

Somatické kmenové buňky – SSCs (Somatic stem cells)

- Podílejí se na regeneraci tkání, orgánů a homeostázi obecně
- Mnohé jsou minimálně multipotentní
- Kromě profesionálních SSC, existuje i množství fakultativních typů
- Případná pluripotence nebyla dosud prokázána

Jak vypadají, jaké mají vlastnosti a schopnosti ?

Mají adultní SSCs stejný potenciál jako embryonální SSCs?

Jsou všechny stejné, podobné, tkáňově specifické ?

Lze je kultivovat *in vitro* ?

Kde se nacházejí?

Jsou nesmrtelné?

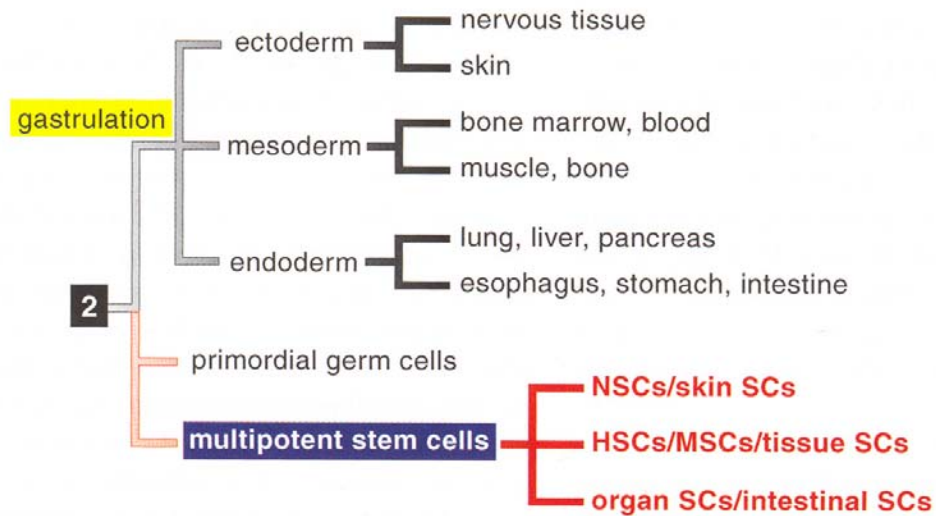
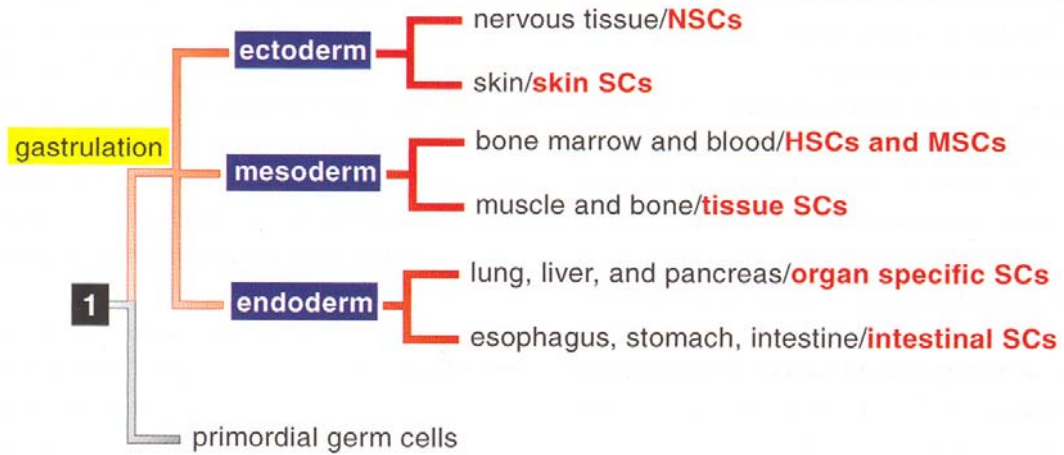
„Existují?“

ADULTNÍ x EMBRYONÁLNÍ somatické kmenové buňky

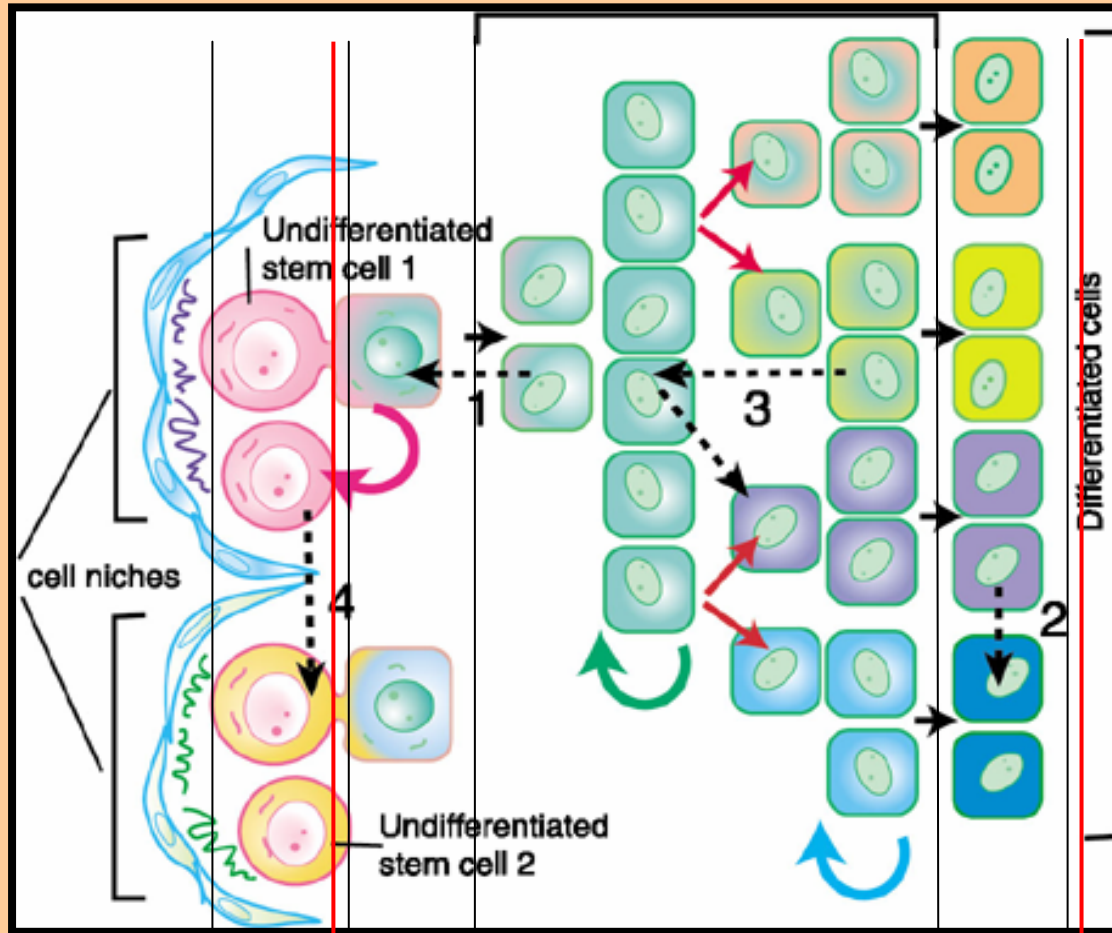
Embryonální somatické kmenové buňky

- Během embryogeneze dávají vznik tkáním a orgánům
- Případná pluripotence nebyla dosud prokázána
- Během časně embryogeneze se intenzivně dělí, později již méně (???)
- Lze je izolovat a množit *in vitro* (zatím pouze po omezenou dobu)
- Pravděpodobně jsou schopné transdiferenciace (?)
- Tvoří solidní nádory (možná i teratomy?!?) po injekci do imunitně tolerantního organismu (všechny ??)
- Ačkoliv jsou v mnoha ohledech podobné somatickým kmenovým buňkám z dospělého organismu (mnohé znaky, podmínky kultivace a izolace), je již jasné, že stejné nejsou.

Původ SSC



Biologie SSC



kmenové buňky
(aktuální)

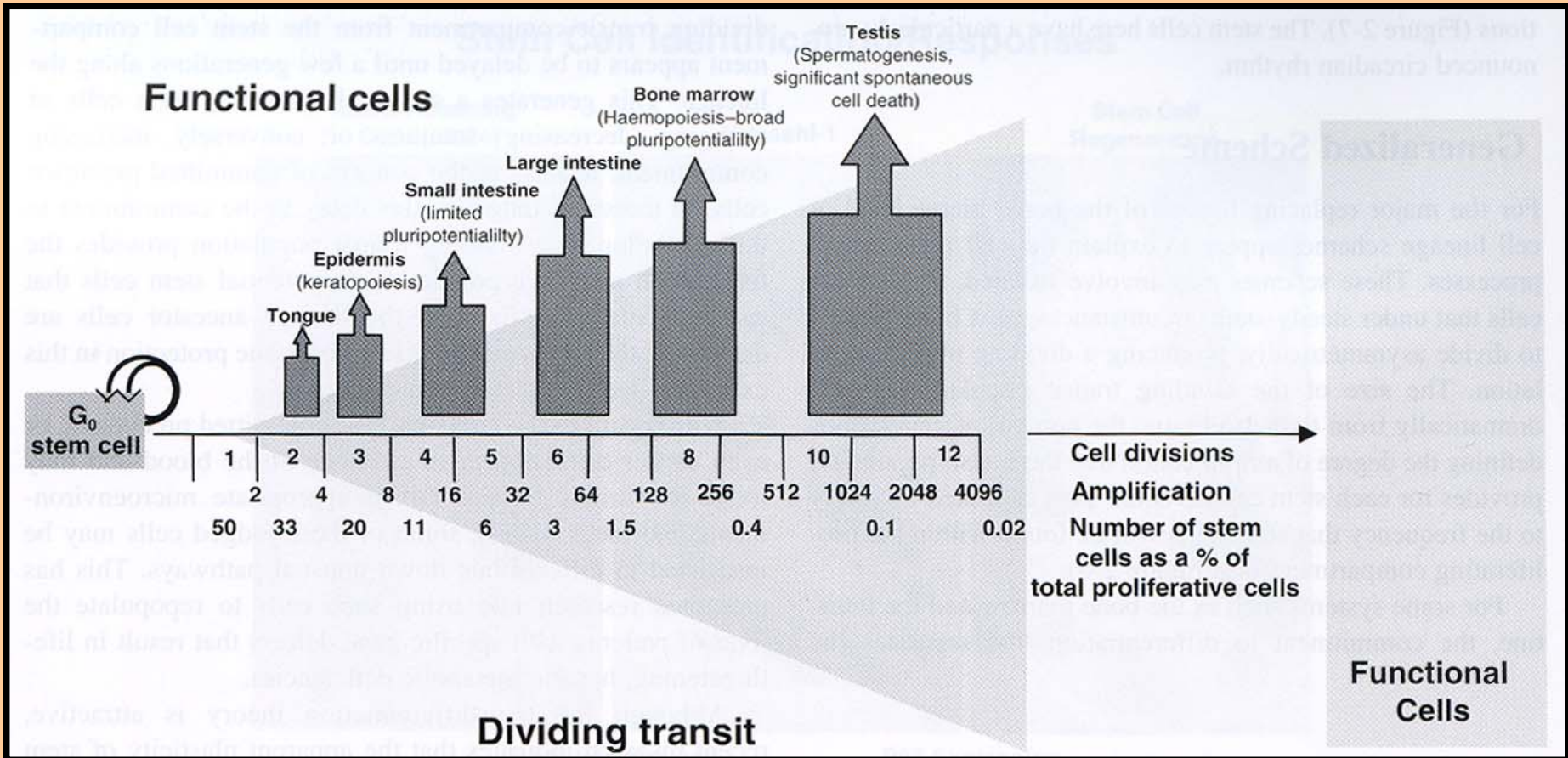
potenciální
kmenové buňky

přechodně se dělicí
progenitory

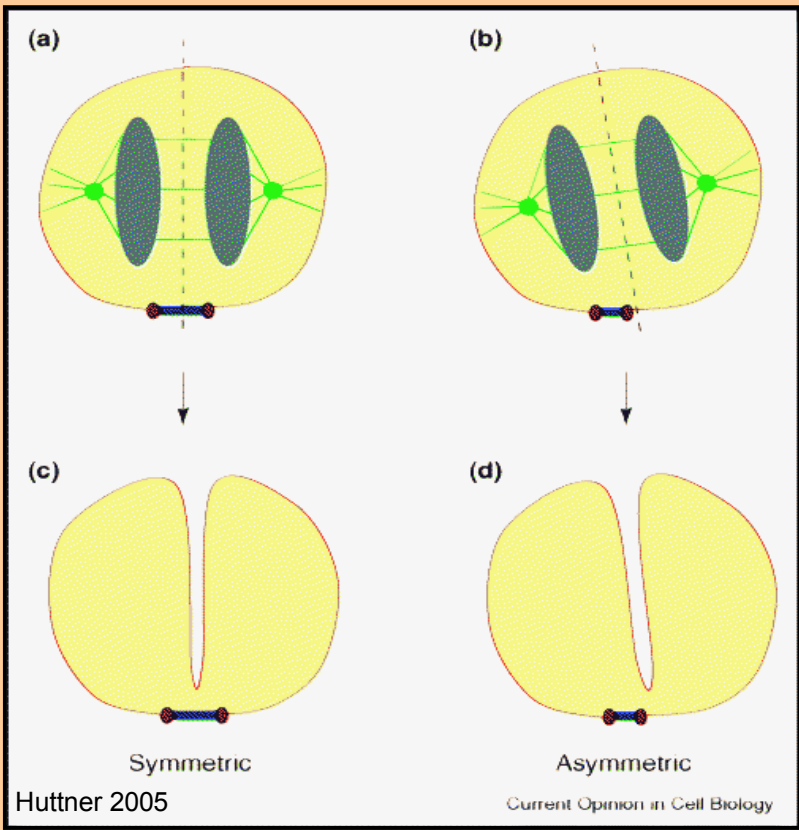
funkční
terminálně
diferencované buňky

přechodně se dělicí buňky – TA (transiently amplifying)

Odhad generačních cyklů od kmenové buňky po funkční / terminálně diferencovanou buňku pro různé typy tkání u myši

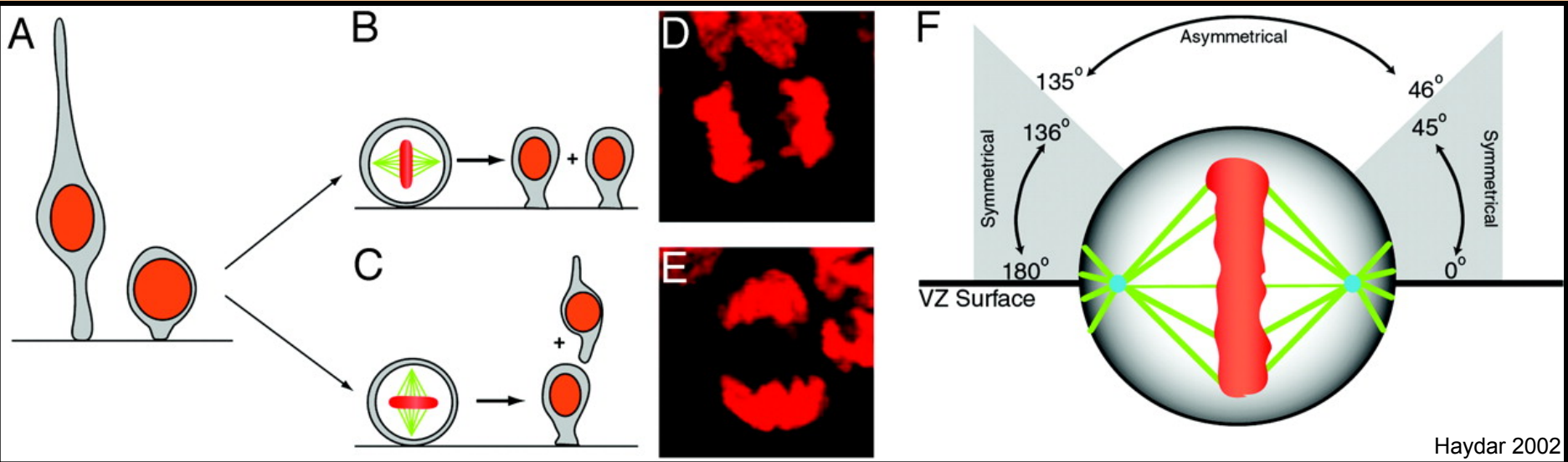


ASYMETRICKÉ DĚLENÍ BUNĚK

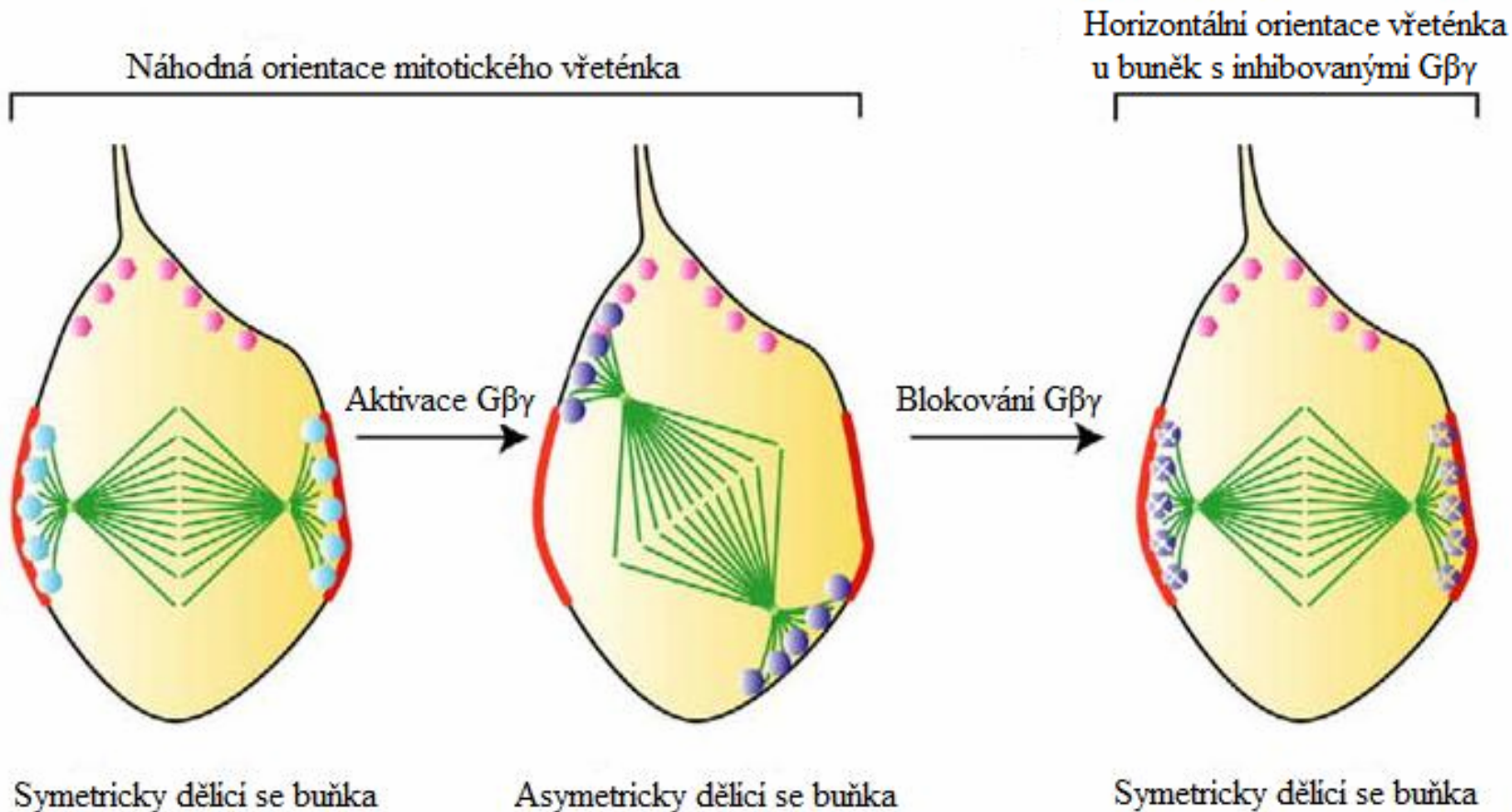


O symetrii dělení rozhoduje

- orientace dělicího aparátu (vřeténka)
- polarizace buněk v tkáni
- gradienty v buňce
- ...

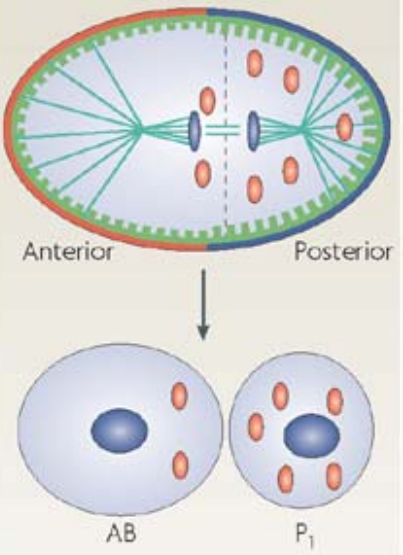


Úloha (trimerických) G-proteinů v regulaci polohy dělicího vřeténka



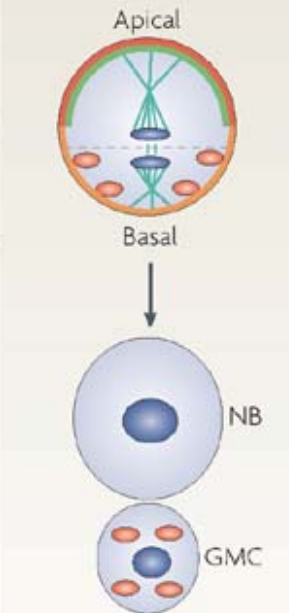
- Podnět laterální polarity
- Proteiny určující neurální osud buňky
- G $\beta\gamma$ v komplexu s G α
- Volný G $\beta\gamma$
- ⊗ Inaktivovaný volný G $\beta\gamma$

a *C. elegans*
(one-cell stage)



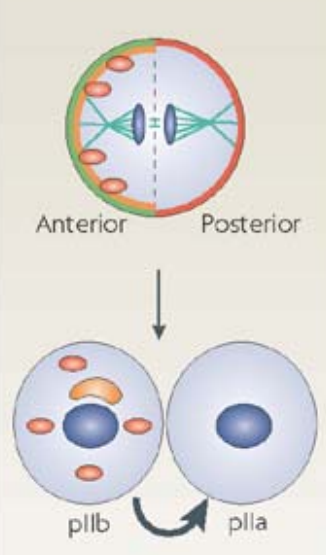
- PAR-3/PAR-6/PKC-3
- PAR-2, PAR-1
- LIN-5/G_α
- ... GPR-1/2
- PIE-1
- Microtubules
- DNA

b *D. melanogaster*
(neuroblast)

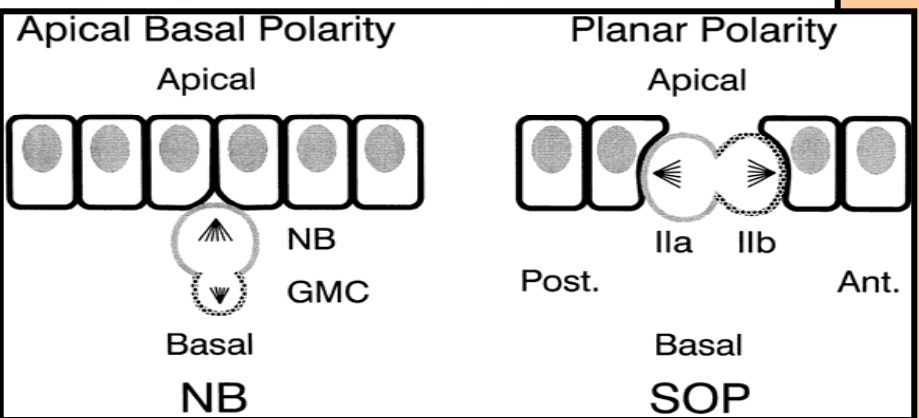


- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Locho/G_α
- Mira, Pon
- Brat, Numb, Prospero
- Microtubules
- DNA

c *D. melanogaster*
(SOP)



- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Locho/G_α
- Pon
- Numb, Neuralized
- Recycling endosome
- Microtubules
- DNA

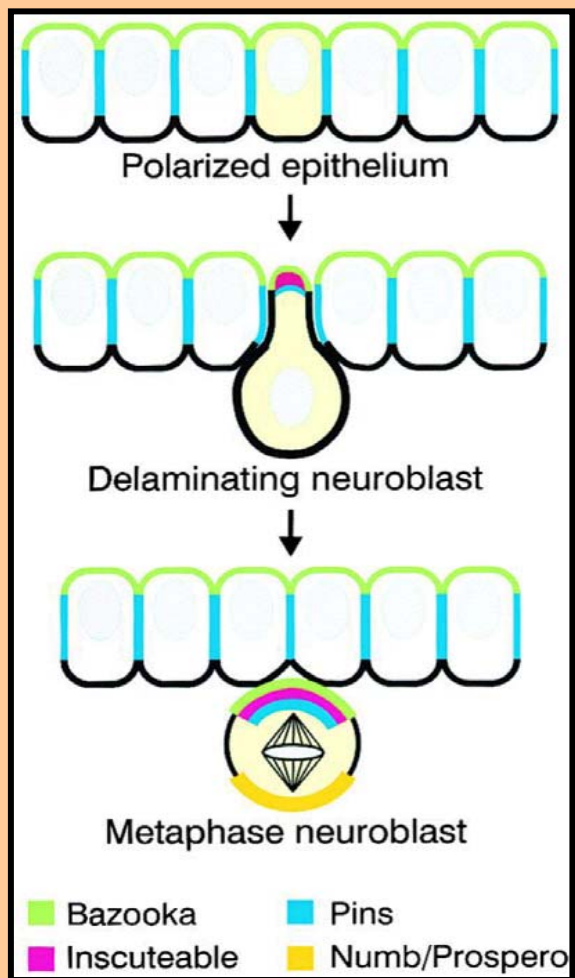


Příklady mechanismů regulujících symetrii buněčného dělení na modelových orgaismech

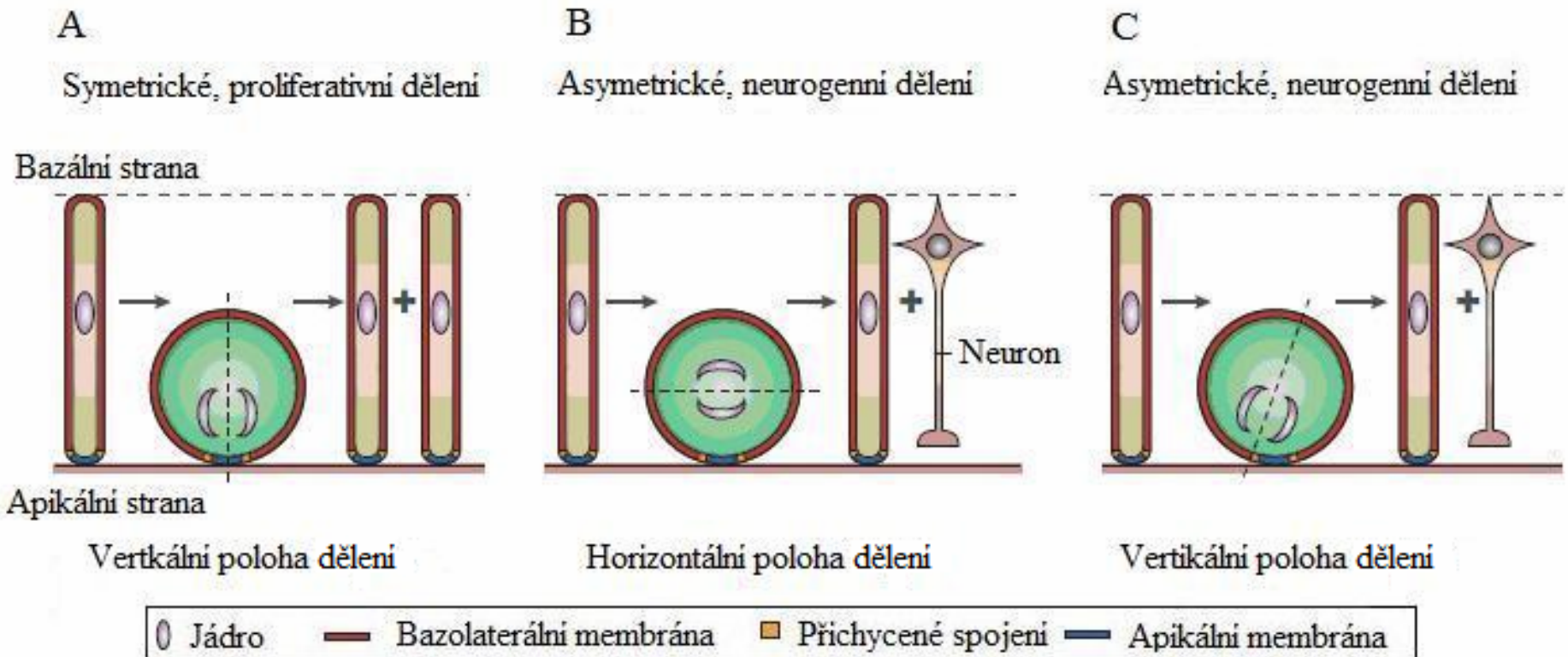
NB – neuroblast

SOP – sensory organ progenitor

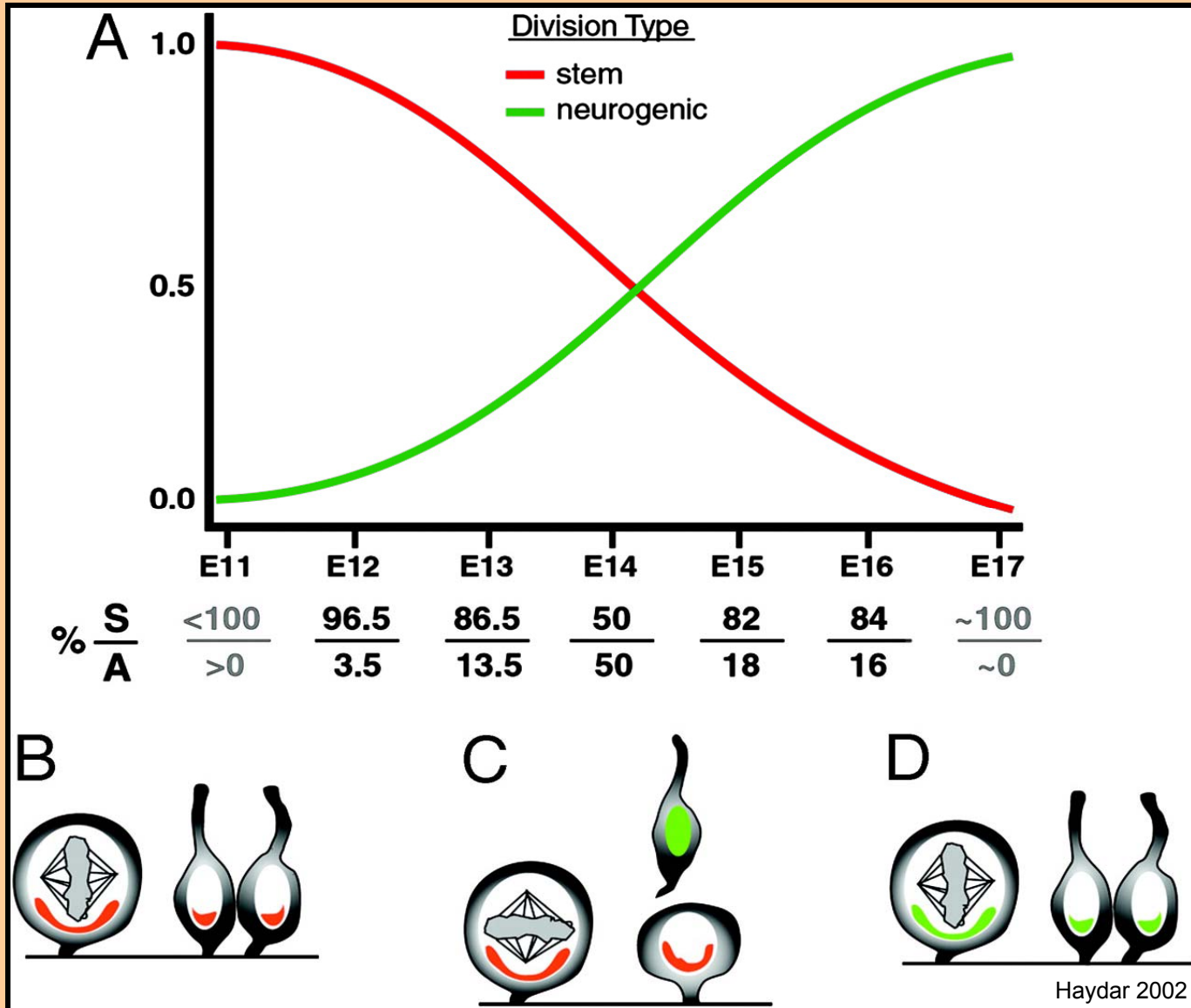
(Jan & Jan 2000; Robert Andrews & Julie Ahringer 2007)



Vertikální a horizontální dělení v neurogenním epitelu

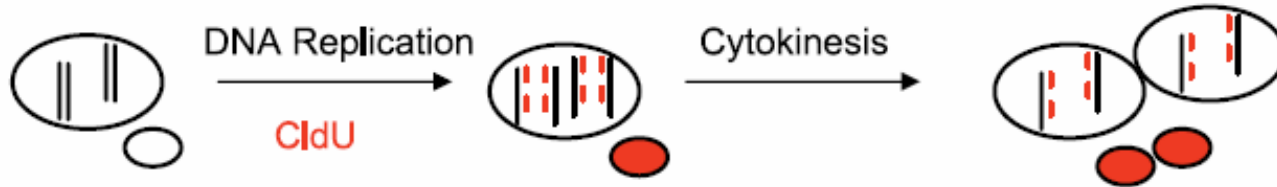


Proporční změny v symetrii buněčného dělení mezi neurálními kmenovými buňkami (**stem**) a neurálními progenitry (**neurogenic**, transientně se dělicími buňkami – TA) v průběhu neurogenese u myši

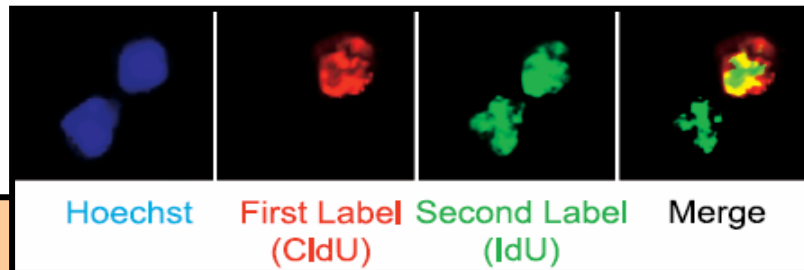
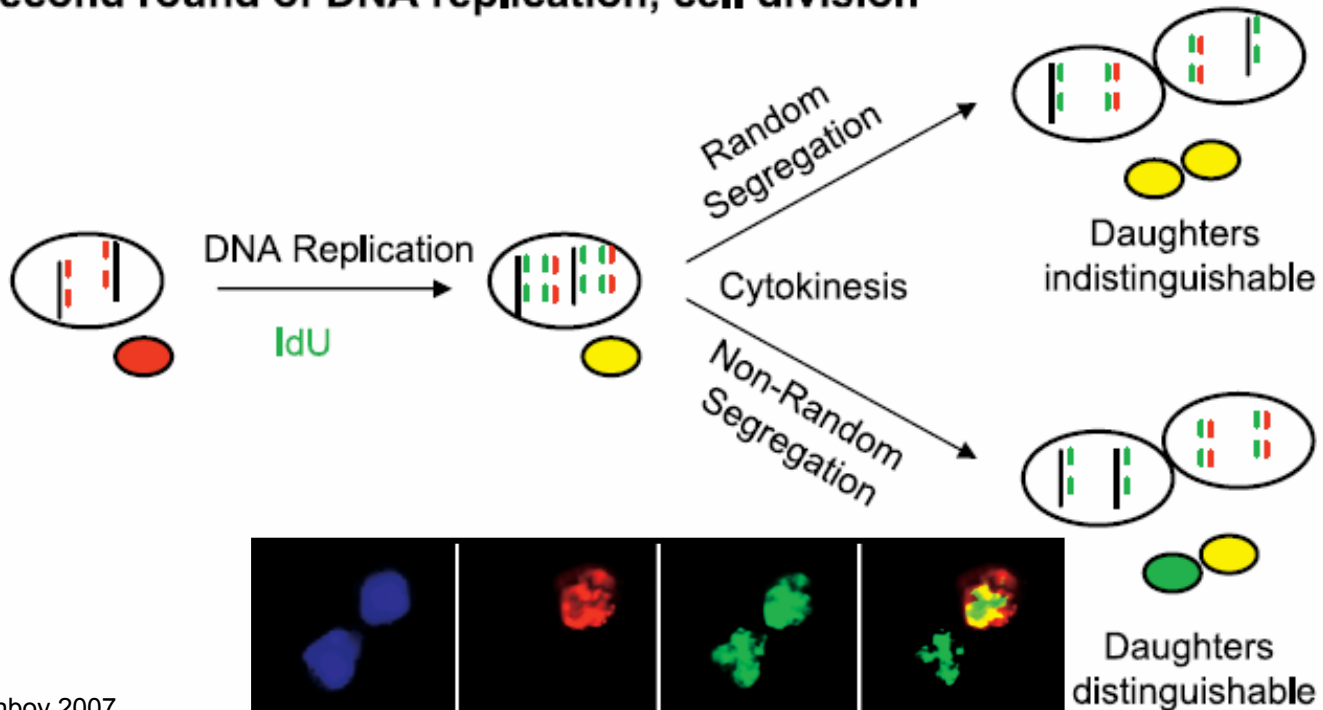


Dělení genomu u progenitorů/kmenových buněk při asymetrickém dělení

First round of DNA replication, cell division

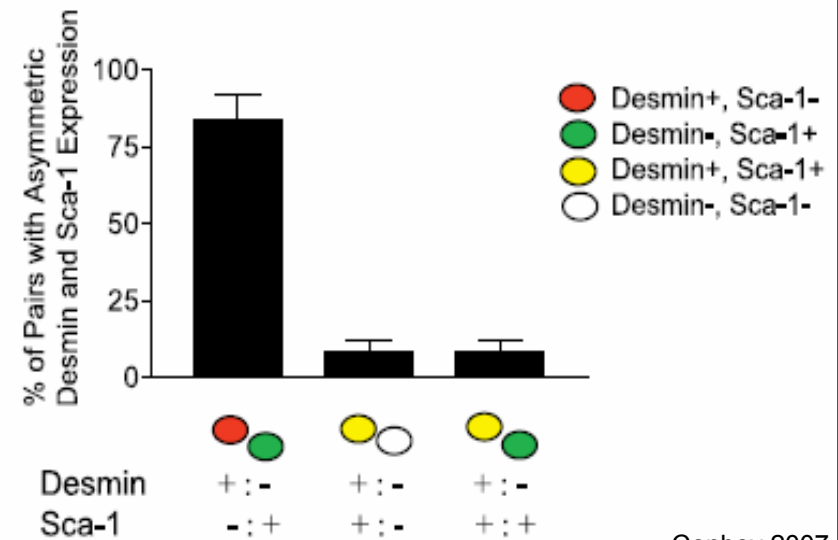
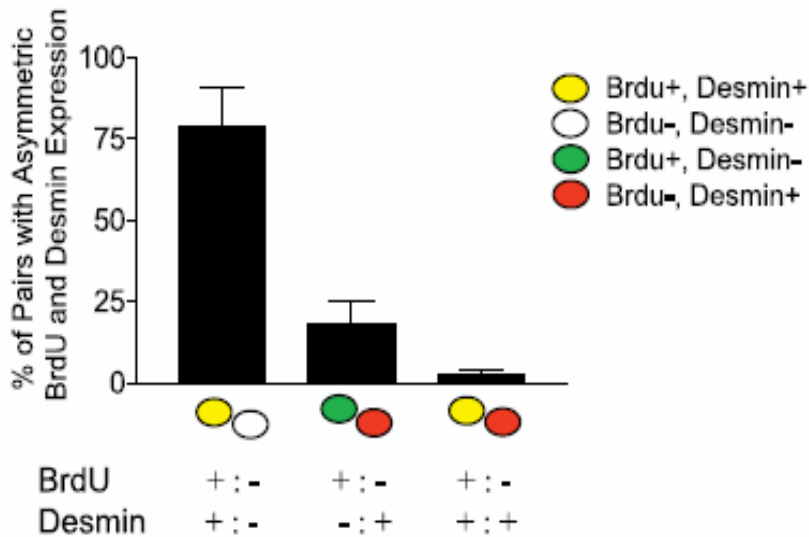
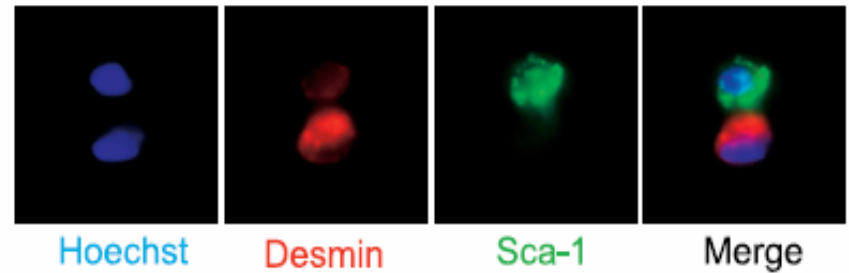
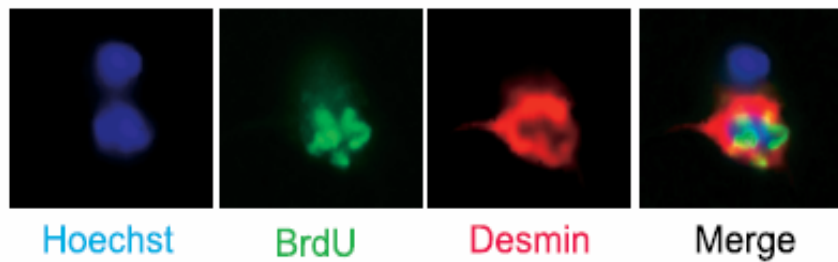


Second round of DNA replication, cell division



Četnost asymetricky a symetricky dělicích se kmenových buněk kosterní svaloviny *in vitro* - potvrzení výše uvedené hypotézy

Sca-1 – znak kmenové buňky koserní svaloviny
Desmin – protein charakterizující myoblast



NICHE a jak být profesionální kmenovou buňkou

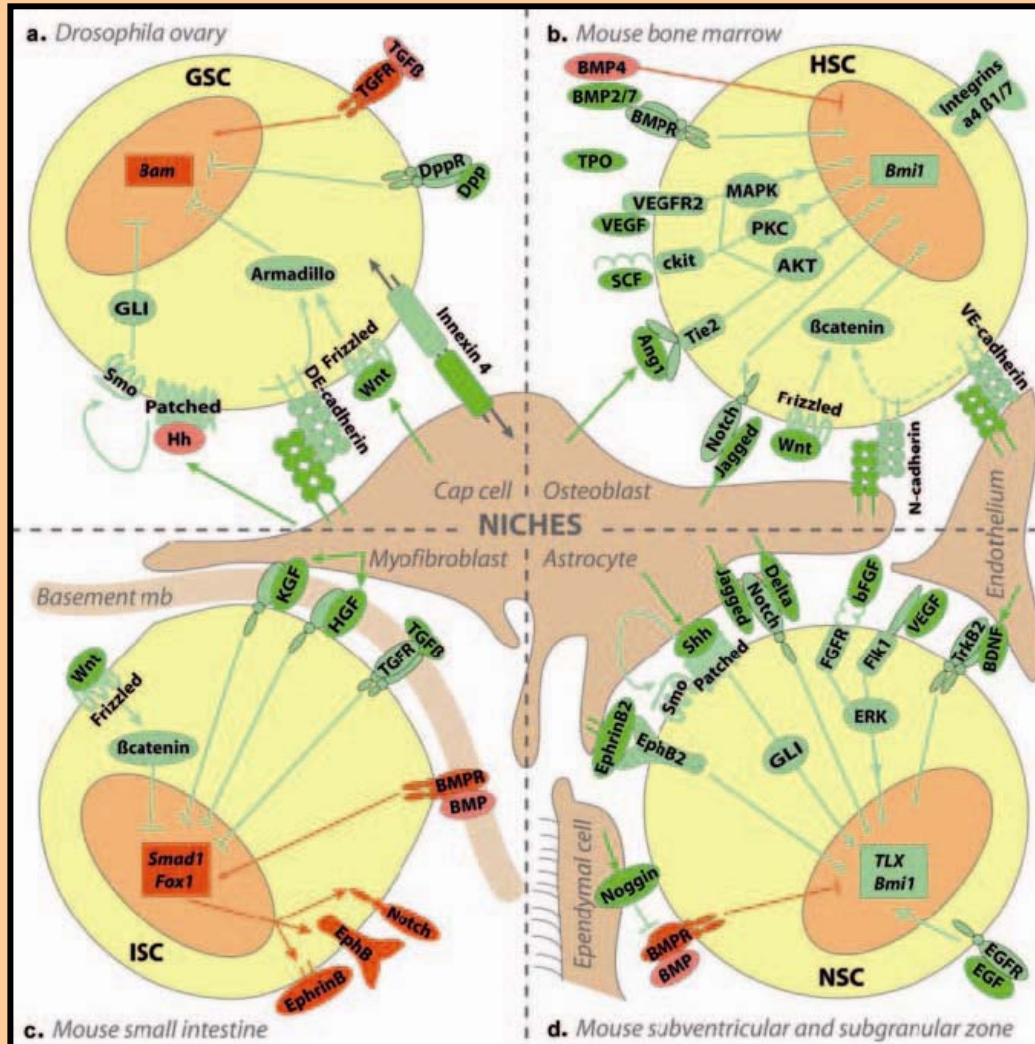
Stejně jako je v současnosti obtížné fyzicky uchopit jednotlivou SSC je velice těžké poznat, jak vypadá a jaké vlastnosti má prostředí, kde se SSCs nachází = niche. Profesionální SSCs mají tzv. nezralý fenotyp, tj. připomínají buňky značně časných vývojových stádií (z hlediska vývoje organismu / ontogeneze). Předpokládá se, že v závislosti na potřebách organismu buď vůbec neproliferují nebo jen pomalu. Intenzivnější proliferace se předpokládá v odpověď na poranění dané tkáně případně její jinou nedostatečnost. Tato proliferace, v odpověď na poranění, je *in vivo* u některých tkání, např. nervové, značně nedostatečná a tkáň má tak velice malou schopnost regenerace, na rozdíl např. od epitelů.

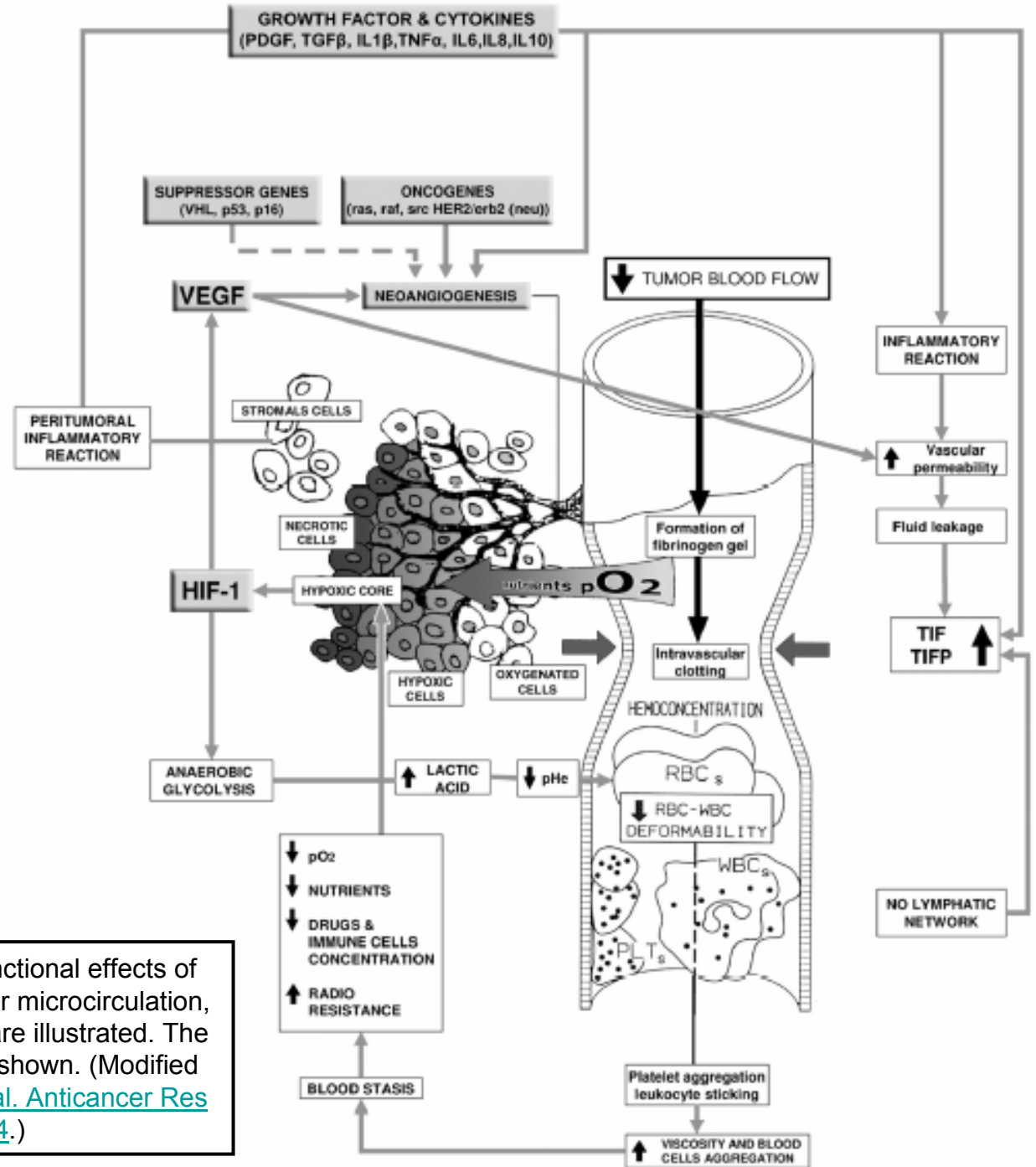
Pro mES je „niche“ feeder + LIF + nedefinované faktory séra (BMP není plně dostatečné z dlouhodobého hlediska). Je to jediný „dokonalý“ niche který umíme navodit v *in vitro* podmínkách, paradoxně u kmenových buněk, které přirozeně neexistují. *In vitro*, však při vhodné manipulaci a za dodržení výše uvedených podmínek mES představují nejhomogenější a ve vlastnostech i nejstálejší populaci kmenových buněk (2007 :o)). Zánik niche = zánik/diferenciace kmenové buňky. Opačný proces, navození niche (kdyby jsme ho znali) kolem progenitoru nebo terminálně diferencované buňky nevede ke vzniku buňky kmenové (analogicky k pokusům s ES a dalšími o SSCs „obohacenými“ populacemi SSCs. Je to pravděpodobně v důsledku ireverzibilně (z pohledu možností extracelulárního působení) změněných regulací „intrinsic“ faktorů, které si SSCs zachovávají z časných vývojových stádií ontogeneze. Toto dokazují i pokusy s exogeními expresemi takových faktorů v různých populacích dělících se buněk (viz. reprogramování buněk).

Co v NICHE najdeme?

růstové faktory, proteiny extracelulární matrix, povrchy buněk / buněčný kontakt, hypoxie, nedostatek živin?

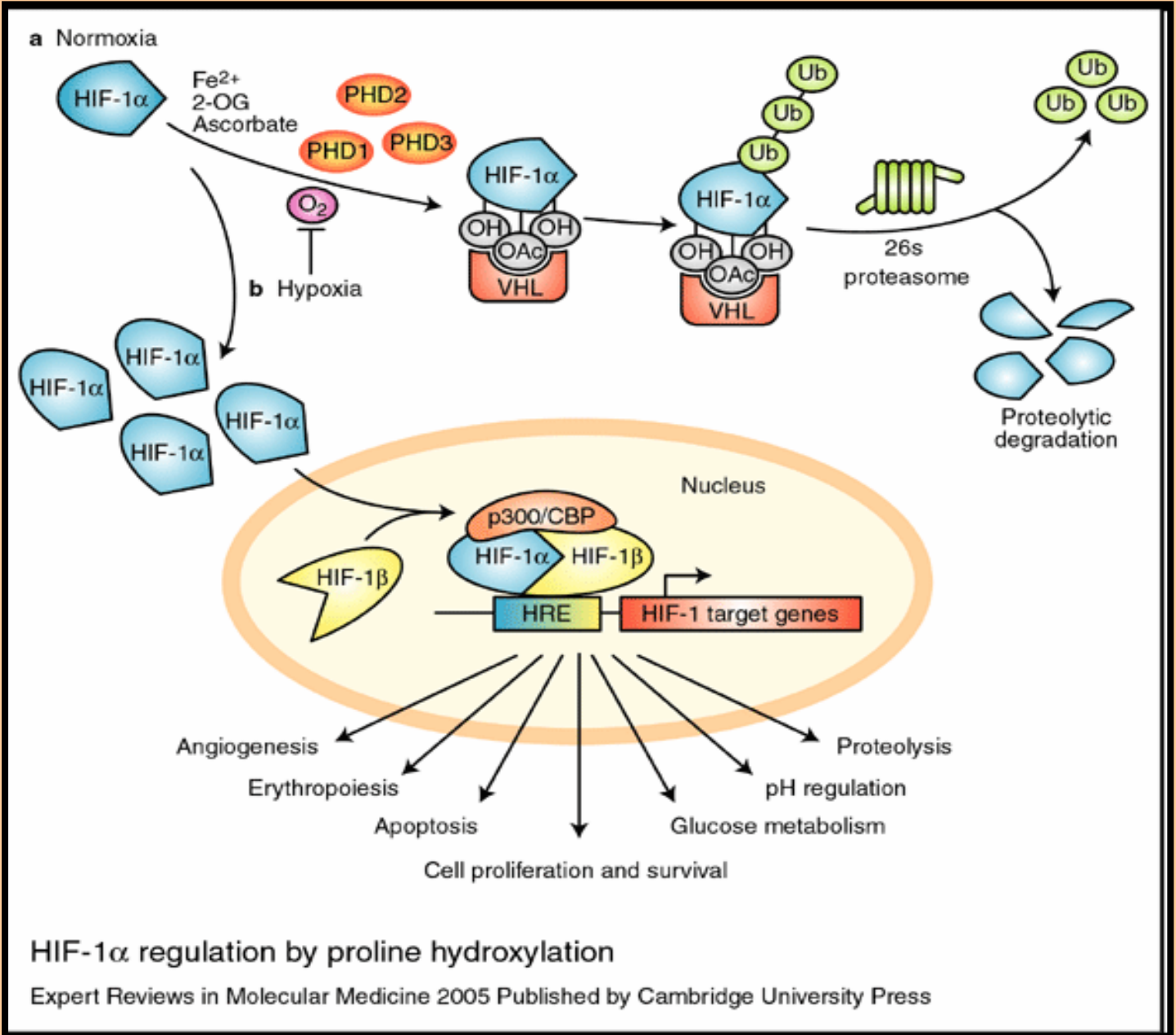
Podobně jako se zdají být SSCs tkáňově/orgánově specifické, budou specifické i jejich „niche“.





In this figure the structural and functional effects of Hypoxia, HIF-1 and VEGF on tumor microcirculation, cancer metabolism and therapies are illustrated. The vicious circles that occur are also shown. (Modified with permission from: [Baronzio et al. Anticancer Res 1994; 14:1145-1154.](#))

HYPOXIE & HIF (hypoxií indukovaný faktor)



Jak očekáváme, že profesionální SSCs vypadají

- Měly by exprimovat „stemness“ geny (které to ale jsou?), analogické geny s ES buňkami nebývají tak silně exprimovány, jak to známe právě u ES buněk, pravděpodobně tu hraje svou roli pluripotence ES buněk oproti multipotenci SSCs, kdy tzv. „stemness“ geny ES buněk jsou spíše geny exprimované pluripotentními buňkami obecně.

=> stemness geny x stemness regulace (signální dráhy/epigenetika)

- Předpokládáme, že mají vysokou hladinu inhibitorů cyklin-dependentních kináz (p21^{waf1/cip1}, p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C}) => pomalá proliferace / semi-quiescence. Toto je velký rozdíl k ES buňkám, které jsou take intenzivně proliferujícími, na rozdíl somatickým kmenovým buňkám v tkáních dospělého jedince.
- Z „extrinsic“ faktorů se předpokládá významná úloha drah TGFβ rodiny, Wnt, Notch, a gp130, v souvislosti s vlastnostmi „niche“ pak také signalizace přes kadheriny a buněčné adhezivní molekuly (CAM – cell adhesion molecule) v jejichž signalizaci jsou MAPKs, β-catenin, NFκB,...=> klíčová je rovnováha
- Jsou obecně odolné k toxinům (MDR - multidrug resistance proteins, ATP pumpy), ale i k tvrdému záření (paprsky X, γ-záření).

Populace vedlejších buněk (SP - side population) = **SP buňky**

- izolovány z různých tkání jako buňky schopné intenzivně vylučovat DNA vázající fluorochrom Hoechst 33342, díky tzv. proteinu rezistence k farmakům = **Abcg2** (BCRP – breast cancer resistance protein; rodina „multidrug resistance transporter proteins“-MDR; obecně ABC (ATP binding cassette) transportery)
- **později prokázán fenotyp Sca1⁺/lin⁺**), byly izolovány z mnoha typů tkání i z nádorových (kostní dřeň, mléčné žlázy, plíce, svaly, srdce, játra, mozek, kůže, a to jak u myši, potkana i člověka)
- **Jsou detekovatelné i v některých nádorových buněčných liniích** (C6 – gliom; IMR-32, JF – neuroblastom; a různých gastrointestinálních nádorových liniích)

**Přes výše uvedené společné znaky SP buněk,
jsou tyto buňky tkáňově specifické**

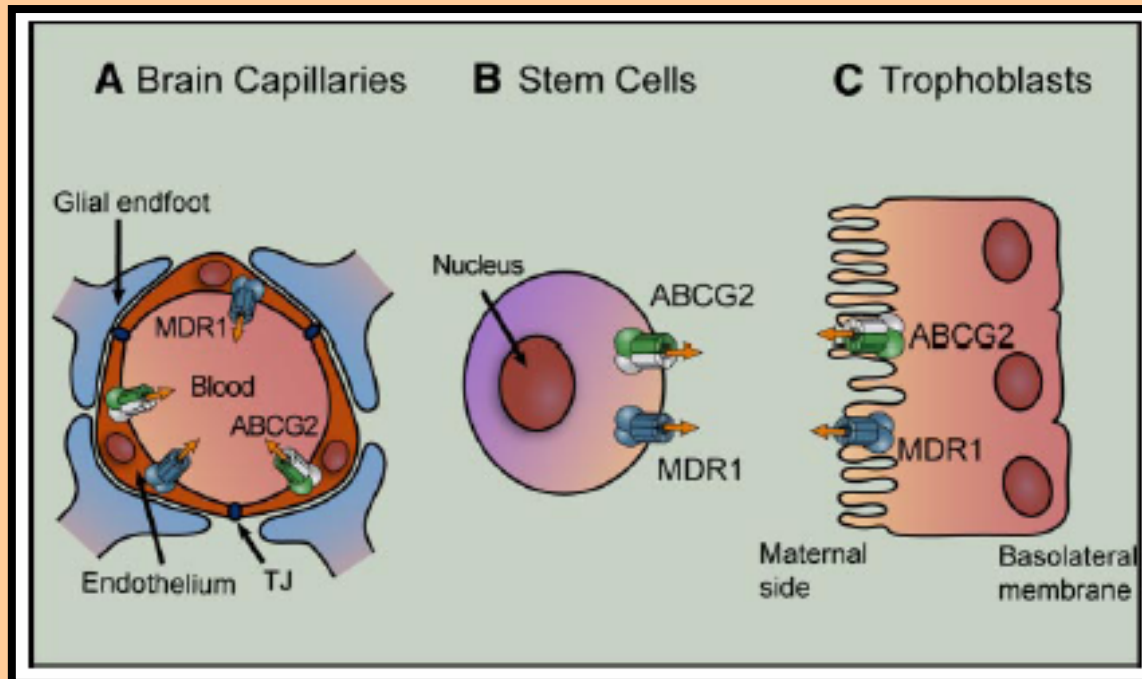
- **SP svalů mají myogení (Sca1⁺/CD45⁻) a hematopoetický potenciál (Sca1⁺/CD45⁺)**
- **Hematopoetické SP jsou Sca1⁺/CD34⁺**
- **SP kůže jsou Sca1⁺/K14⁺/K19⁺**
- **SP z mozku, ale i pankreatu (!) jsou Sca1⁺/nestin⁺**
-

ABC transportéry – ABC transmembránové pumpy

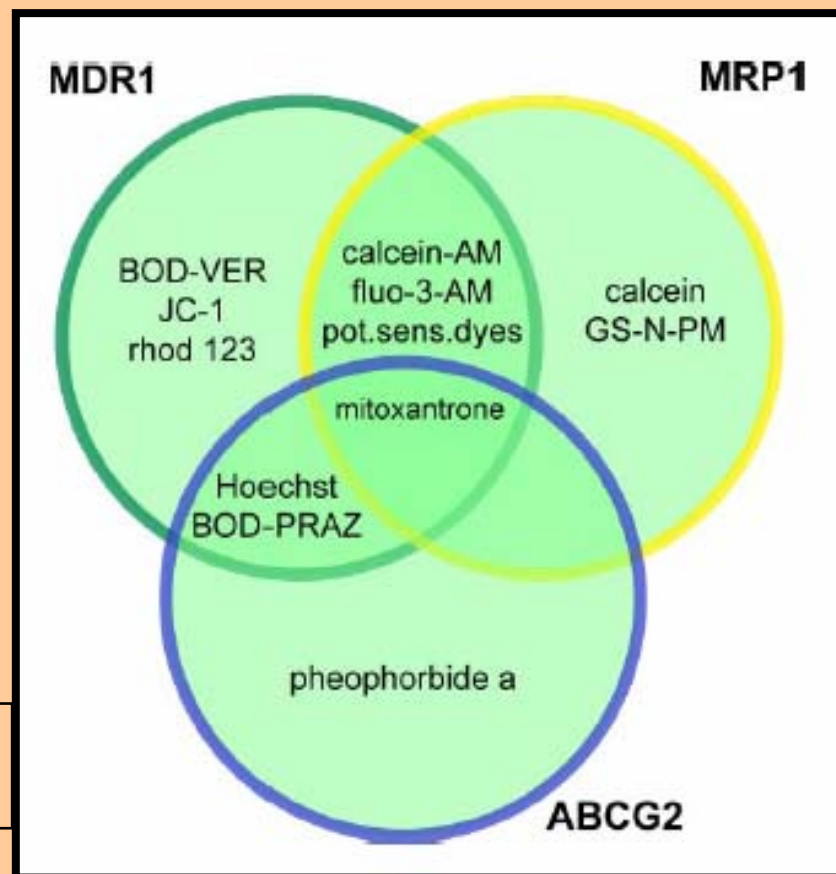
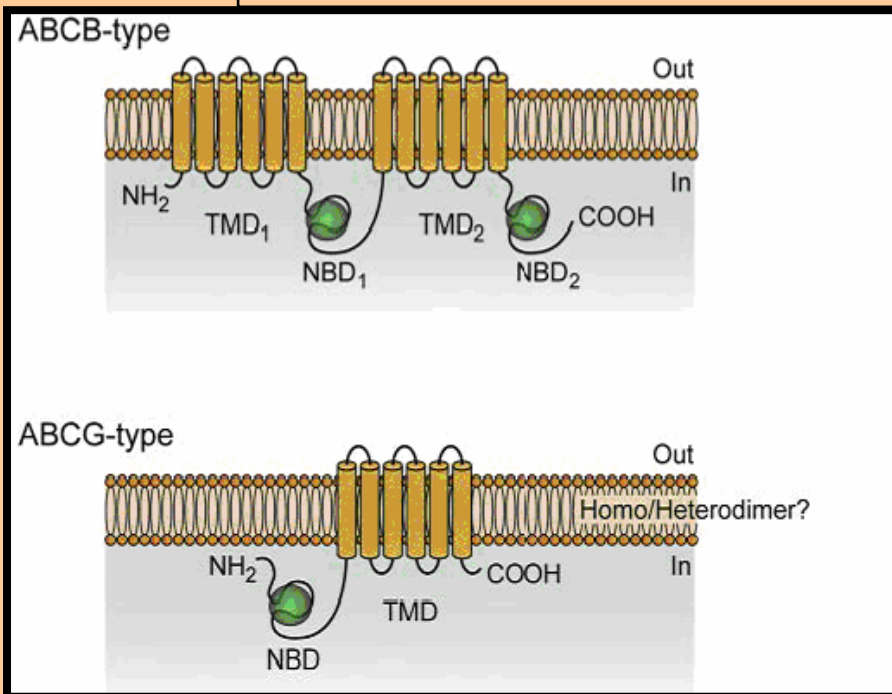
(transmembránové transportéry obsahující ATP vázající doménu)

(ATP binding domain)

- v různé míře jsou přítomny v membránách většiny / všech buněk
(rostlin, živočichů, mikroorganismů)
- účastní se transmembránového transportu různých typů látek, zejména lipofilních
- jsou rozděleny do několika rodin (člověk má 48 známých ABC transportérů)
 - ABCA, ABCB (MDR), ABCC (MRP, CFTR), ABCD (ALD), ABCE, ABCF a ABCG
- nefunkční ABC transportéry = poruchy metabolismu
- některé z nich mají velký význam v metabolismu / transportu farmak



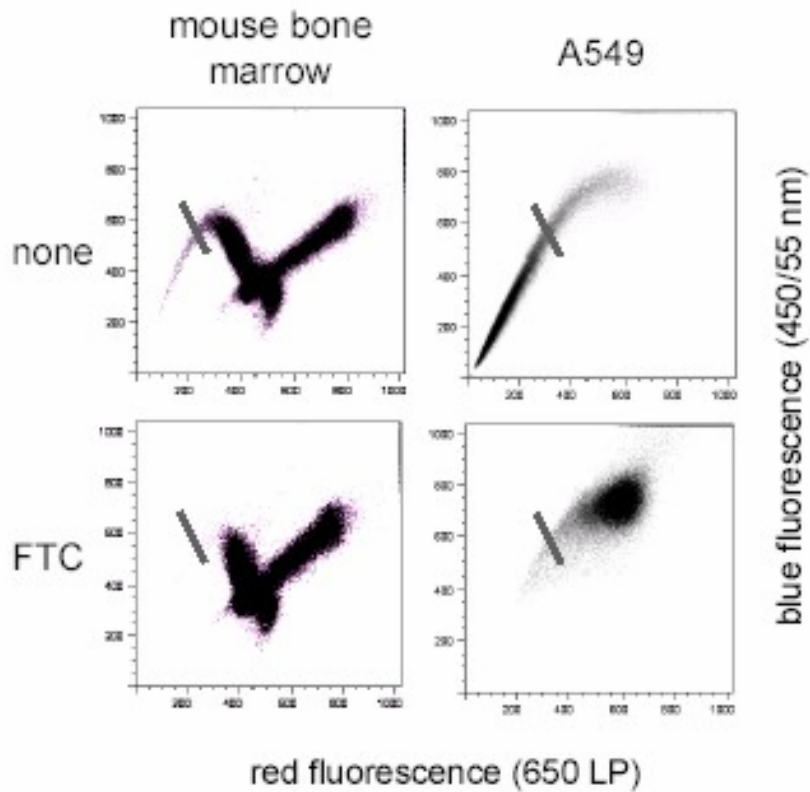
**Doménové uspořádání lidských ABC transportních proteinů.
 Membránový model proteinů ABCB1 – celý transportér,
 ABCG2 – poloviční transportér. NBD – nucleotide binding
 domain, TMD – transmembrane domain (Sarkadi 2006).**



**Substrátová specifita
 některých ABC transportérů**

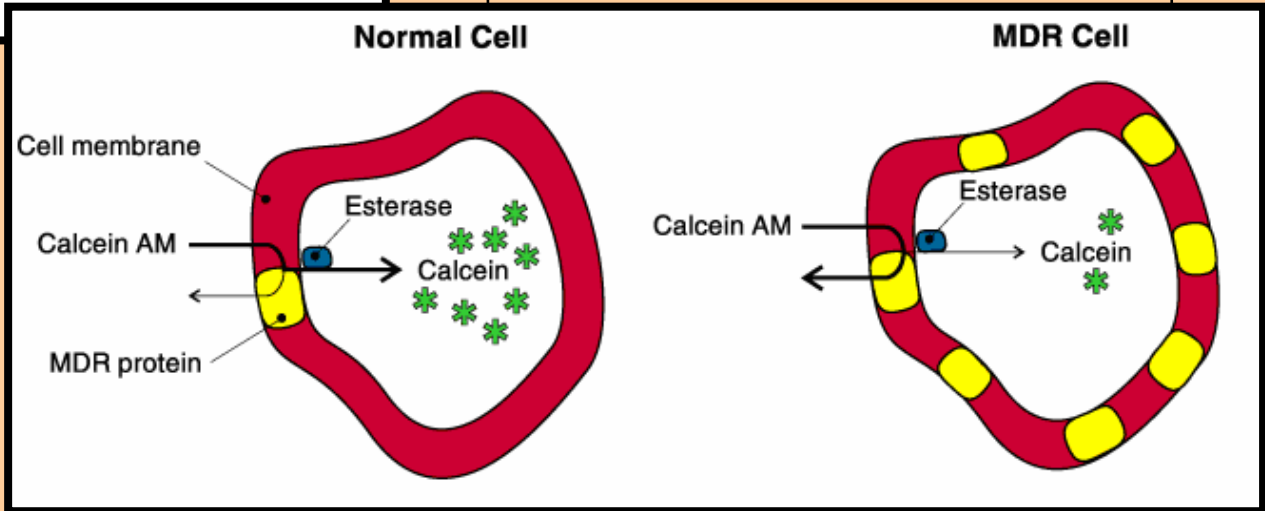
ABC transportéry vylučující chemoterapeutické sloučeniny

| Transportér | Alternativní jméno | Lékové substráty |
|-------------|---------------------|---|
| ABCA2 | | Estramustin |
| ABCA3 | | Daunorubicin |
| ABCB1 | MDR1/p-glykoprotein | Anthracykliny, etoposid, imatinib taxanes, mitoxantron, vinca alkaloidy |
| ABCB4 | MDR2 | Paclitaxel, vinblastin |
| ABCB5 | | Doxorubicin |
| ABCB11 | BESP | Paclitaxel |
| ABCC1 | MRP1 | Anthracykliny, etoposid, methotrexate |
| ABCC2 | MRP2/cMOAT | Cisplatin, doxorubicin, etoposid, methotrexat, mitoxantron, vinca alkaloidy |
| ABCC3 | MRP3 | Cisplatin, doxorubicin, etoposid, methotrexat, vinca alkaloidy |
| ABCC4 | MRP4 | Methotrexat, thiopuriny |
| ABCC5 | MRP5 | 6-Mercaptopurin, 6-thioguanin |
| ABCC6 | MRP6 | Anthracykliny, etoposid, teniposid |
| ABCC10 | MRP7 | Docetaxel, paclitaxel, vinca alkaloid |
| ABCC11 | MRP8 | Purine and pyrimidine nucleotide analogy Mitoxantron, methotrexate, topotecan, |
| ABCG2 | BCRP/MXR | SN-38, imatinib, flavopiridol, anthracycliny |



Příklad detekce buněk s vysokou expresí ABC transportérů. A549 – nádorová linie, FTC – fumitremorgin C (inhibitor aktivity ABC transportérů)

Model funkce ABC transportérů



SSC „mezodermálního“ původu

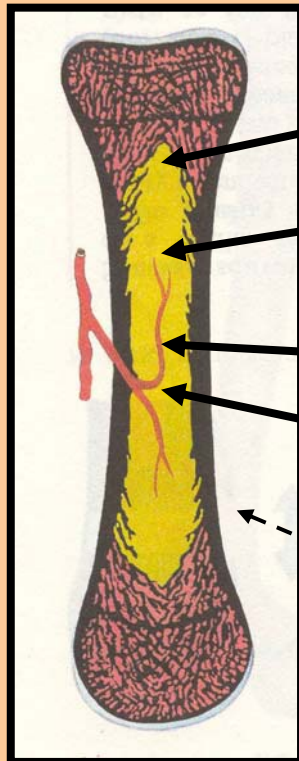
**Mezenchymální kmenové buňky
(MSCs - mesenchymal stem cells)**

buňky tkání mezodermálního původu,
snad i krevní elementy, asi ne buňky ledvin, +

**Hematopoetické kmenové buňky
(HSCs - hematopoietic stem cells)**

krevní elementy, +

Zdrojem adultních SSC mezodermálního původu je zejména kostní dřeň



HSCs (krev, ? jaterní buňky, kardiomyocyty, ...?)

BMSSCs (chrupavka, kost, stroma kostní dřeně, vazivo,
?svaly, nervy,...?)

MAPCs (??? pluripotent ???)

Endoteliální kmenové buňky

Něco dalšího ?

Adultní multipotentní progenitorové buňky – MAPCs (multipotent adult progenitor cells)

- „Jejich existence je velice kontroverzní“
- propagátorkou je Catherine M. Verfaillie (Jiang, 2002)

- **MAPCs byly poprvé izolovány z kostní dřeně, později i z mozku a svalů**
- **na rozdíl od ostatních SSC jsou to proliferující buňky s vysokou aktivitou telomerázy**
- **v kultuře lidských a krysích MAPCs nebyly nalezeny aneuploidie, u myši ano (u myši časté i pro jiné buňky včetně ES???)**
- **v kultuře *in vitro* vyžadují „nízkou“ denzitu (m, r 500-1000 b./cm²; h 1500-3000 b./cm²)**
- **velmi náročná kultivace (fibronectin, EGF, PDGF, LIF, velké objemy pro obdržení dostatečného množství buněk pro analýzu)**
- ***in vitro* dávají vznik řadě typů buněk včetně neurálních, čistota diferencované kultury 70-80%**
- ***in vivo*, po injekci do blastocysty tvoří chiméry (schopné narození) s chimerismem 1-40%, avšak schopnost tvořit zárodečné buňky nebo celé embryo (injekce do tetraploidního trofektodermu) nebyla prokázána**
- **netvoří teratomy**

- **není jasná jejich existence *in vivo***
- **není známý specifický marker**

Fenotyp MAPCs

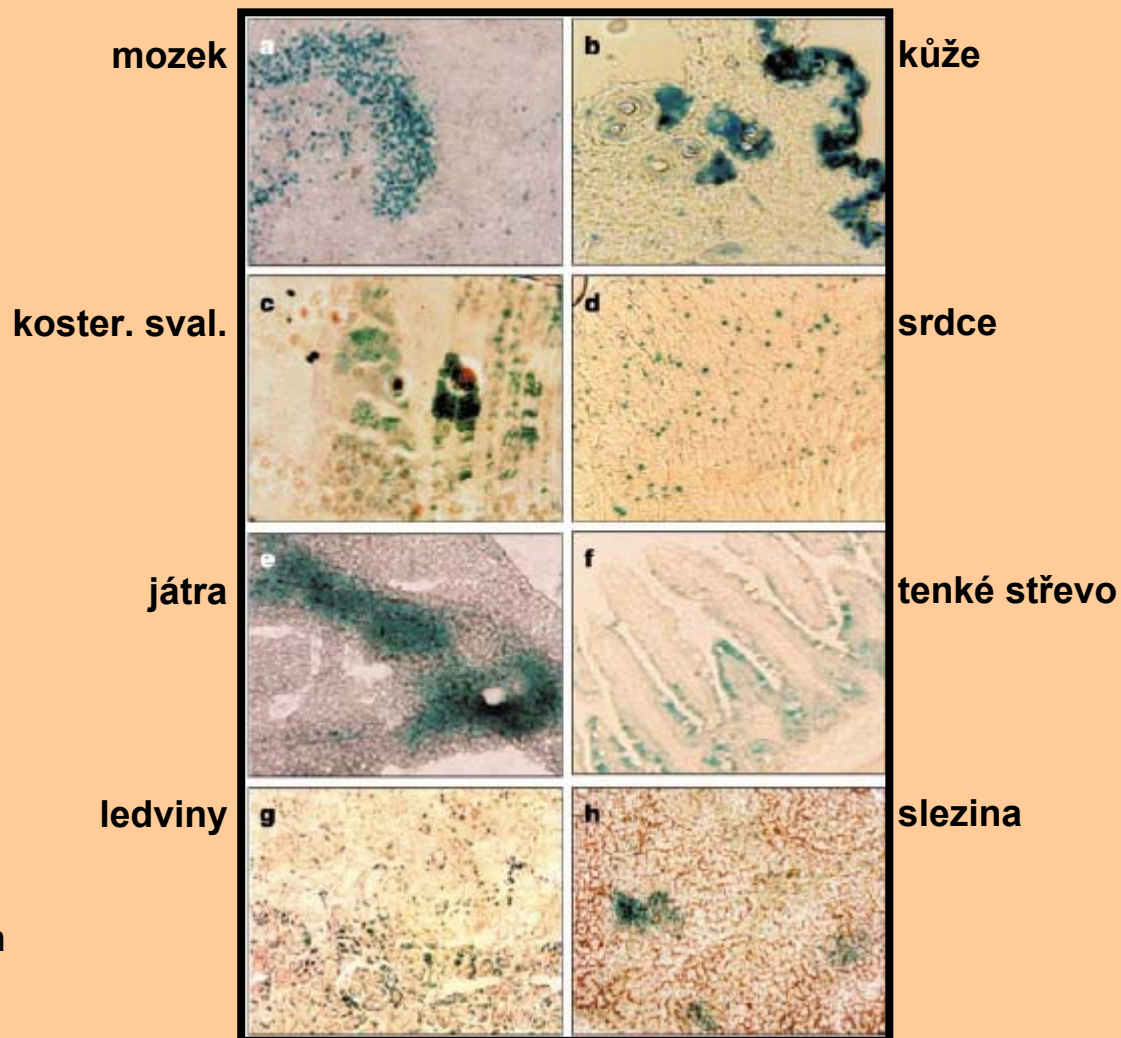
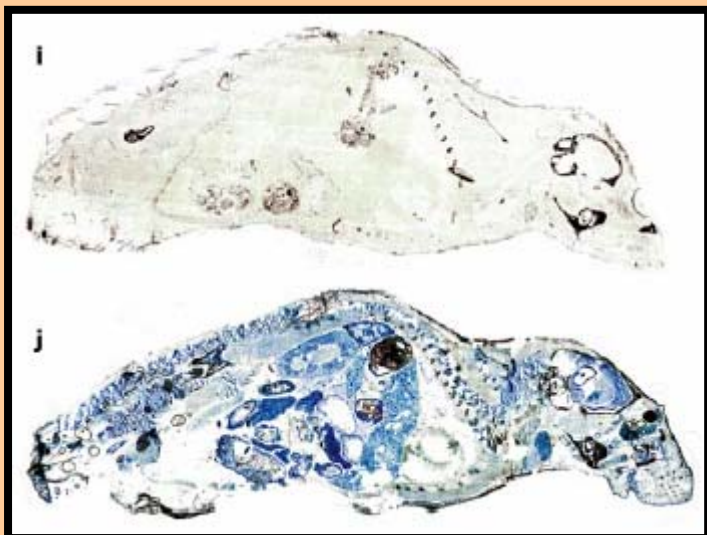
| antigen | exprese | blízke SC |
|--|----------------|-------------|
| MHC-I | - | MSC +++ |
| CD44 (H-CAM) | +/- | různé buňky |
| CD105 (endoglin) | - | MSC +++ |
| CD34 (L-selectinR) | - | HSC +++ |
| CD45 (tyr. fosfatáza) | - | HSC +++ |
| cKit (CD117, SCFR) | - | HSC +++ |
| Thy1 (CD90/CDw90) | + | HSC +++ |
| AC133_h / Sca1*_m | + | HSC +++ |
| SSEA1 | + _m | mES +++ |
| Oct4 | + _m | m+hES +++ |
| Rex1 | + _m | mES +++ |

negativní „-“, ne vždy negativní „+/-“, slabá „+“, mírná „++“, silná „+++“

*Sca1 – stem cell antigen, GPI (glykosylfosfoinositolovou) kotvou vázaný protein v cytoplasmatické membráně zejména „velice časných“ progenitorů

40% chimerismus u myši s ROSA26* MAPCs

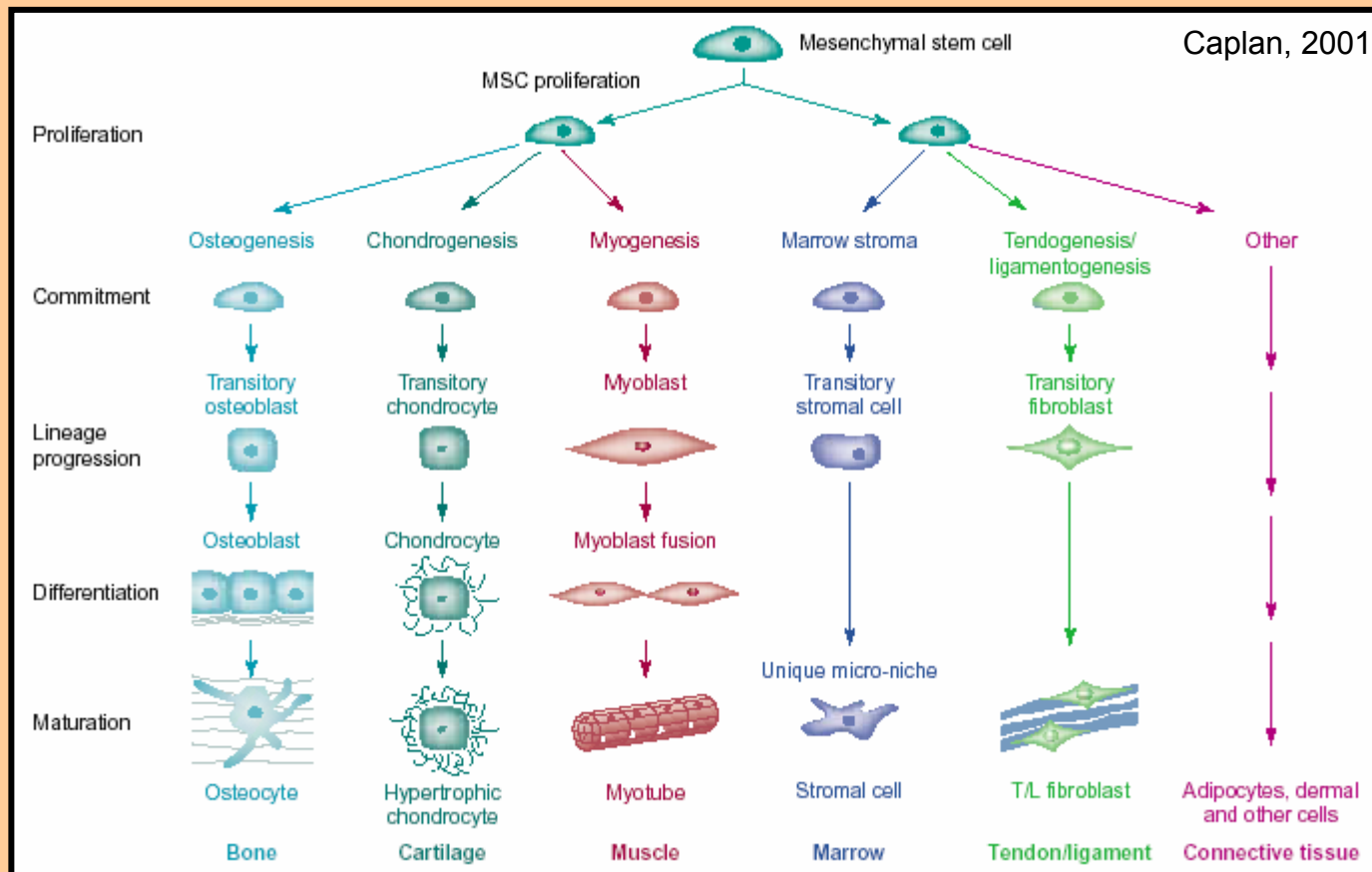
Stanovení β -galaktosidázové aktivity na sagitárním řezu u normální myši (i) a chimerické myši s ROSA26-MAPCs (j).



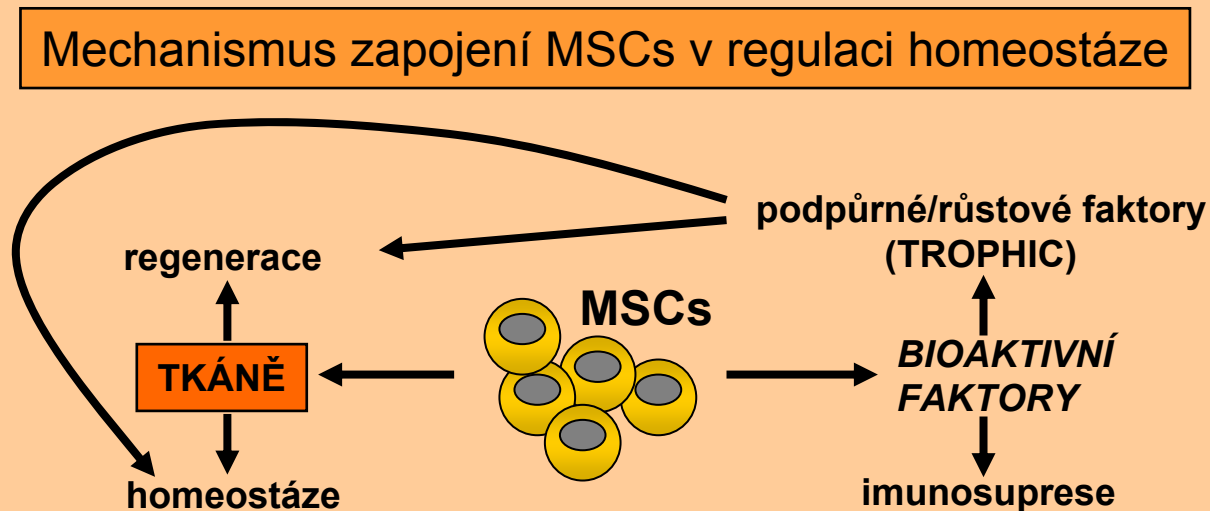
* ROSA26 myši exprimují ve všech buňkách β -galaktosidázu (transgení myši - GMO)

Mezenchymální kmenové buňky – MSCs (mesenchymal stem cells)

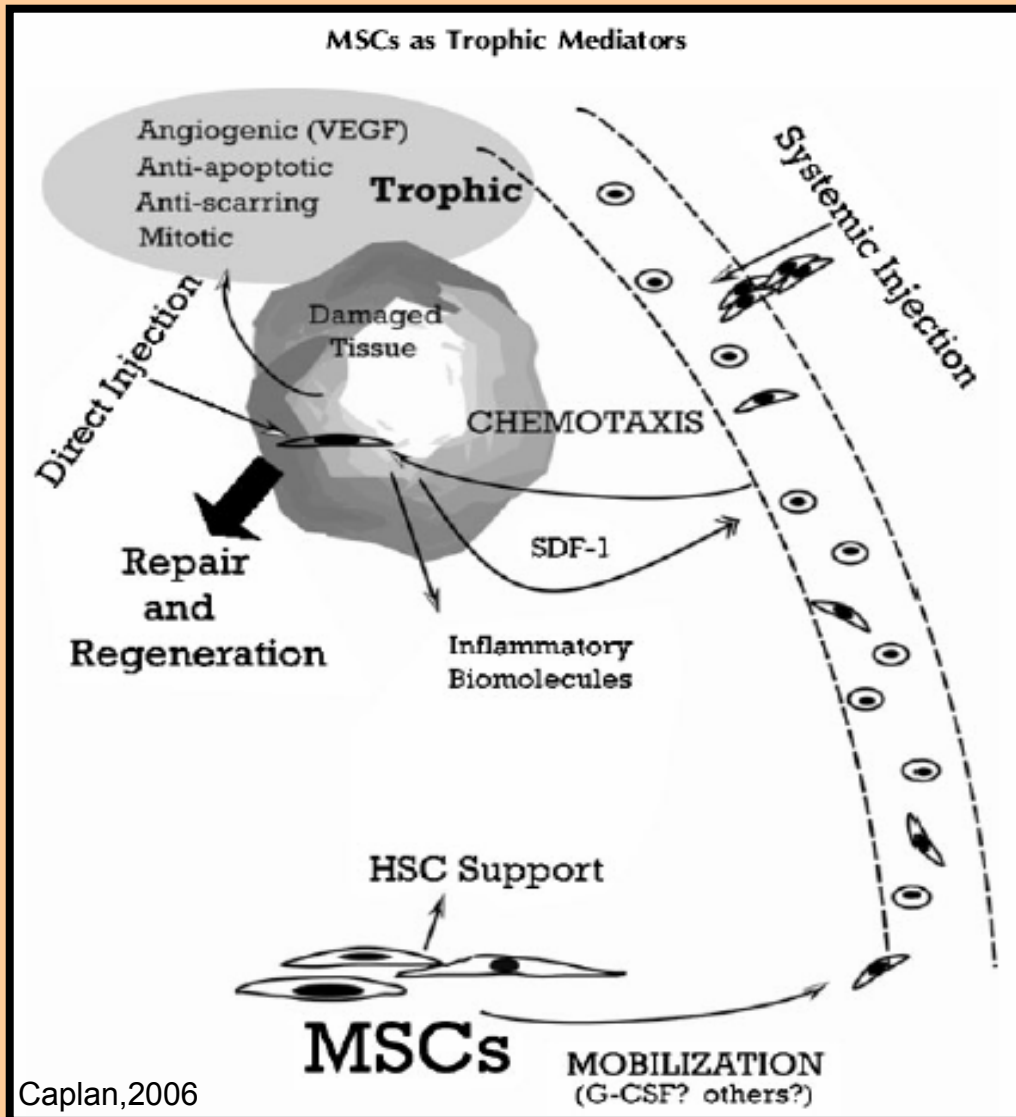
Kmenové buňky kostní dřeně – **BMSSCs** (bone marrow stroma stem cells)
 Kmenové buňky svalové tkáně, chrupavky, kosti,



- MSC lze izolovat z mezenchymálních tkání (kostní dřeň, svaly, dermis, tuková tkáň, chrupavky, kosti, ale i z krevního oběhu (zde se někdy označují jako pericyty), zejména však z kostní dřeně.
- Přesný fenotyp není znám, pracuje se se směsnou populací buněk, která po indukci příslušnými kombinacemi růstových faktorů je schopna dát vznik buňkám dané tkáně.
- Na rozdíl od MAPCs exprimují proteiny MHC-1, a byly připraveny protilátky (SH2, SH3 a SH4) se zvýšenou afinitou k MSCs.
- S věkem jich v organismu ubývá.
- Jsou komerčně dostupné, jejich aplikace v medicíně je ve fázi klinických zkoušek.
- Přes velkou snahu mnoha týmů, pluripotence nebo transdiferenciace v buňky jiného zárodečného listu nebyla dosud potvrzena.



Mechanismu nepřímého zapojení MSCs (a jejich derivátů?) do procesů regenerace jako lokálního zdroje růstových faktorů

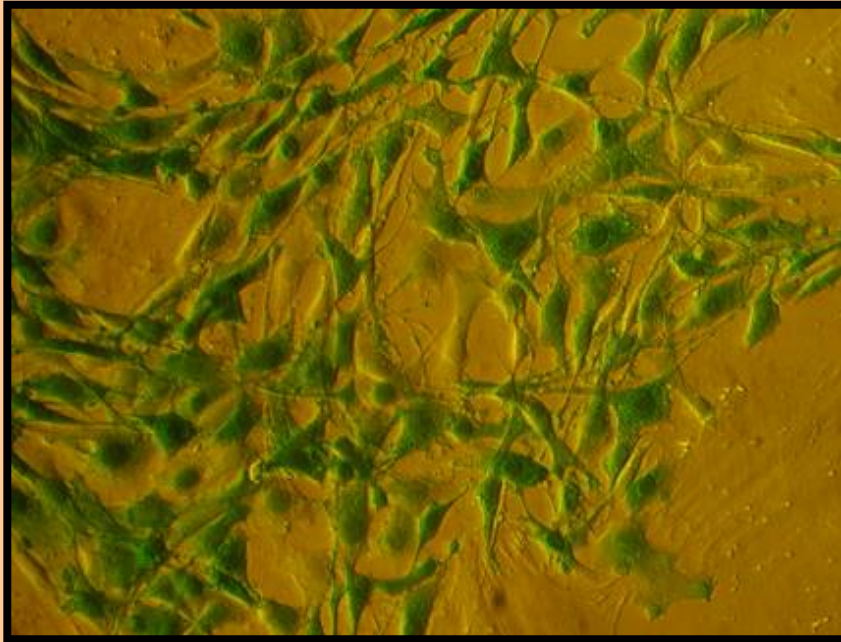


MSCs se aplikují v případě

- infarkt myokardu
- reparace tkáně menisku
- Crohnova nemoc (imunosuprese)

Kmenové buňky stroma kostní dřeně – **BMSSCs** (bone marrow stroma stem cells)

- nejasný fenotyp, ale snadno získatelné ve směsných populacích z kostní dřeně, jako buňky adherující na plastik pro tkáňové kultury (na rozdíl od buněk hematopoetických řad)
- fibroblastům podobné buňky (a) větší, fibroblastům podobné a b) menší, zřejmě progenitory)
- MAPCs jsou někdy označovány jako podskupina (subset) BMSSCs (pluri- x multipotentní???), celkově se ale překrývají s MSCs, obecně je možné, že rozdíly mezi typy jsou dány spíše selekcí, způsobem izolace a nasměrováním k některé diferenační dráze, než skutečnými rozdíly *in vivo*.
- v závislosti na kultivačních podmínkách velmi rychle mění morfologii, což pravděpodobně vedlo k podezření na jejich pluri-/multipotentní schopnosti (zejména vznik neurálních b.)

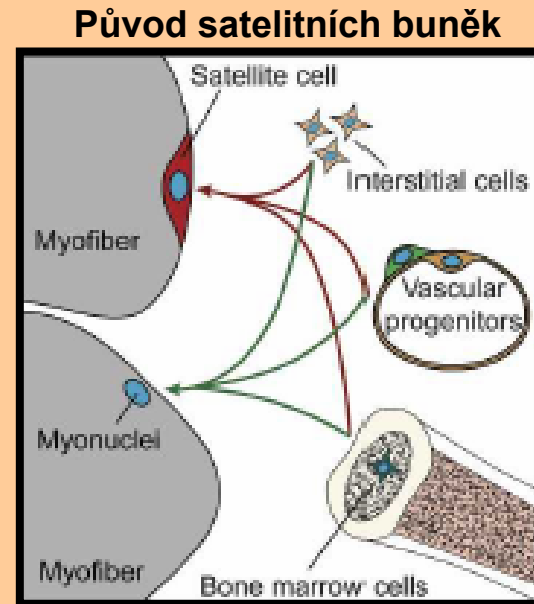
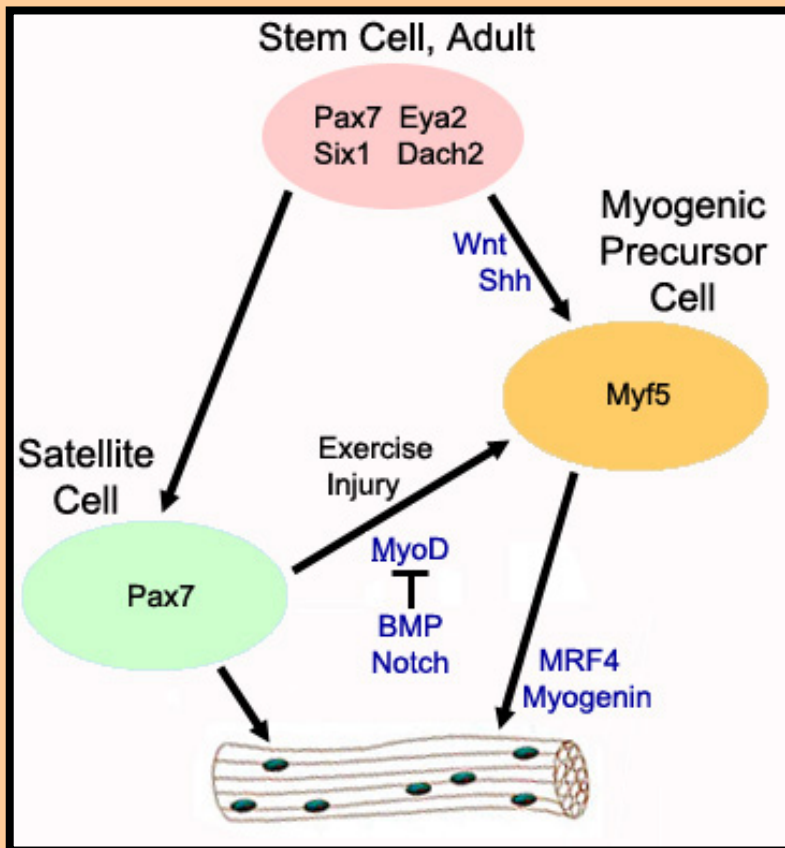


**Stromální buňky kostní dřeně
potkana**

V současné době nejsou plně objasněny vztahy/hierarchie mezi **MSCs – MAPCs – BMSSCs – (+SP)** a dalšími somatickými kmenovými buňkami. Je možné, že mnohé pozorované rozdíly jsou dány postupy izolace daných buněk, jejich kultivací *in vitro* nebo případně i dalšími nedostatky v přípravě vzorků apod.

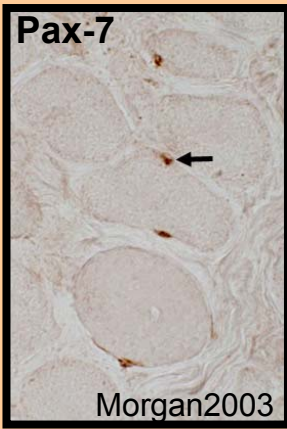
Svalové SC – kmenové buňky kosterní svaloviny = MuSC

- v embryogenezi *somity* → *myotom* → myocyt → svalové vlákno
- v dospělosti MuSC → satelitní buňky → myocyt → svalové vlákno
(kostní dřeň) (povrch svalového vlákna)
- MuSC nejsou přesně definované, náleží zřejmě k užšímu výběru MSC
- *in vivo* je sval regenerován satelitními buňkami, majícími vlastnosti SC
- satelitní buňky se u myši objevují 17.5 dpc., s nástupem tvorby sekundárních svalových fibril (13 dpc. objevení primárních sv. fibril)

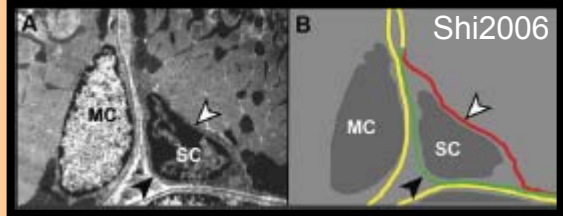


Dále byly izolovány z adultního kosterního svalu buňky CD34+/Sca1+ jako kmenové buňky odvozené ze svalu (MDSC – muscle derived stem cells)

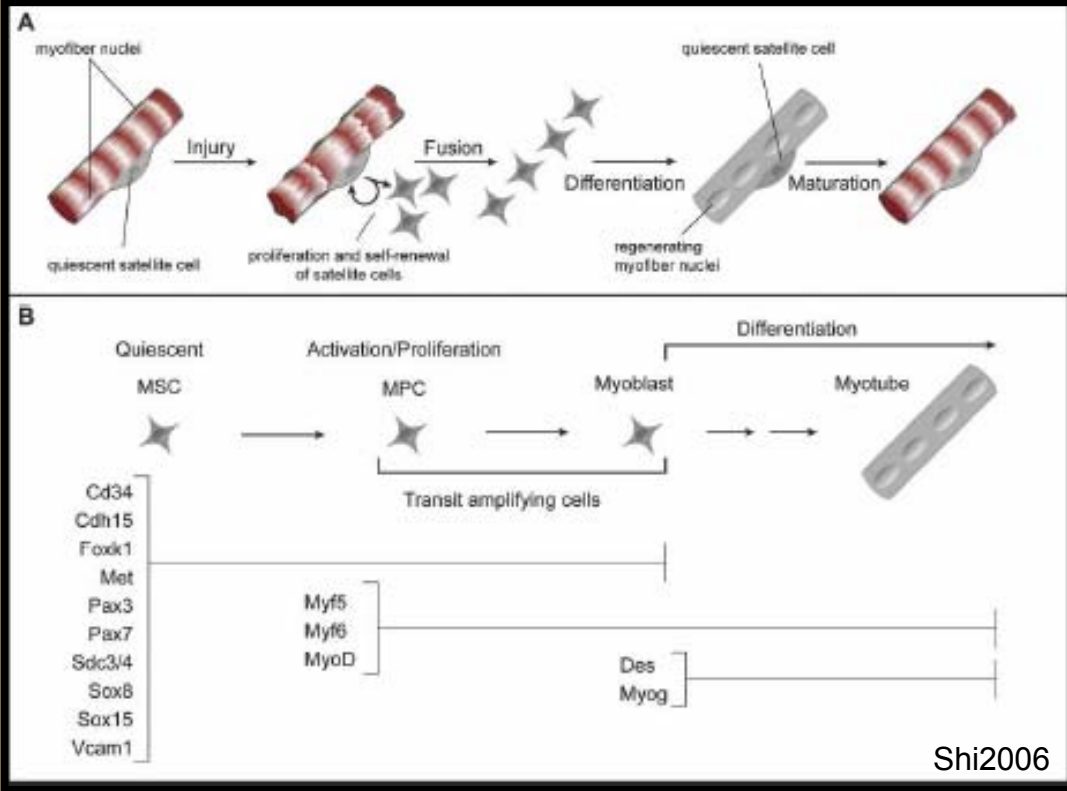
Satelitní buňky kosterní svaloviny a jejich úloha v regeneraci svalu



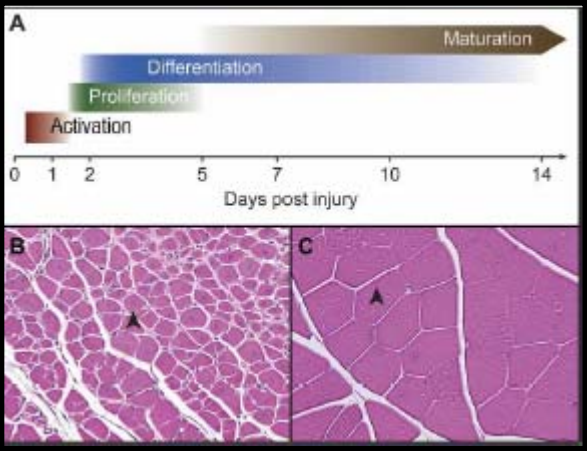
sarkolema □
bazální membrána ■



**Mechanismus regenerace svalového vlákna
MuSC/satelitními buňkami (MSC)**
MPC – myogení progenitor



Dynamika regenerace kosterního svalu



| marker | Satelitní buňky spící, časné? (quiescentní) | Satelitní buňky spící (quiescentní) | Satelitní buňky aktivované |
|--------------------|---|-------------------------------------|----------------------------|
| Pax-7 | + | + | +++ |
| cMet (HGFR) | + | + | + |
| m-cadherin | - | + | + |
| CD34 (L-selectinR) | - | + | + |
| Myf-5 | - | + | + |
| MyoD* | - | - | + |

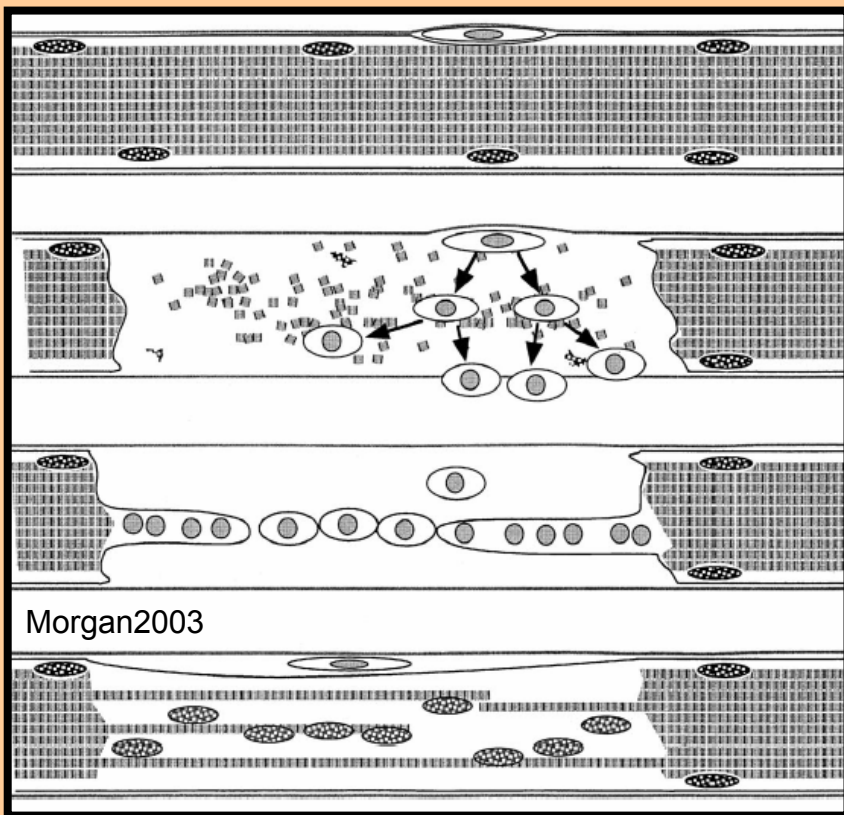
* Overexpresse MyoD u fibroblastů je diferencuje do myogéních buněk

Mechanismus regenerace svalového vlákna satelitními buňkami.

← Aktivace satelitních buněk (IGF 1,2, HGF,..)

← Fúze satelitních buněk

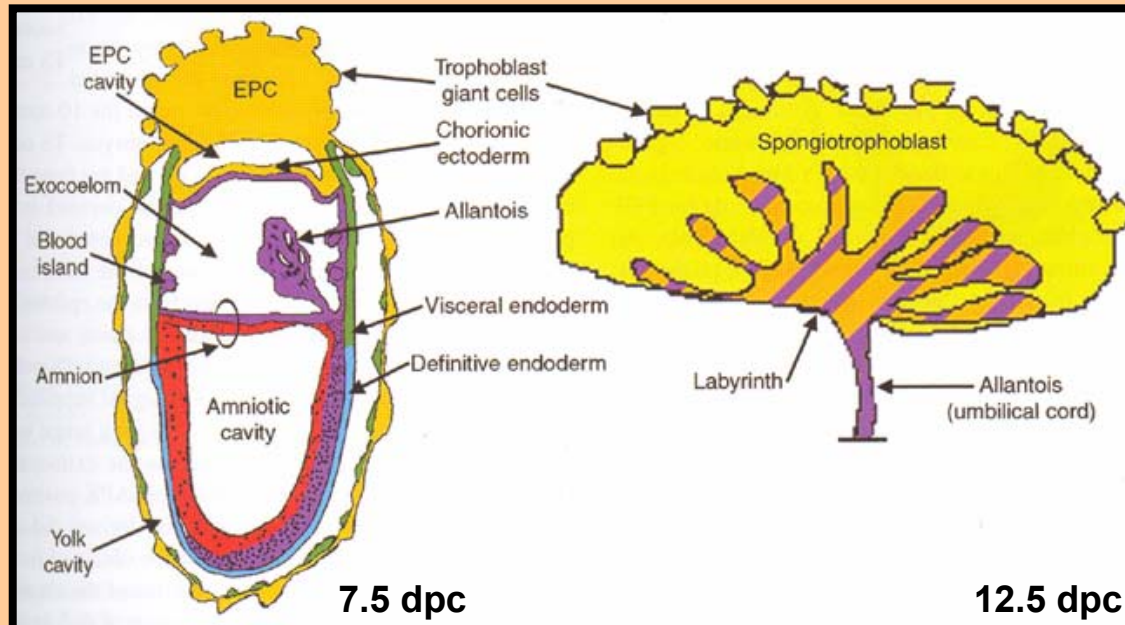
← Regenerace svalového vlákna



Kmenové buňky v pupečníkové krvi (v allantois)

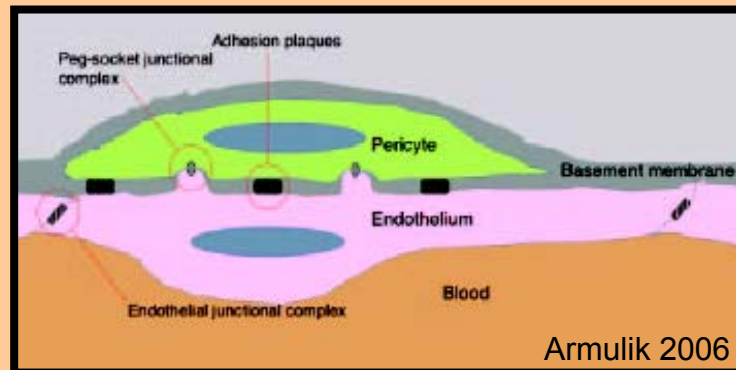
Pupečníková krev obsahuje hematopoetické progenitory existující, jako pozůstatek extraembryonálních krevních ostrůvků a endotelie. Díky tomu, jsou tyto buňky geneticky shodné a fenotypově velice blízké vlastním krevním buňkám embrya a je možné je tak snadno použít jako transplantační štěp pro z tohoto embrya vzniklého jedince. Jejich množství lze navíc navýšit indukci jejich proliferace koktejlem pro-hematopoetických cytokinů.

V současnosti bylo publikováno, že pupečníková krev může být také zdrojem mesenchymálních buněk, snad podobné MSCs i s jejich potencií. Tyto výsledky je však třeba ještě důkladně ověřit.



Endotel

- jednovrstevný dlaždicovitý epitel tvořený endotelovými buňkami adherovanými k bazální membráně
- tvoří výstelku cév případně cévy samotné (mikrokapiláry)
- v případě cév jsou z druhé strany bazální membrány buňky hladké svaloviny a podle typu orgánu také množství pericytů (viz. mesenchym), pericyty jsou i v mikrokapilárách
- endotel je prostupný pro pericyty, monocyty/makrofágy, leukocyty a lymfocyty
- endotel je také významným zdrojem mnoha růstových faktorů, díky tomu hraje významnou úlohu v homeostázi dané tkáně
- obnova endotelu probíhá z endotelových progenitorů (kmenových buněk?), které jsou vmezeřeny mezi endoteliemi, případně plavou v krevním řečišti.
- některé práce ukazují na společného předchůdce endotelií a HSCs (CD31^{+/-} – PECAM1 (Platelet endothelia cell adhesion molecule 1), CD34⁺, CD45⁺) případně také na schopnost vzájemné transdiferenciace těchto dvou buněčných populací. Adultní progenitory pro hematopoézu a endotelie byly izolovány z krve a kostní dřeně s fenotypem CD34⁺, Flk-1⁺, AC133. Podobně bylo prokázán společný progenitor v průběhu embryogeneze pro endotelie a buňky hladké svaloviny. Jestli takový progenitor existuje i v dospělosti není dosud známo.



Srdce, srdeční sval a jeho regenerace

Kardiomyocyty + Endotelie + specializované svalové buňky Hisova svazku a Purkyňových vláken + SP apod.?? + vazivo (fibroblasty)?

Srdeční sval může mohutnět zejména hypertrofií svých buněk, ne jejich namnožením, a tak možnosti autonomní regenerace po poškození jako je infarkt myokardu, ischemie apod., jsou značně omezené. Proto jsme se domnívali, že myokard neobsahuje zásobu progenitorů k reparaci. Navíc se výraznější dělení kardiomyocytů zastaví časně po narození, stanou se senescentními a jejich počet se během života již za normálních okolností zásadně nezvětšuje.

Některé recentní práce však ukazují, že i u srdce můžeme předpokládat jisté regenerační schopnosti, a to buď díky zbytkovým progenitorům nebo schopností (některých?) kardyomyocytů proliferovat v odpověď na poškození.

Byla také prokázána schopnost regenerace srdce cirkulujícími progenitory, jak ukazují sex-mix transplantace srdce. Analýza distribuce X chromosomu ukázala, že se pravděpodobně nejedná o fúzi buněk, ale o diferenciaci progenitorů (SCs ?), přesto jiné práce prokázali jen fúzi mezi buňkami.

- využití transplantátů např v podobě kardiomyocytů získaných z ES buněk je zdá se komplikovanou jinou synchronizací tepu.

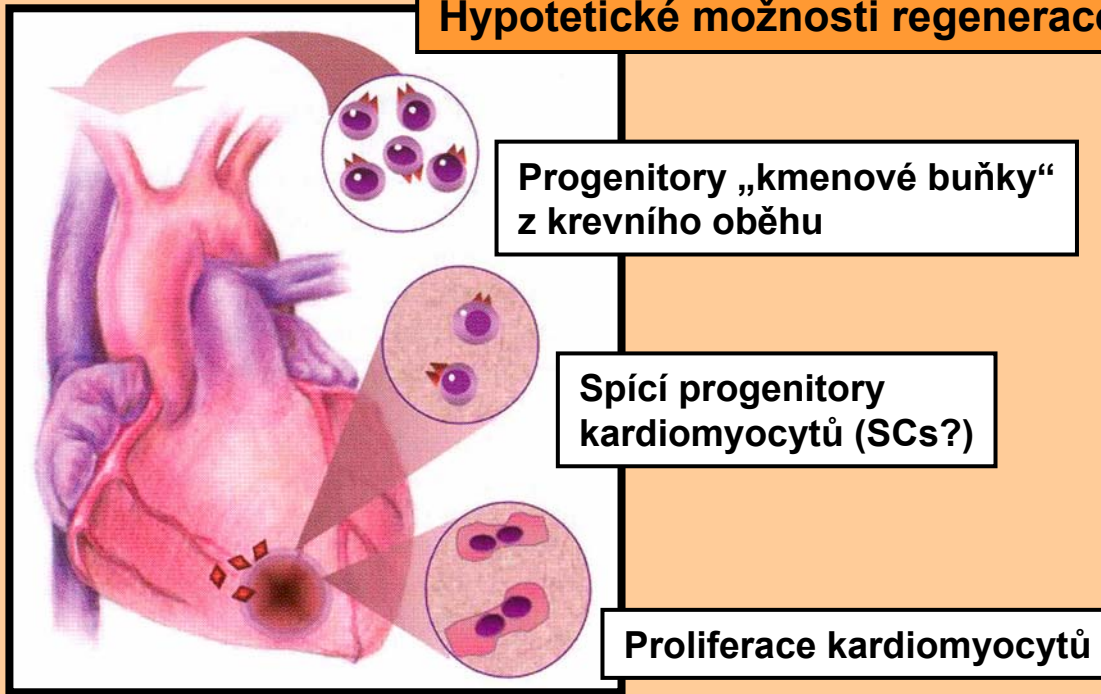
Tyto regenerující buňky jsou pravděpodobně SP a c-kit+ buňky kostní dřěně (MSCs?)¹⁾, i po injekci, se přednostně usazují např. v místě ohraničujícím infarkt²⁾. Mechanismus regenerace srdečního svalu nemusí však být spojen přímo s diferenciací těchto zde se akumulujících buněk, ale může být vyvolaný také růstovými faktory, které tyto buňky produkují (viz. MSCs) a tak stimulují buď samotné kardiomyocyty, nebo a to spíše endotelové buňky vystýlající místní cévy. Endotel snad sám o sobě má regenerační schopnosti pro některé tkáně³⁾. Není však dosud jasné zda tento regenerační (transdiferenční ?) potenciál mají samotné endotelie nebo další typy buněk nacházející se v přímém kontaktu s endotelem (SP buňky, MSCs?, fibroblasty).

1) MSCs, SP buňky, BMSSCs, MAPCs, se "v malém množství vyskytují i v krevním řečišti. V návaznosti na poškození organismu, podle některých teorií, se počty těchto buněk v krvi zvětšují.

2) „Signál poškozené tkáně“. Cirkulující (i např MSCs / BMSSCs) progenitorové a kmenové buňky mají tendence (zřejmě podobně jako buňky imunitního systému) akumulovat se v poškozené tkáni. Podstata tohoto signálu není přesně známa. Zřejmě je však podobného charakteru jako známe z imunitních reakcí a z procesů regenerace (chemoatraktanty – chemotaxe, pathotaxe)

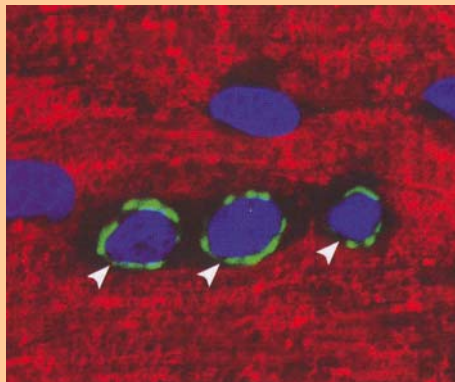
3) Je podezření, že endotel může dávat vznik hematopoetickým progenitorům (viz. např. hematopoéza v stěně dorsální aorty (AGM) embrya a extraembryonální prvotní krevní ostrůvky průběhu embryonálního vývoje atd..

Hypotetické možnosti regenerace srdečního svalu

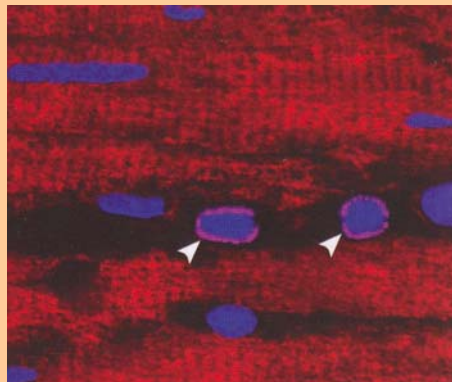


Detekce buněk v srdeční svalovině exprimujících

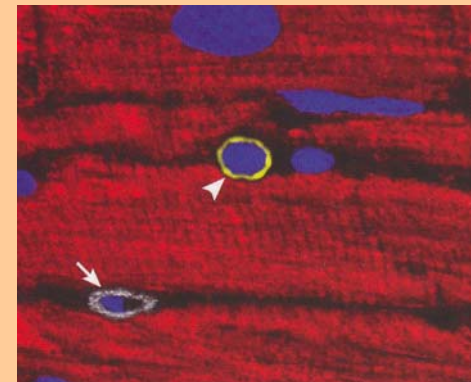
c-kit (zelená)



MDR1 (růžovo-fialová)

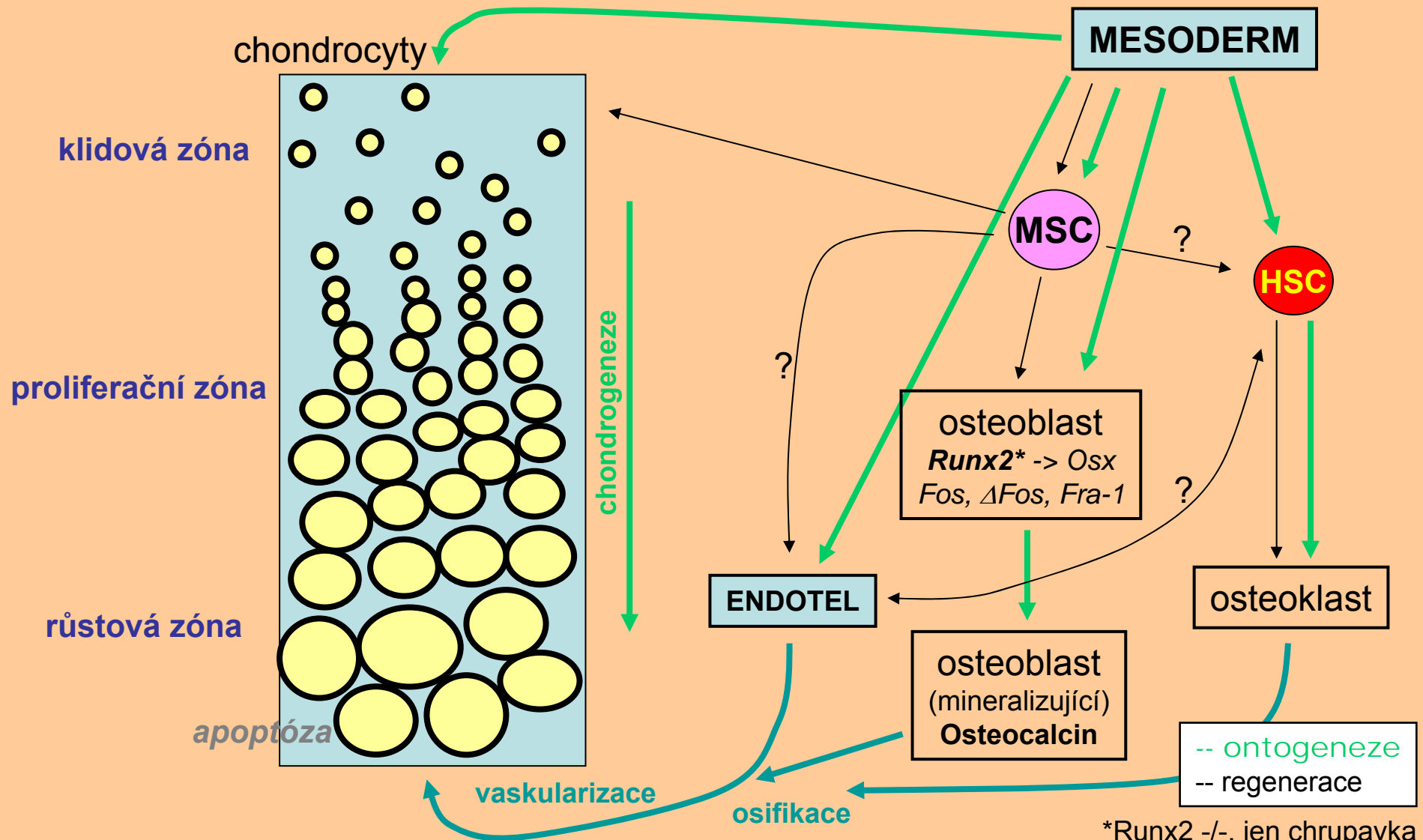


Sca1 (žlutá)
von Willebrandův faktor (bílá)

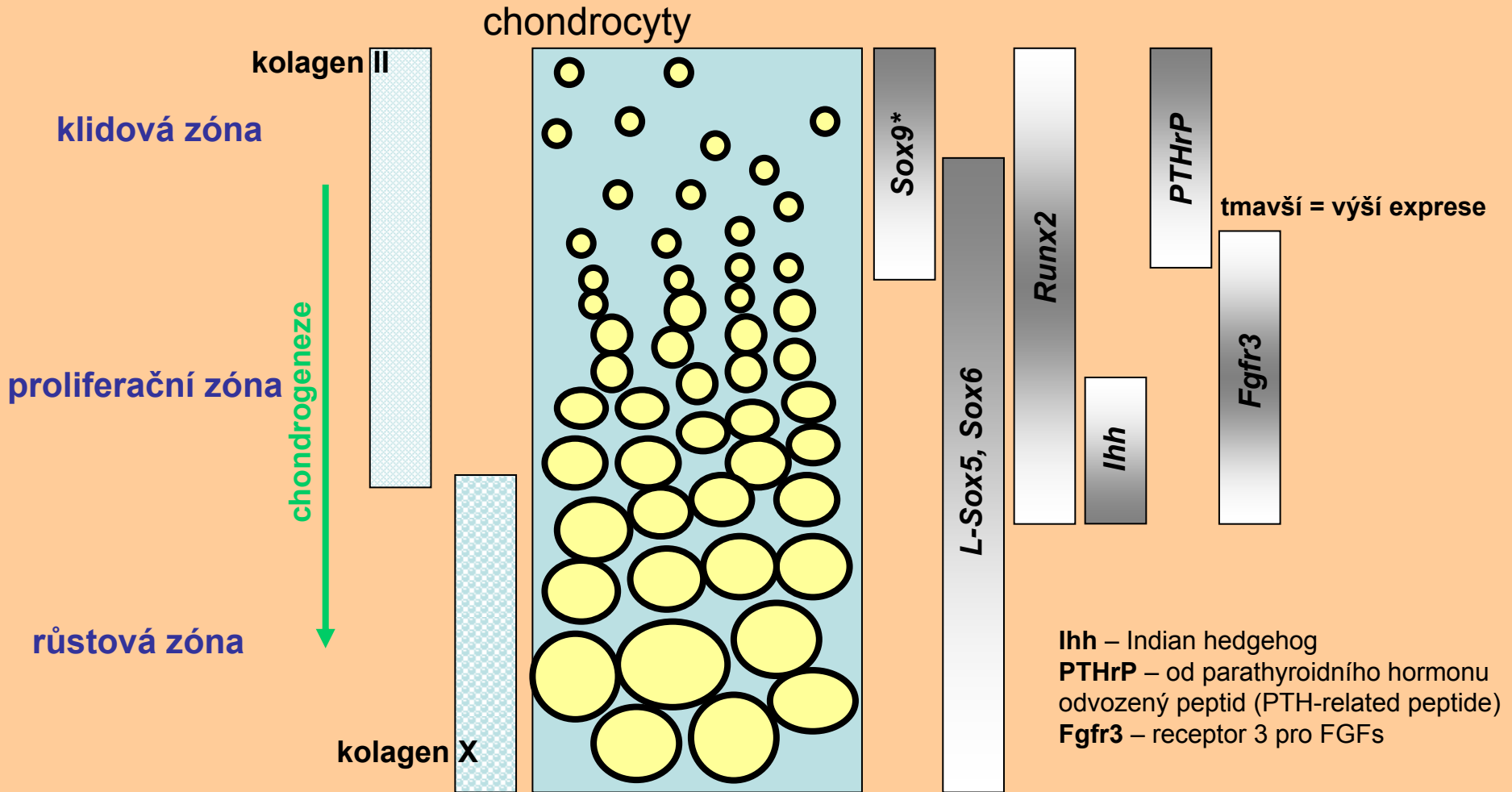


Kostra - skelet

chrupavka (chondrocyty) + kost (osteoblasty a osteoklasy)
- vývoj končí v pubertě



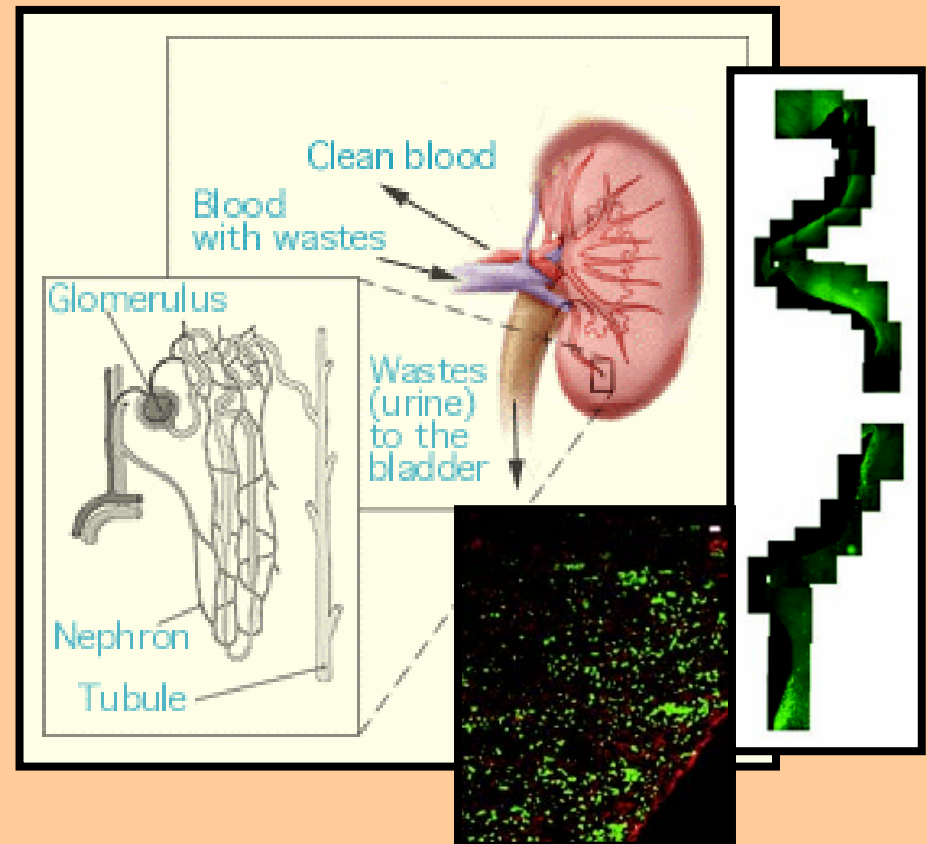
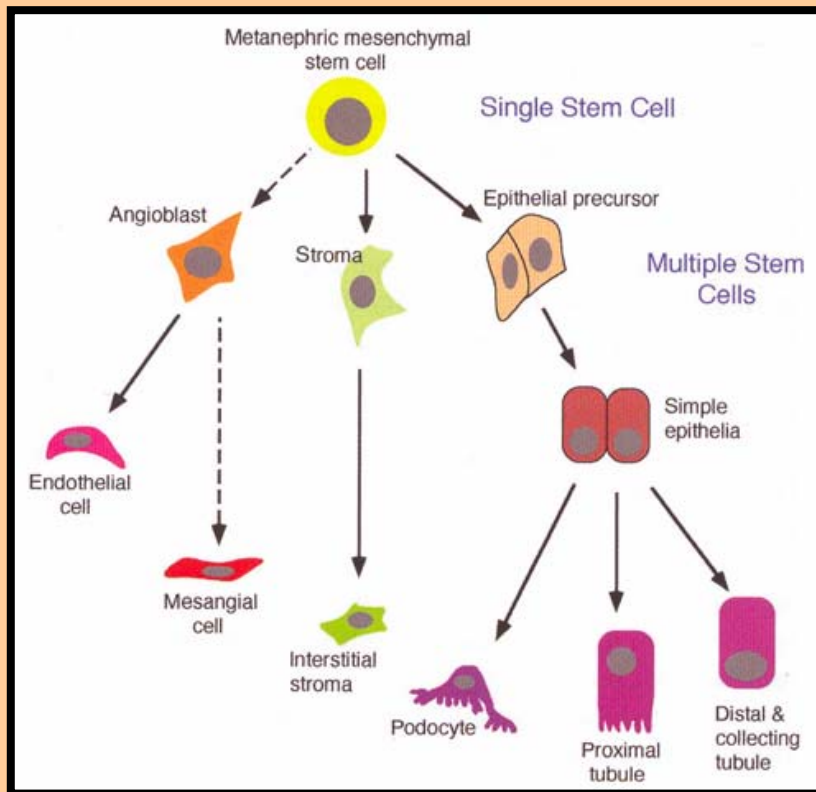
fenotyp chondrocytů v průběhu jejich diferenciace



* Sox9 aktivuje expresi kolagenů typu II, IX, XI
Sox9 -/-, nevznikají chondrocyty

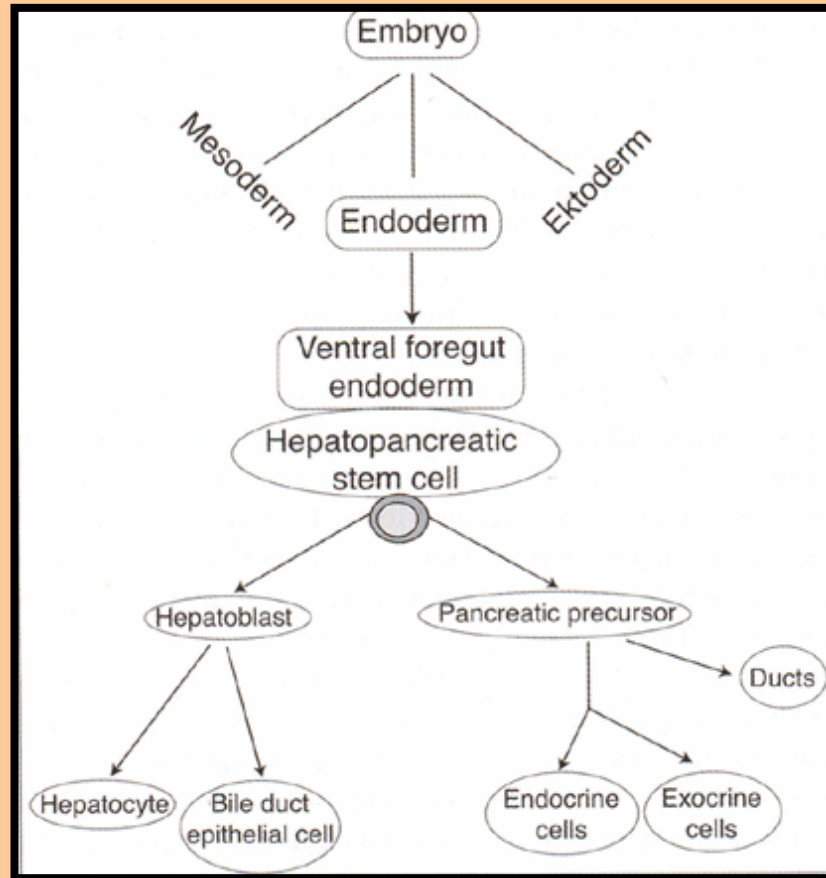
Ledviny

- velice malá schopnost regenerace
- složitý vývoj, různá regulace a odlišné typy buněk mezi pronefros, mesonefros a metanefros
- multipotentní buňky, kultivovatelné *in vitro* a integrující se v různých oblastech ledviny objeveny ve stěně renálních papil (Oliver 2004)
- klíčové geny pro vznik ledvin: **lim1** (homeoboxový gen); transkripční faktory **Pax2, Pax8**
- geny klíčové pro regulerní vývoj ledvin: **Wnt4, BMP7**; transkripční faktor **FoxD1, pod-1; PDFG/PDGFR**



SSC „entodermálního“ původu

Játra a pankreas



Během embryogeneze vznikají játra a pankreat ze společného progenitoru/kmenové buňky. Přítomnost takové buňky v dospělém organismu, však nebyly dosud prokázána.

Játra

a) vlastní jaterní buňky

hepatocyty (albumin), **oválné buňky** (vlastní jaterní kmenové buňky, c-kit, SCF, Thy1 albumin / CK19), **epiteliální buňky žlučovodu** (CK19), **hvězdčicovité buňky**

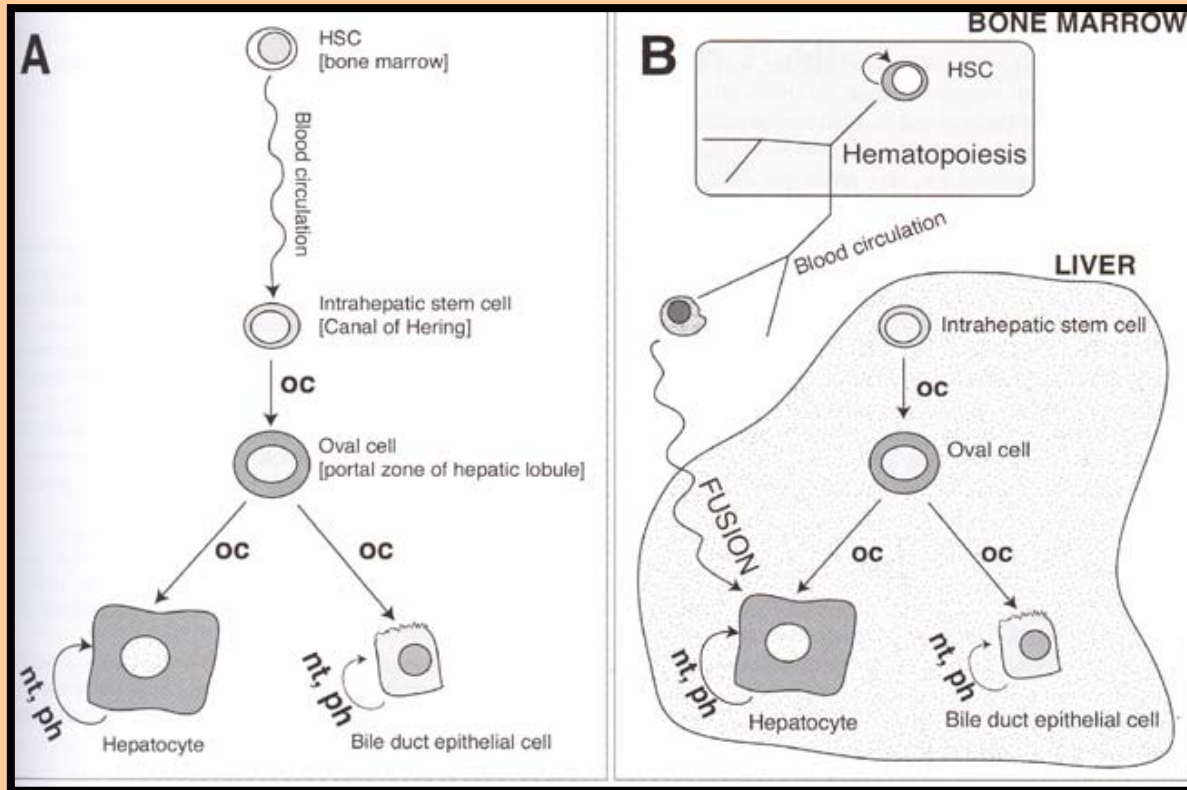
b) další typy buněk v játrech

endotelie, krevní elementy, Kupferovy buňky, SP buňky,..

Jaterní tkáň běžně regeneruje proliferací vlastních hepatocytů (hepatotektomie), případně proliferací a diferenciací oválných buněk (otravy, poškození chemikáliemi). Jednotlivé typy buněk jsou preferovány podle typu poškození. Hlavní, proliferaci indukující faktor je HGF (hepatocyte growth factor), na celkové regulaci regenerace se pak podílejí i IL-6 (interleukin 6), TNF α (tumor necrosis factor α), TGF α (transforming growth factor α), EGF (epidermal growth factor)

- **regenerace jater HSCs: c-kit+++**, Thy+--**, Lin-**, Sca1+ (fenotyp KTLS) z kostní dřeně tvoří po transplantaci do jaterní tkáně, zdá se funkční hepatocyty
- **regenerace jater MAPCs a BMSSCs: MAPCs se usazují v játrech (chiméry i transplatace) a i *in vitro* dávají vznik hepatocytů (?!). BMSSCs, se usazují v játrech, ale zdá se, že zejména fúzí s tamními hepatocyty (časté karyotypy při sex-mix transplantacích jsou XXXY a XXXXY). Plná funkčnost těchto MAPCs a BMSSCs derivátů však zatím nebyla prokázána.**

Model zapojení se HSCs / hematopoetických progenitorů v regeneraci jater



oc – regenerace z oválných buněk

nt – normální obnova jaterní tkáně

pt – obnova jaterní tkáně po odstranění její části

Pankreas

- a) exokrinní buňky (trávicí enzymy) a epiteliální buňky tvořící kanálky pro odvod těchto enzymů do dvanáctníku
- b) endokrinní buňky α (glukagon), β (insulin), δ (somatostatin) a pp-buňky (pankreatický polypeptid)

- prekursor pankreatu (embryonální) exprimuje transkripční faktor „*pdx1*“
- poslední studie ukazují, že β buňky se neobnovují z kmenových buněk, ale svou vlastní pomalou proliferací. Exprimují insulin, *Pax6*, *HNF3 β* ,..
- endokrinní buňky mají velice podobný vývojový program jako buňky neurální (NeuroD, *is11*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*,...) rozdíl je zejména v insulinu a *pdx1*
- epiteliální buňky kanálek se sebeobnovují podobně také exokrinní buňky acinů
- SCs pankreatu nebyly dosud objeveny
- diferenciace BMSSCs (?) do β buněk byla jednou prokázána, ale nezopakována
- buňky pankreatu mohou tvořit hepatocyty u člověka spontánně (*in vivo*), u potkana to lze navodit experimentálně, opačně to nefunguje, avšak exogenní exprese *pdx1* v hepatocytech z nich dělá buňky exprimující insulin a znaky exokrinních buněk, podobné i u buněk embryonálního epitelu střeva

