

Regenerace u obojživelníků

Tomáš Bárta, Vít Hubinka

Regenerace obecně

Schopnost organismů z části znovu nastartovat vývojové procesy za účelem znovuoobnovy funkce poškozené tkáně.

Regenerace nemusí probíhat podle stejných pravidel jako vývoj (embryonální) konkrétní tkáně.

Regenerační schopnosti mají jen živočichové bez konečného determinovaného embryonálního vývoje.

Omezená regenerace až bez regenerace: živočichové s přísně determinovaným embryonálním vývojem (vířníci, hlístice, pijavky, motolice, někteří měkkýši, některé medúzy, korálové polypy – ochrana kolonií)

Řád **Urodela** (mloci)

- největší schopnost regenerace mezi obratlovci
- celou končetinu, čelisti, části oka (jako jsou čočka nebo sítnice), střevo a dokonce malé části srdce.
- lehce přijímají allotransplantáty

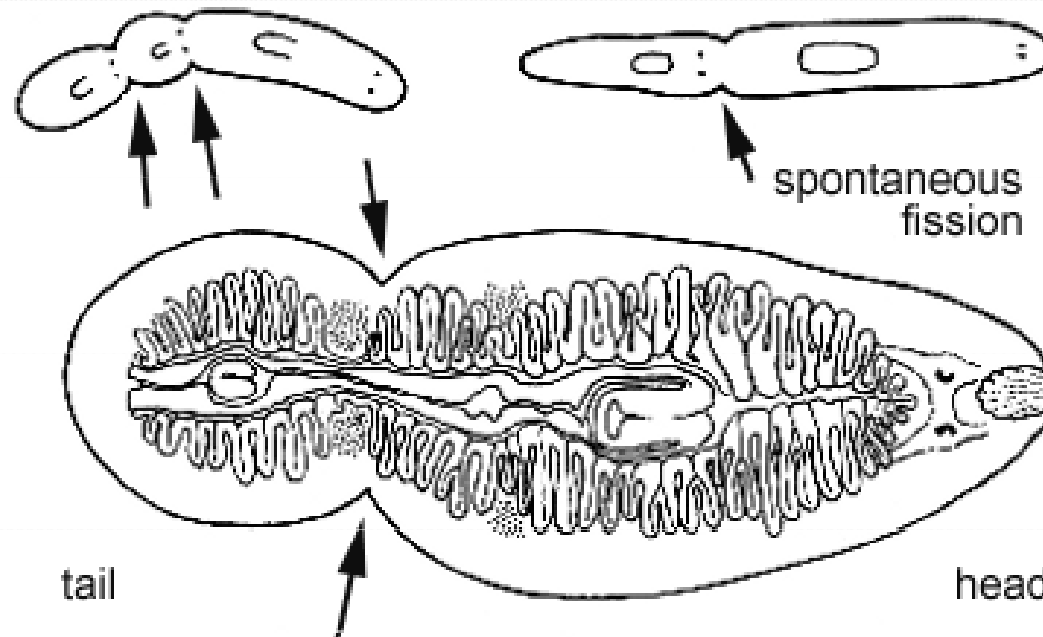
Žáby mají regenerační schopnosti o dost menší a jejich regenerační schopnosti se snižují s věkem, přičemž po metamorfóze obvykle vymizí. < rozdílný embryonálním vývoj, respektive jeho načasování.

Vývoj končetin u **amniot** nastává velmi brzy a při jejich formování dochází k interakcím s přechodnými strukturami časného embrya (somity) zatímco u obojživelníků je vývoj končetin **pozdržen** a k jejich vývoji už nejsou nezbytné žádné dočasné struktury.

Typy regenerace

- A) fyziologická regenerace
- B) reparační regenerace
- C) rozmnožovací regenerace

- např. Fissiparie – rozpad na menší kusy z nichž vznikají noví jedinci.



ploštěnka

Modelové organizmy

Urodela – axolotl mexický (*Ambystoma mexicanum*)

- značná regenerační schopnost
- lehce se chová (oproti ostatním mlokům – nepotřebuje terestriální fázi života, normálně se už chová i jako domácí mazlíček)

Anura – žába drápatka (*Xenopus laevis*)

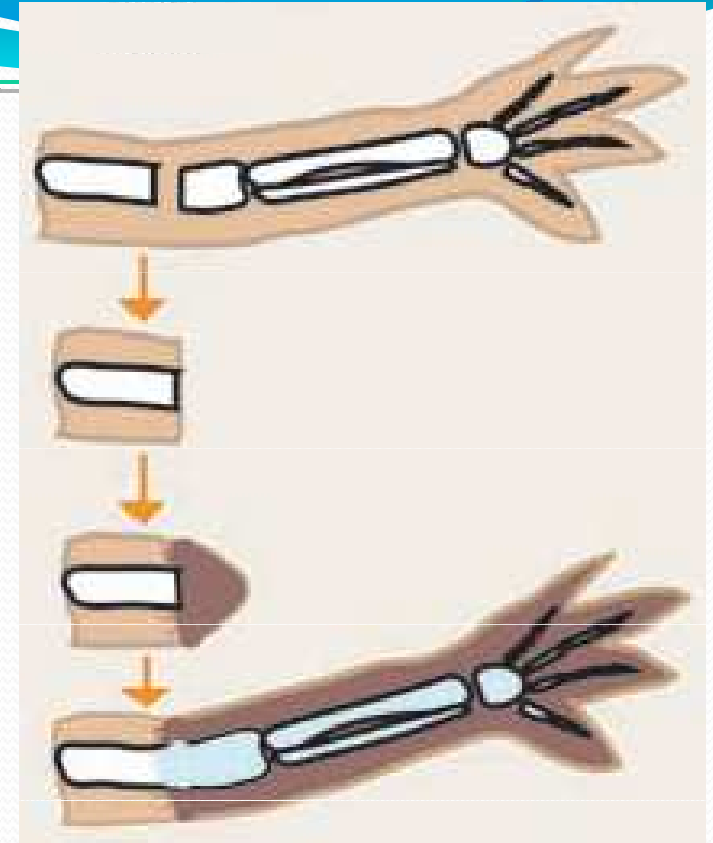
- docela dobrá regenerace před metamorfózou
- lehce se chová
- velká embrya se kterými se snadno manipuluje

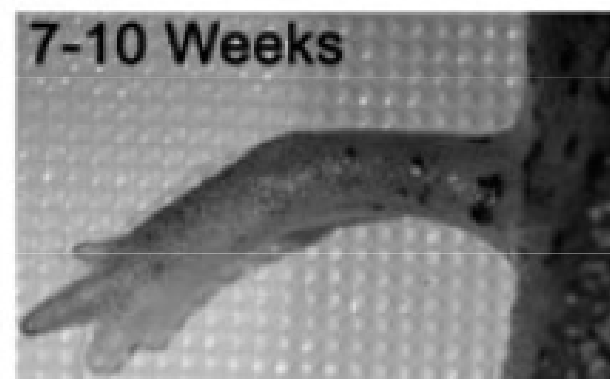
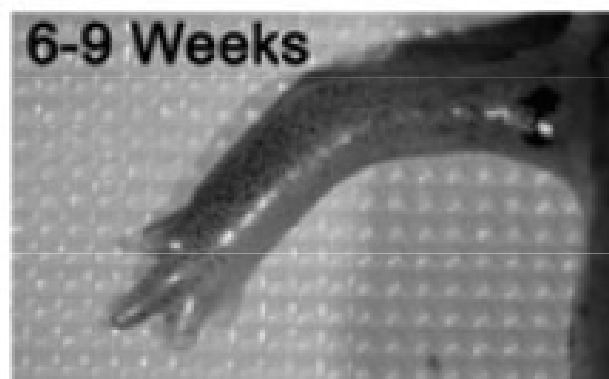
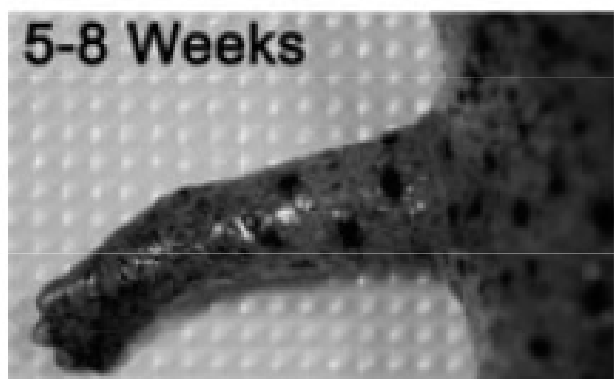
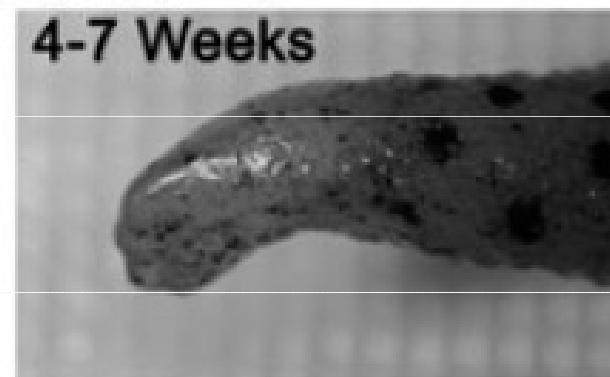
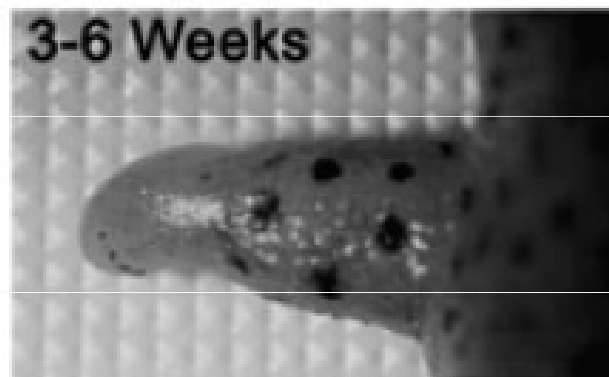
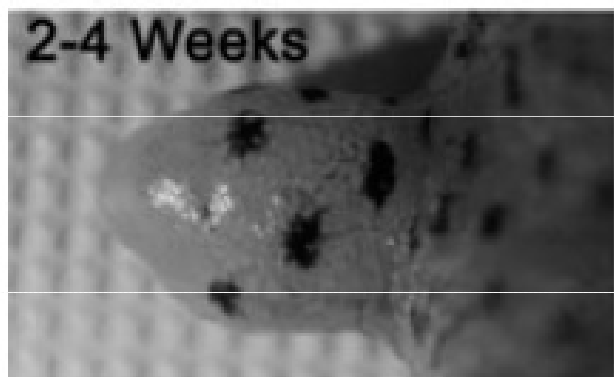
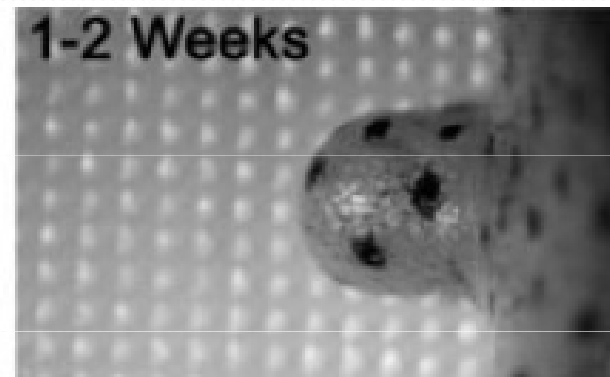
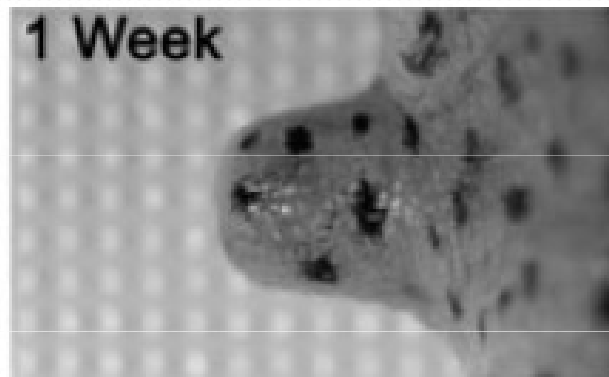
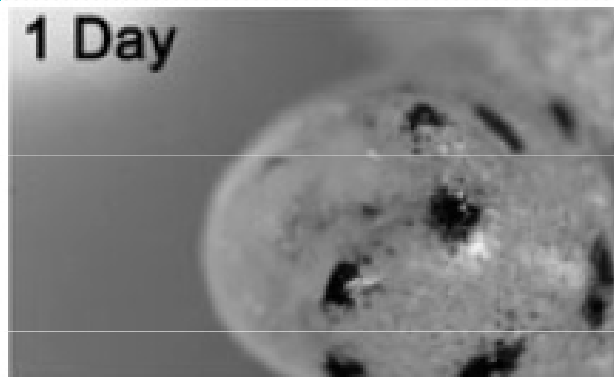


Fáze regenerace

Trauma

- **Epitelizace** - zacelení rány (1 – 2 h)
 - vcestování buněk *stratum basale*
 - bez *lamina basalis* (epitel – mesenchym)
- **tvorba blastému** (několik dní)
 - (dediferenciace > proliferace)
 - dediferenciace mesenchymálních buněk (osteo- chondro- fibro- myo-)
 - vstup do S fáze BC (inaktivace RB)
- **rediferenciace** (redevelopment) (1 - 3 m)
 - správné určení tělních os
 - tvorba specifických buněk a struktur (cévy, nervy) tak jak byly před amputací





(Odelberg, 2005)

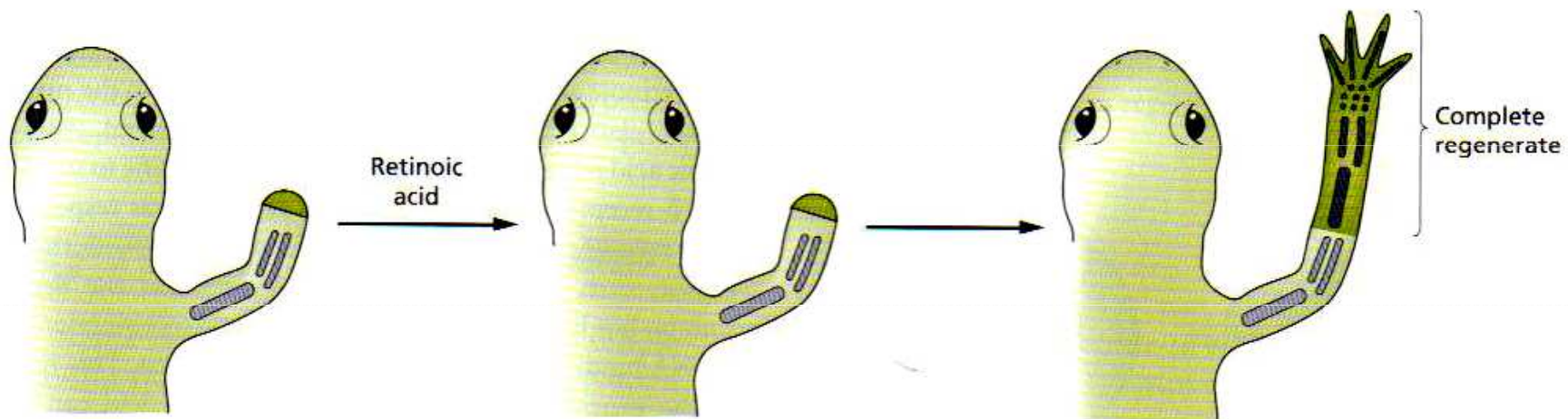
Positional memory

Blastemální buňky si „**pamatují**“ svůj původ.

- Jen takové progenitory, které dají základ všem ostatním tkáním reparovaného orgánu
 - vznikají tak konkrétní progenitorové buňky např. končetiny (zápěstí, lokte, ramene...), ocasu nebo čočky
 - ať je amputace provedena na jakékoli části končetiny, vždy vzniká z blastému právě jen odstraněná část.
-
- Z výše uvedeného je patrné, že existuje klesající gradient buněčné adhezivity od distální k proximální části končetiny.

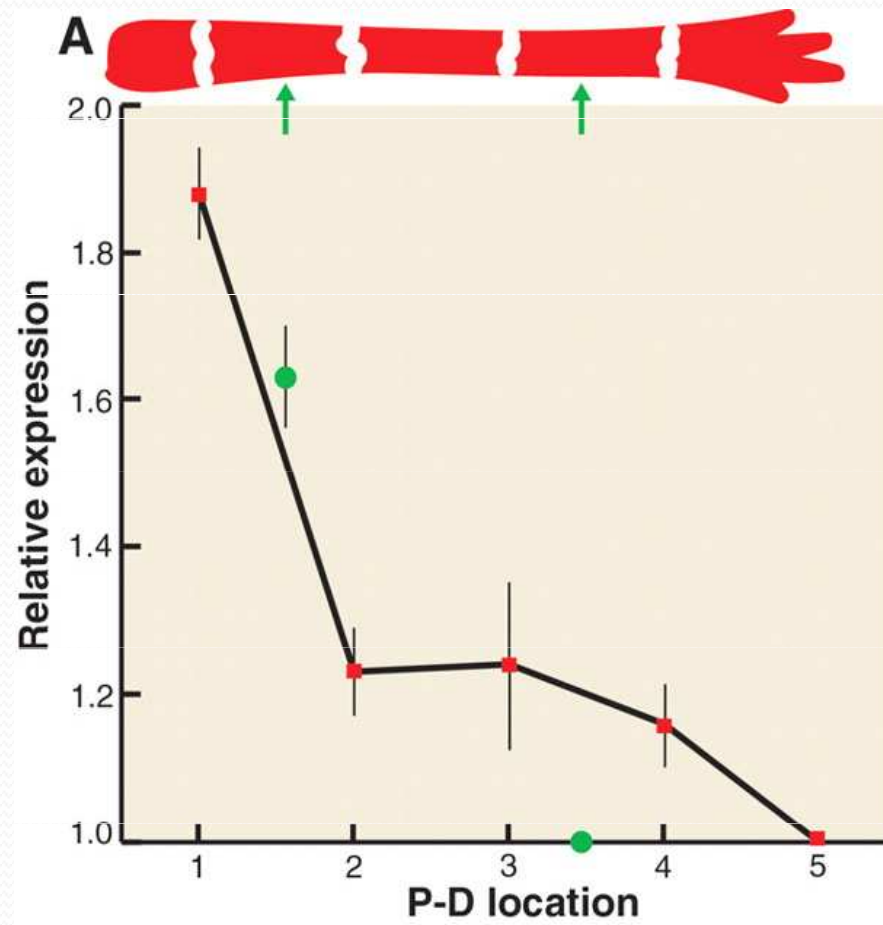
Určování tělních os

- Udává směr, kterým se má nová končetina formovat (vždy distálně)
- **PD osa (proximo-distální)**
 - formována **mezibuněčnými kontakty** nebo **koncentračním gradientem specifických molekul**. Jako vhodný kandidát se ukázala kyselina retinová a její prekurzory (vitamin A). Rozdíl mezi koncentrací retinoidů v proximální (bližší) a distální části je cca 2,5x a tento rozdíl může určovat změny v expresi genů.



- **Prod 1**

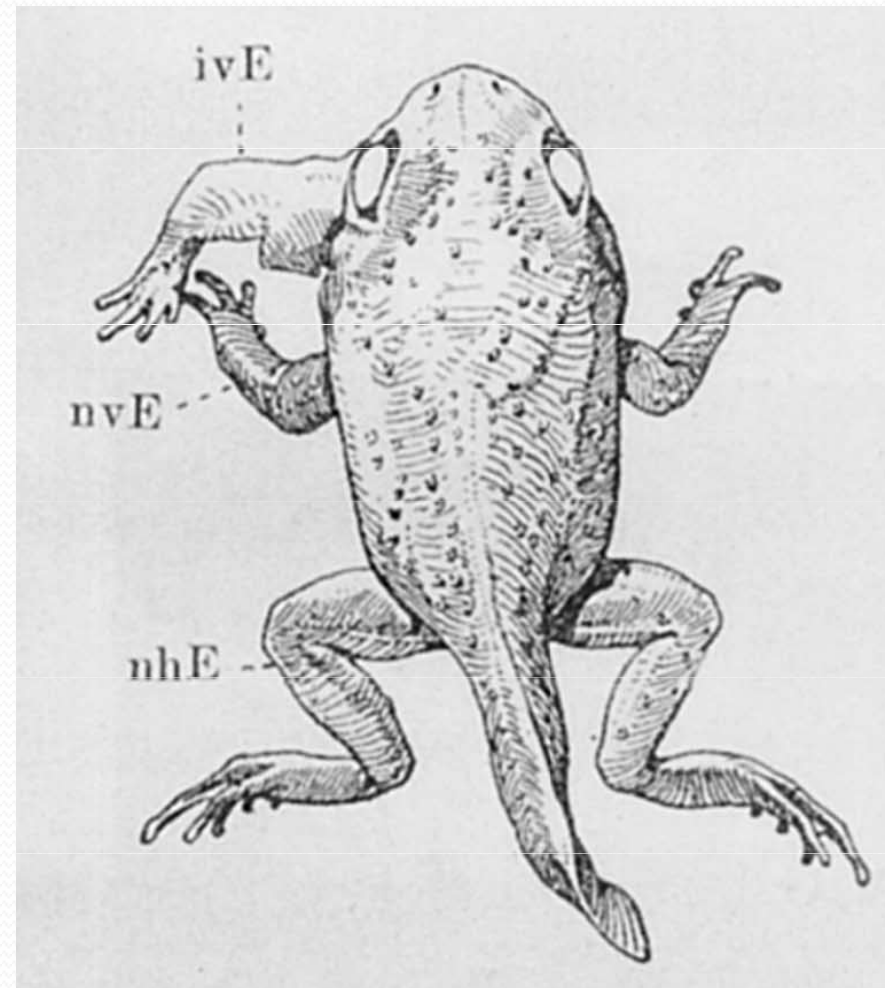
- malý protein na povrchu buněk, který může určovat pozici buňky v rámci PD osy. Konkrétní exprese Prod 1 u dané buňky se zachovává i při tvorbě blastému.



Normální
Blastemální

AP osa (anterio-posteriální)

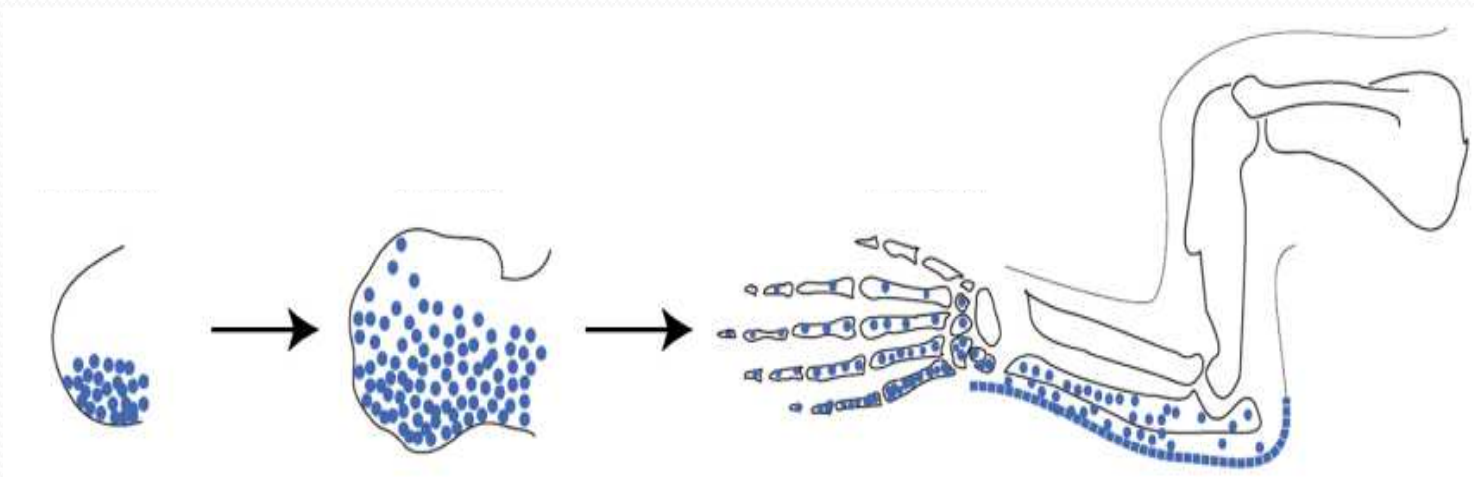
Jedním z možných cílů RA je exprese **Hox genů**, které regulují pozicování podél AP osy a formování tkání. Mají za následek například prvotní formování blastemálních buněk do distálních částí nové končetiny.



DV osa

- částečně určena epitelem časného hojení. Transkripty EČH (AEC) patří do rodiny FGF, které představují silné regulátory vývoje, proliferace a diferenciace buněk a hrají úlohu v reakci na poranění.
- U žab dochází k progresivní **ztrátě regenerace s věkem**. Po podání exogenního FGF žábě došlo k výraznému zpomalení ztráty regeneračních schopností
- morfofen Shh (Sonic hedgehog)

D



V

Sorting out hypotéza

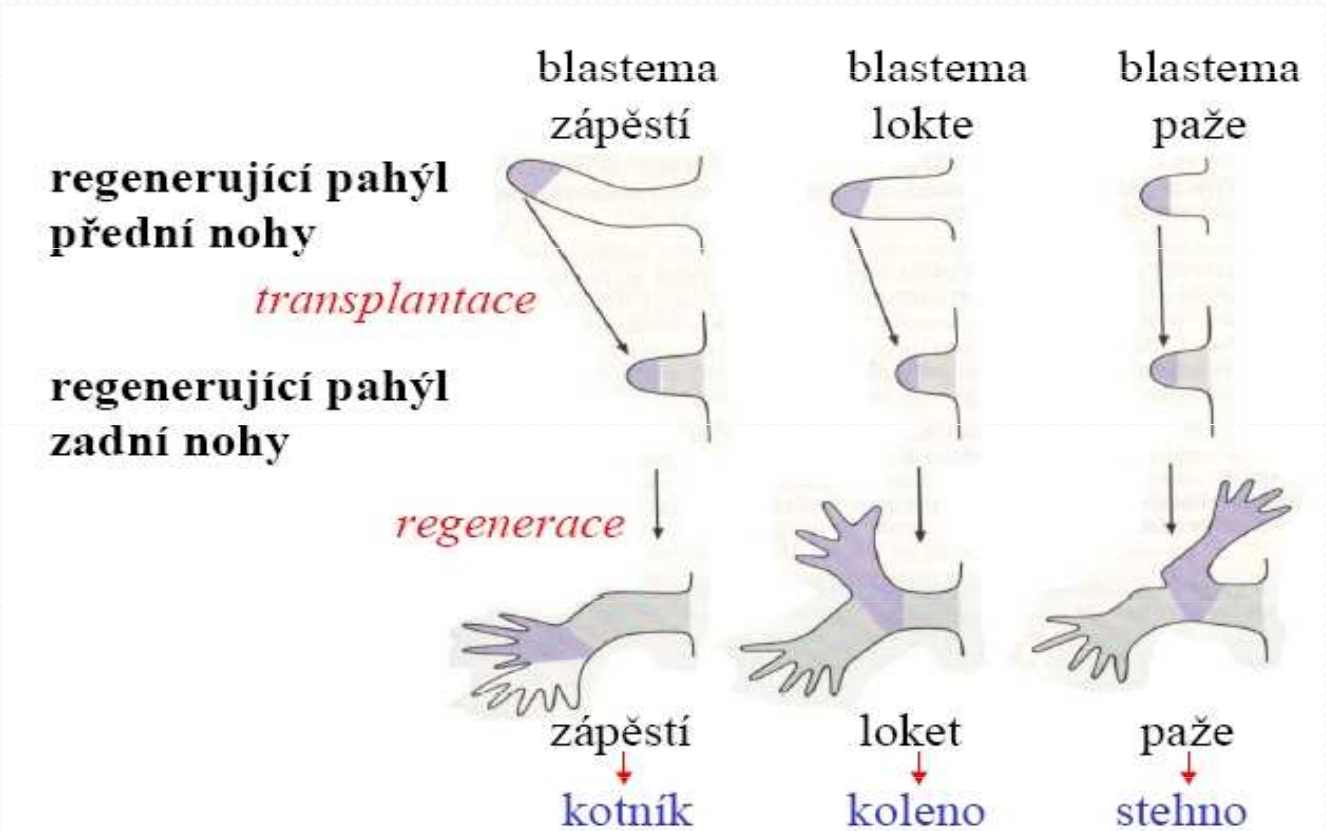
- Vysvětluje umístění blastemy přesně do místa amputace. Ať je amputace provedena na jakékoliv části končetiny, vždy vzniká z blastemy pahýlu právě jen odstraněná část

PRINCIP:

- Roztřídění jednotlivých typů buněk podle jejich původní pozice
- Když jsou smíchány disociované buňky ektodermu a mezodermu, po jejich agregaci *in vitro* se postupně vytvoří centrum mezodermálních buněk a kolem něho vrstva buněk ektodermálních.
 - Vysvětleno rozdílnou adhezivitou buněk – cell adhesion molecules
- Experimentálně ověřena s regenerací končetin mloka

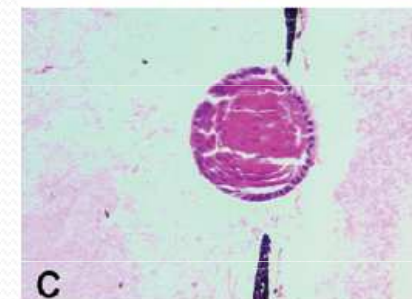
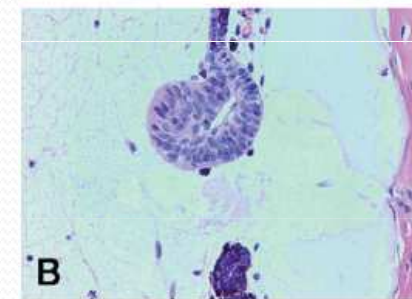
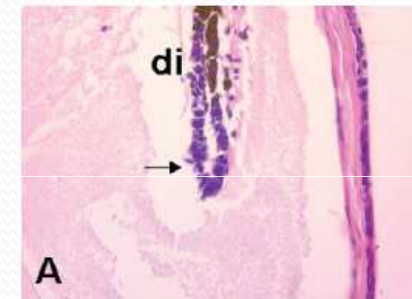
Sorting out hypotéza

Transplantační experimenty regenerující části končetin mloka demonstrují hypotézu **sorting out**. Po amputaci končetiny vzniká v místě řezu regenerační blastém, jenž vede k dotvoření amputované končetiny. Po přenosu buněk z regeneračního blastému ze zápěstí, lokte nebo paže přední končetiny do regeneračního blastému zadní končetiny vzniká z transplantátu vždy odlišný sektor končetiny v závislosti na místě původní extirpace končetiny. Buňky blastému si tedy „pamatují“ svou původní polohu.



Regenerace čočky oka

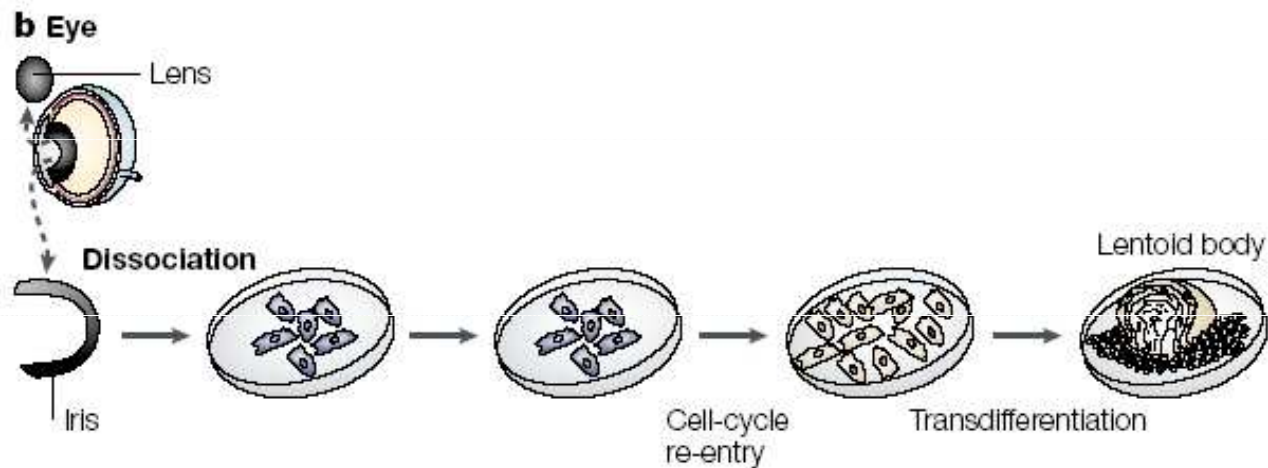
- Transdiferenciace z jednoho buněčného typu (x regenerace končetiny)
- Průběh:
 - pigmentové epiteliální buňky dorzální duhovky dediferencují (ztráta pigmentace) a vstoupí do buněčného cyklu (4. den).
 - buňky utvoří vezikul (10. den)
 - buňky ve vezikulu se prodlužují a diferencují ve vláknité buňky primární čočky (16. den)



(Brookes & Kumar, 2002)

Regenerace čočky oka

- Řízeno: kys. retinovou, FGF, homeobox. geny *Pax-6* a *Prox-1*

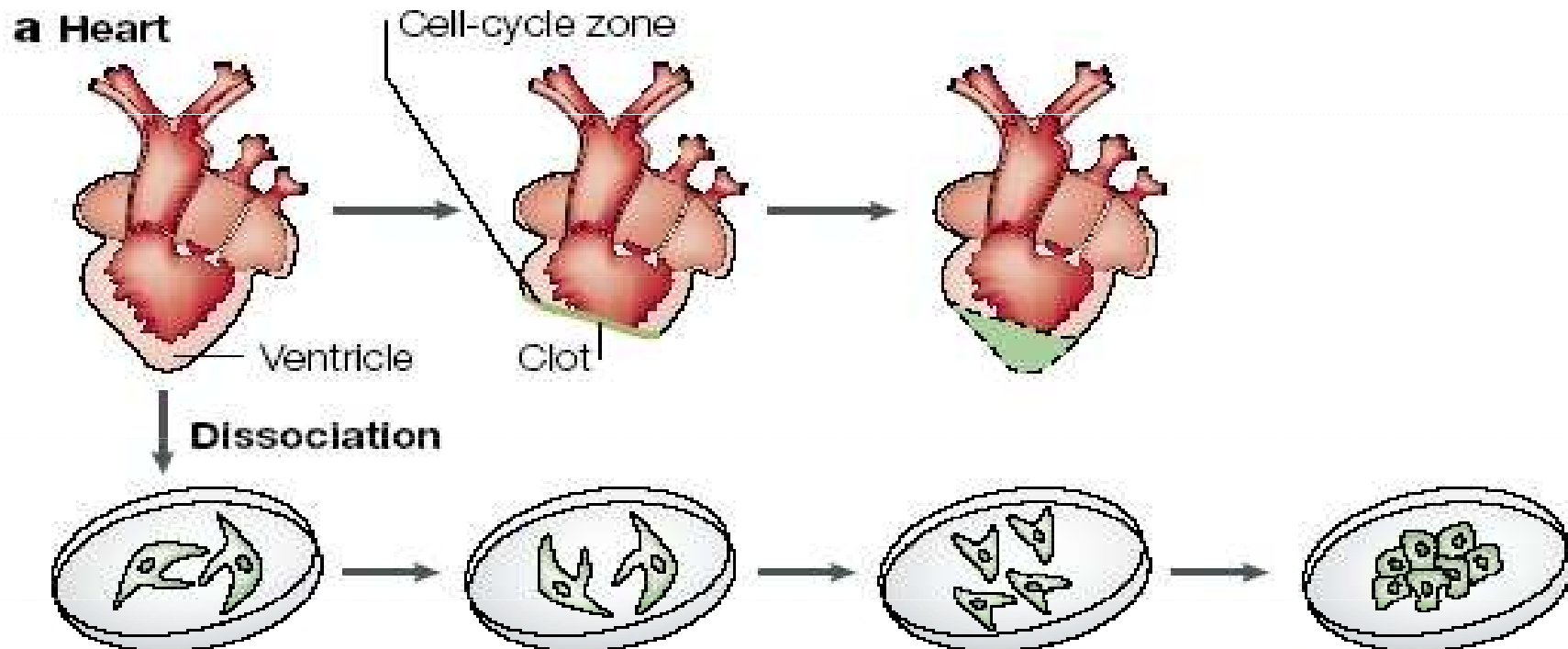


(Brockes & Kumar, 2002)

- Po exogenní aplikaci retinové kyseliny, dochází k abnormální ektopické diferenciaci.
- Disulfiram (antagonista retinové kys.) snižuje schopnosti regenerace čočky.

Regenerace srdce

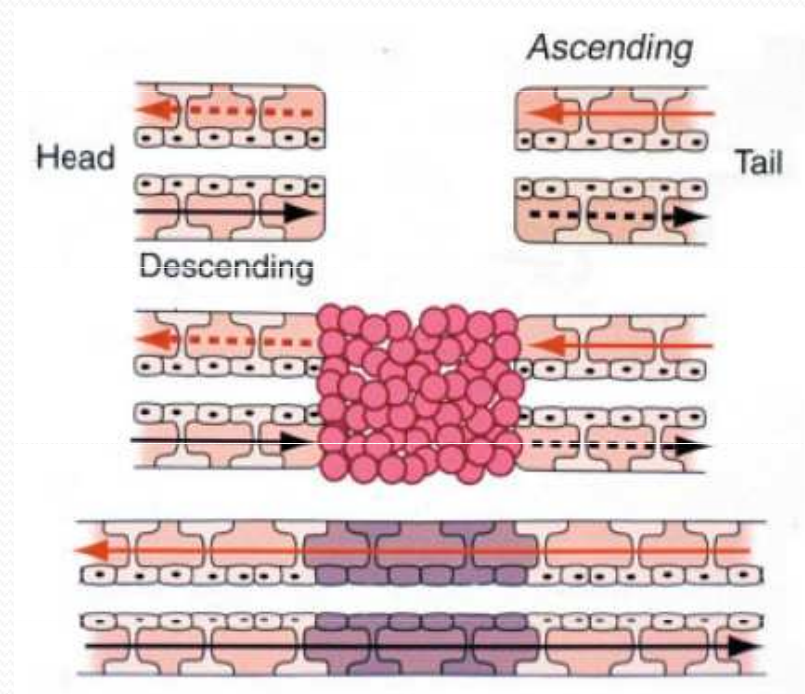
- Kardiomyocyty ohraničující zónu poškození vstoupí do buněčného cyklu (cca 10%)
- V porovnání se savčími kardiomyocyty – po poranění vstupuje do buněčného cyklu velmi málo kardiomyocytů



(Brookes & Kumar, 2002)

Regenerace míchy

- Po poranění míchy dochází k migraci ependymálních buněk (ep).
- Ep proliferují a za pomoci makrofágů odstraňují ECM
- Ep mění retinol na retinovou kyselinu RA, která je přijímána neurony.
- RA indukuje neuronální růst.



Regenerace míchy

- Regenerace míchy je možná v každém stádiu života mloka (u ptáků pouze ve fetálním stádiu).
- K regeneraci není potřebný epitel časného hojení -> asi není potřebný FGF (názory se různí)
- Iniciační a molekulární mechanismus není znám.

Kmenové buňky

- Progenitorové buňky mohou vzniknout:
 - *De novo* dediferenciací tkáňových buněk
 - Kmenové buňky již mohou být přítomny v tkáni
- Žádná z hypotéz nebyla potvrzena ani vyvrácena.
- Jsou vůbec buňky blastemy multipotentní?
- Jedná se skutečně o kmenové buňky?

Thank you

