

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nency Babić

Optimizacija metoda detekcije proteina F-aktina u zebrici, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Diplomski rad

Zagreb, 2021. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod voditeljstvom dr.sc. Deana Karaice i suvoditeljstvom doc.dr.sc. Sofiom Anom Blažević i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru dr.sc. Deanu Karaici na pruženoj prilici za izradu ovog rada, velikoj pomoći prilikom provođenja istraživanja, pisanja rada i interpretacije rezultata. Hvala vam na velikoj požrtvovnosti, susretljivosti, izdvojenom vremenu i neizmjernoj strpljivosti.

Također veliko hvala članovima Jedinice za molekulsku toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i članovima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković na gostoprimstvu i ugodnoj radnoj atmosferi.

Željela bih se zahvaliti i doc.dr.sc. Sofii Ani Blažević na savjetima i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala svim kolegama, a posebice kolegici Žani Barun koja je proživljavala sa mnom sve moje uspone i padove pa tako i ispite.

Zahvaljujem svim divnim ljudima koji su bili uz mene na bezuvjetnoj podršci, pomoći, razumijevanju i vjeri u mene tijekom studiranja. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

I na kraju, od srca hvala cijeloj mojoj obitelji, najviše roditeljima koji su mi svojim odricanjima omogućili studiranje, pružili mi neizmjernu ljubav i podršku u svakom trenutku. Mojoj najdražoj seki veliko hvala što je uvijek uz mene i gura me u nove izazove kad ja za to nemam hrabrosti. Sve što sam danas i u budućnosti dugujem njima.

Ovaj rad posvećujem svojoj seki, mami i tati.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Optimizacija metoda detekcije proteina F-aktina u zebrici, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Nency Babić

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu Horvatovac 102a,
10000 Zagreb, Hrvatska

Riba zebrica, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) je u proteklom desetljeću postala važan modelni organizam u biomedicinskim istraživanjima. Zbog tehničkih izazova u pripremi histoloških kriopreparata, većina dosadašnjih istraživanja lokalizacije/ekspresije proteina u zebrici je koristila parafinske i *whole-mount* preparate. Cilj ovog istraživanja bio je u embrijima/ličinkama ribe zebrice starosti 1.-5. dana poslije oplodnje (broj jedinki/skupini=20): 1) odrediti ključne čimbenike u pripremi tkiva zebrica za izradu kriopreparata očuvane strukture, 2) odrediti optimalni protokol za utvrđivanje lokalizacije/ekspresije fiziološki važnog unutarstaničnog proteina F-aktina upotrebom fluorescentno obojenog faloidina, 3) istražiti starosne razlike u ekspresiji F-aktina u mišićima ribe zebrice, i 4) istražiti upotrebljivost optimiziranog protokola za potrebe imunofluorescencijske analize membranskih proteina zebrice poput Na^+/K^+ -ATPaze. Rezultati su pokazali najbolju kvalitetu kriopreparata debljine 8 μm rezanih pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ nakon inkubacije uzoraka 1 h u 4 % paraformaldehidu (PFA) i smjesi 2,5 % želatine/25 % saharoze. Fluorescencijskom analizom mikroskopskih slika mišića glave i trupa jedinki zebrice utvrđeno je da inkubacija uzoraka 1 h u 4 % PFA omogućuje optimalno vezanje faloidina za protein F-aktin. Daljnjim (imuno)fluorescencijskim analizama utvrđena je starosno-ovisna ekspresija F-aktina u mišićima trupa zebrice te mogućnost upotrebe istog protokola za određivanje lokalizacije/ekspresije membranskog proteina zebrice Na^+/K^+ -ATPaze. Stoga, ovaj optimizirani imuno/histokemijski protokol za pripremu/obradu kriopreparata predstavlja podlogu za istraživanja lokalizacije/ekspresije različitih (ne)membranskih proteina zebrice.

(92 stranice, 46 slika, 208 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, PMF – Biološki odsjek, Marulićev trg 20, Zagreb

Ključne riječi: kriopreparati, (imuno)fluorescencijska analiza, aktin, natrij-kalij ATP-aza, zebrica

Voditelj: dr.sc. Dean Karaica, znanstveni suradnik

Suvoditelj: doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji: doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević,

prof. dr. sc. Nada Oršolić,

dr. sc. Julia Erhardt

Rad prihvaćen: 24.06.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Optimization of the F-actin protein detection methods in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Nency Babić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), became an important model in studying various biomedical issues in the last decade. Technical challenges in the preparation of histological cryosections, directed majority of zebrafish protein localization/expression studies to utilize paraffin-embedded tissue sections or whole-mount preparations. In this study we used zebrafish embryo/larvae (1-5 days after fertilization; number of individuals/group=20) to: 1) determine key factors for preparation of high-quality zebrafish tissue cryosections, 2) optimize the protocol for localization/expression of physiologically important F-actin protein by utilizing fluorescently-labelled phalloidin, 3) investigate age differences in the expression of F-actin in zebrafish, and 4) determine the use of the optimized protocol for immunofluorescence analysis of membrane proteins like Na⁺/K⁺-ATPase. The results revealed that the highest quality of 8µm zebrafish cryosections cut at -20 °C was achieved after 1 h fixation in 4 % paraformaldehyde (PFA) and incubation in 2,5 % gelatine/25 % succrose-mixture. Fluorescence analysis of zebrafish skeletal muscles revealed that 1 h-fixation of samples in 4 % PFA enables optimal binding of phalloidin to F-actin. Further (immuno)fluorescence analyses showed age-dependent expression of F-actin in the zebrafish somitic muscles and usability of the optimized protocol for localization/expression of Na⁺/K⁺-ATPase membrane protein. Thus, this optimized immuno/histochemical protocol provides the basis for bioimaging studies of different (non)membrane zebrafish proteins.

(92 pages, 46 figures, 208 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science – Department of Biology, Marulićev trg 20, Zagreb

Key words: cryosections, (immuno)fluorescence analysis, actin, sodium-potassium ATPase, zebrafish

Supervisor: dr.sc. Dean Karaica, research associate

Cosupervisor: doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers: doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević,

prof. dr. sc. Nada Oršolić,

dr. sc. Julia Erhardt

Thesis accepted: 24.06.2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Zebrica kao pokusni model u biomedicinskim istraživanjima.....	2
1.2. Prednosti i nedostaci životinjskog modela ribe zebrice	4
2. Razvojni stadiji ribe zebrice	5
3. Anatomija i histologija ribe zebrice	6
3.1. Organi i tkiva.....	6
3.1.1. Mozak	6
3.1.2. Oko.....	8
3.1.3. Srce i krvožilni sustav	10
3.1.4. Škrge	11
3.1.5. Probavni sustav	12
3.1.6. Plivaći mjehur	13
3.1.7. Bubrež.....	14
3.1.8. Jetra	15
3.1.9. Gušterača.....	16
3.1.10. Spolni organi	16
4. Protokoli za pripremu histoloških preparata ribe zebrice.....	18
4.1. Parafinski preparati	18
4.2. Kriopreparati	20
4.3. Cjelokupni ili <i>whole-mount</i> preparati.....	21
5. Istraživanja lokalizacije i ekspresije proteina u ribi zebrici	22
5.1. Lokalizacija i ekspresija aktina u ribi zebrici.....	22
5.2. Istraživanje procesa razvoja i starenja u ribi zebrici	24
5.3. Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u ribi zebrici	26
6. Cilj istraživanja	30
7. Materijal i metode	32
7.1. Materijal	32

7.1.1. Pokusne životinje.....	32
7.1.2. Puferi, otopine i kemikalije.....	32
7.1.3. Laboratorijska oprema i potrošni materijal.....	34
7.1.4. Računalni programi.....	35
7.2. Metode.....	36
7.2.1. Uzgoj i uzorkovanje pokusnih životinja	36
7.2.2. Izrada kriopreparata embrija i ličinki ribe zebrice	38
7.2.3. Izrada kriopreparata odrasle jedinke ribe zebrice	41
7.2.4. Anatomsko-histološka analiza kriopreparata ribe zebrice	42
7.2.5. Histokemijska analiza	43
7.2.6. Imunofluorescencijska analiza.....	43
7.2.7. Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika.....	44
7.2.8. Prikaz i statistička obrada rezultata.....	46
8. Rezultati	47
8.1. Određivanje optimalnih uvjeta za izradu kriopreparata embrija i ličinki ribe zebrice.....	47
8.1.1. Optimalno vrijeme fiksiranja tkiva	47
8.1.2. Optimalna smjesa želatine i saharoze za inkubaciju tkiva.....	50
8.1.3. Optimalna temperatura za rezanje tkiva zebrice	53
8.1.5. Optimalna debljina rezanja tkiva zebrice.....	54
8.1.6. Pohrana kriopreparata	56
8.2. Optimizacija uvjeta pripreme uzoraka embrija i ličinki ribe zebrice za detekciju proteina F-aktina	57
8.2.1. Učinak različitog vremena fiksacije uzoraka	57
8.2.2. Učinak inkubacije uzoraka u različitim otopinama želatine i saharoze	62
8.2.3. Učinak detergenata, alkohola ksilola i albumina goveđeg seruma	64
8.3. Lokalizacija F-aktina u ribi zebrici upotrebom fluorescentno obilježenog faloidina	64
8.4. Starosne razlike u ekspresiji F-aktina u mišićima ribe zebrice	66
8.5. Upotreba modificiranog protokola za obradu uzoraka odraslih jedinki ribe zebrice u svrhu analize proteina F-aktina	67
8.6. Upotreba protokola za obradu uzoraka tkiva zebrice u svrhu imunofluorescencijske analize membranskih proteina.....	68

9. Rasprava	74
10. Zaključak.....	79
11. Literatura	80
12. Životopis.....	90

1. UVOD

Zebrica (*Danio rerio*, F. Hamilton, 1822) je mala bentopelagična ciprinidna tropska slatkovodna riba prvi put opisana u delti rijeke Ganges (Braunbeck i Lammer 2006; Spence i sur. 2007). Često se pronalazi blizu rižinih polja kao što i samo ime *Danio* odnosno “*dhani*” na bengalskom jeziku znači „od rižinih polja” (Spence i sur. 2008). Prirodno obitava u područjima oko rijeka Ganges i Brahmaputra u sjevernoj Indiji, sjevernom Pakistanu, Nepal u sjevernom Mijanmaru u jugoistočnoj Aziji (Carpio i Estrada 2006; Spence i sur. 2007, 2008). Prema IUCN (engl. *The International Union for Conservation of Nature*) crvenoj listi ribe zebrice nisu ugrožena vrsta (<https://www.iucnredlist.org/>). Prosječni životni vijek zebrice je 5 godina, postižu juvenilnu fazu u roku od nekoliko tjedana i spolnu zrelost u roku 3-4 mjeseca nakon oplodnje (Braunbeck i Lammer 2006). Zebrica je model kralježnjaka čije odrasle jedinke narastu do prosječne duljine od 3 do 5 cm te je prepoznatljiva po 4 horizontalne tamno sive ili sivo plave pruge koje se protežu od operkuluma do repne peraje (Braunbeck i Lammer 2006). Razlika između spolova (spolni dimorfizam) uočava se u boji i veličini. Ženke su veće te imaju napuhnute trbuhe zbog velikog broja jaja koje nose, za razliku od mužjaka koji su manji i tanjeg tijela te imaju narančasto-crveni odsjaj u srebrenim prugama duž tijela (Slika 1) (Braunbeck i Lammer 2006). Razmnožavanje im ovisi o svjetlosnim ciklusima i cirkadijanim ritmovima pri temperaturi od 26 ± 1 °C (Kolb i sur. 2018). Glavne prepoznatljive komponente prehrane riba zebrica su zooplankton, račići, kukci, fitoplankton, nitaste alge i vaskularni biljni materijal (Spence i sur. 2007). Zebrice se često koriste kao akvarijske ribice, ali sve više i u različitim znanstvenim istraživanjima (Spence i sur. 2007, 2008).



Slika 1. Slika prikazuje dvije ribe zebrice (*Danio rerio*, F. Hamilton, 1822). Gornja jedinka je ženka i može se vrlo lako razlikovati od mužjaka po povećanom trbuhu i nedostatku crvenog odsjaja duž srebrnih pruga na tijelu. Preuzeto i prilagođeno iz Braunbeck i Lammer 2006.

1.1. Zebrica kao pokusni model u biomedicinskim istraživanjima

Zebrica se u istraživanjima počela koristiti još u šezdesetim godinama 20. stoljeća kao alternativni i jednostavniji životinjski model od modela miša koji je tada imao široku upotrebu. U početku su se koristile za proučavanje živčanog sustava, a nakon osamdesetih godina prošlog stoljeća razvitkom različitih genetičkih metoda došlo je do povećanja broja istraživanja na zebricama u različitim biološkim disciplinama (Hill i sur. 2005; Ge 2018; Choi i sur. 2021). Danas je riba zebrica postala jedna od najvažnijih modelnih organizama u biomedicinskim istraživanjima (Hill i sur. 2005; Busse i sur. 2020; Shen i Zuo 2020). Genom joj je u potpunosti sekvenciran prije više od desetljeća te dijeli 70 % sličnosti sa ljudskim genomom, od čega je 82 % gena poznati kao uzročnici ljudskih bolesti (Howe i sur. 2013). Visoka genska homologija omogućava transgena istraživanja sa ljudskim genima i *in vivo* spoznaje o regulaciji i funkciji gena te omogućava komparativna istraživanja razvojnih procesa, staničnih signalnih puteva, stanične strukture, anatomije i fiziologije sa ostalim vrstama kralješnjaka (Dooley i Zon 2000; Hill i sur. 2005; Howe i sur. 2013; Bambino i Chu 2017; Tavakoli i sur. 2017). Primjena životinjskog modela ribe zebrice danas je zaista opsežna te se koristi kao alat za otkrivanje lijekova, u terapijama tumora, kao model za epilepsiju i ortopedska istraživanja, kao model u razvojnoj biologiji i istraživanjima reproduktivnog, kardiovaskularnog i živčanog sustava, biologiji ponašanja, neuroznanosti, farmakologiji, genetici i toksikologiji (Hill i sur. 2005; Santoriello i Zon 2012; Poon i Brand 2013; MacRae i Peterson 2015; Cho i sur. 2017; Saleem i Kannan 2018; Shen i Zuo 2020; Busse i sur. 2020; Fazio i sur. 2020).

U toksikološkim istraživanjima sve se više koristi kao model za istraživanje staničnih i molekularnih mehanizama putem kojih okolišni toksikanti uzrokuju poremećaje fizioloških razvojnih procesa (Hill i sur. 2005; Chakraborty i sur. 2016; Haque i Ward 2018; Pereira i sur. 2019; Shen i Zuo 2020). Detaljno opisane morfološke, biokemijske i fiziološke karakteristike zebrice u svim njezinim razvojnim stadijima čine ovu vrstu idealnim modelom za toksikološka istraživanja čiji je cilj utvrditi štetne učinke kemijske izloženosti (Hill i sur. 2005; Shen i Zuo 2020). Zbog male veličine ličinki i odraslih jedinki ribe zebrice, potrebna je relativno manja količina otopine kojom se životinje izlažu prilikom toksikoloških ispitivanja što pridonosi i smanjenju troškova takvih istraživanja (Hill i sur. 2005; Chakraborty i sur. 2016; Haque i Ward 2018; Pereira i sur. 2019). Podaci dobiveni laboratorijskim ispitivanjem glodavaca relativno su pouzdani za translaciju toksičnih učinaka na ljude, ali su skupi, dugotrajni i imaju zakonska ograničenja (Hill i

sur. 2005; Pereira i sur. 2019). Baš kao što postoji transplacentarni prijenos kemikalije od majčinog tijela do embrija i fetusa u sisavca, kemikalije se prenose iz organizma ženke u jaja riba, vodozemaca i ptica prije samog polaganja jaja (Jacobson i sur. 1984). Sama jaja se u tom slučaju mogu koristiti kao izvor izloženosti kemikalijama za proučavanje učinka istih na embrionalni razvoj organizma (Jacobson i sur. 1984; Hill i sur. 2005). Primjerice, test embriocitotoksičnosti ribe zebrice (engl. *Zebrafish embryotoxicity test (ZET)*) je standardizirani test toksičnosti koji se provodi na embrijima zebrica starosti nekoliko dana nakon oplodnje. Test toksičnosti embrija zebrica temelji se na 48 h izloženosti novooplođenih jajašaca u statičnom ili polustatičnom sustavu. Mjerenje toksikoloških krajnjih točki obavlja se nakon 24 i 48 h te se koristi za izračun parametra akutne toksičnosti LC_{50} (engl. *Lethal Concentration₅₀ (mg/L)*) što označava koncentraciju pri kojoj smrtno strada 50 % izloženih embrija. Kao toksikološke krajnje točke uzimaju se: koagulacija jajašaca i zametaka, neuspjeh u razvoju somita, nedostatak otkucaja srca, kao i neodvojenost repa od žumanjka (Braunbeck i Lammer 2006; Pereira i sur. 2019). Navedene prednosti ovog životinjskog modela čine ga idealnim za procjenu toksičnosti otpadnih voda, raznih okolišnih uzoraka i cijelog niza pojedinačnih kemikalija (Braunbeck i Lammer 2006; Lahnsteiner 2008).

Kao kralježnjak, zebrica ima velik značaj u istraživanju ljudskih neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerera i drugih tauopatija (Newman i sur. 2014; Saleem i Kannan 2018). Predstavlja obećavajući model u istraživanju regeneracije živčanog tkiva jer u lezijama u mozgu zebrice ili presjeku leđne moždine dolazi do neuroregeneracije koja uspješno vraća motornu funkciju (Ceci i sur. 2019). Također, mrežnica oka zebrice pruža idealan sustav za proučavanje regeneracije mrežnice oka u čovjeka. Tako su primjerice istraživanja staničnih mehanizama koji uzrokuju regeneraciju mrežnice otkrila programiranu ekspresiju gena i signalne putove koji su važni za ovaj proces (Lahne i Hyde 2016). Uz razvoj CRISPR / Cas9 tehnologije koja predstavlja vrlo učinkovitu metodu ciljane modifikacije gena u ribama zebricama te metodologije sekvenciranja sljedeće generacije, modeliranje bolesti kod zebrica ubrzava razumijevanje molekularnih mehanizama genetskih bolesti čovjeka (Tavakoli i sur. 2017; Choi i sur. 2021). Stoga, zbog postrožavanja etičkih normi za upotrebu glodavaca i viših životinja u znanstvenim istraživanjima i napretka tehnologija za rad sa zebricama, predvidljivo je da će ovaj životinjski model imati sve važniju ulogu u razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih rješenja (Hill i sur. 2005; Chakraborty i sur. 2016; Haque i Ward 2018; Fazio i sur. 2020 Choi i sur. 2021).

1.2. Prednosti i nedostaci životinjskog modela ribe zebrice

Riba zebrica je relativno novi modelni organizam kralježnjaka. Prednost zebrice kao laboratorijske životinje jest jednostavnost (mala životinja) i niski troškovi uzgoja te upotreba manje količine toksičnih spojeva, eksperimentalnih lijekova i reagensa za bojanje zbog male veličine jedinke (Carpio i Estrada 2006; Strähle i sur. 2012; Haque i Ward 2018; Pereira i sur. 2019). Također, zebrica ima potpuno sekvenciran genom i pripadajuću veliku bazu podataka koja ukazuje na visoku očuvanost ključnih razvojnih gena homologih s ljudskim genima (Fazio i sur. 2020). Ovaj životinjski model ima brze izmjene generacija, brz embrionalni razvoj i sazrijevanje što omogućava kratke eksperimente, manipulaciju mikroinjekcijom i eksperimente transplatnacije stanica već kod embrionalnog stadija (Carpio i Estrada 2006; Strähle i sur. 2012; Haque i Ward 2018). Ukoliko se zebrice mrijeste u laboratorijskim uvjetima mladi su dostupni tijekom cijele godine i istraživanje može trajati kontinuirano (Ali i sur. 2011). U odnosu na druge životinjske modele, optička transparentnost cijelog organizma zebrice u stadiju embrija i ličinki omogućuje snimanje embrionalnog i ličinačkog razvoja, identifikaciju fenotipskih svojstava tijekom praćenja mutagenih promjena (različitih malformacija u razvoju) i određivanje krajnjih točaka toksičnosti tijekom toksikoloških testiranja (Ali i sur. 2011; Chakraborty i sur. 2016; Haque i Ward 2018). Optička prozirnost u ranim fazama razvoja i produkcija velikog broja jaja rezultira mogućnošću snimanja razvoja u stvarnom vremenu (uživo) i omogućava promatranje embrionalnog razvoja izvan tijela. Direktiva Europske Unije 2010/63/EU regulira upotrebu modela kralježnjaka u znanstvenim istraživanjima koja mogu izazvati bol, patnju životinja ili trajne posljedice (EU Parliament i Council 2010; Strähle i sur. 2012). Navedeni dokument propisuje potrebu za dobivanjem dozvole za provođenje pokusa na zebricama starim ≥ 5 dana nakon oplodnje. Stoga, za provođenje pokusa na mlađim jedinkama (< 5 dana nakon oplodnje) postoji manje zakonskih ograničenja što pojednostavljuje dizajn i provođenje mnogih istraživanja koja uključuju navedene starosne skupine ribe zebrice (EU Parliament i Council 2010; Strähle i sur. 2012).

S druge strane, nedostaci ribe zebrice kao modelnog organizma proizlaze iz činjenice da je zebrica imala posljednjeg zajedničkog pretka s ljudima prije 445 milijuna godina naspram modela glodavaca kod kojih je zadnji zajednički predak živio prije 96 milijuna (Postlethwait i sur. 2000; Ali i sur. 2011). Također, zebrica ima egzotermnu fiziologiju i anatomske razlike u odnosu na čovjeka kao što su nedostatak septacije srca, sinovijalnih zglobova, spužvastih kosti, udova i pluća. Kod zebrice je došlo do duplikacije genoma pa mnogi geni imaju dvije kopije što stvaraja dodatan

posao prilikom određivanja funkcije gena. Osim toga, prisutnost koriona i do 48h nakon oplodnje može imati utjecati na difuziju proučavanih spojeva (Hill i sur. 2005; Ali i sur. 2011). Vanjska oplodnja koja omogućava jednostavnu manipulaciju embrijima no ujedno i eliminira mogućnost proučavanja transplacentalnih učinaka spojeva jer ne postoji placenta (Ali i sur. 2011; Lardelli 2014). Mala veličina zametaka i ličinki može biti od koristi za neke eksperimente, no može otežati prikupljanje odgovarajućih količina tkiva za druge. Također, nedostaci su broj dostupnih komercijalnih protutijela za proteine zebrice u odnosu na broj dostupnih protutijela za proteine često korištenih modela glodavaca, miša i štakora (Ferguson i Shive 2019). Osim toga, sve češće se postavlja pitanje za koliko je protutijela koja se danas koriste u istraživanju uspješno provedeno ispitivanje specifičnosti vezanja protutijela na protein od interesa u okviru (imuno)histokemijskih analiza (Baker 2015; Hoek i sur. 2020).

2. Razvojni stadiji ribe zebrice

Razlikujemo sljedeće razvojne stadije ribe zebrice: embrij, ličinka, mlada i odrasla jedinka (Kimmel i sur. 1995; Parichy i sur. 2009). Razvojne stadije nazivamo embrijima do 3 dana nakon oplodnje, a nakon toga ličinkama bez obzira jesu li se izlegle ili ne (Kimmel i sur. 1995). Prilikom oplodnje jaja zebrica, odnosno spajanja muške i ženske spolne stanice nastaje zigota sa 25 parova kromosoma (Postlethwait i sur. 2000). Opisano je 7 stadija ranog embrionalnog razvoja ribe zebrice s obzirom na različite morfološke karakteristike koje su vidljive i prepoznatljive pod stereomikroskopom: 1) zigota, 2) dioba, 3) blastula, 4) gastrula (pojava preteče notokorda i formiranje somita mezoderma), 5) segmentacija (razvoj somita, rudimenti primarnih organa postaju vidljivi, izduživanje repa i embrija, razvitak neuralne cijevi, mozak podijeljen na 3 režnja, 6) faringula (embrij bilateralno organiziran, dobro razvijen notokord, razvijeni somiti te dugi rep na stražnjem dijelu tijela, formiranje krvožilnog sustava i aornih lukova, razvoj osjetila i sinkronizacije rada miotoma, mozak podijeljen na 5 režnjeva, 7) izleganje (razvoj prsnih peraja, čeljusti i škrga, razvitak arterija i vena, repozicioniranje usta) (Papan i Campos-Ortega 1994; Kimmel i sur. 1995)

Potom, sljedeći razvojni stadij koji traje od 3. do 27. dana nakon oplodnje i gdje zebrice narastu još nekoliko mm nazivamo ličinkama. U početku, ličinke su veličine 3-4 mm i imaju gotovo završenu morfogenu. Značajke ranog i srednjeg ličinačkog stadija su: punjenje plivaćeg mjehura

zrakom, aktivno plivanje, pomicanje očiju, čeljusti i prsne peraje, vidljiva usta, zubi (do 8) i škržni nabor, pojava hrskavice u repu i razvoj prednjih i stražnjih peraja te okoštavanje ždrijela (Kimmel i sur. 1995). Mlada zebrica doseže duljinu veću od 1 cm te dolazi do razvoja svih peraja, pojave pigmentacije, zubiju (do 10), pojave mezonefrosa, uspostavljanja nove središnje linije duž tijela te se broj pruga povećava na 5 (Kimmel i sur. 1995; Nusslein-Volhard i Dahm 2003). Stadij odrasle jedinke nastupa 90. dana nakon oplodnje sa prosječnom veličinom od 18 mm. Značajke odraslog stadija su: veličina do 5 cm, glava sa šiljastom njuškom ispod koje su podignuta usta, kosti i ligamenti koji povezuju plivaći mjehur s unutarnjim uhom, parna prsna i jedna dorzalna peraja, nedostatak masne peraje te bodlje na perajama (Kimmel i sur. 1995; Nusslein-Volhard i Dahm 2003).

3. Anatomija i histologija ribe zebrice

Tijekom posljednja dva desetljeća, zebrica se istaknula kao genetski svestrani *in vivo* model za istraživanje različitih aspekata razvojne biologije kralježnjaka. Prednosti ribe zebrice kao razvojnog modelnog organizma su dobro prepoznate i otvaraju mogućnosti u istraživanju bolesti čovjeka. Ova sve prisutnija uporaba zebrice kao modela za istraživanje bolesti čovjeka nužno je generirala potrebu za razumijevanjem razvoja organskih sustava te općenito anatomije i histologije ribe zebrice (Bryson-Richardson i sur. 2007)

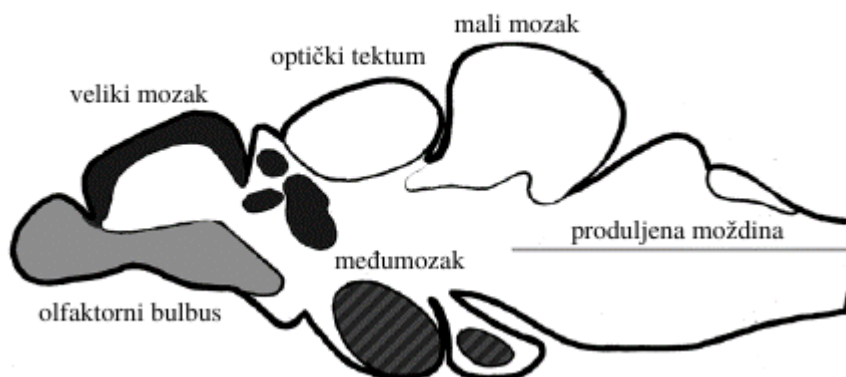
3.1. Organi i tkiva

U svrhu razumijevanja potencijala zebrice kao životinjskog modela u okviru istraživanja biologije razvoja čovjeka, bolesti i ispitivanja različitih spojeva, potrebno je unaprijediti znanje o anatomiji, histologiji i fiziologiji zebrice. Stoga, u nastavku slijedi prikaz anatomije i histologije glavnih organskih sustava zebrice sa opisom njihove funkcije.

3.1.1. Mozak

Mozak zebrice nalazi se u glavi i svojim osnovnim dijelovima sličan je mozgu viših životinja te se može podijeliti u pet regija: telencefalom, diencefalom, mezencefalom, metencefalom i mijelencefalom (Speare i Frasca 2006). Veliki mozak ili telencefalom je odgovoran za njuh, pamćenje, reproduktivno ponašanje, hranjenje i vid u boji (Roberts i Ellis 2012). Mirisni organ

izravno je povezan s telencefalonom putem olfaktornog bulbusa (Slika 2). Međumozak ili diencefalom se može podijeliti u tri dijela: epitalamus, talamus i hipotalamus. Epitalamus obuhvaća epifizu i *saccus dorsalis* (Menke i sur. 2011). Epifiza je svjetlosno osjetljiva neuroendokrina struktura te kao i kod sisavaca izlučuje hormone indolamin, melatonin i neurotransmitere. Ima ključnu ulogu u kontroli sezonskih ritmova poput regulacije razmnožavanja, rasta i sezonskih migracija. Talamus i hipotalamus su odgovorni za senzorička opažanja među kojima su trudnoća i njuh (Menke i sur. 2011). Srednji mozak ili mezencefalom anatomski je podijeljen na optički tektum i tegmentum koji redom s gornje i donje strane oblikuju treći ventrikul (Roberts i Ellis 2012). Tegmentum je struktura građena od različitih tkiva koje čini trbušni dio srednjeg mozga (Speare i Frasca 2006). Optički tektum je relativno velik i podijeljen uzdužnom brazdom u dvije globularne strukture (lat. *corpora bigemina*). Uloga optičkog tektuma je prijem i koordinacija optičkih živčanih informacija (Roberts i Ellis 2012). Mali mozak ili metencefalom (lat. *cerebellum*) povezan je s prijemom i koordinacijom signala iz proprioceptora i održavanjem ravnoteže (Roberts i Ellis 2012). Sastoji se od dva dijela: 1) režanj *vestibulolateralis*, koji prima podražaje iz otolita i 2) *corpus cerebelli*, više dorzalno smješten, koji putem kralježnice prima osjetne podražaje od ekstremiteta i proprioceptora. Otolitni organ vrlo je važan u percepciji zvuka, brzini i promjeni ravnoteže (Roberts i Ellis 2012). Sastoji se od tri međusobno povezane komore (*utriculus*, *sacculus* i *lagena*) koje su ispunjene endolimfom. U svakoj komori se na osjetnim epitelnim stanicama nalazi kalcificirani "kamen" ili otolit. Kretanje otolita stimulira sila gravitacije ili niskofrekventne zvučne vibracije (Menke i sur. 2011; Roberts i Ellis 2012).



Slika 2. Shematski prikaz dijelova mozga zebrice. Preuzeto i prilagođeno iz Ceci i sur., 2019.

3.1.2. Oko

Oko zebrice nalazi se u glavi i slično je oku svih ostalih kralježnjaka (Roberts i Ellis 2012). Oko je složeni organ koji funkcionira kao osjetni aparat vidnog sustava. Otkriva informacije u obliku prelomljene svjetlosti i zajedno s vizualnim centrima u mozgu omogućuje vizualnu percepciju okoline (Robles i sur. 2014). Sastoji se od tri sloja: 1) *tunica fibrosa*, koja obuhvaća rožnicu i bjeloočnicu, 2) *tunica vasculosa*, koja obuhvaća žilnicu, *rete mirabile* i šarenicu, i 3) mrežnica (Menke i sur. 2011) (Slika 3). Vid, jedno od najvažnijih osjetila, započinje kad foton udari u molekule opsina smještene u vanjskim segmentima fotoreceptora. Fotoreceptori prevode ovaj fizički podražaj u elektrokemijski signal koji se prenosi kroz interneurone mrežnice. U roku od milisekunde, ova poruka konvergira na ganglijske neurone mrežnice koji projiciraju svoje aksone na određena mjesta u optičkom tektumu, centru za vizualnu obradu u mozgu zebrice (Bilotta i Saszik 2001; Kretzberg i Ernst 2013).

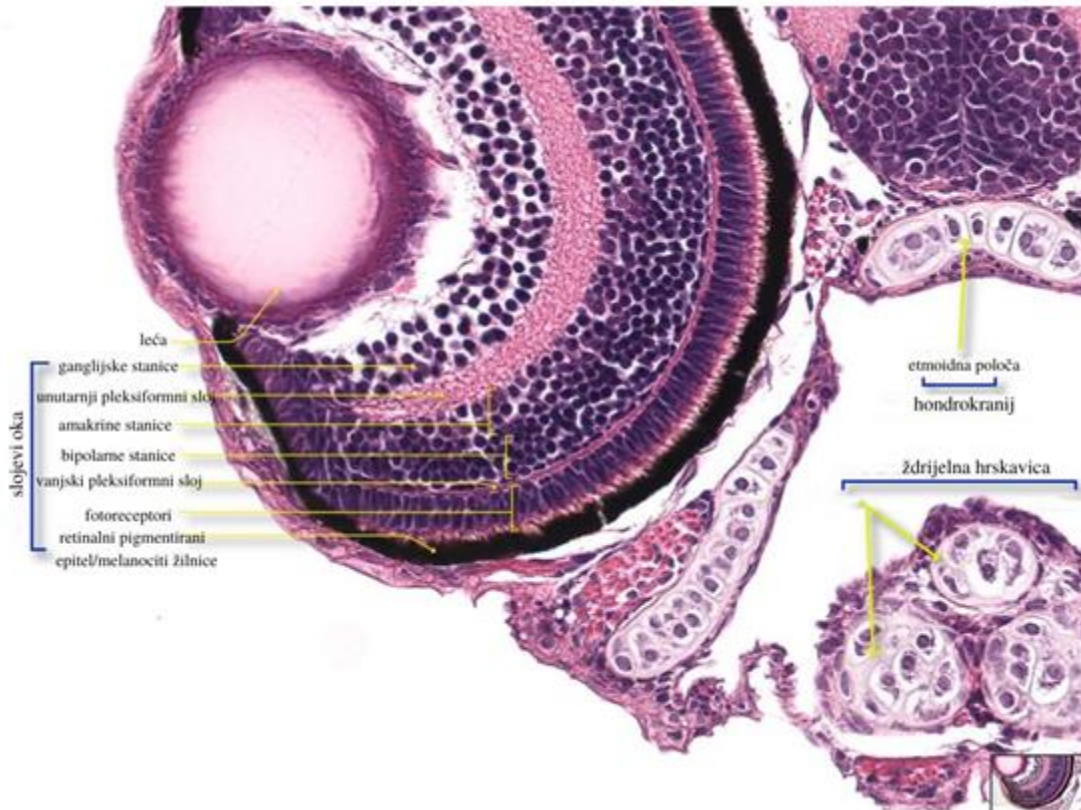
Rožnica je u usporedbi s rožnicom kopnenih životinja relativno ravna. Sastoji se od slojevitih nepigmentiranih, nekeratiniziranih epitelnih stanica, pričvršćenih na debelu bazalnu membranu koja se smatra analognom Bowmanovoj membrani u sisavaca (Menke i sur. 2011). Stroma se nalazi na *Descemetovoj* membrani te unutarnji sloj rožnice, endotel, služi za održavanje prozirnosti rožnice. Leća oka je potpuno sferična pa djelomično strši kroz šarenicu pružajući širokokutni pogled (Menke i sur. 2011). Prozirna rožnica i leća zajedno čine dio oka odgovoran za eliminiranje sferičnih aberacija svjetlosti i projekciju fokusirane slike na mrežnicu (Piatigorsky 2002). Uz to, rožnica služi kao zaštitna barijera između oka i vanjske okoline. Refrakcija svjetlosti kroz rožnicu ili leću oka karakteristična je za pojedinu vrstu (Greiling i Clark 2008; Gestri i sur. 2012). Za zebrice i ostale vodene životinje leća pruža relativno veću snagu fokusiranja od leće kopnenih životinja. To je zato što se indeks loma vode u usporedbi s indeksom loma zraka bolje podudara s onom stanica rožnice i rožnici je potrebna manja snaga prelamanja (Greiling i Clark 2008; Gestri i sur. 2012). Bjeloočnica je vanjski sloj oka bogat izvanstaničnim matriksom, posebno kolagenom, elastinom i proteoglikanima. Ovo žilavo, vlaknasto tkivo daje oku oblik i ima zaštitnu ulogu. Bjeloočnica je također mjesto vezivanja i umetanja ekstraokularnih mišića. Za razliku od strome rožnice koja učinkovito prenosi svjetlost, stroma bjeloočnice raspršuje svjetlost, dajući joj neproziran izgled (Gestri i sur. 2012).

Tunica vasculosa, sastoji se od žilnice, ovojnice bogate krvnim kapilarama koja opskrbljuje mrežnicu sa kisikom i prehranbenim tvarima, šarenice koja kontrolira količinu svjetlosti koja

odlazi u mrežnicu te *rete mirabile* kao dodatni sustav krvnih žila smještenog iza mrežnice i odgovornog za održavanje parcijalnog tlaka kisika u mrežnici (Wittenberg i Haedrich 1974; Menke i sur. 2011).

Kao i većina postojećih kralježnjaka, mrežnica riba zebrica sastoji se od šest glavnih tipova stanica, pet vrsta neurona i jedne glija stanice, Müllerove glije (MacDonald i sur. 2015). U mrežnici se može razlikovati nekoliko slojeva: 1) pigmentni epitel mrežnice u kojem su fotoreceptorske stanice (štapići i čunjići), 2) vanjski nuklearni sloj, koji sadrži jezgre štapića i čunjića, 3) bipolarne stanice koje povezuju štapiće i čunjiće, i 4) ganglijske stanice koje svoje aksone šalju kroz optička vlakna koja se stapaju u vidni živac, a koji je povezan sa mozgom. Amakrine stanice su interneuroni koji povezuju bipolarne i ganglijske stanice mrežnice. One su sinaptički aktivne u unutarnjem pleksiformnom sloju i služe za integraciju, moduliranje i umetanje vremenske domene u vizualnu poruku predstavljenu ganglijskoj ćeliji. Amakrinske stanice tako su nazvane jer su živčane stanice za koje se smatra da nemaju akson (Ramón y Cajal i sur. 1972). Za razliku od drugih pravih koštunjača, riba zebrica nema avaskularnu mrežnicu (Menke i sur. 2011). Stanice mrežnice osjetljive na svjetlost, fotoreceptori (čunjići i štapići), smješteni su na apikalnom sloju mrežnice i prikazuju stereotipnu subcelularnu organizaciju sa svojim bazalnim jezgrama okrenutim prema unutarnjem segmentu (tijelo stanice ili soma) i vanjskom segmentu naslanjajući se na pigmentni epitel mrežnice sa membranskim invaginacijama prepunih opsinom (stanice osjetljive na svjetlost) (Mahabadi i Al Khalili 2021). Stariji ostaci membrane i proteina odlijevaju se s distalnog vrha vanjskog segmenta i fagocitoziraju ih susjedne stanice pigmentnog epitela. Čunjići su potrebni za vid jakog svjetla i mogu se podijeliti u četiri klase na temelju ekspresije i morfologije opsina. Upareni dugi dvostruki čunjići izražavaju crveni i zeleni opsin, dugi pojedinačni čunjići izražavaju plavi opsin, a kratki pojedinačni čunjići izražavaju opsin osjetljiv na ultraljubičasto zračenje (Mahabadi i Al Khalili 2021). Štapići se uglavnom koriste za vid pri slabom svjetlu, a njihova su stanična tijela smještena bliže staklovini oka, a u mrežnici prilagođenoj svjetlosti, unutarnji i vanjski segmenti tankih štapića strše izvan čunjića, razdvajajući apikalne mikrovile susjednog retinalnog pigmentnog epitela jedne stanice (Mahabadi i Al Khalili 2021). Bipolarne stanice su interneuroni koji prenose informacije s fotoreceptora u unutarnju mrežnicu. Bipolarne stanice klasificirane su prema tri glavna kriterija: vrsti fotoreceptora koji pruža ulaz, dendritičkoj i aksonskoj morfologiji i polarnosti njihovih odgovora (npr. depolarizirajući ili hiperpolarizirajući). Ganglijske stanice krajnji su izlazni neuroni mrežnice kralježnjaka. Aksoni ganglijskih stanica čine

sloj živčanih vlakana unutarnje mrežnice dok se spajaju i tvore glavu vidnog živca, koja se sastoji od aksona i glija ganglijskih stanica koji migriraju u vidni živac (Mahabadi i Al Khalili 2021).

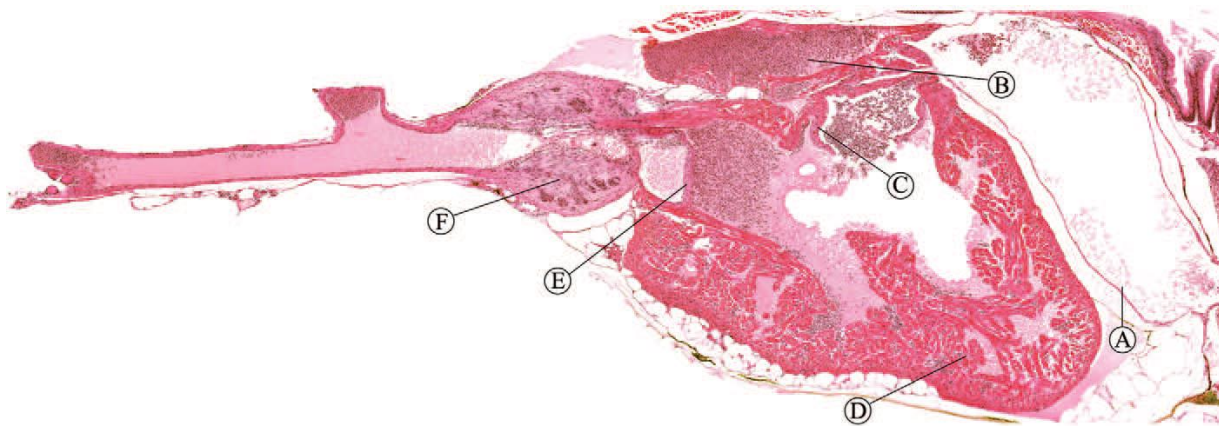


Slika 3. Slojevi oka. Preuzeto i prilagođeno iz <https://bio-atlas.psu.edu/zf/progress.php>.

3.1.3. Srce i krvožilni sustav

Kod ribe zebrice srce je smješteno ispred glavne tjelesne šupljine i ventralno od jednjaka (Speare i Frasca 2006; Roberts i Ellis 2012). Srce je građeno od jedne pretkljetke (atrija) i jedne kljetke (ventrikula). Deoksigenirana venska krv ulazi u *sinus venosus* (Slika 4). Stijenka *sinusa venosusa* je tanka i uglavnom se sastoji od kolagenog vezivnog tkiva. Krv nakon toga prolazi kroz sinusatrijski zalistak u pretkljetku. Pretkljetka ima tanku, mišićavu stijenku, a tanke labave *trabekulae* tvore mrežasto tijelo. Kontrakcijom pretkljetke i širenjem (dilatacijom) kljetke krv odlazi kroz atrioventrikularni zalistak u kljetku. Kljetka ima puno deblju stijenku. Vanjski sloj stijenke je građen od kompaktnog mišića, dok je unutrašnji sloj spužvast i sadrži brojne *trabekulae*. Pod kontrakcijom

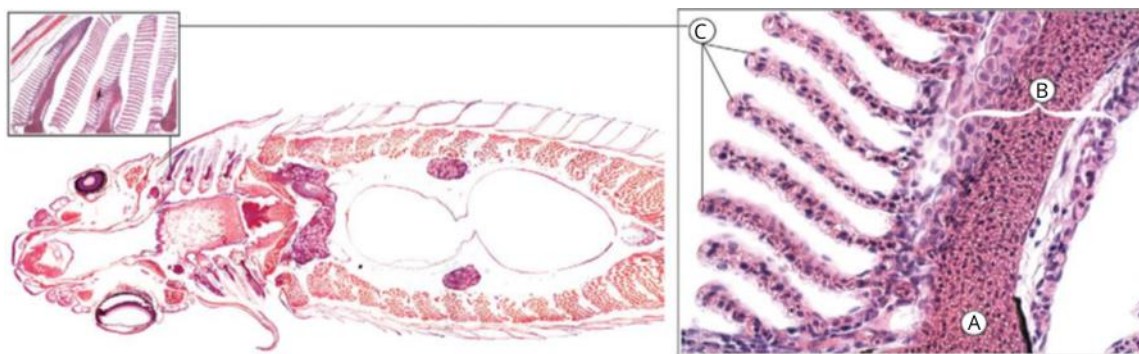
klijetke nastaje relativno visoki tlak, krv potom odlazi u atrijsku lukovicu (lat. *bulbus arteriosus*), a dalje ventralnom aortom odlazi iz srca u škrge i ostatak tijela (Menke i sur. 2011; Poon i Brand 2013).



Slika 4. Srce ribe zebrice. (A) Stijenka sinusa *venosusa*; (B) atrij; (C) atrio-ventrikularni zalistak; (D) klijetka; (E) bulbo-ventrikularni zalistak; (F) atrijska lukovica (*bulbus arteriosus*). Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

3.1.4. Škrge

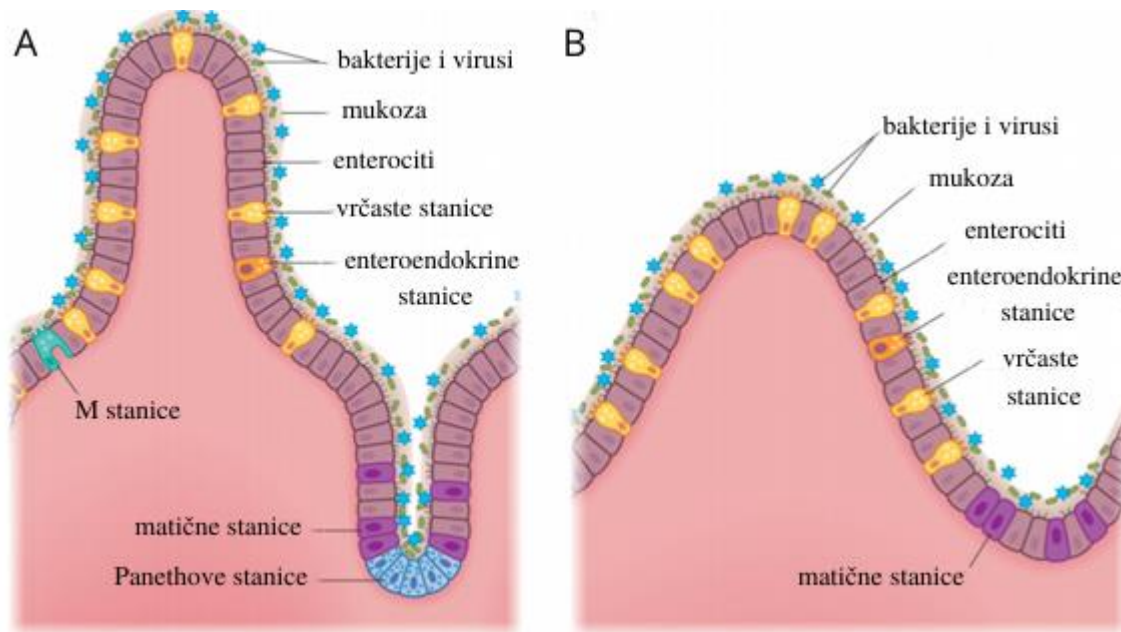
Škrge igraju važnu ulogu u oksigenaciji krvi (Slika 5). Škrge zebrića sastoje se od četiri bilateralna škržna luka u trbušnom orofarinksu. Škržni lukovi podržani su koštanim i hrskavičavim tkivom i sadrže skeletne mišiće. Inerviraju ih kranijalni živci lica i jezično-ždrijelni i vagusni živci (Bjurstedt 1957). Voda ulazi kroz usta preko škrge te izlazi ispod škržnog poklopca ili operkuluma. Krv teče kroz aferentne arterije primarnih lamela u krvne prostore sekundarnih lamela, gdje se ugljikov dioksid (CO_2) ispušta u vodu u zamjenu za kisik (O_2). Oksigenirana krv napušta sekundarne lamele eferentnim lamelarnim arterijama do dorzalne aorte, odakle se dostavlja u sva tkiva. Pored njihove uloge u oksigenaciji krvi, škrge također igraju važnu ulogu u kiselobaznoj ravnoteži, osmoregulaciji i izlučivanju tvari (Menke i sur. 2011).



Slika 5. Škrge ribe zebrice. (A) lamelarna arterija; (B) primarna lamela; (C) sekundarna lamela. Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

3.1.5. Probavni sustav

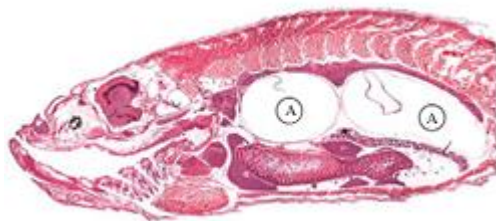
Primarne funkcije probavnog sustava uključuju probavu i apsorpciju hranjivih tvari i uklanjanje otpadnih tvari. Crijevo ribe zebrice vrlo je homologno s crijevom sisavaca u svom razvoju, organizaciji i funkciji (Slika 6) (Wallace i sur. 2005; Flores i sur. 2020). U usporedbi sa crijevima sisavaca, crijevo ribe zebrice ima jednostavniju građu. Crijevna sluznica presavijena je u resičaste nabore bez prepoznatljivih resica prstastog oblika koje nalazimo u crijevima sisavaca. U presjeku je vidljivo da je nabor identičan resici i stoga može biti njezina evolucijska preteča (Burgess 1975). Probavni sustav zebrice može se podijeliti na prednji i stražnji dio. Prednji dio se sastoji od usta, bukalne šupljine i orofarinksa. Jednjak, proksimalno crijevo, srednje crijevo, stražnje crijevo i anus čine stražnji dio. Apsorpcija masti događa se u proksimalnom crijevu, dok se apsorpcija proteina događa u srednjem crijevu. Stražnje crijevo ima ulogu u osmoregulaciji (Holden i sur. 2013). Crijevo sa kratkim mišićavim jednjakom, sastoji se od jedne duge cijevi koja se dva puta savija u trbušnoj šupljini. Crijevo započinje širokim lumenom koji postupno postaje manji u rostralno-kaudalnom smjeru. Ne može se razlikovati želudac, tanko crijevo ili debelo crijevo u zebrica (Wallace i sur. 2005; Menke i sur. 2011). Međutim, postoje razlike u morfologiji cilindričnih epitelnih stanica sluznice i u broju vrčastih stanica, a što upućuje na razliku u funkciji pojedinih dijelova crijeva. Crijevo ima brojne nabore koji postaju postupno kraći rostralno-kaudalnom smjeru. Nabori su proporcionalno znatno veći od crijevnih resica u sisavaca. Cilindrični enterociti koji imaju funkciju apsorpcije tvari su najbrojnija, dok su vrčaste stanice druga najbrojnija vrsta stanica u crijevnom epitelu zebrice (Wallace i sur. 2005; Menke i sur. 2011).



Slika 6. Usporedba staničnih tipova i struktura između probavnog trakta sisavaca (A) i zebrice (B). Za razliku od sisavaca crijevo zebrice je organizirano u nepravilne pregibe te nema resica i kripti. Crijevo sisavaca i zebrica posjeduju matične stanice, enterocite, enteroendokrine stanice i vrčaste stanice. Paneth-ove stanice i M-stanice su odsutne u zebricama. Preuzeto i prilagođeno iz Flores i sur., 2020.

3.1.6. Plivaći mjehur

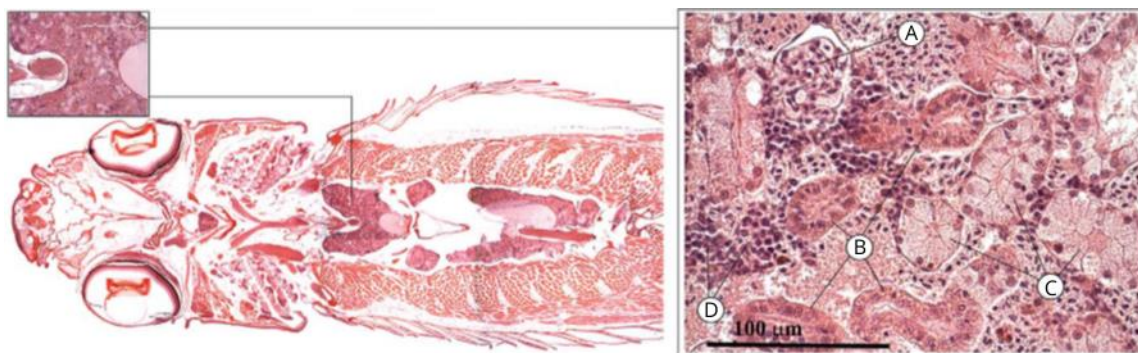
Plinski ili plivaći mjehur embriološki je izveden iz gornjeg probavnog trakta, ali nema probavnu funkciju (Menke i sur. 2011; Roberts i Ellis 2012). U zebrica, razvoj plivaćeg mjehura započinje tijekom embriogeneze, a inflacija se javlja unutar 5 dana nakon oplodnje (Yue i sur. 2015). Plivaći mjehur u ribe zebrice, igra ključnu ulogu u plovnosti. Smješten je ventralno od bubrega i podijeljen je na dva dijela (Slika 7) (Menke i sur. 2011). Sastoji se od: 1) jednog sloja cilindričnog epitela koji stvara surfaktant koji prekriva tanki sloj adventicija i 2) mišićnog sloja sastavljenog od glatkih mišića i submukoznog sloja, gdje se nalazi većina krvnih žila. U cilindričnom epitelu nalaze se tzv. „rodlet“ ili štapićaste stanice kojih obično najviše ima unutar škrge, crijeva, žučnih kanala i atrijske lukovice (Speare i Ferguson 2006; Menke i sur. 2011). Zebrice imaju povezan plivaći mjehur i jednjak pneumatskim kanalom, dopuštajući ribi punjenje plivaćeg mjehura gutanjem zraka (Finney i sur. 2006).



Slika 7. Prikaz smještaja plivaćeg mjehura (A). Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

3.1.7. Bubrež

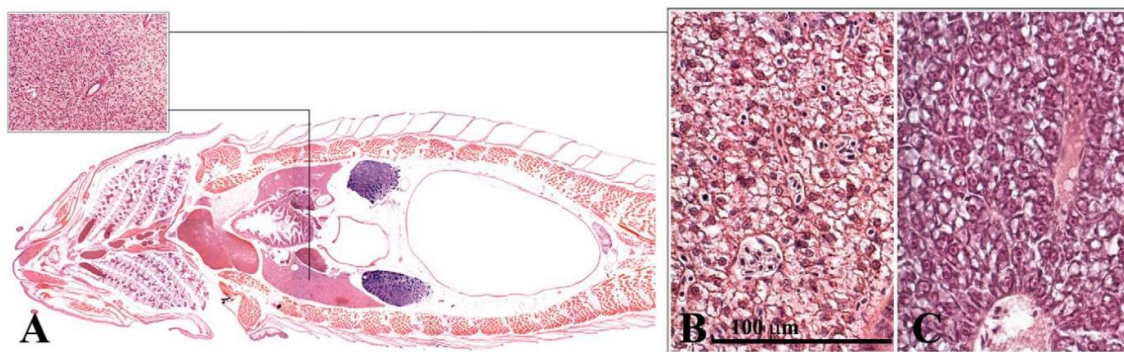
Bubrež zebriće nalazi se retroperitonealno i ventralno od kralježnice. Dvije primarne uloge bubreža su uklanjanje i izlučivanje nepotrebnih i štetnih tvari iz krvi i regulacija koncentracije iona i metabolita u krvi u okviru fizioloških granica. Bubrež svoju funkciju postiže filtriranjem krvi i reapsorpcijom korisnih iona i malih molekula koristeći se epitelnim prijenosom tvari. Navedeni prijenos tvari ostvaruju nefroni, funkcionalne jedinice bubreža (Menke i sur. 2011; Drummond i Davidson 2016;). Zebrića je slatkovodna riba konstantno okružena medijem niske osmolarnosti pa bubrež (uz škrge i kožu) također pomaže u izlučivanju vode i održavanju osmolarnosti tjelesnih tekućina (Hill i sur. 2004; Menke i sur. 2011). Usprkos razlikama, postoji funkcionalna analogija između bubreža riba zebrića i sisavaca, što zebriće čini izvrsnim modelom za istraživanje fiziologije bubreža. Tijekom ranog embrionalnog razvoja zebrića ima pronefros kao funkcionalni oblik bubreža. To je ujedno i najnezreliji oblik bubreža kralježnjaka koji je pogodan za istraživanje molekularnih mehanizama razvoja nefrona, a koje nalazimo i u metanefrosu, složenijem obliku bubreža sisavaca (Gerlach i Wingert 2013; Drummond i Davidson 2016). Pronefros u zebrića sastoji se od samo dva nefrona sa sraslim glomerulima ventralno na dorzalnoj aorti (Drummond i Davidson 2016). Epitel pronefrosa zebrića podijeljen je na dva segmenta proksimalnih kanalića (proksimalni zavijeni kanalić i proksimalni ravni kanalić) i dva distalna kanalića koji su u mnogočemu homologni s nefronom sisavaca (Slika 8) (Wingert i sur. 2007). Bubrež ribe zebriće također sadrži i sabirne kanale. U bubrežnom intersticiju nalaze se hematopoetske stanice i tu se događa hematopoeza kod odraslih jedinki. Osim hematopoetskih, u prednjem dijelu bubreža mogu se pronaći i endokrine stanice (interrenalne i kromafine stanice) duž glavnih krvnih žila u prednjem dijelu bubreža (Menke i sur. 2011). Kasnije, tijekom razvoja mladih (juvenilnih oblika) zebrića dolazi do razvoja mezonefrosa koji služi kao završni oblik bubreža u odraslih jedinki (Drummond i Davidson 2016).



Slika 8. Bubreg ribe zebrice. (A) glomerulus, (B) proksimalni ili distalni kanalić, (C) sabirni kanalić, i (D) hematopoetsko tkivo. Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

3.1.8. Jetra

Jetra zebrice je zaseban organ smješten u prednji dio trbušne šupljine sačinjen od tri režnja koja se pružaju duž crijeva. Slično kao i kod sisavaca, jetra igra važnu ulogu u održavanju metaboličke homeostaze tijela, a uključuje metabolizam ugljikohidrata, proteina, lipida i vitamina (Evensen 2006; Menke i sur. 2011; Roberts i Ellis 2012). Također, ima ključnu ulogu u detoksifikaciji i sintezi proteina seruma poput albumina, fibrinogena, čimbenika sustava komplementa i proteina akutne faze. Jetra zebrice razlikuje se od jetre sisavaca jer hepatociti nisu jasno organizirani i tipične portalne trijade nisu očite (Van Der Ven i sur. 2003; Menke i sur. 2011). Osim toga, jetra zebrice nema Kuppferove stanice. Jasna razlika može biti napravljena između muške i ženske jetre kod odraslih jedinki zebrica jer su hepatociti u jetri ženki vrlo bazofilni kao posljedica proizvodnje vitellogenina (Slika 9) (Van Der Ven i sur. 2003; Menke i sur. 2011). Žučni ili bilijarni sustav zebrice se također razlikuje od onog u sisavaca u kojemu mnogobrojni unutarstanični kanalikuli u konačnici anastomoziraju stvarajući žučne kanale. Žučni kanali se spajaju i tvore žučni mjehur koji sadrži zelenkastu žuč i koja potom odlazi u crijevo putem zajedničkog žučovoda (Roberts i Ellis 2012).



Slika 9. Jetra ribe zebrice. (A) dorzalni prikaz, (B) muška jetra, (C) ženska jetra. Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

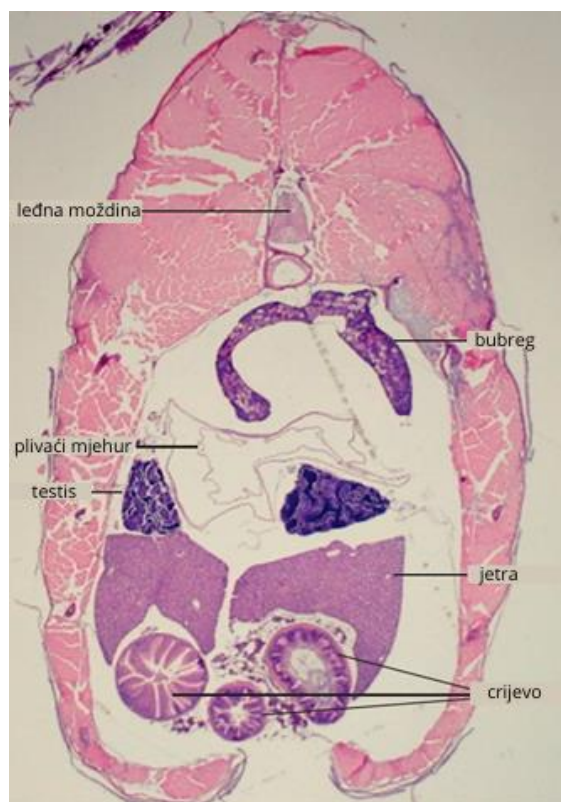
3.1.9. Gušterača

Gušterača zebrice nije diskretan organ i poprima svoj zreli oblik 6 dana nakon oplodnje. Nalazi se asimetrično na desnoj strani tijela kao izduženi organ koji se proteže između somita (Youson i Al-Mahrouki 1999; Menke i sur. 2011; Prince i sur. 2017). Sastoji se od dva različita, ali kolokalizirana dijela: 1) egzokrini dio koji sadrži acinarne stanice koje proizvode probavne enzime i kanale kroz koje teku izlučeni enzimi, te 2) endokrini dio kojeg čine "Langerhansovi otočići" koji luče hormone zadužene za regulaciju razine glukoze u krvi (Prince i sur. 2017). U ribe zebrice egzokrino tkivo gušterače je lokalizirano uzduž crijeva. Acinarna struktura egzokrinog dijela gušterače je vrlo slična onoj kod sisavaca i sadrži stanice s vrlo tamnom, bazofilnom citoplazmom (Menke i sur. 2011; Roberts i Ellis 2012). Osnovni sastav i organizacija endokrinih otočića gušterače je slična onoj u čovjeka. Karakterističan i prepoznatljiv Langerhansov otočić u zebrice zove se Brockmanovo tijelo. Inače, endokrino tkivo gušterače zebrice se sastoji od α -stanica koje proizvode glikagonu sličan peptid, β -stanice koje proizvode inzulin, i δ -stanice koje proizvode somatostatin (Menke i sur. 2011).

3.1.10. Spolni organi

Zebrica nema spolnih X i Y kromosoma analognih sisavcima. No nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da gubitak funkcije gena *wnt4a* promovira razvoj mužjaka odnosno da aktivnost ovog gena potiče razvoj ženskih spolnih organa u zebrica (Kossack i sur. 2019). Na početku embriološkog razvoja spolna žlijezda nalikuje primitivnom jajniku i ukoliko je riba mužjak, rana spolna žlijezda jajnika nazaduje i testisi se počinju stvarati između 21. i 30. dana nakon oplodnje.

Inače se primitivni jajnik razvija u odrasloj ženki (Speare i Frasca 2006). Testisi riba zebrica su parni organi smješteni ventralno od plivaćeg mjehura i dorzalno od jetre (Slika 10). Testisi su sastavljeni od "lobula" ili režnjića odvojeni vlaknastim vezivnim tkivom. Prekriveni su sa spermatogenim epitelom. Unutar svakog režnjića, zametne epitelne stanice započinju niz mitotskih i mejotičnih dioba koje dovode do proizvodnje sperme (Mokhtar 2017). Jajnici su parni organi sastavljeni od dva uzdužna režnja i smješteni su ventralno od plivaćeg mjehura u trbušnoj šupljini (Mokhtar 2017). Jajnici sadrže oocite u različitim fazama razvoja koje kratki jajovod vodi prema van (Menke i sur. 2011). Jajnici su prekriveni *tunicom albugineom*, tkivom koji sadrži zametni epitel. Zametne epitelne stanice prolaze kroz niz mitotičkih dioba kako bi stvorile primarne oocite (Mokhtar 2017).



Slika 10. Presjek bilateralnih testisa u trbušnoj šupljini između jetre i plivaćeg mjehura. Preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011.

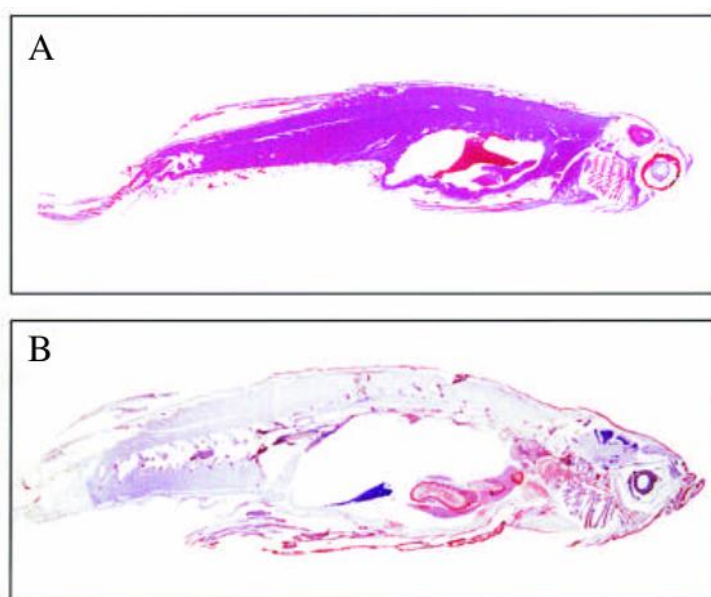
4. Protokoli za pripremu histoloških preparata ribe zebrice

Kako bi se uzorci organa i tkiva zebrice mogli proučavati pod mikroskopom potrebno ih je prethodno pripremiti. Postupak pripreme se sastoji od nekoliko koraka: 1) fiksacija, 2) uklapanje, 3) rezanje pripremljenog uklopljenog uzorka, 4) obrada i bojanje presjeka. Svaki od koraka ima svoju funkciju i svrhu kako bi se očuvala morfološka struktura preparata. Fiksacijom se sprječava propadanje uzorka, a uklapanje se provodi kako bi uzorci bili dovoljno čvrsti za rezanje na mikrotomu. Bitno je napraviti dovoljno tanke prereze tkiva kako bi svjetlost mogla proći kroz njih i kako bi se sve strukture organa i tkiva mogle jasno promatrati. Stoga su u nastavku opisane tri metode pomoću kojih se uzorci zebrice mogu pripremiti i promatrati pod mikroskopom. Prve dvije metode uključuju pripremu presjeka tkiva zebrice na mikrotomu, a treća metoda uključuje pripremu cijelog organizma zebrice za posljedično promatranje pod mikroskopom (Moore i sur. 2002; Junqueira i Carneiro 2005; Buesa i Peshkov 2009)

4.1. Parafinski preparati

Uklapanje u parafin je metoda koja se koristi za stvaranje parafinskih blokova koji su rezultat prožimanja tkiva parafinom te naposljetku nastaju parafinski rezovi koji se mogu obojati i koristiti za imunokemijske i molekularno biološke analize (Slika 11). Presjeci tkiva ugrađenih u parafin koriste se često u histologiji i patologiji zbog jednostavnosti upotrebe i očuvanja anatomsko-histoloških struktura uzorka. Parafin je medij za uklapanje bijele boje i bez mirisa, građen od lančanih ugljikovodika te dolazi u obliku listića ili zrnaca (Canene-Adams 2013). Biološke uzorke često treba učvrstiti kako bi se omogućilo njihovo rezanje. Diskontinuitet tkiva u presjecima, uobičajena prepreka stvaranja kvalitetnih presjeka zebrica, minimiziran je obradom i ugrađivanjem fiksiranih tkiva u formalinu. Budući da se parafin ne miješa s vodom, glavnim sastojkom tkiva, uzorke treba dehidrirati postupno sa etanolom. Nakon toga slijedi sredstvo za čišćenje, obično ksilen, za uklanjanje etanola. Konačno, rastopljeni parafinski vosak infiltrira se u uzorak i zamjenjuje ksilen. Parafinski medij najčešće je korišten u svjetlosnoj mikroskopiji i presjeci za svjetlosnu mikroskopiju obično su debljine oko 5 μm . Parafinski vosak ne pruža dovoljno tvrdu matricu za rezanje tankih presjeka potrebnih za elektronsku mikroskopiju, obično debljine 80-100 nm te se onda koriste epoksidne ili akrilne smole posebice za potrebe imunohistokemijskih analiza (Edward Harlow 1999; Celis 2005). Kako bi se napravili presjeci na

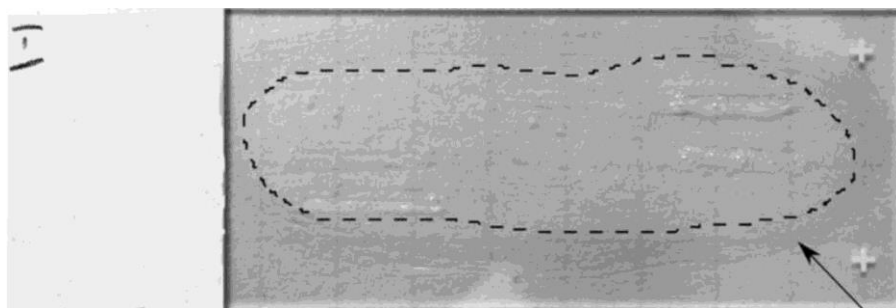
mikrotomu, uzimaju se uzorci tkiva prethodno prožeti i uklopljeni u parafin (Vishwakarma 2017). Pri rezanju parafinski blok mora biti paralelno postavljen u odnosu na mikrotomski nož za rezanje (Sabaliauskas i sur. 2006), a presjeci se potom prenose na površinu vode u vodenoj kupelji. Presjeci plutaju prema stražnjoj strani vodene kupelji. Presjeci se uzimaju mikroskopskim stakalcem kad dođu do stražnje strane vodene kupelji i potpuno su se rasklopili (Qin i sur. 2018). Stakalce sa presjekom se uroni u ksilen za uklanjanje parafina i prenese kroz niz razrijeđenja alkohola (npr. 100 %, 95 %, 70 % i 50 %) u vodu prije bojenja ili druge obrade. Postupak premještanja fiksnog tkiva putem dehidracije, infiltracije i ugradnje može se obaviti ručno, ali većina laboratorija koristi automatizirane procesore tkiva za obavljanje ovih zadataka (Bancroft i Gamble 2007). Vrijeme potrebno za svaki korak ovisi o vrstama i dimenzijama uzoraka tkiva, ali uobičajena praksa je jedan sat na svakom koraku. Budući da su ksileni za ugradnju tkiva otrovni, njima treba rukovati u rukavicama i koristiti ih u dimovodu. Alternative koje su manje štetne od ksilena komercijalno su dostupne i široko se koriste za histopatologiju. Tkiva koja su fiksirana u otopinama formalina (ili formaldehidu) i prerađena u parafin obično se nazivaju tkivima FFPE (engl. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*; fiksirana formaldehidom, ugrađena u parafin) (Bancroft i Gamble 2007).



Slika 11. Parafinski presjeci ribe zebrice. (A) Hematoksilin-eozin bojanje (B) anti-citokeratin (crveno) i hematoksilin (plavo). Preuzeto i prilagođeno iz Choi i sur. 2021.

4.2. Kriopreparati

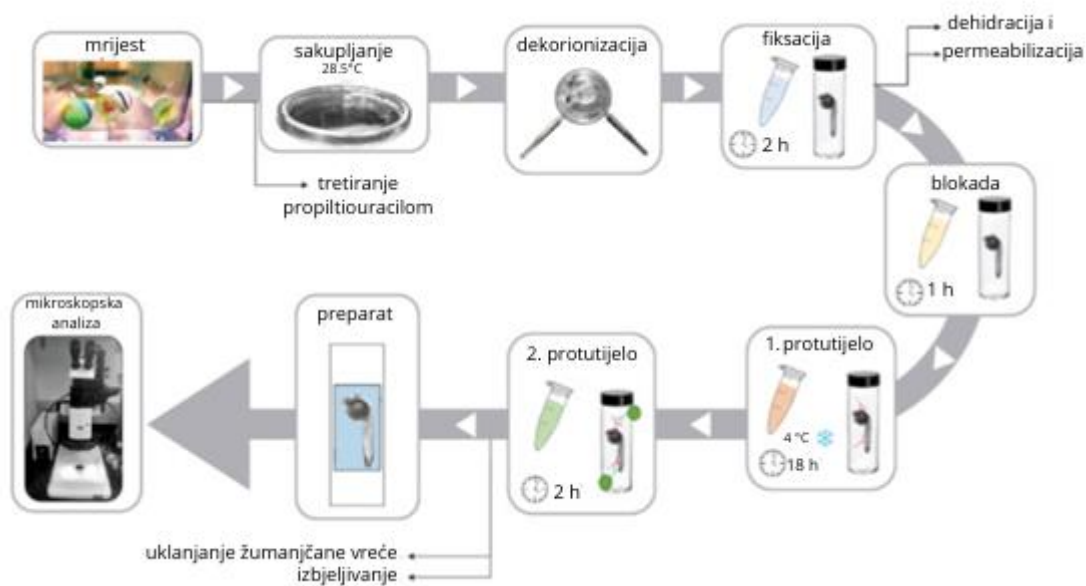
Postupak pripreme kriopreparata zebriće (Slika 12) se općenito sastoji od nekoliko koraka koji uključuju fiksaciju uzorka, uklapanje uzorka u medij za uklapanje, zamrzavanja uzorka i njihovog rezanja na debljinu između 4-15 μm pomoću kriomikrotoma pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ferguson i Shive 2019). Kriopreparati se koriste za osjetljiva tkiva poput embrija zebriće u okviru fluorescencijskih analiza jer su se pokazali superiornijima od parafinskih uzoraka (Ferguson i Shive 2019). Stoga se tehnika pripreme kriopreparata nameće kao optimalna metoda za pripremu histoloških preparata tkiva zebriće, a posebice u smislu očuvanja morfologije i antigenosti tkiva (Macdonald 1999). Istraživanje međustaničnih interakcija često zahtijeva obilježavanje specifičnih staničnih populacija i preciznu lokalizaciju proteina. Embrij ribe zebriće izvrstan je alat za ispitivanje takvih interakcija s *in vivo* modelom. Iako se IHC (imunohistokemija) i IF (imunofluorescentne) tehnike sa cjelokupnim uzorcima (engl. *whole mount*) češće koriste za analizu ekspresije proteina u riba zebriće (Macdonald 1999; Kogata i Howard 2013; Santos i sur. 2018; Santos i Pinto 201.) taj postupak može predstavljati problem prilikom sakupljanja preciznih podataka o kolokalizaciji proteina jer može biti teško razlikovati slojeve tkiva i vizualizirati ekspresiju proteina na razini jedne stanice u cijelim uzorcima. Neka istraživanja mogu zahtijevati upotrebu dva antitijela koja nisu kompatibilna za upotrebu u istoj tehnici. Tako primjerice antitijelo 1 može biti prikladno samo za imunohistokemiju, a antitijelo 2 prikladno samo za imunofluorescencijsku analizu. Ekspresija proteina na površini može se prekriti jako svijetlom ekspresijom površine, što dovodi do netočnosti u kvantifikaciji (Ferguson i Shive 2019). Softverski programi za obradu slika ne mogu razlikovati površinsko bojanje nasuprot bojanju u dubljem dijelu tkiva. Uz to, većina tradicionalnih metoda prilično je toksična, a time su i manje poželjne za upotrebu (Karlsson i sur. 2001; Ferguson i Shive 2019).



Slika 12. Prikaz konačnog izgleda kriopreparata embrija ribe zebriće. Preuzeto i prilagođeno iz Ferguson i Shive 2019.

4.3. Cjelokupni ili *whole-mount* preparati

Priprema cjelokupnih ili *whole-mount* preparata sastoji se od malih komadića tkiva, kao što su cjeloviti embriji ili ličinke riba zebrića (Macdonald 1999; Santos i sur. 2018). Ova se tehnika pojavila kao moćan istraživački alat koji može pružiti dodatne informacije o morfološkom stanju tkiva, u situacijama kada je teško rezati embrije ili ličinke zebriće. Osim toga, *whole-mount* postupak može se koristiti za ispitivanje prostorno-vremenske ekspresije molekula s obzirom da je morfologija tkiva i ekspresije proteina očuvana uz minimalnu dehidraciju tkiva i fizička oštećenja. Imunoreaktivnost antigena na protutijela također je vrlo dobro očuvana što ovako pripremljene preparate čini dobrim za imunofluorescencijske analize lokalizacije i ekspresije proteina (Kogata i Howard 2013). Kako bi se poboljšali dobiveni rezultati u imunofluorescencijskim analizama proteina na *whole-mount* uzorcima koristi se konfokalni mikroskop za snimanje cijelog embrija u određenim žarišnim ravninama bez potrebe za rezanjem tkiva (Santos i sur. 2018). Osnovni tijek imunohistokemije na *whole-mount* uzorcima zebrića uključuje: uzgoj i pripremu zametaka, blokiranje nespecifičnih antigena, korištenje antigen-specifičnog primarnog protutijela koje se specifično veže za protein od interesa, detektiranje tog primarnog protutijela vezanjem sekundarnog protutijela, poklapanje uzorka i dokumentiranje ekspresije specifičnog proteina (Slika 13) (Hammond-Weinberger i Zeruth 2019).



Slika 13. Postupak imunohistokemije na cjelokupnim (engl. *whole-mount*) uzorcima. Preuzeto i prilagođeno iz Hammond-Weinberger i Zeruth 2019.

5. Istraživanja lokalizacije i ekspresije proteina u ribi zebrici

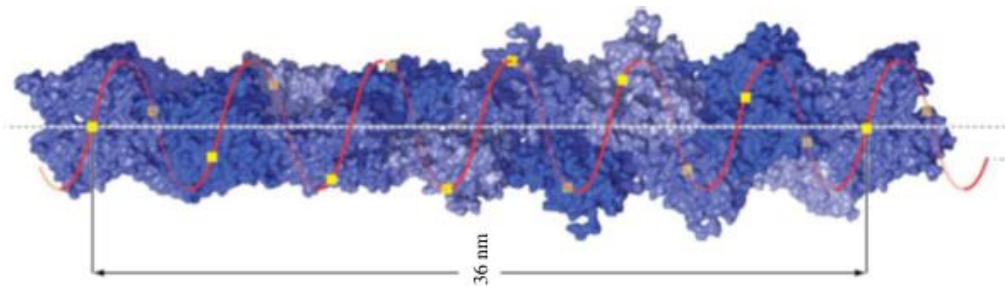
Funkcionalne aktivnosti proteina odgovaraju njihovoj unutarstaničnoj ekspresiji i molekularnim interakcijama što dovodi do toga da je funkcionalna karakterizacija svakog pojedinog proteina glavni izazov postgenomske ere (Hartmann i sur. 1996; Bryant i Stow 2004; Dönnés i Höglund 2004; Shurety i sur. 2000). Važan korak na ovom putu je utvrđivanje unutarstanične lokalizacije svakog proteina. Lokalizacija proteina se može učinkovito prikazati tehnikama temeljenim na fluorescentnoj mikroskopiji ili postupcima frakcioniranja. Široki spektar fluorescentnih slika može se dobiti upotrebom rekombinantnih proteina, fluorescentnih boja ili molekula obilježenih fluoroforom. Stoga, napredak u genetski modificiranim sustavima sa fluorescencijom i optičkim uređajima za mikroskopiranje omogućio je da fluorescencijska mikroskopija postane osnovni pristup za lokalizaciju proteina (Dönnés i Höglund 2004; Stadler i sur. 2013). Embriji i ličinke ribe zebrice danas su korišteni kao modelni organizmi u raznim područjima istraživanja koja se bave proučavanjem razvoja, regeneracije i starenja organizma, proučavanjem različitih aspekata imunskog sustava i proučavanjem lokalizacije, ekspresije i funkcije proteina (Van Der Plas-Duivesteyn i sur. 2014). Analiza funkcije proteina ključna je za modernu biologiju. Stoga je proteomika kao interdisciplinarna znanost koja se bavi proučavanjem proteina, nositelja svih bioloških funkcija, postala je moćan alat za pronalazak odgovora na razna biološka pitanja (Lundberg i Borner 2019).

5.1. Lokalizacija i ekspresija aktina u ribi zebrici

Aktin je najzastupljeniji protein u većini eukariotskih stanica čineći do 15 % ukupnih proteina, a mnoge vrste proteina koji vežu aktin mogu činiti još 10 % ukupnih staničnih proteina. Od 1970-ih znanstvenici otkrivaju nove proteine koji vežu aktin (Pollard 2016). Od kvasca do viših biljaka i sisavaca, aktin ima jednu od najočuvanijih aminokiselinskih sekvenci. Broj aktinskih gena znatno se povećao tijekom evolucije, ali svi njihovi produkti imaju male razlike u aminokiselinskom slijedu, a time i u njihovoj strukturi (Silván i sur. 2013). Primjerice poznato je da u kvascu postoji jedan, u *Dictyostelium-u* 17, a u čovjeka jedan gen za protein aktin. Molekulska masa proteina aktina je 42 kDa i poznato je da on polimerizira stvarajući filamente u obliku tankih, fleksibilnih

vlakana promjera ~ 7 nm i duljine do nekoliko mikrometara. U stanicama se aktin nalazi u koncentracijama većim od $100 \mu\text{M}$ (Cooper 2000). Unutar stanice aktinski filamenti ili mikrofilamenti organizirani su u strukture višeg reda, tvoreći snopove ili trodimenzionalne mreže sa svojstvima polukrutih gelova. Sastavljanje i rastavljanje aktinskih filamenata, njihovo spajanje u snopove i mreže i njihovo povezivanje s drugim staničnim strukturama poput stanične membrane regulirano je raznim proteinima koji vežu aktin, a koji su ključne komponente citoskeletnog aktina. Aktinski filamenti se u posebno velikom broju nalaze ispod stanične membrane, gdje tvore mrežu koja pruža mehaničku potporu, određuje oblik stanice i omogućuje kretanje stanične površine, što pak omogućuje stanicama da migriraju, zahvaćaju čestice i dijele se (Cooper 2000). Genetske greške u komponentama citoskeletnog i pokretnog sustava aktina uzrokuju mnoge ljudske bolesti, uključujući mišićnu distrofiju, nasljednu hemolitičku anemiju i kardiomiopatije (Pollard 2016).

Strukturne organizacije aktina su monomerni G-aktin i filamentozni F-aktin. Aktin ima sposobnost prijelaza između monomernih i filamentoznih stanja pod kontrolom hidrolize nukleotida, iona i velikog broja proteina koji vežu aktin te čine ga važnim u mnogim staničnim funkcijama. Sudjeluje u puno više reakcija između proteina nego bilo koji poznati protein. Tako primjerice interakcija filamentoznog aktina s miozinom čini osnovu kontrakcije mišića (Dominguez i Holmes 2011). Iako su usko povezane, strukture aktinske podjedinice G-aktina i F-aktina zapravo su različite. S obzirom da nije bilo moguće kristalizirati aktinske niti, strukturne pojedinosti aktinskog filameta izvedene su iz dijagrama rendgenskih vlakana gelova F-aktina uz pomoć elektronske mikroskopije (EM). EM negativno obojenih aktinskih vlakana pokazala je da je F-aktin izrađen od dva lanca koja se okreću jedan oko drugog i tvore desnu, dugačku dvolančanu zavojnicu (Hanson i Lowy 1963). Stvarna simetrija je lijevo orijentirana spirala s približno 13 molekula koje se ponavljaju svakih šest zavoja u aksijalnoj udaljenosti od $35,9$ nm. Udaljenost između molekula duž osi zavojnice je $27,6 \text{ \AA}$. Međutim, budući da je uvijanje po molekuli blizu 180° ($-166,6^\circ$), struktura se zapravo čini poput dva desno orijentirana lanca (Slika 14).



Slika 14. Spiralna struktura F-aktina dobivena krio-elektronskom mikroskopijom. preuzeto i prilagođeno iz Dominguez i Holmes, 2011.

Kod zebrića postoje dva citoplazmatska aktina: aktin B1 (aktb1) i aktin B2 (aktb2) (Bateman 2019). Razlikuju se samo u jednoj aminokiselini na položaju 3, s glutaminskom kiselinom u B1 i asparaginskom kiselinom u B2. B1 i B2 dijele značajnu homologiju s beta i gama aktinima čovjeka, sa samo 3-5 promjena u aminokiselinama. Kako te razlike mijenjaju svojstva aktina još nije poznato, ali uzimajući u obzir sličnost aktina zebrića s beta i gama aktinima, ostaje nejasno da li se citoplazmatski aktini zebrića mogu svrstati u bilo koju od ove dvije klase ili predstavljaju evolucijske međuprodukte. Vizualizacija aktina u zebrića je moguća pomoću bojanja faloidinom, *LifeAct*-om i *Utrophin-CH* domenom, *SiR-actin*-om, *Actin chromobody*-em, injekcijom obilježenih aktina i obilježavanjem C-kraja proteina moesina u transgenih životinja *in vivo* (Pinto i sur. 2020).

5.2. Istraživanje procesa razvoja i starenja u ribi zebriću

Kao najbrojnija i filogenetski najraznolikija skupina kralježnjaka, ribe doprinose novim saznanjima o temeljnim procesima u evoluciji, razvoju i bolestima kralježnjaka. Više od 100 godina ribe su davale jedinstven uvid u staničnu biologiju, fiziologiju, razvoj i imunologiju (Powers 1989; Casebolt i sur. 1998). Visoka razina očuvanosti genetskih mehanizama koji kontroliraju razvoj i temeljne fiziološke procese prisutna je među svim kralježnjacima, kao i između beskralježnjaka i kralježnjaka. Endokrini sustavi su visoko očuvani između riba i drugih kralježnjaka. Ribe posjeduju većinu vrsta tkiva sisavaca, osim dojke, prostate i pluća. Ribe su desetljećima služile u otkrivanju opasnosti za okoliš kao modelni sustavi za toksikologiju i procjenu rizika (Harshbarger i Clark 1990). Zebrića se tradicionalno koristi za proučavanje embrionalnog razvoja i pruža koristan uvid u post-transkripcijske mehanizme tijekom oogeneze i embrionalnog razvoja (Zaucker i sur. 2020). Embrij ribe zebrića je optički proziran i omogućuje vizualno praćenje razvoja stanica

tijekom organogeneze. To omogućuje znanstveniku da prati razvoj od oplodnje do prvih trenutka slobodnog plivanja kod aktivno hranećih ličinki. Embriji ribe zebrice izlegu se dva dana nakon oplodnje i počnu se aktivno hraniti petog dana nakon oplodnje. Tijekom prvih 5 dana razvijaju se i počinju funkcionirati svi važniji organski sustavi (Veldman i Lin 2008). Osim toga, zebrice se mogu razmnožavati tijekom cijele godine sa ženkama koje su sposobne proizvesti nekoliko stotina embrija svaki tjedan. Obilje potomaka osobito je povoljno za istraživanja genetskog kartiranja i pokuse koji zahtijevaju velike veličine uzoraka (Veldman i Lin 2008). Razvijeni su mnogi novi alati za oslikavanje i manipulaciju ranim razvojnim procesima u zebrici. Fluorescentne boje ili drugi markeri pomažu u vizualizaciji staničnih loza (Kimmel i Warga 1988; Kimmel 1989; Solnica-Krezel i sur. 1995) Širok raspon histokemijskih markera za ekspresiju proteina i gena omogućuje identifikaciju različitih staničnih tipova i često otkriva funkcionalne sposobnosti, poput sinteze dušikovog oksida ili specifičnih neurotransmitera, tijekom razvoja tkiva (van Raamsdonk i sur. 1980; Van Nassauw i sur. 1991; Byrd i Brunjes 1995; Cerdà i sur. 1998; Connaughton i sur. 1999; Yelon i sur. 1999; Cox i Singer 1999; Caminos i sur. 2000; Kawai i sur. 2001; Tsai i sur. 2001; Wullimann i Rink 2001;).

Razumijevanje molekularnih mehanizama starenja kralježnjaka glavni je izazov biologije i biomedicinskih znanosti. Razlog tome je složenost procesa starenja, nedovoljan broj prikladnih životinjskih modela i poteškoće u predviđanju fenotipa u ranoj dobi (Hoffman i McNaughton 2002; Peters 2002; Herbig i sur. 2006; Francis i sur. 2008). Genetski model zebrice nudi priliku za popunjavanje ove praznine i doprinosi napretku u biološkoj i bihevioralnoj gerontologiji (Gerhard i Cheng 2002; Kishi i sur. 2003; Keller i Murtha 2004; Yu i sur. 2006; Tsai i sur. 2007; Zhdanova i sur. 2008). Nedavna istraživanja pokazala su da je zebrica kao kralježnjak s postupnom senescencijom izvrstan model u kojem se mogu proučavati dobno ovisne promjene u mišićno-koštanoj i očnoj morfologiji, endokrinim čimbenicima, ekspresiji gena, cirkadijalnim ritmovima, spavanju i kognitivnim funkcijama (Kishi i sur. 2009). Otkrivena je i prisutnost biomarkera β -galaktozidaze povezanog sa starenjem koji se može uočiti tijekom ranog razvoja zebrice i upotrijebiti za predviđanje fenotipa preranog starenja odraslih jedinki (Kishi i sur. 2003, 2008; Tsai i sur. 2007). Dostupnost mutiranih „genotipova“ s identificiranim „fenotipovima starenja“ u zebrici, u kombinaciji s bogatstvom informacija o razvoju i genetici zebrice, i postojanjem više mutiranih i transgenih linija, trebalo bi značajno olakšati upotrebu ovog izvanrednog modela kralježnjaka u otkrivanju mehanizama starenja i razvijanju preventivnih i terapijskih planova za

produljenje produktivnog životnog vijeka kod ljudi (Kishi i sur. 2009). Međutim, korisnost zebrica kao modela starenja dovedena je u pitanje zbog njihove sposobnosti regeneracije i mogućeg neodređenog rasta. Ipak, budući da regeneracijska sposobnost zebrica opada s godinama, i povećava se vjerojatnost fizioloških oštećenja, postupno starenje se još uvijek događa (Keller i Murtha 2004). U starijih ljudi identificirane su mnoge sličnosti sa ribama zebricama. Primjerice, prilikom starenja ljudi i zebrica dolazi do nakupljanja oksidiranih bjelančevina, manje funkcionalnosti mitohondrija i degeneracije koštanih mišića (Gerhard i Cheng 2002; Doherty 2003; Kishi i sur. 2003, 2009; Short i sur. 2005). Nadalje, model zebrice može se koristiti za proučavanje učinkovitosti vježbanja kao moguće metode za ublažavanje učinaka starenja. Istraživanja pokazuju da u zebrica sa starošću dolazi do smanjene sposobnosti organizma s godinama. Ova otkrića podsjećaju na propadanje tjelesnih sposobnosti koje imaju ljudi i modeli starenja sisavaca te se stoga podržava uporaba zebrica kao modela za proučavanje tjelesne aktivnosti čovjeka i starenja (Marck i sur. 2019). Također, starost je najveći faktor rizika za neke od najzastupljenijih bolesti čovjeka poput tumora. Smatra se da skraćivanje telomera igra središnju ulogu u procesu starenja kod ljudi. Poveznica između telomera i starenja naglašava činjenica da su genetske bolesti koji uzrokuju nedostatak enzima telomeraze povezane s preuranjenim starenjem i povećanim rizikom od tumora (Armanios i sur. 2005). Za razliku od miševa, koji imaju duge telomere, zebrica je komplementarni model ljudima jer ima kratke telomere koje se skraćuju sa starošću jedinke (Wong i sur. 2003). Visoka očuvanost fenotipova i molekularnih mehanizama između čovjeka i zebrice u kontekstu disfunkcije telomera čine zebricu izvrsnim modelom za otkrivanje odnosa između skraćivanja telomera, regeneracije tkiva, starenja i bolesti (Carneiro i sur. 2016).

5.3. Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Na^+/K^+ -ATPaze u ribi zebrici

Stanične membrane mjesta su aktivnog prijenosa kationa koji održavaju koncentracijski gradijent između stanice i izvanstaničnog prostora (Glynn 2002). Ionski gradijenti i membranski potencijali izvedeni iz spomenutog prijenosa iona kroz membranu čine osnovu za niz bitnih staničnih procesa (Hodgkin i Huxley 1952). To se posebno odnosi na o natriju ovisnom primarnom i o protonima ovisnim sekundarnim transportnim sustavima koji su odgovorni za unos i izlučivanje staničnih metabolita i drugih iona. Ionski gradijenti se također izravno i neizravno koriste za kontrolu

homeostaze pH (izvan)staničnih tekućina i za regulaciju staničnog volumena (Post i Jolly 1957; Morth i sur. 2011).

Svi kopneni i neki vodeni kralježnjaci uspješno su razvili mehanizme za regulaciju ionske i osmotske homeostaze različitih tjelesnih tekućina što omogućava održavanje fizioloških procesa na razini stanica, organa i cijelog organizma. Za održavanje ionske i osmotske homeostaze tjelesnih tekućina u kopnenih kralježnjaka primarno su zaduženi bubrezi, a u vodenih kralježnjaka, poput riba, to su škrge (Evans i sur. 2005; Hwang i sur. 2011; Guh i sur. 2015).

Nadalje, nekoliko istraživačkih skupina koristilo je model ribe zebrice za proučavanje integrativne i regulatorne fiziologije koja uključuje epitelni prijenos tvari povezan s održavanjem ionske i osmotske homeostaze tjelesnih tekućina (Hwang i Chou 2013). Zebrica, slatkovodna riba, nastanjuje hipotonično slatkovodno okruženje s niskim ionskim koncentracijama (u usporedbi s onima u krvnoj plazmi) i promjenjivim pH, te stoga mora aktivno apsorbirati ione i izlučivati kiseline i amonijak u okoliš kako bi održala homeostazu tjelesnih tekućina. Većinu ovih zadataka vezanih uz regulaciju iona obavljaju škrge, a ionociti unutar škrge glavni su tipovi stanica koji sudjeluju u epitelnom prijenosu iona (Evans i sur. 2005). Ionociti su analogni transportnim stanicama u različitim segmentima bubrega sisavaca, što uključuje ekspresiju i funkciju ionskih prijenosnika ili transportera. Tijekom embrionalnih stadija, prije potpunog funkcionalnog razvoja škrge, dolazi do razvoja ionocita u embrionalnoj koži već 24 h nakon oplodnje (Hwang 2009; Hwang i Perry 2010; Chang i Hwang 2011). Stoga, embriji ribe zebrice služe kao moćan *in vivo* model za proučavanje fiziologije i regulacije epitelnog transporta iona iz sljedećih razloga: 1) ionociti u koži embrija izravno su izloženi okolišu, a morfologija i ekspresija njihovog ionskog transportera može se lako promatrati *in situ* bez daljnje anatomske manipulacije, 2) prijenos iona može se izravno ispitati neinvazivnim elektrofiziološkim pristupima ili upotrebom fluorescentnih proba i radioizotopa, 3) gubitak ili razvoj funkcije prijenosnika ionocita može se analizirati u roku od 1–5 dana nakon oplodnje, i 4) inkubacija embrija ili odraslih jedinki zebrice u podlogama s različitim ionskim sastavima (uključujući promjene koncentracije iona Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , NH_4^+ , pH vrijednosti i drugih parametara) može olakšati istraživanje važnosti prijenosa i regulacije određenog iona ciljajući određenu vrstu prijenosnika ili ionocita (Hwang i Chou 2013).

Jedan od fiziološki važnih proteina koji aktivno održava homeostazu životinjskih stanica, a onda i tjelesnih tekućina jest membranski protein Na^+/K^+ -ATPaza. Ovaj membranski protein pripadnik je obitelji P aktivnih proteina kationskog transporta (Skou i sur. 1992; Morth i sur. 2011).

Na^+/K^+ pumpa neophodna je za sve stanice sisavaca. U mirovanju se troši 20–30 % proizvodnje ATP-a za aktivni transport Na^+ iz i K^+ u stanicu. Na^+ i K^+ gradijenti potrebni su za održavanje membranskih potencijala, staničnog volumena i sekundarnog aktivnog transporta ostalih otopljenih tvari, npr. transcelularnog transporta u crijevima, žlijezdama i bubrezima (Jørgensen i sur. 2003). Sastoji se od heterodimernih ekvimolarnih količina funkcionalnih α i β podjedinica (Jørgensen 1974). α -podjedinica sadrži katalitičko mjesto za hidrolizu ATP-a i stanični je receptor za srčane glikozidne lijekove poput ouabaina i digitalisa (Jørgensen 1974; Cantley 1981). Podjedinica β je glikozilirani polipeptid i bitna je komponenta Na^+/K^+ -ATPaze (Cantley 1981). Međutim, točna uloga β podjedinice u aktivnosti enzima još nije utvrđena. Kod sisavaca su identificirana 4 izoformna oblika α -podjedinice i najmanje tri izoforme β -podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze (Price 1990; Axelsen i Palmgren 1998). Izoformni oblici se kombiniraju kako bi tvorili razne oblike Na^+/K^+ -ATPaza specifične za tkivo i stanice (Jørgensen i sur. 2003).

Po cijelom tijelu izražena je $\alpha 1$ podjedinica (Shyjan i Levenson 1989) dok $\alpha 2$ podjedinica prevladava u mozgu, srcu i skeletnim mišićima, dok je $\alpha 3$ podjedinica ograničena na tkiva neuronskog podrijetla (Shyjan i Levenson 1989; Cameron i sur. 1994). Do sada je kod ljudi i glodavaca otkrivena isključivo ekspresija $\alpha 4$ podjedinice u epididimisu i testisu (Underhill i sur. 1999; Woo i sur. 1999). Podjedinice $\beta 1$ i $\beta 3$ su sveprisutne, dok je izoforma $\beta 2$ pretežno izražena u mozgu (Shyjan i Levenson 1989; Malik i sur. 1996, 1998). U postgenomskoj eri istraživanja proteina u određenim organima ili staničnim vrstama postala su složenija zbog otkrića dodatnih izoformi proteina. Riba zebrica može biti prikladna za *in vivo* istraživanja s obzirom na dostupne genetske podatke i primjenjivosti zebrica na različite molekularno fiziološke pristupe (Hwang i sur. 1998; Cheng i sur. 2003). Identificirana je skupina sekvenci u zebrica koje kodiraju za Na^+/K^+ -ATPazu; osam α podjedinica i pet β podjedinica. Usporedbe sekvenci i filogenetska analiza pokazuju da pet gena α podjedinice zebrice obuhvaćaju podporodicu gena nalik $\alpha 1$ i dva su ortologna gena $\alpha 3$ podjedinice sisavaca. Preostali klon α podjedinice najbliži je $\alpha 2$ podjedinici sisavca (Rajarao i sur. 2001). Među pet gena β podjedinice, dva su ortologa $\beta 1$ izoforme sisavaca, jedan predstavlja $\beta 2$ ortolog, a dva su ortologna $\beta 3$ podjedinici sisavca (Rajarao i sur. 2001). Mapiranja pokazuju da se većina gena Na^+/K^+ -ATPaze zebrica lokalizirana u očuvanim regijama sinteze između zebrica i ljudi. Ekspresija gena podjedinica Na^+/K^+ -ATPaza u zebrica prilično je prepoznatljiva jer nijedna dva gena α ili β podjedinice ne pokazuju isti profil ekspresije (Rajarao i sur. 2001). Zebrica ima vrlo visok stupanj heterogenosti izoenzima Na^+/K^+ -ATPaze s potencijalom

za 40 strukturno različitih kombinacija α/β podjedinica. Razlike u ekspresiji α i β podjedinica sugeriraju da će mnogi izoenzimi vjerojatno pokazivati razlike u funkcionalnim svojstvima unutar određenih tipova stanica i tkiva (Rajarao i sur. 2001). Jedna od mogućih metoda identifikacije Na^+/K^+ -ATPaze je uz pomoć protutijela a6F (Takeyasu i sur. 1988; Drummond i sur. 1998). Koristi se u tehnikama poput ELISA-e (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), FFPE, imunofluorescencije, imunohistokemije, imunoprecipitacije i Western Blot-a. Preporučeno razrijeđenje protutijela varira ovisno o istraživanju. Protutijelo a6F prepoznaje citosolni epitop na alfa podjedinici Na^+/K^+ -ATPaze, izoformu alfa-1. (<https://dshb.biology.uiowa.edu/a6F>, Takeyasu i sur. 1988). Bubrežna riba zebrica ima mnoge sličnosti s bubrezima drugih kralježnjaka, uključujući i ljudski bubrežni. Slični tipovi stanica i zajednički razvojni mehanizmi i mehanizmi oblikovanja čine ribe zebrice dragocjenim modelom za organogenezu bubrega (Drummond i Davidson 2016). Bubrežni ima dvije glavne funkcije: uklanjanje otpada iz krvi i uravnoteženje koncentracije iona i metabolita u krvi unutar fizioloških raspona koji održavaju pravilno funkcioniranje svih ostalih stanica (Vize i sur. 2003). Funkcija bubrega postiže se uglavnom filtriranjem krvi koju rade nefroni, funkcionalne jedinice bubrega, a zatim povratkom korisnih iona i malih molekula usmjerenim epitelnim transportom. Nefron se sastoji od krvnog filtra, nazvanog glomerulus, pričvršćenog na cjevasti epitel. Glomerulus sadrži specijalizirane epitelne stanice podocyte, a bazalna membrana između podocita i kapilarnih endotelnih stanica, zajedno sa specijaliziranim spojevima između podocitnih stanica djeluje kao prepreka za filtraciju krvi, omogućujući prolazak malih molekula, iona i tekućine iz krvi u mokraćni prostor, pritom zadržavajući proteine visoke molekularne težine u krvožilnom sustavu. Filtrat krvi putuje niz lumen bubrežnih kanalića, nailazeći na različite proksimalne i distalne segmente koji utječu na sastav urina. Urin se odvodi putem sabirnih kanala, koji dalje modificiraju njegov sastav soli i vode, dok ne izađe izvan tijela (Vize i sur. 2003). Unatoč nekim razlikama u morfologiji organa između različitih oblika bubrega, mnogi uobičajeni elementi postoje na staničnoj i molekularnoj razini što može biti iskorišteno za naše opće razumijevanje bubrežnog razvoja i biologije. Nadalje, polaritet stanica i pravilno vezanje iona za specifične membranske prijenosnike presudni su za njihov pravilan transport i održavanje funkcije bubrega. Prije stvaranja lumena, komponente kompleksa apikalne polarnosti, atipične protein kinaze C (jota i zeta), lokalizirane su na apikalnoj membrani i djeluju na isključivanje bazolateralne Na^+/K^+ -ATPaze iz apikalne domene. Utvrđeno je da nekoliko mutanata riba zebrice utječe na migraciju Na^+/K^+ -ATPaze u kanalićima od njezina fiziološki uobičajenog mjesta na bazolateralnoj membrani

do apikalne membrane (Drummond i sur. 1998) (Slika 15). Aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze pruža pokretačku snagu mnogim drugim povezanim transportnim sustavima (Alpern i sur. 2008), a promjena u njezinoj lokalizaciji upućuje da postoje ozbiljni problemi u osmoregulaciji (Drummond i sur. 1998).



Slika 15. Polarizirana raspodjela Na^+/K^+ -ATPaze u epitelnim stanicama kanalića pronefrosa starosti 2,5 dana vizualiziranih $\alpha 6\text{F}$ monoklonskim antitijelom. Na površini apikalne stanice nema bojanja, dok je bojanje jako na bazolateralnoj površini stanica (Drummond i Davidson 2016).

6. Cilj istraživanja

Zbog sve učestalije prisutnosti zebrice kao *in vivo* modelnog organizma u različitim područjima biomedicinskih istraživanja čiji je cilj odrediti fiziološku i ekotoksikološku ulogu pojedinih proteina, od velike je važnosti razviti i optimizirati metode i tehnike potrebne za proučavanje prostorne lokalizacije i ekspresije proteina u različitim organima, tkivima i stanicama navedenog modela. Detaljni pregled dostupne literature ukazuje na malu zastupljenost kriopreparata u analizama lokalizacije i ekspresije važnog citoskeletnog proteina F-aktina u modelu zebrice. Osim toga, postojeći protokoli za pripremu i upotrebu kriopreparata u svrhu utvrđivanja lokalizacije i ekspresije proteina poput F-aktina u različitim organima i tkivima zebrice ograničeni su na pojedine razvojne stadije ovog modela. S obzirom na navedeno, smatramo kako je moguće optimizirati i ujediniti postojeće protokole za pripremu i obradu kriopreparata ribe zebrice u svrhu njihove upotrebe za određivanje lokalizacije i ekspresije proteina F-aktina korištenjem fluorescencijske

mikroskopije u svim razvojnim stadijima zebrice (embriji, ličinke i odrasle jedinke). Pretpostavljamo da bi čimbenici poput vremena fiksacije uzoraka u 4 % PFA, inkubacije uzoraka u različitim smjesama govede želatine i saharoze, i rezanja uzoraka na određenoj temperaturi i debljini mogli biti bitni za optimalnu pripremu i obradu kriopreparata za detekciju lokalizacije i ekspresije proteina F-aktina. Budući u zebrice dosada nije istražena starosno-ovisna lokalizacija i ekspresija proteina F-aktina, pretpostavljamo da bi razina spomenutog proteina u organima i tkivima ribe zebrice mogla biti ovisna o starosti jedinke. Također, pretpostavljamo da bi optimizirani protokol za pripremu i obradu kriopreparata mogao poslužiti za istraživanje detaljne lokalizacije i ekspresije drugih fiziološki važnih membranskih proteina poput Na^+/K^+ -ATPaze.

Stoga, specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) Optimizirati i ujediniti postojeće protokole za pripremu kriopreparata ribe zebrice sa očuvanim anatomsko-histološkim odnosima.
- 2) Optimizirati uvjete za obradu kriopreparata zebrice za uspješno vezanje fluorescentno obilježenog faloidina u svrhu određivanja detaljne lokalizacije i ekspresije proteina F-aktin.
- 3) Istražiti moguće starosne razlike u ekspresiji proteina F-aktina histokemijskom analizom upotrebom fluorescencijske mikroskopije u različitim organima i tkivima zebrice.
- 4) Ispitati kompatibilnost prethodno optimiziranog i jedinstvenog protokola za određivanje lokalizacije i ekspresije membranskih proteina upotrebom komercijalno dostupnog specifičnog protutijela za fiziološki važan protein Na^+/K^+ -ATPazu.

7. Materijal i metode

7.1. Materijal

7.1.1. Pokusne životinje

- Ribe vrste *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska).
- E3 Medij za razvoj embrija (50x, čuvati na temperaturi + 4 °C, pH = 7,8)
 - 7,305 g NaCl, 250 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,317 g KCl, 8,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,916 g CaCl₂, g 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 0,993 g MgSO₄, 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 500 mL deH₂O

7.1.2. Pufferi, otopine i kemikalije

7.1.2.1. Fiksacija, dekalifikacija i rezanje tkiva kriomikrotomom

- Paraformaldehid (PFA): 4 % otopina u 1x PBS puferu:
 - 20 g PFA (Sigma, SAD)
 - 500 mL 1x PBS (recept u nastavku)
- PBSt, pH 7,4: 1x PBS koji sadrži koji sadrži 0,1 % neionskog surfaktanta Tween 20:
 - 1 L 1x PBS (recept u nastavku)
 - 1 mL Tween 20 (Calbiochem, SAD)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA): 0.35 M EDTA (pH 7,8):
 - 51,14 g EDTA (Sigma, SAD)
 - 500 mL deH₂O
 - ~25 mL 10N NaOH za prilagodbu pH vrijednosti (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev azid (NaN₃), 20 % otopina u deH₂O:
 - 20 g NaN₃ (Fisher Scientific, SAD)
 - 100 mL deH₂O

- Saharoza: 30 % otopina u 1x PBS puferu sa 0,02 % NaN₃:
 - 30 g saharoza (Fisher Scientific, SAD)
 - 100 mL deH₂O
 - 100 μL 20 % NaN₃
- Smjesa komercijalno dostupne goveđe želatine (0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2,5 %, 5 % i 15 %) i 25 % saharoze u deH₂O sa 0,02 % NaN₃ (IMI, Hrvatska)
 - 0,5 g, 1 g, 2,5 g, 5 g ili 15 g komercijalno dostupna mljevena bijela goveđa želatina (dr. Oetker, Njemačka)
 - 25 g saharoza
 - 100 mL deH₂O
 - 100 μL 20 % NaN₃
- Polimerni medij za uklapanje O.C.T. (engl. *Optimal Cutting Temperature*) (Leica Biosystems, Njemačka)

7.1.2.2. Histokemijska i imunofluorescencijska analiza

- 1x PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*), pH 7,4:
 - 7,95 g NaCl, 140 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 200 mg KCl, 2,7 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1,14 g Na₂HPO₄, 8 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 272 mg KH₂PO₄, 2 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1 L deH₂O
- Triton-X-100: 0,1 %; 0,5 % i 2 % otopina u 1x PBS puferu:
 - 0,1 g, 0,5 g ili 2 g Triton-X-100 (Merck, Njemačka)
 - 100 mL 1x PBS
- Vectashield: 25 % otopina za očuvanje fluorescencije u puferu za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina:
 - 300 μL Vectashield (Vector Laboratories, SAD)
 - 900 μL puferu za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina (recept u nastavku)
- Pufer za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,9:
 - 18,17 g Tris (Sigma, SAD)

- 100 mL deH₂O
- 10 % HCl za prilagođavanje pH vrijednosti (Kemika, Hrvatska)
- SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*): 1 % otopina u deH₂O:
 - 1 g SDS (Sigma, SAD)
 - 100 mL deH₂O
- BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*): 1 % otopina u 1x PBS puferu
 - 1 g BSA (Sigma, SAD)
 - 100 mL deH₂O

7.1.2.3. Peptidi i protutijela za histokemijske i imunofluorescencijske analize

- Faloidin–FITC (engl. *Phalloidin–Fluorescein Isothiocyanate*) – ciklički heptapeptid obilježen fluorescencijskom bojom fluorescein izotiocijanat; 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich/Merck; P5282-1MG, Njemačka)
- Primarno protutijelo: protutijelo za protein $\alpha 1$ podjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze (Na⁺/K⁺-Ab) – monoklonsko protutijelo proizvedeno u stanicama miša upotrebom imunizirajućeg peptida N-terminalnog kraja proteina Na⁺/K⁺-ATPaza (slijed aminokiselina između 27-55); 43 μ g/mL (a6F, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, Sveučilište Iowa, SAD)
- Sekundarno protutijelo: DAM–CY3 (engl. *Donkey Anti-Mouse-CY3*) – magareće protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno fluorescencijskom bojom CY3; 1,2 μ g/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)

7.1.3. Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- Jednokratni plastični kriokalupi 25mm x 20 mm x 5 mm (Adwin Scientific, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Fluorescencijski mikroskop: OPTON III RS (Opton Feintechnik, Njemačka)
- Digitalna kamera za fluorescencijski mikroskop: Spot RT (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- Kriomikrotom: Leica CM 1850 (Leica Instruments, Njemačka)
- Nož za kriomikrotom: High Profile Disposable Blade Leica 818 (Leica Biosystems, Njemačka)
- Hladnjaci (4 °C) i zamrzivači (-20 °C i -80 °C)

- Računalo: Asus MSGW
- Digestor
- Tehnička vaga
- Analitička vaga
- Vibracijska miješalica: Genie 2 Vortex (Fisher Scientific, SAD)
- Orbitalna mješalica: Thermolyne BIG BiII Orbital Shaker (Thermolyne, SAD)
- Automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 μL ; 0,5-10 μL ; 2-20 μL ; 20-200 μL i 100-1000 μL) (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 μL) (Eppendorf, Njemačka)
- Pokrovna stakalca Menzel-Glaser (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Predmetna stakalca Superfrost/Plus (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Kutije za mikroskopska stakalca (Heathrow Scientific, SAD)

7.1.4. Računalni programi

- SPOT RT v3.4 (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- Adobe Photoshop 6.0 (<http://www.adobe.com>)
- ImageJ/FIJI 1.53c (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- Statistica 14.0.0.15 (<http://tibco.com>)

7.2. Metode

7.2.1. Uzgoj i uzorkovanje pokusnih životinja

Prilikom ovog istraživanja koristila sam spolno nezrele (1.-5. dana nakon oplodnje) i spolno zrele (30.-44. dan nakon oplodnje) ribe vrste *Danio rerio* uzgojene u Laboratoriju za ekotoksikologiju mora Instituta Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu. Uzorkovala sam 20 jedinki u svakoj od 5 starosnih skupina koje su činili embriji starosti 24 h i 48 h nakon oplodnje te ličinke starosti 3, 4 i 5 dana nakon oplodnje. Uzorkovala sam i jednu odraslu jedinku ribe zebrice ženskog spola (ukupne duljine tijela 10 mm) za testiranje protokola pripreme kriopreparata i upotrebu u histokemijskom protokolu za obilježavanje i lokalizaciju F-aktina. Sve jedinke su uzgojene u akvarijskom sustavu PP-Module (AquaSchwarz, Njemačka) u kontroliranim uvjetima pri čemu je temperatura vode u akvarijskom sustavu održavana konstantnom između 27 do 29 °C, pH vrijednost vode od 7 do 8,2, konduktivitet 1000-12000 μ S, a uvjeti svjetla i tame u odnosu 14h:10h (Slika 16). Spomenuti akvarijski sustav koristi vodu dobivenu reverznom osmozom vodovodne vode sa dodatkom smjese soli za akvarije. Prije ponovnog ulaska u akvarijski sustav, korištena voda prolazi kroz filtere sa porama veličina 120 i 50 μ m, biološki filter (Siporax) koji razgrađuje organske dušikove spojeve (npr. amonijak), apsorpcijski filter sa aktivnim ugljenom (uklanja prethodno neuklonjene organske spojeve i čestice) te se dodatno dezinficira ultraljubičastim filterom (UV vodena svjetiljka uklanja mikrobiološku kontaminaciju poput bakterija).



Slika 16. PP-Module (AquaSchwarz, Njemačka) za uzgoj riba zebrica u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković.

Ribe su hranjene jednom dnevno sa standardnom ribljom hranom odgovarajuće veličine (Gemma Micro, Skretting France). Za potrebe uzgoja spolno nezrelih jedinki koje sam koristila u ovom istraživanju mriještene su odrasle muške i ženske jedinke starosti 1-1.5 godine u mrijesticama u najvećem omjeru muški vs. ženski spol 3:1 (Slika 17). Ribe su potaknute na mrijest paljenjem svijetla u jutarnjim satima između 8-9h. Oplodeni mrijest je isti dan popodne između 16-17h prenijet u petrijevu zdjelicu sa E3 medijem te su odloženi u inkubator na 28 °C do uzorkovanja, najkraće 24 h i najdulje 5 dana nakon oplodnje. Sve aktivnosti vezano uz uzgoj i mrijest riba proveli su djelatnici Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković. Uzorke embrija i ličinku ribe zebrice iz različitih starosnih skupina inkubirala sam u volumenu od 1,5-2 mL otopine za fiksaciju tkiva (4 % paraformaldehidu; 4 % PFA). Zbog optimalne fiksacije uzoraka embrija starosti 24-48h, pincetama sam mehanički uklonila korion (ili vanjska embrionalna ovojnica) netom prije inkubacije u 4% PFA (Video). Ličinke starosti 3.-5. dana nakon oplodnje izravno sam uronila u 4 % PFA. Odraslu jedinku ženskog spola koju sam koristila u ovom istraživanju je prije uranjanja u otopinu 4 % PFA usmrćena temperaturnim šokom u vodi ispunjenoj ledom od strane djelatnika Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju. Svi pokusi na životinjama su odobreni od Etičkog povjerenstva IRB, Nacionalnog povjerenstva za dobrobit životinja i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-10/124120-9) prilikom odobravanja znanstveno-istraživačkog projekta DANIOTRANS (HRZZ-IP-2019-04-1147, voditelj: dr.sc. Tvrtko Smital) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

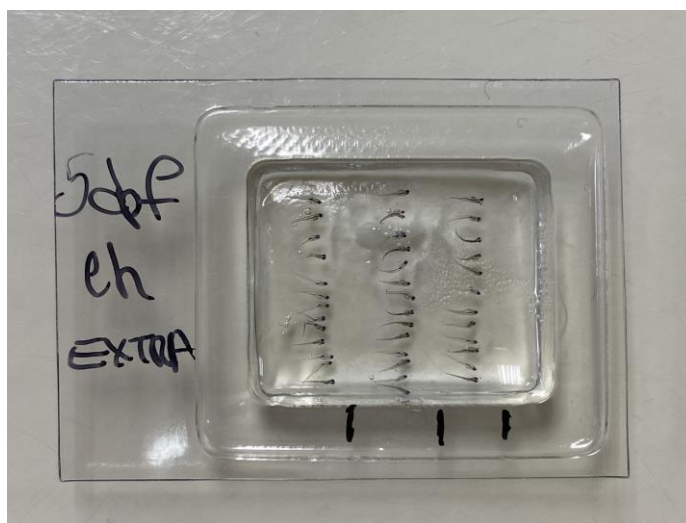


Slika 17. Prikaz (A) mrijestilica i (B i C) inkubatora za oplodnju i razvoj embrija ribe zebrice.

7.2.2. Izrada kriopreparata embrija i ličinki ribe zebrice

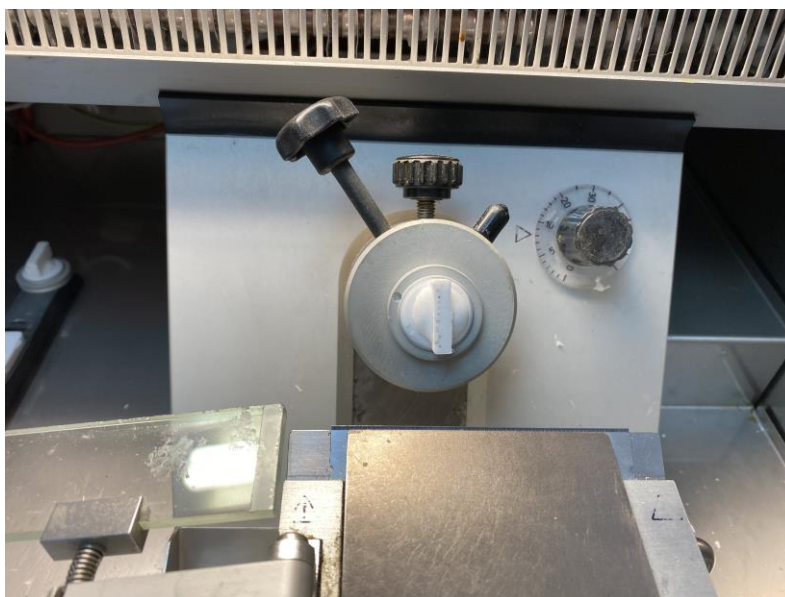
Za pripremu kriopreparata koristila sam modificirani protokol za uzastopnu imunofluorescenciju i immunohistokemijsku analizu kriopreparata (Ferguson i Shive 2019). Pri tome sam testirala različite vremenske intervale fiksiranja uzoraka (1 h i 24 h), pripremu uzoraka u različitim smjesama komercijalno dostupne goveđe želatine i saharoze (0,5 %, 1 %, 2,5 %, 5 % i 15 % želatine / 25 % saharoze) i rezanje tkiva ribe zebrice pri različitim temperaturama (-18 °C, -20 °C, -22 °C, -25 °C) i na različitim debljinama (4 µm, 6 µm, 8 µm i 10 µm). Koraci protokola za pripremu uzoraka ribe zebrice različitih razvojnih stadija (24 h – 5 dana nakon oplodnje) detaljno su opisani kako slijedi:

Uzorke sam fiksirala u 4% PFA u vremenu od 1 h i 24 h na 4 °C, isprala dva puta sa PBSt na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, a potom inkubirala u 1mL 30 % saharoze u otopini 1x PBS + NaN₃ tijekom 1 h. Uzorke sam nadalje inkubirala u predviđenoj smjesi (0,5-15%) želatine i 25% saharoze + 0.02% NaN₃ pri sobnoj temperaturi na klackalici preko noći. Nakon toga, pola volumena prethodne smjese zamjenila sam sa polimernim medijem za uklapanje uzoraka O.C.T. i inkubirala na sobnoj temperaturi na klackalici tijekom 1 h. Taj korak sam ponovila još 2 puta. Uzorke embrija i ličinka ribe zebrice sam potom prvo prenijela iz epice u pripremljeni prazni kriokalup pipetom (embriji) ili iglom veličine 25G (ličinke), a potom u pripremljeni kriokalup koji je do pola ispunjen čistim O.C.T. medijem (Slika 18).



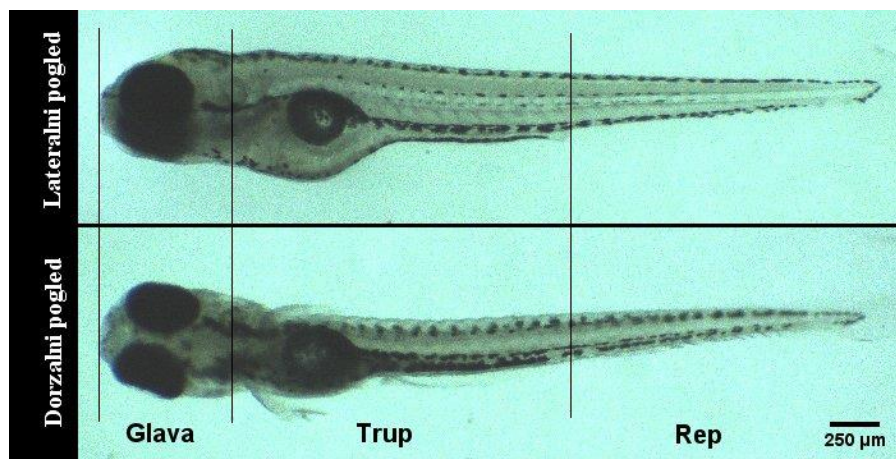
Slika 18. Prikaz ličinka ribe zebrice u željenoj orijentaciji u kriokalupu sa medijem za uklapanje uzoraka O.C.T.

Takav postupak je osigurao što manji prijenos prethodnog medija u čisti O.C.T. medij u kojem sam uzorke potom uklopila. Uzorke sam u O.C.T. mediju postavila u željenu orijentaciju i zajedno sa kriokalupom prenijela u prethodno ohlađen kriomikrotom na temperaturu između -18 i -25 °C bez agitacije. Uzorke sam ostavila da se zamrznu tijekom 15-30 min, a u međuvremenu sam na držač za rezanje uzoraka nanijela tanki sloj O.C.T. medija i prenijela ga u kriomikrotom na temperaturu između -18 i -25 °C bez agitacije da se zamrzne tijekom 15-30 min. Nakon toga, zamrznuti kriokalup sa uzorcima i pripremljeni držač za uzorke sam izvadila iz kriomikrotoma te sam zamrznuti blok O.C.T. medija sa uzorcima istisnula iz kriokalupa pazeći na orijentaciju uzoraka. Ukoliko je bilo potrebno odrezala sam suvišak O.C.T. medija od bloka sa uzorcima (debljine 2-5 mm) te ga uronila u netom nanešeni O.C.T. medij na zamrznutom držaču za rezanje uzoraka na način da sam prilikom rezanja uzorka mogla napraviti poprečne presjeke počevši od predjela glave uzorka. Tako pripremljeni držač sa uzorcima prenijela sam u kriomikotom na temperaturu između -18 i -25 °C bez agitacije i ostavila da se zamrzne tijekom 15 min. Držač sa uzorcima smjestila sam na pripadajuće mjesto za rezanje unutar kriomikrotoma te sam na postavljenoj debljini od 20-30 µm odrezala suvišak O.C.T. medija do mjesta na kojem su se pojavili prvi presjeci uzorka vidljivi na predmetnom stakalcu (Slika 19).



Slika 19. Prikaz uklopljenih uzoraka spolno nezrelih jedinki ribe zebrice u medij O.C.T. spremnih za rezanje krimonarezaka.

Tkivo sam rezala na debljinu od 4-12 μm , a poprečne presjeke uzoraka sam prikupila pomoću kista na obična i predmetna stakalca presvučena pozitivnim nabojem za bolje prijanjanje tkiva. Prikupljala sam poprečne presjeke u predjelu glave, trupa i repa ribe zebrice (Slika 20).



Slika 20. Prikaz dijelova tijela ribe zebrice čiji su poprečni presjeci prikupljeni u svrhu daljnjih (imuno)histokemijskih analiza.

Kvalitetu kriouzoraka sam provjeravala u stvarnom vremenu netom nakon rezanja pomoću svjetlosnog mikroskopa pri povećanju od 100 puta. Ukoliko kvaliteta uzoraka nije bila zadovoljavajuća ponovila sam rezanje do trenutka kada sam procjenila da je postignut najbolji presjek tkiva u zadanim uvjetima. Pripremljene kriopreparate sam potom bez prethodnog sušenja pohranila u kutiju za mikroskopska stakalca koja je odmah odložena u hladnjak na temperaturu od 4 °C (Slika 21).



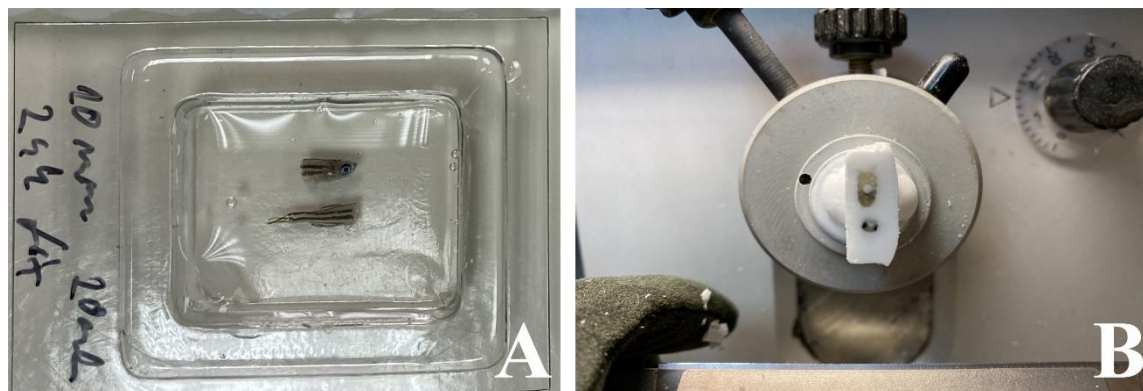
Slika 20. Prikaz dijelova tijela ribe zebrice čiji su poprečni presjeci prikupljeni u svrhu daljnjih (imuno)histokemijskih analiza.

7.2.3. Izrada kriopreparata odrasle jedinke ribe zebrice

Zbog razvijenog koštanog sustava u odrasle jedinke ribe zebrice koristila sam kombinaciju dijela protokola za pripremu histoloških preparata i prethodno opisanog modificiranog protokola za uzastopnu imunofluorescenciju i imunohistokemijsku analizu kriopreparata (Copper i sur. 2018; Ferguson i Shive 2019). Iz prvog protokola preuzela sam korake fiksacije i uklanjanja anorganskog dijela koštanog tkiva (dekalifikacija) upotrebom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), a iz drugog protokola korake pripreme, uklapanja i rezanja tkiva u kriomikrotomu. Koraci protokola za pripremu uzorka odrasle ribe zebrice (30-44 dana nakon oplodnje) detaljno su opisani kako slijedi:

Nakon usmrćivanja uzorak odrasle ribe zebrice sam fiksirala u 20 mL 4 % PFA u vremenu od 24 h na +4 °C, isprala dva puta u 1x PBS-u na sobnoj temperaturi na klackalici tijekom 15 minuta, a potom inkubirala u 0.35 M EDTA pH 7,8 na orbitalnoj mješalici pri +4 °C tijekom 5 dana (Copper i sur. 2018). Uzorak sam dalje inkubirala u 20 mL 30 % saharoze pri sobnoj temperaturi na klackalici preko noći te potom u 2 mL smjese 2,5 % želatine / 25 % saharoze + 0,02 % NaN₃ pri sobnoj temperaturi na klackalici preko noći. Nakon toga, pola volumena prethodne smjese zamjenila sam sa polimernim medijem za uklapanje uzoraka O.C.T. i inkubirala na sobnoj temperaturi na klackalici tijekom 1 h. Taj korak sam ponovila još 2 puta. Uzorak sam izvadila iz medija, prepоловила u predjelu trupa i pomoću pincete prenijela u pripremljeni kriokalup koji sam do pola prethodno ispunila čistim O.C.T. medijem. Uzorak sam potom postavila u željenu

orijentaciju, zamrzнула, postavila na držač za rezanje uzoraka i rezala prema već opisanom postupku iz prethodnog potpoglavlja (Slika 22). Pripremljene kriopreparate sam do korištenja pohranila u kutiju za mikroskopska stakalca u hladnjak na temperaturu od +4 °C.



Slika 22. Prikaz dijelova tijela odrasle jedinke u (A) željenoj orijentaciji u kriokalupu i (B) uklopljenih dijelova tijela u O.C.T. medij na držaču za rezanje uzoraka.

7.2.4. Anatomsko-histološka analiza kriopreparata ribe zebrice

Za analizu očuvanosti anatomsko-histološke strukture kriopreparata ribe zebrice koristila sam protokol za lokalizaciju jezgara stanica pomoću DAPI (engl. *diamidino-2-phenylindole*) boje kako slijedi:

Kriopreparate ribe zebrice sam rehidrirala u 1x PBS-u tijekom 15 min, inkubirala u 0,1 % Triton-X-100 detergentu tijekom 10 min te potom isprala u 1x PBS-u tijekom 10 min prije inkubacije u DAPI boji tijekom 1 h (razrijeđenje 1:8000). Nakon inkubacije, kriopreparate sam isprala 1x PBS-u tijekom 10 min, suvišak tekućine sam uklonila sa predmetnog stakalca pomoću staničevine, a uzorak sam pokrila sa ~10 µL medija za očuvanje fluorescencije *Vectashield* (300 µL *Vectashield* i 900 µL pufera za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina) i poklopila pokrovnim stakalicem koje sam potom na rubovima zaljepila lakom za nokte kako medij za očuvanje fluorescencije ne bi ispario.

Koristeći prirodnu autofluorescenciju i lokalizaciju jezgara stanica u tkivu ribe zebrice pomoću DAPI boje na pripremljenim kriopreparatima obavila sam analizu očuvanosti anatomsko-histoloških struktura pod fluorescencijskim mikroskopom. Pod filterima svjetlosti 49004 i 31000v2 (Chroma Technology, SAD) koji redom propuštaju svjetlost valne duljine 566-646 nm i 428-507 nm promatrala sam prirodnu autofluorescenciju tkiva i emisiju svjetlosti boje DAPI.

7.2.5. Histokemijska analiza

Prije obrade uzoraka iste sam izvadila iz hladnjaka i ostavila 2 min na sobnoj temperaturi. Daljnji koraci histokemijskog protokola za određivanje lokalizacije i ekspresije proteina F-aktina (Faloidin-FITC) te lokalizaciju jezgara stanica (DAPI) u tkivima različitih stadija ribe zebrice (24 h – 5 dana nakon oplodnje) detaljno su opisani kako slijedi:

Kriopreparate ribe zebrice sam rehidrirala u 1x PBS-u tijekom 15 min, inkubirala u 0,1 % Triton-X-100 detergentu tijekom 10 min te potom isprala u 1x PBS-u tijekom 10 min prije inkubacije u faloidin-FITC-u tijekom 1 h i 30 min (razrijeđenje 1:25; u 1x PBS + 0,02 % NaN_3) u vlažnoj komori. Nakon inkubacije uzorke sam isprala u 1x PBS-u tijekom 10 min, suvišak tekućine sam uklonila sa predmetnog stakalca pomoću staničevine, uzorak sam pokrila sa ~10 μL medija za očuvanje fluorescencije *Vectashield* (300 μL *Vectashield* i 900 μL pufera za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina) i poklopila pokrovnim stakalicem koje sam potom na rubovima zaljepila lakom za nokte kako medij za očuvanje fluorescencije ne bi ispario.

Koristeći emisijski spektar fluorescencijske boje FITC na obrađenim kriopreparatima obavila sam analizu vezanja faloidin-FITC-a za protein F-aktin i analizu lokalizacije i ekspresije proteina F-aktina u različitim tkivima različitih starosnih skupina ribe zebrice. Pod filterom svjetlosti 49011 (Chroma Technology, SAD) koji propušta svjetlost valne duljine 508-565 nm promatrala sam emisiju svjetlosti fluorescencijske boje FITC.

7.2.6. Imunofluorescencijska analiza

Kao i kod prethodne histokemijske analize, uzorke sam morala izvaditi iz hladnjaka i ostaviti ih 2 min na sobnoj temperaturi. Daljnji koraci protokola za imunofluorescencijsku analizu određivanja lokalizacije i ekspresije proteina Na^+/K^+ -ATPaze u tkivima ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje detaljno su opisani po kako slijedi:

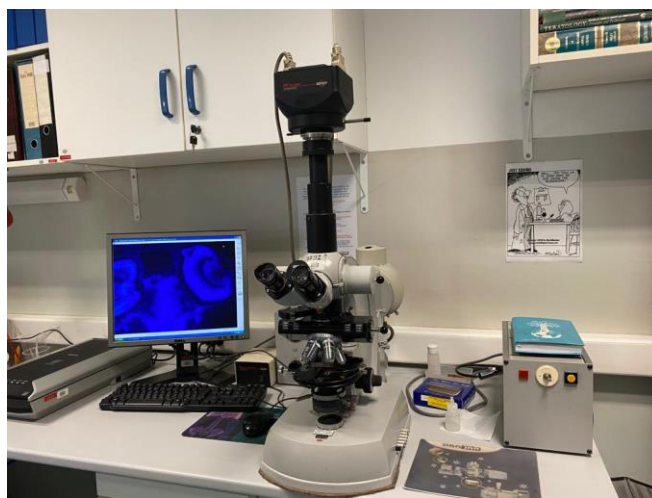
Kriopreparate ribe zebrice sam rehidrirala u 1x PBS-u tijekom 15 min, inkubirala u 0,1 % Triton-X-100 detergentu tijekom 10 min, isprala u 1x PBS-u tijekom 10 min, a potom inkubirala u 1 % BSA tijekom 30 min te u primarnom protutijelu za protein Na^+/K^+ -ATPazu (koncentracije 4,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pri razrijeđenju 1:10; u 1x PBS + 0.02 % NaN_3) u vlažnoj komori preko noći. Tako obrađene uzorke sam isprala u 1x PBS-u tijekom 10 minuta i inkubirala u sekundarnom protutijelu DAM-CY3 (koncentracija izvorne otopine 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) na sobnoj temperaturi (razrijeđenje 1:400; u 1x

PBS + 0,02 % NaN₃) u vlažnoj komorici tijekom 2 h. Nakon inkubacije, uzorke sam isprala u 0,1 % Triton-X-100 tijekom 10 min, a potom u 1x PBS-u tijekom 10 min. Nakon ispiranja, uklonila sam suvišak tekućine sa predmetnih stakalca pomoću staničevine, pokrila uzorak sa ~10 µL medija za očuvanje fluorescencije *Vectashield* (300 µL *Vectashield* i 900 µL pufera za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina) i poklopila pokrovnim stakalicem koje sam potom na rubovima zaljepila lakom za nokte kako medij za očuvanje fluorescencije ne bi ispario.

Koristeći prirodnu autofluorescenciju u emisijskom spektru svjetlosti valne duljine 508-565 nm i emisijski spektar fluorescencijske boje CY3 na obrađenim kriopreparatima obavila sam analizu vezanja Na⁺/K⁺-Ab i analizu lokalizacije i ekspresije proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u različitim tkivima ribe zebrice starosti 4 dana poslije oplodnje. Pod filterima svjetlosti 49004 i 49011 (Chroma Technology, SAD) koji redom propuštaju svjetlost valne duljine 566-646 nm i 508-565 nm promatrala sam emisiju svjetlosti boje CY3 i prirodnu autofluorescenciju tkiva.

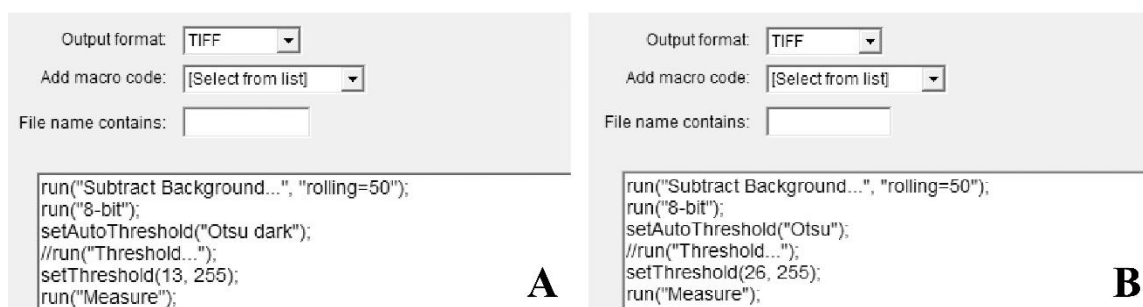
7.2.7. Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika

Kvalitetu kriopreparata dobivenih različitom pripremom i obradom uzoraka kao i lokalizaciju i relativnu ekspresiju proteina F-aktina i Na⁺/K⁺-ATPaze određivala sam pomoću fluorescencijskog mikroskopa OPTON III RS pri povećanjima od 100 i 250 puta. Za prikupljanje mikroskopskih slika na fluorescencijskom mikroskopu koristila sam digitalnu kamera SPOT RT sa pridruženim SPOT RT v3.4 programom (Slika 23).



Slika 23. Fluorescencijski mikroskop OPTON III RS sa pridruženim SPOT RT v3.4 programom.

Prikupljene mikroskopske slike sam obradila i analizirala računalnim programom ImageJ/FIJI 1.53c (Schindelin i sur. 2012; Rueden i sur. 2017). Prije analize intenziteta bojanja fluorescencijske boje FITC (koja upućuje na vezanje faloidina za F-aktin), slikama sam razdvojila kanale crvenog, zelenog i plavog spektra svjetlosti upotrebom ImageJ/FIJI umetka (engl. *plugin*) *Batch_Split_Channels_Tool*. Za analizu sam potom koristila samo kanal iz zelenog spektra svjetlosti. Nakon procjene raspodjele bojanja na reprezentativnim mikroskopskim slikama, za analizu intenziteta bojanja velikog broja mikroskopskih slika prednjeg (glava do škržnog poklopca) i stražnjeg (od škržnog poklopca do repa) dijela tijela ribe zebrice koristila sam redom dva *Macro* algoritma, *Macro 1* i *Macro 2* (Slika 24A i B).



Slika 24. Prikaz algoritama za automatiziranu analizu intenziteta bojanja na mikroskopskim slikama (A) prednjeg *Macro 1* i (B) stražnjeg *Macro 2* dijela tijela ribe zebrice.

Unutar oba *Macro* algoritma svim slikama sam prvo na jednak način oduzela pozadinsko osvjetljenje pomoću alata *Subtract Background* (*Rolloing ball radius* parametar postavila sam na 50 piksela), a potom sam upotrebom *Otsu* algoritma i alata *Threshold* segmentirala bojanja koja pripadaju fluorescencijskoj boji FITC. Takvim segmentiranim slikama sam mjerila intenzitete bojanja koje sam koristila za statističku analizu ekspresije F-aktina u uzorcima jedinki zebrice. Granice minimalnog i maksimalnog intenziteta bojanja koje sam koristila za segmentaciju signala u analiziranim slikama su bile različite za prednji i stražnji dio ribe zebrice zbog različite raspodjele bojanja odnosno manjeg intenziteta bojanja u prednjem u odnosu na stražnji dio ribe.

7.2.8. Prikaz i statistička obrada rezultata

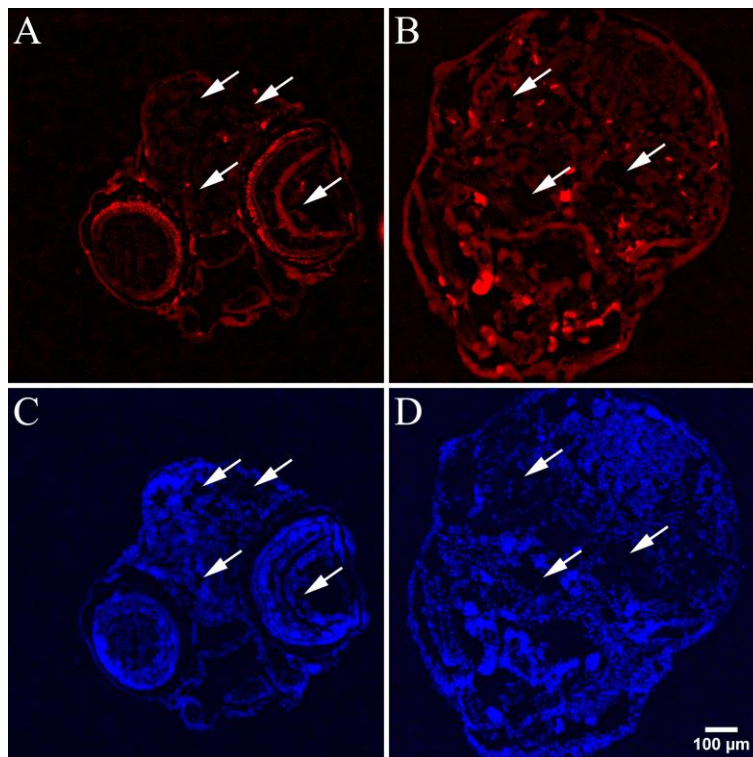
Fotografije i paneli koje prikazuju protokole pripreme i obrade prikupljenih uzoraka ribe zebrice obradila sam računalnim programom Adobe Photoshop 6.0. Konačni prikaz obrađenih mikroskopskih slika i izrada panela napravila sam pomoću računalnog programa ImageJ/FIJI 1.53c i njegovog umetka (engl. *plugin*) ScientiFig (Aigouy i Mirouse 2013). Prikaz i statistička analiza podataka napravila sam korištenjem ANOVA/Duncan i Factorial ANOVA testova unutar računalnog programa Statistica 14 (TIBCO, SAD) uz razinu statističke značajnosti od $p < 0,05$.

8. Rezultati

8.1. Određivanje optimalnih uvjeta za izradu kriopreparata embrija i ličinki ribe zebrice

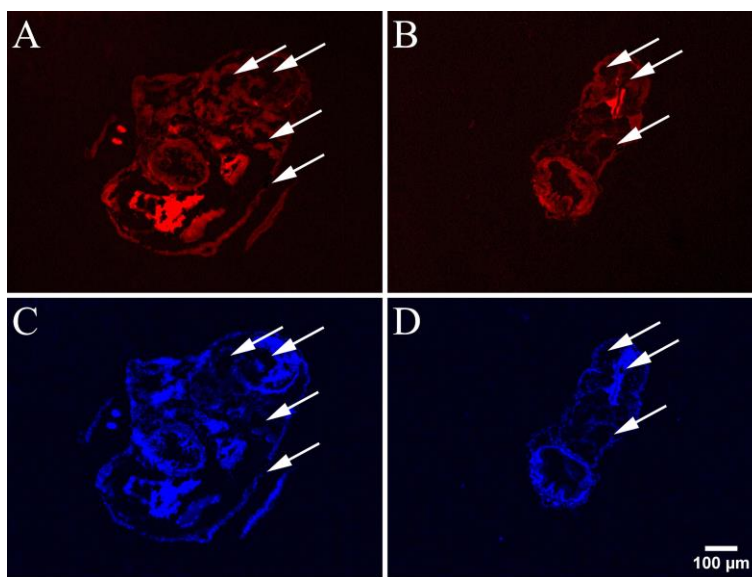
8.1.1. Optimalno vrijeme fiksiranja tkiva

Kako bi se odredilo optimalno vrijeme fiksiranja tkiva spolno nezrelih jedinki ribe zebrice, tkiva jedinki starosti 4 dana nakon oplodnje inkubirana su u 4 % PFA tijekom vremenskih intervala od 1 h i 24 h. Za izradu kriopreparata je korišten protokol za izradu kriopreparata embrija i ličinki ribe zebrice opisan u prethodnom poglavlju te je potom napravljena analiza očuvanosti anatomsko-histološke strukture tkiva kriopreparata pod fluorescentnim mikroskopom. Prirodna autofluorescencija tkiva koja uključuje i jaku autofluorescenciju eritrocita u krvnim žilama te lokalizacija jezgara stanica bojom DAPI u različitim tkivima ribe zebrice korišteni su za ovu analizu. S obzirom na različito vrijeme fiksacije uzoraka analizirala su se tri različita dijela tijela ribe zebrice: glava, trup i rep (Slika 20).



Slika 25. Kriopreparati tkiva prednjeg (A i C) i stražnjeg (B i D) dijela glave ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 24 h. Na slikama prirodne autofluorescencije tkiva (A i B) i lokalizacije jezgara stanica (C i D) kriopreparata ribe zebrice strelice pokazuju vidljiva veća oštećenja unutar fragmentirane strukture tkiva u predjelu mozga i oka.

Rezultati analize poprečnih presjeka uzoraka fiksiranih 24 h u predjelu glave otkrila su oštećenja strukture tkiva mozga i djelomična oštećenja strukture tkiva oka ribe zebrice (Slika 25, strelice). Naime, prirodna autofluorescencija tkiva otkrila je velike praznine i fragmentiranost unutar tkiva mozga. Narušenu histološku strukturu mozga dodatno je potvrdilo narušeni raspored jezgara stanica mozga te postojanje manjih ili većih praznina između istih. Autofluorescencija tkiva u predjelu oka ribe zebrice nije upućivala na značajnija oštećenja histološke strukture, no otkrivanjem lokalizacije jezgara stanica u predjelu oka uočeni su prekidi u različitim slojevima stanica oka (Slika 25).

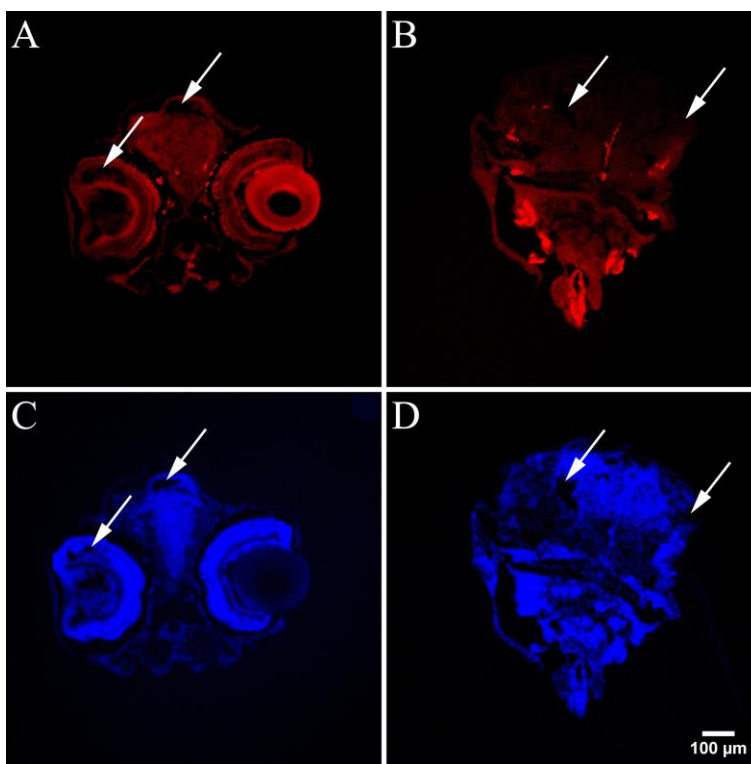


Slika 26. Kriopreparati tkiva trupa (A i C) i repa (B i D) ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 24 h. Na slikama prirodne autofluorescencije tkiva (A i B) i lokalizacije jezgara stanica (C i D) kriopreparati ribe zebrice imaju vidljiva oštećenja strukture tkiva leđne moždine i mišića trupa i repa (strelice).

Analiza mikroskopskih slika poprečnih presjeka uzoraka fiksiranih 24 h u predjelu trupa i repa također su pokazala znatna oštećenja i fragmentaciju tkiva (Slika 26, strelice). Autofluorescencija tkiva i bojanje jezgara u poprečnim presjecima u predjelu trupa otkrili su značajna oštećenja živčanog (leđna moždina) i somitskih mišića (horizontalni i vertikalni mioseptum). Također, uočena su oštećenja na vanjskoj stijenci tijela i fragmentiranost tkiva unutarnjih organa. U poprečnim presjecima repa ribe zebrice autofluorescencija tkiva otkrila je značajna oštećenja

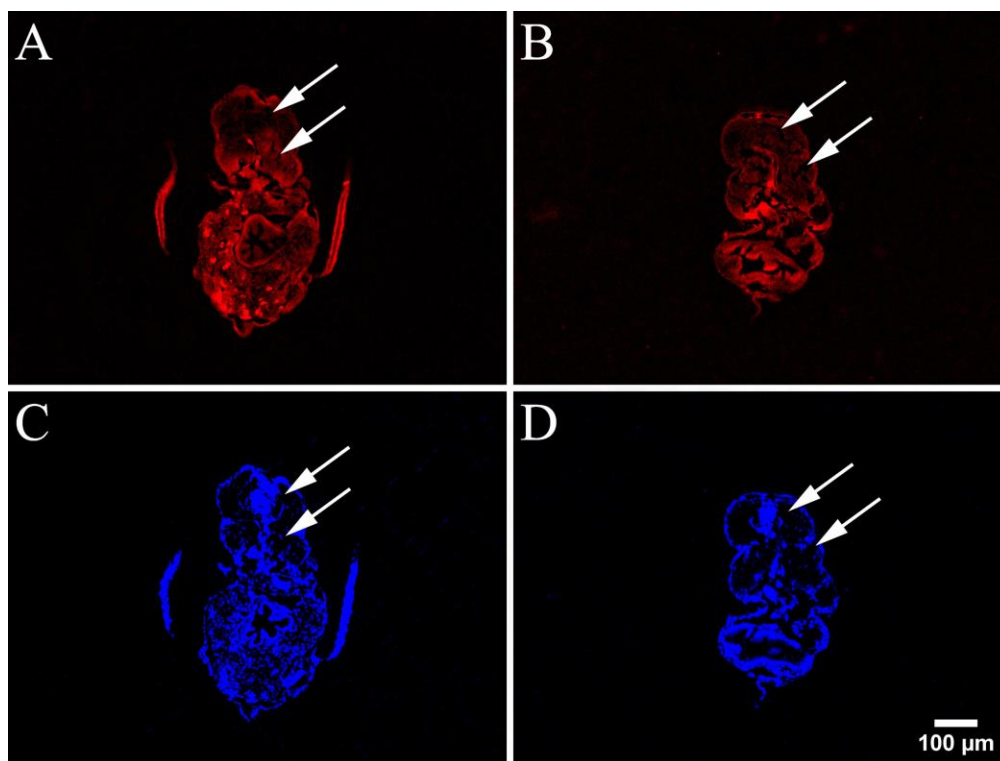
mišićnog tkiva koje bilo vidljivo promatrajući autofluorescenciju tkiva, ali ne i lokalizaciju jezgara stanica tkiva (Slika 26).

Za razliku od prethodno analiziranih uzoraka, mikroskopska analiza poprečnih presjeka uzoraka fiksiranih 1 h u predjelu glave otkrila je očuvanu anatomsko-histološku strukturu tkiva minimalnim oštećenjima tkiva. Autofluorescencija tkiva bila je vidljiva u krvnim žilama mozge, leći oka i različitim slojevima mrežnice oka poput vanjskog i unutarnjeg peksiformnog sloja i sloja fotoreceptorskih stanica (Slika 27A). Također, jaka autofluorescencija tkiva uočena je u ostalim organima ispunjenim krvlju poput škržnih lukova i srca u stražnjem dijelu glave (Slika 27B). Lokalizacija jezgara u prednjem i stražnjem djelu uzoraka glave riba fiksiranih 1 h, također je pokazala očuvanu anatomsko-histološku strukturu svih tkiva sa minimalnim oštećenjima tkiva mozga i oka (Slika 27, strelice).



Slika 27. Kriopreparati tkiva prednjeg (A i C) i stražnjeg (B i D) dijela glave ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h. Slike prirodne autofluorescencije tkiva (A i B) i lokalizacije jezgara stanica (C i D) ribe zebrice prikazuju očuvanu strukturu tkiva u svim organima s minimalnim oštećenjima u predjelu mozga (strelice).

Kao i u predjelu glave, mikroskopska analiza poprečnih presjeka uzoraka fiksiranih 1 h pokazala je očuvanu anatomsko-histološku strukturu svih tkiva u predjelu trupa i repa ribe zebrice sa minimalnim oštećenjima somitskih mišića (okomiti i horizontalni mioseptum) (Slika 28, strelice). Autofluorescencija eritrocita uočena je u krvnim žilama poput središnje glavne vene i dorzalne aorte te krvlju ispunjenom organu jetri (Slika 28A i B). Uočeni su i drugi dijelovi tijela sa značajnom autofluorescijom poput mišića peraja, mišića probavne cijevi (lat. *zona muscularis*) i stijenke notokorda (Slika 28A i B). Lokalizacijom jezgara stanica različitih tkiva u uzorcima ribe zebrice bojom DAPI potvrđena je očuvana anatomsko-histološka struktura svih tkiva (Slika 28C i D).

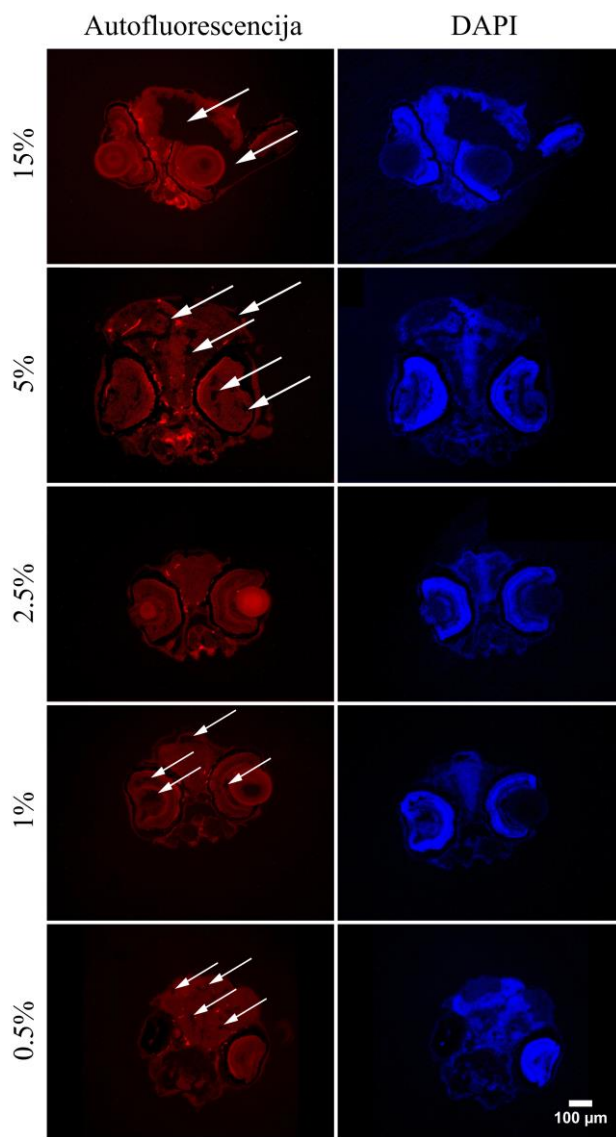


Slika 28. Kriopreparati tkiva trupa (A i C) i repa (B i D) ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h. Slike prirodne autofluorescencije tkiva (A i B) i lokalizacije jezgara stanica (C i D) kriopreparata ribe zebrice pokazuju očuvanu strukturu tkiva u svim organima s minimalnim oštećenjima somitskih mišića (strelice).

8.1.2. Optimalna smjesa želatine i saharoze za inkubaciju tkiva

Kako bi odredili optimalnu smjesu komercijalno dostupne goveđe želatine i saharoze za pripremu kriopreparata tkiva jedinki ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje, ispitano je 5 različitih

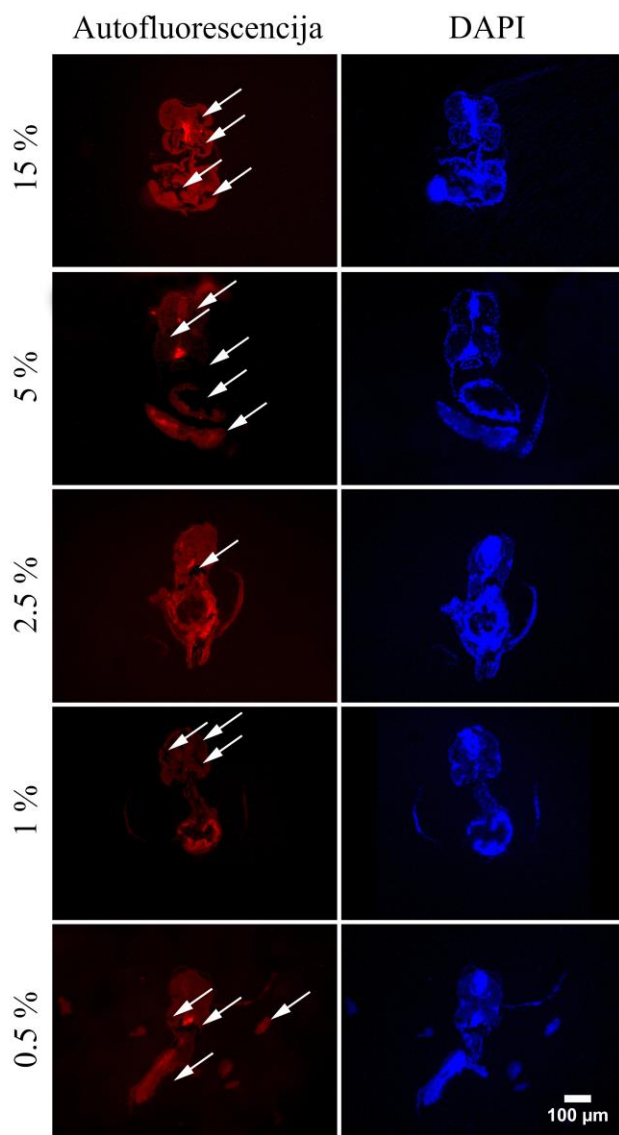
otopina pri čemu se prilagođavao samo udio želatine u istoj. Početni postotci želatine i saharoze preuzeti su iz protokola za uzastopnu imunofluorescencijsku i imunohistokemijsku analizu koja je izvorno koristila riblju želatinu za pripremu kriouzoraka (Ferguson i Shive 2019). Ispitane su smjese koje sadrže 15 %, 5 %, 2,5 %, 1 % i 0,5 % goveđe želatine i 25 % saharoze. Analizom mikroskopskih slika kriopreparata pod fluorescencijskim mikroskopom uočeno je poboljšanje očuvanja anatomsko-histološke strukture tkiva u predjelu glave i trupa kod uzoraka koji su inkubirani u smjesama sa udjelom goveđe želatine nižim od 5 % (Slika 29 i 30).



Slika 29. Kriopreparati tkiva glave ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h i inkubiranih u različitim otopinama želatine i saharoze. Slike prirodne autofluorescencije tkiva i lokalizacije jezgara stanica (DAPI) ribe zebrice pokazuju veća ($\geq 5\%$) i manja ($< 2,5\%$) oštećenja tkiva mozga i oka (strelice).

Rezultati mikroskopske analize očuvanosti anatomsko-histološke strukture tkiva u poprečnim presjecima uzoraka ribe zebrice inkubiranih u otopinama saharoze s većim postotkom želatine ($\geq 5\%$) pokazali su veća oštećenja u predjelu tkiva mozga i oka (Slika 29). Autofluorescencija tkiva i lokalizacija jezgara stanica u navedenim uzorcima otkrili su veća oštećenja tkiva mozga i oka kod uzoraka inkubiranih sa otopinom 15 % želatine i 25 % saharoze nego kod uzoraka koji su bili inkubirani u otopini sa 5 % želatine i 25 % saharoze (Slika 29, strelice). Prema analizama slika autofluorescencije i lokalizacije jezgara, preparati sa najočuvanijom anatomsko-histološkom strukturom u predjelu trupa dobiveni su kod uzoraka inkubiranih u smjesi 2,5 % želatine i 25 % saharoze. Kod preparata dobivenih od uzoraka riba inkubiranih u 1 % i 0,5 % želatine sa 25 % saharozom uočena su manja oštećenja moždanog tkiva (Slika 29, strelice).

Komparativna analiza poprečnih presjeka trupa istih uzoraka ribe zebrice pokazala je sličan uzorak prema kojem su kriopreparati pripremljeni od uzoraka riba inkubiranih u otopini s većim udjelom goveđe želatine ($\geq 5\%$) imali veća oštećenja tkiva mišića i vanjske stjenke trupa (Slika 30). To je često za posljedicu imalo gubitak organa i dijelova tkiva iz trbušne šupljine. Najočuvaniji kriopreparati sa minimalnim oštećenjima i gubitkom anatomsko-histološke strukture su napravljeni od uzoraka inkubiranih u otopini 2,5 % želatine i 25 % saharoze dok su oni inkubirani u otopinama saharoze sa nižim udjelom želatine imali veća oštećenja organa i tkiva iz trbušne šupljine ribe zebrice (Slika 30, strelice).

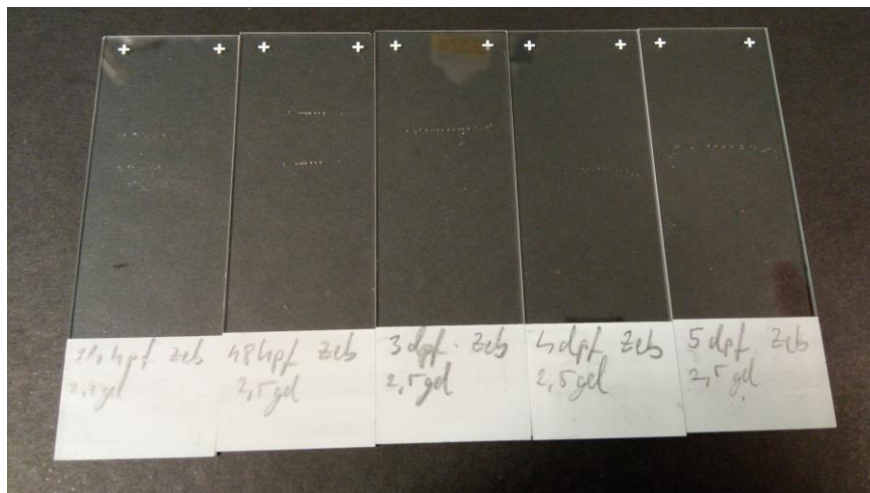


Slika 30. Kriopreparati tkiva trupa ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h i inkubiranih u različitim smjesama želatine i saharoze. Slike prirodne autofluorescencije tkiva i lokalizacije jezgara stanica (DAPI) ribe zebrice pokazuju veća i manja oštećenja tkiva u predjelu trupa (strelice).

8.1.3. Optimalna temperatura za rezanje tkiva zebrice

Kao jedan od ključnih čimbenika za izradu poprečnih presjeka tkiva ribe zebrice pokazala se temperatura pri kojoj su uzorci uklopljeni u O.C.T. medij rezani u kriomikrotomu. Kako bi odredili optimalnu temperaturu za rezanje jedinki tkiva zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje, korištene su različite temperature rezanja pripremljenih uzoraka: $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati su pokazali da temperatura više od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) uzrokuje ljepljenje uzoraka za nož pri čemu se

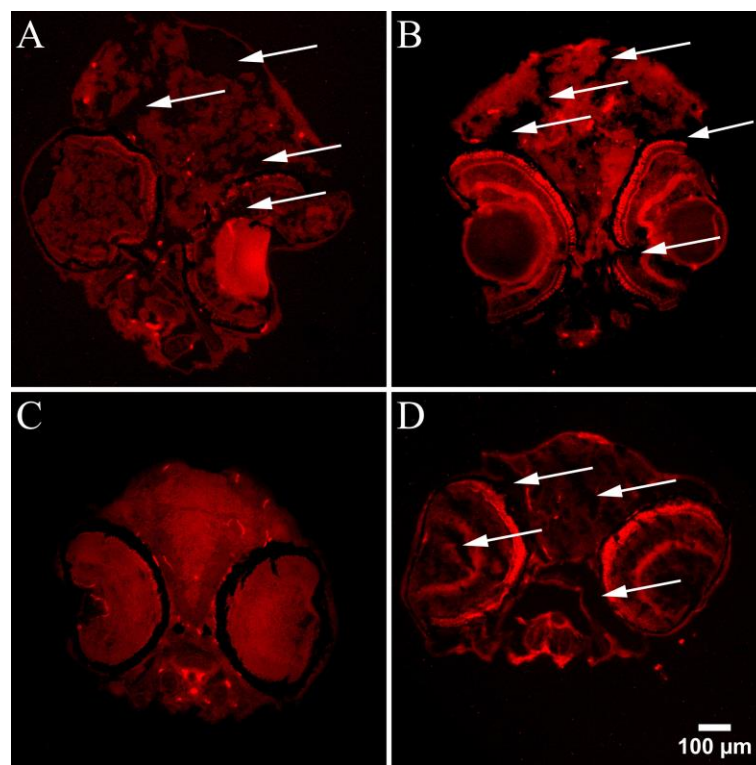
uzorci nepovratno uništavaju. Rezanje uklopljenih uzoraka na temperaturama iznad $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ($-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) uzrokovalo je mrvljenje uzoraka pri čemu bi se uzorci također nepovratno uništili. Uzorci rezani pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ najviše su očuvali cjelovitost svoje strukture te su mogli biti uspješno prenešeni na predmetna stakalca (Slika 31.).



Slika 31. Kriouzorci riba zebrica starosti 1.-5. dana nakon oplodnje inkubirani u otopini 2,5% goveđe želatine i 25% saharoze, uklopljeni u O.C.T. medij, rezani pri optimalnoj temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i prenešeni na predmetno stakalce presvučeno pozitivnim nabojem.

8.1.5. Optimalna debljina rezanja tkiva zebrice

Dodatni čimbenik koji se također pokazao važnim za izradu poprečnih presjeka tkiva zebrice očuvane anatomsko-histološke strukture jest debljina rezanja tkiva pri optimalnoj temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stoga, za ispitivanje optimalne debljine presjeka tkiva ličinke starosti 4 dana nakon oplodnje, izrađivani su poprečni presjeci različitih debljina: $4\text{ }\mu\text{m}$, $6\text{ }\mu\text{m}$, $8\text{ }\mu\text{m}$ i $10\text{ }\mu\text{m}$ (Slika 32). Prilikom rezanja na debljinu od $4\text{ }\mu\text{m}$ često su oštećivani mekani dijelovi tkiva poput mozga, očiju i djelova usne šupljine što je za posljedicu imalo gubitak njihove izvorne anatomsko-histološke strukture (Slika 32A). Na presjecima tkiva debljine $6\text{ }\mu\text{m}$ također su se mogla vidjeti oštećenja mozga dok su oči i usta imali minimalna oštećenja anatomsko-histološke strukture (Slika 32B). Većina presjeka tkiva ribe zebrice debljine $8\text{ }\mu\text{m}$ u potpunosti su imali očuvanu anatomsko-histološku strukturu, a kod manjeg dijela uzoraka uočena su minimalna oštećenja tkiva mozga (Slika 32C). Izrada presjeka tkiva zebrice debljine $10\text{ }\mu\text{m}$ bila je tehnički zahtjevnija jer su se uzorci prilikom rezanja često savijali. Također, kod izrađenih kriopreparata te debljine često je dolazilo do manjih i većih oštećenja u predjelu tkiva mozga i oka (Slika 32C).



Slika 32. Kriopreparati tkiva glave ribe zebrice različitih debljina pripravljenih od uzoraka fiksiranih 1 h: (A) 4 µm, (B) 6 µm, (C) 8 µm i (D) 10 µm . Slike prirodne autofluorescencije tkiva ribe zebrice pokazuju veća i manja oštećenja tkiva u predjelu tkiva mozga i oka (strelice).

8.1.6. Pohrana kriopreparata

Posljednji čimbenik koji je imao utjecaj na očuvanje kvalitete anatomsko-histološke strukture kriopreparata ribe zebrice je bila pohrana pripremljenih uzoraka. Naime, prilikom kontrole kvalitete uzoraka pod svjetlosnim mikroskopom uočeno je da brza dehidracija uzoraka na sobnoj temperaturi uzrokuje brzo sakupljanje te oštećenja različitih tkiva u predjelu glave i trupa. Stoga, za potrebe očuvanja anatomsko-histološke strukture pripremljenih kriopreparata ispitana su četiri pristupa: 1) Dehidracija uzorka na sobnoj temperaturi tijekom 15 min prije pohrane u hladnjak na temperaturu +4 °C u kutiju za mikroskopska stakalca, 2) Spremanje kriouzoraka netom nakon izrade u hladnjak na +4 °C u kutiju za mikroskopska stakalca, 3) Zamrzavanje kriopreparata pri temperaturi od – 20 °C tijekom 15 minuta te pohrana u hladnjak na temperaturu od +4 °C u kutiju za mikroskopska stakalca, i 4) Zamrzavanje kriopreparata pri temperaturi od –80 °C tijekom 15 minuta te pohrana na temperaturu od –20 °C u kutiju za mikroskopska stakalca.

Prvi način pohrane uzoraka uzrokovao je brzu dehidraciju uzorka i velika oštećenja mekih tkiva ribe zebrice poput mozga, unutarnjih organa smještenih u trbušnoj šupljini te pucanje vanjske stijenke trbušne šupljine. Kod ostalih načina pohrane pripremljenih kriopreparata ribe zebrice postignuta je zadovoljavajuća očuvanost strukture različitih organa i tkiva bez vidljivih oštećenja. Ipak, tehnički najjednostavniji pristup je bio pohraniti uzorke u hladnjak na temperaturu +4 °C netom nakon njihove izrade.

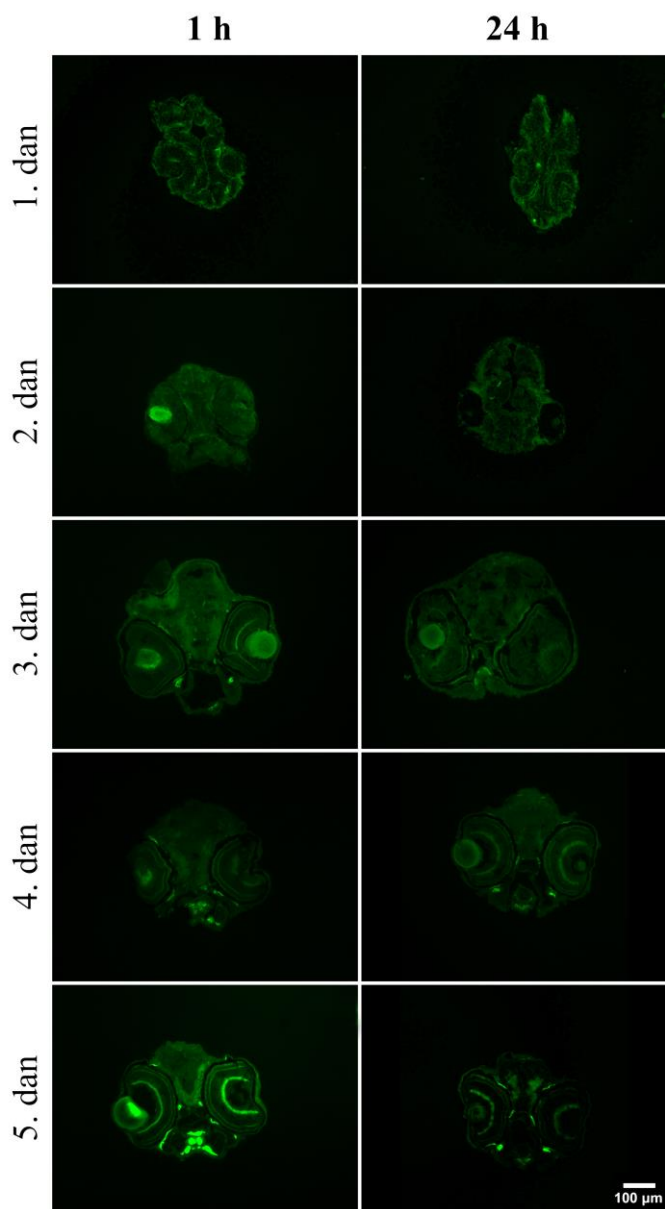
8.2. Optimizacija uvjeta pripreme uzoraka embrija i ličinki ribe zebrice za detekciju proteina F-aktina

8.2.1. Učinak različitog vremena fiksacije uzoraka

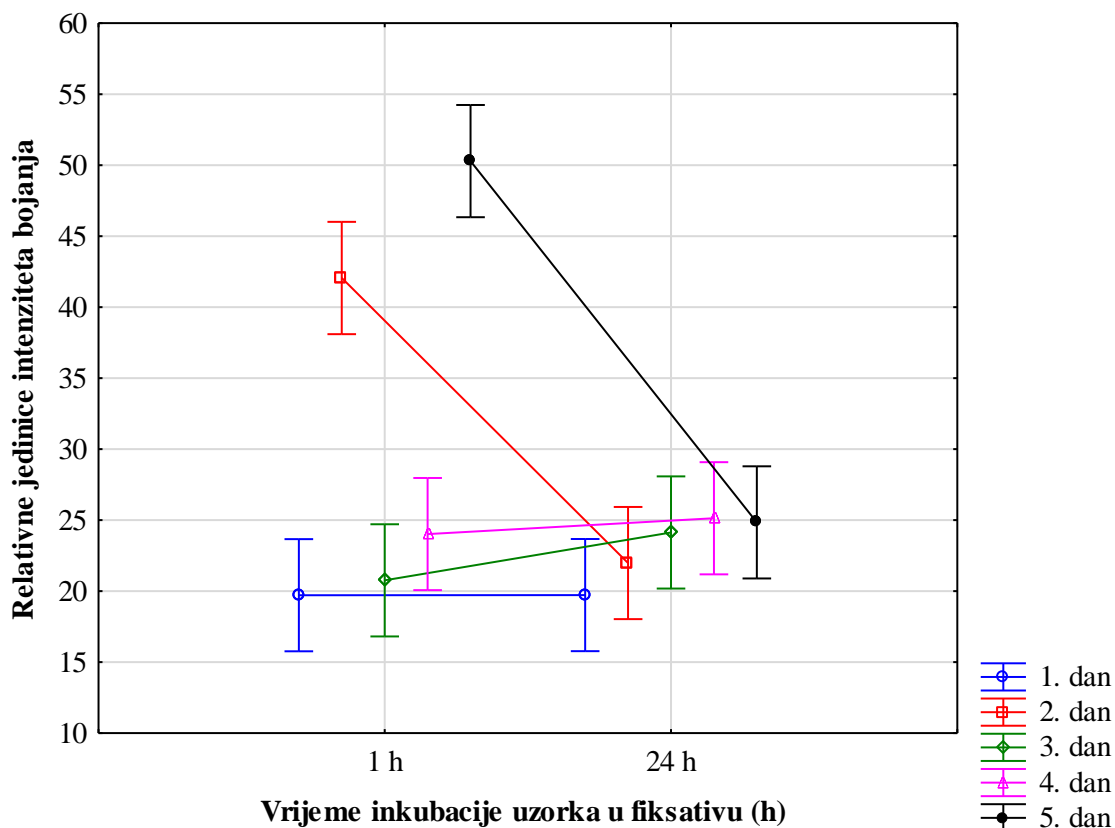
Kako bi smo odredili optimalno vrijeme fiksacije uzoraka ribe zebrice potrebno za uspješno vezanje fluorescentno obilježenog faloidina (faloidin-FITC) za protein F-aktin, provedena je histokemijska analiza za određivanje lokalizacije i ekspresije F-aktina i posljedična analiza intenziteta fluorescencijske boje FITC kod uzoraka fiksiranih 1 h i 24 h.

Rezultati provedenih analiza otkrili su jednak intenzitet fluorescencijske boje FITC u uzorcima glava ribe zebrice neovisno o vremenu fiksacije unutar grupa jedinki starosti jedan, tri i četiri dana nakon oplodnje (Slika 33 i 34; ANOVA, Duncan post-hoc test, $p > 0,05$). Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC je bio značajno veći u uzorcima glava ribe zebrice fiksiranih 1 h u odnosu na glave uzoraka fiksiranih 24 h unutar grupa jedinki starosti dva i pet dana nakon oplodnje (Slika 33 i 34; ANOVA, Duncan post-hoc test, $p < 0,05$).

U istim kriopreparatima je opaženo da se faloidin-FITC redovito vezao za leću oka i uzrokovao intenzivno bojanje te strukture oka. Stoga je provedena analiza pojavnosti te strukture u svim kriopreparatima glave ribe zebrice. Analiza broja kriopreparata glava ribe zebrice pokazala je da je 61 % (dva dana nakon oplodnje; 1 h fiksirani uzorci) i 45 % (pet dana nakon oplodnje; 1 h fiksirani uzorci) kriopreparata unutar skupina koje su imale značajno veći intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC imalo obojenu leću dok je kod svih ostalih skupina udio preparata s prisutnošću obojene leće bio ispod 28 %.

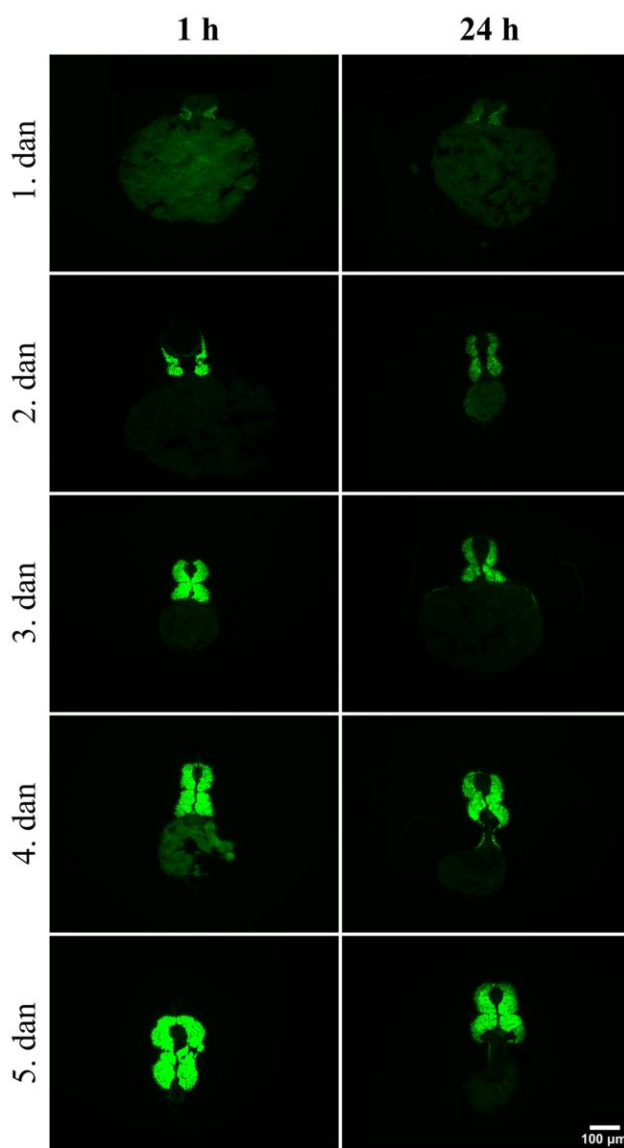


Slika 33. Kriopreparati tkiva glave ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h (desno) i 24 h (lijevo) u različitim starosnih skupina. Slike prikazuju vezanje faloidin-FITC-a za F-aktin u različitim mišićima, mozgu i različitim strukturama oka ribe zebrice (zeleno obojenje).

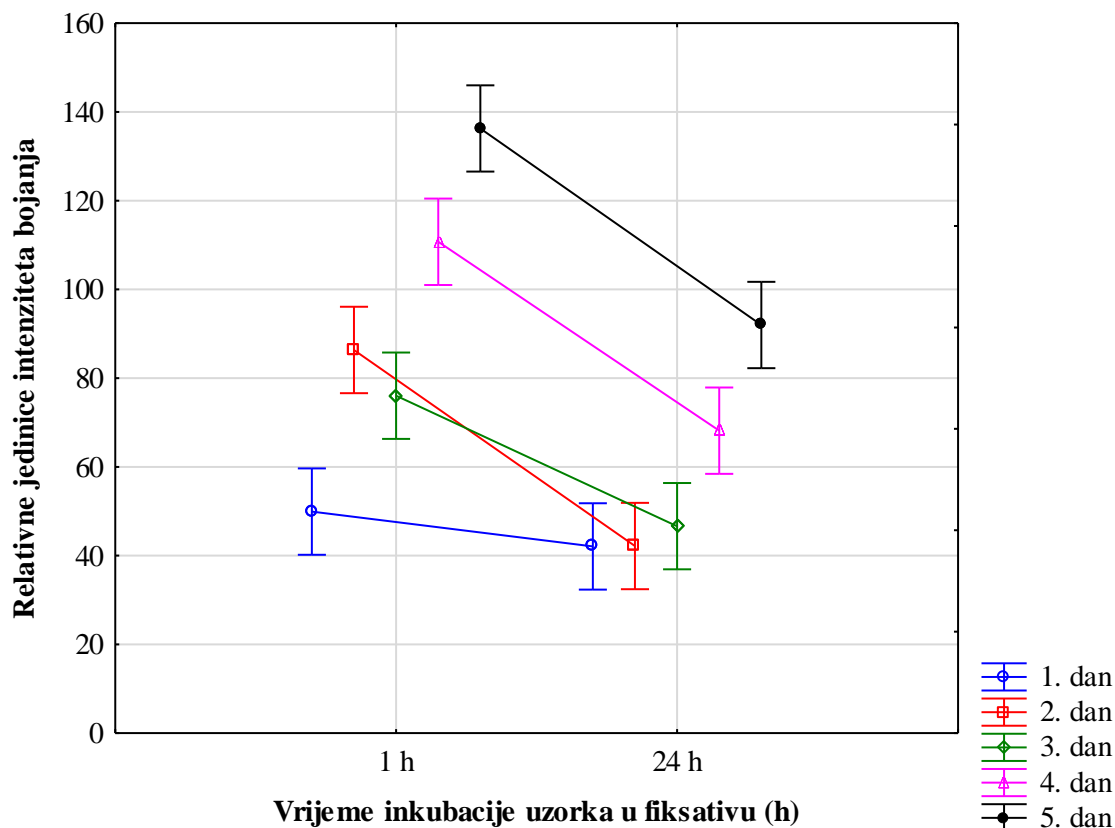


Slika 34. Analiza intenziteta bojanja fluorescencijske boje FITC koja ukazuje na vezanje peptida faloidina za protein F-aktin u kriopreparatima glave ribe zebrice različitih starosnih skupina. Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC bio je značajno veći samo u dvije starosne skupine (2. i 5. dan) kriopreparata glave ribe zebrice fiksiranih (ANOVA, Duncan post-hoc test, $p < 0,05$). Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC u ostalim starosnim skupinama nije se bitno razlikovao (ANOVA, Duncan post-hoc test, $p > 0,05$). Vertikalne linije prikazuju 0,95 interval pouzdanosti.

Provedena analiza intenziteta bojanja fluorescencijske boje FITC u predjelu trupa ribe zebrice pokazala je značajno jači intenzitet bojanja u kriopreparata starosti 2.-5. dana nakon oplodnje fiksiranih 1 h u odnosu na one fiksirane 24 h (Slika 35 i 36; ANOVA, Duncan post-hoc test, $p < 0,05$). Samo u skupini uzoraka starosti 1. dan nakon oplodnje nije bilo statistički značajne razlike u intenzitetu bojanja fluorescencijske boje FITC između uzoraka fiksiranih 1 h i 24 h (Slika 35 i 36; ANOVA, Duncan post-hoc test, $p > 0,05$).



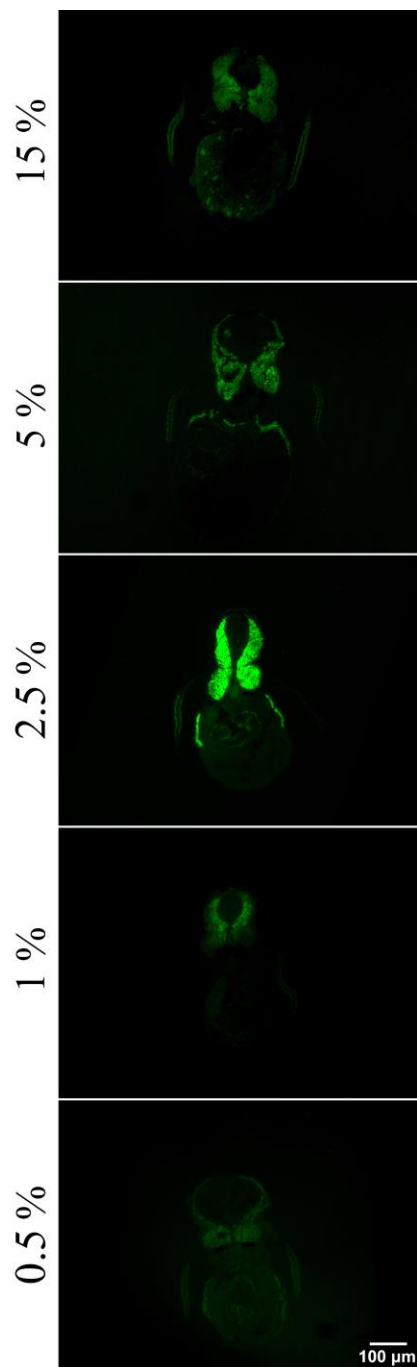
Slika 35. Kriopreparati tkiva trupa ribe zebrice kod uzoraka fiksiranih 1 h (desno) i 24 h (lijevo) u različitim starosnih skupina. Slike prikazuju vezanje faloidin-FITC-a za F-aktin u mišićima trupa ribe zebrice (zeleno obojenje).



Slika 36. Analiza intenziteta bojanja fluorescencijske boje FITC koja ukazuje na vezanje peptida faloidina za protein F-aktin u kriopreparatima trupa ribe zebrice različitih starosnih skupina. Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC je značajno veći u skupinama uzoraka starosti 2.-5. dana nakon oplodnje fiksiranim 1 h u odnosu na one fiksirane 24 h: ANOVA, Duncan post-hoc test, $p < 0,05$. Intenziteti bojanja fluorescencijske boje FITC između skupina uzoraka starosti 1. dan nakon oplodnje nisu se razlikovali: ANOVA, Duncan post-hoc test, $p > 0,05$. Vertikalne linije prikazuju 0,95 interval pouzdanosti.

8.2.2. Učinak inkubacije uzoraka u različitim otopinama želatine i saharoze

Kako bi odredili optimalan način vezanja faloidina za F-aktin ispitali smo kako inkubacija uzorka u različitim otopinama želatine i saharoze utječe na intenzitet fluorescencijske boje FITC u predjelu trupa ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje. Rezultati mikoskopske analize fluorescencijske boje FITC nam pokazuju da je optimalno vezanje faloidina u trupu ribe zebrice postignuto inkubacijom uzoraka u 2,5 % želatini i 25 % saharozu (Slika 37). Kod uzoraka inkubiranih u smjesama sa većim udjelom želatine ($\geq 5\%$), fluorescencijsko bojanje je slabije i ukazuje na oštećenja tkiva mišića prilikom rezanja na kriomikrotomu. Uzorci inkubirani u smjesama sa manjim udjelom želatine ($< 2,5\%$) također imaju niži intenzitet fluorescencijskog bojanja mišićnih stanica no sa mnogo manje oštećenja u predjelu mišićnog tkiva.



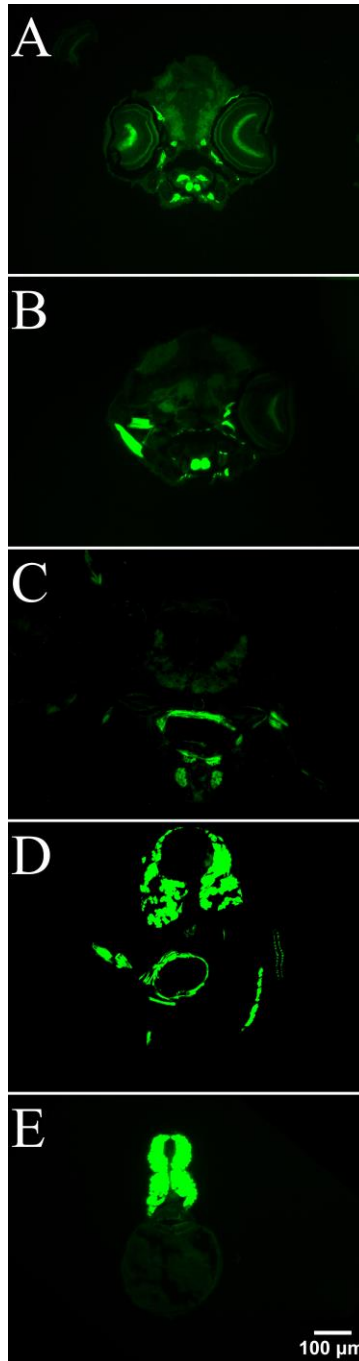
Slika 37. Analiza intenziteta bojanja fluorescencijske boje FITC koja ukazuje na vezanje peptida faloidina za protein F-aktin u kriopreparatima trupa ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje. Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC je vidljivo veći u skupini uzoraka inkubiranih u smjesi 2,5 % želatine i 25 % saharoze.

8.2.3. Učinak detergenata, alkohola ksilola i albumina govedeg seruma

Ispitivanja učinaka inkubacije uzoraka ribe zebrice starosti četiri dana nakon oplodnje u različitim razrjeđenjima deterdženata Tritona-X-100 (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2%, 5 % i 10 %) nije pokazalo vidljiv učinak na vezanje faloidin-FITC-a u mišićnom tkivu. Korištenje alkohola ksilola za dodatnu permeabilizaciju uzoraka kao i inkubacija tkiva ribe zebrice u albuminu govedeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*) također nije vidljivo doprinjelo poboljšanju vezanja faloidina za protein F-aktin u mišićnom tkivu. Štoviše inkubacija uzoraka u alkoholu ksilolu dodatno je dehidrirala uzorak i znatno oštetila njegovu prepoznatljivu anatomsko-histološku strukturu.

8.3. Lokalizacija F-aktina u ribi zebrici upotrebom fluorescentno obilježenog faloidina

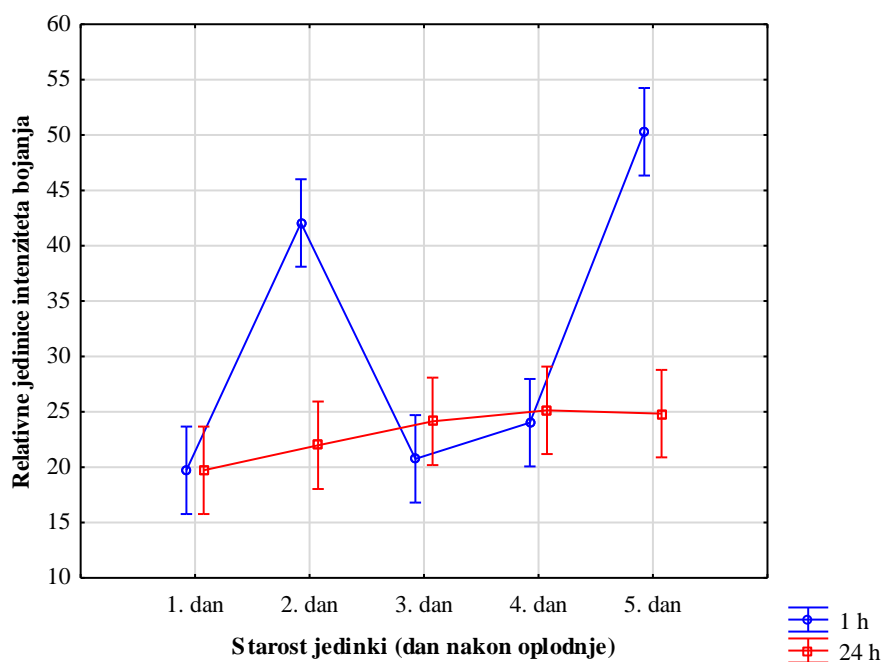
Za otkrivanje lokalizacije proteina F-aktina u različitim tkivima ribe zebrice starosti četiri dana nakon oplodnje korišteni su prethodno prilagođeni protokoli za pripremu kriopreparata ribe zebrice i histokemijsku analizu F-aktina čije smo uvjete prethodno optimizirali. U tu svrhu su korišteni različiti poprečni presjeci tijela ribe zebrice kako bi odredili prisutnost vezanja faloidin-FITC-a za protein F-aktin u njezinim različitim tkivima. Mikroskopska analiza fluorescencijskog bojanja otkrila je postojanje bojanja jakog intenziteta FITC-a u svim poprečnim presjecima ribe zebrice od prednjeg dijela glave do repa (Slika 38). Fluorescencijsko bojanje boje FITC koje upućuje na prisutnost F-aktina bilo je intenzivno u predjelu mišića usta i oka, krvnim žilama (u mozgu i blizu oka), optičkom tektumu mozga, očnom živcu, unutarnjem i vanjskom pleksiformnom sloju i sloju fotosenzoričkih stanica oka (Slika 33, treći dan i Slika 38A i B). Također, vidljivo bojanje opaženo je u predjelu mišića usne (bukalne) šupljine i skeletnih mišića koji okružuju srce (Slika 38C). U predjelu trupa dominira intenzitet bojanja F-aktinskih niti u mišićnim stanicama vertikalnih i horizontalnih somitskih mišića, glatkih mišića prednjeg dijela probavne cijevi (lat. *zona muscularis*), i skeletnih mišića vanjske stijenke trupa, a slabije su vidljivi skeletni mišići peraja (Slika 38D). U predjelu stražnjeg dijela trupa i repa dominiraju intenzitet bojanja F-aktinskih niti u mišićnim stanicama vertikalnih i horizontalnih somita te se nazire ekspresija istog proteina u četkastoj membrani epitelnih stanica crijeva i glatkim mišićima crijeva (lat. *zona muscularis*) (Slika 38D i E).



Slika 38. Lokalizacija F-aktina upotrebom faloidin-FITC-a u različitim poprečnim presjecima ribe zebrice starosti četiri dana. (A) Prednji dio glave, (B) Srednji dio glave, (C) Stražnji dio glave, (D) Trup, i (E) Stražnji dio trupa i rep.

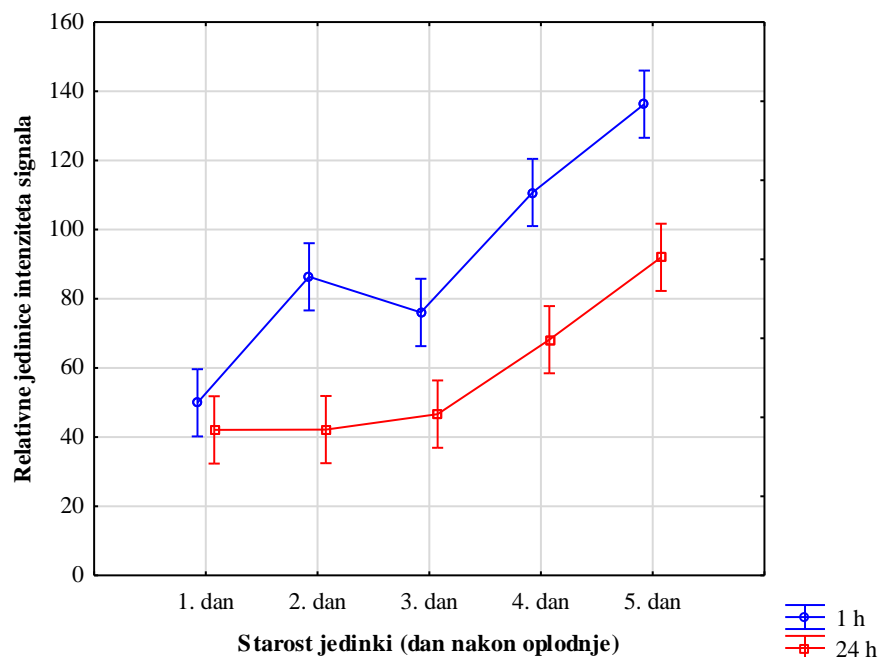
8.4. Starosne razlike u ekspresiji F-aktina u mišićima ribe zebrice

Kako bi utvrdili postoje li starosti razlike u ekspresiji proteina F-aktin između embrionalnih i ličinačkih razvojnih stadija (starosti 1.-5. dana nakon oplodnje) proveli smo analizu intenziteta fluorescencijskog bojanja u uzorcima glave i trupa uzoraka fiskiranih 1 h i 24 h (korištenih u optimizaciji fiksacije tkiva). Rezultati analize su utvrdili male promjene intenziteta fluorescencijskog bojanja u predjelu glave između ispitivanih starosnih skupina (Slika 39). Samo su dvije starosne skupine imale značajan porast intenziteta fluorescencijskog bojanja u predjelu glave, no za te skupine je prethodno utvrđen velik udio preparata sa prisutnošću obojenja očne leće koja intenzivno veže faloidin (vidi potpoglavlje 6.2.1.).



Slika 39. Ekspresija F-aktina u poprečnim presjecima glave ribe zebrice različitih starosti kod uzoraka fiksiranih 1 h i 24 h. Intenziteti bojanja fluorescencijske boje FITC u skupinama uzoraka starosti 2 i 5 dana nakon oplodnje statistički su značajno veći u uzorcima fiksiranim 1 h u odnosu na 24 h: ANOVA, $p > 0,05$. Vertikalne linije prikazuju 0,95 interval pouzdanosti.

Analiza intenziteta fluorescencijskog bojanja u trupu zebrice utvrdila je o starosti zavisno postepeno povećanje ekspresije (2-3 puta) proteina F-aktina od embrija starosti 1. dan do ličinke starosti 5. dan nakon oplodnje (Slika 40). Taj trend je bio uočljiv neovisno o vremenu fiksacije uzoraka između skupina jedinki starosti 3.-5. dana nakon oplodnje no kod uzoraka starosti 1.-3. dana nakon oplodnje povećanje ekspresije F-aktina je bilo vidljivo samo kod jedinki riba zebrica fiksiranih 1 h.

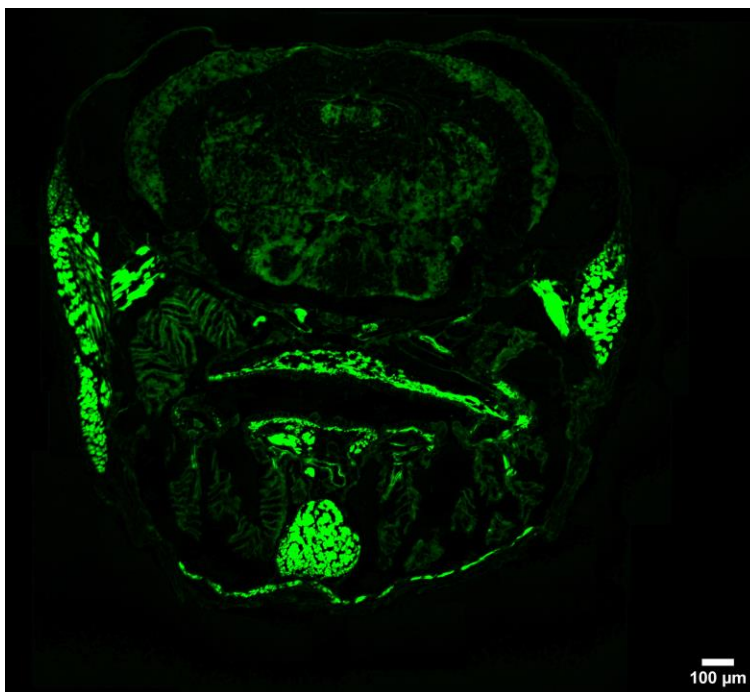


Slika 40. Ekspresija F-aktina u poprečnim presjecima trupa ribe zebrice različitih starosti kod uzoraka fiksiranih 1 h i 24 h. Intenziteti bojanja fluorescencijske boje FITC u skupinama uzoraka starosti 2.-5. dana nakon oplodnje statistički su značajno veći u uzorcima fiksiranim 1 h u odnosu na 24 h: ANOVA, Duncan post-hoc test, $p > 0,05$. Vertikalne linije prikazuju 0,95 interval pouzdanosti.

8.5. Upotreba modificiranog protokola za obradu uzoraka odraslih jedinki ribe zebrice u svrhu analize proteina F-aktina

U svrhu utvrđivanja upotrebe optimiziranog/modificiranog protokola za uzastopnu imunofluorescenciju i imunohistokemijsku analizu kriopreparata (Copper i sur. 2018; Ferguson i Shive 2019) provedeno je ispitivanje istog na uzorku odrasle jedinke ribe zebrice procijenjene starosti 33.-40. mjeseca nakon oplodnje i ukupne duljine tijela 10 mm. Jedina razlika je što su

spomenutom optimiziranom protokolu prethodili koraci fiksacije tkiva tijekom 24 h i uklanjanje mineralnog dijela koštanog tkiva upotrebom EDTA otopine kroz 5 dana. Mikroskopska analiza tkiva odrasle jedinke zebrice nakon prethodno opisane pripreme i histokemijske obrade pomoću faloidin-FITC-a otkrila je lokalizaciju proteina F-aktina u svim prethodno navedenim tkivima ličinke ribe zebrice pri čemu je ekspresija i dalje bila mnogo veća u mišićnim stanicama u odnosu na živčano tkivo (Slika 41).



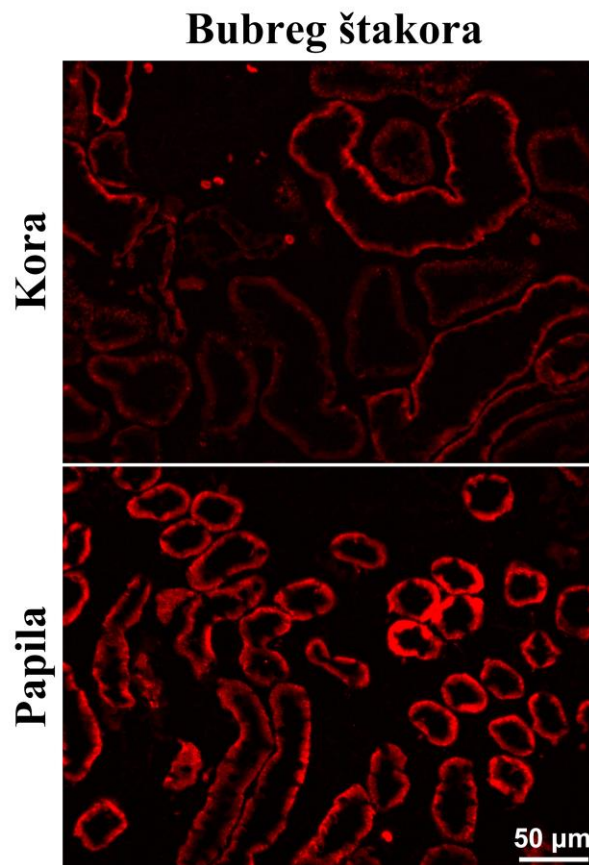
Slika 41. Lokalizacija i ekspresija proteina F-aktina u poprečnom presjeku stražnjeg dijela glave odrasle jedinke ribe zebrice fiksirane 24 h. Intenzitet bojanja fluorescencijske boje FITC vidljivo je jači u skeletnim mišićima peraja i mišićima srca i usne šupljine u odnosu na živčano tkivo mozga i tkivo škrge.

8.6. Upotreba protokola za obradu uzoraka tkiva zebrice u svrhu imunofluorescencijske analize membranskih proteina

Kako bi utvrdili mogućnost upotrebe specifičnih protutijela za lokalizaciju membranskih proteina ribe zebrice u okviru prethodno optimiziranog i modificiranog protokola za imunofluorescencijsku i imunohistokemijsku analizu, provedena su ispitivanja lokalizacije membranskog proteina Na^+/K^+ -ATPaze pomoću komercijalno dostupnog protutijela ($\alpha 6\text{F}$; *Delopmental Studies*

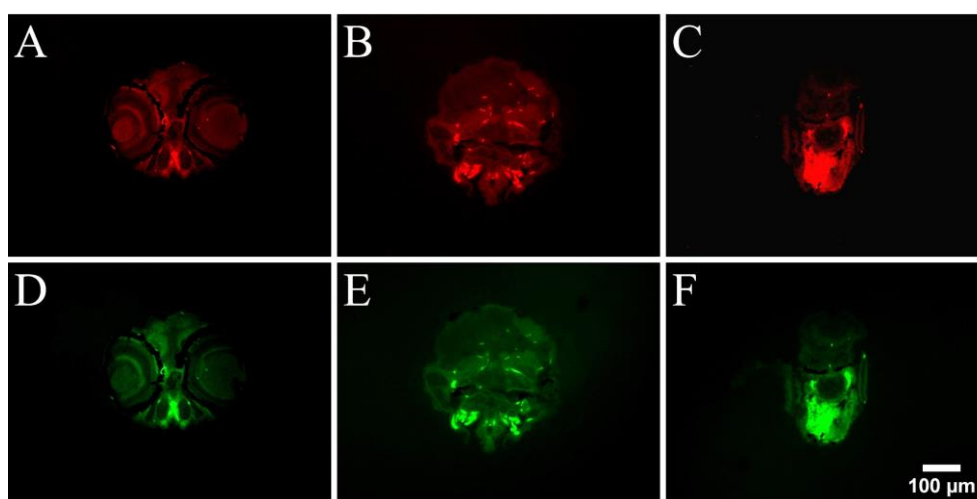
Hybridoma Bank) specifičnog za vezanje $\alpha 1$ podjedinice tog fiziološki važnog proteina (Drummond i sur. 1998).

Za pozitivnu kontrolu upotrebe Na^+/K^+ -Ab u imunofluorescencijskoj analizi korišteni su bubrezi štakora iz arhivskih uzoraka Jedinice za molekulsku toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja. Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su uspješno vezanje protutijela za protein Na^+/K^+ -ATPazu u bazolateralnoj membrani proksimalnih i distalnih kanalića bubrega, što odgovara njegovoj prethodno opisanoj lokalizaciji u bubregu štakora (Wetzel i Sweadner 2001). Najjače bojanje protutijela opaženo je u debelim uzlaznim krakovima Henleove petlje i distalnim zavijenim kanalićima dok je slabije bojanje uočeno u sabirnim kanalićima kore i proksimalnim kanalićima kore bubrega (Slika 42).



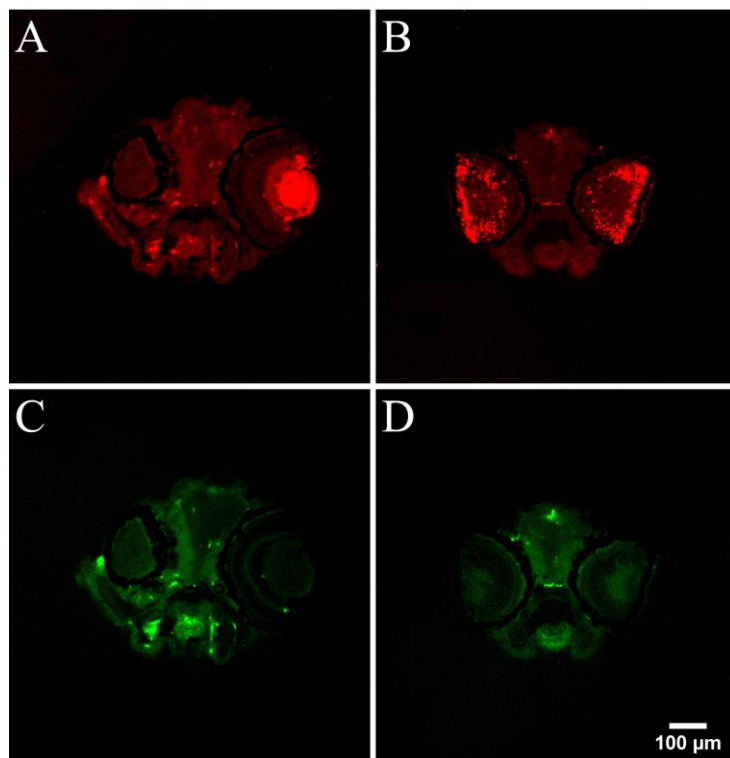
Slika 42. Lokalizacija proteina Na^+/K^+ -ATPaze u bazolateralnoj membrani kanalića bubrega štakora.

U svrhu određivanja lažnog bojanja koje može biti posljedica prirodne autofluorescencije tkiva ribe zebrice i nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela DAM-CY3 korištenog u imunofluorescencijskoj analizi lokalizacije proteina Na^+/K^+ -ATPaza upotrebene su dvije negativne kontrole. Prva negativna kontrola je uključivala analizu prirodne autofluorescencije u različitim poprečnim presjecima ribe zebrice (Slika 43). Prirodna autofluorescencija tkiva je kao i u prethodno opisanim histokemijskim analizama uočena u krvnim žilama mozga i škruga smještenim u prednjem i stražnjem dijelu glave ribe zebrice (Slika 43A, B, D i E) te u krvnim žilama i jetri smještenim u trupu ribe zebrice (Slika 43C i F).



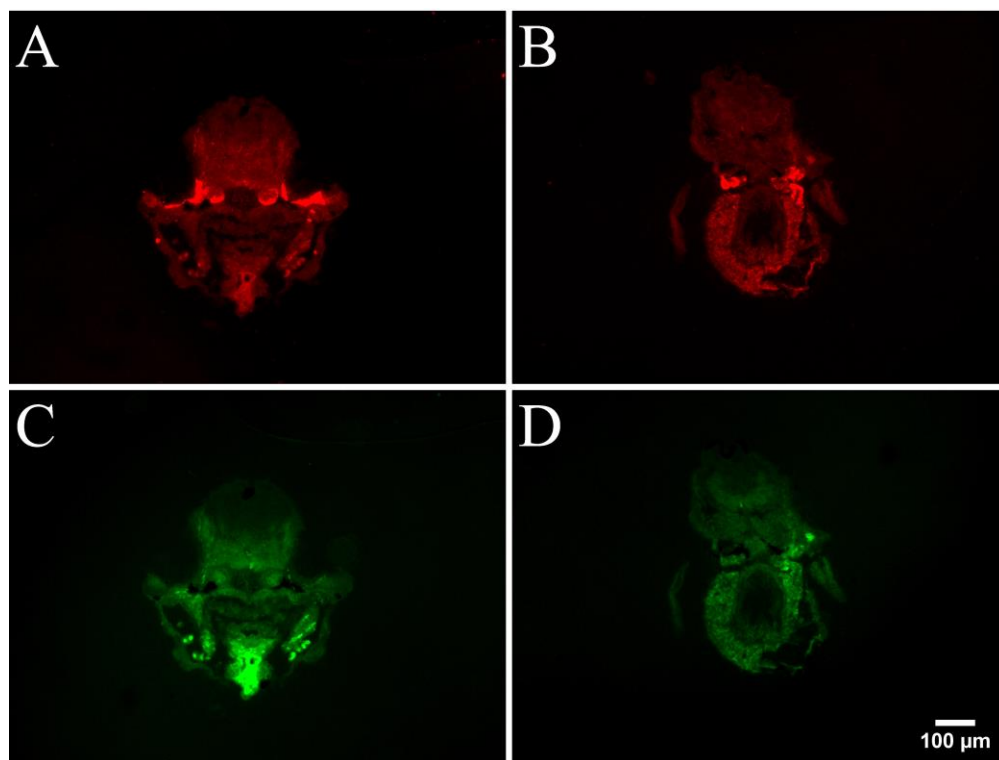
Slika 43. Prirodna autofluorescencija tkiva krvnih žila i krvlju ispunjenih tkiva (jetra) u prednjem (A i D) i stražnjem dijelu glave (B i E) i trupu (C i F) ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje vidljiva u crvenom (A, B i C) i zelenom (D, E i F) spektru svjetlosti.

Druga negativna kontrola uključivala je inkubaciju kriopreparata ribe zebrice isključivo u sekundarnom DAM-CY3 protutijelu bez prethodne inkubacije u primarnom protutijelu za protein Na^+/K^+ -ATPazu (Slika 44). Stoga su prije inkubacije u sekundarnom protutijelu, uzorci umjesto u primarnom protutijelu inkubirani u otopini korištenoj za pripremu primarnog protutijela, PBS + NaN_3 . Rezultati imunofluorescencijske analize otkrili su intenzivno bojanje leće oka te točkasto bojanje na vanjskom dijelu rožnice oka. Navedena bojanja nisu bila vidljiva u zelenom spektru svjetlosti kao što je to bio slučaj sa prirodnom autofluorescencijom krvnih žila u predjelu mozga, oka i usne šupljine (Slika 44).

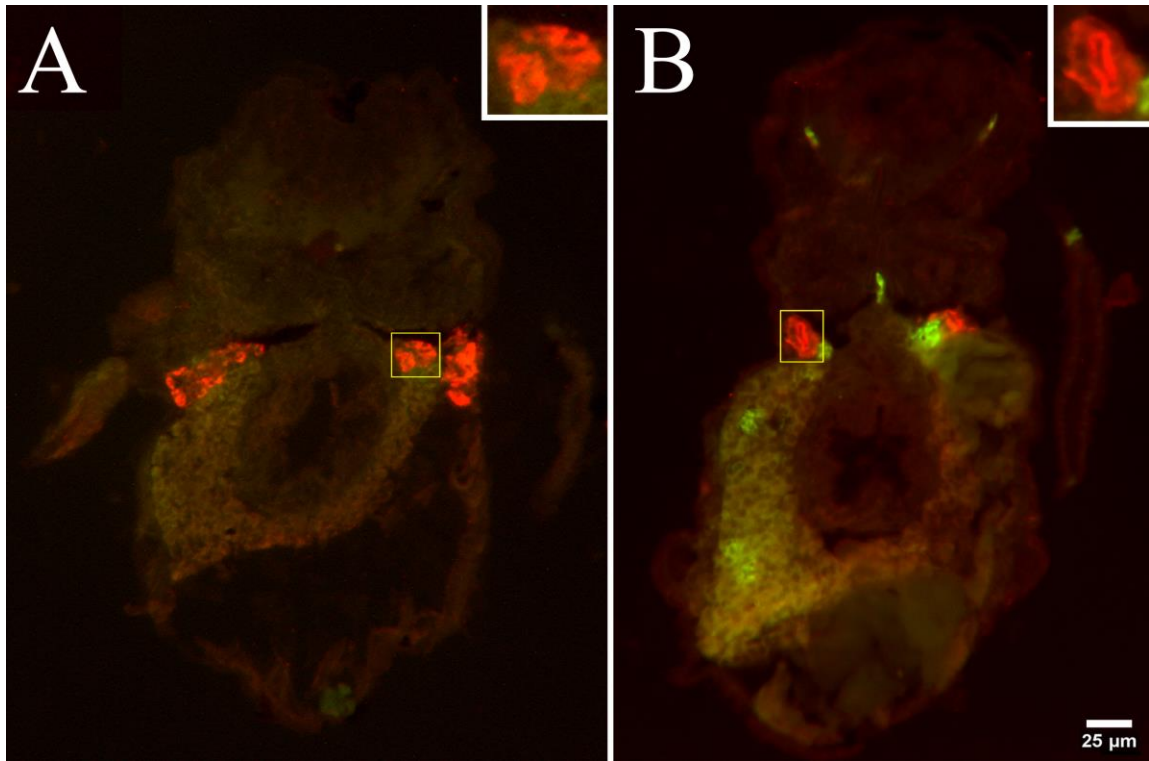


Slika 44. Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela DAM-CY3 za leću oka (A) i vanjsku površinu oka (B, točkasto bojanje) ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje vidljivo u crvenom (A i B), ali ne i u zelenom (C i D) spektru svjetlosti. Prirodna autofluorescencija krvnih žila vidljiva je u svim presjecima i oba spektra svjetlosti (A-D).

Imunofluorescencijska analiza kriopreparata ribe zebrice inkubiranih u primarnom protutijelu za Na^+/K^+ -ATPazu pokazala je bojanje u bazolateralnoj (uvijek) i apikalnoj (u jednom slučaju) membrani proksimalnih zavijenih i ravnih kanalića bubrega (pronefrosa) ribe zebrice (Slika 45A i B, 46). Prirodna autofluorescencija tkiva bila je vidljiva u krvi ispunjenim tkivima poput srca i jetre (Slika 45). Osim navedenih, nisu pronađena fluorescencijska bojanja u drugim dijelovima tijela.



Slika 45. Specifično vezanje protutijela Na^+/K^+ -Ab za $\alpha 1$ podjedinicu proteina Na^+/K^+ -ATPaza u kanalićima bubrega (pronefrosa) ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje. Protein Na^+/K^+ -ATPaza je lokaliziran u membranama epitelnih stanica proksimalnih (A) i distalnih (B) kanalića pronefrosa koje nije vidljivo u zelenom (C i D) spektru svjetlosti. Prirodna autofluorescencija srca (A i C), jetre i krvnih žila u blizini kanalića bubrega (B i D) vidljiva je u oba spektra svjetlosti.



Slika 46. Specifično vezanje protutijela Na⁺/K⁺-Ab za α1 podjedinicu proteina Na⁺/K⁺-ATPaza u kanalićima bubrega (pronefrosa) ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje. Pri većem povećanju (x400) uočljiva je lokalizacija proteina Na⁺/K⁺-ATPaza u apikalnoj (A) i (B) bazolateralnoj membrani epitelnih stanica kanalića bubrega. Prirodna autofluorescencija jetre i krvnih žila u blizini kanalića bubrega i mozgu vidljiva je u oba spektra svjetlosti (A-E).

9. Rasprava

Zebrica predstavlja važan *in vivo* model u znanstvenim istraživanjima, no trenutni pristupi u pripremi i obradi histoloških preparata ribe zebrice za proučavanje lokalizacije i ekspresije proteina su vrlo različiti. U ovom diplomskom radu ispitani su, objedinjeni i optimizirani svi prepoznati ključni čimbenici za pripremu histoloških preparata ribe zebrice, a u svrhu izrade jedinstvenog protokola za pripremu kvalitetnih kriopreparata svih razvojnih stadija ribe zebrice sa očuvanom anatomsko-histološkom strukturom. Kako bi smo ispitali kvalitetu pripremljenih kriopreparata, u ovom radu smo pristupili ispitivanju i upotrebi istih za lokalizaciju i ekspresiju fiziološki važnog citoskeletnog proteina F-aktina, a potom i membranskog prijenosnika Na^+/K^+ -ATPaze. Pri tome su redom u histokemijskoj i imunofluorescencijskoj analizi korišteni fluorescentno obilježeni mikotoksin faloidin koji se veže na filamente proteina F-aktina i protutijelo za $\alpha 1$ podjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze. Na taj način su provjerena dva različita pristupa koja se rutinski koriste u obilježavanju i istraživanju proteina u histološkim preparatima. Ključni čimbenici koji su ispitivani u okviru ovog diplomskog rada su: 1) vrijeme fiksacije uzoraka u 4 % PFA, 2) način uklapanja uzoraka u različitim otopinama govede želatine i saharoze, 3) temperatura pri rezanju uzorka, 4) debljina rezanja uzorka, i 5) sušenje i pohrana prikupljenih uzoraka.

Poznato je da fiksacija omogućava očuvanje staničnih i izvanstaničnih komponenti tkiva onemogućavajući razgradnju tkiva na način da sprječava autolizu tkiva, eliminira mikroorganizme i stabilizira makromolekularnu strukturu tkiva (Bancroft i Gamble 2007). Prema dosadašnjim istraživanjima optimalna fiksacijska otopina koja podjednako omogućava očuvanje nukleinskih kiselina i proteina je 4 % PFA ili 10 % formalin (engl. *neutral buffer formalin*) (Drummond i sur. 1998; Moore i sur. 2002; Westerfield 2007; Copper i sur. 2018; Ferguson i Shive 2019). Stoga, ta najčešće korištena otopina za fiksaciju korištena je i za fiksaciju uzoraka tkiva ribe zebrice u ovom diplomskom radu. Rezultati dosadašnjih istraživanja također upućuju da vrijeme fiksacije (npr. 24 h vs. 48 h) uzorka može igrati bitnu ulogu u očuvanju kvalitete tkiva ribe zebrice i imati posljedice na povezana histološka bojanja i analize (Copper i sur. 2018; Moore i sur. 2002). Rezultati ovog diplomskog rada u skladu su sa tim opažanjima i pokazuju da vrijeme fiksacije u 4 % PFA bitno utječe na očuvanje anatomsko-histološke strukture tkiva ribe zebrice, ali i na histokemijske analize otkrivanja lokalizacije proteina F-aktina. Naime, rezultati analiza provedenih u ovom radu nedvojbeno su pokazali da uzorci ribe zebrice starosti ≤ 5 dana nakon oplodnje fiksirani 1 h u 4 %

PFA na sobnoj temperaturi imaju očuvaniju anatomsko-histološku strukturu nego oni fiksirani 24 h pod istim uvjetima. To je ponajviše bilo vidljivo u broju i veličini oštećenja tkiva mozga i oka u glavi i leđne moždine, mišića i unutrašnjih organa u trupu i repu uzoraka ribe zebrice. Autofluorescencija tkiva, poglavito eritrocitima ispunjene krvne žile i organi, pomogla je otkriti oštećenja tkiva koja nisu uvijek bila vidljiva gledajući lokalizaciju staničnih jezgri. Inače, autofluorescencija je prepoznat fenomen u fluorescencijskoj mikroskopiji, a velikim je dijelom posljedica prisutnosti autofluorescencije eritrocita u krvnim žilama (Alpert i sur. 1980; Romijn i sur. 1999; Schnell i sur. 1999; Monici 2005; Whittington i Wray 2017). Zbog same veličine uzorka i postojanja koštanog tkiva, za postizanje uporedivih rezultata kod odrasle ribe zebrice (33.-40. mjesec nakon oplodnje; duljine 10 mm) uzorci su morali biti fiksirani 24 h i dekalificirani upotrebom 0,35 M EDTA prije rezanja na kriomikrotomu prema uputama iz prethodno objavljenog protokola (Copper i sur. 2018).

Poznato je da postojeće histološke metode koriste O.C.T. medij za uklapanje uzoraka prije rezanja na kriomikrotomu te da iste mogu rezultirati u mehaničkim oštećenjima uzoraka mekih tkiva poput mozga (Hine i Rodriguez 1992; Hruschka i sur. 2013). Jedan od novijih protokola pokazao je da je riblja želatina (15 %) u otopini 25 % saharoze pogodna za uklapanje uzoraka i pripremu kvalitetnih kriopreparata ribe zebrice (Ferguson i Shive 2019). No, dosada nitko nije ispitao mogućnost korištenja goveđe želatine kao komercijalno dostupne i jeftinije varijante. Stoga, u ovom radu ispitani su različiti omjeri goveđe želatine u otopini 25 % saharoze za potrebe uklapanja uzoraka i izrade kriopreparata očuvane anatomsko-histološke strukture. Analize autofluorescencije tkiva i lokalizacije F-aktina provedene na uzorcima uklopljenim u različitim otopinama želatine i saharoze otkrile su da su očuvanost anatomsko-histološke strukture tkiva i fluorescencijski signal za lokalizaciju F-aktina optimalni u uzorcima uklopljenim u smjesu 2,5 % goveđe želatine i 25 % saharoze. Dakle, za usporediv rezultat očuvanja anatomsko-histološke strukture tkiva ribe zebrice bio je potreban relativno niži udio goveđe želatine u otopini 25 % saharoze. S obzirom da je snaga goveđe želatine izražena u jedinici cvjetanja (engl. *bloom*) u prosjeku ~1,5 puta veća od snage riblje želatine ne iznenađuje da je za isti rezultat bilo potrebno smanjiti udio goveđe želatine u otopini saharoze za postizanje istog učinka (Derkach i sur. 2020; Nitsuwat i sur. 2021).

Temperatura kao i postavljena debljina pri rezanju uklopljenih uzoraka su također bitni čimbenici koji doprinose očuvanju anatomsko-histološke strukture tkiva (Peters 2015; Liyanage i sur. 2017;

MacMillan i Harris 2018). Ispitujući različite temperature komore kriomikrotoma pri rezanju različitih debljina tkivnih narezaka u ovom radu je utvrđeno da se najbolja kvaliteta kriopreparata ribe zebrice postiže pri temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i debljini tkivnih preparata od $8\text{ }\mu\text{m}$. Navedeni uvjeti se stoga nešto razlikuju od onih preporučenih u najnovijem protokolu za uzastopnu imunofluorescencijsku i imunohistokemijsku analizu kriopreparata embrija zebrice koji propisuju rezanje pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i debljini $10\text{-}12\text{ }\mu\text{m}$ (Ferguson i Shive 2019). Kao što je navedeno u spomenutom protokolu, a i utvrđeno prilikom izrade presjeka tkiva zebrice u ovom radu, trening operatera je iznimno bitan u pogledu usavršavanja tehnike rezanja pomoću kriomikrotoma i prikupljanja uzoraka na predmetna stakalca kako bi se dobili kriopreparati visoke kvalitete. Naposljetku, utvrđeno je da kod tako pripremljenih preparata ribe zebrice nastupa brza dehidracija uzorka pri sobnoj temperaturi koja često uzrokuje vidljiva mehanička oštećenja. To znači da je način pohrane kriopreparata još jedan čimbenik koji osigurava kvalitetu kriopreparata ribe zebrice te utječe na njihovu upotrebu u daljnjim analizama. Rezultati ovog istraživanja su utvrdili da je nepotrebno ostavljati preparate na sušenju preko noći već da je dehidracija koja nastupa u okviru nekoliko minuta na sobnoj temperaturi dovoljna kako bi se kriopreparati uspješno pohranili u hladnjak/zamrzivač pri temperaturi od $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Navedeno nadopunjuje upute iz protokola koji propisuje sušenje uzoraka preko noći i pohranu uzoraka pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do maksimalno 9 mjeseci (Ferguson i Shive 2019). Ipak, zbog tehničkih razloga i jednostavnosti pohrane uputno je pripremljene kriopreparate pohraniti pri temperaturi od $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unutar nekoliko minuta nakon izrade i koristiti unutar dva-tri mjeseca od pohrane kao što je to bio slučaj u ovom istraživanju.

Kako bi odredili optimalne uvjete za lokalizaciju fiziološki važnog citoskeletnog proteina F-aktina proučili smo učinak pojedinih uvjeta pripreme uzoraka ribe zebrice na određivanje intenziteta fluorescencijskog bojanja koji je posljedica vezanja faloidin-FITC konjugata za filamente spomenutog proteina. Uz učinak vremena fiksacije uzoraka u $4\text{ }\%$ PFA (1 h vs. 24 h) i inkubacije uzoraka u različitim otopinama želatine i $25\text{ }\%$ saharoze ispitan je učinak različitih razrijeđenja detergenta Tritona te alkohola ksilola i otopine 1% albumina goveđeg seruma koji se redom koriste za permeabilizaciju uzorka i smanjivanje nespecifičnog vezanja protutijela u različitim imunohistokemijskim protokolima. Analize intenziteta fluorescencijskog bojanja FITC molekule u uzorcima obrađenim spomenutim otopinama utvrdile su da je bojanje najintenzivnije kod uzoraka fiksiranih 1 h koji su potom uklopljeni u $2,5\text{ }\%$ goveđe želatine i $25\text{ }\%$ saharoze. Dodatna obrada uzoraka otopinama s većom koncentracijom Tritona ($>0,1\text{ }\%$), alkoholom ksilolom ili otopinom 1

% albumina goveđeg seruma nisu promjenile intenzitet bojanja faloidin-FITC-om čineći taj dio protokola nepotrebnim za daljnju upotrebu.

Korištenjem optimalnih uvjeta za pripremu i obradu kriopreparata ribe zebrice provedena je analiza lokalizacije proteina F-aktina u različitim organima/tkivima. Rezultati analize u okviru ovog istraživanja pokazali su da je F-aktin lokaliziran u skeletnim mišićima glave, trupa i repa, krvnim žilama glave, optičkom tektumu mozga, oba pleksiformna sloja i fotosenzoričkom dijelu oka te četkastoj membrani epitelnih stanica crijeva i glatkim mišićima crijeva. Lokalizacija F-aktina u mišićima prisutnim u različitim dijelovima tijela zebrice je u skladu sa činjenicom da skeletni, glatki i srčani mišići koriste aktinske (i miozinske) filamente za provođenje kontrakcije (Carroll 2007). Osim toga, poznato je da se citoskelet aksona koji se nalaze u optičkom tektumu mozga, očnom živcu, i pleksiformnim slojevima oka sastoji od aktinskih filamenata (Bertalmío 2019; Harvey i sur. 2019; Johansen-Berg i Behrens 2013; Nevin i sur. 2010). Fotosenzoričke stanice oka i endotelne stanice krvnih žila također posjeduju aktinske filamente koji imaju važnu ulogu u održavanju funkcije istih (Lu i sur. 2017; Okuda i Hogan 2020). Naposljetku, prethodno je opisano da se četkasta membrana na apikalnoj površini enterocita crijeva sastoji od gusto smještenih redova mikrovila cilindričnih izdanaka stanične membrane podupriete mikrofilamentima F-aktina koji se mogu vizualizirati upotrebom *Lifeact-Green Fluorecent Protein* tehnologije koristeći konfokalni mikroskop (Delacour i sur. 2016; Seiler i sur. 2012).

Prema dostupnoj literaturi dosada je jedno istraživanje opisalo promjene ekspresije gena aktina tijekom embrionalnog razvoja na razini cijelog organizma (Costa i sur. 2003; Shi i sur. 2005). Rezultati ovog istraživanja po prvi puta su pokazali promjenu ekspresije proteina F-aktina u različitim dijelovima tijela ribe zebrice. Također, otkrili su tkiva sa različitim razinama ekspresije F-aktina. Tako su fluorescencijske analize mikroskopskih slika pokazale da su skeletni mišići u trupu i repu mjesto najveće ekspresije proteina F-aktina i da je to mjesto gdje se odvijaju najveće promjene u ekspresiji tog proteina tijekom embrionalnog/ličinačkog razvoja ribe zebrice. Dakle, postepeno povećanje ekspresije proteina F-aktina zabilježeno u trupu i repu ribe zebrice u ovom radu u skladu je sa postepenim povećanjem ekspresije gena aktina opisanim u prethodno objavljenom istraživanju te je vjerojatno posljedica vidljivog povećanja mišićne mase zebrice tijekom njezinog embrionalnog/ličinačkog razvoja (Shi i sur. 2005).

Kako bi ispitali mogućnost korištenja protutijela za obilježavanje fiziološki važnih proteina poput Na^+/K^+ -ATPaze u okviru prethodno ispitanog i optimiziranog protokola, upotrijebili smo kriopreparate ribe zebrice starosti 4 dana nakon oplodnje za imunofluorecencijsku analizu lokalizacije navedenog proteina. Rezultati imunofluorecencijske analize provedene nakon obrade kriopreparata istim postupkom korištenim za određivanje F-aktina fluorescencijskom bojom faloidin-FITC pokazali su uspješno vezanje protutijela za protein Na^+/K^+ -ATPazu za bazolateralnu membranu epitelnih stanica kanalića bubrega (pronefrosa) ribe zebrice. Samo u jednom slučaju zabilježeno je vezanje istog protutijela za apikalnu membranu epitelnih stanica. Navedena lokalizacija proteina Na^+/K^+ -ATPaze na bazolateralnoj membrani epitelnih stanica kanalića bubrega sukladna je prethodno objavljenoj lokalizaciji tog proteina u cjelokupnim (engl. *whole mount*) uzorcima ribe zebrice na kojima se koristilo identično protutijelo (Drummond i sur. 1998; Drummond i Davidson 2016). Lokalizacija istog proteina u apikalnoj membrani kanalića bubrega ribe zebrice zabilježena je samo kod nekih mutanata (npr. *duble bubble* i *fleer*) za koje je pokazano da su izgubili bazolateralnu polarnost epitelnih stanica (Drummond i sur. 1998; Drummond i Davidson 2016). No, kako u ovom istraživanju nisu korišteni mutanti već jedinke divljeg soja (engl. *wild type*) ribe zebrice moguće je da je samo kod te jedinke došlo do promjene fiziološkog stanja koje je privremeno promjenilo lokalizaciju Na^+/K^+ -ATPaze. Usprkos tom nalazu koji se nije ponovio u svim drugim ponovljenim analizama, rezultati ovog istraživanja su pokazali da je optimizirani postupak za pripremu i obradu kriopreparata ribe zebrice moguće uspješno koristiti za sve razvojne stadije (uključujući i odrasle jedinke) u okviru različitih (imuno)histokemijskih postupaka za obilježavanje fiziološki važnih proteina poput F-aktina i Na^+/K^+ -ATPaze. Također, ovaj protokol predstavlja korak naprijed k definiranju jednostavnijeg i jedinstvenog protokola za (imuno)histokemijsku analizu tkiva ribe zebrice.

10. Zaključak

- 1) Provedbom postupka optimiziranja protokola za pripremu kvalitetnih kriopreparata ribe zebrice sa očuvanom anatomsko-histološkom strukturom definirani su sljedeći optimalni uvjeti:
 - a) Fiksiranje tkiva 1 h u 4 % PFA na sobnoj temperaturi
 - b) Inkubacija/uklapanje tkiva u otopinu 2,5 % goveđe želatine i 25 % saharoze
 - c) Temperatura od -20 °C za rezanje tkiva zebrice u komori kriostata
 - d) Debljina rezanja tkiva od 8 µm
 - e) Pohrana kriopreparata nekoliko minuta od pripreme na temperaturu od + 4 °C

- 2) Provedbom postupka optimiziranja protokola za obradu kriopreparata u svrhu analize stanične lokalizacije i ekspresije proteina F-aktina pomoću FITC-om obilježenog faloidina definirani su sljedeći optimalni uvjeti:
 - a) Fiksiranje tkiva 1 h u 4 % PFA na sobnoj temperaturi
 - b) Inkubacija/uklapanje tkiva u otopinu 2,5 % goveđe želatine i 25 % saharoze

- 3) Analiza intenziteta fluorescencijskog bojanja faloidin-FITC-a u uzorcima trupa zebrice otkrila je postupno o starosti zavisno povećanje ekspresije proteina F-aktina koje je ponajprije povezano sa povećanjem udjela mišićnog tkiva u trupu ribe zebrice tijekom embrionalnog razvoja između 1. i 5. dana poslije oplodnje. Isti trend povećanja ekspresije proteina F-aktina nije bio vidljiv u glavi gdje je udio mišića u odnosu na druge vrste tkiva bitno manji.

- 4) Korištenjem primarnog protutijela za obilježavanje proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u okviru imunofluorescencijske analize potvrđena je prethodno opisana lokalizacija spomenutog proteina i utvrđena je kompatibilnost optimiziranog protokola za pripremu i obradu kriopreparata u svrhu imunofluorescencijske analize membranskih proteina ribe zebrice. Stoga, rezultati ovog diplomskog rada pokazuju da se ovdje optimizirani protokol može koristiti za istraživanje lokalizacije i ekspresije membranskih i nemembranskih proteina u okviru različitih histoloških analiza kriopreparata navedenog životinjskog modela.

11. Literatura

- Aigouy B., Mirouse V. (2013): ScientiFig: A tool to build publication-ready scientific figures. *Nat. Methods* 10: 1048.
- Ali S., Champagne D.L., Spaink H.P., Richardson M.K. (2011): Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 93: 115–133.
- Alpern R.J., Herbert S.C., Seldin D.W., Giebisch G.H. (2008): *Seldin and Giebisch's the kidney: physiology & pathophysiology*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Alpert B., Jameson D.M., Weber G. (1980): Tryptophan Emission From Human Hemoglobin and Its Isolated Subunits. *Photochem Photobiol.* 31: 1–4.
- Armanios M., Chen J.L., Chang Y.P.C., Brodsky R.A., Hawkins A., Griffin C.A., Eshleman J.R., Cohen A.R., Chakravarti A., Hamosh A., Greider C.W. (2005): Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 15960–15964.
- Axelsen K.B., Palmgren M.G. (1998): Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84–101.
- Baker M. (2015): Blame it on the antibodies. *Nature* 521: 274–275.
- Bambino K., Chu J. (2017): Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Curr. Top. Dev. Biol.* 124: 331–367.
- Bancroft M., Gamble J. (2007): *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier Churchill Livingstone, London.
- Bateman A. (2019): UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47: D506–D515.
- Bertalmío M. (2019): *Vision models for high dynamic range and wide colour gamut imaging: techniques and applications*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Bilotta J., Saszik S. (2001): The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 621–629.
- Bjurstedt H. (1957): Respiratory system. *Annu. Rev. Physiol.* 19: 151–174.
- Braunbeck T., Lammer E. (2006): Fish embryo toxicity assays. *Contract* 20: 725–731.
- Bryant D.M., Stow J.L. (2004): The ins and outs of E-cadherin trafficking. *14*: 427–34.
- Bryson-Richardson R.J., Berger S., Schilling T.F., Hall T.E., Cole N.J., Gibson A.J., Sharpe J., Currie P.D. (2007): FishNet: an online database of zebrafish anatomy. *BMC Biol.* 5: 1–8.
- Buesa R.J., Peshkov M. V. (2009): Histology without xylene. *Ann. Diagn. Pathol.* 13: 246–256.
- Burgess D.R. (1975): Morphogenesis of intestinal villi. *Development* 34: 723–740.
- Busse B., Galloway J.L., Gray R.S., Harris M.P., Kwon R.Y. (2020): Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research. *J. Orthop. Res.* 38: 925–936.
- Byrd C.A., Brunjes P.C. (1995): Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J. Comp. Neurol.* 358: 247–259.
- Cameron R., Klein L., Shyjan A.W., Rakic P., Levenson R. (1994): Neurons and astroglia express distinct subsets of Na,K-ATPase α and β subunits. *Mol. Brain Res.* 21: 333–343.
- Caminos E., Velasco A., Jarrín M., Lillo C., Jimeno D., Aijón J., Lara J.M. (2000): A comparative study of protein kinase C-like immunoreactive cells in the retina. *Brain. Behav. Evol.* 56: 330–339.
- Canene-Adams K. (2013): Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for

- immunohistochemistry. *Methods Enzymol.* 533: 225–233.
- Cantley L.C. (1981): Structure and Mechanism of the (Na,K)-ATPase. *Curr. Top. Bioenerg.* 11: 201–237.
- Carneiro M.C., Castro I.P. De, Ferreira M.G. (2016): Telomeres in aging and disease: Lessons from zebrafish. *DMM Dis. Model. Mech.* 9: 737–748.
- Carpio Y., Estrada M.P.P. (2006): Zebrafish as a genetic model organism. *Biotechnol. Apl.* 23: 265–270.
- Carroll R.G. (2007): Elsevier's integrated physiology. Elsevier Mosby, Missouri.
- Casebolt D.B., Speare D.J., Horney B.S. (1998): Care and use of fish as laboratory animals: current state of knowledge. *Lab. Anim. Sci.* 48: 124–136.
- Ceci M., Mariano V., Romano N. (2019): Zebrafish as a translational regeneration model to study the activation of neural stem cells and role of their environment. *Rev. Neurosci.* 30: 45–66.
- Celis J.E. (2005). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Cerdà J., Conrad M., Markl J., Brand M., Herrmann H. (1998): Zebrafish vimentin: molecular characterisation, assembly properties and developmental expression. *Eur. J. Cell Biol.* 77: 175–187.
- Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Lee S.S. (2016): Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J. Nanobiotechnology* 14: 1–13.
- Chang W.J., Hwang P.P. (2011): Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93: 205–214.
- Cheng K.C., Levenson R., Robishaw J.D. (2003): Functional Genomic Dissection of Multimeric Protein Families in Zebrafish. *Dev. Dyn.* 228: 555–567.
- Cho S.J., Byun D., Nam T.S., Choi S.Y., Lee B.G., Kim M.K., Kim S. (2017): Zebrafish as an animal model in epilepsy studies with multichannel EEG recordings. *Sci. Rep.* 7: 1–10.
- Choi T.Y., Choi T.I., Lee Y.R., Choe S.K., Kim C.H. (2021): Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp. Mol. Med.* 53: 310–317.
- Connaughton V.P., Behar T.N., Liu W.L.S., Massey S.C. (1999): Immunocytochemical localization of excitatory and inhibitory neurotransmitters in the zebrafish retina. *Vis. Neurosci.* 16: 483–490.
- Cooper G.M. (2000). *The cell: a molecular approach*. ASM Press, Washington.
- Cooper M.S., D'Amico L.A., Henry C.A. (1999): Analyzing morphogenetic cell behaviors in vitally stained zebrafish embryos. *Methods Mol. Biol.* 122: 185–204.
- Cooper M.S., D'Amico L.A., Henry C.A. (1999): Confocal microscopic analysis of morphogenetic movements. *Methods Cell Biol.* 59: 179–204.
- Copper J.E., Budgeon L.R., Foutz C.A., Rossum D.B. Van, Vanselow D.J., Hubley M.J., Clark D.P., Mandrell D.T., Cheng K.C. (2018): Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 208: 38–46.
- Costa M.L., Escaleira R., Manasfi M., Souza L.F. de, Mermelstein C.S. (2003): Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 36: 1117–1120.
- Cox W.G., Singer V.L. (1999): A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 1443–1455.
- Delacour D., Salomon J., Robine S., Louvard D. (2016): Plasticity of the brush border-the yin and yang of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 161–174.
- Derkach S.R., Voron'ko N.G., Kuchina Y.A., Kolotova D.S. (2020): Modified fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin in modern food technologies. *Polymers (Basel).* 12: 1–10.

- Doherty T.J. (2003): Invited review: Aging and sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* 95: 1717–1727.
- Dominguez R., Holmes K.C. (2011): Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 40: 169–186.
- Dönnes P., Höglund A. (2004): Predicting protein subcellular localization: past, present, and future. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2: 209–215.
- Dooley K., Zon L.I. (2000): Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 252–256.
- Drummond I.A., Davidson A.J. (2016): Zebrafish kidney development. *Methods Cell Biol.* 134: 391–429.
- Drummond I.A., Majumdar A., Hentschel H., Elger M., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Neuhauss S.C.F., Stemple D.L., Zwartkruis F., Rangini Z., Driever W., Fishman M.C. (1998): Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 125: 4655–4667.
- Edward Harlow D.L. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York.
- Ellett F., Lieschke G.J. (2010): Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 563–570.
- EU Parliament, Council (2010): Directive 2010/63/eu of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* 276: 33–79.
- Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P. (2005): The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97–177.
- Evensen O. (2006): *Liver. Systemic Pathology of Fish*, London.
- Fazio M., Ablain J., Chuan Y., Langenau D.M., Zon L.I. (2020): Zebrafish patient avatars in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 20: 263–273.
- Ferguson J.L., Shive H.R. (2019): Sequential immunofluorescence and immunohistochemistry on cryosectioned zebrafish embryos. *J. Vis. Exp.* 14: 3–4.
- Finney J.L., Robertson G.N., McGee C.A.S., Smith F.M., Croll R.P. (2006): Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 495: 587–606.
- Flores E.M., Nguyen A.T., Odem M.A., Eisenhoffer G.T., Krachler A.M. (2020): The zebrafish as a model for gastrointestinal tract–microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 22: e13152.
- Francis P.J., Appukuttan B., Simmons E., Landauer N., Stoddard J., Hamon S., Ott J., Ferguson B., Klein M., Stout J.T., Neuringer M. (2008): Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease. *Hum. Mol. Genet.* 17: 2673–2680.
- Ge W. (2018): *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Gerhard G.S., Cheng K.C. (2002): A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell* 1: 104–111.
- Gerlach G.F., Wingert R.A. (2013): Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2: 559–585.
- Gestri G., Link B.A., Neuhauss S.C.F. (2012): The visual system of zebrafish and its use to model human ocular Diseases. *Dev. Neurobiol.* 72: 302–327.
- Glynn I.M. (2002): A Hundred Years of Sodium Pumping. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 1–18.
- Greiling T.M.S., Clark J.I. (2008): The transparent lens and cornea in the mouse and zebra fish eye. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 94–99.
- Guh Y.J., Lin C.H., Hwang P.P. (2015): Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J.* 14: 627–659.

- Hammond-Weinberger D.R., Zeruth G.T. (2019): Whole mount immunohistochemistry in zebrafish embryos and larvae. *J. Vis. Exp.* 29: 1–9.
- Hanson J., Lowy J. (1963): The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.* 6: 46–60.
- Haque E., Ward A.C. (2018): Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials* 8: 1–18.
- Harshbarger J.C., Clark J.B. (1990): Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Sci. Total Environ.* 94: 1–32.
- Hartmann T., Bergsdorf C., Sandbrink R., Tienari P.J., Multhaup G., Ida N., Bieger S., Dyrks T., Weidemann A., Masters C.L., Beyreuther K. (1996): Alzheimer's Disease: A4 Protein release and amyloid precursor protein sorting are regulated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 271: 13208–13214.
- Harvey B.M., Baxter M., Granato M. (2019): Optic nerve regeneration in larval zebrafish exhibits spontaneous capacity for retinotopic but not tectum specific axon targeting. *PLoS One* 14: e0218667.
- Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J.M. (2006): Cellular senescence in aging primates. *Science.* 311: 1257.
- Hill A.J., Bello S.M., Prash A.L., Peterson R.E., Heideman W. (2004): Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol. Sci.* 78: 78–87.
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86: 6–19.
- Hine B., Rodriguez R. (1992): Rapid gelatin embedding procedure for frozen brain tissue sectioning. *J. Histotechnol.* 15: 121–122.
- Hodgkin A. L., Huxley A. F. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117: 500–544.
- Hoek J.M., Hepkema W.M., Halfman W. (2020): The effect of journal guidelines on the reporting of antibody validation. *PeerJ* 8: 1–26.
- Hoffman K.L., McNaughton B.L. (2002): Coordinated reactivation of distributed memory traces in primate neocortex. *Science* 297: 2070–2073.
- Holden J., Layfield L., Matthews J.L. (2013): *Digestive system: The Zebrafish*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Tarrant J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., Stemple D.L. (2013): The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503.
- Hruschka V., Meinel A., Saeed A., Cheikh Al Ghanami R., Redl H., Shakesheff K., Wolbank S. (2013): Gelatin embedding for the preparation of thermoreversible or delicate scaffolds for histological analysis. *Biomed. Mater.* 8: 041001.
- Hwang P.P. (2009): Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* 212: 1745–1752.
- Hwang P.P., Chou M.Y. (2013): Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 465: 1233–1247.
- Hwang P.P., Fang M.J., Tsai J.C., Huang C.J., Chen S.T. (1998): Expression of mRNA and protein of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol. Biochem.* 18: 363–373.
- Hwang P.P., Lee T.H., Lin L.Y. (2011): Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: R28-47.
- Hwang P.P., Perry S.F. (2010): Ionic and acid–base regulation. *Fish Physiol.* 29: 311–344.

- Jacobson J.L., Fein G.G., Jacobson S.W., Schwartz P.M., Dowler J.K. (1984): The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *Am. J. Public Health* 74: 378–379.
- Johansen-Berg H., Behrens T.E.J. (2013): *Diffusion MRI: from quantitative measurement to in-vivo neuroanatomy*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Jørgensen P.L. (1974): Purification and characterization of (Na+K+)-ATPase IV. Estimation of the purity and of the molecular weight and polypeptide content per enzyme unit in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *BBA - Biomembr.* 356: 53–67.
- Jorgensen P.L., Håkansson K.O., Karlsh S.J.D. (2003): Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817–849.
- Junqueira L.C., Carneiro J. (2005): *Osnove histologije*. Školska knjiga, Zagreb.
- Karlsson J., Hofsten J. Von, Olsson P.E. (2001): Generating transparent zebrafish: A refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* 3: 522–527.
- Kawai H., Arata N., Nakayasu H. (2001): Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia* 36: 406–413.
- Keller E.T., Murtha J.M. (2004): The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 138: 335–341.
- Kimmel C.B. (1989): Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet.* 5: 283–288.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253–310.
- Kimmel C.B., Warga R.M. (1988): Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends Genet.* 4: 68–74.
- Kishi S., Bayliss P.E., Uchiyama J., Koshimizu E., Qi J., Nanjappa P., Imamura S., Islam A., Neuberg D., Amsterdam A., Roberts T.M. (2008): The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genet.* 4: e1000152.
- Kishi S., Slack B.E., Uchiyama J., Zhdanova I. V. (2009): Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates. *Gerontology* 55: 430–441.
- Kishi S., Uchiyama J., Baughman A.M., Goto T., Lin M.C., Tsai S.B. (2003): The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp. Gerontol.* 38: 777–786.
- Kogata N., Howard B.A. (2013): A whole-mount immunofluorescence protocol for three-dimensional imaging of the embryonic mammary primordium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18: 227–231.
- Kolb A., Hildebrandt F., Lawrence C. (2018): Effects of diet and social housing on reproductive success in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish* 15: 445–453.
- Kossack M.E., High S.K., Hopton R.E., Yan Y., Postlethwait J.H., Draper B.W. (2019): Female sex development and reproductive duct formation depend on Wnt4a in zebrafish. *Genetics* 211: 219–233.
- Kretzberg J., Ernst U. (2013): *Neurosciences*. Springer Nature, Baskingstoke.
- Lahne M., Hyde D.R. (2016): Interkinetic nuclear migration in the regenerating retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 854: 587–593.
- Lahnsteiner F. (2008): The sensitivity and reproducibility of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo test for the screening of waste water quality and for testing the toxicity of chemicals. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 36: 299–311.
- Lardelli M. (2014): *Transgenesis and Modelling: Using zebrafish in human disease research: some*

- advantages, disadvantages and ethical considerations. *PLoS One* 9: 23–28.
- Liyanage S., Dassanayake R.S., Bouyanfif A., Rajakaruna E., Ramalingam L., Moustaid-Moussa N., Abidi N. (2017): Optimization and validation of cryostat temperature conditions for trans-reflectance mode FTIR microspectroscopic imaging of biological tissues. *MethodsX* 4: 118–127.
- Lu Z., Hu X., Liu F., Soares D.C., Liu X., Yu S., Gao M., Han S., Qin Y., Li C., Jiang T., Luo D., Guo A.Y., Tang Z., Liu M. (2017): Ablation of EYS in zebrafish causes mislocalisation of outer segment proteins, F-actin disruption and cone-rod dystrophy. *Sci. Rep.* 7: 1–12.
- Lundberg E., Borner G.H.H. (2019): Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 285–302.
- Macdonald R. (1999): Zebrafish immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* 127: 77–88.
- MacDonald R.B., Randlett O., Oswald J., Yoshimatsu T., Franze K., Harris W.A. (2015): Müller glia provide essential tensile strength to the developing retina. *J. Cell Biol.* 210: 1075–1083.
- MacMillan D.B., Harris R.J. (2018): *An Atlas of Comparative Vertebrate Histology*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- MacRae C.A., Peterson R.T. (2015): Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14: 721–731.
- Mahabadi N., Khalili Y. Al (2021): *Neuroanatomy, Retina*. StatPearls, Treasure Island.
- Malik N., Canfield V., Sanchez-Watts G., Watts A.G., Scherer S., Beatty B.G., Gros P., Levenson R. (1998): Structural organization and chromosomal localization of the human Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit gene and pseudogene. *Mamm. Genome* 9: 136–143.
- Malik N., Canfield V.A., Beckers M.C., Gros P., Levenson R. (1996): Identification of the mammalian Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 22754–22758.
- Marck A., Antero J., Berthelot G., Johnson S., Sedeaud A., Leroy A., Marc A., Spedding M., Meglio J.M. Di, Toussaint J.F. (2019): Age-related upper limits in physical performances. *Journals Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 74: 591–599.
- Menke A.L., Spitsbergen J.M., Wolterbeek A.P.M., Woutersen R.A. (2011): Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39: 759–775.
- Mokhtar D. (2017): *Fish Histology*. CRC Press, Boca Raton.
- Monici M. (2005): Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 227–256.
- Moore J.L., Aros M., Steudel K.G., Cheng K.C. (2002): Fixation and decalcification of adult zebrafish for histological, immunocytochemical, and genotypic analysis. *Biotechniques* 32: 296–298.
- Morth J.P., Pedersen B.P., Buch-Pedersen M.J., Andersen J.P., Vilsen B., Palmgren M.G., Nissen P. (2011): A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 60–70.
- Nassauw L. Van, Harrisson F., Callebaut M. (1991): Localization of smooth-muscle markers in the ovaries of some ectothermic vertebrates. *Anat. Rec.* 229: 439–446.
- Nevin L.M., Robles E., Baier H., Scott E.K. (2010): Focusing on optic tectum circuitry through the lens of genetics. *BMC Biol.* 8: 1–10.
- Newman M., Ebrahimie E., Lardelli M. (2014): Using the zebrafish model for Alzheimer’s disease research. *Front. Genet.* 5: 1–10.
- Nitsuwat S., Zhang P., Ng K., Fang Z. (2021): Fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin for food industry: A meta-analysis. *LWT-Food Sci. Technol.* 141: 110899.
- Nusslein-Volhard, Dahm R. (2003): *Zebrafish: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.

- Okuda K.S., Hogan B.M. (2020): Endothelial cell dynamics in vascular development: insights from live-imaging in zebrafish. *Front. Physiol.* 11:842.
- Papan C., Campos-Ortega J.A. (1994): On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203: 178–186.
- Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer E. (2009): Normal table of post-embryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* 238: 2975–3015.
- Pereira A.C., Gomes T., Ferreira Machado M.R., Rocha T.L. (2019): The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environ. Pollut.* 252: 1841–1853.
- Peters A. (2002): Structural changes in the normally aging cerebral cortex of primates. *Prog. Brain Res.* 136: 455–465.
- Peters S.R. (2015): Pathology Innovations: Frozen Section Technique III. *Pathol. Innov.* 201: 847-7600
- Piatigorsky J. (2002): Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea. *LWW* 20: 853–858.
- Pinto C.S., Mishima M., Sampath K. (2020): Tools of the trade: studying actin in zebrafish. *Histochem. Cell Biol.* 154: 481–493.
- Plas-Duivestijn S.J. Van Der, Mohammed Y., Dalebout H., Meijer A., Botermans A., Hoogendijk J.L., Henneman A.A., Deelder A.M., Spaik H.P., Palmblad M. (2014): Identifying proteins in zebrafish embryos using spectral libraries generated from dissected adult organs and tissues. *J. Proteome Res.* 13: 1537–1544.
- Pollard T.D. (2016): Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8: 1–18.
- Poon K.L., Brand T. (2013): The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 1: 9-28.
- Post R.L., Jolly P.C.I. (1957): The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 25: 118–128.
- Postlethwait J.H., Woods I.G., Ngo-Hazelett P., Yan Y.L., Kelly P.D., Chu F., Huang H., Hill-Force A., Talbot W.S. (2000): Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10: 1890–1902.
- Powers D.A. (1989): Fish as model systems. *Science* 246: 352–8.
- Price E.M. (1990): Molecular Genetics of Na⁺, K-ATPase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38: 37-89.
- Prince V.E., Anderson R.M., Dalgin G. (2017): Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies. *Curr. Top. Dev. Biol.* 124: 235–276.
- Qin C., Bai Y., Zeng Z., Wang L., Luo Z., Wang S., Zou S. (2018): The cutting and floating method for paraffin-embedded tissue for sectioning. *J. Vis. Exp.* 139: 58288.
- Raamsdonk W. van, Tekronnie G., Pool C.W., Laarse W. van de (1980): An immune histochemical and enzymic characterization of the muscle fibres in myotomal muscle of the teleost *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan. *Acta Histochem.* 67: 200–216.
- Rajaroo S.J.R., Canfield V.A., Mohideen M.A.P.K., Yan Y.L., Postlethwait J.H., Cheng K.C., Levenson R. (2001): The repertoire of Na⁺, K-ATPase α and β subunit genes expressed in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Genome Res.* 11: 1211–1220.
- Ramón y Cajal S., Thorpe S.A., Glickstein M. (1972): The structure of the retina. *Nature.* 239: 529-530.
- Roberts R.J., Ellis A.E. (2012): *The Anatomy and Physiology of Teleost*. Wiley Online Library, New Jersey.

- Robles E., Laurell E., Baier H. (2014): The retinal projectome reveals brain-area-specific visual representations generated by ganglion cell diversity. *Curr. Biol.* 24: 2085–2096.
- Romijn H.J., Uum J.F.M. Van, Breedijk I., Emmering J., Radu I., Pool C.W. (1999): Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 229–235.
- Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W. (2017): ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18: 1–26.
- Sabalaiuskas N.A., Foutz C.A., Mest J.R., Budgeon L.R., Sidor A.T., Gershenson J.A., Joshi S.B., Cheng K.C. (2006): High-throughput zebrafish histology. *Methods* 39: 246–254.
- Saleem S., Kannan R.R. (2018): Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer’s disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov.* 4: 45.
- Santoriello C., Zon L.I. (2012): Hooked! modeling human disease in zebrafish. *J. Clin. Invest.* 122: 2337–2343.
- Santos C., Pinto M.D.L. (2018): Immunohistochemical assessment as a tool for investigating developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Methods Mol Biol.* 1797: 461–476.
- Santos D., Monteiro S.M., Luzo A. (2018): General whole-mount immunohistochemistry of zebrafish (*Danio rerio*): Embryos and Larvae Protocol. *Teratog. Test. Methods Protoc.* 1797: 365–371.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012): Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9: 676–682.
- Schnell S.A., Staines W.A., Wessendorf M.W. (1999): Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 719–730.
- Seiler C., Davuluri G., Abrams J., Byfield F.J., Janmey P.A., Pack M. (2012): Smooth muscle tension induces invasive remodeling of the zebrafish intestine. *PLoS Biol.* 10: e1001386.
- Shen C., Zuo Z. (2020): Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27: 43599–43614.
- Shi X., Bosenko D. V., Zinkevich N.S., Foley S., Hyde D.R., Semina E. V., Vihtelic T.S. (2005): Zebrafish *pitx3* is necessary for normal lens and retinal development. *Mech. Dev.* 122: 513–527.
- Short K.R., Bigelow M.L., Kahl J., Singh R., Coenen-Schimke J., Raghavakaimal S., Nair K.S. (2005): Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 5618–5623.
- Shurety W., Merino-trigo A.N.A., Brown D., Hume D.A., Stow J.L. (2000): Localization and post-golgi trafficking of tumor necrosis factor- α in macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* 438: 427–438.
- Shyjan R., Levenson E. (1989): Antisera specific for the alpha 1, alpha 2, alpha 3, and beta subunits of the Na,K-ATPase: differential expression of alpha and beta subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry* 28: 4531–4535.
- Silvan U., Jockusch B.M., Schoenenberger C.A. (2013): Unconventional actin configurations step into the limelight. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 90: 151–177.
- Skou J.C., Esmann N, Esmann M. (1992): The Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24: 249–61.
- Solnica-Krezel L., Stemple D.L., Driever W. (1995): Transparent things: Cell fates and cell movements during early embryogenesis of zebrafish. *BioEssays* 17: 931–939.

- Speare D.J., Ferguson H.W. (2006): Gills and pseudobranchs. *Syst. Pathol. Fish*, str. 24–63.
- Speare D.J., Frasca S.J. (2006): Nervous system. *Syst. Pathol. Fish*, str. 219–243.
- Spence R., Fatema M.K., Ellis S., Ahmed Z.F., Smith C. (2007): Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *J. Fish Biol.* 71: 304–309.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83: 13–34.
- Stadler C., Rexhepaj E., Singan V.R., Murphy R.F., Pepperkok R., Uhlén M., Simpson J.C., Lundberg E. (2013): Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat Methods* 10: 315–23.
- Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T. (2012): Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments: A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33: 128–132.
- Takeyasu K., Tamkuns M., Renaud K.J., Fambrough D.M. (1988): Ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection with DNA encoding the alpha-subunit of an avian sodium pump. *J. Biol. Chem.* 263: 4347–4354.
- Tavakoli S., Rothschild H., Zon L.I. (2017): Zebrafish as a Model for Human Diseases. *Genome Res.* 9: 99–100.
- Tsai C.W., Tseng J.J., Lin S.C., Chang C.Y., Wu J.L., Horng J.F., Tsay H.J. (2001): Primary structure and developmental expression of zebrafish sodium channel Nav1.6 during neurogenesis. *DNA Cell Biol.* 20: 249–255.
- Tsai S.B., Tucci V., Uchiyama J., Fabian N.J., Lin M.C., Bayliss P.E., Neuberger D.S., Zhdanova I. V., Kishi S. (2007): Differential effects of genotoxic stress on both concurrent body growth and gradual senescence in the adult zebrafish. *Aging Cell* 6: 209–224.
- Underhill D.A., Canfield V.A., Dahl J.P., Gros P., Levenson R. (1999): The Na,K-ATPase $\alpha 4$ gene (*Atp1a4*) encodes a ouabain-resistant α subunit and is tightly linked to the $\alpha 2$ gene (*Atp1a2*) on mouse chromosome 1. *Biochemistry* 38: 14746–14751.
- Veldman M.B., Lin S. (2008): Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatr. Res.* 64: 470–476.
- Ven L.T.M. Van Der, Holbech H., Fenske M., Brandhof E.J. Van Den, Gielis-Proper F.K., Wester P.W. (2003): Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: Evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. *Aquat. Toxicol.* 65: 1–11.
- Vishwakarma S. (2017): Techniques in histopathology and cytopathology. Jaypee Brothers Medical, Madhya Pradesh.
- <https://www.iucnredlist.org/> (pristupljeno 26.5.2021.)
- Vize P.D., Woolf A.S., Bard J.B.L. (2003): The kidney: from normal development to congenital diseases. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Wallace K.N., Akhter S., Smith E.M., Lorent K., Pack M. (2005): Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech. Dev.* 122: 157–173.
- Westerfield M. (2007): The zebrafish book, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Oregon.
- Wetzel R.K., Sweadner K.J. (2001): Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281: F531–F545.
- Whittington N.C., Wray S. (2017): Suppression of red blood cell autofluorescence for immunocytochemistry on fixed embryonic mouse tissue. *Curr. Protoc. Neurosci.* 81: 2.28.1–2.28.12.
- Wingert R.A., Selleck R., Yu J., Song H.D., Chen Z., Song A., Zhou Y., Thisse B., Thisse C.,

- McMahon A.P., Davidson A.J. (2007): The *cdx* genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. *PLoS Genet.* 3: 1922–1938.
- Wittenberg J.B., Haedrich R.L. (1974): The choroid rete mirabile of the fish eye. II. Distribution and relation to the pseudobranch and to the swimbladder rete mirabile. *Biol. Bull.* 146: 137–156.
- Wong K.K., Maser R.S., Bachoo R.M., Menon J., Carrasco D.R., Gu Y., Alt F.W., DePinho R.A. (2003): Telomere dysfunction and *Atm* deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* 421: 643–648.
- Woo A.L., James P.F., Lingrel J.B. (1999): Characterization of the fourth α isoform of the Na,K-ATPase. *J. Membr. Biol.* 169: 39–44.
- Wullimann M.F., Rink E. (2001): Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. *Dev. Brain Res.* 131: 173–191.
- Xie R., Chung J.Y., Ylaya K., Williams R.L., Guerrero N., Nakatsuka N., Badie C., Hewitt S.M. (2011): Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 356–365.
- Yelon D., Horne S.A., Stainier D.Y.R. (1999): Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev. Biol.* 214: 23–37.
- Youson J.H., Al-Mahrouki A.A. (1999): Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116: 303–335.
- Yu L., Tucci V., Kishi S., Zhdanova I. V. (2006): Cognitive aging in zebrafish. *PLoS One* 1: e14.
- Yue M.S., Peterson R.E., Heideman W. (2015): Dioxin inhibition of swim bladder development in zebrafish: Is it secondary to heart failure? *Aquat. Toxicol.* 162: 10–17.
- Zaucker A., Kumari P., Sampath K. (2020): Zebrafish embryogenesis – A framework to study regulatory RNA elements in development and disease. *Dev. Biol.* 457: 172–180.
- Zhdanova I. V., Yu L., Lopez-Patino M., Shang E., Kishi S., Guelin E. (2008): Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res. Bull.* 75: 433–441.

12. Životopis

Nency Babić rođena je 15. travnja 1996. godine u Dubrovniku, Republika Hrvatska. Osnovnoškolsko obrazovanje je stekla u Osnovnoj školi Smljevac, a srednjoškolsko u Klasičnoj gimnaziji Ivana Pavla II. u Zadru. Završila je preddiplomski sveučilišni studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu tijekom kojeg je sudjelovala u Erasmus programu studentske razmjene na Università degli Studi del Sannio di Benevento u Italiji. Upisala je 2019. diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.