

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Buněčná a vývojová biologie



Bc. Aneta Wróblová

Studium regeneračního potenciálu progenitorů Sertoliho buněk u pulců *Xenopus tropicalis* po amputaci ocasu

Study of regenerative potential of Sertoli cell progenitors in *Xenopus tropicalis* tadpoles after tail amputation

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2020

Podpis

Poděkování

Poděkování směřuji mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za ochotu, skvělé odborné vedení, věcné připomínky a velkou psychickou podporu.

M. Sc. Xuan Nguyen, PhD. děkuji za odbornou pomoc a podporu v počátcích mého studia. Dále děkuji kolegům za tvorbu příjemného a motivujícího pracovního prostředí, jmenovitě Mgr. Ing. Jiřímu Vávrovi, RNDr. Tereze Tlapákové, PhD., Mgr. Markétě Vegrachtové, Mgr. Andree Mančíkové, Bc. Jakubovi Onhajzerovi a Bc. Lucii Slovákové.

V neposlední řadě pak děkuji své rodině a nejbližším přátelům za velké pochopení a nehybnou podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Žáby rodu *Xenopus* představují ideální modelový organismus pro studium regeneračních procesů. U žab lze kompletní regeneraci pozorovat ve stádiu pulce. V pozdějších stádiích vývoje je tato schopnost ztracena. V Laboratoři vývojové biologie se podařilo založit buněčnou kulturu společných progenitorů Sertoliho a peritubulárních myoidních buněk (XtiSC) odvozenou z varlat samce *X. tropicalis*.

Tyto buňky vykazují obdobné charakteristiky jako mesenchymální kmenové buňky, jež jsou v současné době předmětem zájmu mnoha vědců pro své imunomodulační vlastnosti a multipotentní diferenciační a regenerační potenciál. V této práci byl studován regenerační a migrační potenciál XtiSC po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50. Pro usnadnění transplantačních experimentů byla vytvořena transgenní linie XtiSC exprimující RFP. Pomocí transplantačních experimentů pak byla potvrzena preferenční migrace XtiSC do místa zranění. S využitím pulců *X. laevis* s vyřazenou funkcí NO syntáz eNOS a nNOS bylo rovněž zjištěno, že migrace XtiSC do místa zranění je zprostředkována signalizací oxidu dusnatého. Imunocytochemickým barvením XtiSC *in vitro* byla zjištěna pozitivní exprese iNOS, nNOS a Pax7. Imunohistochemické barvení vibratomových řezů ocasu pulců s transplantovanými XtiSC potvrdilo částečnou kolokalizaci XtiSC barvených proti RFP s iNOS, nNOS a Pax7. Dále byla testována schopnost XtiSC produkovat NO. *In vitro* jsme produkci NO nepotvrdili ani po stimulaci různými faktory. Prostřednictvím fluorescenčního indikátoru NO DAF-2DA byla *in vivo* prokázána produkce NO u XtiSC transplantovaných do pulců *X. tropicalis*. Genová expresní analýza metodou RT-PCR prokázala u XtiSC pozitivní expresi markerů ROC, které jsou pro správný průběh regenerace klíčové. Tyto výsledky naznačují možný regenerační potenciál XtiSC.

Klíčová slova: regenerace, *Xenopus tropicalis*, Sertoliho buňky, amputace, ocas, kmenové buňky, oxid dusnatý, ROC, satelitní buňky

Abstract

African clawed frogs (*Xenopus*) represent an ideal model organism for study of regeneration mechanisms. In frogs, complete regeneration occurs in the tadpole stage. In later stages the regeneration capacity is lost. The Laboratory of Developmental biology was successful in establishment of cell culture called *Xenopus tropicalis* immature Sertoli cells (XtiSCs) derived from *X. tropicalis* testes. These cells are common progenitors of Sertoli cells and peritubular myoid cells. XtiSCs show similar characteristics as mesenchymal stem cells. MSCs hold interest of scientists for their immunomodulatory properties and multipotent differential and regeneration potential.

In this thesis, we studied regeneration and migration potential of XtiSCs after *X. tropicalis* tadpole's tail amputation in developmental stage 47 – 50. Transgenic XtiSCs culture expressing RFP was prepared to facilitate transplantation experiments.

Transplantation experiments showed preferential migration of XtiSCs into the site of injury. XtiSCs transplantations in *X. laevis* tadpoles with downregulated NO synthases eNOS and nNOS revealed their migratory dependence on nitric oxide signalization. Immunocytochemical staining of XtiSCs *in vitro* showed positive iNOS, nNOS and Pax7 expression. Immunohistochemical staining of tadpole's tail vibratome sections containing transplanted XtiSCs confirmed partial colocalization of RFP positive XtiSCs and iNOS, nNOS and Pax7.

Later on, we focused on NO production. NO production wasn't observed in XtiSCs *in vitro* even after stimulation. Nevertheless, fluorescent DAF-2DA NO indicator confirmed its production in XtiSCs *in vivo* after their transplantation into *X. tropicalis* tadpoles. Gene expression analysis using RT-PCR revealed positive expression of ROCs markers in XtiSCs. ROCs are crucial for proper regeneration. Results gained in this study suggested possible regeneration potential of XtiSCs.

Key words: regeneration, *Xenopus tropicalis*, Sertoli cells, amputation, tail, stem cells, nitric oxide, ROC, satellite cells

Seznam zkratek

Bmp	bone morphogenetic protein	kostní morfogenetický protein
CD	cluster of differentiation	
DAF-2DA	4,5-diaminofluorescein diacetate	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidin-2-fenylindol
dpa	days post amputation	dny po amputaci
EMT	epithelial-mesenchymal transition	epitelo-mezenchymální tranzice
ESC	embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
Fgf	fibroblast growth factor	fibroblastický růstový faktor
hCG	choriogonadotropin	choriogonadotropin
Hgf	hepatocyte growth factor	hepatocytární růstový faktor
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
hpa	hours post amputation	hodin po amputaci
iPSC	induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní buňky
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase	indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN- γ	interferon gamma	interferon gamma
IL	interleukin	interleukin
IVF	<i>in vitro</i> fertilisation	<i>in vitro</i> fertilizace
Lef1	lymphoid enhancer-binding factor 1	lymfoidní enhancer-vázající faktor 1
mLIF	mouse Leukemia inhibitory factor	myší Leukemický inhibiční faktor
MMR	Marc's Modified Ringer's	
Msx	Msh homeobox	
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
iNOS	inducible nitric oxide synthase	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
MO	morpholino oligonucleotides	morpholino oligonukletidy
MSC	mesenchymal stem cells	mezenchymální kmenové buňky
nNOS	neuronal nitric oxide synthase	neurální syntáza oxidu dusnatého
PCP	planar cell polarity	planární buněčná polarita
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
RFP	red fluorescent protein	červený fluorescenční protein
ROC	regeneration organizing cells	buňky organizující regeneraci
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
RT	room temperature	pokožová teplota

RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
Shh	sonic hedgehog	
Sma	α -smooth muscle actin	α aktin hladké svaloviny
SSC	spermatogonial stem cells	spermatogoniální kmenové buňky
Tgf- β	transforming growth factor	transformující růstový faktor
TNF α	tumor necrosis factor - α	tumor nekrotizující faktor - α
TNB	Tris NaCl blocking buffer	Tris NaCl blokovací pufr
TP63	tumor protein p63	nádorový protein p63
Wnt	Wingless/int-1	
WT	wild type	divoký typ
XtiSC	<i>X. tropicalis</i> immature Sertoli cells	nezralé Sertoliho buňky <i>X. tropicalis</i>
XtiSCc	<i>X. tropicalis</i> immature Sertoli cells colonies	kolonie nezralých Sertoliho buněk <i>X. tropicalis</i>
XtTSC	<i>X. tropicalis</i> testicular somatic cells	testikulární somatické buňky <i>X. tropicalis</i>

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Kmenové buňky	2
2.1.1 Charakteristika kmenových buněk	2
2.1.2 Mezenchymální kmenové buňky	3
2.1.3 Sertoliho buňky	4
2.1.3.1 Nezralé Sertoliho buňky <i>X. tropicalis</i>	5
2.2 <i>Xenopus tropicalis</i> jako modelový organismus	8
2.2.1 Srovnání <i>Xenopus laevis</i> a <i>Xenopus tropicalis</i>	9
2.3 Regenerace	10
2.3.1 Morfolaxe	10
2.3.2 Epimorfóza	11
2.3.3 Kompenzační regenerace	11
2.3.4 Regenerace ocasu u žab	12
2.3.4.1 První fáze regenerace ocasu	12
2.3.4.2 Druhá fáze regenerace ocasu	14
2.3.4.3 Třetí fáze regenerace ocasu	15
2.3.4.4 Klíčové signální molekuly	16
3. Cíle práce	20
4. Materiál	21
4.1 Živý materiál	21
4.1.1 Zvířata a chovy	21
4.1.2 Buněčná kultura	21
4.2 Média	21
4.3 Roztoky	21
4.3.1 Roztoky pro IVF a transplantace	21
4.3.2 Další roztoky	22
4.4 Studium genové exprese	22
4.4.1 Izolace RNA	22
4.4.2 Příprava cDNA	22
4.4.3 RT-PCR	22

4.5 Fluorescenční barvení	24
4.6 Chemikálie a ostatní materiál	24
4.7 Použité přístroje	25
5. Metody	26
5.1 Kultivace a příprava XtiSC	26
5.2 RT-PCR	27
5.3 Imunocytochemické barvení	28
5.4 Měření produkce oxidu dusnatého	28
5.5 Transplantace XtiSC do pulců <i>X. tropicalis</i>	29
5.6 Studium migratorního potenciálu XtiSC po amputaci ocasu	30
5.6.1 Studium migratorního potenciálu XtiSC v závislosti na NO	30
5.6.2 Lightsheet mikroskopie	31
5.7 Imunohistologické barvení vibratomových řezů	31
5.8 Statistická analýza	32
6. Výsledky	33
6.1 Studium refraktorní fáze u <i>X. tropicalis</i>	33
6.2 Přežívání XtiSC po transplantaci	34
6.3 Studium migratorního potenciálu XtiSC	35
6.3.1 Studium migratorního potenciálu XtiSC <i>in vivo</i> po amputaci ocasu	35
6.3.2 Studium migratorního potenciálu XtiSC v závislosti na NO <i>in vivo</i>	37
6.4 Studium regeneračního potenciálu XtiSC	42
6.4.1 XtiSC a produkce NO	42
6.4.2 XtiSC a satelitní buňky	49
6.4.3 Porovnání genové exprese XtiSC a ROC	53
7. Diskuze	55
8. Závěr	63
9. Seznam literárních zdrojů	64

1. Úvod

Kmenové buňky jsou v posledních desetiletích intenzivně sledovaným tématem. Vzhledem ke svým vlastnostem představují slibný nástroj pro použití v oblasti regenerativní medicíny. Kmenových buněk existuje několik typů a ty se mezi sebou liší z hlediska diferenciačního potenciálu a sebeobnovovací kapacity. Nejširším diferenciačním potenciálem disponují ESC, ty nicméně přináší etické problémy s ohledem na jejich získávání.

Dalším atraktivním typem kmenových buněk jsou iPSC, které vznikly cílenou reprogramací. U těchto buněk se ale objevuje problém s jejich možnou tumorogenicitou a také imunitní reakcí hostitele při transplantaci iPSC, která může vést k rejekci. Z těchto důvodů jsou slibné MSC, které sice ztrácejí na diferenciačním potenciálu, ale lze je snadněji získat. Díky svým imunomodulačním a protizánětlivým vlastnostem a nižším rizikem rejekce by mohly být ideální pro terapeutické využití.

V Laboratoři vývojové biologie byla úspěšně založena buněčná kultura XtiSC neboli nezralých Sertoliho buněk *X. tropicalis* odvozených z varlat juvenilního samce. Tyto buňky jsou progenitory Sertoliho buněk a peritubulárních myoidních buněk. XtiSC vykazují multipotentní diferenciační potenciál a migratorní schopnost. Mimo jiné exprimují několik pluripotentních markerů a povrchové markery MSC. Předmětem zájmu jsou i možné imunomodulační schopnosti XtiSC. Lze tedy říci, že XtiSC disponují podobnými vlastnostmi jako MSC.

Cílem této diplomové práce bylo prověřit regenerační potenciál XtiSC u pulců *X. tropicalis*. Ačkoliv se pro studium kmenových buněk častěji využívají savčí modelové organismy, použití *X. tropicalis* poskytuje výhody. Žáby rodu *Xenopus* mají vnější embryonální vývoj a průhledná embrya, což značně usnadňuje transplantační experimenty. Pulci xenopa disponují značnou regenerační kapacitou, která je vyšší než u savců. Na druhou stranu ale regenerace ocasu u pulců sdílí podobné mechanismy s regenerací svalu u savců. Výsledky získané studiem regenerace ocasu pulců jsou tak poměrně snadno aplikovatelné i na savčím modelu.

2. Literární přehled

2.1 Kmenové buňky

2.1.1 Charakteristika kmenových buněk

Kmenové buňky lze definovat jako nediferencované buňky, jež disponují neomezenou sebeobnovovací kapacitou a rovněž schopností diferencovat ve specializované buněčné typy. Přítomnost kmenových buněk v organismu podmiňuje schopnost nahrazovat poškozené tkáně.

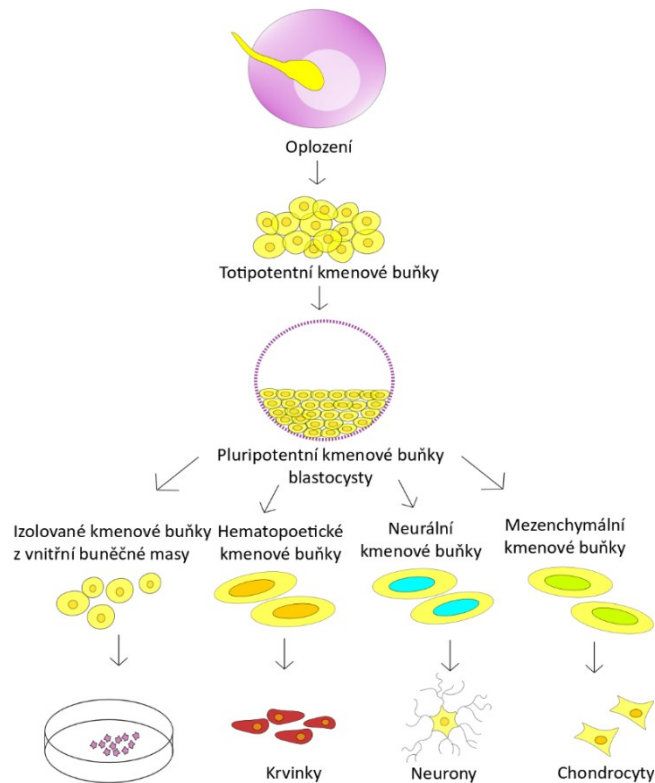
V závislosti na diferenciačním potenciálu, tedy dle schopnosti přeměnit se v různé buněčné typy, dělíme kmenové buňky na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (viz. Obr. 1).

Totipotentní kmenové buňky mají schopnost diferencovat v jakýkoliv typ buněk jedince včetně buněk extraembryonálních tkání. Tyto buňky se vyskytují v embryu v průběhu časného vývoje.

Příkladem pluripotentních buněk jsou pak embryonální kmenové buňky, ty nalézáme ve stádiu blastocysty a diferencují v buňky všech tří zárodečných listů.

Charakteristikou multipotentních kmenových buněk je schopnost přirozeně diferencovat do více než jednoho buněčného typu, což splňují kupříkladu mezenchymální kmenové buňky (Pittenger a kol., 1999).

Nejvíce omezené jsou pak unipotentní kmenové buňky, které diferencují pouze v jeden buněčný typ, stále si však udržují schopnost sebeobnovy. Významným milníkem byl objev indukovaných pluripotentních buněk. Připravují se cílenou modifikací již diferencovaných buněk a vykazují obdobné znaky jako embryonální kmenové buňky (Takahashi a Yamanaka, 2006).



Obrázek 1.: Schematické znázornění dělení kmenových buněk dle jejich diferenciačního potenciálu.

2.1.2 Mezenchymální kmenové buňky

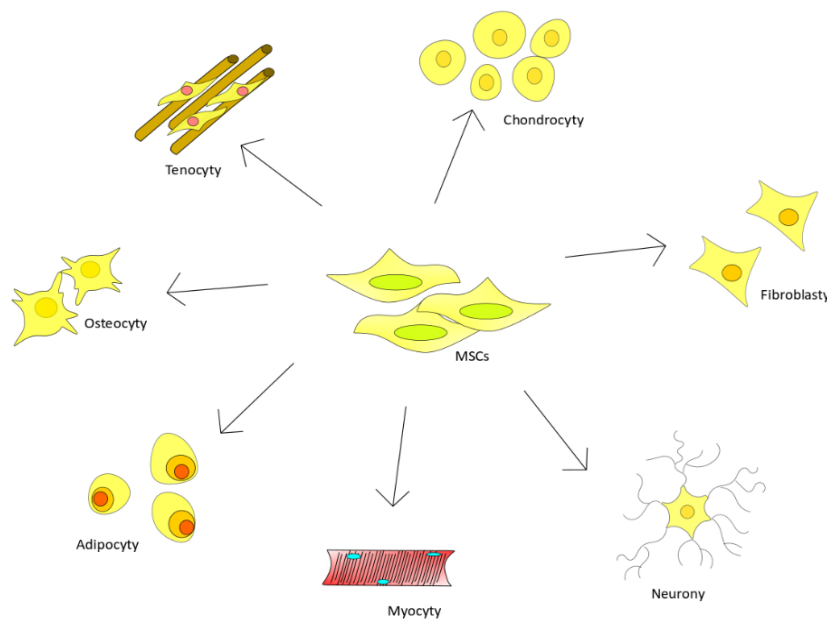
MSC byly poprvé rozpoznány a popsány v kostní dřeni u myši jako populace adherentních a fibroblasty připomínajících buněk (Friedenstein a kol., 1976).

Dnes je definujeme jako nehematopoetické buňky, tedy samovolně neschopné diferencovat v krevní buňky, které ale mohou dát vznik buňkám tkání mezodermálního původu (tj. svaly, kosti, šlachy, chrupavky a tuková tkáň). Jsou to tedy kmenové buňky s multipotentním diferenciačním potenciálem (Pittenger a kol., 1999).

Objev MSC byl na poli vědy senzací, není tedy divu, že vzbudil zájem mnoha výzkumných týmů. S postupem času byly objeveny nové způsoby izolace MSC a vědci se následně rozcházeli i v jejich definování. Za tímto účelem ustanovila společnost International Society for Cellular Therapy trojici kritérií, která charakteristiku a rozpoznávání lidských MSCs usnadňují (Horwitz a kol., 2005; Dominici a kol., 2006).

A sice:

- Adherence buněk k plastiku
- Expresí specifických povrchových antigenů – 95% populace musí exprimovat CD105, CD73 a CD90, a zároveň postrádat expresi CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 α nebo CD19 a HLA třídy II.
- Multipotentní diferenciační potenciál – schopnost diferencovat *in vitro* v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty.



Obrázek 2.: Multipotentní diferenciační potenciál MSC.

Nicméně MSC mohou po vhodné stimulaci diferencovat i do buněk jiného než mezodermálního původu. Ochtově diferencují například v tenocyty, myocyty, nervové a epiteliální buňky a další (viz. Obr. 2; shrnuto v Gimble a kol., 2008).

Nelze opomenout, že MSC vykazují imunomodulační a protizánětlivé schopnosti. Po transplantaci nejen že migrují do místa vzniklého poranění, ale rovněž produkují solubilní faktory, které působí inhibičně na imunitní systém.

MSCs byly dlouho považovány za imunologicky privilegované kmenové buňky, minimální riziko rejekce po alogenní transplantaci představovalo obrovskou výhodu pro jejich použití (Le Blanc, 2003; 2006). Naproti tomu dnes je tato schopnost předmětem sporů (Ankrum a kol., 2014).

Z tohoto důvodu je v dnešní době aktivně zkoumán terapeutický efekt MSC na autoimunitní choroby jako je například diabetes mellitus (Daneshmandi a kol., 2017).

MSC mají také prokazatelně pozitivní vliv na regeneraci mnoha typů tkání od poškození myokardu (Du a kol., 2008) přes poranění míchy a kůže (Mansilla a kol., 2005) až k defektům jaterní tkáně (Chang a kol., 2009).

MSC jsou tudíž velkým příslibem pro regenerativní medicínu.

2.1.3 Sertoliho buňky

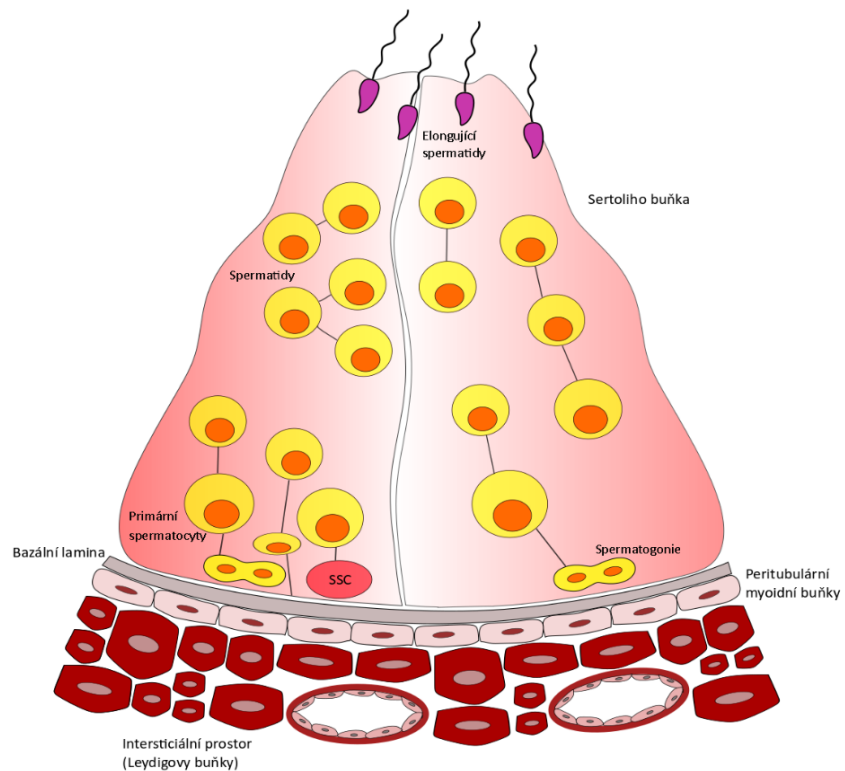
Sertoliho buňky jsou podlouhlé somatické buňky, které nalézáme v semenotvorných

kanálcích varlat.

Zde se odehrává celý proces spermatogeneze.

Sertoliho buňky přisedají k bazální lamíně, jsou ohraničeny vrstvou peritubulárních myoidních buněk a vyčnívají do středu kanálku (viz. Obr. 3).

Jsou v přímém kontaktu s pohlavními buňkami, pro jejichž vývoj jsou zcela nepostradatelné.



Obrázek 3.: Průřez semenotvorným kanálkem. Semenotvorný kanálek je tvořen Sertoliho buňkami, na bazální straně je obklopuje vrstva peritubulárních myoidních buněk a Leydigových buněk. Spermatogeneze postupuje ve směru od bazální laminy do středu kanálku.

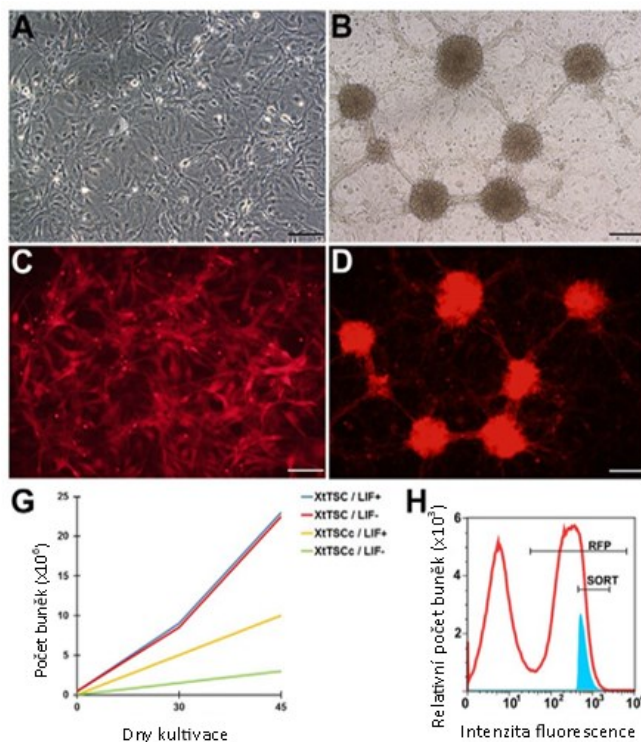
Vyvíjejícím se spermiiím poskytují nezbytnou ochranu a výživu, produkují regulační látky a udržují mikroprostředí kanálku. Mimoto také fagocytují nepotřebné zbytky.

V procesu spermatogeneze se ze spermatogoniální kmenové buňky postupně ve směru od bazální laminy ke středu kanálku vyvíjí spermatická buňka.

Dozrávající spermatické buňky mají na svém povrchu antigeny, které mohou být rozpoznávány imunitním systémem, a způsobovat tak imunitní odpověď (Ryan a Fitzpatrick, 1986).

Tomuto brání Sertoliho buňky, vzájemným propojením pomocí těsných spojů vytváří hemato-testikulární bariéru, jíž projdou jen vybrané molekuly. V kanálku se tak ustanovuje mikroprostředí podmiňující vývoj a dozrávání spermatických buněk (Dym a Fawcett, 1970). Sertoliho buňky mimo jiné vykazují schopnost přežívat v organismu po alogenní i xenogenní transplantaci, ale také zvyšují přežívání buněk při kotransplantacích (Bistoni a kol., 2012).

2.1.3.1 Nezralé Sertoliho buňky *X. tropicalis*



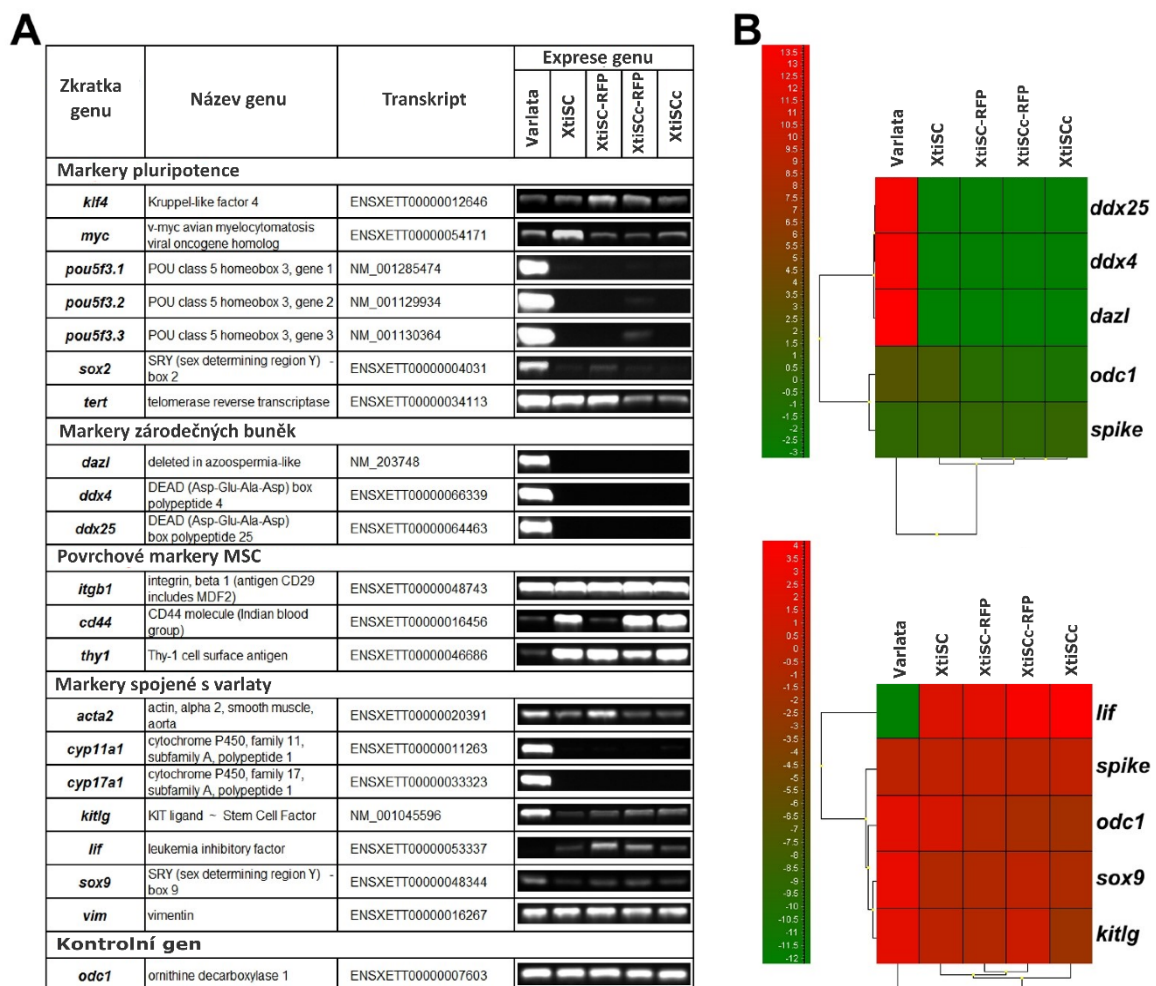
V laboratoři školitele se podařilo založit buněčnou kulturu XtiSC neboli nezralých Sertoliho buněk *X. tropicalis* (dříve také XtTSC) odvozených z varlat juvenilního samce (viz. Obr. 4). U těchto buněk byla prokázána exprese markerů nezralých Sertoliho buněk (*Sox9*, *vimentin*, *cytokeratin* a β -*katenin*), ale i peritubulárních myoidních buněk (*Sma* a *lif*), čímž byla potvrzena existence společného progenitoru pro tyto buněčné typy u *X. tropicalis* (Tlapáková a kol., 2016; Nguyen a kol., 2019a; 2019b).

Obrázek 4.: Charakteristika XtiSC. Dlouhodobou kultivací XtiSC docházelo k formování kolonií XtiSCc na podpůrné vrstvě XtiSC (A, B). Pro usnadnění in vivo experimentů byla vytvořena transgenní linie XtiSC-RFP (C, D) (Tlapáková a kol., 2016).

Naopak exprese markerů zárodečných buněk (*dazl*, *ddx4* a *ddx25*) byla u XtiSC vyvrácena, což dokazuje jejich somatický původ.

Je rovněž důležité zmínit, že XtiSC byly negativní na markery typické pro Leydigovy buňky. Analýza genové exprese dále odhalila expresi několika genů pluripotence (*klf4*, *c-myc*, *tert*), nicméně buňky byly negativní v ostatních klíčových genech pluripotence (*pouf5f3.1*, *pouf5f3.2*, *pouf5f3.3* a *sox2*), což naznačuje, že nevykazují pluripotentní potenciál. Expresi dalšího důležitého markeru pluripotence, *nanog*, nelze prokázat, jelikož u žáby rodu *Xenopus* dosud nebyl popsán jeho homolog (Silva a kol., 2009).

Následně byla potvrzena také pozitivní exprese markerů charakteristických pro MSC (*itgb-1-cd29*, *cd44* a *thy1-cd90*; viz. Obr. 5). Pro usnadnění *in vivo* pokusů byla vytvořena transgenní linie XtiSC-RFP exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem (viz. Obr. 4). Genové expresní analýze byly podrobeny jak XtiSC a XtiSCc, tak i XtiSC-RFP a XtiSCc-RFP, a byl tak prokázán podobný expresní profil těchto buněk (viz. Obr. 5; Tlapáková a kol., 2016).



Obrázek 5.: Charakteristika XtiSC. Analýza genové exprese XtiSC, XtiSCc, XtiSC-RFP, XtiSCc-RFP a tkáně varlat *X. tropicalis* (A). qPCR heatmapa markerů zárodečných buněk a markerů spojených s varlaty (B) (Tlapáková a kol., 2016).

XtiSC rovněž vykazují značný migratorní i diferenciační potenciál, byly ochotny *in vitro* diferencovat v chondrocyty, adipocyty a osteocyty (Strnadová, 2016).

Nguyen a kol. prokázali indukci EMT u XtiSC ošetřených pomocí CHIR99021, což mělo za následek rozšíření diferenciačního potenciálu. Takto stimulované buňky mnohem ochotněji diferencovaly v buňky mezenchymální řady *in vitro*, a navíc i v kardiomyocyty *in vivo*. Rovněž byla pozorována upregulace pluripotentního markeru *sox2* a povrchových markerů MSCs *cd44* a *itgb-1-cd29*. Dále byl naznačen jejich migratorní potenciál *in vivo*, kdy byla pozorována migrace do místa zranění, a *in vitro* pomocí migrace směrem k rakovinným buňkám (Nguyen a kol., 2019a; 2019b).

Krátce po mikroinjekci do peritoneální dutiny pulců *X. tropicalis* XtiSC migrovaly do oblasti srdce, střeva a pronefros (Tlapáková a kol., 2016), což jsou také hlavní migratorní cíle MSC injikovaných do krevního oběhu myši (shrnutí v Cornelissen a kol., 2015).

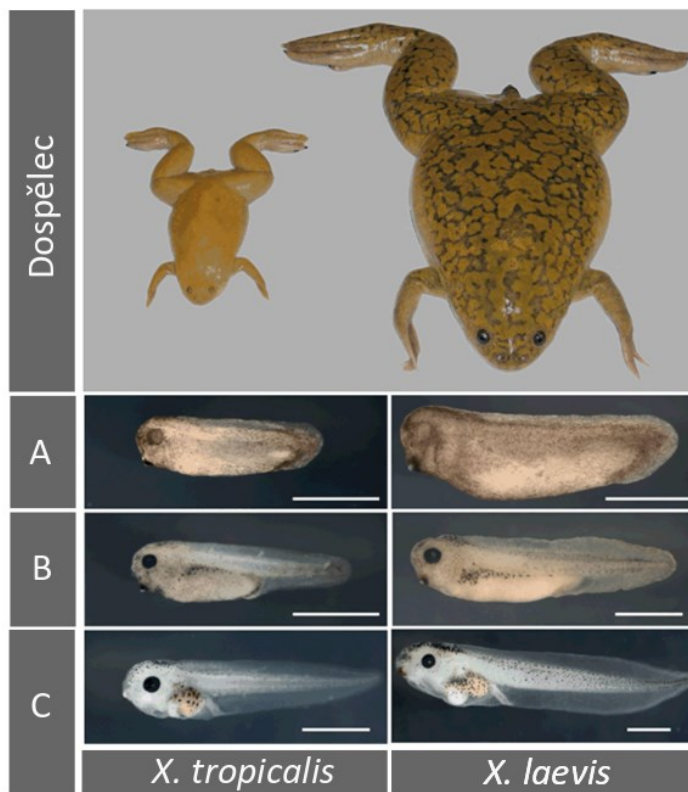
Z prozatímních výsledků lze tedy konstatovat, že XtiSC vykazují podobné charakteristiky jako MSC.

2.2 *Xenopus tropicalis* jako modelový organismus

Skupina afrických drápkatých žáb zahrnuje dva zcela výjimečné zástupce, jimž se na poli vědy dostalo nebývalé pozornosti – *Xenopus laevis* (Drápatka vodní) a blíže příbuzný *Xenopus tropicalis* (Drápatka africká).

Žáby rodu *Xenopus* řadíme fylogeneticky do třídy *Amphibia* (Obojživelníci), podtřídy *Ecaudata* (Bezocasí), řádu *Anura* (žáby), čeledi *Pipidea* a podčeledi *Xenoponidae* (de Sa a Hillis, 1990; Cannatella a de Sa, 1993). Rod *Xenopus* se následně dělí do dvou větví, z nichž první (*Xenopus*) reprezentuje *X. laevis*, a druhou (*Silurana*) *X. tropicalis* (Evans a kol., 2004).

Dosavadní studium na žábách *Xenopus* přispělo k objasnění a pochopení mnoha procesů buněčné a vývojové biologie. Podobně jako další zástupci obojživelníků (mlok



Obrázek 6.: Srovnání dospělců a pulců *X. tropicalis* a *X. laevis*. (A) Stádium ocasního pupenu – stádium 22 (B) Pulec se začíná pohybovat – stádium 41 (C) Pulec začíná filtrovat potravu – stádium 45 (shrnuto v Niewkoop a Faber, 1994; upraveno dle Hellsten a kol., 2010)

využití oocytů i embryí pro mikromanipulace.

a čolek) je i *Xenopus* ideálním modelem pro studium embryonálního vývoje i regenerace jako takové. Největšího rozmachu jako modelový organismus však dosáhl v polovině minulého století *X. laevis*, kdy byl využíván jako tehdy nejsnadnější forma těhotenských testů (Bellerby, 1934; Shapiro a Zwarenstein, 1934).

Jak u *X. laevis*, tak i u *X. tropicalis* lze navodit ovulaci kdykoliv během roku prostřednictvím injekce hCG za výsledné produkce velkého množství snadno dosažitelných embryí. Dostatečná velikost a extrauterinní vývoj umožňuje

Dnes již plně osekvenovaný genom (Hellsten a kol., 2010) a možnosti transgeneze (Amaya a kol., 1998) dotváří obraz *xenopa* coby ideálního modelového organismu, který snadno konkuruje i savčím modelům.

2.2.1 Srovnání *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis*

X. tropicalis je stejně tak jako tradičně užívaný *X. laevis* vhodným modelovým organismem pro studium regenerace u obratlovců, a to jak jednobuněčného hojení u oocytů, tak i mechanismu mnohobuněčných tkáňových a orgánových oprav u pulců i dospělců (shrnuto v Li a kol., 2016). Ve srovnání s *X. laevis* má značnou výhodu v menší velikosti genomu, oproti pseudo-tetraploidní *X. laevis* je *X. tropicalis* diploidní (viz. Tab. 1.), a tudíž vhodnější ke genetickým manipulacím (Amaya a kol., 1998).)

Mimo jiné má *X. tropicalis* o poznání kratší generační dobu trvající 4 - 6 měsíců, namísto 8 - 12 měsíců u *X. laevis* (viz. Tab.1).

X. tropicalis se rovněž vyznačuje produkcí většího počtu oocytů o menší velikosti, i v dospělosti pak *X. tropicalis* dorůstá menších rozměrů než *X. laevis*, což nezanedbatelně snižuje náklady na chov (viz. Obr. 6). Blízká příbuznost obou druhů nám současně umožňuje využít totožné molekulární přístupy a techniky jako u *X. laevis*.

Žáby rodu *Xenopus* jsou jakožto vodní živočichové chovány ve vodních nádržích, aniž by potřebovaly živou stravu (shrnuto v Hirsch a kol., 2002a).

	<i>X. tropicalis</i>	<i>X. laevis</i>
Ploidie	Diploid	Pseudo-tetraploid
Velikost genomu	1,7 x 10 ⁹ bp	3,1 x 10 ⁹ bp
Velikost vajíčka	0,7 - 0,8 mm	1 - 1,3 mm
Velikost dospělé	4 - 5 cm	10 cm
Počet vajíček	1000 - 5000	300 - 1000
Generační doba	3 - 6 měsíců	8 - 12 měsíců a víc

Tabulka 1.: Srovnání modelových organismů *X. tropicalis* a *X. laevis* (Hirsch a kol., 2002a).

2.2.3 Regenerace

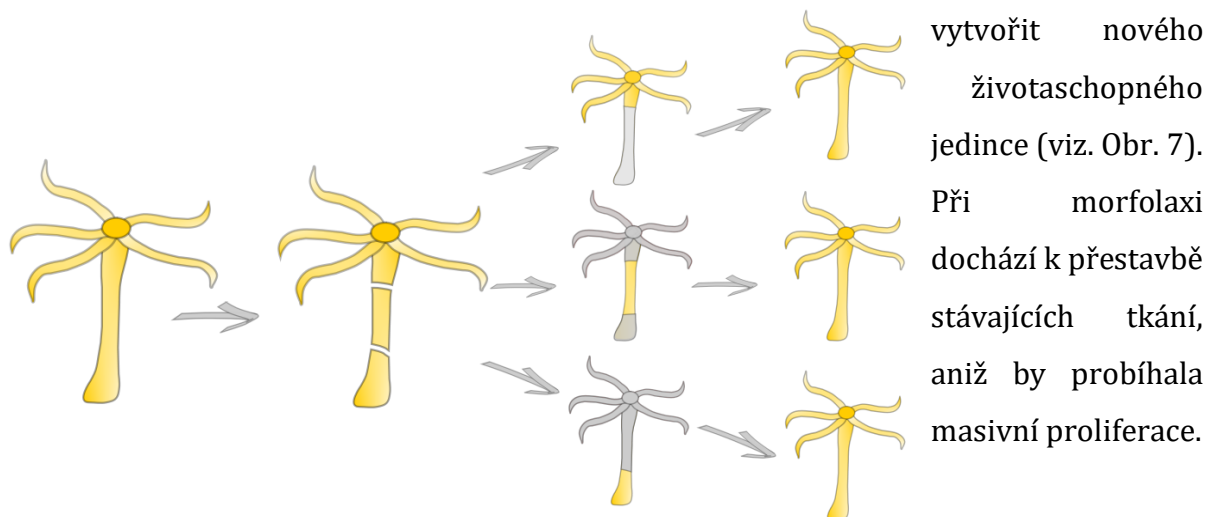
Regenerace je proces, který lze chápat jako reaktivaci embryonálního genomu v dospělosti, při níž dochází k obnově poškozené tkáně. Základy experimentálního studia regenerace, jež vedly k pochopení elementárních mechanismů, položili Abraham Tremblay (modelový organismus nezmara), René-Antoine Ferchault de Réaumur (korýši) a Lazzaro Spallanzani (mlok).

Regenerace nových tkání probíhá obecně třemi způsoby – morfolaxí, epimorfózou a kompenzační regenerací.

V této kapitole krátce představím mechanismy, které jsou pro ně příznačné.

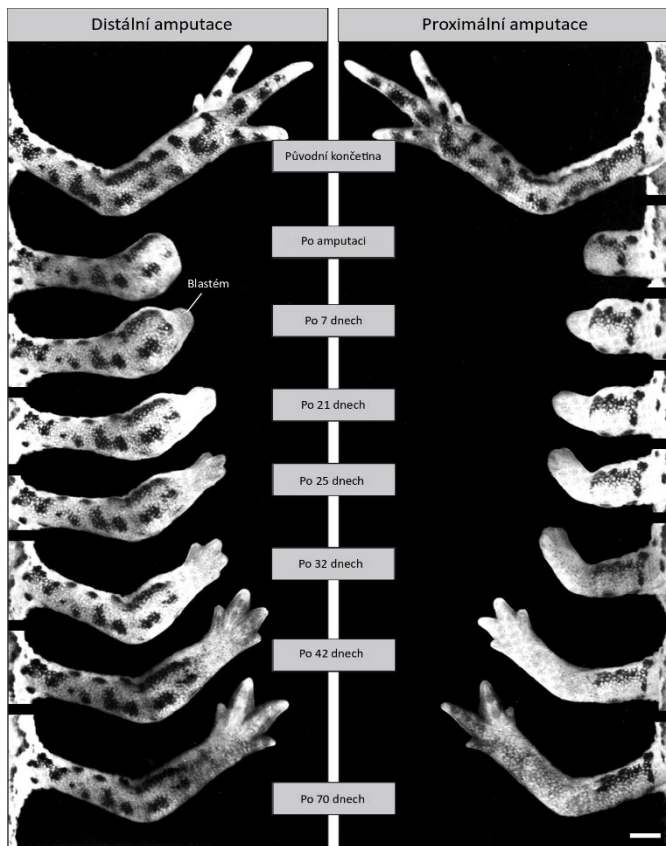
2.2.3.1 Morfolaxe

Tento typ regenerace nalézáme u nezmaru (*Hydra*). Pokud rozřezeme tělo nezmaru na několik částí, je na základě gradientu morfogenů každá z těchto částí schopná



Obrázek 7.: Regenerace u nezmaru po fragmentaci těla.

2.2.3.2 Epimorfóza



Obrázek 8.: Regenerace končetin u mloka po amputaci (upraveno dle Gilbert, 2000).

U mloka pozorujeme regeneraci amputovaných končetin pomocí epimorfózy v rámci několika týdnů (viz Obr. 8). Několik hodin po amputaci migrují epidermální buňky do místa zranění, kde vytváří ektodermální čepičku. V těchto místech pak dochází k buněčné dediferenciaci, tvoří se regenerační blastém, v němž buňky následně rediferencují a nahrazují poškozené tkáně. Nepostradatelnou roli v tomto procesu hrají metaloproteázy, což jsou enzymy štěpící ECM, čímž zprostředkují migraci diferencujících buněk.

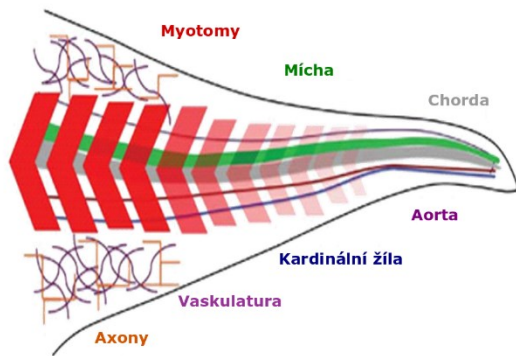
2.2.3.3 Kompenzační regenerace

Savci, člověka nevyjímaje, jsou schopni tzv. fyziologické regenerace, která přispívá k náhradě opotřebovaných buněk a tkání a zahrnuje například obnovu červených krvinek a epitelální obnovu kůže, střeva či děložní sliznice při menstruačním cyklu. Jejich regenerační potenciál je však značně omezen.

Jedním z mála příkladů regenerace u savců může sloužit schopnost kardiomyocytů nahrazovat poškozenou tkáň myokardu (Hsieh a kol., 2007).

Učebnicovým příkladem regenerace u savců v důsledku porušení tkáně je kompenzační regenerace jater. Po jejich částečné amputaci u savců dochází k náhradě chybějících tkání tím, že buňky tkání stávajících znovu vstoupí do buněčného cyklu a namnoží se (Higgins a Anderson, 1931).

2.2.4 Regenerace ocasu u žab



Obrázek 9.: Stavba ocasu pulce (upraveno dle Chang a kol., 2017).

Žáby rodu *Xenopus* jsou v průběhu larválního období schopné regenerovat ocas, končetiny a čočku, a rovněž hojit epidermální poranění bez jizvy již v embryonálním stádiu. Po metamorfóze *Xenopus* tuto schopnost ztrácí, což z něj činí ideální model pro studium signálních drah a mechanismů, které regenerační potenciál podmiňují.

Ocasní tkáň pulců je tvořena míchou, chordou, vaskulaturou a segmenty myotomu, které jsou obklopeny pojivovou tkání. Na povrchu je ocas pulce kryt pokožkou a obalen dorzální a ventrální ploutví (viz. Obr 9).

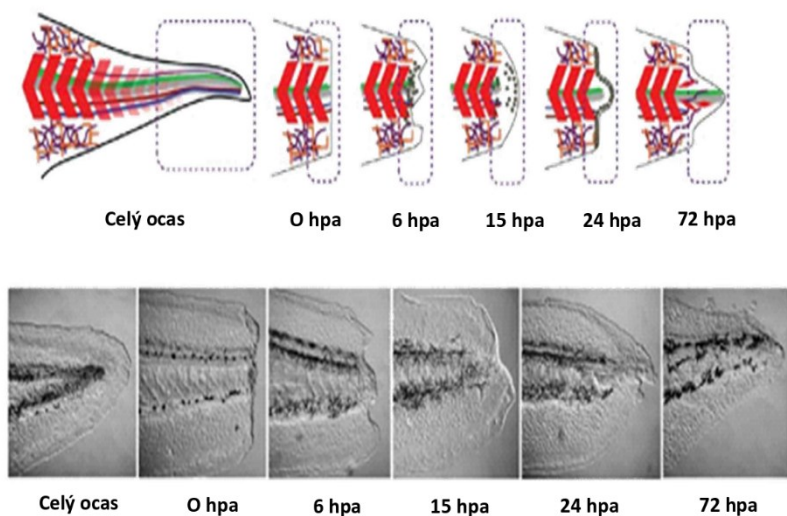
Všechny tyto tkáně mají schopnost regenerovat a dát po amputaci vzniknout novému plně funkčnímu ocasu v rozmezí jednoho až dvou týdnů.

Pro regeneraci a úspěšnou remodelaci tkání jsou zcela zásadní změny v expresi základních vývojových signálních drah jako Fgf, Wnt, Tgf- β , Notch, Bmp, Shh, stejně tak jako mechanismy apoptózy, působení reaktivních forem kyslíku a změny v membránovém potenciálu (Beck a kol., 2003; Ho a kol., 2008; Lin a kol., 2008; Love a kol., 2011; Taniguchi a kol., 2014).

Průběh samotné regenerace lze rozdělit do tří fází. Prvotní fáze zahrnuje bezjizvé epidermální hojení rány a zánětlivou reakci, dochází k reorganizaci tkání, místně specifické apoptóze a k aktivaci ROS v rámci 24 hpa. V další fázi následuje tvorba regeneračního pupenu a buněčná proliferace, načež záhy navazuje pozdní fáze diferenciací a růstu počínající v rozmezí 48 – 72 hpa (viz. Obr. 10; Love a kol., 2011; Chang a kol., 2017).

2.2.4.1 První fáze regenerace ocasu

V této fázi dochází k prvotnímu epidermálnímu hojení rány, spouští se zánětlivá reakce (Love a kol., 2011) a reorganizují se tkáně, což zahrnuje upregulaci genů důležitých pro buněčný pohyb, komunikaci a procesy specifikace tělních os (Chang a kol., 2017).



Obrázek 10.: Průběh regenerace ocasní tkáně v rozmezí 72 hpa (upraveno dle Chang a kol., 2017).

a kol., 2003; Tseng a kol., 2007).

Bylo zjištěno, že apoptotické buňky u regenerujícího nezmaru produkují růstové faktory (Galliot a Chera, 2010), lze se tedy domnívat, že apoptóza by mohla hrát obdobnou roli i v regeneraci ocasu u pulce (Chen a kol., 2014).

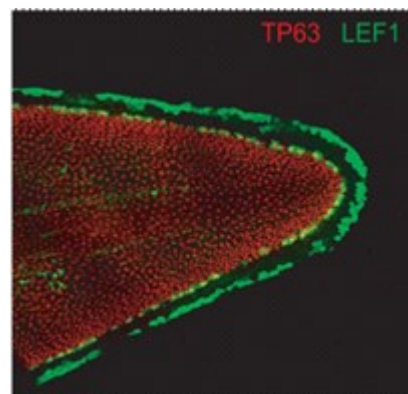
Přísně regulovaná apoptóza ovlivňuje buněčnou proliferaci v reakci na amputaci ocasu, a je tedy pro kompletní regeneraci zcela nepostradatelná (Tseng a kol., 2007).

V průběhu několika hodin dochází v místě amputace ke zvýšení hladiny ROS, které hrají v procesu regenerace nepostradatelnou roli.

Fungují jako induktory důležité signální dráhy Wnt/ β -katenin, po snížení hladiny ROS dojde k útlumu buněčné proliferace, a regenerace je tudíž neúspěšná. V místě zranění pak působí jako chemoatraktanty pro zánětlivé buňky (Love a kol., 2013).

Dalším podstatným hráčem v procesu regenerace jsou nově objevené regeneration-organizing cells. Jedná se o dosud nepopsaný typ buněk, které nalézáme u pulců pod pokožkou po celé délce ocasu.

Během první fáze regenerace, tzn. v rozmezí 12 - 24 hpa dochází k apoptóze. V důsledku potlačení apoptózy skrze specifickou inhibici kaspázy 3 je regenerace ocasu neúspěšná, stejného efektu ale docílí naopak i přemíra umírajících buněk po amputaci u pulců v refraktorní fázi* (Beck



Obrázek 11.: Identifikace ROC prostřednictvím markerů LEF1 a TP63 pod pokožkou ve špičce ocasu pulce (převzato z Aztekin a kol., 2019).

* Refraktorní fáze je krátké období dvou stádií v průběhu vývoje pulce, v němž je regenerace ocasu potlačena.

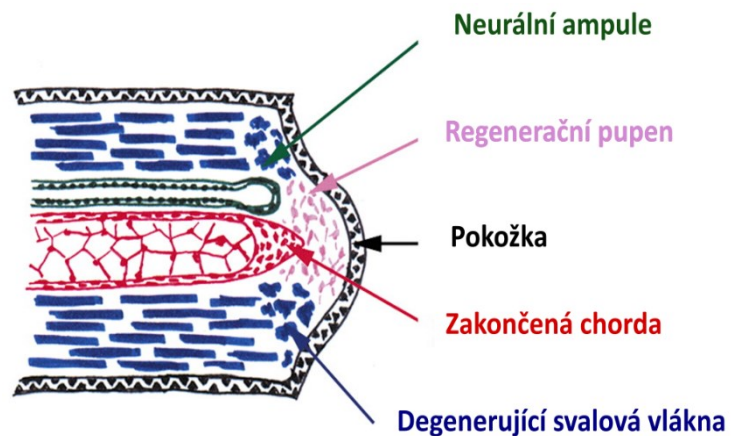
V reakci na zranění ROC migrují do místa amputace, kde slouží jako signální centrum produkující molekuly nezbytné pro regeneraci a proliferaci (Fgf8, Fgf9, Fgf10, Fgf20, Tgf- β , Notch1, Wnt-3a, Wnt-5a, Bmp4, Bmp2, Delta-1, Msx1, Msx2). Tyto buňky lze identifikovat pomocí markerů Lef1 a Tp63 (viz. Obr. 11; Aztekin a kol., 2019). Za mobilizaci ROC v reakci na zranění jsou zodpovědné myeloidní buňky (Aztekin a kol., 2020).

2.2.4.2 Druhá fáze regenerace ocasu

Fáze počínající prvním dnem po amputaci je charakterizována rychlým nástupem buněčné proliferace, která přetrvává až do pozdní fáze regenerace (Chang a kol., 2017).

V místě amputace se dále formuje regenerační pupen (viz. Obr. 12). Je to vysoce dynamická struktura tvořená směsí nediferencovaných buněk, zakončenou chordou, degenerujícími svalovými vlákny, neurální ampulí na konci míchy a skupinou prekursorových buněk, které proliferují a nahradí tak poškozenou chordu i míchu.

Pupen ale na rozdíl od klasického regeneračního blastému neobsahuje směs aktivně dediferencujících buněk, které by následně rediferencovaly a obnovily chybějící tkáň. Z tohoto důvodu je regenerace ocasu u pulců zdaleka více podobná mechanismům tkáňové obnovy



Obrázek 12.: Stavba regeneračního pupenu (upraveno dle Gargioli a Slack, 2004).

u savců než mechanismům regenerace, kterou pozorujeme obecně u obojživelníků (Gargioli a Slack, 2004).

Nezastupitelnou roli hraje v regeneraci ocasu i změna v membránovém potenciálu. Ocas pulce je v klidu polarizovaný, krátce po amputaci dojde k náhlé depolarizaci a v průběhu 24 hpa následně repolarizuje činností V-ATPázy.

Změna membránového potenciálu je v tomto procesu natolik důležitá, že aktivace protonových pump sama o sobě stačí k indukci regenerace i u pulců v refraktorním období (Adams a kol., 2007).

2.2.4.3. Třetí fáze regenerace ocasu

Ve třetí neboli pozdní fázi regenerace, počínaje 48 hpa, přetrvává proliferace a nastupuje buněčná diferenciace. Dochází k přestavbě tkání a růstu, nahrazují se chybějící části chordy, míchy, svaloviny a vaskulatury.

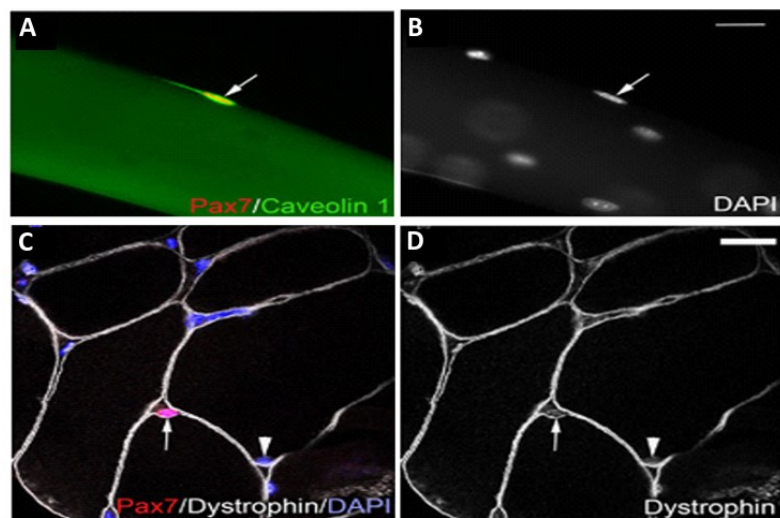
Mícha regeneruje z buněk neurální ampule, chorda obdobně zase z prekurzorových buněk své koncové části, aniž by zde docházelo k rediferenciaci (Gargioli a Slack., 2004).

Významným milníkem ve studiu regenerace byl objev satelitních buněk, poprvé byly rozpoznány u žab, a záhy na to se potvrdil jejich výskyt i u plazů, ptáků a savců.

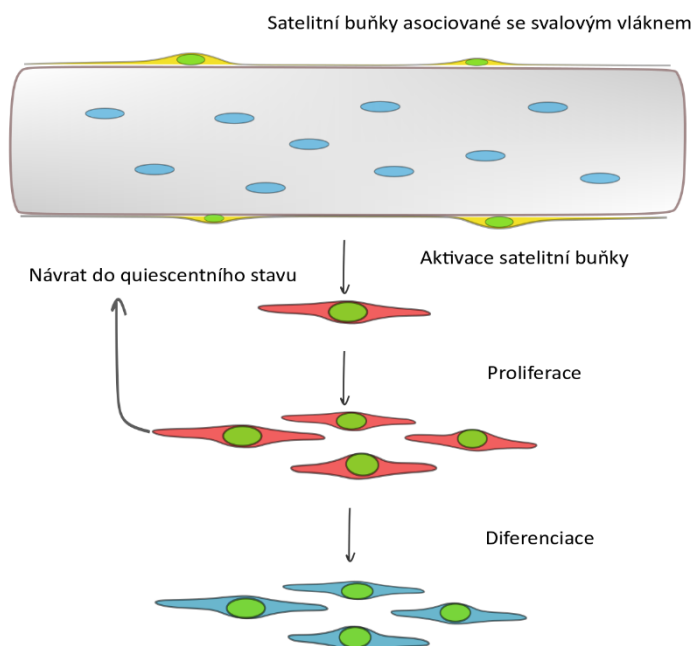
Tyto quiescentní buňky perzistují vmezeřené mezi svalová vlákna a bazální laminu a jsou schopny nahradit poškozená svalová vlákna (viz. Obr. 13; Mauro, 1961; Church, 1969; Chen a kol., 2006).

Quiescentní i právě aktivované satelitní buňky lze snadno identifikovat díky expresi proteinu Pax7.

Jedná se o jeden z transkripčních faktorů z rodiny Pax (paired box), jež hrají důležitou roli v časném embryonálním vývoji a organogenezi (Basch a kol., 2006). Pax7 je zcela nezbytný pro specifikaci populace satelitních buněk (Seale a kol., 2000).



Obrázek 13.: Nika satelitních buněk na povrchu svalových vláken buněk u myši. Pozorujeme zde červeně barvený Pax7 (A, C) zobrazující jádra satelitních buněk, a zeleně barvený caveolin 1 (A). Dále bíle barvený dystrophin (C, D) vymezující plasmalemu svalových vláken (upraveno dle Relaix a Zammit, 2012).



Obrázek 14.: Satelitní buňky v rámci regenerace ocasu. Tyto buňky jsou asociované se svalovým vláknem a v reakci na zranění se aktivují a diferencují v myoblasty.

V reakci na poranění se tyto buňky aktivují, znovu vstoupí do buněčného cyklu, proliferují a diferencují v myoblasty. Většina těchto buněk pak fúzuje, tvoří myofibrily a nahradí tak poškozenou svalovinu (viz. Obr. 14; Church, 1969; Bischoff, 1986). Menší část satelitních buněk je zadržena v místě původu, kde obnoví původní populaci (shrnutí v Chargé a Rudnicki, 2004). Závěrem je nutno podotknout, že regenerace ocasu u pulců je v mnoha směrech unikátní. Pro regeneraci končetin

u čolků i u žab je typická tvorba regeneračního blastému, kde buňky dediferencují a následně rediferencují. V regeneraci ocasu u pulců dediferenciací a následnou rediferenciací nepozorujeme, buňky pouze degenerují a tkáň se obnovuje z populací progenitorových buněk. Tento způsob regenerace je tak blízký savčímu modelu jen s vyšší regenerační kapacitou, což podněcuje výzkumné týmy k dalšímu studiu (Gargioli a Slack, 2004; Chen a kol., 2006).

2.2.4.4 Klíčové signální molekuly

Pro úspěšnou regeneraci je mimo jiné zapotřebí aktivace již zmiňovaných signálních drah, z nichž většina je spojena i s embryonálním vývojem.

V procesu regenerace již byla popsána funkce značného množství molekul, stále však není přesně známo, jakým způsobem jsou tyto mechanismy koordinovány.

V první fázi regenerace hraje podstatnou roli signalizace Tgf- β (viz. Obr. 15). Tato dráha funguje prostřednictvím aktivace serin/threonin kinázových receptorů, které fosforylují cílové komponenty a ty se následně translokují do jádra.

Aktivace Tgf- β je nezbytná pro zacelení rány a epidermální hojení ihned po amputaci a následně i pro buněčnou proliferaci (Ho a Whitman, 2008).

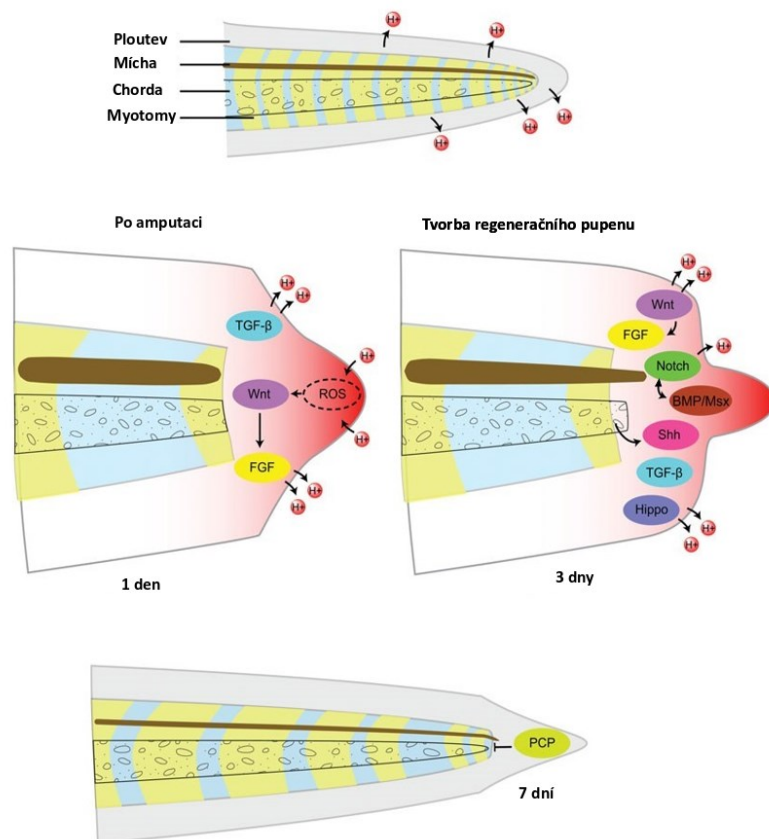
Po ustanovení regeneračního pupenu je zapotřebí aktivace signálních drah kontrolujících buněčnou proliferaci a růst. Jednou z klíčových signálních molekul je Bmp (viz. Obr. 15) patřící do nadrodiny Tgf- β . Bmp signalizace je zprostředkována

aktivací povrchových receptorů, které aktivují cytoplazmatické

proteiny Smad, ty následně migrují do jádra a ovlivňují cílové komponenty. Bmp je v ocasní tkáni exprimován 24 hpa, a zejména v oblasti chordy a míchy pak podmiňuje buněčnou proliferaci, která je při inhibici Bmp značně utlumena (Beck a kol., 2006).

Zajímavé ale je, že aktivace Bmp signalizace u pulců v refraktorním období umožní po amputaci indukci regenerace u všech tkání ocasu (Beck a kol., 2003).

Další podstatnou součástí je Notch signalizace (viz. Obr. 15), která je podobně jako Bmp pro regeneraci esenciální a je aktivována rovněž 24 hpa. Aktivace Notch v refraktorním období vyústí ve částečně regenerující ocas, který postrádá svalovou tkáň a ploutve, což naznačuje, že Bmp signalizace předchází Notch (Beck a Slack, 2002; shrnuto v Slack a kol., 2008).



Obrázek 15.: Signalizace v rámci regenerace ocasu. Regenerace ocasu je koordinována vzájemně se ovlivňujícími signálními drahami jako Tgf- β , Wnt, Fgf, Bmp, Notch, Shh, Hippo, PCP atd. Na aktivaci těchto kaskád se zároveň podílí např. působení ROS (upraveno dle Li a kol., 2016).

Bmp dále ovlivňuje expresi transkripčního faktoru Msx1 (viz. Obr. 15). Ten hraje prokazatelnou roli v regeneraci nejen u žab (Kumar a kol., 2004; Beck a kol., 2003). Zdá se, že funkce Msx1 tkví v inhibici buněčné diferenciace. Důkazem, že Bmp funguje v signální kaskádě nad Msx1, je specifická inhibice Bmp, kdy dochází i k potlačení exprese Msx1. Na druhou stranu aktivace Msx1 u pulců v refraktorním období podněcuje plnou regeneraci, což naznačuje, že Msx1 může v růstu ocasu po amputaci zastoupit funkci Bmp (Beck a kol., 2006).

Další klíčové komponenty regenerace ocasu jsou kanonická dráha Wnt/ β -katenin a Fgf (viz. Obr. 15). Inhibice obou těchto drah separátně vede k potlačení regenerace. Exprese Fgf je regulována Wnt, zároveň jsou pak obě tyto signální dráhy ovlivňovány Bmp (Lin a Slack., 2008).

V procesu regenerace ocasu byla rovněž prokázána i role nekanonické Wnt/Jnk dráhy, která je indukována Wnt-5a, přičemž studie naznačují, že nekanonická dráha Wnt je klíčová pro prvotní zotavení po zranění. Tato dráha mimo jiné aktivuje PCP signalizaci (viz. Obr. 15), jež je důležitá pro buněčnou migraci a růst v rámci regenerace (Sugiura a kol., 2009; Beane a kol., 2012). Podobnou úlohu má i signální dráha Hippo (viz. Obr. 15), která funguje v regulaci orgánového růstu, jeho tvaru a velikosti (Hayashi a kol., 2014).

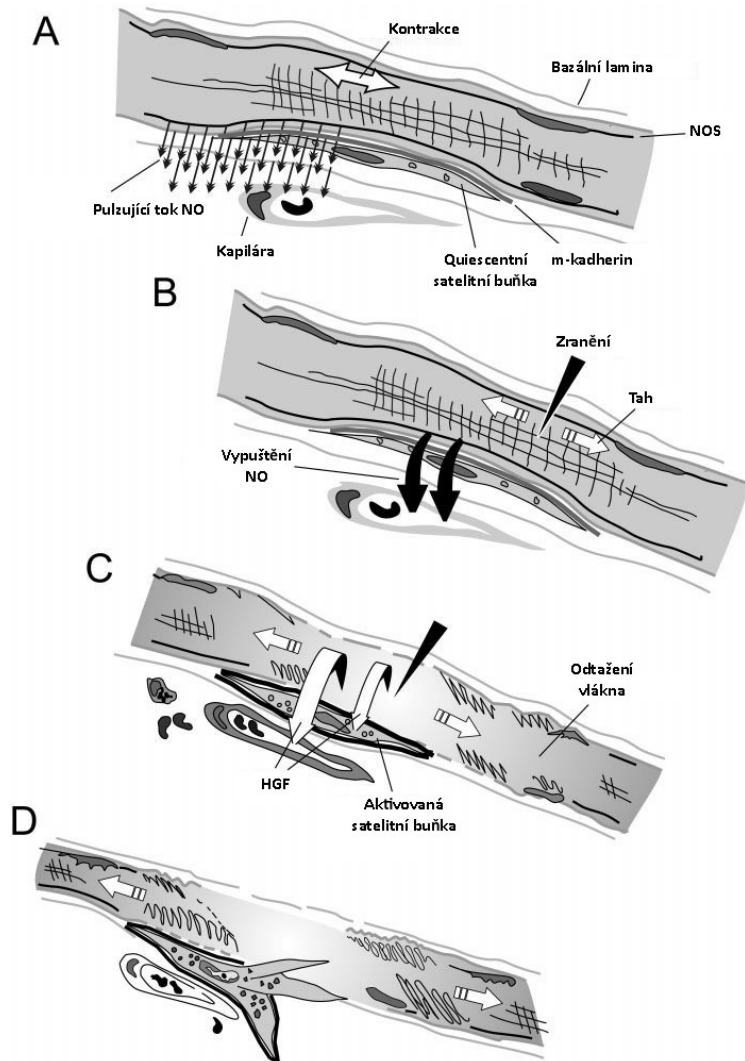
Neméně důležitá je i místně specifická exprese Shh v oblasti chordy. Ta má vliv na proliferaci a diferenciaci v regenerujícím ocasu (Taniguchi a kol., 2017).

Kapitolu týkající se signálních molekul v regeneraci ocasu završím zmínkou o oxidu dusnatém. NO je bezbarvý plyn s významnou rolí v mnoha biologických procesech savců i obojživelníků. Pro regeneraci je zásadní a nepostradatelný především v procesu epidermálního hojení. V počáteční fázi regenerace se podílí na regulaci angiogeneze a samotného zánětu (Schäffer a kol., 1996; Tománková, 2019). Ve vysokých koncentracích však NO působí naopak inhibičně (Franchini a Bertolotti, 2011).

NO je v organismu produkován přeměnou L-argininu na L-citrulín třemi typy syntáz oxidu dusnatého – jmenovitě nNOS, eNOS a iNOS. Aktivace eNOS a nNOS je závislá na Ca^{2+} , které zprostředkují aktivaci kalmodulinu. iNOS je naproti tomu Ca^{2+} independentní a kalmodulin váže konstantně (shrnuto v Alderton a kol., 2001). Hlavním producentem NO v průběhu první fáze hojení jsou makrofágy (Lee a kol., 2001).

Nicméně u všech tří syntáz byla prokázána jejich exprese i v kožních buňkách žab a myši, a u myši navíc i jejich účast v regeneraci (Frank a kol., 2002; Tománková, 2019).

U žab je v tomto směru zapotřebí dalších studií. Nicméně na základě podobnosti způsobu hojení poškozeného ocasu u žab a regenerace u savců lze předpokládat obdobnou funkci všech tří syntáz i v hojení žabí pokožky.



Obrázek 16.: Aktivace satelitních buněk prostřednictvím nNOS. (A) V klidovém stavu je quiescentní satelitní buňka vymezena m-kadherinem a pulzující tok NO na ně nemá vliv. (B) V reakci na zranění je NO vypuštěn do okolí satelitních buněk. (C) Satelitní buňky jsou aktivovány, dochází ke změně morfologie a adhezivitu. Aktivuje se Hgf, který je dále schopen rekrutovat další satelitní buňky i v intaktních svalových vláknech. (D) Satelitní buňka získává motilitu (upraveno dle Anderson, 2000).

nNOS i v pokožkových buňkách žabích embryí.

Yamasaki a kol. (1998) a další prokázali význam funkce iNOS v průběhu epidermálního hojení u myši po poranění. Tato NO syntáza hraje hlavní roli. Menší význam v regeneraci je pak připisován i eNOS (Ställmeyer a kol., 2002).

Co se týče poslední syntázy oxidu dusnatého, nNOS, její exprese je ihned po zranění potlačena a poté postupně upregulována v průběhu regenerace, což ukazuje na její vliv spíše v rámci buněčné proliferace než hojení (Boissel a kol., 2004). Stěžejní role nNOS byla prokázána v regulaci aktivace satelitních buněk prostřednictvím snížení jejich adheze, změnou tvaru a zvýšenou proliferací (viz. Obr. 16; Anderson, 2000; Buono a kol., 2012).

Tománková a kol. (2017) před nedávnem potvrdili expresi

3. Cíle práce

Jak již bylo zmíněno, Sertoliho buňky disponují imunomodulační a signalizační funkcí i po alogenních i xenogenních transplantacích. V laboratoři školitele se podařilo ustanovit buněčnou linii XtiSC odvozenou z varlat juvenilního samce. Tyto buňky vykazují multipotentní diferenciační potenciál a charakteristiky MSC.

Cílem mé práce bylo prověřit, zda XtiSC mají regenerační potenciál v reakci na amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis*. Za tímto účelem jsme stanovili dílčí cíle práce:

- Prokázat, zda u *X. tropicalis* existuje refraktorní fáze, kdy fyziologicky nedochází k regeneraci ocasu po amputaci podobně jako je tomu u příbuzného druhu *X. laevis*.
- Prokázat schopnost XtiSC přežít v organismu po alogenní transplantaci
- Prokázat *in vivo* migratorní potenciál XtiSC do místa poranění po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis* a *X. laevis* z pohledu role NO signalizace
- Prokázat, zda XtiSC mají přímý či nepřímý pozitivní vliv na počet svalových satelitních buněk z pohledu regenerace svalové hmoty po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis*

4. Materiál

4.1 Živý materiál

4.1.1 Pokusná zvířata

Pro IVF byly použity žáby *X. tropicalis* kmene Nigerian Strain pořízené od společnosti European Xenopus Resource Centre (Portsmouth). V transplantačních experimentech byli použiti pulci ve stádiu 47 – 50.

4.1.2 Buněčná kultura

V laboratoři vývojové biologie byla založena buněčná kultura XtiSC z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* kmene Ivory Coast stáří 5 – 6 měsíců.

4.2 Média

Kultivační médium

L-15 Leibovitz (Sigma-Aldrich)	33,33%	(150 ml)
RPMI 1640 HEPES mod. (82 mg/ml)(Sigma-Aldrich)	33,33%	(30 ml)
FBS (Life Technologies)	10%	(45 ml)
glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich)	1%	(4,5 ml)
7,5% NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich)	0,13%	(8 ml)
gentamycin (64 g/ml)	0,005%	(360 µl)
pyruvát sodný (1 mM) (Sigma-Aldrich)	0,66%	(3 ml)
2-mercaptoetanol (0,1 mM) (Sigma-Aldrich)	0,26%	(1,2 ml)
deionizovaná H ₂ O	46,20%	(207,9 ml)

4.3 Roztoky

4.3.1 Roztoky pro IVF a tranplantace

- 20× MMR (2M NaCl; 40 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 40 mM CaCl₂; 100mM HEPES; deionizovaná H₂O; pH 7,7 – 7,8)
- 0,05× MMR (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizované H₂O; pH 7,7 – 7,8)
- 1× MMR + Gentamycin (5 ml 20× MMR; 95 ml deionizované H₂O; 100 µl Gentamycinu; pH 7,7 – 7,8)
- 0,05× MMR + Gentamycin (2,5 ml 20× MMR; 997,5 ml deionizované H₂O; 1 ml Gentamycinu; pH 7,7 – 7,8)
- 1% roztok agarózy v 0,05× MMR

- 2,2% roztok cysteinu (0,5 ml 20× MMR; 99,5 ml deionizované H₂O; 2,2 g L- cysteinu; pH 7,7 – 7,8)
- 0,2% MS-222 = uspávací roztok (2 g MS-222; 0,2 g NaHCO₃; 100 ml destilované H₂O)
- 0,4% MS-222 = usmrcovací roztok (2 g MS-222; 2 g NaHCO₃; 500 ml destilované H₂O)

4.3.2 Další roztoky

- CUBIC I (175 ml H₂O; 125 g urea; 124 ml 4NTEA; 70 ml TritonX-100)
- CUBIC II (130 ml H₂O; 125 g urea; 44,5 ml TEA; 250 g sacharózy; 380 µl TritonX-100)
- Fixační roztok (800 µl PBS; 100 µl MEMFA; 100 µl 38% formaldehydu)
- Griessova reakce - roztok A (0,5g sulfonylamidu; 1,5 ml H₃PO₄; 48,5 ml H₂O) a roztok B (0,15 g N-1-naphtylendiamine dihydrochloride; 1,5 ml H₃PO₄; 48,5 ml H₂O)
- MEMFA (0,1 M MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 3,7% formaldehyd)
- PBS (136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 2,25 mM KH₂PO₄; pH 7,35)
- 2/3 PBS (2 díly PBS : 1 díl H₂O)
- TNB (3,63 g Tris báze; 2,63 g NaCl; 1,5 g Blocking Reagent; 300 ml H₂O; Ph 7,5)

4.4 Analýza DNA

4.4.1 Izolace RNA

- RNeasy® Mini Kit (74104; Qiagen)
- RNase-Free DNase Set (79254; Qiagen)

4.4.2 Příprava cDNA

- RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Synthesis Kit (K1632; Thermo Scientific)

4.4.3 RT-PCR

- 10x Taq pufr s KCl (Thermo Scientific)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific)
- 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific)
- Taq DNA polymeráza 5 U/µl (EP0402, Thermo Fisher Scientific)

Gen	přední primer	Velikost produktu (páry bazí)
	zadní primer	
<i>bmp2</i>	GCCGAGCAAACACCGTTAG	188
	GCTGCTGTCACCCTCAAATG	
<i>bmp4</i>	AGCGGAGGAGGAGGATGAA	170
	CTGGAATGCTGCTGAGGTTG	
<i>delta-1</i>	GCACCAACTCCTTCGTGTA	300
	AGCCTTCCCCGTAGTAGTGT	
<i>fgf8</i>	GTCATCTGCCTACAAGCCA	322
	GCGAACTCTGCTTCCAAACG	
<i>fgf9</i>	CGAAGGAGGCAGCTCTATTG	190
	ACAGCTCCCCCTTTTCATTCA	
<i>fgf10</i>	GAAAGTCCAGGGTCCCGTTG	329
	GAGCTTCTACTCCGCACG	
<i>fgf20</i>	ACAGGTAGGCTCCACTTCT	429
	AGTACCGCCTTCCAGAGTCT	
<i>lef1</i>	CCCAGTAGCAACAGTCACGA	481
	TGTCATCTGGCCCACTTC	
<i>msx1</i>	GAAAGAGACCTGTCCAGCCC	388
	GGTTGAGGGAGCTGGAGAAC	
<i>msx2</i>	CCAACAGAAAGCCCAGGACT	324
	TGGGAAGGACTGGTCTGTGA	
<i>notch1</i>	CGCCCCGACTTTATCTCCTC	374
	CCATTTCCCTGCTTGTGGCC	
<i>tgf-β1</i>	GGTGCTGCATCTTTCCACTT	1026
	TCCAGGACATCAGGAACACA	
<i>tp63</i>	CAGATTGCCAAAACCTGCC	494
	GTGCTGTCGGAAACTTGCTG	
<i>vim</i>	CCTCTTTGGCACGTATTGACTT	464
	TCTCCTCCATTTCTCGCATTTG	
<i>wnt-3a</i>	TTGCCGTTACCAGATCCTGC	388
	CCCCGGGATTCTCGATGTTT	
<i>wnt-5a</i>	GAACCTGCACAACAACGAGG	409
	CCGCTCAGTCTGTACCGTTT	

Tabulka 2.: Seznam použitých primerů.

4.5 Fluorescenční barvení

Antigen	Hostitel	Výrobce	Ředění
Kl67	Rabbit	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:7
iNOS	Mouse	Thermo Fisher Scientific	1:1000
nNOS	Mouse	Enzo Life Sciences	1:150
Pax7	Rabbit	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:30
RFP	Rabbit	Evrogen	1:5000
RFP	Mouse	Thermo Fisher Scientific	1:500
Rabbit IgG- Alexa Fluor® 594 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500
Rabbit IgG- Alexa Fluor® 488 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500
Mouse IgG- Alexa Fluor® 488 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500
Mouse IgG- Alexa Fluor® 594 conjugate	Goat	Thermo Fisher Scientific	1:500

Tabulka 3.: Seznam použitých primárních a sekundárních protilátek.

4.6 Chemikálie a ostatní materiál

- Agaróza 50004 (Lonza)
- Low melting agarose (Carl Roth)
- Bromfenolová modř (50% glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12% BFM) (Sigma Aldrich)
- Cystein C7352 (Sigma-Aldrich)
- DAF-2DA 85165 (Cayman chemicals)
- DAPI DES1000L (Intimex)
- 6× DNA Loading Dye R0611 (Fermentas)
- Interferon γ (Peprotech)
- 38% Formaldehyd 30251 (Lach-Ner)

- 2% Gelatin solution (G1393-100ML, Sigma-Aldrich)
- Gene Ruler DNA Ladder mix (SM0333, Fermentas)
- Gentamycin – Gentaveto – 5 (V.M.D.)
- Lidský hCG C1063 (Sigma-Aldrich)
- Lipopolysacharid (Sigma-Aldrich)
- 15 mM NH₄Cl
- Montovací médium (Mowiol/DAPI)
- MS-222 (Sigma-Aldrich)
- N-1-naphtylendiamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)
- Papain preparation (61,25 µg/ml) (L2223, Biochrom AG)
- Sítka pro barvení řezů 30 µm (pluriSelect)
- Skleněné kapiláry typu 1-000-0500 (Drummond)
- Sulfonylamid (Sigma-Aldrich)
- Supernatant izolovaný ze splenocytů (Laboratoř imunoregulací, PŘF UK)
- 0,5% Triton X -100 v 2/3 PBS
- Trypan Blue stain 0,4% (T 10282, Life Technologies™)
- 0,1% Tween v PBS

4.7 Použité přístroje

- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)
- Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen)
- Flow box EM Box 120 (Schoeller Instruments)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX40F (Olympus Optical)
- Fluorescenční stereomikroskop Olympus SZX16 (Olympus Optical)
- Inverzní mikroskop Olympus IX 71 (Olympus Optical)
- Lightsheet mikroskop Z.1 (Zeiss)
- MCO-19 AIC Sterisonic® UVH Incubator (Panasonic)
- Mikroinjektor IM 400 se sacím modulem IM 400B (Narishige)
- Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop)
- Programmable Thermal Controller PTC – 100TM (Biotech)
- Spektrofotometr OpsysMR (Dynex)

- Stereomikroskop Stemi 2000 (Zeiss)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Vibratom (Leica 1200)
- Vodní lázeň Techne TE 10D Tempette® (Techne)
- Vortex Ika Works Minishaker MS1 (Ika Works)
- Vyhřívaný blok Eppendorf ThermoStat Plus (Eppendorf)
- XP cycler (BIOER)

5. Metody

5.1 Kultivace a příprava XtiSC

V laboratoři školitele se podařilo založit buněčnou kulturu XtiSC z varlat juvenilního samce *X. tropicalis* Ivory Coast stáří 5 – 6 měsíců.

Pro usnadnění transplantačních experimentů byla následně pomocí nukleofekce vytvořena transgenní linie XtiSC-RFP exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem. Tyto buňky byly následně sortovány pomocí FACS za účelem získání populace s nejvyšší intenzitou RFP signálu.

Výsledná buněčná linie XtiSC-RFP byla dále kultivována v kultivačním médiu v termostatu při 29,5° a 5,5% atmosféře CO₂. Buněčná kultura byla pravidelně jednou do týdne pasážována. Po odsátí média z lahve byl nanesen roztok papainu, po 10 minutách inkubace byla buněčná suspenze přenesena do zkumavky s 5 ml kultivačního média a následně zcentrifugována (5 minut při 900 rpm). Po odlití supernatantu byla peleta resuspendována v 1 ml kultivačního média, z čehož 200 µl se vrátilo zpět do kultivační lahve spolu s 15 ml čerstvého média. Zbylé buňky v médiu bylo možno použít pro imunocytochemické barvení. Pro transplantační experimenty byly buňky znovu zcentrifugovány (5 minut při 900 rpm) a resuspendovány v 1 ml 2/3 PBS.

Pro všechny následující experimenty v této diplomové práci byly použity XtiSC-RFP, dále zkracovány jako XtiSC.

5.2 RT-PCR

Pro izolaci RNA z buněk byl použit RNeasy® Mini Kit (74104; Qiagen) a RNase-Free DNase Set (79254; Qiagen) dle přiloženého návodu. Koncentrace získané RNA byla následně změřena na Nanodropu® ND-1000 (NanoDrop) při vlnové délce 260 nm. Výsledná RNA pak byla použita pro tvorbu cDNA pomocí RevertAid H Minus FirstStrand cDNA Synthesis Kit (K1632; ThermoScientific) dle přiloženého návodu, přičemž vstupní koncentrace činila 200 ng. Pro kontrolu možné kontaminace templátu byla vytvořena cDNA bez přidání reverzní transkriptázy. Jako pozitivní kontrola pro PCR reakci byl použit gen *vim* kódující protein vimentin.

Sekvence daných genů byly získány z databází Ensembl (www.ensembl.org) a Xenbase (www.xenbase.org). Pro samotné navržení primerů pak byl použit program Primer3 (www.primer3.ut.ee) v kombinaci s programem Oligo Calculator (www.biotech.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) a FastPCR (www.primerdigital.com/fastpcr.html).

Složky reakční směsi:

- 37,5 µl H₂O
- 5 µl 10x Taq pufru s KCl (Thermo Fisher Scientific)
- 3 µl 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl 10 µM předního primeru (F)
- 1 µl 10 µM zadního primeru (R)
- 1 µl 10 mM dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific)
- 1 µl templátu (ss cDNA)
- 0,5 µl Taq DNA polymerázy 5 U/µl (EP0402, Thermo Fisher Scientific)

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
Start reakce	94°C	1 min	1
Denaturace	94°C	30 s	35
Nasedání primerů	60°C	1 min	
Syntéza	72°C	1 min 30 s	
Konečná syntéza	72°C	5 min	1

Tabulka 4.: Podmínky PCR reakce.

PCR amplifikáty byly následně obarveny bromfenolovou modří (3 μ l na 10 μ l vzorku) a detekovány na 1,5% agarózovém gelu s obsahem ethidium bromidu pomocí elektroforetické analýzy.

5.3 Imunocytochemické barvení

Pro imunocytochemické barvení byla kapka s obsahem zhruba 10 000 buněk (15 μ l) přenesena na krycí sklíčko do 1 ml kultivačního média do 24-jamkové destičky.

Takto připravené buňky byly přes noc inkubovány a druhého dne fixovány ve 2% formaldehydu (20 minut). Následně bylo sklíčko promyto PBS (3x 5 minut) a inkubováno v 15mM NH₄Cl (5 minut).

Po promytí byly buňky permeabilizovány pomocí 0,5% roztoku Tritonu X-100 (2 minuty), opět promyty PBS (3x 5 minut) a následně inkubovány v TNB (30 minut).

Po aplikaci primární protilátky ředěné v TNB byly buňky inkubovány (1.5 hodiny při RT).

Následně byly buňky promyty v PBS (5x 5 minut) a inkubovány v sekundární protilátce v TNB v temné komůrce (1.5 hodiny při RT). Po opětovném promytí (5x 5 minut) byla sklíčka montována na podložní skla do kapky Mowiol/DAPI. Poté byly buňky nasnímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX40F (Olympus Optical).

5.4 Měření produkce oxidu dusnatého

Pro měření produkce NO u XtiSC byly buňky přeneseny v kultivačním médiu na 12-jamkovou destičku samostatně, s přídatkem IFN- γ , lipopolysacharidu a supernatantu izolovaného ze splenocytů. Po 48 hodinách inkubace byl supernatant odebrán a za pomoci Griessovy reakce byla stanovena koncentrace NO, přičemž kultivační médium sloužilo jako kontrola.

Jako standard byl použit roztok NaNO₃ (Sigma-Aldrich). Do 96-jamkové destičky bylo postupně nanášeno 100 μ l jednotlivých vzorků a standardů včetně kontroly, k nimž bylo přidáno 50 μ l roztoku A a B. Po inkubaci (5 minut) byla změřena koncentrace NO na spektrofotometru (OpsysMR) při vlnové délce 570 nm.

Ke stanovení produkce NO *in vivo* u pulců *X. tropicalis* bylo použito DAF-2DA. Pulcům ve stádiu 47 – 50 byla po mikroinjekci XtiSC pomocí skalpelu amputována 1/3 ocasu. Jako kontrola pak byli barveni pulci bez amputace s mikroinjikovanými buňkami. Intaktní pulci sloužili jako negativní kontrola.

Produkce NO byla zaznamenána u pulců v čase 0h, 6h, 24h, 72h a 7 dní po mikroinjekci. Zásobní roztok DAF-2DA (5mM v DMSO) byl naředěn 1:150 v 0,05x MMR a použit k inkubaci pulců po dobu 15 minut. Poté byli pulci 30 minut fixováni ve fixačním roztoku. Následovalo promytí pulců v 1x PBS (3x 5 minut) a snímání pomocí fluorescenčního stereomikroskopu.

5.5 Transplantace XtiSC do pulců *X. tropicalis*

Pro transplantaci XtiSC byli použiti pulci ve stádiu 47 – 50. Pro tyto pokusy byli pulci získáváni pomocí IVF. Pro stimulaci ovulace bylo večer předem čtyřem samicím *X. tropicalis* injikováno 30 mezinárodních jednotek (IU) hCG a 300 IU druhý den ráno.

Po 4-6 hodinách byly samice připraveny ke kladení. Pro oplození vykladených oocytů byla samci *X. tropicalis* odebrána a následně homogenizována varlata v 500 μ l L-15 médiu s 10% FBS. Oocyty byly v 1x MMR rozprostřeny na Petriho misce do jedné vrstvy, na niž byla aplikována směs homogenizovaných varlat (5 min).

Po vazbě spermií k oocytům byl přidán 0,05x MMR (20 min). Po oplození následovala inkubace oocytů v 2,2% roztoku cysteinu (5 min) a promytí v 0,05x MMR (4x). Dále byla provedena opakovaná selekce životaschopných embryí, která byla následně přenesena do 0,05x MMR + Gentamycin na agarózou pokryté Petriho misky.

Takto byla embrya kultivována do třetího dne, kdy byl aplikován 0,05x MMR. Od čtvrtého dne byli pulci kultivováni v tancích ve speciálně upravené vodě filtrované přes aktivní uhlí, aktivně provzdušněné a s přídavkem mořské soli na hladinu konduktivity 1000 μ S/cm. Od tohoto okamžiku byli pulci pravidelně krmeni.



Obrázek 17.: Mikroinjekce buněčné suspenze do dorzální žíly u *X. tropicalis*.

Ve stádiu 47 – 50, tj. zhruba 10 – 21 dní po IVF byli pulci používáni k transplantačním experimentům. Pro samotnou transplantaci byla použita suspenze XtiSC v 2/3 PBS (viz. kapitola 5.1). V den experimentu pulci nebyli krmeni a pro usnadnění manipulace byli na Petriho misce uspáni v 0,2% MS-222. Jednotliví pulci byli přidržováni holdingovou kapilárou po boční straně těla.

Po nasátí buněčné suspenze do skleněné kapiláry bylo pomocí mikroinjektoru IM 400 (Narishige) mikroinjikováno 40 nL (zhruba 1000 buněk) do dorzální žíly u kořene ocasu pulce (viz. Obr. 17). Tato část experimentu vyžadovala přesnou a rychlou manipulaci a časté měnění buněčné suspenze, což zaručovalo přežívání buněk. Po transplantaci a amputaci byli pulci kultivováni v tancích s upravenou vodou a Gentamycinem v koncentraci 50 µg/ml.

5.6 Studium migratorního potenciálu XtiSC po amputaci ocasu

Migratorní potenciál XtiSC byl studován *in vivo* za použití fluorescenčního stereomikroskopu Olympus SZX16 (Olympus Optical). Ihned po transplantaci XtiSC byli pulci děleni do několika skupin.

Pro studium migrace XtiSC byly použity dvě skupiny pulců s transplantovanými buňkami – první, jimž byla skalpelem amputována 1/3 ocasu, a druhá skupina pulců bez amputace. Druhý den při pozorování na fluorescenčním stereomikroskopu byl zaznamenáván počet pulců, u nichž byla pozorována migrace XtiSC do místa zranění, nebo naopak do konce intaktního ocasu. Počty u obou skupin byly následně porovnány statistickou analýzou.

5.6.1 Studium migratorního potenciálu XtiSC v závislosti na NO

Ve spolupráci s Laboratoří genové exprese (Biotechnologický ústav AV ČR) byl dále studován migratorní potenciál XtiSC u pulců *X. laevis* v závislosti na produkci NO. Za tímto účelem byli využíváni pulci *X. laevis* ve stádiu 48 – 50 s vyřazenou funkcí *eNOS* a *nNOS* pomocí morpholino oligonukleotidů. MO byly zakoupeny z Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA) a mikroinjikovány do oplozených oocytů ve stanovené koncentraci. Tuto část experimentu provedl Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Gen	Sekvence MO	Koncentrace na oocyt
nNOS	5'-TGGCTAAAAGAACACAGGACATCAA-3'	17 ng
eNOS	5'-AAAAGCCAAGCACTACTCACCGTTT-3'	34 ng

Tabulka 5.: Seznam použitých morpholino oligonukleotidů (Tománková, 2019).

Takto připraveným pulcům bylo transplantováno zhruba 1000 XtiSC v 2/3 PBS do dorzální žíly (viz. kapitola 5.5). Druhou skupinu pro transplantaci buněk tvořili pulci s normální funkcí NO syntáz. Pulcům obou skupin byla ihned po mikroinjekci amputována 1/3 ocasu pomocí skalpelu.

Po 1 dni byly zaznamenány počty pulců, u nichž byla na fluorescenčním stereomikroskopu pozorována migrace XtiSC do místa amputace. Výsledky byly vyhodnoceny statistickou analýzou.

5.6.2 Lightsheet mikroskopie

Pro zobrazení XtiSC migrujících v ocasu po amputaci byl použit Lightsheet mikroskop Z.1 (Zeiss). Za tímto účelem byl pulec přes noc při 4°C inkubován ve fixačním roztoku. Následně byl promyt v PBS (3x po 5 min) a zalit do 1% Low melting agarózy. Celý blok byl pak inkubován v roztoku CUBIC I (3 dny) a CUBIC II (2 dny) pro projasnění tkáně. Ocas v bloku agarózy byl pak snímán v roztoku CUBIC II (index lomu 1,465). Výsledky byly vyhodnoceny ve spolupráci s Mgr. Zuzanou Burdíkovou, Ph.D.

5.7 Imunohistologické barvení vibratomových řezů

Po mikroinjekci a amputaci byli pulci ve třech skupinách (6hpa, 24hpa, 72 hpa) přes noc inkubováni ve fixačním roztoku při 4°C. Následující den byli promyti v PBS (3x 5 min) a v methanolu (3x 5 minut), v němž byli poté zamrazeni (- 20°C). Takto byli pulci skladováni nejméně 1 den, ale nejdéle 1 rok.

Pro tvorbu řezových preparátů byl pulec rehydratován v methanolové řadě (90, 75, 50, 25% methanol v PBS + 0,1% Tween) po dobu 5 minut. Poté byl pulci amputován ocas, který, pečlivě osušen, byl montován do lékového blistru a zalit 4% Low melting agarózou. Po 10 minutách při RT byl ocas v agarózovém bloku připraven na řezání, nejpozději však do 2 dnů od zalití (v takovém případě byl přechováván v 0,02% azidu v PBS).

Agarózový blok s ocasem pulce byl nařezán na vibratomu na 20 µm příčné řezy ve zchlazeném a filtrovaném PBS. Řezy byly permeabilizovány pomocí 0,1% Tween v PBS (1 hodinu), promyty čistým PBS (3x 5 minut) a blokovány v TNB (1 hodinu). Po 2 noci byly řezy inkubovány v primární protilátce ředěné v TNB ve 4°C. Následovalo promytí PBS (3x 5 minut) a inkubace přes noc sekundární protilátkou v TNB ve 4°C v temné komůrce. Další den byly řezy promyty v PBS (3x 5 minut) a montovány na podložní sklo do 4 kapek Molwio/DAPI.

5.8 Statistická analýza

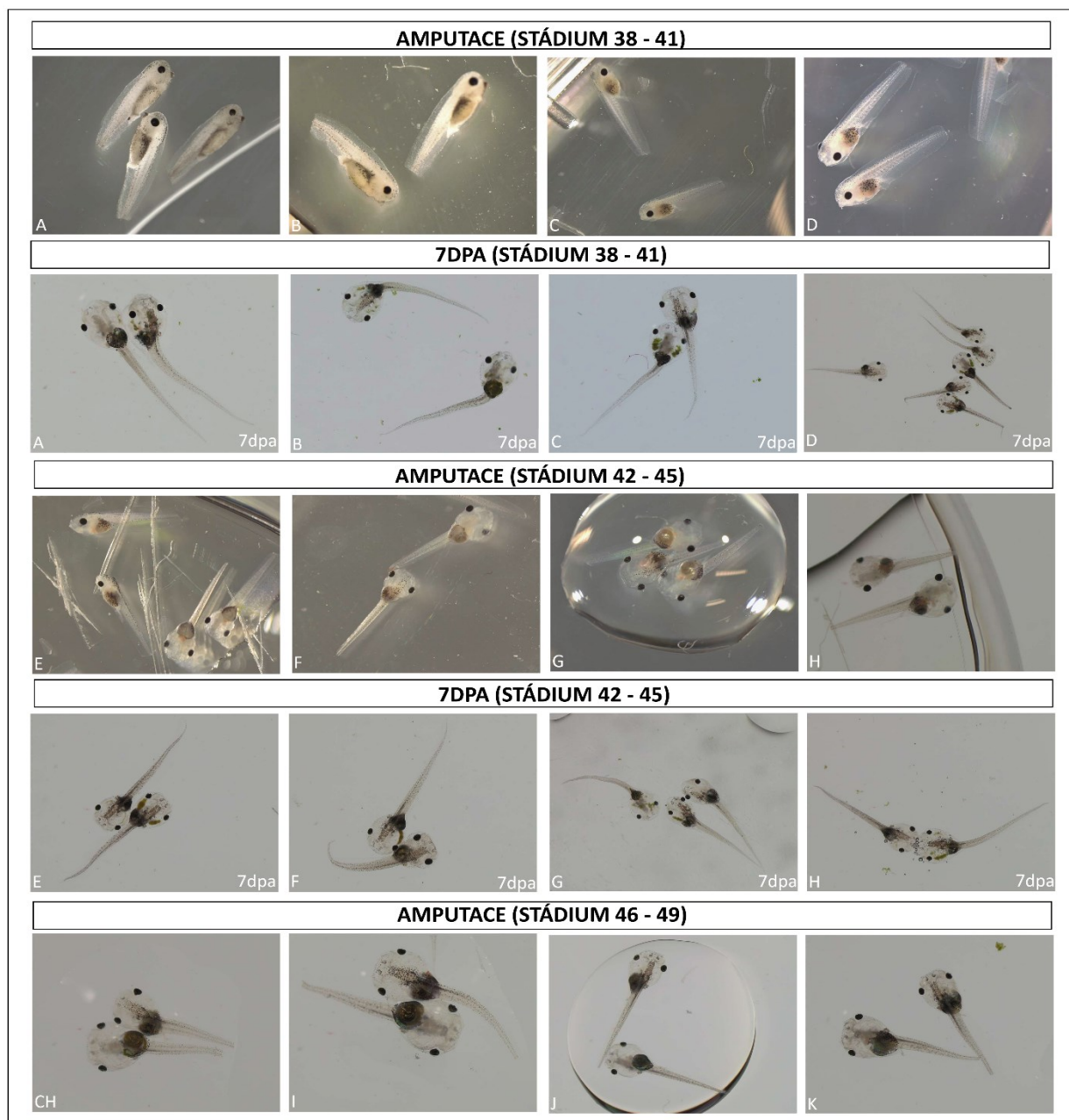
Všechny pokusy byly zopakovány alespoň 3x nezávisle za sebou. K vyhodnocení migratorního potenciálu XtiSC byl použit Fisherův exaktní test. Pro vyhodnocení vlivu XtiSC na počet satelitních buněk byl použit Studentův t-test.

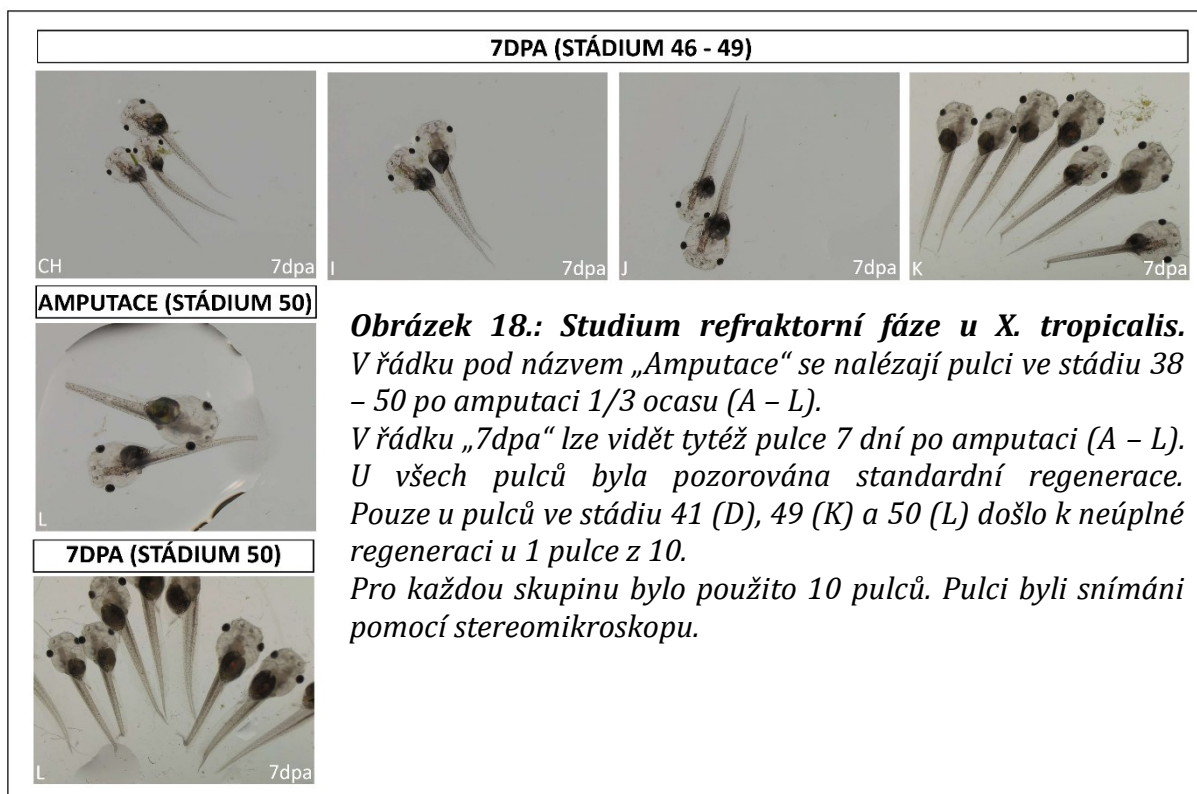
6. Výsledky

6.1 Studium refraktorní fáze u *X. tropicalis*

Refraktorní fáze je krátké období v průběhu vývoje pulce *X. laevis* (stádium 45 – 47), kdy pulec není schopen plně zregenerovat ocas po jeho amputaci (Beck a kol. 2003).

Nicméně u *X. tropicalis* tato fáze prozatím nebyla zaznamenána. Prvním cílem práce bylo prověřit regenerační kapacitu ocasu u *X. tropicalis*. Z tohoto důvodu byla pomocí skalpelu provedena amputace 1/3 ocasu u pulců ve stádiu 38 - 50 a v průběhu 7 dní byla pozorována jejich schopnost ocas zregenerovat. Ve stádiu 41, 49 a 50 u 1 pulce z celkového počtu 10 regenerace neproběhla. Zbylí pulci ocas regenerovali standardně.



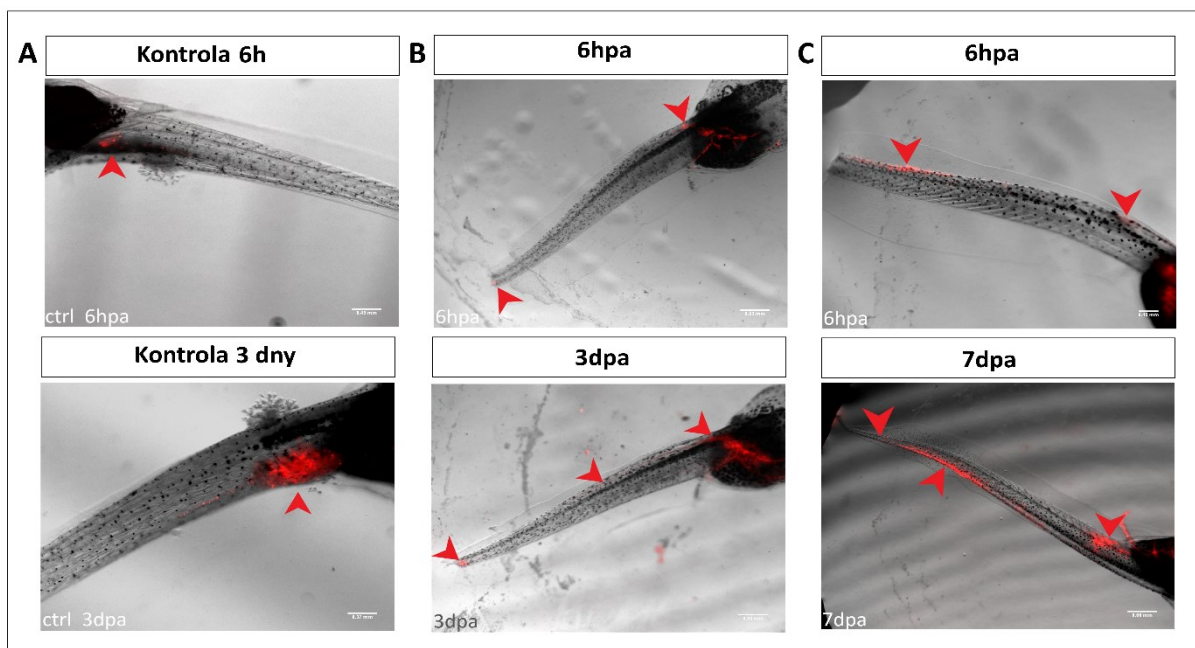


Obrázek 18.: Studium refraktorní fáze u *X. tropicalis*.
 V řádce pod názvem „Amputace“ se nalézají pulci ve stádiu 38 – 50 po amputaci 1/3 ocasu (A – L).
 V řádce „7dpa“ lze vidět tytéž pulce 7 dní po amputaci (A – L).
 U všech pulců byla pozorována standardní regenerace.
 Pouze u pulců ve stádiu 41 (D), 49 (K) a 50 (L) došlo k neúplné regeneraci u 1 pulce z 10.
 Pro každou skupinu bylo použito 10 pulců. Pulci byli snímáni pomocí stereomikroskopu.

Tyto výsledky ukazují, že *X. tropicalis* postrádá refraktorní fázi a představuje tak vhodnější modelový organismus pro studium regenerace po poranění či amputaci ocasu než standardně používaný *X. laevis* (viz. Obr. 18).

6.2 Přežívání XtiSC po transplantaci

V počátku transplantačních experimentů bylo nutno prověřit, zdali jsou XtiSC schopny proliferovat a přežít v organismu po transplantaci *in vivo*. Za tímto účelem byly pulcům *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50 mikroinjikovány XtiSC do dorzální žíly a s pomocí fluorescenčního stereomikroskopu byli tito pulci porovnání 6 hodin, 3 dny a 7 dní po transplantaci. Znatelné namnožení buněk bylo pozorováno již 3. den po transplantaci, a to jak u kontrol, tak i u pulců po amputaci ocasu. Z obrázků je patrné, že buňky ochotně tvoří niku, v níž se množí (viz. Obr. 19).



Obrázek 19.: Přežívání XtiSC po alogenní transplantaci u *X. tropicalis*.

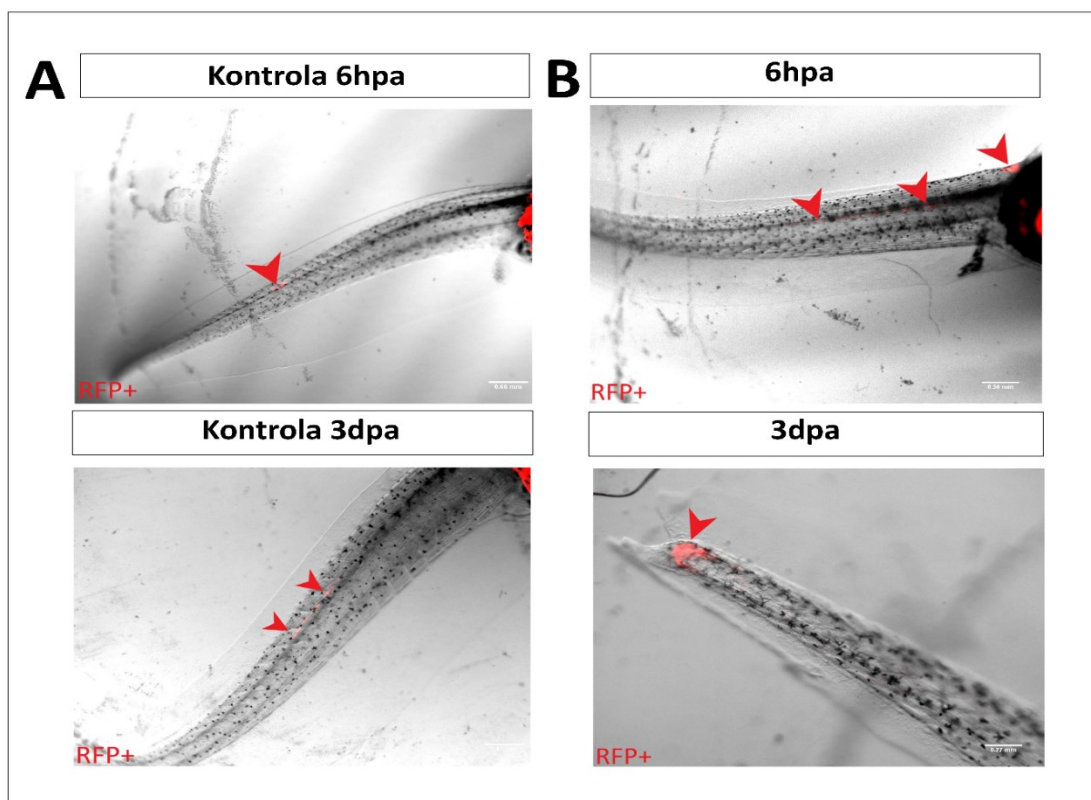
Při porovnání pulců 6h a 3 dny a 6h a 7 dní po transplantaci bylo patrné namnožení buněk již po 3 dnech, a to jak u kontroly bez amputace ocasu (A), tak u pulce s amputací ocasu (B). Zmnožení buněk bylo pozorováno i po 7 dnech od transplantace (C).

Pulci byli snímáni pomocí fluorescenčního stereomikroskopu.

6.3 Studium migratorního potenciálu XtiSC

6.3.1 Studium migratorního potenciálu XtiSC *in vivo* po amputaci ocasu

Po transplantaci XtiSC do dorzální žíly pulců *X. tropicalis* a amputaci 1/3 ocasu pomocí skalpelu byla s pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorována migrace buněk z místa vpichu do místa zranění. V průběhu 1 dne po transplantaci buňky domigrovaly do místa zranění, kde se během 3 dní namnožily (viz. Obr. 20). Migrace XtiSC do místa zranění byla pozorována u pulců s amputací ocasu (úspěšnost migrace do místa zranění byla 65,85%), zatímco u kontrol bez zranění buňky preferenčně zůstávaly v oblasti vpichu (úspěšnost migrace do špičky ocasu byla 7,41%; viz. Tab. 6 a Obr. 21).

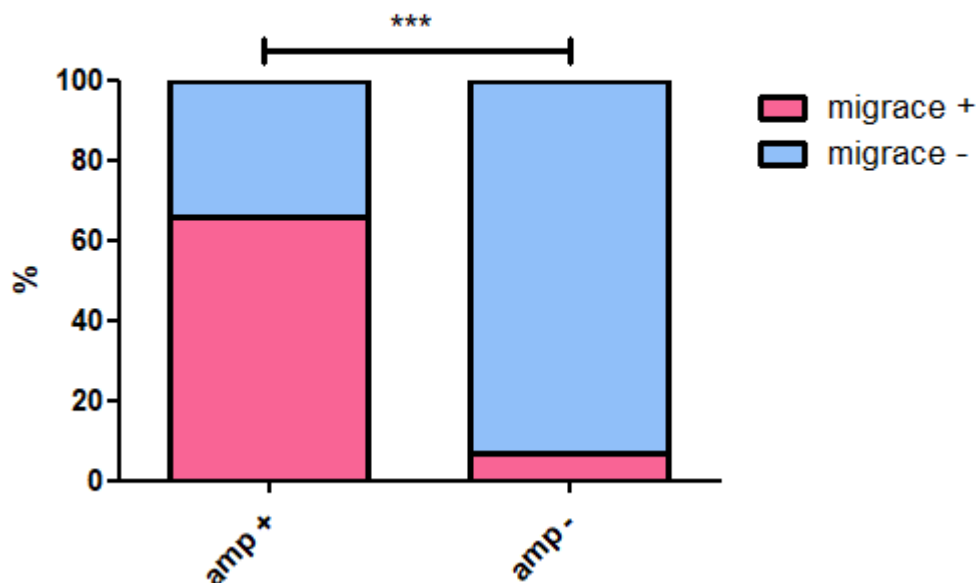


Obrázek 20.: Migrace XtiSC in vivo u *X. tropicalis*. U pulců s amputací ocasu byla pozorována počínající migrace po 6 hodinách, v průběhu 1 – 3 dní buňky akumulovaly ve špičce ocasu (B). U kontrol bez amputace ocasu zůstávaly buňky preferenčně v blízkosti místa vpichu (A). Pulci byli snímáni pomocí fluorescenčního stereomikroskopu.

	Počet pulců s migrací	Počet pulců bez migrace	Celkem
+amputace	27	14	<u>41</u>
-amputace	2	25	<u>27</u>

Tabulka 6.: Migrace XtiSC in vivo u *X. tropicalis*. Porovnání migrace XtiSC do místa zranění u pulců po amputaci 1/3 ocasu (+amputace). Jako kontrola byla použita skupina pulců s transplantovanými XtiSC bez amputace ocasu (-amputace).

Vliv amputace ocasu na migraci XtiSC do místa poranění u pulců *X. tropicalis*

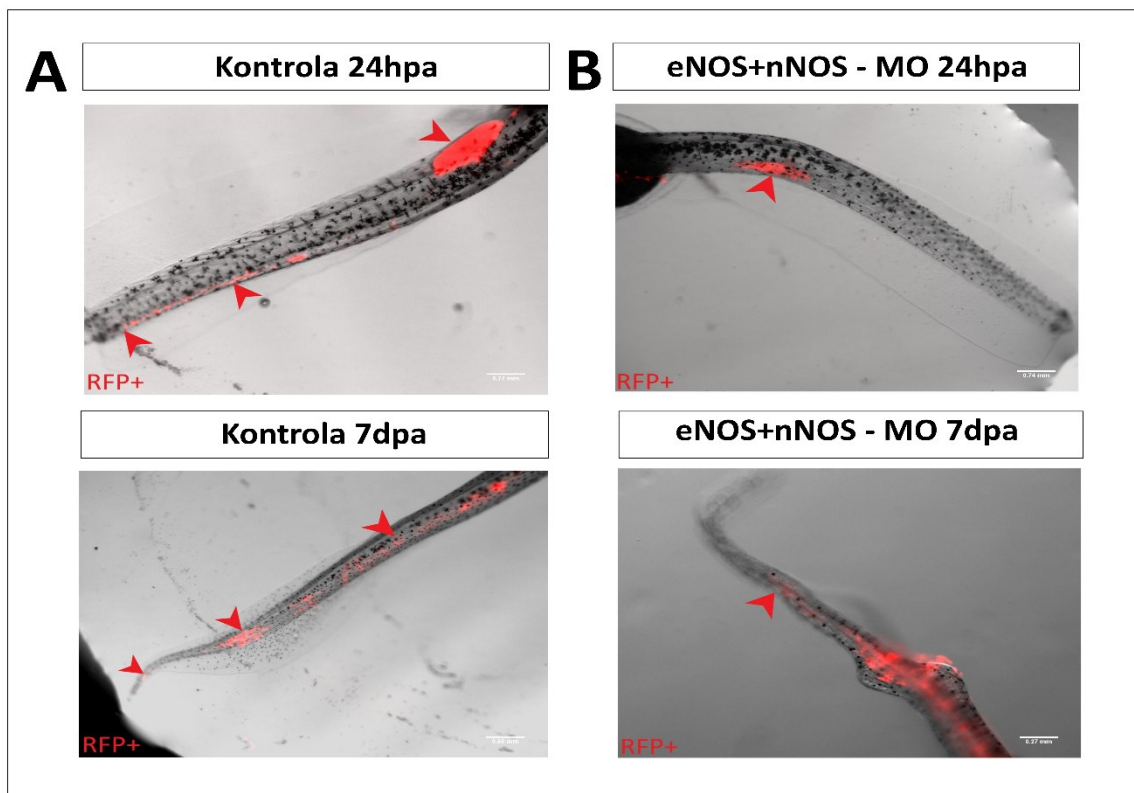


Obrázek 21.: Migrace XtiSC *in vivo* u *X. tropicalis*. Byla pozorována preferenční migrace XtiSC do místa zranění u 65,85% pulců po amputaci ocasu (amputace+). Jako kontrola byla použita skupina pulců s transplantovanými XtiSC bez amputace ocasu (-amputace), u níž byla zaznamenána migrace XtiSC do špičky ocasu u 7,41% pulců. Pro analýzu dat byl použit Fisherův exaktní test s hodnotou statistické významnosti $P < 0,01$.

6.3.2 Studium migratorního potenciálu XtiSC v závislosti na NO *in vivo*

NO je bezbarvý plyn s významnou signální rolí v mnoha biologických procesech. Bylo prokázáno, že NO může mimo jiné ovlivňovat buněčnou migraci (Fuseler a Valarmathi, 2016; Zhan a kol., 2016). Z tohoto důvodu byl ve spolupráci s Laboratoří genové exprese (Biotechnologický ústav AV ČR) dále studován migratorní potenciál XtiSC u pulců *X. laevis* v závislosti na produkci NO. Za tímto účelem byli využíváni pulci *X. laevis* ve stádiu 48 – 50 s vyřazenou funkcí *eNOS* a *nNOS* pomocí morpholino oligonukleotidů (*eNOS+nNOS* – MO). Jako kontrola byli použiti pulci *X. laevis* s normální funkcí NO syntáz. Ihned po mikroinjekci XtiSC byla pulcům obou skupin amputována 1/3 ocasu. Pulci *X. laevis* s vyřazenou funkcí NO syntáz jsou v Laboratoři genové exprese zavedeným modelem pro studium NO signalizace, proto jsme v tomto případě upustili od použití *X. tropicalis*.

1 den po amputaci byla pomocí fluorescenčního stereomikroskopu hodnocena migrační schopnost XtiSC (viz. Obr. 22). Byla prokázána zhoršená migrace do místa zranění u pulců s vyřazenou funkcí NO syntáz (úspěšnost migrace 40,63%) oproti kontrolám (úspěšnost migrace 65,79%; viz. Tab. 7 a Obr. 23).

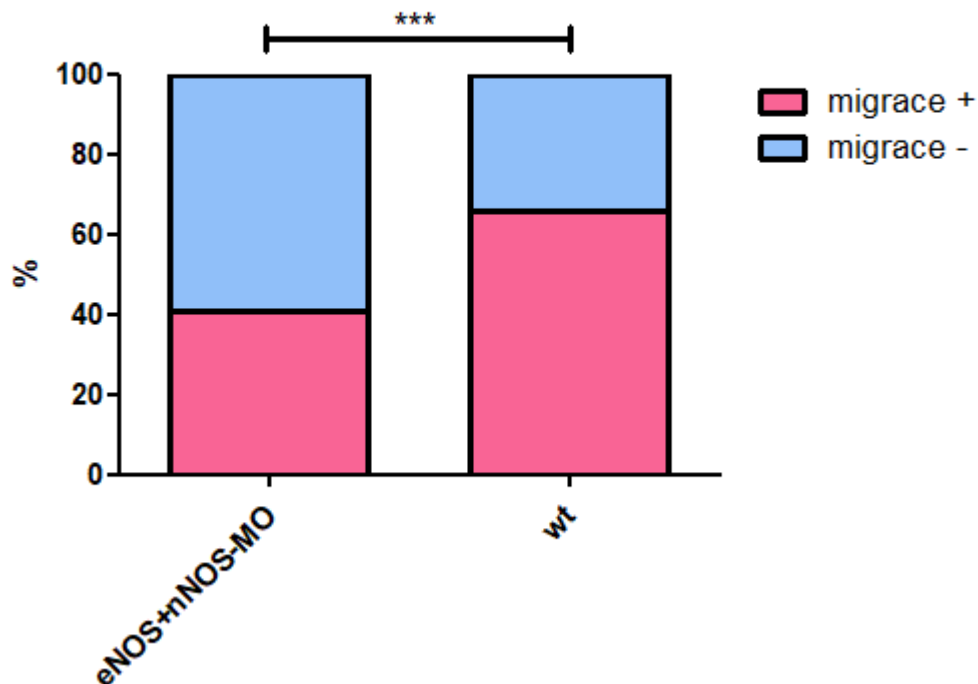


Obrázek 22.: *Vliv NO na migraci XtiSC in vivo u X. laevis.* U eNOS+nNOS - MO (B) byla prokázána zhoršená migrace do místa zranění oproti WT pulcům s normální funkcí NO syntáz (A). U obou skupin bylo možné pozorovat přítomnost buněk v regenerátu 7 dní po amputaci, nicméně u skupiny eNOS+nNOS - MO ve snížené míře.

	Počet pulců s migrací	Počet pulců bez migrace	Celkem
eNOS+nNOS - MO	13	19	<u>32</u>
WT	25	13	<u>38</u>

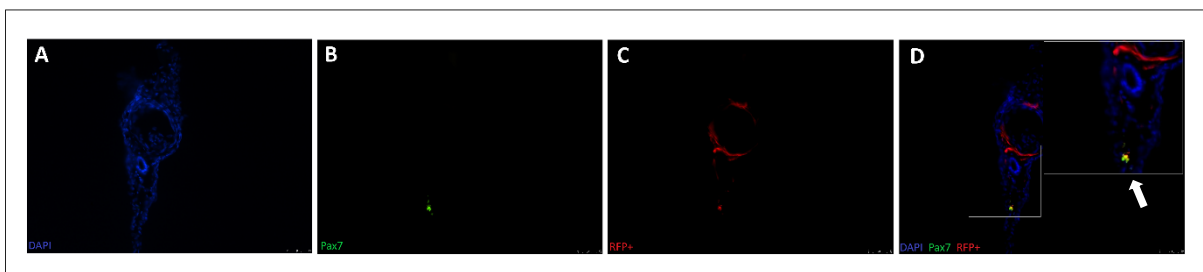
Tabulka 7.: *Vliv NO na migraci XtiSC in vivo u X. laevis.* Srovnání schopnosti migrace transplantovaných XtiSC do místa zranění u pulců u skupiny eNOS+nNOS - MO a u WT (normální funkce eNOS a iNOS). U obou skupin byla provedena amputace 1/3 ocasu ihned po transplantaci buněk.

Vliv eNOS+nNOS-MO na migraci XtiSC do místa zranění po amputaci ocasu pulců *X. laevis*



Obrázek 23.: Vliv NO produkovaného eNOS a nNOS na *in vivo* migraci XtiSC u pulců *X. laevis* po amputaci ocasu. Migrace XtiSC byla pozorována u 40,63% pulců s vyřazenou funkcí NO syntáz (eNOS+nNOS-MO). Migrace XtiSC u kontrol s normální funkcí NO syntáz (wt) byla pozorována u 65,79% pulců. Pro analýzu dat byl použit Fisherův exaktní test s hodnotou statistické významnosti $P < 0,01$.

Po 7 dnech od transplantace bylo rovněž možné pozorovat přítomnost buněk ve zregenerovaném ocasu, a to zejména u pulců s normální funkcí NO syntáz (viz. Obr. 24 a 26). Přítomnost buněk v regenerátu u pulců s vyřazenou funkcí NO syntáz tvořila 30,77% z celkového počtu, zatímco u kontrol 64% (viz. Tab. 8 a Obr. 25). Tyto výsledky naznačují, že NO může působit jako chemoatraktant pro XtiSC migrující do místa zranění.

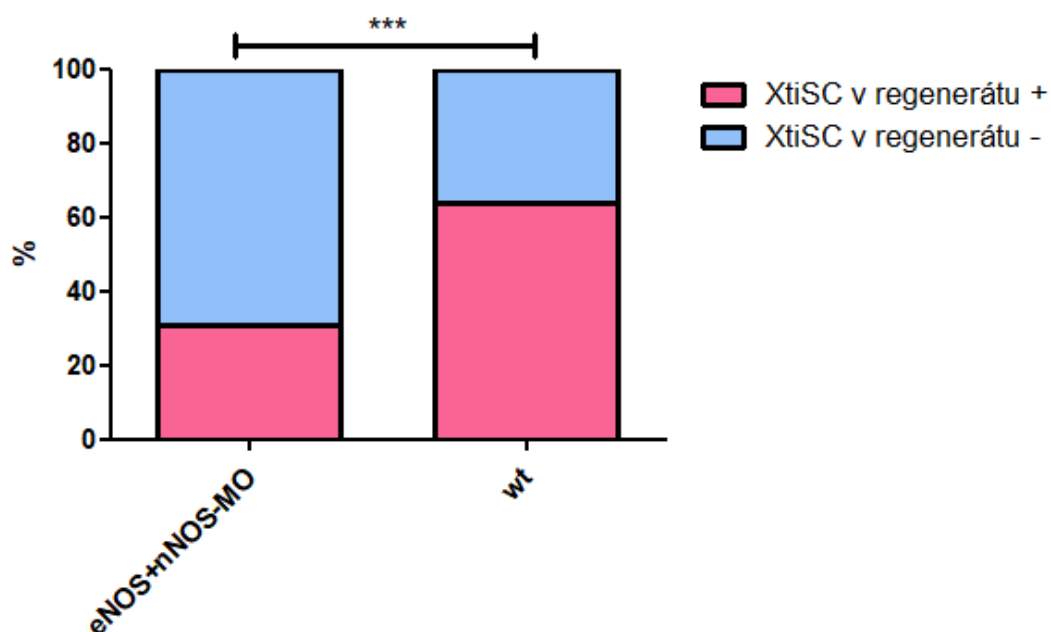


Obrázek 24.: Imunohistochemické barvení Pax7 u *X. laevis* v regenerátu. Vibratomové řezy zregenerované části ocasu po 7 dnech od amputace u pulce *X. laevis* s normální funkcí NO syntáz barvené proti Pax7 (zeleně) a RFP (červeně) dokazují přítomnost XtiSC v regenerátu. Jádra jsou barvena DAPI (modře). Lze pozorovat částečnou kolokalizaci Pax7 a RFP (D - bílá šipka) naznačující diferenciaci některých XtiSC do svalových satelitních buněk.

	Počet pulců s buňkami v regenerátu	Počet pulců s absencí buněk v regenerátu	Celkem
eNOS+nNOS - MO	4	9	<u>13</u>
WT	16	9	<u>25</u>

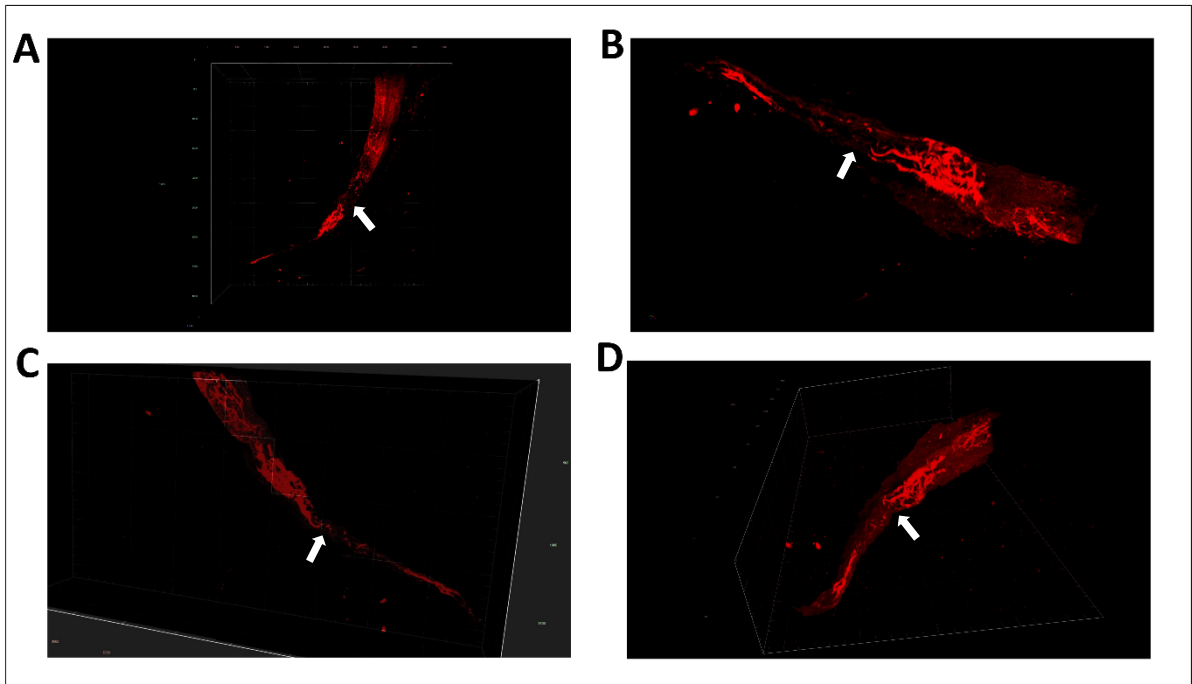
Tabulka 8.: Vliv NO na přítomnost XtiSC v regenerátu ocasu pulců *X. laevis* 7 dní po amputaci. Skupina eNOS+nNOS - MO zahrnuje pulce s vyřazenou funkcí eNOS a iNOS, skupina WT představuje pulce s normální funkcí NO syntáz. U obou skupin byla provedena amputace 1/3 ocasu ihned po transplantaci buněk.

Vliv eNOS+nNOS-MO na přítomnost XtiSC v regenerátu po amputaci ocasu pulců *X. laevis*



Obrázek 25.: Vliv NO na přítomnost XtiSC v regenerátu ocasu pulců *X. laevis* 7 dní po amputaci. Přítomnost XtiSC v regenerátu u skupiny eNOS+nNOS-MO tvořila 30,77% pulců. U kontrol s normální funkcí NO syntáz (wt) byly XtiSC přítomny v regenerátu u 64% pulců. Pro analýzu dat byl použit Fisherův exaktní test s hodnotou statistické významnosti $P < 0,01$.

Přítomnost buněk ve zregenerované části ocasu pulce *X. laevis* byla zobrazena i pomocí Lightsheet mikroskopie (viz. Obr. 23).



Obrázek 26.: Migrace XtiSC po xenogenní transplantaci u *X. laevis* 7 dní po amputaci. Lightsheet mikroskopie zobrazuje 3D strukturu XtiSC prorůstající zregenerovaný ocas 7 dní po amputaci. Lze pozorovat přítomnost buněk i v regenerátu. Bílé šipky zobrazují původní místo amputace.

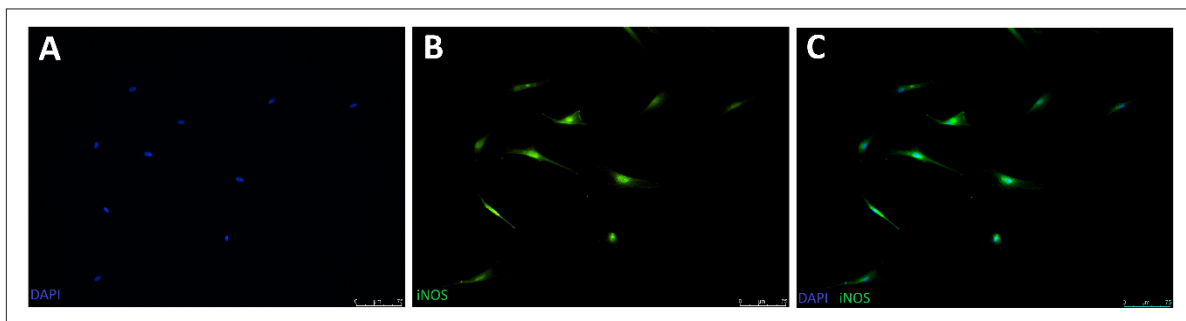
6.4 Studium regeneračního potenciálu XtiSC

6.4.1 XtiSC a produkce NO

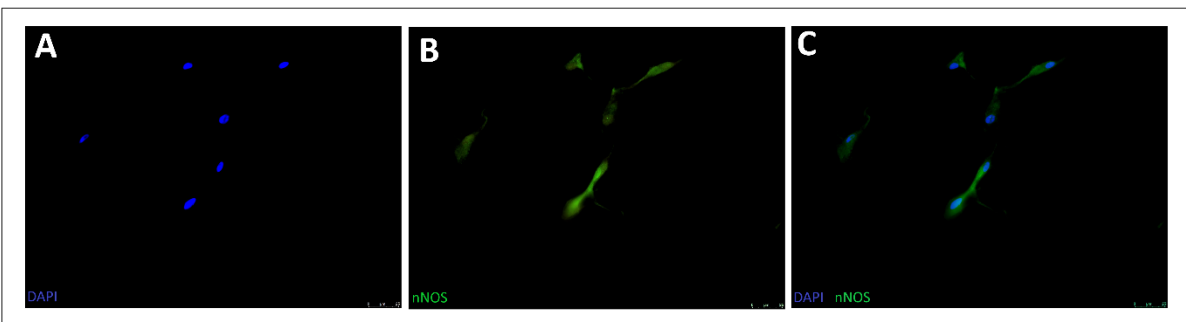
Jak již bylo řečeno, NO je významná signální molekula. Důležitou roli hraje zejména v regeneraci, kde se účastní procesu epidermálního hojení (Schäffer a kol., 1996; Tománková, 2019).

Produkce NO je řízena třemi typy syntáz (iNOS, eNOS, nNOS), jejichž exprese byla potvrzena v kožních buňkách žab i myší (Frank a kol., 2002; Tománková, 2019).

Imunocytochemickým barvením bylo zjištěno, že XtiSC exprimují iNOS (viz. Obr. 27) a nNOS (viz. Obr. 28). Expresi eNOS jsme se v rámci této práce nevěnovali, ale bude pravděpodobně předmětem dalších studií.



Obrázek 27.: Imunocytochemické barvení XtiSC proti iNOS (B). Jádra jsou barvena DAPI (A). Barvení bylo zopakováno nejméně třikrát nezávisle na sobě.



Obrázek 28.: Imunocytochemické barvení XtiSC proti nNOS (B). Jádra jsou barvena DAPI (A). Barvení bylo zopakováno nejméně třikrát nezávisle na sobě.

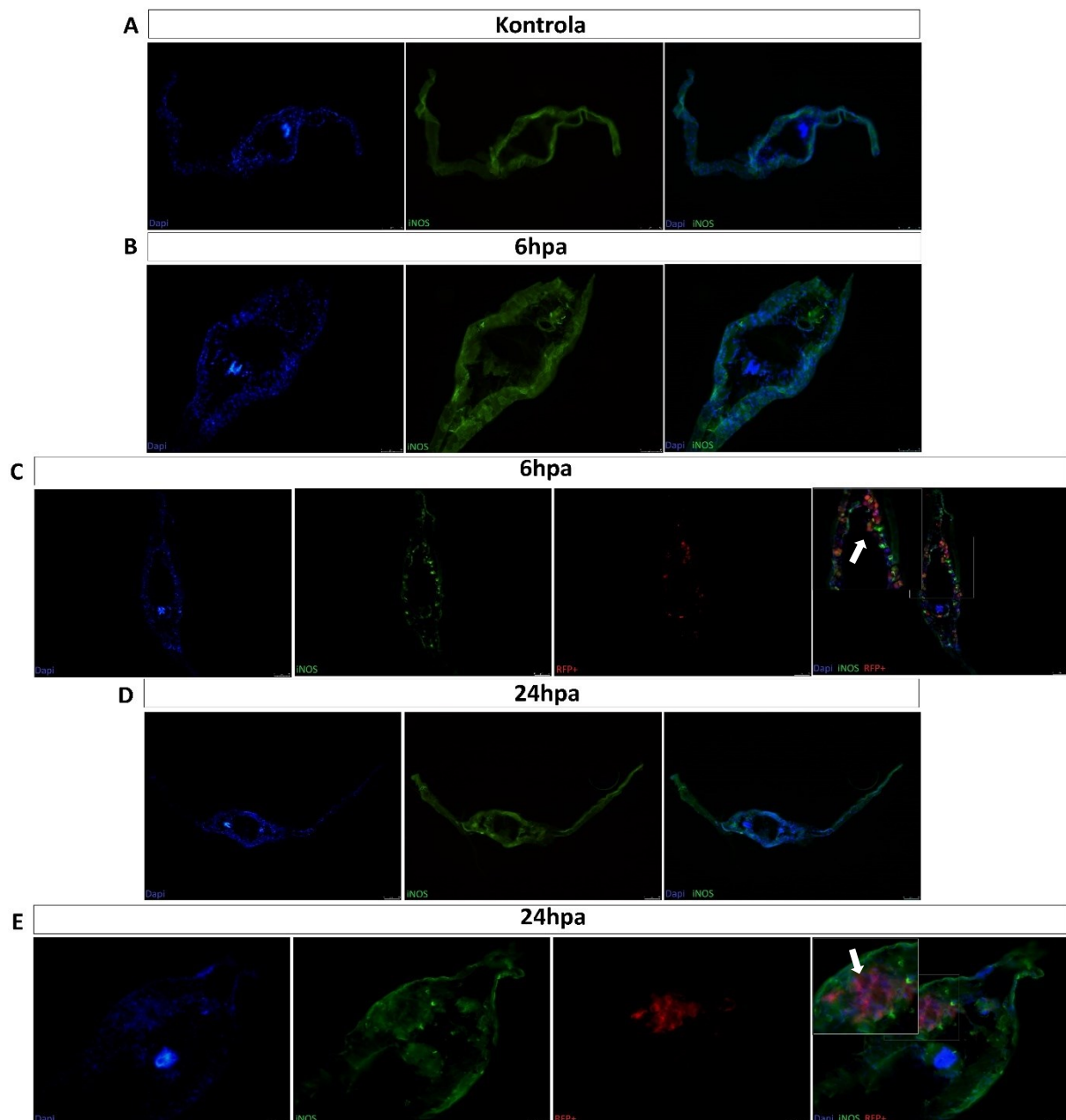
Po detekci exprese iNOS a nNOS byly XtiSC podrobeny měření produkce NO pomocí spektrofotometru při vlnové délce 570 nm. XtiSC byly indukovány pomocí supernatantu izolovaného ze splenocytů, lipopolysacharidu, IFN- γ a následně všem těmto stimulátorům najednou v určeném poměru. Výsledky však byly negativní ve všech případech (viz. Tab. 9).

Měření produkce NO	Hodnota absorbance
Kontrolní médium	0,04
Bez stimulace	-0,006
Supernatant	0,006
Lipopolysacharid	0,006
IFN- γ	-0,003
Supernatant + lipopolysacharid + IFN- γ	0,004

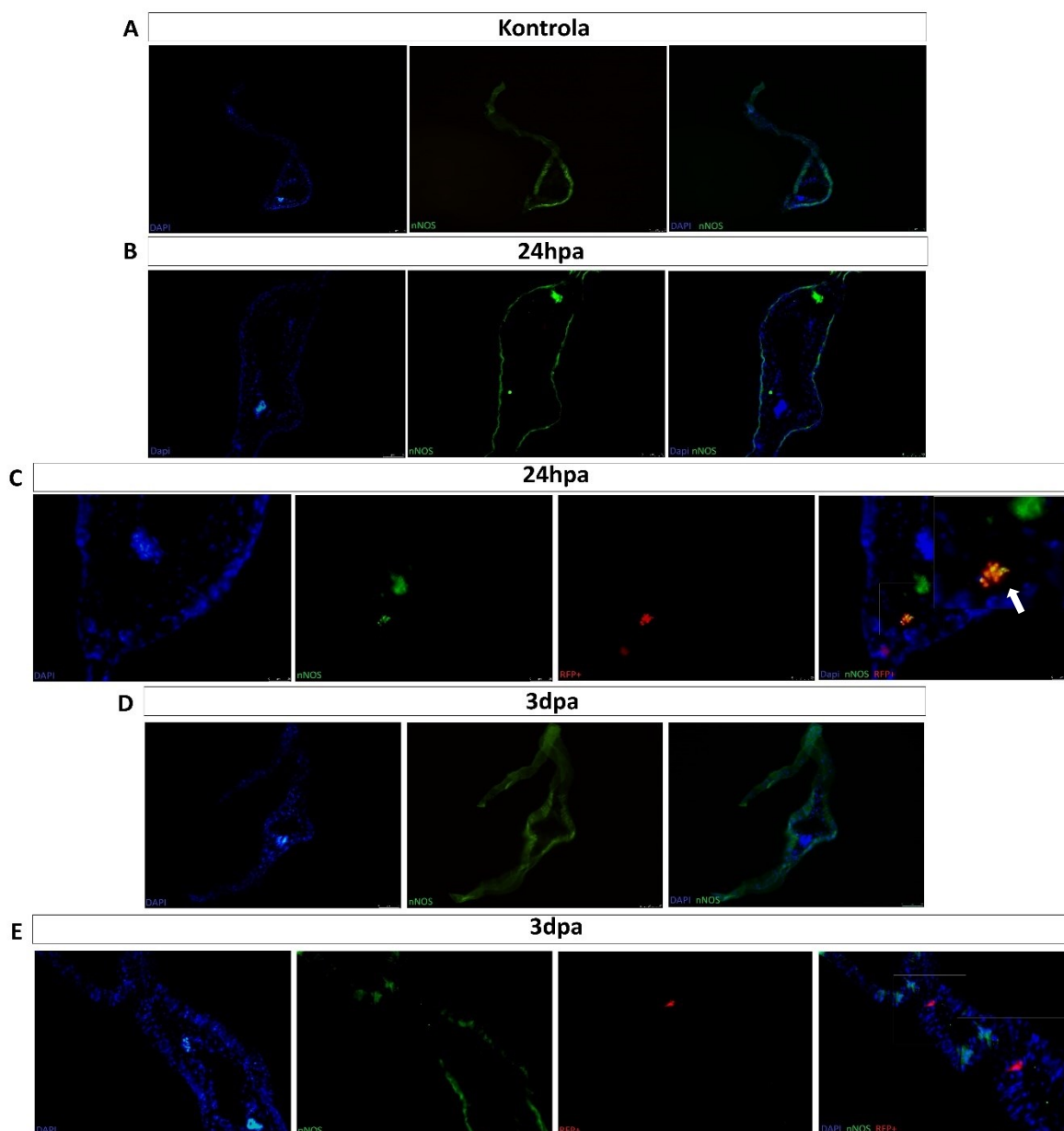
Tabulka 9.: Měření produkce NO u XtiSC. Buňky byly indukovány pomocí supernatantu ze splenocytů, lipopolysacharidu, IFN- γ a poté všemi těmito stimulatory najednou. Jako kontrola bylo použito čisté kultivační médium s naměřenou hodnotou absorbance 0,04.

Syntázám oxidu dusnatého jsme se dále věnovali v rámci imunohistochemického barvení vibratomových řezů ocasu pulců. Již dříve byla potvrzena exprese NO syntáz v pokožce embryí *X. laevis* v časných vývojových stádiích (Tománková, 2019).

Pro barvení řezů proti iNOS byli pulci ve stádiu 47 – 50 po transplantaci XtiSC do dorzální žíly a amputaci ocasu 1/3 ocasu zafixováni v čase 6h a 24h. Pro barvení proti nNOS byli fixováni pulci v čase 24h a 3 dny. Časové rozmezí pro fixaci pulců bylo stanoveno dle aktivity vybrané syntázy. iNOS je aktivní zejména v první fázi hojení a poté její aktivita klesá (Lee a kol., 2001). Naopak nNOS je aktivní ve fázi proliferace a remodelace, kdy se mimo jiné podílí na aktivaci satelitních buněk (Anderson, 2000). Zafixovaným pulcům byl nařezán ocas na vibratomu na 20 μ m tenké příčné řezy, které byly následně barveny. Pro barvení byli použiti pulci s transplantovanými XtiSC a amputovaným ocasem a pulci s amputovaným ocasem bez transplantovaných buněk. Jako kontrola byli nabarveni intaktní pulci bez amputace i transplantace. Barvení iNOS a nNOS na ocasních řezech pulců *X. tropicalis* potvrdilo pozitivní expresi obou syntáz v pokožkových buňkách a v chordě u pokusných i intaktních pulců. V několika případech byla rovněž pozorována částečná kolokalizace iNOS či nNOS s XtiSC barvenými proti RFP (viz. Obr. 29 a 30).

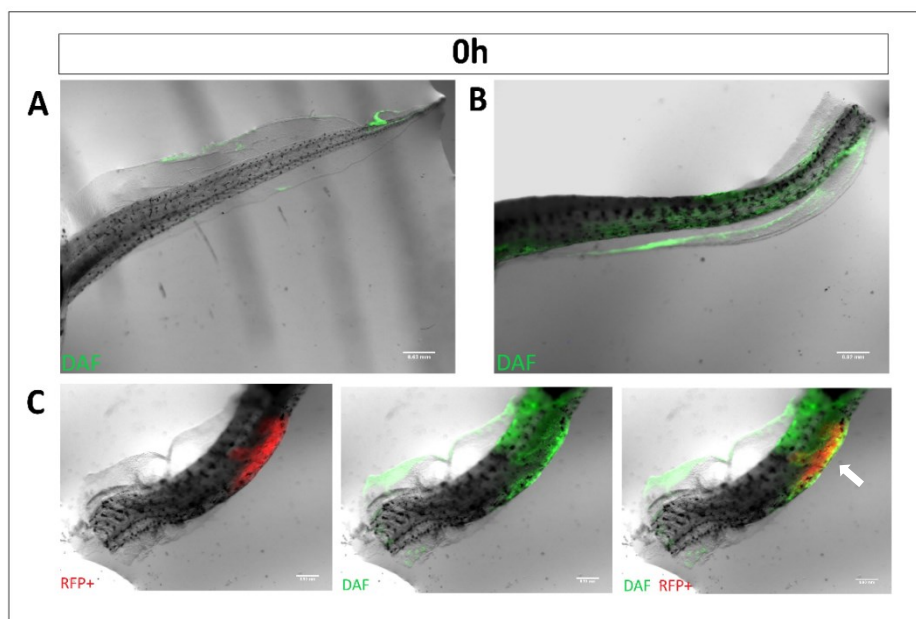


Obrázek 29.: Imunohistochemické barvení iNOS u *X. tropicalis*. Vibratomové řezy ocasu pulce 6h (C) a 24h (E) po amputaci a transplantaci byly barveny proti iNOS (zeleně) a RFP (červeně). Řezy pulců 6h (B) a 24h (D) po amputaci bez transplantovaných buněk byly barveny pouze proti iNOS (zeleně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Byla pozorována částečná kolokalizace iNOS a RFP (C, E – bílé šipky). Barvení každé skupiny bylo provedeno nejméně na 3 pulcích.

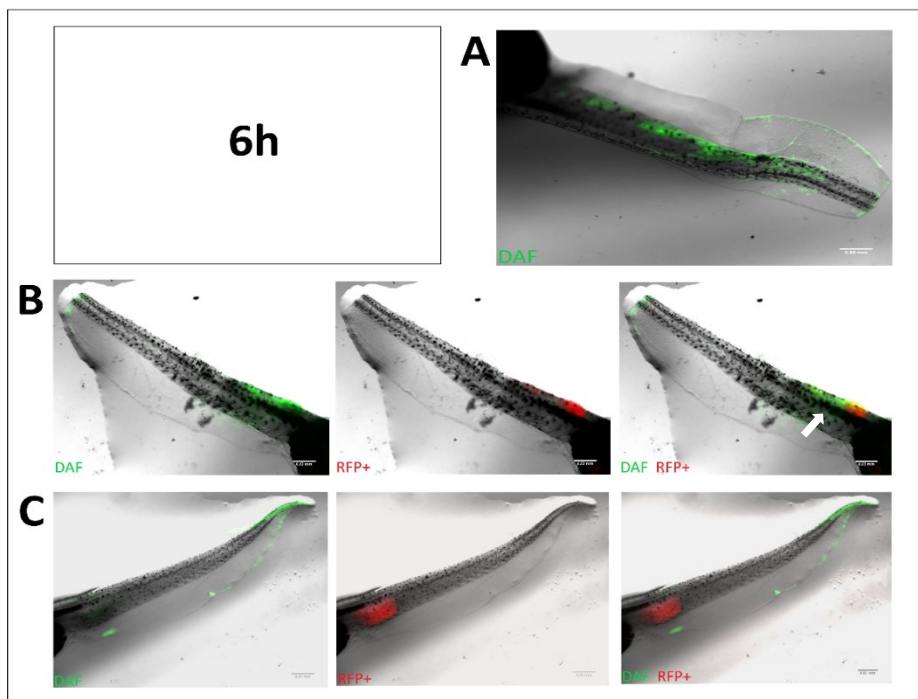


Obrázek 30.: Imunohistochemické barvení nNOS u *X. tropicalis*. Vibratomové řezy ocasu pulce 24h (C) a 3 dny (E) po amputaci a transplantaci byly barveny proti nNOS (zeleně) a RFP (červeně). Řezy pulců 24h (B) a 3 dny (D) po amputaci bez transplantovaných buněk byly barveny pouze proti nNOS (zeleně). Jako kontrola slouží intaktní pulec (A) barvený proti nNOS (zeleně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Byla pozorována částečná kolokalizace nNOS a RFP (C – bílá šipka). Barvení každé skupiny bylo provedeno nejméně na 3 pulcích.

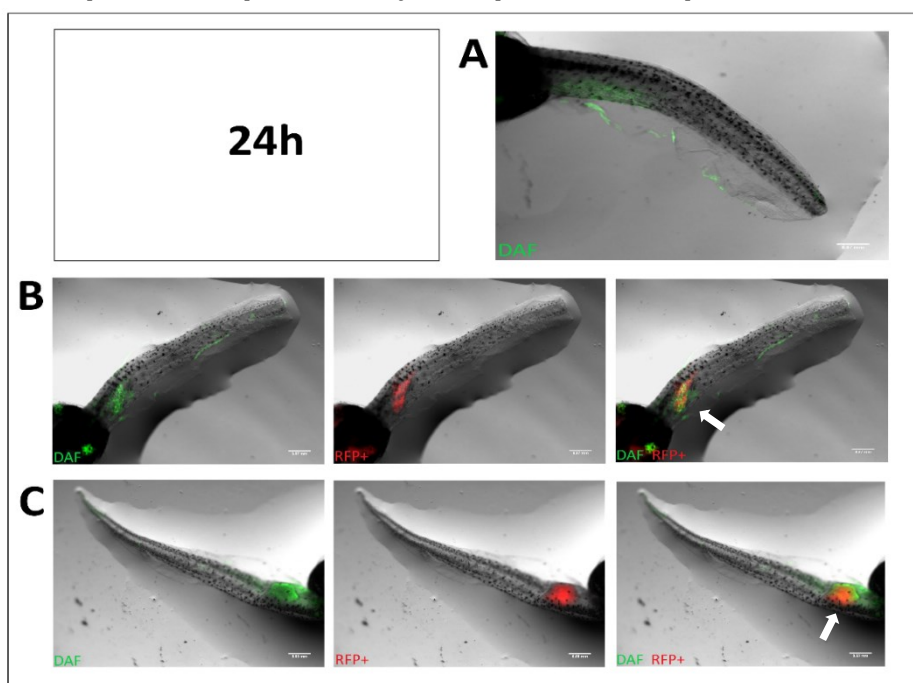
Jelikož se produkce NO u XtiSC *in vitro* nepotvrdila, zabývali jsme se jejich schopností produkovat NO *in vivo* po transplantaci do pulců *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50. Produkce NO byla zaznamenána u pulců v čase 0h, 6h, 24h, 72h a 7 dní po transplantaci pomocí indikátoru NO DAF-2DA. V průběhu 24h byla pozorována kolokalizace DAF-2DA a RFP, která byla postupně potlačena. Kolokalizace byla zaznamenána nejen u pulců s amputovaným ocasem, ale i u kontrol bez amputace (viz. Obr. 31 – 35). Pomocí Lightsheet mikroskopie a následnou analýzou obrazu v ImageJ byla potvrzena téměř 95% kolokalizace DAF-2DA a RFP (viz. Obr. 36). Z těchto výsledků lze konstatovat, že XtiSC jsou schopny produkce NO *in vivo*.



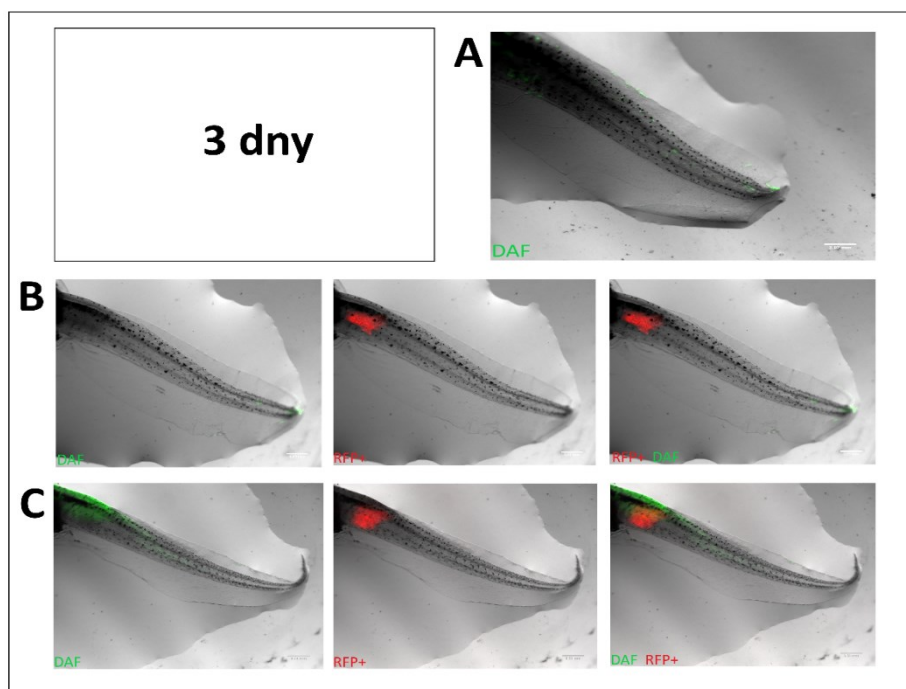
Obrázek 31.: Produkce NO u pulců *X. tropicalis* *in vivo* v čase 0h. Pulci byli inkubováni v DAF-2DA po dobu 15 min, následně jim byla amputována 1/3 ocasu a byli zafixováni a snímáni pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. U pulce s transplantovanými buňkami a amputací ocasu (C) lze pozorovat kolokalizaci (bílá šipka) DAF-2DA (zeleně) a RFP (červeně). Pulec bez transplantovaných buněk byl barven DAF-2DA (B). Jako kontrola sloužil intaktní pulec barvený DAF-2DA (A).



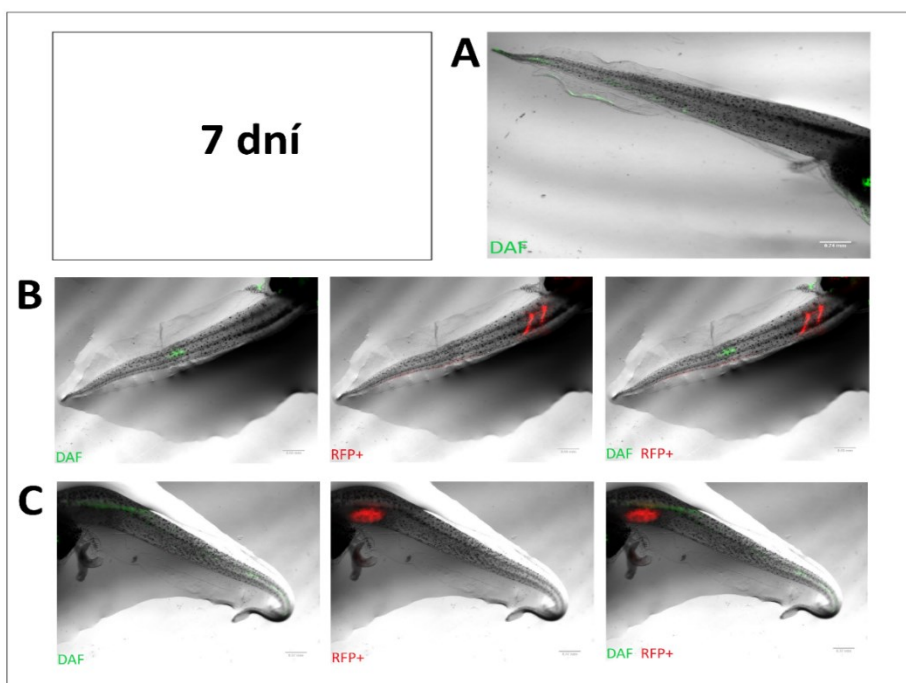
Obrázek 32.: Produkce NO u pulců *X. tropicalis* in vivo v čase 6h. Pulci 6h po amputaci a transplantaci buněk byli inkubováni v DAF-2DA a zafixováni a snímání pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. U pulce po amputaci i transplantaci (B) lze pozorovat kolokalizaci (bílá šipka) DAF-2DA (zeleně) a RFP (červeně). Pulec po transplantaci bez amputace kolokalizaci nevykazuje (C). Pulec bez transplantovaných buněk byl barven DAF-2DA (A). Barvení pro každou podmínku bylo zopakováno alespoň třikrát.



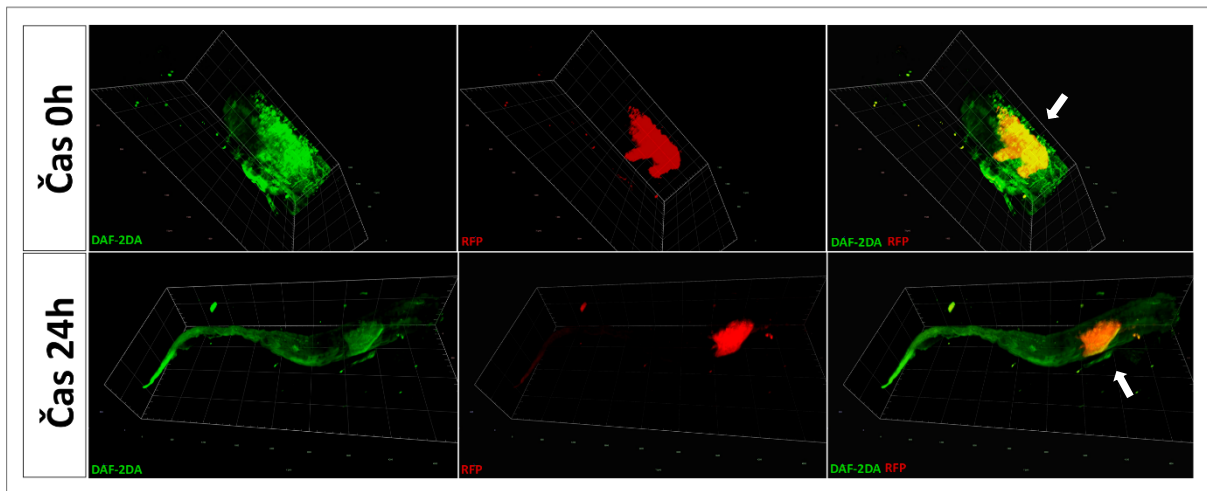
Obrázek 33.: Produkce NO u pulců *X. tropicalis* in vivo v čase 24h. Pulci 24h po amputaci a transplantaci buněk byli inkubováni v DAF-2DA a zafixováni a snímání pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. U pulce po amputaci i transplantaci (B) i u pulce po transplantaci bez amputace (C) lze pozorovat kolokalizaci (bílé šipky) DAF-2DA (zeleně) a RFP (červeně). Pulec bez transplantovaných buněk byl barven DAF-2DA (A). Barvení pro každou podmínku bylo zopakováno alespoň třikrát.



Obrázek 34.: Produkce NO u pulců *X. tropicalis* in vivo v čase 3 dny. Pulci 3 dny po amputaci a transplantaci buněk byli inkubováni v DAF-2DA a zafixováni a snímání pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. Kolokalizace DAF-2DA (zeleně) a RFP (červeně) nebyla pozorována u pulce po amputaci i transplantaci (B), ani u pulce po transplantaci bez amputace (C). Pulec bez transplantovaných buněk byl barven DAF-2DA (A). Barvení pro každou podmínku bylo zopakováno alespoň třikrát.



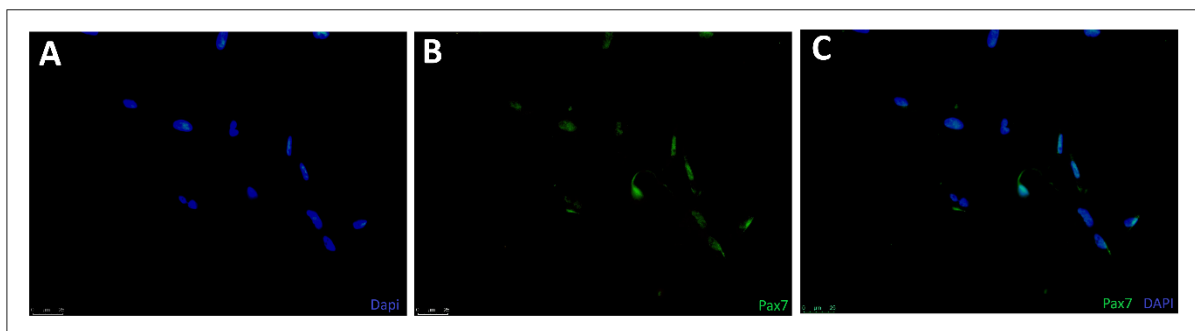
Obrázek 35.: Produkce NO u pulců *X. tropicalis* in vivo v čase 7 dní. Pulci 7 dny po amputaci a transplantaci buněk byli inkubováni v DAF-2DA a zafixováni a snímání pomocí fluorescenčního stereomikroskopu. Kolokalizace DAF-2DA (zeleně) a RFP (červeně) nebyla pozorována u pulce po amputaci i transplantaci (B), ani u pulce po transplantaci bez amputace (C). Pulec bez transplantovaných buněk byl barven DAF-2DA (A). Barvení pro každou podmínku bylo zopakováno alespoň třikrát.



Obrázek 36.: *Produkce NO u pulců X. tropicalis in vivo.* Lightsheet mikroskopie a následná analýza obrazu v ImageJ pomocí pluginu JaCoP prokázala kolokalizaci (bílé šipky) RFP (červeně) a DAF-2DA (zeleně) u pulců *X. tropicalis* 0h a 24h po amputaci ocasu. Overlap Coefficient v čase 0h činil $r = 0,945$, v čase 24h pak $r = 0,943$. Absolutní kolokalizace je $r = 1$.

6.4.2 XtiSC a satelitní buňky

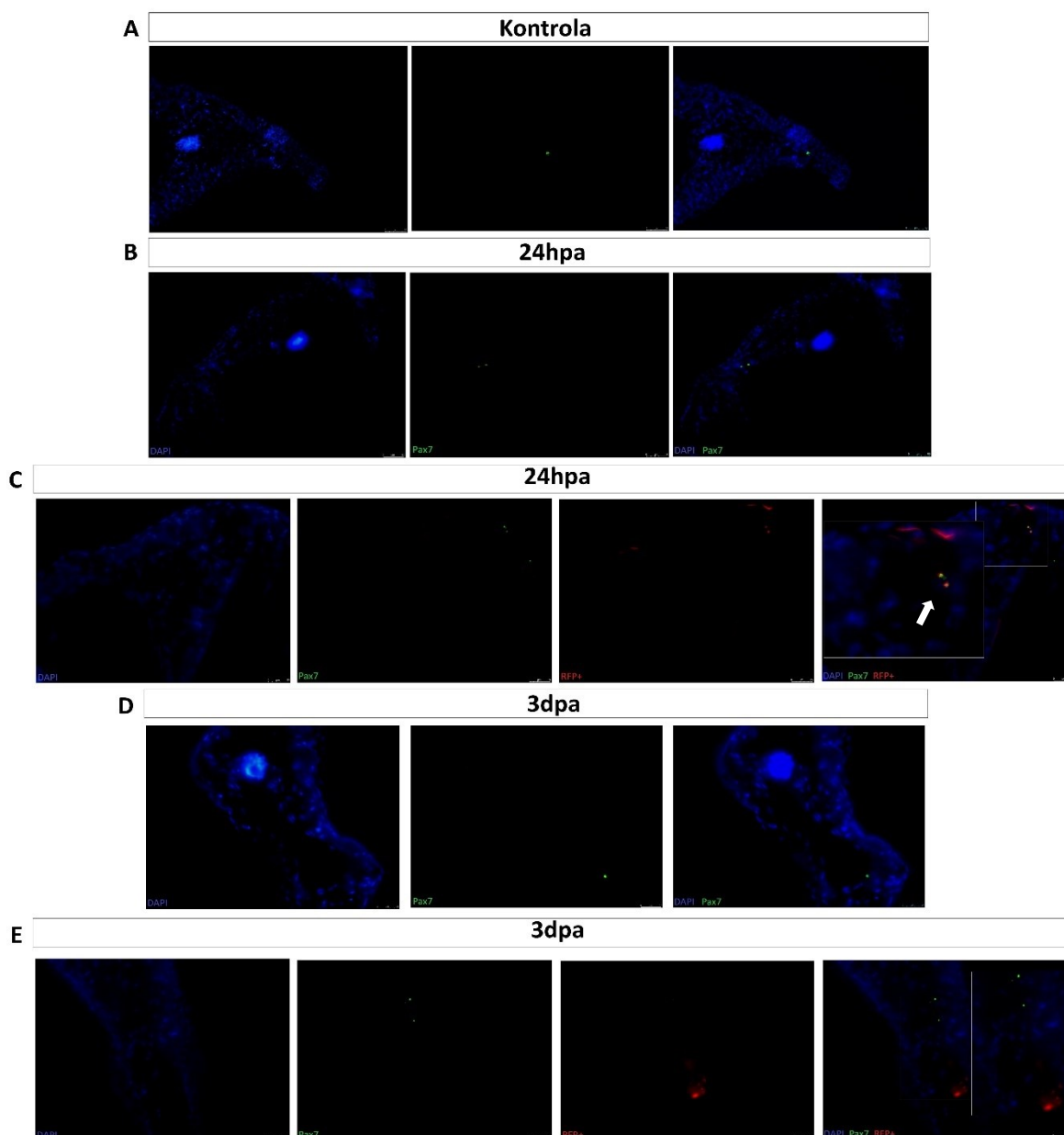
Satelitní buňky jsou pro regeneraci ocasu u pulců zcela nezbytné. Nalézají se mezi svalovými vlákny a v reakci na zranění jsou aktivovány, začnou proliferovat a diferencovat v myoblasty (Church, 1969; Bischoff, 1986). Quiescentní i právě aktivované satelitní buňky lze snadno identifikovat díky expresi proteinu Pax7 (Seale a kol., 2000). Imunocytochemickým barvením XtiSC byla zjištěna pozitivní exprese tohoto transkripčního faktoru (viz. Obr. 37).



Obrázek 37.: *Imunocytochemické barvení XtiSC proti Pax7 (B).* Jádra byla barvena DAPI (A). Barvení bylo zopakováno nejméně třikrát nezávisle na sobě.

V rámci studia regeneračního potenciálu XtiSC jsme se zabývali jejich možným vlivem na satelitní buňky. Za tímto účelem byly satelitní buňky barveny na imunohistochemických řezech. Pro barvení řezů proti Pax7 byli pulci ve stádiu 47 – 50 po transplantaci XtiSC do dorzální žíly a amputaci ocasu 1/3 ocasu zafixováni v čase 24h a 3 dny. Časové rozmezí pro fixaci pulců bylo stanoveno v závislosti na aktivaci satelitních buněk, která nastupuje v pozdější fázi regenerace (Chen a kol., 2006). Zafixovaným pulcům byl nařezán ocas na vibratomu na 20 µm tenké příčné řezy, které byly následně barveny. Pro barvení byli použiti pulci s transplantovanými XtiSC a amputovaným ocasem a pulci s amputovaným ocasem bez transplantovaných buněk. Jako kontrola byli nabarveni intaktní pulci bez amputace i transplantace.

Barvení Pax7 na ocasních řezech pulců *X. tropicalis* potvrdilo přítomnost satelitních buněk u pokusných i intaktních pulců. V několika případech byla rovněž pozorována částečná kolokalizace Pax7 s XtiSC barvenými proti RFP (viz. Obr. 38).



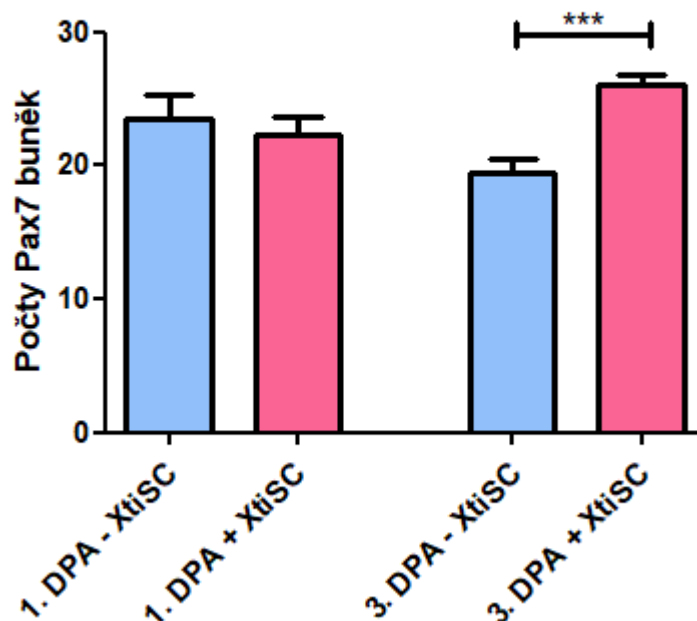
Obrázek 38.: Imunohistochemické barvení Pax7. Vibratomové řezy ocasu pulce 24h (C) a 3 dny (E) po amputaci a transplantaci byly barveny proti Pax7 (zeleně) a RFP (červeně). Řezy pulců 24h (B) a 3 dny (D) po amputaci bez transplantovaných buněk byly barveny pouze proti Pax7 (zeleně). Jádra jsou barvena DAPI (modře). Byla pozorována částečná kolokalizace Pax7 a RFP (C). Barvení každé skupiny bylo provedeno na 6 pulcích.

Pro posouzení vlivu XtiSC na satelitní buňky v rámci regenerace byly porovnávány počty satelitních buněk na 1 pulce mezi skupinou pulců s transplantovanými XtiSC ku skupině pulců bez buněk, přičemž u obou skupin byla ihned po transplantaci amputována 1/3 ocasu v čase 24h a 3 dny. 1 den po amputaci nebyl v počtu buněk mezi skupinami zaznamenán rozdíl, nicméně počty buněk po 3 dnech byly u pulců s transplantovanými XtiSC statisticky významně vyšší než u kontrol bez XtiSC (viz. Tab. 10 a Obr. 39). Tyto výsledky naznačují možný pozitivní vliv XtiSC na regeneraci svalové hmoty ocasu u pulců.

	1 dpa		3 dpa	
	-XtiSC	+XtiSC	-XtiSC	+XtiSC
1. pulec	20	26	16	28
2 pulec	24	22	18	25
3. pulec	25	25	21	29
4. pulec	23	24	20	27
5. pulec	27	17	23	26
6. pulec	17	20	19	24
Průměr	<u>23,5</u>	<u>22,33</u>	<u>19,5</u>	<u>26</u>

Tabulka 10.: Vliv XtiSC na počet satelitních buněk v ocase pulců *X. tropicalis*. Srovnání počtu satelitních buněk u jednotlivých pulců po transplantaci XtiSC (+XtiSC) a kontroly bez transplantovaných XtiSC (-XtiSC) 1. a 3. den po amputaci.

Vliv XtiSC na počet Pax7 satelitních buněk v ocase pulců *X.tropicalis*



Obrázek 39.: Vliv XtiSC na počet satelitních buněk v ocase pulců *X. tropicalis*. Rozdíl v počtu satelitních buněk v ocase mezi kontrolní skupinou pulců (1DPA-XtiSC) a skupinou s transplantovanými XtiSC (1DPA+XtiSC) první den po amputaci není statisticky významný ($P > 0,1$). Třetí den po amputaci došlo k signifikantnímu navýšení ($P < 0,01$) počtu satelitních buněk u skupiny pulců s transplantovanými XtiSC (3DPA+XtiSC) oproti kontrole (3DPA-XtiSC). Pro vyhodnocení dat byl použit Studentův t-test pro obě experimentální skupiny (1 den a 3 dny).

6.4.3 Porovnání genové exprese XtiSC a ROC

V rámci studia regeneračního potenciálu XtiSC jsme se rozhodli porovnat genovou expresi XtiSC a ROC. ROC jsou recentně identifikované buňky s významnou rolí v procesu regenerace. Nalezneme je v pulci pod pokožkou, odkud v reakci na zranění migrují do místa poškození, vytvoří signální centrum a produkují molekuly nezbytné pro regeneraci a proliferaci (Fgf8, Fgf9, Fgf10, Fgf20, Tgf- β , Notch1, Wnt-3a, Wnt-5a, Bmp4, Bmp2, Delta-1, Msx1, Msx2). Mimo jiné exprimují Lef1 a Tp63, které slouží jako identifikační markery (Aztekin a kol., 2019). Analýza genové exprese XtiSC pomocí RT-PCR potvrdila pozitivní expresi všech genů ROC buněk vyjma *tp63* a *wnt-3a* (viz. Tab. 11). Tyto výsledky naznačují možný regenerační potenciál XtiSC skrze produkci výše zmíněných faktorů.

Gen	Přední primer	Velikost produktu (páry bází)	Exprese u XtiSC
	Zadní primer		
<i>bmp2</i>	GCCGAGCAAACACCGTTAG	188	
	GCTGCTGTCACCCTCAAATG		
<i>bmp4</i>	AGCGGAGGAGGAGGATGAA	170	
	CTGGAATGCTGCTGAGGTTG		
<i>delta-1</i>	GCACCAACTCCTTCGTCGTA	300	
	AGCCTTCCCCGTAGTAGTGT		
<i>fgf8</i>	GTCATCTGCCTACAAGCCCA	322	
	GCGAACTCTGCTTCCAAACG		
<i>fgf9</i>	CGAAGGAGGCAGCTCTATTG	190	
	ACAGCTCCCCCTTTTCATTCA		
<i>fgf10</i>	GAAAGTCCAGGGTCCC GTTG	329	
	GAGCTTCCTACTCCGCACG		
<i>fgf20</i>	ACAGGTAGGCTCCC ACTTCT	429	
	AGTACCGCCTTCCAGAGTCT		
<i>lef1</i>	CCCAGTAGCAACAGTCACGA	481	
	TGTCATCTGGCCACACTTC		
<i>msx1</i>	GAAAGAGACCTGTCCAGCCC	388	
	GGTTGAGGGAGCTGGAGAAC		
<i>msx2</i>	CCAACAGAAAGCCCAGGACT	324	
	TGGGAAGGACTGGTCTGTGA		
<i>notch1</i>	CGCCCCGACTTTATCTCCTC	374	
	CCATTTCTGCTTGTGGCC		
<i>tgf-β1</i>	GGTGCTGCATCTTCCACTT	1026	
	TCCAGGACATCAGGAACACA		
<i>tp63</i>	CAGATTGCCAAAACCTGCC	494	
	GTGCTGTCGGAACTTGCTG		
<i>vim</i>	CCTCTTTGGCACGTATTGACTT	464	
	TCTCCTCCATTTCTCGCATTTG		
<i>wnt-3a</i>	TTGCCGTTACCAGATCCTGC	388	
	CCCCGGGATTCTCGATGTTT		
<i>wnt-5a</i>	GAACCTGCACAACAACGAGG	409	
	CCGCTCAGTCTGTACCGTTT		

Tabulka 11.: Srovnání genové exprese ROC a XtiSC. Pomocí RT-PCR bylo zjištěno, že XtiSC exprimují všechny známé markery ROC vyjma *tp63* a *wnt-3a*. Jako pozitivní kontrola byl použit gen pro vimentin.

7. Diskuze

U pulců *X. laevis* se vyskytuje fenomén s názvem refraktorní fáze. Jedná se o krátké období stádia 45 – 47, kdy pulec není schopen po amputaci regenerovat svůj ocas. V tomto období je formování regeneračního pupenu neúspěšné, což vede k selhání regenerace ocasních tkání. Nelze pozorovat žádnou akumulaci dediferencovaných progenitorových buněk a místo amputace je zaceleno pokožkou (Beck a kol., 2003). V současné době ještě není zcela zřejmé, jakými mechanismy je tato fáze podmíněna. Jedna z mnoha teorií poukazuje na metabolické změny v rámci přechodu na přímý typ potravy, které by mohly vést k dočasnému utlumení energeticky náročných regeneračních procesů. Jiné spekulace hovoří o vlivu rozvoje adaptivní imunity, která v této fázi probíhá a mohl by ovlivňovat regeneraci. Tuto teorii podporuje i skutečnost, že regenerace ocasu v refraktorní fázi může být navozena imunosupresí. Velkou otázkou rovněž zůstává, čím je podloženo znovunabytí regenerační kapacity po refraktorní fázi (Fukazawa a kol., 2009; shrnuto v Li a kol., 2016). Faktorů podmiňujících refraktorní fázi je několik, jedním z nich jsou ROC. Tyto buňky za normálních okolností migrují do místa amputace, kde ustanovují signální centrum nezbytné pro regeneraci. U regenerativně-inkompetentních pulců však ROC nejsou schopny aktivace (Aztekin a kol., 2019). Za mobilizaci ROC jsou zodpovědné myeloidní buňky. Tyto buňky jsou u pulce dvojího typu – zánětlivé a reparativní, jejich poměrné zastoupení je v intaktním pulci přibližně stejné. U regeneračně-kompetentních pulců po amputaci však dochází k namnožení reparativních myeloidních buněk, u regeneračně-inkompetentních pulců naopak převažují buňky zánětlivé. Předmětem dalšího studia těchto myeloidních buněk bude jejich podobnost se savčími makrofágy. Makrofágy se totiž po aktivaci v organismu dělí také na dva typy – M1 (prozánětlivé) a M2 (protizánětlivé), čímž nápadně připomínají subpopulaci myeloidních buněk u xenopa (Aztekin a kol., 2020).

Během studia refraktorní fáze bylo zjištěno, že reaktivací Bmp nebo Msx1, který je v signální kaskádě pod vlivem Bmp, lze v pulci znovu navodit regenerační schopnost i ve stádiu 45 – 47. Podobně reaktivace Notch signalizace v průběhu refraktorní fáze vyústí v částečnou regeneraci všech tkání ocasu kromě svaloviny. Tato fakta poukazují na klíčovou roli Bmp signalizace v procesu regenerace, jelikož je nezbytná pro aktivaci Notch i Msx1 (Beck a kol., 2003, 2006; shrnuto v Slack a kol. 2008).

Neméně důležitý vliv na regeneraci má membránový potenciál. Depolarizace v reakci na zranění a pozvolná repolarizace ocasu pulce zprostředkovaná aktivací V-ATPázy navozuje regeneraci i v refraktorní fázi (Adams a kol., 2007).

V této práci bylo poprvé prokázáno, že *X. tropicalis* refraktorní fázi úplně postrádá, nebo neprobíhá tak markantně jako u *X. laevis*. Všichni pulci ve fázích 38 – 50 po amputaci regenerovali ocas standardně během 7 dní vyjma 1 pulce z 10 ve fázích 41, 49 a 50 (viz. Obr. 18). Tato skutečnost naznačuje, že *X. tropicalis* by mohl být ideálním modelem pro studium mechanismů podmiňujících refraktorní fázi při porovnání s *X. laevis*.

Zjištění, že pulci *X. tropicalis* nevykazují refraktorní fázi umožňuje jejich neomezené použití v průběhu embryonálního vývoje pro transplantační experimenty. Nicméně pro mikroinjekce do dorzální žíly jsou nejvhodnější pulci ve stádiu 47 – 50.

Laboratoř vývojové biologie PŘF UK byla úspěšná v založení kultury XtiSC neboli nezralých Sertoliho buněk *X. tropicalis*. Tyto buňky byly již dříve podrobeny analýze genové exprese, která potvrdila přítomnost markerů nezralých Sertoliho buněk (*Sox9*, *vimentin*, *cytokeratin* a β -*katenin*) a peritubulárních myoidních buněk (*Sma* a *lif*). Lze tak usoudit, že XtiSC jsou společným progenitorem pro tyto buňky.

Další analýza prokázala expresi markerů MSC (*itgb-1-cd29*, *cd44* a *thy1-cd90*) a některých pluripotentních markerů. Naopak markery zárodečných buněk (*dazl*, *ddx4* a *ddx25*) byly u XtiSC negativní, jedná se tedy nepochybně o buňky somatického původu. (viz. Obr. 5). Následně byla vytvořena stabilní transgenní linie XtiSC-RFP exprimující Katushka RFP pod CAG promotorem, což značně usnadilo transplantační experimenty v této diplomové práci (Tlapáková a kol., 2016; Nguyen a kol., 2019a; 2019b).

Samotné Sertoliho buňky jsou skvělým prostředkem pro transplantační experimenty. Nejenže samy přežívají po alogenních i xenogenních transplantacích, ale jsou významné i při kotransplantacích. Díky svým imunomodulačním schopnostem totiž podporují přežívání kotransplantátu (Bistoni a kol., 2012).

Mikroinjekce XtiSC do dorzální žíly u pulců *X. tropicalis* ve stadiu 47 – 50 potvrdily schopnost buněk přežít a množit se v organismu po alogenní transplantaci. Pozorováním pulců 6h, 3 dny a 7 dní po transplantaci bylo zjištěno značné namnožení buněk již 3. den. Pozorovali jsme tendenci buněk vytvářet niku, v níž se množily a z níž následně i migrovaly (viz. Obr. 19).

Posléze vyvstaly otázky týkající se migratorního potenciálu XtiSC. Nguyen a kol. (2019a, 2019b) provedli pilotní pokusy testující migraci buněk do místa zranění a prokázali jejich migraci ve směru k nádorovým HeLa buňkám *in vitro*. Při mikroinjekci buněk do peritoneální dutiny pulců byla pozorována migrace do srdce, střeva a pronefros (Tlapáková a kol., 2016). Podobné chování lze pozorovat po injikaci MSC do krevního oběhu myši (shrnuto v Cornelissen a kol., 2015).

V rámci této diplomové práce jsme se zabývali migratorním potenciálem XtiSC *in vivo* po amputaci ocasu u pulců *X. tropicalis*. Pozorováním pulců s amputací ocasu pomocí fluorescenčního stereomikroskopu 6h a 3 dny po transplantaci byla zjištěna preferenční migrace do místa zranění (viz. Obr. 20). V místě amputace buňky akumulují a po 7 dnech od amputace prorůstají i do nově zregenerovaného ocasu (viz. Obr 22 a 24). Na druhou stranu u pulců bez amputace ocasu byly buňky i 3 dny po transplantaci pozorovány pouze v blízkosti místa vpichu, migrace do špičky ocasu byla u těchto pulců zanedbatelná (viz. Obr. 20).

Otázkou ale zůstává, jakými mechanismy je tato migrace XtiSC do místa zranění zprostředkována. MSC obdobně jako XtiSC vykazují schopnost migrovat ve směru k poraněné tkáni. U savců dochází v místě zranění ke značné produkci zánětlivých cytokinů (např. TNF- α , IFN- γ , IL-1), které na MSC působí jako chemoatraktanty. Působením těchto faktorů dochází na povrchu MSC ke změně exprese adhezivních molekul, která vyústí v buněčný pohyb. MSC mimoto disponují imunomodulačními vlastnostmi. Po přemístění do oblasti zranění působí prostřednictvím produkce faktorů (TGF- β , HGF, LIF, IL-1, IL-6, NO,IDO a další) na imunitní reakci. Tímto způsobem MSC inhibují aktivitu M1 prozánětlivých makrofágů a podporují jejich přeměnu v M2 protizánětlivé makrofágy (shrnuto v Volarevic a kol., 2017).

Způsob, jakým jsou do místa poranění přitahovány XtiSC, však zatím není znám. Z tohoto důvodu jsme v další části této práce upřeli pozornost na oxid dusnatý (NO), který je jednou z molekul s významnou rolí v regeneraci a dalších fyziologických procesech. Produkci NO řídí tři typy syntáz, a sice iNOS, nNOS a eNOS, které katalyzují přeměnu L-argininu na L-citrulín za vzniku NO jako vedlejšího produktu (shrnuto v Alderton a kol., 2001). iNOS má nejvýznamnější funkci v první fázi regenerace při epidermálním hojení, kdy jsou hlavními producenty NO zejména makrofágy (Yamasaki a kol., 1998; Lee a kol., 2001).

nNOS zase přebírá ústřední roli v pozdějších fázích regenerace, kdy zprostředkuje aktivaci satelitních buněk, o nichž bude řeč v další části diskuze (Anderson a kol., 2000). NO může působit skrze aktivaci či inhibici velkého množství efektorů. Nadto významně ovlivňuje i buněčnou migraci.

NO reguluje například migraci neutrofilů, monocytů a makrofágů v rámci zánětlivé reakce (Dal Secco a kol., 2003; Zhou a kol., 2009). Mnoho studií uvádí aktivační, ale také inhibiční vliv NO na buněčnou migraci. Fuseler a Valarmathi (2016) prokázali inhibiční účinek NO na migraci do oblasti zranění u MSC odvozených z kostní dřeně. Aktivačně působí NO prostřednictvím cGMP/PKG dráhy na migraci keratinocytů, které jsou v průběhu hojení důležité pro reepitalizaci. Skrze cGMP-Rho GTPázovou signalizaci NO podněcuje také migraci epidermálních kmenových buněk (Zhan a kol., 2015, 2016).

V Laboratoři genové exprese (Biotechnologický ústav AV ČR) naznačili důležitou roli NO v migraci progenitorů již zmiňovaných myeloidních buněk u pulců *X. laevis* v reakci na zranění. Po zablokování funkce NO syntáz docházelo k značnému zpomalení či až úplné inhibici migrace myeloidních buněk do poraněné oblasti. Tímto byla prokázána důležitost NO signalizace pro normální průběh regenerace i migračních procesů, které ji provázejí (Abaffy, 2020). Z dostupných studií lze usuzovat, že NO zprostředkovaná migrace je přísně regulovaná a mechanismus jeho působení ještě dnes není plně objasněn.

Za účelem zjištění vlivu NO na migraci XtiSC jsme použili pulce *X. laevis* ve stádiu 47 - 50 dodané z Laboratoře genové exprese. Porovnávali jsme buněčnou migraci do místa zranění po mikroinjekci do dorzální žíly u pulců s vyřazenou funkcí eNOS a iNOS pomocí morpholino oligonukleotidů oproti pulcům s normální funkcí NO syntáz.

U obou skupin pulců byla provedena amputace 1/3 ocasu. Prokázali jsme značně zhoršenou migraci XtiSC v pulcích s vyřazenou funkcí NO syntáz ve srovnání s kontrolou. 7 dní po transplantaci jsme taktéž pozorovali přítomnost buněk v regenerátu u pulců obou skupin, nicméně u pulců eNOS+nNOS - MO ve snížené míře (viz. Obr. 22). To jsme prokázali jednak na imunohistochemicky barvených řezech (viz. Obr. 24), ale také pomocí Lightsheet mikroskopie (viz. Obr. 26). Z dosažených výsledků vyplývá, že NO produkovaný po poranění pravděpodobně působí jako chemoatraktant pro migrující XtiSC. Dalším možným a dle mého úsudku pravděpodobnějším vysvětlením je, že NO funguje jako spouštěč dalších signálních drah podmiňujících regeneraci.

Některý z těchto NO aktivovaných faktorů či kombinace více takových by se patrně mohl podílet na atrakci XtiSC do místa zranění. Další z možností je, že XtiSC by do místa zranění mohly být přitahovány signalizací myeloidních buněk či pomocí ROC signálního centra. Vyřazení NO syntáz by tak mohlo mít přímý nebo nepřímý vliv na NO závislou signalizaci, či produkci chemoatraktivních molekul ovlivňujících migraci ROC nebo myeloidních buněk, což by značně narušilo regeneraci. K tomuto ale bude zapotřebí dalších studií.

U NO jsme zůstali i v následující části práce. Kontrolním imunocytochemickým barvením byla překvapivě zjištěna pozitivní exprese iNOS a nNOS i přímo u XtiSC (viz. Obr. 27 a 28). Proto jsme se rozhodli prověřit, jestli XtiSC také vykazují schopnost NO produkovat. K měření produkce NO v médiu, v němž byly XtiSC 48 hodin kultivovány, byla použita Griessova reakce a následné měření koncentrace na spektrofotometru.

Výsledek měření byl ale negativní, proto jsme se v následujících pokusech snažili XtiSC přinutit k produkci NO pomocí stimulatorů. Jedny z faktorů aktivujících MSC k migraci do místa zranění a následné produkci dalších molekul (jako je např. i NO) jsou TNF- α , IL-1 a IFN- γ (shrnutí ve Volarevic a kol., 2017). Z tohoto důvodu jsme ve spolupráci s Laboratoří imunoregulací (PřF UK) inkubovali XtiSC po dobu 48 hodin v médiu s přídatkem supernatantu izolovaného ze splenocytů, který obsahoval směs těchto stimulačních látek. I toto měření bylo negativní. Následně jsme zkoušeli XtiSC inkubovat s přídatkem lipopolysacharidu, který je (podobně jako IFN- γ) známým stimulatorem produkce NO u makrofágů (Stich a kol., 1998). V neposlední řadě byly XtiSC inkubovány v médiu se samotným IFN- γ a konečně i s kombinací všech zmíněných faktorů v doporučeném poměru. Všechna měření koncentrace NO však byla negativní (viz. Tab. 9).

Před nedávnem byla potvrzena exprese NO syntáz v pokožkových buňkách časných embryí *X. laevis* (Tománková, 2019). Imunohistochemickým barvením řezů ocasu u pulců jsme potvrdili expresi nNOS a iNOS v pokožkových buňkách u pulců *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50. Vzor exprese těchto syntáz nebyl významně pozměněn po amputaci ocasu u těchto pulců, ani po transplantaci XtiSC (viz. Obr 29 a 30). To naznačuje, že v průběhu zranění se mění pouze aktivita těchto syntáz, nikoliv jejich exprese. V několika případech jsme také pozorovali částečnou kolokalizaci obou syntáz a XtiSC barvených proti RFP.

Jelikož se produkce NO u XtiSC *in vitro* neprokázala, a to ani po stimulaci, rozhodli jsme se prověřit jejich produkci NO *in vivo* po transplantaci do pulců *X. tropicalis*.

Za tímto účelem jsme XtiSC mikroinjikovali do dorzální žíly u pulců ve stádiu 47 – 50. U jedné skupiny byla následně provedena amputace 1/3 ocasu, druhá skupina bez amputace sloužila jako kontrola. Poté jsme pomocí NO indikátoru DAF-2DA barvili pulce v čase 0h, 6h, 24h, 72h a 7 dní po transplantaci a pozorovali je pomocí fluorescenčního stereomikroskopu.

Z výsledků bylo patrné, že produkce NO v celém pulci se zvedá v prvních hodinách a následně je utlumena. Dále jsme pozorovali kolokalizaci DAF-2DA a RFP značených XtiSC, která nastupovala v prvních hodinách po transplantaci, gradovala v průběhu 24h a poté byl DAF-2DA zelený signál postupně potlačen (viz. Obr. 31 – 35). Zajímavé je, že kolokalizace DAF-2DA a RFP byla zaznamenána i u kontrolních pulců bez amputace ocasu. V tomto případě je ale nutné vzít v úvahu fakt, že zranění, které by stimulovalo XtiSC k produkci NO, mohlo být způsobeno už samotným vpichem kapiláry při transplantaci buněk. Tyto výsledky prokázaly schopnost XtiSC produkovat NO v reakci na zranění *in vivo*. Fakt, že se nám nepodařilo detekovat produkci NO pomocí Griessovy reakce, nemusí být na škodu. Produkce NO pomocí XtiSC je zřejmě přísně regulovaná, a proto by mohla být pro regeneraci nápomocná. Velká koncentrace NO totiž může průběh regenerace spíše zhoršovat (Franchini a Bertolotti, 2011).

V rámci prověření regenerativního potenciálu XtiSC jsme se zabývali jejich vlivem na satelitní buňky. Jedná se o kmenové buňky, které nalézáme u všech obratlovců, a jsou zcela nepostradatelné pro regeneraci svalstva.

V klidovém stavu jsou satelitní buňky uloženy mezi svalovými vlákny a bazální lamínu (Chen a kol., 2006). Při poranění dojde k aktivaci těchto buněk, čímž znovu spustí buněčný cyklus, namnoží se a následně diferencují v myoblasty. Ty poté zfúzí za vzniku myofibril, které nahradí poškozený sval (Church, 1969; Bischoff, 1986). Aby byla zachována populace satelitních buněk připravených pro další opravy, dochází u části buněk k deaktivaci a návratu do quiescentního stavu (shrnutí v Chargé a Rudnicki, 2004).

Pro identifikaci satelitních buněk slouží transkripční faktor Pax7. Tento protein je exprimován v quiescentních i proliferujících satelitních buňkách a v průběhu diferenciace ve svalové buňky je jeho exprese utlumena.

Proliferující satelitní buňky lze identifikovat pomocí koexprese Pax7 a Myf5 a diferencující buňky pak pomocí koexprese Myf5 a MyoD (Cornelison a kol., 1997; Seale a kol., 2000).

Na aktivaci satelitních buněk se významně podílí NO produkovaný nNOS. Ve spolupráci s Hgf mění morfologii a adhezivitu satelitních buněk, což vede k jejich aktivaci a proliferaci (Anderson, 2000; Buono a kol., 2012).

Díky kontrolnímu barvení XtiSC jsme u těchto buněk potvrdili pozitivní expresi Pax7 (viz. Obr. 37). Imunohistochemickým barvením jsme rovněž dokázali částečnou kolokalizaci Pax7 a XtiSC barvených proti RFP, a to jak u *X. tropicalis* (viz. Obr. 38), tak u *X. laevis* (viz. Obr. 24). Toto zjištění nás vedlo ke spekulacím, zdali by XtiSC mohly být schopny diferencovat ve svalové prekurzory.

XtiSC disponují multipotentním diferenciačním potenciálem, *in vitro* diferencují v chondrocyty, adipocyty a osteocyty a *in vivo* v kardiomyocyty (Strnadová, 2016; Nguyen a kol., 2019a). Pax7 je důležitým faktorem s rolí v embryonálním vývoji (Basch a kol., 2006). Mimoto ale také funguje jako specifický marker pro myší subpopulaci spermatogonií A (Aloisio a kol., 2014).

Nicméně XtiSC byly na expresi zárodečných markerů negativní (*dazl*, *ddx4* a *ddx25*), čímž byl již dříve potvrzen jejich somatický původ. Je potřeba vzít v úvahu, že XtiSC jsou progenitory nejen Sertoliho buněk, ale také peritubulárních myoidních buněk (Tlapáková a kol., 2016). Jedná se o buňky, které obklopují semenotvorné kanálky varlat, jsou kontraktilní a vykazují znaky buněk hladkého svalstva (shrnuto v Maekawa a kol., 1996). Ale jestli mohou XtiSC opravdu fungovat jako svalové progenitory, bude předmětem dalších studií.

Ve snaze zjistit, zda mají XtiSC nějaký vliv na satelitní buňky, jsme porovnávali jejich počet na imunohistochemicky barvených řezech pulců *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50. Srovnávali jsme počet satelitních buněk na 1 pulce u skupiny s transplantovanými XtiSC a bez nich, přičemž oběma pulcům byla po transplantaci amputována 1/3 ocasu. U skupiny 1 den po amputaci nebyl prokázán vliv na satelitní buňky, ale u skupiny 3 dny po amputaci byl počet satelitních buněk u pulců s transplantovanými XtiSC signifikantně vyšší. Lze se tedy domnívat, že XtiSC mohou mít pozitivní vliv na probíhající regeneraci.

V poslední části práce jsme pozornost upřeli na ROC. Jedná se o nově popsané buňky, které perzistují pod pokožkou pulce. Jsou snadno identifikovatelné pomocí markerů Lef1 a Tp63. Při poranění jsou aktivovány působením myeloidních buněk a migrují do místa zranění. Zde ROC ustanovují signální centrum a produkují faktory, které se podílí na regeneraci, buněčné proliferaci a diferenciaci. Mezi tyto faktory patří Fgf8, Fgf9, Fgf10, Fgf20, Tgf- β , Notch1, Wnt-3a, Wnt-5a, Bmp4, Bmp2, Delta-1, Msx1 a Msx2. ROC jsou pro správný průběh regenerace zcela nepostradatelné, jejich ablace má za následek regenerační inkompetenci (Aztekin a kol., 2019; 2020).

V prvotní fázi regenerace je významná signalizace Tgf- β , která napomáhá zacelení rány a reguluje buněčnou proliferaci (Ho a Whitman, 2008). V pozdějších fázích regenerace přebírá klíčovou roli Bmp signalizace, jíž podléhá Notch s ligandem Delta-1 a Msx (Beck a Slack, 2002; Beck a kol., 2003, 2006). Dalším důležitým hráčem je Fgf a Wnt signalizace, které jsou ovlivňovány působením Bmp (Lin a Slack, 2008). Tyto faktory společně regulují buněčné chování jako je migrace a proliferace vedoucí k regeneraci. Deaktivace kterékoliv z těchto molekul nevyhnutelně vede k zhoršené či úplně potlačené regeneraci.

Pomocí analýzy genové exprese jsme u XtiSC zjistili pozitivní expresi všech těchto genů kromě *wnt-3a* a *tp63* (viz. Tab. 11). Wnt-3a molekula je pro regeneraci podstatná (Lin a Slack, 2008), nicméně Tp63 koexprimován společně s Lef1 funguje jako identifikátor pro ROC (Aztekin a kol., 2019). Pozitivní expresi *tp63* jsme tedy u XtiSC neočekávali. Tímto jsme prokázali, že XtiSC by mohly v reakci na zranění produkovat faktory napomáhající regeneraci.

Z výsledků této diplomové práce lze předpokládat, že XtiSC by mohly mít pozitivní vliv na průběh regenerace. XtiSC exprimují NO syntázy a jsou schopny produkce NO *in vivo*. Dále exprimují markery ROC, které jsou pro regeneraci klíčové. Je tedy otázkou, zdali by XtiSC mohly fungovat jako signální centrum podobně jako ROC. Pravděpodobně také mohou diferencovat v progenitory svalových buněk, což bude předmětem dalších studií. Zajímavé by bylo zjistit, jestli mohou XtiSC ovlivňovat regeneraci u regeneračně-inkompetentních pulců *X. laevis* v refraktorní fázi. Je zapotřebí dalších studií, aby byl prověřen regenerační potenciál XtiSC a jejich případné budoucí použití v regenerační medicíně.

8. Závěr

- Bylo prokázáno, že *X. tropicalis* refraktorní fázi úplně postrádá, nebo je u něj významně potlačena.
- Potvrdili jsme schopnost XtiSC přežít po alogenní transplantaci do dorzální žíly u pulců *X. tropicalis* a po xenogenní transplantaci u pulců *X. laevis*.
- Mikroinjekcí XtiSC do dorzální žíly byla u pulců *X. tropicalis* po amputaci ocasu potvrzena schopnost těchto buněk preferenčně migrovat do místa zranění.
- S využitím morpholino oligonukleotidů byla prokázána zhoršená schopnost migrovat do místa zranění u XtiSC transplantovaných do dorzální žíly u pulců *X. laevis* s vyřazenou funkcí eNOS a nNOS. Tímto byl potvrzen vliv oxidu dusnatého (NO) na migraci XtiSC *in vivo*.
- Imunocytochemickým barvením byla potvrzena pozitivní exprese nNOS, iNOS a Pax7 u XtiSC.
- Imunohistochemickým barvením vibratomových řezů byla potvrzena pozitivní exprese nNOS a iNOS v pokožkových buňkách pulců *X. tropicalis* ve stádiu 47 – 50. Byla pozorována částečná kolokalizace nNOS a iNOS s XtiSC barvenými proti RFP.
- Pomocí Griessovy reakce bylo zjištěno, že XtiSC nejsou schopny produkce NO *in vitro* ani po stimulaci supernatantem ze splenocytů, IFN- γ a lipopolysacharidem.
- Po transplantaci XtiSC do dorzální žíly u pulců *X. tropicalis* byla pomocí NO indikátoru DAF-2DA potvrzena schopnost těchto buněk produkovat NO *in vivo*.
- Imunohistochemickým barvením vibratomových řezů a následnou statistickou analýzou byl prokázán pozitivní vliv transplantovaných XtiSC na počet satelitních buněk 3. den po amputaci u pulců *X. tropicalis*. Zároveň byla potvrzena částečná kolokalizace Pax7⁺ satelitních buněk s RFP⁺ XtiSC.
- Analýzou genové exprese metodou RT-PCR byla u XtiSC potvrzena exprese markerů ROC, které jsou nepostradatelné pro regeneraci.

9. Seznam literárních zdrojů

Abaffy, P. (2020). Úloha oxidu dusnatého počas embryonálneho hojenia a regenerácie. (Disertační práce). Dostupné z:

https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSSIONDC4C9D7C94A4AE5F5E633E92364E6D25/zzp/detail/143375/?back_id=7

Adams, D. S., Masi, A., & Levin, M. (2007). H⁺ pump-dependent changes in membrane voltage are an early mechanism necessary and sufficient to induce *Xenopus* tail regeneration. *Development*, *134*(7), 1323-1335.

*Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, *357*(3), 593-615.

Aloisio, G. M., Nakada, Y., Saatcioglu, H. D., Peña, C. G., Baker, M. D., Tarnawa, E. D., ... & Amatruda, J. F. (2014). PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *The Journal of clinical investigation*, *124*(9), 3929-3944.

Amaya, E., Offield, M. F., & Grainger, R. M. (1998). Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends in Genetics*, *14*(7), 253-255.

Anderson, J. E. (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Molecular biology of the cell*, *11*(5), 1859-1874.

Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, *32*(3), 252.

Aztekin, C., Hiscock, T. W., Marioni, J. C., Gurdon, J. B., Simons, B. D., & Jullien, J. (2019). Identification of a regeneration-organizing cell in the *Xenopus* tail. *Science*, *364*(6441), 653-658.

Aztekin, C., Hiscock, T. W., Butler, R., Andino, F. D. J., Robert, J., Gurdon, J. B., & Jullien, J. (2020). The myeloid lineage is required for the emergence of a regeneration-permissive environment following *Xenopus* tail amputation. *Development*, *147*(3).

* Sekundární zdroj

- Basch, M. L., Bronner-Fraser, M., & García-Castro, M. I. (2006). Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature*, 441(7090), 218-222.
- Beane, W. S., Tseng, A. S., Morokuma, J., Lemire, J. M., & Levin, M. (2012). Inhibition of planar cell polarity extends neural growth during regeneration, homeostasis, and development. *Stem cells and development*, 21(12), 2085-2094.
- Beck, C. W., & Slack, J. M. (2002). Notch is required for outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *International Journal of Developmental Biology*, 46(2), 255-258.
- Beck, C. W., Christen, B., & Slack, J. M. (2003). Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Developmental cell*, 5(3), 429-439.
- Beck, C. W., Christen, B., Barker, D., & Slack, J. M. (2006). Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles. *Mechanisms of development*, 123(9), 674-688.
- Bellerby, C. W. (1934). A rapid test for the diagnosis of pregnancy. *Nature*, 133(3361), 494.
- Bischoff, R. (1986). Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Developmental biology*, 115(1), 129-139.
- Bistoni, G., Calvitti, M., Mancuso, F., Arato, I., Falabella, G., Cucchia, R., ... & Nastruzzi, C. (2012). Prolongation of skin allograft survival in rats by the transplantation of microencapsulated xenogeneic neonatal porcine Sertoli cells. *Biomaterials*, 33(21), 5333-5340.
- Boissel, J. P., Ohly, D., Bros, M., Gödtel-Armbrust, U., Förstermann, U., & Frank, S. (2004). The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. *Journal of investigative dermatology*, 123(1), 132-139.
- Buono, R., Vantaggiato, C., Pisa, V., Azzoni, E., Bassi, M. T., Brunelli, S., ... & Clementi, E. (2012). Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. *Stem Cells*, 30(2), 197-209.

Cannatella, D. C., & De Sa, R. O. (1993). *Xenopus laevis* as a model organism. *Systematic Biology*, 42(4), 476-507.

Cornelison, D. D. W., & Wold, B. J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Developmental biology*, 191(2), 270-283.

*Cornelissen, A. S., Maijenburg, M. W., Nolte, M. A., & Voermans, C. (2015). Organ-specific migration of mesenchymal stromal cells: who, when, where and why?. *Immunology letters*, 168(2), 159-169.

Dal Secco, D., Paron, J. A., de Oliveira, S. H., Ferreira, S. H., Silva, J. S., & de Queiroz Cunha, F. (2003). Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, 9(3), 153-164.

Daneshmandi, S., Karimi, M. H., & Pourfathollah, A. A. (2017). TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *International immunopharmacology*, 44, 191-196.

De Sa, R. O., & Hillis, D. M. (1990). Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Molecular Biology and Evolution*, 7(4), 365-376.

Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.

Du, Y. Y., Du, Y. Y., Zhou, S. H., Zhou, T., Su, H., Pan, H. W., ... & Liu, Q. M. (2008). Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *Cytotherapy*, 10(5), 469-478.

Dym, M., & Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction*, 3(3), 308-326.

Evans, B. J., Kelley, D. B., Tinsley, R. C., Melnick, D. J., & Cannatella, D. C. (2004). A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, 33(1), 197-213.

Franchini, A., & Bertolotti, E. (2011). Tail regenerative capacity and iNOS immunolocalization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Cell and tissue research*, 344(2), 261.

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5), 267-274.

Fukazawa, T., Naora, Y., Kunieda, T., & Kubo, T. (2009). Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period. *Development*, 136(14), 2323-2327.

Fuseler, J. W., & Valarmathi, M. T. (2016). Nitric oxide modulates postnatal bone marrow-derived mesenchymal stem cell migration. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 133.

Galliot, B., & Chera, S. (2010). The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends in cell biology*, 20(9), 514-523.

Gargioli, C., & Slack, J. M. (2004). Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development*, 131(11), 2669-2679.

*Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*, 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

*Gimble, J. M., Guilak, F., Nuttall, M. E., Sathishkumar, S., Vidal, M., & Bunnell, B. A. (2008). In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), 228-238.

Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K., & Yokoyama, H. (2014). Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Developmental biology*, 396(1), 31-41.

Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., ... & Blitz, I. L. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328(5978), 633-636.

Higgins, G. M., Anderson R. M., (1931). Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch pathol*, 12, 186-202.

*Hirsch, N., Zimmerman, L. B., & Grainger, R. M. (2002). *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 225(4), 422-433.

Ho, D. M., & Whitman, M. (2008). TGF- β signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Developmental biology*, 315(1), 203-216.

Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395.

Hsieh, P. C., Segers, V. F., Davis, M. E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J. D., ... & Lee, R. T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature medicine*, 13(8), 970.

Chang, Y. J., Liu, J. W., Lin, P. C., Sun, L. Y., Peng, C. W., Luo, G. H., ... & Chiou, T. W. (2009). Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life sciences*, 85(13-14), 517-525.

Chang, J., Baker, J., & Wills, A. (2017). Transcriptional dynamics of tail regeneration in *Xenopus tropicalis*. *genesis*, 55(1-2), e23015.

*Charge, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, 84(1), 209-238.

Chen, Y., Lin, G., & Slack, J. M. (2006). Control of muscle regeneration in the *Xenopus* tadpole tail by Pax7. *Development*, 133(12), 2303-2313.

Chen, Y., Love, N. R., & Amaya, E. (2014). Tadpole tail regeneration in *Xenopus*.

Church, J. C. (1969). Satellite cells and myogenesis; a study in the fruit-bat web. *Journal of anatomy*, 105(Pt 3), 419.

Frank, S., Kämpfer, H., Wetzler, C., & Pfeilschifter, J. (2002). Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney international*, 61(3), 882-888.

- Kumar, A., Velloso, C. P., Imokawa, Y., & Brockes, J. P. (2004). The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on MSX1. *PLoS biology*, 2(8), e218.
- Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 5(6), 485-489.
- Le Blanc, K. (2006). Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*, 8(6), 559-561.
- Lee, R. H., Efron, D., Tantry, U., & Barbul, A. (2001). Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *Journal of Surgical Research*, 101(1), 104-108.
- Lin, G., & Slack, J. M. (2008). Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Developmental biology*, 316(2), 323-335.
- *Li, J., Zhang, S., & Amaya, E. (2016). The cellular and molecular mechanisms of tissue repair and regeneration as revealed by studies in *Xenopus*. *Regeneration*, 3(4), 198-208.
- Love, N. R., Chen, Y., Bonev, B., Gilchrist, M. J., Fairclough, L., Lea, R., ... & Amaya, E. (2011). Genome-wide analysis of gene expression during *Xenopus tropicalis* tadpole tail regeneration. *BMC developmental biology*, 11(1), 70.
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., ... & Amaya, E. (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology*, 15(2), 222.
- *Maekawa, M., Kamimura, K., & Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology*, 59(1), 1-13.
- Mansilla, E., Marin, G. H., Sturla, F., Drago, H. E., Gil, M. A., Salas, E., ... & Iorio, G. (2005, January). Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. In *Transplantation proceedings* (Vol. 37, No. 1, pp. 292-294). Elsevier.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9(2), 493.
- Nguyen, T. M. X., Vegrichtova, M., Tlapakova, T., Krulova, M., & Krylov, V. (2019a). Epithelial-mesenchymal transition promotes the differentiation potential of *Xenopus tropicalis* immature Sertoli cells. *Stem cells international*, 2019.

Nguyen, T. M. X., Vegrictova, M., Tlapakova, T., Krulova, M., & Krylov, V. (2019b). The interconnection between cytokeratin and cell membrane-bound β -catenin in Sertoli cells derived from juvenile *Xenopus tropicalis* testes. *Biology Open*, 8(12).

*Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. *New York: Garland Pub.*

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411), 143-147.

*Relaix, F., & Zammit, P. S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 139(16), 2845-2856.

Ryan, P. C., & Fitzpatrick, J. M. (1986). Experimental testicular torsion: Do spermatozoal autoantigens cause immunological activation?. *World Journal of Urology*, 4(2), 92-99.

Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777-786.

Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., ... & Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 138(4), 722-737.

Schäffer, M. R., Tantry, U., Gross, S. S., Wasserkrug, H. L., & Barbul, A. (1996). Nitric oxide regulates wound healing. *Journal of surgical research*, 63(1), 237-240.

*Slack, J. M. W., Lin, G., & Chen, Y. (2008). Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair. *Cellular and molecular life sciences*, 65(1), 54.

Shapiro, H. A., & Zwarenstein, H. (1934). A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature*, 133(3368), 762.

Ställmeyer, B., Anhold, M., Wetzler, C., Kahlina, K., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2002). Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration. *Nitric Oxide*, 6(2), 168-177.

Stich, R. W., Shoda, L. K., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T. W., & Brown, W. C. (1998). Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infection and immunity*, 66(9), 4130-4136.

Strnadova, K. (2016). Indukce diferenciace Testikulárních kmenových buněk *Xenopus tropicalis in vitro* (Diplomová práce). Dostupné z:
https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSION3D4BCDEA5B2B1BD94D7C2D3CD62394BA/zzp/detail/155548/?back_id=7

Sugiura, T., Tazaki, A., Ueno, N., Watanabe, K., & Mochii, M. (2009). *Xenopus* Wnt-5a induces an ectopic larval tail at injured site, suggesting a crucial role for noncanonical Wnt signal in tail regeneration. *Mechanisms of development*, 126(1-2), 56-67.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.

Taniguchi, Y., Watanabe, K., & Mochii, M. (2014). Notochord-derived hedgehog is essential for tail regeneration in *Xenopus* tadpole. *BMC developmental biology*, 14(1), 27.

Tlapakova, T., Nguyen, T. M. X., Vegrichtova, M., Sidova, M., Strnadova, K., Blahova, M., & Krylov, V. (2016). Identification and characterization of *Xenopus tropicalis* common progenitors of Sertoli and peritubular myoid cell lineages. *Biology open*, 5(9), 1275-1282.

Tomankova, S., Abaffy, P., & Sindelka, R. (2017). The role of nitric oxide during embryonic epidermis development of *Xenopus laevis*. *Biology open*, 6(6), 862-871.

Tomankova, S. (2019). Úloha oxidu dusnatého (NO) v průběhu embryonálního vývoje pokožky drápatky vodní (Disertační práce). Dostupné z:
https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSION8EEE9184338B53FECE567C48A4F9B213/zzp/detail/143374/?back_id=7

Tseng, A. S., Adams, D. S., Qiu, D., Koustubhan, P., & Levin, M. (2007). Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 301(1), 62-69.

Tseng, A. S., Carneiro, K., Lemire, J. M., & Levin, M. (2011). HDAC activity is required during *Xenopus* tail regeneration. *PloS one*, 6(10), e26382.

Yamasaki, K., Edington, H. D., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovesdi, I., ... & Billiar, T. R. (1998). Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *The Journal of clinical investigation*, *101*(5), 967-971.

*Volarevic, V., Gazdic, M., Markovic, B. S., Jovicic, N., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *Biofactors*, *43*(5), 633-644.

Zhan, R., Yang, S., He, W., Wang, F., Tan, J., Zhou, J., ... & Luo, G. (2015). Nitric oxide enhances keratinocyte cell migration by regulating Rho GTPase via cGMP-PKG signalling. *PloS one*, *10*(3).

Zhan, R., He, W., Wang, F., Yao, Z., Tan, J., Xu, R., ... & Gaoxing, L. U. O. (2016). Nitric oxide promotes epidermal stem cell migration via cGMP-Rho GTPase signalling. *Scientific reports*, *6*(1), 1-12.

Zhou, J., Dehne, N., & Brüne, B. (2009). Nitric oxide causes macrophage migration via the HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42 and Rac1. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(6), 741-749.