχεια έγινε εκλογή των συγκεκριμένων λαρβών που φέρουν το επιθυμητό διαγονίδιο απεικόνισης των ουδετερόφιλων (*mrx*). Για να γίνει απεικόνιση των ουδετερόφιλων κατά την διάρκεια της αναγέννησης, στις 72hpf γίνεται ακρωτηριασμός της ουράς, όπως έχει δειχθεί ανωτέρω, και στις 4 hpa (hours post amputation) γίνεται η πρώτη παρατήρηση, στο ανάστροφο μικροσκόπιο, της έκφρασης ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος. Η ίδια παρατήρηση γίνεται στις 8 hpa, 24 hpa και στις 48 hpa. Στο τέλος της παρατήρησης της έκφρασης των ουδετερόφιλων πραγματοποιείται γονοτύπηση για εξακρίβωση ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας των λαρβών ώστε να καταλήξουμε στο συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης ουδετερόφιλων σε *crh-/-* και *crh +/-* ψάρια. Στις 4hpa παρατηρείται συσσώρευση των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος, κάτι που είναι σύμφωνο με την πρώιμη αντίδραση που έχουν τα ουδετερόφιλα κατά την

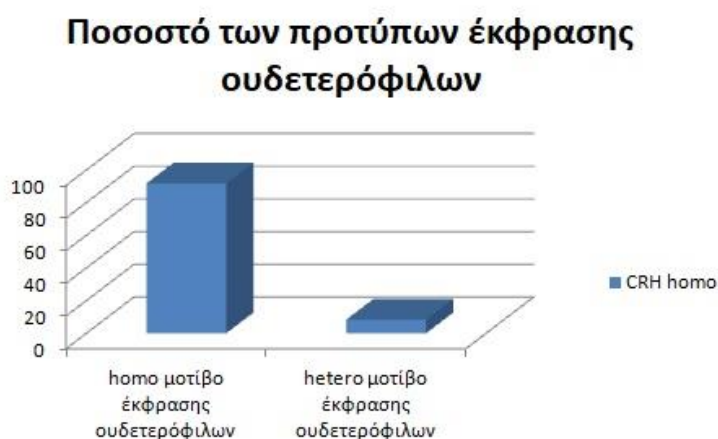
πρόκληση τραύματος και στις *crh* και WT λάρβες. Το ίδιο μοτίβο έκφρασης παρατηρείται στις 8 hpa και στις 24 hpa. Τέλος, στις 48 hpa, στα WT παρατηρείται διάλυση της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος, ενώ στα *crh* ψάρια παρατηρείται ότι δεν έχει γίνει διάλυση της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων.



Εικόνα 24: Στρατολόγηση ουδετερόφιλων στο αναγεννώμενο ουραίο περύγιο. Οι εικόνες αυτές αναπαριστούν την συσσώρευση ουδετερόφιλων σε *crh*^{-/-}(*mpx*:GFP) (N=22), *crh*^{+/-}(*mpx*:GFP)(N=6) και σε *tcf/tie2*(*mpx*:GEP)(N=>40) λάρβες στις 8, 24 και 48 hpa. Το πείραμα έγινε για n=5 φορές. Οι ενδιάμεσες φωτογραφίες στις 24 hpa δεν φαίνονται. Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης του μοτίβου έκφρασης ουδετερόφιλων στις 48 hpa δείχνουν ότι: τα WT εμφανίζουν ένα μοτίβο έκφρασης που περιλαμβάνει έντονη συσσώρευση κατά μήκος του ουραίου αιματοποιητικού ιστού και μια μικρή έως καθόλου συσσώρευση στο σημείο του τραύματος καθώς έχει αρχίσει να διαλύεται η συσσώρευση των ουδετερόφιλων στο σημείο αυτό. Στη συνέχεια, τα *crh*^{+/-}, εμφανίζουν μια μικρή

συσσώρευση στο άκρο αλλά και κατά μήκος του ουραίου αιματοποιητικού ιστού. Όσο αναφορά τα *crh*^{-/-}, εμφανίζουν μια έντονη συσσώρευση των ουδετερόφιλων κατά μήκος του ουραίου αιματοποιητικού ιστού και μια έντονη συσσώρευση στο σημείο του τραύματος (Εικόνα 24). Η ένδειξη αυτή είναι σημαντική διότι δείχνει ότι η διάλυση της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων δεν έχει αρχίσει να γίνεται και ότι τα ουδετερόφιλα παραμένουν στο σημείο του τραύματος παρατείνοντας την δράση τους και την φλεγμονή. Αξιοσημείωτο είναι ότι ορισμένα από τα ομόζυγα ψάρια φαίνεται να ακολουθούν το μοτίβο έκφρασης ουδετερόφιλων των ετερόζυγων ψαριών (8.3%) έναντι του φυσιολογικού μοτίβου έκφρασης ουδετερόφιλων σε ομόζυγα ψάρια που φτάνει το 91.7% (Πίνακας 11).



Πίνακας 11: Ποσοστά των μοτίβων έκφρασης των *crh* ομόζυγων ψαριών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου *tert*^{-/-} zebrafish

Η μελέτη των τελομερών είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των διαδικασιών της γήρανσης και του καρκίνου. Αν και το ποντίκι έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μοντέλο για αυτούς τους σκοπούς και έχει καθιερωθεί ως βασικό μοντέλο για να διασαφηνιστεί ο ρόλος των τελομερών και της τελομεράσης στη γήρανση και τον καρκίνο, υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ των ποντικών και των ανθρώπων. Για παράδειγμα, το μήκος των τελομερών του ποντικού είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των ανθρώπων και το μοντέλο ποντικού δεν είναι σε θέση να μελετήσει πλήρως τα συμπτώματα της ανεπάρκειας της ανθρώπινης τελομεράσης (Autexier, 2008, Mitchell et al., 1999). Ως εκ τούτου, έχει χαρακτηριστεί ένα δεύτερο μοντέλο σπονδυλωτών για τη μελέτη του ρόλου της τελομεράσης και των τελομερών. Τα τελομερή των Zebrafish (15-20 kb) είναι σχετικά παρόμοια με τα ανθρώπινα (10-15 kb) και παρουσιάζουν προοδευτική μείωση (Anchelin et al., 2011). Τα αποτελέσματα από την συγκεκριμένη εργασία δείχνουν ότι από τις 72-168 hpf τα *tert*^{-/-} παρουσιάζουν ένα πλήθος παθολογικών χαρακτηριστικών σε μεγαλύτερα ποσοστά από εκείνα που προέρχονται από *-/-* x *+/-* γονείς, όπως έχει περιγραφεί ανωτέρω και από τον πίνακα 12, συμφωνώντας εν μέρη με τα παρακάτω αποτελέσματα των Anchelin et al., κατά τα οποία, από τις 24-72 hpf, *tert*^{-/-} εμφάνισαν σοβαρό παθολογικό φαινότυπο (~60%), πιο ήπιο (~25%) και κανονικό (~15%), σε σύγκριση με τα *-/-* x *+/+* που εμφάνισαν σοβαρό παθολογικό φαινότυπο (~25%), πιο ήπιο (~15%) και κανονικό (~60%).

hpf	TERT ^{-/-}	TERT ^{-/-} x ^{+/-}
72	34.4%	21.4%
96	30.8%	0.8%
120	39%	1.4%
144	32.6%	1.2%
168	30.6%	9%

Πίνακας 12: Ποσοστά εμφάνισης παθολογικών φαινοτύπων σε *tert*^{-/-} και *tert*^{-/-} x *+/-* λάρβες στις 72,96,120,144,168 hpf. Στα ποσοστά αυτά δεν συμπεριλαμβάνονται τα

ποσοστά έλλειψης της νηκτικής κύστης, καθώς δεν γνωρίζουμε αν αυτό υποδηλώνει παθολογικό φαινότυπο.

Μια ακόμη μελέτη έδειξε ότι η διαγραφή της τελομεράσης στα ποντίκια δεν παρουσίασε κανένα προβληματικό φαινότυπο στις πρώτες γενιές, όταν τα τελομερή ήταν μακριά (Chiang κ.ά., 2004, Lee κ.ά., 1998). Αντιθέτως οι *G2 tert - / -* απόγονοι παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό (58,73%) κοντών τελομερών σε σύγκριση με *+ / +* ψάρια (15,13%). Έχει παρατηρηθεί, επίσης, καλύτερο ποσοστό επιβίωσης στους απογόνους που ελήφθησαν από μεταλλαγμένα *- / -* ψάρια 5 μηνών σε σχέση με εκείνα που προκύπτουν από γονείς 11 μηνών. Τέλος, ενδιαφέρον έχει ότι η ανεπάρκεια του p53 διέσωσε εν μέρει τη βιωσιμότητα των *G2 tert - / -* zebrafish κατά την πρώτη εβδομάδα (το μήκος των τελομερών δεν επηρεάστηκε) και ότι ο βαθμός αναπτυξιακών προβλημάτων κάθε φαινοτύπου σχετίζεται άμεσα με το μήκος των τελομερών (Anchelin et al., 2013). Όσο αναφορά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τα ποσοστά εμφανίζουν μεγάλες τυπικές αποκλίσεις και έτσι θα πρέπει να γίνει περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιώντας και ελέγχοντας μεμονωμένα την κάθε λάρβα από τις 72 hpf έως και σε μεγαλύτερα αναπτυξιακά στάδια από εκείνων των 168 hpf, έτσι ώστε να υπάρχει και μια καλύτερη εικόνα του συνολικού ποσοστού θανάτου.

5.2. Η έλλειψη της λειτουργικότητας του γονιδίου της τελομεράσης οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα αναγέννησης σε *tert - / -* zebrafish

Η έκφραση της τελομεράσης και το μήκος των τελομερών είναι στενά συνδεδεμένα καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής των zebrafish. Επίσης έρευνες δείχνουν ότι υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ της έκφρασης της τελομεράσης και του μήκους των τελομερών και της αποτελεσματικότητας της αναγέννησης των ιστών. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι οποιαδήποτε διαταραχή στη λειτουργία της, θα επιφέρει προβλήματα στη διαδικασία αυτή. Όπως έχει προαναφερθεί, η συσσώρευση βραχέων τελομερών και βλάβης στα τελομερή με την πάροδο του χρόνου στα zebrafish οδηγεί στην εμφάνιση φαινοτύπων γήρανσης ειδικών για τον κάθε ιστό και η έλλειψη της τελομεράσης δείχνει, εξαρτώμενη από την p53, πρόωρη γήρανση (Carneiro et al., 2016). Συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι μεταλλαγμένα ψάρια που τους λείπει η λειτουργικότητα της τελομεράσης συμπεριφέρονται ως γερασμένα ψάρια. Έτσι,

τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής εργασίας κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν *tert* -/- ψάρια έδειξαν ότι η έλλειψη της δραστηριότητας της τελομεράσης οδηγεί σε μειωμένη αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου. Επιπλέον, σε προηγούμενες μελέτες, στα αναγεννώμενα πτερύγια γερασμένων ψαριών παρατηρείται μια ασθενέστερη ρύθμιση προς τα πάνω της έκφρασης της τελομεράσης, η οποία συσχετίζεται με τη μειωμένη ικανότητα αναγέννησης που έχουν τα γερασμένα ψάρια. Τα ηλικιωμένα zebrafish έχουν χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, φτάνοντας το 50% της αναγέννησης των πτερυγίων τους (μετά από 12 ημέρες μετά τον ακρωτηριασμό (dpa)) και δεν εμφανίζουν φυσιολογική αναγέννηση του ουραίου πτερυγίου. Αυτό υποδεικνύει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της χαμηλής έκφρασης της τελομεράσης και της αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου σε γερασμένα ψάρια. Ωστόσο, ο ακρωτηριασμός σε νεότερα zebrafish ηλικίας 3 μηνών έδειξε 58% αυξημένη ρύθμιση σε σύγκριση με τη βασική έκφραση και προκάλεσε ασθενώς αυξημένη έκφραση της τελομεράσης σε γερασμένους ιχθύες ηλικίας 24 μηνών (18% προς τα άνω) στις 5dpa (Elmore LW et al., 2008). Είναι σημαντικό ότι η αύξηση της ρύθμισης της έκφρασης της τελομεράσης στα τελομερή θα πρέπει να διατηρηθεί κατά τη διάρκεια του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού που σχετίζεται με την ανανέωση του ιστού. Η τελομεράση ρυθμίζεται προς τα πάνω κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των ιστών σε 3 διαφορετικά είδη ψαριών, γεγονός που υποδηλώνει έναν αναπόσπαστο ρόλο της τελομεράσης σε άλλες διαδικασίες εκτός από τη γήρανση και τον καρκίνο. Είναι σημαντικό ότι αυτή η αύξηση της δραστηριότητας της τελομεράσης συσχετίζεται με τη διατήρηση ή την επιμήκυνση των τελομερών. Αυτά τα δεδομένα είναι συσχετιζόμενα με την ιδέα ότι η τελομεράση προτιμά να επιμηκύνει τα βραχύτερα ή πολύ βραχύτερα τελομερή, όπως έχει δειχθεί χρησιμοποιώντας knockout για την τελομεράση ποντίκια (Hemann MT et al., 2001; Lynne W. Elmore et al., 2008). Παρά την ουσιαστική αυτή πρόοδο, τα πλεονεκτήματα αυτού του μοντέλου των σπονδυλωτών για την αποκρυπτογράφηση του ρόλου της τελομεράσης στην αναγέννηση, τη γήρανση και τον καρκίνο έχουν αξιοποιηθεί μόνο εν μέρει.

5.3. Ενήλικα crh -/- ψάρια εμφανίζουν μια τάση μείωσης στο δυναμικό αναγέννησης

Έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την δράση της crh ορμόνης και της αναγέννησης δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση στο ποντίκι αλλά και στην σαλαμάνδρα. Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία θέλαμε να δούμε αν υπάρχει συσχέτιση του δυναμικού αναγέννησης σε έλλειψη της συγκεκριμένης ορμόνης. Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό, ότι κατά τα αρχικά στάδια του τραυματισμού είναι σημαντική η δημιουργία φλεγμονής στο σημείο του τραύματος και ότι κατά τα μεταγενέστερα στάδια είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί η φλεγμονή για να γίνει επούλωση του τραύματος. Αυτό στρατολογείται μέσω του μονοπατιού Wnt/- β κατενίνης (Timothy A. Petrie et al., 2015). Επίσης, για ναδειχθεί η σημασία του μονοπατιού Wnt / β-κατενίνης έγινε αναστολή της σηματοδότησης Wnt λίγο πριν από τον ακρωτηριασμό του πτερυγίου και βρέθηκε ότι επηρεάζεται πλήρως η αναγέννηση των πτερυγίων (Azevedo et al., 2011). Σημαντικό είναι, ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι στρατολογεί τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα στο σημείο του τραύματος (Peghaire C, et al., 2016) και συνεισφέρει στην αναγεννητική ικανότητα (Daniel Wehner et al., 2013). Επίσης, έχει προταθεί ένας νέος μοριακός μηχανισμός για το crh που ρυθμίζει την οδό σηματοδότησης του Wnt / β-κατενίνης / TCF-4 και ότι το crh ενεργοποιεί την οδό Wnt / β-κατενίνη / TCF-4 μέσω της οδού της αδενυλικής κυκλάσης / cAMP / PKA- μονοπατιού (Muhammad Nasir Khan Khattak et al., 2010). Συνεπώς, αν λάβουμε υπόψη μας τα παραπάνω δεδομένα, σε crh -/- ψάρια δεν υπάρχει θετική ανάδραση του μονοπατιού Wnt/- β κατενίνης και έτσι η φλεγμονή παραμένει στο σημείο του τραυματισμού, δεν υπάρχει επαρκής στρατολόγηση των ουδετερόφιλων και διάλυσή τους στο σημείο του τραύματος και η αναγεννητική ικανότητα μειώνεται. Τα αποτελέσματά μας επαληθεύουν εν μέρη τα παραπάνω συμπεράσματα, καθώς, φαίνεται ότι τα crh-/- ψάρια, εμφανίζουν μια τάση μείωσης του δυναμικού αναγέννησης του ουραίου πτερυγίου. Δείχνοντας, έτσι, ότι η μειωμένη απόκριση στο στρες (το οποίο στρατολογείται από την crh ορμόνη) έχει αντίκτυπο στην διαδικασία της αναγέννησης. Με βάση και τα αποτελέσματά μας που έγιναν σε λάρβες crh -/- που φαίνεται ότι στα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα ψάρια εμφανίζεται συσσώρευση ουδετερόφιλων μπορούμε να υποθέσουμε ότι και στις λάρβες αλλά και στα ενήλικα ψάρια με

οχή έλλειψη εμφανίζεται ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης ουδετερόφιλων (συσσώρευση), εξηγώντας έτσι την μειωμένη αναγέννηση στα ενήλικα. Για να προβούμε, όμως, σε μια άρτια απάντηση είναι καλό να ελεγχθεί το μοτίβο έκφρασης ουδετερόφιλων σε ενήλικα οχή -/- ψάρια, ώστε εάν δειχθεί τελικά ότι υπάρχει συσσώρευση ουδετερόφιλων να επαληθευθούν τα αποτελέσματα του μειωμένου δυναμικού αναγέννησης στα οχή ενήλικα ψάρια που έχουμε βρει, ή, εάν δειχθεί ότι δεν υπάρχει συσσώρευση ουδετερόφιλων να υποτεθεί κάποιος αναπτυξιακός μηχανισμός που δρα πάνω στο πρότυπο συσσώρευσης που εμφανίζεται στις λάρβες ή κάποιος άλλος εναλλακτικός μηχανισμός που να οδηγεί σε μειωμένο δυναμικό αναγέννησης. Τέλος, μια έρευνα των Petrie et al. υποθέτει ότι είναι απίθανο τα ουδετερόφιλα να έχουν κάποιο ανασταλτικό αποτέλεσμα στην αναγέννηση, καθώς τα ουδετερόφιλα συσσωρεύονται σε σημαντικά μεγαλύτερους αριθμούς σε γρηγορότερους αναγεννητικά ιστούς καθόλη την αναγεννητική διαδικασία. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν αντιτίθενται στα παρόντα αποτελέσματα, καθώς η συγκέντρωση των ουδετερόφιλων μπορεί να είναι μεγάλη σε ιστούς που έχουν μεγάλο αναπτυξιακό δυναμικό αλλά η δική μας υπόθεση λέει ότι εάν δεν γίνει απομάκρυνση αυτών και παραμείνουν στο σημείο του τραύματος μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβη στον ιστό και μειωμένη αναγέννηση καθώς η καθυστερημένη απόπτωση ή η διαταραγμένη απομάκρυνση των ουδετερόφιλων μπορεί να επιδεινώσει και να παρατείνει τον ιστικό τραυματισμό (Sadiket al., 2011).

5.4. Η έλλειψη της οχή ορμόνης σε λάρβες οδηγεί σε συσσώρευση και παραμονή των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος

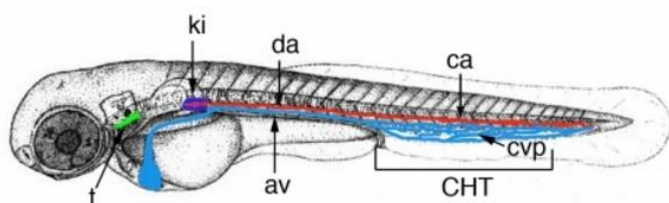
Αφού έγινε μελέτη της αναγέννησης σε ενήλικα ψάρια, ήταν σημαντικό να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης των ουδετερόφιλων στις λάρβες, ώστε να ελεγχθεί αν στις λάρβες που τους λείπει το γονίδιο της κορτικοτροπίνης υπάρχει αυξημένη συσσώρευση των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα ουδετερόφιλα, στρατολογούνται από χημικά σήματα που απελευθερώνονται από τα σημεία τραυματισμού αλλά και μόλυνσης. Ο κύριος σκοπός τους είναι να προσβάλλουν παθογόνους παράγοντες και να στρατολογήσουν επιπλέον ανοσοποιητικές άμυνες. Πέρα από αυτές τις επιθυμητές ιδιότητες αυτά τα

κύτταρα μπορούν επίσης να προκαλέσουν βλάβη των ιστών μέσω της παρατεταμένης τους ενεργοποίησης, συμβάλλοντας έτσι σε σοβαρές ασθένειες όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και η χρόνια αποφρακτική πνευμονική διαταραχή. Μετά τον τραυματισμό είναι ουσιώδες να γίνει καθαρισμός των ουδετερόφιλων, το οποίο είναι σημαντικό για την λήξη της φλεγμονής, αλλιώς τα ουδετερόφιλα δημιουργούν συσσωματώματα τα οποία διαιωνίζουν το τραύμα (Sadik et al., 2011). Επίσης, η ενεργή σηματοδότηση Wnt μπορεί να μετριάσει τη φλεγμονή του πρώιμου σταδίου και να λειτουργήσει ως μοριακός διακόπτης μετάβασης στα μεταγενέστερα στάδια της ανοσοαπόκρισης (resolution). Η ιδέα αυτή μοιράζεται ομοιότητες με την κατάσταση που επικρατεί στα θηλαστικά, όπου η έγκαιρη απομάκρυνση των ουδετερόφιλων μετά το τραύμα είναι ουσιώδης σημασίας για τον τερματισμό της φλεγμονής και την καθυστέρηση της απόπτωσης (Timothy A. Petrie et al., 2014). Δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν σε μια διαδικασία κατά την οποία μπορούν είτε να προάγουν είτε να εμποδίζουν την επούλωση των πληγών, η οποία είναι εξαρτώμενη από τον ιστό, το επίπεδο του τραυματισμού και τον χρόνο. Ο ρόλος της σηματοδότησης Wnt / β-κατενίνης στη διαμόρφωση της αντίδρασης κατά τη πρόκληση τραυματισμού μπορεί πράγματι να είναι εξίσου όμοια με τη συγκεκριμένη περίπτωση στο zebrafish. Τα αποτελέσματα αυτού του συγκεκριμένου τμήματος της εργασίας δείχνουν ότι σε λάρβες που τους λείπει το γονίδιο της κορτικοτροπίνης εμφανίζεται ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης ουδετερόφιλων κατά το οποίο η συσσώρευση των ουδετερόφιλων ξεκινά στις 4 hρα, η πιο υψηλή συσσώρευση γίνεται στις 24 hρα και ο αριθμός των εντοπισμένων ουδετερόφιλων μειώνεται ταχέως στις 48 hρα στα WT ψάρια (διάλυση της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων), ενώ στα *crh* να παραμένει. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τους Renshaw et al., όπου τα ουδετερόφιλα συσσωρεύτηκαν από 6 έως 12 ώρες μετά τον τραυματισμό, ακολουθούμενα από μια φάση διάλυσης που ολοκληρώθηκε σε μεγάλο βαθμό στις 24 ώρες. Η ανίχνευση του φθορισμού θεωρείται ότι εξαρτάται από το θάνατο των φλεγμονωδών ουδετερόφιλων μέσω της απόπτωσης (Renshaw et al., 2006). Αντιθέτως, σε έρευνες που έχουν γίνει στα ενήλικα ψάρια, έχει βρεθεί ότι η συσσώρευση των ουδετερόφιλων ξεκινά στις 6 hρα. Η πιο υψηλή συσσώρευση γίνεται στις 3 dρα, με τον αριθμό των εντοπισμένων

ουδετερόφιλων να μειώνεται ταχέως στις 5 dpa. Στη συνέχεια έχει βρεθεί ότι οι ακραίοι ακρωτηριασμοί προσελκύουν πάνω από το διπλάσιο αριθμό των ουδετερόφιλων σε σχέση με τους απομακρυσμένους ακρωτηριασμούς, αλλά και οι δύο τραυματισμοί ακολουθούν το ίδιο πρότυπο συσσώρευσης καθ' όλη την αναγέννηση (Timothy A. Petrie et al., 2014). Η στρατολόγηση των ουδετερόφιλων φαίνεται να οδηγείται μέσω της απομάκρυνσης από το αγγειακό σύστημα κοντά στο επίπεδο ακρωτηριασμού, ακολουθούμενη από μετανάστευση στην τραυματισμένη περιοχή. Τόσο τα ουδετερόφιλα όσο και τα μακροφάγα συσσωρεύονται πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερες πυκνότητες στην πλησιέστερη (ταχύτερη αναγέννηση) εκτομή σε σύγκριση με τους ιστούς που έχουν ακρωτηριαστεί στην εγγύς περιοχή.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του προτύπου έκφρασης των ουδετερόφιλων έδειξαν ότι τα WT εμφανίζουν ένα μοτίβο έκφρασης που περιλαμβάνει έντονη συσσώρευση κατά μήκος του ουραίου αιμοποιητικού ιστού και μια μικρή έως καθόλου συσσώρευση στο σημείο του τραύματος καθώς έχει αρχίσει να διαλύεται η συσσώρευση των ουδετερόφιλων στο σημείο αυτό. Στη συνέχεια, τα *crh*^{+/-}, εμφανίζουν μια μικρή συσσώρευση στο άκρο αλλά και κατά μήκος του ουραίου αιμοποιητικού ιστού. Όσο αναφορά τα *crh*^{-/-}, εμφανίζουν μια έντονη συσσώρευση των ουδετερόφιλων κατά μήκος του ουραίου αιμοποιητικού ιστού και μια έντονη συσσώρευση στο σημείο του τραύματος (Εικόνα 24). Το συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης των ουδετερόφιλων ταιριάζει με την παραπάνω υπόθεσή μας ότι σε *crh*^{-/-} ψάρια δεν υπάρχει θετική ανάδραση του μονοπατιού Wnt/ β κατενίνης και έτσι τα ουδετερόφιλα παραμένουν στο σημείο του τραυματισμού, δημιουργώντας, έτσι, συσσωματώματα στο σημείο αυτό, διακρινόμενα στην φλεγμονή στην περιοχή του τραύματος. Τέλος, μια ακόμη παρατήρηση που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι τα αρχικά προγονικά κύτταρα των μακροφάγων προκαλούν την γένεση των ουδετερόφιλων, τα οποία επίσης διασκορπίζονται και στη συνέχεια ζουν στους ιστούς. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι, ακόμη και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια, σε νεαρά zebrafish, καθώς και σε άλλα ψάρια και βατράχια, τα ουδετερόφιλα είναι παρόντα σε υγιείς, μη φλεγμονώδεις ιστούς, σε αντίθεση με τα θηλαστικά. Εφόσον έχει βρεθεί ότι είναι εξίσου ικανά με τα ομόλογά τους στα θηλαστικά στην καταπολέμηση λοιμώξεων, είναι εύλογο να μελετηθεί πώς τα ουδετερόφιλα των ψαριών ζουν ακίνδυνα στους ιστούς. Αυτό θα μπορούσε

να μας διδάξει πώς να εμποδίζεται η υπερβολική φλεγμονή που προκαλείται από τα ουδετερόφιλα στους ανθρώπινους ιστούς. Στα zebrafish, όπως και στα θηλαστικά, τα πολυδύναμα HSPCs (αιμοποιητικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα) που περιλαμβάνουν τα μελλοντικά μακροπρόθεσμα HSC αρχικά εμφανίζονται κατά μήκος της κοιλιακής πλευράς της κεντρικής αρτηρίας του εμβρύου, της αορτής (Εικόνα 25) και από εκεί υποβάλλονται σε ένα ταξίδι μέσω της κυκλοφορίας και τελικά καταλήγουν στα σημεία δράσης τους, όπου θα δημιουργήσουν αιματοποίηση πολλαπλών οικογενειών (Murayama et al., 2006, Kissa et al., 2008). Έχει ανακαλυφθεί ότι το πρώτο από αυτά τα σημεία δράσης τους, βρίσκεται στην ουρά των ψαριών γύρω από ένα αγγειακό πλέγμα που σχηματίζεται από την διακλάδωση της φλέβας του ουραίου περυγίου, με όνομα Caudal Hematopoietic Tissue (CHT) (Εικόνα 25) (Murayama κ.ά., 2006). Όπως το εμβρυϊκό ήπαρ στα θηλαστικά, το CHT είναι μια μεταβατική θέση για την διαμονή, την επέκταση και τη διαφοροποίηση των HSPC πριν από την τελική μετανάστευσή τους στα αιμοποιητικά όργανα (θύμος και νεφρό) (σε ψάρια, η ενήλικη αιμοποίηση δεν λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών όπως στα θηλαστικά, αλλά στον “μυελό των νεφρών” (Kissa et al., 2008).



Εικόνα 25: Χρονική αναπαράσταση της αιμοποίησης σε προνύμφες zebrafish. Η οριστική αιμοποίηση αρχίζει στον κορμό του εμβρύου με τον μετασχηματισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων του κοιλιακού τοιχώματος της ραχιαίας αορτής (da) σε αιμοποιητικά βλαστικά / προγονικά κύτταρα (HSPCs) από τις 32 έως και 56 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hpf) και την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της αξονικής φλέβας (av). Αυτά τα HSPC έπειτα εγκαθίστανται στον ουραίο αιματοποιητικό ιστό (CHT) που σχηματίζεται γύρω από το πλέγμα ουραίας φλέβας (cvp, μπλε), όπου επεκτείνονται και διαφοροποιούνται σε αρκετές γενεές για περίπου μία εβδομάδα. Από εκεί, μερικά μεταναστεύουν ξανά για τον θύμο αδένα (t) από τις 56 hpf, και στη συνέχεια στο νεφρό (ki), που είναι το σημείο αιμοποίησης ενηλίκων, στις 4,5 dpf.

Συνεπώς είναι προτιμητέο να γίνει χρήση νεαρών ατόμων zebrafish (juveniles), περίπου ενός μήνα, (καθώς το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται μετά από περίπου 4 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση (Trede NS et al., 2004)), και έτσι, τα αποτελέσματά μας θα είναι πιο στοχευόμενα στην στρατολόγηση ουδετερόφιλων, όχι κατά την εμβρυογένεση αλλά στα μεταγενέστερα στάδια. Επίσης, εκτός από το πιθανό πρόβλημα των εμβρυικών σταδίων, θα υπάρχει και καλύτερη απεικόνιση των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος καθώς η συσσώρευση των ουδετερόφιλων σε άτομα του ενός μήνα θα είναι πιο αντικειμενική διότι τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα θα έχουν εγκατασταθεί στο σημείο δράσης τους (τα HSPC διαφοροποιούνται ακόμη και μετά από μια εβδομάδα), σε σχέση με την τωρινή παρατήρησή μας που έγινε στις 72hrf-144 hrf.

Πολλά είναι γνωστά σχετικά με τους παράγοντες που ελέγχουν την παραγωγή ουδετερόφιλων και την στρατολόγηση αυτών σε φλεγμονώδεις περιοχές. Αντίθετα, οι παράγοντες που ελέγχουν την επιβίωση και την κάθαρση των ουδετερόφιλων από τους ιστούς παραμένουν ελάχιστα προσδιορισμένοι.

5.5. Ο επανειλημμένος ακρωτηριασμός του ουραίου πτερυγίου οδηγεί σε ανάκαμψη του δυναμικού αναγέννησης

Τα επαναλαμβανόμενα πειράματα ακρωτηριασμού είναι θεμελιώδη για την αποκάλυψη του ορίου της αναγεννητικής ικανότητας των κατώτερων σπονδυλωτών. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι οι επαναλαμβανόμενοι ακρωτηριασμοί μέχρι και 29 φορές σε μια περίοδο 11 μηνών δεν μεταβάλλουν την ικανότητα αναγέννησης (Azevedo et al., 2011). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας συμφωνούν με την ανωτέρω έρευνα δείχνοντας ότι σε ενήλικα μεταλλαγμένα ψάρια (*crh*^{-/-} και *tert*) διατηρείται η ικανότητα αναγέννησης σε επαναλαμβανόμενους ακρωτηριασμούς του ουραίου πτερυγίου. Αυτό το αποτέλεσμα εμπλουτίζει, έτσι, τα δεδομένα δείχνοντας ότι όχι μόνο τα WT αλλά και τα μεταλλαγμένα ψάρια έχουν την ικανότητα να διατηρούν την ικανότητα αναγέννησης. Αναλυτικά, τα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα ψάρια που έχουν χρησιμοποιηθεί όχι μόνο διατηρούν την αναγεννητική ικανότητά τους κατά τους επαναλαμβανόμενους ακρωτηριασμούς, αλλά φαίνεται να ανακτούν πλήρως το αναγεννητικό δυναμικό τους εμφανίζοντας ίδια επίπεδα αναγέννησης με τα WT. Μια εξήγηση

μπορεί να είναι ότι μετά τον πρώτο ακρωτηριασμό δημιουργείται μια κατάσταση μνήμης, κατά την οποία παραμένουν ενεργοποιημένα κάποια σημαντικά για την επίτευξη της διαδικασίας γονίδια ή ενεργοποιείται κάποιος εναλλακτικός μηχανισμός σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ύπαρξης όγκων σε *tert*-/- ψάρια εμφανίζεται ένας μηχανισμός εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) (Bryan et al., 1997). Με τον ίδιο τρόπο μπορούμε να υποθέσουμε ότι κατά τον δεύτερο ακρωτηριασμό ενεργοποιείται ο ALT μηχανισμός επιμηκώνοντας τα τελομερή και διατηρώντας τα επίπεδα της αναγέννησης παραπλήσια με εκείνα των WT. Στη περίπτωση των *crl* ψαριών, μετά τον πρώτο ακρωτηριασμό, είναι πιθανό, όπως έχει προαναφερθεί να γίνεται διάλυση τελικά της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων στο σημείο του τραύματος και έτσι να μπορεί να επιτευχθεί καλύτερα η διαδικασία της αναγέννησης την δεύτερη φορά. Παρόλα αυτά για την διεξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων είναι καλό να μετρηθεί το μήκος των τελομερών σε κάθε περίπτωση και να μελετηθούν παράγοντες που προσδιορίζουν την ύπαρξη φλεγμονής. Στη συνέχεια, το συγκεκριμένο φαινόμενο παρομοιάζει ένα φαινόμενο με τον όρο «preconditioning».

Το ισχαιμικό preconditioning (IPC), το οποίο αναφέρεται σε μη θανατηφόρα επεισόδια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωση (I/R) πριν από την παρατεταμένη ισχαιμία με επακόλουθη επαναιμάτωση, μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος (Murry CE et al., 1986), και το φαινόμενο αυτό αναφέρθηκε αρχικά πριν από 30 χρόνια (Hausenloy DJ et al., 2016). Η καρδιοπροστασία της IPC έχει επιβεβαιωθεί σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν μέχρι τώρα, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων (Heusch G et al., 2016). Σε ασθενείς, η IPC πριν από μια εκλεκτική επέμβαση, π.χ., το εμφύτευμα παράκαμψης της στεφανιαίας αρτηρίας (Alkhalifi AM et al., 1994) μειώνει την απελευθέρωση καρδιακών βιοδεικτών που αντανακλούν μυοκαρδιακή βλάβη (Heusch G et al., 2001; Heusch G et al., 2013). Η πλειοψηφία των πειραμάτων που ανέλυσαν την καρδιοπροστατευτική μεταγωγή σήματος της IPC έχουν πραγματοποιηθεί σε μικρά τρωκτικά (Heusch G, 1997). Έχουν ταχτοποιηθεί τρεις κύριες οδοί μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην καρδιοπροστασία της IPC: 1) το RISK μονοπάτι 2) την οδό αύξησης του παράγοντα ενεργοποίησης της επιβίωσης (SAFE) και 3) την οδό μονοξειδίου του αζώτου / πρωτεϊνικής κινάσης G (NO / PKG) (Heusch G, 1997; Oldenburg O et al., 2004). Μια ακόμη μελέτη

που υπογραμμίζει την αποτελεσματικότητα της στρατηγικής του preconditioning χρησιμοποιεί δινιτροφαινόλη (DNP) για την ενίσχυση του δυναμικού αναγέννησης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs). Αυτή η προσέγγιση του preconditioning μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική στην αποκατάσταση ή την αναγέννηση καρδιακού ιστού που έχει υποστεί βλάβη. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή καταδεικνύει ότι η προετοιμασία με DNP των MSCs πριν από τη μεταμόσχευση βελτιώνει την καρδιακή απόδοση και την επαναγγείωση αυξάνοντας την κυτταρική επιβίωση, την προσκόλληση και την εγκατάσταση των MSCs οδηγώντας σε καρδιομυογονική και ενδοθηλιακή διαφοροποίηση (Irfan Khan et al., 2016). Επίσης σε μια ακόμη μελέτη έχει δειχθεί ότι το υποξικό preconditioning ασκεί προστατευτική επίδραση σε MSC του μυελού των οστών έναντι της υποξίας και της στέρησης θρεπτικών ουσιών in vitro, που σχετίζονται με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας (Zheng Zhang et al., 2017). Σε ζωικά μοντέλα, υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες, σύντομα επεισόδια ισχαιμίας και επανέγχυσης μπορούν να προκαλέσουν έντονη καθυστέρηση στην μυοκαρδιακή νέκρωση κατά τη διάρκεια μιας επακόλουθης παρατεταμένης περιόδου ισχαιμίας. Το ισχαιμικό preconditioning μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του μεγέθους του εμφράγματος κατά περίπου 80% (Murry CE et al., 1982) και σε παρόμοια μείωση της εμφάνισης κοιλιακών ταχυαρρυθμιών (Shiki Ket al., 1987) σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένων αρουραίων, κουνελιών, χοίρων και σκύλων. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες Gi διαμεσολαβούν τα σήματα των ενεργοποιημένων υποδοχέων της αδενοσίνης A1 και των μουσκαρινικών M2 υποδοχέων για να παρεμποδίσουν την αδενυλική κυκλάση (Yamamura H et al., 1977) για να ενεργοποιήσουν τα κανάλια καλίου που εξαρτώνται από την ATP (Kirsch GE et al., 1990) και να αναστέλλουν το νάτριο (Matsuda J J et al., 1993) και τα L-τύπου κανάλια ασβεστίου (Keung CE et al., 1990; Niroomand et al., 1994). Το φαρμακολογικό preconditioning έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την επιδιόρθωση του τραύματος, όπως επεξηγείται από την αίμη και την κουρκουμίνη που επάγουν επίσης την κυτταροπροστατευτική πρωτεΐνη οξυγενάση της αίμης-1 (HO-1), καθώς το HO1 είναι ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που προστατεύουν από οξειδωτικά και φλεγμονώδη γεγονότα (Wagener F.A et al., 2003).

Σημαντική πληροφορία είναι ότι κατά τους επαναλαμβανόμενους

ακρωτηριασμούς έγινε μελέτη των επιπέδων έκφρασης του δείκτη επούλωσης τραύματος (mmp9) (Heusch G et al., 2016) και του δείκτη κυττάρων του blastema (msxb) (Bollì R et al., 2011). Αν και το επίπεδο έκφρασης mmp9 στις 8 ηρα παρουσίασε μείωση μετά από 14 ακρωτηριασμούς, διατηρήθηκε στο ίδιο επίπεδο σε επακόλουθους ακρωτηριασμούς. Τα επίπεδα msxb επίσης μειώθηκαν ελαφρώς, αν και όχι σημαντικά. Αυτά τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι, ακόμη και αν η έκφραση αυτών των δεικτών ελαττώνεται ελαφρώς με τους επαναλαμβανόμενους ακρωτηριασμούς, αυτές οι αλλαγές δεν οδηγούν σε μείωση της ικανότητας του πτερυγίου να επιτύχει επιτυχώς την επούλωση των πληγών και τον σχηματισμό του blastema. Η καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών μηχανισμών που αποτελούν τη βάση της ουσιαστικά απεριόριστης αναγεννητικής ικανότητας της αναγέννησης των ψαριών, θα είναι ενημερωτική για τις προσπάθειες βελτίωσης της επισκευής, ιδίως των οστών, στον άνθρωπο (Azevedo et al., 2011).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarabi, S.; Longaker, M.T.; Gurtner, G.C. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: New approaches to treatment. *PLoS Med.* 2007, 4, e234.
- Akimenko, M. A., Mari-Beffa, M., Becerra, J. and Geraudie, J. (2003). Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev. Dyn.* 226, 190-201.
- Akimenko, M.-A., Mar´ı-Beffa, M., Becerra, J. & G´eraudie, J. (2003). Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 226(2), 190–201.
- Alkhulaifi AM, Yellon DM, Pugsley WB. Preconditioning the human heart during aorto-coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 8: 270–275, 1994.
- Allen, J. P. and M. N. Neely (2010). "Trolling for the ideal model host: zebrafish take the bait." *Future Microbiol* **5**(4): 563-569.
- Ana Sofia Azevedo^{1,2,3}, Bartholoma ´us Grotek⁴, Anto ´nio Jacinto^{1,2}, Gilbert Weidinger^{4*}, Leonor Sau ´de^{1,2*}. (2011) The Regenerative Capacity of the Zebrafish Caudal Fin Is Not Affected by Repeated Amputations. *PLoS ONE* 6(7).
- Anchelin M., Murcia L., Alcaraz-P´erez F., Garc´ıa-Navarro E. M., Cayuela M. L. (2011). Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. *PLoS ONE* 6, e16955.
- Anchelin, M., Murcia, L., Alcaraz-P´erez, F., Garc´ıa-Navarro, E. M. and Cayuela, M. L. (2011). Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. *PLoS ONE* 6, e16955.
- Andreas Skyschally, Petra Kleinbongard, and Gerd Heusch. Integrative Cardiovascular Physiology and Pathophysiology Ischemic preconditioning in pigs: a causal role for signal transducer and

activator of transcription 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312: H478–H484, 2017.

- Arunachalam, M., M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal and R. L. Mayden (2013). "Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India." *Zebrafish* 10(1): 1-14.
- Aubert, G., Baerlocher, G. M., Vulto, I., Poon, S. S. and Lansdorp, P. M. (2012). Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet.* 8, e1002696.
- Autexier C. (2008). POT of gold: modeling dyskeratosis congenita in the mouse. *Genes Dev.* 22, 1731–1736.
- Azevedo, A.S., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G., and Saude, L. (2011). The regenerative capacity of zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS ONE* 6, e22820.
- Becerra, J., Montes, G.s., Baxiga, S.R.R. and Junqueira, L.C.U. (1983). Structure of the tail fin in teleosts. *Cell Tissue Res.* 230, 127-137.
- Bednarek, D., González-Rosa, J.M., Guzmán-Martínez, G., Gutiérrez-Gutiérrez, O., Aguado, T., Sánchez-Ferrer, C., Marques, I. J., Galardi-Castilla, M., de Diego, I., Gómez, M. J. et al. (2015). Telomerase is essential for zebrafish heart regeneration. *Cell Rep.* 12, 1691-1703.
- Beis, D. and D. Y. Stainier (2006). "In vivo cell biology: following the zebrafish trend." *Trends Cell Biol* 16(2): 105-112.
- Beis, D., T. Bartman, et al. (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* **132**(18): 4193-4204.
- Bienz, M., Clevers, H., 2003. Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus—proof beyond a reasonable doubt? *Nat. Cell Biol.* 5, 179-182.
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569–573.
- Blasco MA (2005) Mice with bad ends: mouse models for the study of

telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J* 24:1095–1103.

- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91:25–34, 1997.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, et al. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25–34.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A. and Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25–34.
- Blum, N. & Begemann, G. (2012). Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 139(1), 107–116. doi:10.1242/dev.065391
- Bolli R, Stein AB, Guo Y, Wang OL, Rokosh G, Dawn B, Molkenstein JD, Sanganalmath SK, Zhu Y, Xuan YT. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 50: 589–597, 2011.
- Bouzaffour, M., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Haas, P. & Vríz, S. (2009). Fgf and Sdf-1 pathways interact during zebrafish fin regeneration. *PLoS One*, 4(6), e5824. doi:10.1371/journal.pone.0005824
- Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9082–9086.
- Brockes, J.P. & Kumar, A. (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(8), 566–574.

- Brown, A.M., Fisher, S., and Iovine, M.K. (2009) Osteoblast maturation occurs in overlapping proximal-distal compartments during fin regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* 238, 2922-2928.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A. and Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3, 1271-1274.
- Cailhier, J.F., Sawatzky, D.A., Kipari, T., Houlberg, K., Walbaum, D., Watson, S., Lang, R. A., Clay, S., Kluth, D., Savill, J. et al. (2006). Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 540-547.
- Campbell, L.J. & Crews, C.M. (2008). Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(1), 73–79. doi:10.1007/s00018-007-7433-z
- Carlson GD, Gorden C (2002) Current developments in spinal cord injury research. *Spine J* 2:116–128.
- Carneiro, M. C., Henriques, C. M., Nabais, J., Ferreira, T., Carvalho, T. and Ferreira, M. G. (2016). Short telomeres in key tissues initiate local and systemic aging in zebrafish. *PLoS Genet.* 12, e1005798.
- Catherine Pfefferli & Anna Jazwinska, The art of fin regeneration in zebrafish (2015).
- Caubit, X., Nicolas, S. and Le Parco, Y. (1997a). Possible roles for Wnt genes in growth and axial patterning during regeneration of the tail in urodele amphibians. *Dev. Dyn.* 210, 1-10. Caubit, X., Nicolas, S., Shi, D. L. and Le Parco, Y. (1997b). Reactivation and graded axial expression pattern of Wnt-10a gene during early regeneration stages of adult tail in amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. *Dev. Dyn.* 208, 139148.
- Chablais, F. & Jazwinska, A. (2010). IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 137(6), 871–879. doi:10.1242/dev.043885

- Chan SW, Blackburn EH (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21: 553–563. Review.
- Chiang Y. J., Hemann M. T., Hathcock K. S., Tessarollo L., Feigenbaum L., Hahn W. C., Hodes R. J. (2004). Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7024–7031.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Collins K (2000) Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12:378–383.
- Collins K, Mitchell JR (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21:564–579.
- Collins K, Mitchell JR (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564–579.
- Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S (1995) Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315–2320.
- Cristi L, Stoick-Cooper^{1,2,*}, Gilbert Weidinger^{1,*}, Kimberly J. Riehle^{3,4}, Charlotte Hubbert¹, Michael B. Major¹, Nelson Fausto⁴ and Randall T. Moon¹. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479-489 (2007).
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J. D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K., Granick, M. and Aviv, A. (2013). Telomere shortening is equivalent to somatic tissues of adults. *Nat. Commun.* 4, 1597.
- Daniel Wehner, Wiebke Cizelsky, Mohankrishna Dalvov Vasudevaro, Gunes Ozhan, Crista Haase, Birgit Kagermeier-Schenk, Alexander Roder

Richard I. Dorsky Enrico Moro, Francesco Argenton, Michael Kuhl and Gilbert Weidinger, Wnt/ β -Catenin Signaling Defines Organizing Centers that Orchestrate Growth and Differentiation of the Regenerating Zebrafish Caudal Fin. *Cell Reports* 6, 467-481,2014.

- de Jong JW, de Jonge R, Marchesani A, Janssen M, Bradamante S. Controversies in preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther* 10: 767–773, 1997. doi:10.1007/BF00053035.
- De lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19:2100–2110
- De Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19:2100–2110.
- Dovi, J. V., He, L.-K. and DiPietro, L. A. (2003). Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J. Leukoc. Biol.* 73, 448-455.
- Dovi, J. V., He, L.-K. and DiPietro, L. A. (2003). Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J. Leukoc. Biol.* 73, 448-455.
- Dufourcq, P. & Vríz, S. (2006). The chemokine SDF-1 regulates blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development Genes and Evolution*, 216(10), 635–639. doi:10.1007/s00427-006-0066-7
- Dur´an, I., Mar´ı-Beffa, M., Santamar´ıa, J.A., Becerra, J. & Santos-Ruiz, L. (2011). Actinotrichia collagens and their role in fin formation. *Developmental Biology*,354(1), 160–172.
- El Ghazali I., Saqrane S., Carvalho A. P., Ouahid Y., Oudra B., Del Campo F.F. & Vasconcelos V., 2009:Compensatory growth induced in zebrafish larvae after pretexposure to a *Microcystis aeruginosa* natural bloom extract containing microcystins. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 133 – 146.
- Elmore LW, Norris MW, Sircar S, Bright AT, McChesney PA, et al. (2008) Upregulation of telomerase function during tissue regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 958–967.

- Elmore, L. W., Norris, M. W., Sircar, S., Bright, A. T., McChesney, P. A., Winn, R. N. and Holt, S. E. (2008). Upregulation of telomerase function during tissue regeneration. *Exp. Biol. Med.* 233, 958-967.
- Engeszer, R. E., G. Wang, M. J. Ryan and D. M. Parichy (2008). "Sex-specific perceptual spaces for a vertebrate basal social aggregative behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(3): 929-933.
- Evans, M.A., Smart, N., Dubé, K.N., Bollini, S., Clark, J.E., Evans, H.G., Taams, L. S., Richardson, R., Lévesque, M., Martin, et al. (2013). Thymosin β 4-sulfoxide attenuates inflammatory cell infiltration and promotes cardiac wound healing. *Nat. Commun.* 4, 2081.
- F. Niroomand, W. Ktibler Hibernating. Stunning and ischemic preconditioning of the myocardium: therapeutic implications. *Clin Investig* (1994) 72:731-736.
- Fraysse B., Mons R., Garric J., 2006: Development of a zebrafish 4day Embryo larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (2): 253-267.
- French, D. M., Kaul, R. J., D'Souza, A. L., Crowley, C. W., Bao, M., Frantz, G. D., Filvaroff, E. H. and Desnoyers, L. (2004). WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am. J. Pathol.* 165, 855-867.
- G´eraudie, J., Monnot, M.J., Brulfert, A. & Ferretti, P. (1995). Caudal fin regeneration in wild type and long-fin mutant zebrafish is affected by retinoic acid. *The International Journal of Developmental Biology*, 39(2), 373–381.
- Gellert G. & Heinrichsdorff J., 2001: Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater. *Water Resources* 35 (15): 3754 – 3757.
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R. and Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 29, 611-620.
- Geng X¹, Xu T², Niu Z², Zhou X², Zhao L³, Xie Z⁴, Xue D⁵, Zhang F⁶, Xu C⁷. Differential proteome analysis of the cell differentiation regulated by

- BCC, CRH, CXCR4, GnRH, GPCR, IL1 signaling pathways in Chinese fire-bellied newt limb regeneration. [Differentiation](#). 2014, 88(4-5):85-96.
- Goldsmith, M.I., Fisher, S., Waterman, R., and Johnson, S.L. (2003). Saltatory control of isometric growth in the zebrafish caudal fin is disrupted in *long fin* and *rapunzel* mutants. *Dev. Biol.* 259,303-317.
 - Goldsmith, M.I., Iovine, M.K., O'Reilly-Pol, T. & Johnson, S.L. (2006). A developmental transition in growth control during zebrafish caudal fin development. *Developmental Biology*, 296(2), 450–457.
 - Gonçalo Miguel Brito, The Role of Hippo Pathway in Zebrafish (*Danio rerio*) Caudal Fin Regeneration (2011).
 - Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405–413.
 - Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887–898.
 - Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331–337.
 - Grone BP and Maruska KP (2015). Divergent evolution of two corticotropin-releasing hormone (CRH) genes in teleost fishes. *Front. Neurosci.* 9:365.
 - Grotek, B., Werner, D., and Weidinger, G. (2013). Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development* 140, 1412-1423.
 - Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Van Eeden FJM, Jiang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of zebrafish, *Danio rerio*, *Development*, 123 (1996): 1-36.
 - Hajo 's F (2008) Changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity reflect neuronal states. *Neurochem Res* 33:1643–1650

- Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inzerillo J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol* 111: 70, 2016.
- Hausenloy DJ, Iliodromitis EK, Andreadou I, Papalois A, Gritsopoulos G, Anastasiou-Nana M, Kremastinos DT, Yellon DM. Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 26: 87–93, 2012.
- Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. Remote ischaemic preconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc. Res.* 2008, 79, 377–386.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107:67–77, 2001.
- Henle, E. S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y. and Linn, S. (1999). Sequence specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions as possible biological implications. *J. Biol. Chem.* 274, 962-971.
- Henriques, C. M., Carneiro, M. C., Tenente, I. M., Jacinto, A. and Ferreira, M. G. (2013). Telomerase is required for zebrafish lifespan. *PLoS Genet.* 9, e1003214.
- Herbomel, P., Thisse, B. and Thisse, C. (1999). Ontogeny and behavior of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126, 3735-3745.
- Heusch G, Rassaf T. Time to give up on cardioprotection? A critical appraisal of clinical studies on ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 119: 676–695, 2016.

- Heusch G, Skyschally A, Schulz R. The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation. *J Mol Cell Cardiol* 50: 951–963, 2011. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.016.
- Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet* 381: 166–175, 2013.
- Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 116: 674–699, 2015. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
- Heusch G. Nitroglycerin and delayed preconditioning in humans: yet another new mechanism for an old drug? *Circulation* 103: 2876–2878, 2001.
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E., 2005: Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86 (1): 6–19.
- Hirose, K., Shimoda, N. & Kikuchi, Y. (2013). Transient reduction of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine is associated with active DNA demethylation during regeneration of zebrafish fin. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*, 8(9), 899–906. doi:10.4161/epi.25653
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, et al. (1995) Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1: 249–255.
- Hiyama K, Ishioka S, Shirogami Y, Inai K, Hiyama E, et al. (1995) Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. *Oncogene* 10: 937–944.
- Hoptak-Solga, A.D., Nielsen, S., JAIN, I., Thummel, R., Hyde, D.R and Iovine, M.K. (2008). Connexin43 (GJA1) is required in the population of dividing cells during fin regeneration. *Dev. Biol.* 317, 541–548.
- http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/DBNModel.html
- <http://www.fac.org.ar/scvc/llave/pediat/diaz/diazi.htm>

- <http://www.zmsystems.co.uk>
- <https://wiki.med.harvard.edu/SysBio/Megason/CollectingEggs>
- Huang, C. J., C. T. Tu, et al. (2003). "Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish." *Dev Dyn* **228**(1): 30-40.
- Huang, C., Lawson, N.D., Weinstein, B.M. & Johnson, S.L. (2003). reg6 is required for branching morphogenesis during blood vessel regeneration in zebrafish caudal fins. *Developmental Biology*, 264(1), 263–274.
- Imokawa, Y. and Brockes, J. P. (2003). Selective activation of thrombin is a critical determinant for vertebrate lens regeneration. *Curr. Biol.* 13, 877-881. Imokawa, Y., Simon, A. and Brockes, J. P. (2004). A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 765776.
- Iovine, M.K., and Johnson, S.L.,(2000). Genetic analysis of isometric growth control mechanisms in the zebrafish caudal fin. *Genetics* 155, 1321-1329.
- Irfan Khan, Anwar Ali, Muhammad Aleem Akhter, Nadia Naeem, Maqsood Ahmed Chotani, Tuba Mustafa, Asmat Salim. Preconditioning of mesenchymal stem cells with 2,4-dinitrophenol improves cardiac function in infarcted rats. *Life Sciences*. S0024-3205(16)30476-3.
- ISO, 1996. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test, ISO 6341. ISO: Geneva.
- Jason R Goldsmith, Christian Jobin , Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology, BioMed Research International, June 2012.

- Kammann U., Biselli S., Huhnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W., 2004: Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132 (2): 279-287.
- Karalis K¹, Muglia LJ, Bae D, Hilderbrand H, Majzoub JA. CRH and the immune system. *J Neuroimmunol.* 72(2):131-6 (1997).
- Katsuyama, T. & Paro, R. (2011). Epigenetic reprogramming during tissue regeneration. *FEBS letters*, 585(11), 1617–1624. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.010
- Kawakami, A. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Development, growth & differentiation* 52, 77-87 (2010).
- Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Marti, M., Dubova, I. and Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 20, 3232-3237.
- Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Marti, M., Dubova, I. and Izpisua Belmonte, J. C. (2006). Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 20, 3232-3237.
- Ken M. Cadigan, Yan I. Liu. Wnt signaling: complexity at the surface (2006).
- Keung CE, Karliner JS (1990) Complex regulation of calcium current in cardiac cells. *J Clin Invest* 85:950-954.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011–2015.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. and Schilling T.F., 1995: Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM (1990) Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 259 :H820-826.

- Kishi S, Uchiyama J, Baughman AM, Goto T, Lin MC, et al. (2003) The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp Gerontol* 38: 777–786.
- Kishi, S., Slack, B. E., Uchiyama, J. and Zhdanova, I. V. (2009). Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates—a mini-review. *Gerontology* 55, 430-441.
- Kissa K, Murayama E, Zapata A, Cortés A, Perret E, Machu C, Herbomel P, Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization, *Blood* 2008 Feb;111(3):1147-56.
- Knopf, F. et al. Bone Regenerates via Dedifferentiation of Osteoblasts in the Zebrafish Fin. *Developmental cell* 20, 713-24 (2011).
- Knopf, F., Hammond, C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C.W., Mahatma, G., Fisher, S., Brand, M., Schulte-Merker, S., and Weidinger, G. (2011) Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev. Cell* 20, 713-724.
- Koch, S., Nava, P., Addis, C., Kim, W., Denning, T. L., Li, L., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2011). The Wnt antagonist Dkk1 regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair. *Gastroenterology* 141, 259-268. e8.
- Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Illtische, A. and Brand, M. (2012). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338, 1353-1356.
- Laforest, L., Brown, C.W., Poleo, G., G´eraudie, J., Tada, M., Ekker, M. et al. (1998). Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. *Development* (Cambridge, England), 125(21), 4175–4184.

- Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck Th., 2009: Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology h C Toxicology and Pharmacology* 149 (2): 196-209.
- Lange M., Gebauer W., Markl J. & Nagel R., 1995: Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish *Brachydanio rerio* and RTGt2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11): 2087 – 2102.
- Lawson, N. D. and S. A. Wolfe (2011). "Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish." *Dev Cell* **21**(1): 48-64.
- Lee H. W., Blasco M. A., Gottlieb G. J., Horner J. W., 2nd, Greider C. W., DePinho R. A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569–574.
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M. & Poss, K.D. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge, England)* 132, 5173-83 (2005).
- Lee, Y., Hami, D., De Val, S., Kagermeier-Schenk, B., Wills, A.A., Black, B.L., et al. (2009). Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Developmental Biology*, 331 (2), 270–280.
doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.545
- Leibovich, S. J. and Ross, R. (1975). The role of macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* 78, 71-100.
- Li, L., Yan, B., Shi, Y.-Q., Zhang, W.-Q. and Wen, Z.-L. (2012). Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 25353-25360.
- Li, L., Yan, B., Shi, Y.-Q., Zhang, W.-Q. and Wen, Z.-L. (2012). Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 25353-25360.

- Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*. 2001;98: 3087-3096.
- Liu H., Yu H., Giesy J.P., Sun Y., Wang X. 2007: Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 66 (11): 2159-2165.
- Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- LYNNE W. ELMORE, MICHELLE W. NORRIS, SOHINI SIRCAR, A. TAYLOR BRIGHT, PATRICIA A. MCCHESENEY, RICHARD N. WINN, AND SHAWN E. HOLT, Upregulation of Telomerase Function During Tissue Regeneration. *Biol Med* 233:958-967, 2008.
- Münch, J., González-Rajal, A. & de la Pompa, J.L. (2013). Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 140(7), 1402-1411. doi:10.1242/dev.087346.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9-26.
- Madalena C. Carneiro, Inês Pimenta de Castro and Miguel Godinho Ferreira*. Telomeres in aging and disease: lessons from zebrafish. *Disease Models & Mechanisms* (2016) 9, 737-748.
- Mammoto, T. & Ingber, D.E. (2010). Mechanical control of tissue and organ development. *Development (Cambridge, England)*, 137(9), 1407-1420. doi:10.1242/dev.024166.
- Martin, P. and Feng, Y. (2009). Inflammation: wound healing in zebrafish. *Nature* 459, 921-923. Mathias, J.R., Perrin, B.J., Liu, T.
- Martin, P. and Feng, Y. (2009). Inflammation: wound healing in zebrafish. *Nature* 459, 921-923.
Mirza, R., DiPietro, L.A. and Koh, T.J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am. J. Pathol.* 175, 2454-2462.

- Mathew, L.K., Sengupta, S., Franzosa, J.A., Perry, J., La Du, J., Andreasen, E.A., and Tanguay, R.L. (2009). Comparative expression profiling reveals an essential role for raldh2 in epimorphic regeneration. *J. Biol. Chem.* 284, 33642-33653.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Rhodes, J., Kanki, J. P., Look, A. T. and Huttenlocher, A. (2007). Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish *Hai1*. *J. Cell Sci.* 120, 3372-3383.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Ranheim, E. A. and Huttenlocher, A. (2009). Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1212-1217.
- Matsuda J J, Lee HC, Shibata EF (1993) Acetylcholine reversal of isoproterenol-stimulated sodium currents in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 72:517-525.
- Matthew I. Goldsmith, M. Kathryn Lovine, Thomas O'Reilly-Pol, Stephen L. Johnson (2006). A developmental transition in growth control during zebrafish caudal fin development. *Developmental Biology* 296, 450-457.
- Matzelle, M. M., Gallant, M. A., Condon, K. W., Walsh, N. C., Manning, C. A., Stein, G. S., Lian, J. B., Burr, D. B. and Gravallesse, E. M. (2012). Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway. *Arthritis. Reum.* 64, 1540-1550.
- Mauviel, a, Nallet-Staub, F. & Varelas, X. Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* 1-14 (2011).
- Mayer F.L., Ellersieck M.R., Krause G.F., Sun K., Lee G., Buckler D.R., 2001. Time – concentration – effect models in predicting chronic toxicity from acute toxicity data. In: Crane M., Newman M.C., Chapman P.F., Fenlon J. (eds), *Risk assessment with time to event models*, Lewis Publishers, CRC Press LLC, Florida, U.S.A. pp. 39 † 67.
- McChesney PA, Elmore LW, Holt SE (2005) Vertebrate marine species as model systems for studying telomeres and telomerase. *Zebrafish* 1: 349–355.

- McClure, (1999), Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae). *J Morphol.* 241(1):83-105.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN et al (1997) hEST2, the putative human telomere-se catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785–795.
- Mitchell J. R., Wood E., Collins K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551–555.
- Monique Anchin^{1,2}, Francinca Alcaraz-Perez ^{1,2}, Carlos M.Martinez ^{1,2}, Manuel Bernabe-Garcia ^{1,2},Victoriano Mulero ^{3,2} and Maria Gayuela ^{1,2} (2013). Premature aging in telomerase-deficient zebrafish. *Disease Models and Mechanisms* 6,1101-1112.
- Morgan, T.H. (1901). *Regeneration*. Macmillan, London.
- Moro, E., G. Ozhan-Kizil, et al. (2012). "In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains." *Dev Biol* **366**(2): 327-340.
- Morrison, J. I., Loof, S., He, P. and Simon, A. (2006). Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J. Cell Biol.* 172, 433-440.
- Mosiman, C., Hausmann, G., Basler, K., 2009. Beta-catenin hits chromatin:regulation of Wnt target gene activation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*10,276-286.
- Moyle Peter B, Cech Joseph J. Jr, *Fishes: An introduction to ichthyology*. Εκδόσεις Prentice Hall, ISBN 0-13-372996-6,pg. 51-52, 255-257.
- Muhammad Nasir Khan Khattak, Michael Buchfelder, Andrea Kleindienst, Christof Schofl and Natalia Kremenevskaja. CRH and SRIF Have Opposite Effects on the Wnt/ β -Catenin Signalling Pathway Through PKA/GSK-3 β in Corticotroph Pituitary Cells. *Cancer Investigation*, 28:797–805 (2010).

- Murayama E, Kissa K, Zapata A, Mordelet E, Briolat V, Lin HF, Handin RI, Herbomel P, Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development, *Immunity* 2006 Dec;25(6):963-75
- Murray,P.J.andWynn,T.A.(2011).Obstaclesandopportunitiesforunderstanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 89, 557-563.
- Murry CE Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124–1136, 1986
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1982) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 66:1150-1153.
- Nabrit, S.M. (1929). The role of the fin rays in the regeneration in the tail fins of fishes (in *Fundulus* and Goldfish). *Biol. Bull.* 56, 235–266.
- Naghdi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Arabkheradmand J (2009) Induction of bone marrow stromal cells into cholinergiclike cells by nerve growth factor. *Iran Biomed J* 13:117–123.
- Nechiporuk, A. & Keating, M.T. (2002). A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 129(11), 2607–2617.
- Nechiporuk, A., and Keating M.T., (2002). A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development* 129, 2607-2617.
- Newman, A. C. and Hughes, C. C. W. (2012). Macrophages and angiogenesis: a role for Wnt signaling. *Vasc. Cell* 4, 13.
- Niels A. J. Cremers 1,2,4, Kimberley E. Wever 3,5, Ronald J. Wong 6, René E. M. van Rheden 1,4, Eline A. Vermeij 2,4, Gooitzen M. van Dam 7, Carine E. Carels 1,4,8,9, Ditte M. S. Lundvig 1,4 and Frank A. D. T. G. Wagener 1,4,* .Effects of Remote Ischemic Preconditioning on Heme Oxygenase-1 Expression and Cutaneous Wound Repair. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 438.

- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T. and Mitchison, T. J. (2009). A tissue scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996-999.
- Novoa, B. and Figueras, A. (2012). Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Adv.Exp.Med.Biol.*946, 253-275.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2006. Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for an new guideline, Fish embryo toxicity (FET) test, p. 11.
- Oikawa,S.,Tada-Oikawa,S.andKawanishi,S.(2001).Site-specificDNADamage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 40, 4763-4768.
- Okere CO, Waterhouse BD (2004) Capsaicin increases GFAP and glutamine synthetase immunoreactivity in rat arcuate nucleus and median eminence. *NeuroReport* 15:255–258.
- Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H468–H476, 2004.
- Olga Rassouli¹, George Liapakis², Iakovos Lazaridis², George Sakellaris³, Kostas Gkountelias², Achille Gravanis², Andrew N. Margioris¹, Katia P. Karalis^{4,5,}, Maria Venihaki¹. A Novel Role of Peripheral Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) on Dermal Fibroblasts (July 2011).
- Parichy DM, (2006), Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity(Edinb)* 97(3):200-10.
- Pfefferli, C., M"uller, F., Ja'zwi'nska, A. & Wicky, C. (2014). Specific NuRD components are required for fin regeneration in zebrafish. *BMC biology*, 12(30), 1–17. doi:10.1186/1741-7007-12-30
- Polesskaya, A., Seale, P. and Rudnicki, M. A. (2003). Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113, 841-852.

- Poss, K.D. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Seminars in cell & developmental biology* 18, 36-45 (2007).
- Poss, K.D., Keating, M.T. & Nechiporuk, A. Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 226, 202-10 (2003).
- Quint, E., Smith, A., Avaron, F., Laforest, L., Miles, J., Gaffield, W. et al. (2002). Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and *bmp2b* or exposure to cyclopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8713–8718. doi:10.1073/pnas.122571799
- Redd, M. J., Kelly, G., Dunn, G., Way, M. and Martin, P. (2006). Imaging macrophage chemotaxis in vivo: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 415-422.
- Ren, S., Johnson, B.G., Kida, Y., Ip, C., Davidson, K.C., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Lang, R. A., Hadjantonakis, A.-K., Moon, R. T. et al. (2013). LRP6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1440-1445.
- Renner R., 2008: A tale of two fish. *Environmental Science & Technology* 42 (18): 6784 – 6785.
- Renshaw, S. A. and Trede, N. S. (2012). A Model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis. Mod. Mech.* 5, 38-47.
- Renshaw, S.A., Loynes, C.A., Trushell, D.M.I., Elworthy, S., Ingham, P.W. and Whyte, M. K. B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108, 3976-3978.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Rolland-Lagan, A.-G., Paquette, M., Tweedle, V. & Akimenko, M.-A. (2012). Morphogen-based simulation model of ray growth and joint patterning during fin development and regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 139(6), 1188–1197.

- S. O. Reber, F. Obermeier, H. R. Straub, W. Falk, and I. D. Neumann. Chronic Intermittent Psychosocial Stress (Social Defeat/ Overcrowding) in Mice Increases the Severity of an Acute DSS-Induced Colitis and Impairs Regeneration *Endocrinology*. 147(10):4968–4976 (2015).
- Sadik, C. D., Kim, N. D. and Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32, 452-460.
- Sadik, C. D., Kim, N. D. and Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32, 452-460.
- Santos-Ruiz, L., Santamaría, J.A., Ruiz-Sánchez, J. & Becerra, J. (2002). Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 223(2), 262–272.
- Satu Kujawski, Weilin Lin, Florian Kitte, Mandy Bormel, Stephen Fuchs, Guruchandar Arulmozhivaman, Sebastian Vogt, Denise Theil, Yixin Zhang, and Christopher L. Antos. (2014). Calcineurin Regulates Coordinated Outgrowth of Zebrafish Regenerating Fins. *Developmental Cell* 28,573-587.
- Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D., 2008: The zebrafish embryo model in environmental risk assessment + Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15 (5): 394–404.
- Schwartz, M.A., and Assoian, R.K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways, *J. Cell Sci*, 114, 2553-2560.
- Serhan, C. N. and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191-1197.
- Shiki K, Hearse DJ (1987) Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* 253 :H1470-1476.
- Sidorov, I., Kimura, M., Yashin, A. and Aviv, A. (2009). Leukocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth. *Exp. Hematol.* 37, 514-524.

- Smith, A., Avaron, F., Guay, D., Padhi, B.K. & Akimenko, M.A. (2006). Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function. *Developmental Biology*, 299(2), 438–454. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.016.
- Sodhi, D., Micsenyi, A., Bowen, W. C., Monga, D. K., Talavera, J. C. and Monga, S. P. (2005). Morpholino oligonucleotide-triggered beta-catenin knockdown compromises normal liver regeneration. *J. Hepatol.* 43, 132-141.
- Sousa, S., Afonso, N., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Simões, M., Leon, J., et al. (2011). Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 138(18), 3897–3905.
- Souza Filho, M.V.; Loiola, R.T.; Rocha, E.L.; Simao, A.F.; Gomes, A.S.; Souza, M.H.; Ribeiro, R.A. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009, 42, 921–929.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (February 2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews* 83 (1): 13–34.
- Spence, R., G. Gerlach, et al. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**(1): 13-34.
- Stadel, R., Basler, K., 2005. Dissecting nuclear Wingless signaling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech. Dev.* 122, 1171-1182.
- Stanger, B.Z. Organ size determination and the limits of regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7, 318-24 (2008).
- Steen, T.P. (1970). Origin and differentiative capacities of cells in the blastema of the regenerating salamander limb. *American Zoologist*, 10(2), 119–132.

- Stephen A. Renshaw, Catherine A. Loynes, Daniel M.I. Trushell, Stone Elworthy, Philip W. Ingham, and Moira K.B. Whyte. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. Stephen A. Renshaw, Catherine A. Loynes, Daniel M.I. Trushell, Stone Elworthy, Philip W. Ingham, and Moira K.B. Whyte. *Blood* (2006)108: 3976-3978.
- Stewart, S. & Stankunas, K. (2012). Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Developmental Biology*, 365(2), 339–349. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.031
- 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(3), 482–498. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.010
- Stewart, S., Tsun, Z.-Y. & Izpisua Belmonte, J.C. (2012). A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 19889–19894. doi:10.1073/pnas.0904132106
- Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., and Weidinger, G. (2007a). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* 21, 1292-1315.
- Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T. and Weidinger, G. (2007a). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* 21, 1292-1315. Stoick-Cooper, C. L., Weidinger, G., Riehle, K. J., Hubbert, C., Major, M. B., Fausto, N. and Moon, R. T. (2007b). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479-489.
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N. et al. (2007). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* (Cambridge, England), 134(3), 479–489. doi:10.1242/dev.001123
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., Moon, R.T., 2007. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479-489.

- Strahle, U. and C. Grabher (2010). "The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects." *Dis Model Mech* **3**(11-12): 689-692.
- Tanaka, E. M., Drechsel, D. N. and Brockes, J. P. (1999). Thrombin regulates Sphase re-entry by cultured newt myotubes. *Curr. Biol.* **9**, 792-799.
- Timothy A. Petrie^{1,2,*}, Nicholas S. Strand^{1,2}, Chao Tsung-Yang³, Jeremy S. Rabinowitz^{1,2} and Randall T. Moon^{1,2}. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* (2014) **141**, 2581-2591.
- Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004;**20**:367-379.
- Tu, S. & Johnson, S.L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Developmental Cell*, **20**(5), 725–732.
- Tziotzios, C.; Profyris, C.; Sterling, J. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012, **66**, 13–24.
- Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F. and Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* **327**, 466-469.
- Wagener, F.A.; Volk, H.D.; Willis, D.; Abraham, N.G.; Soares, M.P.; Adema, G.J.; Figdor, C.G. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2003, **55**, 551–571.
- Walters, K. B., Dodd, M. E., Mathias, J. R., Gallagher, A. J., Bennin, D. A., Rhodes, J., Kanki, J. P., Look, A. T., Grinblat, Y. and Huttenlocher, A. (2009). Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24. *Dev. Dyn.* **238**, 86-99.
- Wehner, D., Cizelsky, W., Vasudevaro, M. D., Ozhan, G., Haase, C.,

Kagermeier-Schenk, B., et al. (2014). Wnt/ β -catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin. *Cell Reports*, 6(3), 467–481.

doi:10.1016/j.celrep.2013.12. 03

- Whitehead, G. G., Makino, S., Lien, C. L. and Keating, M. T. (2005). fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration. *Science* 310, 1957-1960.
- Whyte, J.L., Smith, A.A., and Helms, J.A. (2012). Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008078.
- Whyte, J.L., Smith, A.A. and Helms, J.A. (2012). Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008078.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18: 173–179.
- www.zfin.org
- Xie, M., Mosig, A., Qi, X., Li, Y., Stadler, P. F. and Chen, J. J. (2008). Structure and function of the smallest vertebrate telomerase RNA from teleost fish. *J. Biol. Chem.* 283, 2049-2059.
- Xu Tao, Yang Ming-kun, Sheng Wei-bin, Guo Hai-long, Kan Rui, Tu Lai-yong. Role of Telomerase Reverse Transcriptase in Glial Scar Formation After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res* (2013) 38:1914–1920.
- Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y., Liu, J.-L., Ool, G.T., Setser, J., Frystyk, J., Bolschalt, Y.R., and LeRoith, D. (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J. Clin. Invest.* 110, 771-781.
- Yamamura H, Lad PM, Rodbell M (1977) GTP stimulates and inhibits adenylate cyclase in fat cell membranes through distinct regulatory processes. *J Biol Chem* 249:7857-7866.
- Yang MK, Sheng WB (2011) The role of astrocytes in spinal cord injury repairment. *Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi* 21:947–951.
- Yoo, S.K. and Huttenlocher, A. (2011). Spatiotemporal photolabeling of neutr

- ophil trafficking during inflammation in live zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* 89, 661-667.
- Yoo, S.K. and Huttenlocher, A. (2011). Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish. *J. Leukoc. Biol.* 89, 661-667.
 - Zebrafish in the World: A Review of Natural History and New Notes from the Field; *Zebrafish*. 2007; 4: 1.
 - Zhang RG, Zhao JJ, Yang LQ, Yang SM, Wang RQ, Chen WS, Peng GY, Fang DC (2010) RNA interference-mediated hTERT inhibition enhances TRAIL-induced apoptosis in resistant hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 23:1013–1019
 - Zhang, J., Wagh, P., Guay, D., Sanchez-Pulido, L., Padhi, B.K., Korzh, V., et al. (2010). Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, 466(7303), 234–237. doi:10.1038/nature09137.
 - Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K.-L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biology* 13, 877-883 (2011).
 - Zheng Zhang¹, Chao Yang², Mingzhi Shen³, Ming Yang^{5,6}, Zhitao Jin¹, Liping Ding¹, Wei Jiang¹, Junke Yang¹, Haixu Chen⁷, Feng Cao^{4*} and Taohong Hu^{1*}. Autophagy mediates the beneficial effect of hypoxic preconditioning on bone marrow mesenchymal stem cells for the therapy of myocardial infarction. *Stem Cell Research & Therapy* (2017) 8:89.
 - Zhong, N., Gersch, R. P. and Hadjiargyrou, M. (2006). Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 39, 5-16.
 - Zhou JJ, Wu GC, Hu R et al (2007) Distribution study for glial scar after experimental spinal cord injury in rats. *Zhonghua Shenjing Waike Zazhi* 23:347–350.