

# Histologie a Embryologie

Přednášející:

Doc. MUDr. Miroslava Sedláčková, CSc.

Mgr. Petr Vaňhara, Ph.D.

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

Brno, 2017

# 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
- Golgiho aparát
- 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?

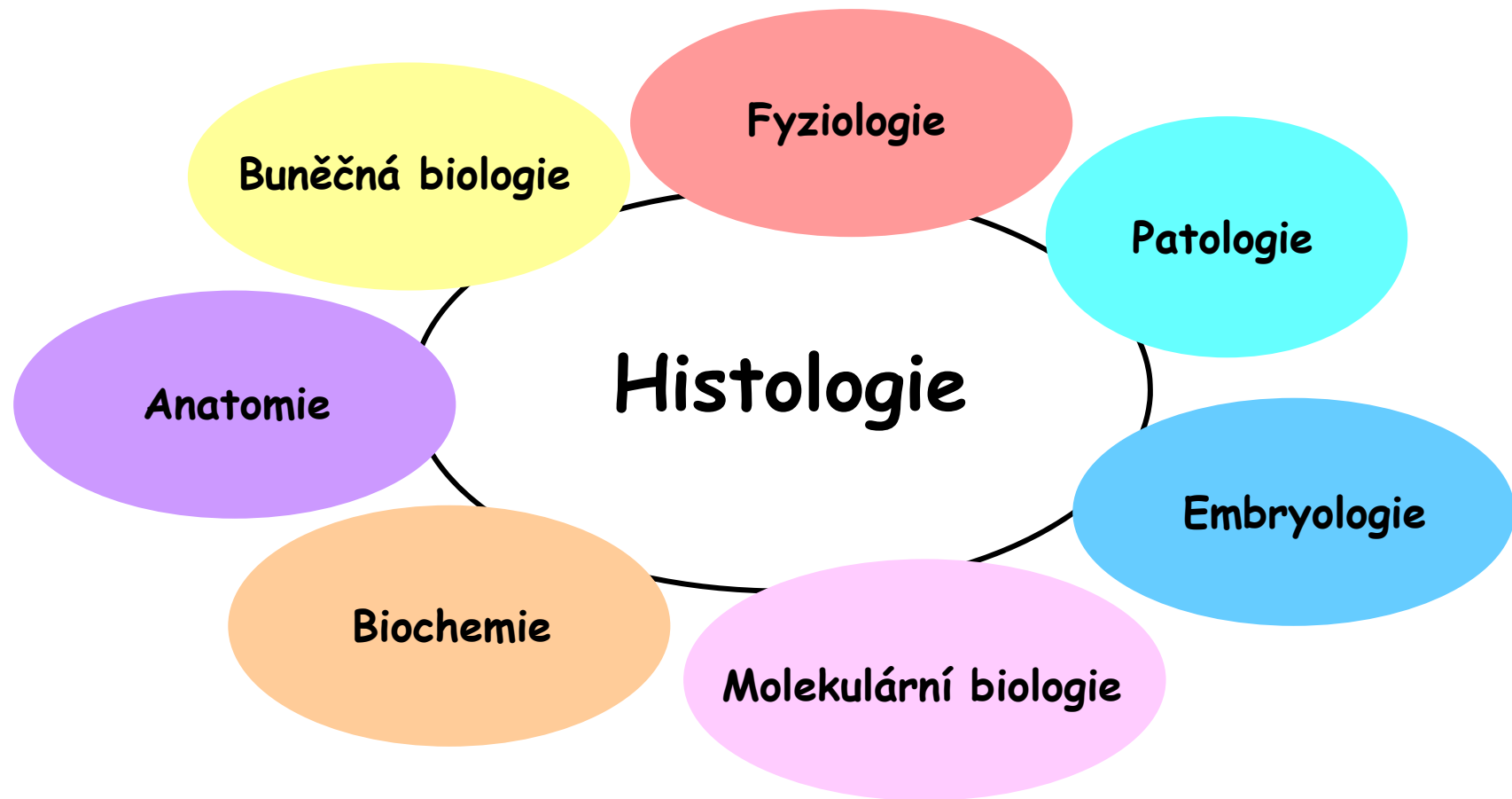
### Mikroskopická anatomie

Složení a struktura orgánových systémů & individuálních orgánů

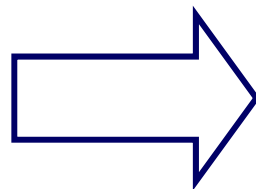
Jaké typy tkání a jak jsou organizovány?  
Jaké speciální buněčné typy?  
Které speciální struktury? (např. tubuly)  
Jak to celé funguje?

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 !**

**Mnoho velkých histologů byli němci, protože vyráběli kvalitní mikroskopy.**

**Eponymously theirs.....**

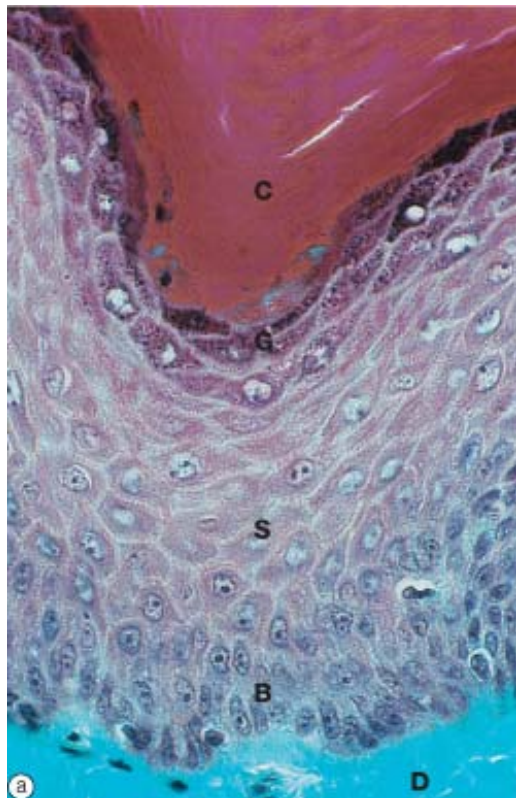
# Marcello Malpighi

## 1628 - 1694

Italský lékař

Zakladatel mikroskopické anatomie a první histolog

- Popsal **chut'ové pohárky**
- Popsal krevní **kapiláry**
- Možná první, kdo viděl v mikroskopu **červené krvinky**



**Malpighiho vrstva kůže**

Stratum basale a stratum spinosum epidermis kůže

**Malpighiho tělíska** v ledvinách a slezině



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

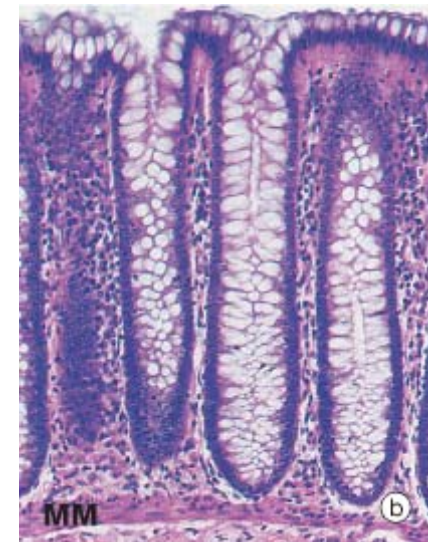
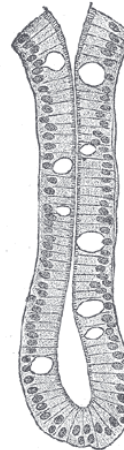
# Johan Nathanael Lieberkuhn 1711 - 1756

Německý anatom a lékař



Johann N. Lieberkuhn  
(1711-1756)

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

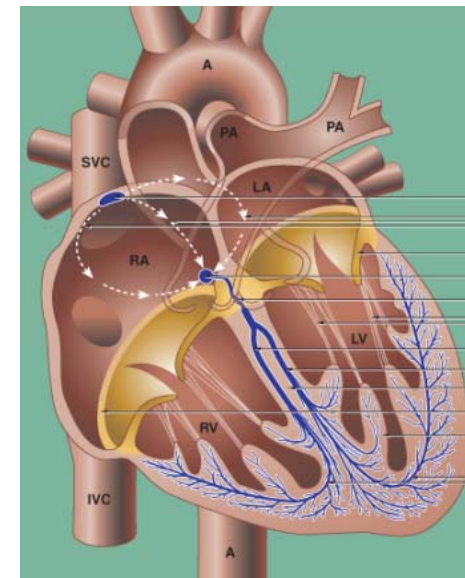
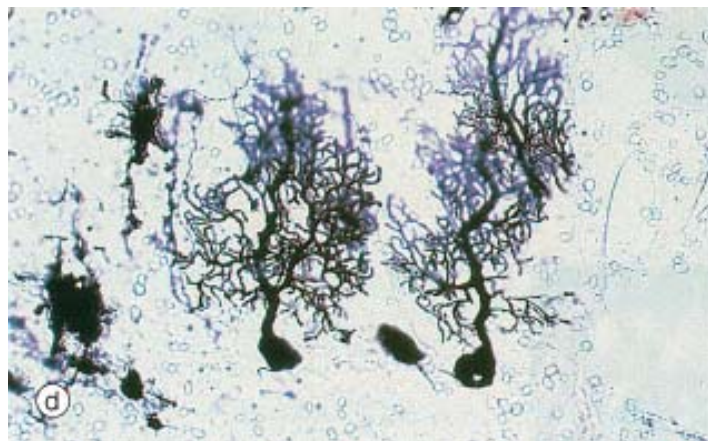
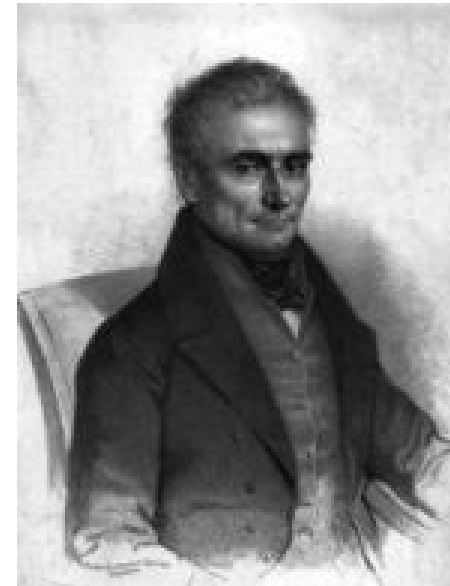


# Jan Evangelista Purkyně 1787 - 1869

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

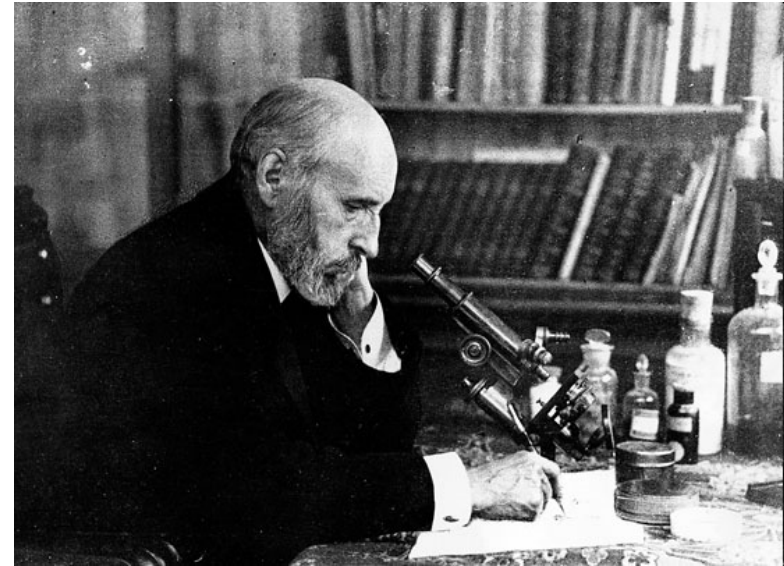
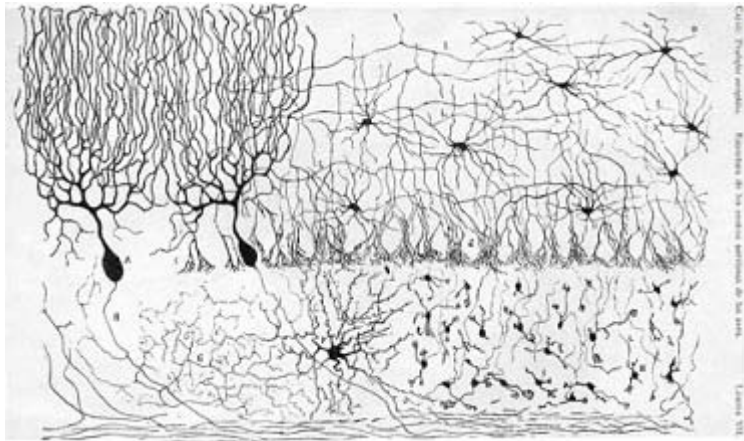




# Santiago Ramón Y Cajal

## 1852 - 1934

Španělský lékař a anatom



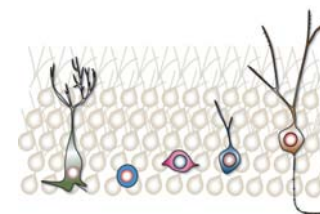
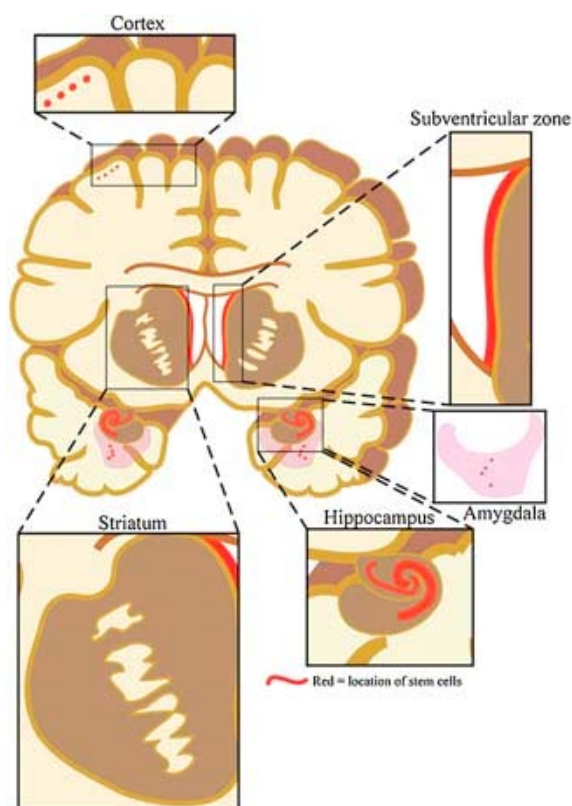
Poprvé popsal **neuron** jako primární strukturní a funkční jednotku nervové tkáně.  
Nobelova cena v roce 1906

“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:

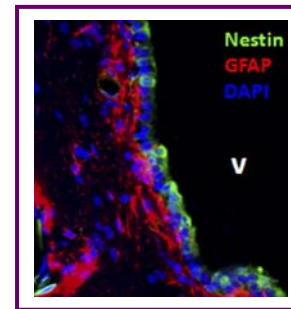
- Kůra koncového mozku ?
- Amygdala ?

**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.

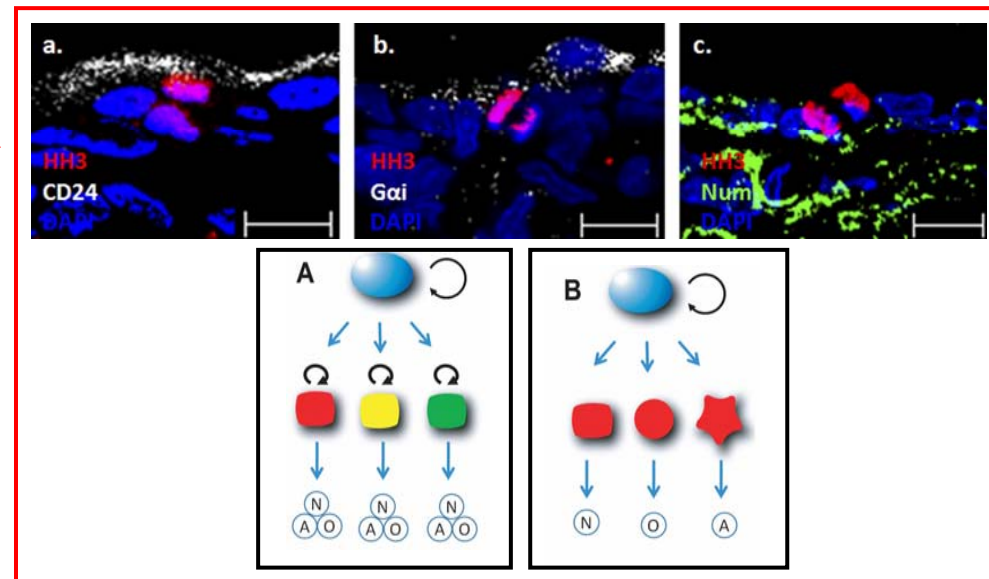
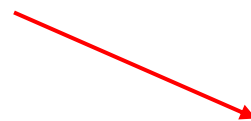
• přesná pozice ve tkáni ?



• proliferační a migrační aktivita ?

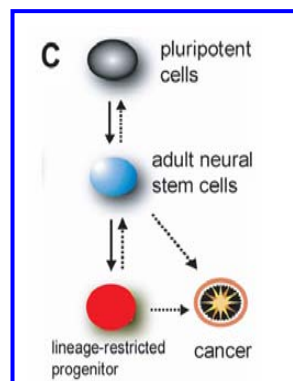
Gleason et al., Neuroscience, 2008.

• vývojový potenciál ?



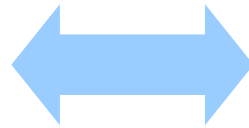
• participace na vzniku chorob CNS ?

• další

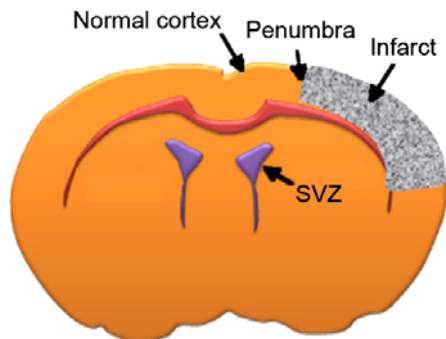


# Má tento objev nějaké praktické užití ? (1)

Pomoc mozku regenerovat  
po infarktu



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



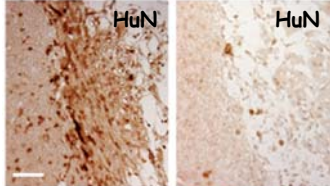
## Možnosti:

- chemická léčiva
  - růstové faktory
  - implantace buněk
- 
- experiment na krysách
  - infarkt mozku vyvolán uzavřením mozkové arterie
  - do místa infarktu transplantovány lidské neurální progenitory
  - **histologicky analyzováno**

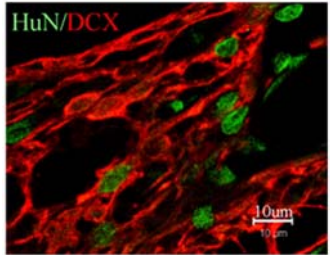
# Má tento objev nějaké praktické užití ? (2)

Transplantované lidské buňky v místě infarktu

3 měsíce    24 měsíců



HuN    HuN

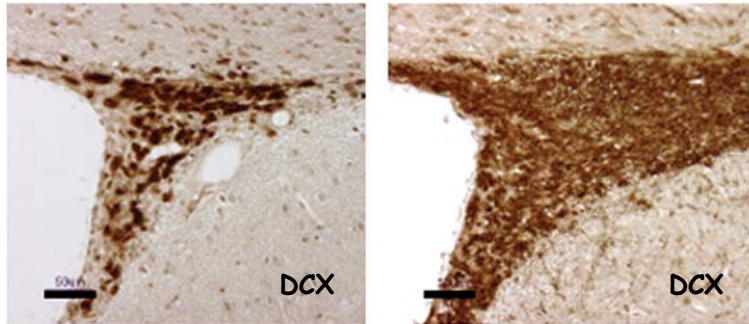


HuN/DCX

10um

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

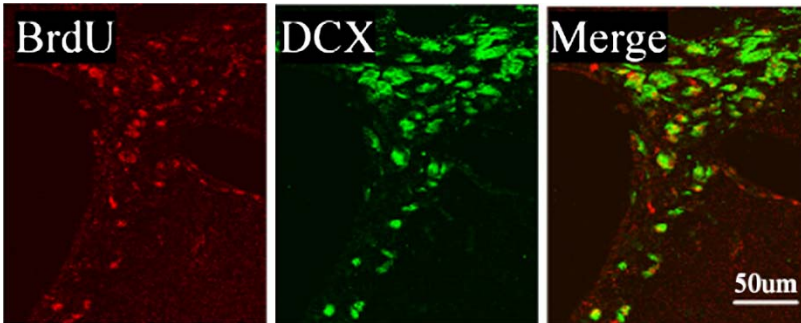
Neurogenese v SVZ krysího mozku je stimulována



DCX    DCX

Bez transplantace    Transplantované buňky

Neocytogeneza probíhá před 60-tým dnem po transplantaci



BrdU    DCX    Merge

50um

Pulzní znační BrdU ve dni 60 po transplantaci

# Transplantace buněk & tkání

Poškození  $\beta$  buněk  
ostrůvků slinivky břišní

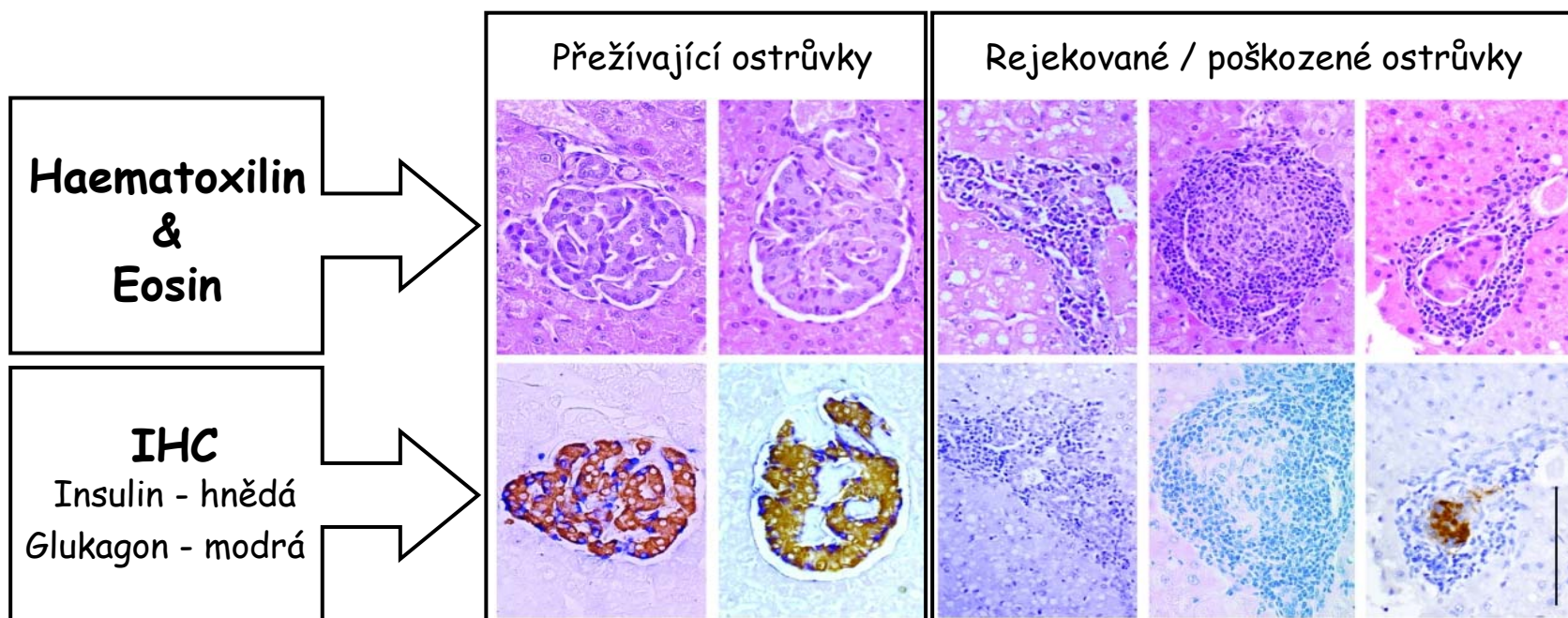
Deregulace  
metabolismu glukózy

Diabetes

Neexistuje trvalá léčba - Transplantace ? - Imunosuprese

Lymphocyte function-associated  
antigen 1 (LFA-1)

Krátkodobé ošetření  
protilátkou proti LFA-1



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

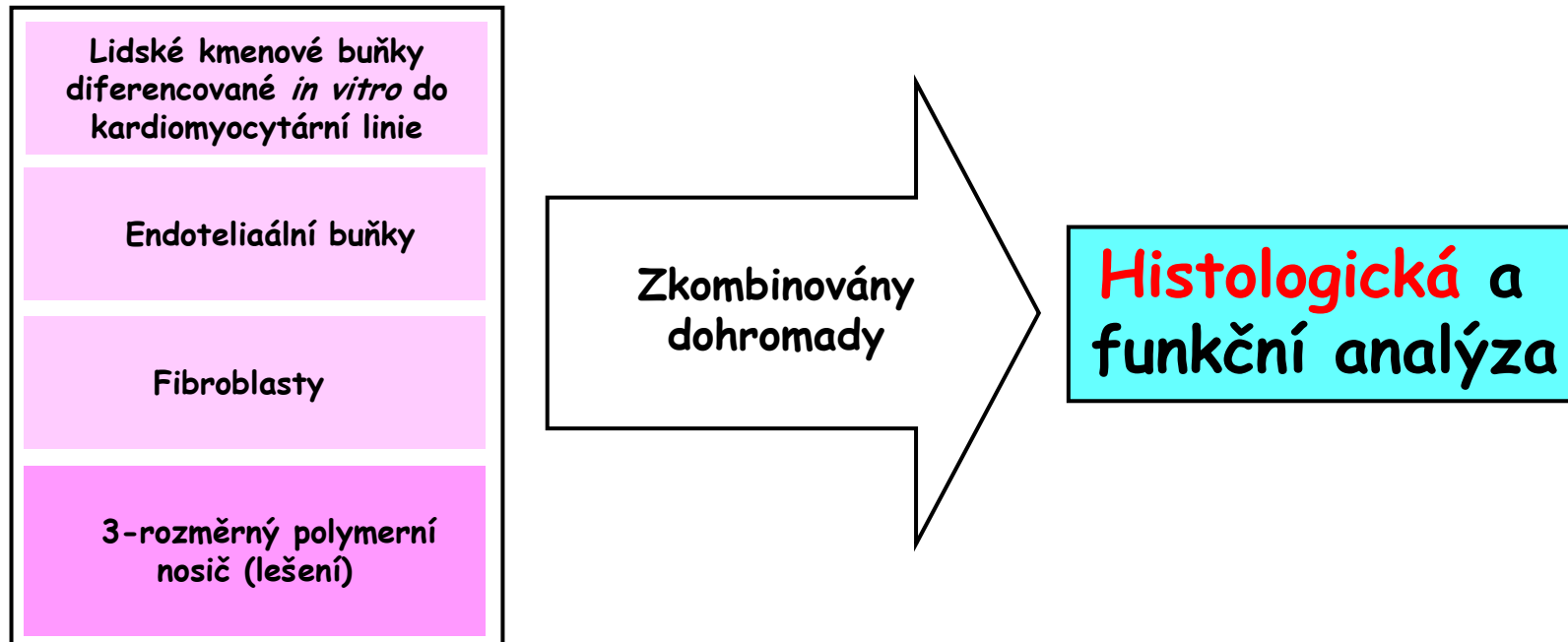


# Tkáňové inženýrství 1

(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)

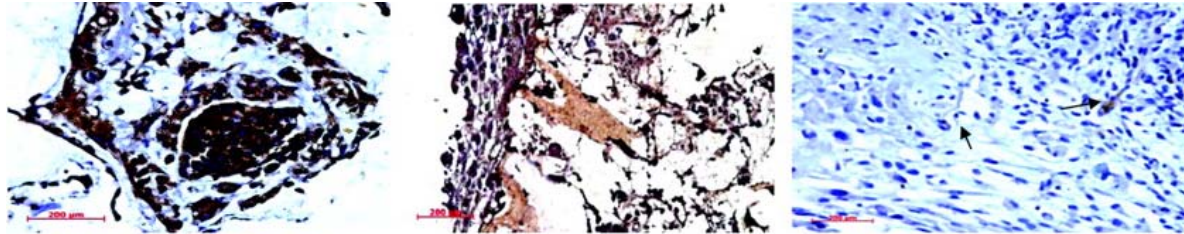
První zpráva o vytvoření 3D vaskularizované srdeční tkáně, která může být použita ke studiu vývoje a funkce srdce a také (snad v budoucnu) k transplantační léčbě



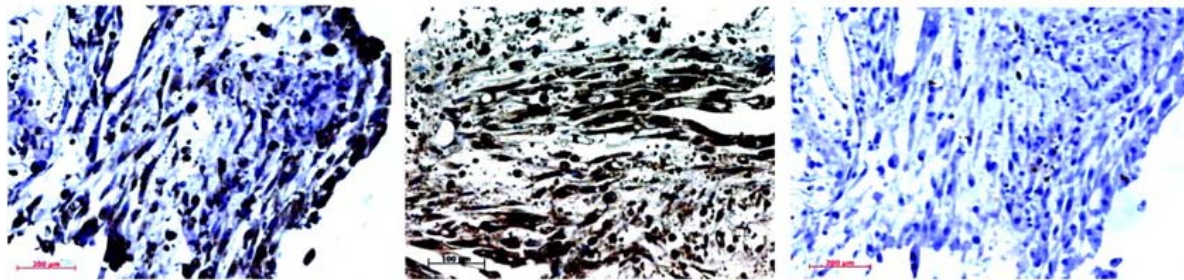


# Tkáňové inženýrství 2

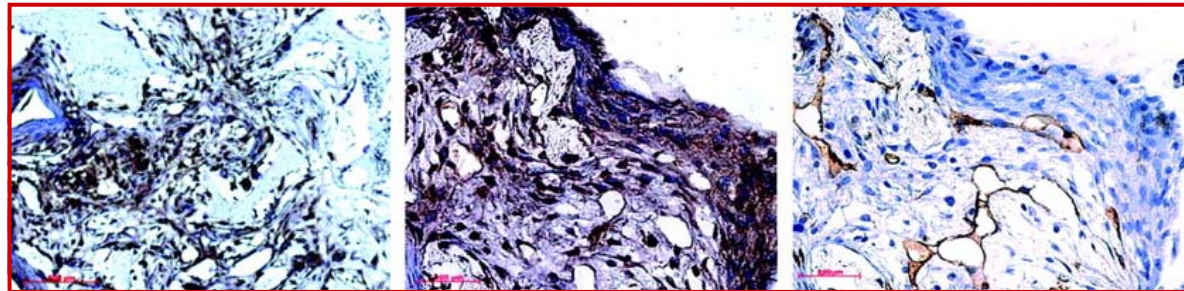
Kardiomyocyty



Kardiomyocyty  
+  
Endotelie



Kardiomyocyty  
+  
Endotelie  
+  
Fibroblasty



Troponin I

Sarkomerický aktinin

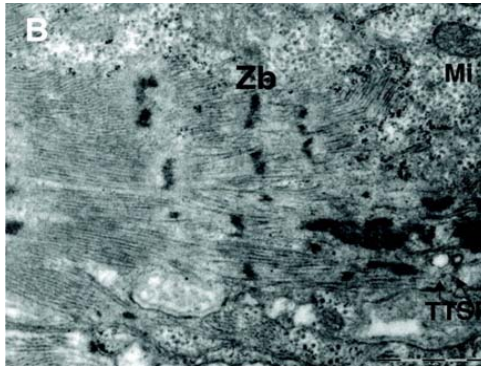
CD 31

Markery **srdeční svaloviny**

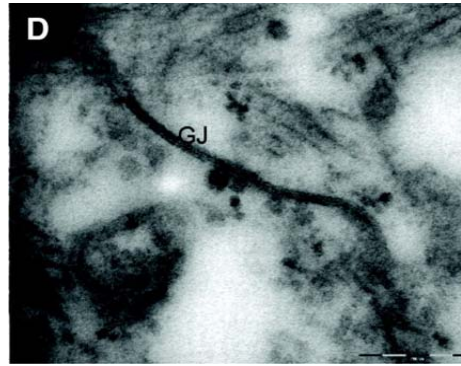
Markery **endotelu** cév

# Tkáňové inženýrství 3

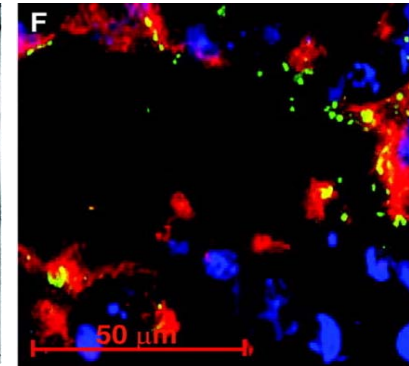
## Ultrastrukturální charakteristiky uměle vytvořené tkáně srdce



Myofibrily  
Z proužky  
T tubuly  
Sarkoplasmatické retikulum

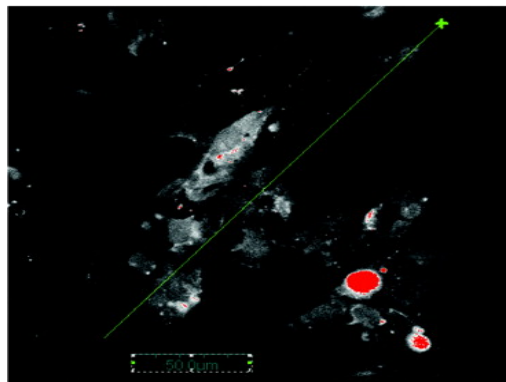


Gap junctions

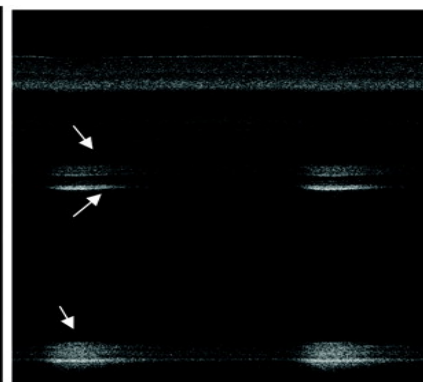


Connexin - Gap junctions  
Troponin - cardiomyocyty

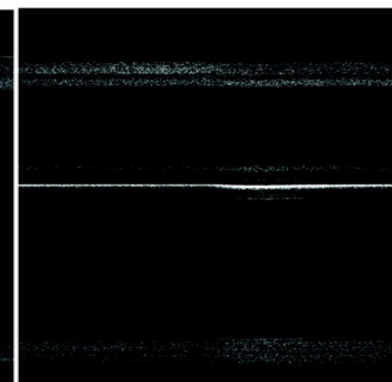
## Uměle vytvořená tkáň srdce má schopnost vést impulzy $Ca^{2+}$



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 - dostupnými  
pro světlo

**Zalití + Příprava řezů**

Zviditelnit struktury

**„Barvení“**

**Zvětšit**



**Použití mikroskopů**



**Světelné (optické) mikroskopy**

(interakce fotonů s hmotou)

**Rozlišení 0.1  $\mu\text{m}$**

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



**Elektronové mikroskopy**

(interakce elektronů s hmotou)

**Rozlišení až 0.1 nm (v praxi 1 nm)**

- Transmisní
- Skenovací

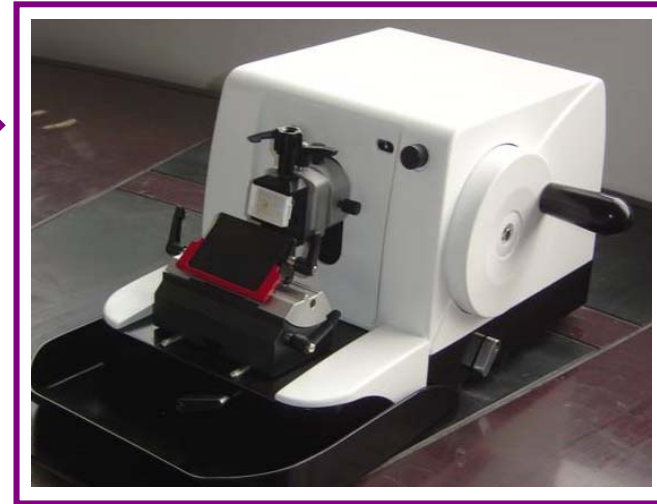
# Histologické metody studia buněk a tkání 2

## 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“

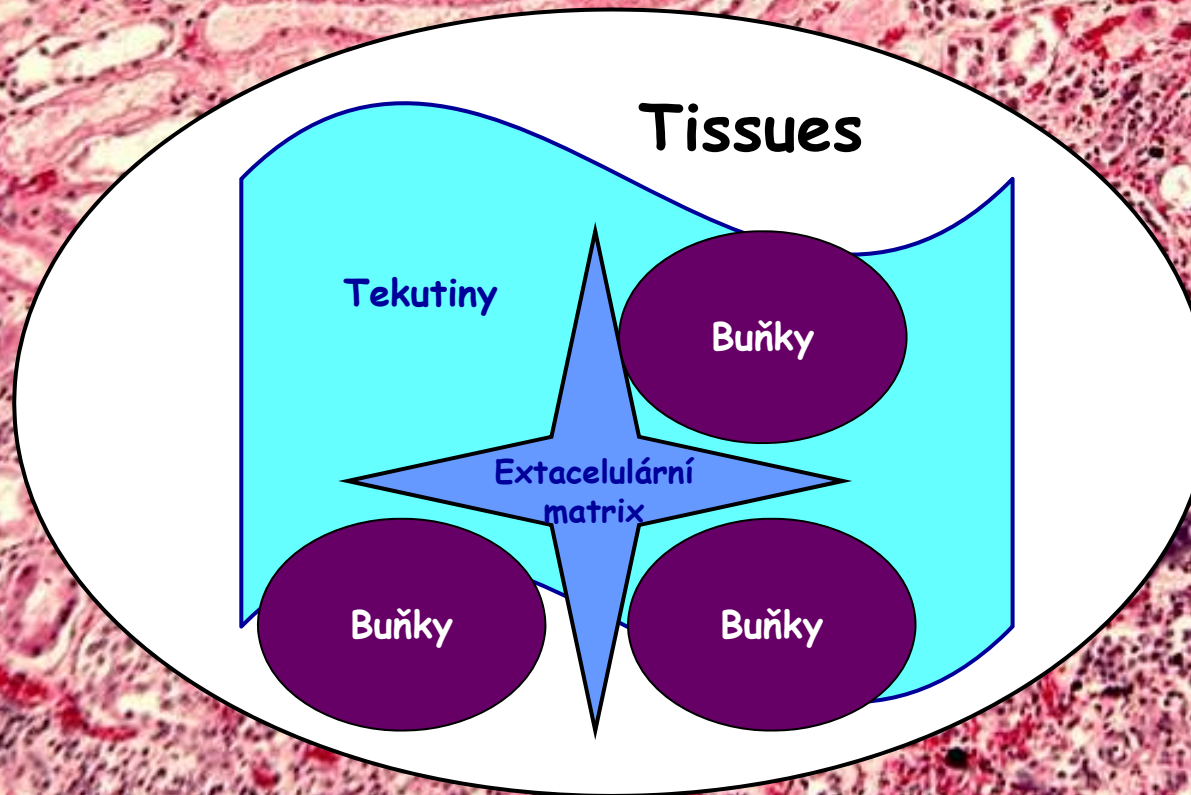
**Chemická přehledná barviva** (H+E, Azan, van Gieson, ...)

**Histochemické reakce** (příkaz 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

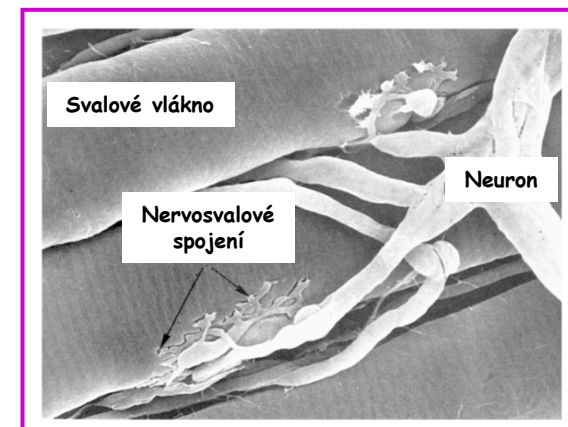
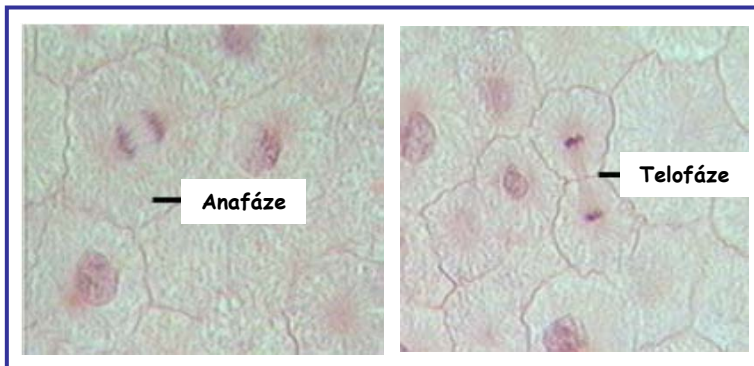


Rudolph Virchow  
1855

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)

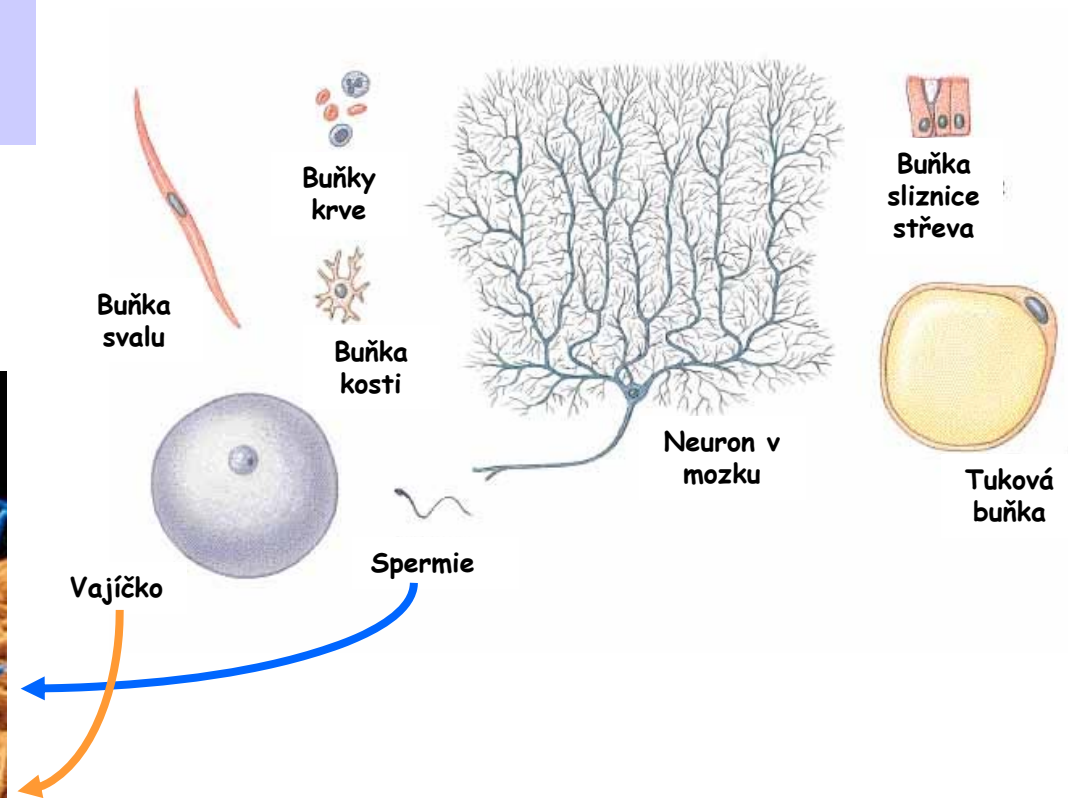
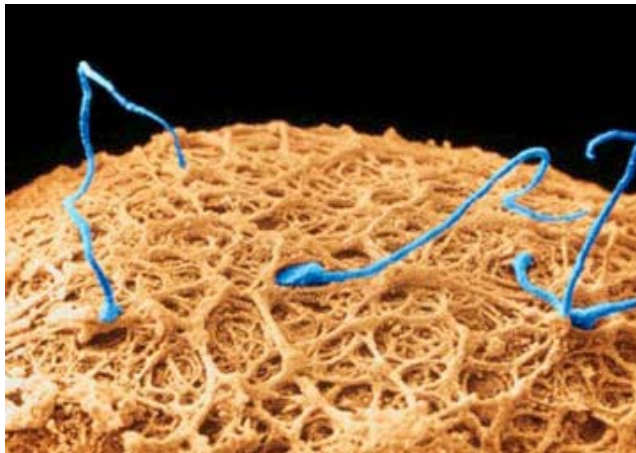


Přes jednotné organizační schéma,  
je typickou vlastností eukaryontních buněk  
jejich strukturální a funkční diverzita



# Také buňky člověka jsou strukturálně a funkčně extrémně rozmanité

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

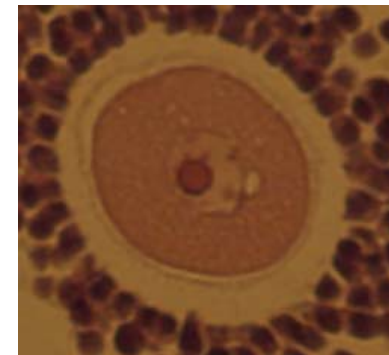
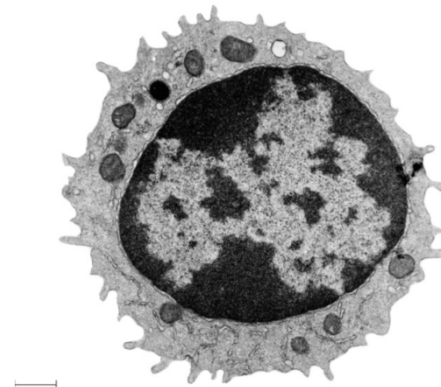
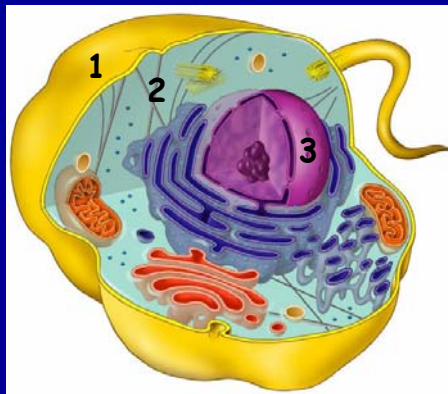


Žádná buňka není zcela stejná jako buňky ostatní, všechny buňky ale mají společné strukturální a funkční znaky.

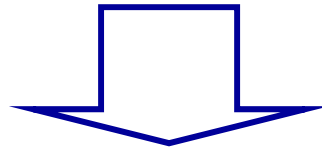
Ne všechny buňky obsahují všechny komponenty o kterých budeme mluvit !

Buňky mají 3 hlavní součásti:

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

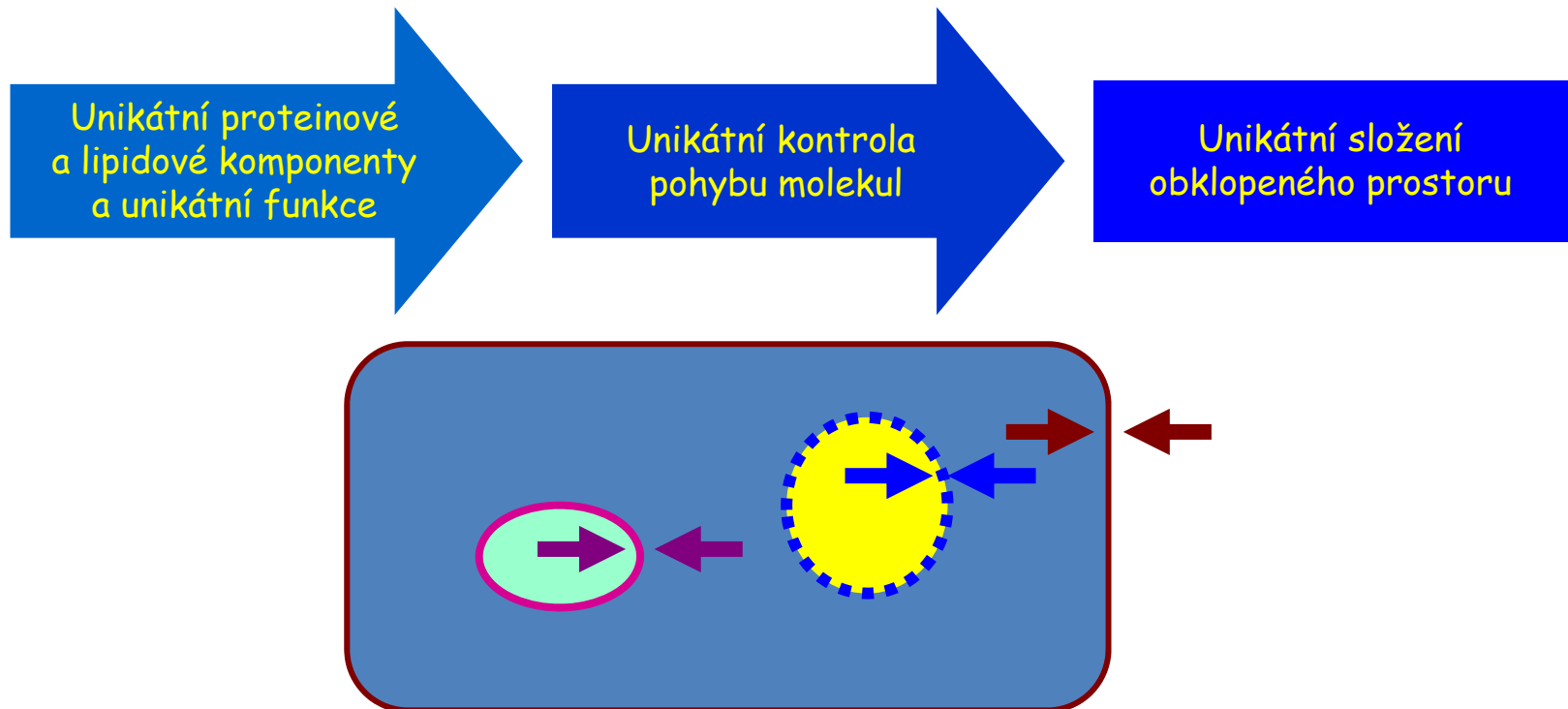


# Organizace buňky je postavena na KOMPARTMENTALIZACI



Specializované funkce se mohou plnit v různých sektorech buňky

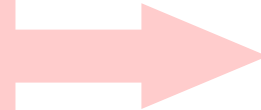
**Membrány** tvoří hranice mezi jednotlivými kompartmenty



# 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

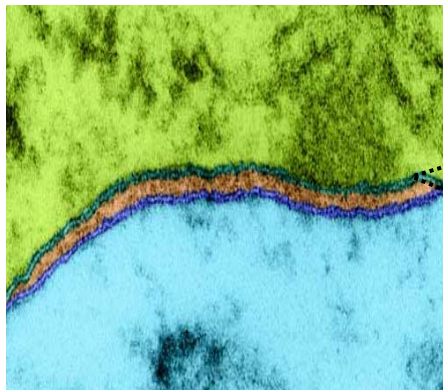


Specializace buněk  
pro různé funkce

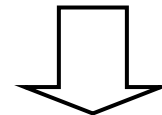
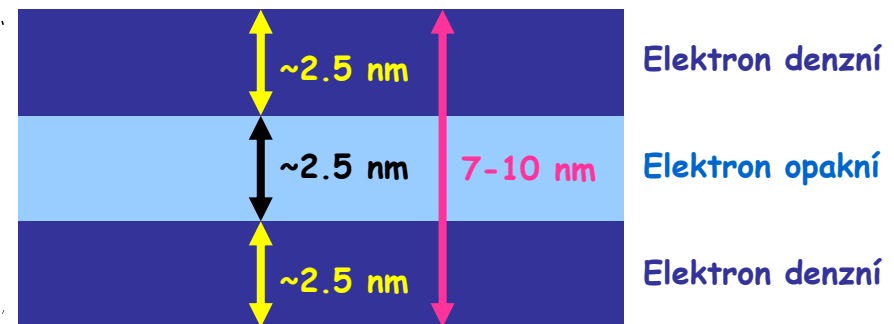
Diferenciace buněk

Drsné ER v sekrečních buňkách  
Mitochondrie v buňkách srdeční svaloviny

# Struktura biologické membrány 1



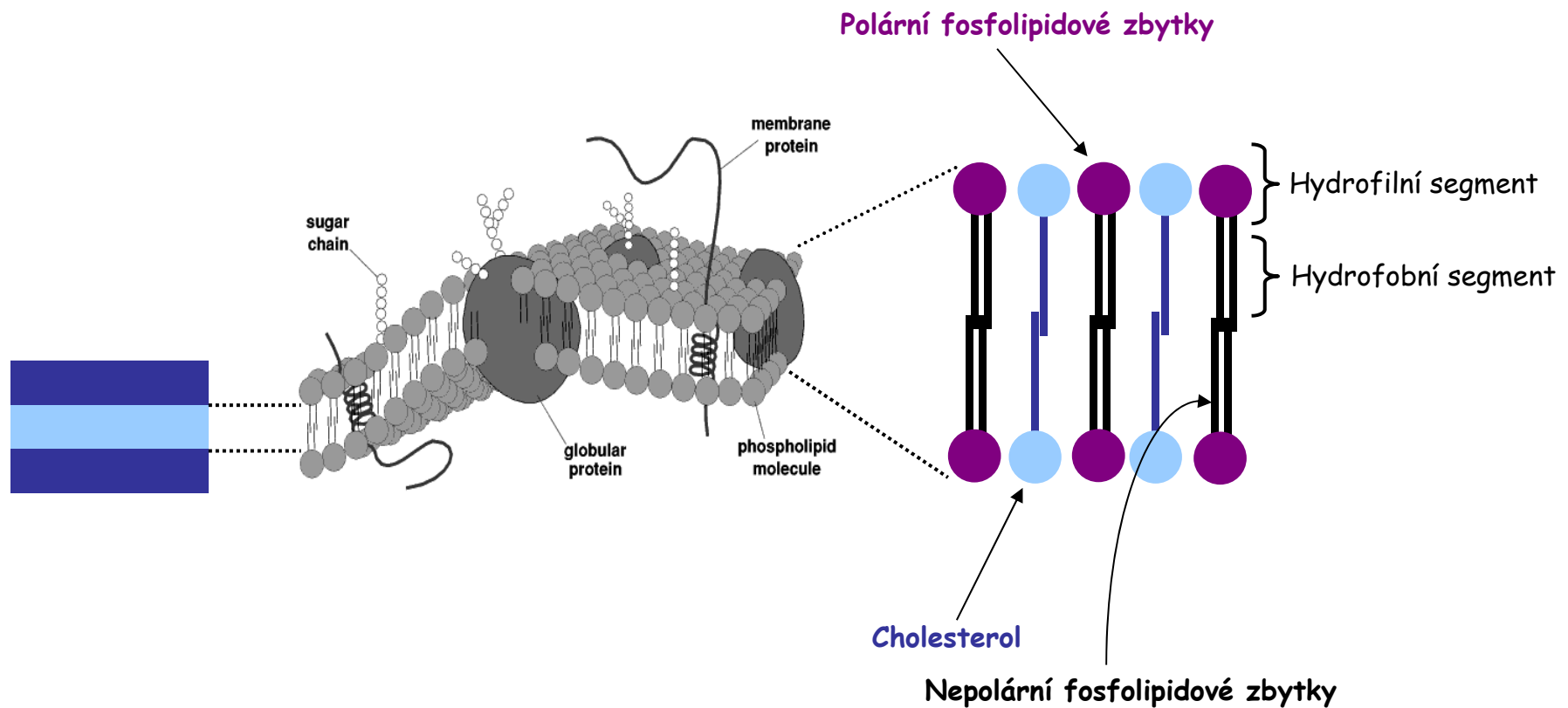
Buněčné membrány viděné elektronovým mikroskopem  
(pseudokolorováno)



**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).

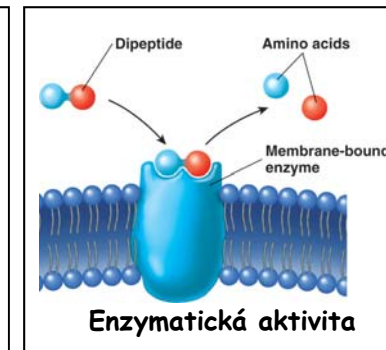
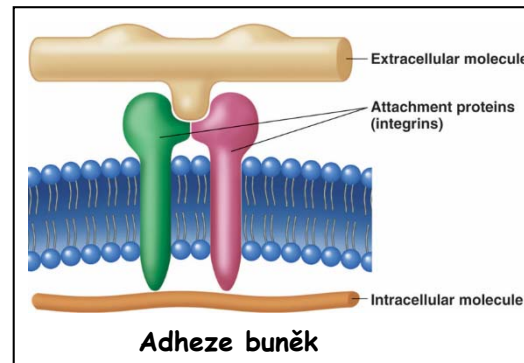
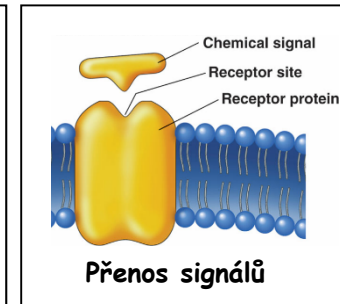
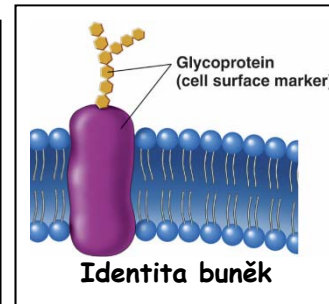
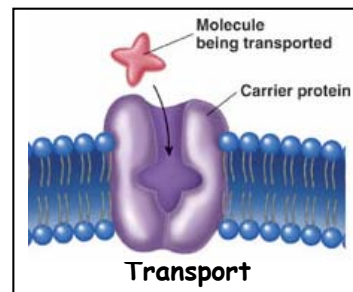
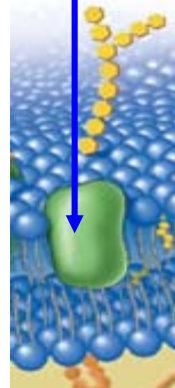
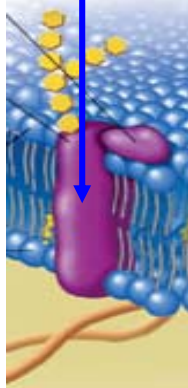
- Fosfolipidy - 75%
- Cholesterol - 20%
- Glykolipidy - 5% - pouze cytoplazmatická membrána - GLYCOCALYX

## Membránové proteiny

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

**Integrální**

**Periferní**



# Organely

Specializované vnitřní struktury se specializovanými funkcemi

## Ohraničené membránou

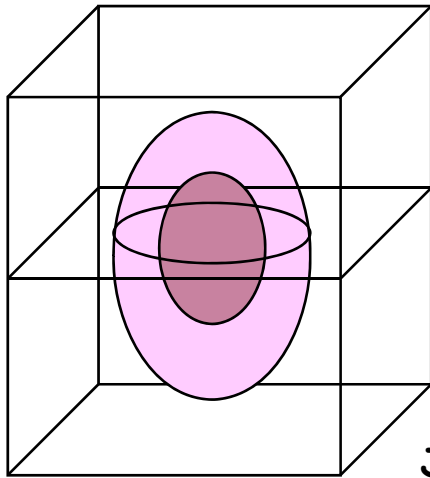
- Jádro
- Endoplasmatické retikulum
- Golgiho aparát
- Lyzosomy
- Endosomy
- Peroxisomy
- Mitochondrie

## Bez membrány

- Ribosomy
- Centrosomy
- Centrioly
- Bazální tělíska

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



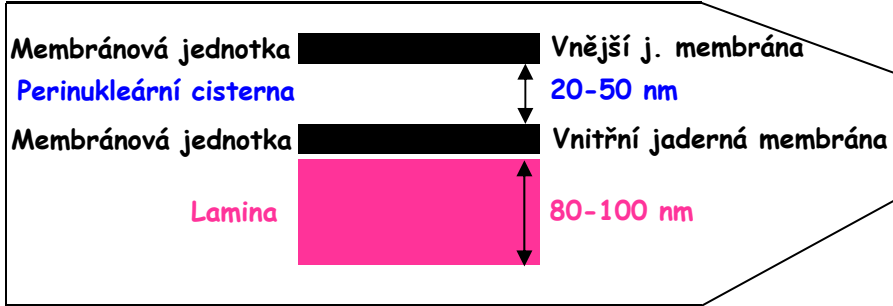
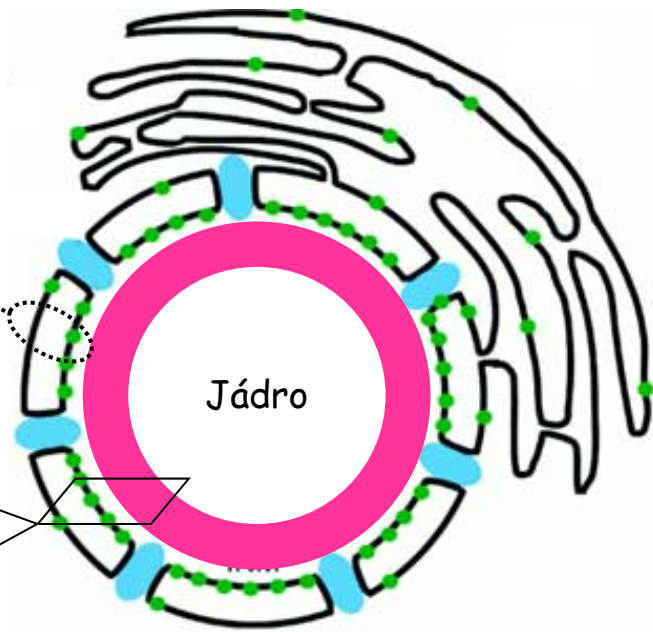
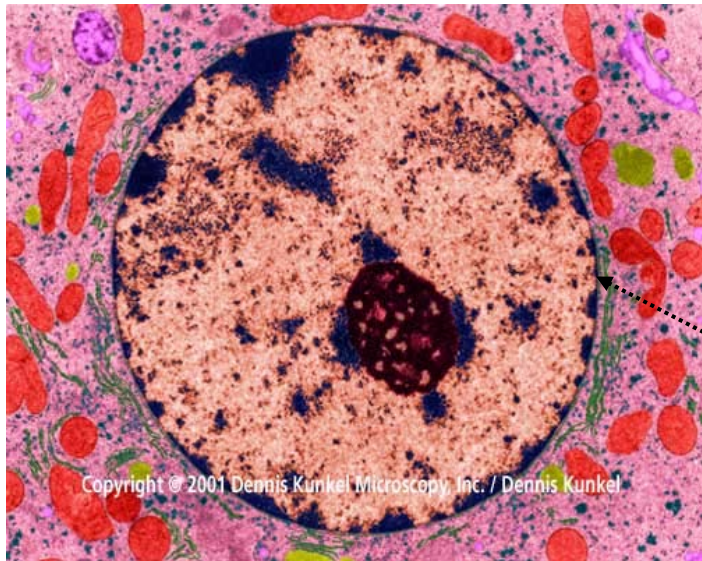


# Jádro 1

## membránou ohraničená organela

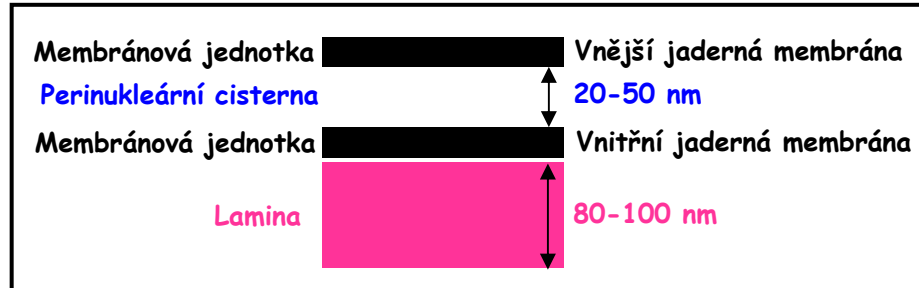
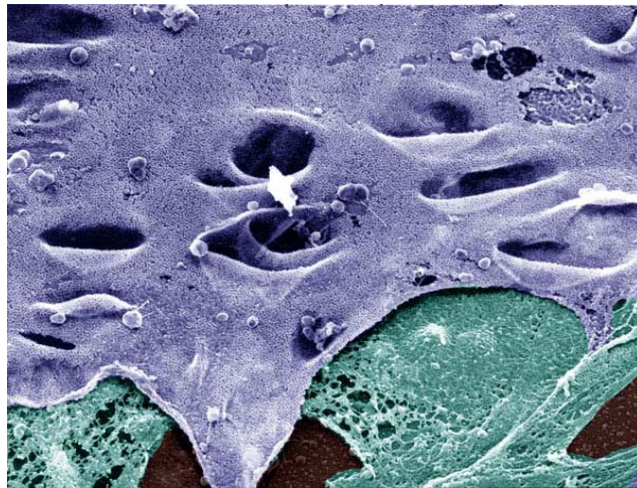
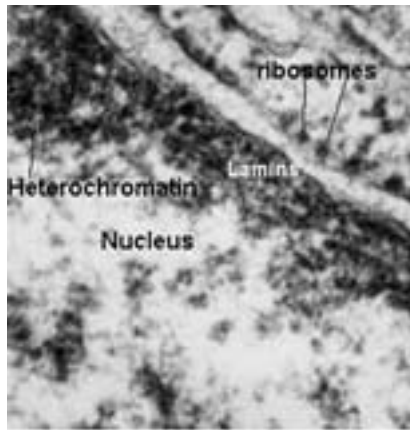
Jádro jaterní buňky

- Nejčastěji:
- Sférické (5-10  $\mu\text{m}$ ) (lobulární, prohnuté, diskovité,...)
  - Uloženo centrálně
  - Jedno v buňce (osteoklast více, erytrocyt žádné)



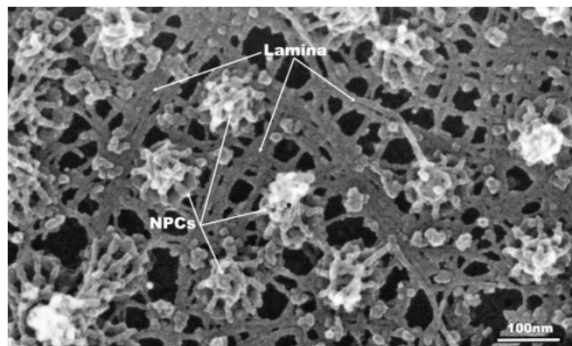
# Jádro 2

## 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

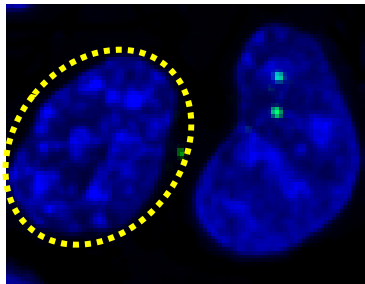
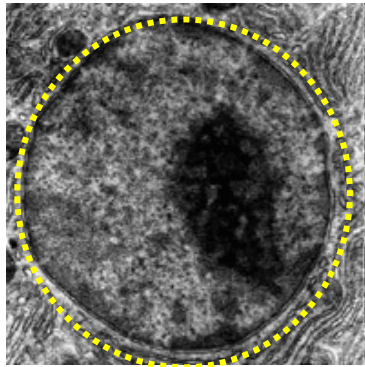
- Lidské choroby (nejméně 13 známých)
- Mutace v genech pro laminy (popsáno asi 200 mutací)
- Deregulace exprese genů
- Předčasné stárnutí



### Hutchinson-Gilford progerie

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

# Jádro 4 Chromatin



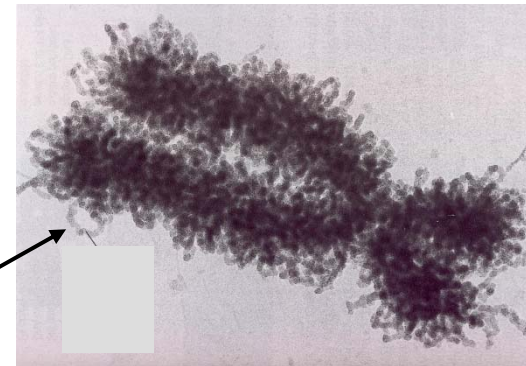
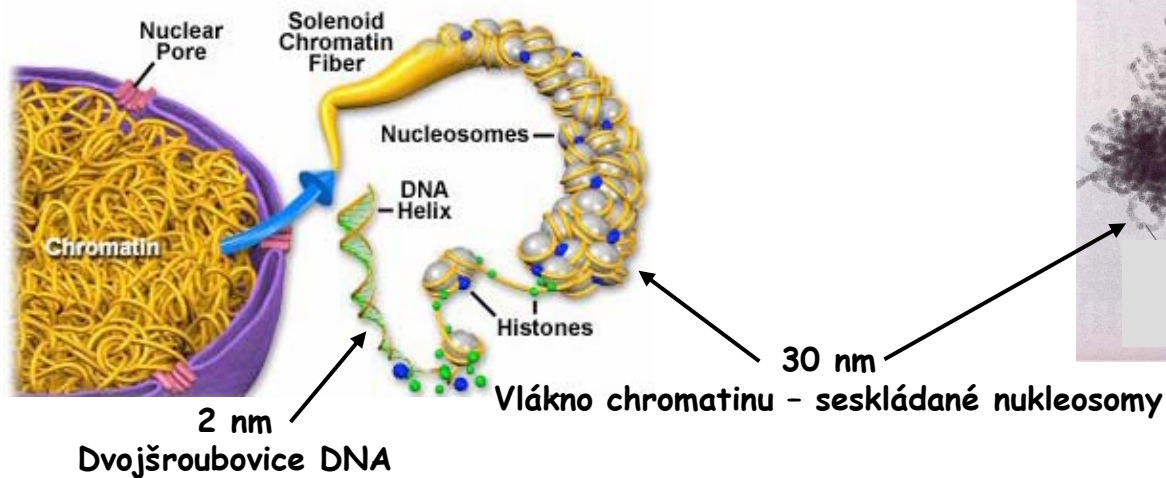
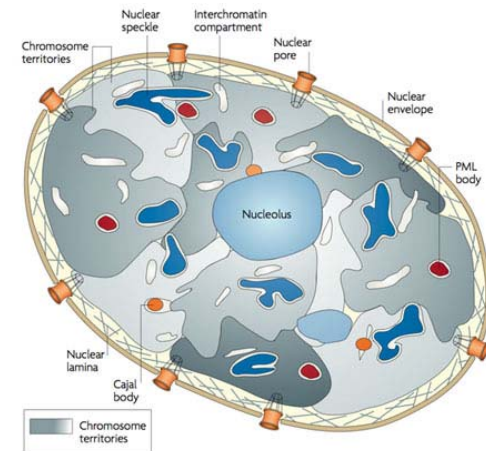
## Interfázové jádro

### Heterochromatin

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

### Euchromatin

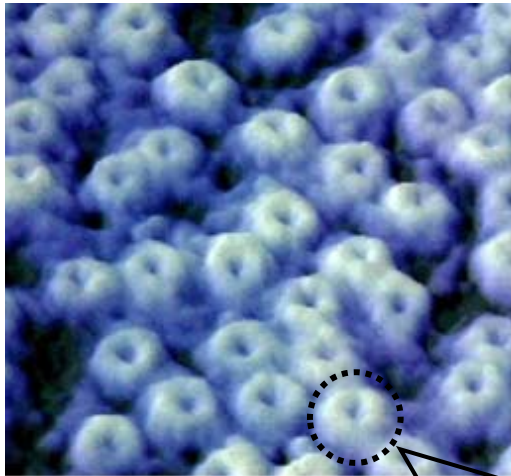
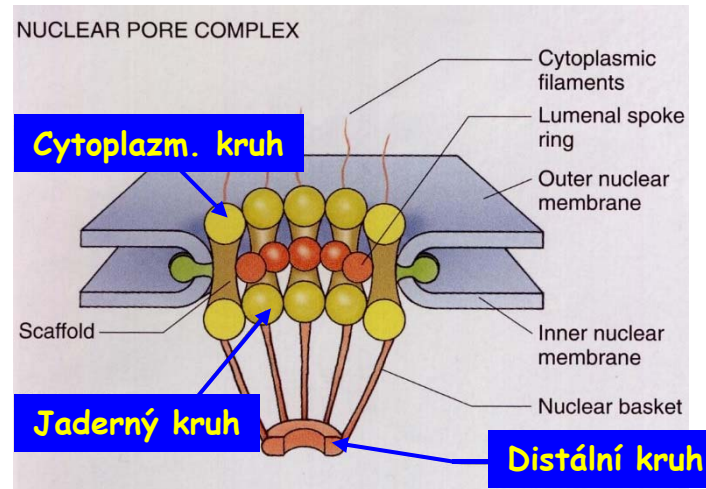
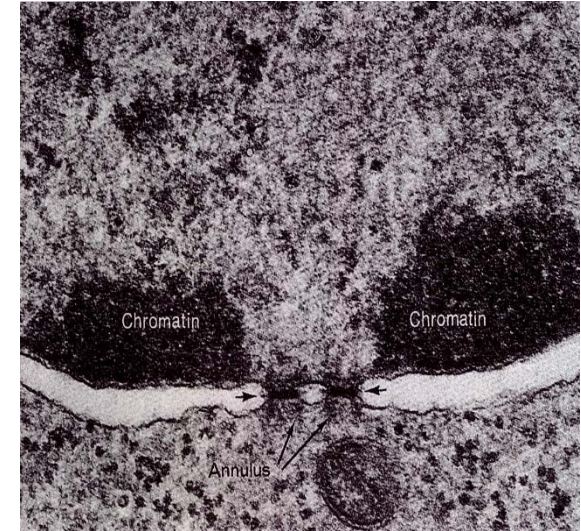
Neviditelný ve světelném mikroskopu  
Relaxované chromosomy  
Transkripčně aktivní





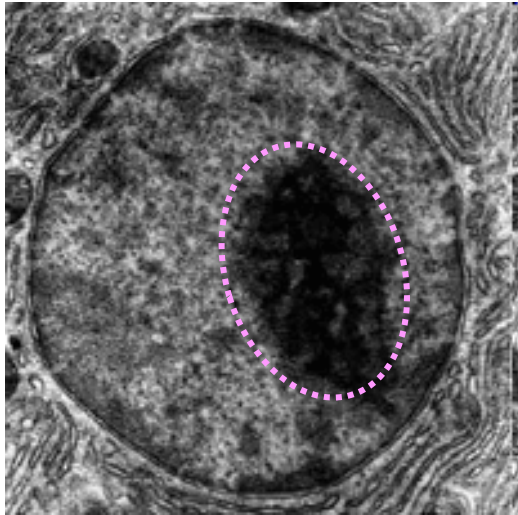
# Jádro 3

## 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

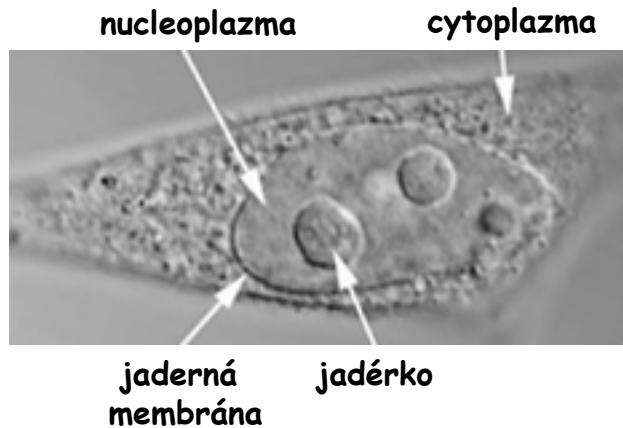


## Jádro 5 Jadérko

Není ohraničeno membránou

### Hlavní funkce

Syntéza RNA  
Skládání ribosomů



**Pars granulosa**  
Skládání ribosomů

**Pars fibrosa**  
Primární transkripty rRNA

**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“

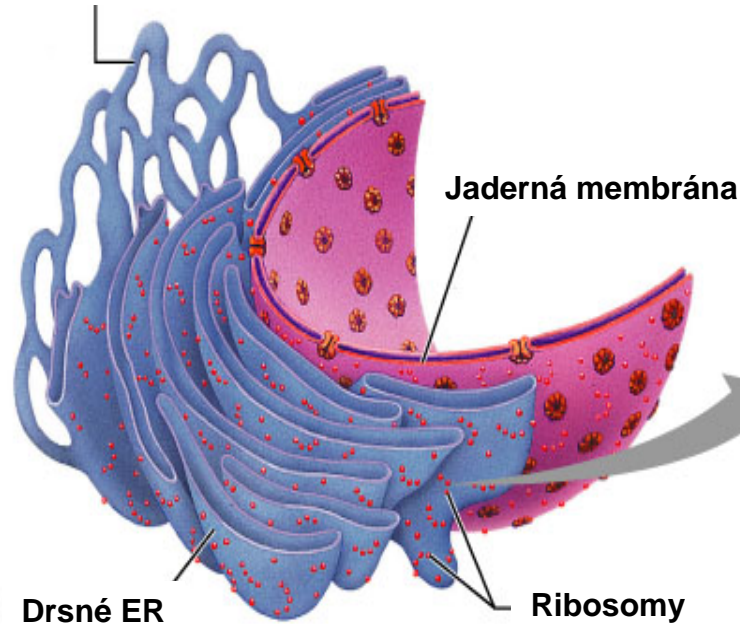
„sít“

Většina membrán uvnitř buňky.

Vzájemně propojené  
kanálky a vácčky

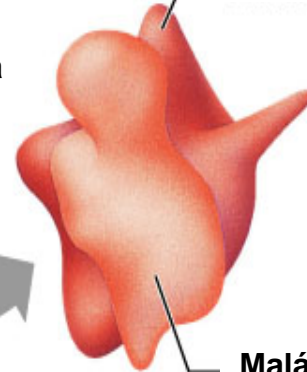
Cisterny

Hladké ER



(a)

Velká podjednotka  
ribosomu



(c)

Malá podjednotka  
ribosomu

# Endoplasmatické retikulum 1

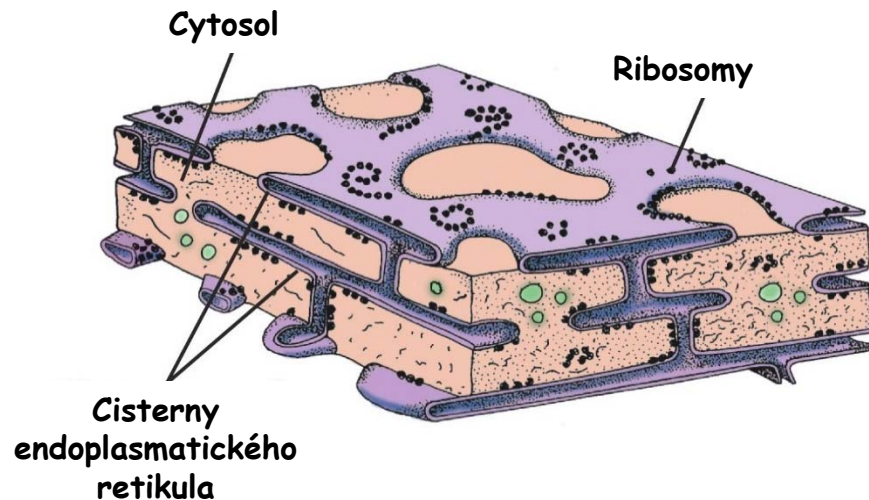
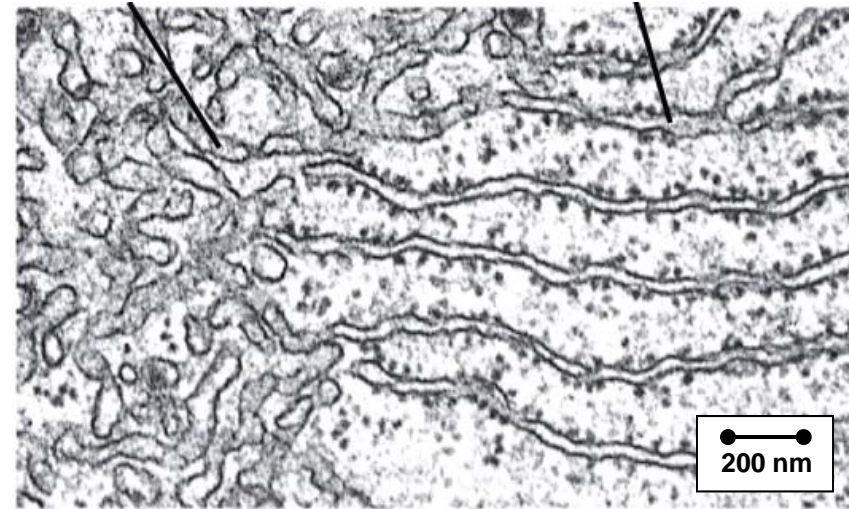
Bez ribosomů → Nemá proteosyntetickou funkci !

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 s srdeční svalovina** - ukládání a uvolňování vápníku (sarkoplasmatické retikulum)

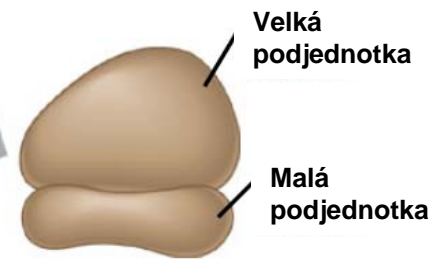
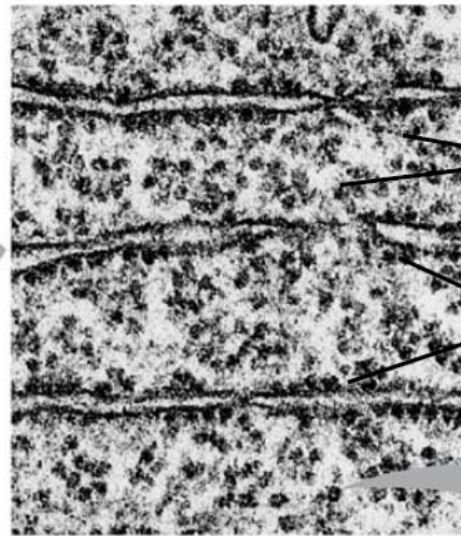
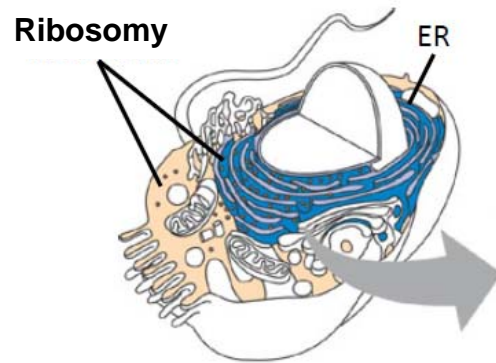
Hladké ER

Drsné ER



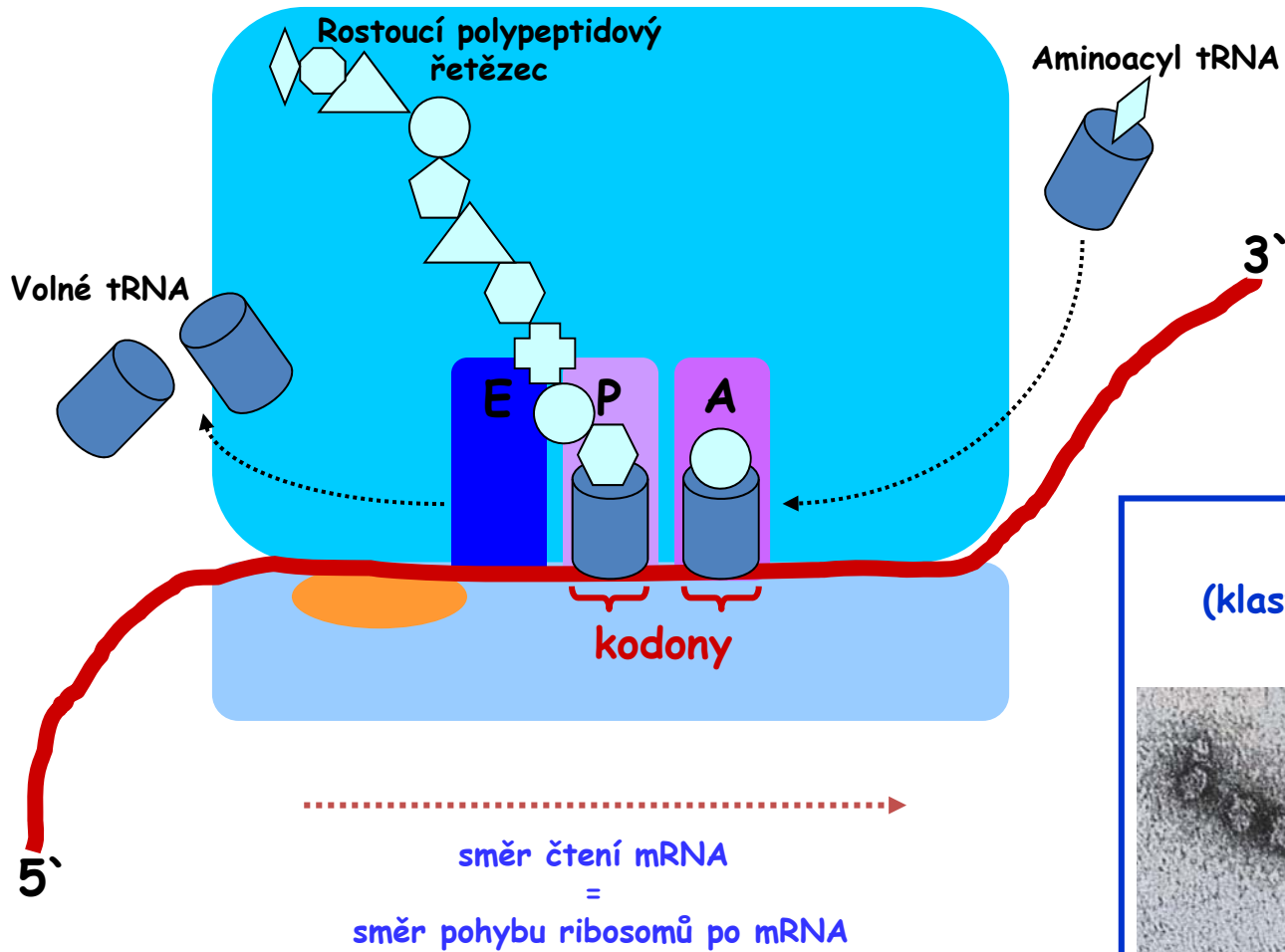
- Syntéza všech sekretovaných proteinů
- Syntéza integrálních proteinů membrán
- Modifikace proteinů

# Ribosomy

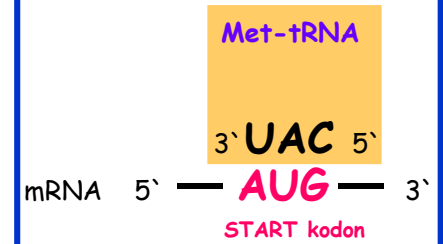




# Ribosomy - Translace



## Začátek translace

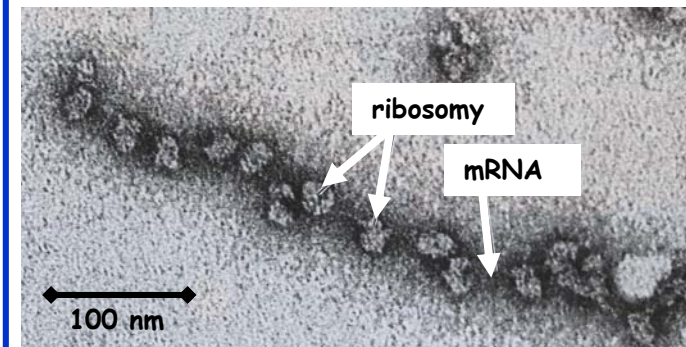


## Konec translace

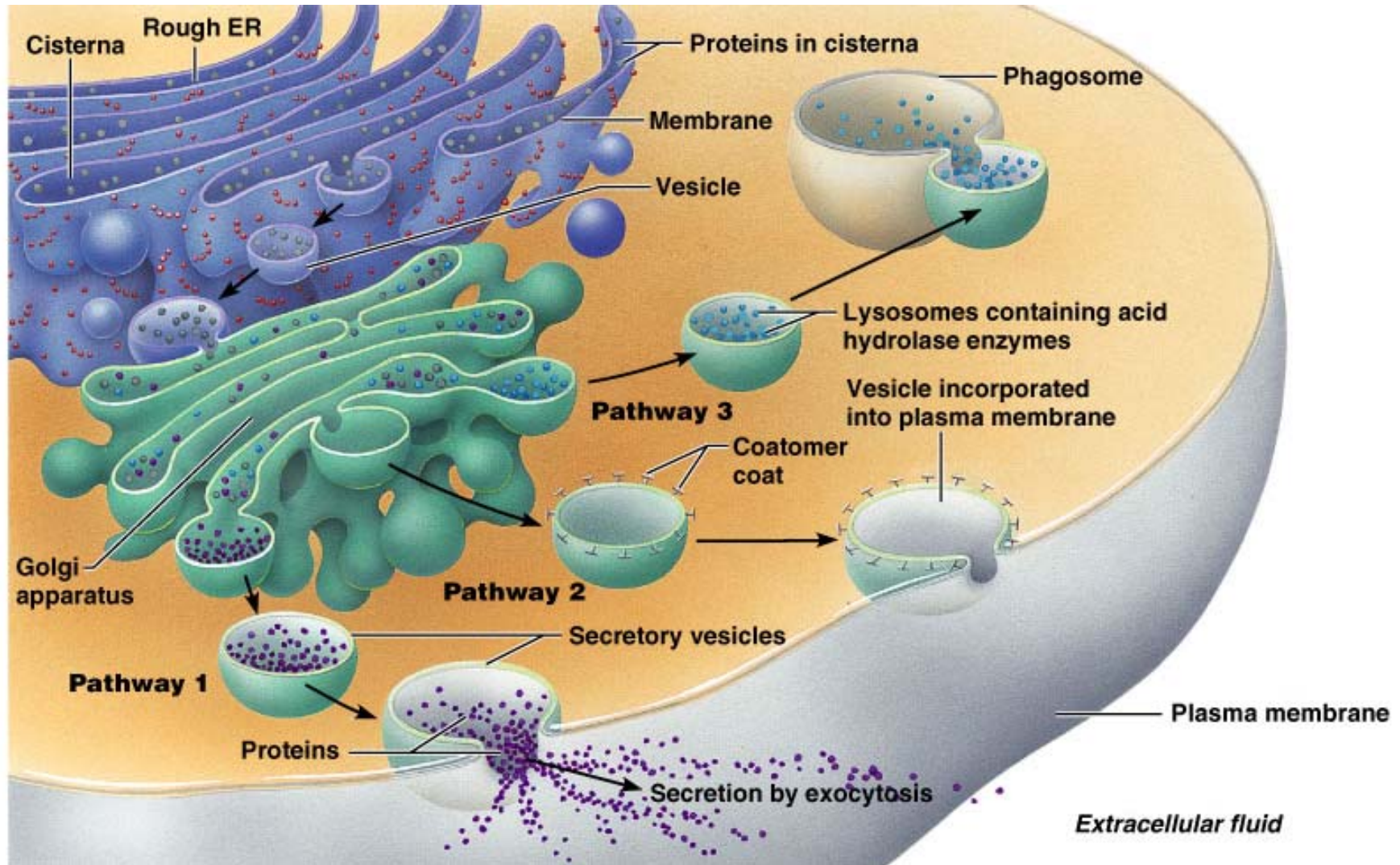


## POLYRIBOSOM

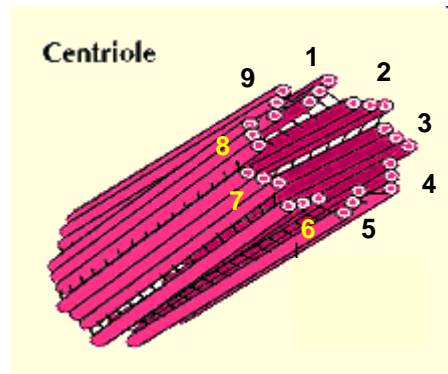
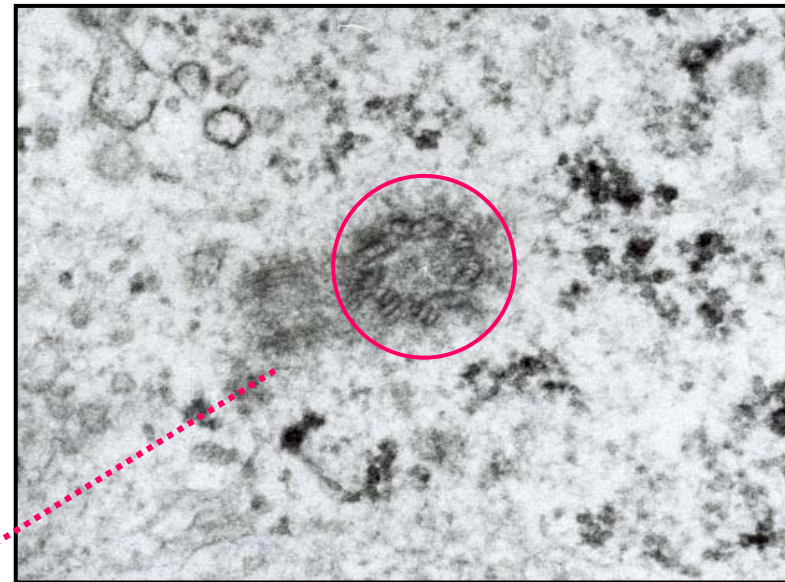
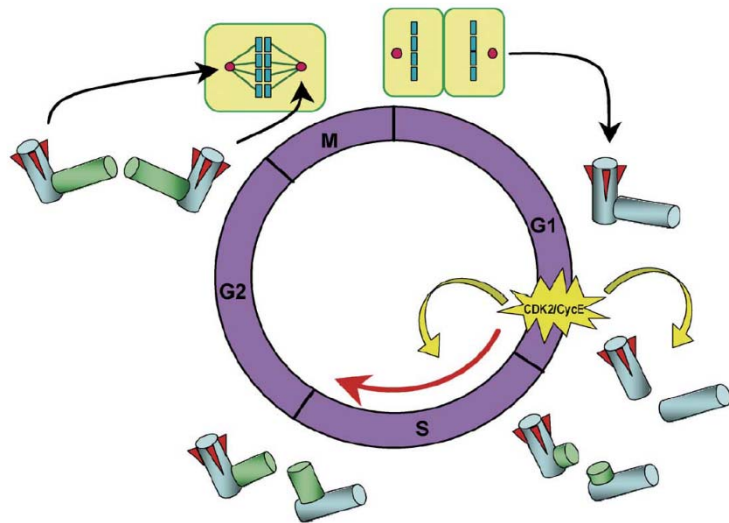
(klastř ribosomů překládající určitý úsek mRNA)



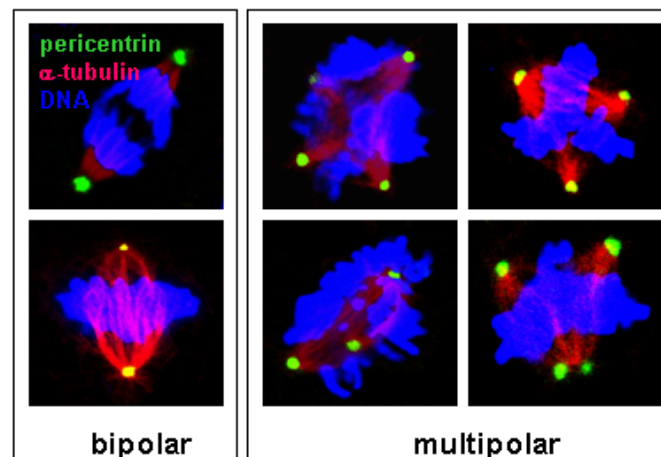
# Golgiho aparát



# Centrosom



Průměr - 0.2  $\mu\text{m}$   
 Délka - 0.5  $\mu\text{m}$



## 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](mailto:ahampl@med.muni.cz)

Budova A1 - 1. patro