

Regenerace srdečních buněk

*Cíl viditelný
zatím jen nezřetelně*

Mnozí to známe z vlastní zkušenosti. Když se řízeme do svalů na bříšku palce nebo si při sportu poraníme svaly na končetinách, většinou se nic tak strašného nestane. Po odeznění akutní bolestivé fáze se nám začnou poškozené svaly hojit a rána se zacelí téměř bez následků.

Jiné je to se svalovinou srdeční. Jakmile je poškozena, nejčastěji nedokrevností při infarktu, růžové srdeční buňky (kardiocyty) odumírají a na jejich místě se pomnožují (proliferují) bledé fibroblasty, které zalátají postiženou oblast jizevnatou, poměrně tenkou kolagenovou tkání. To není dobré. Nejenže se kolagen nestahuje, ale ani nemůže přenášet elektrické impulzy. Od této chvíle se poškozená oblast stává překážkou pro povely ke stahu, které se musí v srdci šířit podle přesného paradigmatu. Hrozí arytmie a další oběhové potíže.

V čem spočívá problém regenerace srdečních buněk? Stručně řečeno, nemají kádrové rezervy – satelitní buňky. Nadto je jejich vlastní schopnost pomnožovat se omezena jen na časné fáze ontogenetického vývoje. Když se vyvíjejí kosterní svaly, jejich mnohojaderná, dlouhá svalová vlákna vznikají fúzí (splýváním) myoblastů. Myoblasty jsou krátké jednojaderné buňky s částečně vyvinutým kontraktilním systémem. Od r. 1961 se ví, že řada těchto malých myoblastů se s ostatními nespojí a zůstávají mimo tloustnoucí svalové vlákno; nicméně s ním jsou v těsném kontaktu pod společným vnějším obalem (bazální membránou). Dostávají nové jméno – satelitní buňky. Co je podstatné, jejich jádra i tělíčka si uchovávají jedinečnou schopnost dělení. Tuto schopnost ovšem nepoužívají, jsou-li v pořádku svalová vlákna, na jejichž „zádech“ satelity sedí.

Při poškození – a to může způsobit i neúměrná námaha – se svalová vlákna (stejně jako kardiocyty) nemohou sama opravit. Žádné z jejich vlastních jader, kterých jsou po fúzi myoblastů uvnitř stovky až tisíce (např. u vláček kuřečích prsíček, která se při nedělním obědě tak pěkně oddělují), není už schopno dělení, protože se nacházejí v postmitotické fázi.¹ V tomto okamžiku ale nastupují do akce (myo)satelitní buňky. Téměř zároveň se zánikem poškozeného svalového vlákna se začínají dělit a splývají do nového svalového vlákna. Sval regeneruje. Je zajímavé, že se opět některé nespojí s ostatními a stanou se z nich satelity nového vlákna. Tak se regenerace svalů může opakovat i několikrát, je-li to nutné. V sedmdesátých letech

jsme v laboratoři prof. E. Gutmanna ve Fyziologickém ústavu AV ČR často pozorovali dokonalou a opakovanou regeneraci svalů, který byl předtím rozetřen na jemnou kašičku nebo zničen dnes již zastaralým lokálním anestetikem markainem.

Satelitní buňky, malý zázrak...

Takovému typu funkčně vybavených a k dělení připravených buněk nějakého orgánu či tkáně říkáme buňky progenitorové. Na rozdíl od nediferencovaných a nesčíslněkrát se dělících buněk kmenových (např. krvetvorných buněk v kostní dřeni) se progenitorové buňky dělí omezeně. U svalů je to kolem patnácti dělení, což ovšem na průměrnou dobu našeho nynějšího života naprosto stačí. Progenitorové satelitní buňky jsou poměrně univerzální a při regeneraci vytvářejí zprvu jakýsi obecný prototyp svalového vlákna. Teprve pod vlivem nervů prorůstajících do místa regenerace se nová vlákna „specializují“ buď na skupiny vláken rychlých bílých (ta jsou snadno unavitelná), nebo pomalejších červených (jsou plná myoglobinu a zajišťují vytrvalostní výkony a postoje těla).

Satelitní buňky ale nejsou jen pasivními čekateli na nejhorší katastrofu – zničení svaloviny. Jsou připraveny svižně reagovat i na zvýšené nároky při fyziologické zátěži, intenzivní či opakované svalové práci a přispívat k tréninkovým výsledkům silových sportovců. Při rostoucím průměru trénovaných svalových vláken (hypertrofii) je totiž nutno zvyšovat počet jader, aby se bioenergetika namáhaného vlákna udržovala na optimální úrovni. Vlastní jádra vláken se dělit nemohou, a proto jim při hypertrofii předávají svá jádra právě přilehlé myosatelitní buňky.

Při jiném typu intenzivního tréninku se počet vláken zvyšuje, a to právě týmž procesem splývání satelitních buněk. V tomto případě narůstá svalová hmota zmožením vláken – hyperplazií (viz obr. 1).

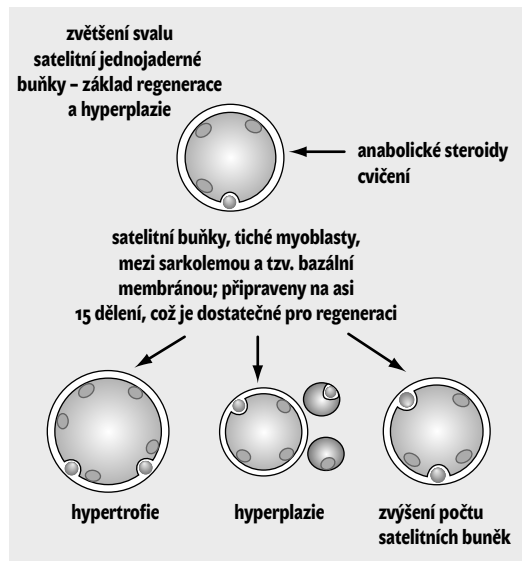
Nabízí se otázka: Není to zbytečný luxus, jestliže se běžné a často jaksi postradatelné kosterní svaly opravují docela dobře, kdežto životně nepostradatelné srdce se hojí špatně? Dosud jsme věřili, že srdeční buňky v dospělosti neregenerují, protože nemají satelitní buňky. Nebyly ani v blízkosti srdeční svaloviny prokázány nějaké buňky kmenové, které by se mohly v místě infarktu pomnožit, jakmile se tam jen trochu obnoví prokrvení a zásobování kyslíkem. Poté, co padlo dogma, že mozková tkáň neregeneruje (regene-

FRANTIŠEK VYSKOČIL

Prof. RNDr. František Vyskočil, DrSc., (*1941) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. Ve Fyziologickém ústavu AV ČR se zabývá neurofyziologií a biofyziikou buněčných membrán. Objevil nekvantové uvolňování neurotransmiterů u savců. Je členem Učené společnosti ČR.

1) Mitóza (řec. *mitos* – vlákno, nit) je normální buněčné dělení u vyšších organizmů, kdy dceřiné buňky mají stejnou genetickou výbavu jako buňka mateřská, na rozdíl od redukčního dělení (meiózy), kdy se u vznikajících pohlavních buněk snižuje počet chromozomů na polovinu. Mitózu lze v některé z fází (v profázi, metafázi, anafázi či telofázi) zastavit, čehož se využívá v chemoterapii nádorů i jinde. (Vesmír 84, 138, 2005/3)

1. Schéma zvětšování svalové hmotnosti za pomoci satelitních buněk.

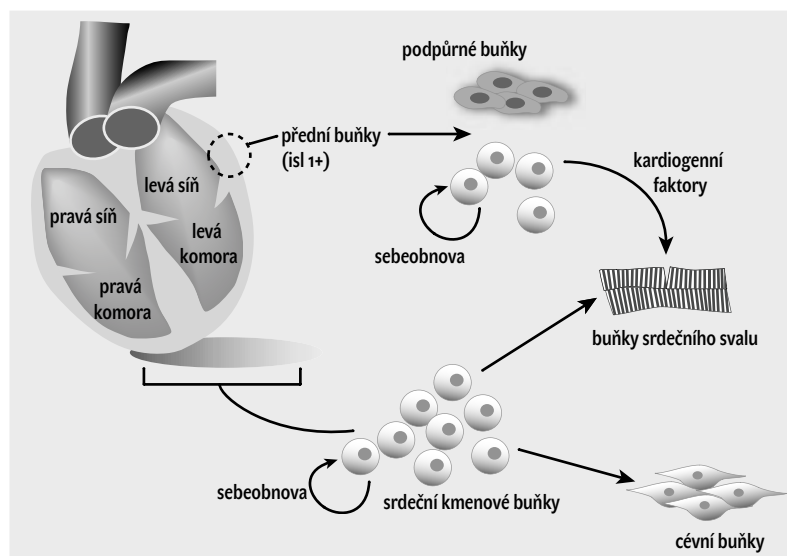


ruje, např. v hipokampu), se daly nějaké novinky čekat i v otázce reparace srdce. (Viz M. Aschermann, Vesmír 84, 320, 2005/6.)

Překvapení, o němž se zmíníme, umožnily stále se zlepšující detekční (a téměř detektivní) metody pro vypátrání i velmi malého počtu nějakého typu buněk. Máte-li dnes k dispozici nějaký znak, který je pro určité buňky charakteristický, můžete je oddělit od ostatních, které ho nemají. A přesně podle tohoto principu objevila skupina deseti badatelů vedená Kennethem Chienem v srdcích laboratorních myší, potkanů a člověka nevelká množství buněk-kardioblastů, které nesou značky (markery) pro progenitorové linie. Hledali v srdci buňky nesoucí jako identifikační znamení gen *islet-1*,² který je typický pro vyvíjející se embryonální srdeční buňky. Po narození buněk s tímto identifikačním znakem rychle ubývalo. Přesto bylo možné zbylé z nich nejen detegovat fluorescenčními barvičkami a promyšlenou kolo-kalizací s jinými geny (např. použitím tamoxifen-citlivých receptorů pro estrogény), ale také je úspěšně bez poškození oddělit pomocí přístroje.

Nezralé kardioblasty byly touto metodou nalezeny v podstatě ve všech funkčních částech srdce. V síních tvořily nevelké shluky, kdežto v komorách se vyskytovaly převážně

2. V experimentu pěstovali izolované kardioblasty v tkáňových kulturách buď samostatně, nebo spolu s mezenchymálními podpůrnými srdečními buňkami, nebo s dospělými kardiocyty. Tím napodobili dvě důležité fáze vývoje skutečného srdce: fázi proliferace (množení) a fázi diferenciaci (vyzrávání).



jen jako ojedinelé buňky. A kolik jich vlastně badatelé našli? Podle Christine L. Mumme-ryové³ jde např. u krysího srdce jen o velmi malý počet (nějakých pět či šest *set*) kardioblastů, které se zachovaly jako „relikt“ po nitroděložním vývoji srdce. To jistě není mnoho ve srovnání se satelitními buňkami kosterních vláken, které jsou ve svalu vlastně všude. Důležitější než počet kardioblastů je ale skutečnost, že jejich poměrný výskyt v jednotlivých částech srdce zůstává téměř stejný jak u laboratorních hlodavců, tak v srdci lidského novorozence, což umožňuje s jistotou opatrností aplikovat poznatky z laboratoře na lidské poměry.

Důležité otázky

Položme ale autorům studie otázky závažnější, než je ta o množství kardioblastů.


Jaká je regenerační potence těchto buněk vystopovaných s takovou námahou? Zachovaly si zbylé kardioblasty svou původní schopnost dělit se a nabývat vlastností funkčních srdečních buněk, schopnost zastoupit zničenou tkáň? Lze s nimi počítat pro nápravu „zlomených srdcí“?

Odpověď na první otázky dávají autoři až překvapivě jasnou. Izolované kardioblasty pěstovali v tkáňových kulturách buď samostatně, nebo spolu s mezenchymálními podpůrnými srdečními buňkami, popřípadě s dospělými kardiocyty. Tím napodobili dvě důležité fáze vývoje skutečného srdce: fázi proliferace (množení) a fázi diferenciaci (vyzrávání). Výsledky byly povzbudivé. Zpočátku se v přítomnosti mezenchymálních buněk kardioblasty jen dělily. Z několika *set* jich vznikly během necelého týdne miliony. Když dělení ustalo, začaly se v přítomnosti dospělých srdečních buněk diferencovat. Postupně vytvářely kontraktilní bílkoviny (např. aktinin a srdeční troponin T). V jejich membránách se objevily funkční vápníkové kanály, tak typické pro elektrickou aktivitu srdečních buněk. Také průběh jejich akčních potenciálů byl velmi podobný dozralým kardiocytům. Buňky se začaly rytmicky stahovat, což je zase charakteristické pro spontánně bijící srdeční svalovinu. Krátce řečeno, autoři prokázali celou baterii metod elektrofyziologických, histochemických, fluorescenčních a kontrakčních (vždyť jich taky na to bylo deset), že kardioblasty skutečně dozrály na plnohodnotné kardiocyty. Ty se dokonce i navzájem propojily elektricky vodivými konexonovými kanálky (skulinovými spojeními, „gap junctions“), jak se sluší a patří na srdeční svalovinu hodnou toho jména.

Obě první otázky byly tedy odpovězeny kladně a to zakládá optimismus i pokud jde o tu třetí, týkající se praktického využití. Věříme, že v budoucnu se podaří tyto nečetné, leč schopné progenitorové buňky z nemocného srdce izolovat. Po namožení v tkáňových kulturách by je mohli kardiologové zpětně transplantovat do ohrožené či postižené oblasti srdečního svalu, podobně jako se to již v jistých případech provádí v mozku. Nebu-

dou se tak léčit jen postinfarktové stavy, ale jistě i řada dalších kardiomyopatií, ať již vyvolaných infekcemi, vysokým krevním tlakem (hypertenzí) nebo jiným poškozením, např. volnými radikály.

Vedoucí týmu dr. K. Chien se ale vyjadřuje velmi opatrně a v tom mu můžeme – i když neradi – dát za pravdu. Říká, že doba pro skutečné léčebné využití těchto buněk je ještě velmi vzdálená, „možná to bude trvat dlouhá léta“. Nerozřešených otázek zůstává totiž stále ještě mnoho. Tak například kolik progenitorových buněk použitelných pro regeneraci je přítomno v srdcích starších osob, které jsou poškozením

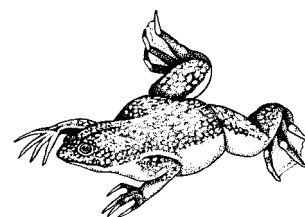
srdce ohroženy nejvíce? Budou progenitorové buňky z dospělých srdcí schopny nahradit nejen stažitelné kardiocyty, ale i vlákna srdečního převodního systému a léčit tak různé typy arytmií? Nahradí se jimi také poškozené buňky udávající základní rytmus stahů („pacemakerové“), jsou-li postiženy infarktem? Ale kdoví, třeba spolu s Kennethem Chienem máme špatný odhad a cesta mezi jeho, popř. jinými kardiologickými laboratořemi, kde se studují srdeční regenerace, a pacienty na nejbližším kardiologickém oddělení nebude zas tak dlouhá. Zatím jsme kdesi v první zatáčce, odkud je vidět cíl jen velmi neztetelně... 

2) Laugwitz a spol., Nature 433, 647, 2005

3) Nature 433, 585, 2005.

Genetický parazit pomocníkem vědců

Spojení molekulární a klasické genetiky při studiu dědičnosti africké žáby



Živé organizmy se stávají modely v biologii z nejrůznějších důvodů. Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) se v Evropě chová v zajetí od padesátých let 20. století v souvislosti s těhotenskými testy. Na vstříknutí moči těhotné ženy, jež obsahuje hormon choriogonadotropin, totiž drápatka reaguje tím, že do druhého dne naklade vejce. Teprve později se o ni začali zajímat i vývojoví biologové, hlavně kvůli jejím vajíčkům. Vajíčka obojživelníků jsou dost velká, nemají skořápku a většina jejich objemu je tvořena protoplazmou, takže se v úvodní fázi vývoje embrya rýhuje téměř celé vajíčko.¹ Díky tomu na něm může výzkumník pod binokulární lupou pomocí různých jehel provádět poměrně složité mikrochirurgické zákroky.

Vývojoví biologové si oblíbili vejce obojživelníků už koncem 19. století. V experimentech, při kterých „přesazovali“ části raného zárodku na jiné místo, už ve dvacátých a třicátých letech 20. století našli řadu oblastí zárodku, které vysílají chemické signály okolním buňkám. Pomocí těchto signálů získají buňky informaci, ve které části embrya se nacházejí, a jakou cestou se tudíž má ubírat jejich vývoj. Zpočátku biologové používali vajíčka divokých žab a mloků, ta ale byla k dispozici pouze v krátkém období žabích námluv. Většina obojživelníků navíc patří mezi ohrožené živočichy (u nás třeba všechny žáby i mloci). Vědci si proto v druhé polovině 20. století všimli chovů drápatky vodní, kterou mohou bez problémů pěstovat v zajetí a vajíčka jim snáší téměř na požádání – po injekci choriogonadotropinu.

Drápatky a genetiky

Některými vlastnostmi, jako je dlouhá generační doba, ale drápatky představují biologů o ideálním modelu právě nenaplněovaly, a tak se stalo, že kromě embryologů se jimi nikdo

příliš nezabýval. Zvláště genetiku drápatek téměř nikdo nestudoval. Abychom mohli sledovat, jak se některý gen předává z rodičů na potomky, musíme být schopni odlišit jeho jednotlivé alely. Zakladatel genetiky J. G. Mendel mohl u svých hrachů rozpoznávat různé alely díky nápadným fenotypovým projevům, jako je barva květu. U drápatky se bohužel mnoho genů s podobně nápadným projevem nevyskytuje a ty linie žab, které nějaký nápadný znak nesou, jsou obvykle špatně dostupné. Jedinou možností jak odlišit dvě alely některého genu je izolovat proteiny, které jsou těmito alelami kódovány, a rozlišit je pomocí elektroforézy. Různé alelické formy proteinů mají totiž někdy různou schopnost pohybovat se v elektrickém poli. K tomu je ale potřeba, aby se tyto formy poměrně výrazně lišily, což vyžaduje náročné vytváření mezidruhových kříženců nebo žab, které mají k svému genomu přidáno několik chromozomů jiného druhu drápatky. Dalším omezením je, že se těchto proteinů spotřebuje na každý pokus poměrně velké množství. Abychom je získali, musíme po zkrřížení vybraných rodičů čekat dlouhé měsíce, než potomci dorostou do potřebné velikosti, extrahujeme z jejich tkáně zkoumaný protein, a pak teprve můžeme zjišťovat, kterou alelu zdědili po kterém rodiči nebo který znak dědí dohromady s jiným apod.

Takový výzkum je zdoluhavý a není divu, že se mu věnovalo jen několik málo opravdu trpělivých badatelů. Zatím nebyl nalezen ani pohlavní chromozom. I když však tvrdíme, že drápatka není ideální model pro genetiku, v jejím genomu se asi skrývá leccos zajímavého. Víme například, že u drápatky vodní došlo v minulosti ke zdvojení počtu chromozomů. Nikdo ale neví, jak je možné, že se s tím drápatka vyrovnala, když u člověka stačí je-

LUKÁŠ FALTEISEK

Lukáš Falteisek (*1983) studuje biologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Na výzkumném pracovišti této fakulty se podílel na hledání variability v genech drápatky pomocí metody popsané v tomto článku.

1) Ptačí vajíčka jsou sice mnohem větší, ale drtivou většinu jejich objemu zabírá zásoba potravy, vlastní embryo vznikne jen z nepatrného zárodečného terčíku.



1. Samice drápatky vodní (*Xenopus laevis*)

diná kopie jednoho chromozomu navíc, aby to vedlo k smrti nebo k těžké nemoci (třeba známý Downův syndrom). Některé druhy drápatek přitom mají dokonce až dvanáct sad chromozomů. Zajímavá a nevysvětlená je i odolnost drápatek vůči retrovirům, které od drápatek vůbec nejsou známy. Lepší poznání genetiky drápatek by výrazně pomohlo i při zmiňovaném embryologickém výzkumu.

K čemu se může hodit repetice

Jedna z cest jak tyto výzkumy usnadnit začala být schůdná teprve díky objevu z roku 2000. Tehdy byla v genomu drápatky vodní náhodou objevena opakující se (repetitivní) sekvence dlouhá 86 párů bází. Byla nazvána Xstir² a další výzkum odhalil, že genetická informace drápatek je touto sekvencí doslova prošpikována, v jedné sadce chromozomů (tedy v haploidním genomu) je jejich kopií nejméně milion. Vyskytuje se na mnoha místech (lokusech) genomu, a na každém takovém místě se navíc obvykle nachází několik jejích kopií těsně za sebou. Taková repetice se jmenuje tandemová. Kromě toho se Xstir vyskytuje i jako repetice obrácená, inverzní. V tomto případě začínají dvě kopie na jednom místě vlákna DNA a každá pokračuje jiným směrem, míří tedy od sebe. DNA díky tomu získává zajímavé vlastnosti, například může vytvářet poměrně stabilní křížovité struktury, které možná slouží jako mezistupeň při šíření repetice.

Repetice Xstir se chová jako transpozon, což znamená, že je schopna vytvářet kopie sebe sama, a tím zvýšit počet svých opakování v místě, kde se nachází, nebo se i šířit do nových míst. Způsob, jakým to činí, je dosud z větší části neznámý, protože na rozdíl od většiny transpozonů Xstir nekóduje žádný z enzymů, které jsou pro tento děj nutné. Možná se dokonce inverzní forma repetice šíří jinak než tandemová (přechod z jedné formy do druhé asi není častý, protože mezi pořadími genetických „písmen“ tandemové a inverzní formy repetice je několik typických

rozdílů, které ukazují, že se formy mezi sebou příliš nemíchají). Je také otázka, zda Xstir má pro drápatku nějaký význam, nebo jestli je to parazit, který se veze v jejím genomu do dalších generací jako černý pasažér.

Pro studium dědičnosti je však důležité, že se repetice Xstir často nachází v intronech ležících uvnitř některých genů. Díky tomu, že Xstir má tendenci produkovat nové kopie a přidávat je k těm starším, je počet kopií repetice v tom kterém intronu u různých jedinců drápatky velmi variabilní. Jeden z důsledků tohoto jevu je, že má daný intron u těchto jedinců různou délku.

Když si uvědomíme, že délka intronu je znak, který se dědí společně s genem,³ v němž se intron nachází, a navíc že není problém příslušný intron namnožit ve zkumavce metodou PCR,⁴ a pak změřit jeho délku elektroforézou, přímo se nabízí možnost jejího využití při genetických výzkumech. Stačí si zjistit délky intronů obsahujících sekvenci Xstir u potomstva získaného křížením a srovnat je s délkami týchž intronů u obou rodičů. Tak můžeme zjistit nejen štepňý poměr alel zkoumaného genu, ale i vazbu mezi ním a jinými geny nebo mezi genem a určitým tělesným znakem, pohlavím apod. S nadsázkou můžeme říci, že délka intronu je pro biologa vyzbrojeného moderními metodami skoro stejně nápadný znak, jako byly barvy květu pro Mendela.

Hlavní výhodou této metody je, že nemusíme čekat dlouhé měsíce, až žabí potěr vyrostne, protože k rozpoznání délky intronu stačí DNA izolovaná z kapky krve nebo z malého pulce. Žábu také nemusíme usmrtit (tak jako pro izolaci proteinu), takže lze pokus mnohokrát opakovat pro různé geny na stejných jedincích. Při experimentech založených na porovnávání proteinů se také občas stává, že nalezneme nějaký protein, který se dědí společně se sledovaným znakem, a je problém zjistit, o který protein jde. Dřívější metody detekovaly proteiny pomocí jejich biochemických vlastností, třeba schopnosti reagovat s určitým substrátem. Takové určování ale není vždy jednoznačné, v některých případech dokonce biochemické testy svedly badatele k chybnému výsledku. Autoři jedné studie například uvádějí, že gen pro mitochondriální jablečný enzym⁵ se dědí společně s pohlavím. Kdyby to byla pravda, byla by to cesta k nalezení pohlavního chromozomu u drápatek. Pokrok biochemie bohužel ukázal, že použitou metodou mohli jako jablečný enzym rozpoznat alespoň osm různých proteinů. Při využití variabilní délky repetice můžeme naopak gen, jehož introny budeme porovnávat, vybrat zcela cíleně. Kromě toho odpadá problém se získáním dostatečné variability genů v potomstvu, protože můžeme žáby otestovat, ještě než je zkřížíme, a vybrat pár s nevhodnější kombinací délek intronů.

Velkým omezením této metody zůstává fakt, že ji můžeme použít jen na geny, jejichž sekvence alespoň zčásti známe a které mají nějaký intron obsahující Xstir nebo jinou repetici s podobnými vlastnostmi. I tak nás ale přiblíží k významnému cíli - vytvoření genetické mapy drápatky vodní.

2) Název vznikl z *Xenopus* short tandemly and invertedly repeated element.

3) Repetice Xstir sice má tendenci se znmožovat, ale není to častá událost, abychom mohli očekávat, že se počet kopií v konkrétním intronu rodiče a potomka bude lišit. Mechanismus, kterým se repetice „množí“, je dosti nejasný, víme však, že se známými retroelementy nemá nic společného.

4) PCR neboli polymerázová řetězová reakce je postup umožňující pomocí enzymu DNA-polymerázy mnohonásobně zkopírovat určitý úsek DNA vymezený dvěma zvolenými sekvencemi, tzv. primery. Je to běžná diagnostická i výzkumná metoda (podrobněji viz Vesmír 77, 444, 1998/8).

5) Mitochondriální jablečný enzym syntetizuje z pyruvátu a CO₂ kyselinu jablečnou, čímž mimo jiné doplňuje meziproducty Krebsova cyklu. Je to jedna z mála reakcí, kde mohou heterotrofní organizmy vázat CO₂ (k výstavbě biomasy použít ale nejde).