

Histologie a Embryologie

Přednášející:

Doc. MUDr. Miroslava Sedláčková, CSc.

Mgr. Petr Vaňhara, Ph.D.

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc., přednosta ústavu

Brno, 2016

Lecture 1

Úvod

- Předmět a význam histologie, její členění.
- Hraniční oblasti histologie.
- Historie, současnost a budoucnost histologie.

Cytologie

- Buňka: definice, obecná stavba, kompartmentalizace.
- Buněčné jádro: ultrastruktura a funkční význam, chromosomy, jadérko.
- Endoplasmatické retikulum
- Centrosom

Histologie

Mikroskopická a submikroskopická struktura těla

(buňky, mezibuněčná hmota, tekutiny)

Cytologie

Struktura buňky
a její vztah k funkci.

Obecná histologie

Jaké jsou základní typy tkání?
Jaké jsou jejich funkce?
Jakými buněčnými typy jsou tvořeny?

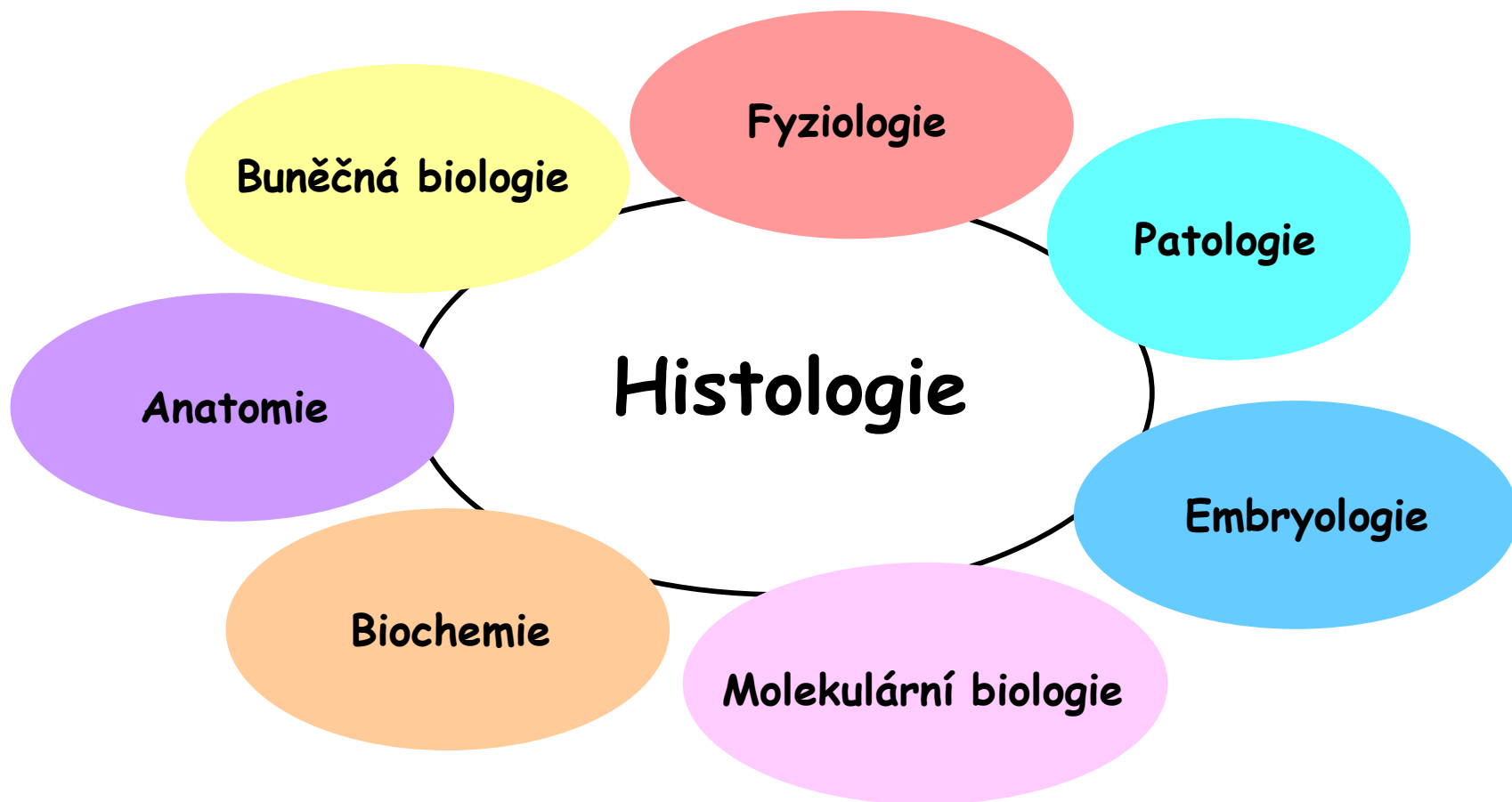
Mikroskopická anatomie

Složení a struktura orgánových systémů & individuálních orgánů

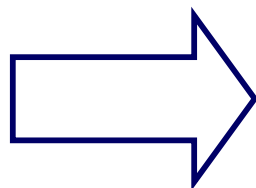
Jaké typy tkání a jak jsou organizovány?
Jaké speciální buněčné typy?
Které speciální struktury? (např. tubuly)
Jak to celé funguje?

Toto vše je odrazem hierarchické struktury mnohobuněčných organismů

Histology není statickou disciplínou, která se zabývá výhradně strukturou !!!



Mysleme „histologicky“



Spojme si histologii s akcí a pohybem

**Studium histologie se poprvé stalo povinným v roce 1893
na John's Hopkins Medical School !**

Většina velkých histologů byli Němci protože vyráběli kvalitní mikroskopy.

Eponymously theirs.....

Marcello Malpighi

1628 - 1694

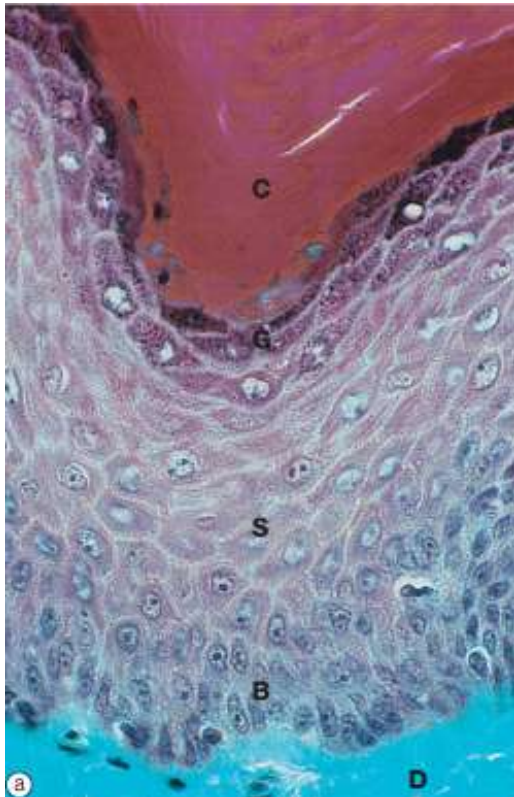
Italský lékař

Zakladatel mikroskopické anatomie a první histolog

- Popsal **chuťové pohárky**
- Popsal krevní **kapiláry**
- Možná první, kdo viděl v mikroskopu **červené krvinky**



MARCELLO MALPIGHI.
From an engraving of the edification by A. M. Tolon, presented to the Royal Society by Malpighi.



← **Malpighiho vrstva kůže**

Stratum basale a stratum spinosum kůže

Malpighiho tělíska v ledvinách a slezině

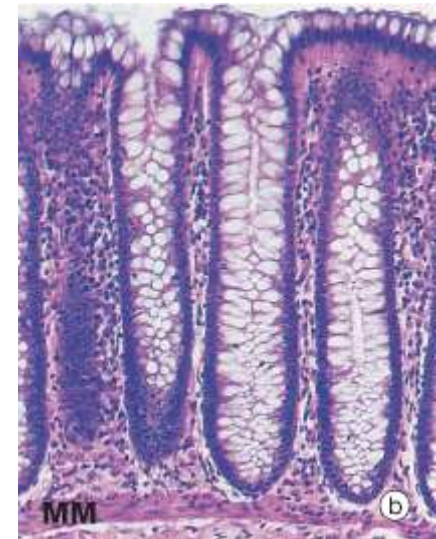
Johan Nathanael Lieberkuhn 1711 - 1756

Německý anatom a lékař



Johann N. Lieberkuhn
(1711-1756)

Hlavním přispěním k histologii
bylo popsání **Lieberkuhnových
krypt** se žlázami v tenkém a
tlustém střevě



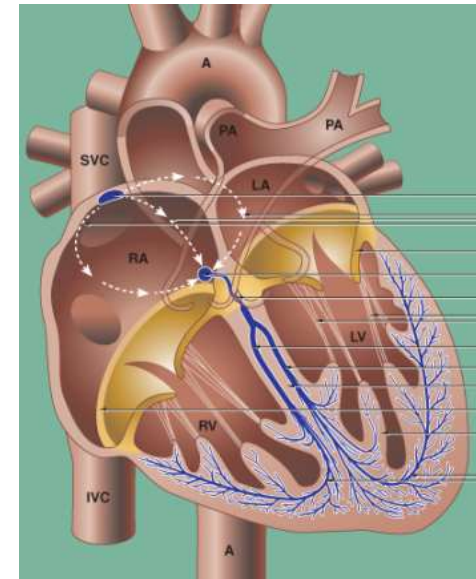
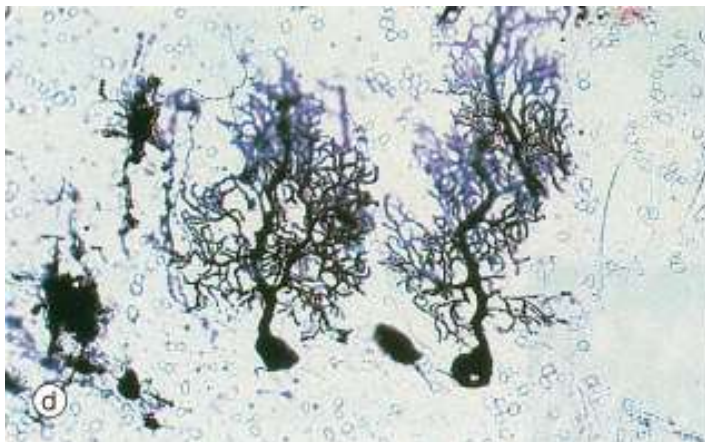
Jan Evangelista Purkyně

1787 - 1869

Český fyziolog

Schwann + Schleiden - 1839 - buněčná teorie

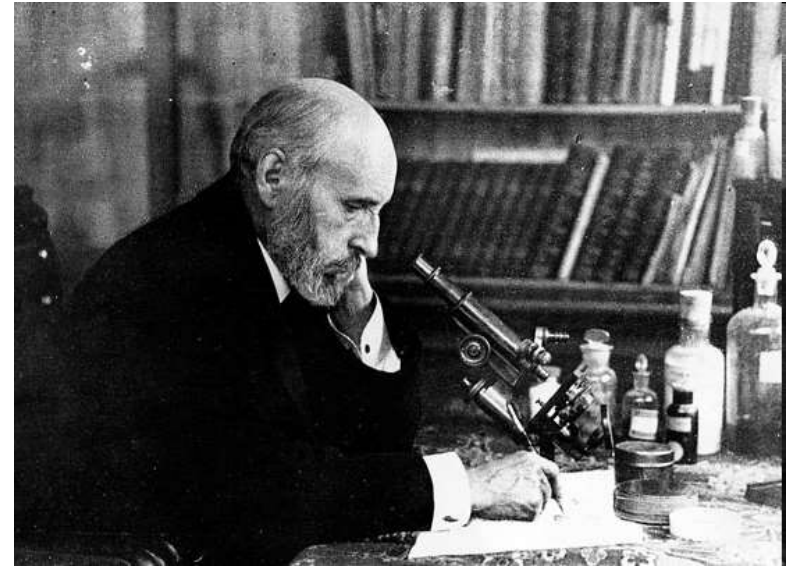
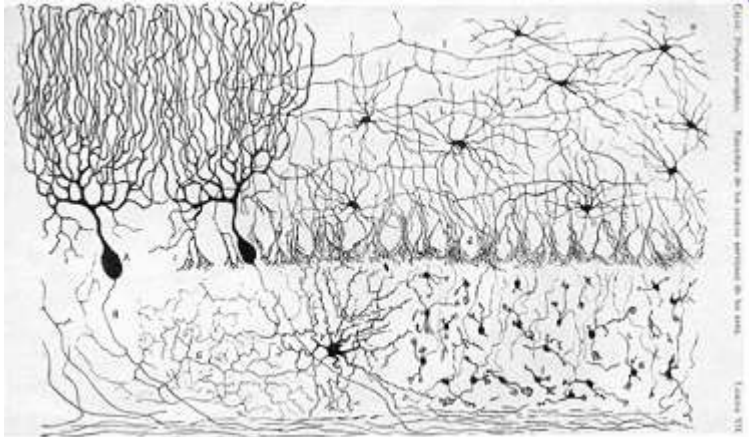
- Pionýr histologických technik
Poprvé použil přístroj podobný současnému **mikrotomu**
- Zavedl termín **plasma**
- Popsal **Purkyňova vlákna** v srdci
- Popsal **Purkyňovy buňky** v kůře mozečku



Santiago Ramón Y Cajal

1852 - 1934

Španělský lékař a anatom



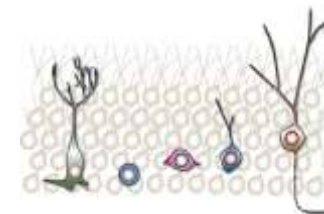
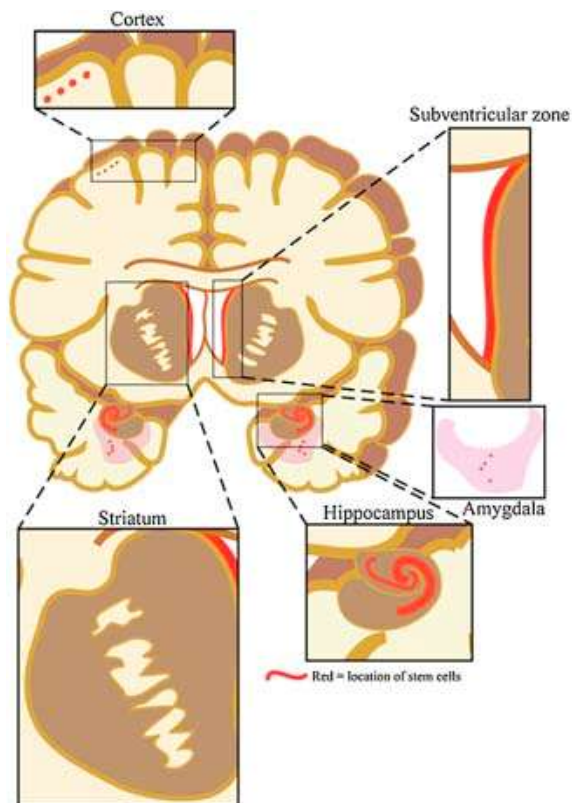
Poprvé popsal **neuron** jako primární strukturální a funkční jednotku nervové tkáně.
Nobelova cena v roce 1906

“Once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.”

Neočekávané objevy

(od časných 90-tých let)

Existence multipotentních sebeobnovujících se progenitorů
v postantálním a dospělém nervovém systému



BEZPOCHYBY V:

- Subventrikulární zóna laterálních komor mozku
- Subgranulární zóna v gyrus dentatus hipokampu

MOŽNÁ V:

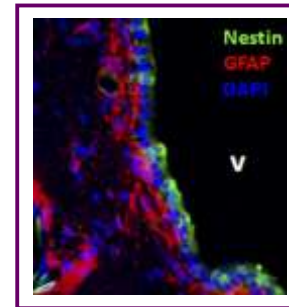
- Kůra koncového mozku ?
- Amygdala ?

Náš pohled na organizaci centrálního nervového systému se dramaticky změnil !!!

Mnoho otázek o NSC stále zůstává k zodpovězení

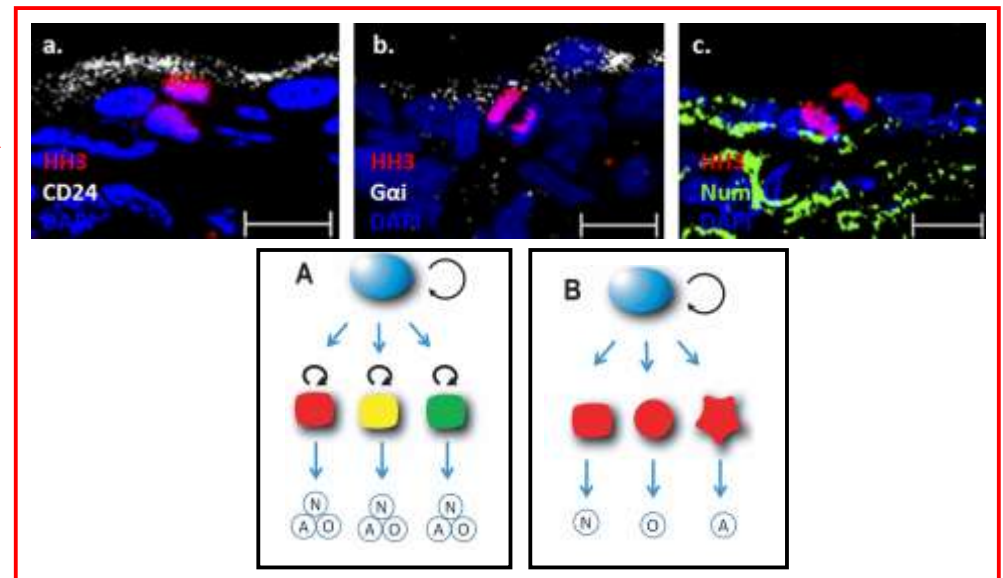
Je nutná kombinace přístupů vývojové biologie, **histologie**, buněčné biologie a molekulární biologie.

- přesná pozice ve tkáni ?
- proliferační a migrační aktivita ?

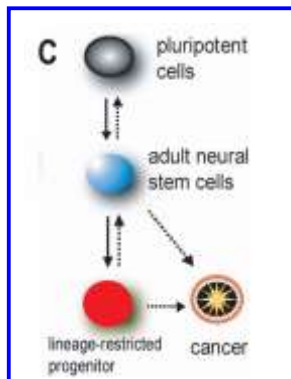


Gleason et al., Neuroscience, 2008.

- vývojový potenciál ?
- participace na vzniku chorob CNS ?



- další

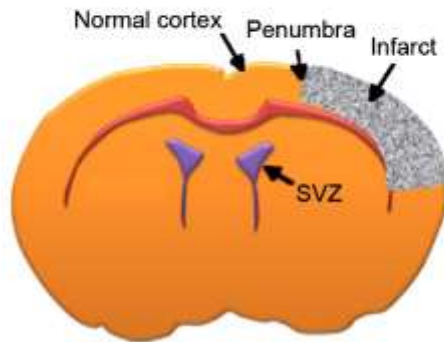
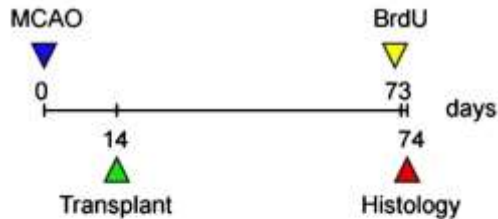


Má tento objev nějaké praktické užití ? (1)

Pomoc mozku regenerovat
po infarktu



Podpořit endogenní neurogenezu
a zlepšit tak **histologickou stavbu**
a funkci



Možnosti:

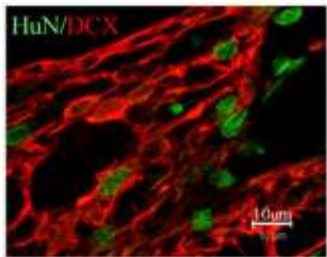
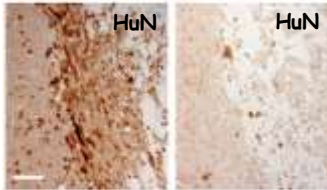
- chemická léčiva
- růstové faktory
- implantace buněk

- experiment na krysách
- infarkt mozku vyvolán uzavřením mozkové arterie
- do místa infarktu transplantovány lidské neurální progenitory
- **histologicky analyzováno**

Má tento objev nějaké praktické užití ? (2)

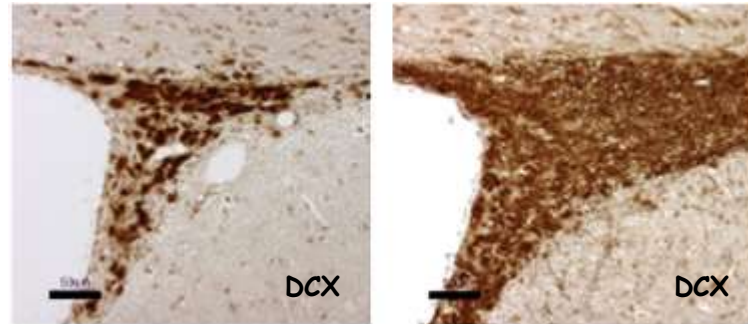
Transplantované lidské buňky v místě infarktu

3 měsíce 24 měsíců



HuN - jádra lidských buněk
DCX - doublecortin (marker časné neuronální linie)

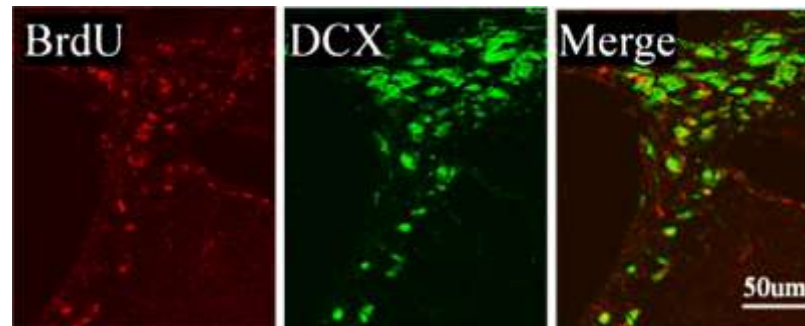
Neurogeneza v SVZ krysího mozku je stimulována



Bez transplantace

Transplantované buňky

Neocytogeneza probíhá před 60-tým dnem po transplantaci



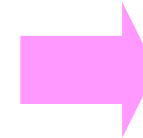
Pulzní znační BrdU ve dni 60 po transplantaci

Transplantace buněk & tkání

Poškození β buněk
ostrůvků slinivky břišní



Deregulace
metabolismu glukózy



Diabetes

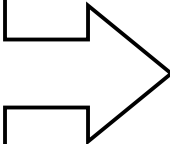
Neexistuje trvalá léčba - Transplantace ? - Imunosuprese

Lymphocyte function-associated
antigen 1 (LFA-1)

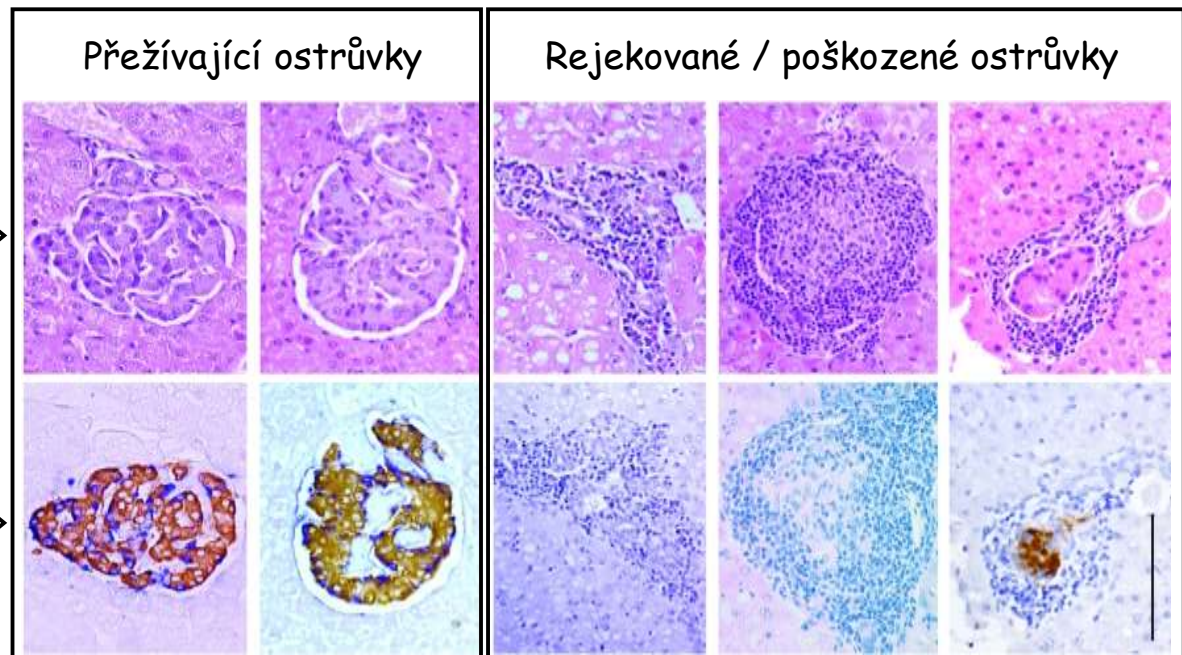
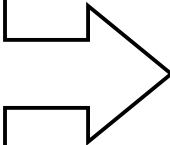


Krátkodobé ošetření
protilátkou proti LFA-1

Haematoxilin
&
Eosin



IHC
Insulin - hnědá
Glukagon - modrá



**Princip náhrady tkání a orgánů není nový,
současné medicíně se však nabízí nové postupy
postavené na pochopení struktury a funkce tkání**



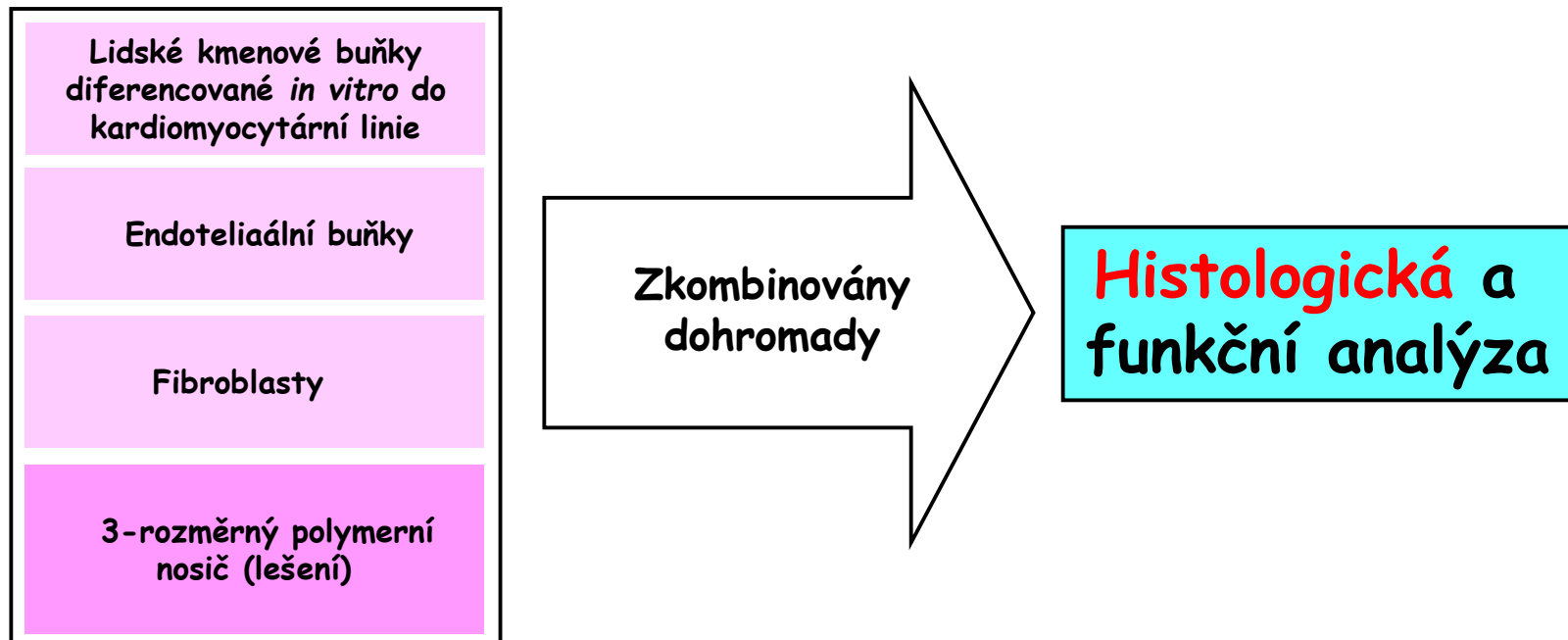
Egyptská mumie

Tkáňové inženýrství 1

(zůstaňme u infarktu)

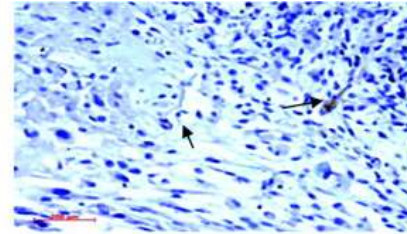
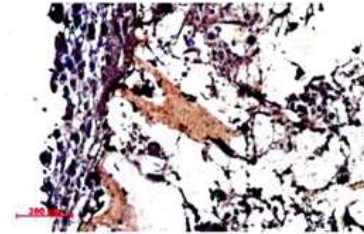
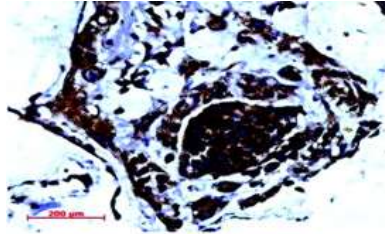
Caspi et al., Tissue Engineering of **Vascularized Cardiac Muscle** From Human Embryonic Stem Cells, *Circulation Research*, 2007 (group of Shulamit Levenberg, Israel)

První zpráva o vytvoření 3D vaskularizované srdeční tkáně, která může být použita ke studiu vývoje a funkce srdce a také (snad v budoucnu) k transplantační léčbě

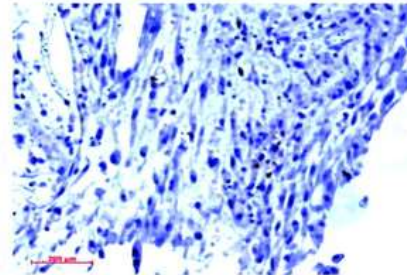
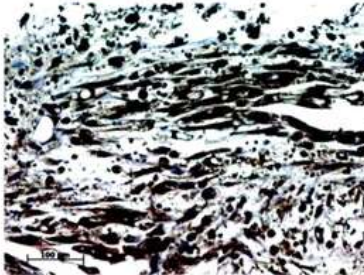
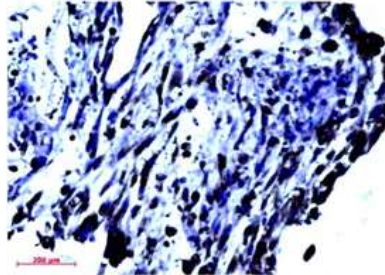


Tkáňové inženýrství 2

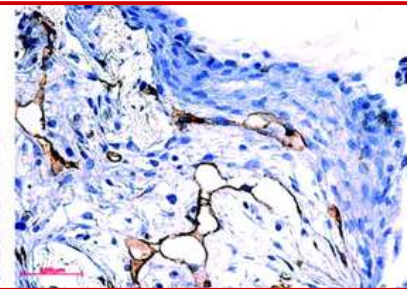
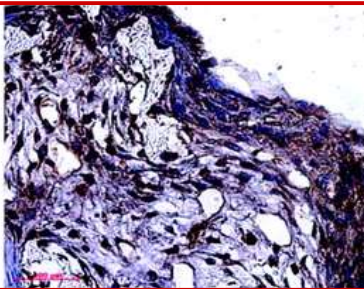
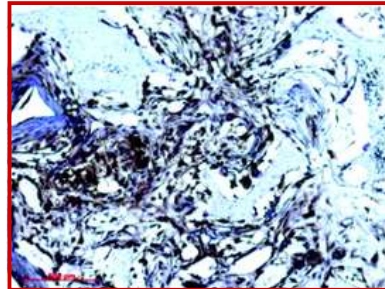
Kardiomyocyty



Kardiomyocyty
+
Endotelie



Kardiomyocyty
+
Endotelie
+
Fibroblasty



Troponin I

Sarkomerický aktinin

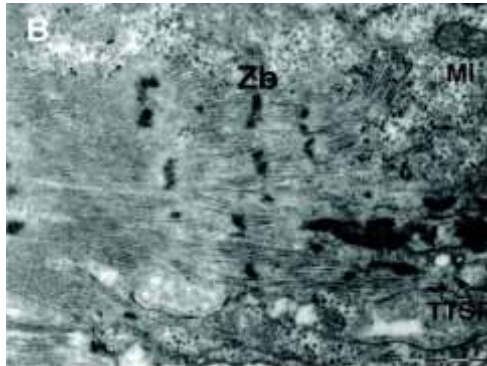
CD 31

Markery **srdeční svaloviny**

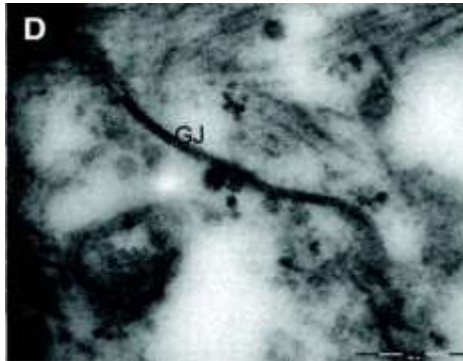
Markery **endotelu** cév

Tkáňové inženýrství 3

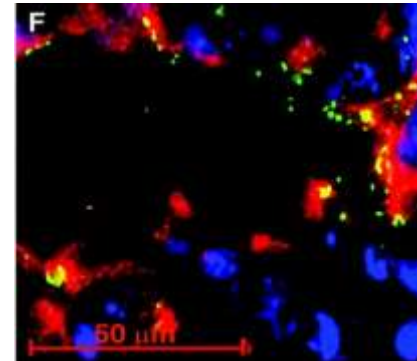
Ultrastrukturální charakteristiky uměle vytvořené tkáně srdce



Myofibrily
Z proužky
T tubuly
Sarkoplasmatické retikulum

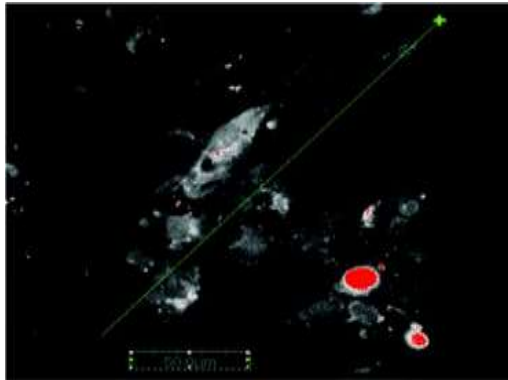


Gap junctions

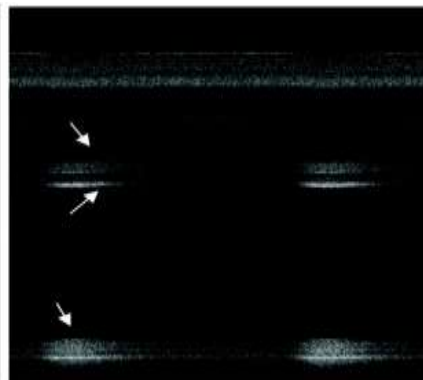


Connexin - Gap junctions
Troponin - cardiomyocyty

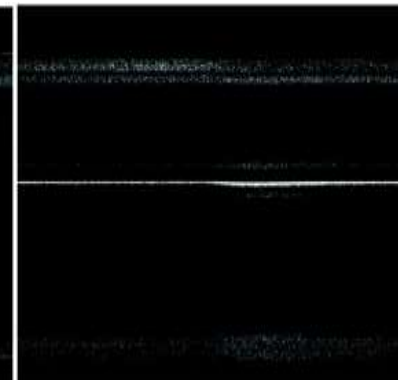
Uměle vytvořená tkáň srdce má schopnost vést impulzy Ca^{2+}



Laserová skenovací konfokální mikroskopie



Vedení impulzů



1-Heptanol
(Rozpojuje Gap junctions)

Histologické metody studia buněk a tkání 1

Učinit pozorovatelným



Stabilizovat struktury

Fixace

Učinit objekty menšími - prostupnými pro světlo

Zaliti + Příprava řezů

Zviditelnit struktury

„Barvení“

Zvětšit



Použití mikroskopů



Světelné (optické) mikroskopy

(interakce fotonů s hmotou)

Rozlišení 0.1 μm

- Pouze s viditelným světlem
- S fluorescenčním světlem
- Konfokální laserový skenovací mikr.



Elektronové mikroskopy

(interakce elektronů s hmotou)

Rolišení až 0.1 nm (v praxi 1 nm)

- Transmisní
- Skenovací

Histologické metody studia buněk a tkání 2

Fixace (denaturace)

- **Organická rozpouštědla** (etanol, metanol, aceton,...)
- **Aldehydy** (form-, paraform-, glutar-aldehyd, ...)
- **Organické kyseliny** (octová, pikrová, ...)
- **Soli těžkých kovů** (rtuť, chrom, osmium, ...)

Zalítí + Krájení (řezy)

- **Parafinový vosk**
- **Celloidin** (=nitrát celózy)
- **Durcupan** (syntetický polymer)
- **LR White** (syntetický polymer)
- **jiné**



„Barvení“

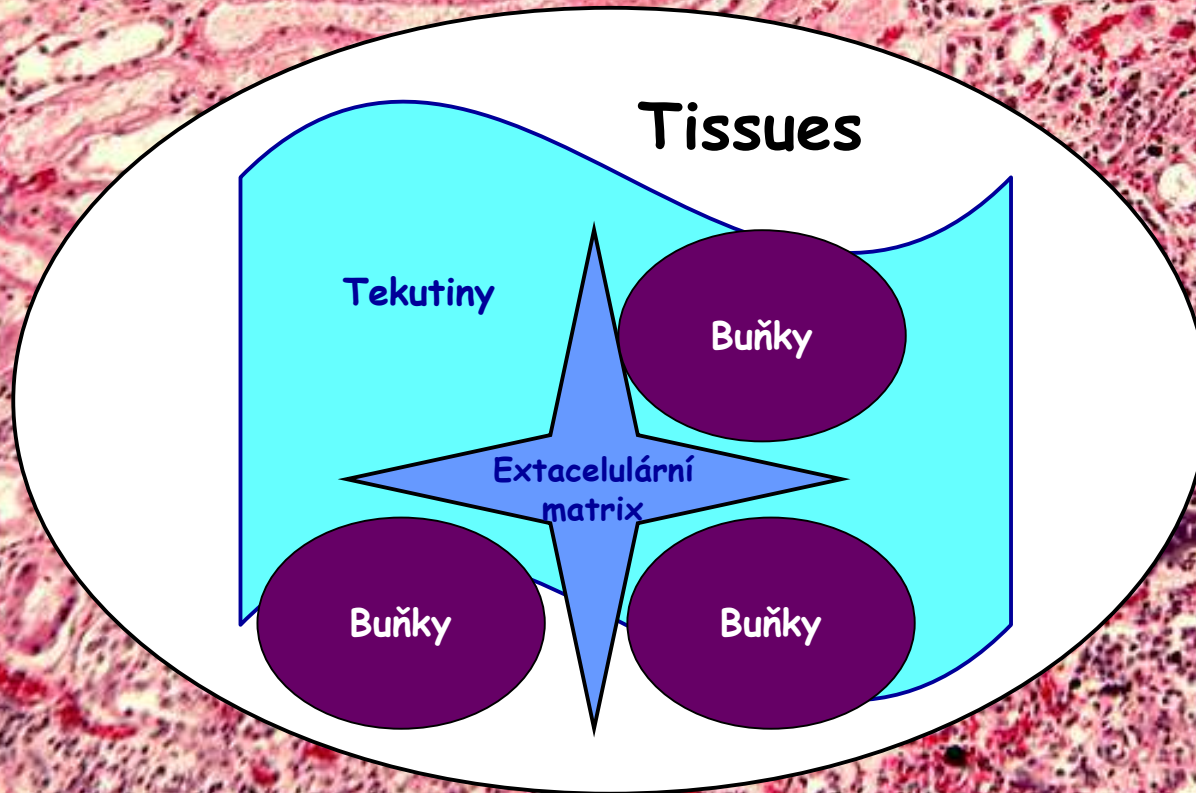
Chemická přehledná barviva (H+E, Azan, van Gieson, ...)

Histochemické reakce (průkaz proteinů/enzymů, lipidů, cukrů, ...)

Imunochemické reakce (značené protilátky)

Ťěžké kovy (pro TEM - soli uranu, olova, wolframu, ...)

Pochopení komplexních systémů musí stát na pochopení struktury a funkce jejich součástí



Tekutiny

- Intersticiální tekutina
 - Plazma (krev)
- Lymfa (v lymfatických cévách)
 - Cerebrospinální mok
- Intracelulární tekutina (cytosol)

Vše je produktem buněk !

Živé organismy jsou tvořeny buňkami

Dlouhá cesta k tomuto odhalení:



Robert Hooke
1665

Poprvé viděl buňky korku - cell



Antonie van Leeuwenhoek
1678

Poprvé uviděl mikroskopické organismy (bakterie, prvoky)



Matthias Schleiden

1839



Theodor Schwann

Všechny organismy jsou tvořeny jednou nebo více buňkami

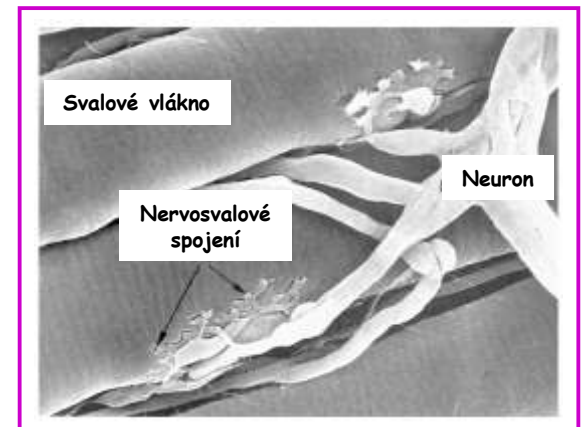


Rudolph Virchow
1855

Buňka může vzniknout pouze z již existující buňky
„Omnis cellula e cellula“

Současná buněčná teorie - 6 principů na kterých stojí

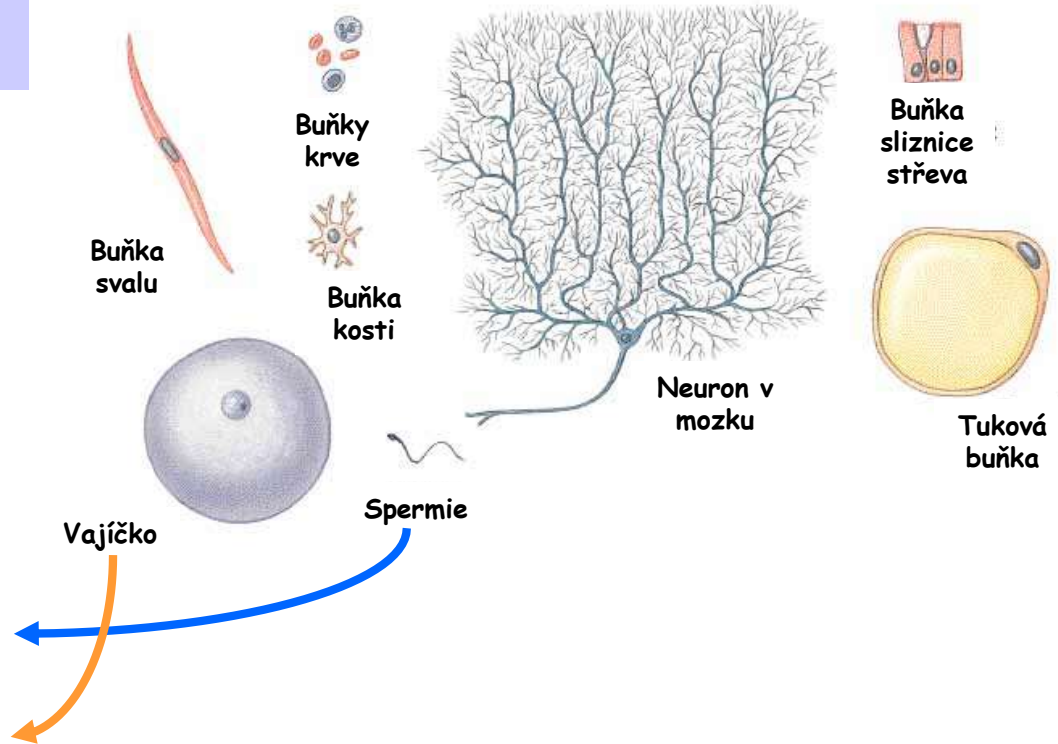
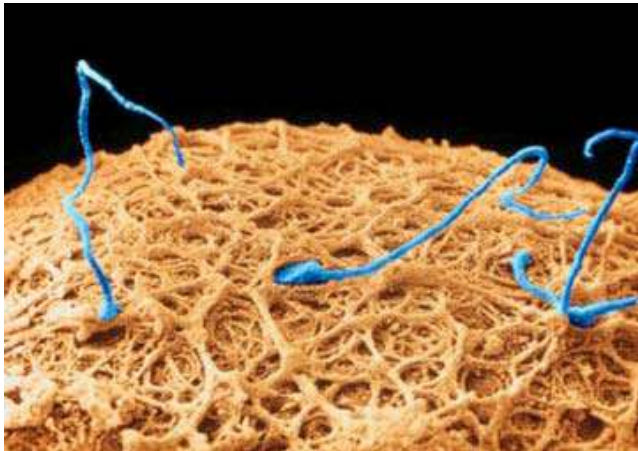
- Buňka je nejmenší strukturní a funkční jednotka schopná životních procesů
- Funkce každé buňky je dána její specifickou strukturou
- Buňky jsou stavební jednotky všech mnohobuněčných organismů, všechny funkce v organismu jsou plněny buňkami
- Struktura a funkce všech organismů je závislá na strukturálních a funkčních vlastnostech buněk, kterými jsou tvořeny
- Všechny nové buňky vznikají z buněk již existujících
- Díky kontinuitě života na zemi jsou buňky všech organismů principiálně stejné (univerzální genetický kód a jeho exprese)



Přes jednotné organizační schéma,
je typickou vlastností eukaryontních buněk
jejich strukturální a funkční diverzita

Také buňky člověka jsou strukturálně a funkčně extrémně rozmanité

Tato různorodost je předpokladem pro schopnost buněk plnit v organismu člověka specializované funkce

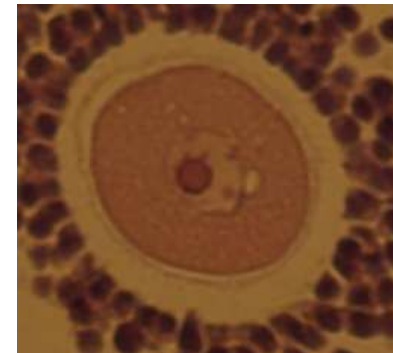
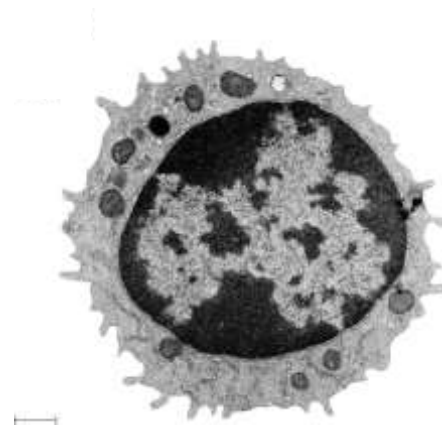
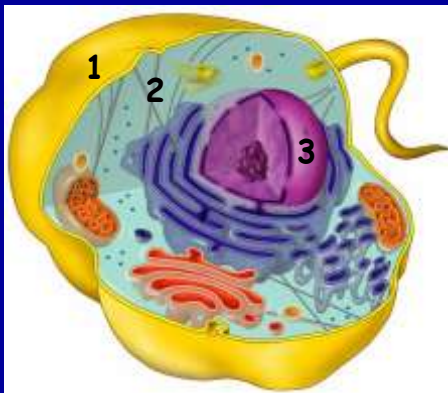


Žádná buňka není zcela stejná jako buňky ostatní, všechny buňky ale mají společné strukturální a funkční znaky.

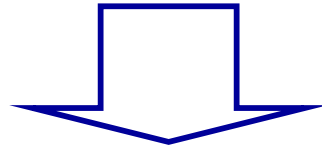
Ne všechny buňky obsahují všechny komponenty o kterých budeme mluvit !

Buňky mají 3 hlavní součásti:

1. Plazmatickou membránu
2. Cytoplazmu
3. Jádro (eukaryontní b.)

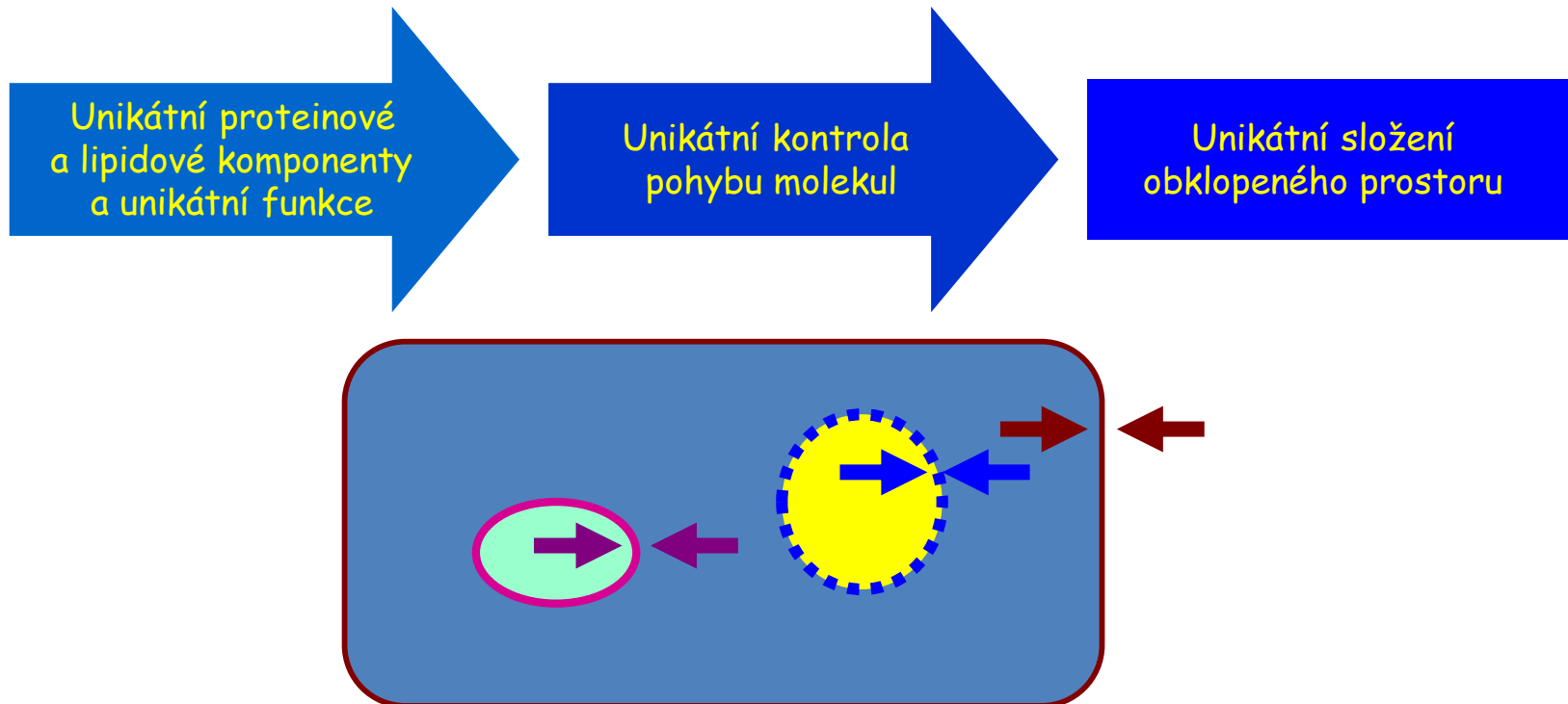


Organizace buňky je postavena na KOMPARTMENTALIZACI



Specializované funkce se mohou plnit v různých sektorech buňky

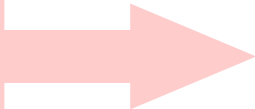
Membrány tvoří hranice mezi jednotlivými kompartmenty



Kompartmenty & Membrány

Mnoho malých kompartmentů je lepší

Větší plocha membrány
na obklopený objem



Více plochy pro:

- regulaci
- výměnu živin
- odstranění odpadních látek

Plocha povrchu je proporcionální se čtvercem poloměru (r^2).
Objem je proporcionální se třetí mocninou poloměru (r^3).

Zmnožení X Redukce
vybraných kompartmentů

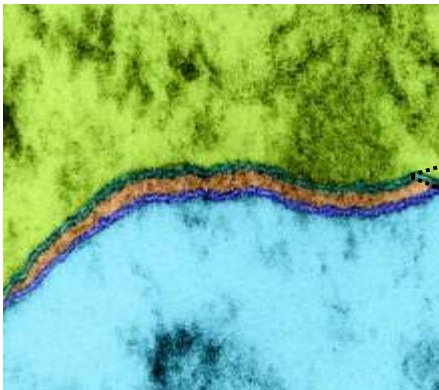


Specializace buněk
pro různé funkce

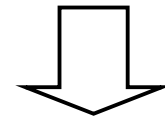
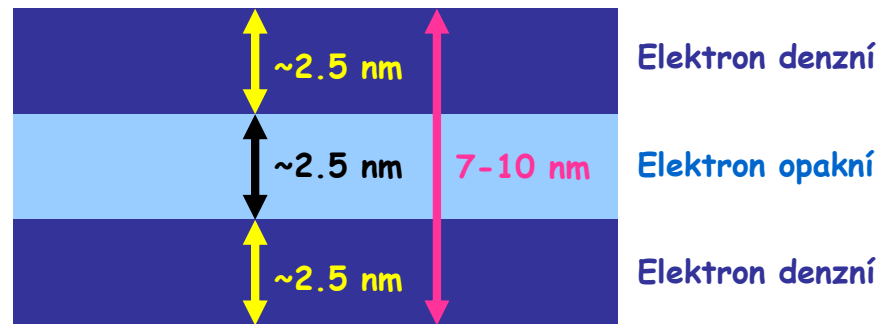
Diferenciace buněk

Drsné ER v sekrečních buňkách
Mitochondrie v buňkách srdeční svaloviny

Struktura biologické membrány 1



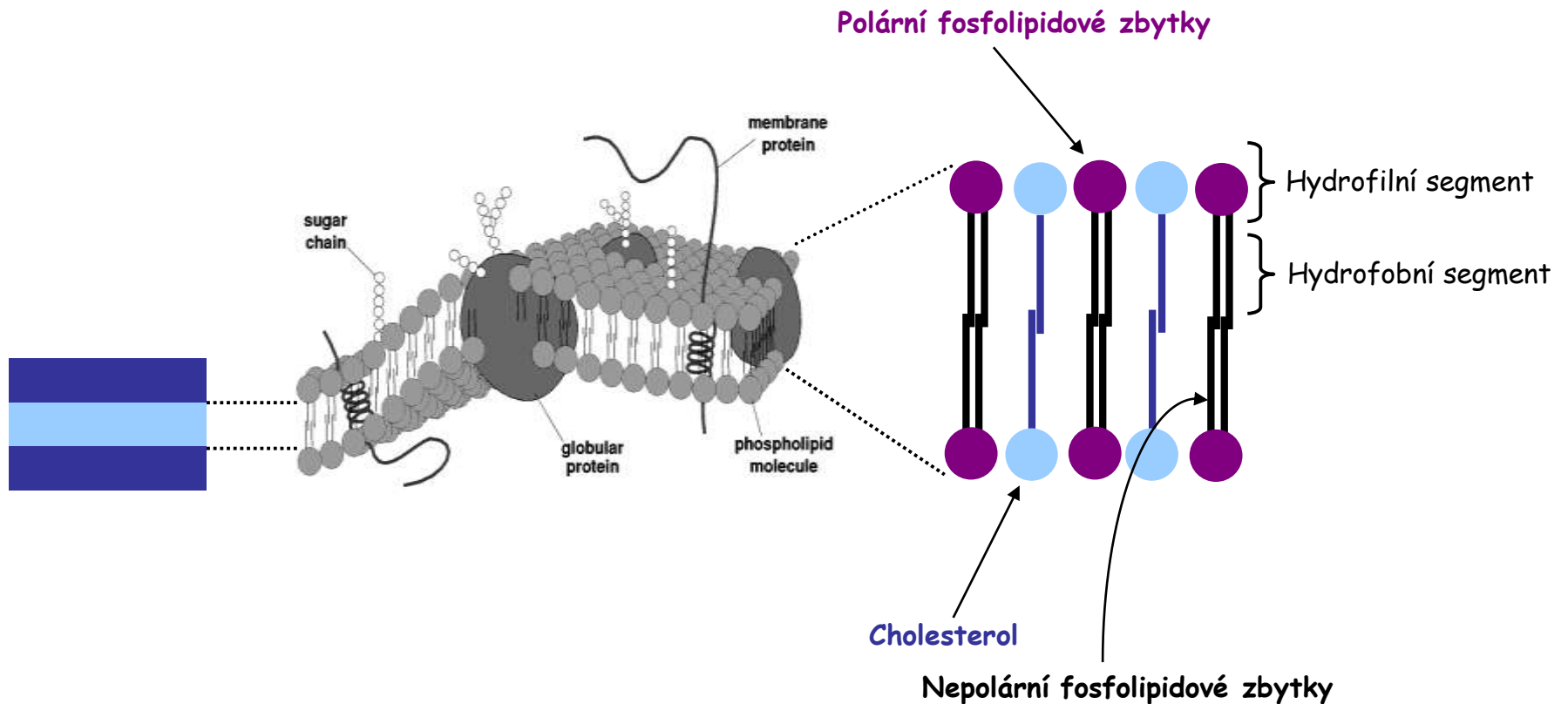
Buněčné membrány viděné elektronovým mikroskopem
(pseudokolorováno)



Membránová jednotka
společná všem membránám

Struktura biologické membrány 2

Fluidní mosaika - Dvojvrstva lipidů s mobilními globulárními proteiny



Struktura biologické membrány 3

Membránové lipidy

Představují 90-99% molekul v membráně (v počtech).

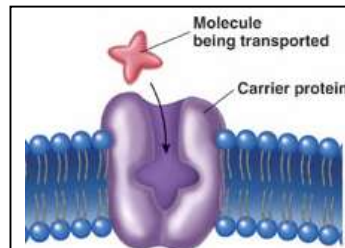
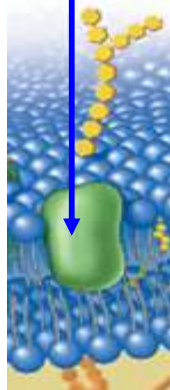
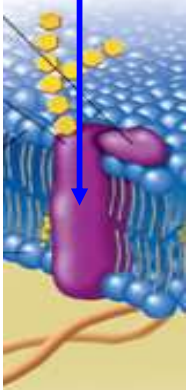
- Fosfolipidy - 75%
- Cholesterol - 20%
- Glykolipidy - 5% - pouze cytoplazmatická membrána - GLYCOCALYX

Membránové proteiny

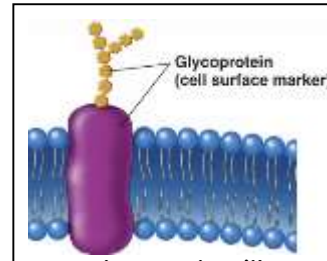
Představují 1-10% všech molekul, ale 50% hmotnosti díky jejich velikosti.

Integrální

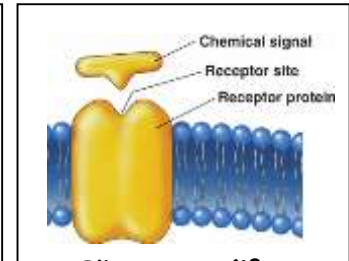
Periferní



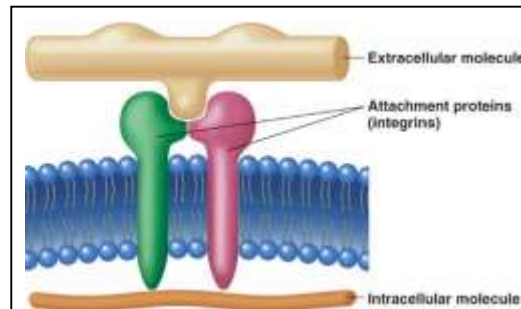
Transport



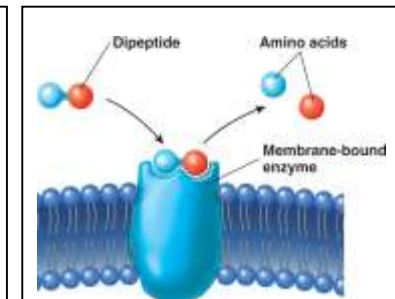
Identita buněk



Přenos signálů



Adheze buněk



Enzymatická aktivita

Organely

Specializované vnitřní struktury se specializovanými funkcemi

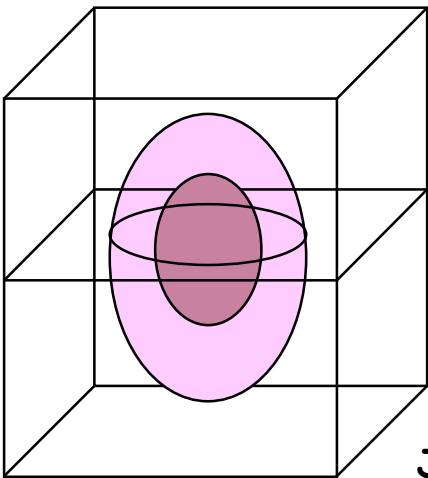
Ohraničené membránou

- Jádro
- Endoplasmatické retikulum
- Golgiho aparát
- Lyzosomy
- Endosomy
- Peroxisomy
- Mitochondrie

Bez membrány

- Ribosomy
- Centrosomy
- Centrioly
- Bazální tělíska

Vztah mezi strukturou buňky a její specifickou funkcí
Např.: potřeba hodně energie → hojnost mitochondrií

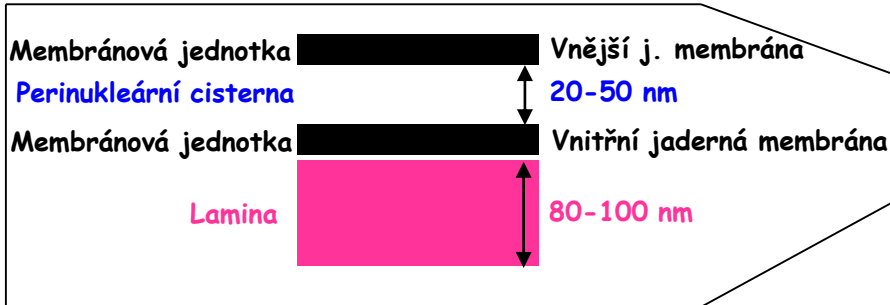
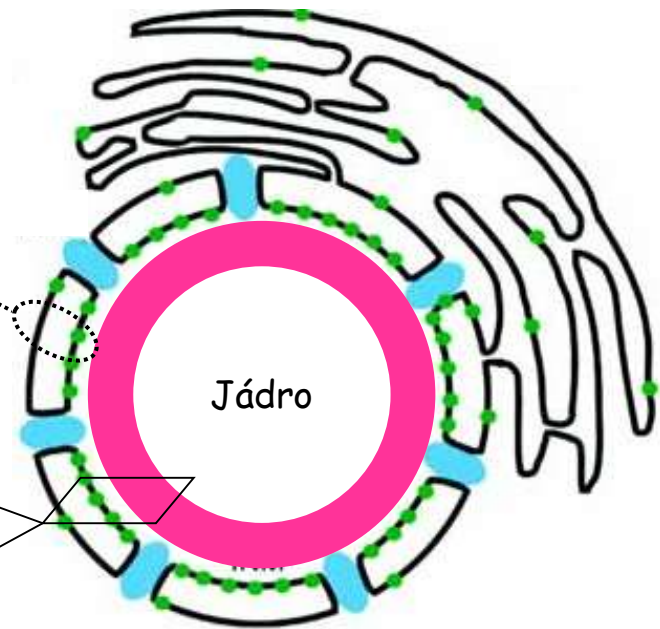
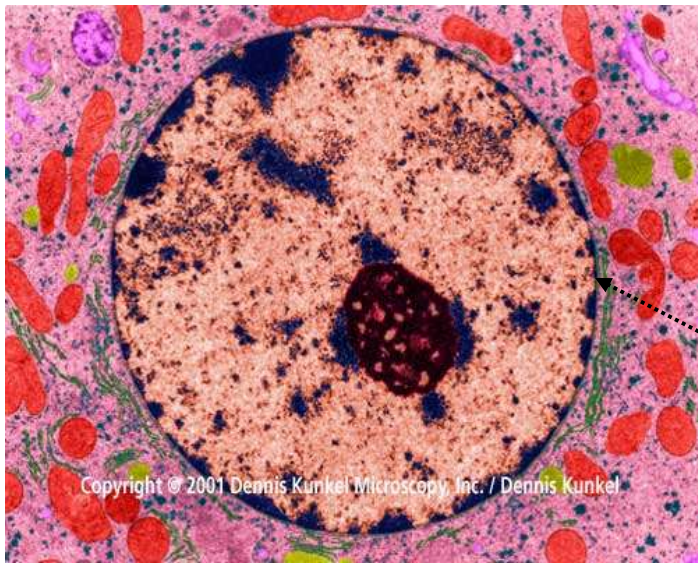


Jádro 1

membránou ohraničená organela

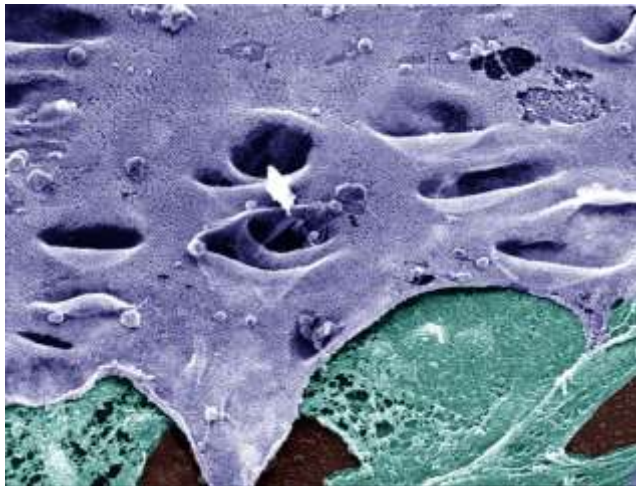
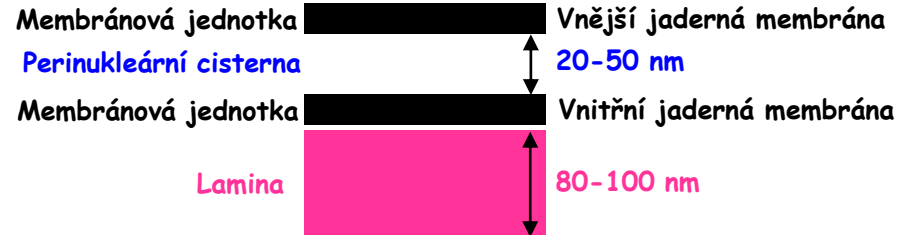
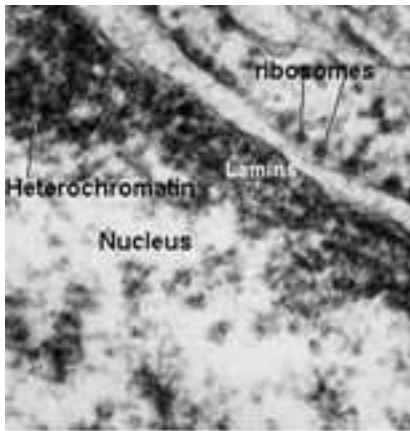
Jádro jaterní buňky

- Nejčastěji:
- Sférické (5-10 μm) (lobulární, prohnuté, diskovité,...)
 - Uloženo centrálně
 - Jedno v buňce (osteoklast více, erytrocyt žádné)



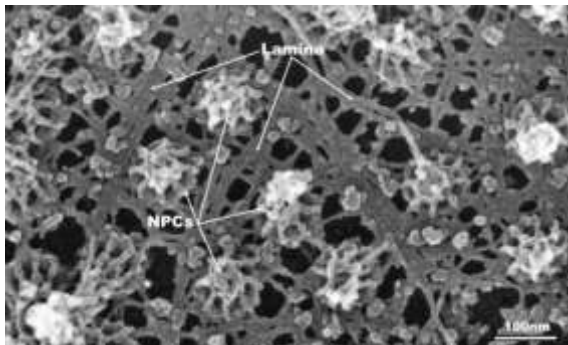
Jádro 2

Jaderná membrána - pokračování



Laminy:

- Intermediární filamenta - proteiny (A, B, C)
- Tvoří síť na vnitřní straně VJM, pronikají i do nukleoplazmy
- Udržují pevnost a architekturu jádra
- Ukotvují chromatin
- Regulují replikaci DNA a transkripci rRNA
- Účastní se regulace apoptózy



Laminopatie

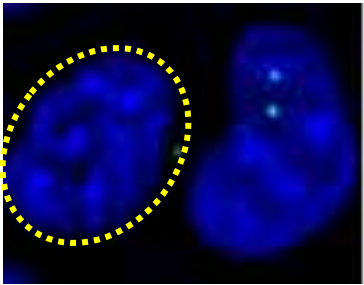
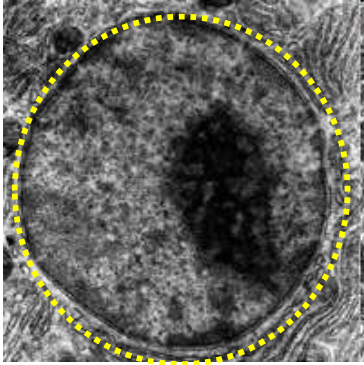
- Lidské choroby (nejméně 13 známých)
- Mutace v genech pro laminy (popsáno asi 200 mutací)
- Deregulace exprese genů
- Předčasné stárnutí



Hutchinson-Gilford progerie

Vzácná - 1-4 na 8 milionů porodů
Missense mutace v laminu typu A

Jádro 4 Chromatin



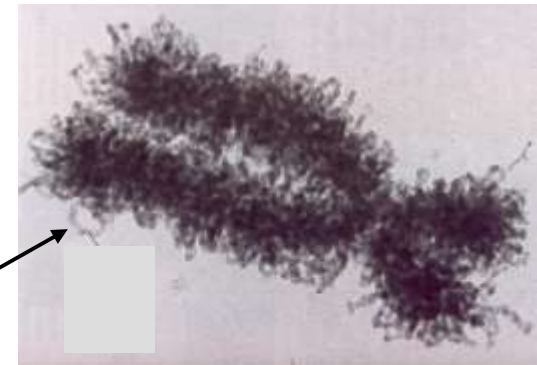
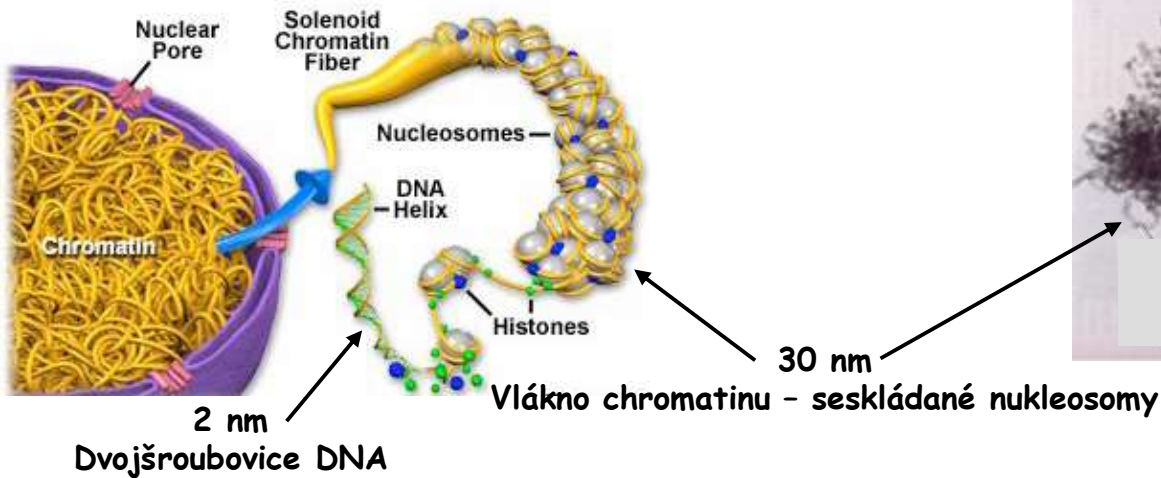
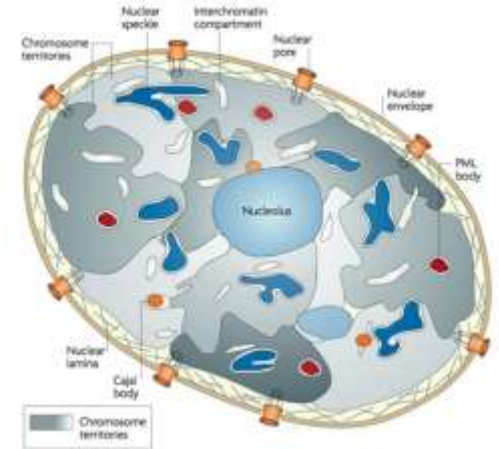
Interfázové jádro

Heterochromatin

Feulgen pozitivní - tmavé ve světelném mikr.
Tmavé/denzní granula v TEM
Transkripčně inaktivní

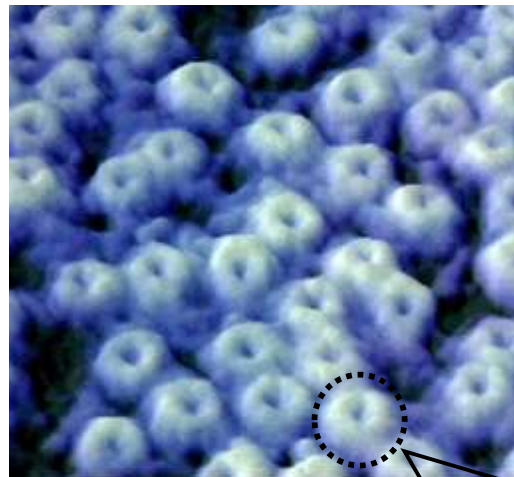
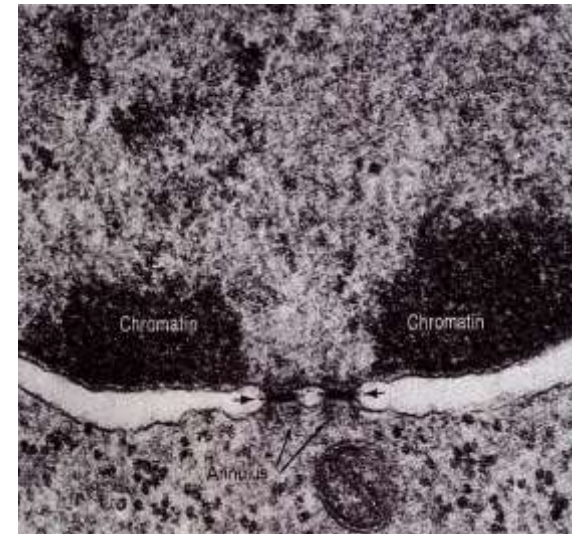
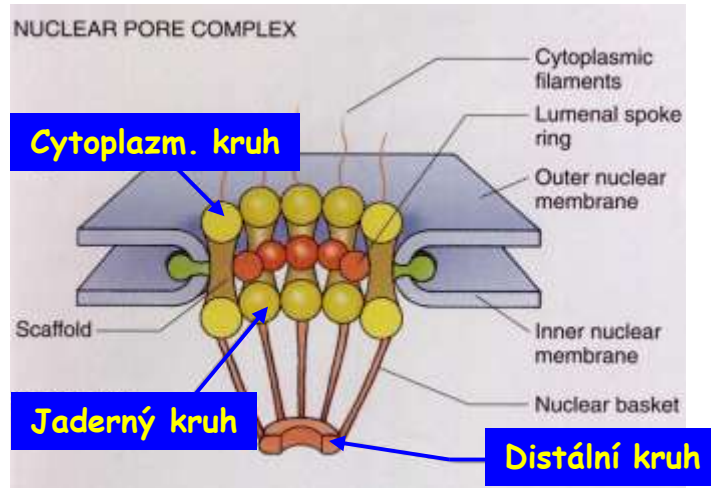
Euchromatin

Neviditelný ve světelném mikroskopu
Relaxované chromosomy
Transkripčně aktivní



Jádro 3

Komplex jaderného póru



Průměr ~ 100 - 125 nm

Tři kruhy (každý 8 podjednotek)

Vnitřní vláknitý košík

Transport jadernými póry (Nukleocytoplazmatický přesun)

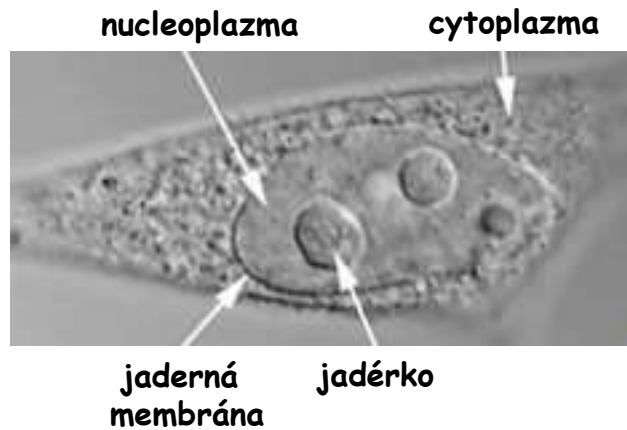
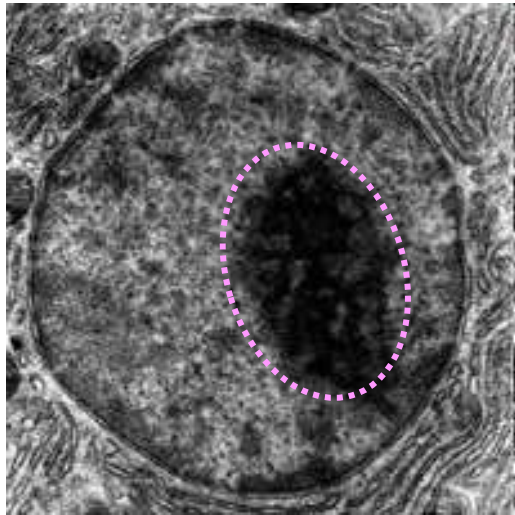
- Proteiny, RNA, podjednotky ribosomů
- Oboustranný
- Vyžaduje jaderné lokalizační/exportní signály
- Podporován importiny/exportiny
- Regulován Ran GTPázami

Jádro 5 Jadérko

Není ohraničeno membránou

Hlavní funkce

Syntéza RNA
Skládání ribosomů



Pars fibrosa
Primární transkripty rRNA

Pars granulosa
Skládání ribosomů

Fibrilární centra
Netranskribovaná DNA

NOR - nukleolární organizátor (na DNA)

V lidských buňkách na 5-ti chromosomech
(chr. 13, 14, 15, 21, 22)

Endoplasmatické retikulum 1

„uvnitř buňky“

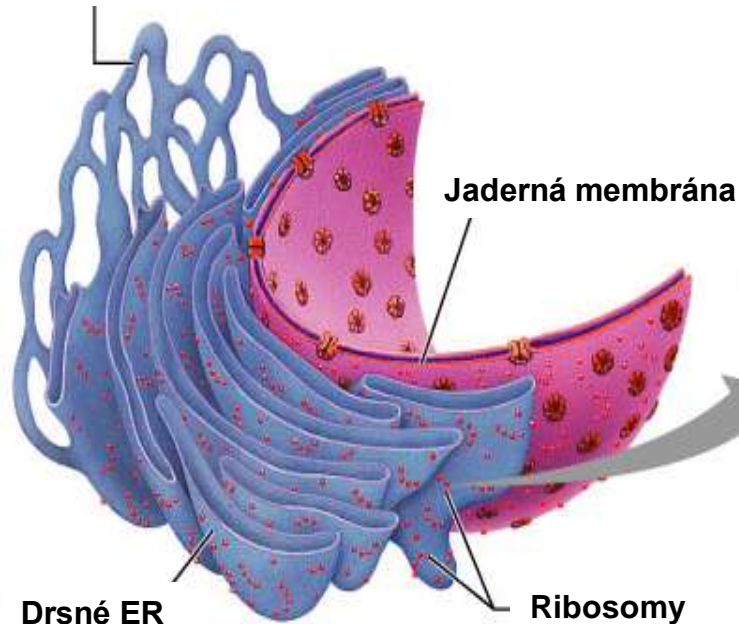
„sít“

Většina membrán uvnitř buňky.

Vzájemně propojené
kanálky a váčky

Cisterny

Hladké ER



Velká podjednotka
ribosomu

Malá podjednotka
ribosomu

(c)

(a)

Endoplasmatické retikulum 1

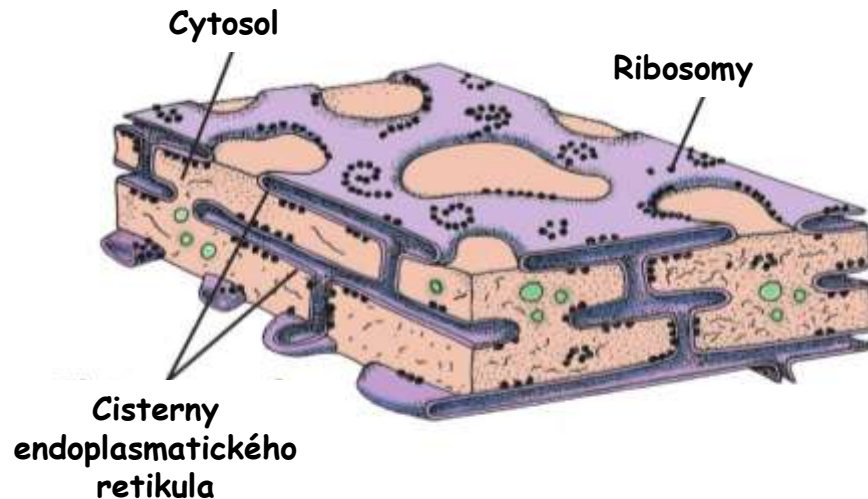
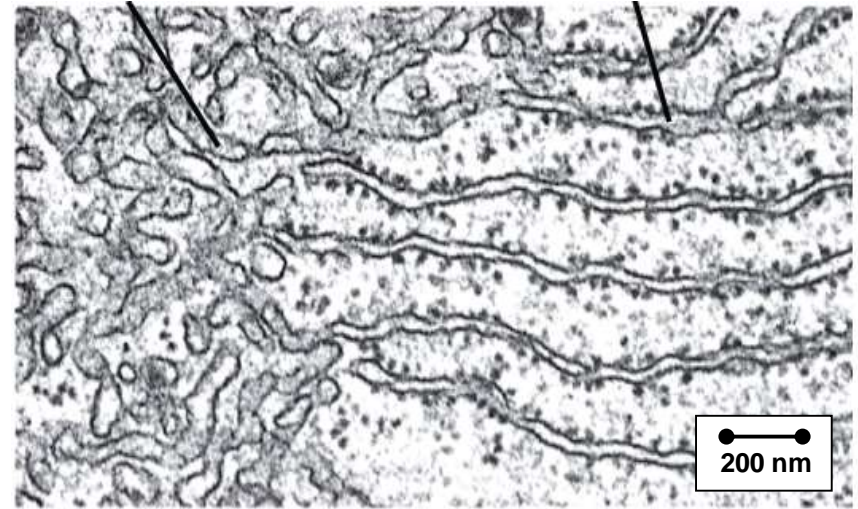
Bez ribosomů → Nemá proteosyntetickou funkci !

Syntetizuje fosfolipidy a cholesterol

- **Játra** - metabolismus lipidů a cholesterolu, degradace glykogenu, detoxifikace (spolu s ledvinami)
- **Varlata** - syntéza steroidních hormonů (testosteron)
- **Buňky střeva** - absorpce, syntéza, a transport lipidů
- **Kosterní a srdeční svalovina** - ukládání a uvolňování vápníku (sarkoplasmatické retikulum)

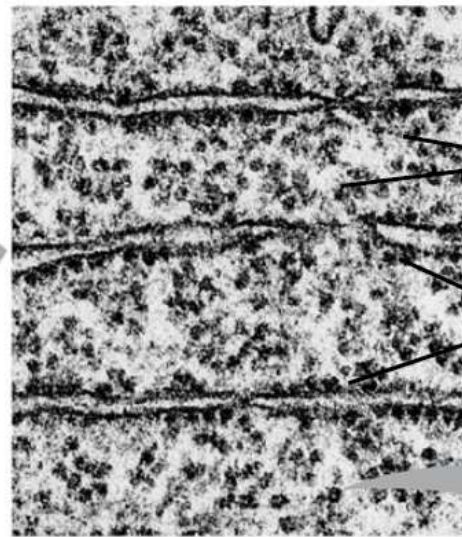
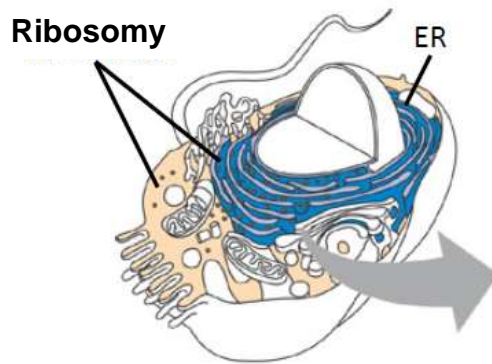
Hladké ER

Drsné ER



- Syntéza všech sekretovaných proteinů
- Syntéza integračních proteinů membrán
- Modifikace proteinů

Ribosomy



0.5 μm

Endoplasmatické retikulum

Volné ribosomy

Vázané ribosomy

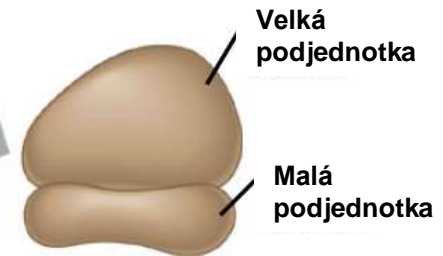
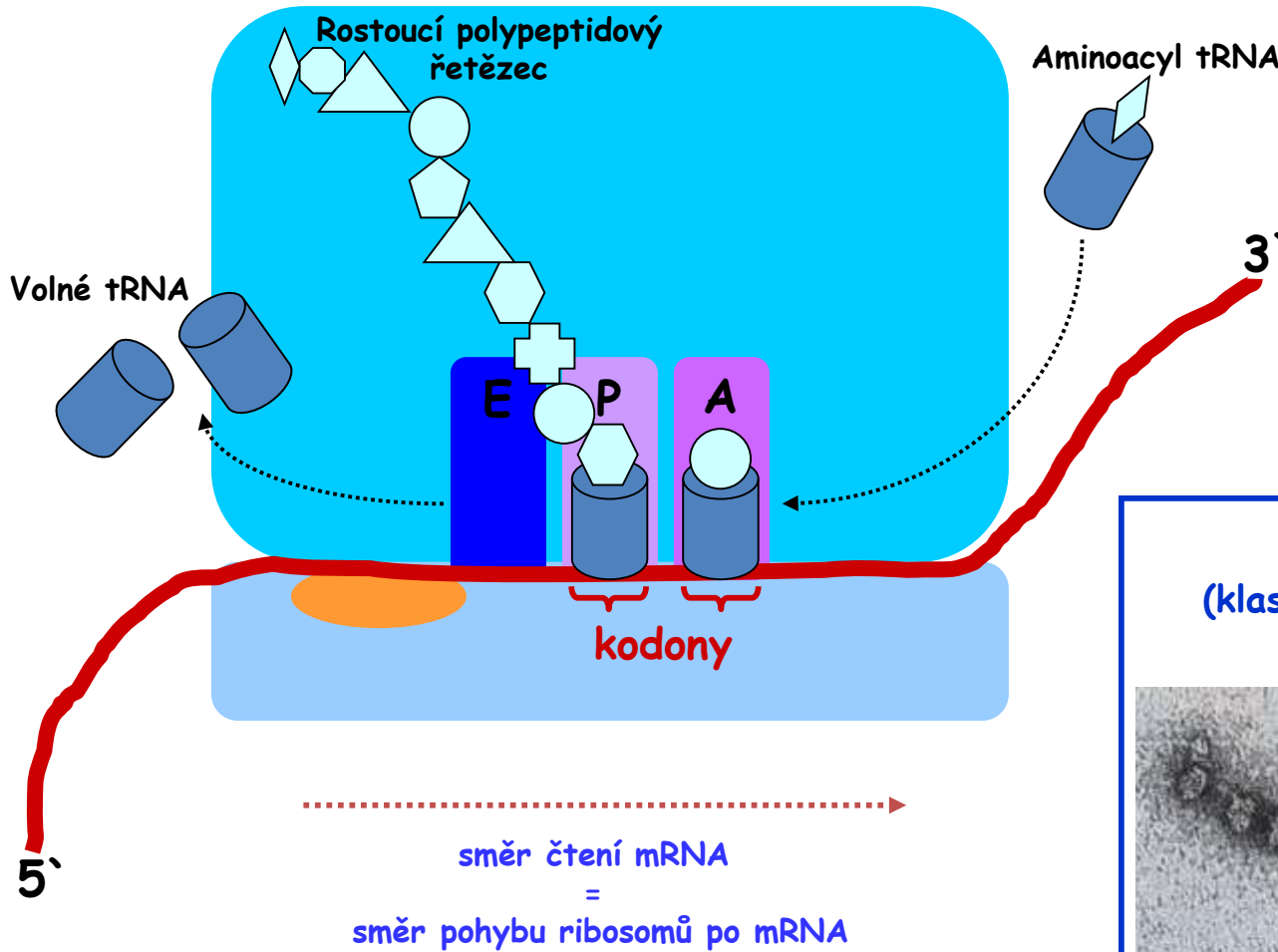


Schéma ribosomu

Ribosomy - Translace



Začátek translace

Met-tRNA

mRNA 5' — AUG — 3'
3' UAC 5'
START kodon

Konec translace

mRNA 5' — UAG — 3'
mRNA 5' — UAA — 3'
mRNA 5' — UGA — 3'
STOP kodony
váží „uvolňující faktor“

POLYRIBOSOM

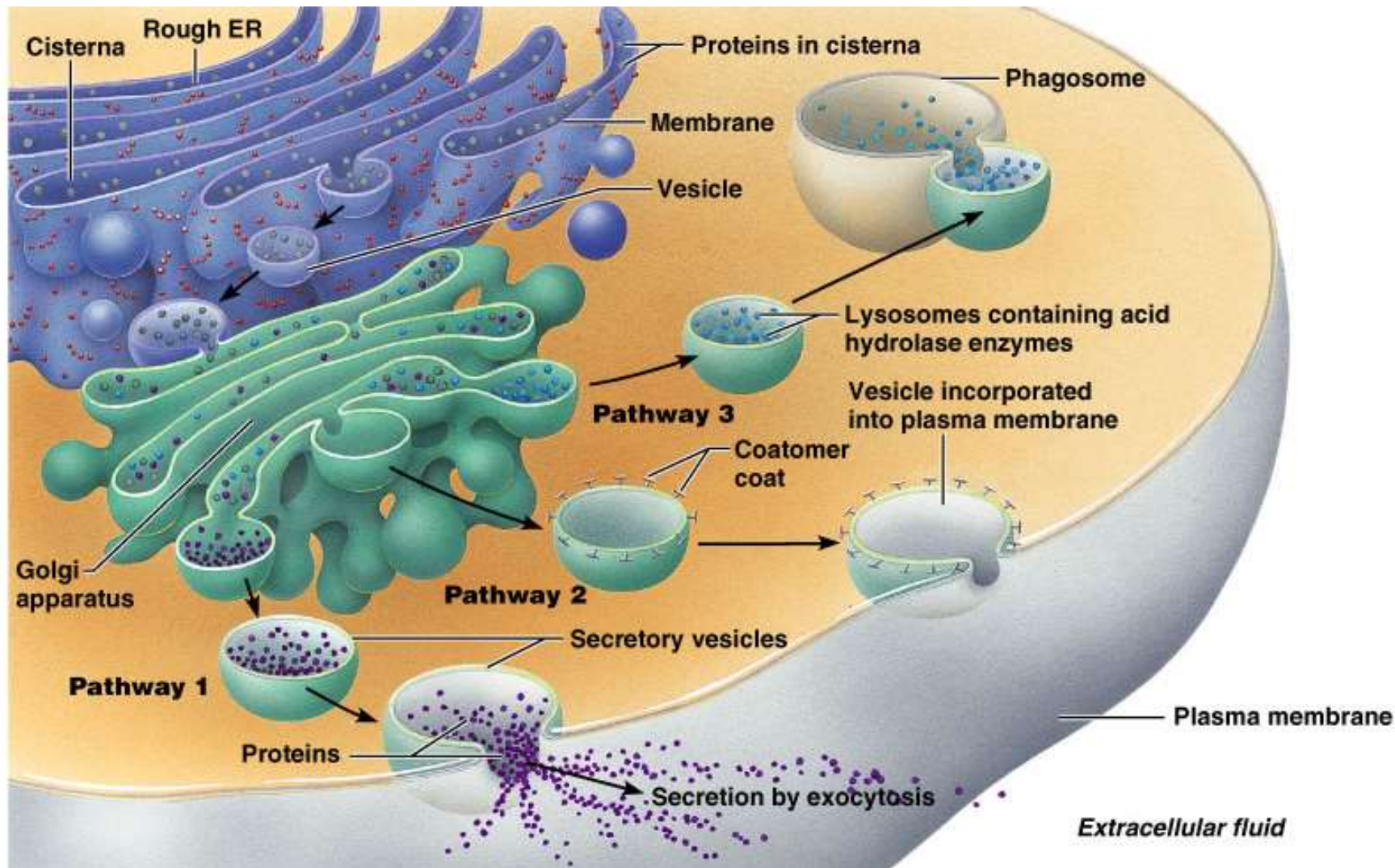
(klastř ribosomů překládající určitý úsek mRNA)

ribosomy

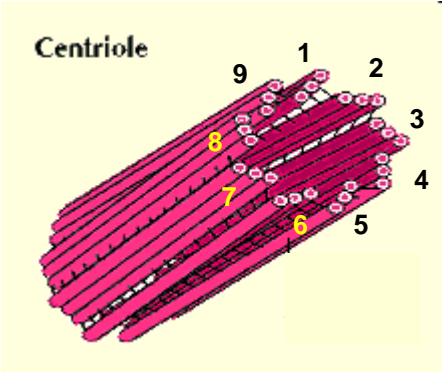
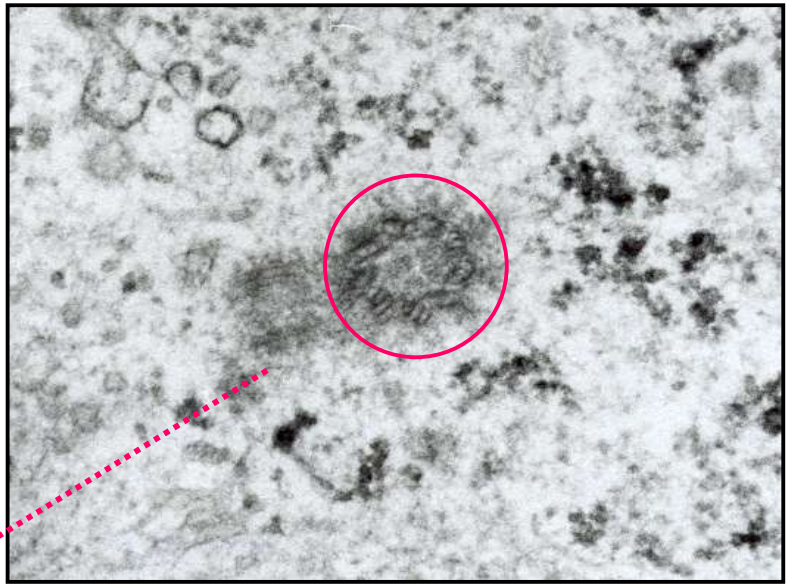
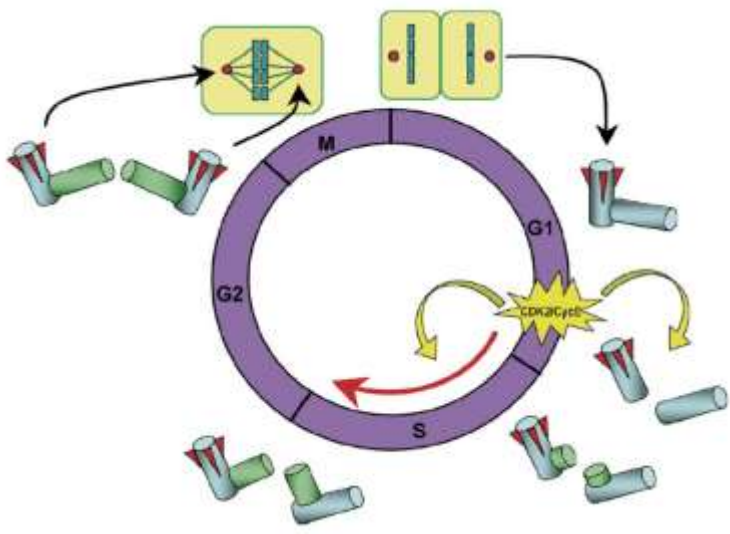
mRNA

100 nm

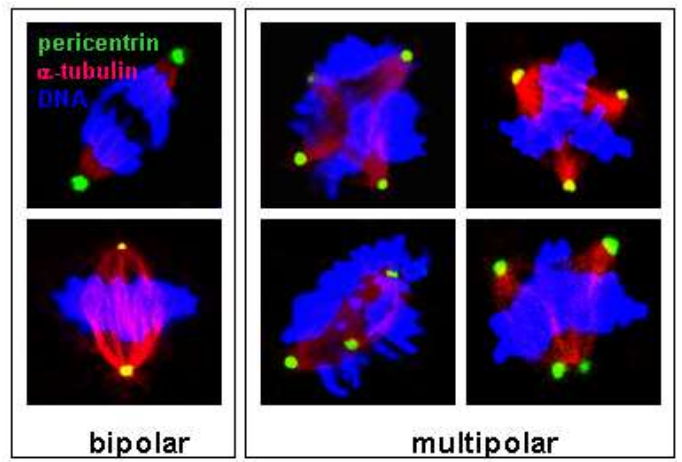
Golgiho aparát



Centrosom



Průměr - 0.2 μm
Délka - 0.5 μm



Přednášky histologie

Klíčové prvky mikroskopické stavby tkání a orgánů a jejich vztah k funkci

Nejnovější objevy v oblasti struktury a obnovy tkání a jejich vztah ke vzniku a léčbě chorob

Děkuji za pozornost !

ahampl@med.muni.cz

Budova A1 - 1. patro