

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

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Jakub Onhajzer**

Molekulárne mechanizmy regenerácie končatín u stavovcov  
Molecular mechanisms of vertebrate limb regeneration

Bakalárska práca

Vedúci práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2018

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť, nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 24.04.2018

Jakub Onhajzer

.....

## **Pod'akovanie**

Prednostne by som chcel pod'akovať školiteľovi doc. RNDr. Ing. Vladimírovi Krylovovi, Ph.D. za jeho trpezlivosť, ochotu a cenné rady pri písaní tejto práce. Pod'akovanie patrí aj Mgr. Tatiane Vančovej a RNDr. Tomášovi Žatkovi, PhD. za cenné pripomienky k práci. Ďalej by som poďakoval celej rodine za neustálu podporu a motiváciu, nielen v priebehu štúdia, ale aj počas celého života.

## Abstrakt

Regenerácia končatín je predmetom štúdia vedeckých pracovníkov už po desaťročia. Mlokotvaré živočíchy ovládajú dokonalú regeneráciu končatín. Túto schopnosť si uchovávajú po celý svoj život. Nie sú však jediné, ktoré disponujú touto schopnosťou. Druhou skupinou sú žabotvaré živočíchy, avšak regenerácia končatín prebieha u nich len v larválnom štádiu. Ich spoločným znakom je, že sú to obojživelníky a regenerácia končatín sa u nich uskutočňuje procesom, ktorý sa nazýva epimorfóza. Primárnym dejom epimorfózy je formovanie blastému. Blastém je masa heterogénnych dediferencovaných buniek, ktoré sú unipotentné, a teda môžu spätne diferencovať len na jediný bunkový typ. Dôležitým faktorom pre regeneráciu končatín je regulácia prostredníctvom rôznych molekulárnych mechanizmov, aby mohol byť dosiahnutý dokonalý tvar končatiny bez vzniku nežiadúcich nádorov. Mechanizmy umožňujúce regeneráciu končatín u nižších stavovcov môžu byť v budúcnosti aplikované prostredníctvom regeneratívnej medicíny aj u vyšších stavovcov.

Kľúčové slová: regenerácia, končatina, epimorfóza, dediferenciácia, stavovce

## **Abstract**

Limb regeneration fascinates innumerable scientists for decades. Urodele amphibians can regenerate their limbs perfectly. This ability is preserved for a whole lifetime. However, they are not the only ones who regenerate their limbs. Second species are anuran amphibians, but their ability to promote limb regeneration take place only throughout a larval stage. Both groups belong to amphibians. Limbs are regenerated by the process called epimorphosis. The primary process is formation of blastema, mass of heterogeneous dedifferentiated cells, which are unipotent with the capacity to redifferentiate into only one cell type. Essential factor is the regulation of limb regeneration by numerous molecular mechanisms in order to achieve the perfect limb shape, without unwanted tumors. Mechanisms allowing limb regeneration in lower vertebrates would be applied via regenerative medicine in higher vertebrates in the future.

Keywords: regeneration, limb, epimorphosis, dedifferentiation, vertebrates

## Zoznam skratiek

AEC	Apical epithelial cap, apikálno-epiteliálna čiapočka
ALM	Accessory limb model, model stupňovitej regenerácie končatiny
AmPrx-1	Ambystoma mexicanum paired related homebox 1
AmTbx-5	Ambystoma mexicanum T-box transcription factor 5
BMP	Bone morphogenic protein, kostný morfogénový protein
BrdU	Bromodeoxyuridine, bromodeoxyuridín
ECM	Extracellular matrix, extracelulárna matrix
FGF	Fibroblast growth factor, fibroblastový rastový faktor
Hoxa-13	Homeobox A cluster 13, Homeobox A klaster 13
HSPG	Heparan sulfate proteoglycans, heparan sulfátové proteoglykany
hsp70	Heat shock protein 70, protein teplotného šoku 70
KGF	Keratinocyte growth factor, keratínocytový rastový faktor
Mmp-9	Matrix metalloproteinase-9, matrix metalloproteináza-9
Msx	Muscle specific homeobox, Svalovo-špecifický homeobox
nAG	Newt anterior gradient
Sp9	Specificity protein 9 transcription factor, špecifický transkripčný faktor 9
TGFβ	Transforming growth factor beta, transformujúci rastový faktor beta
<sup>3</sup> H thymidine	Tritiated thymidine, tritiovaný tymidín

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Epimorfóza .....	10
2.1 Vývoj experimentálneho poznania v regenerácii končatín.....	10
2.2 Dediferenciácia bunky a formovanie blastému u epimorfózy .....	10
2.2.1 Regulácia matrix metalloproteinázy-9 .....	11
2.2.2 Regulácia Wnt/ $\beta$ -catenin.....	12
2.2.3 Notch signalizácia .....	12
2.3 Neurotropná regulácia a závislosť epimorfózy na inervácii.....	13
2.3.1 Neurotropné faktory .....	14
2.3.2 FGF .....	14
2.3.3 BMP .....	15
2.3.4 nAG.....	16
2.3.5 Expresia Sp9 .....	16
2.4 Ektopická končatina .....	17
2.4.1 AmPrx-1 a AmTbx-5 .....	20
2.5 Modelové organizmy pre výskum regenerácie končatín .....	21
2.5.1 Žabotvaré .....	21
2.5.2 Mlokotvaré.....	24
3. Regenerácia a tvorba jazvy .....	26
4. Regeneratívna medicína .....	29
5. Záver.....	31
6. Zoznam použitej literatúry .....	33

# 1.Úvod

Kompletná oprava strateného tkaniva alebo orgánu plne vyvinutého organizmu či bunková diferenciácia boli záhady života a fascinovali veľkú časť vedeckej komunity po stáročia. Proces regenerácie môžeme rozdeliť na tri základné druhy: epimorfóza, morfolaxia a kompenzačná regenerácia.

Epimorfózu môžeme pozorovať u obojživelníkov mlokotvarých (axolotl, mlok, atď.), kde prebieha regenerácia po celý život jedinca a žabotvarých (žaby), u ktorých táto schopnosť pretrváva iba v larválnom štádiu. Pri epimorfóze, ako pri jedinom procese regenerácie dochádza v mieste amputácie končatiny či chvosta k dediferenciacii plno diferencovaných buniek a tvorbe blastému. Blastém je tvorený masou progenitorových buniek pochádzajúcich z miesta amputácie končatiny. Pre vytvorenie správnej štruktúry a funkcie končatiny, progenitorové bunky spätne diferencujú. Prvotne sa predpokladalo, že blastém je homogénna štruktúra tvorená multipotentnými bunkami, z ktorých pri regenerácii vznikne celá končatina. Dnešné štúdie na druhú stranu dokazujú, že blastém sa skladá z heterogénnych unipotentných buniek, ktoré sú špecifické pre pôvod buniek a sú schopné spätne diferencovať len na jeden bunkový typ. Dediferencované tzv. progenitorové bunky pre dokončenie regenerácie podstupujú spätnú diferenciáciu na príslušné bunkové typy a dochádza ku kompletnej obnove poškodenej časti tela.

Druhým typom regenerácie je morfolaxia. Typickým zástupcom, u ktorého prebieha tento druh regenerácie je nezmara. Na rozdiel od epimorfózy sa pri morfolaxii netvorí blastém. Telo nezmara je tvorené ektodermom a endodermom (absentuje tu mezoderm). V hlavovej časti sa nachádza chobot - hypostom a v nožnej časti sa nachádza bazálny disk. Polaritu tela určuje pôsobenie aktivačných a inhibičných gradientov morfogénov pre tvorbu a regeneráciu hlavy a rovnako aj pre bazálnu časť tela. Maximálna hladina aktivačných morfogénov pre hlavovú časť sa nachádza na apikálnom konci a naopak na bazálnom konci sa nachádza jej minimum. S klesajúcou hladinou aktivačného hlavového morfogénu stúpa hladina aktivačných morfogénov nožnej časti, ktorá dosahuje svoje maximum v oblasti bazálneho disku. Každá časť tela nezmara je vďaka rozdielnym hladinám gradientov morfogénov v apikálno-bazálnej ose schopná priestorovej orientácie a podľa miesta amputácie sa vytvorí hlava alebo noha nezmara. Inhibičné gradienty zodpovedajú za vytvorenie jednej hlavy a jednej nohy. V kompletnom tele nezmara sú hladiny týchto gradientov v rovnováhe.



Amputáciou sa rovnováha naruší a podľa miesta zranenia a hladiny morfogénov dorastie odpovedajúci kus hlavy alebo nohy a morfogény sa vrátia do stavu rovnováhy.

Regenerácia pečene alebo kompenzačná regenerácia môže byť definovaná aj ako kompenzačná hyperplázia, kde zvyšné tkanivo pečene expanduje, aby doplnilo metabolické potreby organizmu. Na rozdiel od epimorfózy počas kompenzačnej regenerácie nedochádza k úplne dokonalej anatomickej reparácii poškodenej štruktúry. Pri poškodení časti pečene u cicavcov dochádza k opätovnému spusteniu bunkového cyklu a proliferácii nepoškodených hepatocytov. Pri tomto procese nedochádza k dediferenciácii, takže ich nemôžeme charakterizovať ani ako kmeňové bunky a zatiaľ nebola pozorovaná ani tvorba blastému.

Cieľom tejto práce je zhrnúť a porovnať poznatky molekulárnych mechanizmov regenerácie končatín u nižších a vyšších stavovcov. Demonštrovať regulačné mechanizmy pri epimorfóze, ktoré zabezpečujú priebeh regenerácie končatín. Následne, na základe získaných poznatkov, pojednávať o možnostiach použitia regeneratívnej medicíny v tomto odbore.

## **2. Epimorfóza**

### **2.1 Vývoj experimentálneho poznania v regenerácii končatín**

Regeneráciou končatín sa z vedeckého hľadiska začal zaoberať Lazzaro Spallanzani v 18. storočí, kedy pozoroval tento proces u žubrienky a salamandry škvrnitej (Tsonis and Fox, 2009). Systematické štúdie regenerácie končatín začali až v druhej polovici 19. storočia, skúmal ich Thomas Hunt Morgan (Sunderland, 2010). Počas prvej polovice 20. storočia sa začala veľká časť vedeckej komunity z experimentálnej vývojovej biológie zaoberať regeneráciou končatín u obojživelníkov. Prvé pozorovania vychádzali z anatomických, histologických a morfológických štúdií. Ďalšie experimenty už zahŕňali autoradiografické značenie buniek a transplantačné pokusy, aby objasnili interakcie medzi tkanivami a samotnými bunkami. V priebehu 21. storočia sa vytvorili podmienky dovoľujúce rozvoj imunológie a molekulárnej biológie v oblasti regenerácie končatín (Carlson, 2007; Hay and Fischman, 1961; Thornton, 1960).

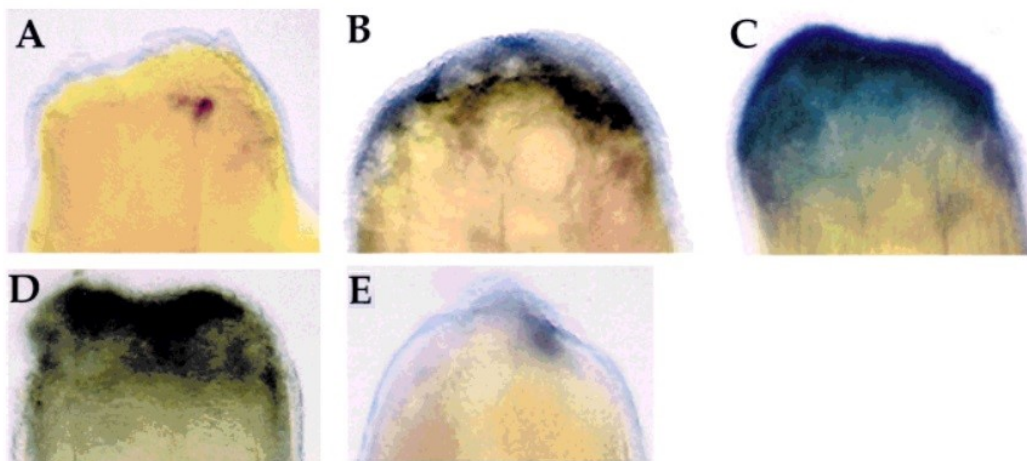
### **2.2 Dediferenciácia bunky a formovanie blastému u epimorfózy**

Regenerácia končatiny je iniciovaná poranením, ktoré vedie k hojeniu. V priebehu prvého dňa sa miesto amputácie uzavrie migráciou epidermálnych buniek z okrajov poranenia, tým sa miesto izoluje od vonkajšieho prostredia. Tieto bunky stratili medzibunkové spoje a prerušil sa kontakt medzi hemidesmozómom a bazálnou laminou. Táto vrstva buniek obsahuje 3-8 buniek na hrúbku. Migrujúce epidermálne bunky sa nedelia (Hay and Fischman, 1961). Zdroj nových migrujúcich buniek zabezpečuje zóna neustále sa deliacich buniek proximálne od miesta amputácie (Repsch and Oberpriller, 1980). V tomto štádiu sú stále vnútorné tkanivá v kontakte s krycou pokožkou a nie sú pozorovateľné žiadne morfológické zmeny. Na druhú stranu, ako odpoveď na amputáciu, začnú byť stimulované progenitorové mezenchymálne bunky, pretože sa zvyšuje inkorporácia bromodeoxyuridínu (BrdU) do jadier buniek vnútorných tkanív (BrdU slúži na detekciu proliferácie a úmrtnosti buniek) (Suzuki et al., 2005). Pod epidermou v mieste zranenia začne proces histolýzy, ktorá nastáva 2-3 dni po amputácii v larválnom štádiu a 4-5 dní u dospelého jedinca (Hay and Fischman, 1961), ale množstvo buniek s inkorporovaným BrdU stúpne (Suzuki et al., 2005). Degradáciu extracelulárnej matrix (ECM) uskutočňujú kyslé hydrolázy a matrixové metaloproteinázy, ktoré degradujú ECM kostí, svalov, nervové a dermálne tkanivá (Yang et al., 1999). Epiteliálne bunky kryjúce ranu zosilnia a následne vytvoria apikálno-epiteliálnu

čiapočku (AEC), ktorá usmerňuje rast a formovanie blastému pod ňou (Thornton, 1960), ale množstvo epiteliálnych buniek s inkorporovaným BrdU poklesne. Po 7 dňoch regenerácie tieto bunky začnú znovu aktívne proliferovať (Suzuki et al., 2005). Následne sa uvoľnia kmeňové bunky, jednojadrové fragmenty myofibríl, chondrocyty, fibroblasty a Schwannové bunky, ktoré podstúpia proces dediferenciácie (Brockes a Kumar, 2008). Počas 4 dňa po amputácii sa tieto dediferencované bunky značené BrdU začnú akumulovať pod epitel kryjúci ranu a začnú formovať blastém (Suzuki et al., 2005). Po vytvorení blastému pokračuje rast distálne aktívnou proliferáciou mezenchymálnych buniek, ktorý je zabezpečený komunikáciou medzi mezenchýmom a AEC prostredníctvom niekoľko rastových faktorov (Ohuchi et al., 1997). Tieto experimenty objasnili, že chronologické udalosti prebiehajúce v ranných štádiách regenerácie, ktoré nasledujú po amputácií, sú analogické pre žabotvaré a mlokotvaré jedince (Iten and Bryant, 1973).

### 2.2.1 Regulácia matrix metalloproteinázy-9

Jeden z prvých dejov pri regenerácii končatín je degradácia a remodelácia ECM. Ako reakcia na amputáciu sa po 2 hodinách spustí expresia génu matrix metalloproteinázy-9 (Mmp-9) v epitely kryjúcom ranu (obr. 1A). Po 5 hodinách sa zvýši hladina a plocha expresie (obr. 1B) s vrcholom pri 14 hodinách v oblasti epitelu kryjúceho ranu (obr. 1C). Následne po 18 hodinách hladina aj plocha expresie klesajú (obr. 1D). Po uplynutí 2 dní po amputácií je expresia Mmp-9 lokalizovaná len v oblasti vrcholu AEC (obr. 1E) (Yang et al., 1999).



**Obr. 1. Génová expresia Mmp-9 pri regenerácii končatiny axolotla (vyhodnotenie in situ hybridizácie).** 2 hodiny po amputácií (A), 5 hodín po amputácií (B), 14 hodín po amputácií (C), 18 hodín po amputácií (D), 2 dni po amputácií (E) (prevzaté a upravené z Yang et al., 1999).

Expresia tohto génu je spustená v každom poranení, či už je v oblasti zranenia nervové zakončenie alebo nie. Indukcia expresie Mmp-9 nie je závislá na inervácii (Sato et al., 2008). Mmp-9 vykazuje spomalenie reformácie bazálnej laminy epidermy, čo má za následok zlepšenie interakcií medzi epidermálnymi a mezenchymálnymi bunkami a tým zvyšuje kvalitu regenerácie. Táto skorá fáza trvá prvé 2 až 3 dni po amputácii v epitely kryjúcom ranu, potom už expresia v epiderme neprebíha. Druhá fáza génovej expresie Mmp-9 je lokalizovaná v mezenchymálnych bunkách v okolí amputovanej kosti, pri formovaní skorého blastému. Počas tejto fázy prebieha histolýza poškodeného tkaniva a trvá až do začiatku dediferenciácie (Yang et al., 1999).

### **2.2.2 Regulácia Wnt/ $\beta$ -catenin**

Wnt sa viaže na „Frizzled“ receptory, sú to transmembránové receptory spojené s G-proteínom, ktoré prechádzajú sedemkrát membránou s extracelulárnou N-terminálnou doménou s cysteínom. Po naviazaní Wnt na receptor prebehne signalizačná kaskáda až k fosforylovanému  $\beta$ -catenin, ktorý následne prestane byť fosforylovaný a vstupuje do jadra, kde ovplyvňuje transkripciu génov (Bhanot et al., 1996). Kawakami et al. (2006) preukázali dôležité zastúpenie Wnt pri regenerácii končatín u *Xenopus*, keď mikroinjikovali adenovírus (Ad-CA-  $\beta$ -catenin) obsahujúci neustále aktívovaný  $\beta$ -catenin do amputovaných nôh vo fáze 53-54. V tomto štádiu hladina regenerácie klesá. Boli pozorované odchýlky od normálneho vývoja končatín, ale indukcia regenerácie nastala. Avšak ak sa uskutočnila rovnaká procedúra na amputovaných končatinách, ktoré stratili schopnosť regenerácie, tak regenerácia nenastala. Wnt signalizácia, sa teda zdá byť veľmi dôležitá v indukcii regenerácie končatín.

### **2.2.3 Notch signalizácia**

Aktivácia Notch signalizácie nastane pri epimorfóze po dvoch dňoch od amputácie plutiev *Danio rerio* (Munch et al., 2013). Satelitné bunky, prekursorov svalových buniek spúšťajú expresiu rovnako dva dni po zranení. Keďže expresia nie je aktivovaná ihneď po poranení, nepodieľa sa na uzatváraní poranenia. Jeho expresiou sa aktivuje proliferácia progenitorových buniek, ktoré sú aj vďaka Notch stále udržiavané v dediferencovanom stave. Jeho antagonistom je Numb, ktorý inhibuje expresiu Notch a vedie k diferencovanému stavu progenitorových buniek do bunkového typu myoblastov. Ukázalo sa, že pri bunkovom delení sú oba asymetricky lokalizované v materskej bunke a pri delení sú rozdelené do každej bunky v rozdielnych hladinách. Toto má za následok vznik dvoch rozdielnych dcérskych buniek

pričom jedna je v dediferencovanom stave a pokračuje v proliferácii, druhá sa diferencuje na myoblast a začína tvoriť budúce svalové vlákno. Rozdielne hladiny expresie Notch a Numb určujú vo výsledku bunkovú homeostázu pri regenerácii svalov (Conboy and Rando, 2002). Na druhú stranu, Notch signalizácia a schopnosť proliferácie buniek slabne postupným starnutím, a teda aj kvalita regenerácie svalových vlákien. Avšak pri nútenej aktivácii Notch pomocou protilátky sa spustila regenerácia starších svalových vlákien (Conboy et al., 2003). Poukazuje to na skutočnosť, že Notch signalizácia je dôležitým faktorom pri regenerácii svalov.

### **2.3 Neurotropná regulácia a závislosť epimorfózy na inervácii**

Proces regenerácie epimorfózou sa začína formovaním blastému z nediferencovaných buniek v bezprostrednej blízkosti miesta amputácie. Pre dôkladnú tvorbu a rast blastému je potrebný dostatok nervových zakončení v mieste amputácie. Avšak namiesto potreby určitého typu nervu (napr. motorického) je nevyhnutné kvantitatívne množstvo nervových zakončení pre správnu regeneráciu, aby bol prekročený prah signalizácie nervami (Singer, 1974). Pre formovanie blastému je dôležitá komunikácia medzi senzorickými nervami a epidermou zranenia AEC. Tento fenomén bol potvrdený pri výskume regenerácie končatín na larvách a dospelých jedincov obojživelníkov, ako sú salamandra a mlok. Tieto živočíchy regenerujú svoje končatiny po amputácii a ich štruktúra a funkcia dokonale odpovedá stratenej časti končatiny. Regenerácia končatín u týchto živočíchov sa dá porovnať s opakovaním procesu vývoja končatín v embryogenéze (Singer, 1952). Na druhú stranu, skorá regeneračná fáza (uzatváranie poranenia) nevyžaduje inerváciu, ale v neskoršom štádiu je inervácia potrebná pre tvorbu a udržanie regenerujúceho blastému (Filoni and Paglialunga, 1990).

Axóny v končatine u mlokov, ktoré ústia z miechy a zadných miechových koreňov, vylučujú neurotropné faktory dôležité pre formovanie a stimuláciu rastu blastému (Maden, 1978). Ibaže ak sú nervové zakončenia končatiny odstránené alebo vznikne poškodenie regenerujúcej končatiny, či už chirurgickým zákrokom, alebo náhodne, buď v počiatočnom štádiu, pri procese tvorby blastému alebo v priebehu regenerácie, preruší sa sekrécia neurotropných faktorov do blastému. Tým sa regenerácia zastaví, blastém je vstrebaný a vytvorí sa jazva (Singer, 1974).

### 2.3.1 Neurotropné faktory

Dediferenciácia je reaktivácia ranných embryonálnych signalizácií a zahŕňa epigenetické modifikácie (McCusker and Gardiner, 2013). Následne boli tiež preskúmané neurotropné faktory ako sú FGF, nAG, KGF, BMP a ďalšie.

### 2.3.2 FGF

Fibroblastové rastové faktory (FGF) sú rodina rastových faktorov, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri normálnom vývoji, neurotropnej signalizácii, angiogenézi a hojení poranení (Greenhalgh et al., 1990). Tieto rastové faktory sa viažu na tyrozín kinázové receptory s vysokou afinitou a do heparan sulfát proteoglykanových (HSPG) väzbových miest s nízkou afinitou, lokalizované na povrchu bunky a v ECM (Zenjari et al., 1996). Ak bola končatina denervovaná a následne ošetrovaná injekciou *in vivo* s rastovým faktorom FGF, nastala stimulácia regenerácie a rast blastému. Tieto výsledky poukazovali na možnosť, že práve FGF je neurotropný faktor (Mescher and Gospodarowicz, 1979). Ďalšie imunochemické experimenty a pokusy, ktoré používali chromatografiu s heparin-sefarózou poukázali na prítomnosť FGF v regenerujúcom blastéme (Boilly et al., 1991). Tieto experimenty ale stále nepotvrdzujú jasný dôkaz, že FGF je zodpovedný za samotnú regeneráciu. Na druhej strane, určite sa dá povedať, že bunky blastému sú citlivé na FGF. Použitím chemikálií, ktoré sa môžu naviazať na FGF a tým ich inhibovať, sa preukázala skutočnosť, že FGF zabezpečuje rast blastému. V tejto štúdii boli použité sulfátované polysacharidy, ktoré sa viažu do heparin väzbovej domény rastového faktoru FGF, tým sa zablokuje väzbové miesto pre receptor a upadne rýchlosť proliferácie buniek blastému. Ošetrovaním neutralizujúcimi látkami proti FGF1, taktiež klesla inkorporácia <sup>3</sup>H thymidínu a mitotická aktivita buniek blastému. Použitím komplexu FGF-saporin, ktorý sa viaže na FGF receptory, boli bunky s týmto receptorom zabité a proliferácia mezenchymálnych buniek klesla. Ošetrovanie samotným saporinom nevykazovalo žiadnu zmenu v proliferácii buniek blastému (Zenjari et al., 1996).

Uskutočnili sa experimenty, kde boli aplikované guľičky napustené FGF2 do denervovanej končatiny v štádiu, kedy je nutná inervácia, pretože nervy boli typickým zdrojom FGF2. Týmto zákrokom sa spustila regenerácia a FGF2 bol charakterizovaný ako neurotropný faktor pri regenerácii končatín (Mullen et al., 1996).

Yokoyama et al. (2000) sa zaoberali miestom expresie FGF8 a FGF10 a ich pôsobením na regeneráciu končatín. Výsledky ukázali, že expresia oboch génov koreluje

s rozdielnymi regeneračnými schopnosťami u žiab pred a po metamorfóze a tiež ich zastúpenie v signalizácii medzi mezenchýmom a epidermou. Boli vykonané pokusy, kedy sa mladý mezenchým schopný regenerácie u žiab pred metamorfózou (žubrienok) prekryl neregenerujúcou epidermou od žiab po metamorfóze a následne bola indukovaná expresia FGF10 a FGF8 v blastéme. Mezenchymálne tkanivo u týchto žubrienok dokázalo kompletne zregenerovať po amputácii a prebiehala v ňom re-expressia génu FGF10. Následne dokázalo indukovať re-expressiu FGF8 v prekryvajúcej epiderme, ktorá nebola schopná regenerácie a ani expresie FGF8. Tieto výsledky podporujú skutočnosť, že kapacita regenerácie končatín je stanovená primárne expresiou FGF10 v mezenchýme. Ďalšie štúdie ukázali, že expresia FGF8 počas tvorby blastému neprebíha len v epiderme a AEC, ale je lokalizovaná aj v distálnej časti mezenchýmu a je zodpovedná za proliferáciu buniek. Príslušné experimenty potvrdili, že interakcia medzi FGF10 a FGF8 je nutná pre správny priebeh regenerácie končatín (Han et al., 2001).

### 2.3.3 BMP

Bone morphogenic proteins (BMP) sú neurotropné rastové faktory, ktoré patria do „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF $\beta$ ) rodiny (Chen et al., 2004). Cieľom BMP pri regenerácii končatín je Msx-1. Msx-1 je transkripčný represor, ktorý v interakcii s ďalšími faktormi inhibuje génovú expresiu zodpovednú za diferenciáciu buniek, a teda jeho expresia v regenerácii končatín je nevyhnutná, aby boli bunky blastému udržané v dediferencovanej forme (Lee et al., 2004). Silná expresia Msx-1 prebieha počas embryonálneho vývoja končatín v anteriórnej oblasti (Koshiba et al., 1998). Počas regenerácie nastane re-expressia v blastéme 2-3 dni po amputácii, tým sa ukázalo, že signalizácia BMP v prvých dvoch dňoch regenerácie nie je potrebná. BMP signalizácia je dôležitá pre proximálno-distálne interakcie pri regenerácii končatín 3 dni od amputácie (Beck et al., 2006).

Dospelý jedinec *Xenopus laevis* stráca kvalitu regenerácie končatín, ale ak sa ošetrí guľičkami napustenými BMP4, tak sa regenerácia obnoví a vytvorí sa chrupavkový hrot, charakteristický pre epimorfózu v tomto štádiu (Sato et al., 2005). Beck et al. (2006) použili stabilný transgény kmeň *Xenopus laevis*, kde expresia solubilného BMP inhibítora (noggin) je kontrolovaná promotorom „heat shock protein 70“ (hsp70), ktorý je indukovaný teplotným šokom. Výsledky ukázali, že po teplotnom šoku nastáva uzatváranie miesta amputácie, migráciou epidermálnych buniek, ktoré nie je ovplyvnené expresiou inhibítora. Na druhú stranu je inhibovaná tvorba blastému a rast hrboľu končatiny.

Počas novších štúdií nastala kombinácia BMP a FGF, ktorá taktiež vyvoláva indukciu regenerácie. Toto štúdium potvrdilo, že tieto dva faktory sú uvoľňované zo zadných miechových koreňov ako neurotropné faktory (Makanae et al., 2014).

### **2.3.4 nAG**

Newt anterior gradient (nAG) patrí do skupiny Anterior Gradient proteínov. nAG sa viaže ako ligand na receptor Prod 1 a pôsobí ako rastový faktor pre bunky blastému (Kumar et al., 2007). Toto tvrdenie bolo potvrdené pokusom, kde bol protilátkou proti receptoru Prod1 inhibovaný bunkový cyklus (vstup do S fáze), ktorý je za normálnych podmienok regenerácie iniciovaný na základe pôsobenia nAG (Grassme et al., 2016). Prod1 sa nachádza na povrchu buniek a do membrány je ukotvený GPI kotvou. Tento proteín určuje proximálno-distálnu identitu buniek pri regenerácii končatín (Da Silva et al., 2002). Po amputácii končatiny dochádza k silnej expresii nAG vo Schwannových bunkách a následne v epiderme prekrývajúcej miesto poranenia. Na druhú stranu, ak je miesto amputácie denervované, expresia nAG neprebíha. Avšak Kumar et al. (2007) vniesli do takejto končatiny prostredníctvom elektroporácie nAG plazmid a dokázali tým indukovať proliferáciu blastémových buniek. Podľa týchto zistení je nAG dôležitým neurotropným faktorom.

### **2.3.5 Expresia Sp9**

Interakcie pri formovaní blastému a hojenie zranenia bez jazvy zahrňujú zmeny v regulácii expresii génov. Sp9 je transkripčný faktor, podliehajúci regulácii FGF10, ktorého expresia je lokalizovaná v mezenchýme. Sp9 následne spúšťa expresiu FGF8 v AEC vyvíjajúceho sa zárodka končatiny v regenerácii (Kawakami, 2004). Počas prvých dní regenerácie končatín dochádza znovu k vysokej expresii Sp9 v keratínocytoch, ktoré sa nachádzajú v epitely kryjúcom ranu. Pri formovaní blastému je expresia nepretržitá a lokalizovaná v AEC bazálnych keratínocytoch. Avšak pri jednoduchom hojení bez jazvy, kde neprebíha regenerácia končatiny, je nestála. Následné sa ukázalo, že FGF10 nie je jediným neurotropným faktorom schopným spustiť expresiu Sp9. Ďalšími faktormi sú keratínocytový rastový faktor (KGF) a FGF2. Translácia KGF prebieha už v zadných miechových koreňoch a následne je dopravený priamo do blastému prostredníctvom nervov. Sp9 je charakteristický embryonálny gén pri vývoji končatín a jeho vysoká hladina re-expresie v epimorfóze, ktorú zabezpečuje nervová signalizácia, ukazuje, že je nevyhnutnou súčasťou pri dediferenciácii a udržaní keratínocytov epitelu kryjúceho ranu v nediferencovanom stave (Sato et al., 2008).

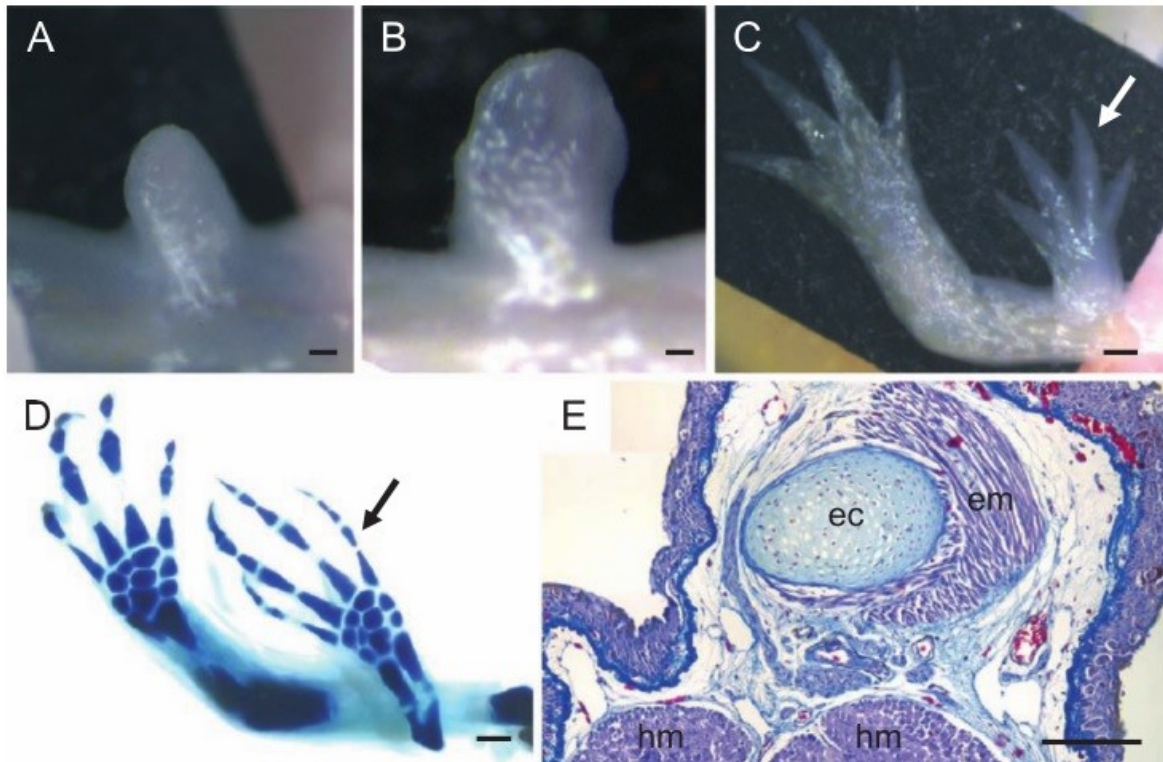


## 2.4 Ektopická končatina

Proces regenerácie môžeme rozdeliť na skorú a neskorú fázu. Skorá fáza sa vyznačuje svojimi unikátnymi mechanizmami, ktoré sú charakteristické len pre regeneráciu. Na druhú stranu, neskorá fáza zdieľa spoločné znaky spolu s embryonálnym vývojom končatiny (Bryant et al., 2002) .

V ranných fázach výskumu bolo publikované, že k vývoji ektopickej končatiny dochádza následkom rozsiahlej traumy a privedením nervu do oblasti poranenia (C. W. Bodemer, 1958, 1959). Ale následné štúdiá poukázali na skutočnosť, že na indukciu rastu ektopickej končatiny sú dostačujúce transplantačné štepy pokožky z opačnej strany končatiny (napríklad z posteriórnej strany na anteriórnu) a zavedenie prerušeného nervu do oblasti poranenia. Pozičná informácia medzi bunkami sa naruší, začnú proliferovať a ustáli sa nová pozičná informácia (French et al., 1976). Na druhú stranu, ak nervové zakončenie nie je privedené do oblasti transplantovanej pokožky, tak nedochádza k indukcii rastu ektopickej končatiny a koža zregeneruje (Reynolds et al., 1983).

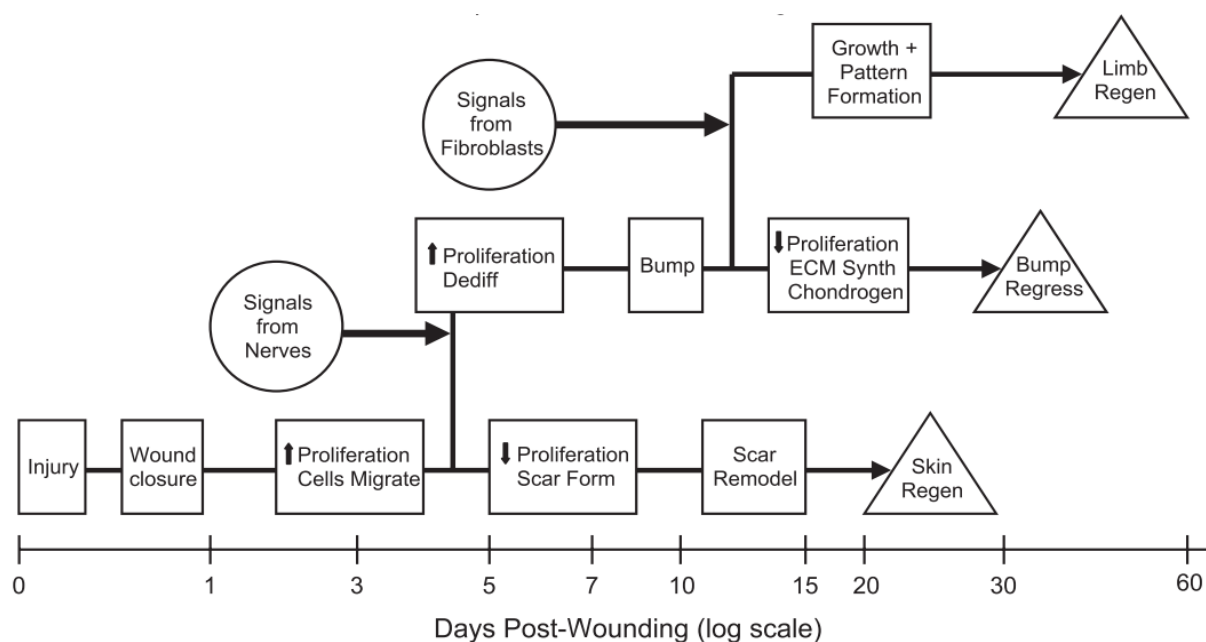
Ektopická končatina sa však nevyvíja správne pozdĺž proximálno - distálnej osi (obr. 2), nie je napojená na kostrový systém hostiteľskej končatiny (obr. 2D). Humerus sa nevyvíja. Avšak ani svalové vlákna ektopickej končatiny nie sú napojené na hostiteľskú končatinu (obr. 2E) (Maden & Holder, 1984).



**Obr. 2 Rast ektoptickej končatiny**

17 deň vývoja ektoptickej končatiny (A), 28 deň vývoja ektoptickej končatiny (B), následne pri 54 dni je už možné pozorovať vyvinutú ektopickú končatinu (C). Na obrázku D (5 mesiacov po indukcii) môžeme vidieť preparát kostí hosťovskej a ektoptickej končatiny (označená šípkou), kde nie je pozorovateľné napojenie medzi týmito dvoma končatinami v rámci kostrovej sústavy (ofarbené Victoria Blue). Histologický preparát priečného rezu ektoptickej končatiny s označenými tkanivami: hm- sval hosťovskej končatiny, em- sval ektoptickej končatiny, ec- ektopická chrupavka (E). Mierka je 200  $\mu\text{m}$  (A,B a E) a 500  $\mu\text{m}$  (C a D) (prevzaté z Endo et al., 2004)

Rast ektoptickej končatiny vyžaduje dva iniciačné signály. Prvý signál zabezpečuje vytvorenie blastému ektoptickej končatiny (hrboľu) a je indukovaný privedeným prerušeným nervom. Druhý signál zabezpečujú fibroblasty kožného štepu s narušenou pozičnou informáciou. Tento signál poskytne stimul na pokračovanie rastu a premeny ektopického blastému na ektopickú končatinu (Endo et al., 2004). Na základe týchto poznatkov bol rozpracovaný model stupňovitej regenerácie končatiny alebo „Accessory limb model“ (ALM). Model umožňuje nezávislú analýzu každého kroku komplexného vývoja regenerácie končatiny (obr. 3) (Endo et al., 2004).



**Obr. 3 Model stupňovitej regenerácie končatiny**

Vytvorený model umožňuje postupnú a nezávislú analýzu jednotlivých krokov počas regenerácie končatín. Na logaritmickej škále sú znázornené dni v priebehu regenerácie končatín, začínajúcej od 0, kedy je prevedené poranenie/amputácia. Na vertikálnej škále sú vyobrazené tri možné vývojové línie (regenerácia pokožky, vytvorenie hrboľu, vytvorenie kompletne funkčnej končatiny), ktoré sa vyvíjajú počas regenerácie na základe pozitívnych alebo negatívnych signálov od nervov a fibroblastov (prevzaté z Endo et al., 2004).

ALM demonštruje, že kožné štepy a privedenie odkloneného nervu sú dostačujúce pre tvorbu končatín. Vzhľadom na to, že nedochádza k poškodeniu mäkkých tkanív pod pokožkou, procesy prebiehajúce pri tvorbe ektopickej končatiny môžu byť študované separátne. Následne môžu byť odobrané vzorky dermálnych buniek, epitelu kryjúceho ranu a nervov. Pomocou ALM je možné identifikovať jednotlivé kroky od hojenie poranenia, formovanie blastému, regenerácie až do ustanovenia štruktúry novej končatiny (Endo et al., 2004).

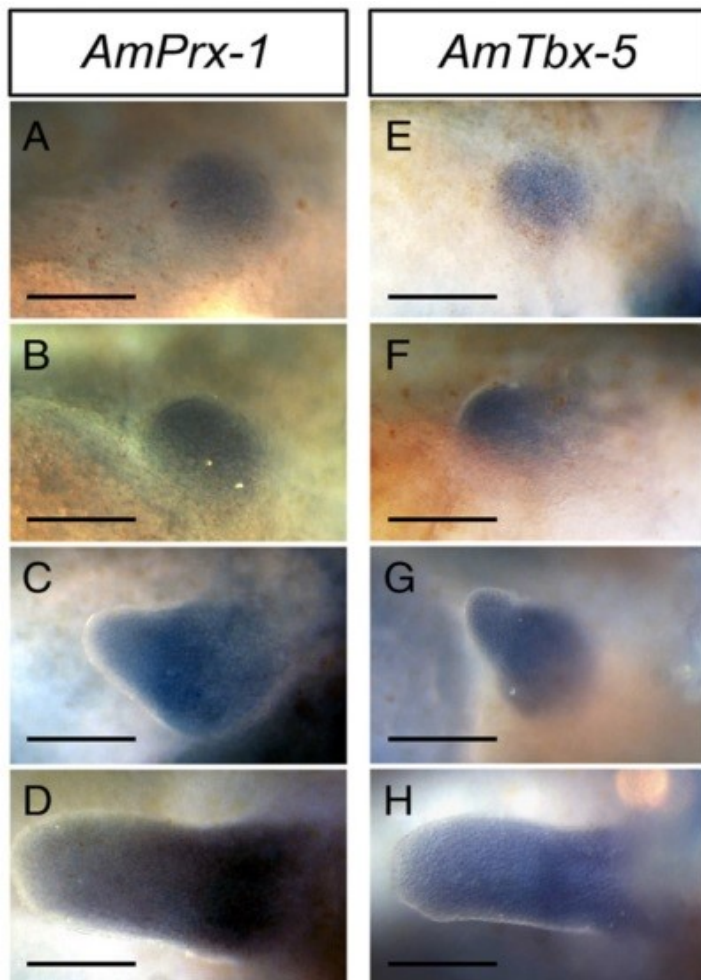
Ako bolo spomenuté vyššie, regenerácia končatiny a rast ektopickej končatiny sú závislé na inervácii, ak sú nervy odstránené v rannom štádiu, nastane regresia regenerácie. Naproti tomu neskoré štádium u oboch procesoch je postupom času menej závislé na inervácii. Ďalším spoločným znakom pre oba typy blastému je migrácia dermálnych fibroblastov z okrajov zranenia. (Endo et al., 2004).

Podobnosť medzi blastémom ektopickej končatiny a blastémom amputovanej končatiny vykazuje skutočnosť, že oboje majú schopnosť vytvoriť komplexné štruktúry, ak majú dostatok pozičných interakcií medzi bunkami, ale zlyhávajú, ak interakcie chýbajú (French et al., 1976).

Na základe týchto výsledkov sa predpokladala podobnosť molekulárnych mechanizmov vývoja ektopického blastému a regenerácie indukovanej amputáciou. Pomocou analýzy génovej expresie bolo identifikovaných 5 génov. Tieto gény sú Mmp-9, Msx-2, Hoxa-13, *A. mexicanum* Prx-1 (AmPrx-1), *A. mexicanum* Tbx-5 (AmTbx-5), ktoré zaisťujú dediferenciáciu, formovanie blastému a tvorbu končatiny v oboch procesoch (Satoh et al., 2007).

#### 2.4.1 AmPrx-1 a AmTbx-5

Expresia týchto génov (obr. 4) je charakteristická pre skorý rast hrboľu ektopickej končatiny, ale pretrváva aj počas vývoja končatiny. Ani jeden z dvojice génov nie je exprimovaný v epidermálnych bunkách. Výsledky ukazujú na skutočnosť, že AmPrx-1 a AmTbx-5 sú gény vyskytujúce sa v mezenchymálnych bunkách vyvíjajúcej sa ektopickej končatiny. Regenerácia indukovaná amputáciou sa vyznačuje rovnakou lokalizáciou aj časovou postupnosťou expresie týchto génov. Amputácia vyvolá zvýšenie expresie AmPrx-1 a AmTbx-5 v mezenchymálnych bunkách a nie je indukovaná *de novo* (Satoh et al., 2007).



**Obr.4 Génová expresia AmPrx-1 a AmTbx-5 vo vyvíjajúcej sa ektopickej končatine axolotla.**

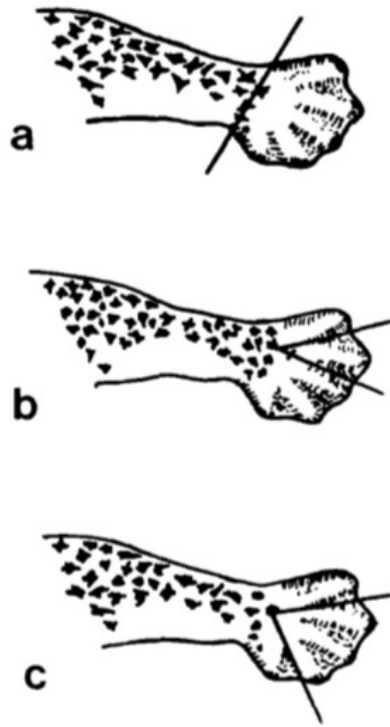
Tieto dva gény boli na začiatku exprimované na bočnej časti hlavnej končatiny (A a E). Ich expresia prebieha v skorom štádiu vývoja končatiny (B a F) s maximálnou hladinou až v neskorších štádiách v proximálnej oblasti (C, D, G a H). Na obrázkoch C, D, G, H je možné pozorovať, že expresia AmPrx-1 a AmTbx-5 neprebíha v epiderme. Hrbole končatiny sú orientované, tak že distálny koniec smeruje na ľavú stranu. Mierka je 200  $\mu\text{m}$  (prevzaté zo Satoh et al., 2007).

## 2.5 Modelové organizmy pre výskum regenerácie končatín

### 2.5.1 Žabotvaré

Jeden z modelových organizmov vo výskume regenerácie končatín je obojživelník Pazúrnatka vodná (*Xenopus laevis*). Tento živočích vykazuje kompletnú schopnosť regenerácie končatín vo fáze žubrienky, až pokiaľ nedosiahne štádium metamorfózy. Mladé živočích v štádiu 51-52 vývoja, dokážu po amputácii dokonale regenerovať zadné končatiny. V tomto období zadné končatiny podstúpili len malé množstvo diferenciácie. Ďalšie štádia vykazujú klesajúcu schopnosť tvorby dokonalého tvaru končatiny. *Xenopus laevis* má pri normálnom vývoji prednej a zadnej končatiny 4 a 5 prstov, ale ak zlyhá formovanie tvaru končatiny a regenerácia nie je kompletná, vytvoria sa končatiny s nižším počtom prstov od 4 až po 1. Pri štádiu 60 je pozorovateľná pokročilá metamorfóza, končatiny sú diferencované, kosti a svaly usporiadané a regeneráciou končatiny sa vytvorí heteromorfný nerozvetvený chrupavkový hrot (Dent, 1962).

Schopnosť regenerácie u *Xenopus laevis* bola skúmaná pomocou odberania rôzneho množstva tkaniva v autopódii, kde sa použili tri rôzne metódy chirurgického odstránenia: jednoduchá amputácia autopódia, klinové odstránenie 1 prstu a klinové odstránenie 3 prstov (obr. 5). Výsledky ukázali koreláciu medzi množstvom odstráneného tkaniva a silou odpovede regenerácie. Jednoduchá amputácia autopódia a klinové odstránenie 3 prstov vykazovali signifikantne silnejšiu odpoveď regenerácie ako klinové odstránenie 1 prstu (Muneoka et al., 1986).

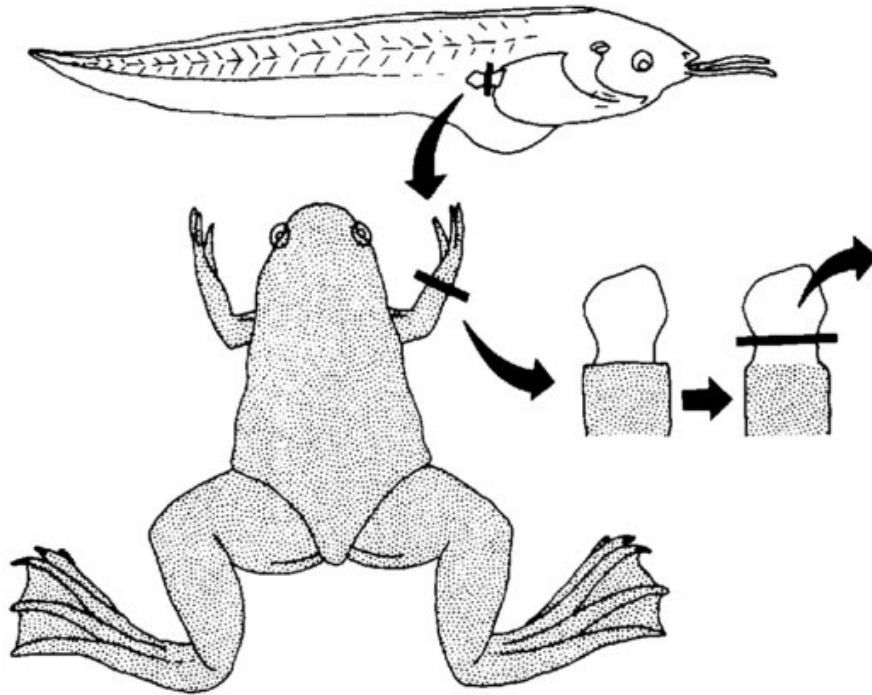


**Obr. 5 Tri rôzne chirurgické odstránenia tkaniva autopodiálneho tkaniva.**

Jednoduchá amputácia autopódia (A), klinové odstránenie jedného prstu (B), klinové odstránenie troch prstov (C) (prevzaté z Muneoka et al., 1986).

Ďalšie experimenty sa zaoberali transplantáciou tkaniva medzi vyvíjajúcou sa zadnou končatinou žubrienky *Xenopus laevis* v štádiu 52-53 na predné končatiny žiab po metamorfóze (obr. 6). Tieto experimenty objasnili, že schopnosť regenerácie u týchto živočíchov je podmienená vývojovým štádiom buniek prítomných v blastéme a nie je ovplyvnená faktormi prostredia živočícha. Pri transplantácií vyvíjajúcej sa zadnej končatiny žubrienky na prednú končatinu žaby po metamorfóze sa transplantát inervoval a vaskularizoval. Následne bola prevedená amputácia. Vo výsledku regenerácia prebehla buď s normálnym počtom prstov alebo menej, ako je typické pre zadnú končatinu žubrienky. Keď boli transplantácie prevedené opačne tak, že bol transplantovaný blastém z prednej končatiny žaby po metamorfóze na zadnú končatinu žubrienky, regeneráciou nevznikla správne tvarovaná končatina, ale chrupavkový hrot typický pre regeneráciu u žiab po metamorfóze. Výsledky týchto experimentov poukazujú na to, že pokles v schopnosti regenerácie kompletnej končatiny závisí na vnútorných vlastnostiach buniek končatiny a nie na vonkajších podmienkach ako sú neurotropné faktory, alebo rastové hormóny. Tieto poznatky naznačujú, že medzi bunkami žubrienky a žaby po metamorfóze u *Xenopus laevis* sú značné

a dôležité rozdiely a vlastnosti mladých buniek žubrienky sa strácajú počas ontogenézy (Sessions and Bryant, 1988).



**Obr. 6** Transplantačné experimenty u *Xenopus laevis*

Transplantácia tkaniva medzi vyvíjajúcou sa zadnou končatinou žubrienky *Xenopus laevis* v štádiu 52-53 na amputované predné končatiny žiab po metamorfóze. Po prijatí časti končatiny donora bola prevedená amputácia v distálnej časti od miesta prepojenia medzi transplantátom a príjemcom (prevzaté a upravené z Sessions & Bryant, 1988).

V minulosti sa viedli debaty o tom, či regenerácia *Xenopus laevis* prebieha u žiab po metamorfóze mechanizmom jednoduchej regenerácie tkaniva bez tvorby blastému alebo procesom epimorfózy. Následne boli prevedené experimenty, ktorých výsledky viedli k domnienke, že v regenerácii končatín sa netvorí dediferencované mezenchymálne bunky, a teda sa netvorí ani blastém a prebieha len jednoduchá regenerácia. Tieto poznatky však vychádzali len z histologických štúdií. Predpokladalo sa, že po amputácii nastáva proliferácia plno diferencovaných buniek chondrocytov, fibroblastov, kostí a spojivového tkaniva. Dôkazy, že regenerácia končatín u *Xenopus laevis* prebieha procesom epimorfózy poskytli experimenty, kde boli amputované predné končatiny u žiab po metamorfóze proximálne od zápästia. Následne bola odstránená pokožka a končatiny vložené do brušnej dutiny. Vo

výsledku sa ukázalo, že blastém sa nevyvinul a epimorfóza zlyhala, ale vytvorila sa chrupavková čiapočka. Poukazuje to na skutočnosť, že regenerácia a tvorba chrupavkového hrotu u žiab *Xenopus laevis* po metamorfóze vyžaduje epitel kryjúci ranu a blastém. Oboje sa vyskytuje len pri epimorfóze (Goss and Holt, 1992).

### 2.5.2 Mlokotvaré

Tieto živočíchy vykazujú schopnosť regenerácie končatín po celý život, ako v období larvy, tak aj u dospelého jedinca. Na rozdiel od žiab, ktoré majú túto schopnosť len počas larválneho štádia. Zdá sa, že schopnosť regenerácie končatín koreluje s vývojom imunitného systému (zhrnuté v Godwin and Rosenthal, 2014). Imunitný systém žiab sa dá porovnať s vyvinutým imunitným systémom u cicavcov, kde prebieha celistvá nešpecifická odpoveď a špecifická odpoveď sa vyvíja podľa množstva predošlých patogénov, s ktorými sa organizmus stretol. Nešpecifický imunitný systém u mlokotvarých (salamandra, axolotl) je dobre vyvinutý a jeho odpoveď je dostatočne silná. Na druhú stranu, špecifická odpoveď je nedostatočná (Chen and Robert, 2011) a pomalá (60 dní). Adaptívna schopnosť je nízka, aj keď sa vyznačujú veľkým množstvom T-buniek a B-buniek, ale len s jediným imunoglobulínom IgM (Tournefier et al., 1998).

Dokonalosť adaptívnej odpovedi imunitného systému žiab je možné demonštrovať ich vysokou rezistenciou proti vírusovým infekciám, ktoré dokážu často prekonať. Naproti tomu rovnaký kmeň a infekčná dávka, je pre mloka letálna. Mlokotvaré živočíchy nedokážu pri vírusovej infekcii indukovať proliferáciu T-buniek v slezine. Na druhú stranu žaby sú schopné indukovať proliferáciu T-buniek v slezine a s ich pomocou zabiť vírus (Cotter et al., 2008).

Ako bolo spomenuté vyššie, žaby pred metamorfózou (žubrienky) majú schopnosť regenerácie končatín. Avšak po metamorfóze regeneračnú schopnosť strácajú. Táto fáza sa vyznačuje vývojom a premenou primitívneho imunitného systému. Použitím imunosupresívnej látky ako napríklad Celastrol, ktorý prechádza cez bunkovú stenu a inhibuje I $\kappa$ B kinázu (enzýmový komplex, podieľajúci sa na bunkovej odpovedi na zápal) (Pinna et al., 2004), sa obnoví schopnosť regenerácie u žiab (Fukazawa et al., 2009). Ako sa obnoví regenerácia u žiab po metamorfóze, tak vzniknú regulačné T-bunky potlačujúce funkciu ostatných imunitných buniek. Na základe tejto regulácie sa predpokladá funkčná spojitosť medzi regulačnými T-bunkami a schopnosťou obnovenia regenerácie u žiab po metamorfóze (Fukazawa et al., 2009). Transplantačné experimenty, ktoré porovnávali odmietnutie transplantátu medzi salamandrou a žabou, poukázali tak isto na slabý imunitný systém



u salamandier. U žiab prebehlo odmietnutie „allograftu“ už v 20 dni od transplantácie a u salamandry až po 60 dňoch. Bolo zistené, že odmietnutie nezahŕňa rozšírenie T-buniek (Kinefuchi et al., 2013).

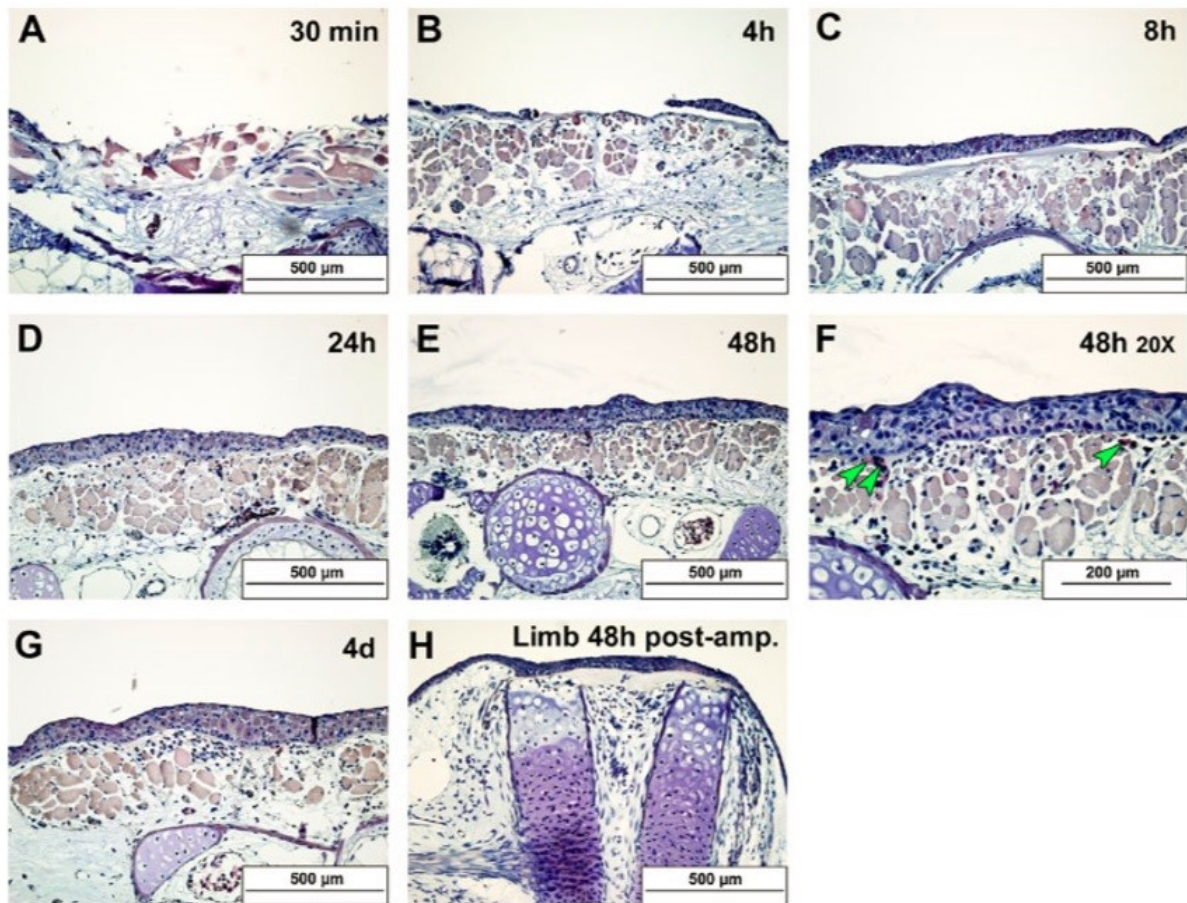
Ak sú v amputovanej končatine odstránené makrofágy z distálnej oblasti, tak regenerácia zlyhá a vytvorí sa chrupavkovitý pahýľ. Na druhú stranu, uzatváranie zranenia nie je ovplyvnené, ale nastane ukládanie kolagénu. Zastaví sa aj expresia Sp9 a Msx-2, génov zodpovedných za dediferenciáciu buniek. Rovnako je potlačená aj expresia Mmp-9. Avšak ak sa prevedie re-amputácia a vložia sa naspäť endogénne makrofágy, tak sa regenerácia končatiny obnoví (Godwin et al., 2013). Štúdie odhalili, že pre správnu kvalitu regenerácie je potrebný balans medzi zápalovými a proti-zápalovými signalizáciami, pretože ani jedna neprebíha pri regenerácii samostatne (King et al., 2012). Pri odstránení makrofágov dochádza k zmenám v ECM. Expresia kolagénu 1 prebieha za normálnych okolností v epidermálnych bunkách aj v mezenchýme. Kolagén 2 sa začína exprimovať pri prvom objavení chondrocytov. Pričom ich najvyššia hladina expresie nastáva 2 týždne po amputácii (Asahina et al., 1999). Zvýšená hladina regulácie nastala dva dni po amputácii u kolagénu 13 a od prvého do štvrtého dňa bola zvýšená u kolagénu 5 (Rao et al., 2009). Pri odstránení makrofágov z končatiny nastane aktivácia myofibroblastov a prerušenie expresie kolagénu (Godwin et al., 2013). Myofibroblasty sa takmer nevyskytujú v končatinách mlokotvarých živočíchov pokiaľ nemajú narušenú regeneráciu (Seifert et al., 2012). Avšak pri ich prítomnosti prebieha tvorba jazvy (Hinz, 2007). Poukazuje to na dôležitú úlohu makrofágov mladého imunitného systému v regenerácii končatín a možné ďalšie použitie v regenerácii u cicavcov (Godwin et al., 2013).

### 3. Regenerácia a tvorba jazvy

Dospelé cicavce majú obmedzenú schopnosť regenerácie končatín a oprava poškodeného tkaniva vedie k formovaniu jazvy. Embryonálne štádium na druhú stranu, ako odpoveď na poranenie končatiny a pokožky, dokáže dokonale zregenerovať tieto poranené časti a tvorba jazvy je redukovaná na minimum (Whitby and Ferguson, 1991a). Jazva nahrádza v mieste poranenia normálne tkanivo a je tvorená nadmerným množstvom ECM z kolagénu 1, kolagénu 3 a fibronektínu. Jazva obmedzuje silu, pohyblivosť, rast a všeobecne normálnu funkciu tkaniva (zhrnuté vo Ferguson and O’Kane, 2004). Jeden z rozdielov, ktorý je zodpovedný za regeneráciu pokožky u embrya a tvorby jazvy u dospelého jedinca je vo vývojovom štádiu imunitného systému. Líšia sa v zápalovej odpovedi na poranenie. Embryonálny imunitný systém je stále vo vývine a odpoveď na poranenie je iná ako u dospelého jedinca. V oblasti poranenia je prítomnosť a počet buniek imunitného systému (makrofágov, neutrofilov, monocytov a lymfocytov) embrya veľmi obmedzená (Cowin et al., 1998). Ďalší rozdiel je v tom, že embryonálna pokožka podstupuje rýchlu expanziu na rozdiel od dospelého jedinca a obsahuje vysoké hladiny morfogénov. Tieto faktory sú zodpovedné za morfogénu, rast a pri poranení za remodeláciu poškodeného tkaniva. Experimenty potvrdili odlišné hladiny expzie typov TGF $\beta$  v oboch štádiách. Dospelé jedince v mieste poranenia syntetizujú TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 2, ktoré pochádzajú od buniek vyvinutého imunitného systému, ako sú makrofágy a monocyty. Na druhú stranu, embryo v mieste poranenia spúšťa expresiu TGF $\beta$ 3, ktorý je exprimovaný fibroblastami a keratínocytmi. TGF $\beta$ 3 je zodpovedný za morfogénu pokožky. TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 2 sú zodpovedné za nadmerné ukladanie kolagénu 1, kolagénu 3 a tvorbu jazvy (Whitby and Ferguson, 1991b). Aplikácia protilátok proti TGF $\beta$ 1 a TGF $\beta$ 2 v dospelých jedincoch hlodavcov výrazne znížila silu zápalovej odpovede a následne aj objemné ukladanie kolagénu a fibronektínu. Protilátky zabezpečili regeneráciu bez jazvy a ustálili stavbu poranenej pokožky. Ale, ak bola protilátka proti TGF $\beta$ 1 podaná samostatne, tak znížila zápalovú odpoveď, aj ukladanie kolagénu a fibronektínu, ale nezabránila vytvoreniu jazvy. Ošetrenie, len protilátkou proti TGF $\beta$ 2 neovplyvnilo priebeh odpovedi imunitného systému, ani formovanie jazvy. Hojenie poranenia prebehlo normálnou cestou ako u dospelého jedinca. Na druhú stranu, injikovanie proteínu TGF $\beta$ 3 prispelo k zlepšeniu architektúry neodermis, zvýšeniu vaskularizácie, zníženému ukladaniu kolagénu 1, kolagénu 3 a fibronektínu. V neposlednom rade došlo k zníženej akumulácii makrofágov a monocytov dospelého imunitného systému v mieste poranenia, a teda slabšej zápalovej

odpovedi, čo malo za následok redukciu tvorby jazvy. Aplikovanie TGF $\beta$ 3 do poranenej oblasti dospelých hlodavcov vo výsledku zabezpečilo regeneráciu pokožky (Shah et al., 1995).

Axolotl pri regenerácii končatín nevykazuje nikdy tvorbu jazvy. Po poranení vykazuje rýchle uzavretie poranenia epidermálnymi bunkami. Histologické pozorovania vylúčili prítomnosť fibrózy pri hojení. Rovnako nebola detegovaná ani prítomnosť neutrofilov v oblasti poranenia (obr.7) (Levesque et al., 2010). Na druhú stranu u cicavcov je prvá imunitná odpoveď na poranenie akumulácia neutrofilov v tej oblasti, ktorá sa podieľa na zápale (Martin, 1997). Použitím bleomycínu na kožné zranenie axolotla, bola indukovaná tvorba jazvy zložená z fibronektínu, ale neobsahovala takmer žiadny typ kolagénu. Rovnako bola spomalená aj tvorba bazálnej membrány. Tento experiment ukázal, že axolotl môže indukovať fibrózu pri pôsobení bleomycínu, aj keď pri normálnej regenerácii nikdy netvorí jazvu. Toto jasne demonštruje, že axolotl má všetky molekulárne mechanizmy na formovanie jazvy, ale pri amputácii končatiny a poranení kože nedochádza k ich aktivácii (Levesque et al., 2010).



**Obr.7 Prítomnosť neutrofilov v priebehu hojenia kožného poranenia u axolotla.**

Počas prvého dňa po kožnom poranení sa v tejto oblasti nevyskytujú žiadne neutrofilý (A,B,C a D). Po 48 hodinách sa objavil malý počet neutrofilov (E, F- ružové bunky označené zelenými šípkami). Po uplynutí 4 dní neboli detegované znovu žiadne neutrofilý v oblasti poranenia (G). Rovnako nenastáva akumulácia neutrofilov ani pri regenerácii končatiny axolotla v mieste amputácie, 48 hodín po amputácii (H) (prevzaté a upravené z Levesque et al., 2010).

## 4. Regeneratívna medicína

Regeneratívna medicína je veľmi mladý obor s veľkým potenciálom do budúcností. Za svoj cieľ si pokladá identifikáciu kmeňových a progenitorových buniek, ktoré by po vložení do poškodeného orgánu či časti tela dokázali spustiť regeneráciu. Ďalšou možnosťou, ako naštartovať schopnosť regenerácie cicavcov a špecificky u ľudí je nájdenie molekuly, ktorá bude mať za cieľ stimulovať progenitorové bunky organizmu a následne spustenie regenerácie, takmer bez väčšieho vonkajšieho zásahu. Všeobecný pohľad na regeneráciu je taký, že u nižších živočíchov prebieha regenerácia lepšie a kvalitnejšie ako u vyšších. Avšak v skutočnosti je pravda úplne iná a aj u nižších živočíchov sa vyskytujú neregenerujúci príbuzný (Cristi L. Stoick-Cooper et al., 2007a).

Takmer všetky diferencované bunky stavovcov obsahujú retinoblastómový proteín (pRB), významný tumor supresor. Tento proteín pôsobí v regulácii transkripcie a zabraňuje bunkám vstup do bunkového cyklu. Inhibuje expresiu génov potrebných pre bunkové delenie. Na druhú stranu, môže dochádzať aj k deaktivácii pRb prostredníctvom fosforylácie v bunkách, ktoré sa musia deliť. Ak sú inhibované kinázy, fosforylujúce pRB, tak diferencované svalové bunky nereagujú ani na vonkajšie stimuly podporujúce delenie (sérum v kultúre). Ale, svalové bunky mloka ako odpoveď na sérum v kultúre spustia bunkový cyklus, takže u nich dochádza k inhibícii pRB. Regulácia fosorylácie pRb môže byť vysvetlením regeneratívnej kapacity u diferencovaných buniek mloka (Tanaka et al., 1997).

Diferencované myšie svalové bunky, pôsobením rastových faktorov a Msx-1 stratili diferencovanú formu a rozpadli sa na jednojadrové bunky. Tieto dediferencované bunky môžu byť znovu stimulované k spätnej diferenciácii na bunkové typy ako sú chondrocyty, adipocyty, myocyty a osteocyty (Odelberg et al., 2000). Tieto výsledky poukazujú na možnosť použiť faktory, ktoré ovládajú molekulárne mechanizmy regenerácie u nižších stavovcov, pre skvalitnenie regenerácie u ľudí.

Ďalšou možnosťou sa zaoberali Yokoyama *et al.*(2001), kedy aplikovali FGF 10 do amputovanej končatiny neregenerujúceho štádia *Xenopus laevis*. Následne sa spustila expresia génov potrebných pre regeneráciu a vytvorila sa normálne tvarovaná končatina. Rovnako ako aj u žiab po metamorfóze chýba schopnosť regenerácie u vyšších stavovcov (Muller et al., 1999), čo znovu naznačuje možnosť použitia tejto metódy u cicavcov.

Signalizácia Wnt/ $\beta$ -catenin je prítomná pri regenerácii končatín u salamandry, *Xenopusa*, ale aj pri regenerácii plutiev u *Danio rerio* (Kawakami et al., 2006; C. L. Stoick-Cooper et al., 2007b). Pri ošetrení amputovanej končatiny, neustále aktivovaným  $\beta$ -cateninom u *Xenopusa* v štádiu, kedy už regenerácia takmer neprebíha, došlo k opätovnej indukcii regenerácie a tvorbe funkčnej končatiny. Rovnakým spôsobom aplikácie na neregenerujúcich jedincoch sa už nepodarilo aktivovať regeneráciu. Nadmerná expresia stále aktívneho  $\beta$ -cateninu dokázala spustiť regeneráciu plutiev u mutantného kmeňa *Danio rerio*, ktorý má defekt v regenerácii plutiev (Kawakami et al., 2006). Experimenty na heterozygotnom *Danio rerio*, s mutáciou (deléciou) v *axin1*, zodpovednou za inhibíciu Wnt/ $\beta$ -catenin dráhy ukázali, že nastane oveľa rýchlejšia regenerácia plutiev, ako u normálnych jedincoch. Zvýšená expresia Wnt8 zase akcelerovala proliferáciu progenitorových buniek v plutvách schopných regenerácie (C. L. Stoick-Cooper et al., 2007b).

Dráha Wnt/ $\beta$ -catenin, ako aj vyššie spomenuté spôsoby manipulácie s regeneráciou končatín, by mohli byť využité v regeneratívnej medicíne. Na druhú stranu, s touto možnosťou prichádza aj nebezpečenstvo a vedľajšie efekty, ako je nekontrolovateľné delenie buniek a vznik nádorov. Živočíchy nesúce si schopnosť regenerácie po celú dobu evolúcie sú na molekulárne a bunkové mechanizmy prispôsobené a dokážu ich regulovať. Cieľom regeneratívnej medicíny s ohľadom na túto skutočnosť nie je len nájsť molekuly, ktoré dokážu indukovať regeneráciu končatín, ale dokážu aj kontrolovať bunkové delenie a tým zabrániť nežiadúcim vedľajším účinkom u cicavcov. C.L. Stoick-Cooper et al. (2007b) pri štúdiu dráhy Wnt/  $\beta$ -catenin nenašli len Wnt8, ale aj inhibítor tejto signalizácie Wnt5. Wnt5 je regulovaný Wnt/ $\beta$ -catenin signalizáciou, čiže ak by došlo k nadmernej expresii a bunkovému deleniu, tak Wnt5 ustáli hladinu Wnt/  $\beta$ -catenin signalizácie a nedôjde k nadmernej proliferácii buniek.

Myostatin je negatívny regulátor rastu svalov. Fenotyp myši, ktorá má „knockout“ v géne pre myostatin sa vyznačuje zväčšenými svalmi (Kambadur et al., 1997). Myš s takouto mutáciou bola použitá v experimente, kde došlo k jej poraneniu a schopnosť regenerácie svalových buniek bola dokonalejšia ako u kontrol (McCroskery, 2005). Myostatin by mohol byť v regeneratívnej medicíne použitý v kombinácii s Wnt5 a ďalšími regulátormi bunkovej proliferácie a v budúcnosti môže byť docielený nevídaný úspech v regenerácii končatín u cicavcov.

## 5. Záver

Proces regenerácie končatín je v dnešnej dobe veľmi diskutovanou problematikou. V práci som pojednával o problematike schopnosti regenerácie končatiny prostredníctvom epimorfózy, ktorou disponujú mlokotvaré obojživelníky a pretrváva u nich po celý život. Ďalším druhom s obdobnou schopnosťou sú žabotvaré obojživelníky, ktoré sú schopne regenerovať amputované končatiny tiež, ale len v larválnom štádiu. Tieto organizmy slúžia aj ako modelové organizmy pre výskum regenerácie končatín.

Prvým mechanizmom po amputácii je uzatvorenie zranenej oblasti, rýchlou migráciou epidermálnych buniek. Následne dôjde k aktivácii enzýmov ako Mmp-9 a ďalších, ktoré zabezpečujú degradáciu ECM. Dôjde k aktivácii dráh, ktoré zabezpečujú dediferenciáciu buniek a ich kumulovanie pod epitelom kryjúcim ranu. Tým sa začne hromadiť masa heterogénnych dediferencovaných buniek, tvoriacich blastém. Bunky blastému sa vyznačujú svojou unipotenciou, čo znamená, že pri ich diferenciacii z nich môže vzniknúť len jedna bunková línia. Kontrolovanou signalizáciou Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch dochádza k indukcii proliferácie buniek blastému.

Pri regenerácii končatín je dôležitá aj nervová signalizácia. Podstatná je predovšetkým prítomnosť dostatočného počtu nervových zakončení v blastéme. Inervovaním je zabezpečená aj neurotrofná signalizácia, pomocou neurotrofných faktorov ako sú FGF, BMP, KGF a nAG. Výsledkom ich signalizácie je dediferenciácia, proliferácia a mitotická aktivita buniek blastému. Signalizácia FGF 10 preukázala spustenie expsie Sp9 v AEC. Sp9 hrá dôležitú úlohu pri dediferenciacii keratínocytov blastému.

V práci sú tiež objasnené molekulárne a bunkové mechanizmy pri regenerácii končatín, kde skúmanie uľahčila ektopická končatina, na základe ktorej bol vypracovaný model stupňovitej regenerácie. Tento model umožňuje nezávislú analýzu jednotlivých krokov pri regenerácii končatín. Následne bolo preukázané, že regenerácia končatín indukovaná amputáciou, zdieľa rovnaké molekulárne mechanizmy ako vývoj ektopickej končatiny. Preukázala to aj zhodná expresia AmPrx-1 a AmTbx-5 v mieste aj čase počas regenerácie.

Je pravdepodobné, že mechanizmy vedúce k úspešnej regenerácii končatín u nižších stavovcov otvárajú nové možnosti v oblasti regeneratívnej medicíny. Táto oblasť smeruje k liečbe kmeňovými bunkami, kedy sú bunky pestované *in vitro* a následne je spustená ich diferenciacia na potrebné bunkové typy vhodné na vloženie do pacienta. Druhou

a vzdialenejšou možnosťou je vývoj nových technológií, ktoré umožnia rast celých orgánov *in vitro* a následnú transplantáciu do pacienta. Tieto technológie budú musieť zájsť až do oblastí nanotechnológií, kde sú vyvíjané tzv. „scaffolds“, čo sú trojdimenzionálne štruktúry zložené z polymérnych vlákien veľkosti nanometrov. Dôvodom sú bunky, ktoré v kultúre nie sú schopné rásť do trojdimenzionálneho priestoru, ale len v 2D priestore. „Scaffolds“ sú dostatočnou oporou pre bunky a vďaka tomu dokážu tvoriť aj 3D štruktúry. Nanotechnológie môžu byť teda rovnako sľubnou cestou pre regeneratívnu medicínu. V neposlednom rade, ďalšou možnosťou je spustenie molekulárnych mechanizmov regenerácie končatín, ktoré boli pravdepodobne u vyšších stavovcov stratené v priebehu evolúcie, pre uprednostnenie imunitného systému. Tieto možnosti sa zdajú byť sľubné a možno v blízkej budúcnosti budeme svedkami prvých úspešných pokusov o indukciu regenerácie končatín u ľudí. Všetky tieto možnosti, musia byť najskôr ale otestované na modelových organizmoch a až následne aplikované do klinickej praxe.



## 6. Zoznam použitej literatúry

- Asahina, K., Obara, M., Yoshizato, K., 1999. Expression of genes of type I and type II collagen in the formation and development of the blastema. *Dev. Biol.* 71, 59–71.
- Beck, C.W., Christen, B., Barker, D., Slack, J.M.W., 2006. Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles. *Mech. Dev.* 123, 674–688.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.-C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R., 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225–230.
- Bodemer, C.W., 1958. The development of nerve-induced supernumerary limbs in the adult newt, *Triturus viridescens*. *J. Morphol.* 102, 555–581.
- Bodemer, C.W., 1959. Observations on the mechanism of induction of supernumerary limbs in adult *Triturus viridescens*. *J. Exp. Zool.* 140, 79–99.
- Boilly, B., Cavanaugh, K.P., Thomas, D., Hondermarck, H., Bryant, S. V., Bradshaw, R.A., 1991. Acidic fibroblast growth factor is present in regenerating limb blastemas of axolotls and binds specifically to blastema tissues. *Dev. Biol.* 145, 302–310.
- Brockes, J.P., Kumar, A., 2008. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 525–549.
- Bryant, S. V., Endo, T., Gardiner, D.M., 2002. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 887–896.
- Carlson, B.M., 2007. Principles of regenerative biology. Elsevier/Academic.
- Conboy, I.H., Conboy, M.J., Smythe, G.M., Rando, T.A., 2003. Notch-Mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302, 1575–1577.
- Conboy, I.M., Rando, T.A., 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev. Cell* 3, 397–409.
- Cotter, J.D., Storfer, A., Page, R.B., Beachy, C.K., Voss, S.R., 2008. Transcriptional response of Mexican axolotls to *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) infection. *BMC Genomics* 9, 493.
- Cowin, A.J., Brosnan, M.P., Holmes, T.M., Ferguson, M.W.J., 1998. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dyn.* 212, 385–393.
- Da Silva, S.M., Gates, P.B., Brockes, J.P., 2002. The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev. Cell* 3, 547–555.

- Dent, J.N., 1962. Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J. Morphol.* 110, 61–77.
- Endo, T., Bryant, S. V., Gardiner, D.M., 2004. A stepwise model system for limb regeneration. *Dev. Biol.* 270, 135–145.
- Ferguson, M.W.J., O’Kane, S., 2004. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359, 839–850.
- Filoni, S., Paglialunga, L., 1990. Effect of denervation on hindlimb regeneration in *Xenopus laevis* larvae. *Differentiation* 43, 10–19.
- French, V., Bryant, P.J., Bryant, S. V, Fields, E., French, V., Bryant, P.J., Bryant, S. V, 1976. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* 193, 969–981.
- Fukazawa, T., Naora, Y., Kunieda, T., Kubo, T., 2009. Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period. *Development* 136, 2323–2327.
- Godwin, J.W., Pinto, A.R., Rosenthal, N.A., 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9415–9420.
- Godwin, J.W., Rosenthal, N., 2014. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. *Differentiation* 87, 66–75.
- Goss, R.J., Holt, R., 1992. Epimorphic vs. tissue regeneration in *Xenopus* forelimbs. *J. Exp. Zool.* 261, 451–457.
- Grassme, K.S., Garza-Garcia, A., Delgado, J.P., Godwin, J.W., Kumar, A., Gates, P.B., Driscoll, P.C., Brookes, J.P., 2016. Mechanism of action of secreted newt anterior gradient protein. *PLoS One* 11, 1–13.
- Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J., Ross, R., 1990. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am. J. Pathol.* 136, 1235–1246.
- Han, M., An, J.-Y., Kim, W.-S., 2001. Expression patterns of FGF-8 during developmental and limb regeneration of the axolotl. *Dev. Dyn.* 220, 40–48.
- Hay, E.D., Fischman, D.A., 1961. Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt *Triturus viridescens*. *Dev. Biol.* 3, 26–59.
- Hinz, B., 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 127, 526–537.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233–241.
- Chen, G., Robert, J., 2011. Antiviral immunity in amphibians. *Viruses* 3, 2065–2086.

- Iten, L.E., Bryant, S. V., 1973. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, rate, and stages. *Wilhelm Roux. Arch. Entwickl. Mech. Org.* 173, 263–282.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7, 910–6.
- Kawakami, Y., 2004. Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* 131, 4763–4774.
- Kawakami, Y., Rodriguez, C., Raya, M., Kawakami, H., Dubova, I., Carlos, J., Belmonte, I., 2006. Wnt /  $\beta$ -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 3232–3237.
- Kinefuchi, K., Kushida, Y., Touma, M., Hosono, M., 2013. Limited immune diversity in urodela: chronic transplantation responses occur even with family-disparate xenografts. *Zool. Sci.* 30, 577–584.
- King, M.W., Neff, A.W., Mescher, A.L., 2012. The developing xenopus limb as a model for studies on the balance between inflammation and regeneration. *Anat. Rec.* 295, 1552–1561.
- Koshiha, K., Kuroiwa, A., Yamamoto, H., Tamura, K., Ide, H., 1998. Expression of Msx genes in regenerating and developing limbs of axolotl. *J. Exp. Zool.* 282, 703–714.
- Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-garcia, A.A., Brockes, J.P., 2007. Molecular Basis for the Nerve Dependence of Limb Regeneration in an Adult Vertebrate. *Science* 318, 772–777.
- Lee, H., Habas, R., Abate-Shen, C., 2004. Msx1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science* 304, 1675–1678.
- Levesque, M., Villiard, É., Roy, S., 2010. Skin wound healing in axolotls: A scarless process. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 314 B, 684–697.
- Maden, M., 1978. Neurotrophic control of the cell cycle during amphibian limb regeneration. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 48, 169–175.
- Maden, M., Holder, N., 1984. Axial characteristics of nerve induced supernumerary limbs in the axolotl. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 394–401.
- Makanae, A., Mitogawa, K., Satoh, A., 2014. Co-operative Bmp- and Fgf-signaling inputs convert skin wound healing to limb formation in urodela amphibians. *Dev. Biol.* 396, 57–66.
- Martin, P., 1997. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276, 75–81.

- McCroskery, S., 2005. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J. Cell Sci.* 118, 3531–3541.
- McCusker, C.D., Gardiner, D.M., 2013. Positional Information Is Reprogrammed in Blastema Cells of the Regenerating Limb of the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One* 8, 1–14.
- Mescher, A.L., Gospodarowicz, D., 1979. Mitogenic effect of a growth factor derived from myelin on denervated regenerates of newt forelimbs. *J. Exp. Zool.* 207, 497–504.
- Mullen, L.M., Bryant, S. V., Torok, M. a, Blumberg, B., Gardiner, D.M., 1996. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* 122, 3487–3497.
- Muller, T.L., Ngo-Muller, V., Reginelli, A., Taylor, G., Anderson, R., Muneoka, K., 1999. Regeneration in higher vertebrates: Limb buds and digit tips. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 405–413.
- Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Bryant, S. V., 1986. Intrinsic control of regenerative loss in *Xenopus laevis* limbs. *J. Exp. Zool.* 240, 47–54.
- Munch, J., Gonzalez-Rajal, A., de la Pompa, J.L., 2013. Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult zebrafish fin regeneration. *Development* 140, 1402–1411.
- Odelberg, S.J., Kollhoff, A., Keating, M.T., 2000. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* 103, 1099–1109.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., Noji, S., 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124, 2235–44.
- Pinna, G.F., Fiorucci, M., Reimund, J.M., Taquet, N., Arondel, Y., Muller, C.D., 2004. Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 778–786.
- Rao, N., Jhamb, D., Milner, D.J., Li, B., Song, F., Wang, M., Voss, S.R., Palakal, M., King, M.W., Saranjami, B., Nye, H.L.D., Cameron, J.A., Stocum, D.L., 2009. Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC Biol.* 7, 1–25.
- Reפש, L.A., Oberpriller, J.C., 1980. Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Am. J. Anat.* 159, 187–208.
- Reynolds, S., Holder, N., Fernandes, M., 1983. The form and structure of supernumerary hindlimbs formed following skin grafting and nerve deviation in the newt *Triturus cristatus*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 77, 221–41.

- Satoh, A., Gardiner, D.M., Bryant, S. V., Endo, T., 2007. Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Dev. Biol.* 312, 231–244.
- Satoh, A., Graham, G.M.C., Bryant, S. V., Gardiner, D.M., 2008. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Biol.* 319, 321–335.
- Satoh, A., Suzuki, M., Amano, T., Tamura, K., Ide, H., 2005. Joint development in *Xenopus laevis* and induction of segmentations in regenerating froglet limb (spike). *Dev. Dyn.* 233, 1444–1453.
- Seifert, A., Monaghan, J., Voss, R., Maden, M., 2012. Skin regeneration in adult axolotls: A blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One* 7, e32875.
- Sessions, S.K., Bryant, S. V., 1988. Evidence that regenerative ability is an intrinsic property of limb cells in *Xenopus*. *J. Exp. Zool.* 247, 39–44.
- Shah, M., Foreman, D.M., Ferguson, M.W., 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J. Cell Sci.* 108, 985–1002.
- Singer, M., 1974. Neurotrophic Control of Limb Regeneration in the Newt. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 228, 308–321.
- Singer, M., 1952. The Influence of the Nerve in the Regeneration of the Amphibian Extremity. *Q. Rev. Biol.* 27, 169–200.
- Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., Weidinger, G., 2007a. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* 21, 1292–1315.
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., Moon, R.T., 2007b. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479–489.
- Sunderland, M.E., 2010. Regeneration: Thomas Hunt Morgan's window into development. *J. Hist. Biol.* 43, 325–361.
- Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H., Tamura, K., 2005. Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration. *Dev. Biol.* 286, 361–375.
- Suzuki, M., Yakushiji, N., Nakada, Y., Satoh, A., Ide, H., Tamura, K., 2006. Limb Regeneration in *Xenopus laevis* Froglet. *Sci. World J.* 6, 26–37.
- Tanaka, E.M., Gann, A.A.F., Gates, P.B., Brockes, J.P., 1997. Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* 136, 155–165.

- Thornton, C.S., 1960. Influence of an eccentric epidermal cap on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *Dev. Biol.* 2, 551–569.
- Tournefier, A., Laurens, V., Chapusot, C., Ducoroy, P., Padros, M.R., Salvadori, F., Sammut, B., 1998. Structure of MHC class I and class II cDNAs and possible immunodeficiency linked to class II expression in the Mexican axolotl. *Immunol. Rev.* 166, 259–277.
- Tsonis, P.A., Fox, T.P., 2009. Regeneration according to spallanzani. *Dev. Dyn.* 238, 2357–2363.
- Whitby, D.J., Ferguson, M.W.J., 1991a. The extracellular matrix of lip wounds in fetal , neonatal and adult mice. *Development* 112, 651–668.
- Whitby, D.J., Ferguson, M.W.J., 1991b. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev. Biol.* 147, 207–215.
- Yang, E. V., Gardiner, D.M., Carlson, M.R.J., Nugas, C.A., Bryant, S. V., 1999. Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Dev. Dyn.* 216, 2–9.
- Yokoyama, H., Ide, H., Tamura, K., 2001. FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 233, 72–79.
- Yokoyama, H., Yonei-Tamura, S., Endo, T., Izpisua Belmonte, J.C., Tamura, K., Ide, H., 2000. Mesenchyme with fgf-10 expression is responsible for regenerative capacity in *Xenopus* limb buds. *Dev. Biol.* 219, 18–29.
- Zenjari, C., Boilly-Marer, Y., Desbiens, X., Oudghir, M., Hondermarck, H., Boilly, B., 1996. Experimental evidence for FGF-1 control of blastema cell proliferation during limb regeneration of the amphibian *Pleurodeles waltl*. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 965–971.