

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 několik 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 ?

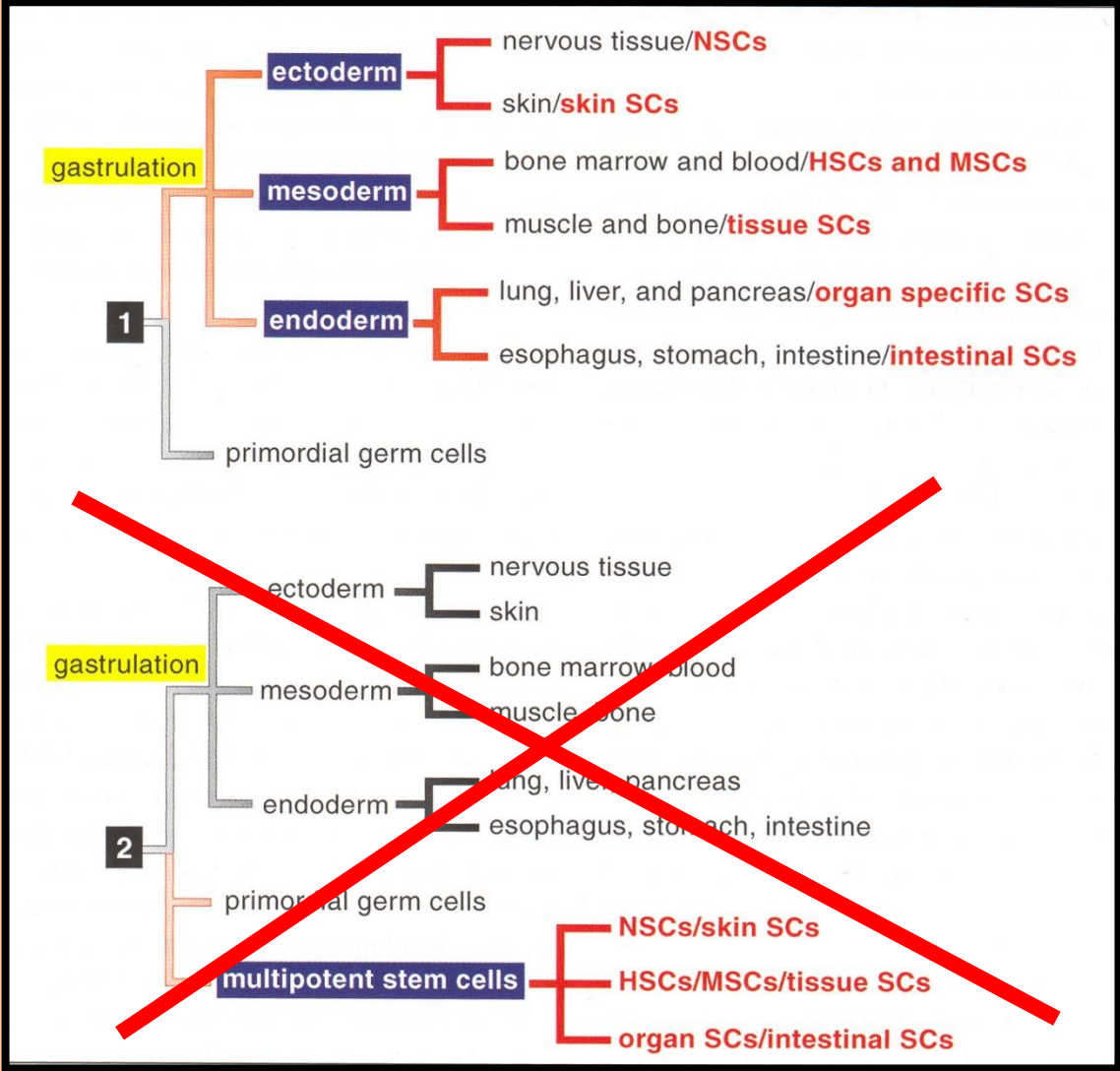
Lze je kultivovat *in vitro* ?

Kde se nacházejí?

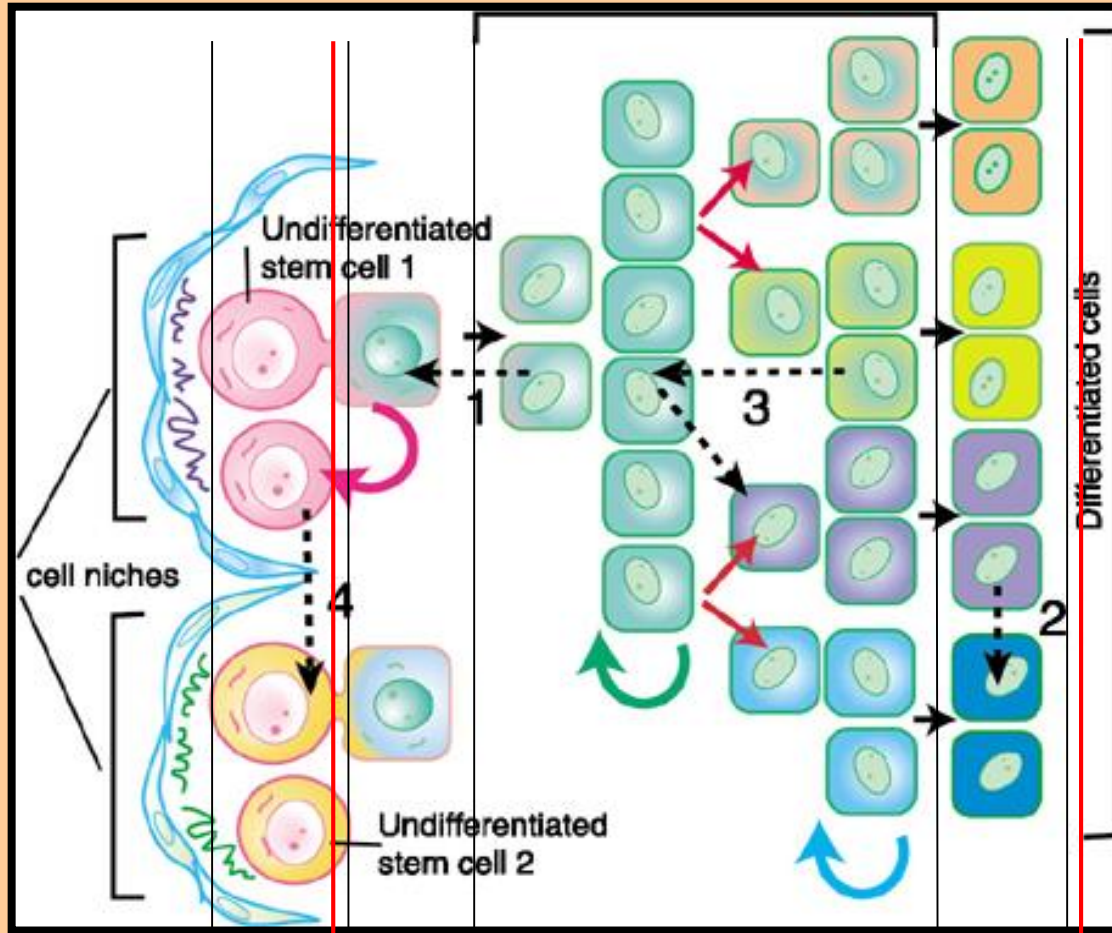
Jsou nesmrtelné?

„Existují?“

Původ SSC



Biologie SSC



**kmenové buňky
(aktuální)**

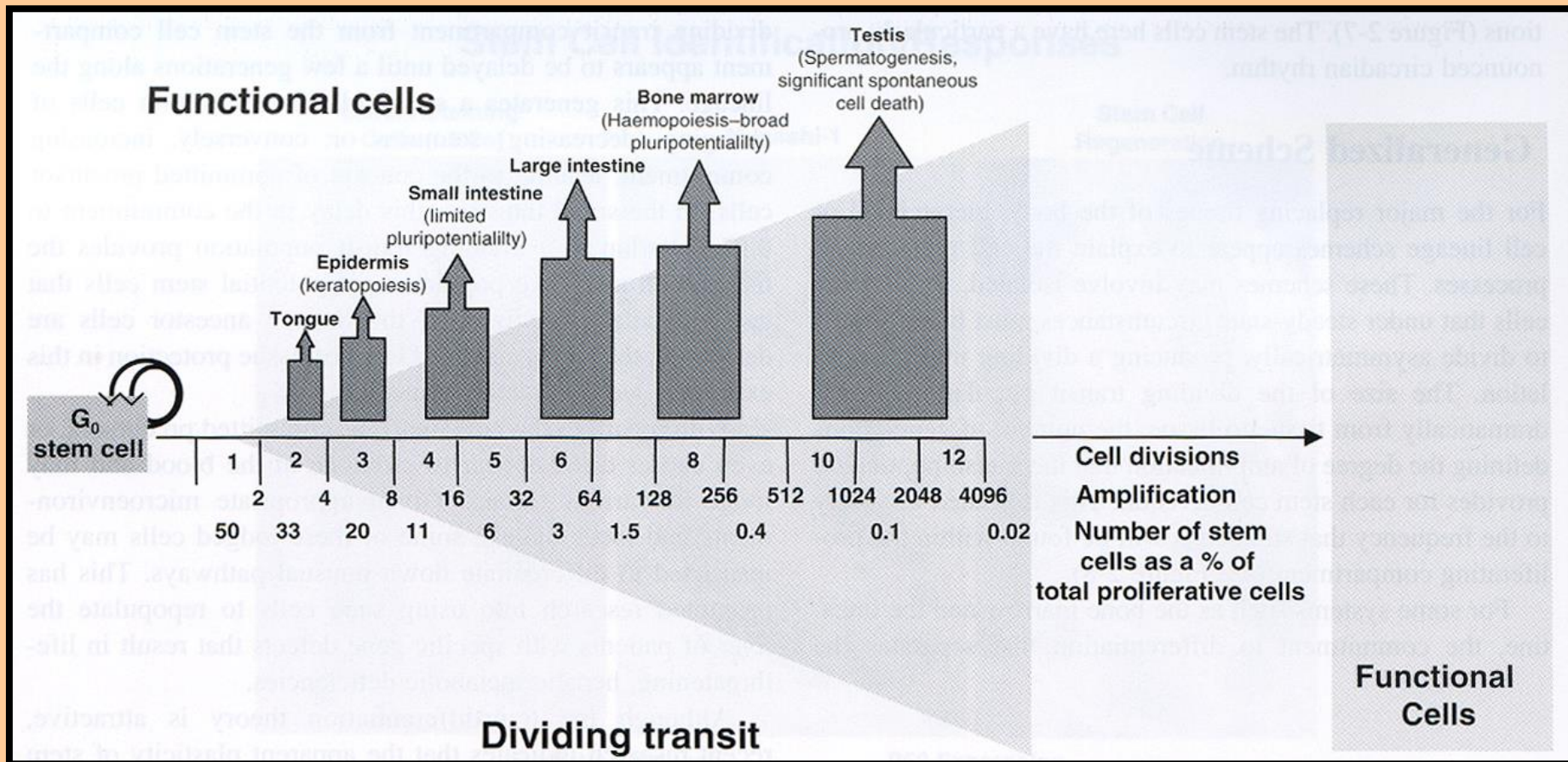
**potenciální
kmenové buňky**

**přechodně se dělicí
progenitory**

**funkční
terminálně
diferencované buňky**

přechodně se dělicí buňky – TA (transiently amplifying)

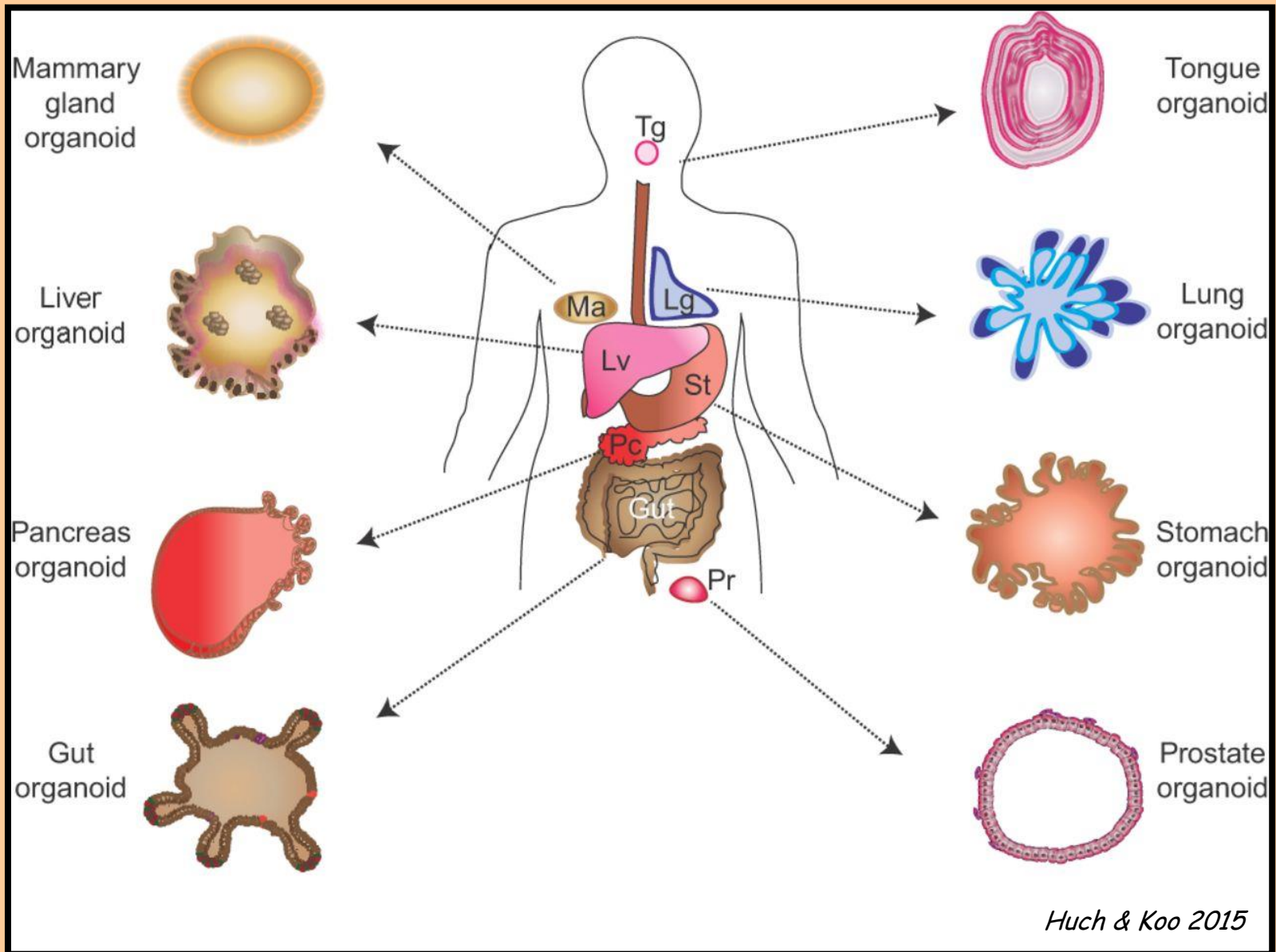
Odhad generačních cyklů od kmenové buňky po funkční / terminálně diferencovanou buňku pro různé typy tkání u myši



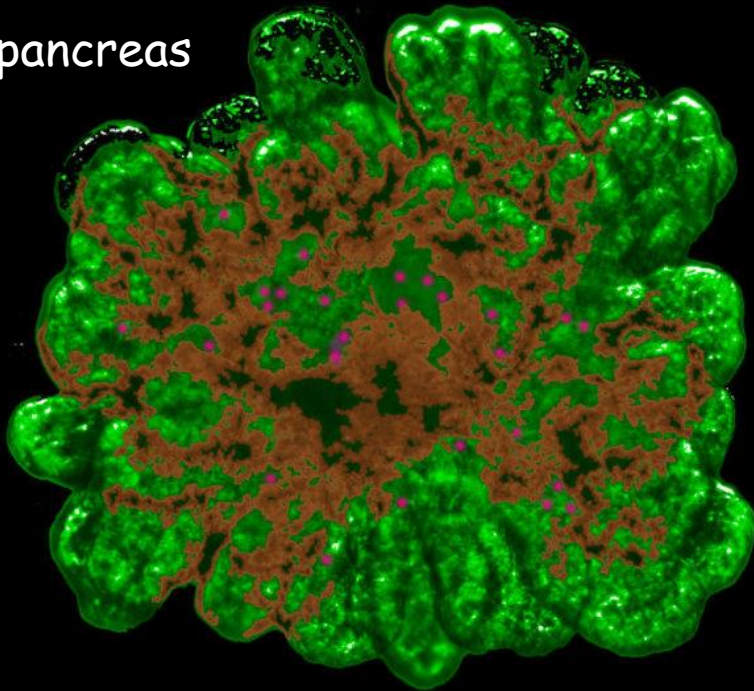
NICHE a jak být profesionální kmenovou buňkou

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. 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).

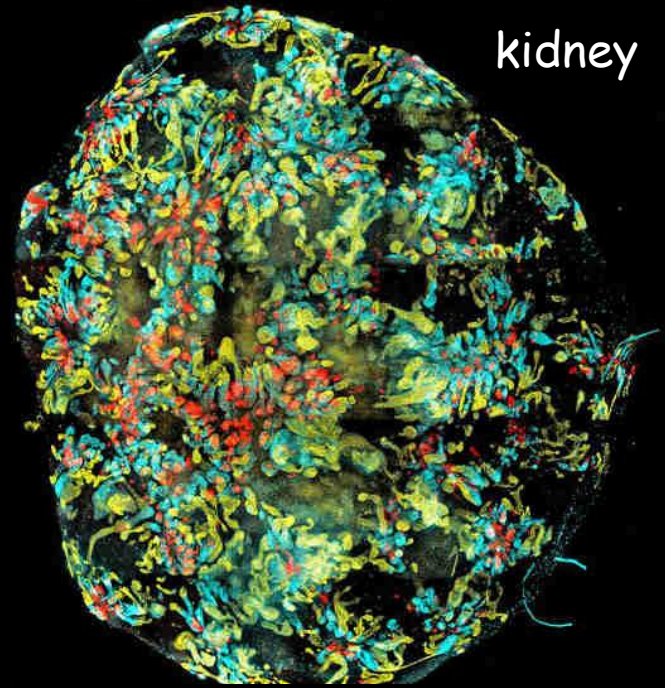
V současné době problém „niche“ pro kultivaci kmenových buněk *in vitro* úspěšně řeší kultivace ve formě tzv. organoidů



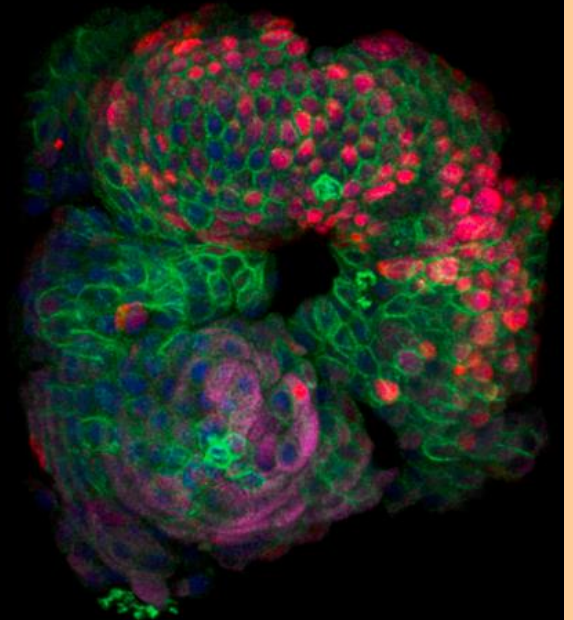
pancreas



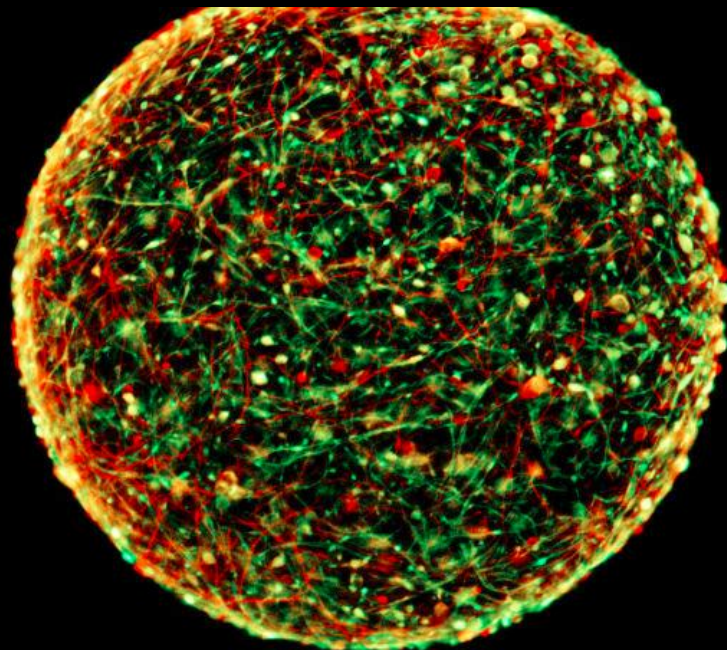
kidney



liver



brain



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 - vývojově specifické geny (viz předchozí přednášky).

=> Vývojově specifické geny a regulace (signální dráhy/epigenetika) = STEMNESS

- 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 intenzivně proliferujícími, na rozdíl od somatickým kmenovým buňkám v tkáních dospělého jedince.
- Z „extrinsic“ faktorů se předpokládá významná úloha drah TGF β 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, NF κ B,...=> klíčová je rovnováha
- Jsou obecně odolné k toxinům (MDR - multidrug resistance proteins, ATP pumpy), ale i k tvrdému záření (paprsky X, γ -záření).

Existují geny kmenovosti, tzv. „stemness geny“ ?

Vývojově specifické geny
=> potenciál buněk

+

Příslušné signální dráhy, specifický patern jejich aktivit
=> regulace diferenciacce, proliferace, sebeobnovy

Pro určení kmenové buňky je klíčová
funkce/potenciál nad fenotypem!

ADULTNÍ x EMBRYONÁLNÍ somatické kmenové buňky

Embryonální somatické kmenové buňky

- Během embryogeneze dávají vznik tkáním a orgánům
- Případná pluripotence nebyla dosud prokázána (NSC?!?)
- Lze je izolovat a množit *in vitro* (není vždy jasné jak dlouho)
- Pravděpodobně jsou schopné transdiferenciace (?)
- Tvoří solidní nádory (možná i teratomy?!?) po injekci do imunitně tolerantního organismu (všechny ??) - zdá se že ne!
- V časných stádiích vývoje intenzivně proliferují, tato proliferace s vývojem ustává, adultní/dospělé jsou „spíše“ quiescentní
- Ačkoliv jsou embryonální somatické kmenové buňky v mnoha ohledech podobné somatickým kmenovým buňkám z dospělého organismu (mnohé znaky, podmínky kultivace a izolace), je již jasné, že stejné nejsou.

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 v kulturách *in vitro* (C6 - gliom; IMR-32, JF - neuroblastom; a různých gastrointestinálních nádorových liniích)

Přes výše uvedené společné znaky SP buněk,

jsou tyto buňky tkáňově specifické

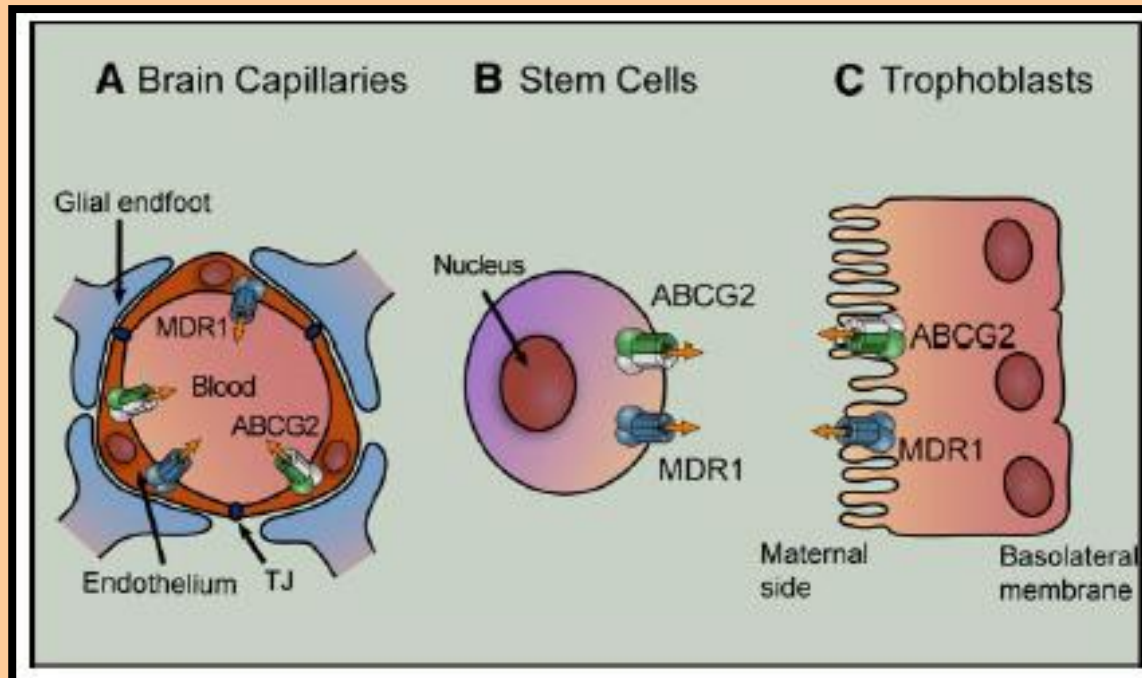
- SP svalů mají myogení ($Sca1^+/CD45^-$) a hematopoetický potenciál ($Sca1^+/CD45^+$)
- Hematopoetické SP jsou $Sca1^+/CD34^+$ nebo (?) $CD34^-$
- SP kůže jsou $Sca1^+/K14^+/K19^+$
- SP z mozku, ale i pankreatu (!) jsou $Sca1^+/nestin^+$
-

ABC transportéry – ABC transmembránové pumpy

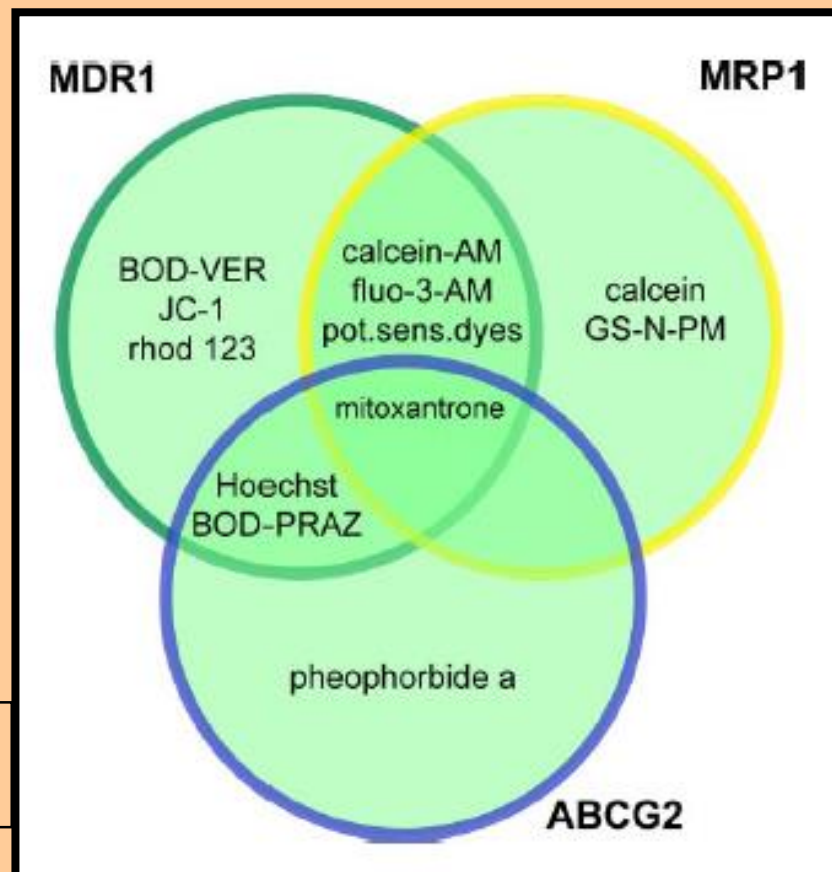
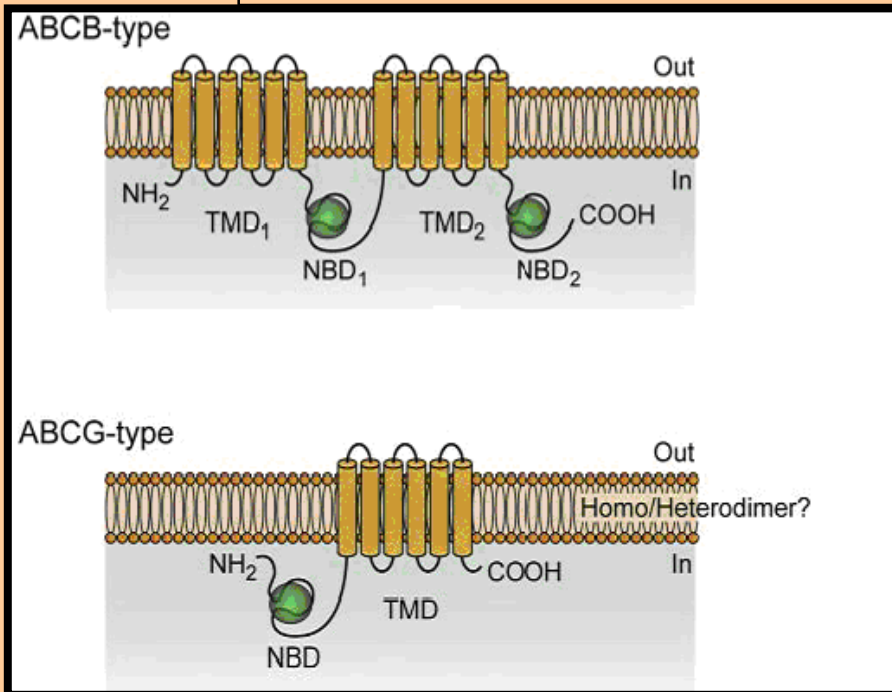
(transmembránové transportéry obsahující ATP vázající doménu)

(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 (**BCRP**)
- 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).**

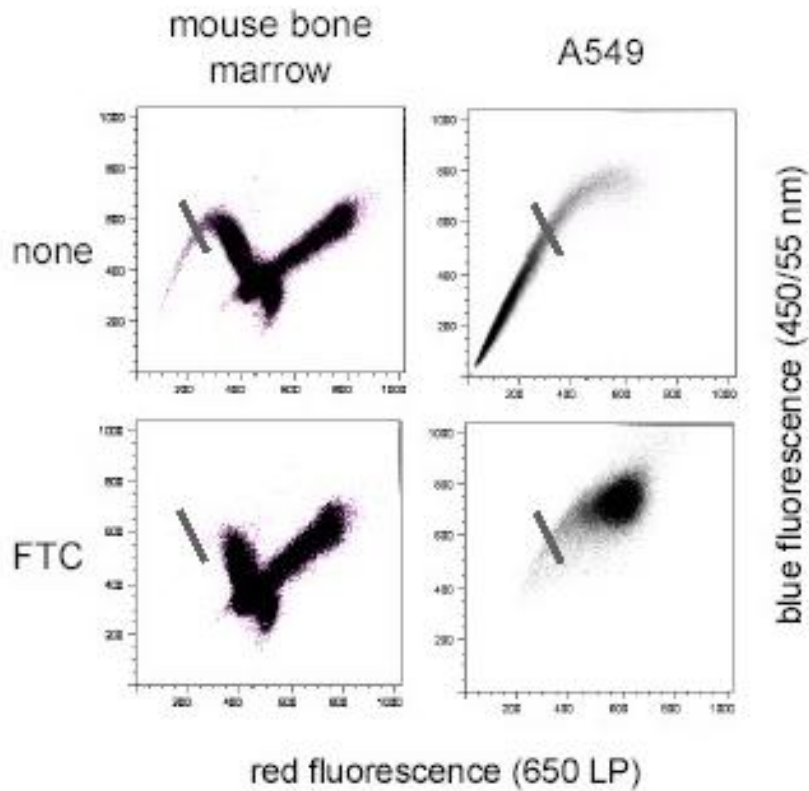


**Substrátová specifita
 některých ABC transportérů**

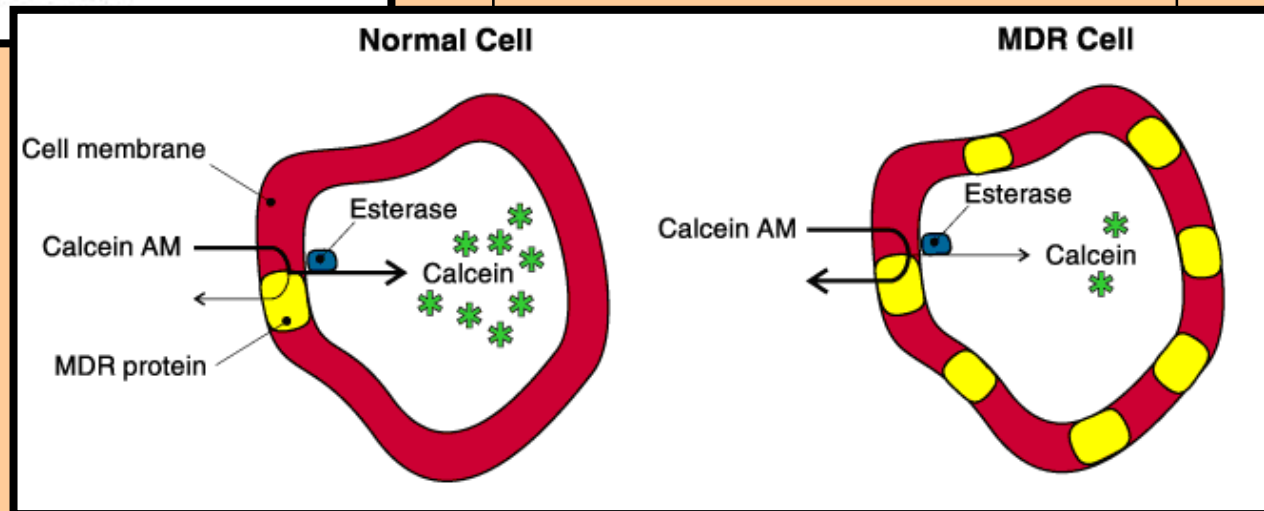
ABC transportéry vylučující chemoterapeutické sloučeniny

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



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

+

Velmi malé embryonální buňkám podobné kmenové buňky (very small embryonic-like stem cells - VSELSC)

- „Jejich existence je velice kontroverzní“
- propagátoři:
Catherine M. Verfaillie
+ M.Z. Ratajczak

- 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 myší ano (u myší 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

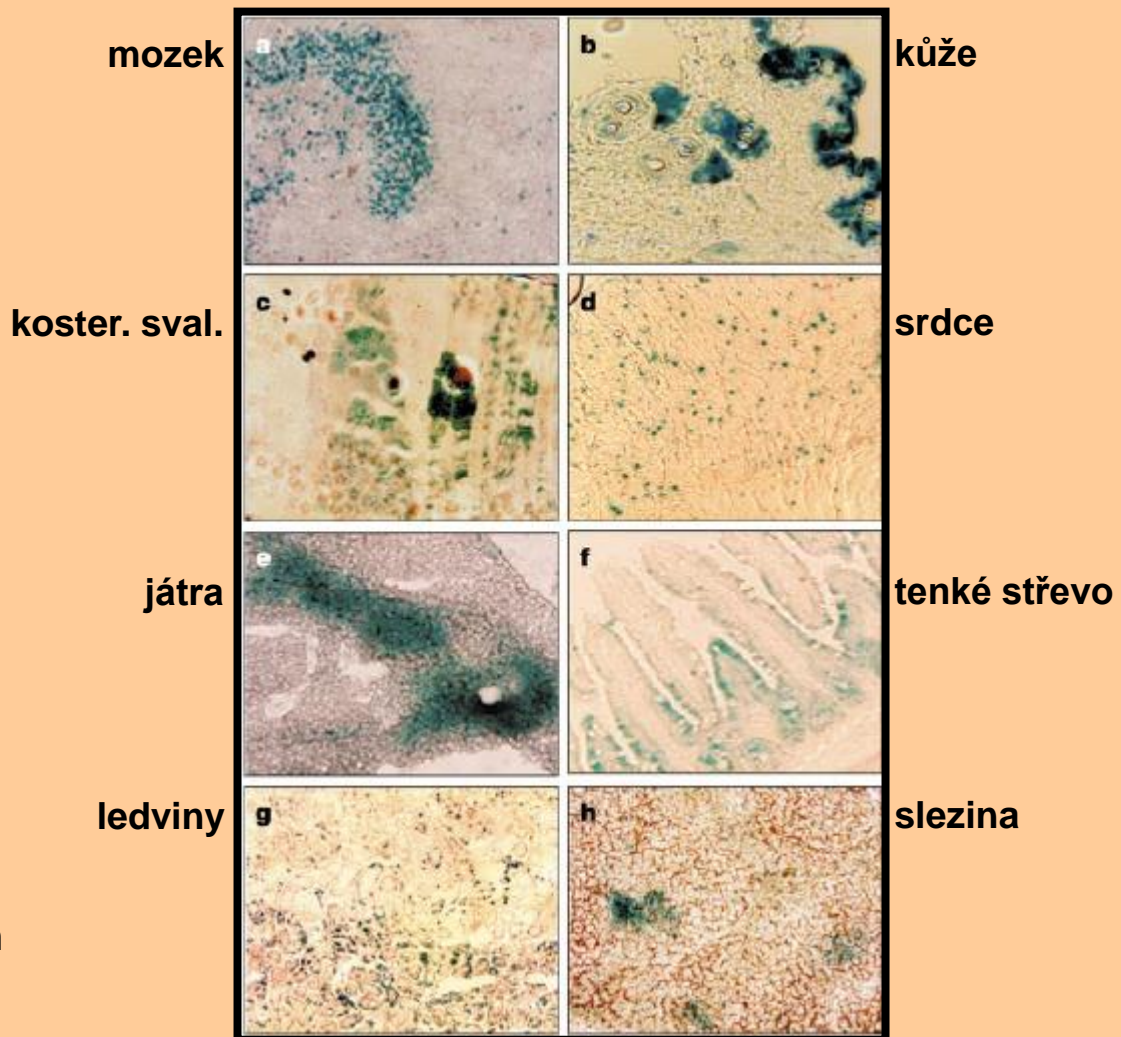
antigen	exprese	blízke SC
MHC-I	-	MSC +++
CD44 (H-CAM)	+/-	různé buňky
CD105 (endoglin)	-	MSC +++
CD34 (L-selectinR)	-	HSC +++
CD45 (tyr. fosfatáza)	-	HSC +++
cKit (CD117, SCFR)	-	HSC +++
Thy1 (CD90/CDw90)	+	HSC +++
AC133_h / Sca1*_m	+	HSC +++
SSEA1	+ _m	mES +++
Oct4	+ _m	m+hES +++
Rex1	+ _m	mES +++

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)

SSC „mezodermálního“ původu

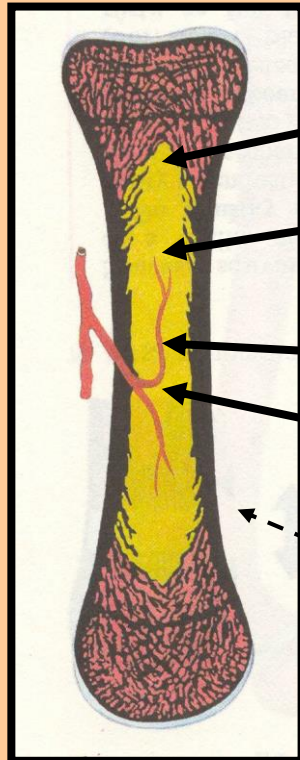
**Mezenchymální kmenové buňky
(MSCs - mesenchymal stem cells)**

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

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

krevní elementy, +

**Zdrojem adultních SSC mezodermálního původu je zejména kostní dřeň
dále pak další mezoderm. tkáně (chrupavka, tuková t. svalová t.,...)**



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

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

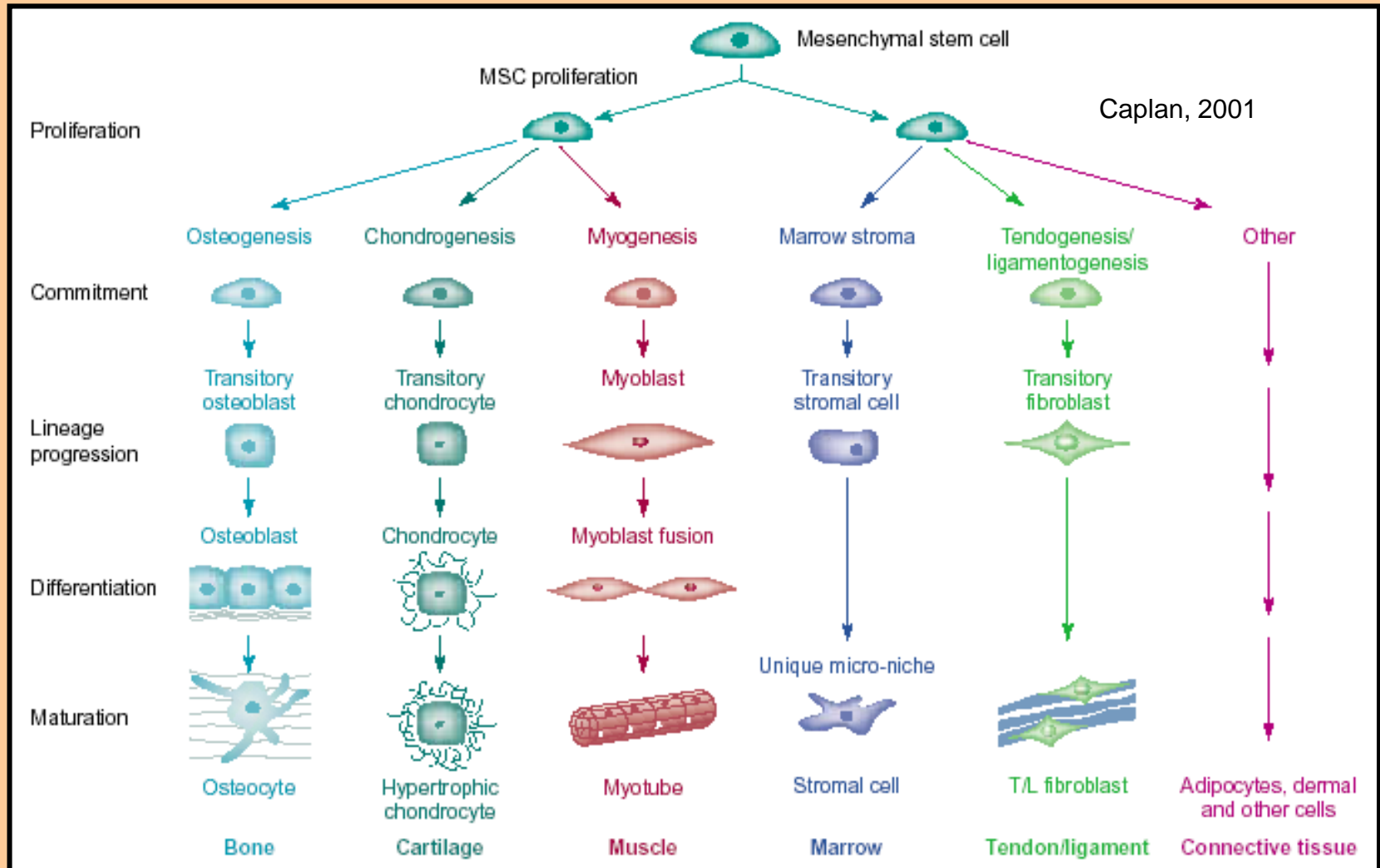
MAPCs / VSELSC (??? pluripotent ???)

Endoteliální kmenové buňky

Něco dalšího ?

Mezenchymální kmenové buňky – MSCs (mesenchymal stem cells)

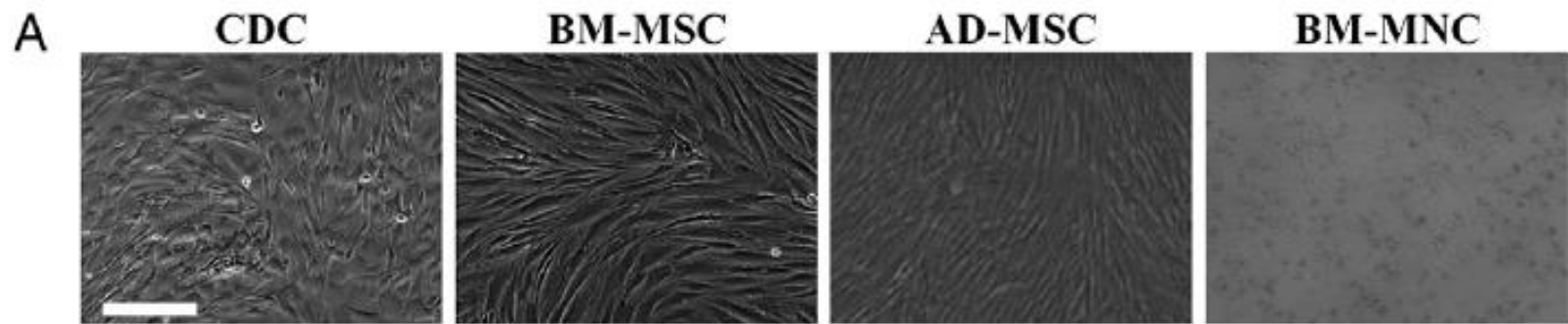
Kmenové buňky kostní dřeně – **BMSSCs** (bone marrow stroma stem cells)
 Kmenové buňky svalové tkáně, chrupavky, kosti,



- 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 dostatečně věrohodně potvrzena (neuro, kardio,...).

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)
- potenciál: osteoblasty, chondrocyty, mesenchymální, fibroblasty, myocyty (srděční? Ne!)
 - indukce *in vitro* kokultivací s cílovou tkání, kultivace v tkáňově specifických médiích
- fibroblastům podobné buňky (a) větší, 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 diferenciací 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.)
- velká schopnost fúzovat mezi sebou i s ostatními buňkami -> falešné výsledky
 - vznik heterokaryonu, ale i polyploidie, vznik heterokaryonu prokázán po transplantaci i *in vivo*.



B

Markers <i>Cell Types</i>	CD29	CD31	CD34	CD45	CD90	CD105	CD117 (c-kit)	CD133
<i>CDC</i>	99.98%	0.62%	1.00%	0.45%	18.40%	99.89%	7.04%	0.99%
<i>BM-MSC</i>	99.95%	0.74%	1.23%	0.54%	99.0%	99.37%	5.60%	1.24%
<i>AD-MSC</i>	99.63%	0.54%	0.11%	0.15%	84.79%	99.68%	10.44%	2.17%
<i>BM-MNC</i>	94.54%	19.88%	3.76%	74.72%	4.21%	24.54%	3.73%	2.17%

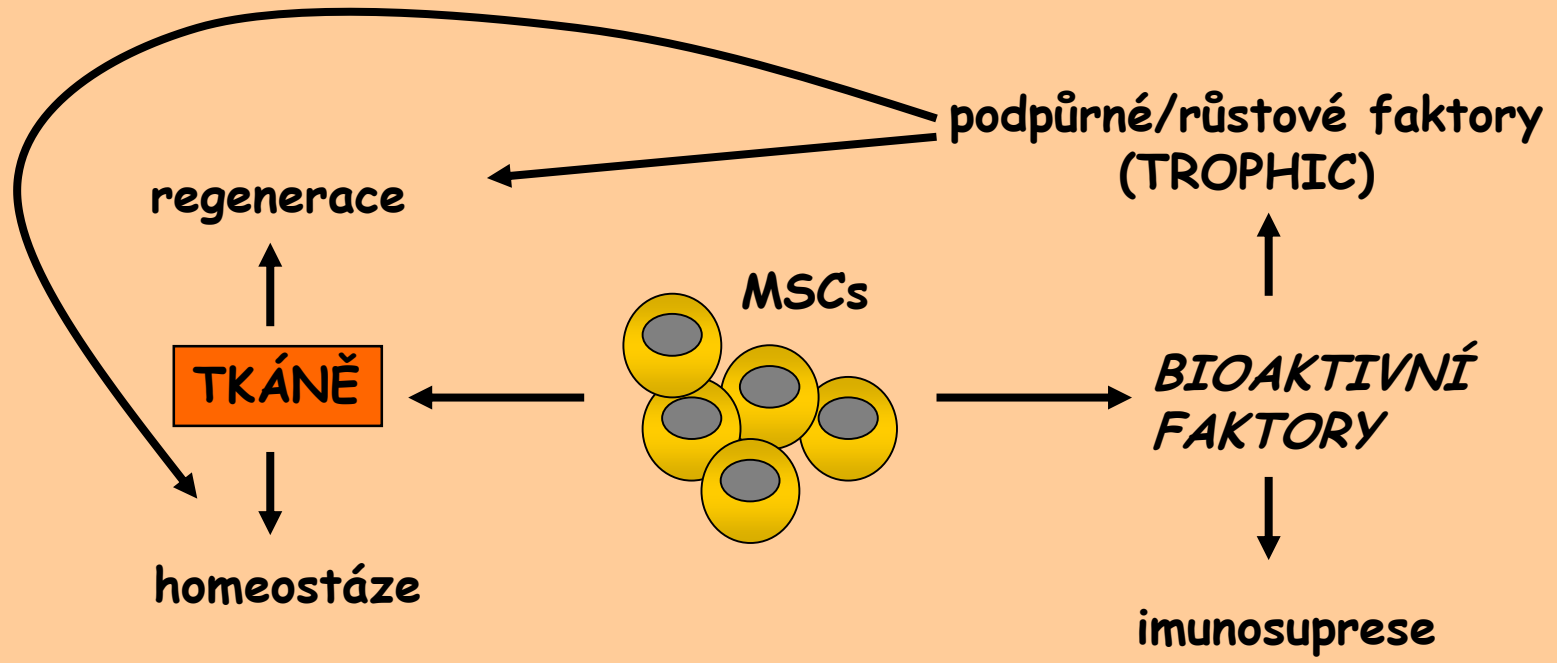
Figure 1 Morphology and Phenotype Characterization

(A) Representative images of cardiosphere-derived cells (CDCs), bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs), adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs), and bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs) after 3 days in culture under 20% O₂. CDCs, BM-MSCs, and AD-MSCs demonstrated adherent growth and stromal (mesenchymal) cell-like morphology; BM-MNCs have smaller size and round shape. (B) Expression profile of CD29, CD31, CD34, CD45, CD90, CD117 (c-kit), and CD133 in CDCs, BM-MSCs, AD-MSCs, and BM-MNCs. Bar = 50 μm.

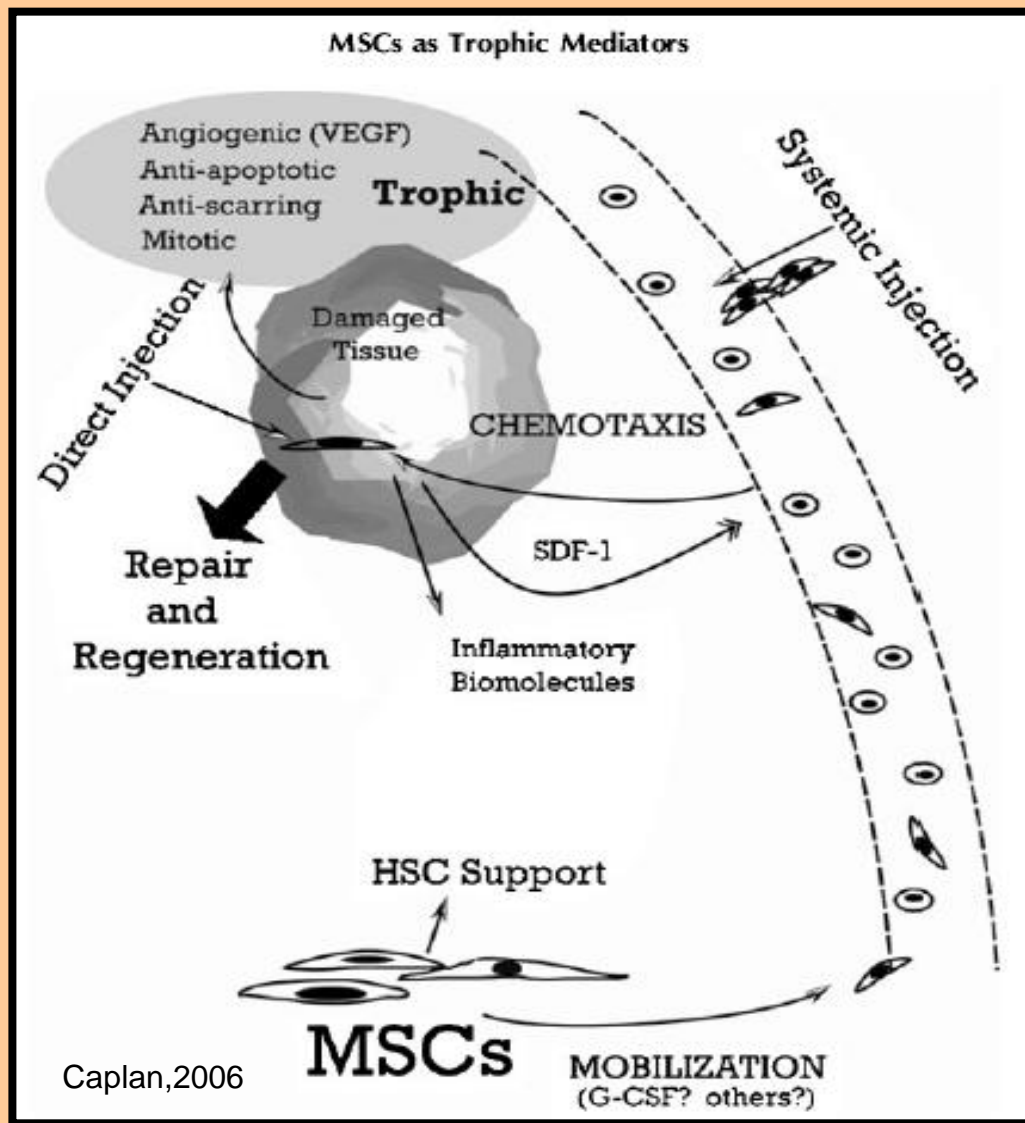
Li T.-S. et al., 2012

CD29 – Integrin b1; CD31 – PECAM1; CD34 – mucisialin, receptor, adhesion (hematopoietic progenitor); CD45 – tyrosin phosphatase (leukocyte); CD90 – Thy1 (thymocyte); CD105 – Endoglin, ligand TGFβ, adhesion; CD117 – receptor for SCF/c-kitL; CD133 – prominin (progenitor)

Mechanismus zapojení MSCs v regulaci homeostáze



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

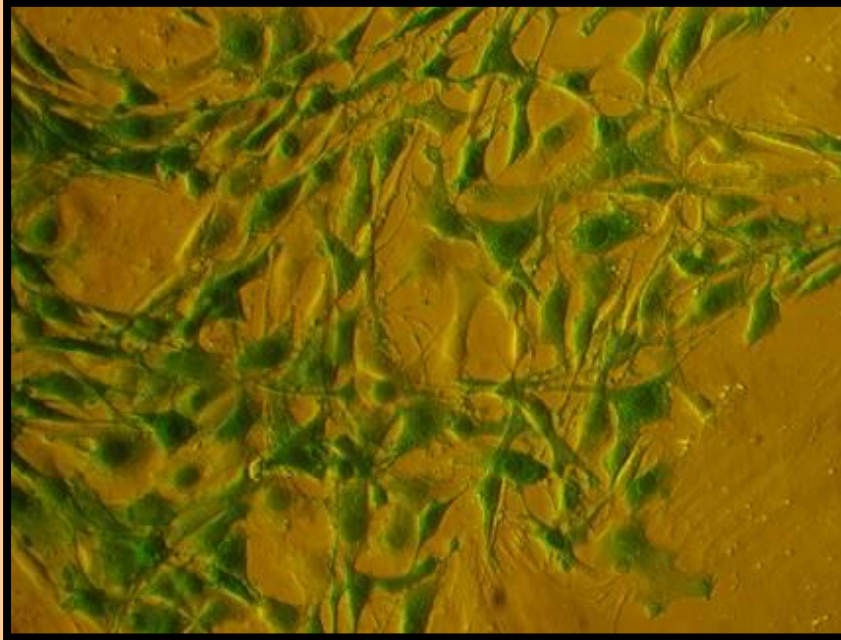


MSCs se aplikují v případech

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

Další zajímavé aplikace

- potlačení reakce štěpu proti hostiteli
- Potlačení imunitní reakce při transplantacích obecně



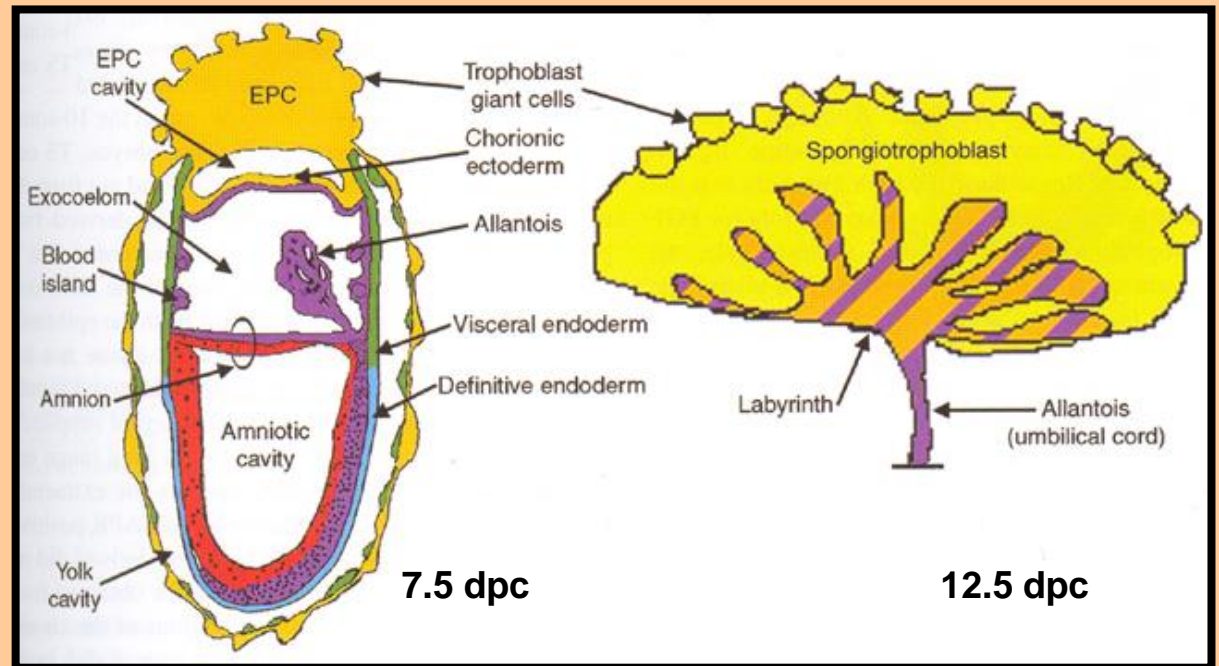
Stromální buňky kostní dřeně
potkana

V současné době nejsou plně objasněny vztahy/hierarchie mezi **MSCs - MAPCs - BMSSCs - (+ některé SP)** a případně dalšími somatickými kmenovými buňkami, stejně jako rozdílnost MSCs z různých tkání. 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.

Kmenové buňky v pupečnickové krvi (v allantois)

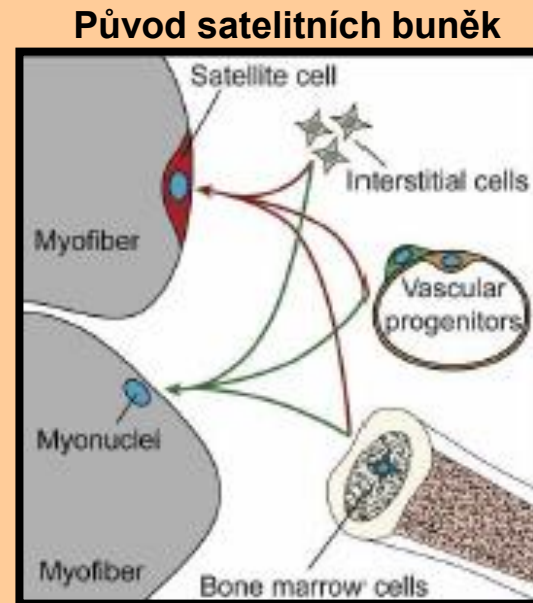
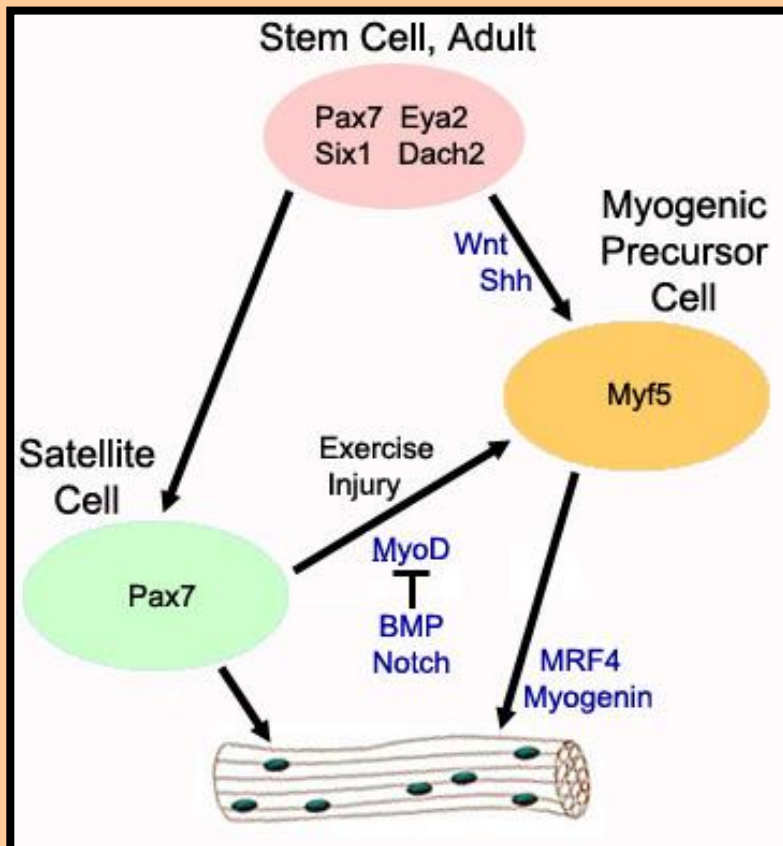
Pupečnicková krev obsahuje hematopoetické progenitory existující, jako pozůstatek extraembryonálních krevních ostrůvků a endotelie. Díky tomu, jsou tyto buňky geneticky shodné a fenotypově velice blízké vlastním krevním buňkám embrya a je možné je tak snadno použít jako transplantační štěp pro z tohoto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

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



Svalové SC - kmenové buňky kosterní svaloviny = MuSC, satelitní buňky

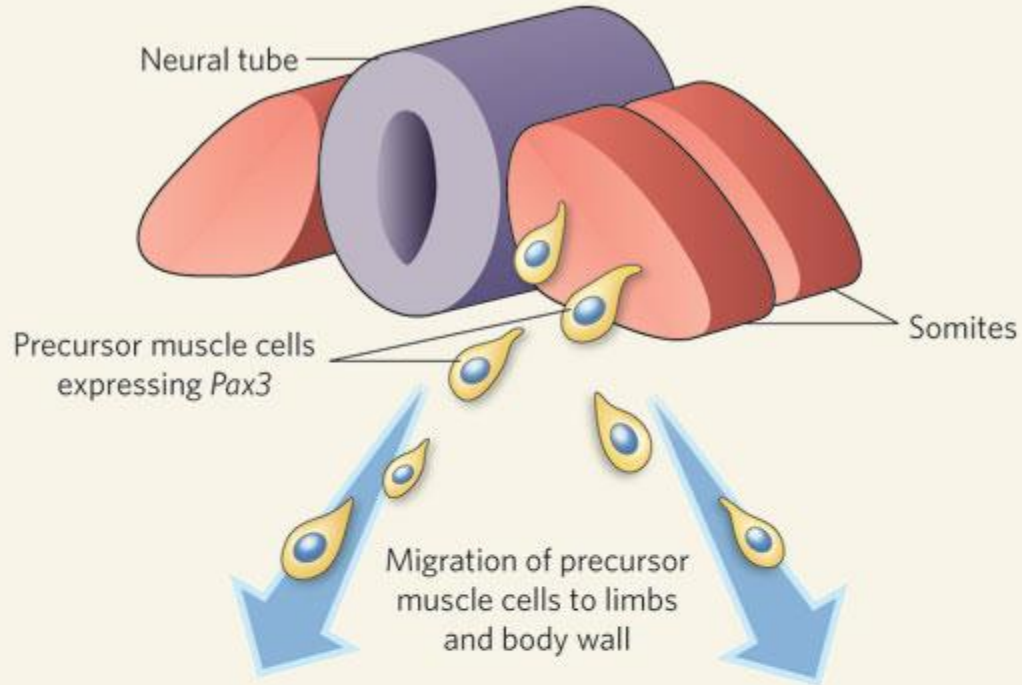
- v embryogenezi *somity* → *myotom* → myocyt → svalové vlákno
- v dospělosti MuSC → satelitní buňky → myocyt → svalové vlákno
(kostní dřeň) (povrch svalového vlákna)
- (MuSC nejsou dosud přesně definované, náleží snad k užšímu výběru MSC?)
- *in vivo* je sval regenerován satelitními buňkami, majícími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



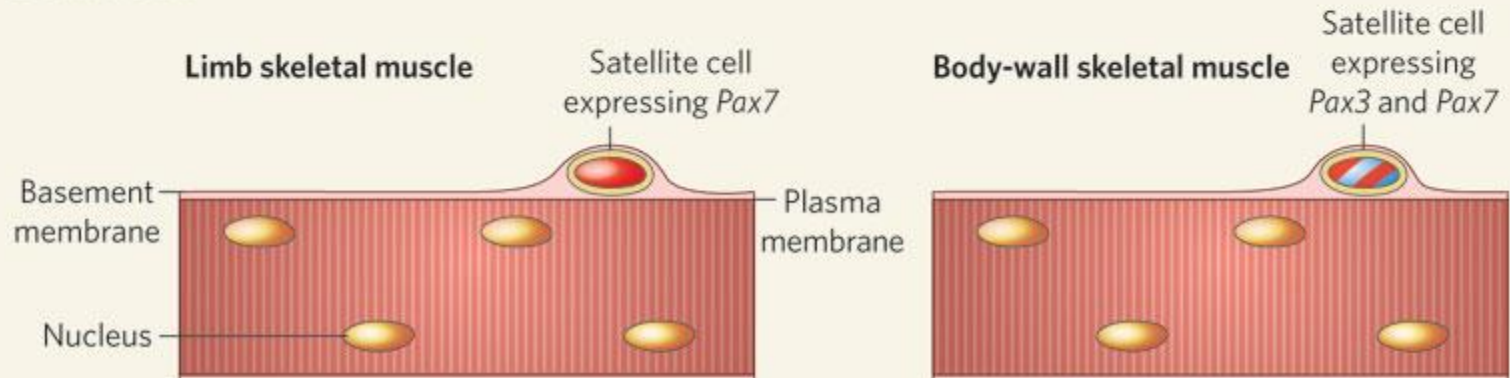
Dále byly izolovány z adultního kosterního svalu buňky CD34+/Sca1+ jako kmenové buňky odvozené ze svalu (**MDSC** – muscle derived stem cells)

Původ MuSC/satelitních buněk

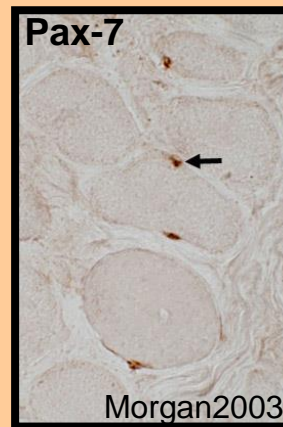
a Before birth



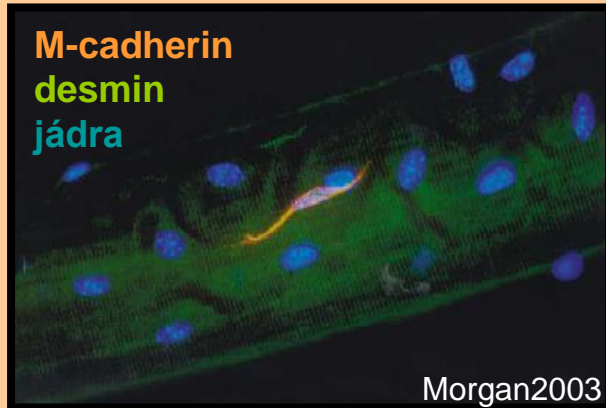
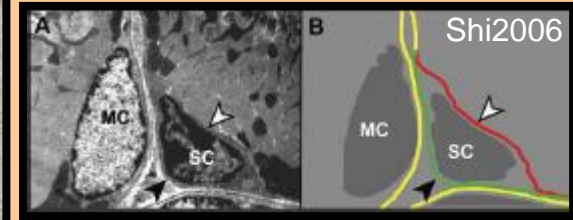
b After birth



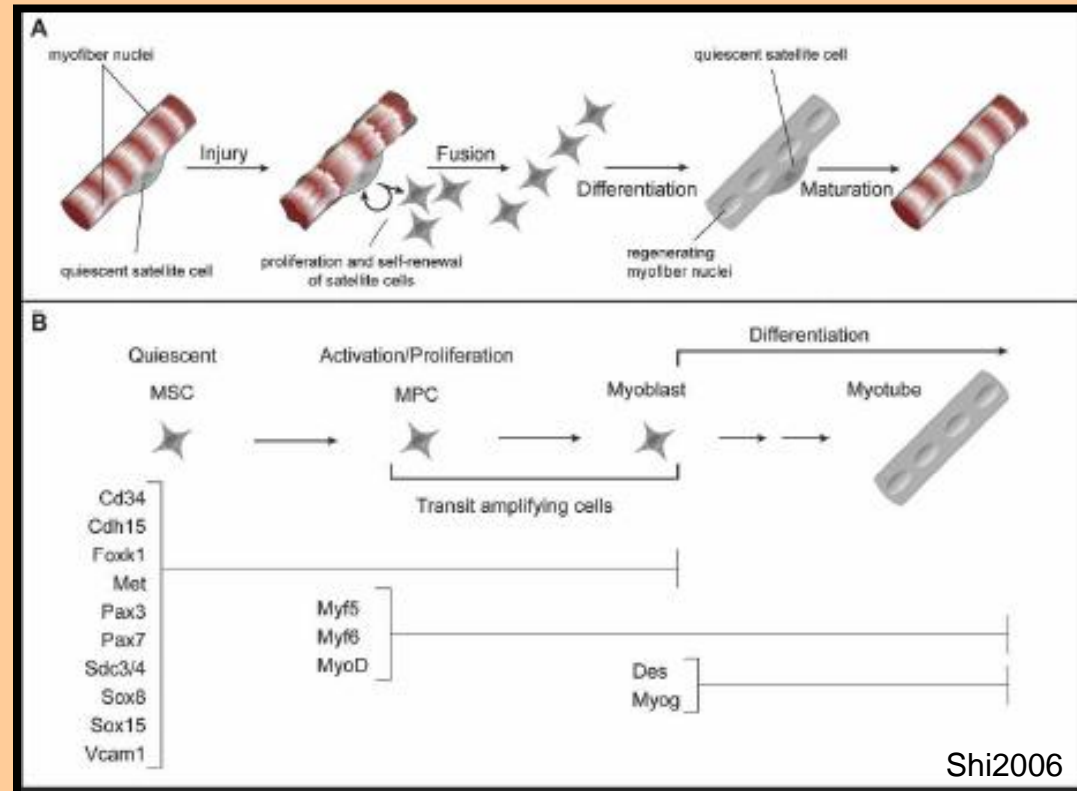
Satelitní buňky kosterní svaloviny a jejich úloha v regeneraci svalu



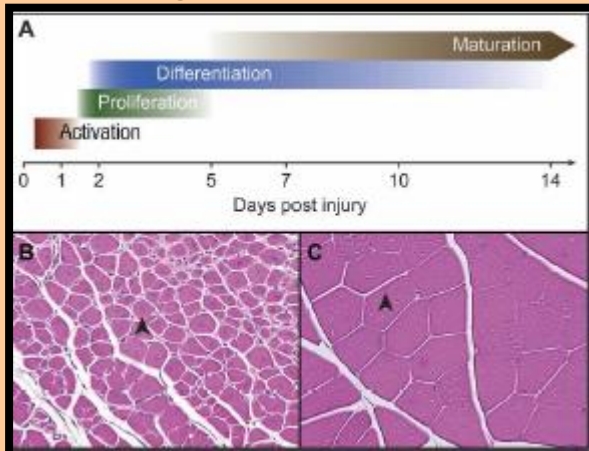
sarkolema □
bazální membrána ■



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

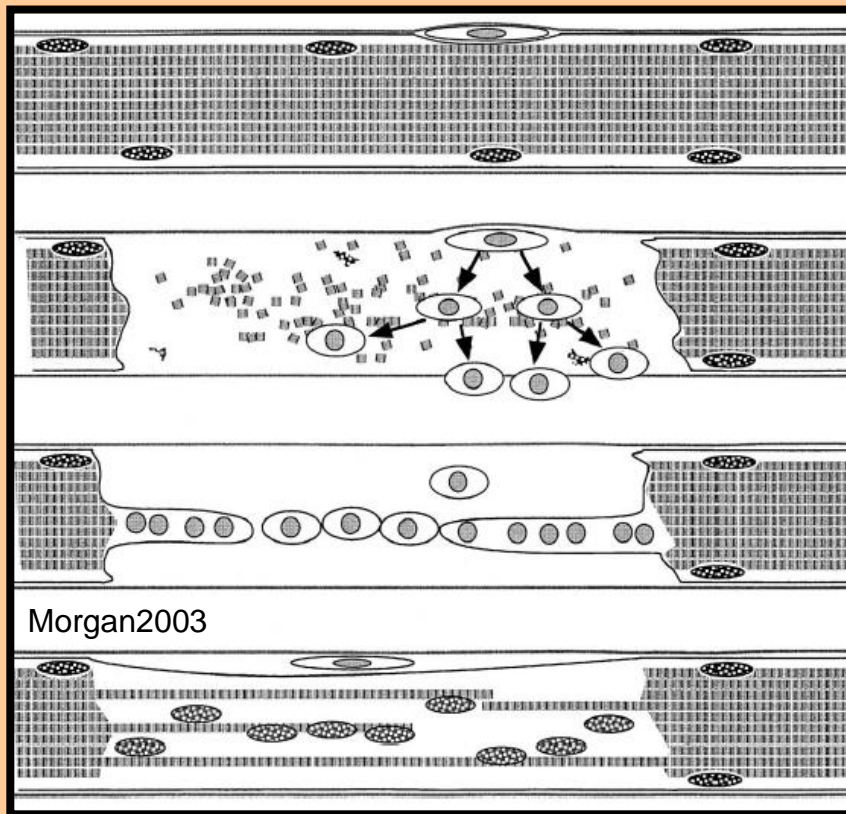


Dynamika regenerace kosterního svalu



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 myogenních buněk



Mechanismus regenerace svalového vlákna satelitními buňkami.

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

← Fúze satelitních buněk

← Regenerace svalového vlákna

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, podpůrné buňky), 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 a jsou přítomny v kostní dřeni.**
- **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.**

Expande endotelu

Bone Marrow

Impaired EPC mobilisation/generation

↓ Pro-angiogenic factors
↓ Oestrogen
↓ NO bioavailability



Circulating EPCs



Impaired EPC migration and homing to sites of vascular injury

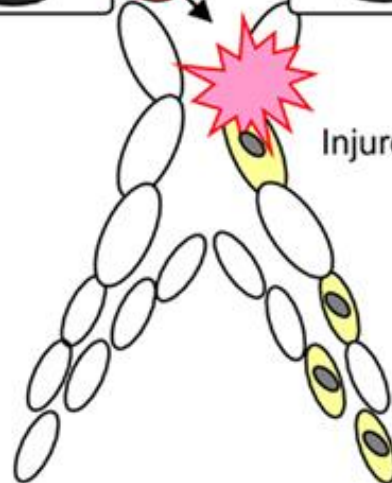
↓ Pro-angiogenic factors
↓ Altered HSPG structure

Impaired function

↑ EPC Senescence
↓ Antioxidant capacity

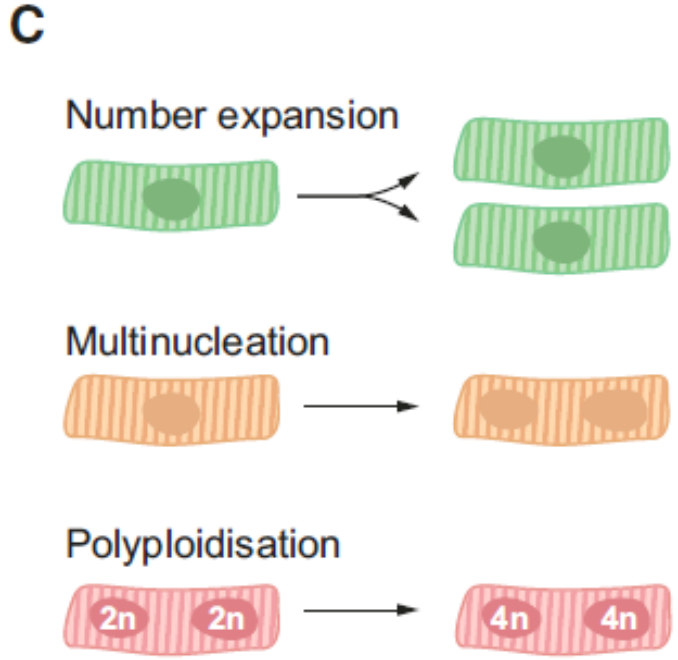
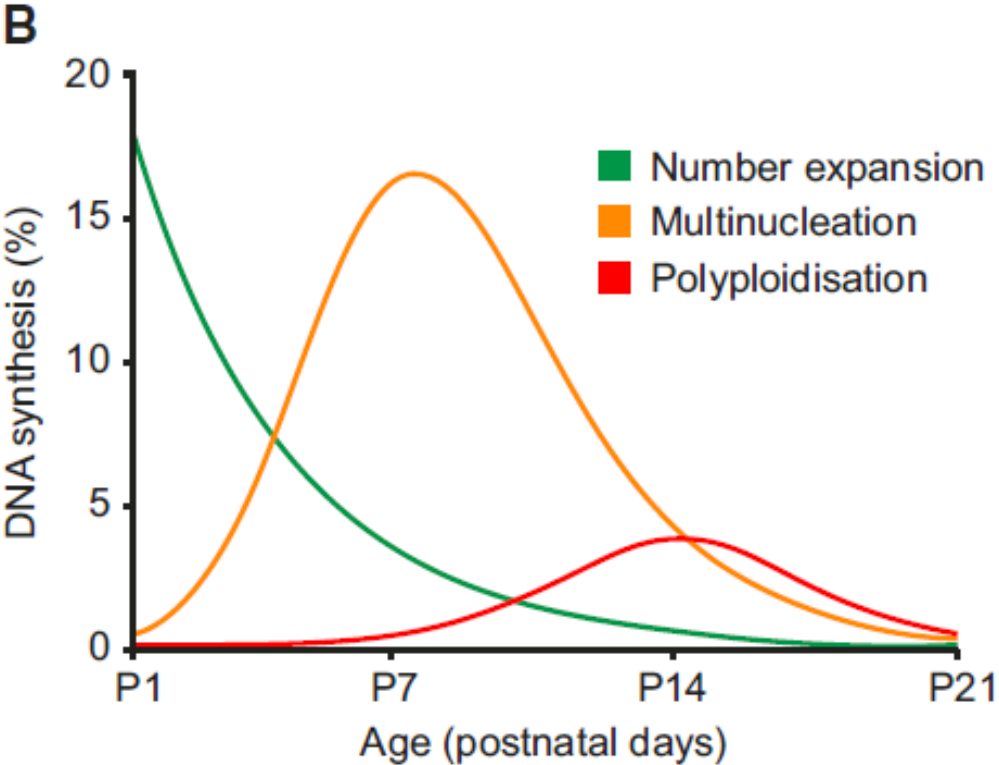
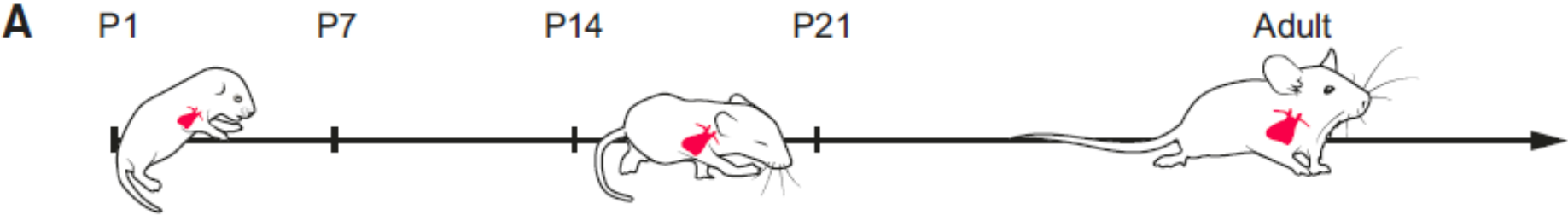
↑ Oxidative Stress
↑ Inflammation
↑ Ang II
↑ ox-LDL
↑ Telomere shortening

Injured endothelium



Srdce, srdeční sval a jeho regenerace

Proliferace kardiomyocytů



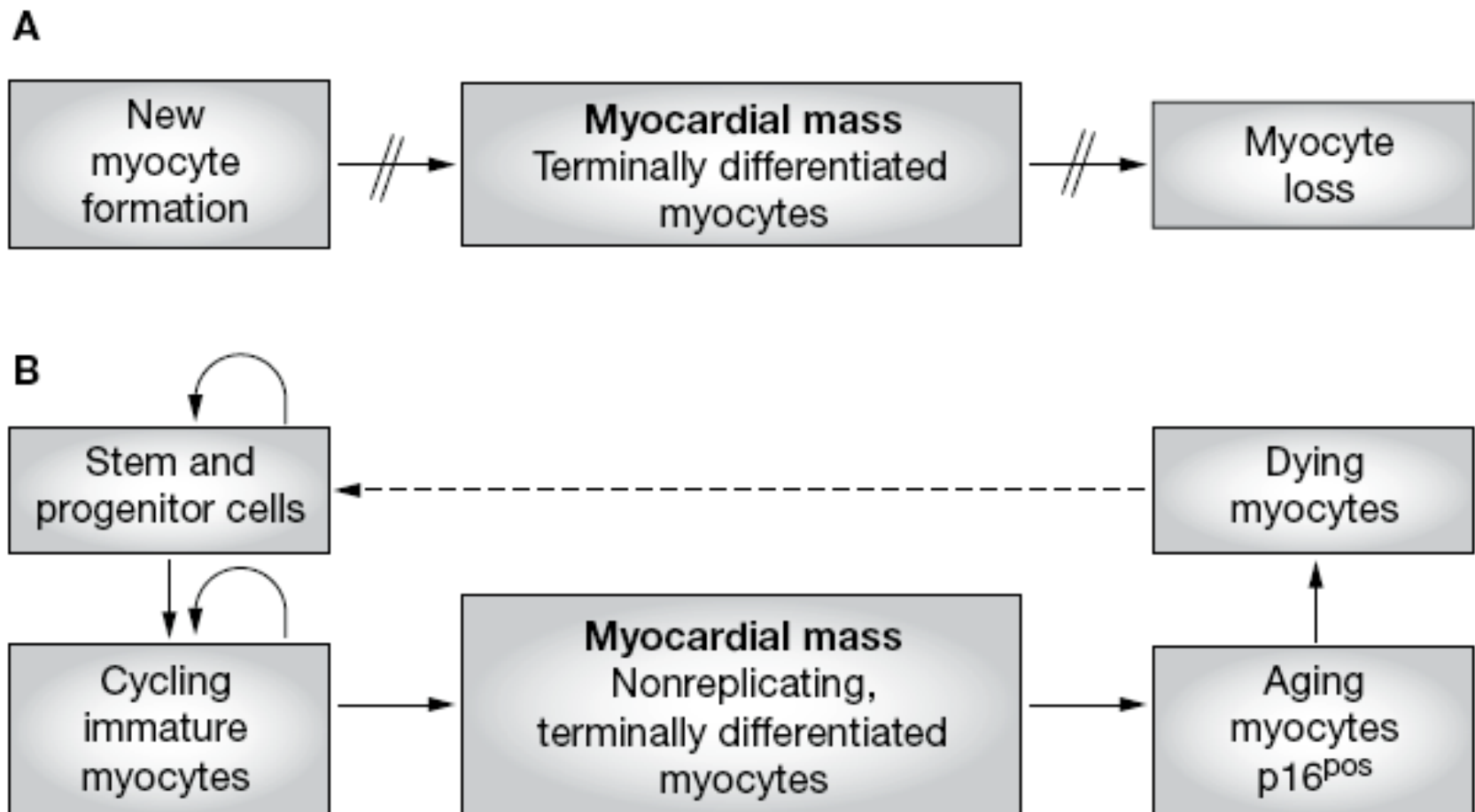


Figure 1 Two views of myocardial cell homeostasis. **(A)** Prevalent view of cardiac cellular homeostasis, where renewal and cardiac stem and progenitor cells (CSCs) are ignored. **(B)** New view of the myocardium, incorporating the existence and role of the CSCs.

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 dělení pre-kardiomyocytů zastaví v průběhu embryogeneze, 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 díky zbytkovým progenitorům kardiomyocytů schopným Proliferovat v odpověď na poškození (v současnosti ale nejasné = nebylo prokázáno!).

Je také poukazováno na 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.

Tyto podpůrné buňky jsou pravděpodobně SP a c-kit+ buňky kostní dřně (MSCs?)¹⁾, i po injekci, se přednostně usazují např. v místě ohraničujícím infarkt²⁾. Mechanismus regenerace srdečního svalu není však spojen přímo s diferenciací těchto zde se akumulujících buněk, ale je vyvolaný 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..

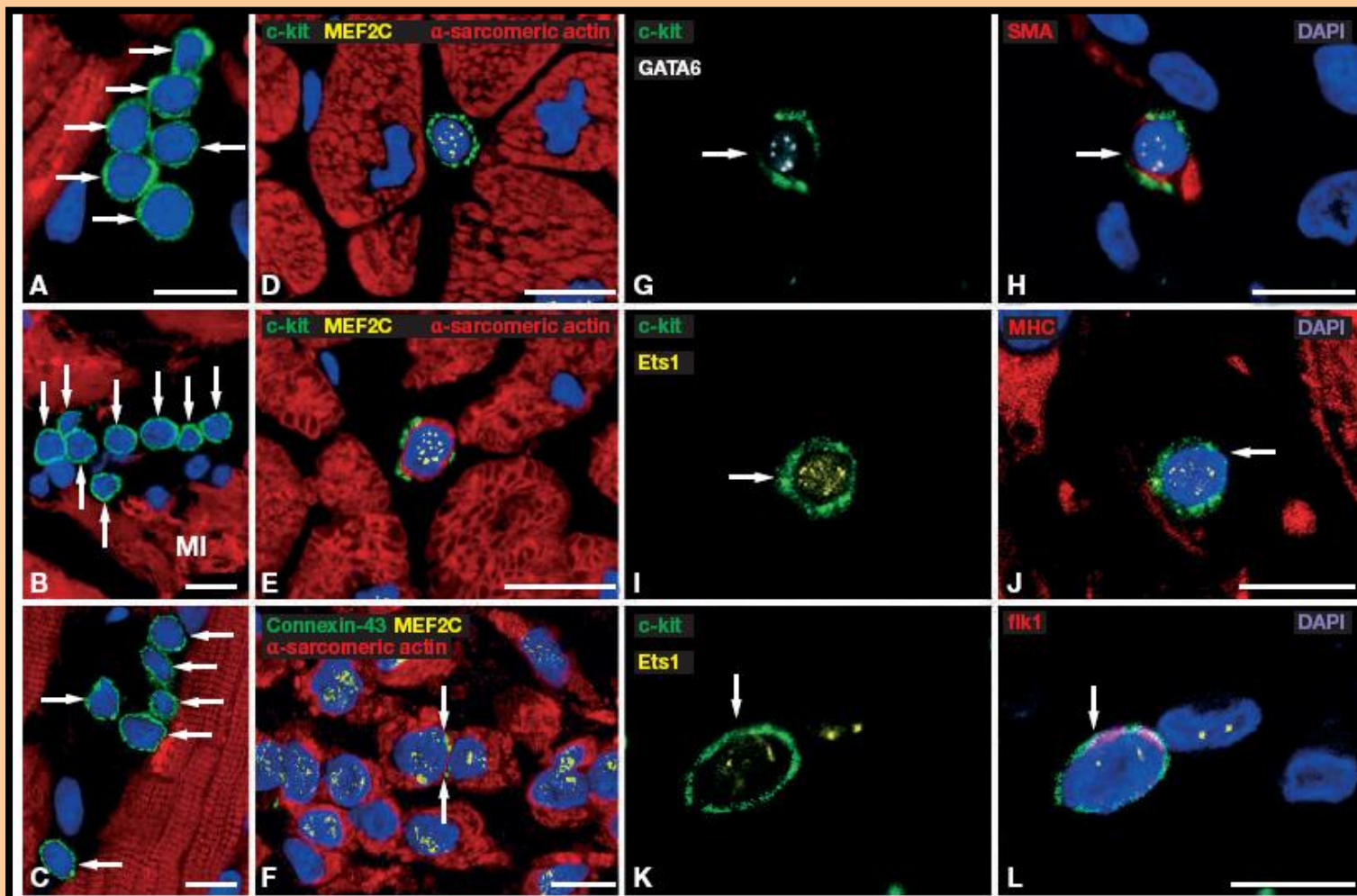


Figure 2 Human cardiac stem cells and their process of *in situ* lineage commitment. (A–C) Three clusters of *c-kit*⁺ cardiac stem cells (CSCs; green, arrows), located in proximity to acute infarcts, are shown. The infarcted myocardium (MI) is apparent in (B). Myocytes are labeled by α -sarcomeric actin (red) and nuclei by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). (D) Committed human CSC (hCSC) expressing *c-kit* (green) and the myocyte transcription factor MEF2C (yellow dots), representing myocyte progenitors. (E) Committed hCSC expressing *c-kit* (green), MEF2C (yellow dots) and cytoplasmic α -sarcomeric actin (red), representing myocyte precursors. (F) Small developing myocytes (α -sarcomeric actin, red) express MEF2C (yellow dots) and have lost the stem cell surface antigen. Connexin 43 is detected between some of these maturing cells (green, arrows) as an expression of their electrical coupling. (G,H) A single smooth-muscle-cell precursor positive for *c-kit* (green), the transcription factor GATA-6 in nuclei (white dots), and α -smooth muscle actin (red in H) is shown. (I–L) An endothelial cell progenitor (I,J) and an endothelial cell precursor (K,L) are illustrated. Both cells express *c-kit* (green), *Ets1* (yellow), and *flk1* (magenta in L). (A–L) Scale bars, 10 μ m. Adapted from reference 18 © (1993–2005) The National Academy of Sciences of the United States of America.

Skutečně existují kardiomyogenní progenitory nebo CardSC?

(Torella, et al., 2006)

Table 1 The four types of resident cardiac stem and progenitor cells identified so far and their salient characteristics.

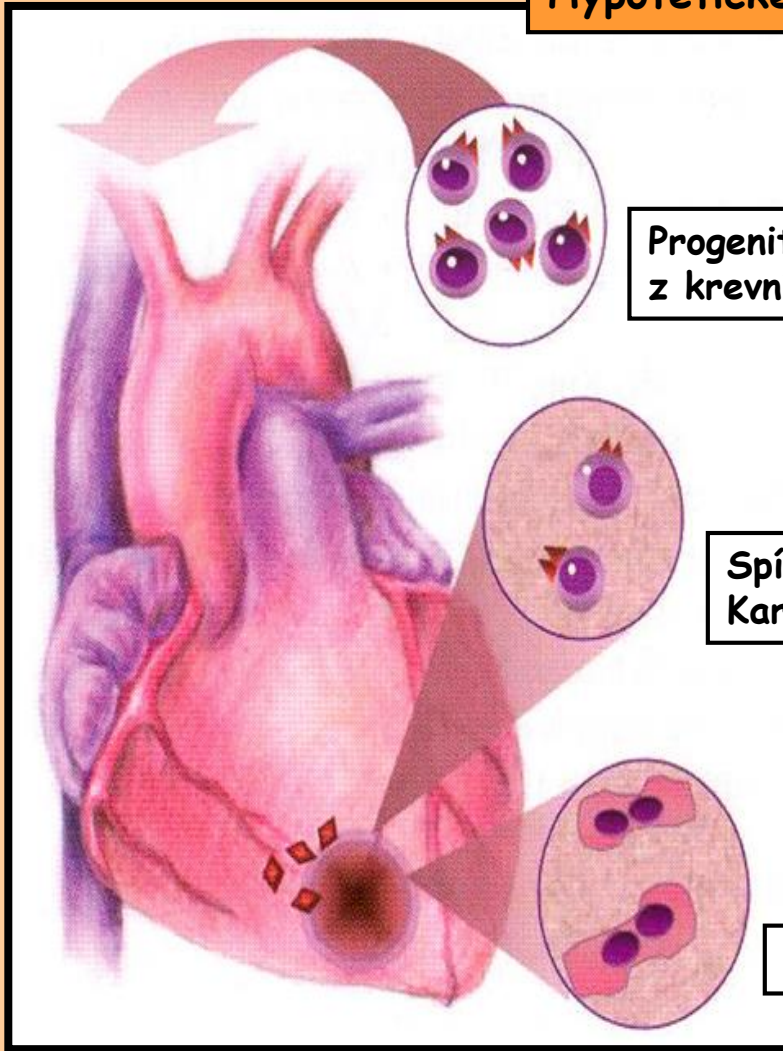
Characteristic	Type of cell			
	c-kit	Sca-1	MDR-1	Isl-1
Cardiac differentiation	Yes	Yes	Yes	Yes
Self-renewal	Yes	Yes	Yes	Yes
Clonogenic	Yes	Yes	Yes	Not known
Multipotent	Yes	Yes	Yes	Not known
Cardiosphere^a formation *	Yes	Yes	Yes	Not known
Present in adult/fetus	Both	Both	Both	Fetus to adult
References	13, 16 and unpublished	23, 24 and unpublished	25 and unpublished	11

^aPseudo-embryoid bodies (a marker of multipotency) when cells are grown in suspension.

*V současnosti se předpokládá, že jde jen o sfery tvořené MSC/fibroblasty.

CardSC - cardiomyogenic stem cell)

Hypotetické možnosti regenerace srdečního svalu



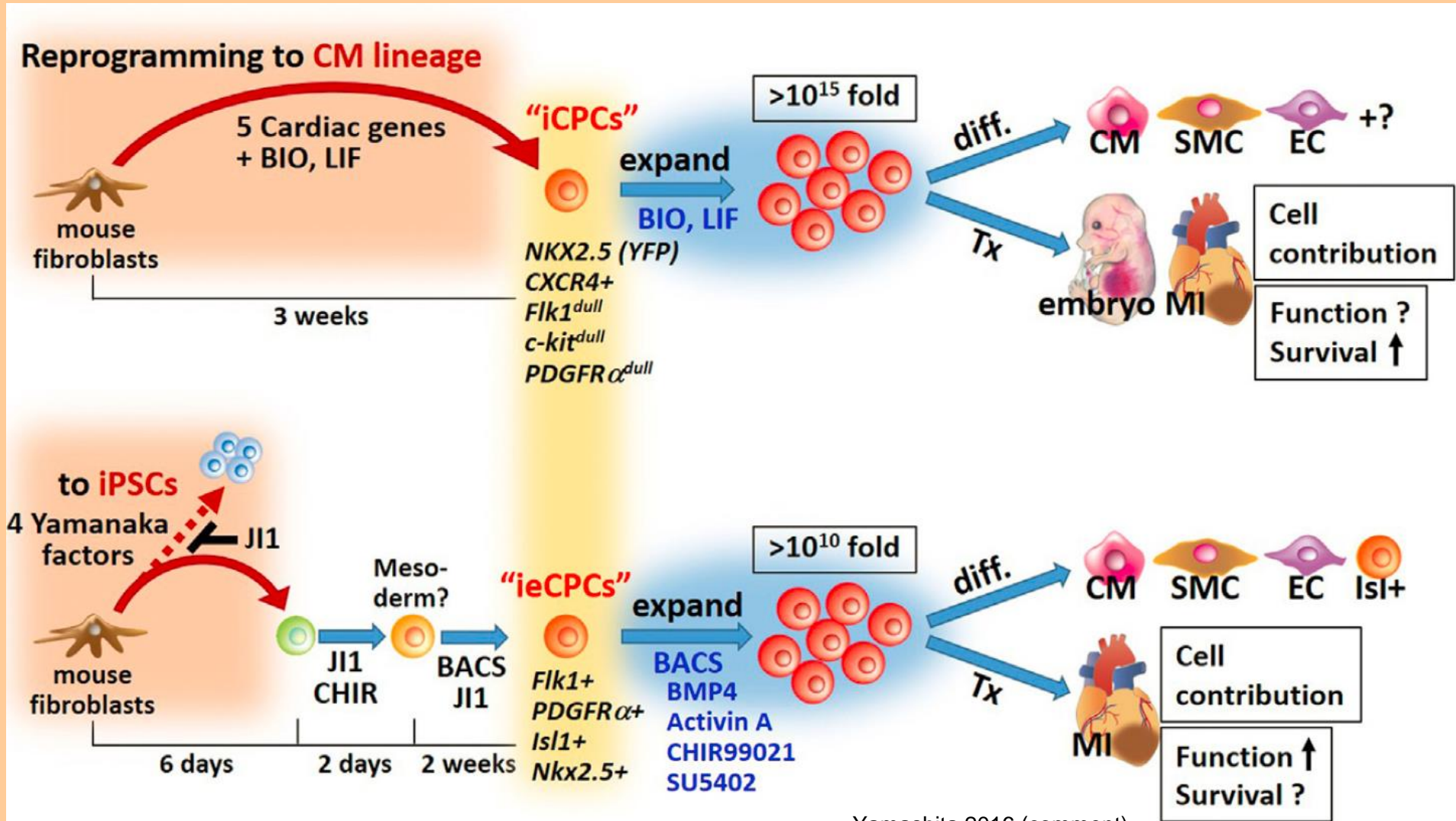
Progenitory „kmenové buňky“
z krevního oběhu (MSC ?) - jen podpora, ne regenerace!

Spící progenitory
Kardiomyocytů a CaSC - ne!

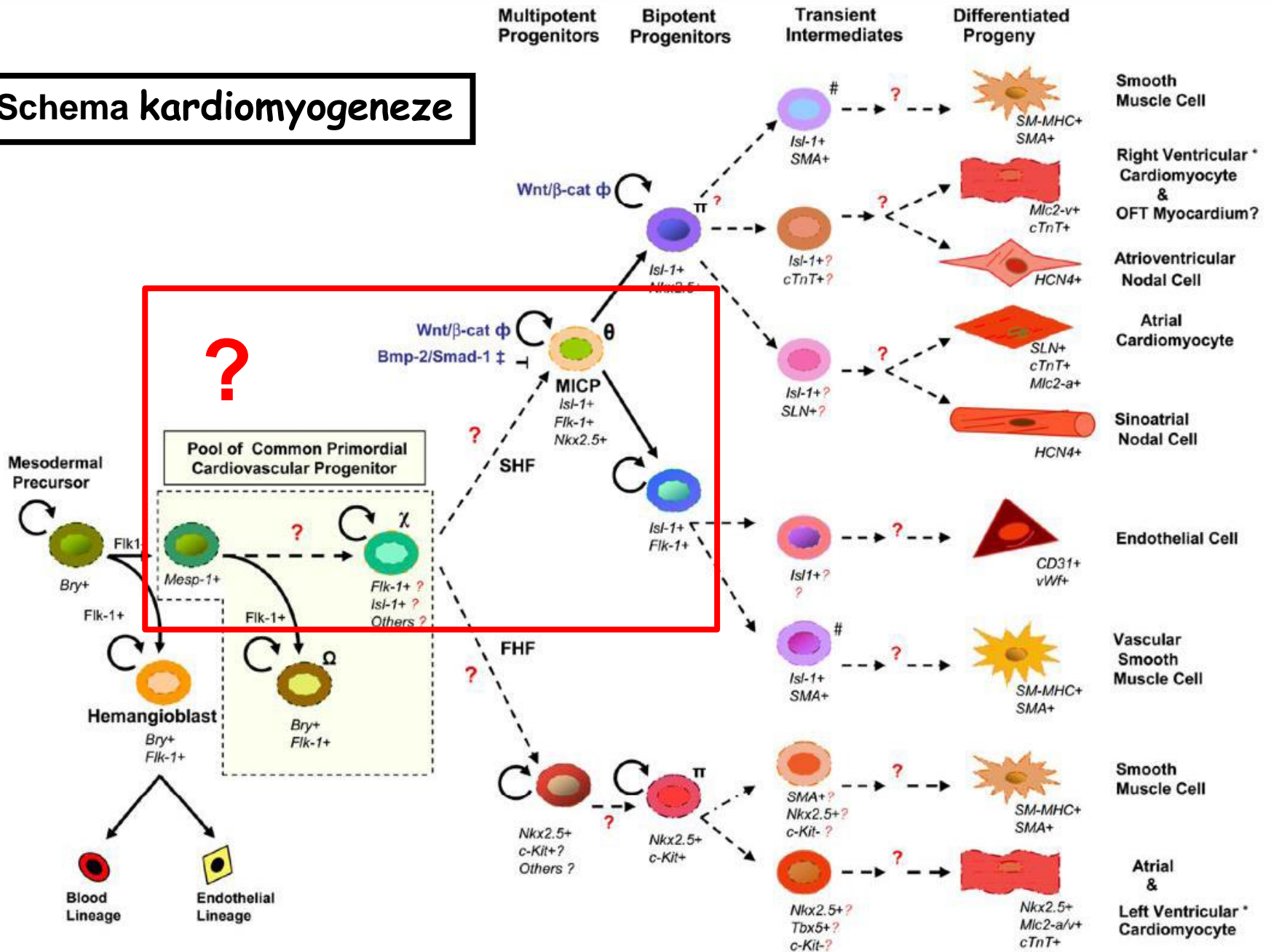
(Proliferace kardiomyocytů - spíše ne!)

Kmenové buňky myokardu – nová naděje

Arteficiální, sekundární kmenové buňky odpovídající fenotypem buňkám kardiogenního mezodermu

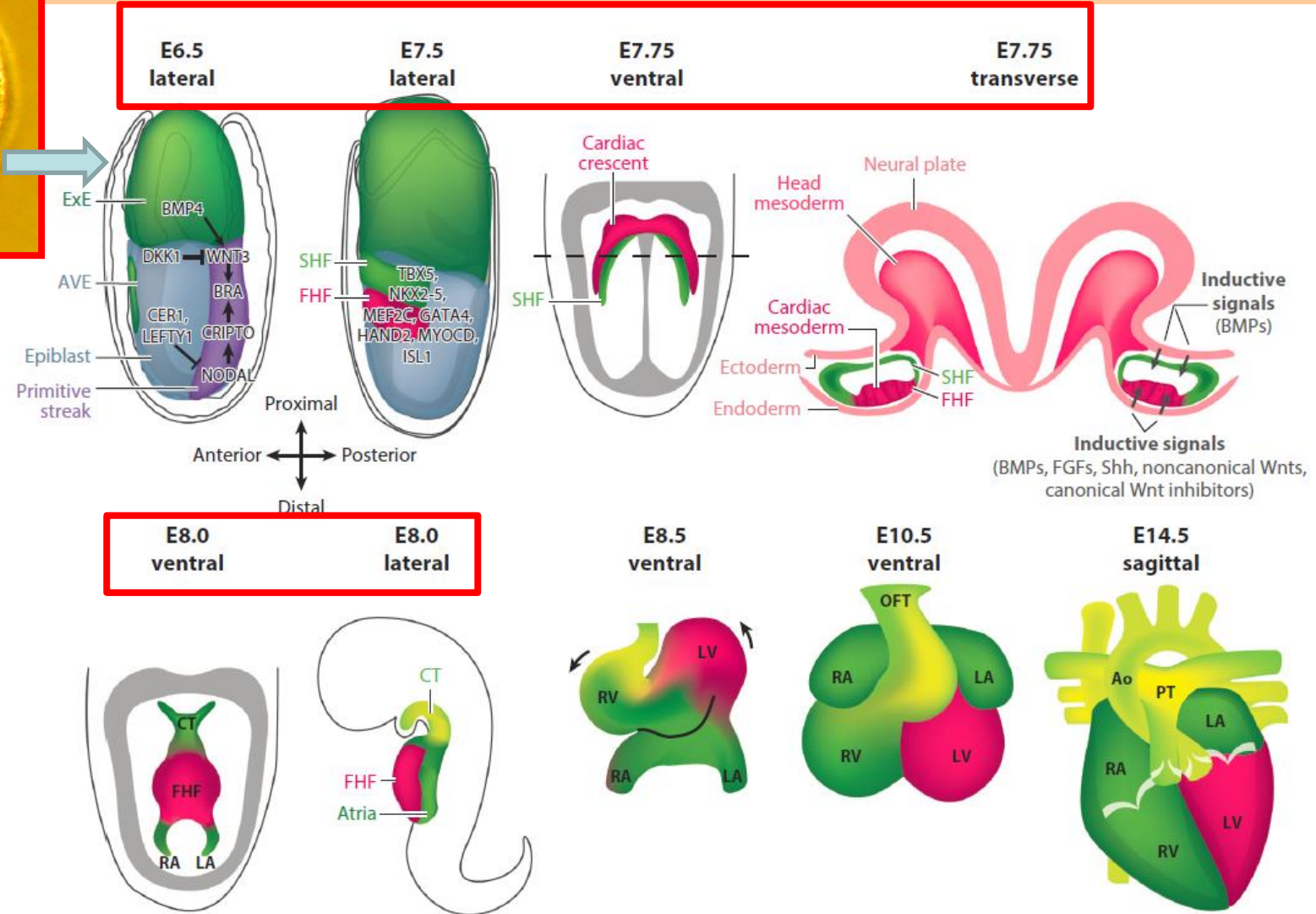
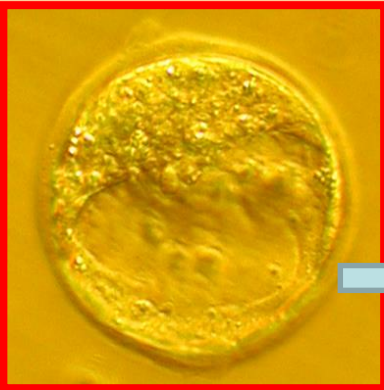


Schema kardiomyogeneze



Kardiomyogenese

E3.5



Kostra - skelet

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

MESODERM

chondrocyty

klidová zóna

proliferační zóna

růstová zóna

apoptóza

chondrogeneze

MSC

HSC

osteoblast
Runx2 -> Osx*
Fos, ΔFos, Fra-1

ENDOTEL

osteoblast
(mineralizující)
Osteocalcin

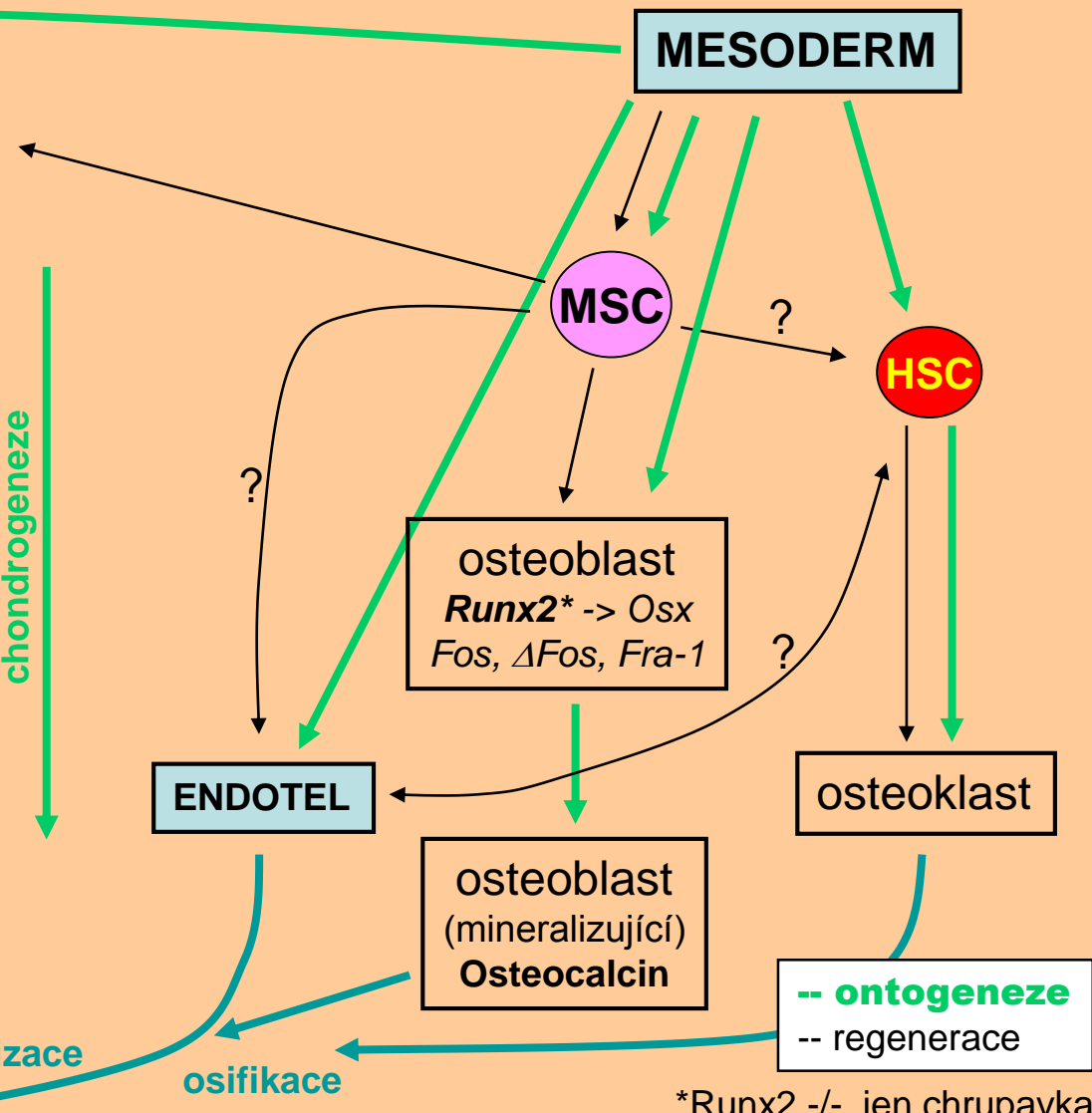
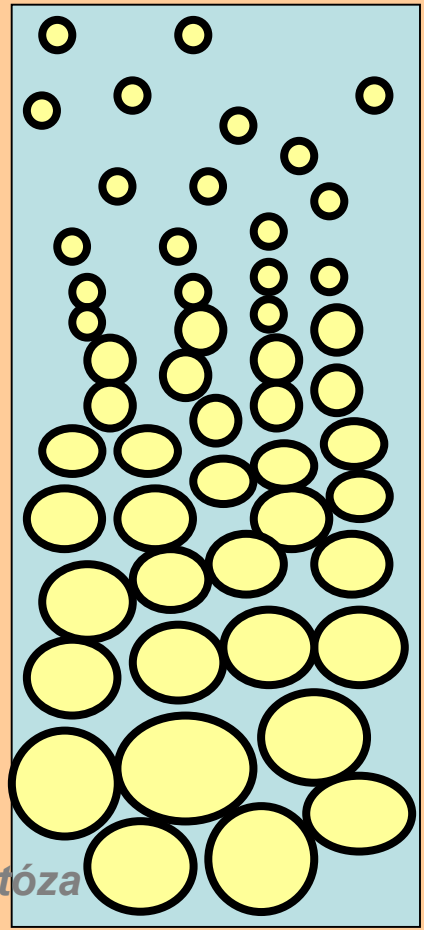
osteoklast

-- ontogeneze
-- regenerace

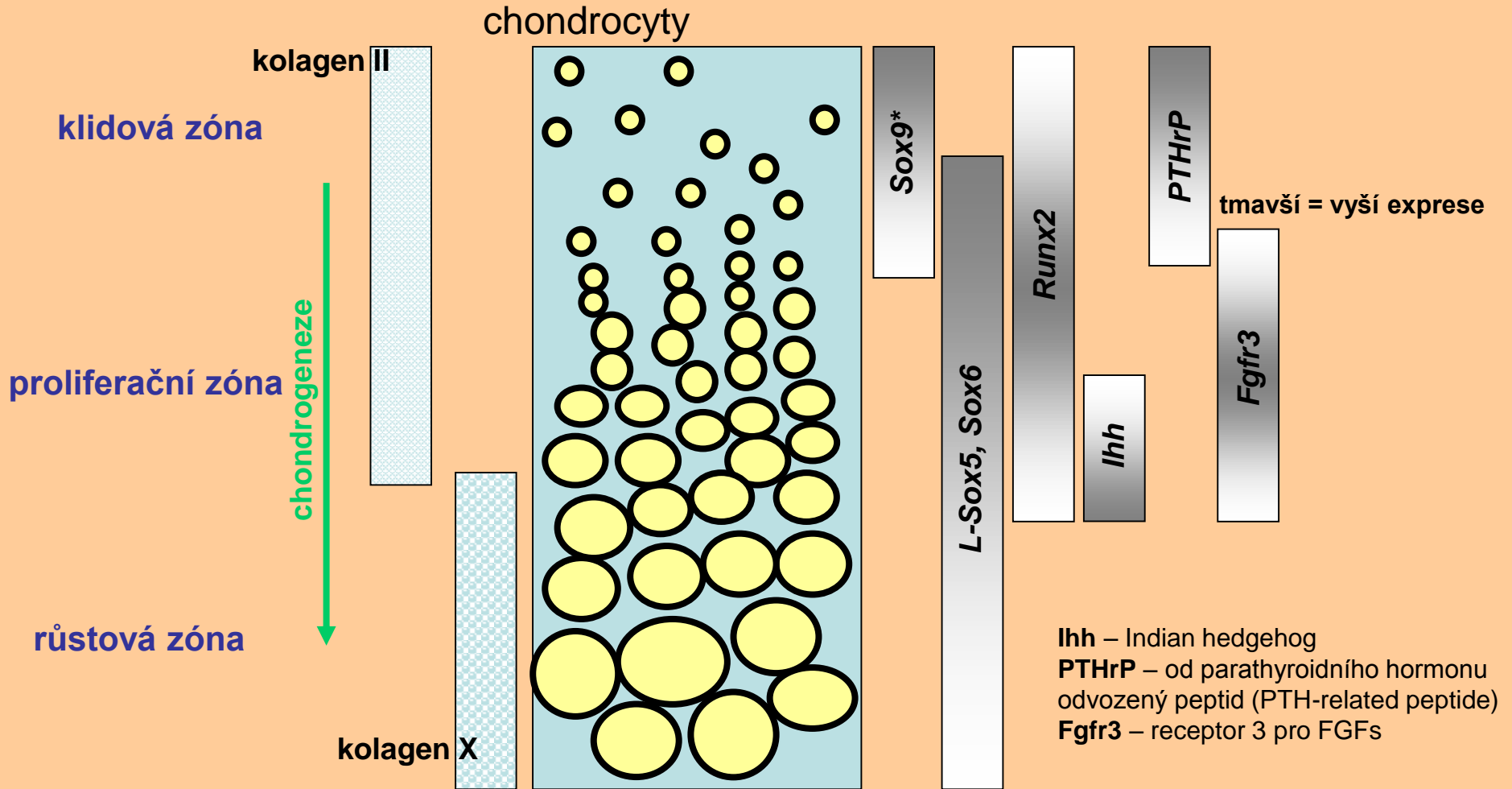
vaskularizace

osifikace

*Runx2 -/-, jen chrupavka



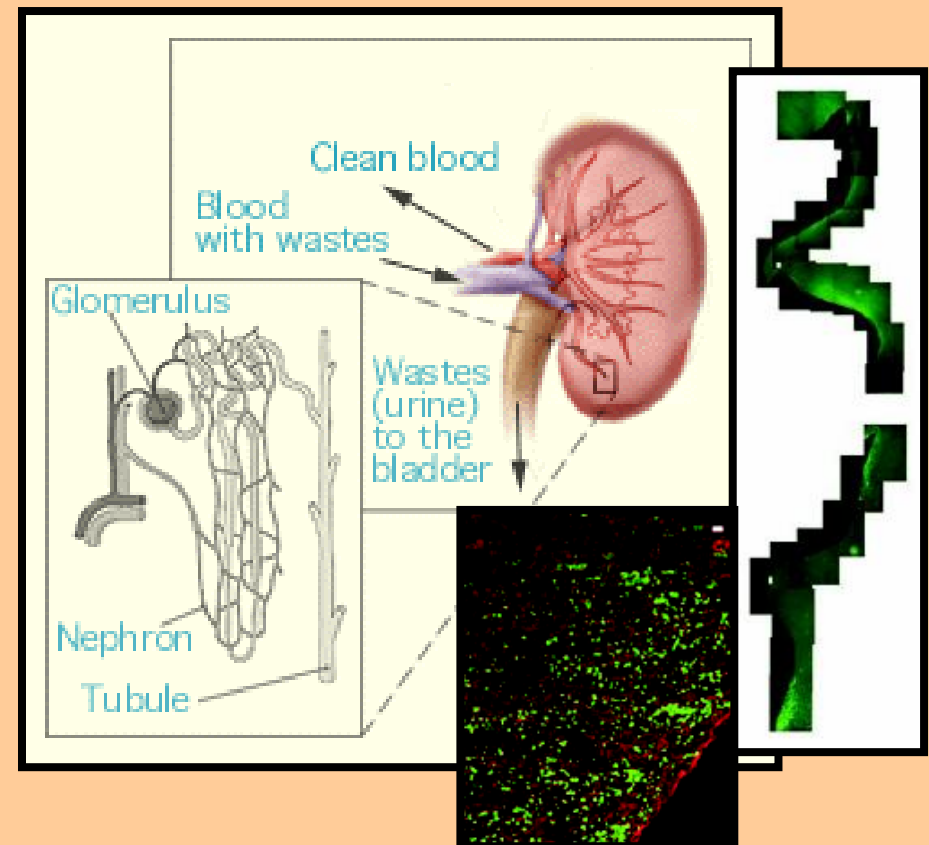
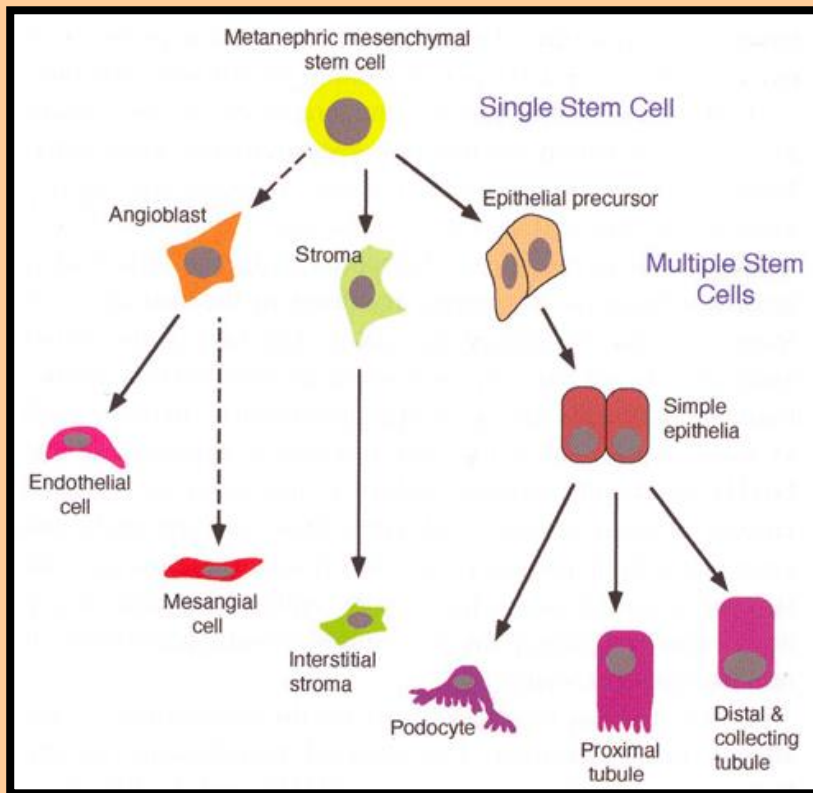
Fenotyp chondrocytů v průběhu jejich diferenciaci



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

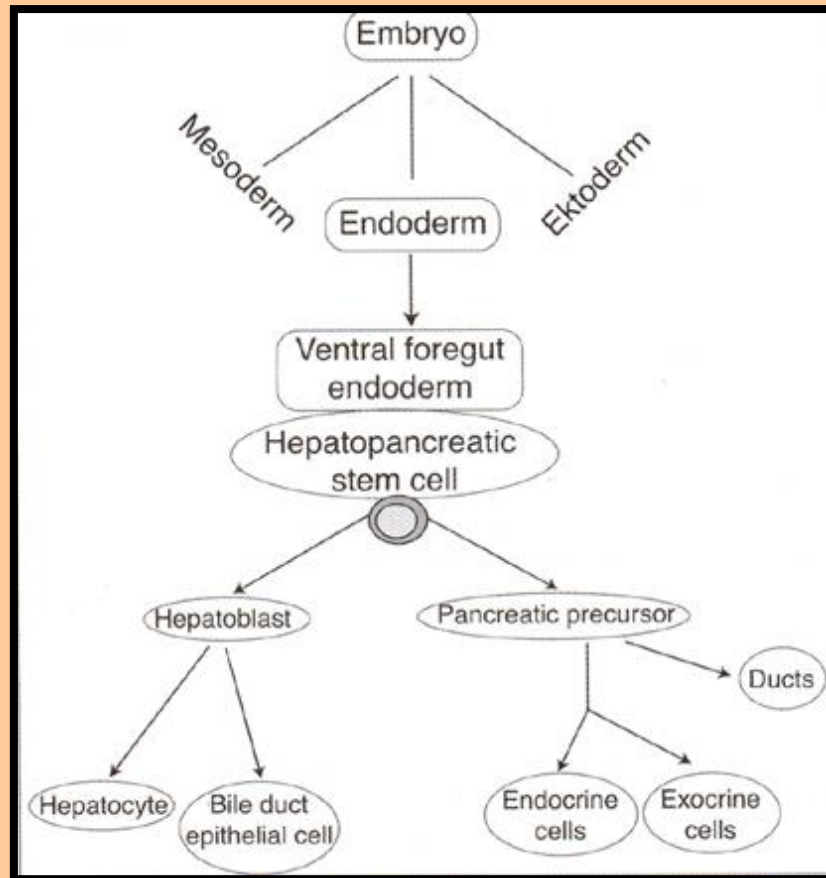
Ledviny

- 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 protein); 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 nebyla dosud prokázána.

Játra

a) vlastní jaterní buňky

hepatocyty (albumin), oválné buňky (vlastní jaterní kmenové buňky, c-kit, SCF, Thy1, albumin / CK19), epiteliální buňky žlučového (CK19), hvězdčité buňky

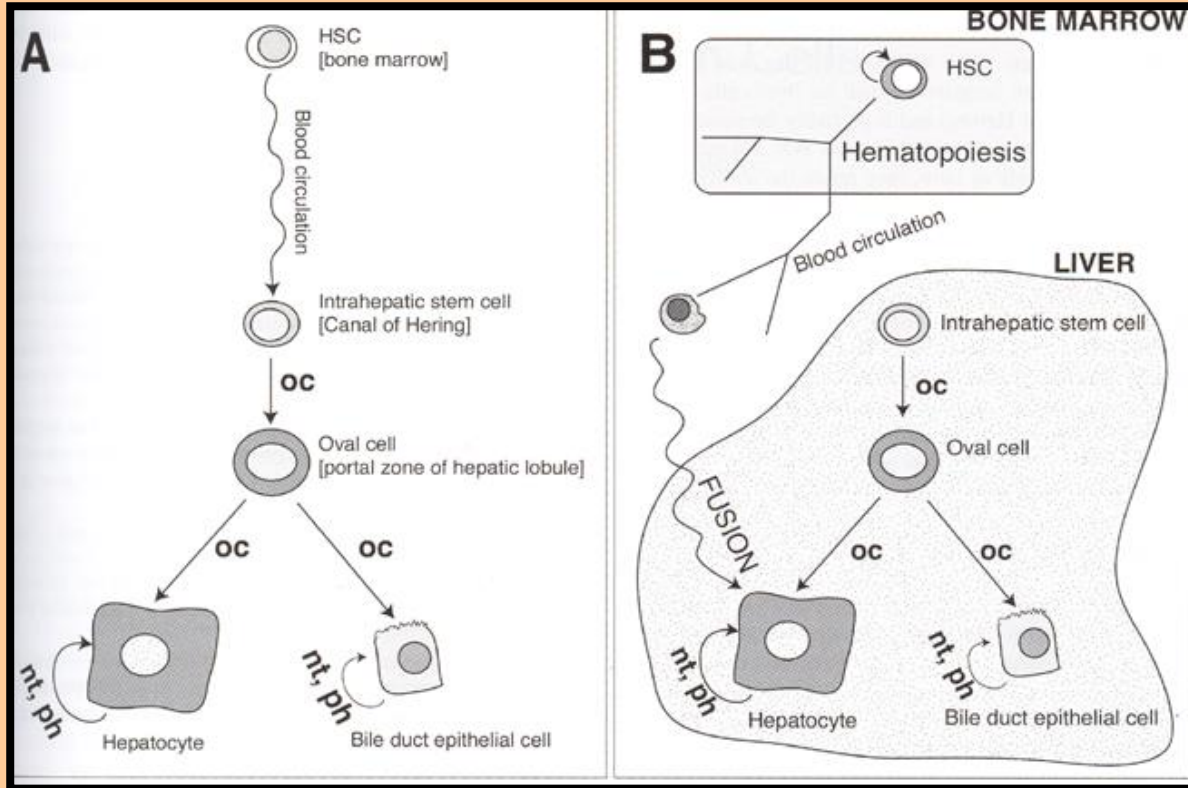
b) další typy buněk v játrech

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

Jaterní tkáň běžně regeneruje proliferací vlastních hepatocytů (hepatotektomie), případně proliferací a diferenciací oválných buněk (otravy, chemické poškození). 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 XXXYY). Plná funkčnost těchto MAPCs a BMSSCs derivátů však zatím nebyla prokázána.

Model zapojení se HSCs / hematopoetických progenitorů v regeneraci jater (není jasně prokázáno)



oc - regenerace z oválných buněk
 nt - normální obnova jaterní tkáně
 pt - obnova jaterní tkáně po odstranění její části

- 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 (i ostatní?) se neobnovují z kmenových (profesionálních) 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 kanálků se sebeobnovují podobně také exokrinní buňky acinů
- 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 se znaky exokrinních buněk, podobné i u buněk embryonálního epitelu střeva

