

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Regenerace srdeční svaloviny u obratlovců  
Regeneration of heart muscle in vertebrates

Bakalářská práce

Školitel: Ing. RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

Praha, 2021

## **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, 02.05.2021

Barbora Bergelová

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, PhD. za pomoc při konzultacích, také za čas a trpělivost, kterou věnoval této práci. Stejně tak bych chtěla poděkovat i své rodině a blízkým, kteří při mně po celou dobu s trpělivostí stáli a podporovali.

## Abstrakt

Modelové organismy jako *Danio rerio* mají schopnost regenerovat srdeční tkáň v průběhu celého života. Regenerační schopnost u obojživelníků se naproti tomu liší. Zatímco čolky je schopný opravit své srdce po celou dobu života, *Xenopus leavis* tuto schopnost ztrácí během metamorfózy. Rozdíly ve schopnosti regenerace se nemusí lišit jen mezi čolky a drápatkami. Oproti *Xenopus leavis* má *Xenopus tropicalis* schopnost regenerovat i v dospělosti. Savci namísto toho mají schopnost regenerace velmi omezenou. U myši i člověka byla pozorována pouze několik prvních dnů po narození. V dospělosti dochází k hojení rány a vzniku kolagenové jizvy. Z toho důvodu je velmi podstatné zkoumat molekulární mechanismy u modelových organismů, které si zachovávají schopnost regenerace, pro možné budoucí klinické uplatnění na lidech.

**Klíčová slova:** regenerace, srdeční svalovina, hojení, zebříčka pruhovaná, savci, obojživelníci, vývoj srdce, obratlovci

## Abstrakt

The model organisms like for example the fish *Danio rerio* has the ability to regenerate heart muscle during its whole lifespan. Compared to *Danio rerio*, the ability of heart regeneration differs in amphibians. While the newt has the ability to regenerate its heart tissue throughout its whole life, the *Xenopus leavis* loses its power when it goes through metamorphosis. The regenerative ability does not only differ between salamanders and claws. We can observe some differences between regeneration of *Xenopus tropicalis* and *Xenopus leavis* too. Compared to *Xenopus leavis*, *Xenopus tropicalis* has the ability to regenerate its heart tissue even in adulthood. Mammals have a very limited ability to regenerate their heart muscle. We can observe the ability to reverse heart damage in mice and humans for a very limited time of a few days after they are born. In adulthood they repair the heart muscle and the rich collagen scar is formed. It is vital that signaling pathways in regeneration of model organisms is researched further, so that the knowledge gained may help us in the treatment of heart injuries in humans.

**Key words:** regeneration, heart muscle, repair, zebrafish, mammals, amphibians, heart development, vertebrates

## Seznam zkratek

AEC	apical epithelial cap	vrcholový epiteliální uzávěr
ASC	apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain	speck-podobný protein spojený s apoptózou obsahující doménu náboru kaspázy
BMP	bone morphogenetic protein	kostní morfogenetický protein
brg1	brahma-related gene 1	gen 1 příbuzný s brahma
CDK	cyclin dependent kinase	cyklin dependentní kináza
cdkn1c	cyclin dependent kinase inhibitor 1C	inhibitor cyklin dependentní kinázy 1c
CM	cardiomyocyte	kardiomyocyty
cmlc2	cardiac myosin light chain	lehký srdeční řetězec myosinu
cxcl12a (SDF1)	stromal cell-derived factor 1	faktor odvozený ze stromálních buněk 1
cxcr4b	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C chemokinového receptoru typu 4b
dn-vegfa	dominant negative vegf	dominantně negativního vegfaa
Fgf	fibroblast growth factor	růstový faktor fibroblastů
FGFR	fibroblast growth factor receptor	receptor růstového faktoru fibroblastů
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
Igf	insulin like growth factor-1	inzulinu podobný růstový faktor
IGF-IR	insulin-like growth factor 1 receptor	receptor inzulínu podobného růstového faktoru
IL-1 $\beta$	interleukine 1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IM	myocardial infarction	infarkt myokardu
Jak1/stat3	Janus kinaza 1/stat 3	janus kinaza 1/stat 3
lefty2	left-right determination factor 2	levo-pravý determinační faktor 2
MMP	matrix metalloproteinases	metaloproteinázy
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	jaderný transkripční faktor kappa B buněk
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3	protein obsahující NOD-, LRR- a pyrinovou doménu 3

NRG-1- $\beta$ 1	neuregulin	neuregulin
Nrp	neuropilin	neuropilin
Opn	osteopontine	osteopontin
p38 $\alpha$ MAPK	p38 $\alpha$ mitogen-activated protein kinases p38 $\alpha$ mitogen-aktivovaná protein kinasa	
pdgf	platelet derived growth factor	růstový faktor odvozený od trombocytů
PDGFR	platelet derived growth factor receptor receptor růstového faktoru odvozeného od trombocytů	
pH3	phospho-histone H3	fosfohiston H3
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
Plg	plasminogen	plasminogen
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
RA	retinoic acid	kyselina retinová
raldh2	retinaldehyde dehydrogenase 2	retinaldehyd dehydrogenáza 2
spp1	secreted phosphoprotein 1	fosfoprotein 1
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$	transformující faktor $\beta$
TH	thyroid hormone	thyroidní hormon
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase tkáňový inhibitor metalloproteinas	
tnf $\alpha$	tumor necrotic factor $\alpha$	faktor nekrózy nádorů
u-PA	urokinase-type plasminogen activator aktivátor plasminogenu urokinázového typu	
Vegfa	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
wif1	wnt inhibitory factor 1	inhibiční faktor wnt 1
wnt	wingless/Int-1	wingless/Int-1
Yap	yes-associated protein	protein asociovaný s yes

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Vývoj srdce u modelových organismů .....	2
2.1. Zebřička pruhovaná ( <i>Danio rerio</i> ).....	2
2.2. Obojživelníci .....	3
2.3. Savci .....	4
3. Typy regenerace .....	5
3.1. Epimorfnní regenerace.....	5
3.2. Morfallaxe .....	6
3.3. Hypertrofie.....	6
4. Hojení .....	6
5. Regenerace srdce u savčích a nesavčích obratlovců .....	8
5.1. Ryby.....	8
5.2. Obojživelníci .....	15
5.3. Savci .....	18
6. Evoluční pohled.....	24
7. Závěr.....	26
8. Reference.....	27

# 1. Úvod

Podle dat z roku 2012 jsou srdeční onemocnění jednou z nejvíce se vyskytujících nemocí s vysokou celosvětovou mortalitou (shrnuje v Laslett et al., 2012).

Vysoký počet srdečních onemocnění může být způsoben určitými faktory, jako je například cholesterol či vysoký tlak. Ve studii z roku 1961 pozorovali vyšší výskyt vaskulárních poruch u lidí s vysokým cholesterolem (Kannel et al., 1961).

Dospělí savci nemají schopnost regenerovat svá srdce po srdečních onemocněních. Dochází u nich k hypertrofii a vytvoření jizvy, která nahradí poškozenou tkáň (shrnuje v Hesse et al., 2018).

Kvůli narůstající incidenci kardiovaskulárních chorob a s tím spojené potřeby regenerace poškozené srdeční tkáně probíhá intenzivní výzkum na poli regenerativní medicíny a jsou zaváděny i různé způsoby klinických terapií. V současnosti je známo hned několik testů léčebných založených na buněčných kulturách. Například buněčné terapie založené na kosterních myoblastech či buňkách z kostní dřevě, kde je zatím nejúčinnější léčba pomocí mezenchymálních buněk. Dalšími buňkami, u kterých se zkoumá, zda by mohly být používány pro podporu regenerace, jsou embryonální kmenové buňky, či progenitorové buňky ze srdcí dospělých jedinců (shrnuje v Menasché, 2018).

Oproti tomu jsou známé modelové organismy jako zebřička, která má schopnost regenerovat ploutve (shrnuje v Gemberling et al., 2013) a obojživelníci, kteří dokáží obnovit své končetiny (shrnuje v Brockes, 1997). U těchto dvou živočichů víme, že mají schopnost i regenerace poškozených srdcí (Poss et al., 2002; Piatkowski et al., 2013).

Určení molekul a signálních drah, které jsou zodpovědné za opravu poškozených tkání, by mohlo být zásadní pro budoucí možnou léčbu lidí.

V této práci je cílem nastínit regenerační schopnost u zkoumaných organismů, z ryb například u *Danio rerio* nebo obojživelníků. Společně s tím se práce snaží popsat molekulární mechanismy, které jsou zodpovědné za regenerační schopnost u *Danio rerio*, a dále signální dráhy u lidí, které regeneraci srdce naopak znemožňují a způsobují zjizvení.



## 2. Vývoj srdce u modelových organismů

Srdeční stěny se skládají ze tří částí, které můžeme rozlišit na epikard, myokard a endokard. Epikard je zevní vrstva srdce, která obklopuje myokard a pochází z mezodermu. Prostřední vrstva je myokard. Jedná se o samotnou srdeční svalovinu, která provádí srdeční kontrakce. Endokard je vnitřní vrstva, která se podílí na vzniku chlopní srdce. Vrstva endokardu vzniká z buněk epiteliálních.

### 2.1. Zebřička pruhovaná (*Danio rerio*)

Srdce zebřičky pruhované se skládá se čtyř částí – komora, síň, bulbus arteriosus a sinus venosus, které se vytvářejí již 48 hodin po fertilizaci embrya (Hu et al., 2000). Srdce je vytvářeno z progenitorových buněk. Progenitorové buňky, z kterých vzniká srdce, leží v blastule v laterálních částech embrya. Po přiblížení progenitorových buněk k ose těla dochází k jejich dělení a následně srůstají a vytváří dvě trubicovitá primordia. Z trubicovitých primordií postupně vznikají srdeční trubice, které nakonec srůstají v jednu mající kuželový tvar. Uprostřed srdeční trubice se nachází buňky endokardu. Třicet hodin od fertilizace embrya začne srdeční trubice vytvářet smyčku (Stainier et al., 1993).

Osmnáct hodin po oplození dochází v srdci k expresi genu *lefty2* (levo-pravý determinační faktor 2 – left-right determination factor 2), který je lokalizovaný na levé straně srdce. Během dalších čtyř hodin se *lefty2* přemísťuje na dorzální stranu srdce. Stejně tak dochází i k přesunu buněk levého myokardu směrem na dorzální část. Dvacet devět hodin po oplození se *lefty2* vrací opět na levou stranu. Společně s přemístěním exprese se dorzální strana srdce natáčí na levou stranu a vzniká tím zakřivení (Baker et al., 2008). Síň a komora se poté přiblíží k sobě tak, že komora je umístěna na pravé části a síň na levé části srdce. Pět dní po oplození dochází opět k otočení. Síň se posune více do hrudní dutiny. Komora naopak získá středovou polohu (Singleman and Holtzman, 2012).

Transkripční faktor *gata5* je jeden z genů, které ovlivňují správný vývoj srdce. Jeho vliv je důležitý pro vznik správného množství endodermu. Mutanti, kterým chybí exprese *gata5*, mají méně vyvinutou srdeční komoru. Nedostatečné vyvinutí komory může být způsobeno tím, že *gata5* má vliv na proliferaci prekurzorů myokardu. V mutantech je proliferace snižena, a tím pádem se vyvine nedostatečné množství srdeční tkáně pro vznik komor. *gata5* má vliv i na expresi dalších srdečních genů, například *nkx2.5*, a genů, které působí na komponenty

sarkomery myokardu (Reiter et al., 1999). Mutanti bez schopnosti exprese genu *bmp2b* (kostní morfogenetický proteinu 2b – morphogenic protein 2b) či *Oep* (one-eye pinhead) měli sníženou schopnost exprese *gata5* od stádia gastruly. Což mělo vliv na sníženou expresi *nkx2.5*. Mutantní srdce měla menší schopnost diferenciacce buněk myokardu (Reiter et al., 2001).

Za správný vývoj srdce je dále zodpovědná signalizace FGF (růstový faktor fibroblastů – fibroblast growth factor). Tato rodina genů má vliv od stádia gastruly až do pozdějšího vývoje. Její důležitost můžeme pozorovat i po vzniku srdeční trubice (Marques et al., 2008). V mutantech, kterým chyběla funkční alela genu *fgf8* (Reifers et al., 1998), tak i v jedincích, kteří měli signalizaci pouze dočasně inhibovanou, byla pozorována zmenšená srdce. Rozdíl byl pozorovatelný především ve velikosti komor, které si zachovaly jen 1/3 normální velikosti (Marques et al., 2008).

## 2.2. Obojživelníci

U drápatky vodní (*Xenopus leavis*) (Mohun et al., 2000) probíhá vývoj srdce podobně jako u *Danio rerio* (Stainier et al., 1993; Baker et al., 2008; Singleman and Holtzman, 2012). Rozdíl mezi nimi je v počtu komor. Srdce *Xenopus* se skládá z jedné komory a dvou síní (Kolker et al., 2000). Během vývoje vzniká srdeční trubice spojením myokardu. I když dojde ke spojení, tak na anteriorní straně trubice nedojde k úplnému uzavření a zůstává tam otvor. V anteriorní části nakonec z endokardu vznikne první aortální oblouk. Posteriovní strana se plně uzavře a myokard obklopí sinus venosus. Srdeční trubice se v průběhu vývoje začne otáčet proti směru hodinových ručiček. Srdeční komora poté leží na levé straně a síň je umístěna více mediálně v embryu. Následuje stlačení trubice, při kterém dojde k posunu zadní části, tedy síně a sinus venosus. Síň se posune blíže ke komoře, přesněji k její dorzální části. V této době dojde i k odlišení tloušťky částí srdce, síň má silnější stěny než komora. Nakonec dojde k rozdělení síně na dvě pomocí přepážky (Mohun et al., 2000).

Při vývoji srdce je důležitá molekula RA (kyselina retinová – retinoic acid). Pokud došlo k znemožnění její exprese, nedošlo k vytvoření srdeční trubice. Společně s tím její inhibice ovlivnila i expresi dalších genů. GATA-4 a *Nkx2.5* měly zmenšenou expresi při inhibici RA (Collop et al., 2006). Stejně jako u *Danio rerio* i u *Xenopus leavis* je GATA signalizace potřebná ve vývoji srdce (Reiter et al., 1999; Peterkin et al., 2003). V jedincích, ve kterých nebyla možná translace RNA genu *Gata-6*, nedošlo k vývoji srdce. Tato zvířata měla nejčastěji na původním místě srdce střevo. Odstranění *Gata-6* mělo vliv i na další molekuly přítomné při vývoji srdce.

Přesněji na protein BMP-4 a gen *Nkx2.5*, který je regulační. Obě dvě tyto molekuly začaly být normálně exprimovány, ale v srdcích bez *Gata-6* si neudržely svou expresi po celou dobu vývoje jako u kontrolních srdcí (Peterkin et al., 2003). Pro správné vytvoření srdeční kličky při vývoji jedince je potřebná BMP signalizace. Protein BMP-4 je nejdříve exprimován po celé délce srdeční trubice. Postupně se během vývoje přesouvá pouze na levou stranu a vytváří pravolevou asymetrii. Po vytvoření kličky se jeho exprese přemísťuje do dorzální části srdce. Pokud došlo k inhibici exprese BMP-4 pomocí molekuly *noggin*, nedošlo k vytvoření srdeční kličky. Srdce si zachovala trubicovitý tvar, pouze došlo k rozrůznění částí srdce pomocí síly stěn (Breckenridge et al., 2001).

### 2.3. Savci

I u myši vzniká během vývoje srdce srdeční trubice, fúzí z myokardu, který pochází z laterální částí embrya. Uvnitř srdeční trubice se nachází endokard. Následně se srdeční trubice zakřivuje, čímž se vytvoří srdeční smyčka. Dochází k prodlužování přední části srdeční trubice a ke vzniku výtokového traktu v anteriorní oblasti trubice. V místě ohybu srdeční trubice se vytvoří levá komora. Tato komorová oblast zvětšuje svou výduť a společně s tím zvětšuje svůj objem do zadní části těla. V přítokovém traktu se nachází síňová oblast. Dojde k vytvoření síní. Nakonec se oddělí komory pomocí přepážky. Po tomto oddělení se vytváří pravá komora, jejíž místo je v části výtokového traktu. Tímto způsobem dochází u myši k vytvoření levé a pravé síně a levé a pravé komory, tedy k srdci se čtyřmi částmi (de Boer et al., 2012).

Transkripční faktory *Gata4* a *Gata6* mají význam ve vývoji srdce i u myši. V jedincích, kterým chyběly oba transkripční faktory, srdce zcela chybělo. Odstranění faktorů nemělo vliv na vývoj celého embrya, ale pouze na srdeční vývoj. K vývoji zbytku embrya docházelo zcela normálně. Vliv *Gata4*, *Gata6* se týkal především progenitorových buněk primárního srdečního pole. Progenitorové buňky druhého srdečního pole se normálně tvořily, zatímco buňky primárního srdečního pole měly tvorbu omezenou. Společně s tím byla inhibovaná i jejich schopnost diferenciovat na myocyty (Zhao et al., 2008).

Pro správný vývoj srdce je důležitá exprese genu *Fgf9*. Jeho produkt se nachází především v endokardu a epikardu vyvíjejících se myších srdcích. *Fgf9* se vytváří hlavně v apexu pravé komory, společně s tím i v pravé a levé komoře. Jedinci s knock out genu pro *Fgf9* měli menší srdce než kontrolní zvířata. Bylo to způsobeno tím, že buňky myokardu měly sníženou proliferaci. FGFR1c (receptor růstového faktoru fibroblastů – fibroblast growth factor receptor)

a FGFR2c jsou receptory, přes něž protein FGF9 působí na myokard vyvíjejícího se srdce. Pokud došlo ke knock out genů pro oba receptory, byly výsledky stejné jako u knock out *Fgf9*. Srdce měla opět sníženou proliferaci myokardu, stejně jako i narušenou mocnost srdečních komor. FGF signalizace je ovlivňována kyselinou retinovou (Lavine et al., 2005). Kyselina retinová má během vývoje velmi různorodou expresi. Jako první je produkovaná pouze v zadní části srdeční trubice, kde je lokalizovaný sinus venosus. Poté, co se na srdci vytvoří klička, se exprese rozroste i do síní. Až nakonec je exprese kyseliny retinové lokalizovaná v epikardu a myokardu vyvíjejícího se srdce (Moss et al., 1998).

### 3. Typy regenerace

#### 3.1. Epimorfní regenerace

Epimorfní regenerace je založená na tvorbě regenerativního blastému v místě poranění. Regenerativní blastem je složen buďto z dediferencovaných buněk, buněk progenitorových či buněk transdiferencovaných (shrnutí v Londono et al., 2018). K dediferenciaci a opravě tkáně dochází právě při regeneraci srdce u *Danio rerio* (Kikuchi et al., 2010; shrnutí v Londono et al., 2018).

Jedním z příkladů živočišného druhu, u kterého dochází k epimorfní regeneraci při poškození ocasu, je *Eublepharis macularius*. Po upadnutí ocasu z důvodu autotomie dochází ke vzniku krevní sraženiny, která je tvořena mrtvými erytrocyty. Postupně dochází k obalení sraženiny pomocí epidermis, která je v okolí. Epitelové buňky zesilují a obalují nově vzniklý blastem. Společně s tím dochází i k osidlování epiteliálních buněk novými krevními cévami a do blastemu pronikají nově vytvořené nervy. Od osmého dne po poškození je možné začít pozorovat vnikání myoblastů do blastemu a k jejímu růstu. V dalším období dochází k pomalé diferenciaci buněk a ukládání extracelulární hmoty, která se skládá z glykosaminoglykanů. Tato látka je obsažena v chrupkách. Vznikají chondrocyty a chondroblasty a epiteliální buňky keratinizují. Nakonec dojde k úplné diferenciaci buněk a tím zániku regenerativního blastemu. Ocas dorůstá do původní velikosti a získává původní zbarvení (McLean and Vickaryous, 2011).

Při epimorfní regeneraci vzniká velmi důležitá struktura s názvem AEC (vrcholový piteliální uzávěr – apical epithelial cap) (shrnutí v Londono et al., 2018). Ten vzniká z přilehlých epiteliálních buněk, které cestují do místa rány, kterou následně ze zadní části obalují. Na poraněné končetině v oblasti rány, kde se nachází AEC, dochází k zvýšení

proliferační buněk blastemu (Thornton, 1960). AEC stimuluje buňky blastemu k správnému průběhu regenerace pomocí vylučovaných látek, které napomáhají v nervové signalizaci nebo mají vliv na vylučování fibronectinu (shrnutí v Londono et al., 2018).

### 3.2. Morfallaxe

Dalším možným typem regenerace je morfallaxe. Tento typ regenerace probíhá z jedné poloviny podobným způsobem jako epimorfnní regenerace. Nejdříve dochází k vytvoření blastemu v místě poranění. Původní část těla, na které blastem vzniká, ale celá projde reorganizací. Tedy přesněji určitá část mezi poraněnou částí a nezraněnou částí těla zcela změní svou organizaci (shrnutí v Carlson, Bruce M., 2007).

Jeden příklad z živočichů, který je schopný morfallaxe je například červ *Sabella*. U tohoto červa je možné pozorovat regeneraci, i pokud je jeho část rozřezána na malé části. Pro úspěšnou regeneraci jsou potřebné alespoň čtyři články z původního těla. Z těchto článků dojde k regeneraci a vytvoření nové hlavové i zadní části těla (shrnutí v Carlson, Bruce M., 2007).

### 3.3. Hypertrofie

Hypertrofie je další z možných způsobů regenerace. Dochází k ní například u krys při regeneraci jater (shrnutí v Carlson, Bruce M., 2007) či právě při regeneraci srdce myši (shrnutí v Hesse et al., 2018). Při tomto typu regenerace dochází k zvětšení velikosti buněk nacházejících se uvnitř poškozeného orgánu. V tomto případě se jedná o reakci celoořánovou. Při hypertrofii dochází k zvětšení orgánu, ale nikoliv k obnově poškozené části tkáně (shrnutí v Carlson, Bruce M., 2007).

## 4. Hojení

Již šest hodin po IM (infarktu myokardu – myocardial infarction) jsou v srdci pozorovatelné nekrotické buňky. K nekróze dochází v místě poranění, v této studii se to týká levé komory srdce. V neporaněné části srdce nebo v části komory, která nebyla infarktem myokardu zasažena, dochází k smrti buněk neboli apoptóze. Ve větší míře dochází k apoptóze buněk blíže k místu, kde došlo k poškození, mezi nekrotickou a zdravou tkání. Určitá část buněk umírá i ve větší vzdálenosti od místa infarktu, kde komora není poškozena (Cheng et al., 1996). Po IM dochází k infiltraci srdce imunitními buňkami. Vyskytují se zde neutrofilové, které

dosahují nejvyšší koncentrace třetí den, dále pak leukocyty či makrofágy. Makrofágy mají v srdci dvojitou podobu. Mohou se vyskytovat jako M1 makrofágy, které mají prozánětlivou povahu a nachází se v srdci především první tři dny po poranění. Druhá varianta jsou M2 makrofágy, které mají protizánětlivý fenotyp a vyskytují se v srdci později, tedy až po pěti dnech od poranění. M1 makrofágy exprimují prozánětlivé molekuly jako jsou například TLR4, TLR6, IL-6, zatímco M2 makrofágy vytvářejí protizánětlivé molekuly jako je například IL-10 (Yan et al., 2013). Stejně jako dochází k infiltraci dvou druhů makrofágů (Yan et al., 2013), tak dochází i k mobilizaci i dvou druhů monocytů. Monocyty, které se vyskytují v prvních čtyřech dnech po poranění jsou Ly-6C<sup>hi</sup>, od pátého dne se vyskytují Ly-6C<sup>lo</sup> monocyty. Ly-6C<sup>hi</sup> monocyty mají prozánětlivou odpověď na poranění. Vytvářejí TNF- $\alpha$ , což je cytokin, který má prozánětlivé vlastnosti. Zatímco Ly-6C<sup>lo</sup> má spíše protizánětlivou reakci. Tyto odlišné monocyty mají i odlišný vliv na reakce v srdci. První monocyty, neboli Ly-6C<sup>hi</sup>, vytvářejí prostředí, ve kterém dochází k zánětu a odbourávání mrtvých částí tkání. Zatímco druhý typ monocytů pak vyvolává ukládání kolagenu (Nahrendorf et al., 2007). V těchto dvou odlišných fázích dochází i expresi IL-1R1 a IL-1R2. IL-1R1 je exprimovaný jako první v prvních sedmi dnech po poranění při zánětlivé fázi. K produkci IL-1R2 dochází až po sedmi dnech od infarktu. Tyto molekuly jsou zodpovědné za přilákání monocytů do místa zranění. Pokud totiž došlo k odstranění IL-1 signalizace, byla rána méně osidlována monocyty. IL-1 signalizace snižuje schopnost TGF- $\beta$  (transformující faktor  $\beta$  – transforming growth factor) (Saxena et al., 2013) přeměňovat fibroblasty na myofibroblasty (Desmoulière et al., 1993). Fibroblasty stimulované IL-1 exprimují MMP (metaloproteinázy – matrix metalloproteinases) kolagenázy (Saxena et al., 2013).

Po infarktu myokardu dochází ke vzniku inflamasomu NLRP3 (protein obsahující NOD-, LRR- a pyrinovou doménu 3 – NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) a expresi proteinu ASC (speck-podobný protein spojený s apoptózou obsahující doménu náboru kaspázy – Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) ve fibroblastech nacházejících se v srdci. V srdcích, ve kterých tyto dvě molekuly chyběly, tak nedocházelo k expresi IL-1 $\beta$  tak, jak k tomu docházelo v kontrolních srdcích. Inflamasom NLRP3 má v srdcích vliv na vznik poškození po prodělání infarktu, ovlivňuje apoptózu buněk. V srdcích NLRP3<sup>-/-</sup> docházelo k úmrtí menšího množství buněk oproti srdcím kontrolním. Stejně tak byla v NLRP3<sup>-/-</sup> srdcích pozorována lepší funkčnost po IM, protože docházelo k menšímu poškození (Sandanger et al., 2013). Podobný vliv byl pozorován i u APC<sup>-/-</sup> srdcí, ve kterých také docházelo k menší velikosti poranění. Zároveň byla tato srdce i méně

infiltrována neutrofilly a makrofágy a docházelo k menší expresi IL-6, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  (Kawaguchi et al., 2011).

Následně se v srdcích vytváří tzv. granulační tkán, která je viditelná jeden týden po infarktu. Postupně dochází k fagocytóze mrtvé tkáně pomocí leukocytů (Virag and Murry, 2003). Nejdříve se vytvoří pouze provizorní jizva, která se skládá především z fibrinu. Postupně je fibrin nahrazován kolagenem a tím dojde ke vzniku trvalé jizvy (Dobaczewski et al., 2006). V srdcích se zvyšuje exprese mRNA prokolagenu I a III. Buňky produkující tuto mRNA se svým fenotypem podobají fibroblastům či myofibroblastům. K tvorbě těchto dvou typů mRNA prokolagenu dochází nejen v místě přímého poškození tkáně, tedy v místě infarktu, ale i v částech odlehlejších od poškozené komory. Od sedmého dne od poranění dochází k ukládání kolagenu I a III v srdci. Množství ukládaného kolagenu se zvyšuje, až nakonec 90 dní od poškození dochází k nahrazení nekrotické tkáně právě těmito dvěma proteiny (Cleutjens et al., 1995a).

## 5. Regenerace srdce u savčích a nesavčích obratlovců

### 5.1. Ryby

Zebřička pruhovaná (*Danio rerio*), jakožto nesavčí obratlovec, dokáže po poranění regenerovat své srdce. Ve zraněné srdeční komoře nejdříve dojde k zástavě krvácení pomocí sraženiny a po dvou dnech od amputace je sraženina nahrazena fibrinem. Poss et al. (2002) zjistili, že zebřička dokáže plně regenerovat až dvacetiprocentní resekci komory do šedesáti dnů od poranění. Ve stejné studii pomocí inkorporace BrdU (bromodeoxyuridin - bromodeoxyuridine) během mitózy autoři prokázali, že k regeneraci srdce dochází díky hyperplazii, nikoliv hypertrofii (Poss et al., 2002).

Další možný způsob zkoumání regenerace srdce u zebřičky je zranění pomocí rychlého zmrazení měděným drátkem předem namočeným v kapalném dusíku. Při tomto poranění dochází k apoptóze poraněných buněk a nekróze (Gonzalez-Rosa et al., 2011). Proto je toto poranění více podobné infarktu myokardu u lidí, při kterém také dochází k apoptóze (Saraste et al., 1997; González-Rosa et al., 2011). Jako první, již šest hodin po poškození, se v místě poranění objevují neutrofilly, jako další v řadě jsou pozorovatelné eozinofily, makrofágy a T-buňky. Tři dny po poranění (v době vzniku jizvy) byly nejhojnějším typem imunitních buněk

pozorovaným v místě zranění makrofágy, přesněji makrofágy *tnfa*<sup>+</sup>. Ty jsou významné v raných fázích zánětlivé reakce a jsou podstatné pro ukládání kolagenu typu I. V pozdější fázi zánětlivé odpovědi jsou naopak podstatné *tnfa*<sup>-</sup> makrofágy, které napomáhají resorpci jizvové tkáně. Za přeměnu fenotypu z makrofága *tnfa*<sup>+</sup> na *tnfa*<sup>-</sup> je zodpovědný gen *spp1* (sekretovaný fosfoprotein 1 – secreted phosphoprotein 1), který kóduje protein Opn (osteopontin – osteopontine). Pokud nebyl Opn protein přítomný v raných fázích zánětu, tak docházelo k nižšímu ukládání Kolagenu typu I., zatímco jeho nepřítomnost v pozdějších fázích zánětu způsobila jeho horší odbourávání (Bevan et al., 2020).

Po poranění v tzv. zánětlivé odpovědi, dochází k zvýšené expresi *il-1b*, *tnf-a*, *il-8*, *ptgs-2b* (prostaglandin-endoperoxid syntáza 2b – prostaglandin-endoperoxide synthase 2b), *mpx* (myeloperoxidáza – myeloperoxidase), což jsou geny zánětlivých markerů. Pokud byla srdce v rané fázi regenerace ošetřena beclomethasonem, což je glukokortikoid, který působí protizánětlivě, anebo ibuprofenem s podobným účinkem, tak došlo k snížení exprese těchto pěti zánětlivých markerů (Huang et al., 2013a). Ošetření probíhalo tak, že jedinci byli na jeden den vloženi do nádrže s vodou s beclomethasonem či ibuprofenem (Mathew et al., 2007; Huang et al., 2013a). Zároveň došlo i ke zmenšení počtu fagocytů, které byly přítomny v místě zranění. Srdce, která byla ošetřena beclomethasonem, vykazovala sníženou schopnost regenerace a neschopnost redukce jizvy, která zůstala přítomna i měsíc po poranění. Neschopnost regenerace mohla být způsobená tím, že po aplikaci beclomethasonu došlo k snížení exprese *vegfaa* (vaskulární endotelový růstový faktor – vascular endothelial growth factor) a tedy i snížení schopnosti revaskularizace, která v těchto srdcích byla pozorována jen z 3,46±0.37%. Ošetření beclometasonem mělo stejný negativní vliv i na proliferaci kardiomyocytů, která byla snížena o 73,08 %. Z toho se dá usoudit, že netlumená zánětlivá reakce je důležitý krok pro úspěšnou regeneraci (Huang et al., 2013a). Enzymy, které mají vliv v prvním týdnu regenerace, tedy při zánětlivé odpovědi, jsou metaloproteinázy. Čtyři dny po poranění došlo ke zvýšené expresi *mmp9* a *mmp13*, což jsou geny zodpovědné za vznik kolagenázy 3 a gelatinasy B. Když došlo k inhibici MMP, tak došlo k horšímu odbourávání jizvy než v kontrolních srdcích. Aktivita MMP enzymů je důležitá při zánětlivé reakci. Zároveň při inhibici exprese MMP byla rána v srdci v prvních sedmi dnech od poranění pomaleji osidlována imunitními buňkami jako jsou neutrofilů a makrofágy, čímž docházelo k znemožnění regenerace. V těchto srdcích byla i třicet dní po poranění viditelná jizva, která nebyla nahrazena funkčním svalem (Xu et al., 2018).

Dalším faktorem důležitým pro správnou regeneraci a neovaskularizaci poškozené tkáně srdce je aktivace epikardu. Receptory, které se vyskytují v aktivovaném epikardu i



endokardu, jsou *nrp* (neuropilin – neurropilin) (Lowe et al., 2019). Expresí neuropilinů začíná již jeden den po poranění komory především v buňkách epikardu, ve kterém byly nalezeny izoformy *nrp1a* a *nrp2a*, zatímco v endokardu byla nalezena expresí izoformy *nrp1b*. U srdcí, u nichž došlo k mutaci v receptoru *nrp1a*, byla pozorována snížená aktivace epikardu. Tato srdce vykazovala velmi nízkou schopnost revaskularizace poškozené tkáně. V těchto srdcích byla pozorována snížená schopnost regenerace a zachování fibrinu i šedesát dnů po poranění, oproti srdcím kontrolním, které v této době už byly uzdraveny (Lowe et al., 2019). Nrp signalizace je podstatná i ve vyvíjejícím se zárodku, kde má vliv na správnou vaskularizaci. Společně s nrp signalizací se na vaskularizaci embrya podílí i *vegf*. Když byla v embryích inhibována jedna z těchto dvou drah, zebřičky vykazovali stejné problémy s vývojem cév, například intersegmentálních cév (Lee et al., 2002). Stejně tak má Vegf signalizace i vliv na revaskularizaci při regeneraci, přesněji molekula *vegfaa* (Marín-Juez et al., 2016). Vegf signalizace má vliv na buňky endokardu cév a jejich proliferaci (Ferrara and Henzel, 1989). Vliv *vegfaa* na regeneraci byl zkoumán pomocí *vegfaa*<sup>-/-</sup> mutantů (Rossi et al., 2015) a také pomocí *dn-vegfaa* (dominantně negativní vegf – dominant negative vegf). Zatímco u *vegfaa*<sup>-/-</sup> mutantů došlo pouze ke zpoždění revaskularizace, tak u zebřiček exprimujících dominantně negativní *vegfaa* došlo k úplné inhibici revaskularizace (Marín-Juez et al., 2016). Tento rozdíl je způsobený tím, že v srdcích s mutovanou *vegfaa*<sup>-/-</sup> expresí došlo ke zvýšení expresí ostatních *vegf* genů, jako například *vegfab*, *vegfc*, které byly schopné kompenzovat chybějící *vegfaa*. Ke zvýšení ostatních genů z Vegf signalizace u *dn-vegfaa* jedinců nedošlo (Rossi et al., 2015; Marín-Juez et al., 2016). *dn-vegfaa* srdce pak vykazovala úplnou inhibici revaskularizace, snížení proliferace CM a ve finále došlo k zjizvení tkáně a neschopnosti nahrazení poškozeného svalu (Marín-Juez et al., 2016). Stejně jako vegf signalizace (Lee et al., 2002) i *pdgf* (růstový faktor odvozený od trombocytů – platelet derived growth factor) je molekula, která se uplatňuje při vzniku cév a má vliv při vývoji zárodka na náležitý vznik intersegmentálních cév (Wiens et al., 2010). A stejně tak má i vliv na regeneraci srdce. Expresí *pdgf* po poranění je nejvíce patrná v ráně a v buňkách epikardu. PDGFR (receptor růstového faktoru odvozeného od trombocytů – platelet derived growth factor receptor) signalizace společně s PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza – phosphatidylinositol-3-kinase) mají vliv v buňkách epikardu na jejich proliferaci a syntézu DNA. Při inhibici PDGFR a PI3K signalizační dráhy dojde ke snížení proliferace buněk epikardu o jednu třetinu, z původních 45 % na 14 %. PDGFR signalizace byla také významná při revaskularizaci poškozených tkání srdce. V srdcích s normální expresí byla pozorována inkorporace nových cév do poškozeného myokardu. V jedincích s inhibovanou PDGFR

signalizační dráhou byla tato schopnost inkorporace nových cév zastavena. V těchto srdečních vůbec nedocházelo ke vzniku nových cév (Kim et al., 2010).

Fang et al. (2013) pro zkoumání RNA, které se vyskytují v regenerujícím srdci, využili TRAP technologii (translační ribosomální afinitní purifikace – translating ribosome affinity purification). Přesněji se zaměřili na RNA, které se sdružují s ribozomy. Jedna ze signalizačních drah, která měla v poraněném srdci změněnou expresi, byla Jak1/Stat3 (janus kinasa 1/stat 3 – janus kinase 1/stat 3). Jak1/Stat3 signalizační dráha má zvýšenou aktivitu v myokardu poraněného srdce, stejně tak dochází i k expresi většího množství ligandů této dráhy. Jak1/Stat3 signalizační dráha má vliv na proliferaci kardiomyocytů. Srdce, ve kterých došlo k expresi dominantně negativní Jak1/Stat3 dráhy, měla sníženou schopnost proliferace CM. Tito jedinci poté nebyli schopni regenerace a vykazovali zjizvení tkáně. Svůj vliv na proliferaci CM zprostředkovávala Jak1/Stat3 dráha pomocí molekuly Relaxin3a (Fang et al., 2013).

Buňky epikardu po poranění komory začínají proliferovat. Během sedmi dní od poranění dochází k obalení poškozené komory proliferujícími buňkami epikardu. Již několik hodin po amputaci apexu komory, buňky epikardu exprimovaly *raldh2* (retinaldehyd dehydrogenáza 2 – retinaldehyde dehydrogenase 2). *raldh2* má význam pro syntézu kyseliny retinové. Buňky epikardu, které obalily srdce, poté invadovaly do rány. Tyto buňky dávají základ neovaskularizaci v místě poranění. Epiteliální buňky pro schopnost invaze a následné neovaskularizace tkáně potřebují signalizaci pomocí molekuly *fgf* (Lepilina et al., 2006). FGF signalizace má vliv i na správný vývoj srdce (Marques et al., 2008). V CM v místě poranění docházelo ke zvýšené expresi *Fgf17b*. Tři dny po poranění došlo ke zvýšené expresi *fgfr2* a *fgfr4* v buňkách epikardu. Expresie *fgfr2* a *fgfr4* byla nejdříve lokalizována jen v oblastech vzdálených od místa poranění, ale postupem času se lokalizace začala přesouvat blíže k ráně až nakonec 14 dní po poranění došlo k invazi těchto buněk do nově vytvořeného svalu v místě amputace. Pokud tato signalizace byla inhibována expresí dominantně negativního *fgfr1*, nedocházelo k integraci buněk epikardu do nově vzniklého svalu a neovaskularizaci. Buňky epikardu namísto toho zůstávaly pouze na povrchu srdce (Lepilina et al., 2006). Molekula *raldh2* je po poranění syntetizována i v buňkách endokardu. Tato reakce probíhá nejdříve v celém srdci, ale postupně se expresie *raldh2* molekuly lokalizuje pouze do místa amputace. Buňky endokardu vykazovaly důsledkem amputace změnu morfologie. Tyto buňky, které vykazují za normálních podmínek fenotyp dlouhých buněk, jsou po poranění spíše zakulacené a ztrácí svou uspořádanost. Stejně jako lokalizace *raldh2* i změna podoby buněk endokardu se projevuje nejdříve v celé komoře a později se lokalizuje na místo amputace. Pokud došlo k inaktivaci *raldh2* signalizace pomocí exprese dominantně negativní formy RAR-a (receptor

kyseliny retinové a – retinoic acid receptor a), tak byla pozorována snížená exprese CM. Narušená schopnost proliferace CM byla pozorována i tehdy, když došlo k inhibici *raldh2* pomocí enzymu degradující RA. Tyto poznatky naznačují, že *raldh2* signalizace v buňkách endokardu přispívá k regeneraci (Kikuchi et al., 2011).

Buňky, které proliferují a nahrazují amputovanou část srdce, nejsou buňky progenitorové, ale jedná se o diferenciované kardiomyocyty, které se už v srdci nacházejí. U těchto diferencovaných kardiomyocytů dochází k dediferenciaci, kterou můžeme pozorovat změnou fenotypu jako například rozvolnění sarkomerní struktury. To přesněji znamená, že vlákna aktinu a myozinu, která jsou za normálních okolností v srdcích uspořádaná, se stávají neuspořádaná a ztrácejí strukturu z-line. (Jopling et al., 2010). Z-line struktura je potřebná pro kontrakci svalů, protože upevňuje vlákna aktinu. Jejich poloha je na koncích sarkomer (Rowe, 1971). Tato hypotéza o dediferenciaci CM byla potvrzena ve studii Kikuchi et al., kde autoři označili většinu CM nacházejících se v nezraněném srdci. CM byly identifikovány označením *cmlc2* (kontraktilní gen srdečního lehkého řetězce myosinu – cardiac myosin light chain) pomocí EGFP (zeleného fluorescenčního proteinu – enhanced green fluorescent protein). *cmlc2* je marker CM, takže došlo k označení pouze kardiomyocytů a ne ostatní srdečních buněk. Po poranění se srdce nechala regenerovat a poté bylo zjišťováno, zda dochází k regeneraci pomocí již existujících CM či progenitorových buněk. Po regeneraci bylo v srdcích pozorováno stejné množství CM označených pomocí EGFP jako před poraněním. Pozorování indikuje, že srdce byla regenerována pomocí dělení již existujících CM namísto neoznačených progenitorových buněk (Kikuchi et al., 2010). S tímto tvrzením ale nesouhlasila studie od Lepilina et al., 2006, ve které určili, že srdce regeneruje z progenitorových buněk a nikoli z dediferencovaných CM (Lepilina et al., 2006).

Ve studii (Kikuchi et al., 2010) také pozorovali expresi transkripčního faktoru *gata4*. Jeho exprese v myokardu začala až jako reakce na poranění. GATA signalizace je významná při správném vývoji srdce a pro správnou velikost srdečních komor (Reiter et al., 1999). *gata4* pozitivní buňky byly nejdříve pozorovány kolem komory, ale čtrnáct dní po poranění začaly obsazovat ránu a pomáhaly v regeneraci chybějící tkáně (Kikuchi et al., 2010). Inhibice signalizace genu *gata4* pomocí exprese dominantně negativní verze, vedla v poraněných srdcích k zjizvení a neschopnosti regenerace (Gupta et al., 2013). Signalizace zodpovědná za inkorporaci *gata4* pozitivních CM do rány je pravděpodobně řízena *Igf* (inzulinu podobný růstový faktor – insulin like growth factor-1). Molekula *Igf* je velmi důležitá již při vývoji srdce zebřičky. Při její inhibici je proliferace velmi snížena. Ve studii byla *Igf* signalizace inhibována

pomocí NVP-AEW541 (Huang et al., 2013b). Tato inhibice je založena na tom, že NVP-AEW541 se naváže na IGF-IR (receptor inzulinu podobnému růstovému faktoru – insulin-like growth factor 1 receptor), a tím dojde k inhibici jeho kinázové aktivity (García-Echeverría et al., 2004). Když k takovéto inhibici došlo, tak *gata4* pozitivní buňky zůstávaly pouze na okraji rány a nevstupovaly do ní. Zároveň byl v těchto buňkách pozorován snížený vznik DNA. V srdcích inhibovaných NVP-AEW541 se namísto regenerace vytvořila jizva (Huang et al., 2013b).

Další signalizace, která ovlivňuje proliferaci *gata4* pozitivních kardiomyocitů, je signalizace pomocí *NF- $\kappa$ B* (jaderný transkripční faktor kappa B buněk – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). V poraněných srdcích byla pozorována zvýšená exprese transkripčního faktoru *NF- $\kappa$ B1* oproti normálním srdcím. Tato zvýšená exprese se nacházela především v kompaktním svalu (Karra et al., 2015). Transkripční faktory *gata4* a *NF- $\kappa$ B* se koexprimují na stejném místě v poraněných srdcích (Kikuchi et al., 2010; Karra et al., 2015). Bylo pozorováno, že v srdcích inhibovaných pro *NF- $\kappa$ B* byla snižená exprese genu *gata4* v CM. Bylo to způsobeno tím, že transkripční faktor *NF- $\kappa$ B1* má schopnost se vázat na promotor genu *gata4*. Tento transkripční faktor má vliv i na dediferenciaci kardiomyocytů. V srdcích, ve kterých byla jeho signalizace inhibovaná, byla pozorována neschopnost rozvolnit sarkomerní strukturu. Společně s tím docházelo i k úplné neschopnosti poškozeného srdce regenerovat a namísto toho docházelo ke vzniku jizvy (Karra et al., 2015).

Další z genů, který má vliv na regeneraci u zebřičky je *brg1* (gen 1 příbuzný s brahma – brahma-related gene 1) (Xiao et al., 2016). S *brg1* genem se ale můžeme potkat například i u myši, kde pomáhá ve vývoji embryonálních srdcí, protože zabraňuje předčasně maturaci buněk a snižuje schopnost exprese  $\alpha$ -MHC (těžký řetězec alfa-myozinu – alpha-myosin heavy chain) molekuly, která se exprimuje v srdcích dospělých myši, namísto toho má pozitivní vliv na expresi embryonální  $\beta$ -MHC molekuly (Hang et al., 2010). V regeneraci srdce u zebřičky je *brg1* gen další molekulou, která má vliv na expresi genu *gata4*. Při inhibici Brg1 signalizace došlo ke snížení počtu *gata4* pozitivních CM. V poraněných srdcích dochází ke zvýšené expresi proteinu Brg1. Stejně tak jako ke snížení počtu *gata4* pozitivních CM došlo i ke snížení jejich proliferace, z 14 % proliferujících CM v kontrolních srdcích na 2,4 % v inhibovaných srdcích. Namísto regenerace v těchto srdcích docházelo ke zjizvení. Brg1 podporuje proliferaci CM v myokardu tím, že tvoří proteinový komplex s Dnmt3ab (DNA (cytosine-5)-methyltransferaza 3ab - DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A), což je methyltransferáza. Brg1 a Dnmt3ab mají schopnost vypnout *cdkn1c* (cyklin dependentní kináza 1c – cyclin dependent kinase inhibitor

1c). *Cdkn1c* je CDK inhibitor, který je silně exprimován v srdcích s inhibovaným Brg1, zatímco v srdcích s normální expresí Brg1 je *cdkn1c* inhibován. To naznačuje, že vlastností molekuly Brg1 je inhibice CDK inhibitoru, která umožňuje to, aby mohly buňky vstoupit do proliferace (Xiao et al., 2016).

Wu et al. (2016) dokázali poraněné srdce, na základě exprese rozdílných molekul v reakci na poranění, rozdělit na tři odlišné oblasti – oblast nejbližší k poranění, oblast nejdále od poranění a střední oblast nacházející se mezi nimi. Ve střední oblasti byla pozorována zvýšená exprese BMP signalizace. Signalizace BMP je důležitá pro dediferenciaci a proliferaci CM. Pokud došlo k inhibici signalizace BMP pomocí molekuly *noggin3*, tak bylo pozorováno snížené množství CM, které podstupují dediferenciaci v reakci na poranění (Wu et al., 2016). *noggin3* je inhibitor, který se navazuje na BMP4 a tím inhibuje signalizaci (Zimmerman et al., 1996). Autoři sledovali hladinu genu *myl7* (lehkého řetězce myozinu 7 - myosin light chain 7), který je markerem diferencovaných kardiomyocytů. Nízká úroveň jeho exprese ukázala na přítomnost nediferencovaných buněk srdeční svaloviny. Stejně tak je i signalizace BMP důležitá pro proliferaci CM. BMP signalizace má vliv na opětovný vstup buněk do buněčného cyklu. Při inhibici signalizace docházelo u menšího počtu buněk k vstupu do mitózy v porovnání se srdci s normální expresí (Wu et al., 2016).

Raya et al. (2003) ve své studii týkající se regenerace srdeční tkáně pozoroval zvýšenou expresi molekuly *notch1b*. Jako další se *notch* molekulou zabýval Zhao et al. (2014; 2019), který více prozkoumal podíl transkriptů receptorů *notch* na regeneraci srdce po poranění. Po poranění komory došlo k významnému zvýšení transkriptů receptorů *notch*. V endokardu byly přítomny receptory *notch1a*, *notch1b*, *notch2* a v epikardu to byly především receptory *notch1a* a *notch2*. Při inhibici Notch signalizace došlo k znemožnění regenerace a ke vzniku jizvy. Inhibice *notch* ale nijak neovlivnila buňky epikardu a endokardu, ale naopak zabránila proliferaci CM v myokardu. Notch signalizace byla důležitá v časovém období mezi šestým a sedmým dnem po amputaci části komory. Stejný důsledek jako inhibice Notch signalizace má i její dvojnásobně zvýšená exprese, která také způsobila zjizvení tkáně a snížení proliferace CM v myokardu (Zhao et al., 2014). Notch signalizace působí přes *wif1* (inhibiční faktor molekuly *wnt1* – *wnt* inhibitory factor 1), což je antagonist *wnt* (*wingless/Int-1* – *wingless/Int-1*) signalizace. *wif1* je za normálních okolností silně exprimován v srdcích po poranění. Při inhibici *notch* bylo sníženo *wif1*. Snížením *wif1* došlo k neschopnosti srdce inhibovat *wnt* dráhu, která regeneraci nepodporuje, naopak ji inhibuje a snižuje proliferaci CM. To naznačuje, že Notch signalizace je velmi důležitá pro inhibici dráhy *wnt* pomocí *wif1* (Zhao et al., 2019).

V embryonálních srdcích myši je *p38a* MAPK (P38 mitogen-aktivovaná protein kináza – *p38a* mitogen-activated protein kinases) nízké exprimovaná, zatímco v buňkách dospělých jedinců je její produkce vysoká. Její aktivita má vliv na snižování schopnosti buněk proliferovat (Engel et al., 2005). Na základě tohoto zjištění se Jopling et al. (2012) ve své studii zaměřil na vliv *p38a* MAPK na regeneraci srdce u zebřičky. Ve této studii zjistil, že deaktivace *p38* MAPK je další akce potřebná pro proliferaci CM při obnově srdeční tkáně. Pokud došlo k aktivaci *p38a* MAPK při vývoji zebřičky, byly pozorovány defekty srdce a snížená proliferace CM, což naznačuje, že její aktivita musí být pro správný vývoj srdce vypnutá. Pokud došlo k aktivaci *p38* MAPK, tak CM neproliferovaly a nedocházelo k regeneraci srdce ani po třiceti dnech od poranění oproti kontrolnímu srdci. Na druhou stranu *p38a* MAPK je za normálních okolností exprimována v CM. Když buňky vstupují při dělení do mitózy, musí být její aktivita vypnuta (Jopling et al., 2012).

Při regeneraci srdce je také velmi podstatná migrace kardiomyocytů. Po resekci komory dojde u zebřičky k expresi *cxcl12a* (zvaný též SDF1) (faktor odvozený ze stromálních buněk – stromal cell-derived factor 1) a *cxcr4b* (chemokinový receptor typu 4b – C-X-C chemokine receptor type 4). *Cxcr4* je exprimován v kardiomyocytech a *cxcl12a* je exprimován buňkami epikardu (Itou et al., 2012). Komplex těchto dvou genů slouží při vývoji *Danio rerio* ke vzniku správné vaskulatury srdce (Harrison et al., 2015). Ve studii od Itou et al. (2012) inhibovali receptor *cxcr4*. Po zablokování funkce *cxcr4* receptoru došlo k zástavě regenerace. Proliferující kardiomyocyty byly jen z 23,5 % nalezeny v blízkosti regenerující oblasti srdce, oproti normálním 74,0 %. Celková schopnost proliferace ale nebyla pozměněna, pouze umístění daných proliferujících CM. Tato práce poukazuje na to, že molekula *cxcl12a* a receptor *cxcr4* mají významnou roli při regeneraci. Přesněji v podpoře migrace proliferujících CM do místa poranění (Itou et al., 2012).

## 5.2. Obojživelníci

Srdce čolků po poranění jsou schopná regenerace až 50% srdeční komory (Piatkowski et al., 2013). U čolků, u kterých došlo k odstranění přibližně 13% srdeční komory, byla pozorována reakce na poranění. Nejdříve došlo k vytvoření krevní sraženiny a společně s tím došlo i k vytvoření nekrotické tkáně. Postupem času bylo možné pozorovat osídlení sraženiny makrofágy, lymfocyty a leukocyty. Od desátého dne po poranění docházelo v srdci k syntéze DNA a mitóze. Dělicí se buňky se nacházely poblíž rány. Jednalo se o dediferencované

myocyty (Oberpriller and Oberpriller, 1974). Flink, 2002 ve své studii zjistil, že buňky, které proliferují v blízkosti krevní sraženiny, jsou především CM a buňky epikardu.

Pro regeneraci srdce je potřebná přítomnost makrofágů. Když v srdci salamandru s kryo poraněním došlo k odebrání makrofágů, vytvořila se jizva. Oproti tomu kontrolní srdce byla zcela regenerovaná po devadesáti dnech. Srdce s vyčerpanými makrofágy měla menší expresi fibrinu oproti kontrolním srdcím. Živočichové bez makrofágů vykazovali dřívější zrání jizvy, oproti kontrolním jedincům, v kterých byla jizva pouze dočasná. Za dřívější zrání jizvy mohla být zodpovědná zvýšená exprese genů z rodiny *Lox* (lysyl oxidáza – lysil oxidase) (Godwin et al., 2017).

Tři dny po poranění komory došlo k ukládání komponent extracelulární hmoty. Jako první se začal exprimovat Tenascin-C, který se ukládal především v myokardu v místě poranění a epikardu. Jeden týden po poranění došlo i k expresi dalších komponent z extracelulární hmoty, kyseliny hyaluronové a dvacet jedna dní po amputaci došlo ke zvýšené expresi fibronectinu. V epikardu v místě, kde se ukládala extracelulární hmota, docházelo k inkorporování proliferujících buněk, které nahrazovaly poškozenou tkáň. K proliferaci buněk docházelo v myokardu, ale postupem času se přemístily do epikardu a apexu komory v místě poranění. Buňky po inkorporaci do epikardu začaly exprimovat WT1 (Wilsomův tumor 1 – Wilms Tumor 1). Jedná se o marker buněk epikardu. Komponenty extracelulární hmoty sloužily k navádění dělících se buněk a jejich správné inkorporaci do míst poranění (Mercer et al., 2013). V poraněných srdcích také docházelo k zvýšené expresi kolagenu III. K ukládání docházelo především v epikardu a myokardu (Piatkowski et al., 2013).

Při regeneraci nejdříve proběhla oprava poškozeného epikardu, čímž se zlepšila funkčnost srdce. Následně na to proliferovaly CM v myokardu poblíž místa poranění. Společně s tím došlo i k proliferaci zbylých buněk myokardu, které nevykazovaly podobnost s CM. V těchto srdcích byla pozorovaná zvýšená exprese transkripčních faktorů, především *Gata4*, a to dvacet tři dní po poranění. Jejich exprese byla pozorována mezi CM, ale i mezi ostatními buňkami srdce (Witman et al., 2011). Za jakých podmínek dochází k proliferaci v regenerujícím srdci se snažili odhalit Bettencourt-Dias et al. (2003). Ve své studii zjistili, že značná část buněk je schopná vstoupit do S-fáze buněčného cyklu. Po tomto započatém vstupu do buněčného cyklu ale jen část buněk, přibližně  $\frac{3}{4}$ , pokračovala a dokončila mitózu. U zbylých došlo k zastavení buněčného cyklu. Z buněk schopných dělení pak vznikaly jak buňky mononukleární tak vícejaderné, které pak mohly dát vznik dalším buňkám. Tato studie zastává názor, že k regeneraci dochází pouze za účasti specifických buněk, které dokáží dokončit buněčný cyklus a rozdělit se (Bettencourt-Dias et al., 2003).

Při amputaci 10 % ze srdeční komory *Xenopus tropicalis* došlo u většiny srdcí k celkové regeneraci. U 1/3 jedinců ale došlo k nedokonalé regeneraci, kdy se mezi částí regenerované tkáně a neporaněnou částí srdce vytvořil adhezní úsek. Ihned po poranění došlo k infiltraci tkáně imunitními zánětlivými buňkami. Jeden den po poranění se vytvořila sraženina. Po několika dnech došlo k ukládání extracelulární hmoty, především fibrinu a kolagenu. Následně byly zánětlivé buňky nahrazeny dělicími se CM. Dělicí se CM byly pozorovány v místě poranění a v neporaněné části srdce poblíž rány. Třicet dní od poranění už bylo možné pozorovat srdce s nově regenerovanou tkání (Liao et al., 2017). Naopak Marshall et al., 2017 ve své studii pozorovali po amputaci 4 % komory *Xenopus laevis* neschopnost regenerace. I v tomto srdci se po zranění vytvořila sraženina. Došlo zde k zvýšené expresi fibronectinu a buňky srdce podstupovaly hypertrofii. Po poranění došlo ke zvýšené expresi *fibronectin1* a *kolagenu 1 alfa 1*, což jsou markery fibrózy. Stejně tak i došlo ke zvýšené expresi markerů pro hypertrofii. Oproti tomu nebyly pozorované žádné markery proliferujících buněk. Nakonec došlo k vytvoření trvalé fibronectinové jizvy (Marshall et al., 2017).

V další studii (Marshall et al., 2019) se po amputaci přibližně 10-15 % srdeční komory u pulců *Xenopus laevis* srdce zcela regenerovala. Během prvních 3 dní po amputaci docházelo k ukládání kolagenu a fibronectinu. Postupně docházelo k vstřebávání obou komponent mezibuněčné hmoty a srdce nakonec regenerovala bez zjizvení. Oproti tomu, pokud došlo ke stejné amputaci u juvenilních žabek, tak byla pozorována neschopnost regenerace a zjizvení srdce i po jednom roku od poranění (Marshall et al., 2019). Stejný výsledek je pozorovaný i pro regenerace dospělých jedinců od *Xenopus laevis* (Marshall et al., 2017). U pulců byla pozorována vyšší schopnost proliferace CM po porušení tkáně oproti juvenilním žabkám. Vliv metamorfózy, která je řízena pomocí exprese TH (thyroidní hormon – thyroid hormone), na regeneraci byl poté zkoumán podáním T3 (trijodothreoninem – triiodothyronine) a perchlorátu. Koncentrace TH je nejvyšší ve fázi metamorfózy. T3 způsobil kratší expresi TH, zatímco perchlorát zcela odstranil expresi TH. V obou ošetřených srdcích došlo k neschopnosti regenerovat. Obě látky ovlivnily ukládání Tenscinu-C. Ani v jednom z ošetřených srdcích nedošlo k odbourání Tenscinu-C po 90 dnech od poranění oproti kontrolním srdcím. Společně s tím došlo k odlišené expresi genu *coll1a1* (kolagen typu I, alfa-1 – collagen, type I, alpha 1) a enzymů matrix metaloproteinase (Marshall et al., 2019).



### 5.3. Savci

Dříve se myslelo, že po narození nejsou kardiomyocyty schopné proliferace. Studie (Li et al., 1996) poukazovala na to, že kardiomyocyty jsou schopné se dělit pouze první tři dny v rámci postnatálního vývoje. Během čtvrtého dne se růst srdce změnil na hypertrofický a docházelo pouze k množování jader uvnitř buněk. Teprve později bylo zjištěno, že v srdcích dochází k mitotické aktivitě i po tomto časovém intervalu (Bergmann et al., 2009; Mollova et al., 2013). Ve studii Bergmann et al., 2009 určovali stáří kardiomyocytů pomocí koncentrace  $^{14}\text{C}$  v DNA. V srdcích pozorovali rozdílné hladiny  $^{14}\text{C}$  podle let, ve kterých se jedinci narodili (Bergmann et al., 2009), protože k začlenění  $^{14}\text{C}$  do genomu buňky došlo v momentě jejího narození. Koncentrace  $^{14}\text{C}$  v atmosféře, ze které se začleňuje do DNA buněk, se v rozmezí let změnila. Díky pozorování koncentrace  $^{14}\text{C}$  v DNA buněk se tedy dalo určit přesné stáří buněk v lidském těle (Spalding et al., 2005). Kardiomyocyty zkoumaných jedinců neměly stejnou koncentraci  $^{14}\text{C}$ , která by odpovídala době jejich narození. Rozdílná koncentrace  $^{14}\text{C}$  naznačuje, že CM vznikaly v různém období života a tedy, že během dospělosti dochází k jejich proliferaci a obnově. Došli k závěru, že srdce mladých lidí do dvaceti let života proliferují více, s obnovou v rozmezí 1 % CM za rok, než osoby starší, u nichž je obnova v rozmezí 0,3 % (Bergmann et al., 2009). Ve druhé studii, která potvrdila, že k proliferaci CM dochází i po narození, autoři sledovali buňky procházející M-fází a cytokinezi a nejvyšší počty zjistili během prvního roku života (Mollova et al., 2013). V studii Mollova et al., 2013 bylo ovšem pozorováno poslední dělení kolem 20. roku života, oproti studii Bergmann et al., 2009, kde pozorovali proliferaci i 75 let po narození. Senyo et al., 2013 odhalili, že nově vytvořené CM pochází z původních CM v srdci již diferencovaných, a ne z buněk progenitorových.

U myši byla schopnost regenerace srdce pomocí CM pozorována do týdne po narození (Porrello et al., 2011; Haubner et al., 2012). Den po narození bylo myši odebráno 15 % srdeční komory a již další den byla rána zacelena sraženinou. Poraněné srdce bylo regenerováno z již existujících CM, které podstoupily dediferenciaci, což bylo podloženo na základě rozvolnění sarkomerní struktury (Porrello et al., 2011). Rozvolnění sarkomerní struktury znamená, že dojde ke ztrátě uspořádanosti aktinových a myozinových vláken (Jopling et al., 2010). Společně s rozvolněním došlo i ke zvýšení počtu CM, které byly pozitivní pro pH3 (fosfohiston H3 – phospho-histone H3) a aurora B. Zvýšené množství pozitivních CM pro pH3 a aurora B znamená, že buňky procházely mitózou a cytokinezi. Srdce jedinců, kteří byly více než 7 dní staří, schopnost regenerace neměla a v místě poranění tvořila vazivovou jizvu (Porrello et al.,

2011). Stejně tak byla regenerace srdce pozorována i u novorozené myši, která byla poraněna pomocí ligace levé přední sestupné tepny (Haubner et al., 2012). Srdce lidského novorozence je také schopné regenerovat při prodělání infarktu myokardu v období hned po narození (Haubner et al., 2016). Období schopné regenerace je možné prodloužit zabráněním exprese *Meis1*. *Meis1* protein v komplexu s proteinem Pbx (transkripční faktor pre-B buněčné leukémie – pre-B cell leukaemia transcription factors) je zodpovědný za správný vývoj srdce, přesněji výtokového traktu (Stankunas et al., 2008). Když u novorozených myši došlo k zvýšení exprese *Meis1*, tak došlo k zastavení proliferace buněk, společně s tím došlo k neschopnosti regenerovat poškozenou tkáň. Vysvětlení tkví pravděpodobně v tom, že zvýšená koncentrace *Meis1* způsobí zvýšenou expresi inhibitorů CDK (cyklin dependentní kináza – cyclin dependent kinase). Inhibitory CDK mají naopak sníženou expresi v srdcích nesyntetizujících *Meis1* (Mahmoud et al., 2013). Molekula, která má vliv na snížení exprese *Meis1*, je *Tbx20*. Tento gen je zodpovědný za správný vývoj srdce, hlavně je důležitý pro tvorbu komor. Srdce s *LoxP* (locus X-nad P1 – locus of X-over P1) knock out genu *Tbx20* nebyla schopná vytvořit srdeční kličku (Singh et al., 2005). *Tbx20* se dokáže navázat se na genovou sekvenci *Meis1*, kde funguje jako transkripční represor. Pokud došlo k zvýšené expresi *Tbx20*, tak byla pozorována zvýšená proliferace, společně s expresí genů zodpovědných za vstup do buněčného cyklu, například cyklinů. Na druhou stranu došlo ke snížené expresi inhibitorů buněčného cyklu, například *p21*. Proliferace CM byla pozorovaná i u srdcí, která podstoupila infarkt myokardu (IM). V těchto srdcích byla pozorovaná stejná exprese genů regulujících buněčný cyklus. V IM srdcích byl navíc exprimován gen podporující angiogenezi *VEGF-A*. Díky lepšímu prokrvení srdce po poranění byla pozorována nižší úmrtnost v porovnání s kontrolními jedinci (Xiang et al., 2016).

Hsieh et al., 2007 zkoumali srdce dospělých jedinců po poranění. CM značili pomocí GFP (zelený fluorescenční protein – green fluorescent protein). Po poranění srdce sledovali postupné snižování množství CM značených GFP. Došli k závěru, že po poranění srdce by u dospělých mohlo docházet ke vzniku CM spíše z prekurzorových buněk než z již existujících CM (Hsieh et al., 2007). Toto tvrzení ale nepotvrdila studie Senyo et al., 2013, kteří pozorovali vznik nových CM z původních již existujících CM. Počet dělicích se CM byl ovšem nízký, jen kolem 3,2 % (Senyo et al., 2013).

Po infarktu myokardu se v srdci začaly akumulovat imunitní buňky. Imunitních buněk bylo několik typů, leukocyty, neutrofilů, makrofágy a žírné buňky. První buňky, které bylo možné pozorovat v poraněném srdci, byly  $M_1$  makrofágy, které mají prozánětlivé vlastnosti. Tyto časné makrofágy bylo možno pozorovat v rozmezí prvních tří dnů po poranění. Druhý typ

makrofágů M<sub>2</sub> (regenerativní) byl přítomný až v období po pátém dni od poranění. Další rozdíl je také v tom, že M<sub>2</sub> makrofágy sice exprimují prozánětlivé faktory, ale společně s tím exprimují i faktory pro opravu srdce (Yan et al., 2013).

Do sedmi dní po poranění srdcí u novorozenech myši vzniká akutní infekce, při které dochází k zvýšení exprese prozánětlivých markerů. Pokud je imunitní reakce potlačena a tím i snížena exprese prozánětlivých markerů, tak se ztrácí schopnost regenerace a dojde k vytvoření jizvy (Han et al., 2015). Imunitní reakce na poranění se liší mezi novorozenci a dospělými jedinci. Jedním z rozdílů, který může způsobovat rozdíl mezi schopností a neschopností regenerace, je rozdíl v reakci monocytů a makrofágů na IM. U novorozenech myši, kterým byl způsoben infarkt myokardu, pozorovali přítomnost M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> makrofágů v podobném množství. Naproti tomu u dospělých převažovaly makrofágy typu M<sub>2</sub>. Rozdíl byl pozorovaný i v umístění makrofágů v reakci na poškození. U novorozenech jedinců jsou rozptýlené různě po myokardu, zatímco v srdci dospělých jedinců se spíše shlukují na jedno místo. Pokud došlo k jejich inhibici, tak srdce novorozenech jedinců nebyla schopná regenerace a místo toho u nich docházelo k zjizvení (Aurora et al., 2014) stejně jako dochází u poranění srdce myši starší sedmi dnů (Porrello et al., 2011).

Po infarktu myokardu se v srdci tvoří jizva. Nejdříve dochází v místě poranění k ukládání fibrinu a fibrinogenu. Toto složení je pouze dočasné a postupně dojde k jeho nahrazení fibrinonektinem. Nakonec u myši dojde během čtrnácti dní k vytvoření kolagenní jizvy. U psů, které byly v této studii také sledovány, došlo k vytvoření kolagenové jizvy až po čtyřech týdnech. Kolagenní jizva nahrazuje nekrotickou tkáň, která po infarktu vzniká (Dobaczewski et al., 2006). V srdcích, která prodělala IM, bylo možné pozorovat zvýšenou expresi mRNA prokolagenu typu I a typu III. Prokolagen typu I byl exprimován od čtyř dnů od poranění a jeho exprese zůstala přítomná i devadesát dní po poranění. mRNA prokolagenu typu III je přítomná již dva dny po poranění, ale jeho exprese začíná klesat už kolem dvacátého prvního dne. Exprese kolagenu je opačná. Kolagen typu III je exprimován i po devadesáti dnech, zatímco kolagen typu I má sníženou expresi již čtrnáct dní od IM. Zvýšená exprese mRNA prokolagenu nebyla pozorována jen v poškozených místech srdce, ale i mimo ně (Cleutjens et al., 1995a).

V srdcích po IM byla pozorována zvýšená koncentrace mRNA matrix metalloproteinas (MMP-1). mRNA MMP-1 se nacházela hlavně v místě poranění, v tomto případě v levé komoře, během sedmého dne po IM. Společně s MMP-1 došlo po IM i ke zvýšené expresi mRNA TIMP (tkáňový inhibitor metalloproteinas – tissue inhibitor of metalloproteinase). TIMP byly ale exprimovány už šest hodin po IM a jejich exprese vydržela delší dobu. mRNA MMP-1 a TIMP nebyly pozorovány v poraněném srdci mimo oblast zranění. Společně s tím

došlo i ke zvýšení kolagenolytické aktivity MMP-1 a MMP-2 již dva dny po poranění. Díky vyvážené aktivitě mezi MMP a TIMP dochází ke správné regulaci při remodelaci srdce po IM a k vytvoření funkční jizvy. Buňky, které exprimují mRNA MMP a TIMP jsou fibroblasty či myofibroblasty (Cleutjens et al., 1995b). Pokud byly vytvořeny myši, které měli knock out genu pro metalloproteinasu 9 (MMP-9) či pro u-PA (aktivátor plasminogenu urokinázového typu – urokinase-type plasminogen aktivátor), tak u nich byla pozorována menší infiltrace imunitními buňkami, přesněji leukocyty. Společně s tím u knock out u-PA myši nedocházelo ani k agregaci fibroblastů do místa poranění. Kontrolní myši měly pozorovatelnou schopnost prokrvení jizvy nově vzniklými cévami. Myši bez u-PA tuto schopnost neměly. Zatímco u kontrolních zvířat docházelo k postupnému zlepšování a vznikání jizvy, myši bez u-PA nevykazovaly žádné zlepšení. Srdce, u nichž došlo ke knock out u-PA genu, měla snížený výskyt prasknutí srdce, které bylo časté v kontrolních srdcích. Stejný vliv na ochranu srdce před prasknutím stěny komory mělo i podání inhibitorů PAI-1 (inhibitor u-PA) a TIMP-1 (inhibitor MMP-9) (Heymans et al., 1999). Schopnost obrany před prasknutím stěny komory měla i srdce, ve kterých došlo k úplnému odstranění MMP-2. Myši bez MMP-2 měly vyšší schopnost přežití první týden po IM (Hayashidani et al., 2003).

Další molekula, která má vliv na odbourávání mezibuněčné hmoty, je Plg (plasminogen – plasminogen). Jeho činnost je aktivována pomocí uPA. Plasminogen je poté schopný aktivovat proteolytickou aktivitu pomocí aktivace MMPs. V srdcích, ve kterých je Plg knockoutovaný, dochází k snížené expresi MMP-9 a MMP-2. V těchto srdcích dochází také ke snížené infiltraci nekrotické tkáně imunitními buňkami, přesněji makrofágy. Malá přítomnost makrofágů má za důsledek mnohem pomalejší odbourávání nekrotické tkáně a nedochází ke vzniku granulační tkáně jako u srdcí kontrolních. V srdcích bez Plg dochází i k mnohem menšímu ukládání kolagenu, než v normálních srdcích (Creemers et al., 2000).

Molekula, která má vliv na vstup buněk do S fáze, je E2F-1 (Johnson et al., 1993). Určitý vliv má i cyklin D v komplexu s molekulou *cdk4*. Tento komplex molekul hyperfosforyluje pRb (retinoblastomový protein – retinoblastoma protein), tím znemožňuje jeho vazbu právě k molekule E2F-1 (Kato et al., 1993) a buňky mohou začít vstupovat do S-fáze buněčného cyklu (Johnson et al., 1993). Tamamori-Adachi et al. (2003) zkoumali expresi cyklinu D v srdcích novorozených mláďat. Expresi cyklinu D našli v cytoplazmě CM. V buňkách s lokalizací cyklinu D v cytoplazmě, pozorovali i nízkou fosforylaci proteinu pRb, který byl lokalizován v jádře. V buňkách, do jejichž jader byl pomocí adenoviru vložen typ cyklinu D, D1NLS, došlo ke zvýšení jaderné koncentrace CDK4. V těchto srdcích pak bylo

pozorováno zvýšené množství fosforylovaného pRb, společně s masivnějším vstupem buněk do buněčného cyklu. V této studii prokázali i možný efekt umístění komplexu D1NLS/CDK4 do jádra na vstup dospělých kardiomyocytů zpět do buněčného cyklu (Tamamori-Adachi et al., 2003). V srdcích, u nichž došlo k odstranění transkripčního faktoru *Gata4*, došlo ke snížení exprese *Cdk4*. Protein GATA4 dokáže regulovat expresi *Cdk4* vazbou na jeho promotor (Yu et al., 2016). Když byly poraněna srdce myši s normální expresí cyklinu D a zároveň i transgenních myši, která měla jeho expresi zvýšenou, tak se lišila reakcí na poranění. Srdce s normální expresí měla i po sto osmdesáti dnech viditelnou jizvu a zároveň u nich nebylo pozorováno žádné zlepšení funkce. Oproti tomu transgenní srdce měla funkci výrazně zlepšenou a došlo u nich k nahrazení části poraněného srdce nově vytvořeným funkčním myokardem (Hassink et al., 2008). Další studie, která zkoumala zvýšenou expresi cyklinů D (D1, D2, D3) v jádře u transgenních myších, pozorovala větší množství buněk se zvýšenou syntézou DNA. Po poranění srdce byla syntéza DNA patrná jen u D2 transgenních myších. Společně s tím sto padesát dní po poranění docházelo k cytokinezi kardiomyocytů a stejně tak i k zmenšení jizvy (Pasumarthi et al., 2005).

Další molekula, jejíž aktivita musí být inhibována v kardiomyocytech, aby došlo k proliferaci, je MAP kináza *p38* (Engel et al., 2005). *p38* MAP kináza je v aktivním stavu zodpovědná za diferenciaci buněk (Davidson and Morange, 2000). Inhibice *p38* společně s expresí FGF1 molekuly, která je zodpovědná za zlepšené prokrvení srdce, díky částečné neovaskularizaci jizvy způsobila lepší funkčnost srdce po poranění. Bylo pozorované zvýšení mitózy, proliferace buněk, společně se zmenšením jizvy oproti myším s neinhibovanou expresí (Engel et al., 2006). Zvýšená mitóza v CM byla pozorována i u srdcí, u kterých namísto použití FGF1, došlo ke stimulaci molekulou NRG-1- $\beta$ 1 (neuregulin – neuregulin) (Engel et al., 2005). Jedná se o růstový faktor. Pro funkční stimulaci expresí NRG1 je zapotřebí, aby byl v komplexu se svým tyrosin kinázovým receptorem ErbB4. Tento komplex je schopný indukovat proliferaci i v dospělém srdci. V takto stimulovaných dospělých srdcích dochází k proliferaci původních diferenciovaných CM, nikoli progenitorových buněk. Po prodělání IM měla srdce s NRG1/ErbB4 komplexem lepší funkčnost a zároveň i zmenšenou velikost jizvy, což bylo způsobené nahrazením poškozených buněk novými buňkami vzniklými proliferací z diferenciovaných buněk (Bersell et al., 2009). Další studie objevila NRG1 a ERBB2 jako komplex potřebný pro proliferaci. Když došlo ke knock out ERBB2, došlo ke snížení proliferace. Zatímco, když došlo ke zvýšené expresi caERBB2 v srdcích, tak buňky častěji vstupovaly do buněčného cyklu. Buňky schopné proliferace nejdříve podstupují dediferenciaci. Za dediferenciaci a následnou schopnost proliferace je zodpovědná molekula caERBB2

působící na ERK. Jak ve zdravých srdcích tak i v srdcích po IM byla pozorována zvýšená dediferenciace a následné zmenšení velikosti jizvy v porovnáním s kontrolními srdci (D'Uva et al., 2015).

Srdce novorozených myší s odstraněnou schopností exprimovat *Gata4* nebyla schopná regenerace. Měla sníženou schopnost cytokineze. V těchto srdcích docházelo i ke snížené expresi *Fgf16*, který patří do skupiny angiogenních genů. Na druhém intronu *Fgf16* se nachází specifická doména pro protein GATA4. Díky tomu je GATA4 schopný regulovat expresi *Fgf16*. To mohlo mít vliv na snížené množství malých tepen v mutantních srdcích bez přítomnosti *Gata4* (Yu et al., 2016).

Na správný vývoj srdce má vliv molekula Hippo, jejíž signalizace je zodpovědná za správnou velikost srdce. Tato dráha funguje tím způsobem, že inhibuje expresi wnt molekuly a tím snižuje proliferaci buněk (Heallen et al., 2011). Heallen et al později ve své studii z roku 2013 rozpracoval vliv Hippo signalizace na regeneraci v savcích srdcích, kde zjistil, že pokud došlo k deleci jedné z dvou komponent Hippo signalizace, *Salv* nebo *Lats*, tak byla v srdcích pozorována větší syntéza DNA než v srdcích kontrolních. V srdcích s inhibovanou dráhou bylo pozorováno i lepší uzdravení po IM. Srdce bez Hippo dráhy vykazovala tři týdny po poranění zlepšení funkce. V těchto srdcích došlo i ke zmenšení jizvy a častější vstup buněk do buněčného cyklu. Jedna z molekul, která je na posledním místě v Hippo signálační dráze, je *Yap* (protein asociovaný s yes – yes-associated protein), jedná se o transkripční koaktivátor (Heallen et al., 2013). *Yap* molekula je významná při vývoji srdce v raném věku. Pokud byla molekula inhibovaná, srdce byla poškozená a docházelo k velmi častým úmrtím. Když došlo k deleci *Yap*, tak srdce nebyla schopná regenerace a docházelo k zjizvení. Naopak když došlo k indukci exprese *Yap* u postnatálních jedinců, tak došlo k opětovnému zvýšení proliferace. Tito jedinci vykazovali i menší míru zjizvení po IM a vyšší proliferaci než kontrolní srdce (Xin et al., 2013). Když došlo u myší starších sedmi dní k opětovné vyšší indukci *Yap*, tak bylo docíleno prodloužení období, ve kterém jsou jedinci schopni regenerovat (Porrello et al., 2011; Xin et al., 2013). Pro schopnost *Yap* vyvolat buněčné dělení je důležitá molekula IGF, jejíž signální dráhu *Yap* aktivuje (Xin et al., 2011). V srdcích s indukovanou expresí isoformy mIGF-1 bylo také pozorováno zmenšení jizvy a zlepšení srdečních funkcí po poranění, společně s proliferací CM. mIGF-1 působí přes komplex PDK1/SGK1 (fosfohistone dependentní kináza 1 – Phosphoinositide-dependent kinase-1/kináza regulována sérem, glukokortikoidy 1 – Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1). Tato signálační dráha má ochrannou funkci po poranění. Srdce, které měla tuto dráhu indukovanou, měla mnohem menší počet apoptických buněk (Santini et al., 2007).

## 6. Evoluční pohled

První podobnost, kterou můžeme u regenerace ryb (Bevan et al., 2020) a savců (Yan et al., 2013) pozorovat je existence dvou různých typů makrofágů, které se mění v průběhu opravy tkáně. V obou dvou živočišných došlo i k expresi stejných prozánětlivých molekul, jako například IL-1 $\beta$  (Huang et al., 2013a; Yan et al., 2013). U krysy (Cleutjens et al., 1995a) a obojživelníků (Piatkowski et al., 2013) zase můžeme pozorovat, že jako reakce na poranění dochází k ukládání kolagenu typu III. U krysy (Cleutjens et al., 1995a) nedochází pouze k ukládání kolagenu typu III, ale nachází se u nich i kolagen typu I, který pro změnu můžeme pozorovat i u *Danio rerio* (Bevan et al., 2020).

V poraněných srdcích savců (Cleutjens et al., 1995b) i ryb (Xu et al., 2018) také můžeme pozorovat zvýšenou expresi MMP enzymů. U obou dvou jedinců bylo možné pozorovat zvýšenou expresi MMP-9 (Cleutjens et al., 1995b; Xu et al., 2018). V rybích srdcích byl druhý aktivovaný enzym MMP-13 (Xu et al., 2018), zatímco u savců MMP-1 a MMP-2 (Cleutjens et al., 1995b). Další možný rozdíl v aktivitě byl v době, po kterou byly enzymy aktivní. V krysích srdcích došlo ke snížení na stejné množství jako v kontrolních srdcích již čtrnáct dní od poranění (Cleutjens et al., 1995b), zatímco u zebřičky byla MMP aktivita pozorována i třicet dní od kryho poškození (Xu et al., 2018).

Ve všech třech pozorovaných živočišných je při regeneraci přítomný transkripční faktor *gata4* (Kikuchi et al., 2010; Witman et al., 2011; Yu et al., 2016). Jak u *Danio* (Gupta et al., 2013), tak u novorozených savců (Yu et al., 2016) je možno pozorovat důležitost *gata4* při regeneraci. V obou pozorovaných organismech byla regenerace srdce zastavena po inhibici exprese *gata4* (Gupta et al., 2013; Yu et al., 2016). GATA signalizace nemá ale vliv jen na regeneraci. Jeho přítomnost je možné nalézt i při vývoji srdce u všech třech pozorovaných jedinců (Reiter et al., 1999; Peterkin et al., 2003; Zhao et al., 2008).

Cyklin dependentní kinázy jsou v regenerujících srdcích zebřičky inhibovány molekulou Brg1. Když došlo k znemožnění vypnutí cyklin dependentních kináz inhibicí Brg1 molekuly, byla snížena proliferace CM (Xiao et al., 2016). V savčích srdcích se cyklin D nachází v cytoplazmě, zatímco pRb (Tamamori-Adachi et al., 2003), kterou cyklin D v komplexu s CDK hyperfosforyluje (Kato et al., 1993), se nachází v jádře. Když došlo k vložení cyklinu D do jádra, došlo ke zvýšené fosforylaci pRb a byla pozorována zvýšená proliferace CM (Tamamori-Adachi et al., 2003). Tyto tři poznatky (Kato et al., 1993; Tamamori-Adachi et al., 2003; Xiao

et al., 2016) naznačují, že lokalizace CDK v savčích CM brání regeneraci srdcí právě nechopností hyperfosforylace pRb.

Jak v savčích srdcích (Engel et al., 2005) tak v srdcích *Danio rerio* (Jopling et al., 2012) je nutná inhibice p38 MAPK k úspěšné regeneraci.

V poraněných srdcích zebřičky je pozorovaná exprese *raldh2* molekuly jak v buňkách endokardu (Kikuchi et al., 2011) tak buňkách epikardu (Lepilina et al., 2006). Když se zkoumalo, zda dochází k stejné expresi *raldh2* i u savčích organismů, byly pozorovány značné rozdíly. V savčích srdcích nebyla přítomnost *raldh2* detekována v buňkách endokardu. V buňkách epikardu se nacházelo pouze v malém množství, a to především v buňkách nacházejících se poblíž rány. V dalších typech buněk, ve kterých byla tato exprese pozorována, byly buňky, které měly podobnost se zánětlivými či fibrotickými buňkami. Tato exprese byla ale velmi snížena již po sedmi dnech od poranění. Naproti tomu syntéza v buňkách endokardu u *Danio rerio* je významná pro regeneraci. Když došlo k inhibici syntézy, došlo i ke zmenšené proliferaci CM (Kikuchi et al., 2011).

Při vývoj srdce můžeme pozorovat, že jak *Danio rerio* (Lavine et al., 2005) tak myš (Reifers et al., 1998; Marques et al., 2008) mají aktivní FGF signalizaci. Pokud došlo k inhibici FGF signalizace, byla u obou modelových organismů pozorována menší srdce (Reifers et al., 1998; Lavine et al., 2005; Marques et al., 2008). Tato signalizace má i zásadní vliv při regeneraci srdce u zebřičky, kde je FGF signalizace podstatná pro správnou neovaskularizaci a invazi buněk epitelu do nově vzniklé tkáně (Lepilina et al., 2006).



## 7. Závěr

Cílem práce bylo nastínit základní mechanismy a rozdíly v regeneraci a hojení poraněných srdcí.

Přestože ve vývoji srdce, jak na molekulární tak v obecné rovině, můžeme pozorovat určité podobnosti napříč organismy, reakce na poranění probíhá u zástupců rozdílně. Největší pozorovatelný rozdíl je, že některé ryby a obojživelníci mají schopnost nahradit poškozenou tkáň nově vzniklým svalem z již existujících buněk, ve srovnání se savci, u kterých namísto toho dochází k nekrotizaci tkáně a následně výměně za zralou kolagení jizvu.

Schopnost regenerace srdce můžeme pozorovat především u ryby *Danio rerio*, která je dlouholetý a velmi dobře prozkoumaný modelový organismus. Regenerace jsou schopní i někteří obojživelníci. Především čolci, kteří si zachovávají celoživotní regenerační schopnost v porovnání s žábami, kde je regenerace v dospělosti schopný *Xenopus tropicalis*, zatímco *Xenopus laevis* nedokáže po metamorfóze regenerovat.

U zebřičky je viditelná reakce na poranění odehrávající se v celém srdci. Po poranění dochází k dediferenciaci původních kardiomyocytů nacházejících se v srdci, které následně na to proliferují. Aktivují se buňky epikardu a endokardu, aktivace je viditelná nejdříve v celém srdci a v průběhu regenerace se lokalizují na poškozenou část srdce. V endokardu a epikardu jsou důležité například molekuly *raldh2*, *nrp* či *fgf*. Ze zjištěných informací je patré, že pro regeneraci jsou důležité molekuly, které mají vliv na angiogenezi (*vegf*, *pedgf*). Stejně tak, že se na vzniku nové tkáně podílejí z velké části kardiomyocyty pozitivní pro transkripční faktor *gata4*, který je ovlivňován velký množstvím jiných molekul, například *igf*, *NF-kB*, *brg1*, a bez aktivace *gata4* je regenerace znemožněna.

I přes dlouholeté názory, že lidská srdce jsou neschopná regenerace z důvodu, že jsou srdeční buňky postmitotické a neschopné dělení, se ukazuje, že to není pravda a v lidských srdcích ke vzniku nových buněk dochází. Tento poznatek společně s odhalením signálních drah, které jsou zodpovědné za nemožnost regenerace, například (*Meis1*, *cdk*), a tvorbu jizvy, by v budoucnu mohl vést ke vzniku klinické léčby, která by pomáhala pacientům po poranění srdce. Naději nám dává i poznatek o tom, že srdce novorozených savců jsou regenerace schopná.

## 8. Reference

- Ali, S.R., Hippenmeyer, S., Saadat, L. V., Luo, L., Weissman, I.L., and Ardehali, R. (2014). Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8850–8855.
- Aurora, A.B., Porrello, E.R., Tan, W., Mahmoud, A.I., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., Sadek, H.A., and Olson, E.N. (2014). Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Invest.* *124*, 1382–1392.
- Baker, K., Holtzman, N.G., and Burdine, R.D. (2008). Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 13924–13929.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* (80-. ). *324*, 98–102.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., and Kühn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury. *Cell* *138*, 257–270.
- Bettencourt-Dias, M., Mittnacht, S., and Brockes, J.P. (2003). Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* *116*, 4001–4009.
- Bevan, L., Lim, Z.W., Venkatesh, B., Riley, P.R., Martin, P., and Richardson, R.J. (2020). Specific macrophage populations promote both cardiac scar deposition and subsequent resolution in adult zebrafish. *Cardiovasc. Res.* *116*, 1357–1371.
- de Boer, B.A., van den Berg, G., de Boer, P.A.J., Moorman, A.F.M., and Ruijter, J.M. (2012). Growth of the developing mouse heart: An interactive qualitative and quantitative 3D atlas. *Dev. Biol.* *368*, 203–213.
- Breckenridge, R.A., Mohun, T.J., and Amaya, E. (2001). A Role for BMP Signalling in Heart Looping Morphogenesis in *Xenopus*. *Dev. Biol.* *232*, 191–203.
- \*Brockes, J.P. (1997). Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science* (80-. ). *276*, 81–87.
- \*Carlson, Bruce M. (2007) *Principles of Regenerative Biology*. Amsterdam: Academic Press. ISBN: 9780123694393.
- Cheng, W., Kajstura, J., Nitahara, J.A., Li, B., Reiss, K., Liu, Y., Clark, W.A., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., et al. (1996). Programmed Myocyte Cell Death Affects the Viable Myocardium after Infarction in Rats. *Exp. Cell Res.* *226*, 316–327.
- Cleutjens, J.P.M., Verluyten, M.J.A., Smiths, J.F.M., and Daemen, M.J.A.P. (1995a). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am. J. Pathol.* *147*, 325–338.
- Cleutjens, J.P.M., Kandala, J.C., Guarda, E., Guntaka, R. V., and Weber, K.T. (1995b). Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *27*, 1281–1292.
- Collop, A.H., Broomfield, J.A.S., Chandraratna, R.A.S., Yong, Z., Deimling, S.J., Kolker, S.J.,

- Weeks, D.L., and Drysdale, T.A. (2006). Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Dev. Biol.* *291*, 96–109.
- Creemers, E., Cleutjens, J., Smits, J., Heymans, S., Moons, L., Collen, D., Daemen, M., and Carmeliet, P. (2000). Disruption of the Plasminogen Gene in Mice Abolishes Wound Healing after Myocardial Infarction. *Am. J. Pathol.* *156*, 1865–1873.
- D’Uva, G., Aharonov, A., Lauriola, M., Kain, D., Yahalom-Ronen, Y., Carvalho, S., Weisinger, K., Bassat, E., Rajchman, D., Yifa, O., et al. (2015). ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat. Cell Biol.* *17*, 627–638.
- Davidson, S.M., and Morange, M. (2000). Hsp25 and the p38 MAPK Pathway Are Involved in Differentiation of Cardiomyocytes. *Dev. Biol.* *218*, 146–160.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* *122*, 103–111.
- Dobaczewski, M., Bujak, M., Zymek, P., Ren, G., Entman, M.L., and Frangogiannis, N.G. (2006). Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res.* *324*, 475–488.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., and Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* *19*, 1175–1187.
- Engel, F.B., Hsieh, P.C.H., Lee, R.T., and Keating, M.T. (2006). FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 15546–15551.
- Fang, Y., Gupta, V., Karra, R., Holdway, J.E., Kikuchi, K., and Poss, K.D. (2013). Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13416–13421.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 851–858.
- Flink, I.L. (2002). Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum* : confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled. *Anat. Embryol. (Berl.)* *205*, 235–244.
- García-Echeverría, C., Pearson, M.A., Marti, A., Meyer, T., Mestan, J., Zimmermann, J., Gao, J., Brueggen, J., Capraro, H.-G., Cozens, R., et al. (2004). In vivo antitumor activity of NVP-AEW541—A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* *5*, 231–239.
- \*Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., and Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* *29*, 611–620.
- Godwin, J.W., Debuque, R., Salimova, E., and Rosenthal, N.A. (2017). Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the

extracellular landscape. *Npj Regen. Med.* 2, 1–11.

Gonzalez-Rosa, J.M., Martin, V., Peralta, M., Torres, M., and Mercader, N. (2011). Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development* 138, 1663–1674.

Gupta, V., Gemberling, M., Karra, R., Rosenfeld, G.E., Evans, T., and Poss, K.D. (2013). An Injury-Responsive Gata4 Program Shapes the Zebrafish Cardiac Ventricle. *Curr. Biol.* 23, 1221–1227.

Han, C., Nie, Y., Lian, H., Liu, R., He, F., Huang, H., and Hu, S. (2015). Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res.* 25, 1137–1151.

Hang, C.T., Yang, J., Han, P., Cheng, H.-L., Shang, C., Ashley, E., Zhou, B., and Chang, C.-P. (2010). Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 466, 62–67.

Harrison, M.R.M., Bussmann, J., Huang, Y., Zhao, L., Osorio, A., Burns, C.G., Burns, C.E., Sucov, H.M., Siekmann, A.F., and Lien, C.-L. (2015). Chemokine Guided Angiogenesis Directs Coronary Vasculature Formation in Zebrafish. *Dev. Cell* 33, 442–454.

Hassink, R.J., Pasumarthi, K.B., Nakajima, H., Rubart, M., Soonpaa, M.H., de la Riviere, A.B., Doevendans, P.A., and Field, L.J. (2008). Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 78, 18–25.

Haubner, B.J., Adamowicz-Brice, M., Khadayate, S., Tiefenthaler, V., Metzler, B., Aitman, T., and Penninger, J.M. (2012). Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging (Albany, NY)*. 4, 966–977.

Haubner, B.J., Schneider, J., Schweigmann, U., Schuetz, T., Dichtl, W., Velik-Salchner, C., Stein, J.-I., and Penninger, J.M. (2016). Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 118, 216–221.

Hayashidani, S., Tsutsui, H., Ikeuchi, M., Shiomi, T., Matsusaka, H., Kubota, T., Imanaka-Yoshida, K., Itoh, T., and Takeshita, A. (2003). Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 285, H1229–H1235.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2011). Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science* (80-. ). 332, 458–461.

Heallen, T., Morikawa, Y., Leach, J., Tao, G., Willerson, J.T., Johnson, R.L., and Martin, J.F. (2013). Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development* 140, 4683–4690.

\*Hesse, M., Welz, A., and Fleischmann, B.K. (2018). Heart regeneration and the cardiomyocyte cell cycle. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 470, 241–248.

Heymans, S., Lutun, A., Nuyens, D., Theilmeier, G., Creemers, E., Moons, L., Dyspersin, G.D., Cleutjens, J.P.M., Shipley, M., Angellilo, A., et al. (1999). Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat. Med.* 5, 1135–1142.

Hsieh, P.C.H., Segers, V.F.M., Davis, M.E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkentin, J.D.,

- Robbins, J., and Lee, R.T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat. Med.* *13*, 970–974.
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H.J., and Clark, E.B. (2000). Structure and function of the developing zebrafish heart. *Anat. Rec.* *260*, 148–157.
- Huang, W.-C., Yang, C.-C., Chen, I.-H., Liu, Y.-M.L., Chang, S.-J., and Chuang, Y.-J. (2013a). Treatment of Glucocorticoids Inhibited Early Immune Responses and Impaired Cardiac Repair in Adult Zebrafish. *PLoS One* *8*, 1–11.
- Huang, Y., Harrison, M.R., Osorio, A., Kim, J., Baugh, A., Duan, C., Sucov, H.M., and Lien, C.-L. (2013b). Igf Signaling is Required for Cardiomyocyte Proliferation during Zebrafish Heart Development and Regeneration. *PLoS One* *8*, 1–11.
- Itou, J., Oishi, I., Kawakami, H., Glass, T.J., Richter, J., Johnson, A., Lund, T.C., and Kawakami, Y. (2012). Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish. *Development* *139*, 4133–4142.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Belmonte, J.C.I. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* *464*, 606–609.
- Jopling, C., Suñè, G., Morera, C., and Belmonte, J.C.I. (2012). p38 $\alpha$  MAPK regulates myocardial regeneration in zebrafish. *Cell Cycle* *11*, 1195–1201.
- Kannel, W.B., Dawber, T.R., Kagan, A., Revotskie, N., and Stokes, J. (1961). Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease—Six-Year Follow-up Experience. *Ann. Intern. Med.* *55*, 33–55.
- Karra, R., Knecht, A.K., Kikuchi, K., and Poss, K.D. (2015). Myocardial NF- $\kappa$ B activation is essential for zebrafish heart regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 13255–13260.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* *7*, 331–342.
- Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., et al. (2011). Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* *123*, 594–604.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., MacRae, C.A., Stainier, D.Y.R., and Poss, K.D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*<sup>+</sup> cardiomyocytes. *Nature* *464*, 601–605.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Major, R.J., Blum, N., Dahn, R.D., Begemann, G., and Poss, K.D. (2011). Retinoic Acid Production by Endocardium and Epicardium Is an Injury Response Essential for Zebrafish Heart Regeneration. *Dev. Cell* *20*, 397–404.
- Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., Wiens, K.M., Huang, Y., Rubin, N., Shimada, H., Handin, R.I., Chao, M.Y., Tuan, T.-L., et al. (2010). PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 17206–17210.
- Kolker, S.J., Tajchman, U., and Weeks, D.L. (2000). Confocal Imaging of Early Heart

Development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 218, 64–73.

\*Laslett, L.J., Alagona, P., Clark, B.A., Drozda, J.P., Saldivar, F., Wilson, S.R., Poe, C., and Hart, M. (2012). The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, S1–S49.

Lavine, K.J., Yu, K., White, A.C., Zhang, X., Smith, C., Partanen, J., and Ornitz, D.M. (2005). Endocardial and Epicardial Derived FGF Signals Regulate Myocardial Proliferation and Differentiation In Vivo. *Dev. Cell* 8, 85–95.

Lee, P., Goishi, K., Davidson, A.J., Mannix, R., Zon, L., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 10470–10475.

Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., and Poss, K.D. (2006). A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration. *Cell* 127, 607–619.

Li, F., Wang, X., Capasso, J.M., and Gerdes, A.M. (1996). Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1737–1746.

Liao, S., Dong, W., Lv, L., Guo, H., Yang, J., Zhao, H., Huang, R., Yuan, Z., Chen, Y., Feng, S., et al. (2017). Heart regeneration in adult *Xenopus tropicalis* after apical resection. *Cell Biosci.* 7, 1–16.

\*Londono, R., Sun, A.X., Tuan, R.S., and Lozito, T.P. (2018). Tissue Repair and Epimorphic Regeneration: an Overview. *Curr. Pathobiol. Rep.* 6, 61–69.

Lowe, V., Wisniewski, L., Sayers, J., Evans, I., Frankel, P., Mercader-Huber, N., Zachary, I.C., and Pellet-Many, C. (2019). Neuropilin 1 mediates epicardial activation and revascularization in the regenerating zebrafish heart. *Development* 146, 1–13.

Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., and Sadek, H.A. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253.

Marín-Juez, R., Marass, M., Gauvrit, S., Rossi, A., Lai, S.-L., Materna, S.C., Black, B.L., and Stainier, D.Y.R. (2016). Fast revascularization of the injured area is essential to support zebrafish heart regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 11237–11242.

Marques, S.R., Lee, Y., Poss, K.D., and Yelon, D. (2008). Reiterative roles for FGF signaling in the establishment of size and proportion of the zebrafish heart. *Dev. Biol.* 321, 397–406.

Marshall, L., Vivien, C., Girardot, F., Péricard, L., Demeneix, B.A., Coen, L., and Chai, N. (2017). Persistent fibrosis, hypertrophy and sarcomere disorganisation after endoscopy-guided heart resection in adult *Xenopus*. *PLoS One* 12, 1–24.

Marshall, L.N., Vivien, C.J., Girardot, F., Péricard, L., Scerbo, P., Palmier, K., Demeneix, B.A., and Coen, L. (2019). Stage-dependent cardiac regeneration in *Xenopus* is regulated by thyroid hormone availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 3614–3623.

Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C. V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling Tissue Regeneration

Pathways Using Chemical Genetics. *J. Biol. Chem.* 282, 35202–35210.

McLean, K.E., and Vickaryous, M.K. (2011). A novel amniote model of epimorphic regeneration: the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *BMC Dev. Biol.* 11, 1–24.

\*Menasché, P. (2018). Cell therapy trials for heart regeneration — lessons learned and future directions. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 659–671.

Mercer, S., Odelberg, S.J., and Simon, H.-G. (2013). A dynamic spatiotemporal extracellular matrix facilitates epicardial-mediated vertebrate heart regeneration. *Dev. Biol.* 382, 457–469.

Mohun, T.J., Leong, L.M., Weninger, W.J., and Sparrow, D.B. (2000). The Morphology of Heart Development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 218, 74–88.

Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.-Y., Silberstein, L.E., dos Remedios, C.G., Graham, D., Colan, S., et al. (2013). Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1446–1451.

Moss, J.B., Xavier-Neto, J., Shapiro, M.D., Nayeem, S.M., McCaffery, P., Dräger, U.C., and Rosenthal, N. (1998). Dynamic Patterns of Retinoic Acid Synthesis and Response in the Developing Mammalian Heart. *Dev. Biol.* 199, 55–71.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047.

Oberpriller, J.O., and Oberpriller, J.C. (1974). Response of the adult newt ventricle to injury. *J. Exp. Zool.* 187, 249–259.

Pasumarthi, K.B.S., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Soonpaa, M.H., and Field, L.J. (2005). Targeted Expression of Cyclin D2 Results in Cardiomyocyte DNA Synthesis and Infarct Regression in Transgenic Mice. *Circ. Res.* 96, 110–118.

Peterkin, T., Gibson, A., and Patient, R. (2003). GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation. *EMBO J.* 22, 4260–4273.

Piatkowski, T., Mühlfeld, C., Borchardt, T., and Braun, T. (2013). Reconstitution of the Myocardium in Regenerating Newt Hearts is Preceded by Transient Deposition of Extracellular Matrix Components. *Stem Cells Dev.* 22, 1921–1931.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science* (80-. ). 331, 1078–1080.

Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart Regeneration in Zebrafish. *Science* (80-. ). 298, 2188–2190.

Raya, Á., Koth, C.M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R.M., Sternik, G., Tsai, H.-J., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2003). Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11889–11895.

Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E.C., Crossley, P.H., Stainier, D.Y.R., and Brand, M. (1998). *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of

- midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* *125*, 2381–2395.
- Reiter, J.F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., and Stainier, D.Y.R. (1999). *Gata5* is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* *13*, 2983–2995.
- Reiter, J.F., Verkade, H., and Stainier, D.Y.R. (2001). *Bmp2b* and *Oep* Promote Early Myocardial Differentiation through Their Regulation of *gata5*. *Dev. Biol.* *234*, 330–338.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* *524*, 230–233.
- Rowe, R.W. (1971). ULTRASTRUCTURE OF THE Z LINE OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Cell Biol.* *51*, 674–685.
- Sandanger, Ø., Ranheim, T., Vinge, L.E., Bliksøen, M., Alfsnes, K., Finsen, A. V., Dahl, C.P., Askevold, E.T., Florholmen, G., Christensen, G., et al. (2013). The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *99*, 164–174.
- Santini, M.P., Tsao, L., Monassier, L., Theodoropoulos, C., Carter, J., Lara-Pezzi, E., Slonimsky, E., Salimova, E., Delafontaine, P., Song, Y.-H., et al. (2007). Enhancing Repair of the Mammalian Heart. *Circ. Res.* *100*, 1732–1740.
- Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., Voipio-Pulkki, L.-M. (1997). Apoptosis in Human Acute Myocardial Infarction. *Cirkulation.* *95*, 320–323.
- Saxena, A., Chen, W., Su, Y., Rai, V., Uche, O.U., Li, N., and Frangogiannis, N.G. (2013). IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium. *J. Immunol.* *191*, 4838–4848.
- Schnabel, K., Wu, C.-C., Kurth, T., and Weidinger, G. (2011). Regeneration of Cryoinjury Induced Necrotic Heart Lesions in Zebrafish Is Associated with Epicardial Activation and Cardiomyocyte Proliferation. *PLoS One* *6*, 1–11.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* *493*, 433–436.
- Singh, M.K., Christoffels, V.M., Dias, J.M., Trowe, M.-O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Bürger, A., Ericson, J., and Kispert, A. (2005). *Tbx20* is essential for cardiac chamber differentiation and repression of *Tbx2*. *Development* *132*, 2697–2707.
- Singleman, C., and Holtzman, N.G. (2012). Analysis of post-embryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Dyn.* *241*, 1993–2004.
- Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., and Frisén, J. (2005). Retrospective Birth Dating of Cells in Humans. *Cell* *122*, 133–143.
- Stainier, D.Y.R., Lee, R.K., and Fishman, M.C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish: I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development* *119*, 31–40.
- Stankunas, K., Shang, C., Twu, K.Y., Kao, S.-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sanyal, M.,



- Selleri, L., Cleary, M.L., and Chang, C.-P. (2008). Pbx/Meis Deficiencies Demonstrate Multigenetic Origins of Congenital Heart Disease. *Circ. Res.* *103*, 702–709.
- Tamamori-Adachi, M., Ito, H., Sumrejkanchanakij, P., Adachi, S., Hiroe, M., Shimizu, M., Kawauchi, J., Sunamori, M., Marumo, F., Kitajima, S., et al. (2003). Critical Role of Cyclin D1 Nuclear Import in Cardiomyocyte Proliferation. *Circ. Res.* *92*, e12–e19.
- Thornton, C.S. (1960). Influence of an eccentric epidermal cap on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *Dev. Biol.* *2*, 551–569.
- Virag, J.I., and Murry, C.E. (2003). Myofibroblast and Endothelial Cell Proliferation during Murine Myocardial Infarct Repair. *Am. J. Pathol.* *163*, 2433–2440.
- Wiens, K.M., Lee, H.L., Shimada, H., Metcalf, A.E., Chao, M.Y., and Lien, C.-L. (2010). Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$  Is Critical for Zebrafish Intersegmental Vessel Formation. *PLoS One* *5*, 1–12.
- Witman, N., Murtuza, B., Davis, B., Arner, A., and Morrison, J.I. (2011). Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. *Dev. Biol.* *354*, 67–76.
- Wu, C.-C., Kruse, F., Vasudevarao, M.D., Junker, J.P., Zebrowski, D.C., Fischer, K., Noël, E.S., Grün, D., Berezikov, E., Engel, F.B., et al. (2016). Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Dev. Cell* *36*, 36–49.
- Xiang, F., Guo, M., and Yutzey, K.E. (2016). Overexpression of Tbx20 in Adult Cardiomyocytes Promotes Proliferation and Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation* *133*, 1081–1092.
- Xiao, C., Gao, L., Hou, Y., Xu, C., Chang, N., Wang, F., Hu, K., He, A., Luo, Y., Wang, J., et al. (2016). Chromatin-remodelling factor Brg1 regulates myocardial proliferation and regeneration in zebrafish. *Nat. Commun.* *7*, 1–13.
- Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L.B., Qi, X., McAnally, J., Schwartz, R.J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2011). Regulation of Insulin-Like Growth Factor Signaling by Yap Governs Cardiomyocyte Proliferation and Embryonic Heart Size. *Sci. Signal.* *4*, 1–15.
- Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L.B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Tan, W., Shelton, J.M., et al. (2013). Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13839–13844.
- Xu, S., Webb, S.E., Lau, T.C.K., and Cheng, S.H. (2018). Matrix metalloproteinases (MMPs) mediate leukocyte recruitment during the inflammatory phase of zebrafish heart regeneration. *Sci. Rep.* *8*, 1–14.
- Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., et al. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *62*, 24–35.
- Yu, W., Huang, X., Tian, X., Zhang, H., He, L., Wang, Y., Nie, Y., Hu, S., Lin, Z., Zhou, B., et al. (2016). GATA4 regulates Fgf16 to promote heart repair after injury. *Development* *143*, 936–949.

Zhao, L., Borikova, A.L., Ben-Yair, R., Guner-Ataman, B., MacRae, C.A., Lee, R.T., Burns, C.G., and Burns, C.E. (2014). Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 1403–1408.

Zhao, L., Ben-Yair, R., Burns, C.E., and Burns, C.G. (2019). Endocardial Notch Signaling Promotes Cardiomyocyte Proliferation in the Regenerating Zebrafish Heart through Wnt Pathway Antagonism. *Cell Rep.* *26*, 546–554.

Zhao, R., Watt, A.J., Battle, M.A., Li, J., Bondow, B.J., and Duncan, S.A. (2008). Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev. Biol.* *317*, 614–619.

Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., and Harland, R.M. (1996). The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell* *86*, 599–606.