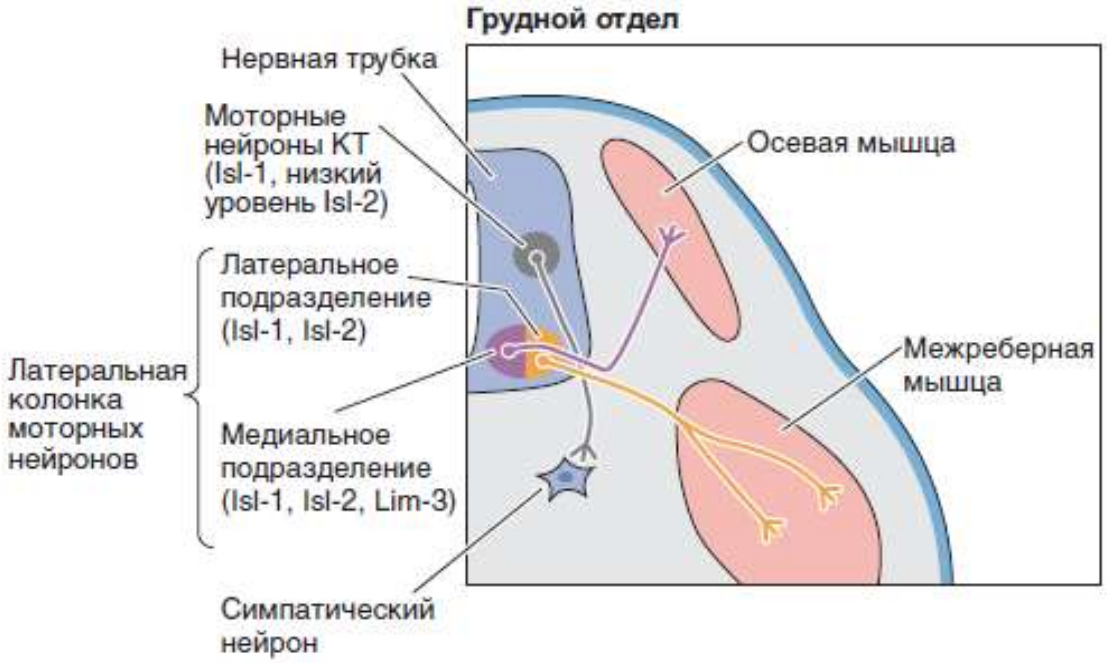
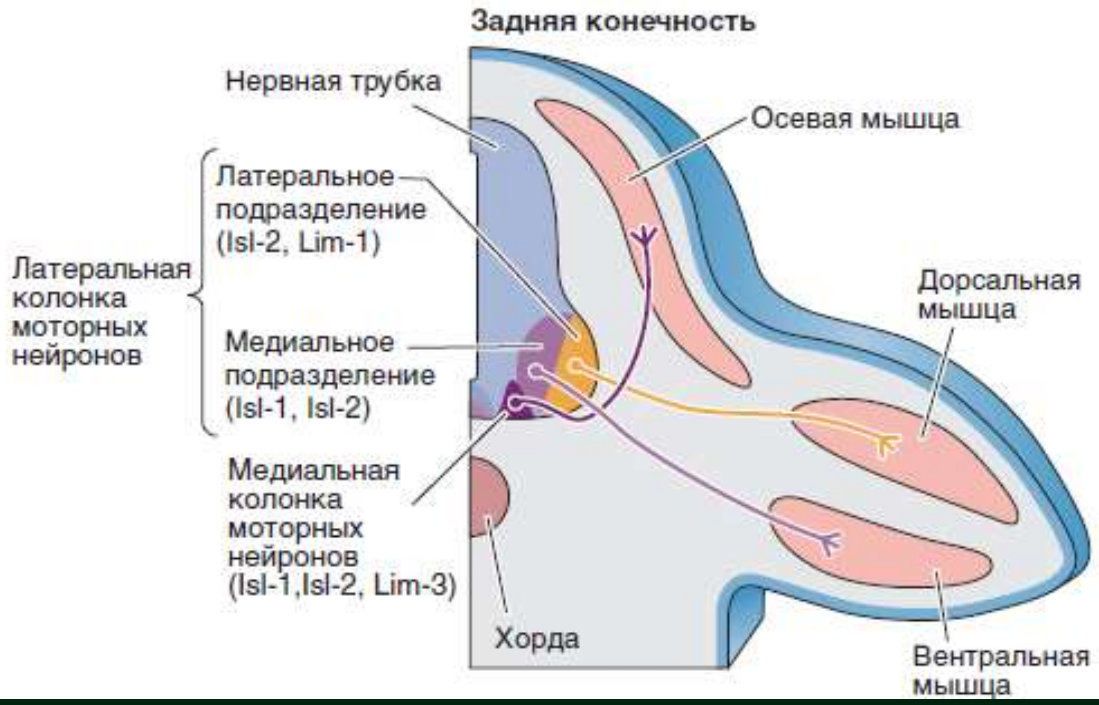
Биология развития

14-15. Развитие производных зародышевых листков.
Развитие конечностей тетрапод.
Регенерация.

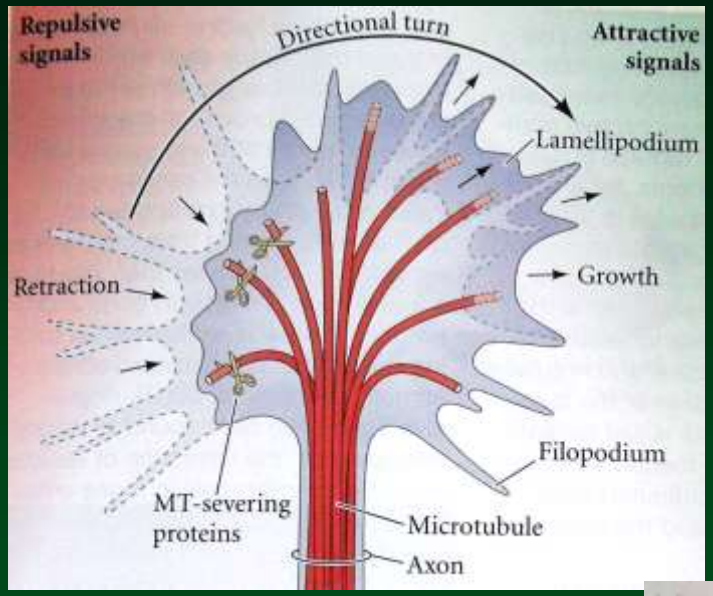




Формирование паттерна в нервной системе
мишень имеет значение,
но LIM белки индуцируют
специфичность связи нейрона
во время миграции аксонов

ламинин - рельсы

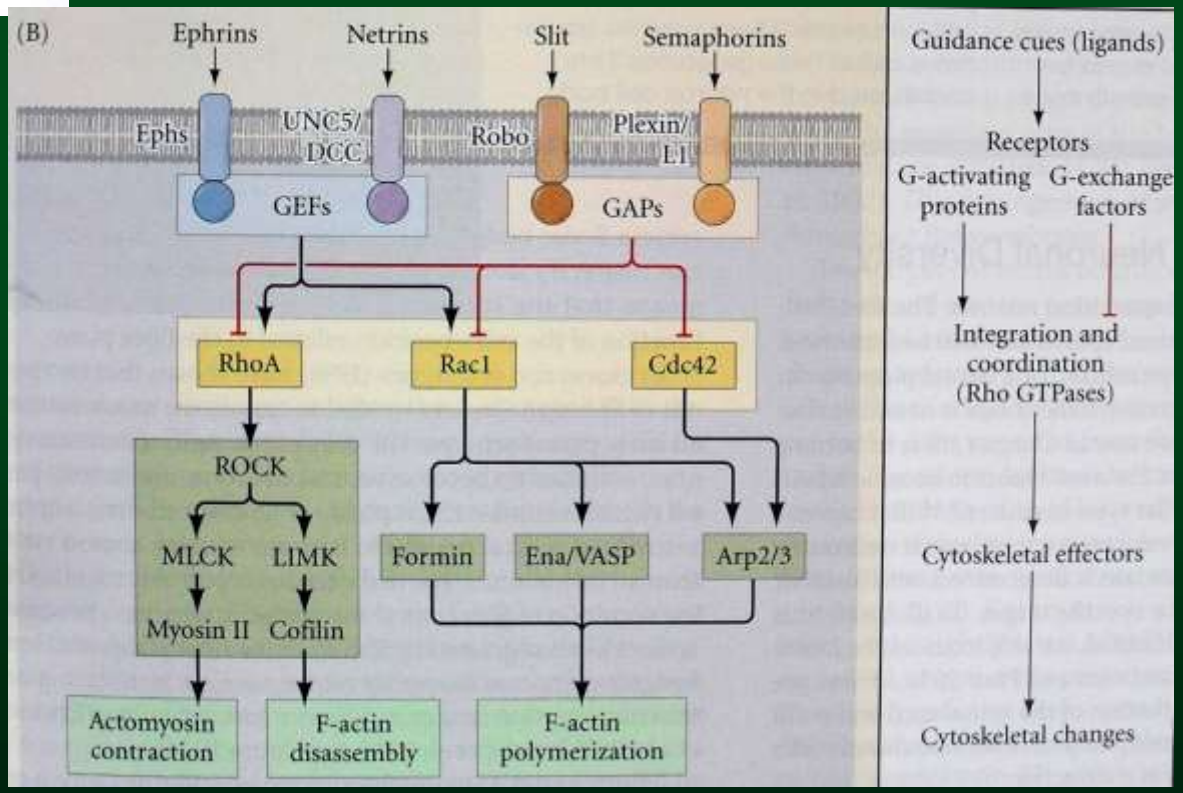
По Гилберт, 2010



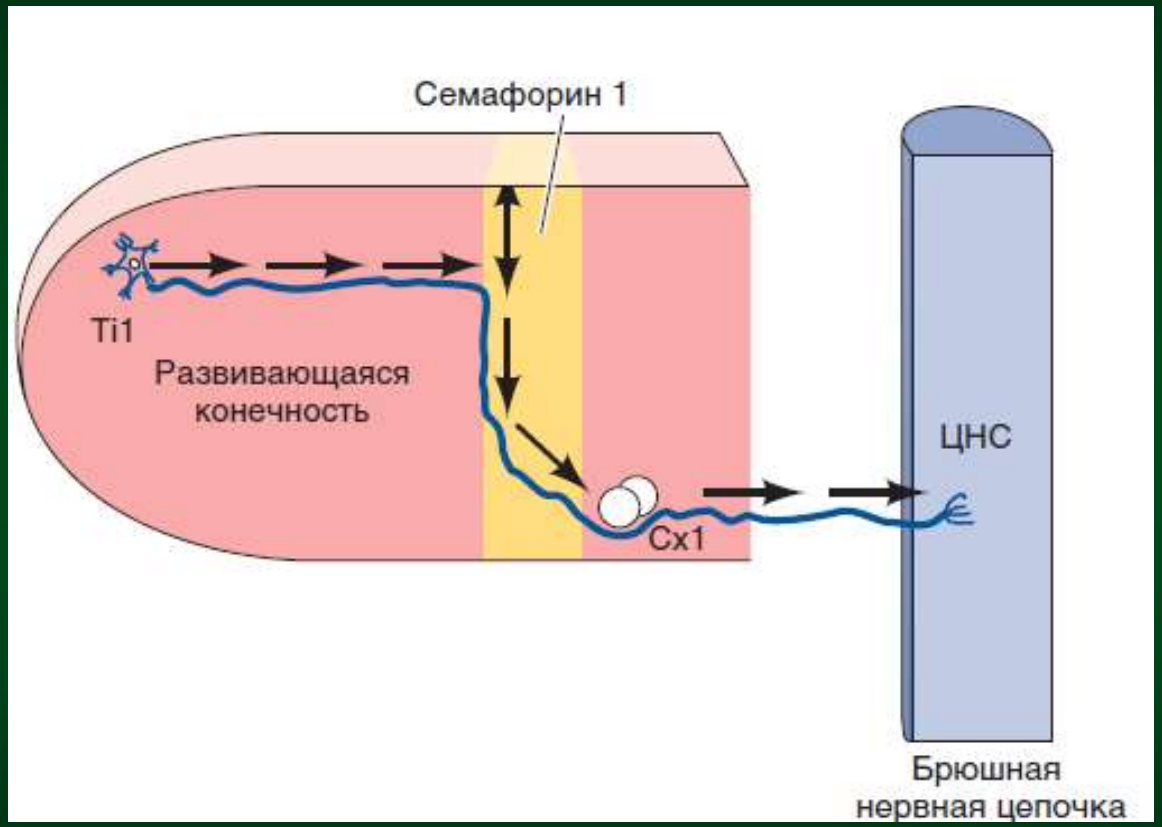
отталкивание и притягивание конусов роста аксонов

эфрины – могут отталкивать (часто) или притягивать, в зависимости от истории нейрона

семафорины –трансмембранные факторы эпителиальных клеток – отталкивают (важны для поворотов)

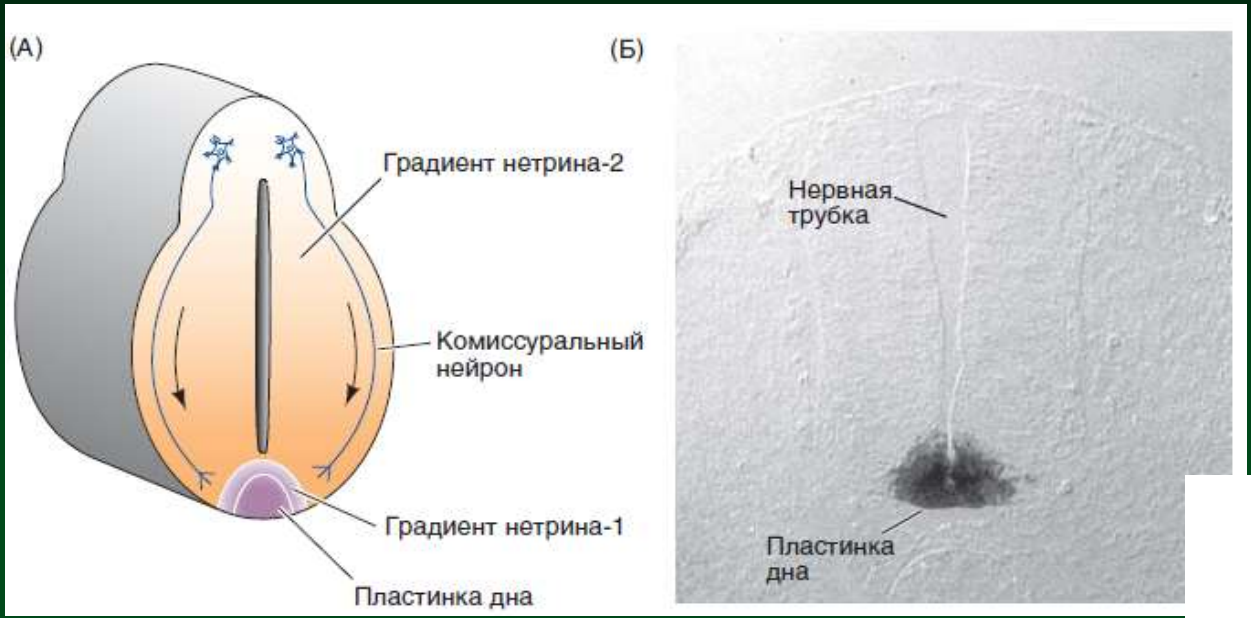


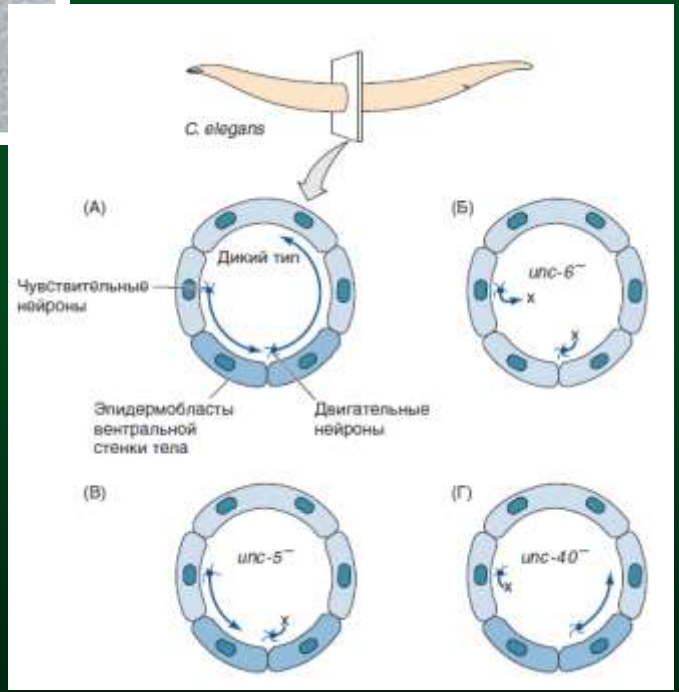
конечность насекомого



По Гилберт, 2010

нетрины (паракринные факторы, связанные с внеклеточным матриксом) – в основном аттрактанты

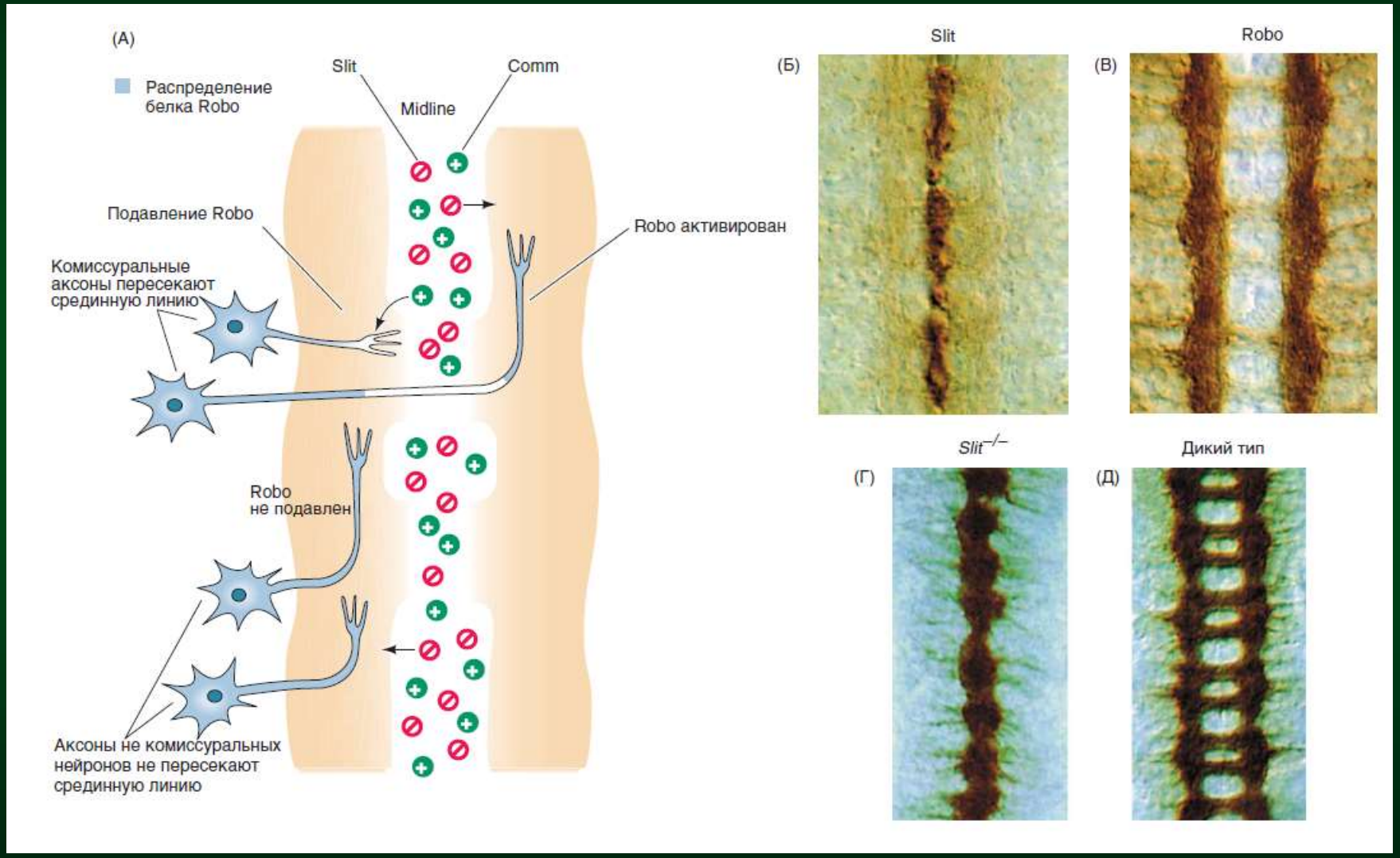




По Гилберт, 2010

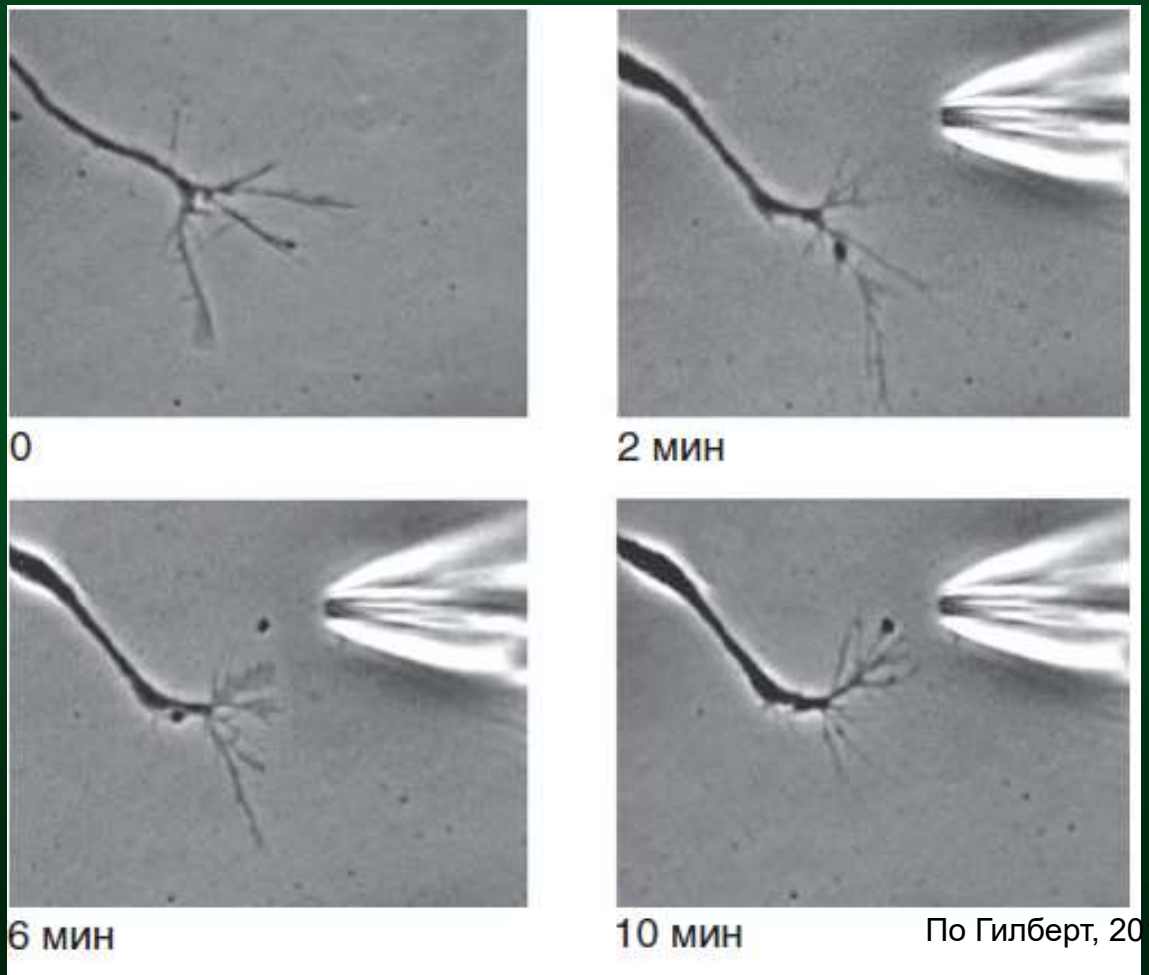
Конусы роста нейронов: рецептор **Roundabout** (**Robo**) (“Roundabout” — окольный путь) лиганд Slit ингибирующий все аксоны, белок Comm, стимулирует комиссуральные аксоны

дрозофила
позвоночные

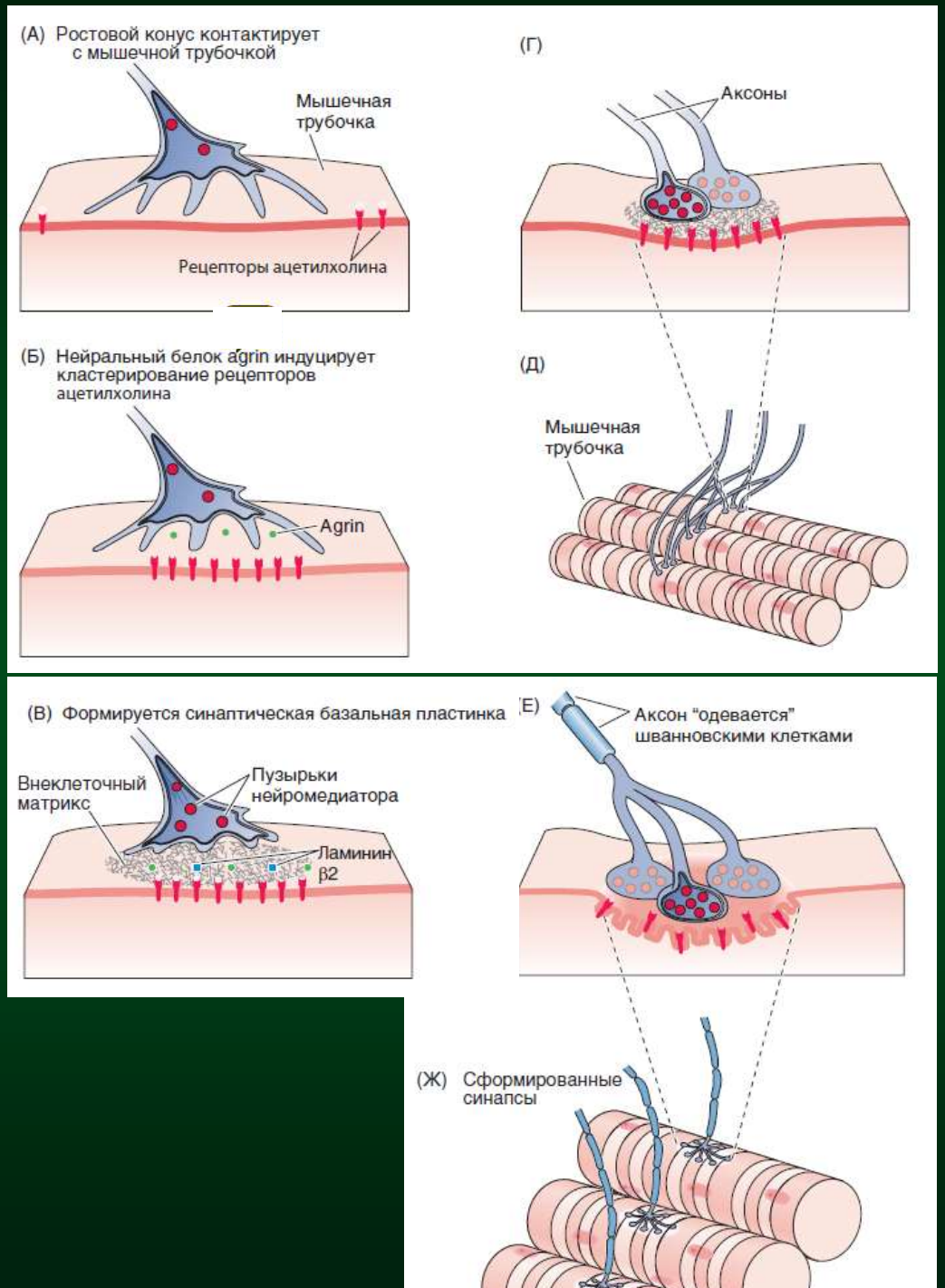


По Гилберт, 2010

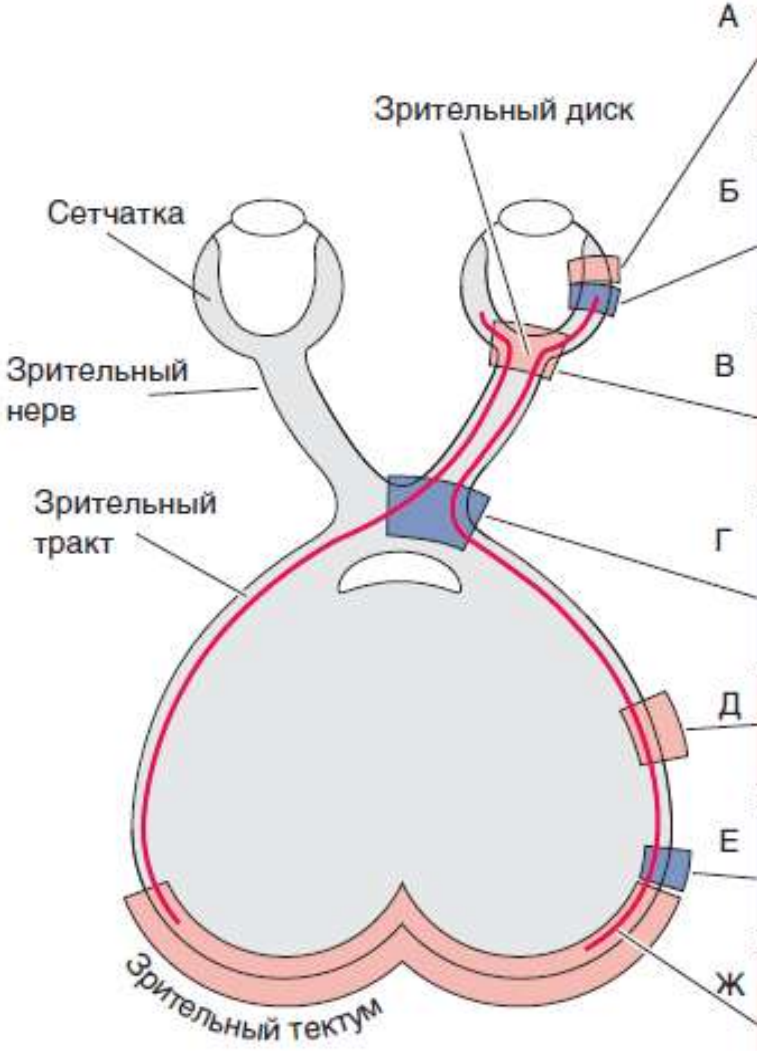
нейротрофины:
фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор голов-
ного мозга (BDNF) и нейротрофины NT-3 и NT-4/5
выделяемые тканью потенциальных мишеней, служат белками
ближнего действия, являясь либо хемотактическими факторами,
либо хеморепеллентными



По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010



А **Установление слоев сетчатки**
(ганглиозные клетки на внутренней поверхности)
Антитела к N-кадгерину нарушают упорядоченность

Б **Направленный рост аксонов**
Антитела к N-CAM препятствуют росту, необходим нетрин-1
Интенсивный рост аксонов на ламинине in vitro

В Упорядоченное образование зрительного нерва
Нарушение его образования антителами к N-CAM
Возможная роль нетринов и кадгеринов
Аксоны формируют пучки в зависимости от положения

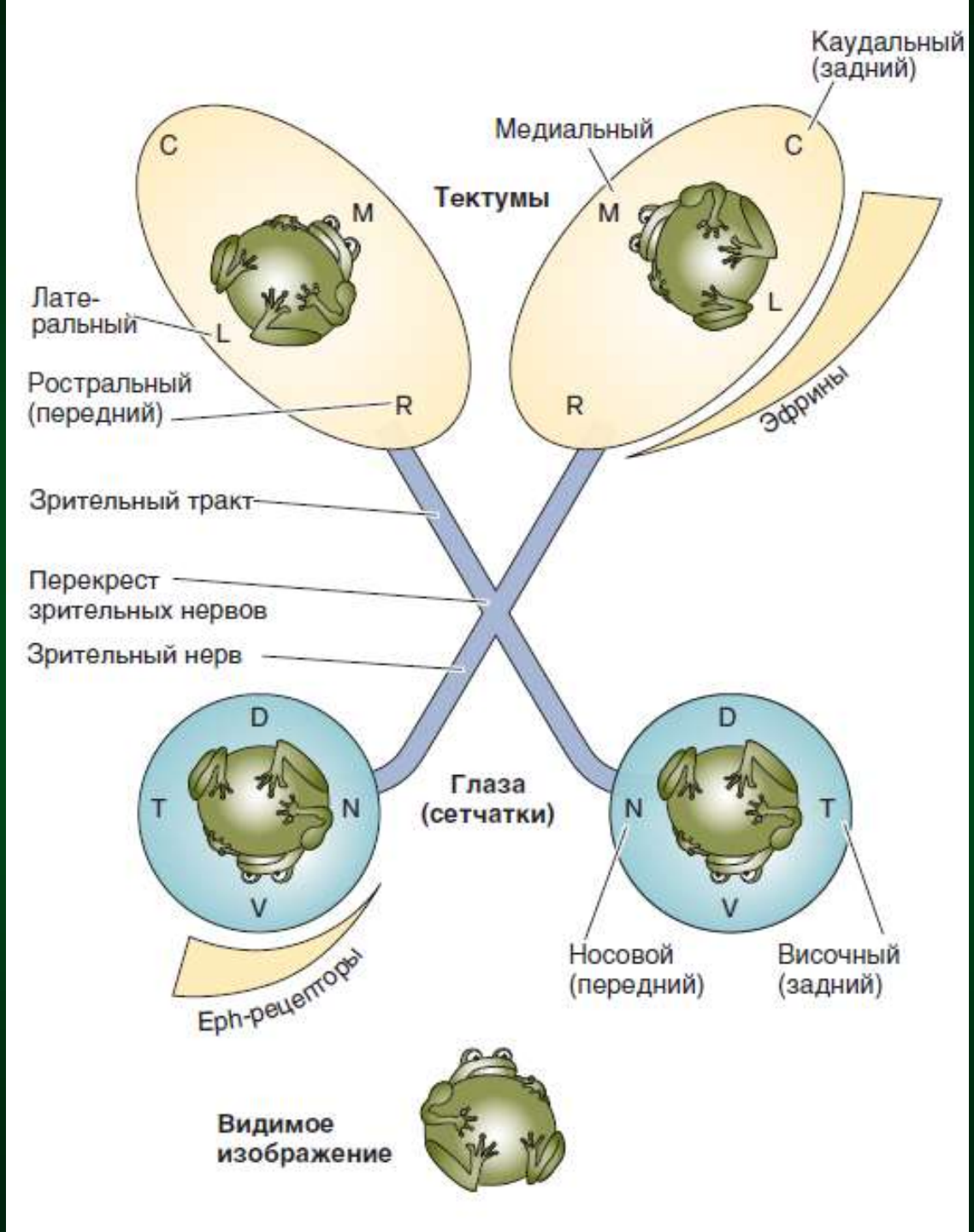
Г **Принятие решения: пересечь или повернуть**
Возможные ингибирующие сигналы эфрина
Специфичность формирования пучков аксонов под действием L1, CD44

Д **Наведение на объект иннервации**
Возможна роль ламинина
Общие позиционные сигналы

Е **Достижение объекта инервации**
Утрата ламинина in vivo
Утрата ответа на ламинин in vitro

Ж **Установление топографической карты**
Позиционно-специфические ингибиторы, градиенты эфринов

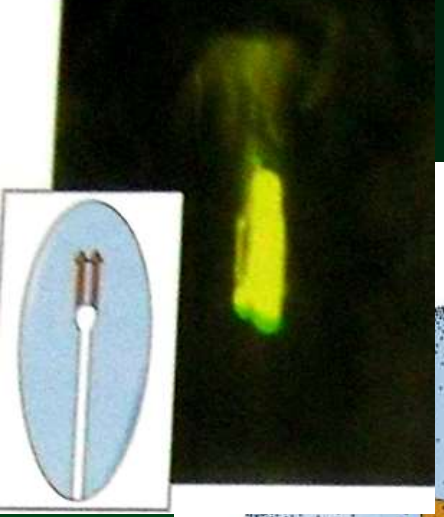
По Гилберт, 2010

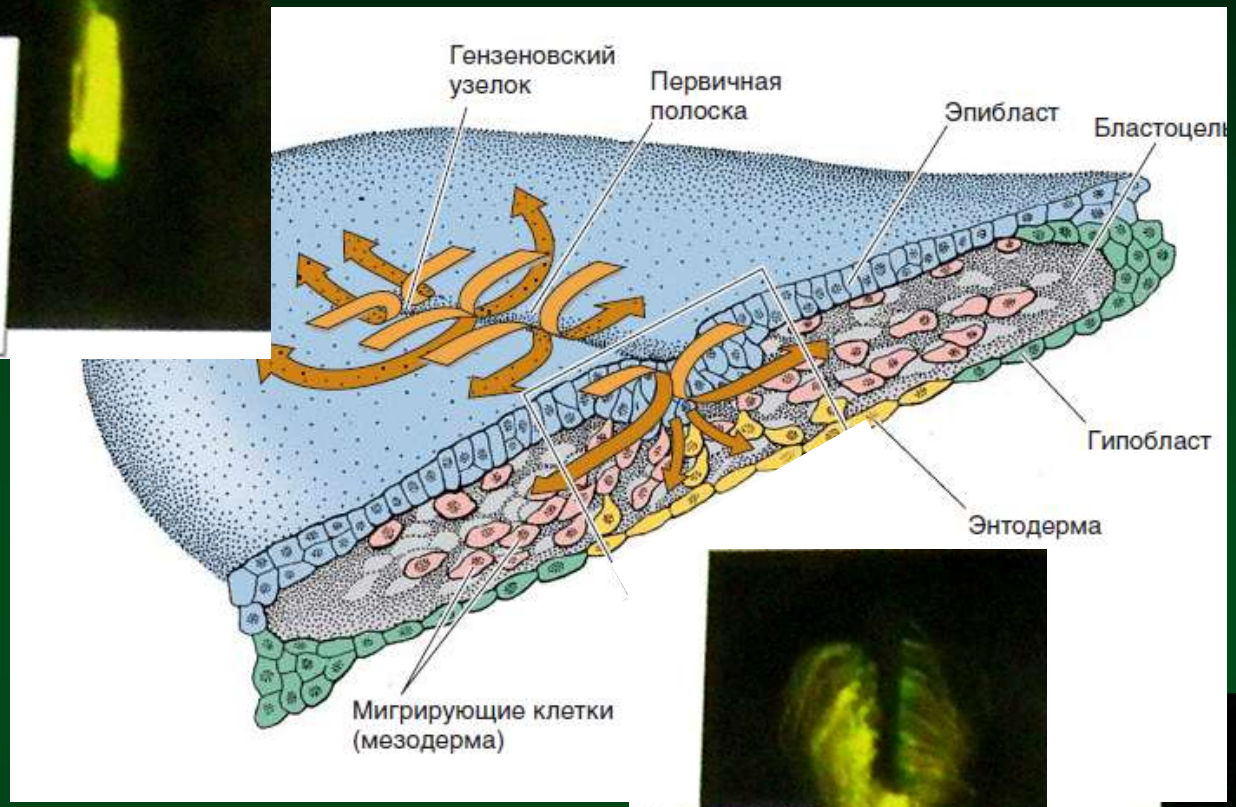


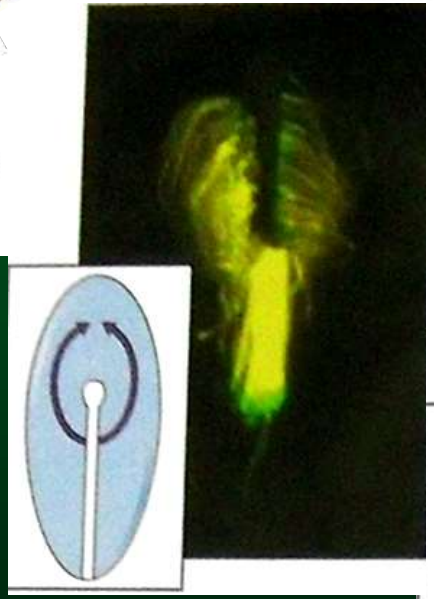
Карта нормальной ретинотектальной проекции у взрослой шпорцевой лягушки

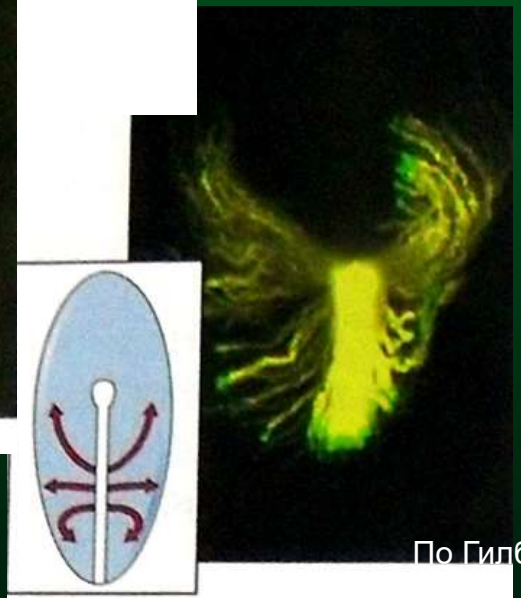
По Гилберт, 2010

Производные мезодермы

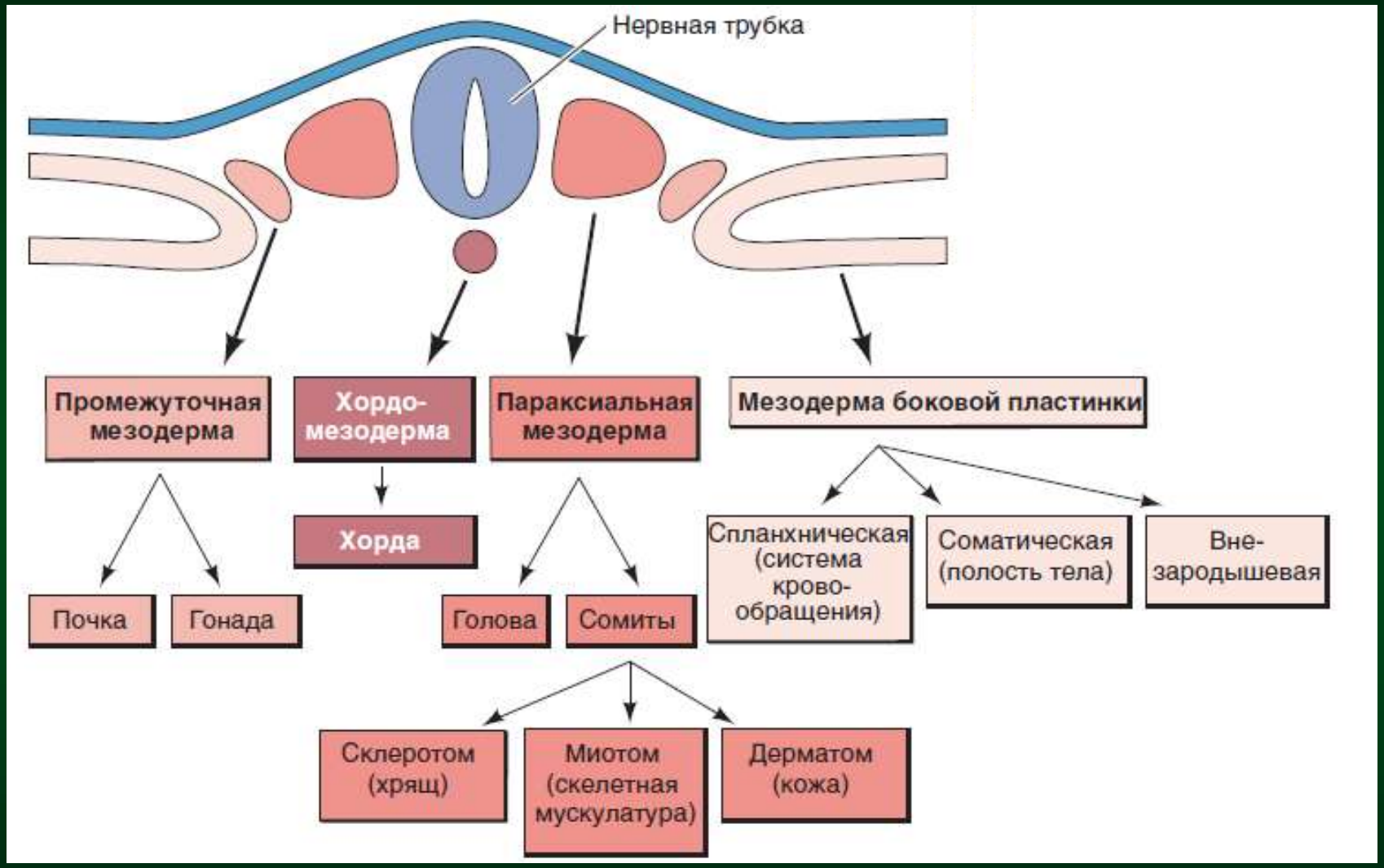




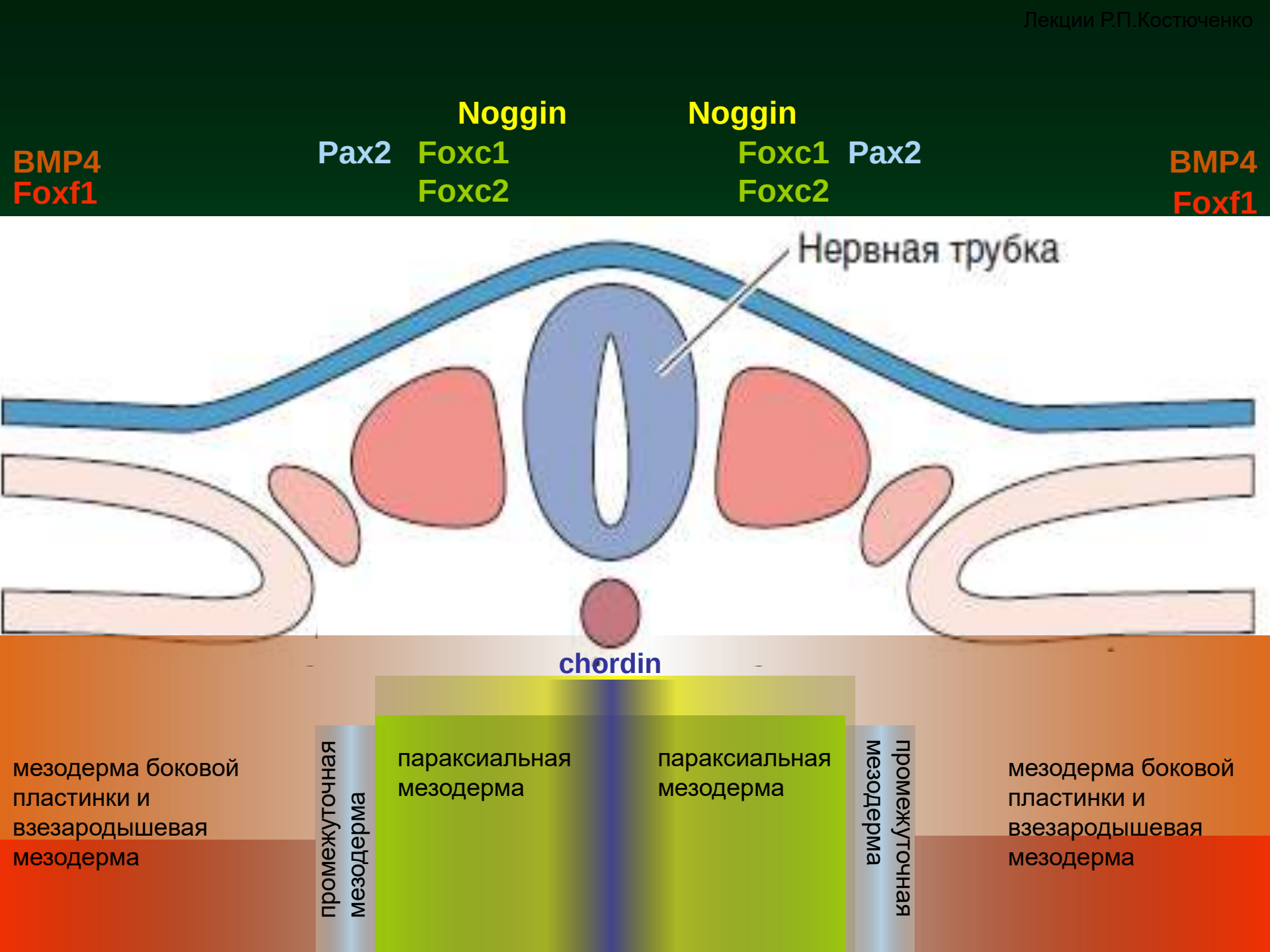




По Гилберт, 2010

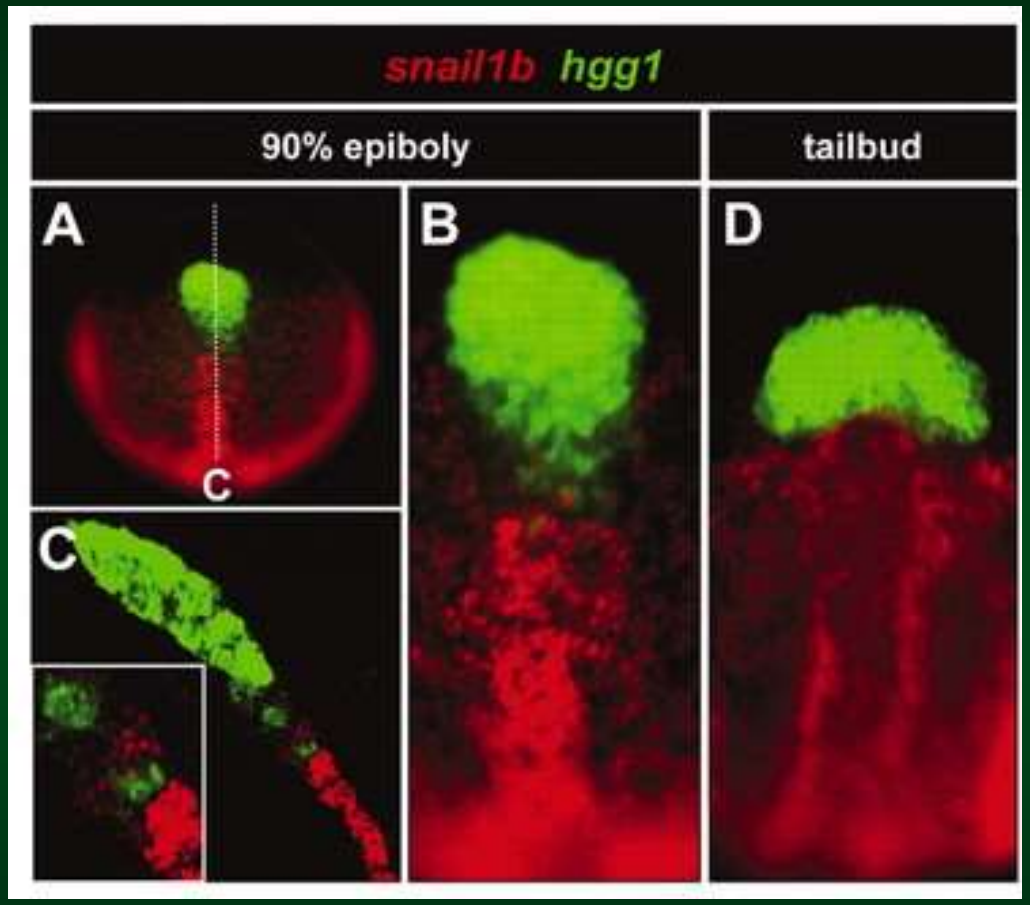


По Гилберт, 2010


Noggin
Noggin
BMP4
Foxf1
Pax2
Foxc1
Foxc2
Foxc1
Pax2
Foxc2
BMP4
Foxf1
Нервная трубка
chordin
мезодерма боковой пластинки и взезародышевая мезодерма
промежуточная мезодерма
паракситальная мезодерма
паракситальная мезодерма
промежуточная мезодерма
мезодерма боковой пластинки и взезародышевая мезодерма

Головная мезодерма

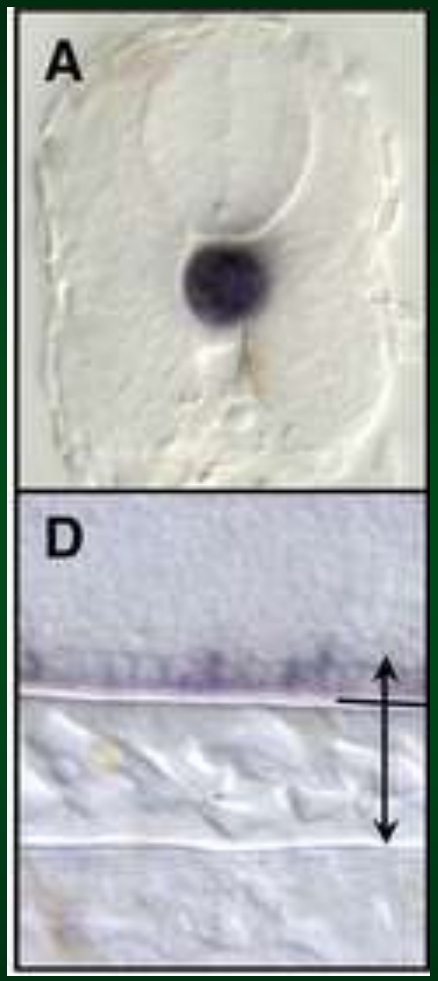
мезодерма прехордальной пластинки



головная мезенхима, формирующая большую часть соединительных тканей и мышц лица

Blanco *et al.*, 2007

Туловищная мезодерма



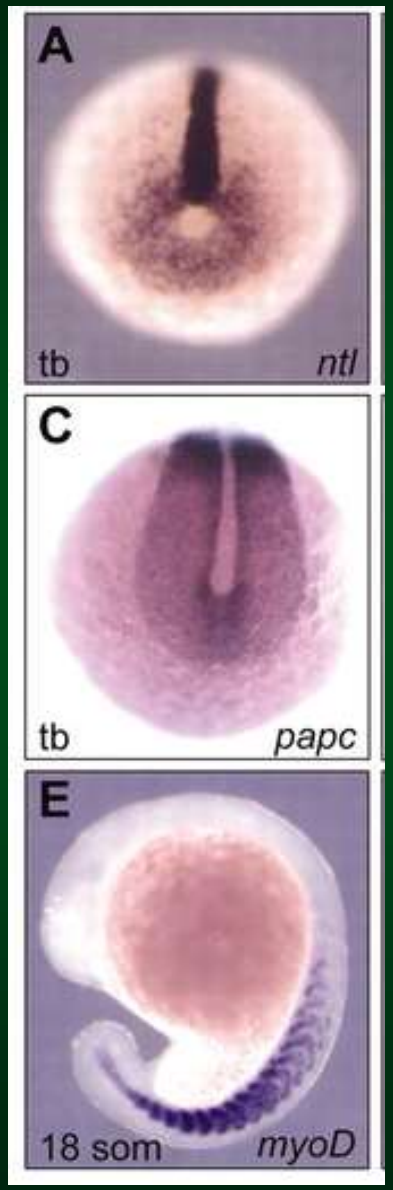
Dal-Pra et al., 2011

хордомезодерма

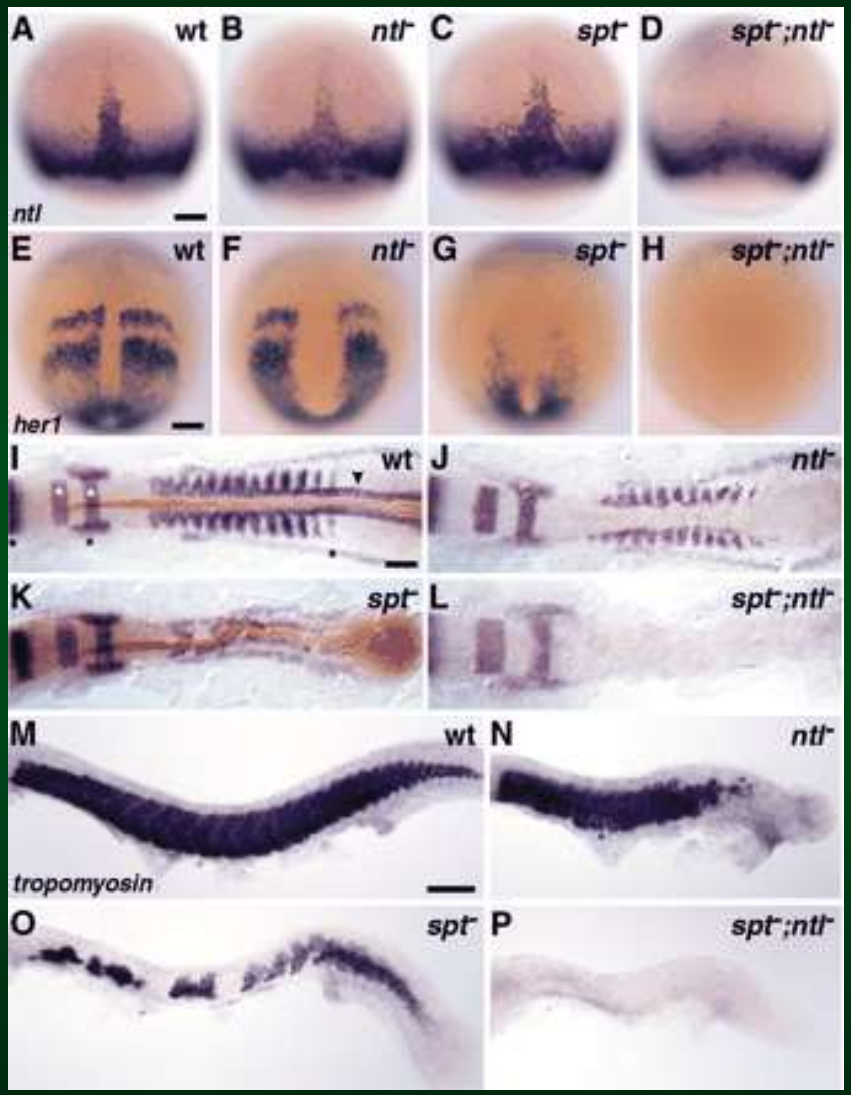
хорда — временный орган

индукция формирования нервной трубки и установление передне-задней оси тела

сегментационная пластинка, либо **несегментированная мезодерма**
– регресс первичной полоски
– **сомиты**

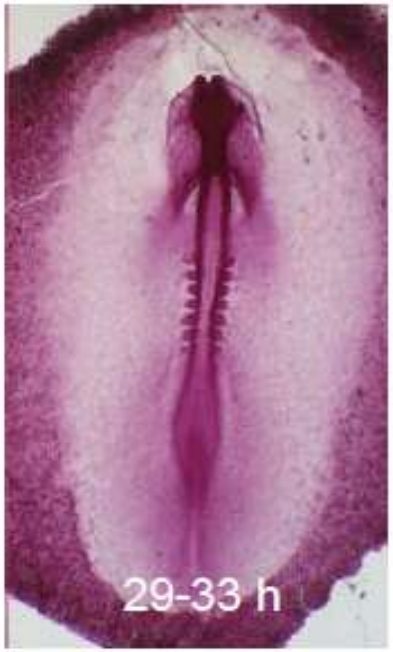


Blanco *et al.*, 2007



Amacher et al., 2002

параксиальная мезодерма, или **дорсальная мезодерма сомитов**

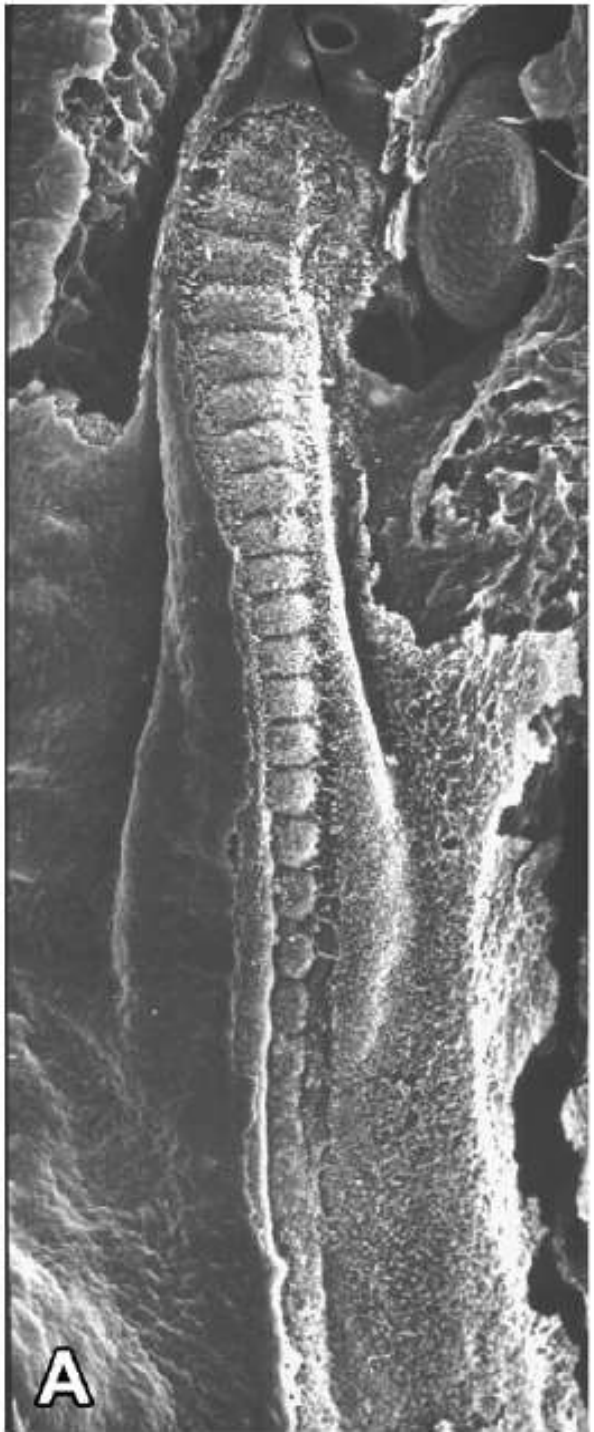


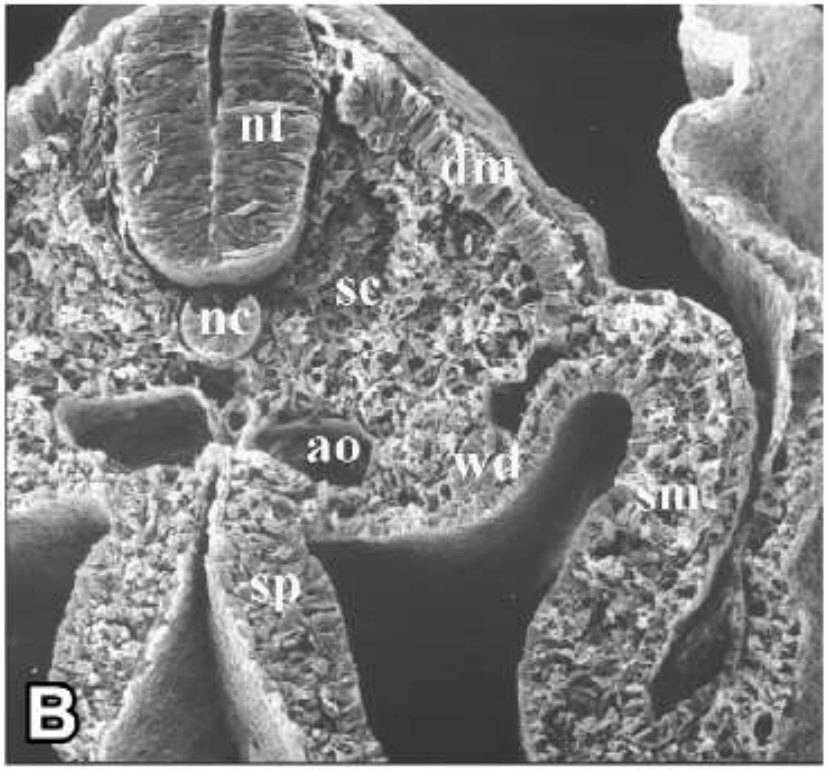
По Гилберт, 2010

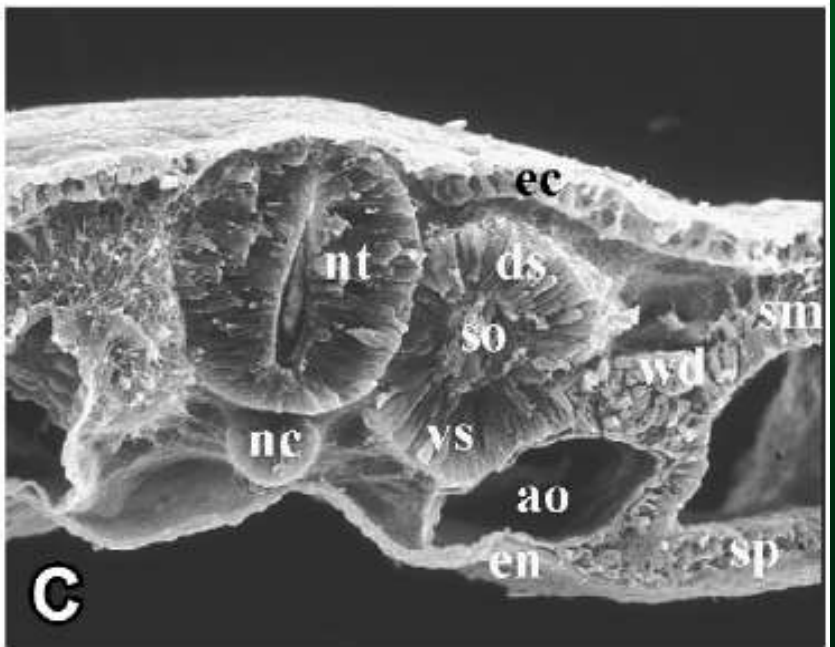
Формирование сомитов

•периодичность образования **сомитомеров** от пресомитной параксиальной мезодермы и преобразование в отдельные сомиты

•компактизация и эпителизация сомитов
•спецификация сомитов
•дифференцировка сомитов







Geetha-Loganathan et al., 2008

гензеновский узелок регулирует временной паттерн сомитогенеза

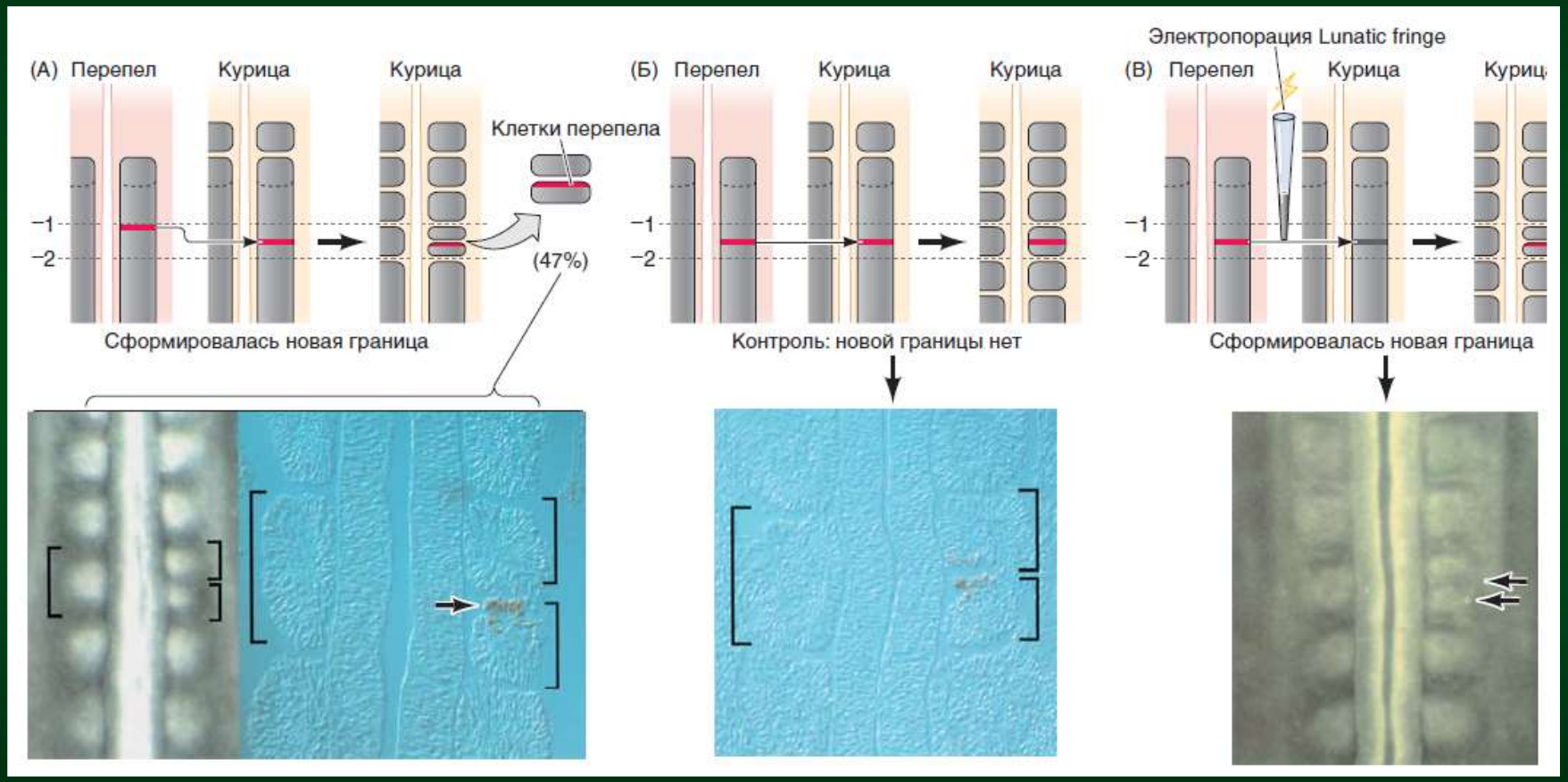
в гензеновском узелке FGF8

⊥

lunatic fringe

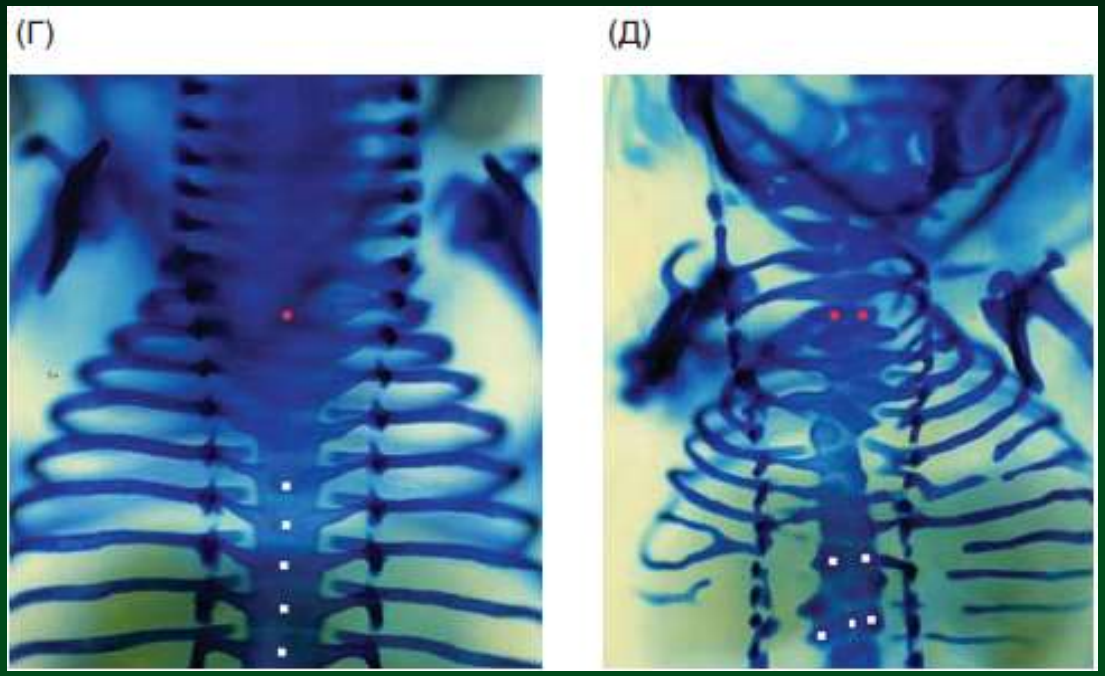
клетки параксиальной мезодермы

Lunatic fringe



Трансплантация проспективной пограничной области в область, которая не будет пограничной, создает в последней новую границу и новый сомит

По Гилберт, 2010



Вид с дорсальной стороны (Г) контрольных и (Д) мышат того же помета с мутацией гена *Delta-like3*, кодирующего лиганд для Notch. У этих мутантов обнаружено несколько центров окостенения (белые точки), расположенных в ряд, а не в столбик, а также аномальные ребра

По Гилберт, 2010

экспрессия гена *c-hairy 1*, регуляция которого происходит путем Notch

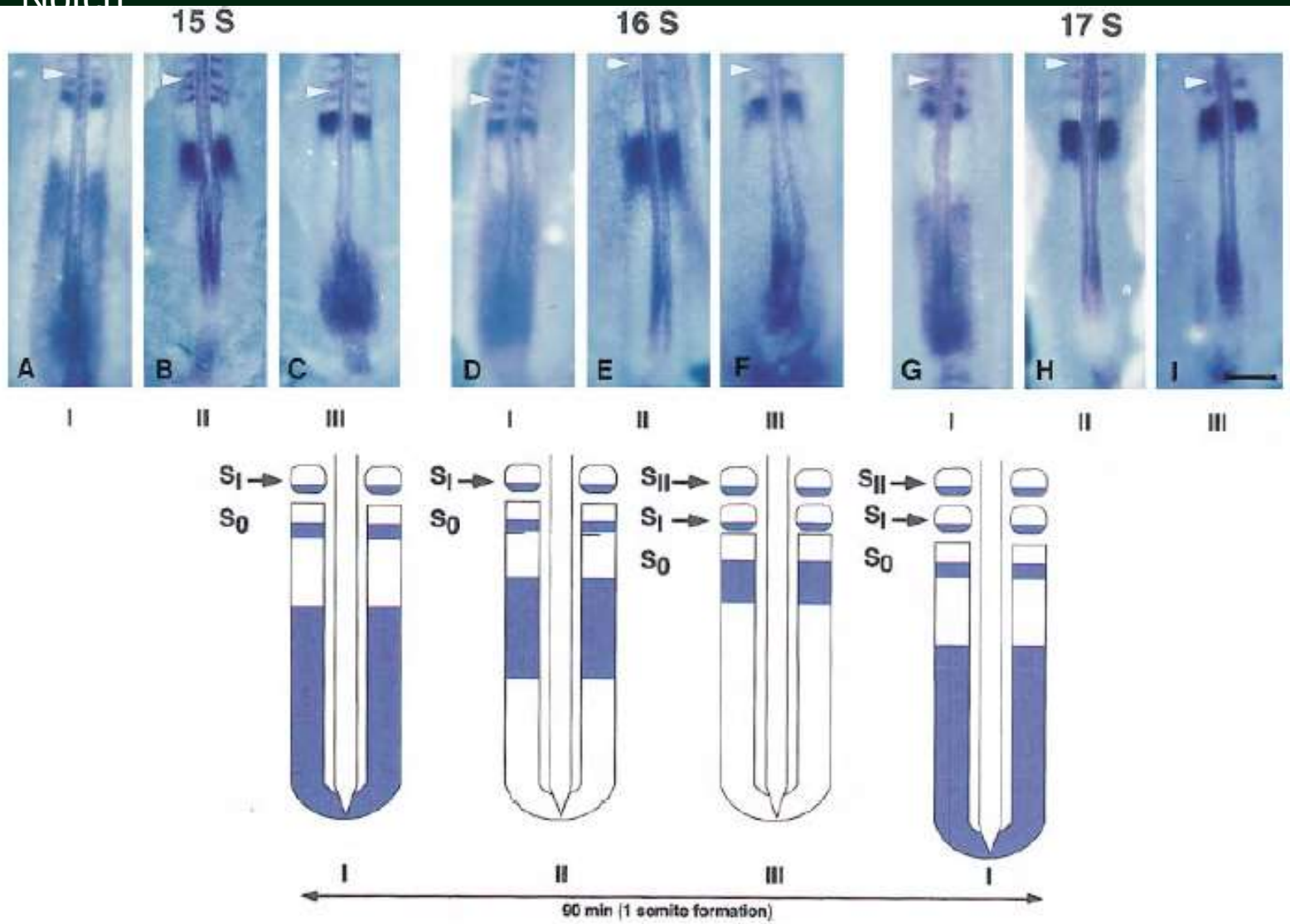
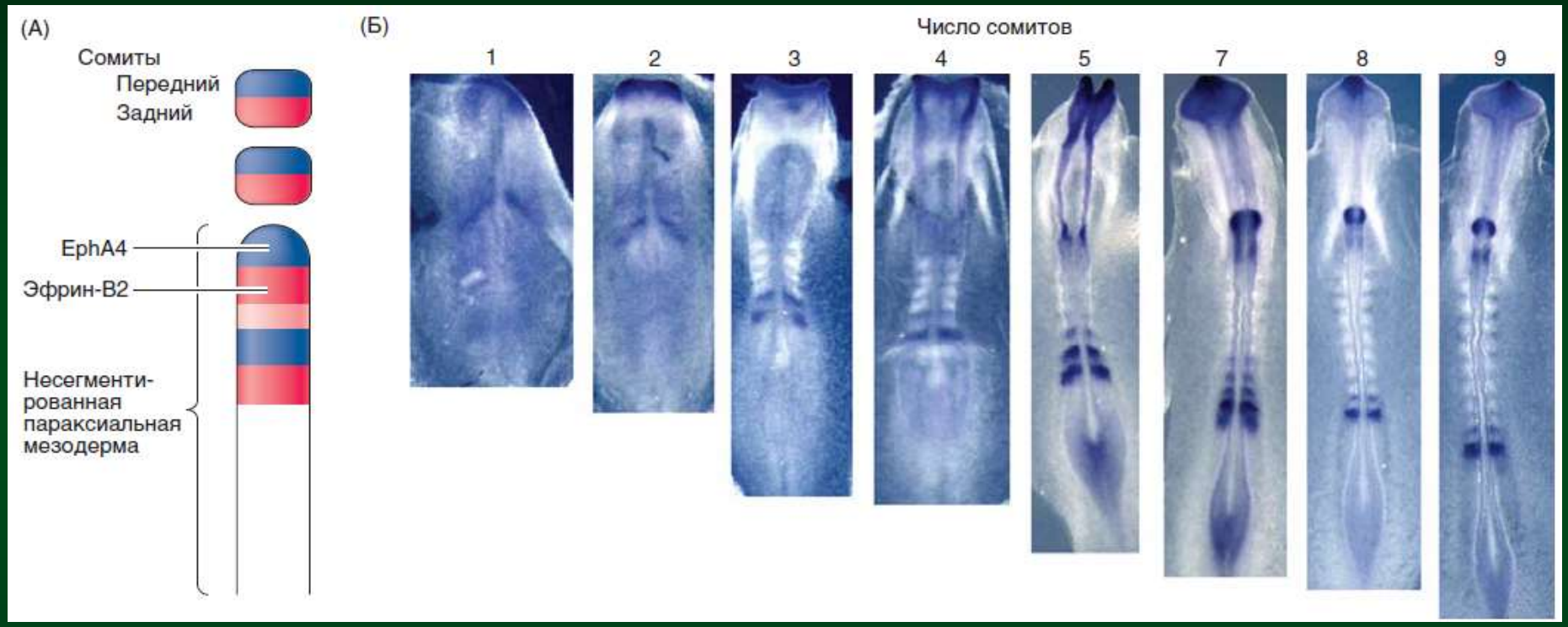


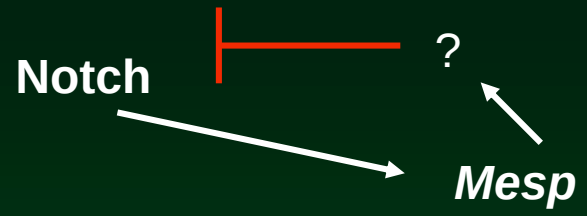
Figure 3. *c-hairy1* mRNA Expression in the Presomitic Mesoderm Defines a Highly Dynamic Caudal-to-Rostral Expression Sequence Reiterated during Formation of Each Somite

Palmeirim et al., 1997

вероятная мишень гена *c-hairy 1* - гены эфрина и его рецепторы



По Гилберт, 2010



передняя

граница

задняя

(i)

вентрально-дорсальная индукция выравнивания задней границы

(ii)

Mesp
Mesp
Ephs

(iii)

Eph → Ephrin

задне-передняя индукция формирования зоны разделения

зона разделения

(iv)

спецификация задних клеток

эктодермальный сигнал

(v)

MET

эктодермальный сигнал стимулирует и координирует мезенхимо-эпителиальный переход через активацию ГТФазы Rac1

осцилляция по принципу обратной негативной связи

высокие концентрации FGF8 ⊣ *Delta* → Notch

FGF8 → pERK ⊣ *Delta*

Notch → *Mesp*

Notch → NICD → *hes* (*Hairy/Enhancer of Split*)

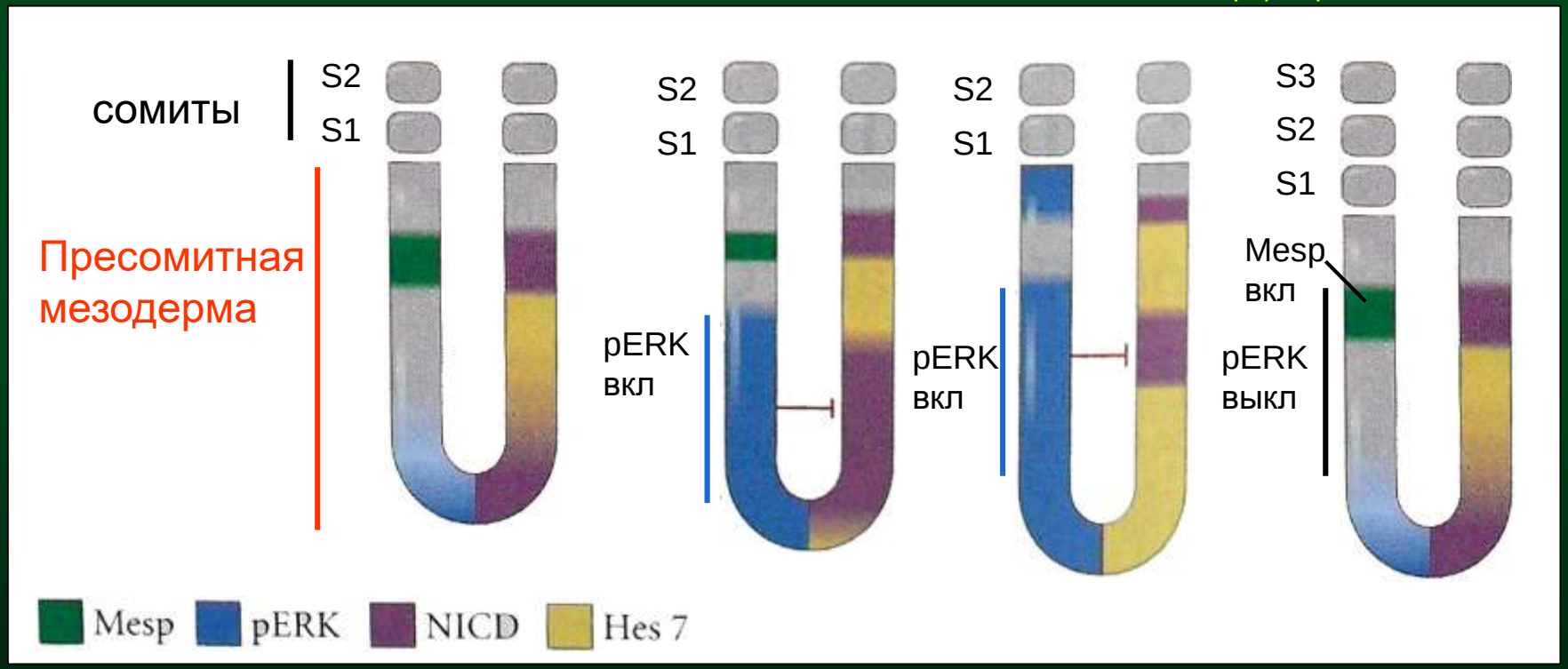
Notch ⊣ NICD

Notch ⊣ ?

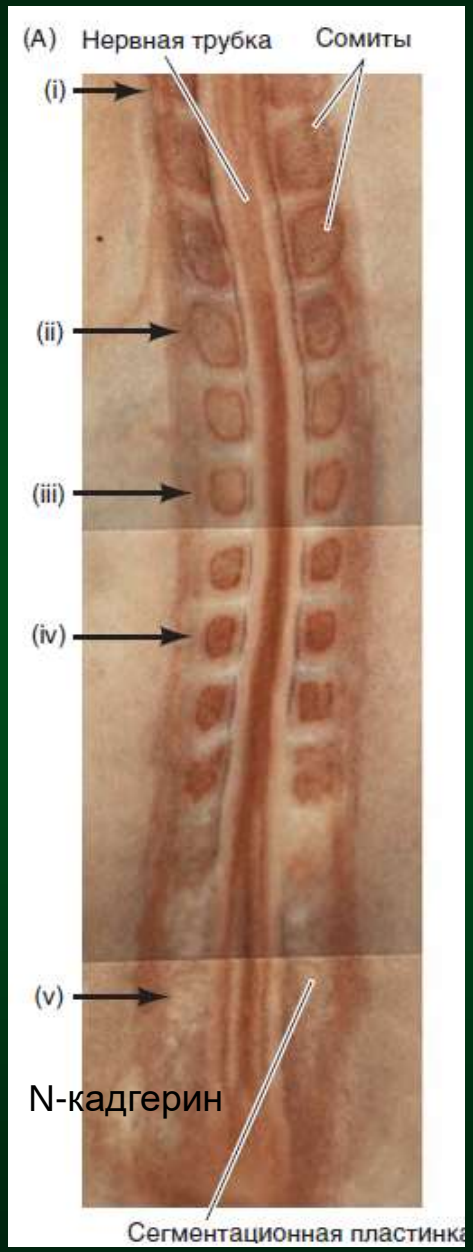
Mesp → ?

Mesp → Ephrs

периодическое формирование сомитов



Эпителизация сомита



происходит еще
до отделения сомита

синтез фибронектина и N-кадгерина —
тканевые блоки

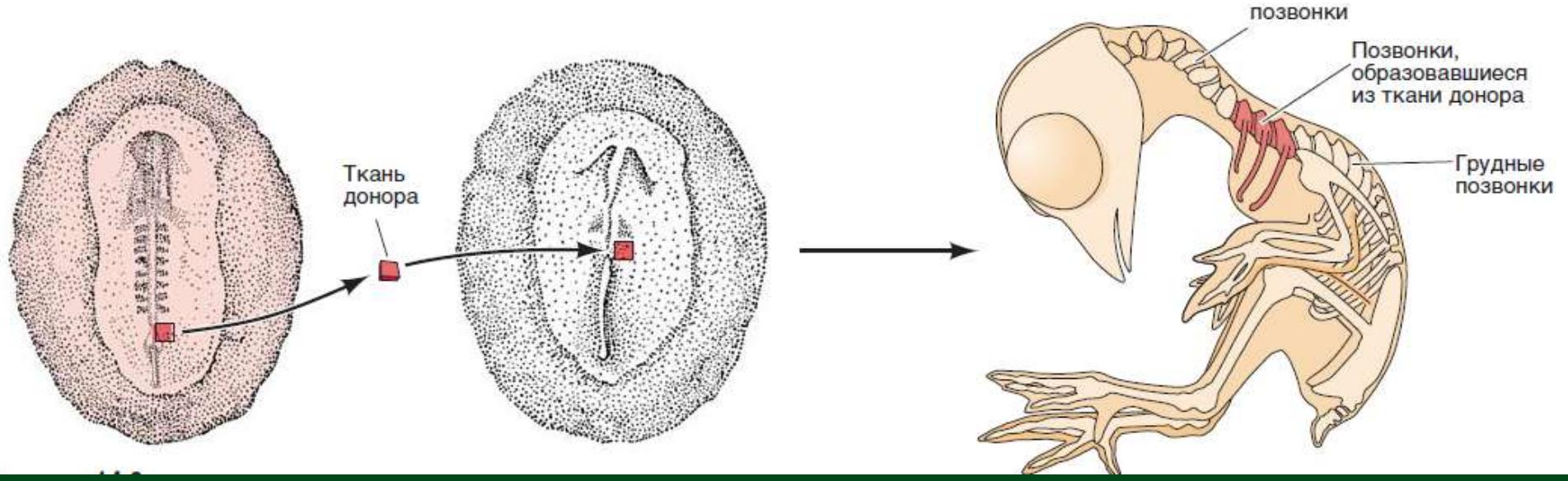
базальные пластинки

фибронектин, интегрин

активация Rac1, что может послужить стимулом для запуска глубоких изменений актинового цитоскелета

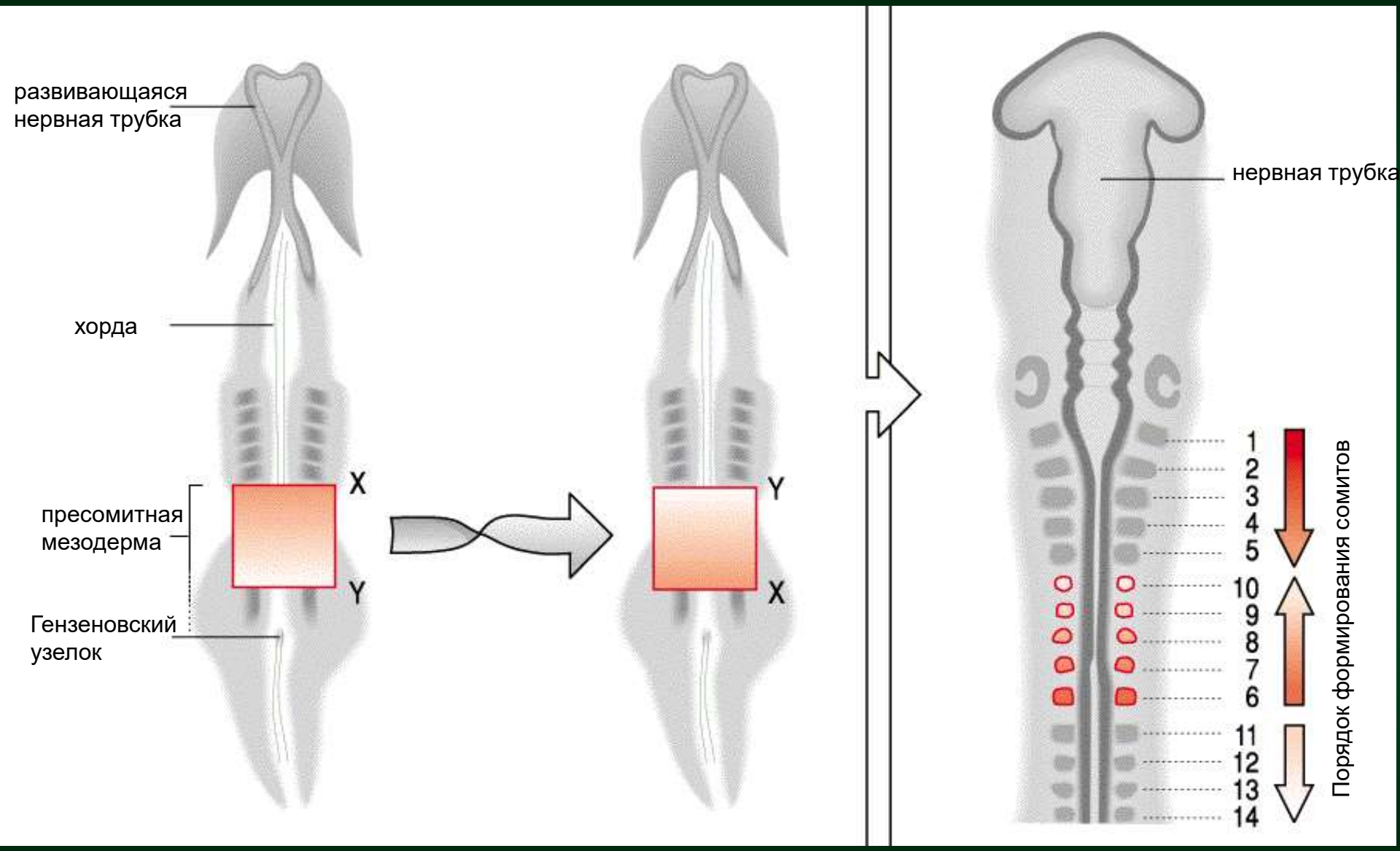
По Гилберт, 2010

Спецификация сомитов вдоль передне-задней оси



каждый сомит сохраняет свой паттерн экспрессии Hox-гена, причем даже в том случае, когда он трансплантирован в другую область зародыша

По Гилберт, 2010

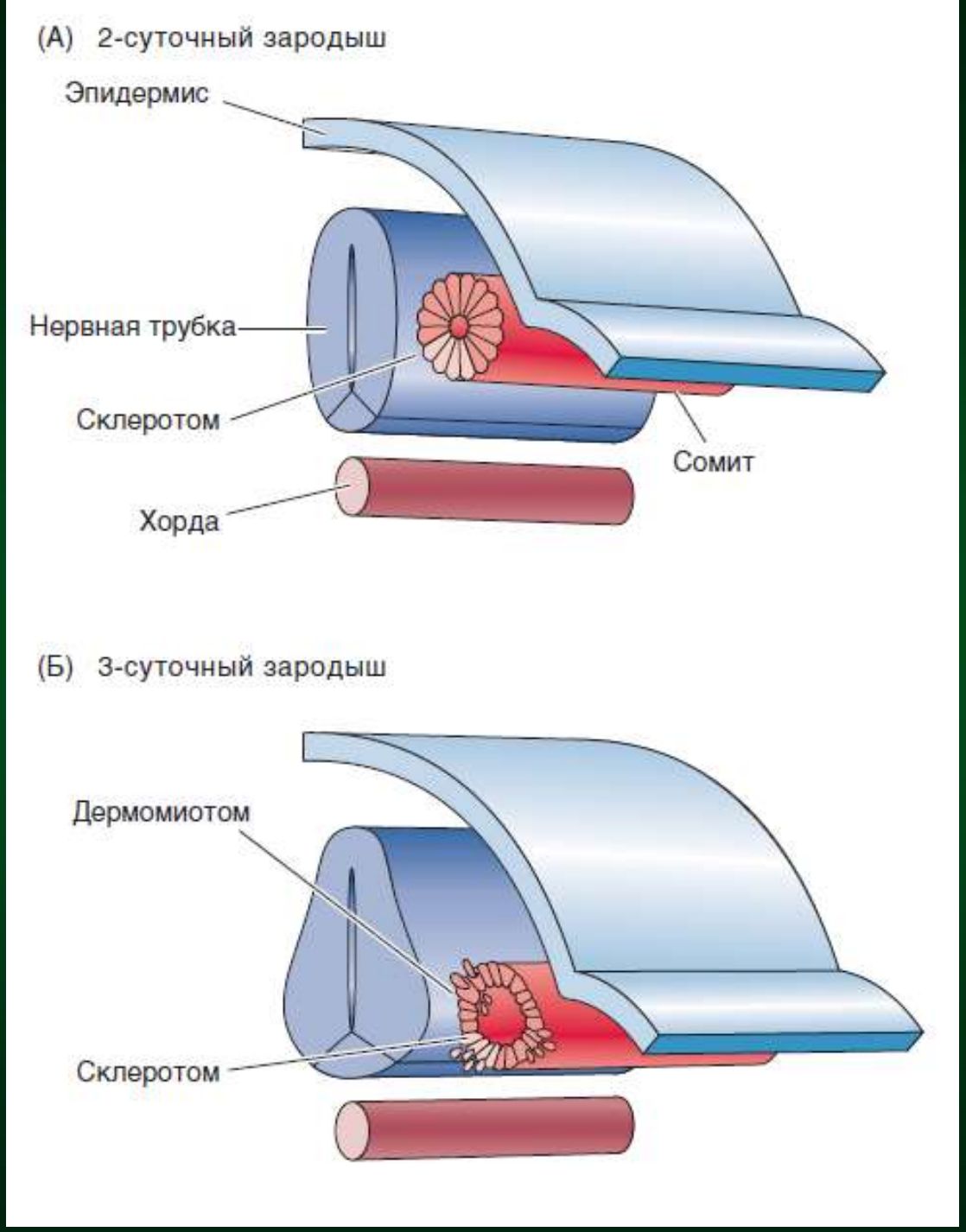

развивающаяся нервная трубка
хорда
пресомитная мезодерма
Гензеновский узелок
X
Y
Y
X
нервная трубка
1
2
3
4
5
10
9
8
7
6
11
12
13
14
Порядок формирования сомитов

Производные сомитов

(1) хрящ позвонков и ребер
(2) мышцы ребер грудной клетки , конечностей, стенки брюшной полости, спины и языка
(3) связки, соединяющие мышцы и кости
(4) дерма кожи спины
(5) клетки, вносящие вклад в формирование аорты и межреберных сосудов

мезодерма рано коммитируется вдоль передне-задней оси

но клетки формирующегося сомита являются мультипотентными, судьба их определится, когда сомит уже будет сформирован и получит сигналы паракринных факторов от окружающих его тканей.

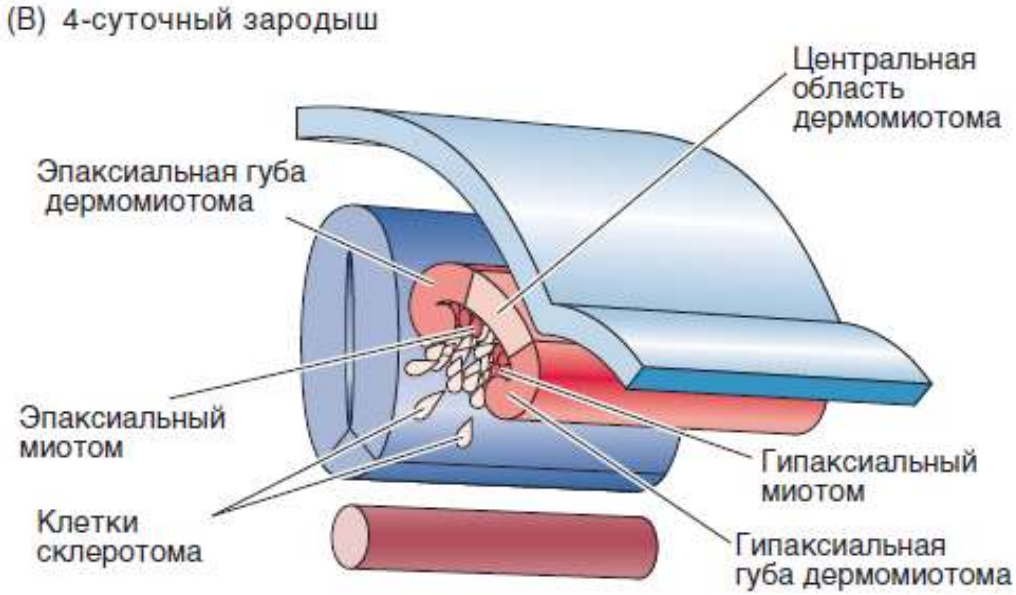


склеротомом

клетки хряща (хондроциты) позвонков, часть каждого из ребер

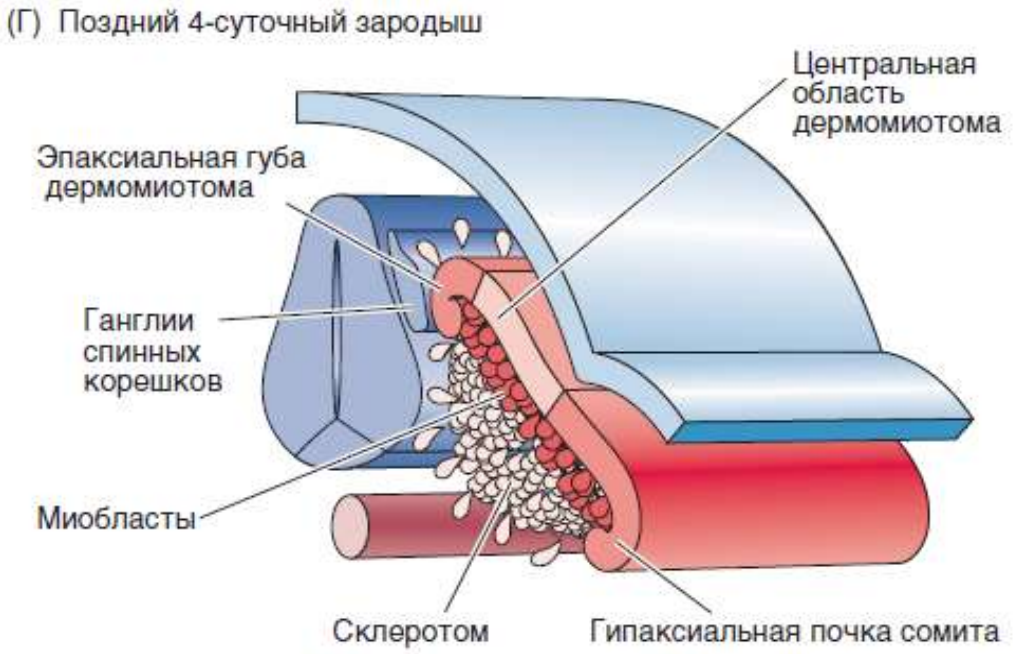
дермомиотом

По Гилберт, 2010



миотом

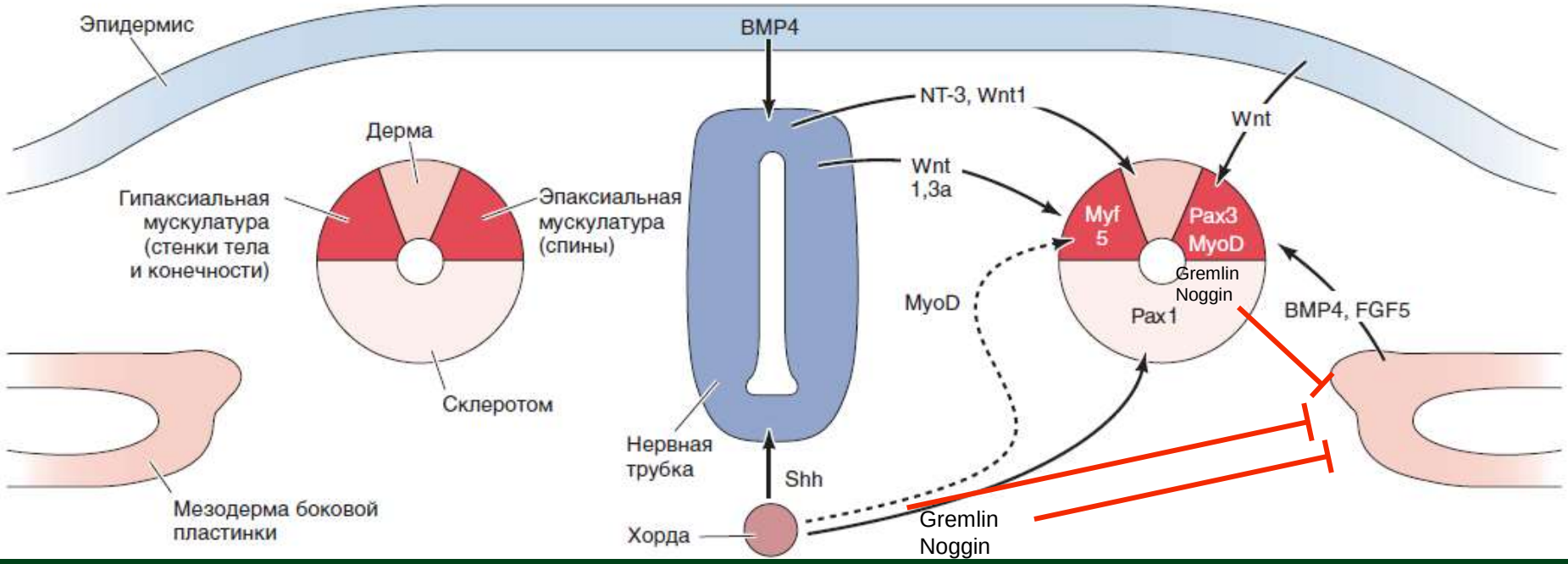
миобласты



дермомиотом:
эпаксиальные мышцы (глубокие мышцы спины), **гипаксиальные мышцы** стенки тела, конечностей и языка

дерматом
дает мезенхимную соединительную ткань кожи спины — **дерму**

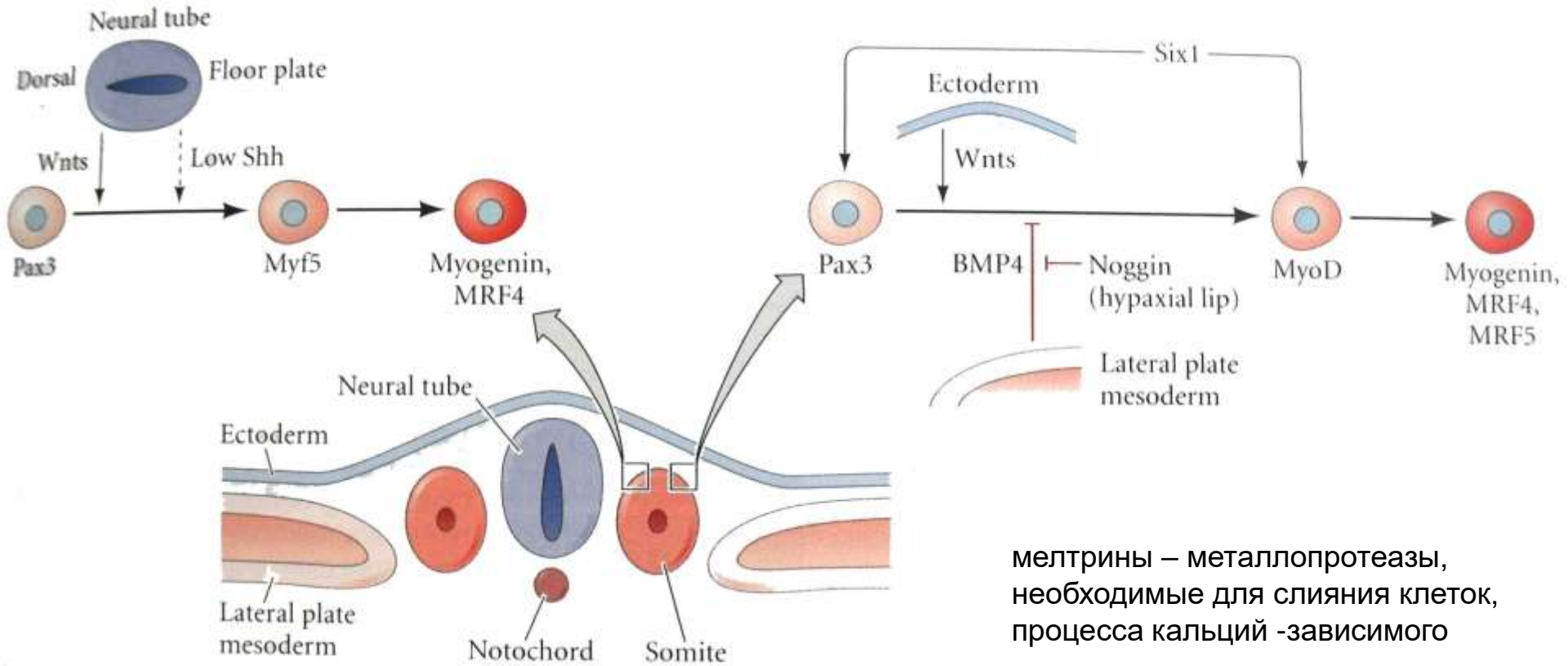
По Гилберт, 2010



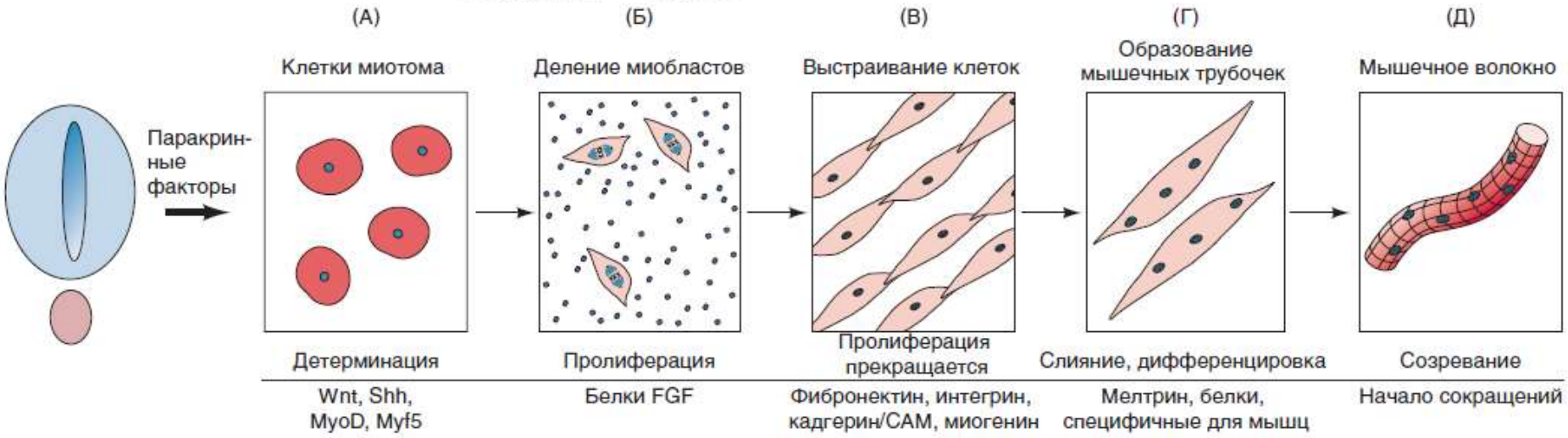
нейротрофин 3 (NT-3)

По Гилберт, 2010, с изменениями

Миогенез. Развитие мышцы



мелтрины – металлопротеазы, необходимые для слияния клеток, процесса кальций -зависимого



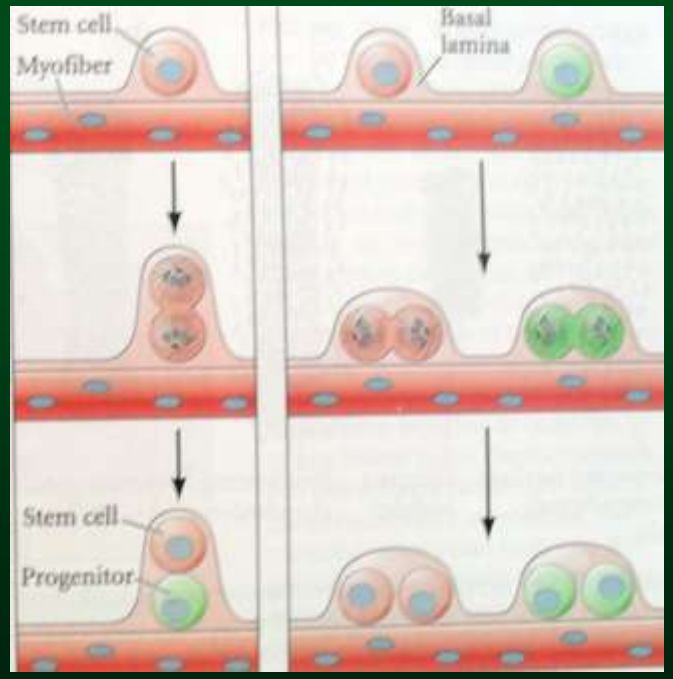
Миогенез. Развитие мышцы

центральная часть дермомиотома - источник клеток-сателлитов

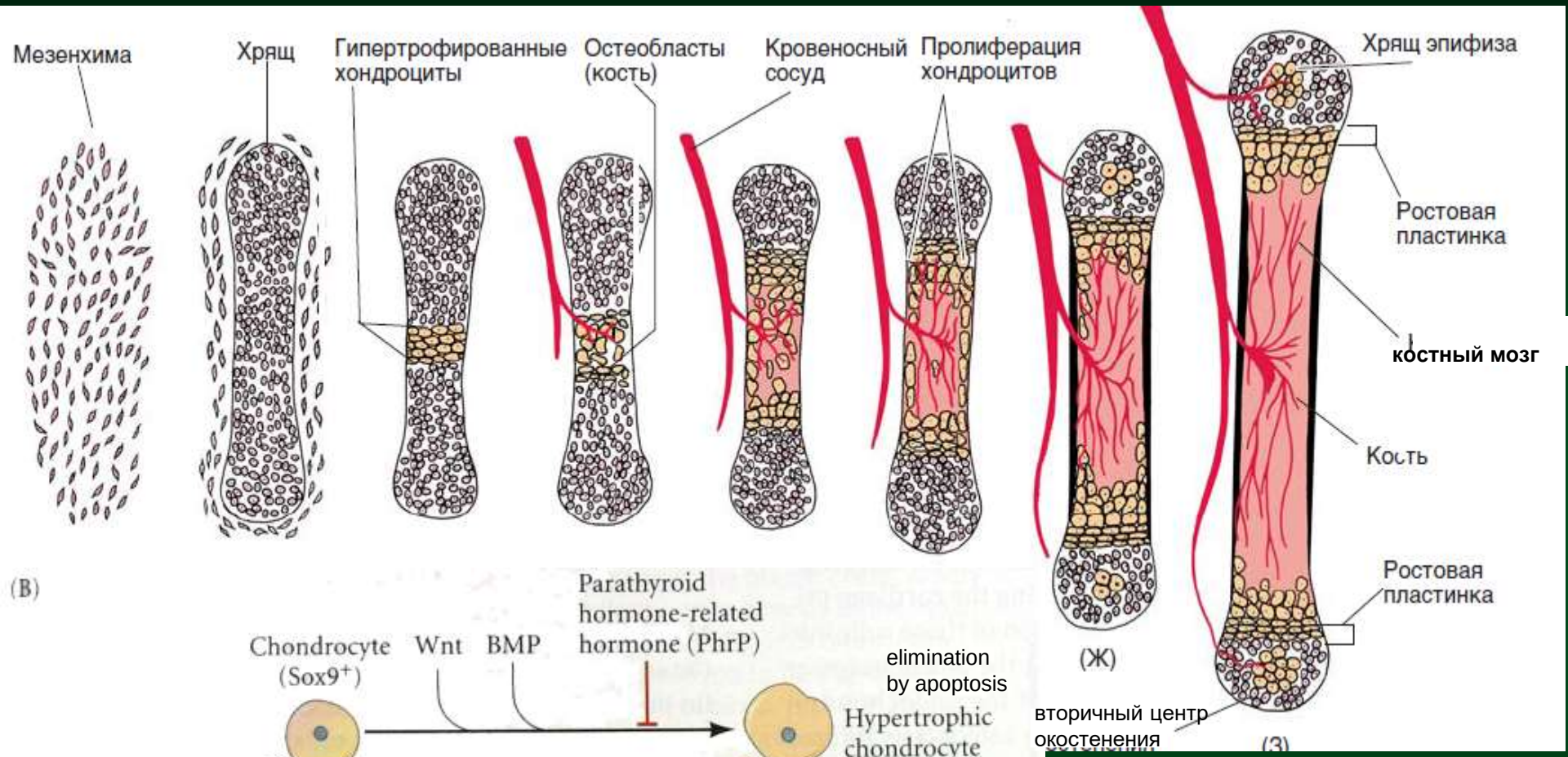
Pax3 Pax7 ⊣ MyoD

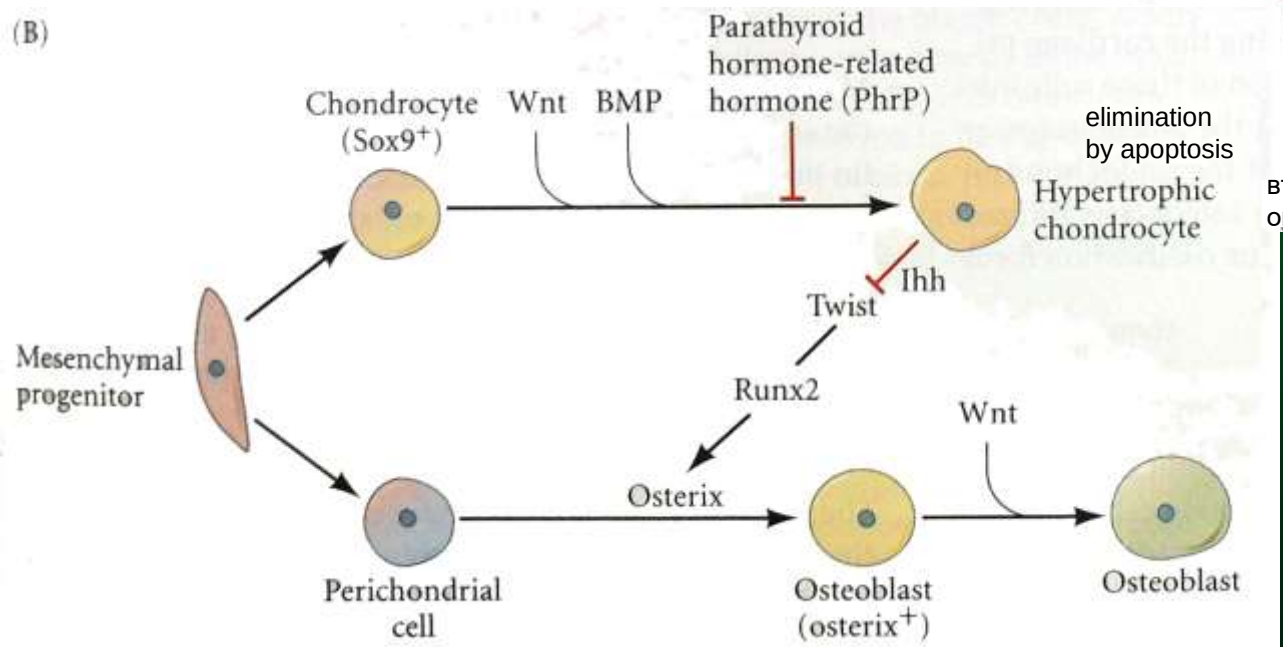
Pax7 ⊣ апоптоз

miRNAs ⊣ Myf5



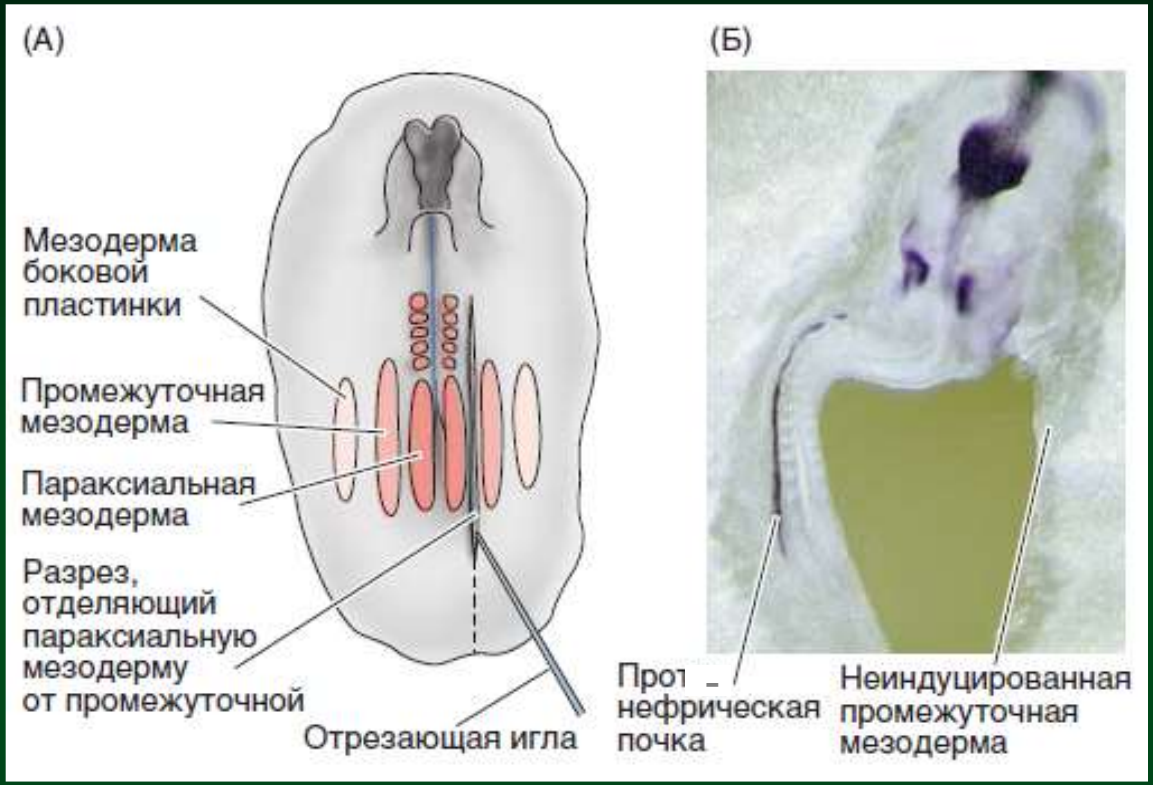
Остеогенез. Развитие костей





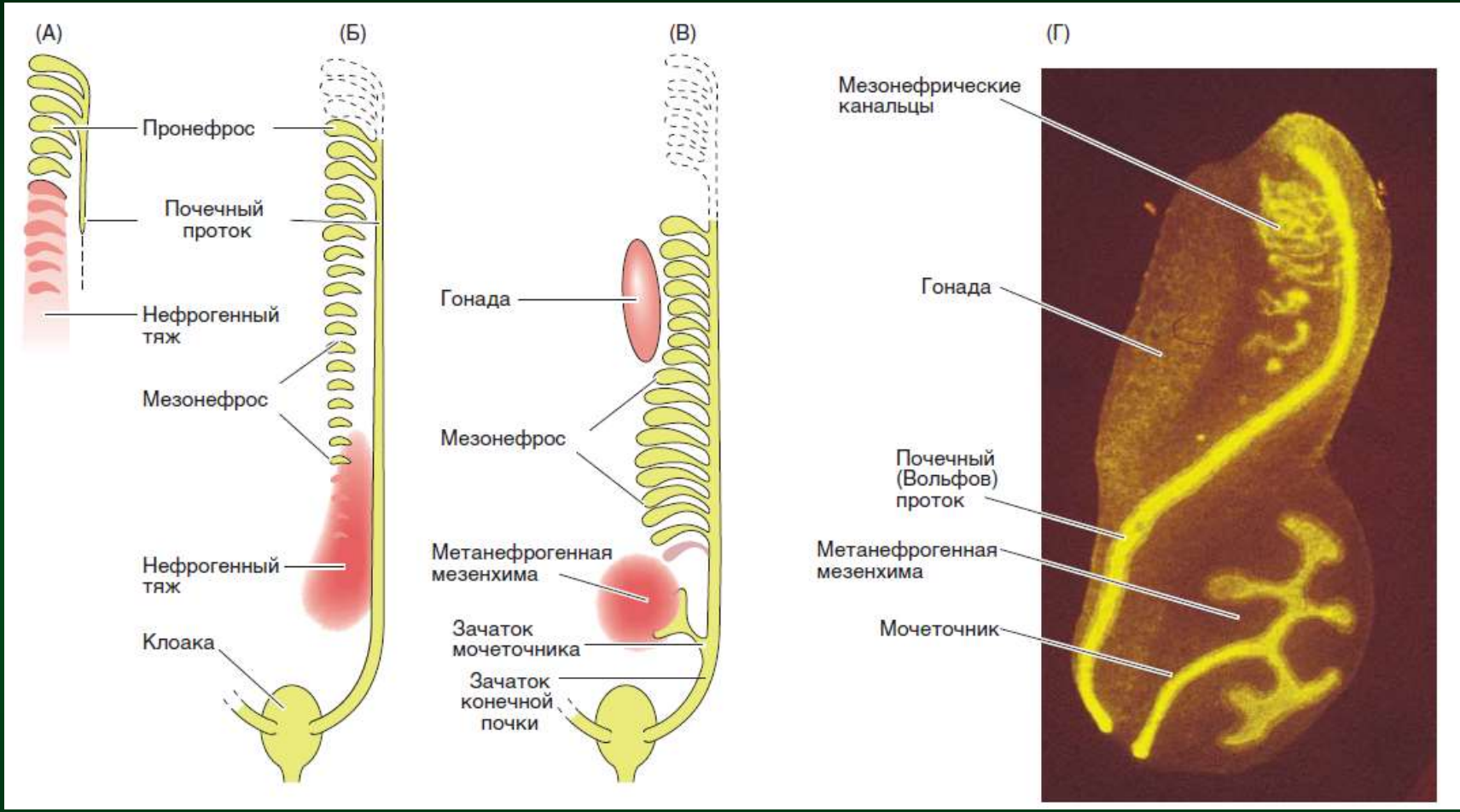
Скелет возникает из трех источников. Сомиты дают осевой скелет, мезодерма боковых пластинок дает скелет конечностей, а черепной отдел нервного гребня дает начало жаберным дугам, черепно-лицевым костям и хрящу.

ПРОМЕЖУТОЧНАЯ МЕЗОДЕРМА: МОЧЕПОЛОВАЯ СИСТЕМА



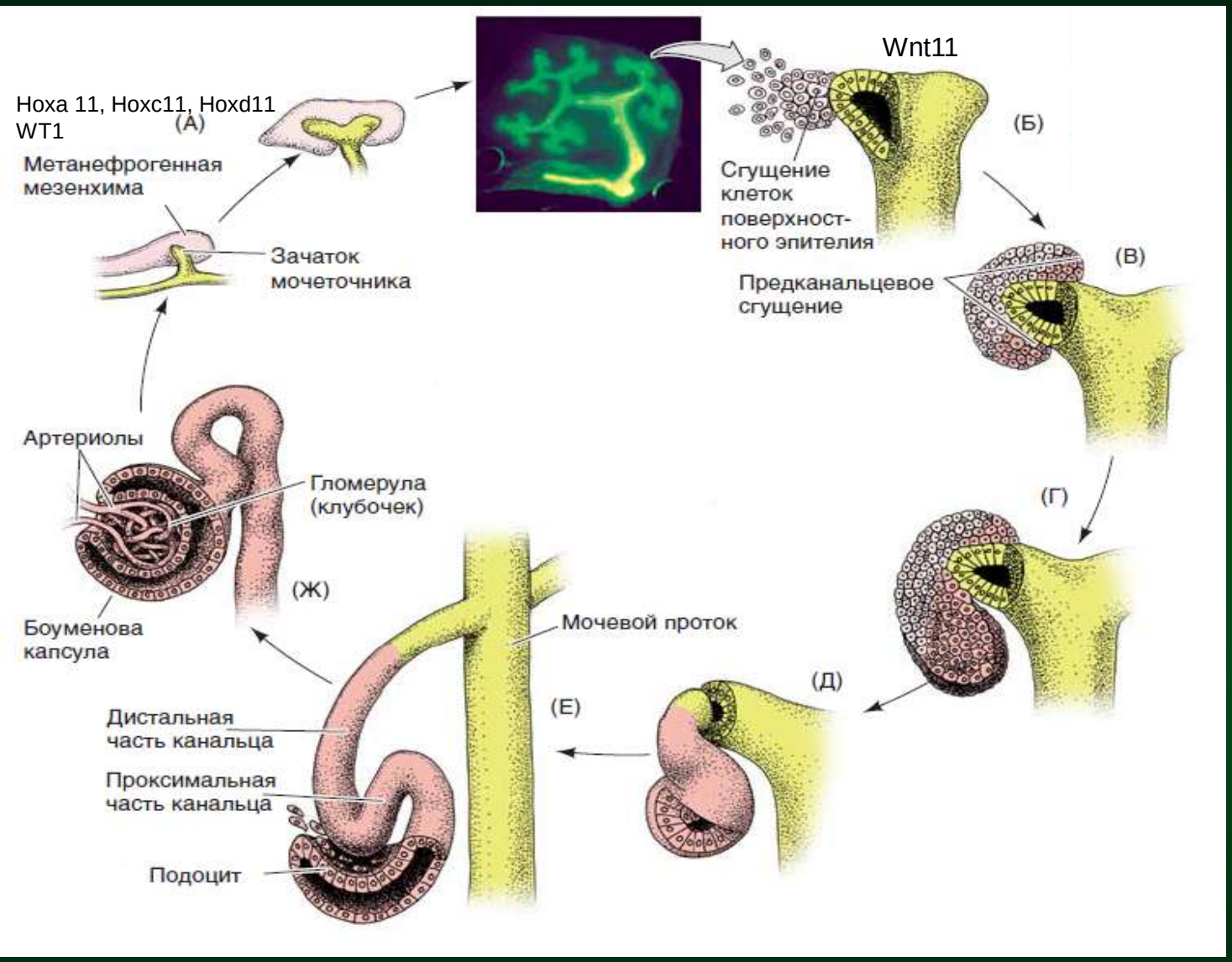
параксиальная мезодерма посылает неизвестный сигнал, индуцирующий в промежуточной мезодерме экспрессию *Lim1*, *Pax2* и *Pax8.*

По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010

Реципрокная индукция в ходе развития почки млекопитающих



А. мезенхима индуцирует ветвление зачатка (G

Б-Д. Верхушечный эпителий ветвлений индуцирует мезенхиму к агрегации и кавитации, ведущей к формированию почечных канальцев и клубочков

Е-Г. эпителий из бывших клеток мезенхимы переваривает базальную мембрану их индуцировавших клеток зачатка мочеточника и соединяются с эпителием зачатка

Ж. Часть агрегировавшей мезенхимы (предканальцевое сгущение) дает нефрон (почечные канальцы и боуменову капсулу), а зачаток мочеточника становится протоком, собирающим мочу.

По Гилберт, 2010

Реципрокная индукция в ходе развития почки млекопитающих

метанефрическая мезенхима

Pax2

Hoxa 11, Hoxc11, Hoxd11
WT1

GDNF

Wnt11

зачаток мочеточника

Wnt11

стимуляция к продолжению роста

TGF-ß1
BMP4

ветвление зачатка

FGF2
BMP7

WT1

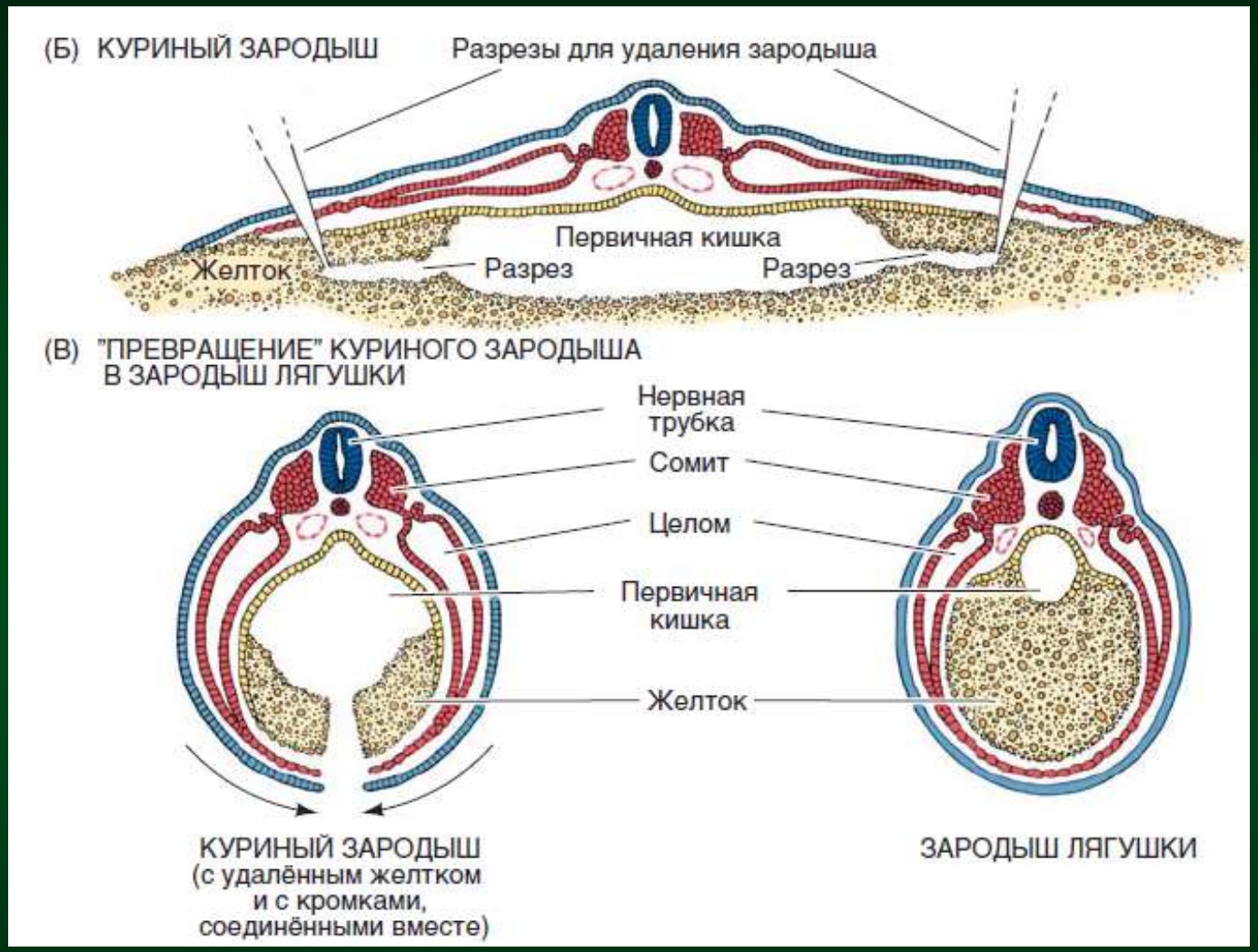
ингибируют апоптоз,
способствуют конденсации мезенхимных клеток

В результате индукции
запускается аутокринный фактор Wnt4

эпителий нефрона

GDNF(нейротрофический фактор
клеточной линии глии)

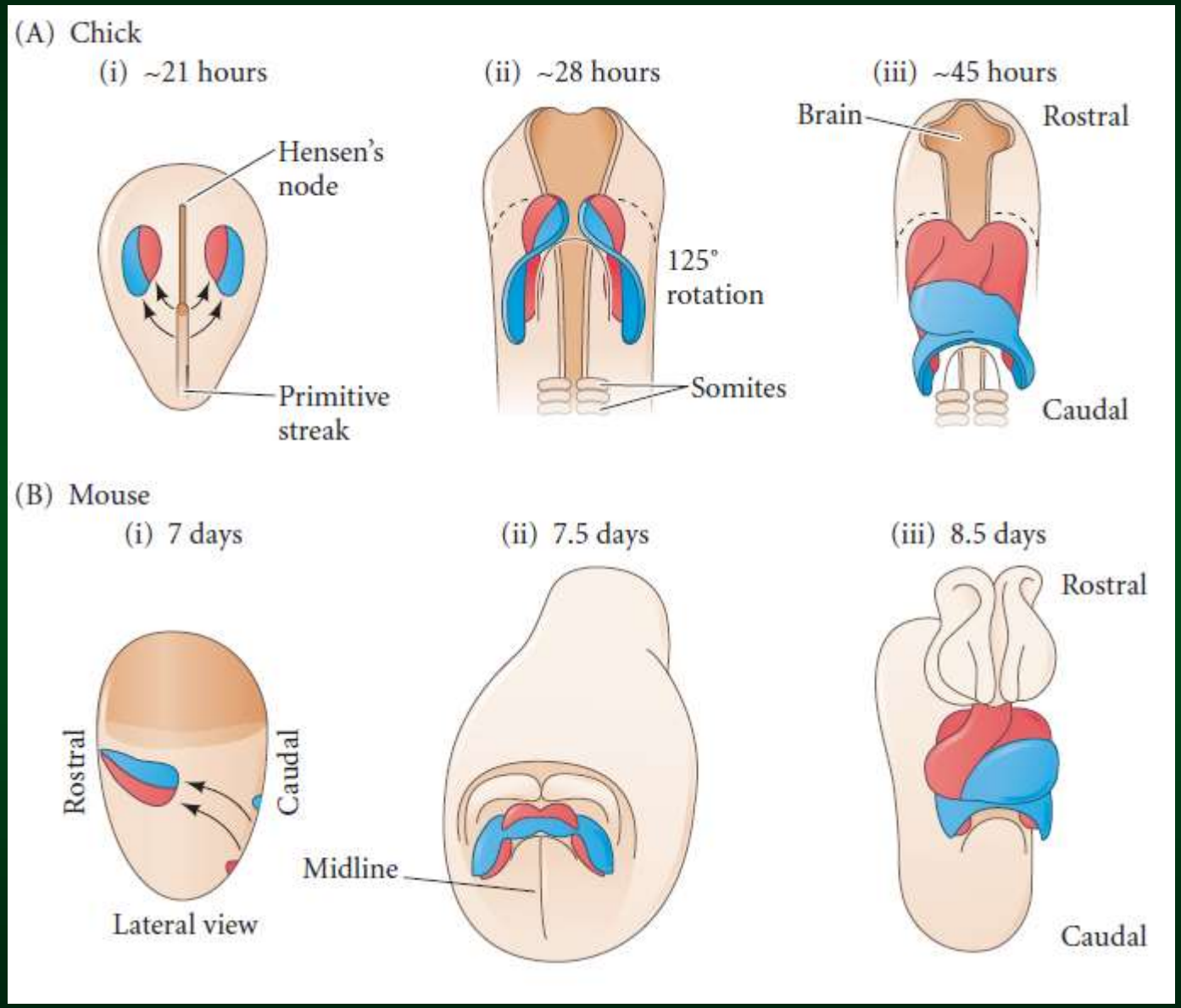
Мезодерма боковой пластинки



Дорсальный слой называется **соматической (париетальной) мезодермой**, которая подстилает эктодерму и вместе с ней образует **соматоплевру**. Вентральный слой называется **спланхнической (висцеральной) мезодермой**, которая выстилает энтодерму и вместе с ней образует **спланхноплевру**

Сердце

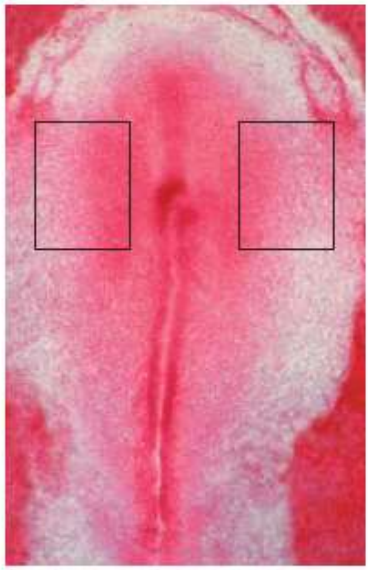
кардиогенная мезодерма

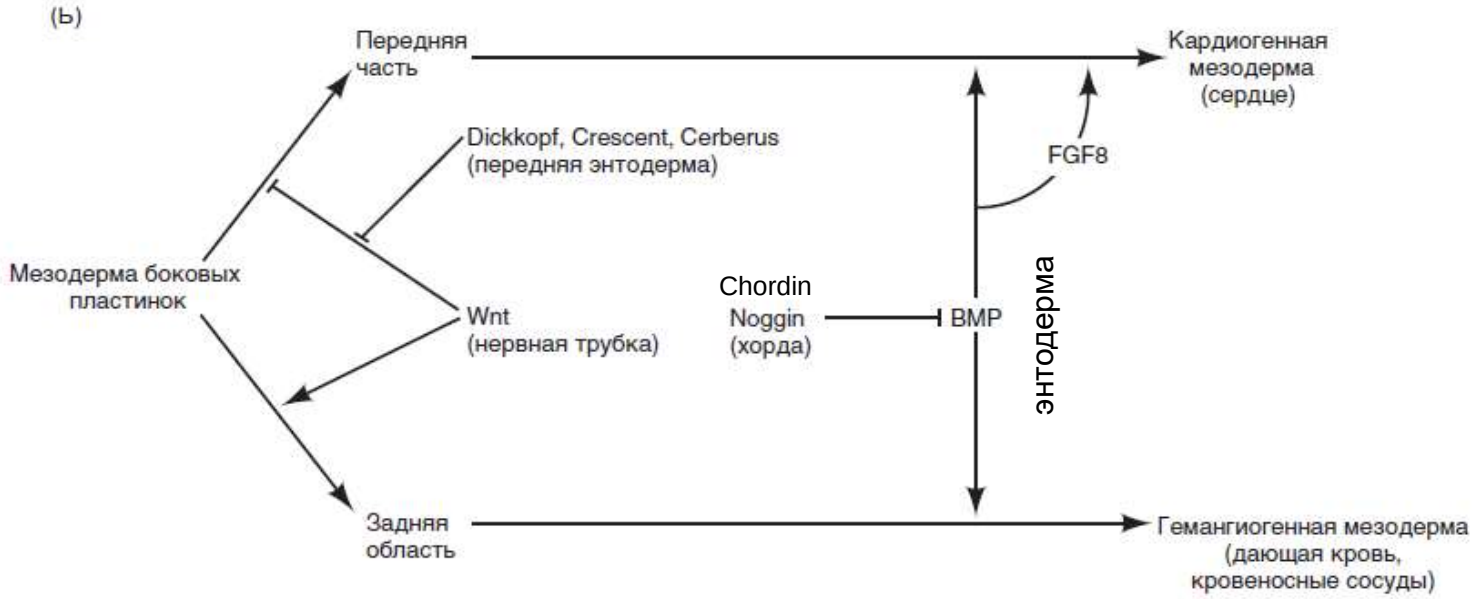


выходящие

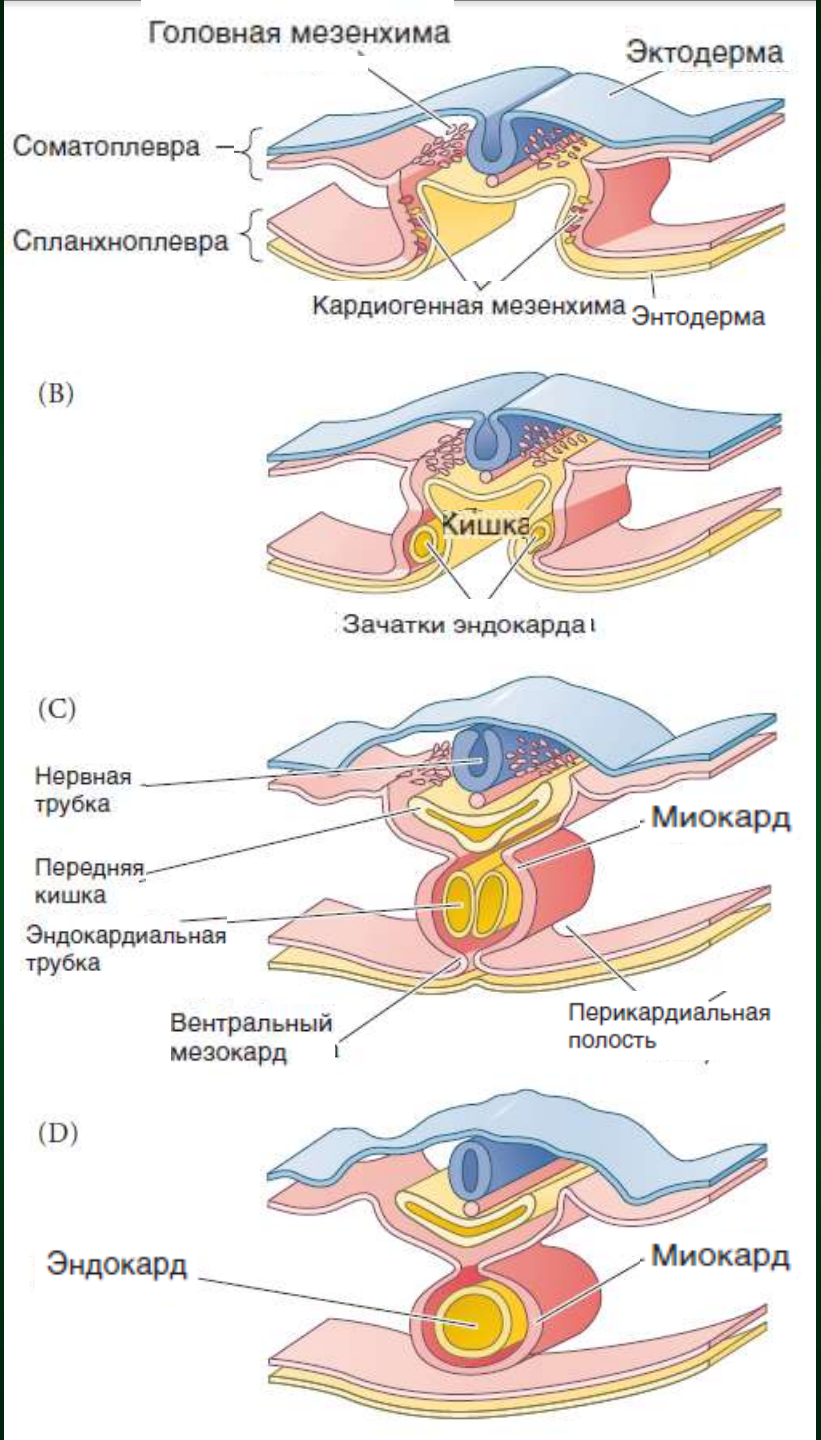
входящие

Спецификация клеток кардиогенной мезодермы

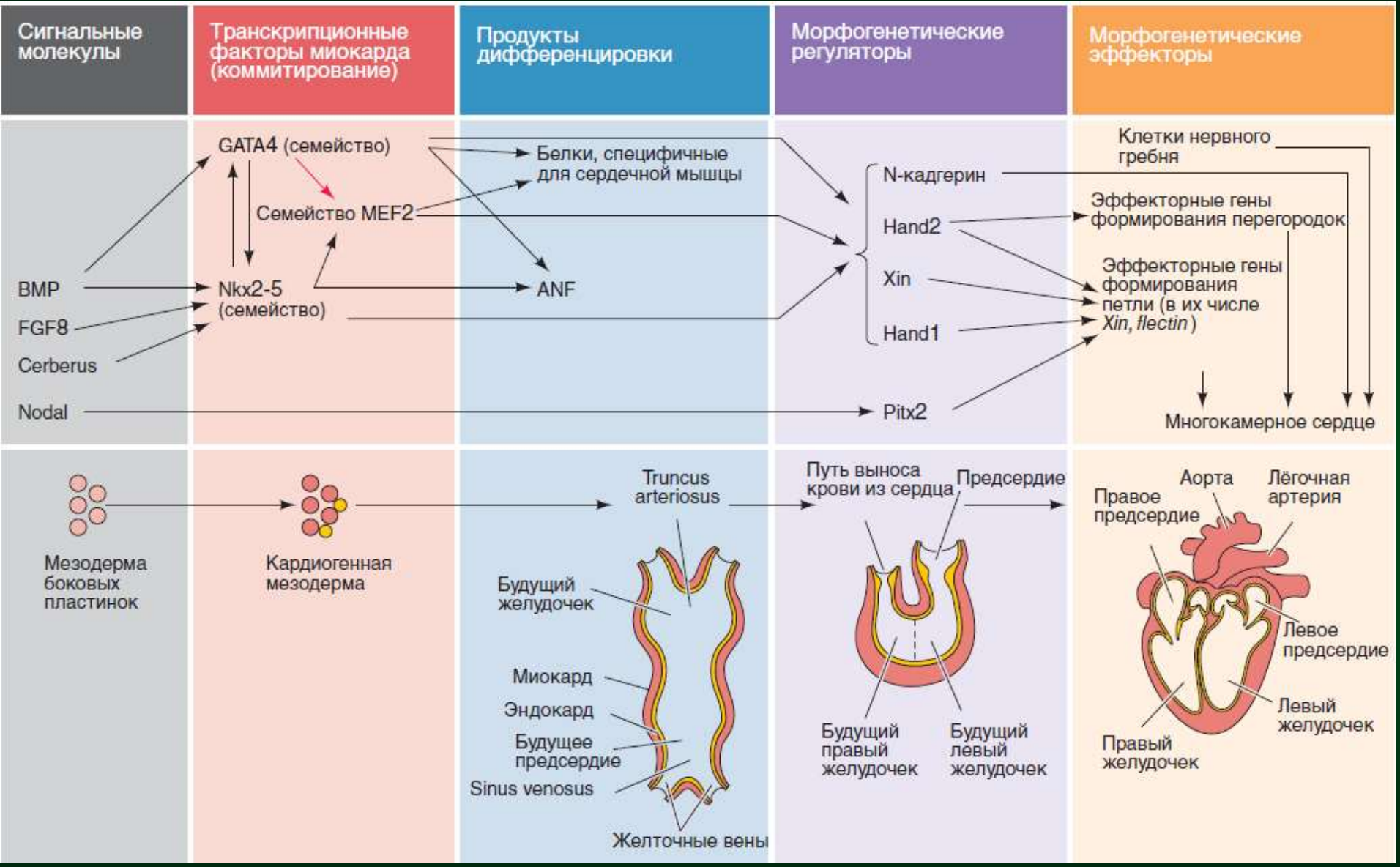




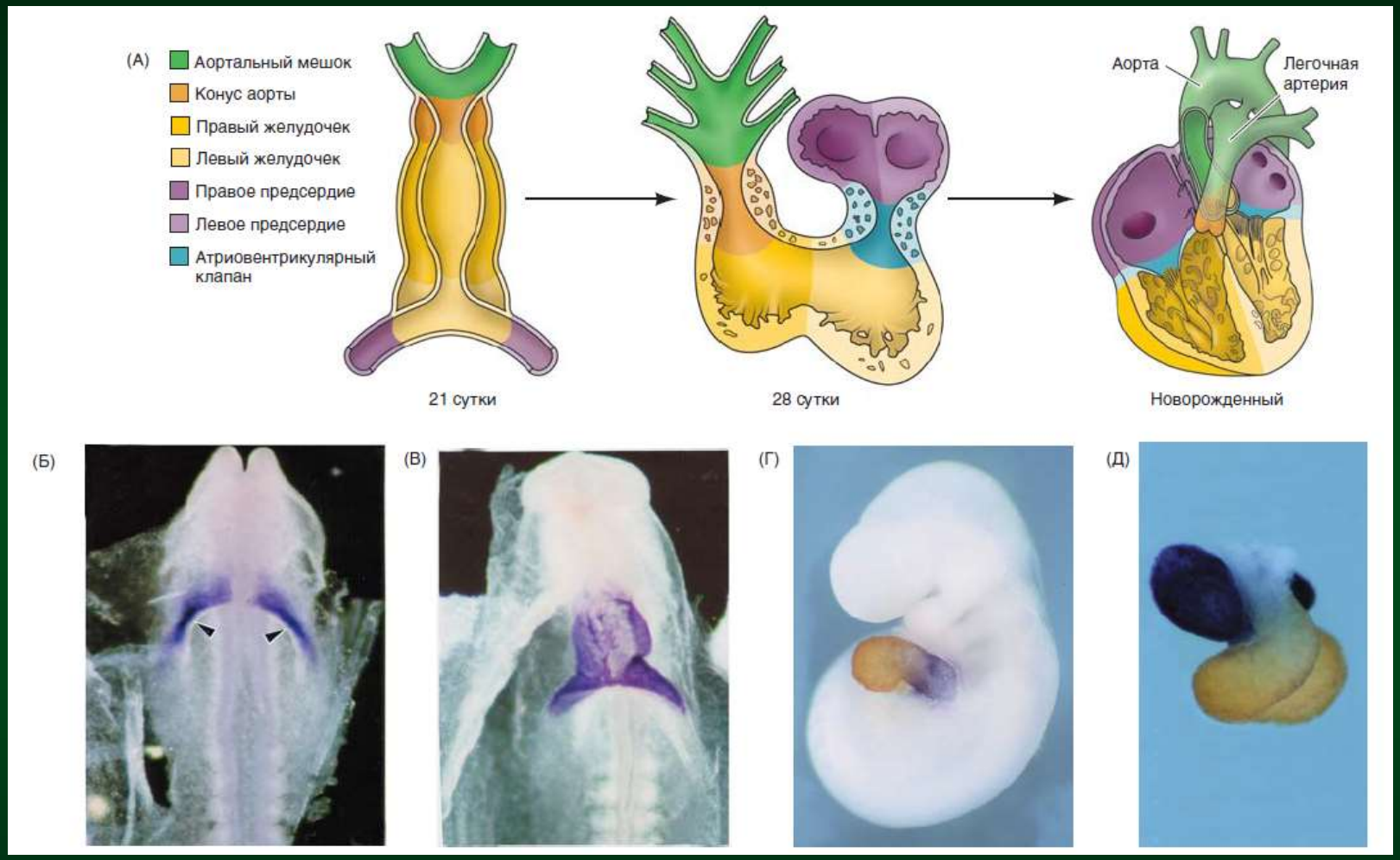
По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010

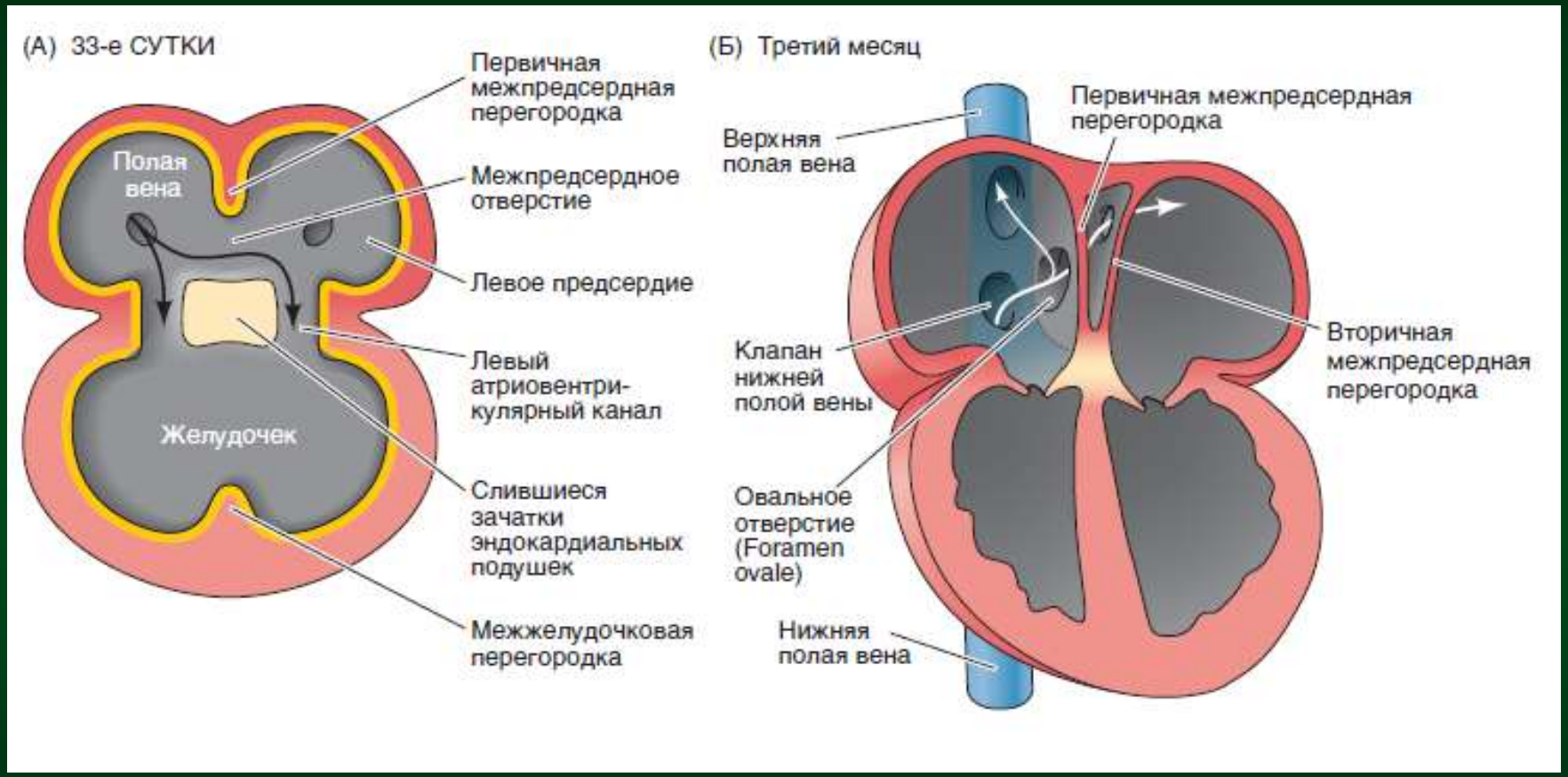


По Гилберт, 2010



Xin (по-китайски «сердце»), может опосредовать изменения цитоскелета, необходимые для изгибания сердечной трубки

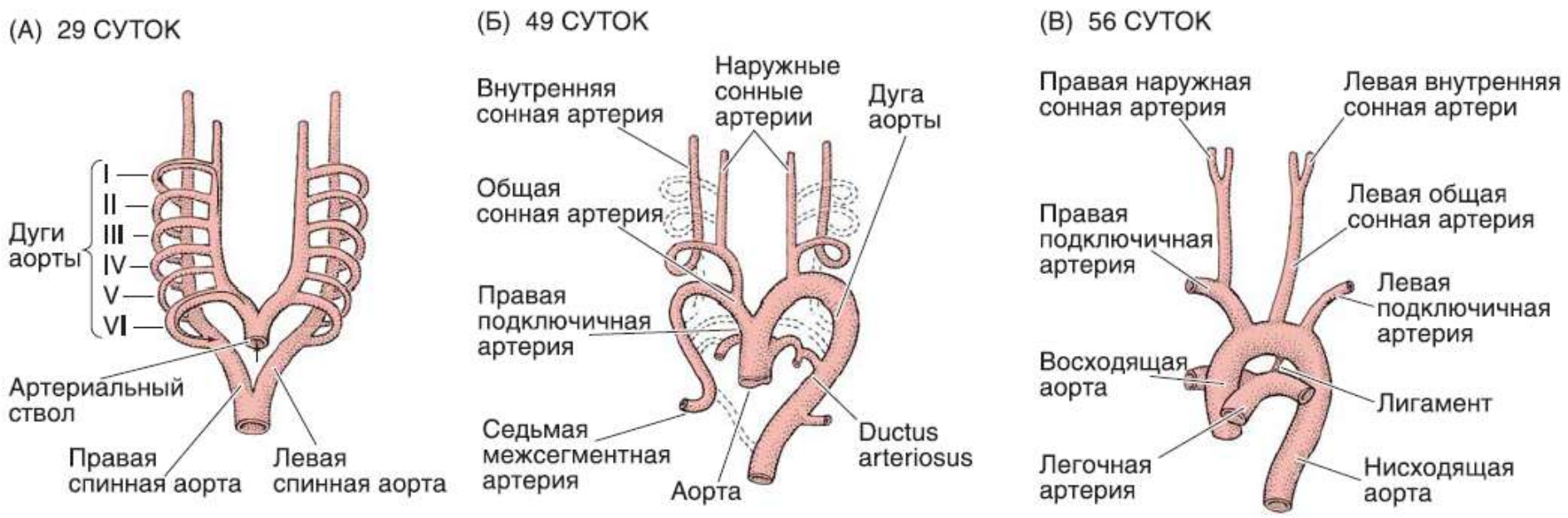
По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010

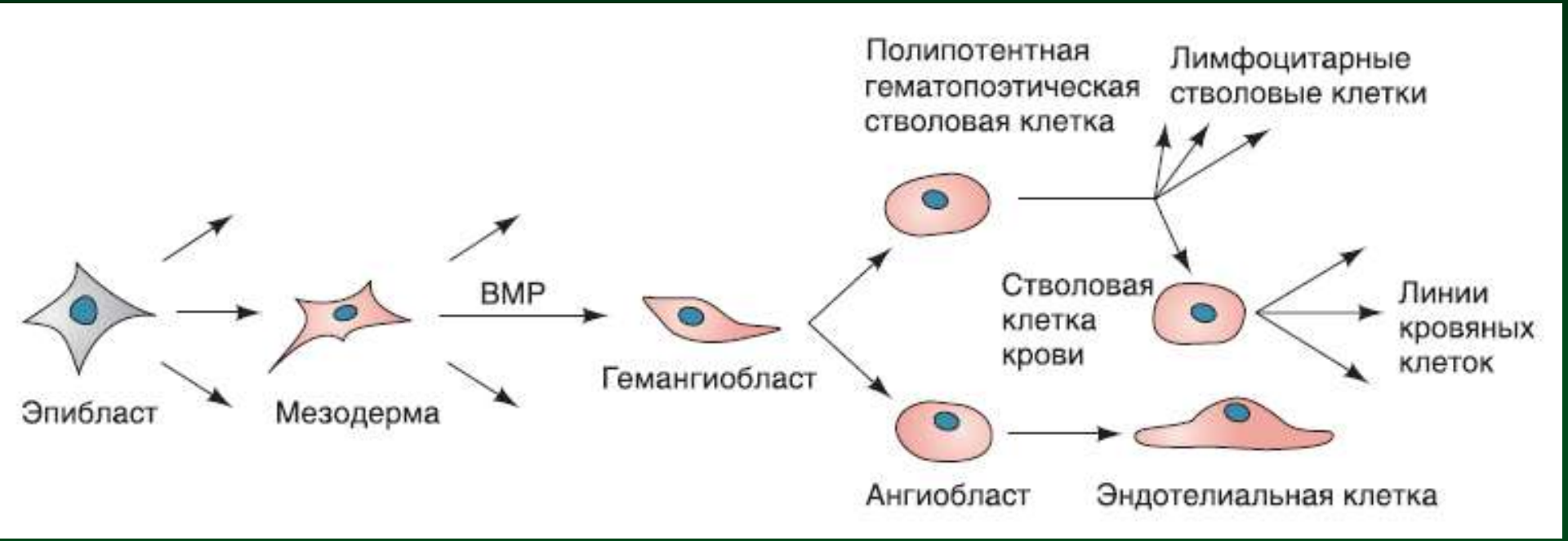
Формирование кровеносных сосудов

факторы, ограничивающие развитие сосудистой системы,
— *физиологический*
эмбриональная система кровообращения и внезародышевые структуры
— *эволюционный*
сосуды в желточный мешок
— *физический*
эффективность транспорта и диффузии



По Гилберт, 2010

васкулогенез и ангиогенез

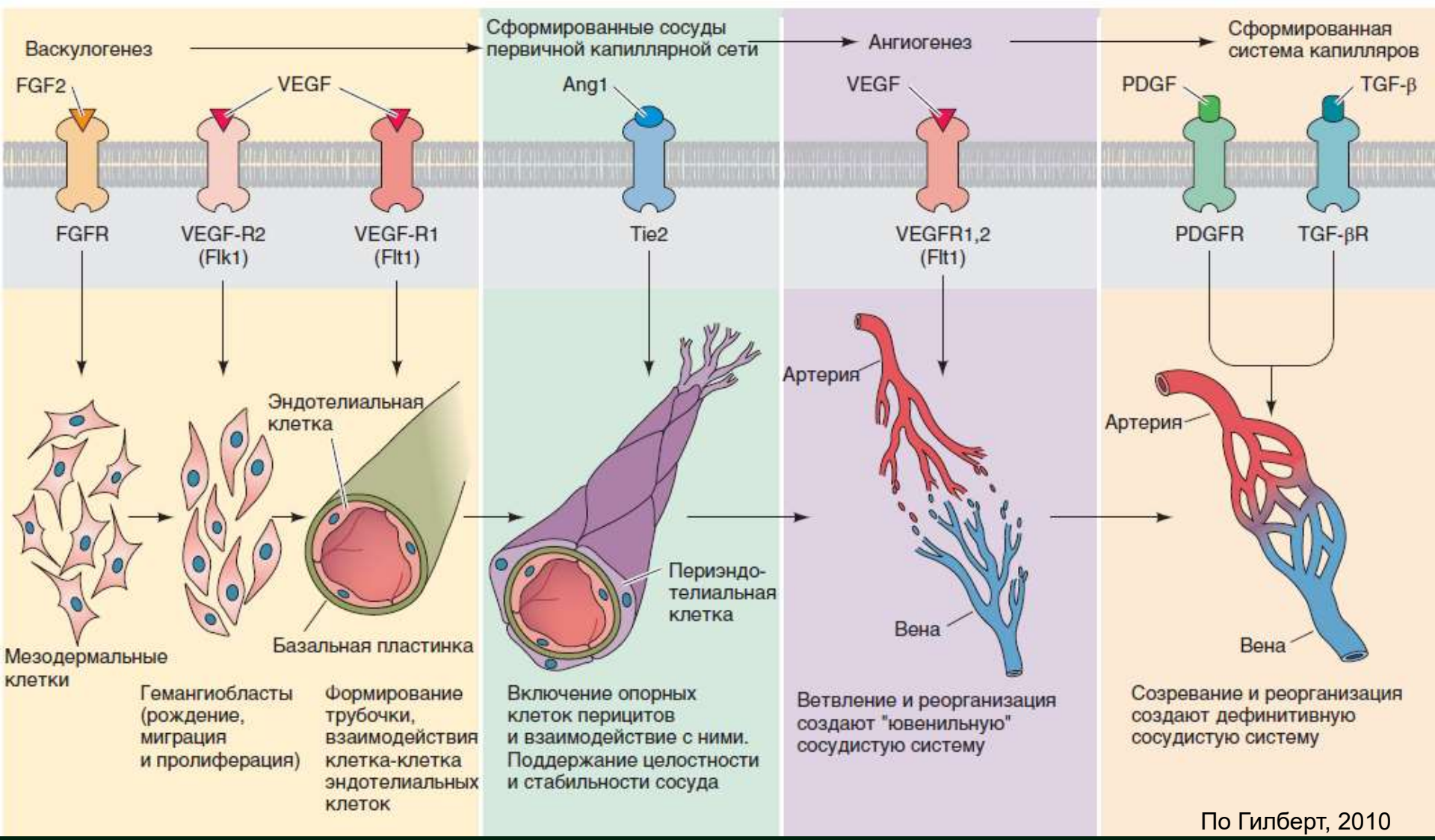


внезародышевый васкулогенез
кровяные островки

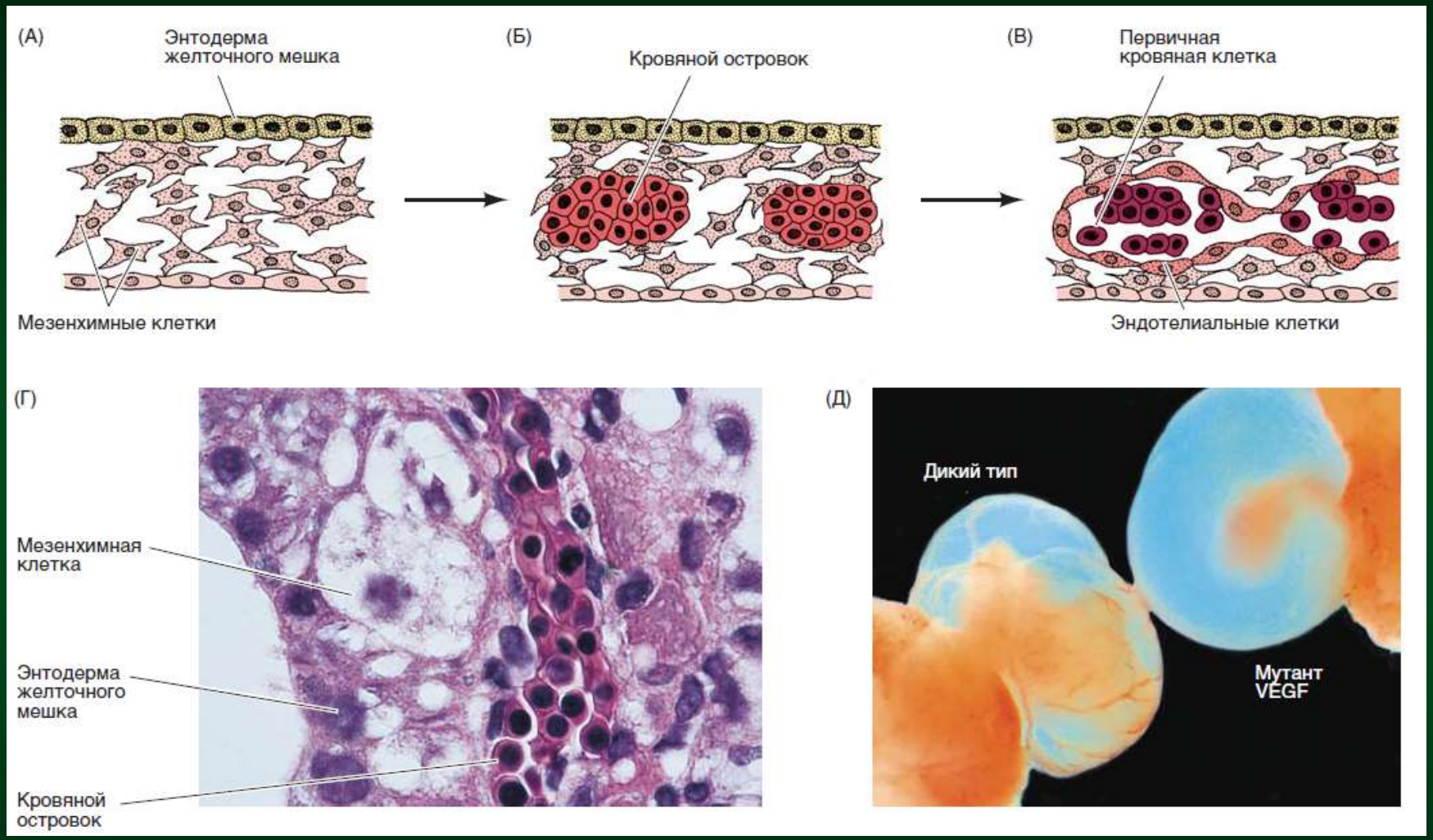
внутризародышевый васкулогенез
из единичных ангиобластных клеток-предшественниц в мезодерме, окружающей формирующийся орган

васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF)
из мезенхимных клеток - лигант к тирозинкиназе Flk1

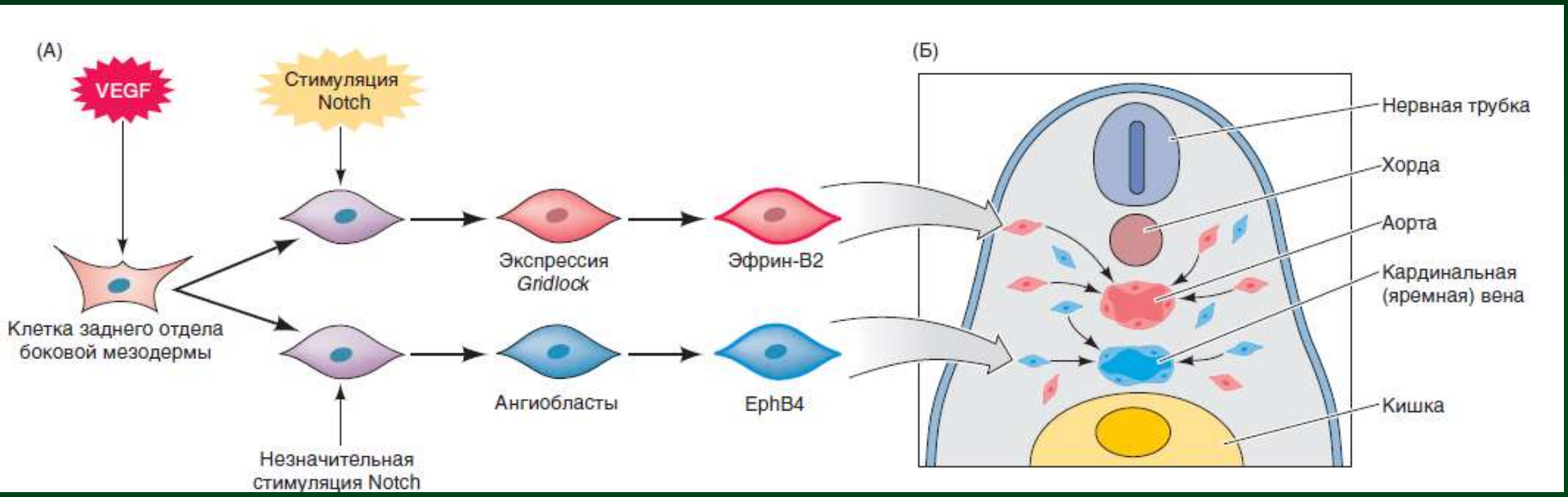
фактор роста кровяных пластинок, PDGF



По Гилберт, 2010

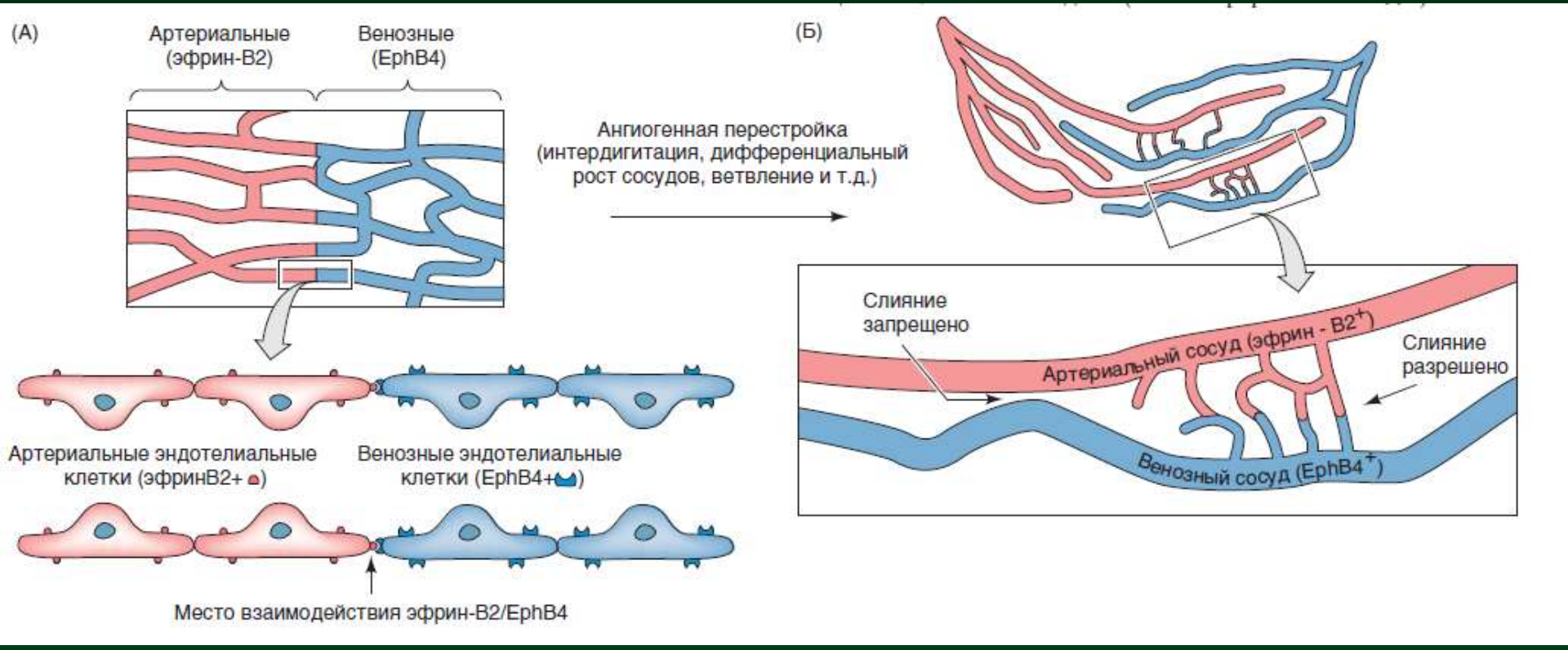


По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010

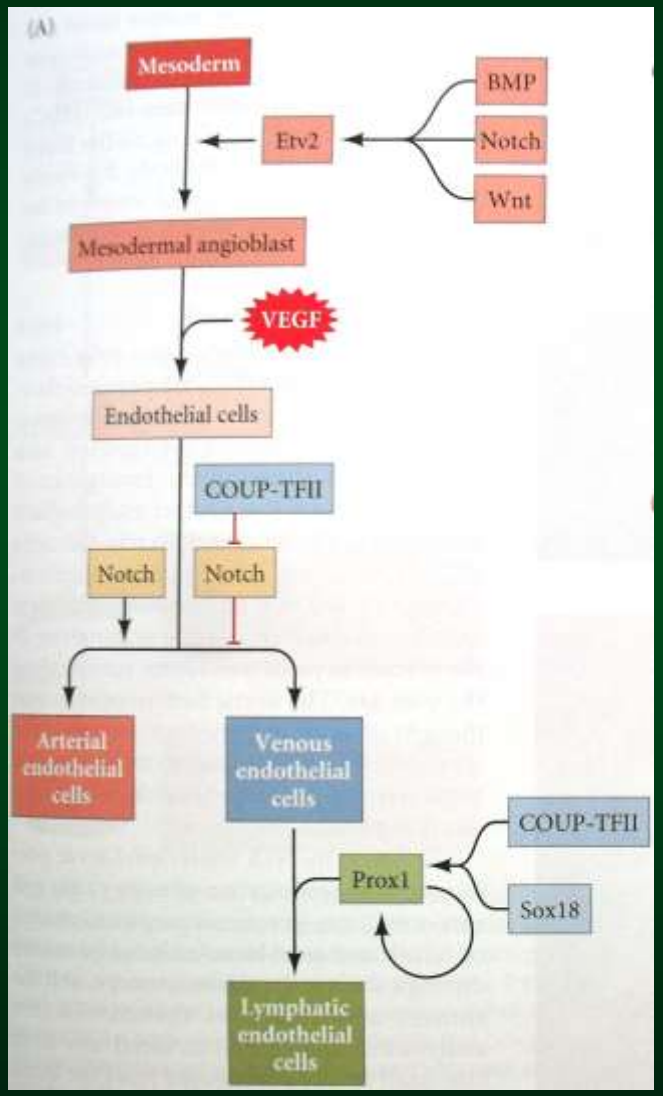
в ходе **ангиогенеза** происходит реорганизация первичной капиллярной сети, которая сокращается до более простой и четкой системы капилляров, артерий и вен

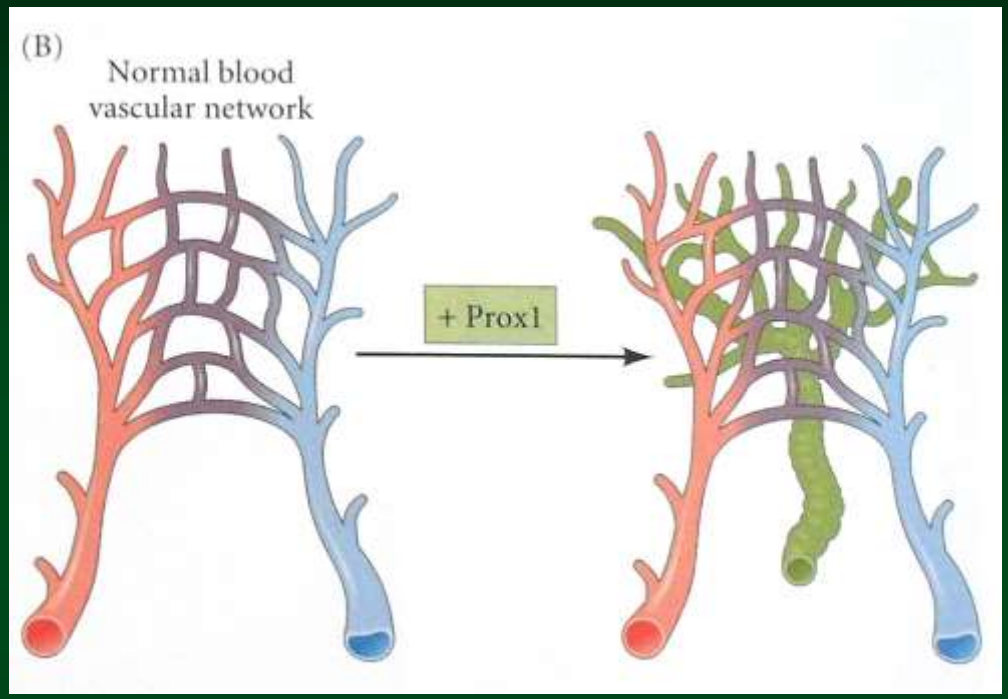


рецептор EphB4
лиганд эфрин-В2

По Гилберт, 2010

Продолжительная экспрессия Prox1 приводит к репрессии генов развития венозных кровеносных сосудов и активирует гены лимфатических

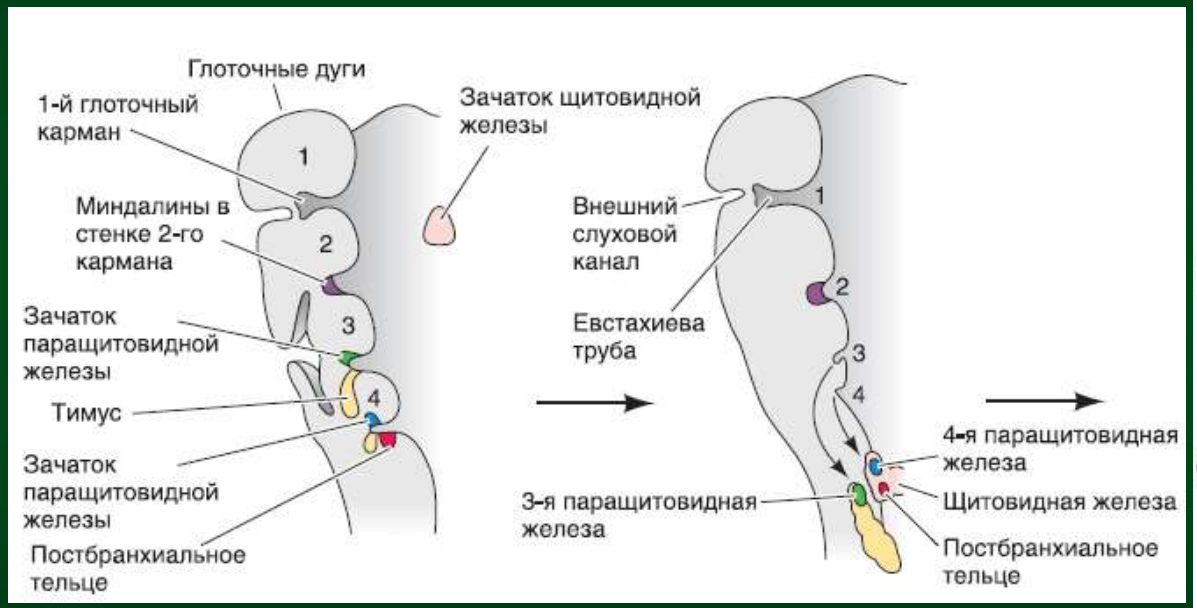


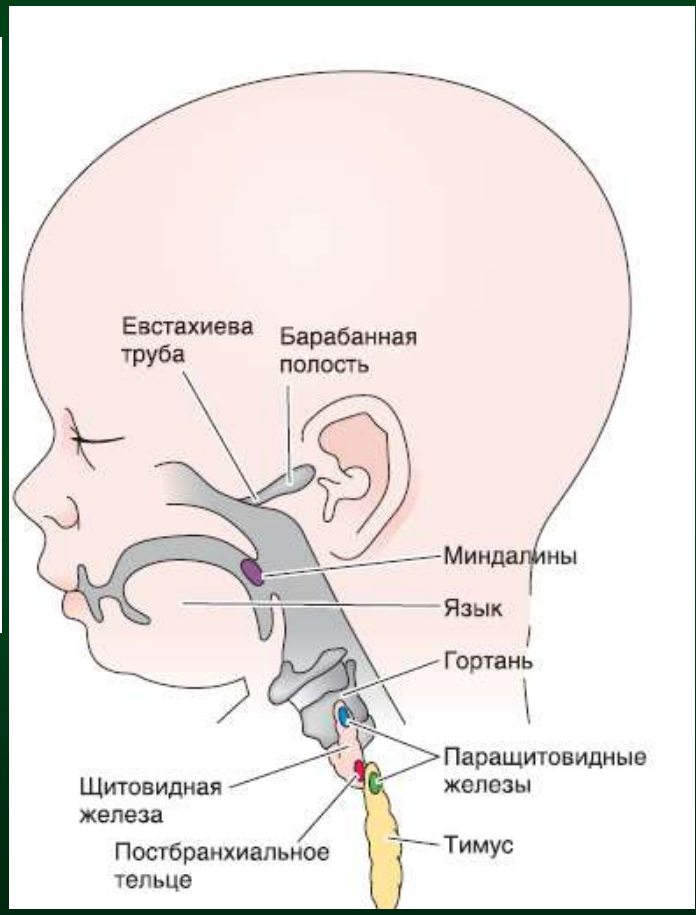


ЭНТОДЕРМА

глотка
пищеварительная трубка:
дыхательная трубка

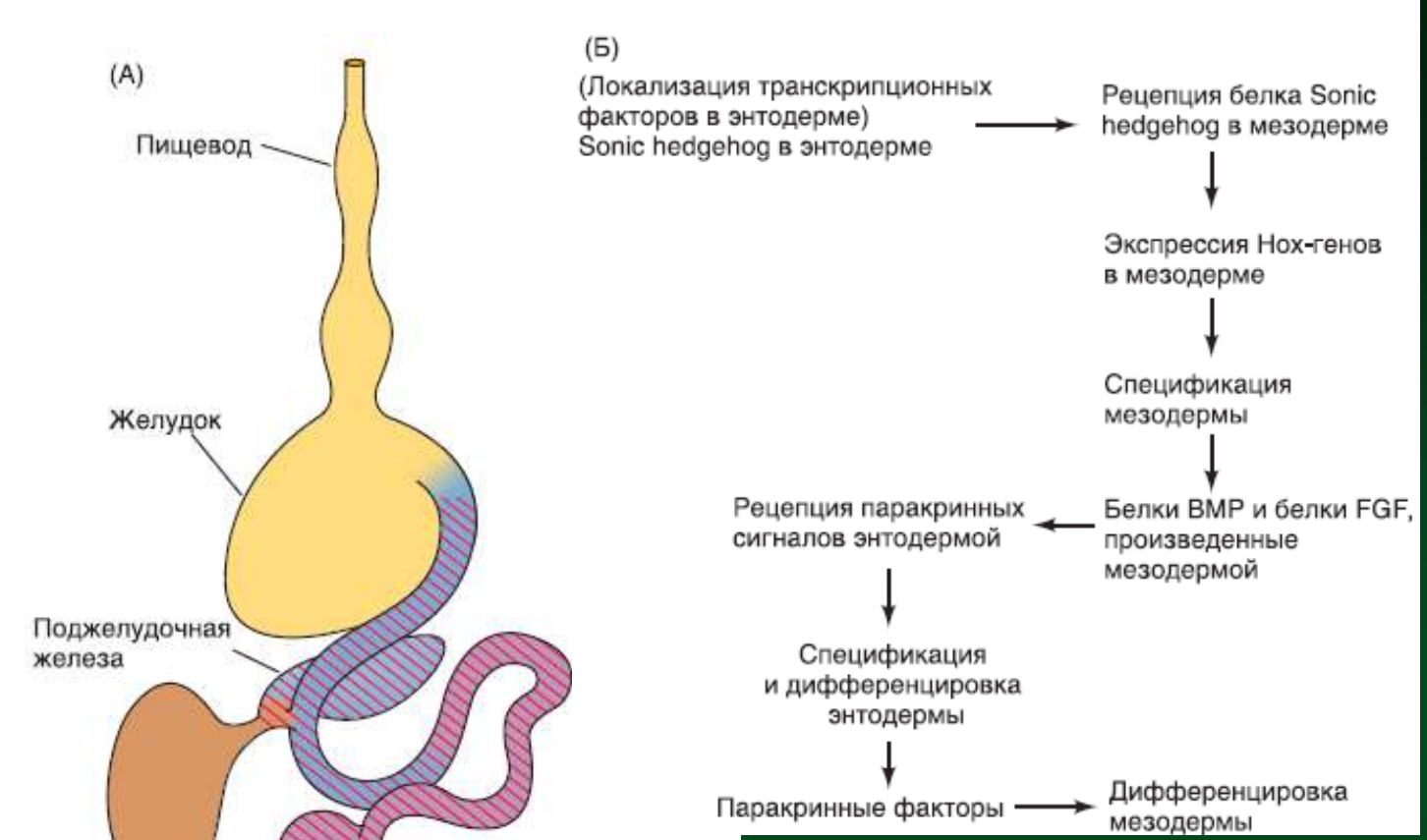
Формирование зачатков желез из четырех пар глоточных карманов





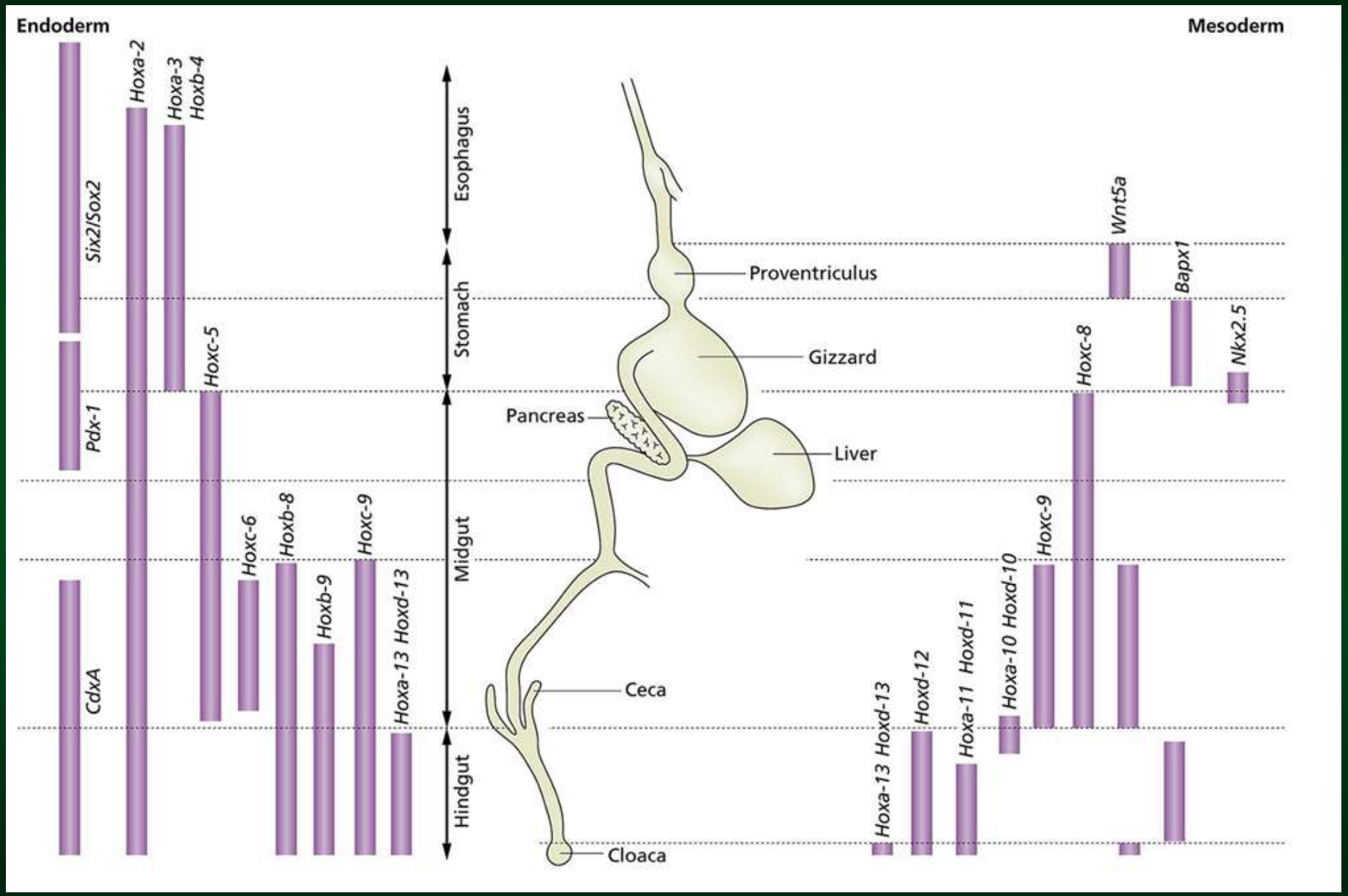
По Гилберт, 2010

Пищеварительная трубка и её производные

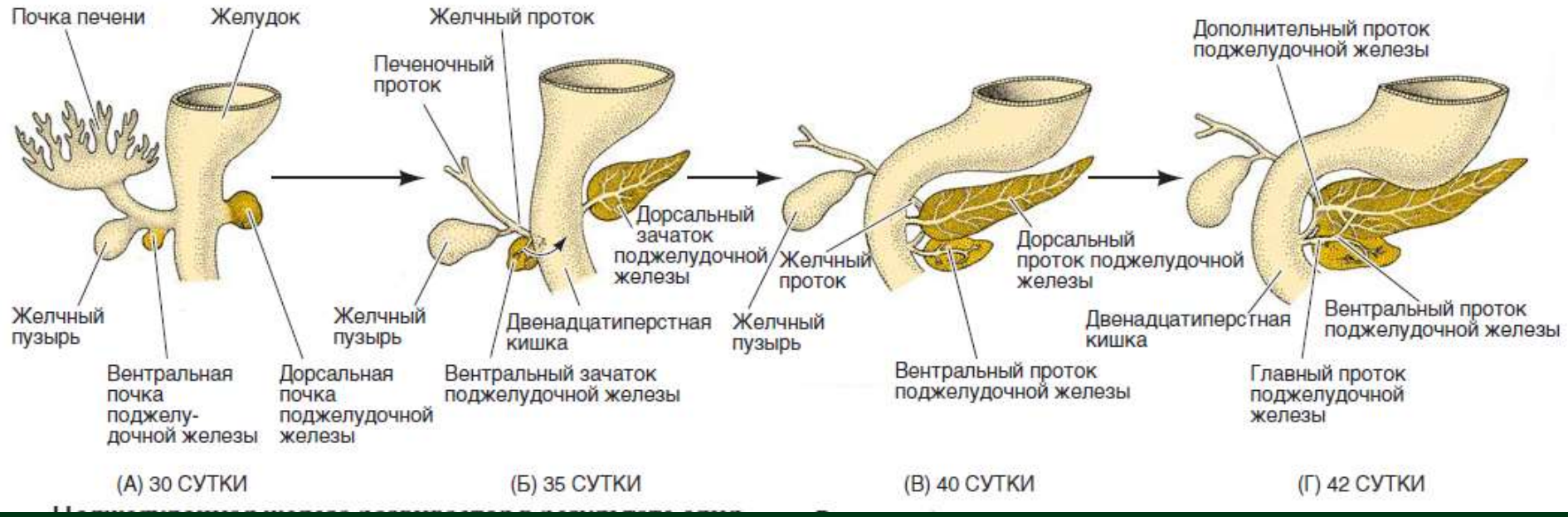


Спецификация ткани кишки происходит на ранних стадиях

По Гилберт, 2010


Endoderm
Mesoderm
Six2/Sox2
Pdx-1
CdxA
Hoxa-2
Hoxa-3
Hoxb-4
Hoxc-5
Hoxc-6
Hoxb-8
Hoxb-9
Hoxc-9
Hoxa-13 Hoxd-13
Esophagus
Stomach
Midgut
Hindgut
Proventriculus
Gizzard
Pancreas
Liver
Ceca
Cloaca
Hoxa-13 Hoxd-13
Hoxd-12
Hoxa-11 Hoxd-11
Hoxa-10 Hoxd-10
Hoxc-9
Hoxc-8
Wnt5a
Bapx1
Nkx2.5

Печень, поджелудочная железа и желчный пузырь

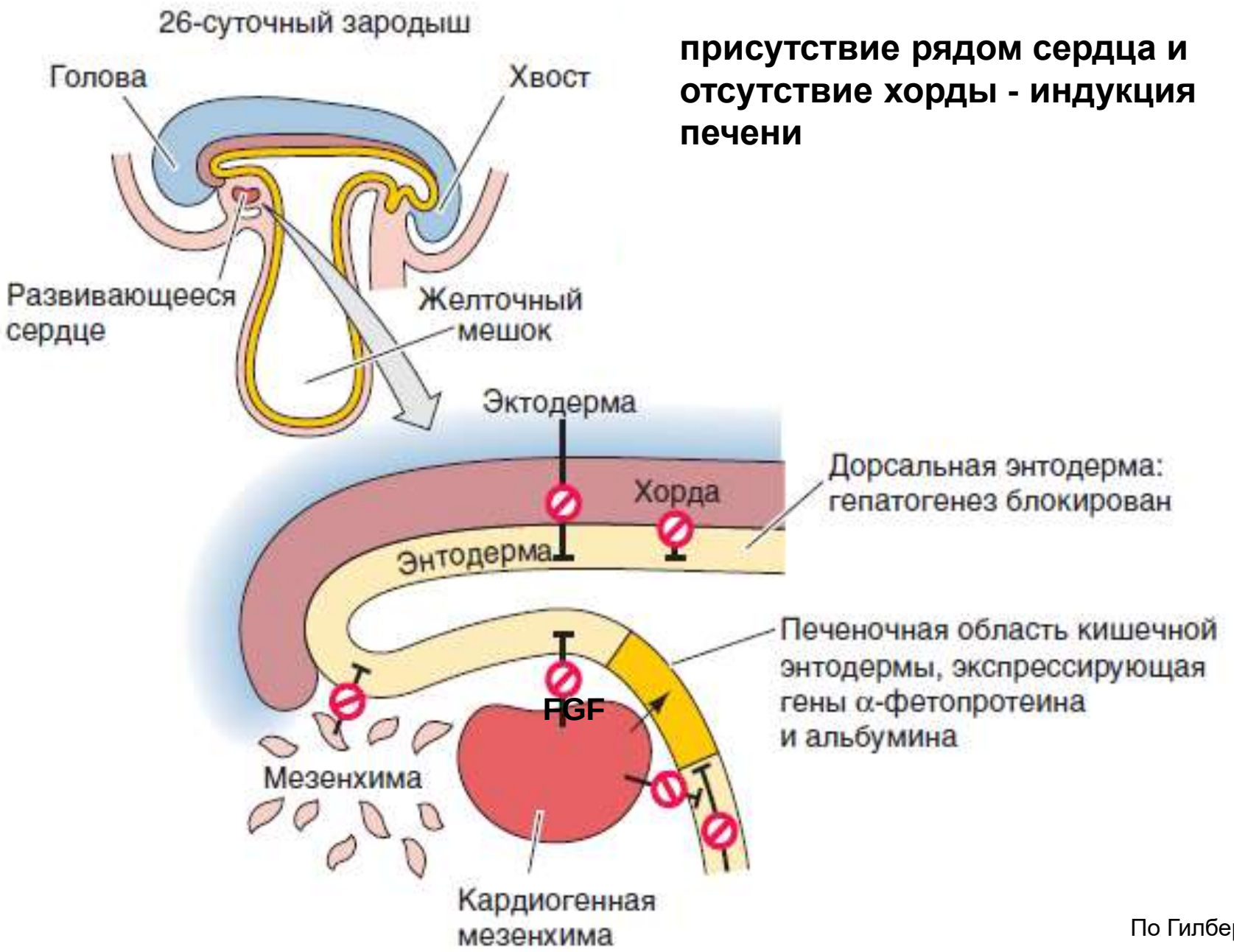


По Гилберт, 2010

Печень

экспрессия pdx1 в энтодерме

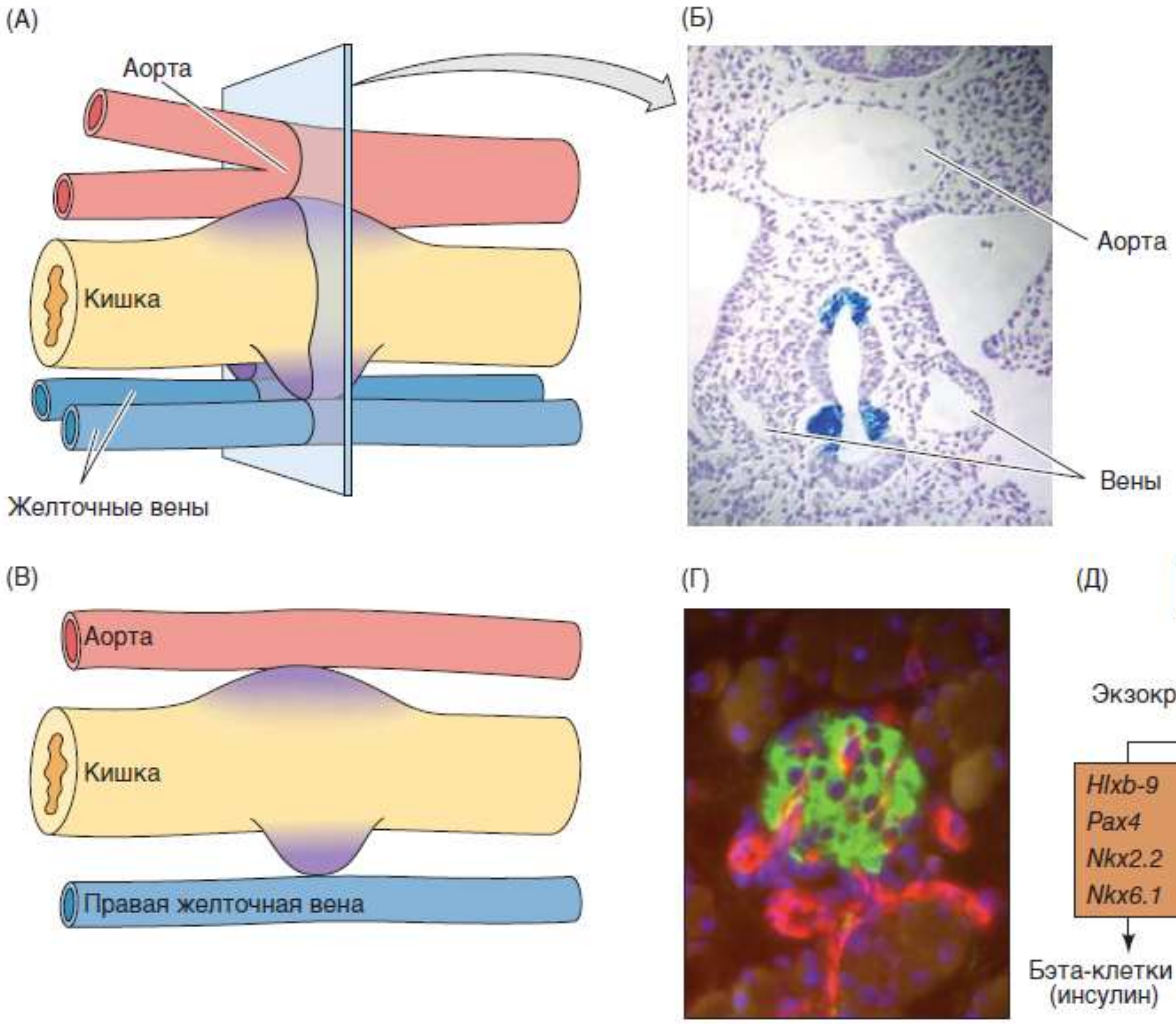
присутствие рядом сердца и отсутствие хорды - индукция печени



По Гилберт, 2010

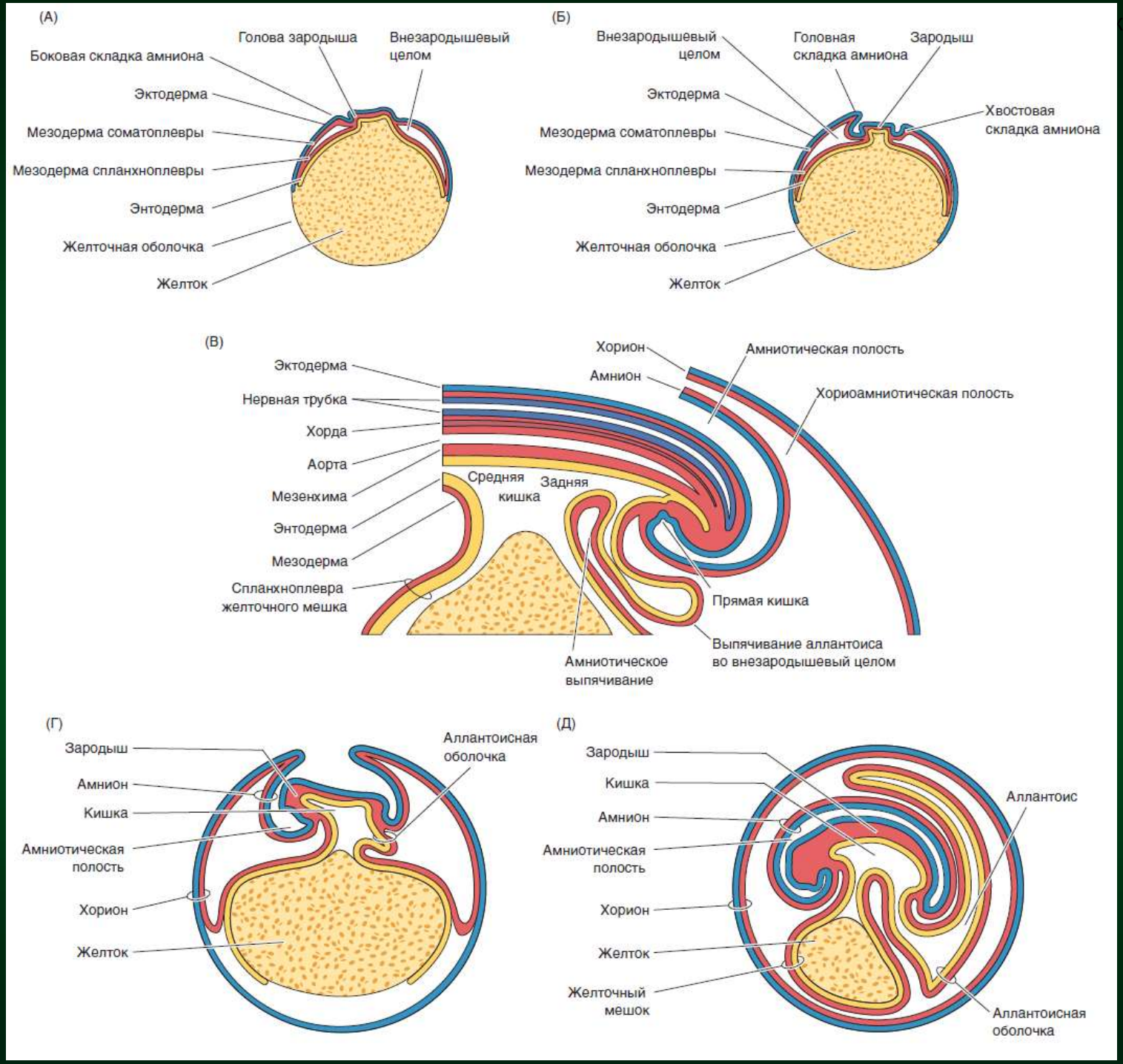
поджелудочная железа

Индукция гена *pdx1* в кишечном эпителии



наличие рядом хорды и отсутствие сердца — индукция поджелудочной железы

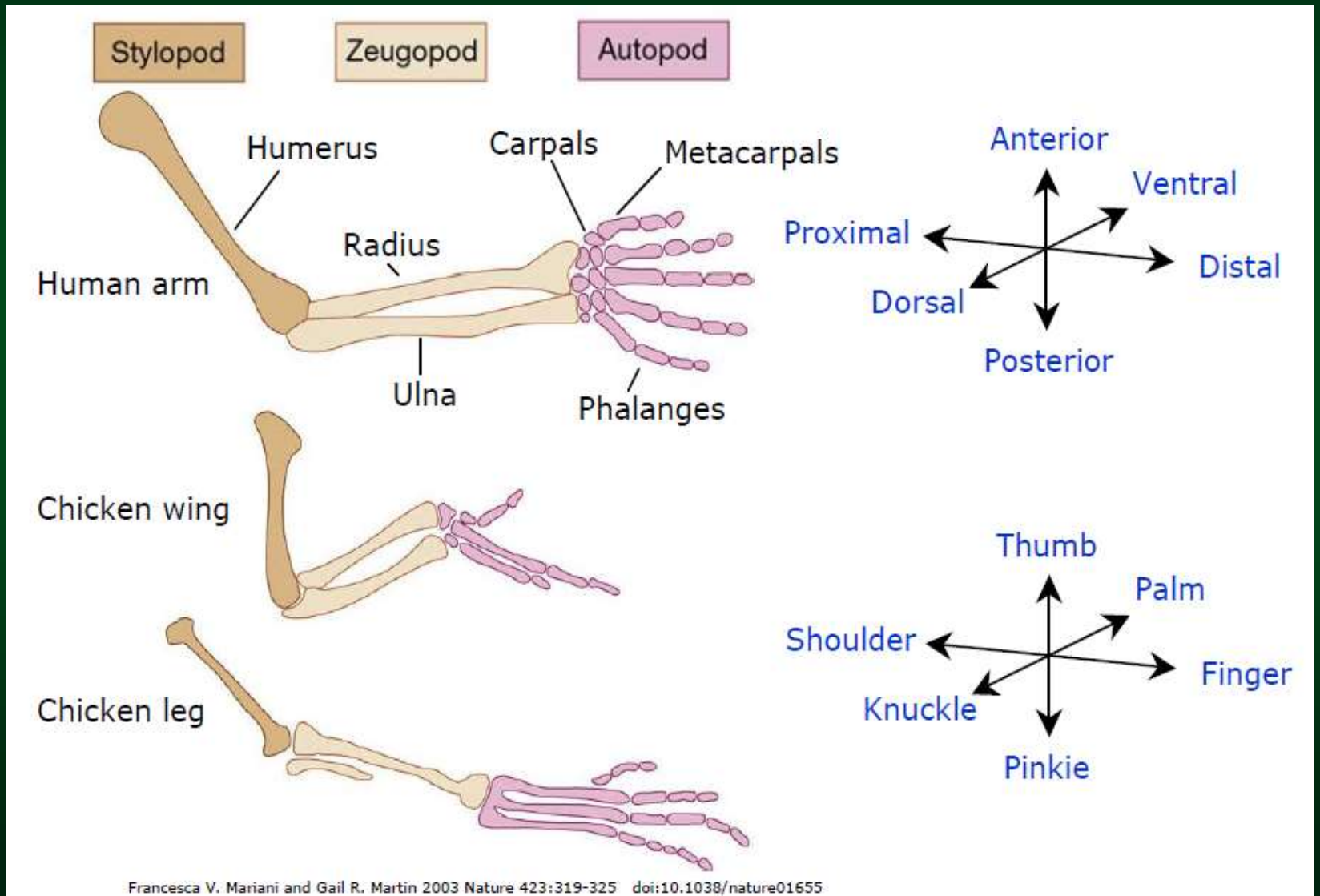
По Гилберт, 2010



По Гилберт, 2010

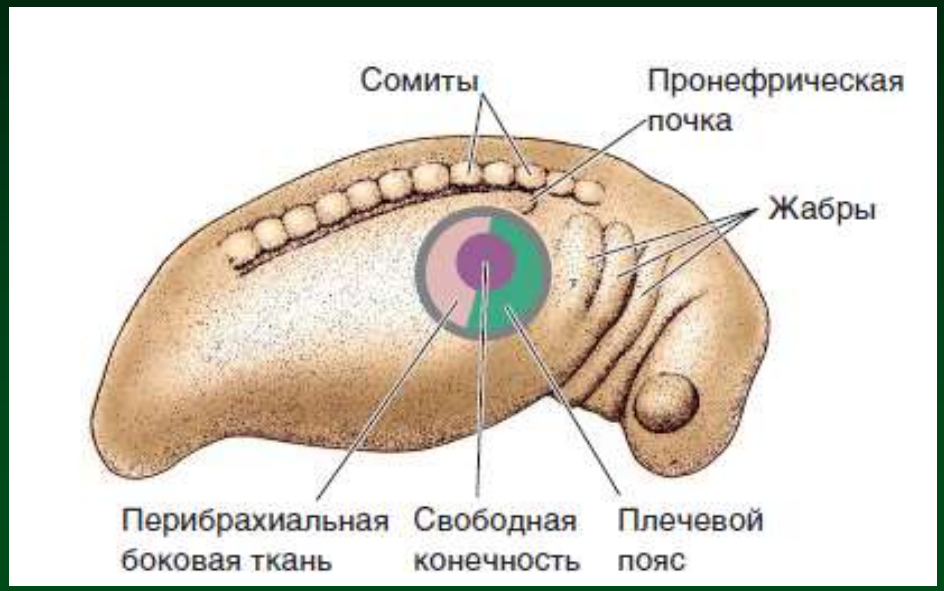
Развитие конечности тетрапод

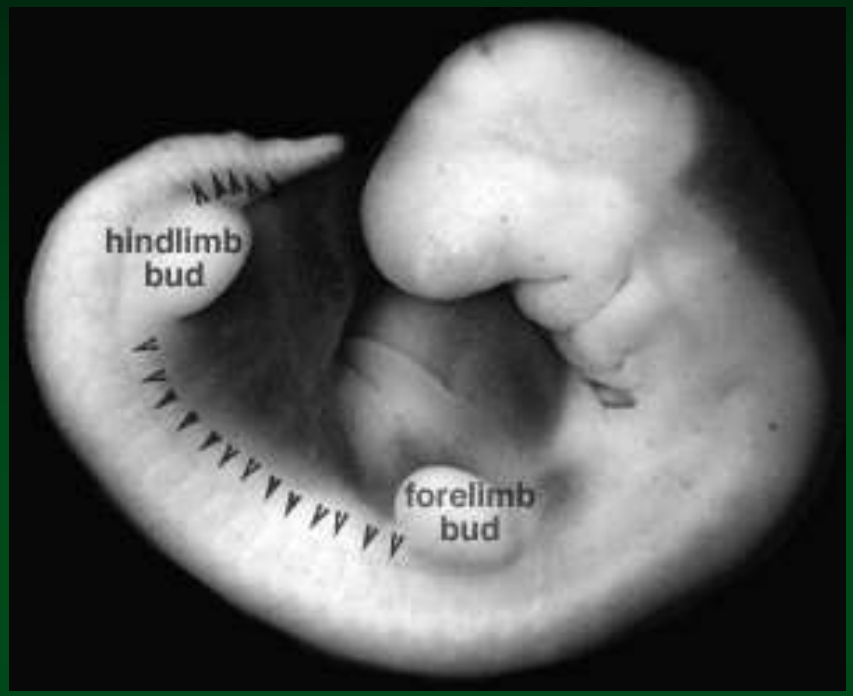
стилоподий (плечо/бедро)
зигоподий (лучевая-локтевая кости/большая-малая берцовая)
аутоподий (запястье-пальцы/плюсна-пальцы ноги)



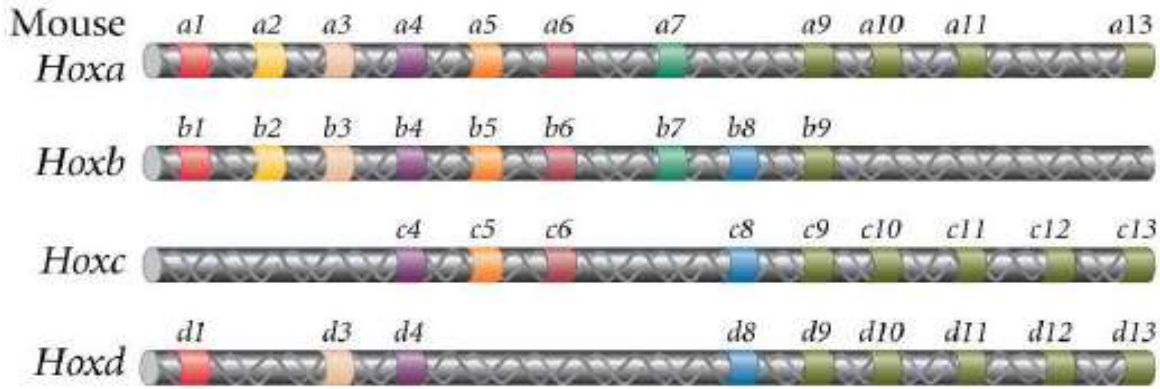
Формирование почки конечности

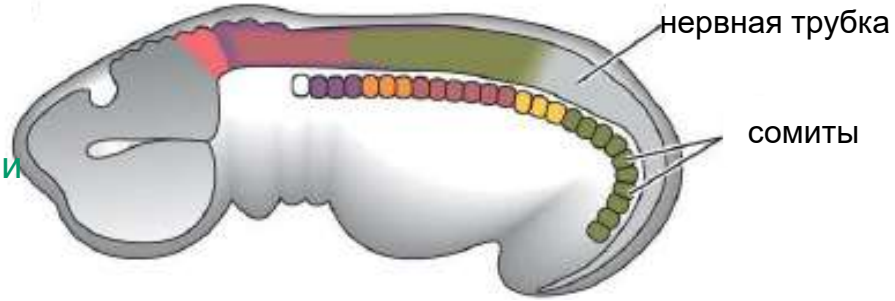
Формирование паттерна



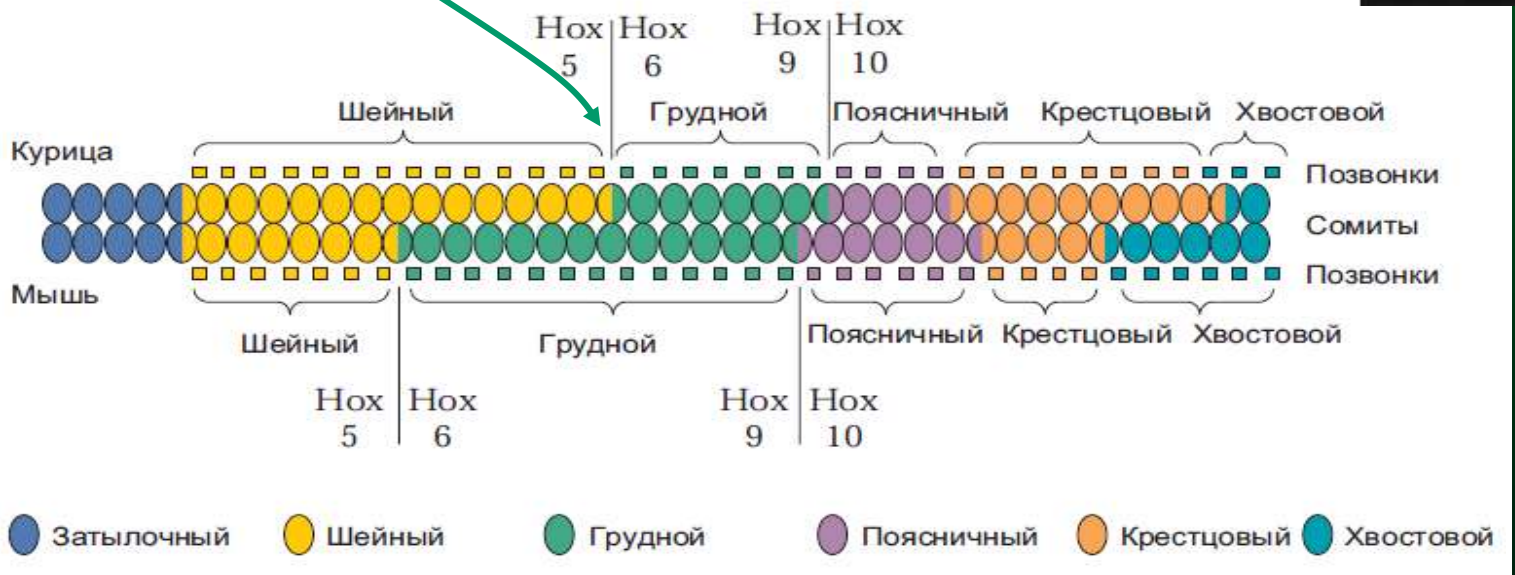


Спецификация полей конечности: Hox-гены и ретиноевая кислота

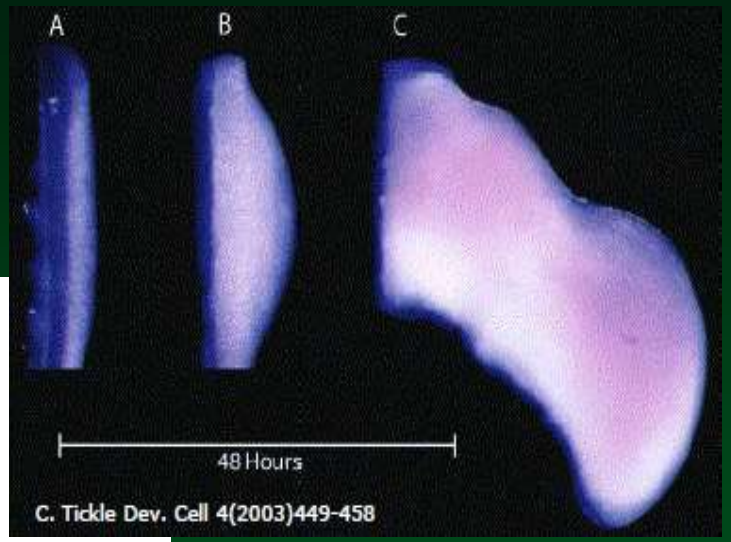


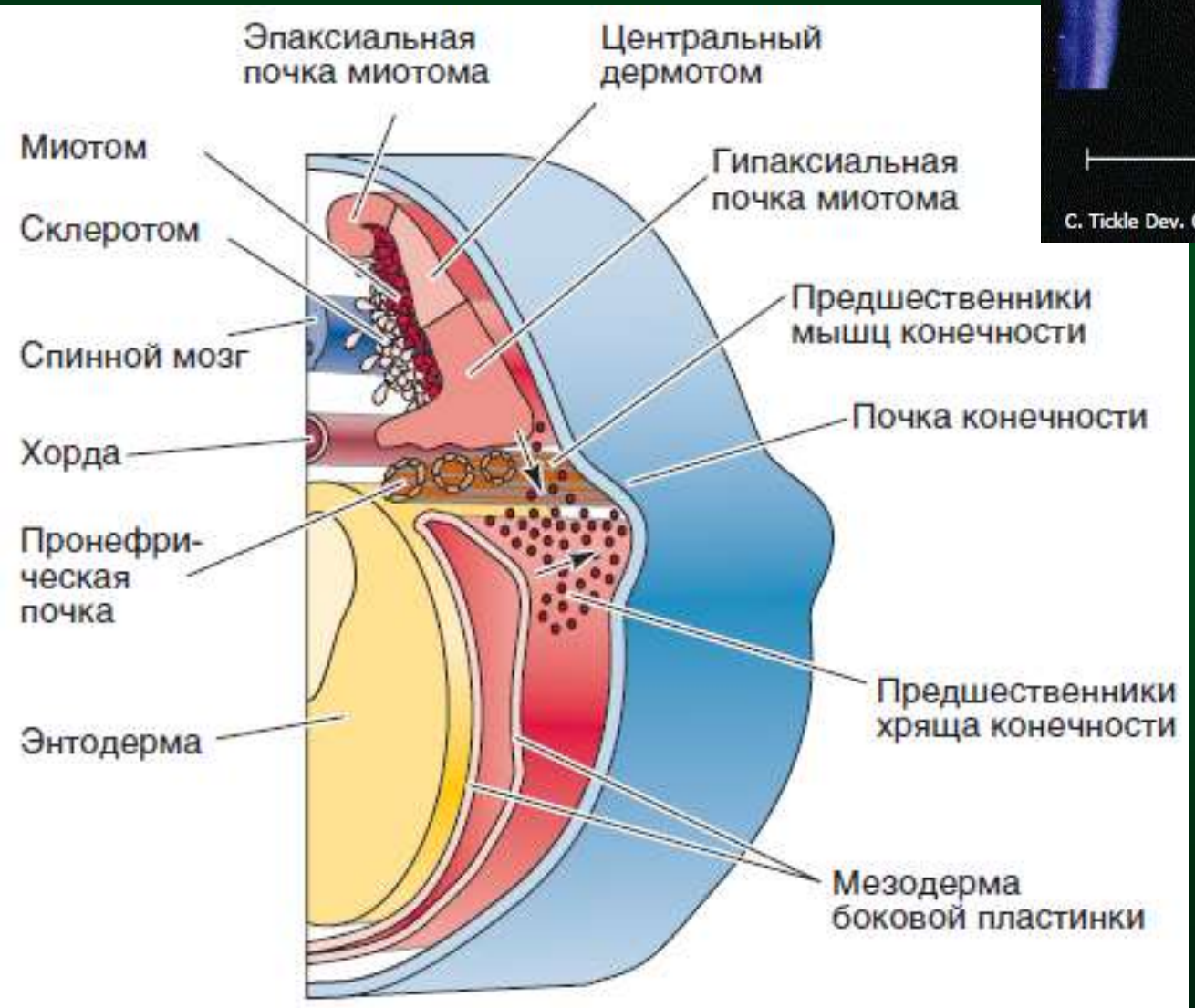


почки передних конечностей закладываются в крайней передней области экспрессии гена *Hoxc-6*, которая соответствует положению первых грудных позвонков



почка конечности

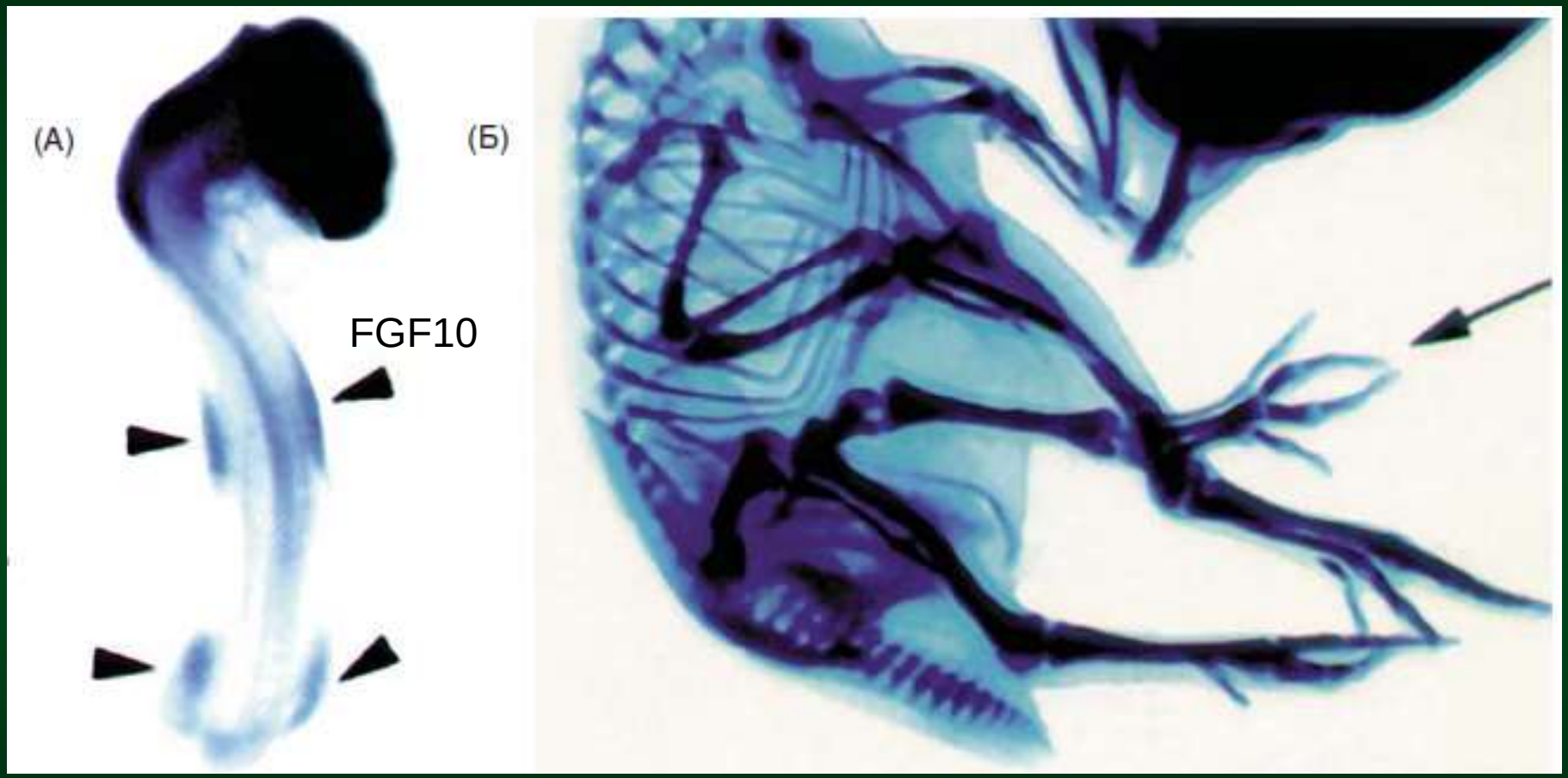




округлый бугорок - **почка конечности**

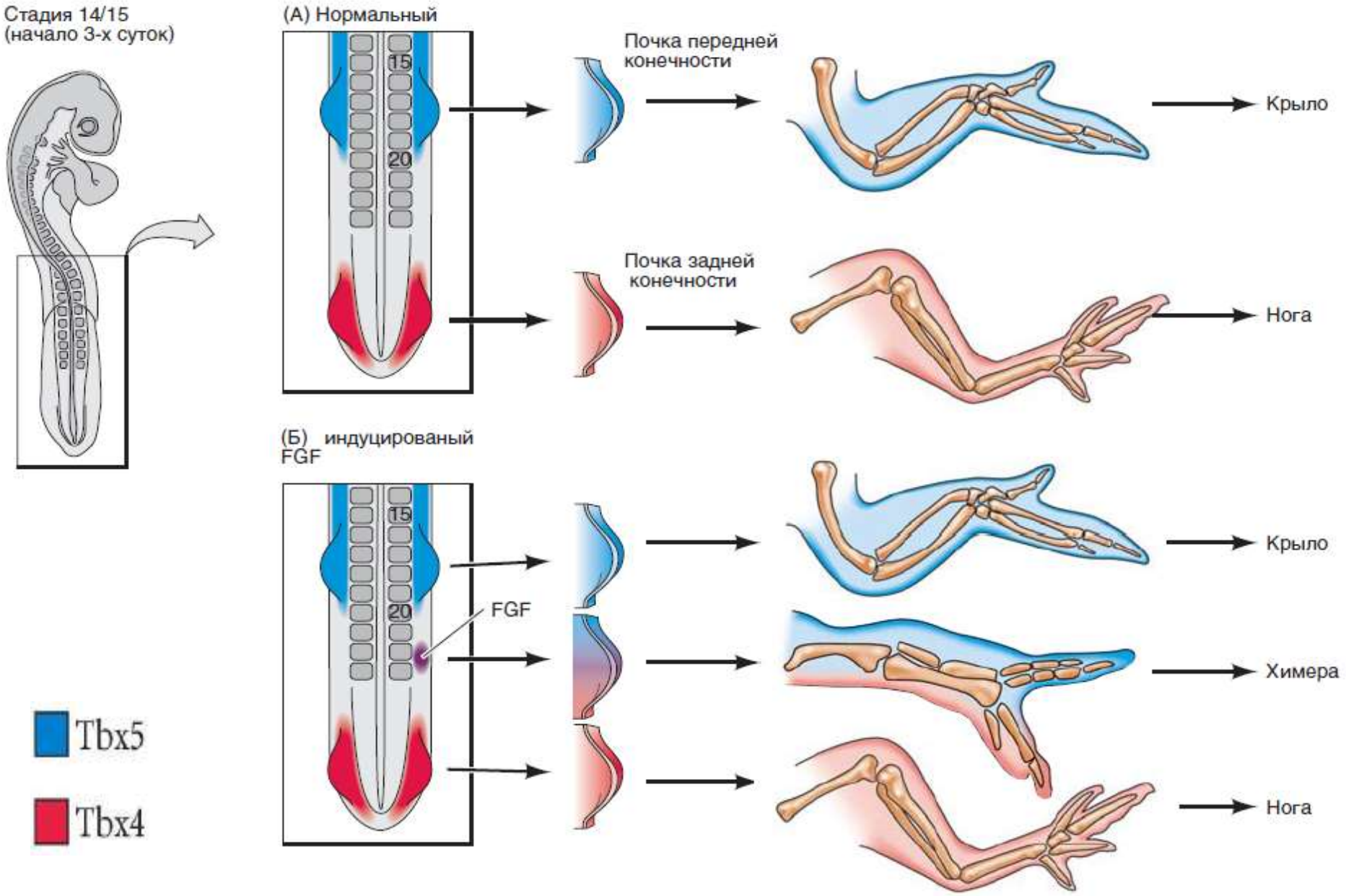
По Гилберт, 2010

Формирование паттерна

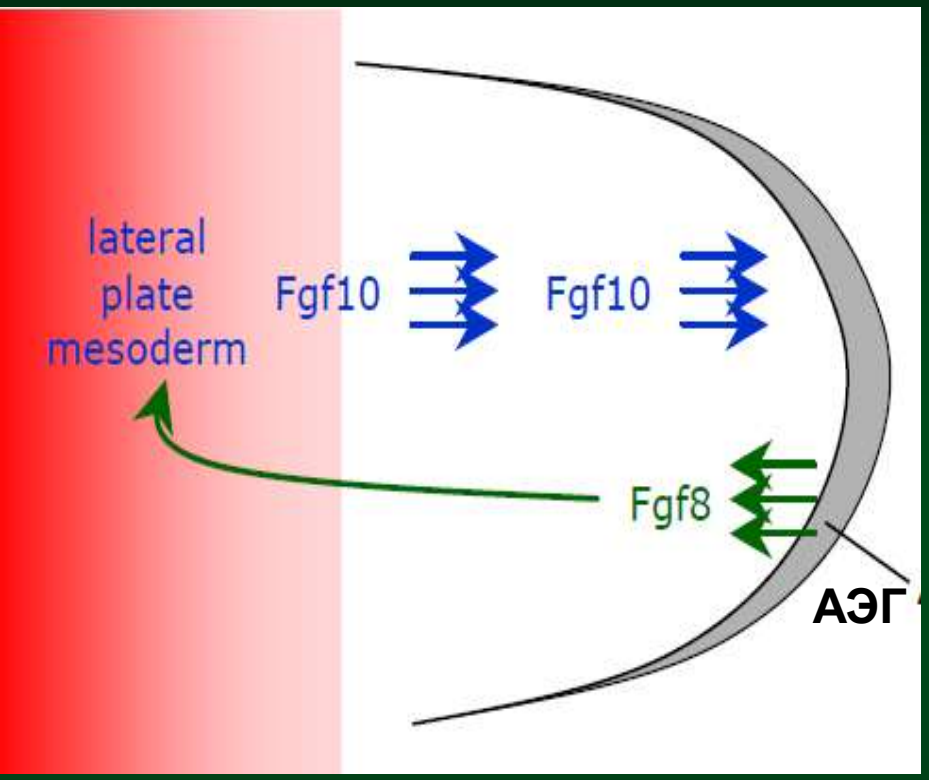


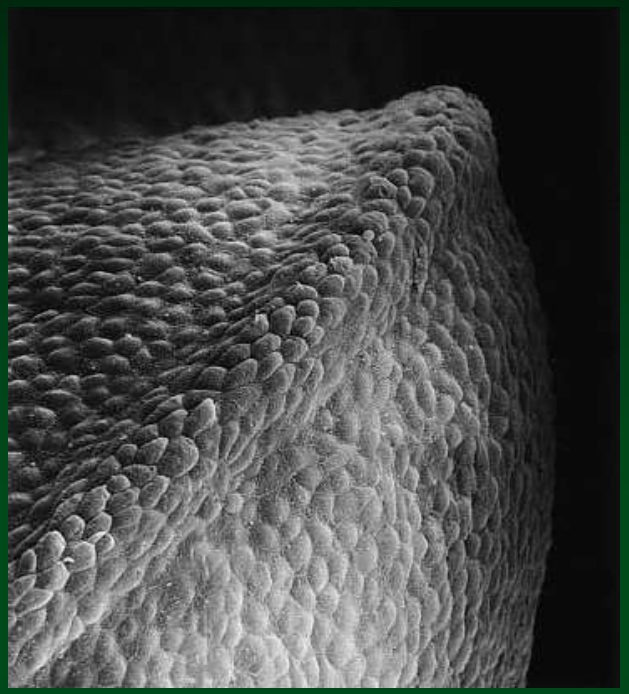
По Гилберт, 2010

Tbx гены специфицируют тип почки конечности



Апикальный эктодермальный гребень - сигнальный центр развивающейся конечности





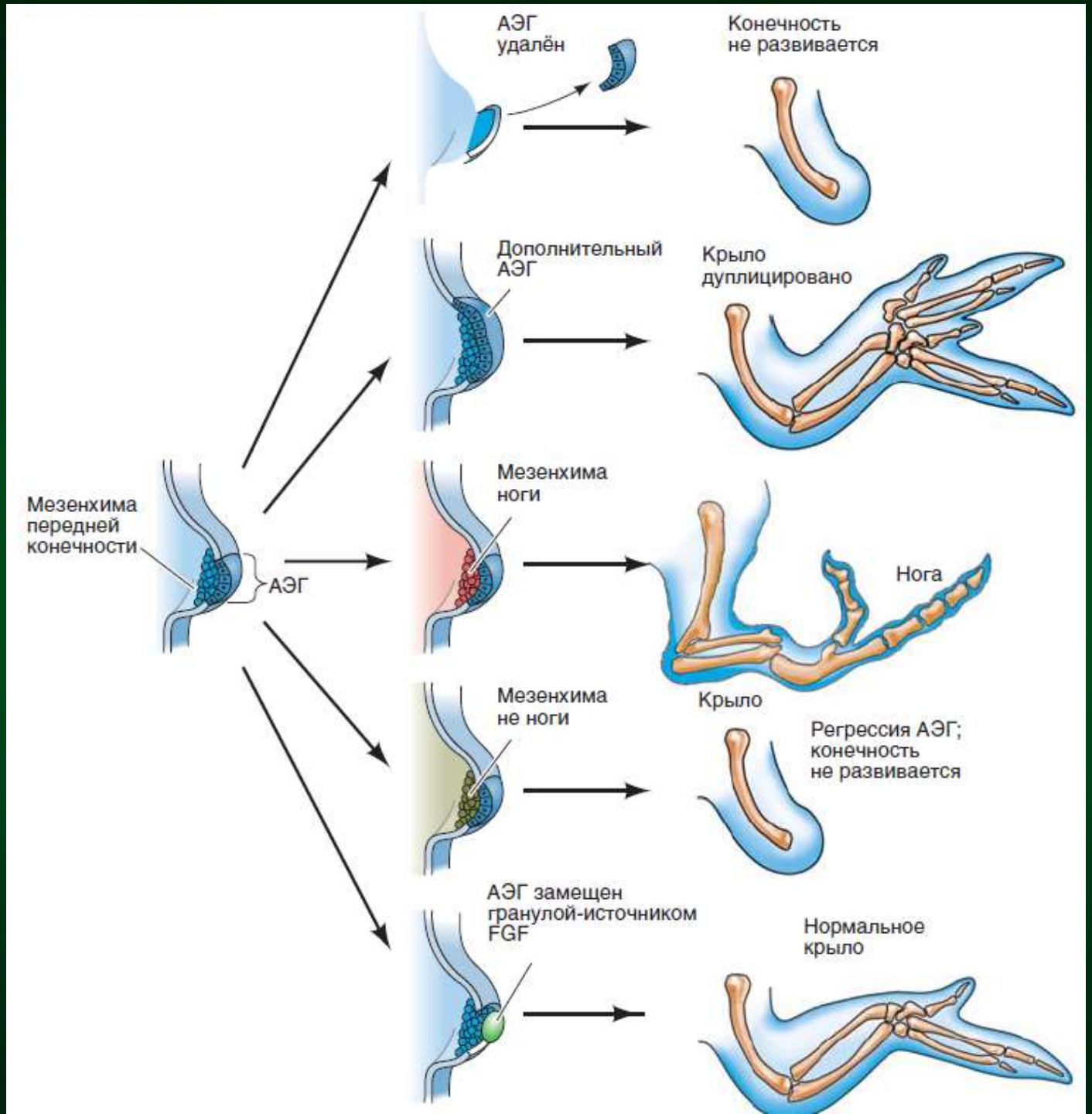
Формируется на границе дорсальной и вентральной эктодермы, индуцируется и поддерживается мезенхимой

Апикальный эктодермальный гребень - сигнальный центр развивающейся конечности

Fgf10 индуцирует АЭГ via Wnt3a, βcatenin

АЭГ экспрессирует Fgf8, Fgf4 и поддерживает экспрессию Fgf10

(1) поддержание пролиферации в подлежащей мезенхиме (**зоне прогресса**) (через Fgf8) , что обусловливает линейный (проксимодистальный) рост конечности; (2) поддержание экспрессию молекул, от которых зависит создание переднезадней оси (большой палец-мизинец); (3) такое взаимодействие с белками, специфицирующими переднезаднюю и дорсовентральную оси, в результате которого каждая клетка получает инструкции о способе ее дифференцировки.

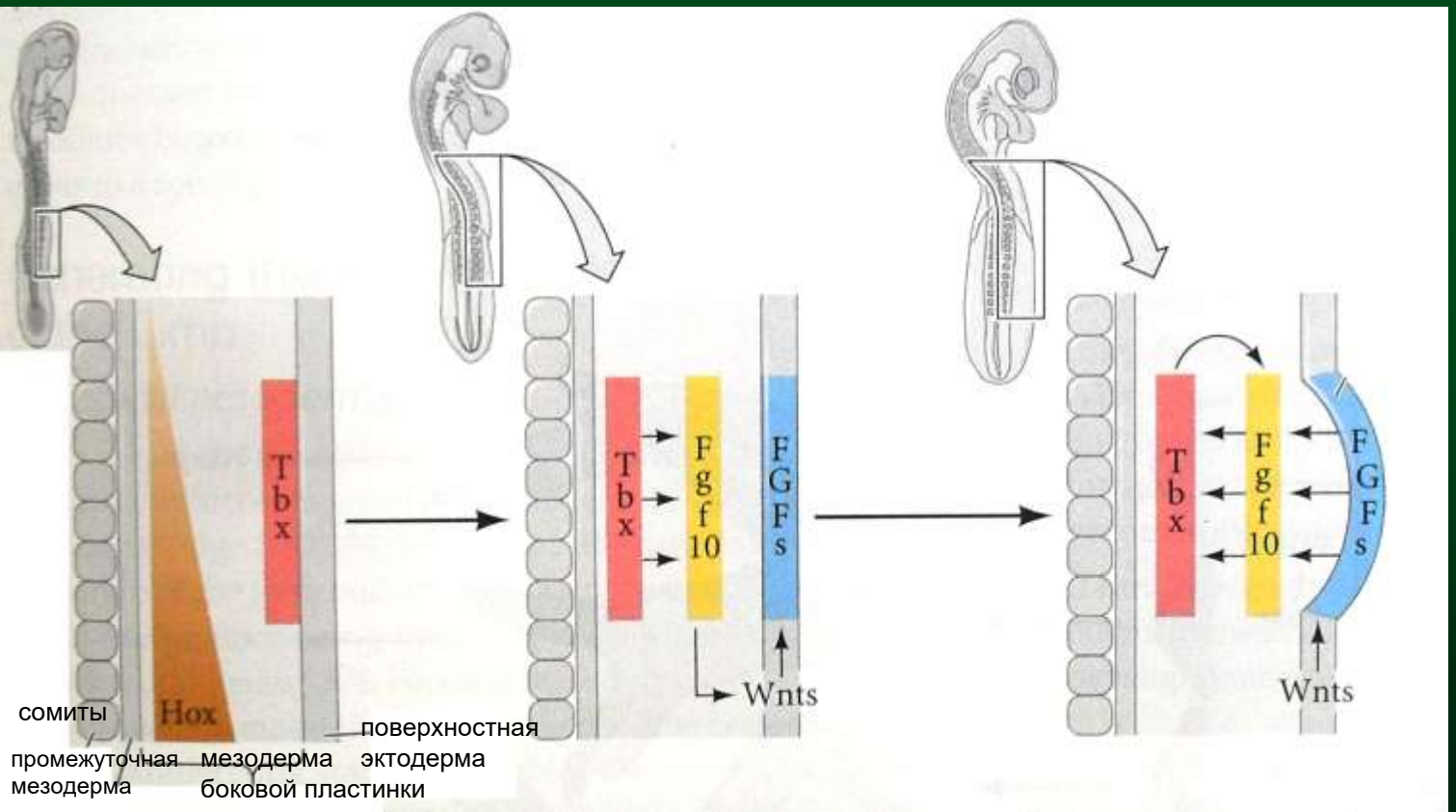

АЭГ
удалён
Конечность
не развивается
Дополнительный
АЭГ
Крыло
дуплицировано
Мезенхима
передней
конечности
АЭГ
Мезенхима
ноги
Нога
Мезенхима
не ноги
Крыло
Регрессия АЭГ;
конечность
не развивается
АЭГ замещен
гранулой-источником
FGF
Нормальное
крыло

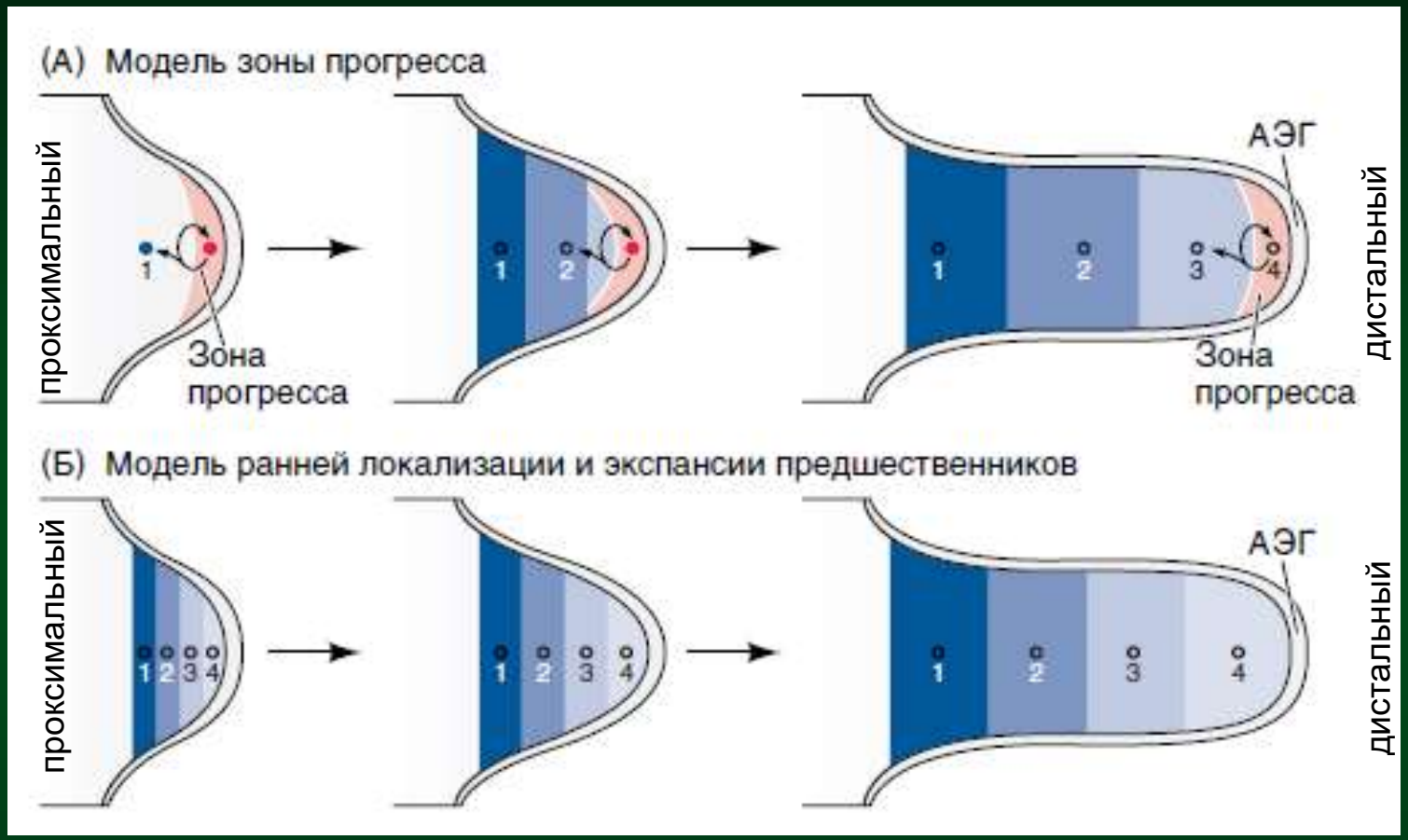
Формирование паттерна

белки Hox → синтез ретиноевой кислоты → белки Tbx → FGF10 (мезодерма) —Wnt→ FGF8 (эктодерма)

Tbx → FGF10 → FGF8 → Wnt → FGF10

индукция и рост почки





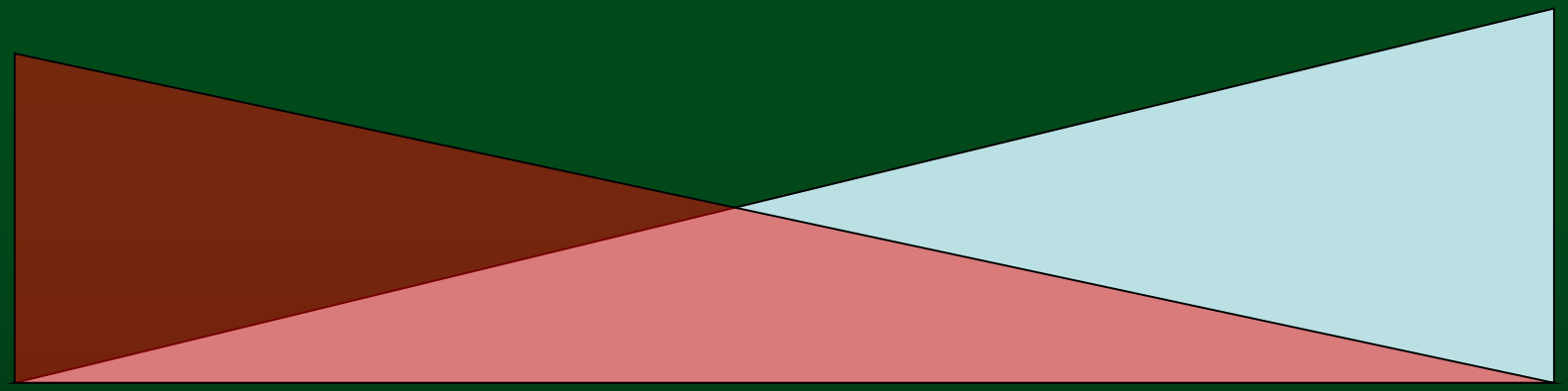
(А) Модель зоны прогресса, в соответствии с которой спецификация положения мезодермальной клетки определяется длительностью времени ее пребывания в зоне прогресса. (Б) Модель ранней локализации и экспансии предшественников , в соответствии с которой территории почки конечности устанавливаются очень рано, и пролиферация клеток приурочена к каждой из этих территорий

По Гилберт, 2010

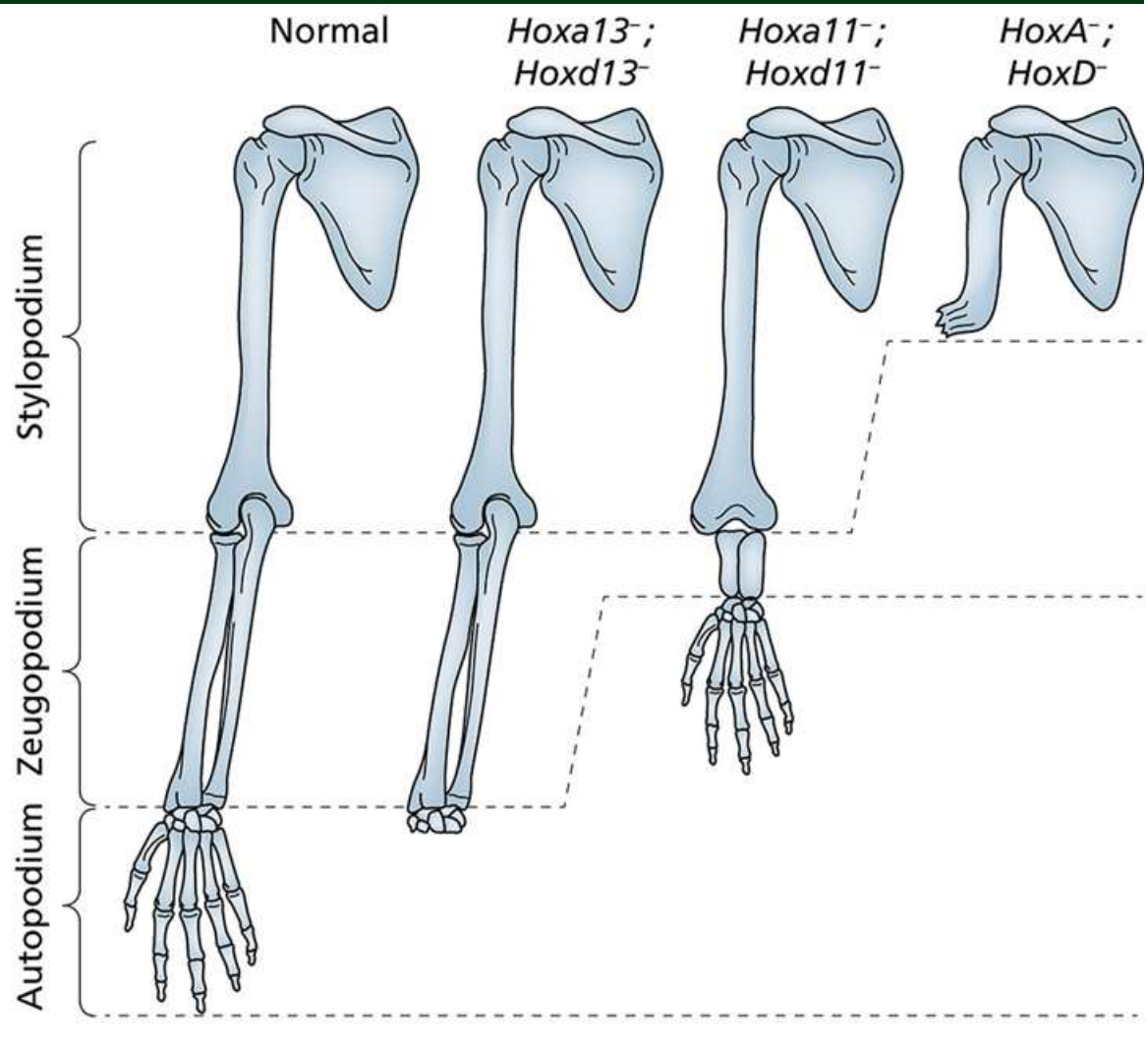
Модель двух градиентов

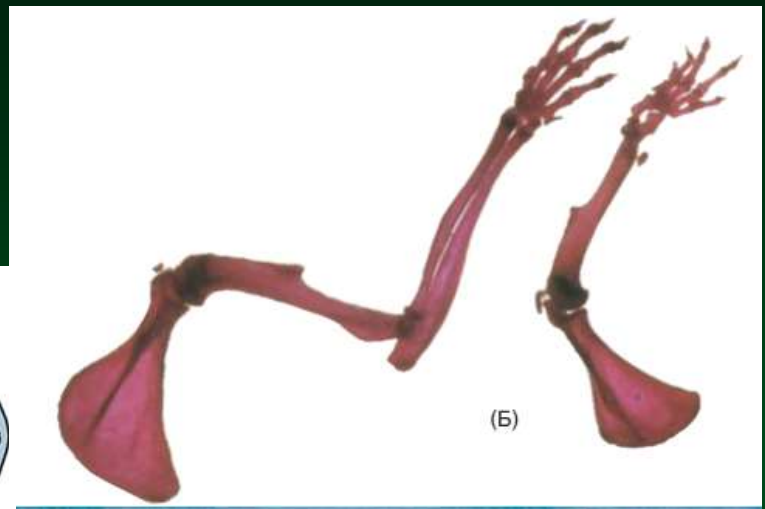
ретиноевая
кислота (прокс)

FGFs, Wnts (дист)



Hox-гены, гены meis и спецификация проксимодистальной оси





передняя конечность

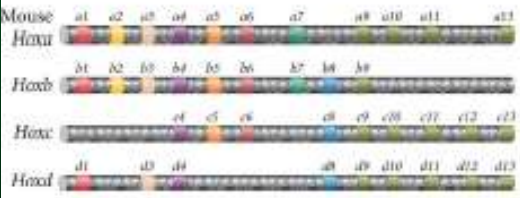
Hox паралогичная группа

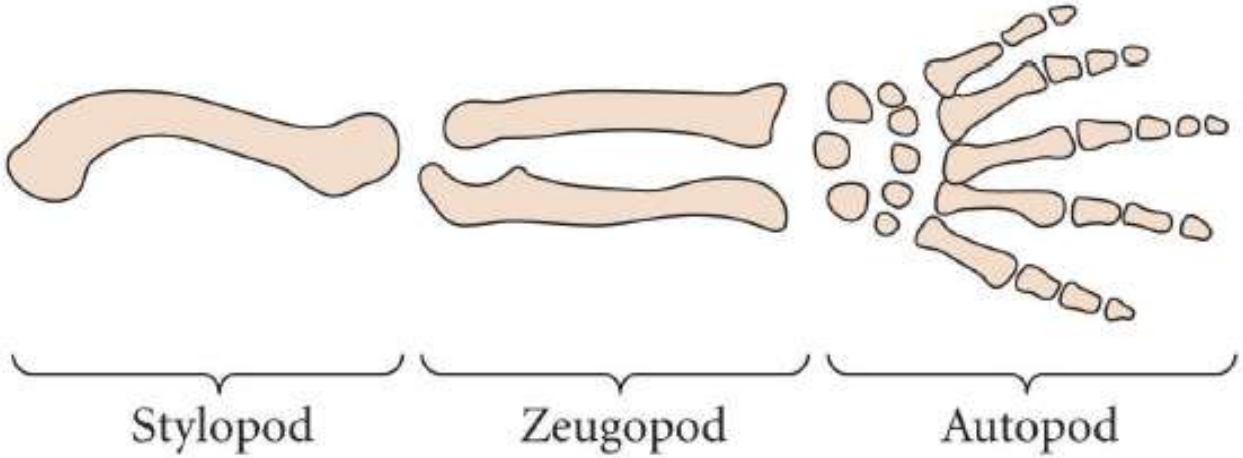
13
12
11
10
9

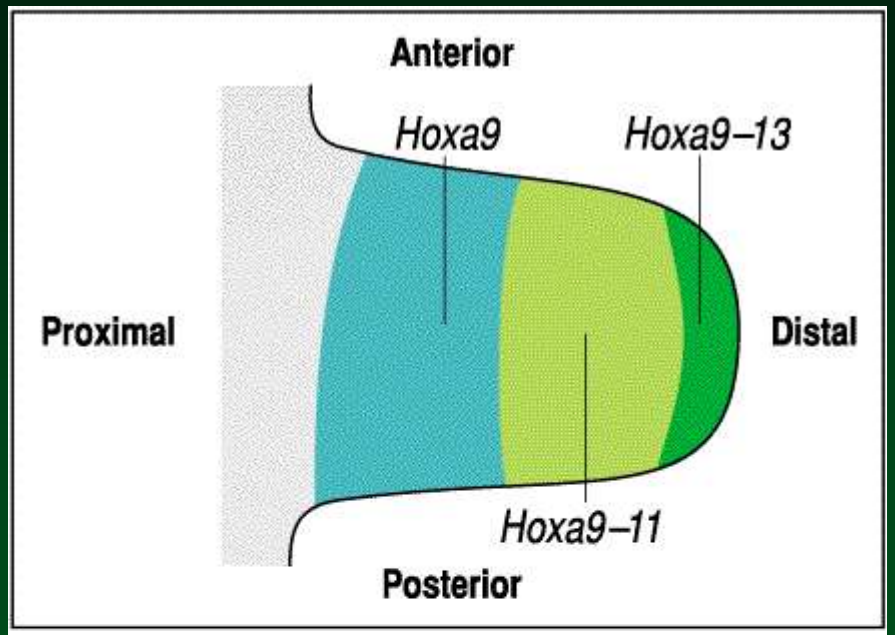
задняя конечность

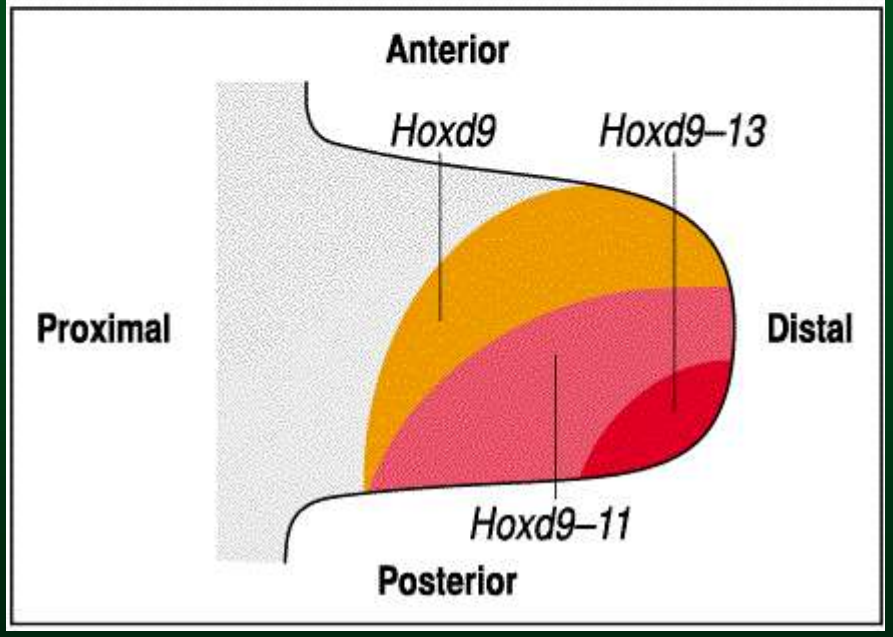
Hox паралогичная группа

13
12
11
10
9

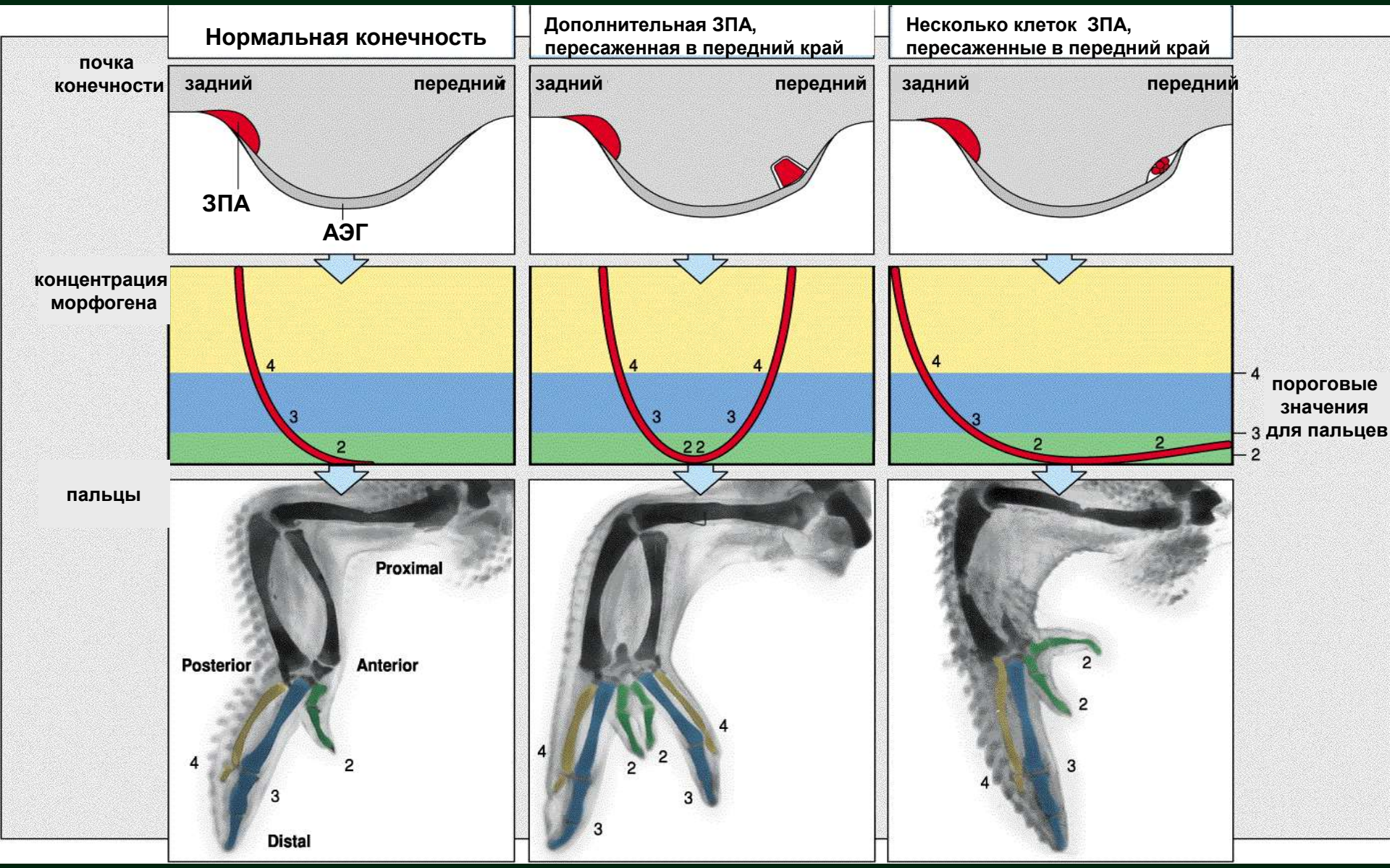


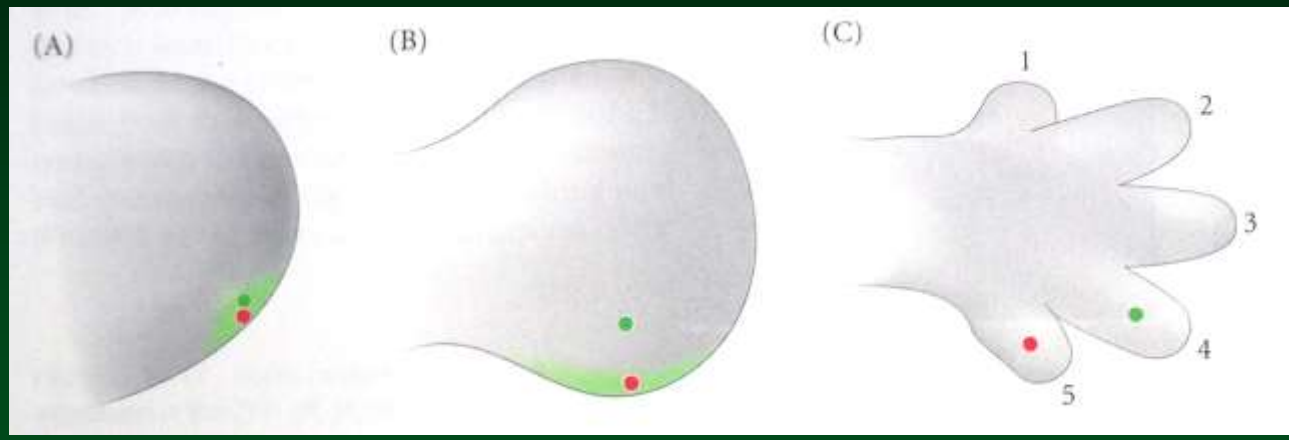


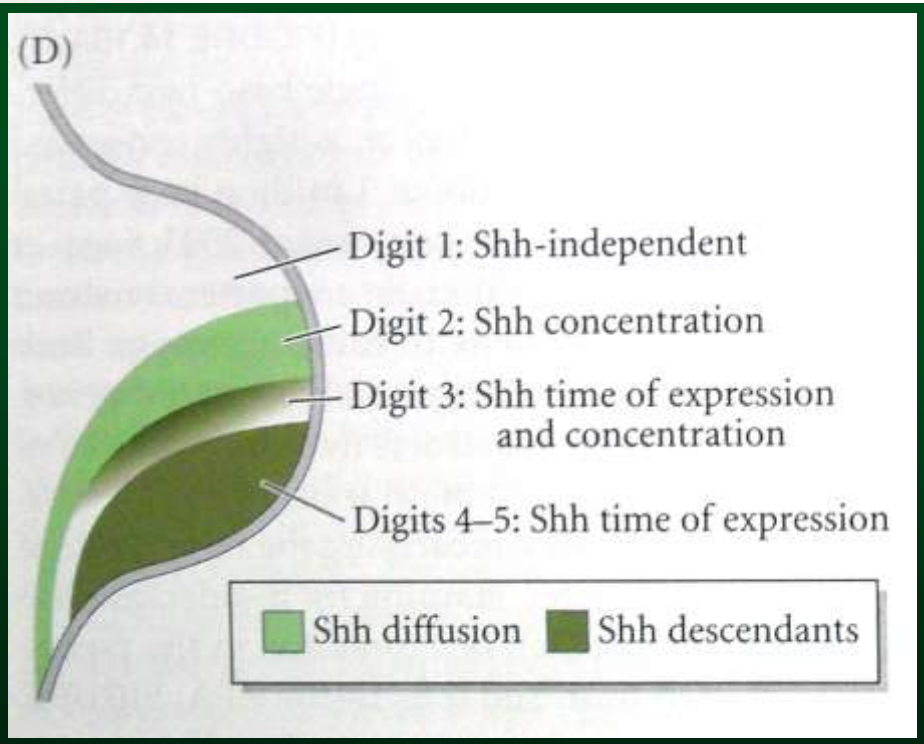

Anterior
Hoxa9
Hoxa9–13
Proximal
Distal
Hoxa9–11
Posterior


Anterior
Hoxd9
Hoxd9–13
Proximal
Distal
Hoxd9–11
Posterior

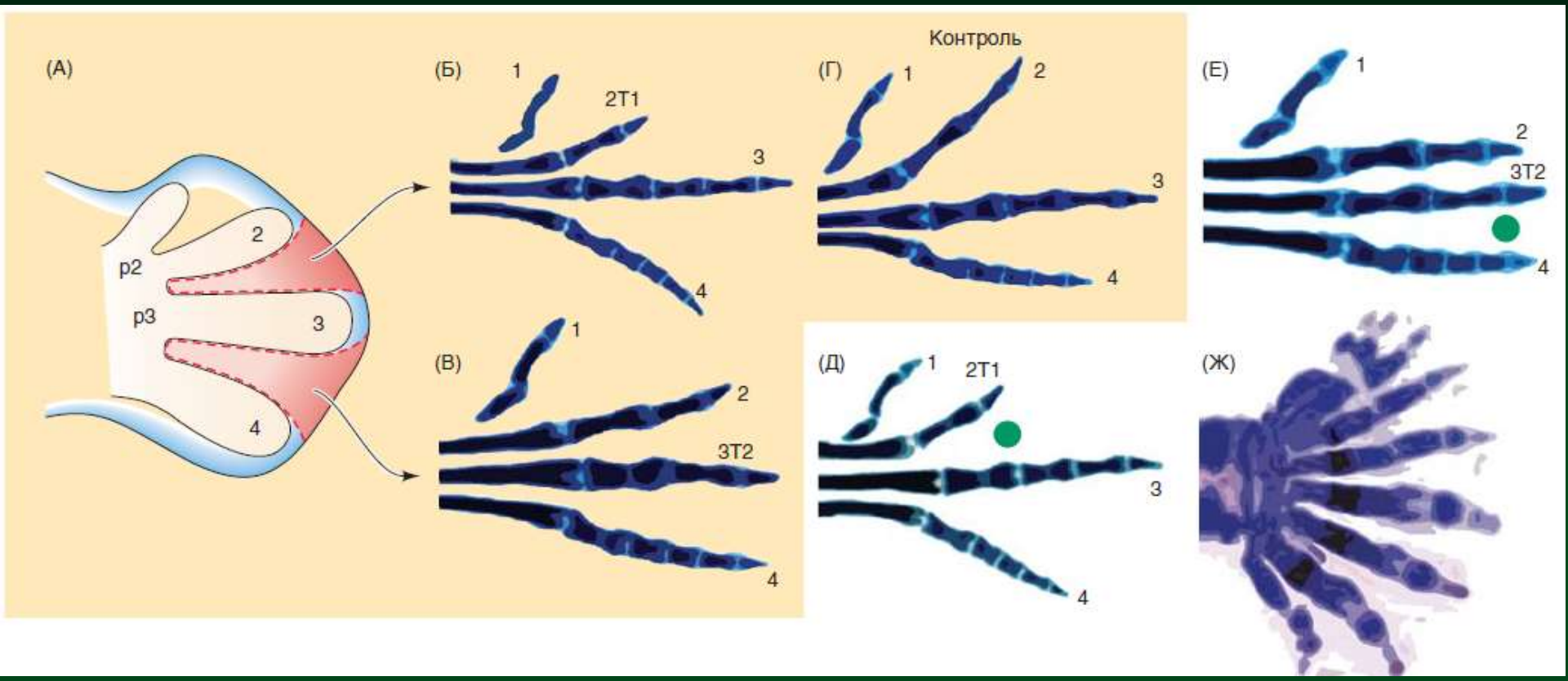
Спецификация переднезадней оси конечности: Зона поляризующей активности (ЗПА)







Sonic hedgehog
5,4 аутокринный
3 – аутокринный и паракринный
2 – паракринный
1 –Shh-независимый



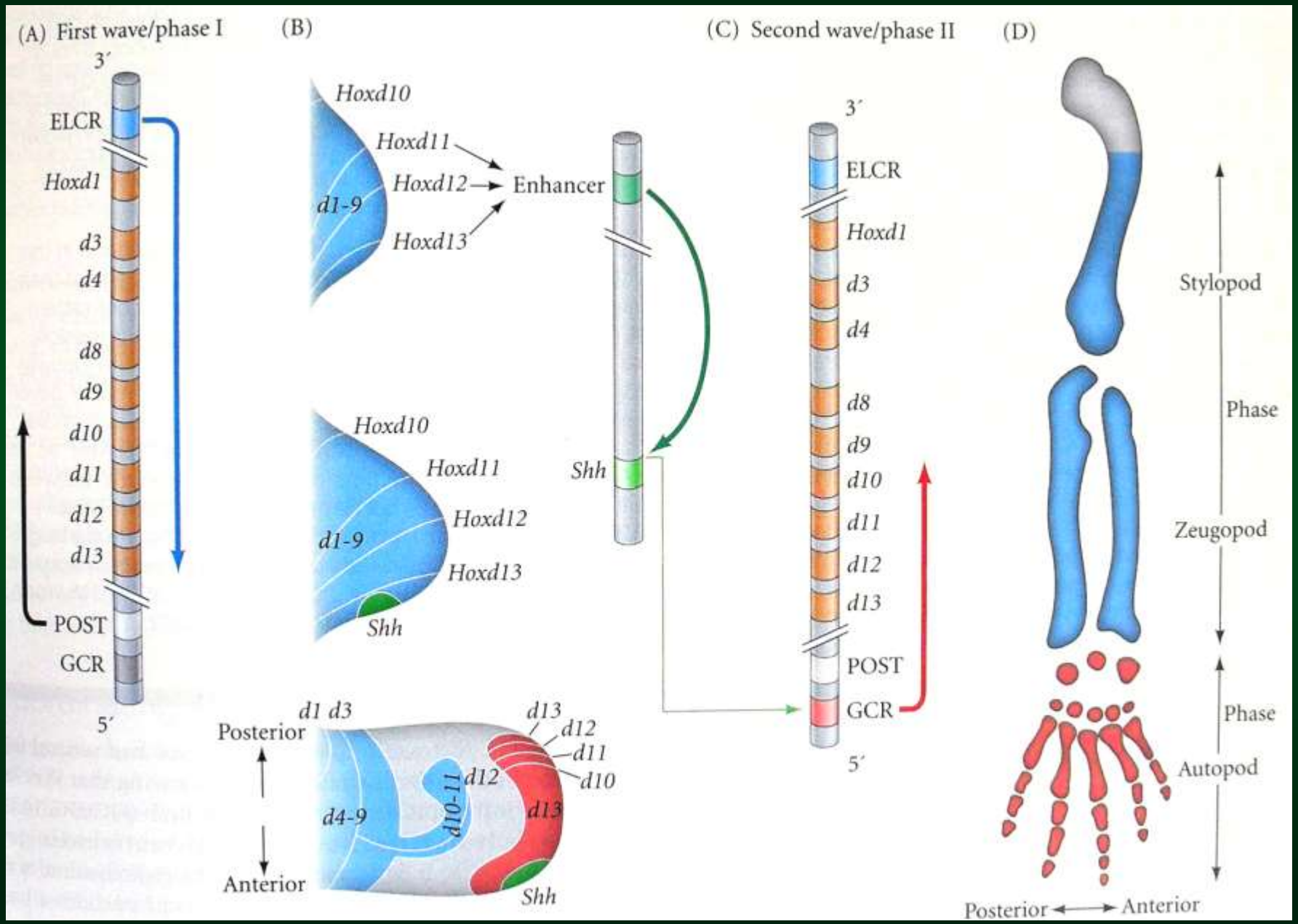
Удаление межпальцевой области 2 между зачатками пальцев 2 и 3 вызывает изменение строения пальца 2: он приобретает черты пальца 1.

Такая же трансформация, как в случаях (Б) и (Г), может быть получена в результате имплантации в межпальцевые области гранул, пропитанных белком Noggin — ингибитором BMP.

(Ж) Передняя конечность мыши, гомозиготной по делециям как в *Gli3*, так и в *Shh,* характеризуется дополнительными пальцами неопределенного типа

По Гилберт, 2010

5’ HoxD белки связываются с удаленным энхансером Shh (ZRS)
Shh связывается с GCR локусом Hox генов, инвертируя паттерн экспрессии – Hoxd13 – в переднем положении

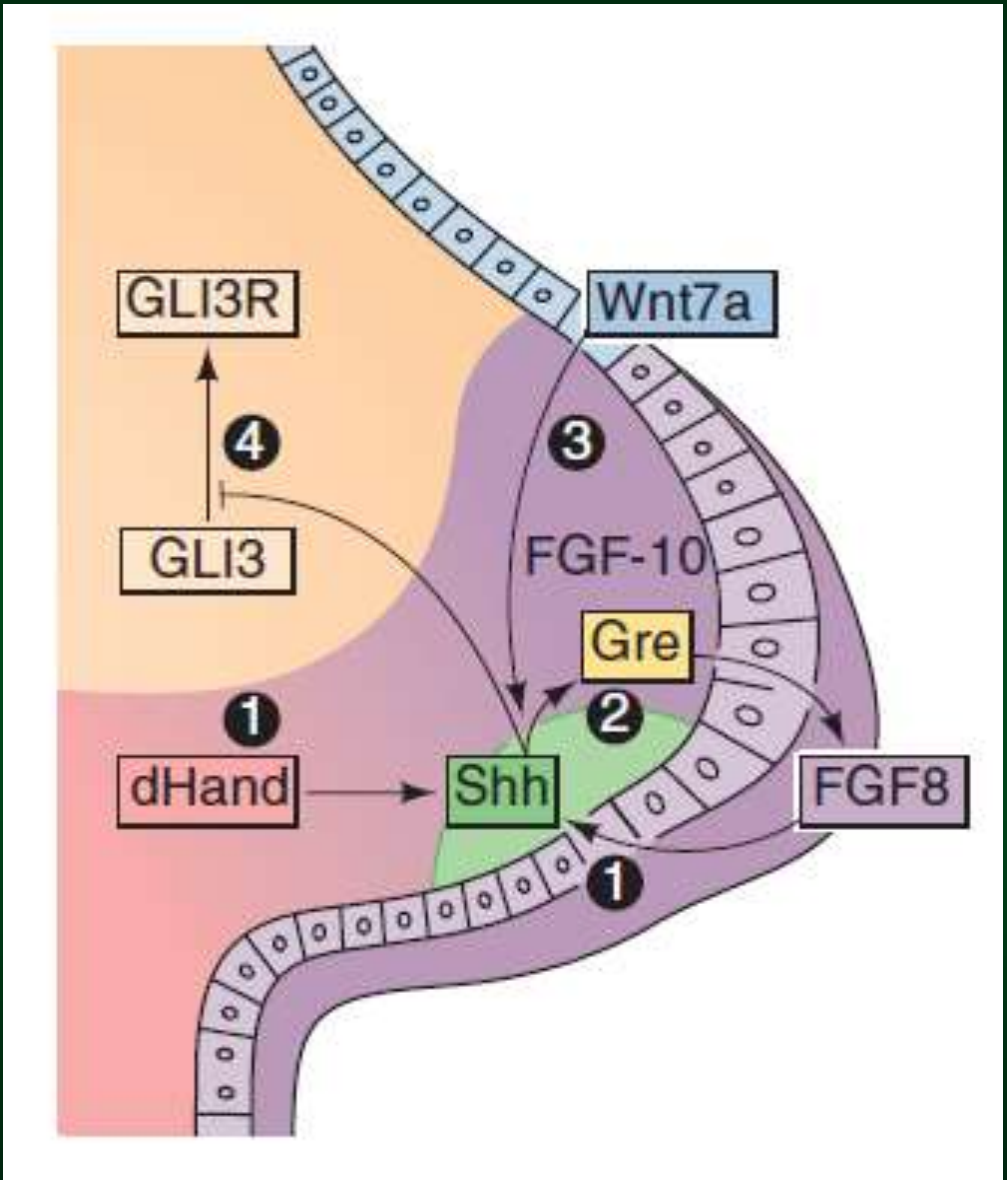


Образование дорсовентральной оси

Wnt7a – необходим и достаточен для дорсализации,
запускает *Lmx1* в дорсальной мезенхиме

нокаут по *Wnt7a* = вентральные подушечки пальцев на обеих сторонах
нокаут по *Lmx1* = вентрализация

Модель взаимодействия ЗПА и АЭГ



1. dHAND bHLH транскрипционный фактор и Fgf8 из АЭГ стимулируют *Shh*
Fgf8 (и Fgf4) поддерживают экспрессию *Shh*

2. Shh активирует *Gremlin1* в задней мезенхиме
Grem1 – антагонист лигандов BMP
BMPs репрессирует экспрессию Fgf в АЭГ

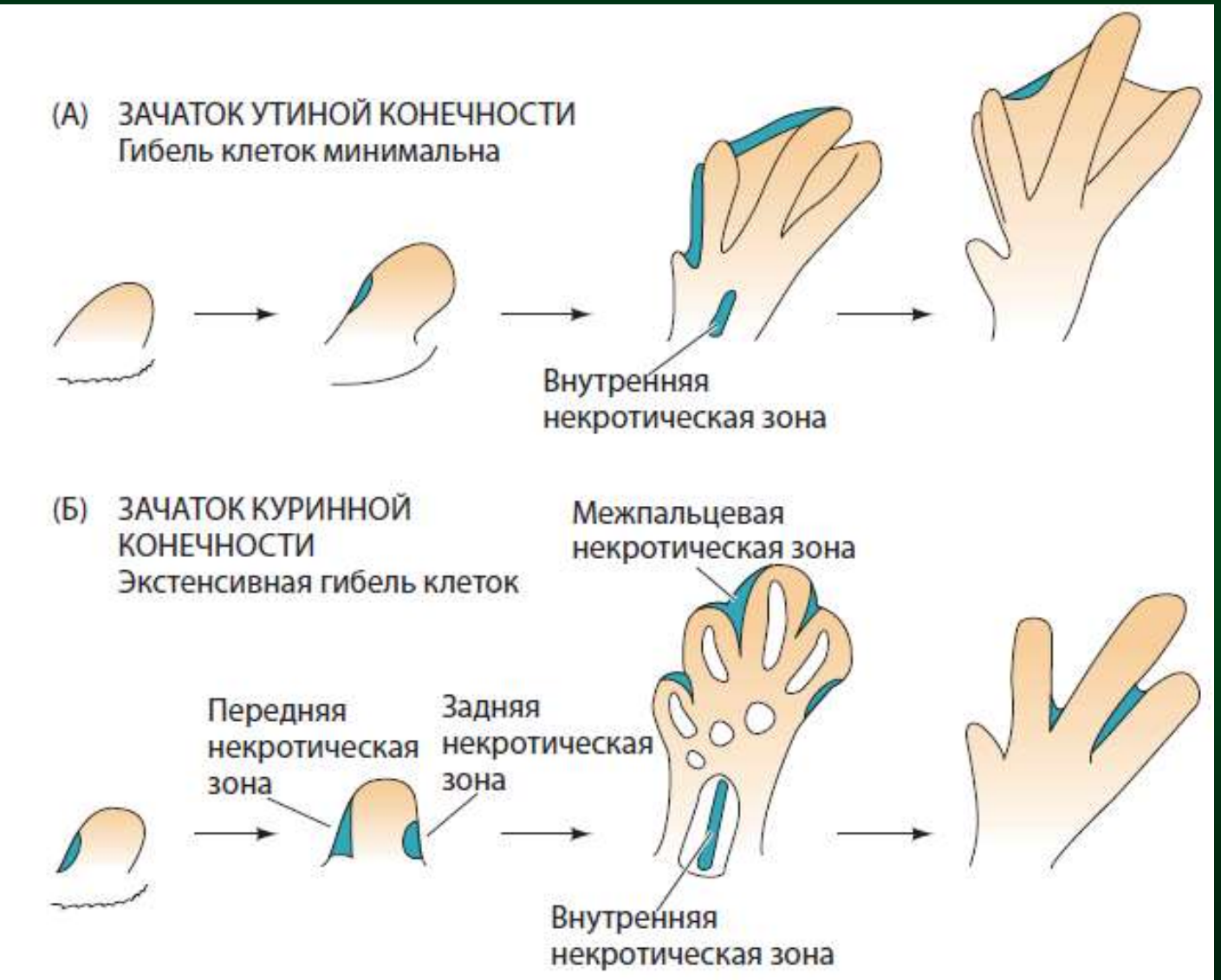
3. Wnt7a поддерживает *Shh*
Wnt7a определяет стороны АЭГ

мутации Loss-of-function
(одновременно по *Shh* и *Grem1*)
= синдактилия, отсутствие пальцев

По Гилберт, 2010

Гибель клеток и формирование пальцев и суставов

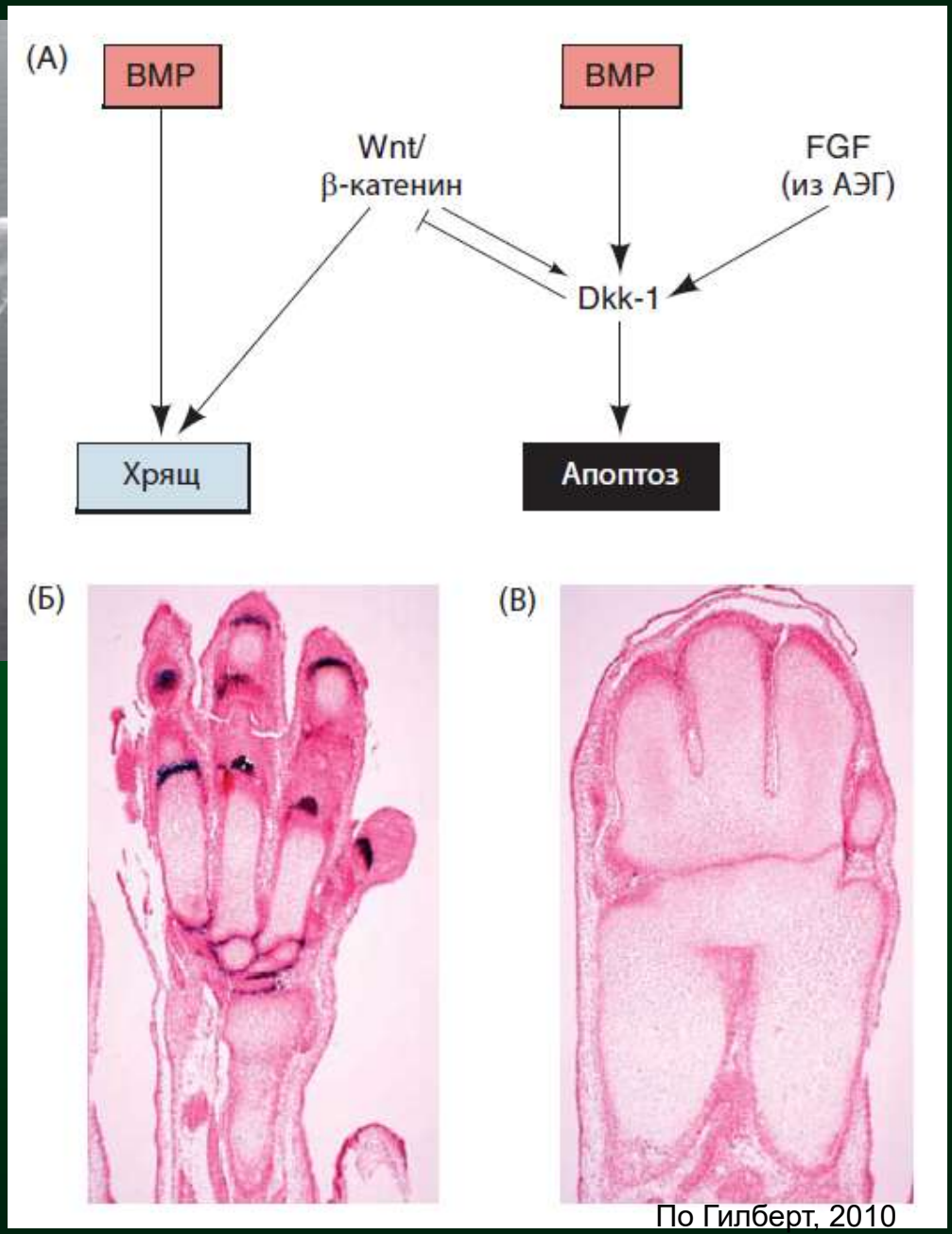
BMP либо апоптоз, либо хондрогенез



По Гилберт, 2010

курица, норма

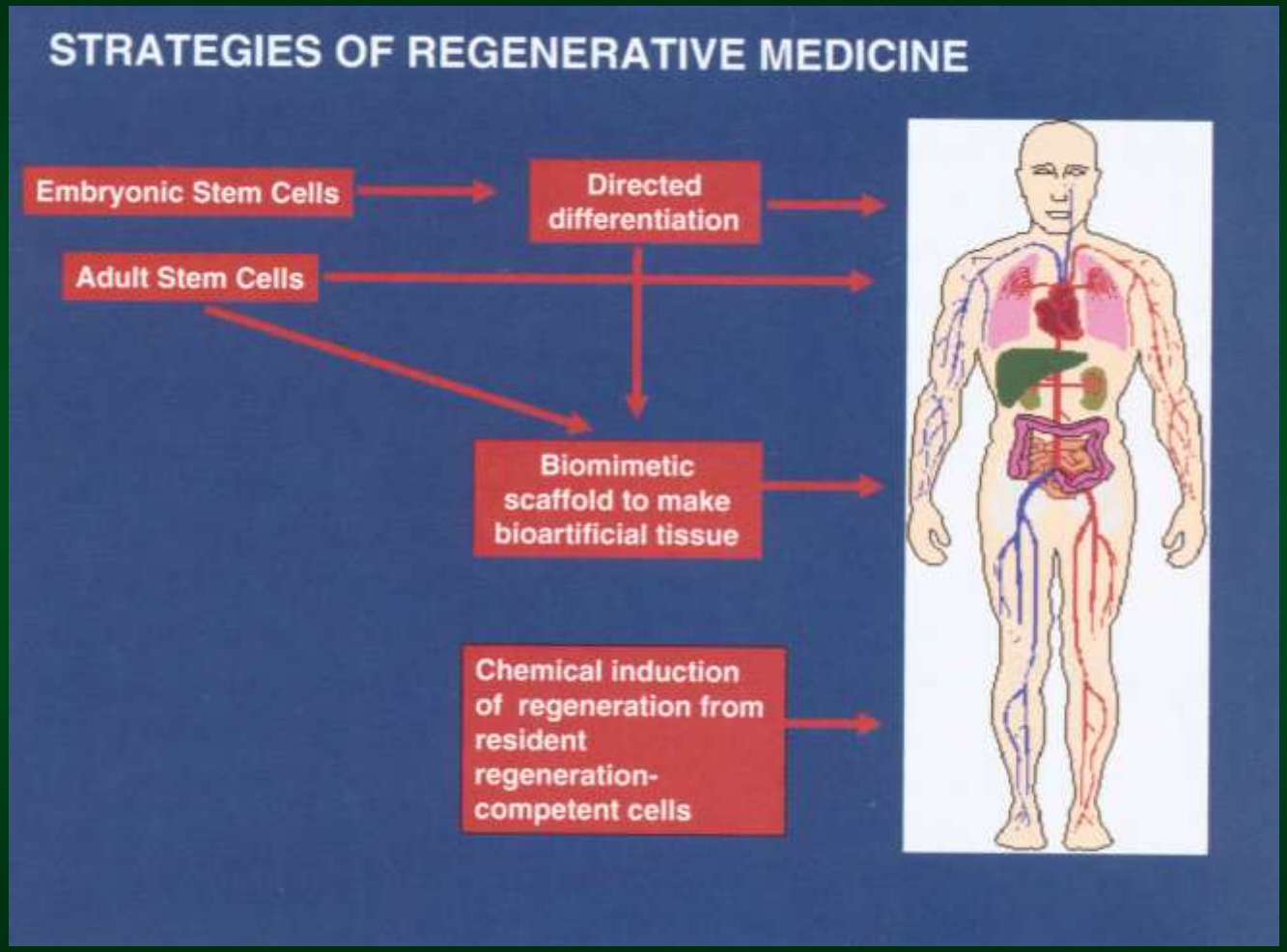
курица, развитие с бусиной, пропитанной Gremlin



По Гилберт, 2010

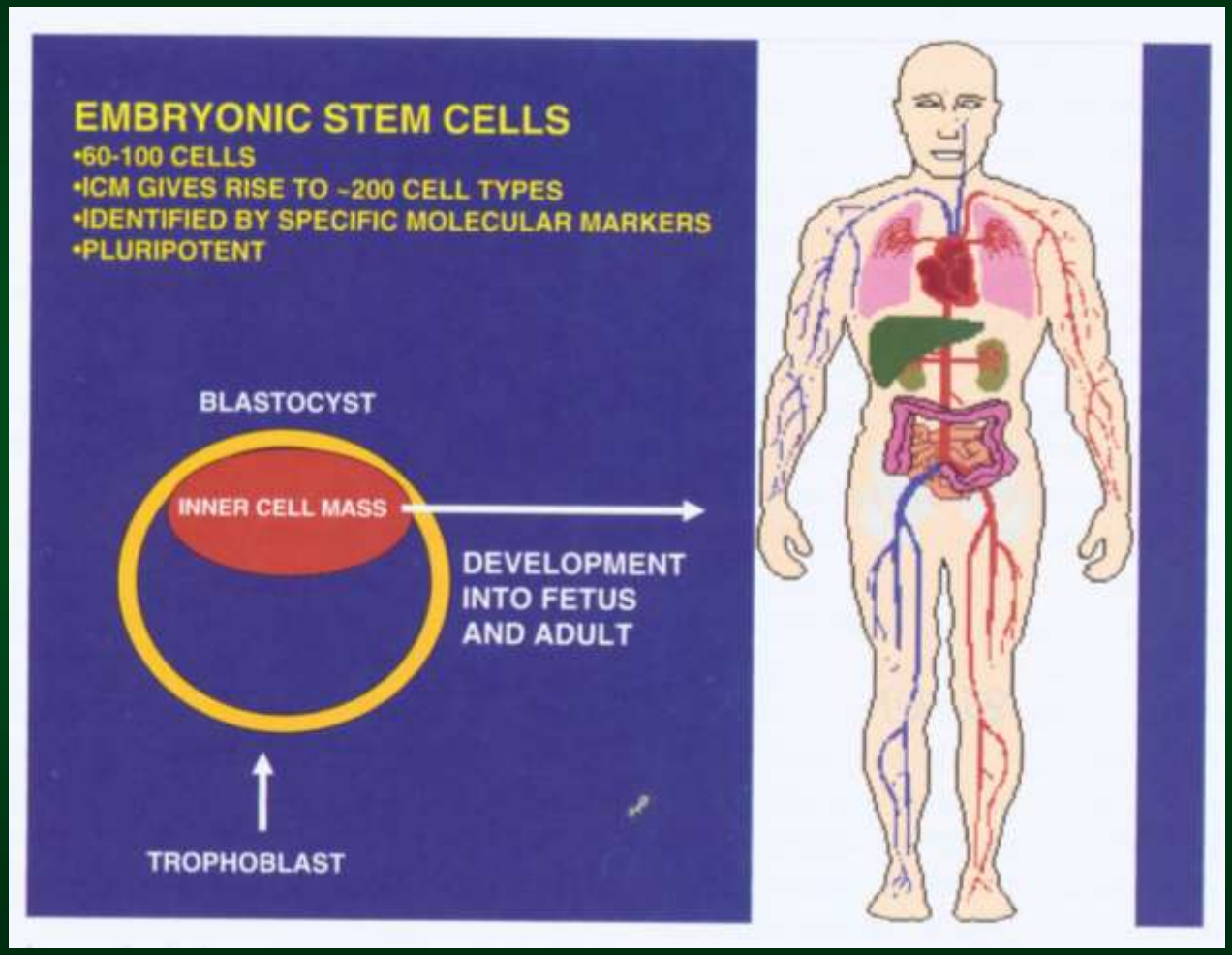
опосредованный BMP апоптоз и утки и у курицы, но в развивающейся ноге утки синтезируется белок Gremlin

Регенерация



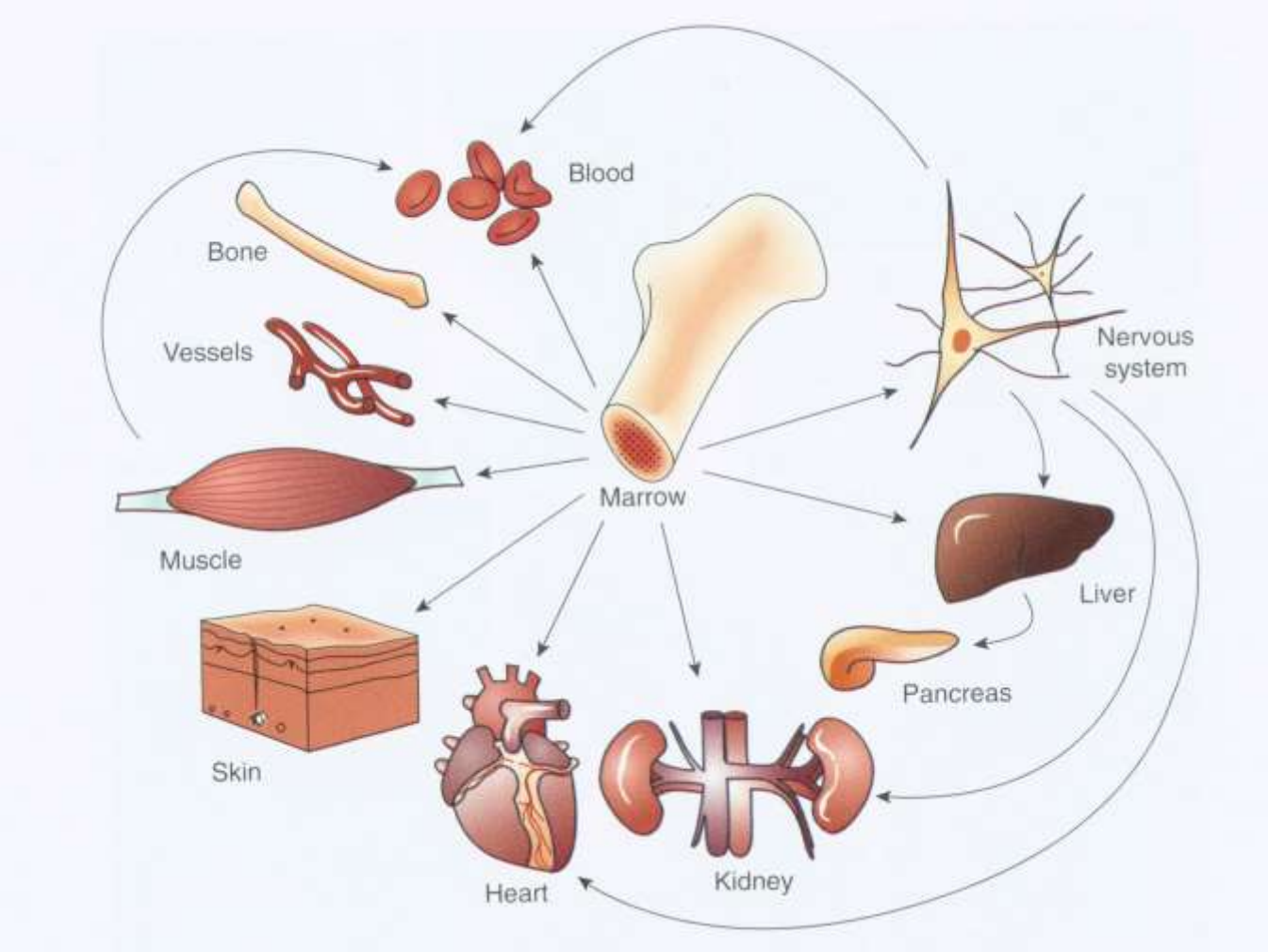
Stocum, 2006

Регенерация



Stocum, 2006

Регенерация



Stocum, 2006

Регенерация

- фундаментальность

- все ветви филогенетического древа

- все стадии онтогенеза

- способность может кардинально отличаться

Регенерация

История регенерации

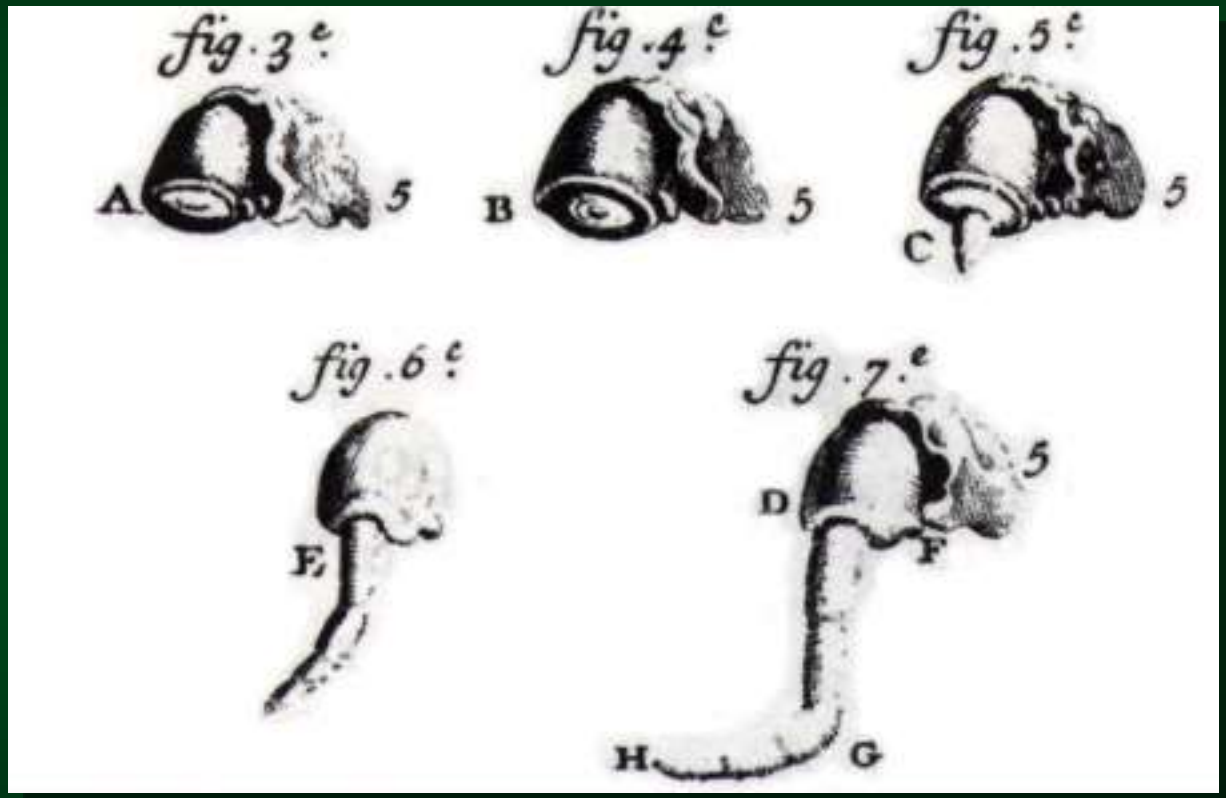
Регенерация

XVIII в. – время первоначального рассвета экспериментальной биологии

Р.Реомюр (Rene Antoine Ferchault de Reaumur, 1683 --- 1757)

Регенерация

Р.Реомюр (Reaumur, 1712)



назвал это явление *регенерацией* (от лат. regeneratio --- возрождение)

Регенерация

А. Трамбле (Abraham Trembley)

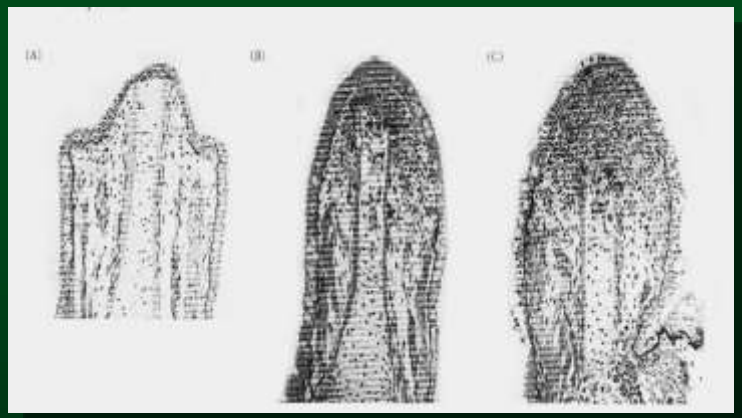
Регенерация

Биоинженерные принципы

Регенеративная медицина

Регенерация

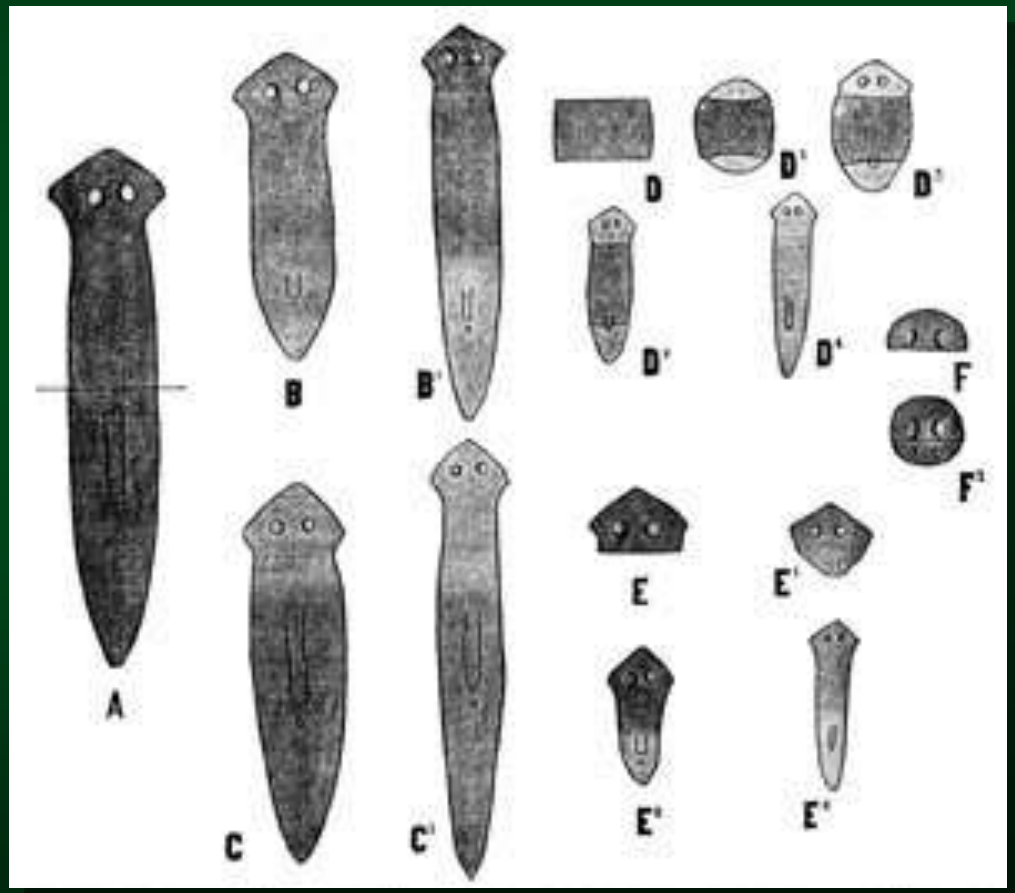
образуется недифференцированная регенерационная бластема (от греч. βλαστός --- росток)



эпиморфоз (от греч. ἐπί --- прибавление; μόρφωσις --- образование)

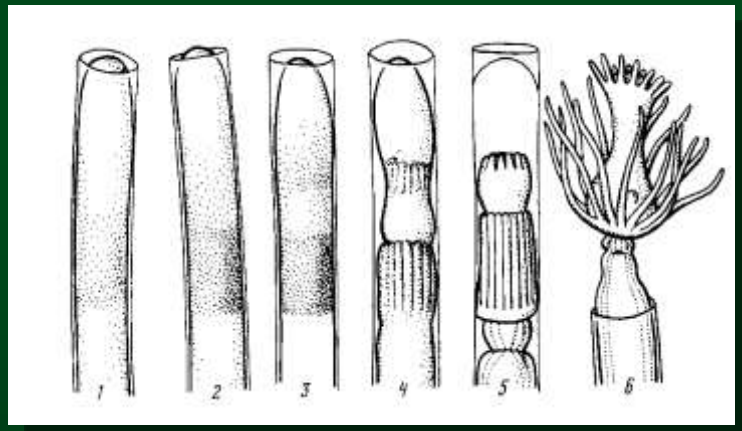
Регенерация

Т. Морган (1901)



Регенерация

восстановление утраченной формы происходит путем перестройки оставшейся части



морфаллаксис (от греч. μορφή --- вид, форма; άλλάσσω --- делать другим, изменять)

Регенерация

митотическая активность

миграция

реорганизация остатка тела

регенерационная почка

Регенерация

эпиморфоз

морфаллаксис

с образованием бластемы

без образования бластемы

с активным делением клеток

без активного деления клеток

Регенерация

Классификация

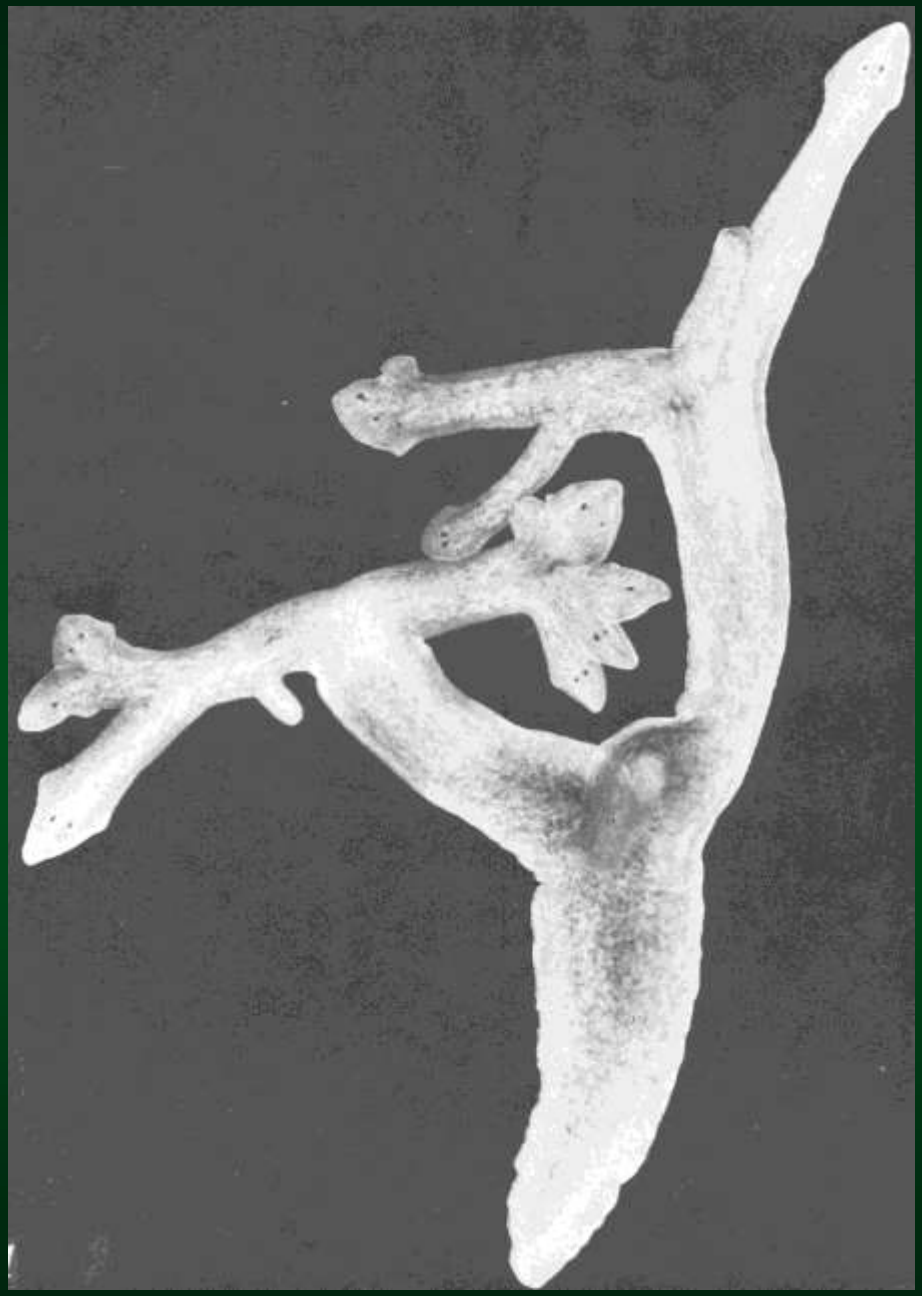
Регенерация

Атипичная

гиперморфозы

гипоморфозы

гетероморфозы



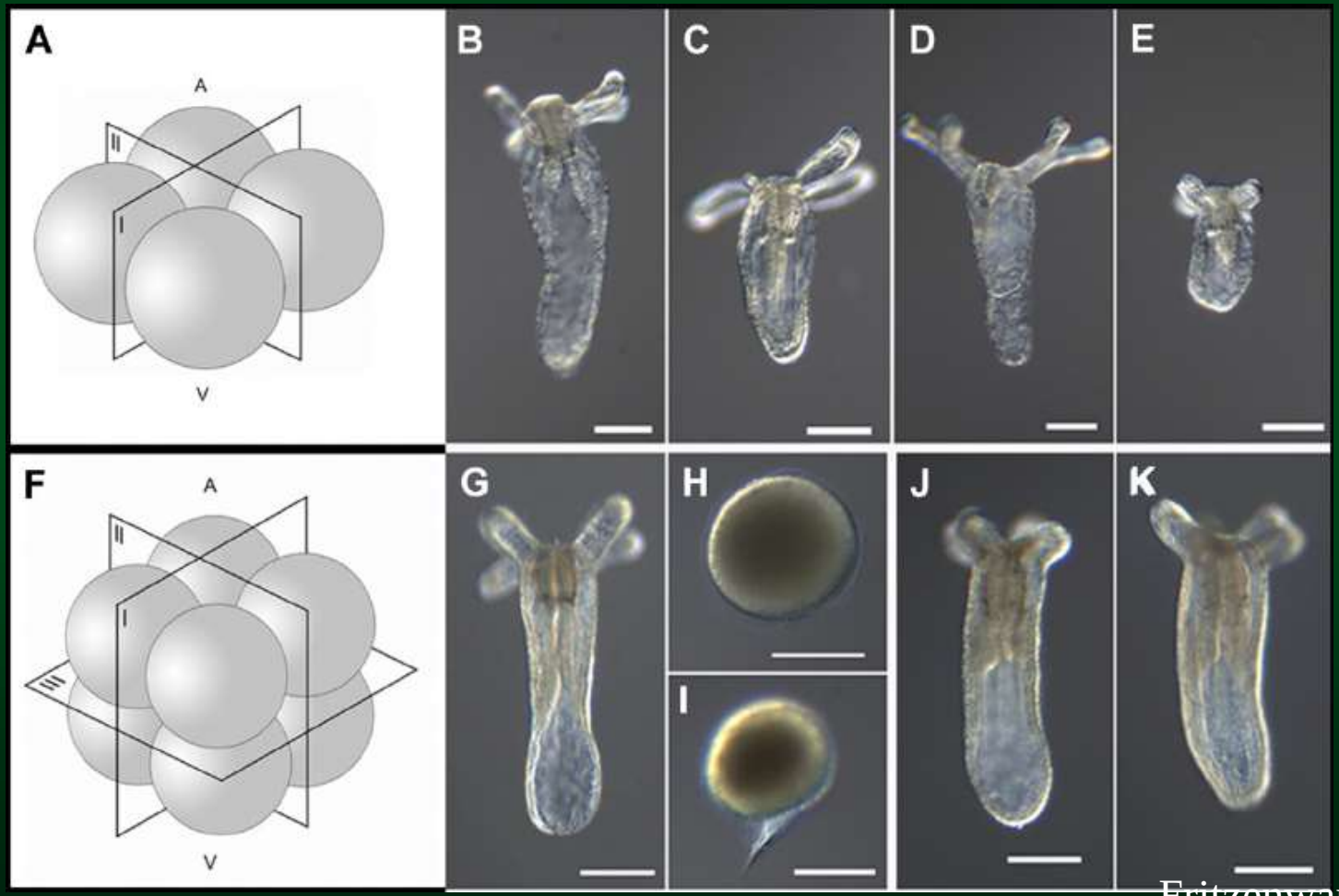
Регенерация

гетероморфозы

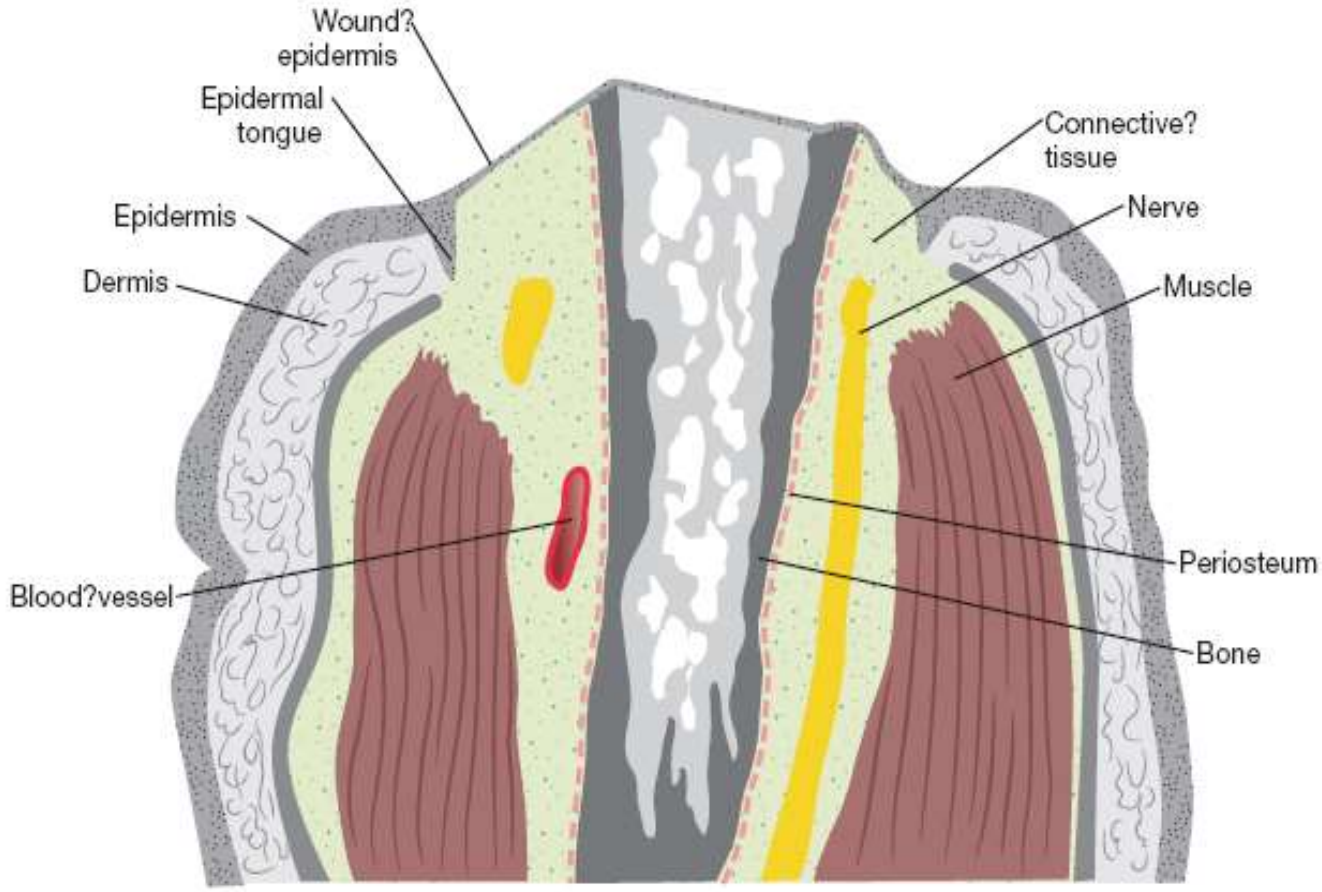
гомейозис

Регенерация у книдарий

Anthozoa. Онтогенетическая изменчивость

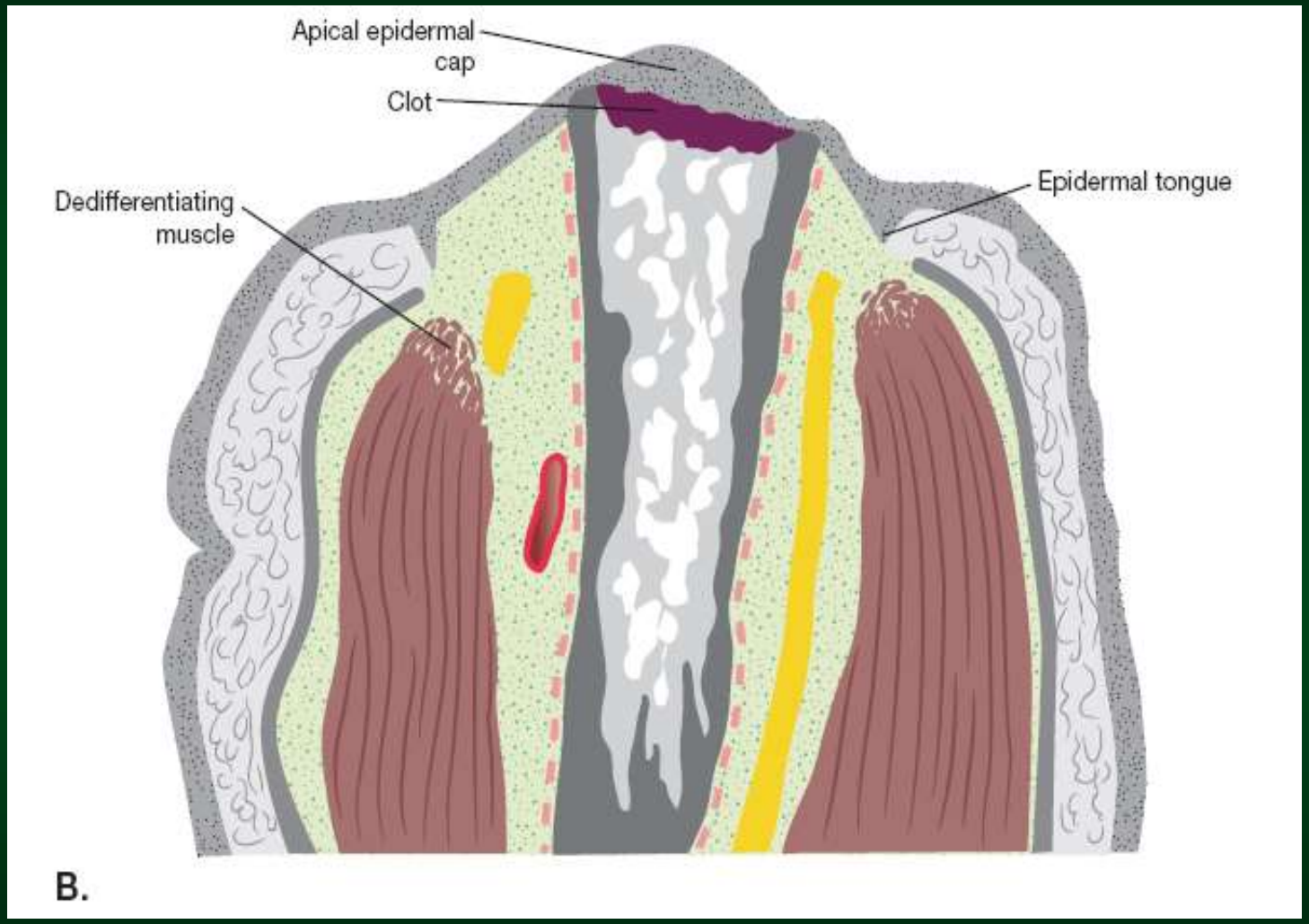


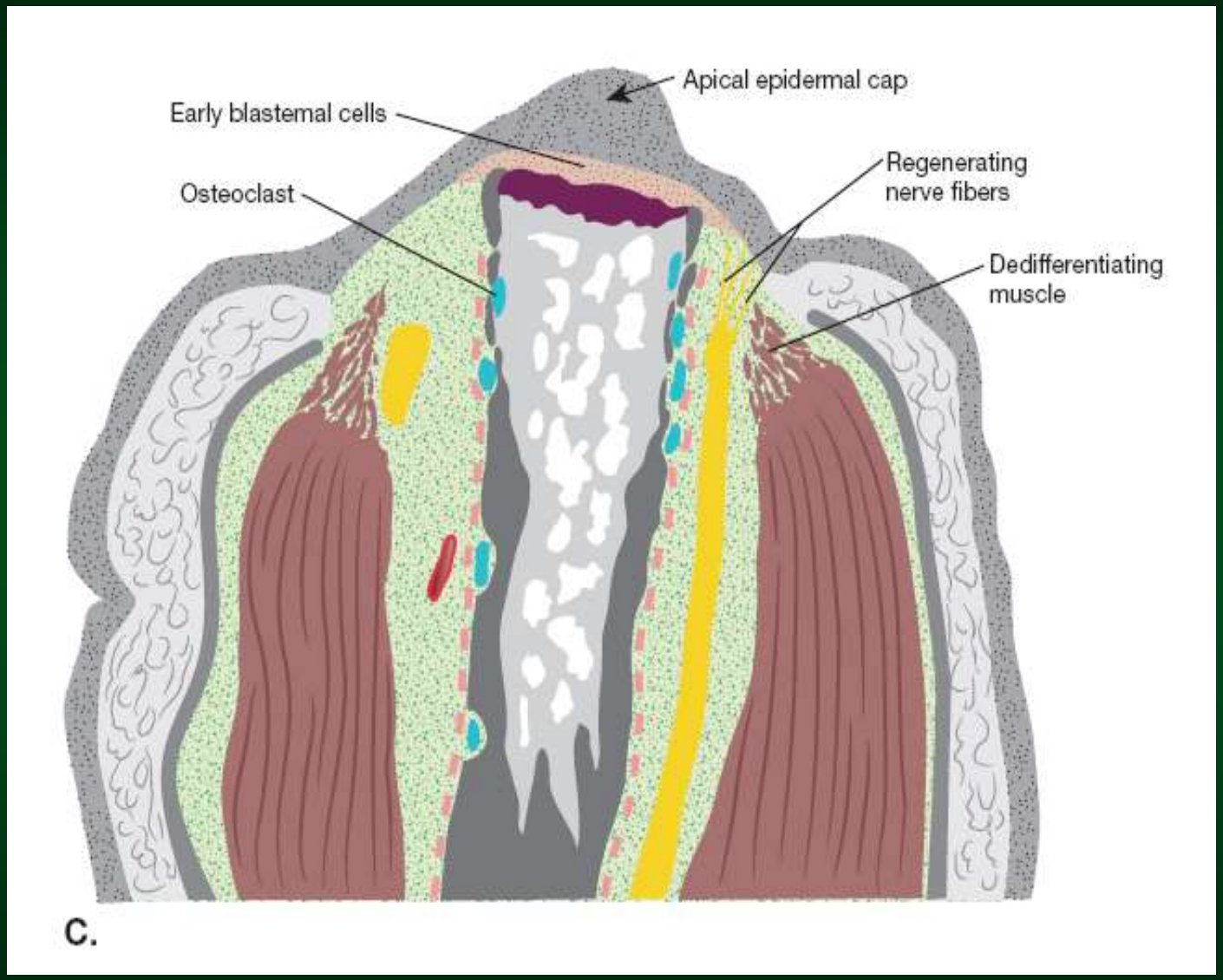
Fritzenwanker et al., 2007

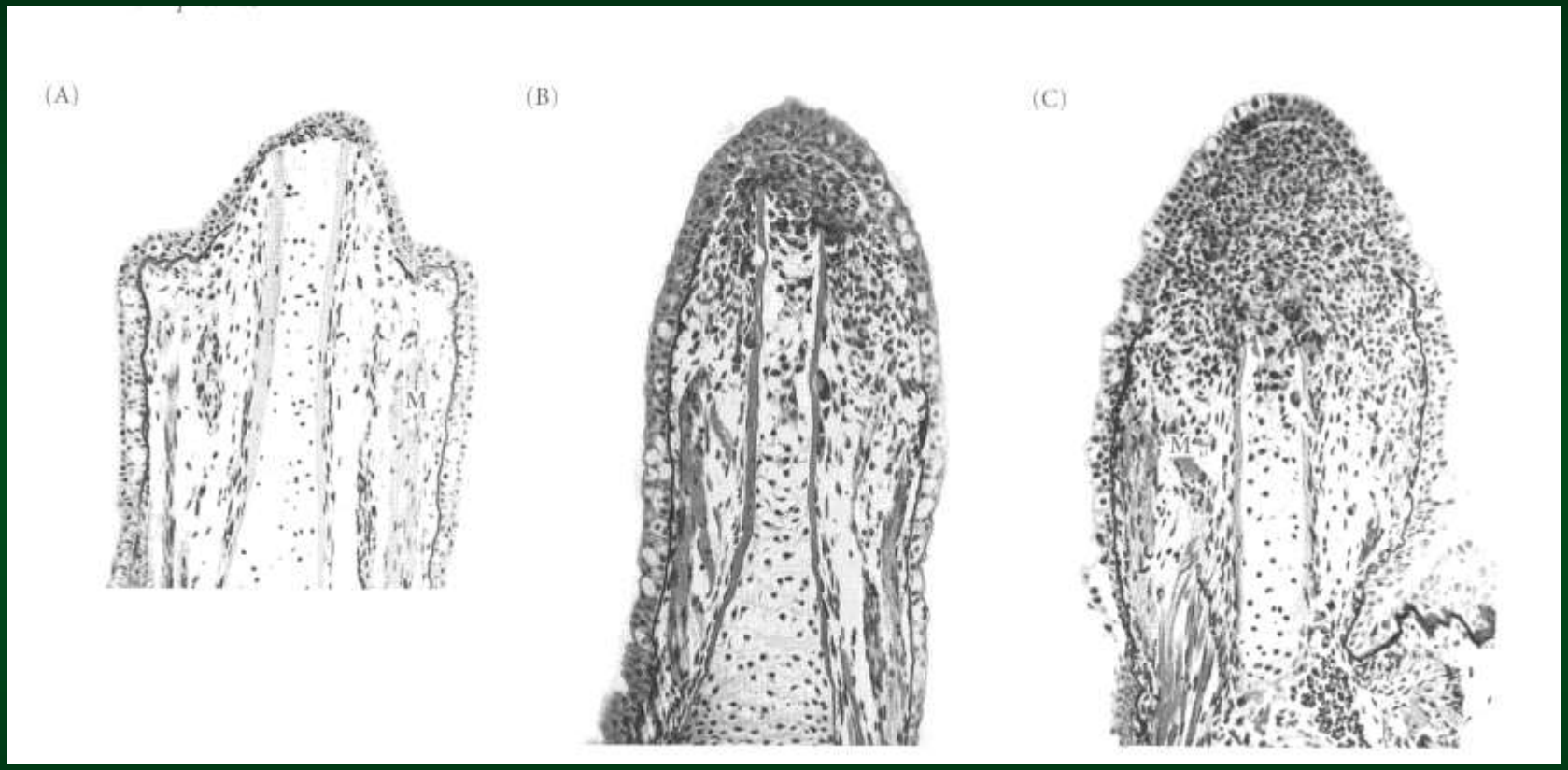

Wound?
epidermis
Epidermal
tongue
Epidermis
Dermis
Blood?vessel
Connective?
tissue
Nerve
Muscle
Periosteum
Bone

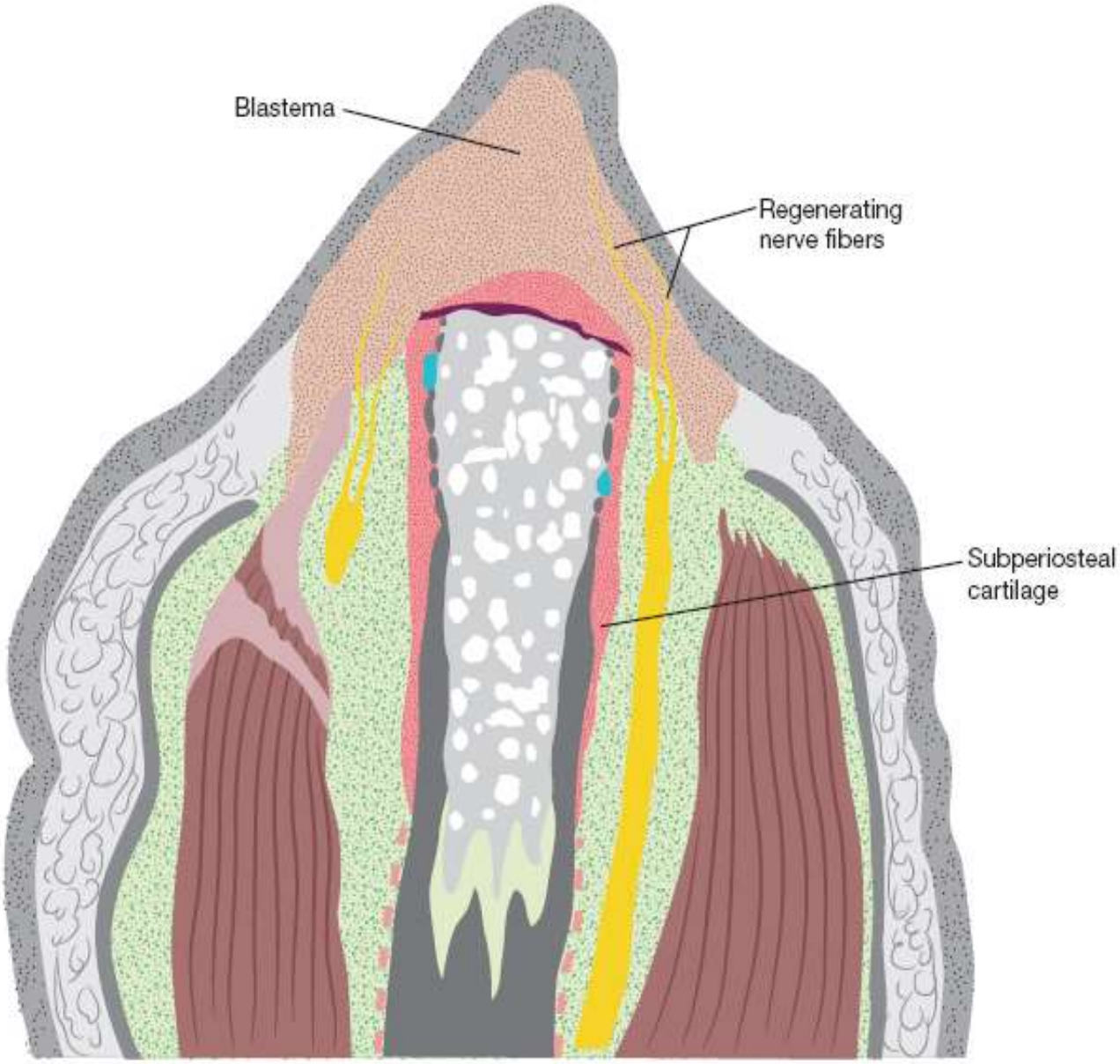
A.

б
а
в
л
ф

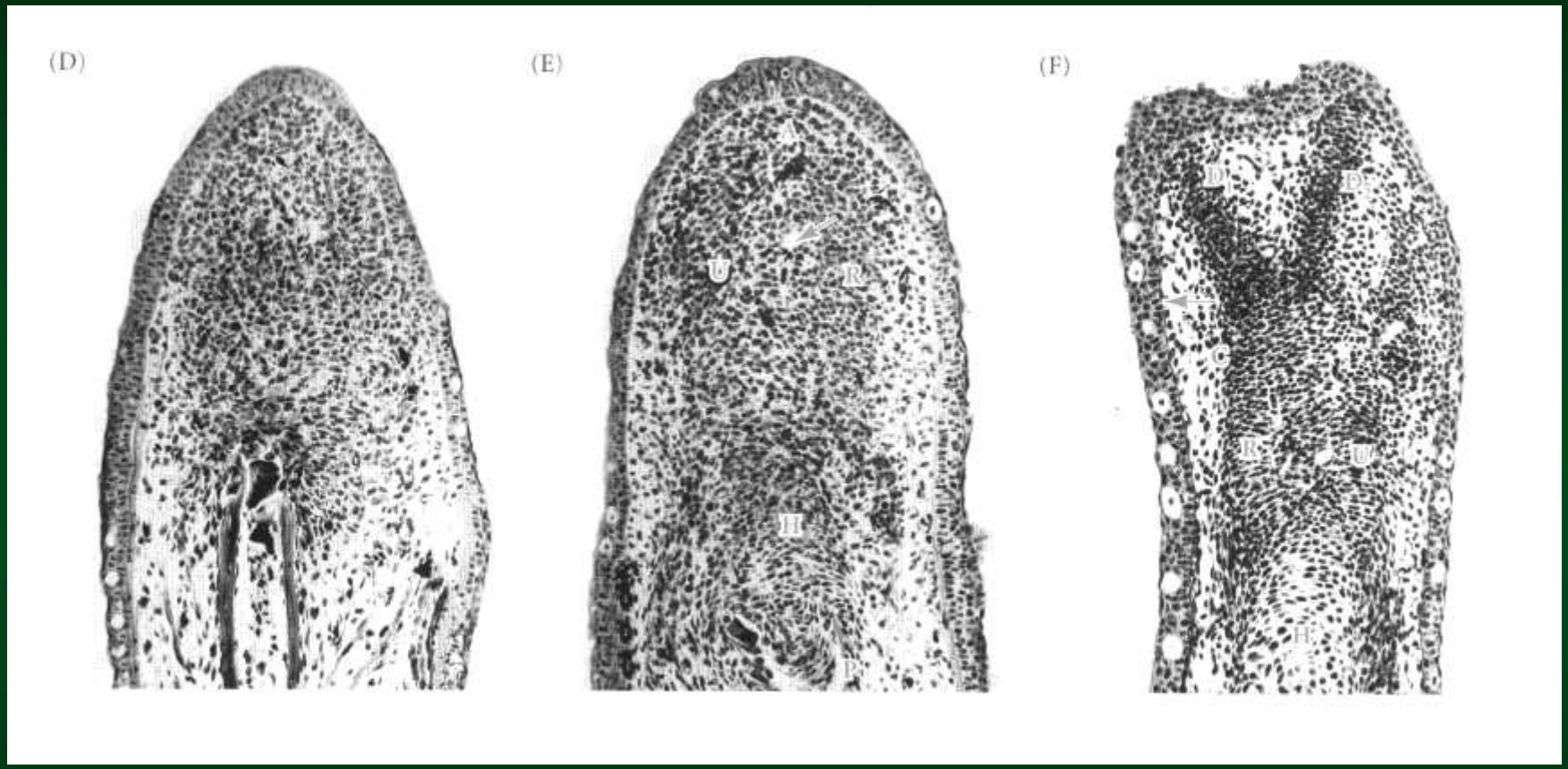

Apical epidermal cap
Clot
Dedifferentiating muscle
Epidermal tongue
B.

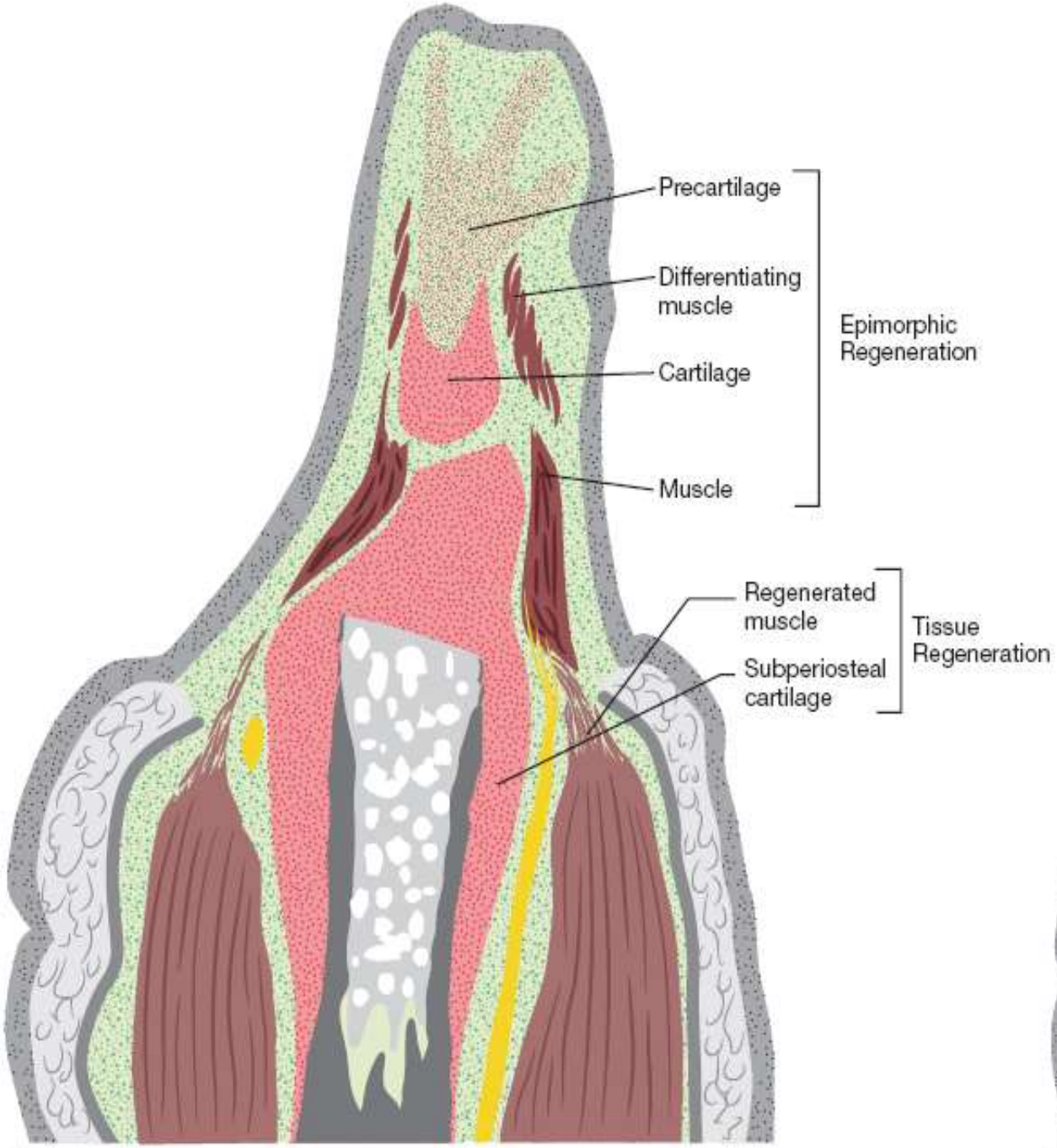

Apical epidermal cap
Early blastemal cells
Regenerating nerve fibers
Osteoclast
Dedifferentiating muscle
C.


(A)
M
(B)
(C)
M

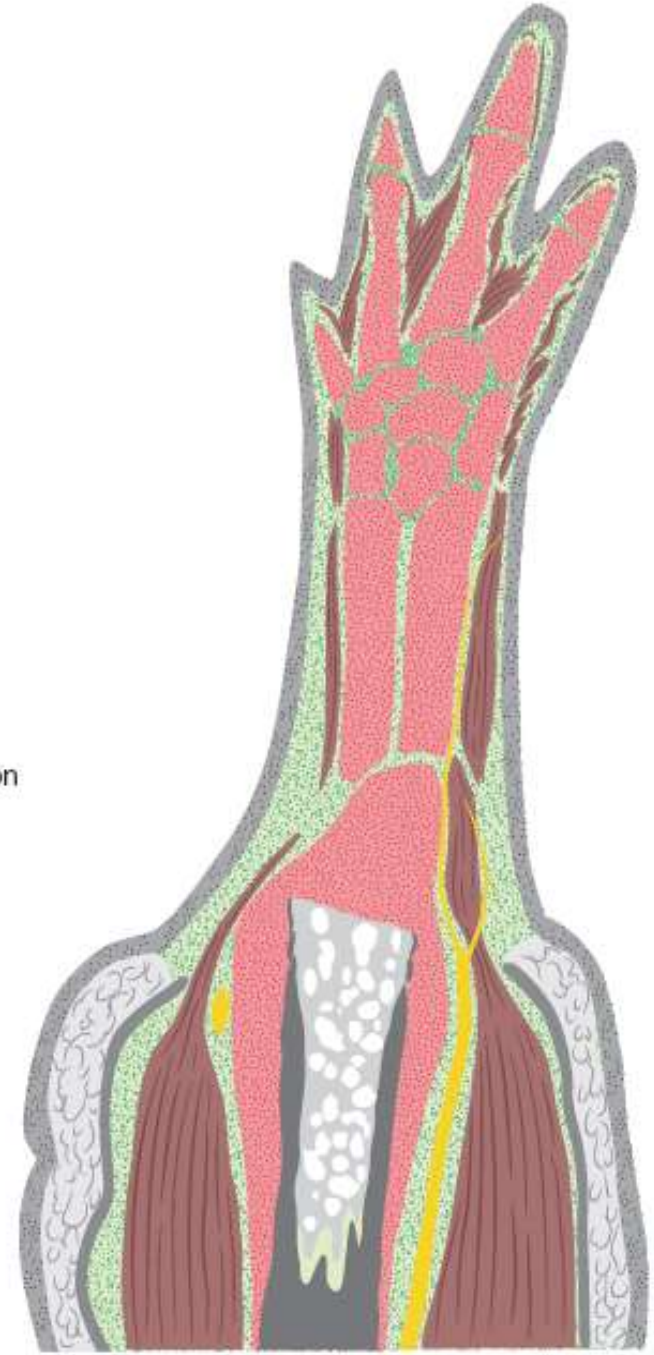

Blastema
Regenerating nerve fibers
Subperiosteal cartilage

D.


(D)
(E)
(F)


Precartilage
Differentiating muscle
Cartilage
Muscle
Epimorphic Regeneration
Regenerated muscle
Subperiosteal cartilage
Tissue Regeneration

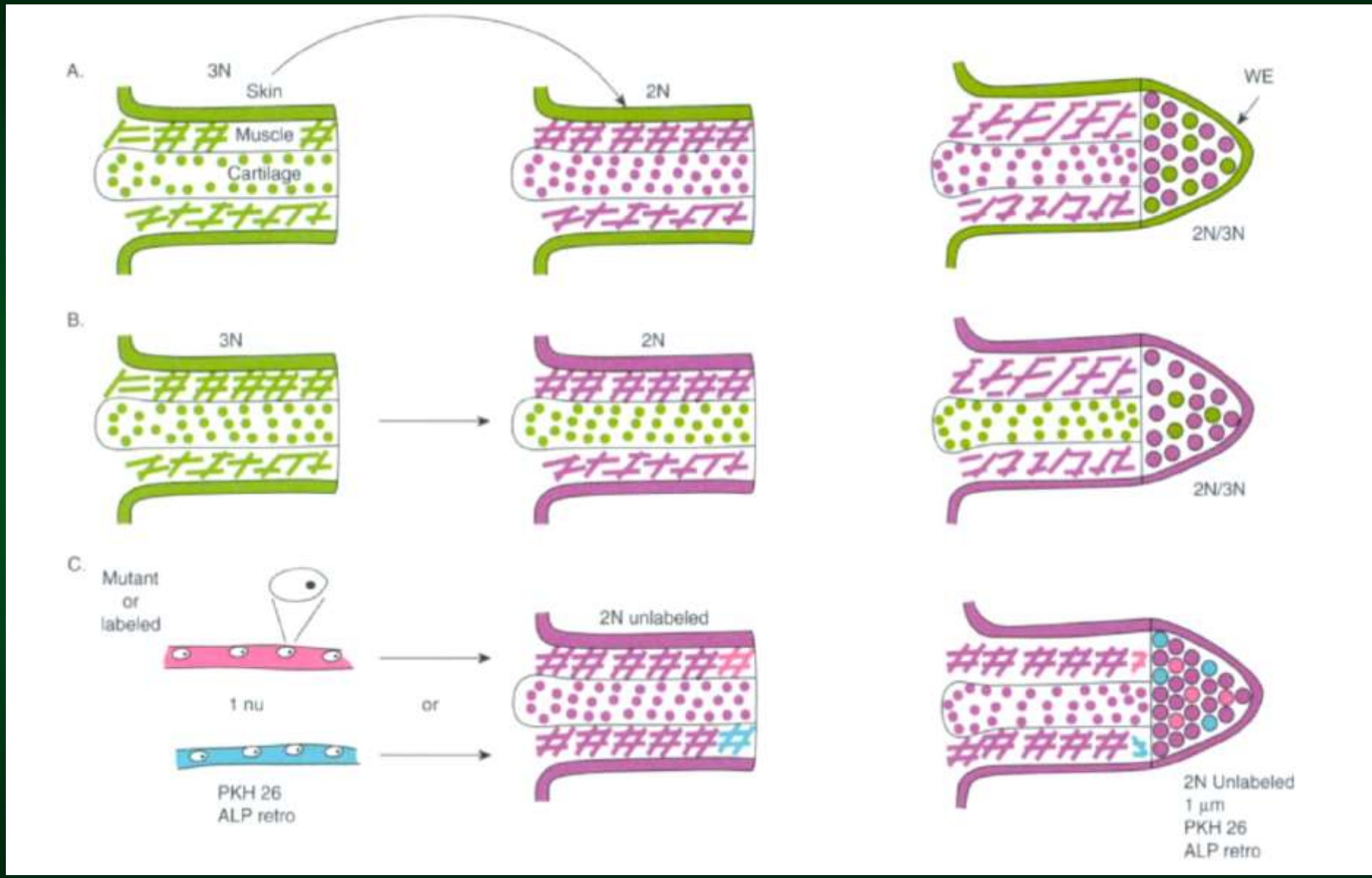
E.

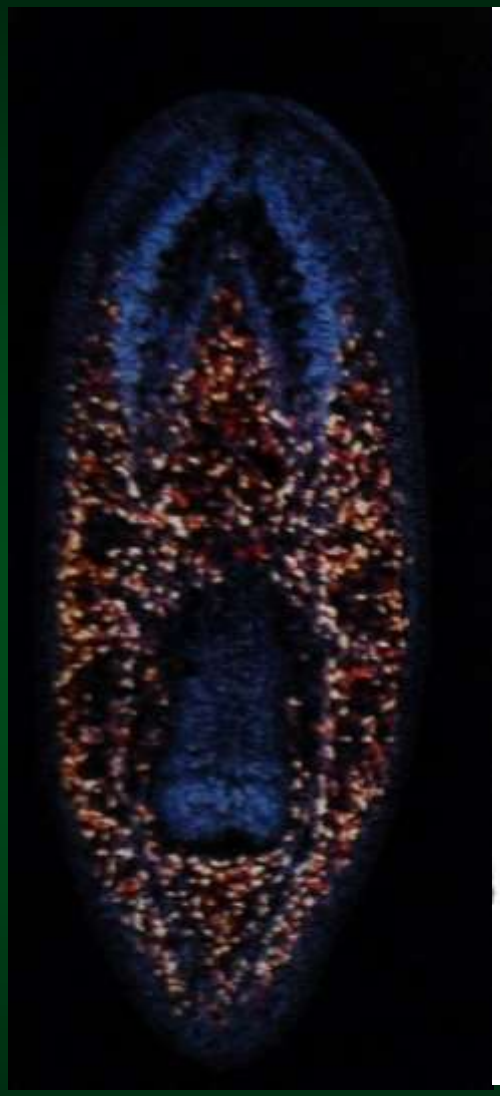


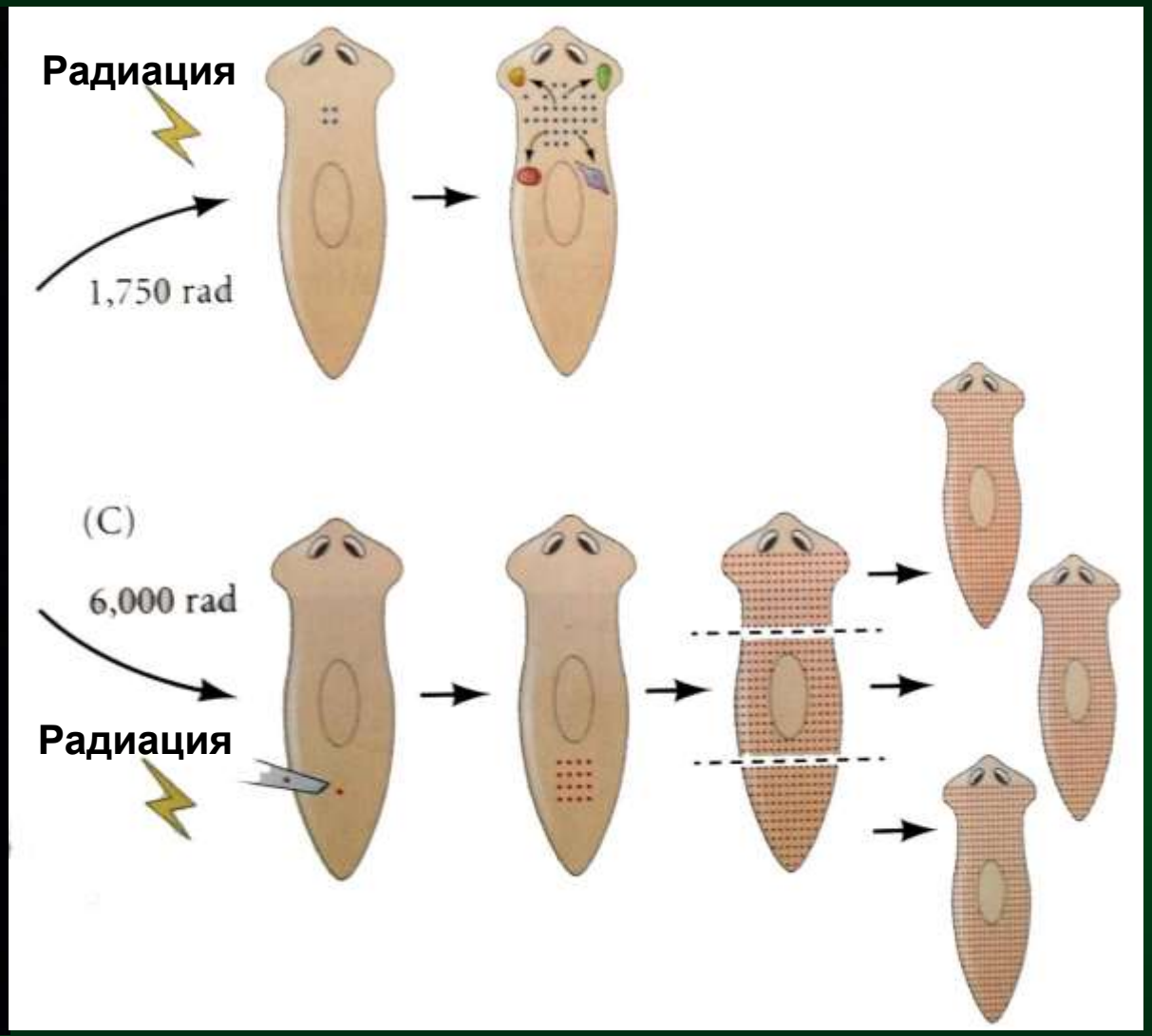
F.

Регенерация

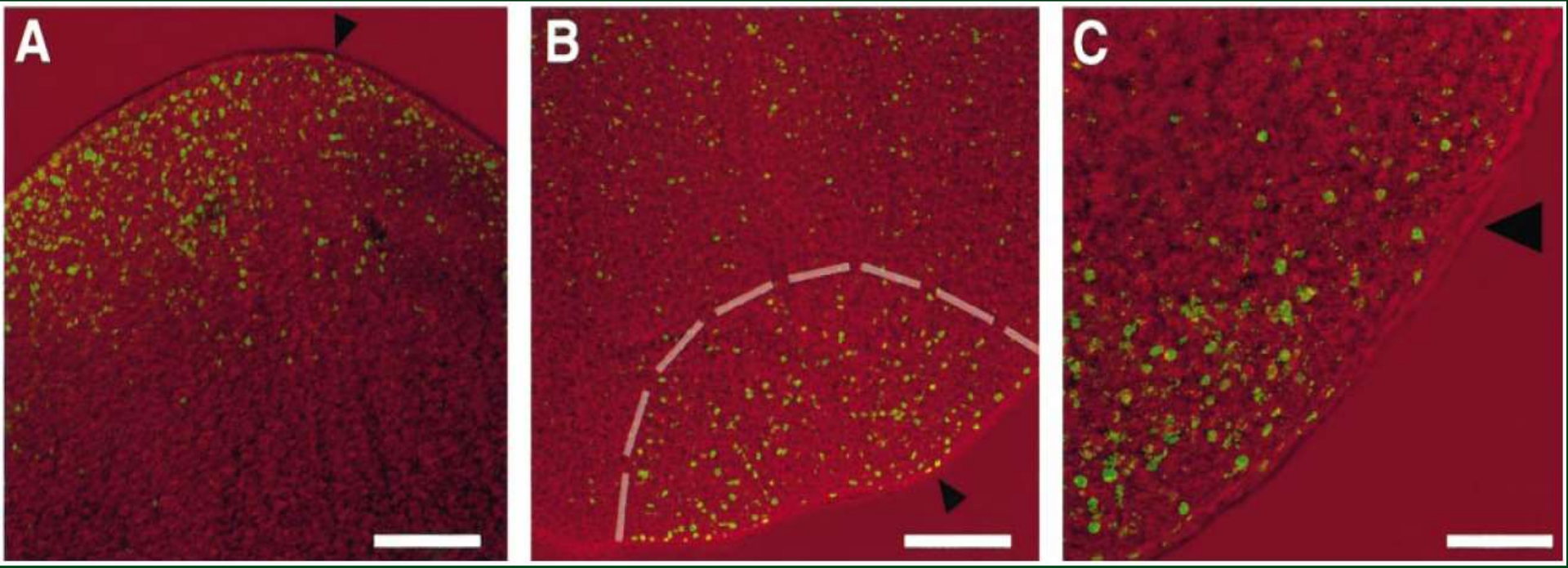
Клеточные источники


A.
3N
Skin
Muscle
Cartilage
2N
WE
2N/3N
B.
3N
2N
2N/3N
C.
Mutant
or
labeled
1 nu
PKH 26
ALP retro
or
2N unlabeled
2N Unlabeled
1 µm
PKH 26
ALP retro

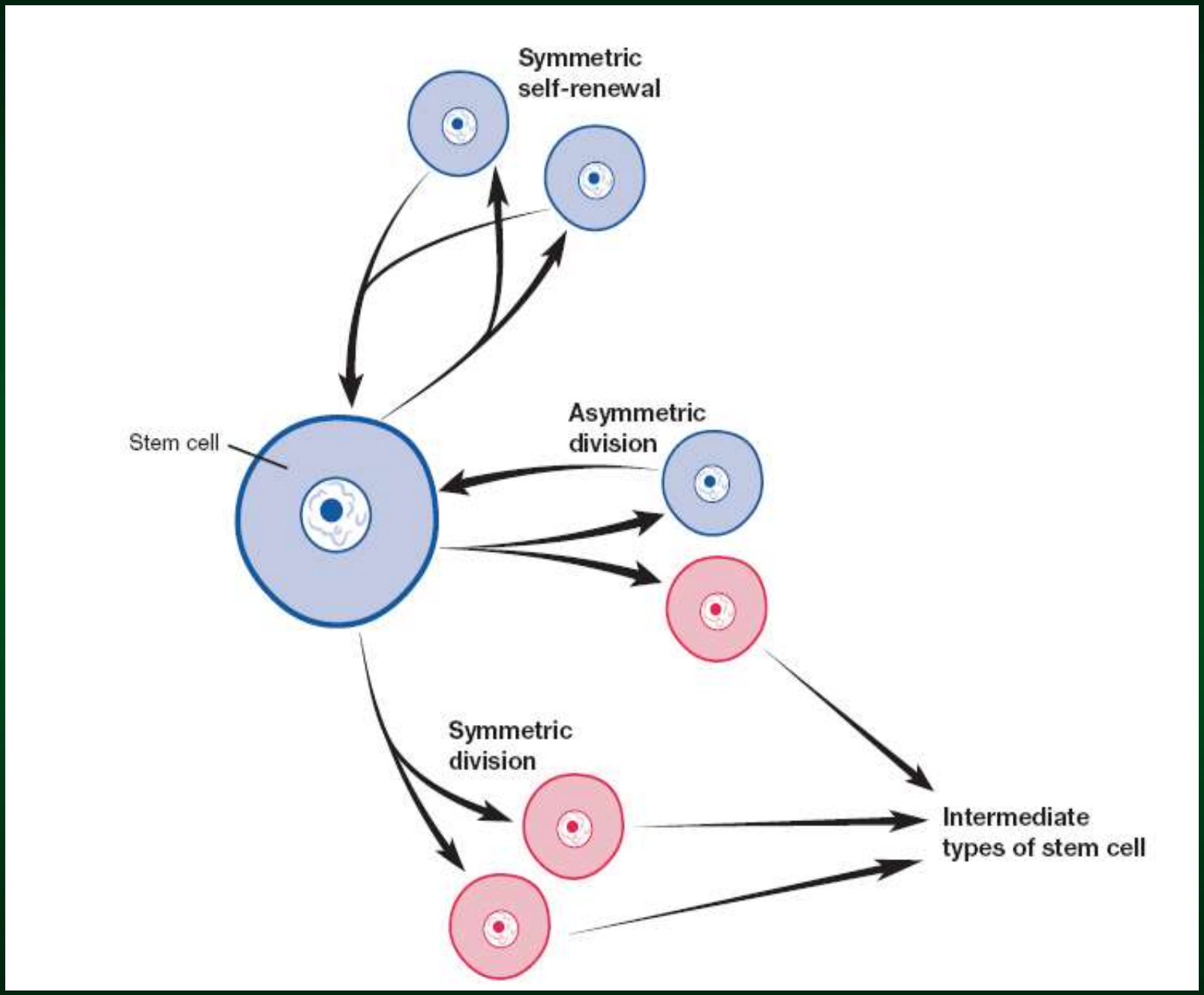


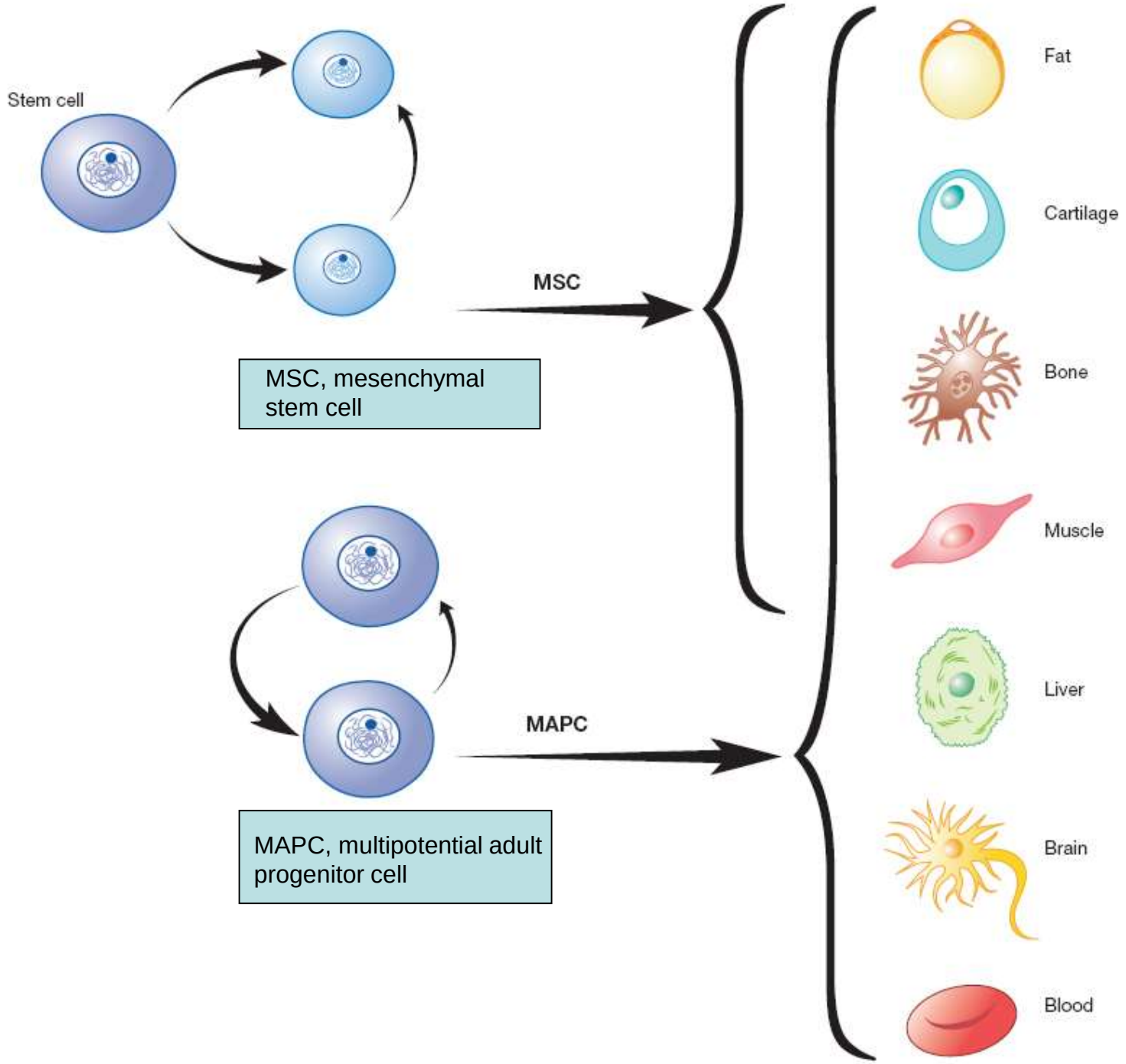

Радиация
1,750 rad
(C)
6,000 rad
Радиация

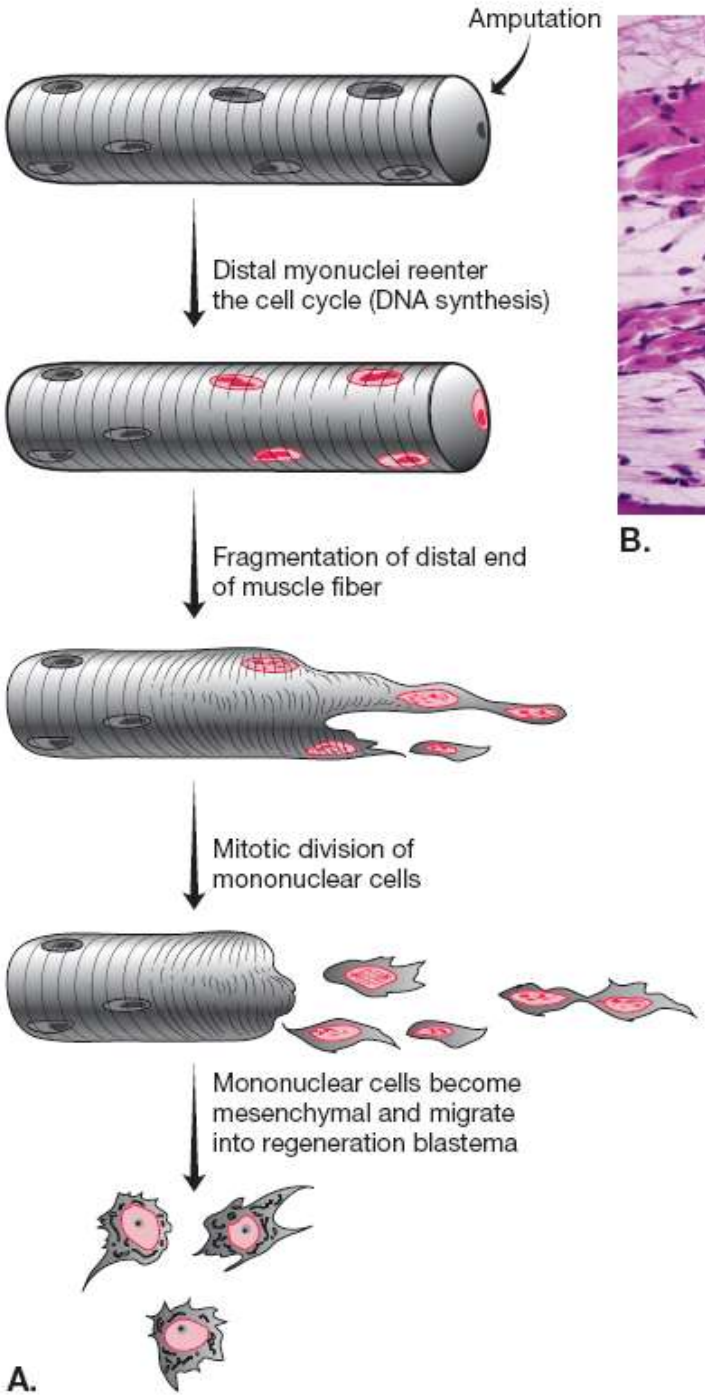
Регенерация у планарий



Newmark, Sánchez Alvarado, 2000


Symmetric
self-renewal
Stem cell
Asymmetric
division
Symmetric
division
Intermediate
types of stem cell


Stem cell
MSC
MSC, mesenchymal stem cell
MAPC
MAPC, multipotential adult progenitor cell
Fat
Cartilage
Bone
Muscle
Liver
Brain
Blood



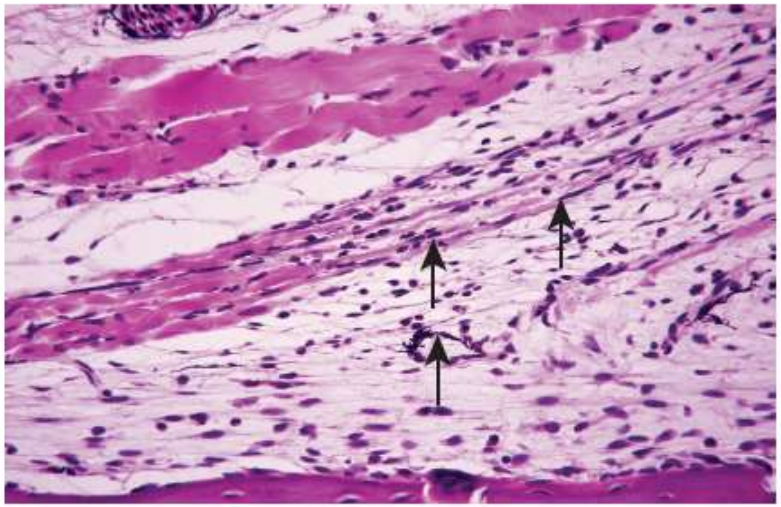
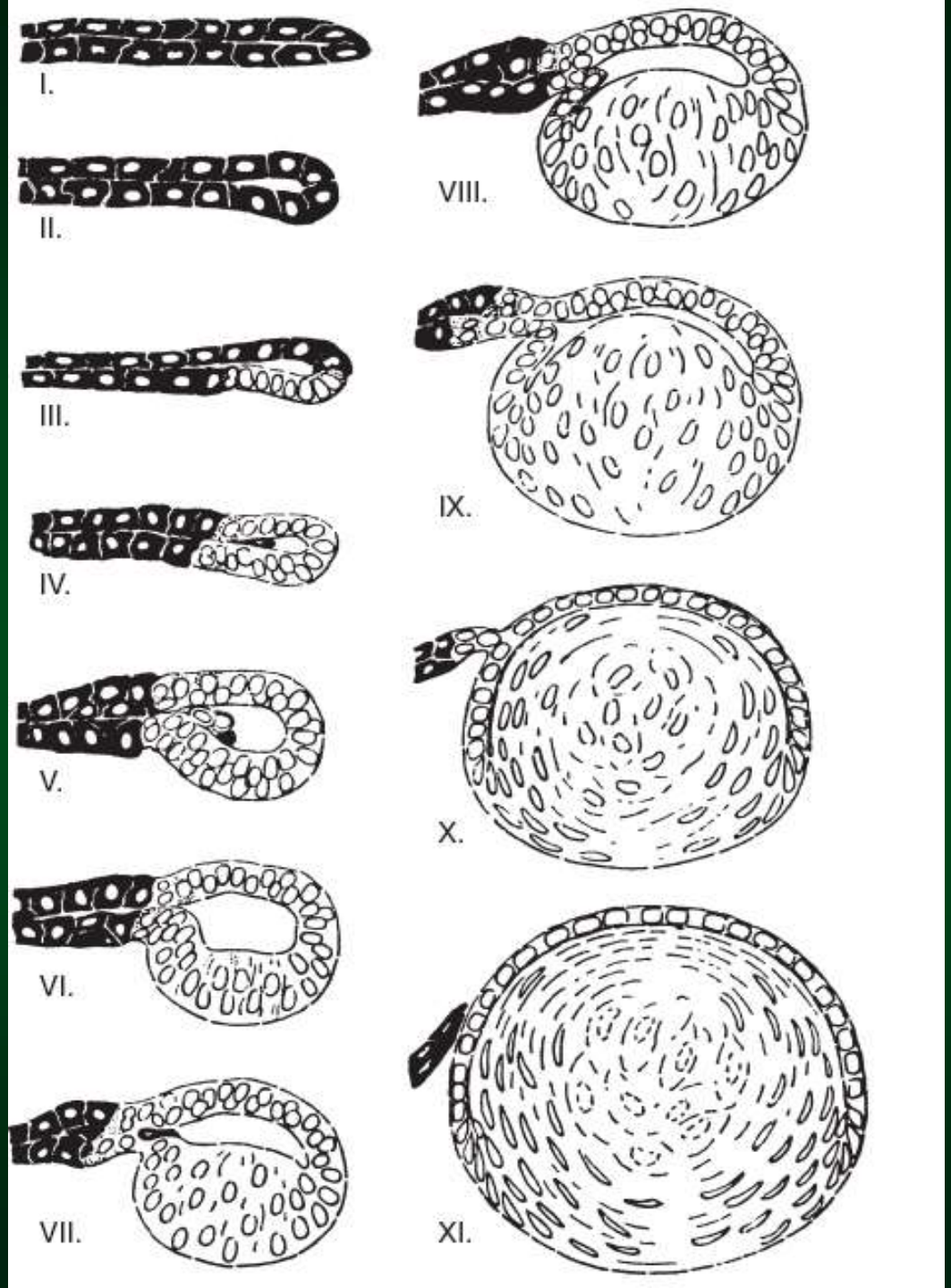
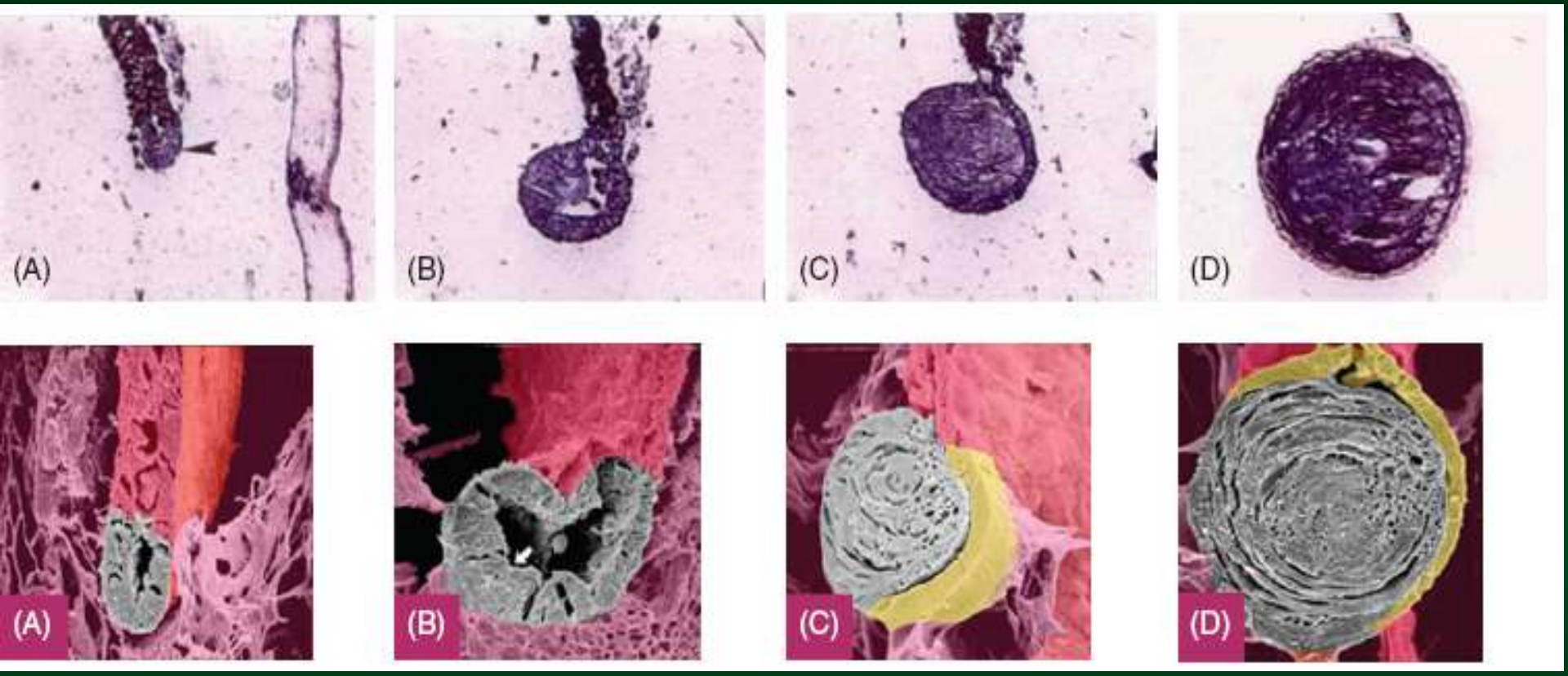
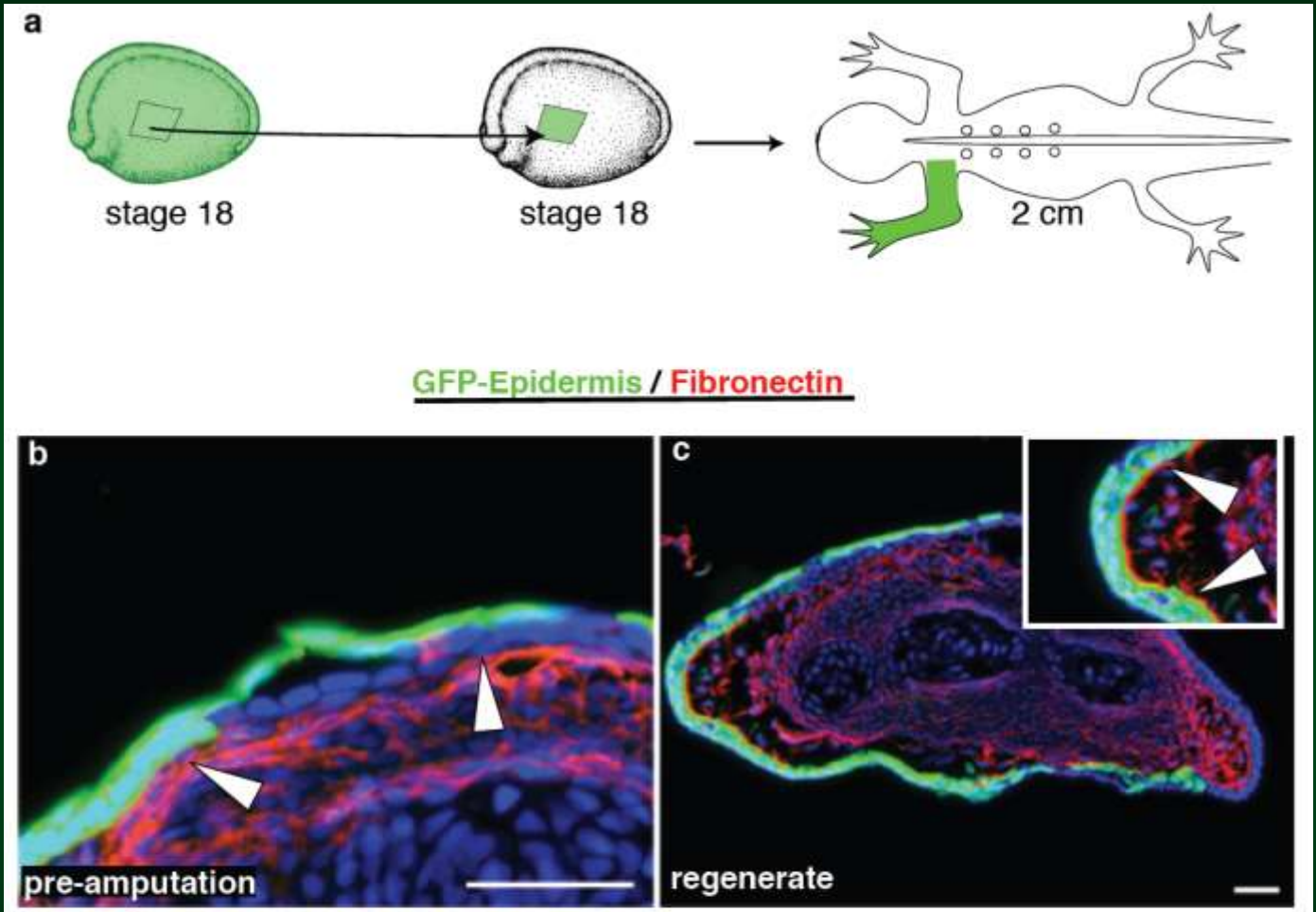


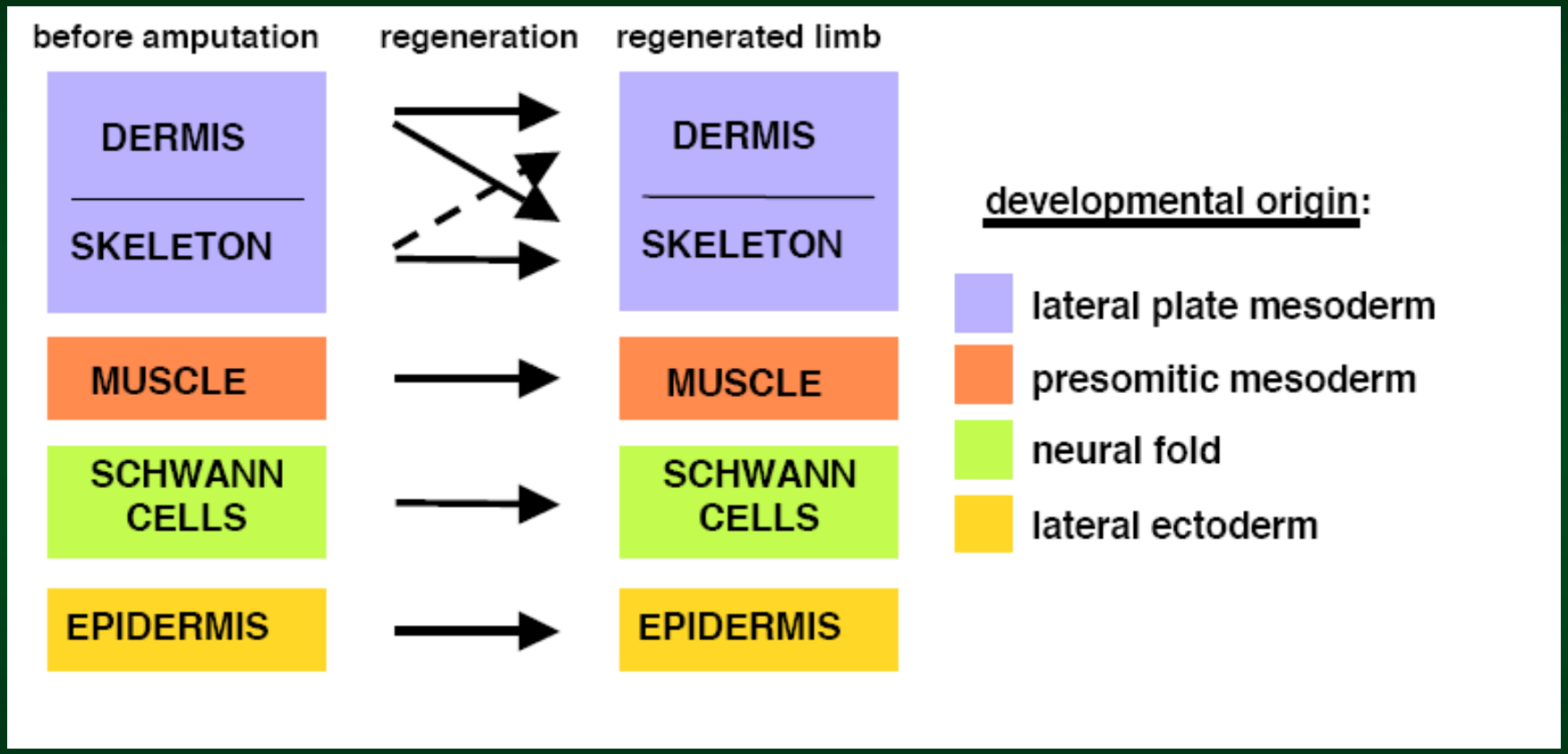
FIGURE 2-3 *(A)* Diagrammatic representation of the dedifferentiation of a muscle fiber in the amputated amphibian limb and the conversion of the resulting mononuclear cells into blastemal cells. *(B)* Photomicrograph of dedifferentiating muscle (arrows) in the amputated forelimb of the axolotl. The right side faces the plane of amputation.


I.
II.
III.
IV.
V.
VI.
VII.
VIII.
IX.
X.
XI.


(A)
(B)
(C)
(D)
(A)
(B)
(C)
(D)

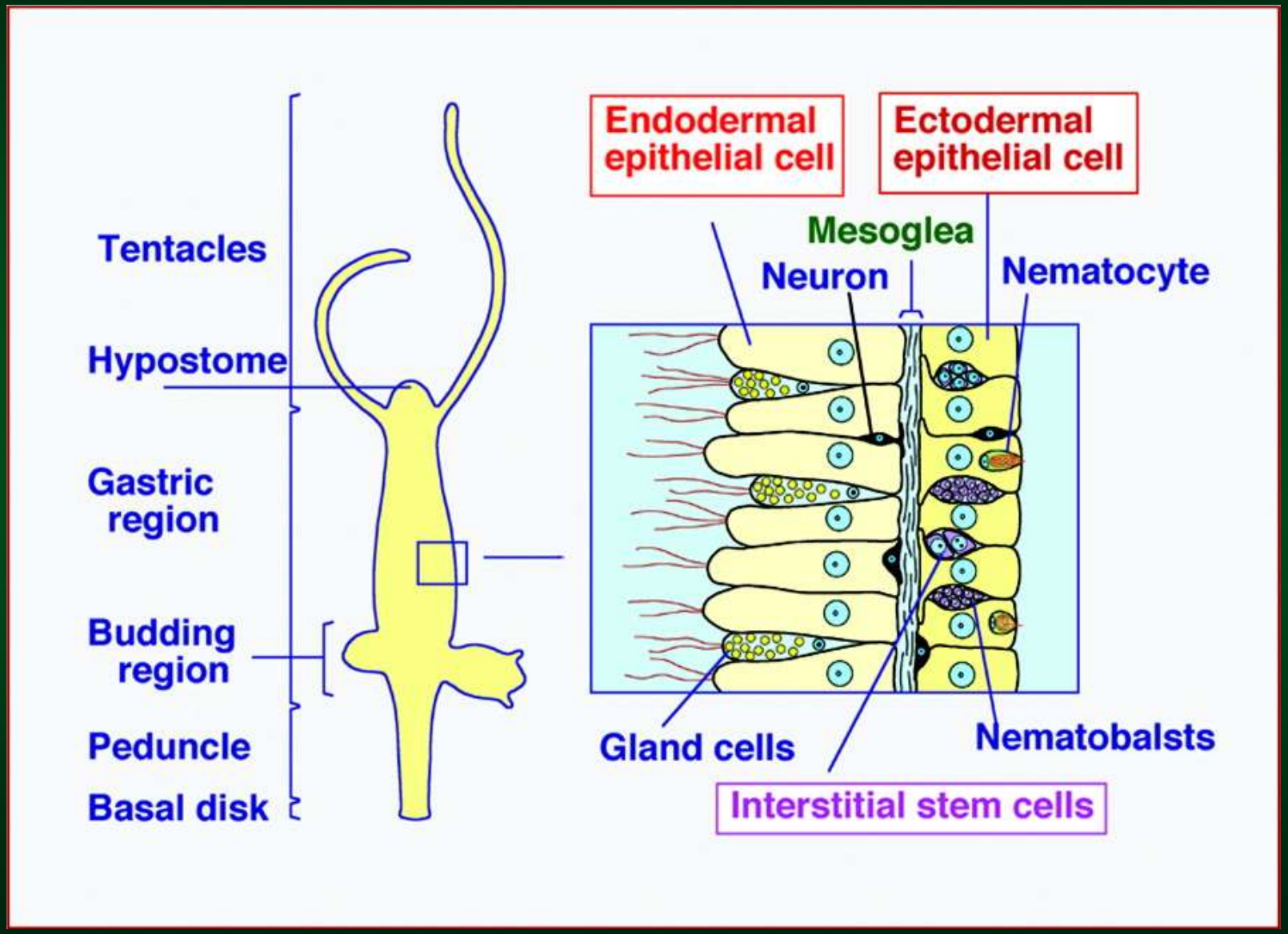


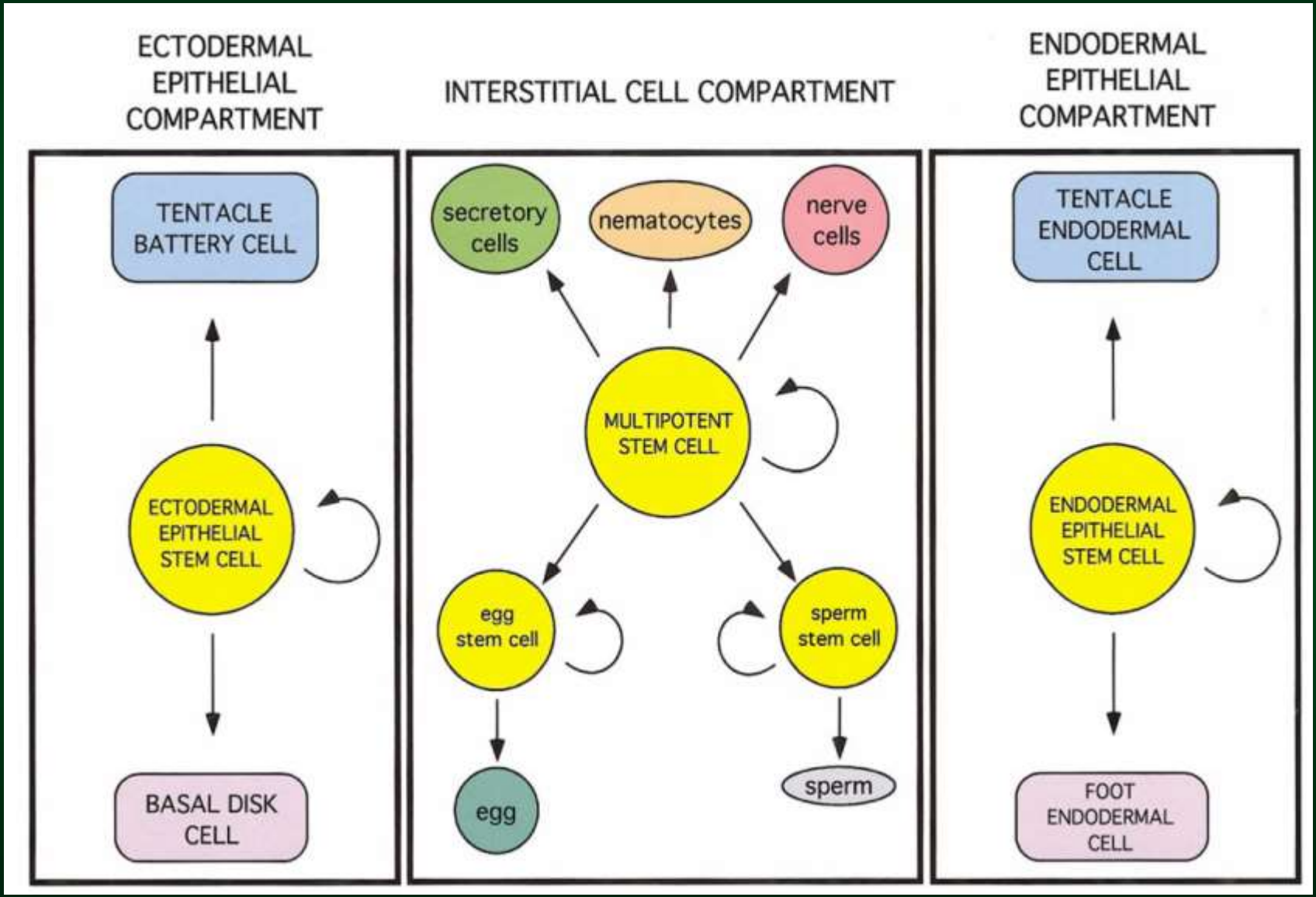
Kragl et al., 2009

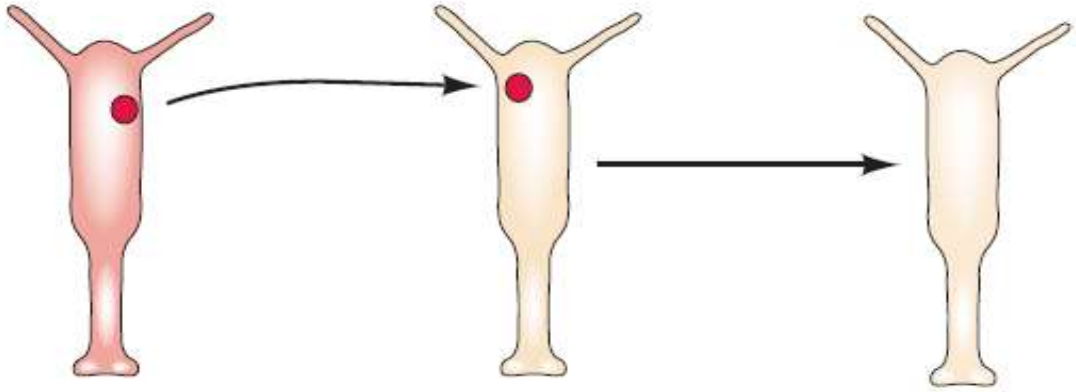


Kragl et al., 2009

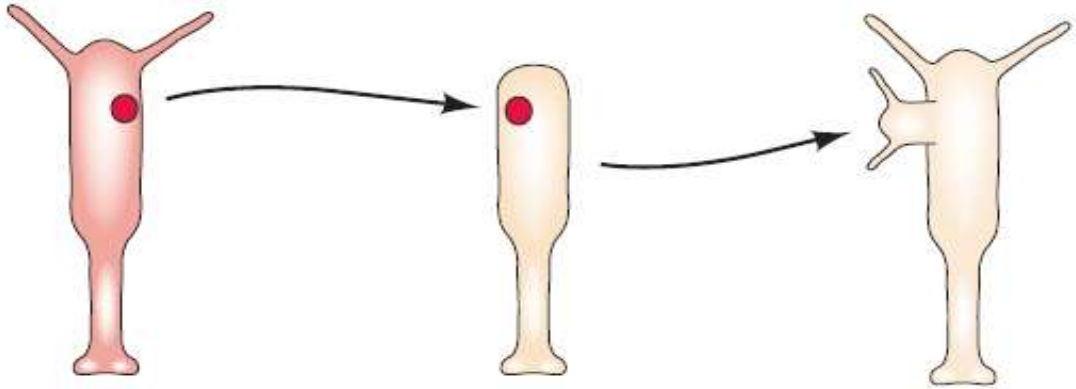
Регенерация у гидры



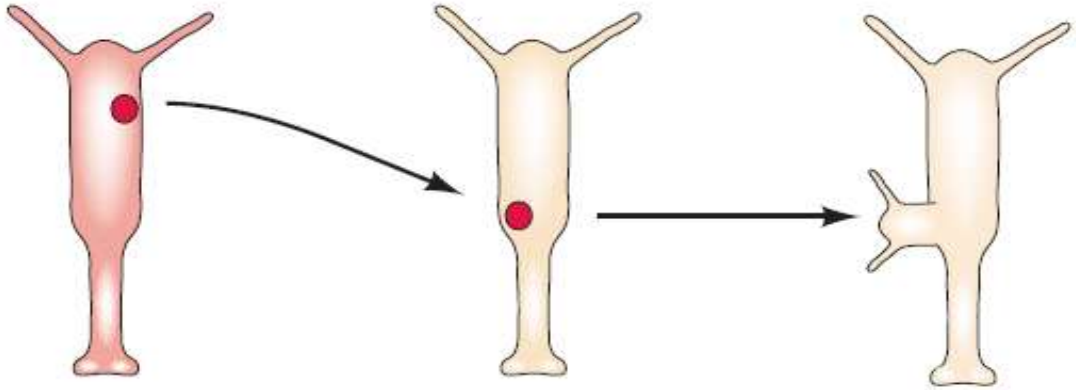

ECTODERMAL EPITHELIAL COMPARTMENT
INTERSTITIAL CELL COMPARTMENT
ENDODERMAL EPITHELIAL COMPARTMENT
TENTACLE BATTERY CELL
ECTODERMAL EPITHELIAL STEM CELL
BASAL DISK CELL
secretory cells
nematocytes
nerve cells
MULTIPOTENT STEM CELL
egg stem cell
sperm stem cell
egg
sperm
TENTACLE ENDODERMAL CELL
ENDODERMAL EPITHELIAL STEM CELL
FOOT ENDODERMAL CELL

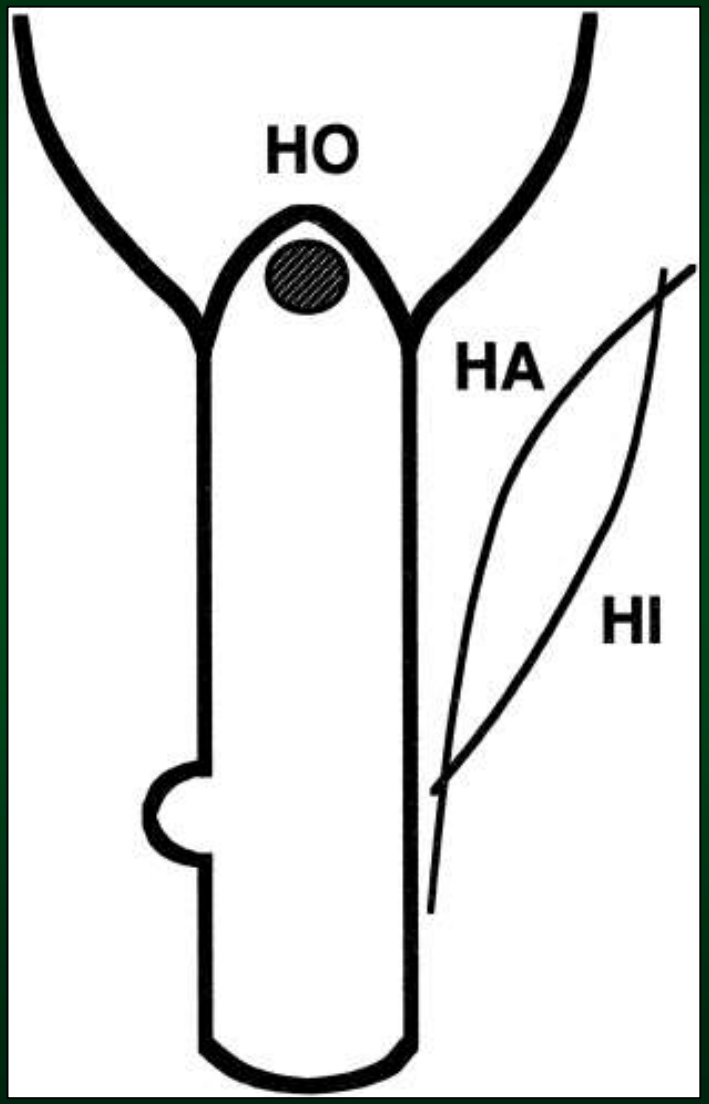


()

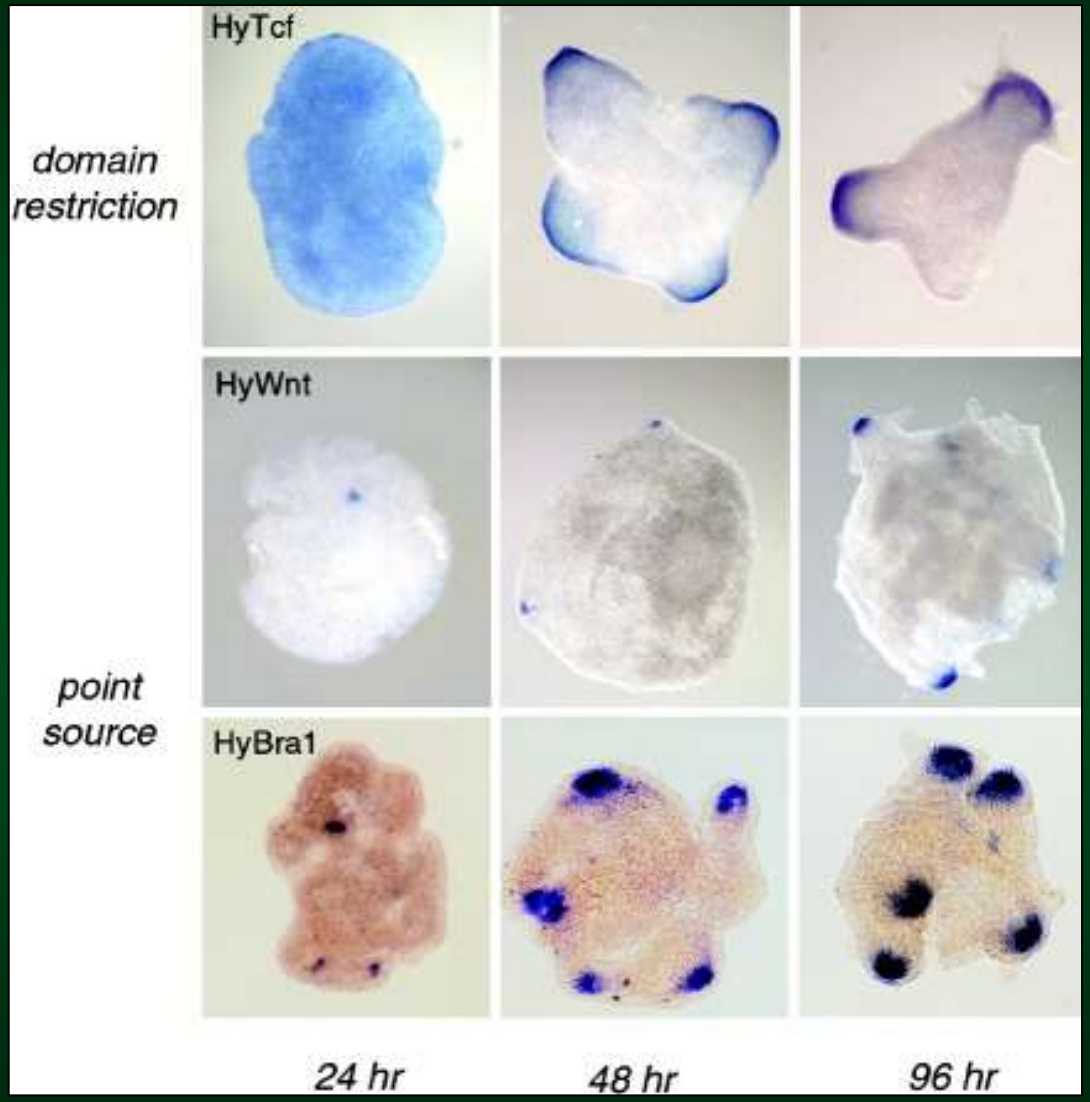


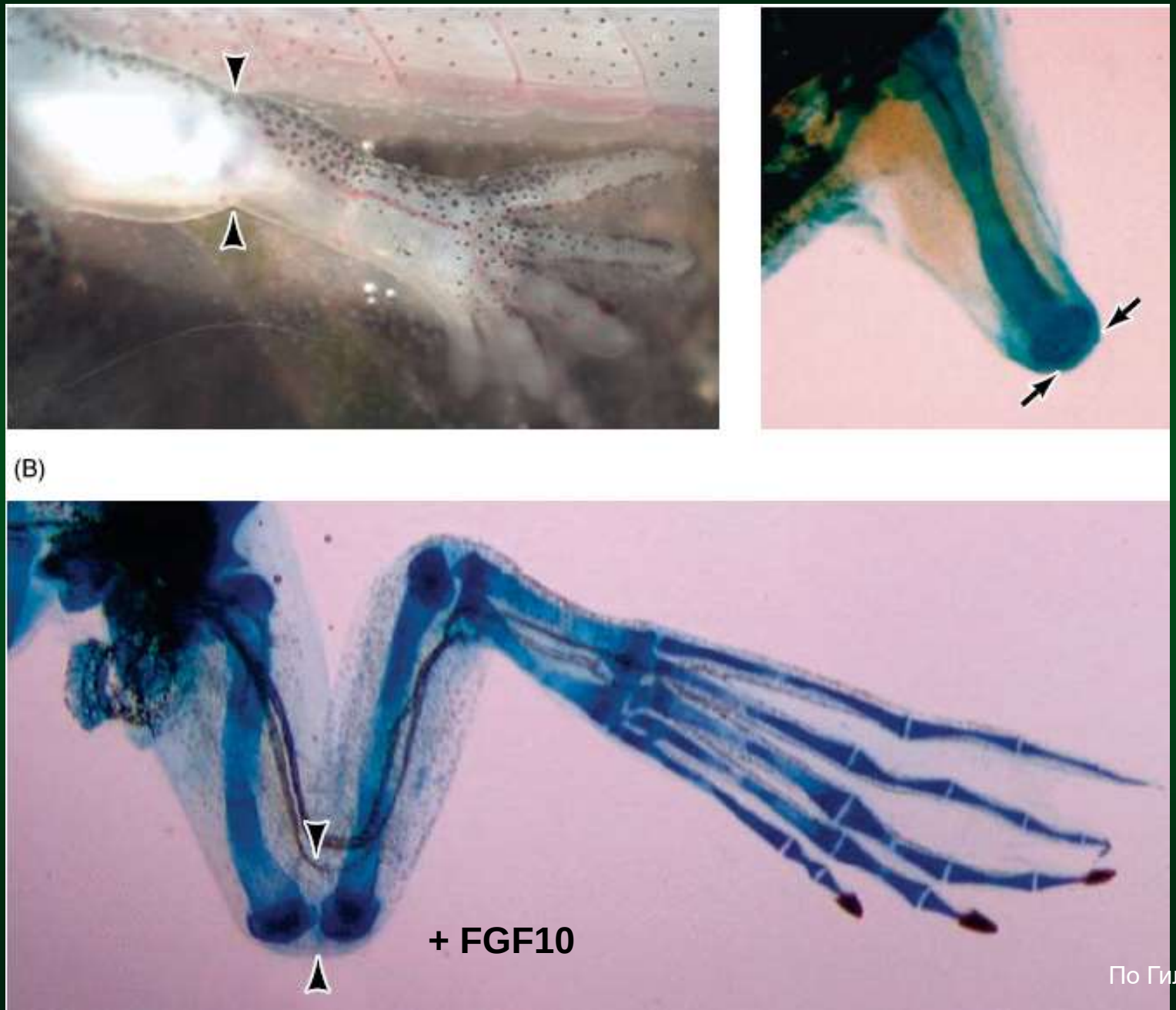
()



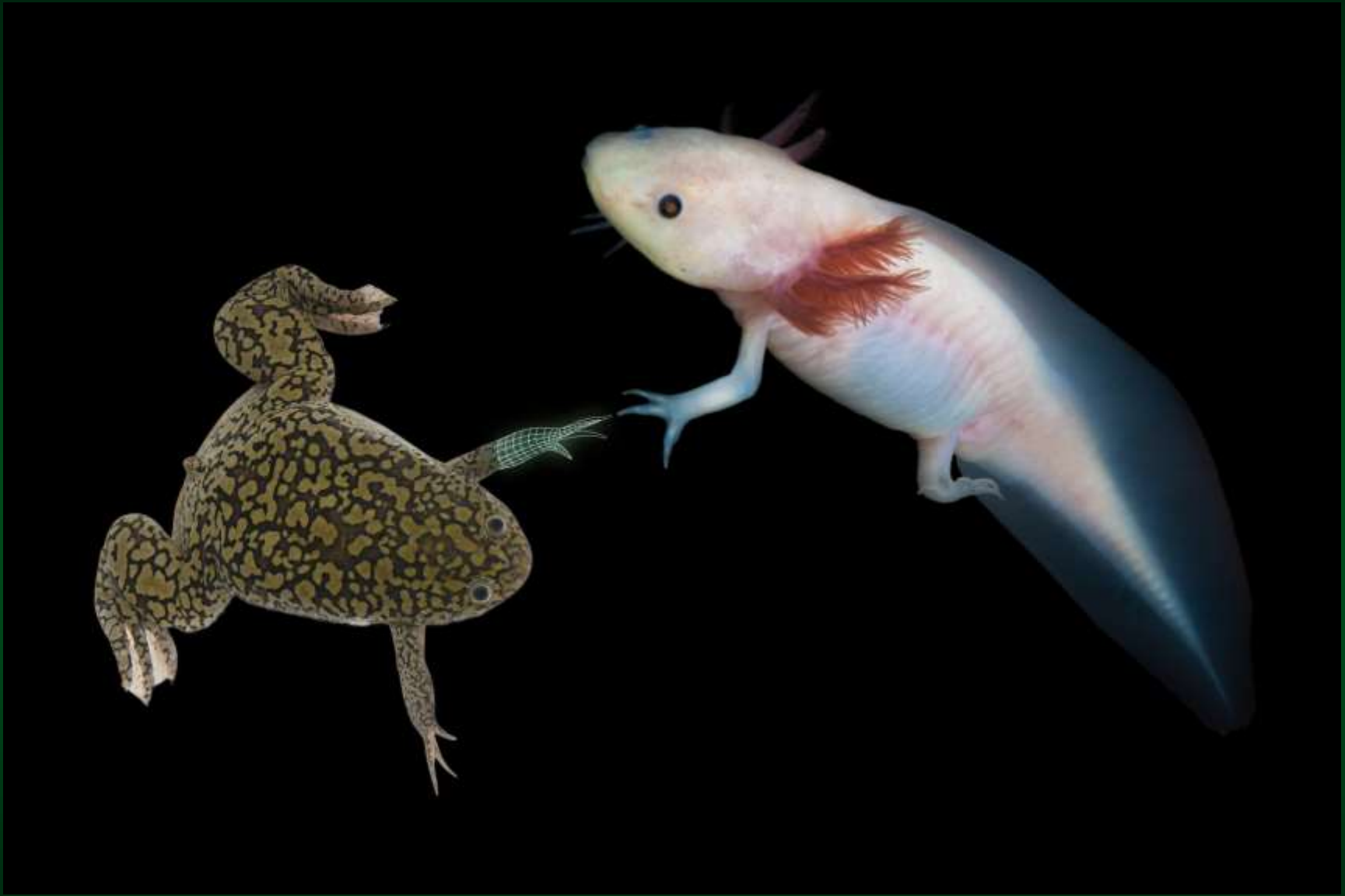


Bode, 2003


HyTcf
domain restriction
HyWnt
point source
HyBra1
24 hr
48 hr
96 hr

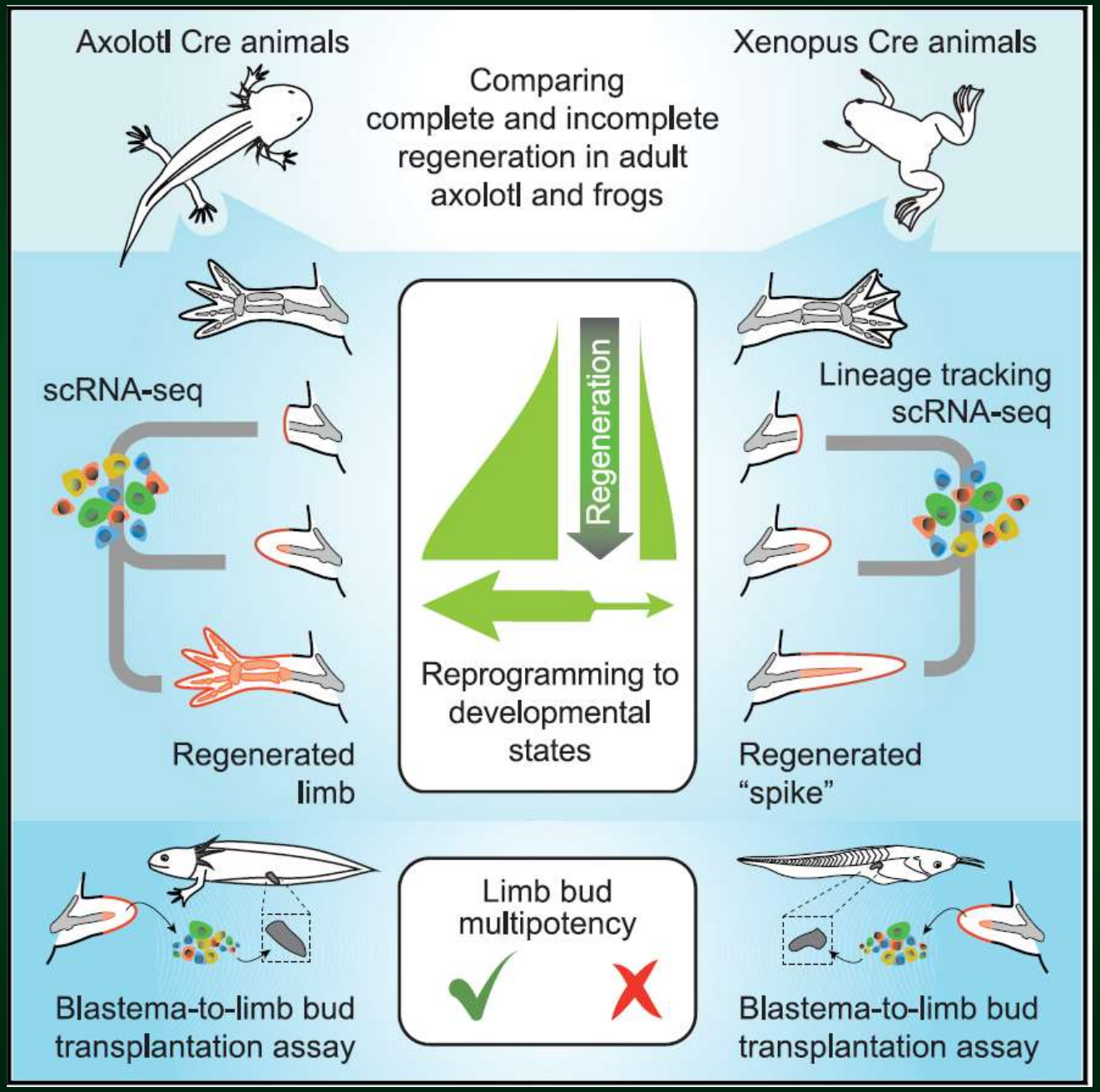


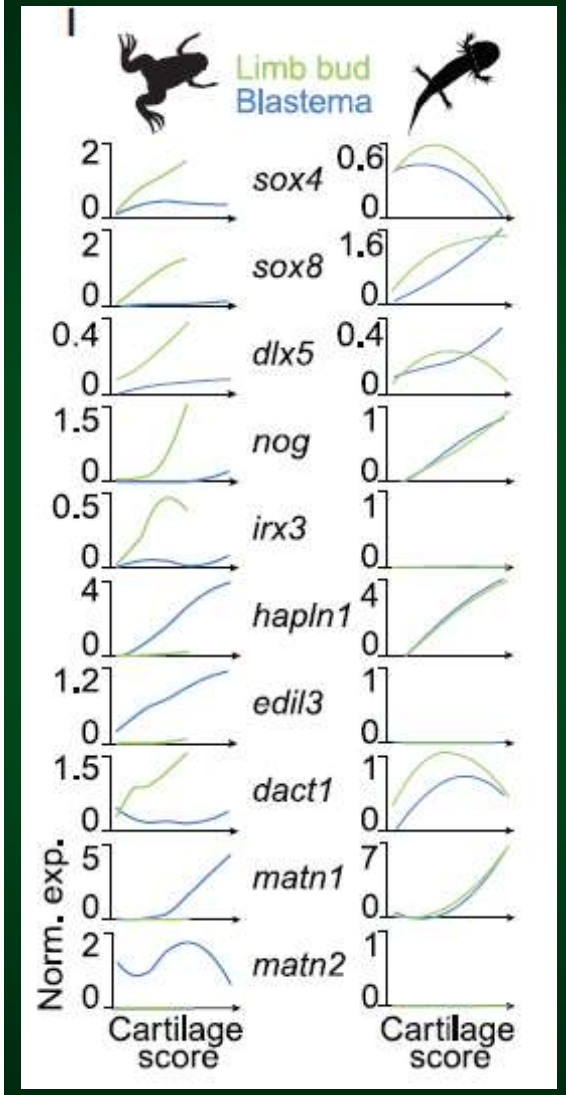
По Гилберт, 2010



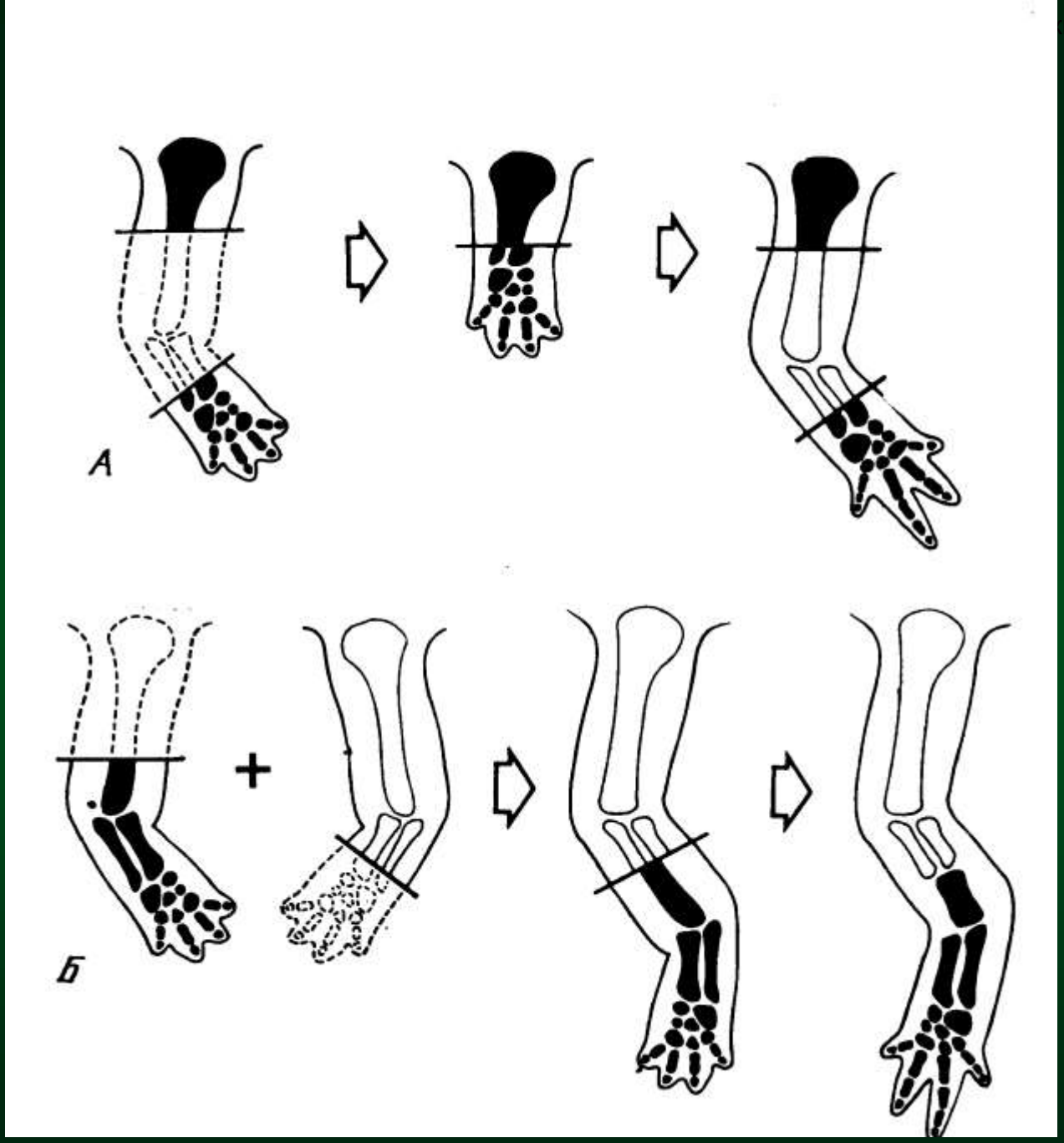
Credit: IMP

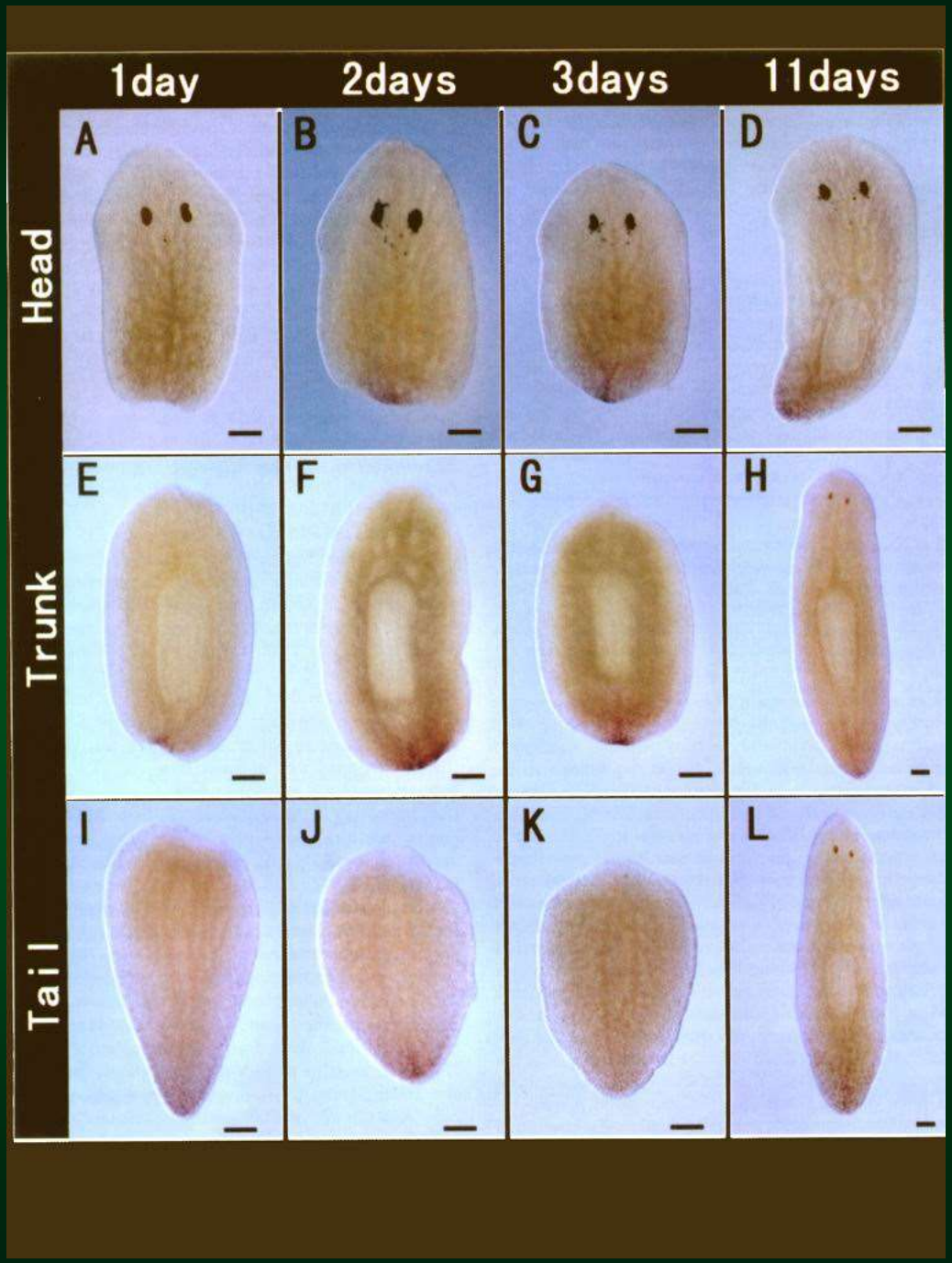
Fibroblast dedifferentiation as a determinant of successful regeneration



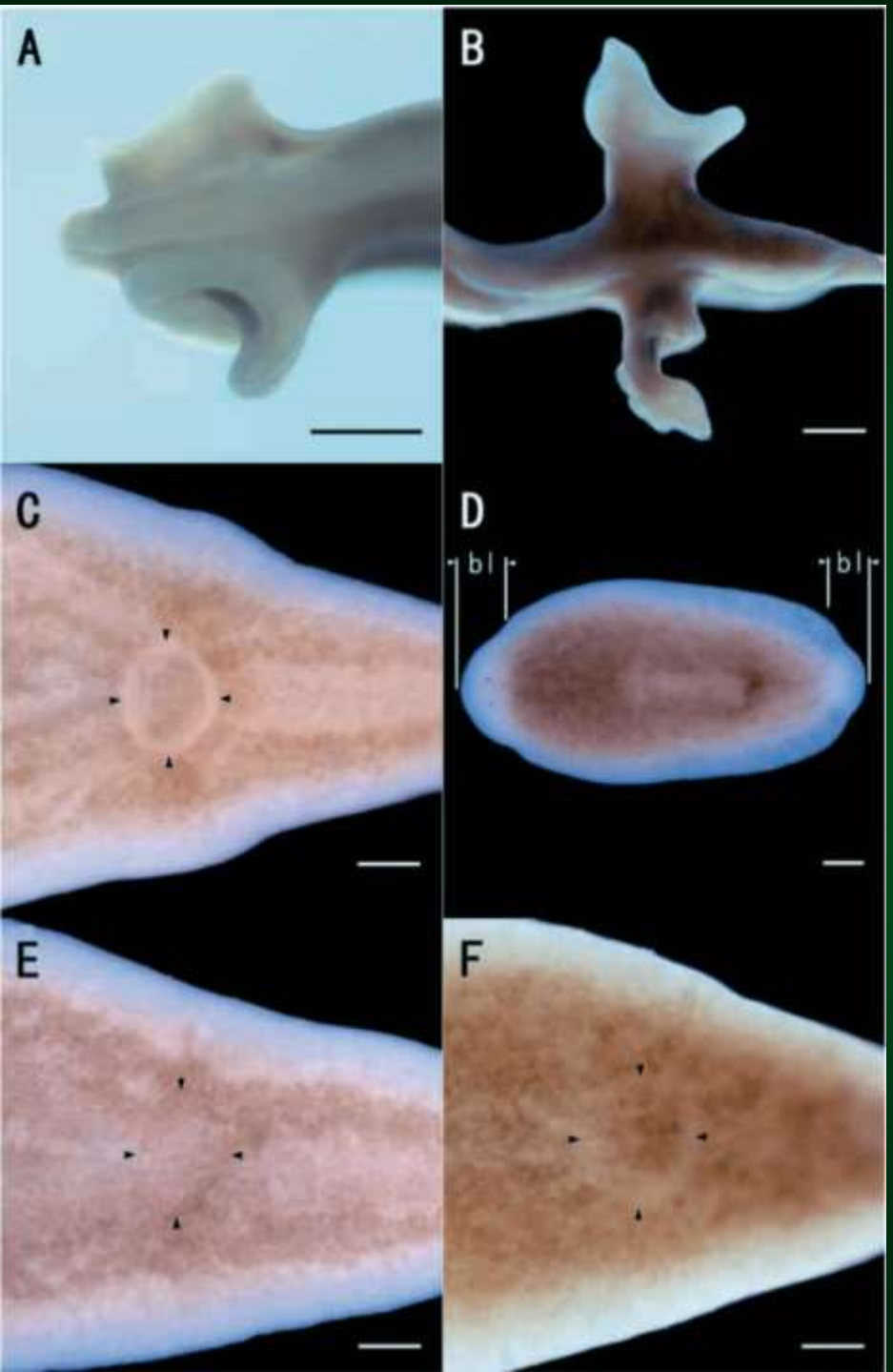


Lin et al., 2021

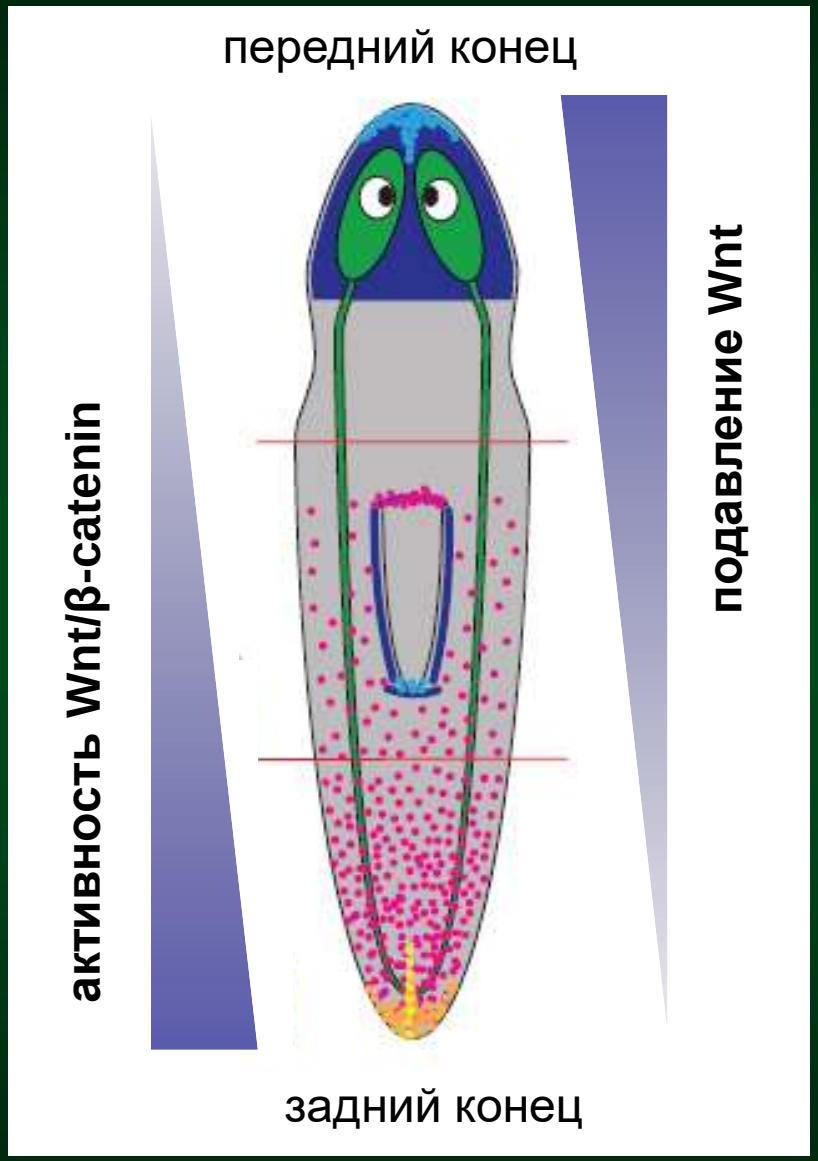

А
Б

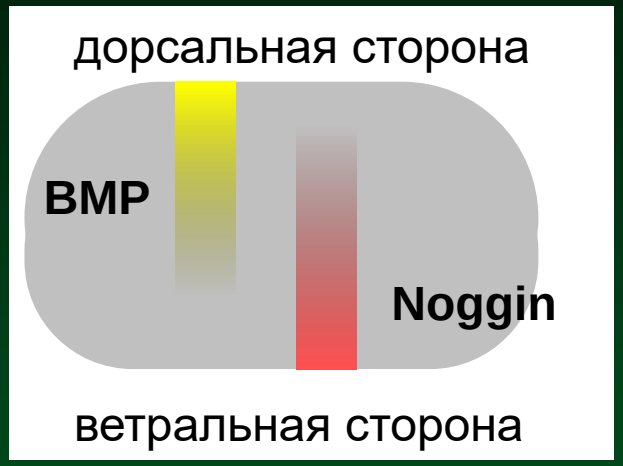

1day
2days
3days
11days
Head
Trunk
Tail
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

Регенерация у планарий



Kato et al., 1999

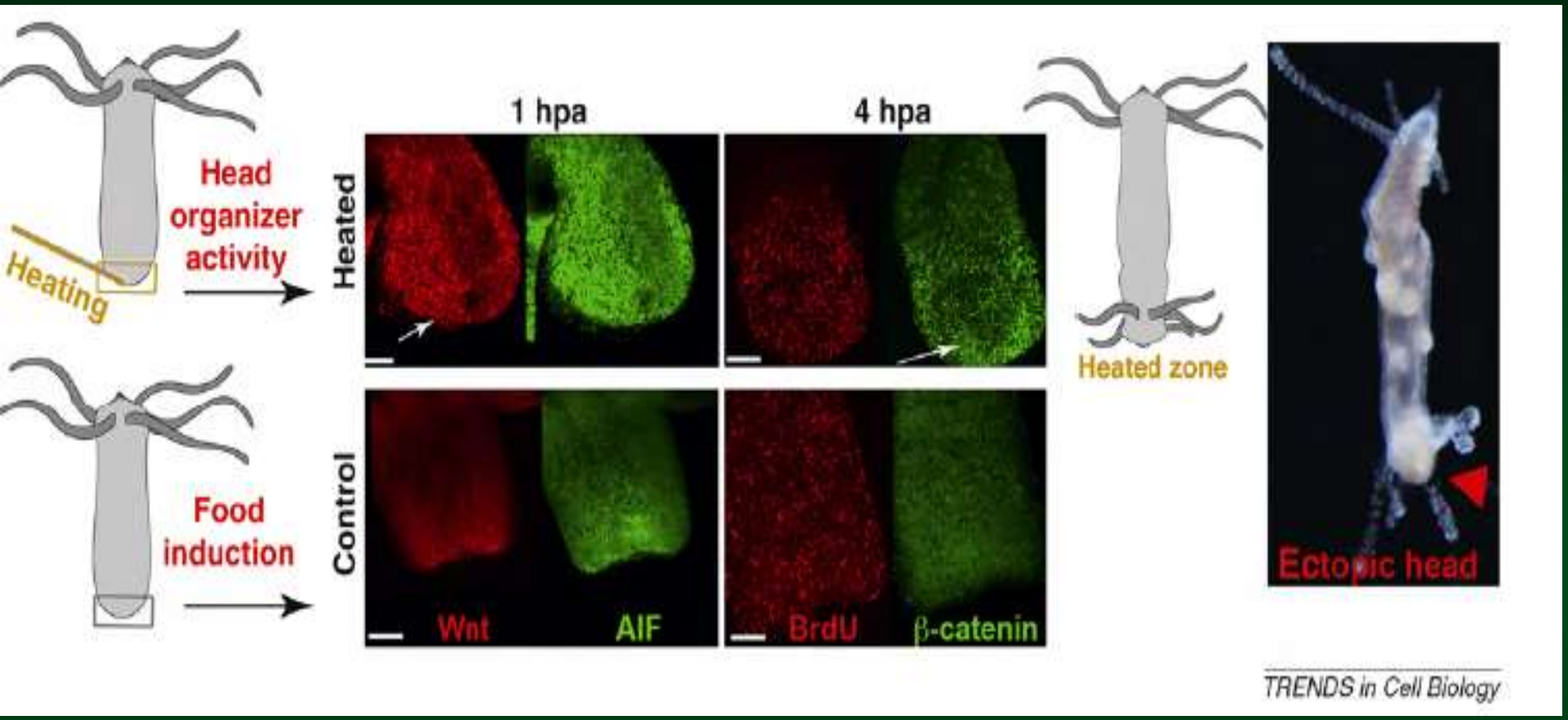




блок Wnt1

блок β-catenin

Лернейская гидра



Galliot, Chera, 2010