

# Regenerace & reparace

## Hojení ran

Buněčný stres a poškození a následné reakce  
Typy buněk a tkání z hlediska proliferace  
Podstata regenerace vs. reparace  
Průběh a poruchy hojení ran



# Buňky a tkáně mohou být poškozeny různě:

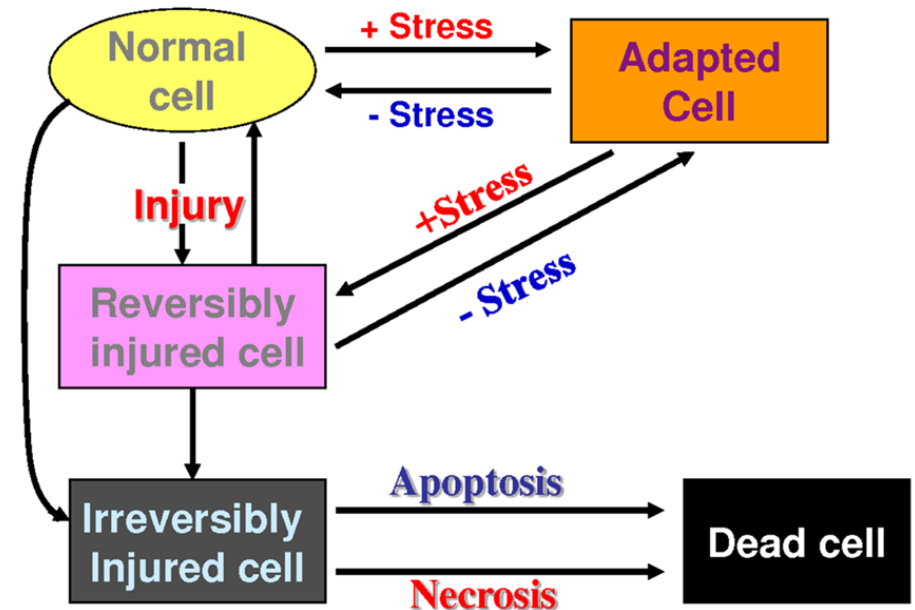


- fyzikálně
  - mechanické
    - trauma (např. lacerace, incize, abraze, ...)
  - tepelně (popálení, omrznutí)
  - záření (UV, ionizující)
- chemicky
  - oxidační stres (reaktivní metabolity kyslíku, angl. ROS)
  - toxiny (např. bakteriální)
  - poleptání (kyseliny a louhy)
- biologicky
  - invaze mikroorganismů s destrukčními vlastnostmi (zejm. proteázy)
    - flegmóna, gangréna
- imunologicky (indukce apoptózy)
  - komplement
  - cytotoxické lymfocyty, NK bb.
- hypoxií
  - ischemická nekróza
    - + nedostatek živin a hromadění metabolitů
- a konečně přirozený zánik/ztráta bb.
  - destrukce v RES (např. erythrocyty)
  - mechanické odloučení (např. střevní epitel)
  - fagocytóza

**důsledky jdou pro buňky buď fatální (buněčná smrt) nebo se stresu adaptuje**

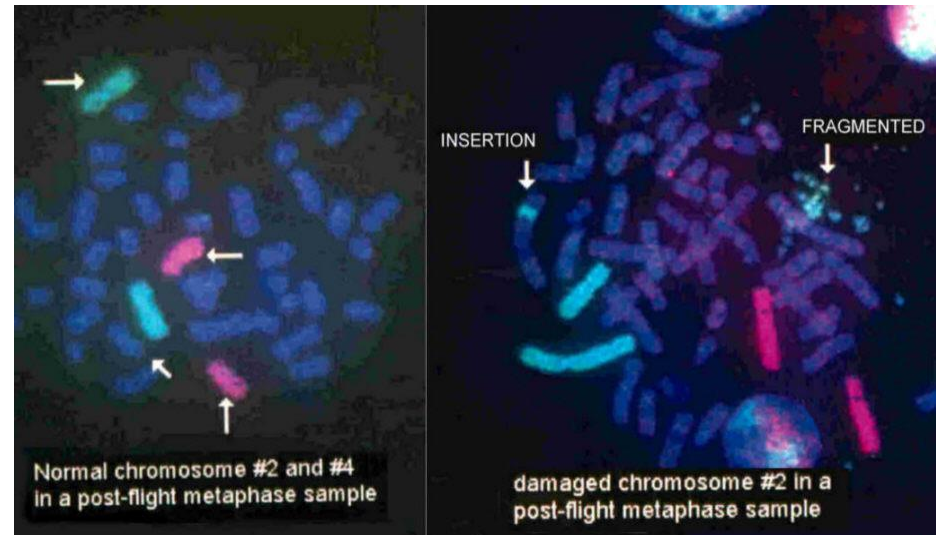
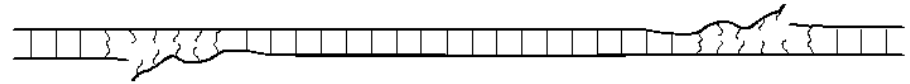
# Buněčný stres – možnosti adaptace

- různé typy stresů
  - oxidativní
  - misfolded proteins
  - hypoxie
  - nutriční deficit (b. „hladovění“)
- indukují různé typy odpovědí v závislosti na typu stresu, závažnosti a trvání
  - signální vedoucí k přežití
    - (A) reparace DNA poškození
    - (B) antioxidantní enzymy
    - (C) reparace proteinů - heat shock proteiny
      - chaperony zabraňují misfoldovaným proteinům agregovat a pomáhají refoldingu
    - (D) unfolded protein response
    - (E) autofagie
    - (F) reakce na hypoxii
  - apoptóza



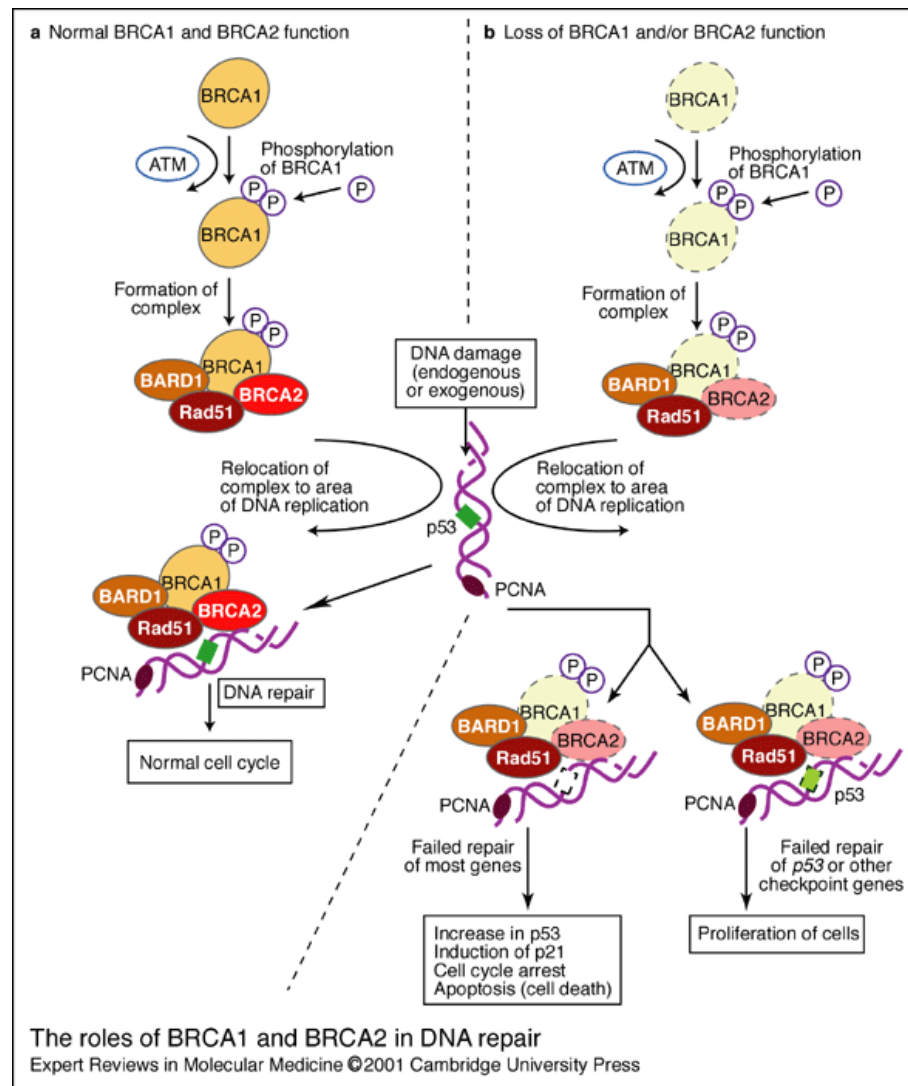
# (A) Reparace DNA

- reakce buňky na poškození DNA
  - detekce poškození (p53)
  - zástava b. cyklu (inhibitory cyklin dependentních kináz, např. p21)
  - pokus o opravu
  - apoptóza
- typy reparací podle poškození
  - bodové mutace → mismatch repair
  - jednovláknové zlomy (angl. single strand breaks) → excizní reparace
  - dvouvláknové zlomy (angl. double strand breaks)
    - většinou pro buňku letální (apoptóza)
    - homologní rekombinace
      - fyziologicky nezbytná pro meiotický crossing-over
    - nehomologní ligace – jeden z mechanismů maligní transformace buňky
      - translokace
      - inserce

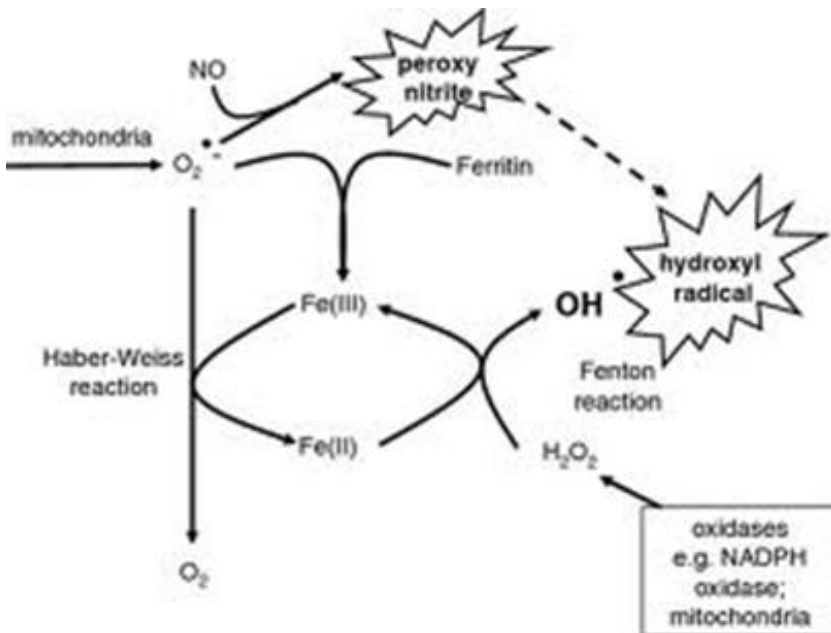
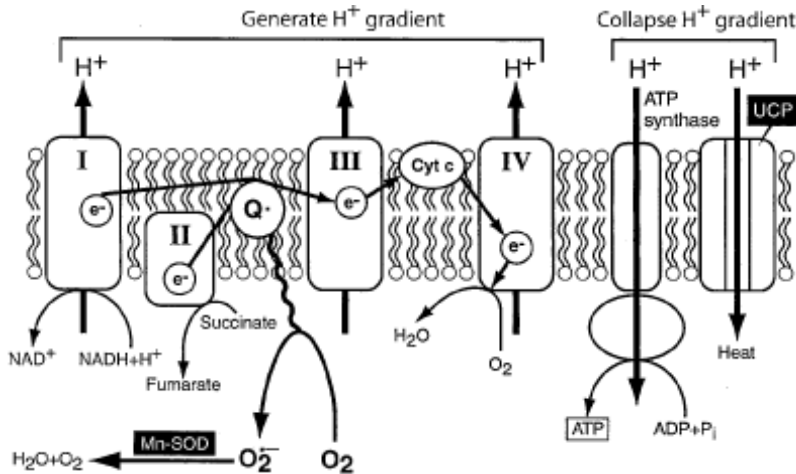


# (A) DNA reparační geny jsou tumor supresorové geny!!

- (1) geny reparace chybného párování (“mismatch repair”)
  - nestabilita délky mikrosatelitových lokusů (např. **HNPCC** = Hereditary Non-Polypous Colon Cancer)
- (2) geny excizní reparace
- (3) geny homologní rekombinace
  - hlavní dráha aktivovaná při poškození DNA (double strand break) zahrnuje:
    - **BRCA1** a **BRCA2**
    - **ATM, ATR** – jinázy
    - **CHK1** a **2** – checkpoint kinázy
      - ATM, ATR/CHK2 (CHK1) → p53/MDM2 → p21 → “growth arrest”
- vrozená porucha reparačních genů je podkladem několika dědičných typů nádorových onemocnění
  - ataxia telangiectatica
  - Bloomův syndrom
  - Fanconiho anemie
  - xeroderma pigmentosum
  - syndrom fragilního X



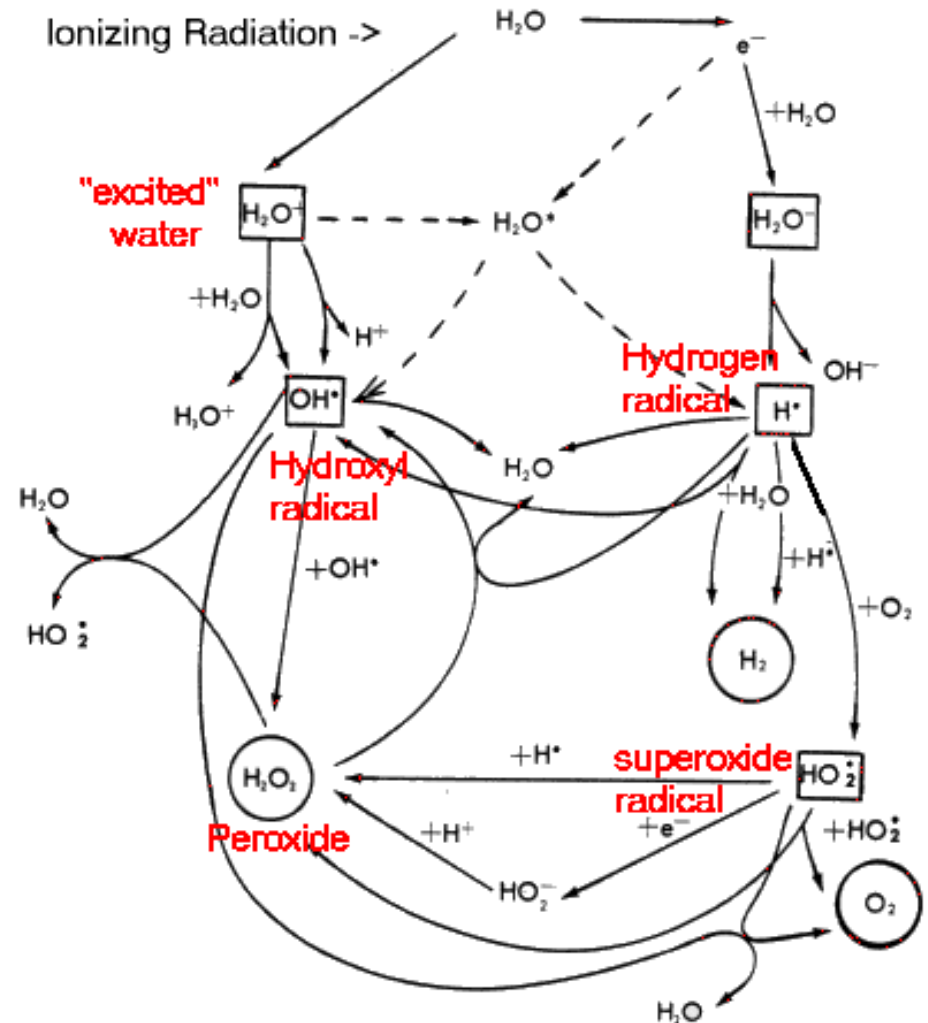
# (B) oxidační stres a antioxidační obrana



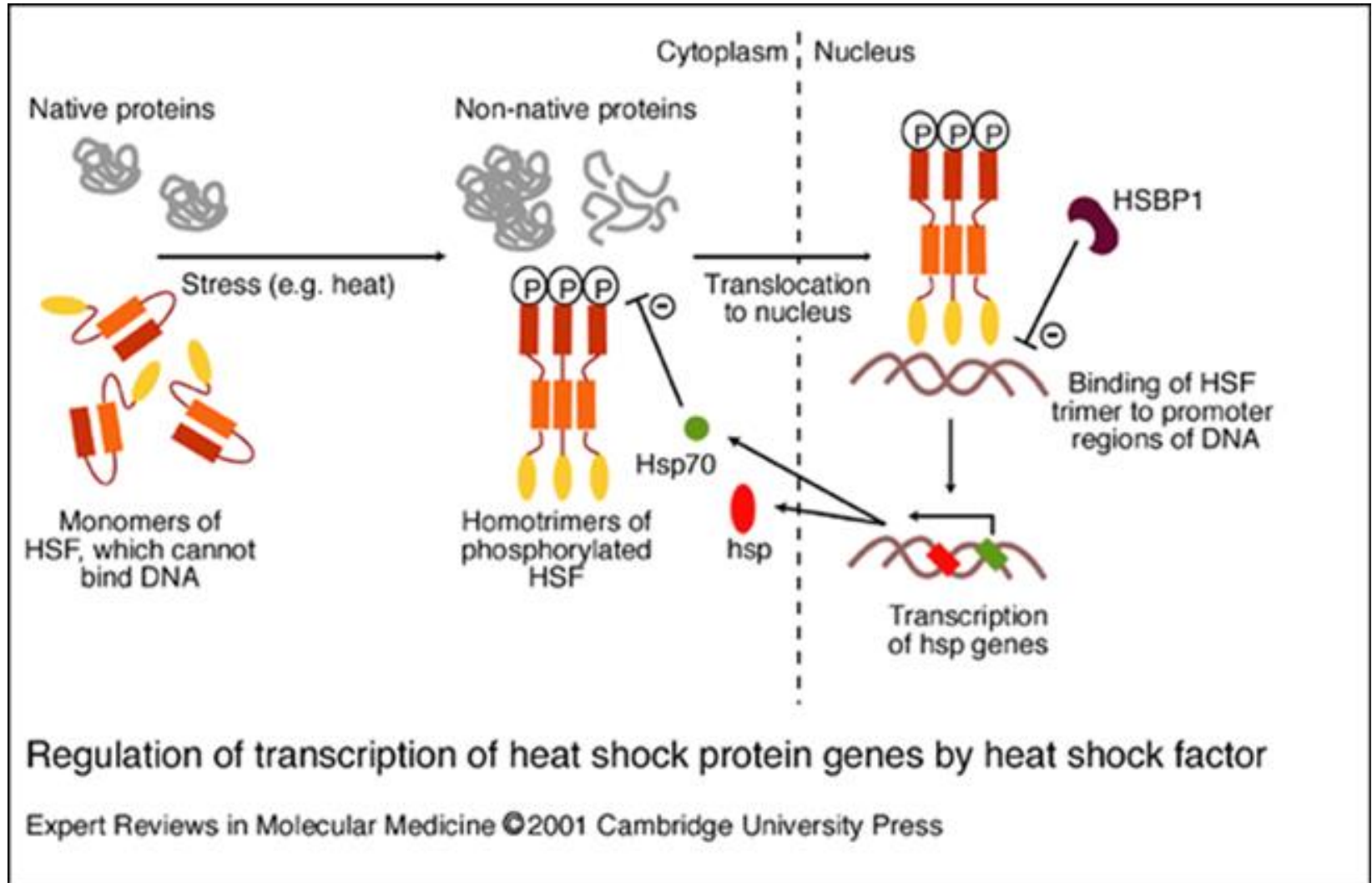
- hlavní zdroj jsou **mitochondrie** (ale také enzymy fagocytujících bb. )
- normálně není ~ 1 – 2 % kyslíku konvertováno na vodu ale **superoxid** (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- superoxid je konvertován na hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - spontánně
  - v reakci katalyzované superoxidodismutázou (SOD)
- peroxid je “detoxifikován” katalázou (CAT) a glutathionperoxidázou (GPX) na vodu a kyslík
- když ne, tak reaguje s dalšími látkami a makromolekulami a poškozuje buněčné struktury (oxidace, lipoperoxidace)
- normální (nevyhnutelná) produkce ROS je fyziologicky kompenzován působením
  - enzymatických antioxidačních mechanismů
    - SOD, KAT, GPX, ...
  - neenzymaticky
    - vit. E, glutathion, thioredoxin, kys. močová, bilirubin, ...
- **oxidační stres** znamená situaci kdy tvorba ROS přesáhne možnosti jejich degradace

# (B) příklad - biologické efekty a důsledky ionizujícího záření

- přímá ionizace makromolekul
- nepřímá cestou “radiolýzy” vody
  - vznik reaktivních metabolitů kyslíku (ROS)
- důsledky:
  - blokáda b. cyklu → apoptóza
    - mitotická nebo post-mitotická smrt (proliferující bb.)
  - mutace (genové nebo chromozomální)
    - reparace
    - ne-reparabilní změny
      - somatické bb. → kancerogeneze

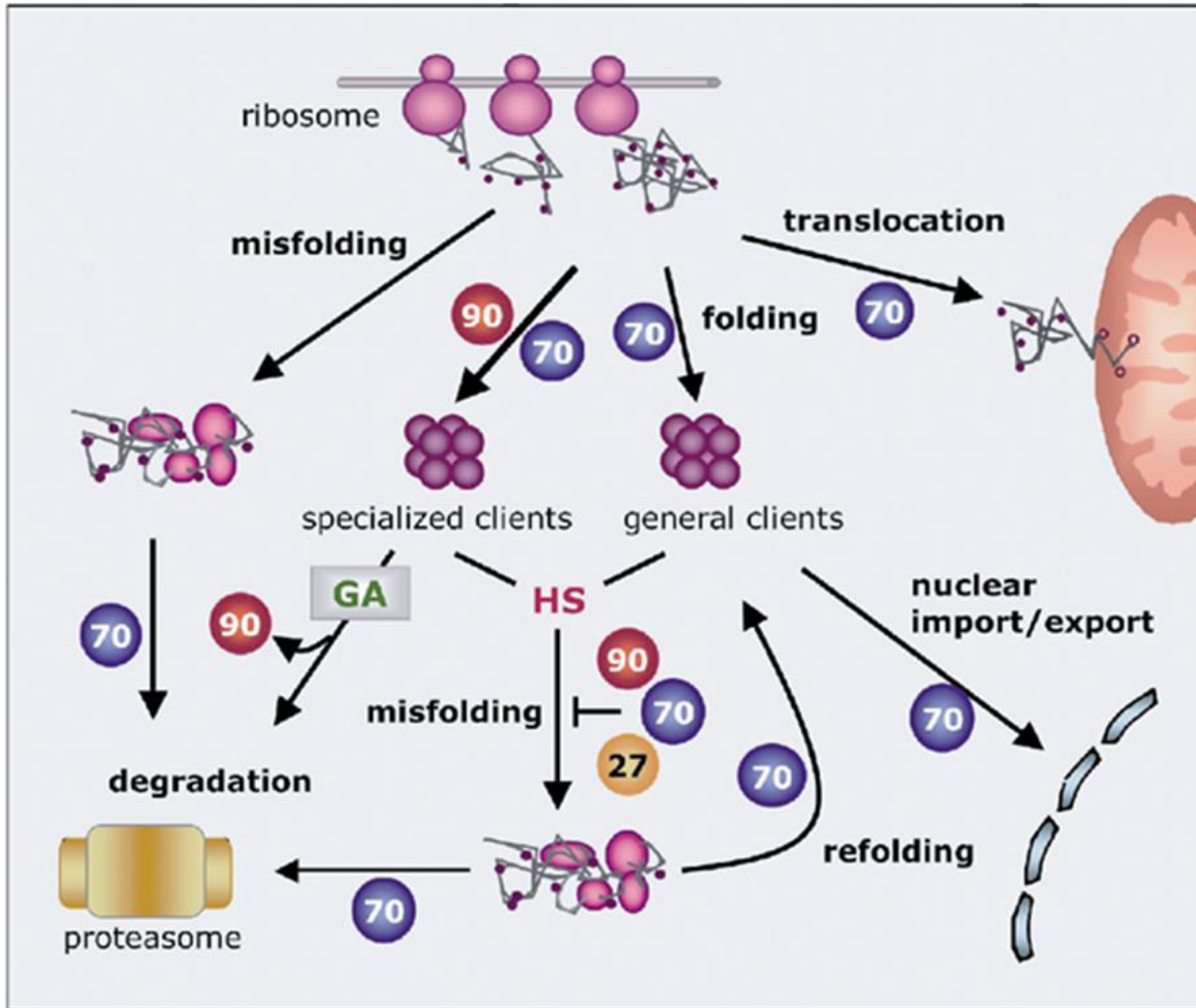


# (C) Repair proteinů – Hsp / chaperony



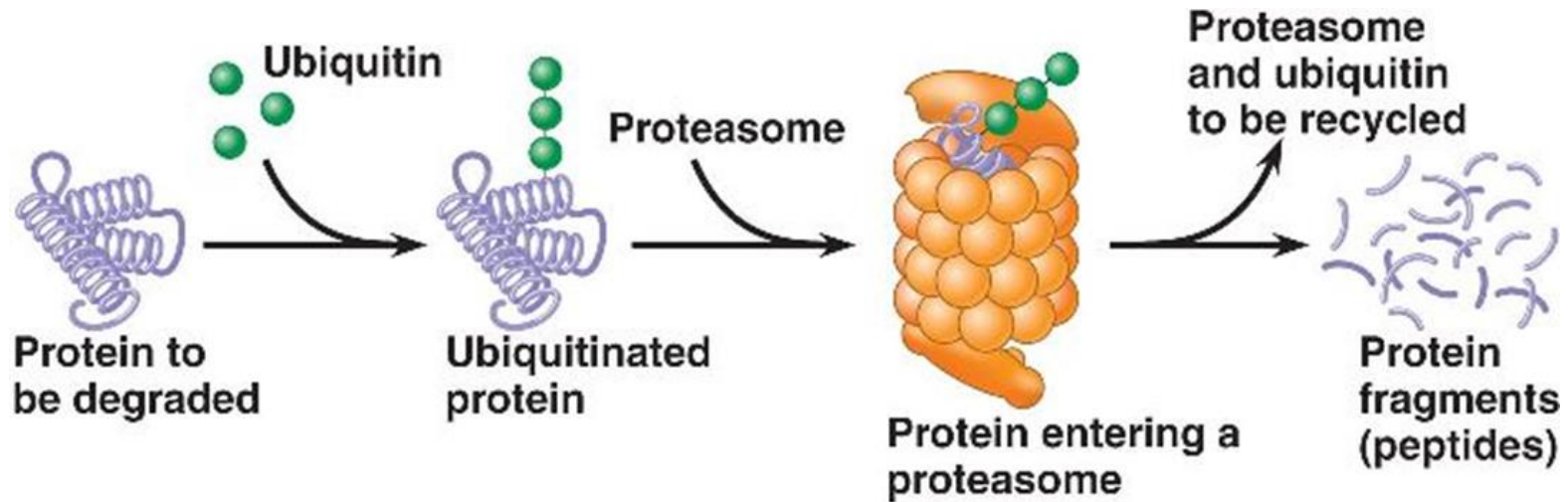


# Princip funkce chaperonů



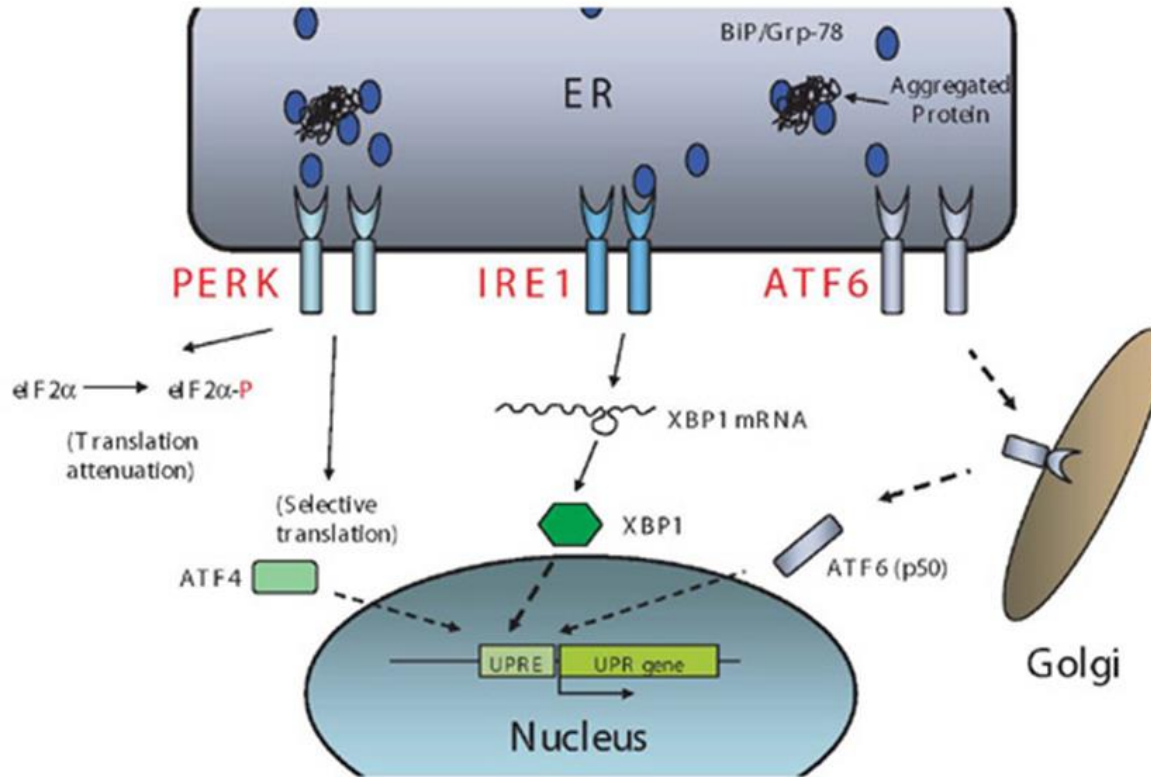
**Chaperone-assisted protein folding.** Hsp70 is required for the productive folding of newly synthesized proteins, their translocation across intracellular membranes (endoplasmic reticulum, mitochondria, lysosomes) and import into and export out of the nucleus. Specialized client proteins are transferred to hsp90 and held in activation-competent states. This includes signaling kinases (Raf-1, Akt, RIP), hormone receptors (glucocorticoid hormone receptor) and transcription factors (HSF1, HIF1). Heat shock (HS) and other protein-damaging stresses cause protein misfolding and aggregation, which can be limited by the heat-shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. These misfolded proteins can be rescued by the refolding activity of Hsp70. Proteins that cannot be productively refolded are targeted to the proteasome for degradation. The Hsp90-binding drug geldanamycin (GA) causes release of client proteins resulting in proteasomal degradation

## (C) Degradace proteinů – celulární i extracelulární



- intracelulární systém
  - ubiquitin/proteasom: označení poškozených proteinů ubiquitinem a jejich degradace v S26 proteasomovém komplexu
  - lyzozomální proteázy („lysosomal storage“ choroby, napr. Niemann-Pick)
- extracelulární proteázy
  - plasmin: fibrinolýza
  - matrix-metaloproteinázy (MMPs): remodelace tkání, angiogeneze, metastazování
- luminální GIT proteázy
  - trávení: žaludek, střevo, pankreas

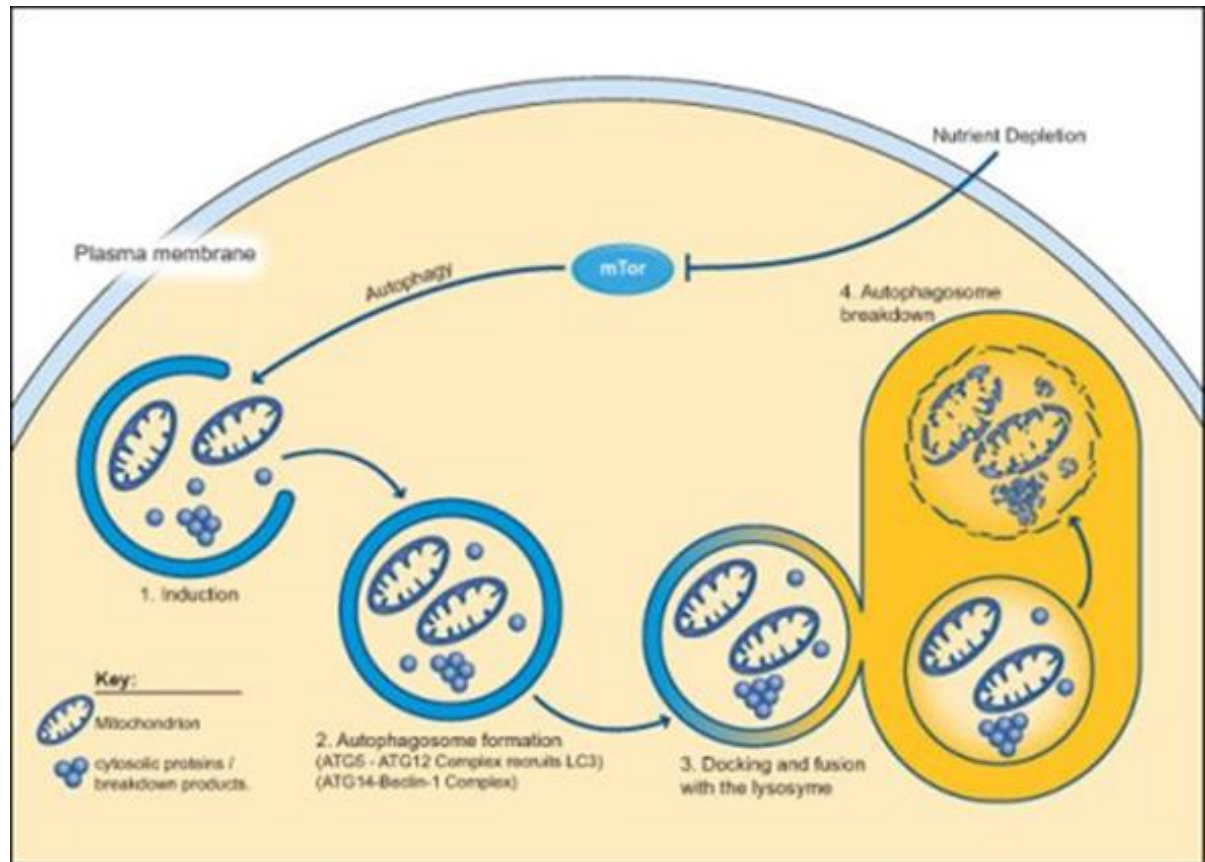
# (D) Unfolded protein response (UPR)



- stres endoplazmatického retikula
  - vysoký požadavek na syntézu proteinů → jejich misfolding → UPR
    - → zpomalení proteosyntézy, oprava (refolding) a přežití
    - příliš velké nároky → selhání → apoptóza
  - např. diabetes typu 2 vedoucí k sekundárnímu selhání  $\beta$ -bb. pankreatu
    - v důsledku inzulínové rezistence stoupají nároky na syntézu inzulínu

# (E) Autofagie - lyzozomální rozklad proteinů

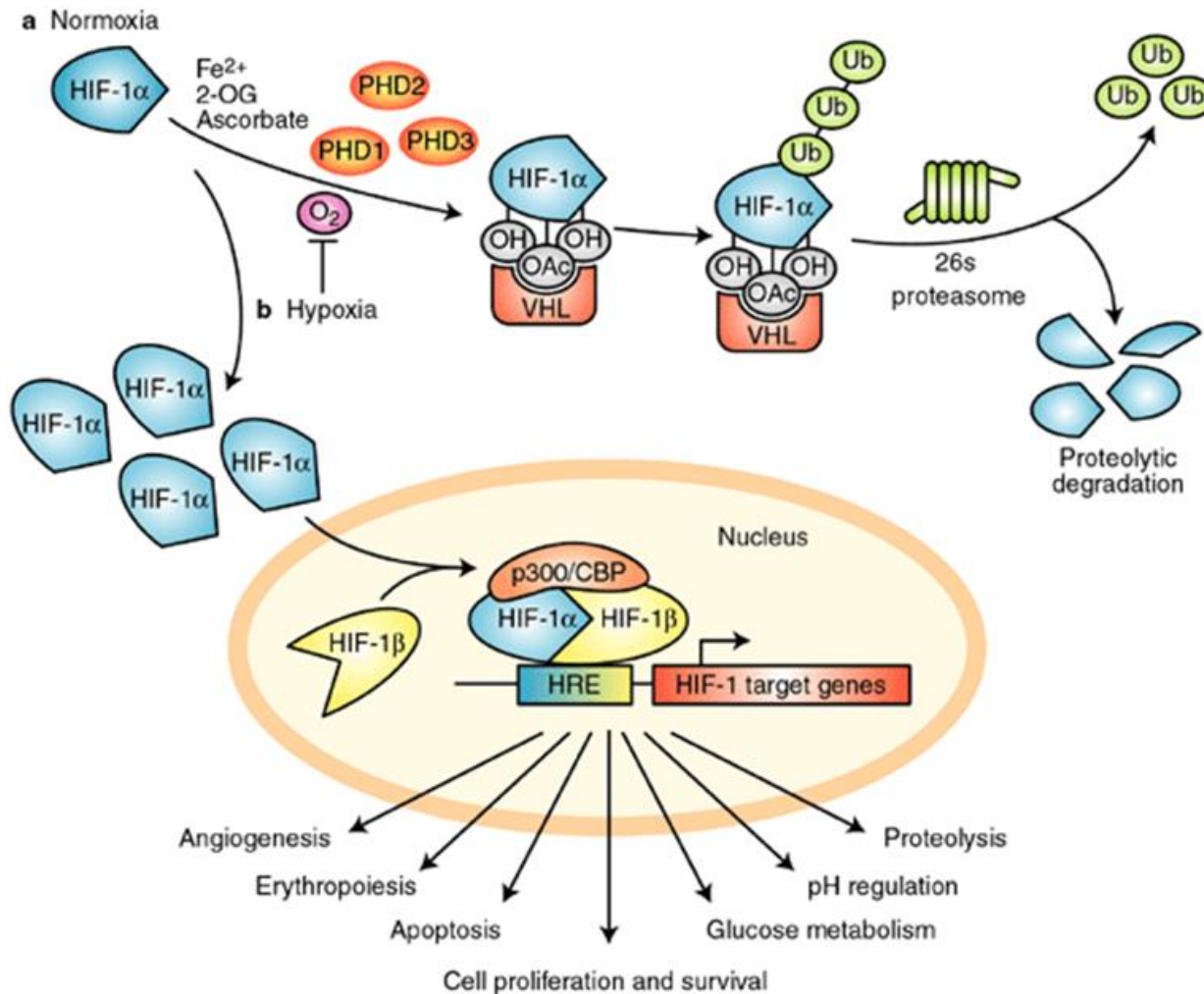
- fyziologicky např. adaptace bb. na hladovění – rozklad vysokomolekulárních nitrobuněčných proteinů a organel a jejich využití pro tvorbu ATP
- patologicky podstata atrofie, význam u nádorů, neurodegenerativních onem. a myopatií
- zásadní je signální dráha **mTor**



# (F) Reakce bb. na hypoxii

- “kyslíkový senzor” buněk = **adaptace**
  - při  $pO_2 < 40 \text{ mmHg}$  (5%)
  - ↑ transkripční faktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor)
    - konstitutivní exprese HIF-1 $\beta$  podjednotky, ale indukovaná exprese HIF-1 $\alpha$  podjednotky
    - po heterodimerizaci se HIF-1 váže na HREs (hypoxia-response elements) cílových genů
  - exprese genů pro
    - enzymy zvyšující intenzitu glykolýzy a produkce ATP anaerobní cestou
    - angiogenní faktory (např. VEGF, angiopoetin-2) – zvýšení vaskularizace tkání
    - erythropoetin – zvýšení počtu erytrocytů
    - při vyšším stupni pro-apoptotické geny
- pokud hypoxie trvá a je kritická vede k **zániku** buněk
  - nekrózou
    - akutně vzniklá kritická hypoxie (porucha Na/K ATPázy) – otok buněk a prasknutí
  - apoptózou
    - subkritická hypoxie – aktivace kaspáz

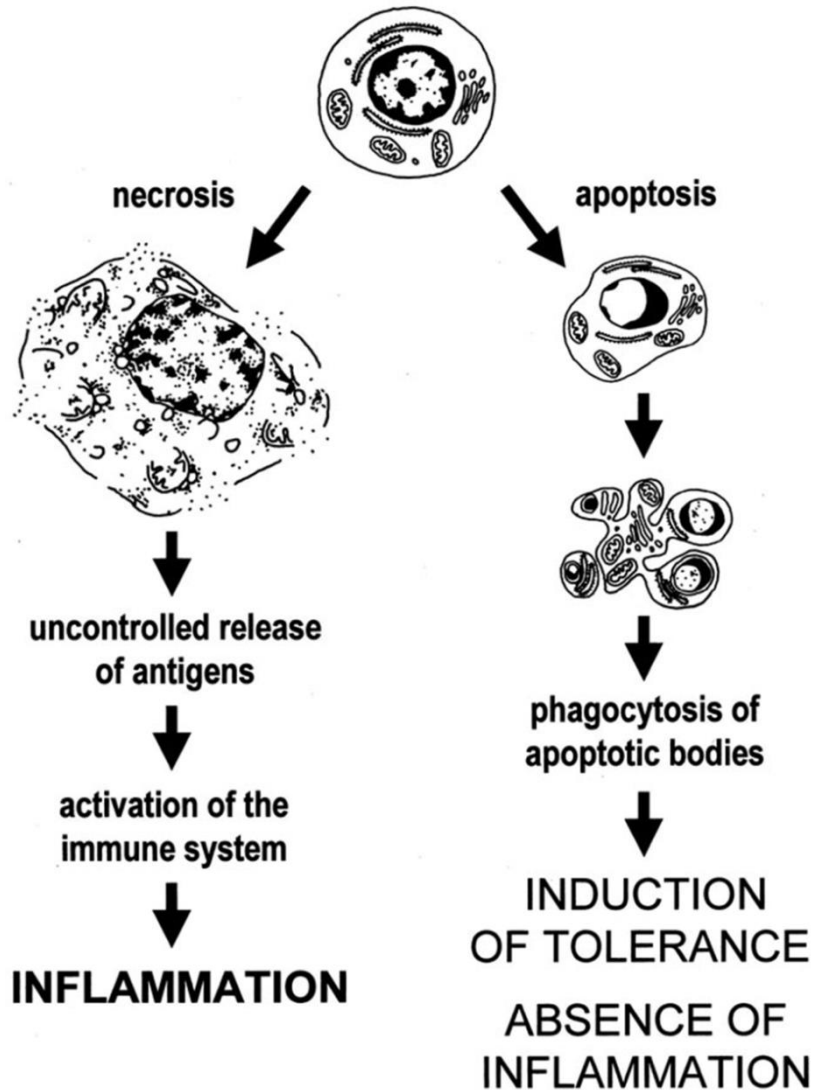
# „Kyslíkový“ senzor buněk



HIF-1 $\alpha$  regulation by proline hydroxylation

**HIF-1 $\alpha$  regulation by proline hydroxylation.** (a) In normoxia, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  is hydroxylated by proline hydroxylases (PHD1, 2 and 3) in the presence of O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, 2-oxoglutarate (2-OG) and ascorbate. Hydroxylated HIF-1 $\alpha$  (OH) is recognised by pVHL (the product of the von Hippel–Lindau tumour suppressor gene), which, together with a multisubunit ubiquitin ligase complex, tags HIF-1 $\alpha$  with polyubiquitin; this allows recognition by the proteasome and subsequent degradation. Acetylation of HIF-1 $\alpha$  (OAc) also promotes pVHL binding. (b) In response to hypoxia, proline hydroxylation is inhibited. VHL is no longer able to bind and target HIF-1 $\alpha$  for proteasomal degradation, which leads to HIF-1 $\alpha$  accumulation and translocation to the nucleus. There, HIF-1 $\alpha$  dimerises with HIF-1 $\beta$ , binds to hypoxia-response elements (HREs) within the promoters of target genes and recruits transcriptional co-activators such as p300/CBP for full transcriptional activity. A range of cell functions are regulated by the target genes, as indicated. Abbreviation: CBP, CREB-binding protein; Ub, ubiquitin.

# Selhání adaptace – buněčná smrt



- základní typy

- nekróza

- pasivní (bez spotřeby ATP, buňka sama o ní nerozhoduje)
- zpravidla zasahuje vícero bb.
- začíná narušením b. membrány
- vede k zánětu (vylití b. obsahu do okolí)
- aktivace často kritickou hypoxií, osmoticky, mechanicky, termicky, ...

- apoptóza

- aktivní = programovaná, spotřeba ATP
- může se omezit pouze na jednu či několik málo bb.
- membrána celistvá do konce
- nevede k zánětu (b. materiál rozložen před zánikem b. a separován v apopt. tělískách)
- aktivace často imunitními mechanizmy, poškozením DNA, subkritickou ischemií

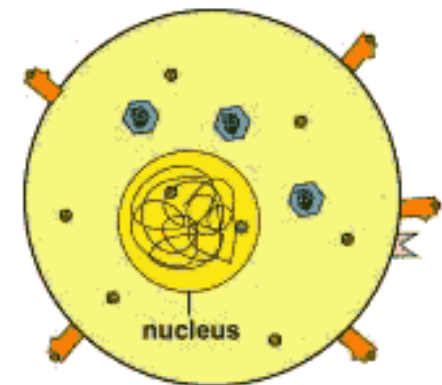
- příklad koexistence obou typů – infarkt myokardu

- absolutně hypoxická zóna → nekróza
- omráčený a hibernující myokard → pokud nerevascularizován rychle apoptóza

# Apoptóza

- forma aktivní (spotřebovává energii), řízené buněčné smrti postihující izolované buňky = „programovaná buněčná smrt,“
- indukce
  - **vnější cesta (receptorová dráha)**
    - DEATH receptory (FAS, TNFR) a jejich ligandy (Fas ligand, TNF $\alpha$ , LTA, TRAIL) = DISC (death-inducing signalling complex)
    - Tc lymfocyty a NKbb (granzyme)
    - absence růstových stimulů
  - **vnitřní cesta (nereceptorová) - zásadní úlohu mají mitochondrie**
    - ROS, hypertermie, poškození DNA, hypoxie, hladovění, ...
    - permeabilizace mitoch. membrány (Bax, ...), uvolnění cytochromu c a Ca
    - v cytoplazmě tvorba apoptozomu - cytochrom c + Apaf + ionty Ca a aktivace “horních” kaspáz (pro-caspase 9)
- obě cesty konvergují na úrovni kaspázy 3, na regulaci obou drah se podílí členové rodiny Bcl
  - anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-X, ...)
  - pro-apoptotické (Bax, Bak, Bad, ...)
- realizace apoptózy
  - kaspázy (cysteinové aspartázy)
    - horní kaspázy (receptorová cesta k-8, nereceptorová k-9)
    - dolní kaspázy (-3, -6, -7)
    - substráty: cytoskelet, membránové proteiny
  - endonukleázy
    - fragmentace DNA
- morfologie apoptózy: zakulacení buňky, → budding → apoptotická tělísk

## APOPTOSIS

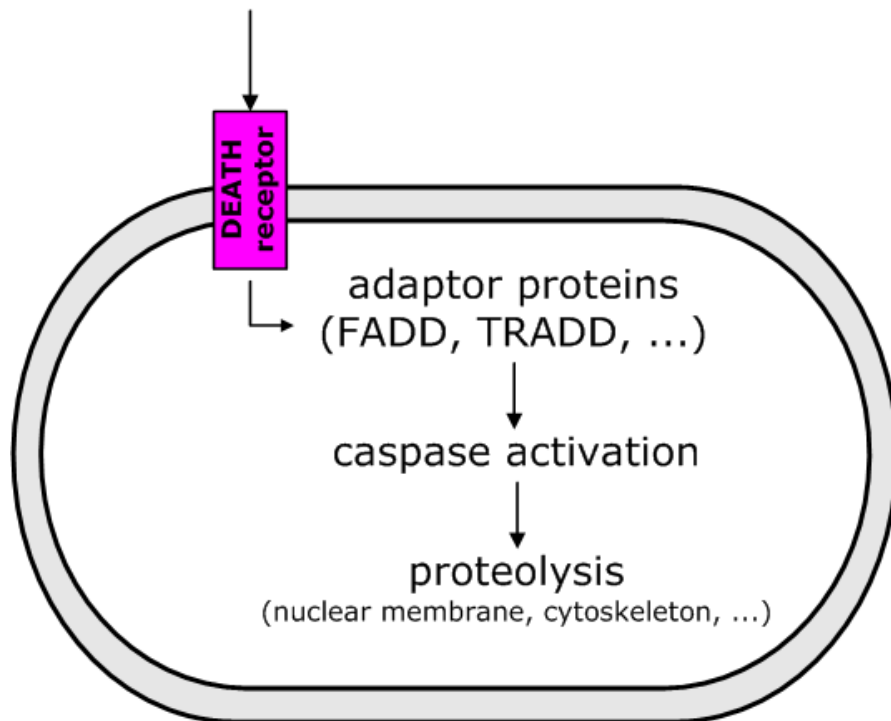




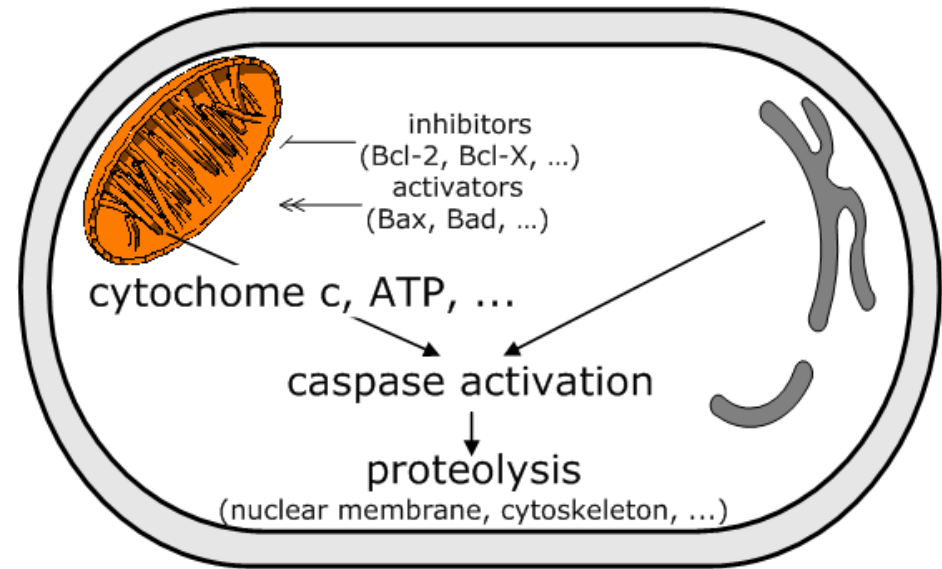
# Dráhy aktivace apoptózy

## EXTRINSIC PATHWAY

ligands: TNF- $\alpha$ , LTA, TRAIL, Fas-L



## INTRINSIC PATHWAY - mitochondria-related ER-related



# Tvorba apoptozomu a konvergence drah

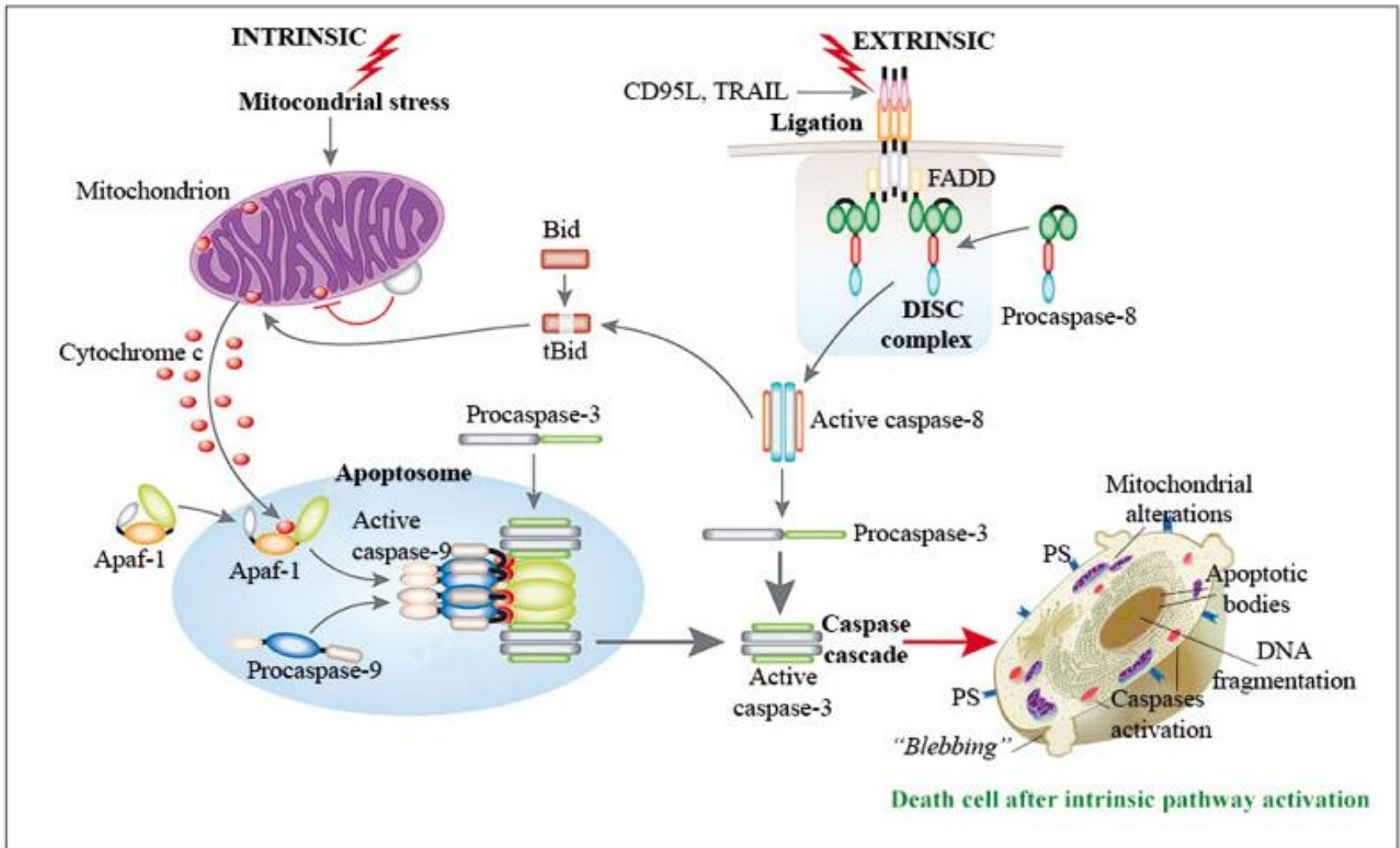
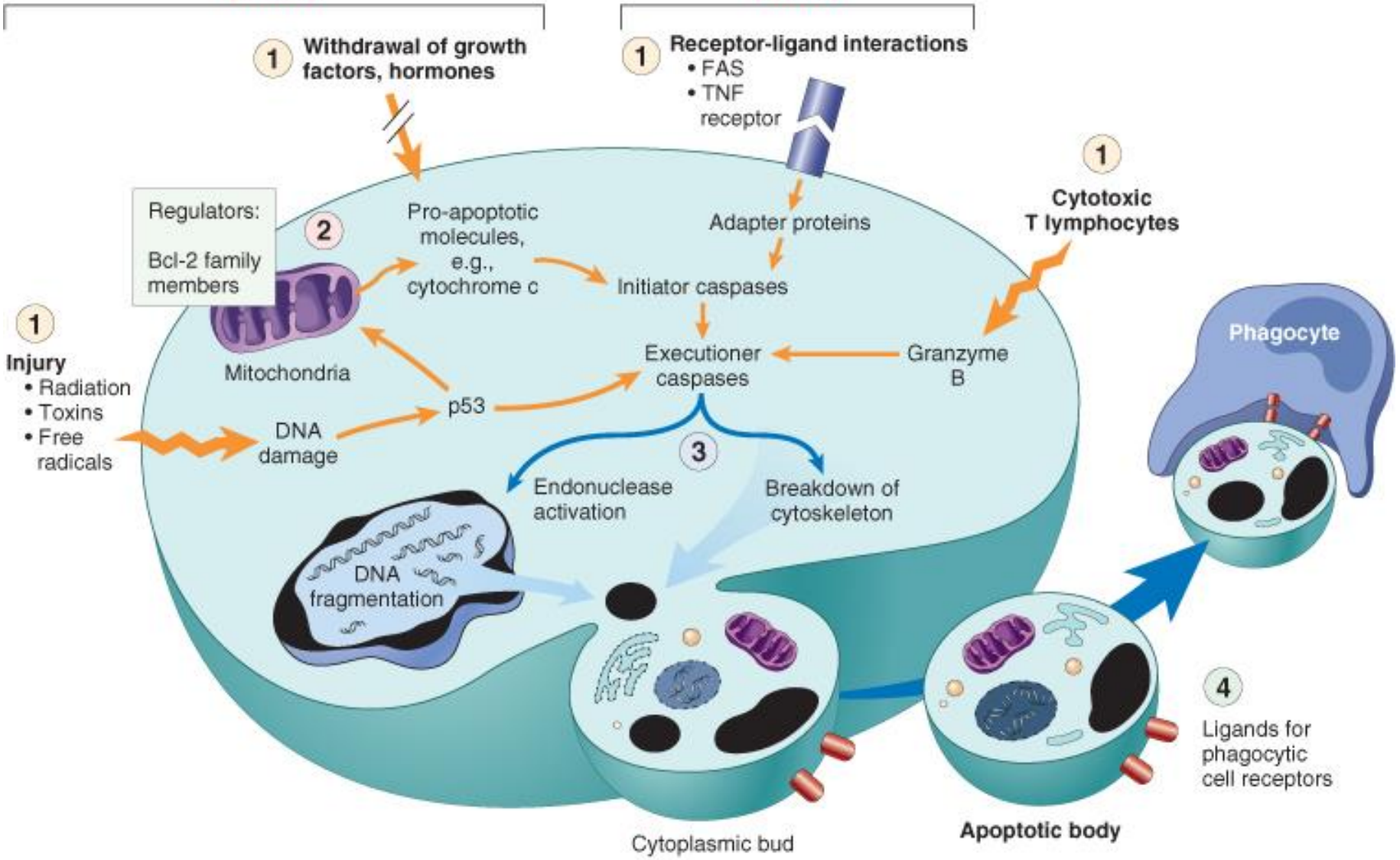


Fig. 3. *Apoptotic pathways*: the extrinsic pathway involves so-called death receptors (CD95, TRAIL); the intrinsic one involves mitochondrial granules. Both pathways converge at caspase-3 activation, where classic biochemical and morphological changes in association with the apoptotic phenotype are originated.

**Intrinsic (mitochondrial) pathway**

**Extrinsic (death receptor-initiated) pathway**



# Obnova a remodelace tkání

- reakce na poškození a přirozenou ztrátu bb.

- **regenerace**

- regenerativní potenciál tkání
  - labilní tkáně
    - » vysoký obrát bb.
    - » skvamozní, glandulární a GIT epitelie, kostní dřeň
  - stabilní tkáně
    - » nízká proliferační aktivita, ale zvyšuje se při poškození
    - » hepatocyty, tubulární epitelie ledvin, fibroblasty, osteoblasty, endotel, glie

- **reparace** (reakce na poškození, ne sebeobnova)

- permanentní tkáně (terminálně diferencované)
  - » nedělí se = nemohou regenerovat
  - » hojí se za tvorby jizvy
  - » neurony, svalové bb.

- patologická změna

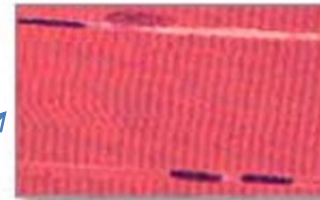
- velikosti buněk = **hypertrofie**
- počtu buněk = **hyperplazie**
- **metaplazie** = náhrada jiným typem
- **dysplazie** = kvalitativní změny



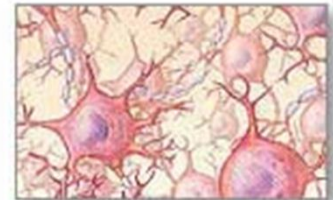
Connective tissue



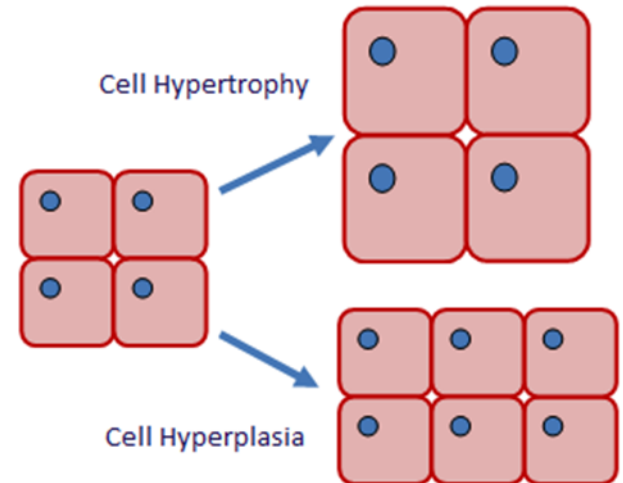
Epithelial tissue



Muscle tissue

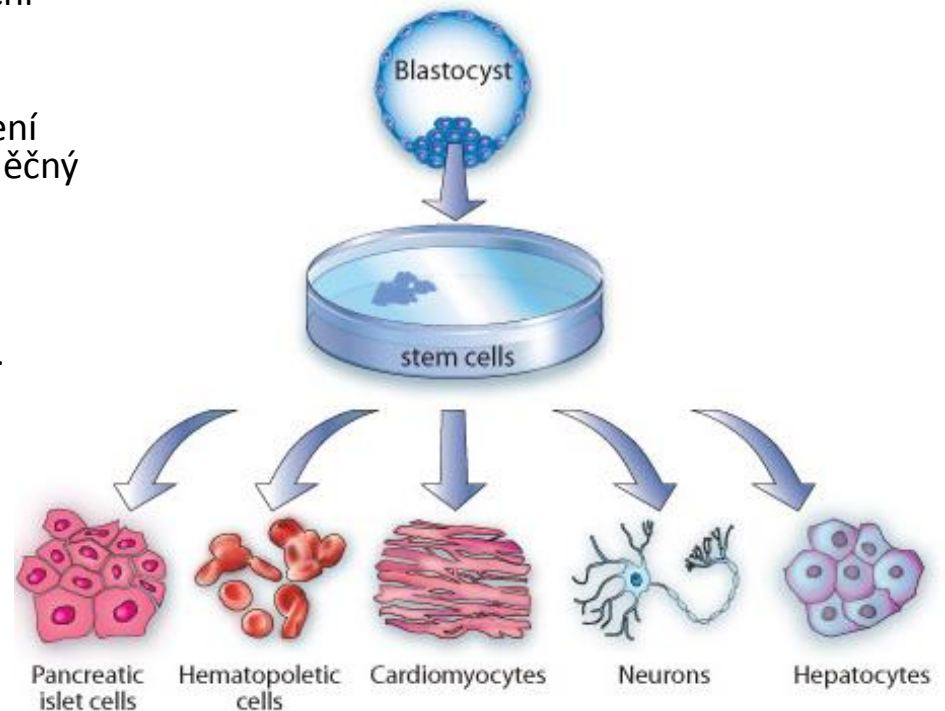
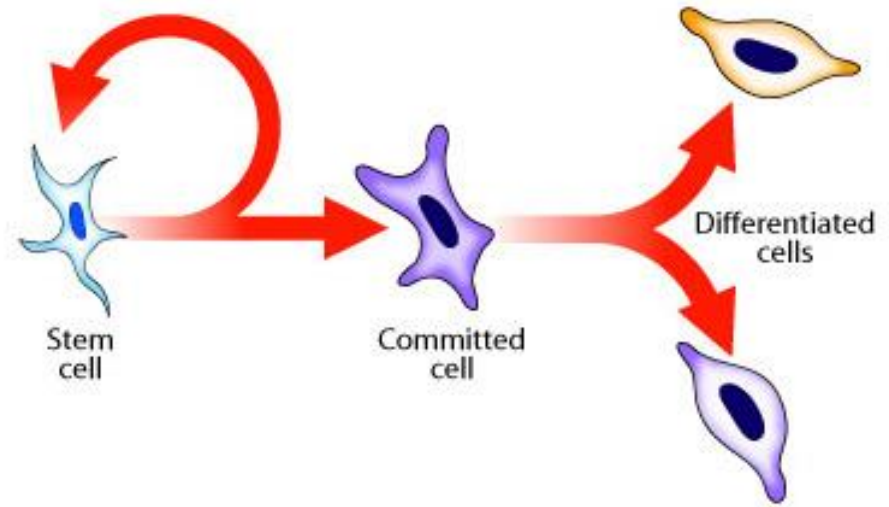


Nervous tissue



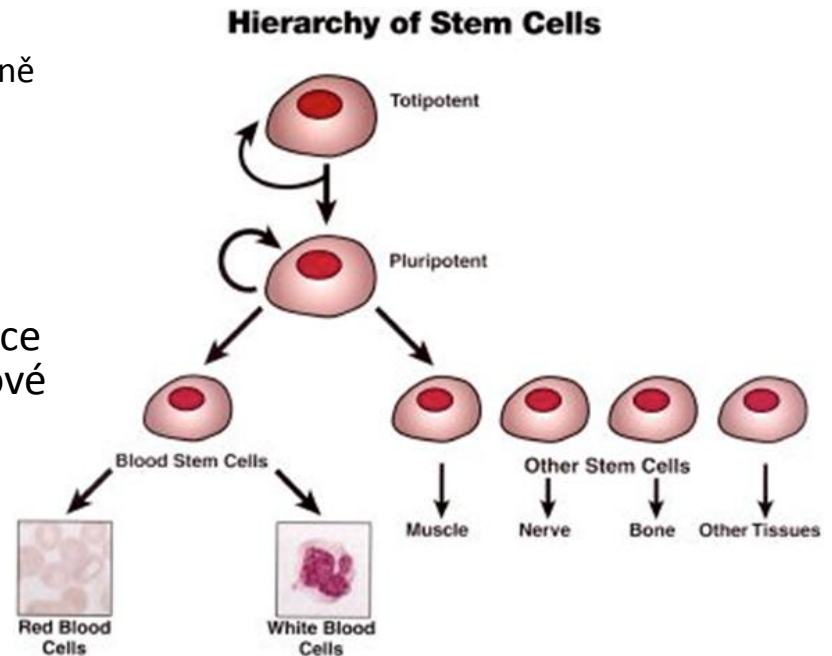
# Kmenové buňky

- základními vlastnostmi KB jsou
  - schopnost sebeobnovy
    - tj. dělení bez diferenciacce (asymetrické)
  - produkce specializovaných bb. (regenerace tkání)
- typy KB
  - časné KB (toti-/omnipotentní)
    - embryonální (blastocysta, pre-implantační stadium)
    - dávají vznik všem typům buněk těla
    - jako jediné nepotřebují ke stimulaci dělení růstové faktory, u všech ostatních je buněčný cyklus startován mitogeny
  - zralé KB (adultní, somatické)
    - pluripotentní
      - dávají vznik omezenému repertoáru bb.
        - » např. hematopoetické KB, mesenchymální KB, ...
        - » CAVE progenitorové bb.
    - monopotentní
      - dávají vznik jednomu typu bb.
        - » např. KB bazální vrstvy kůže

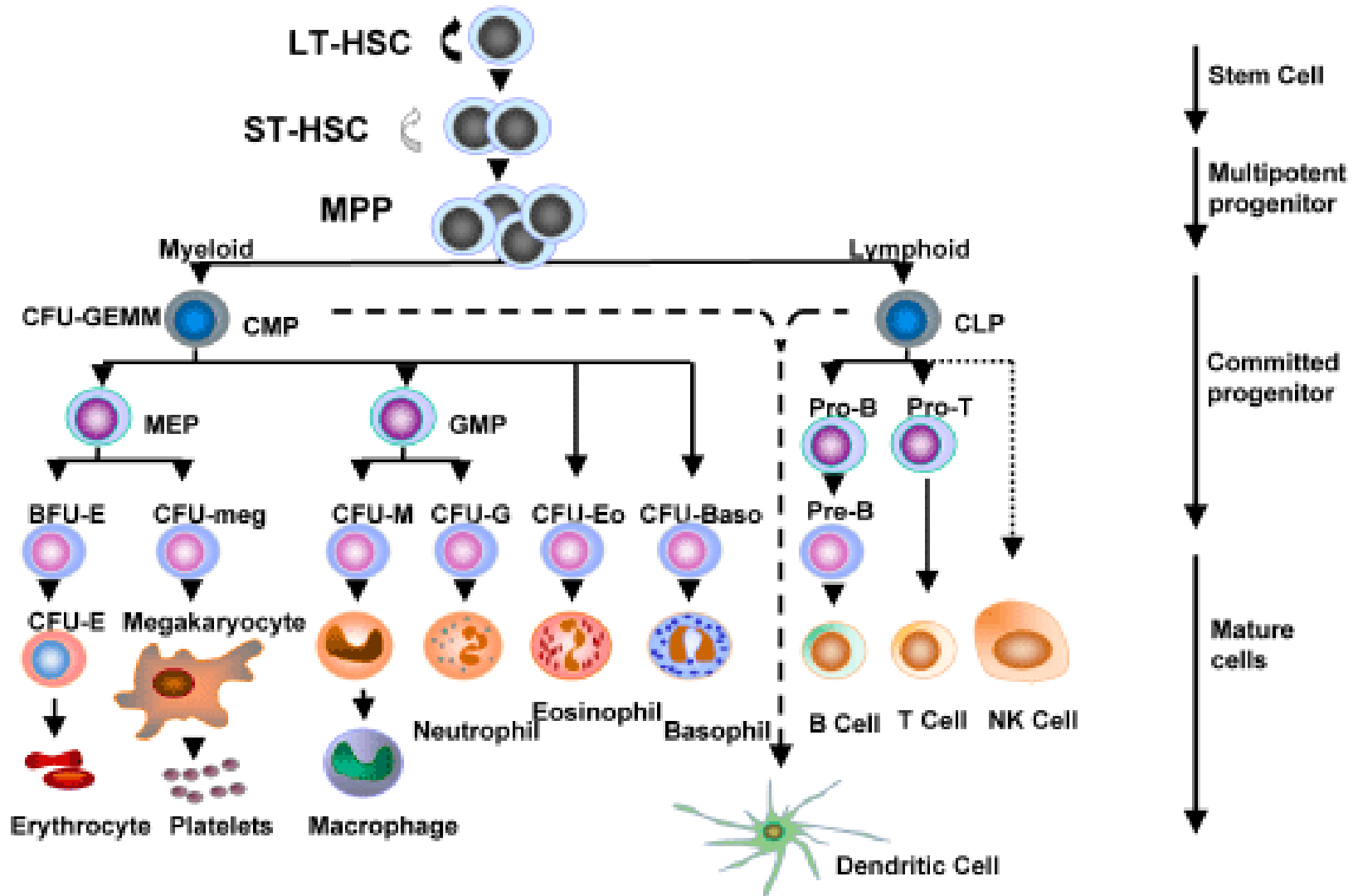


# Adultní (somatické) KB

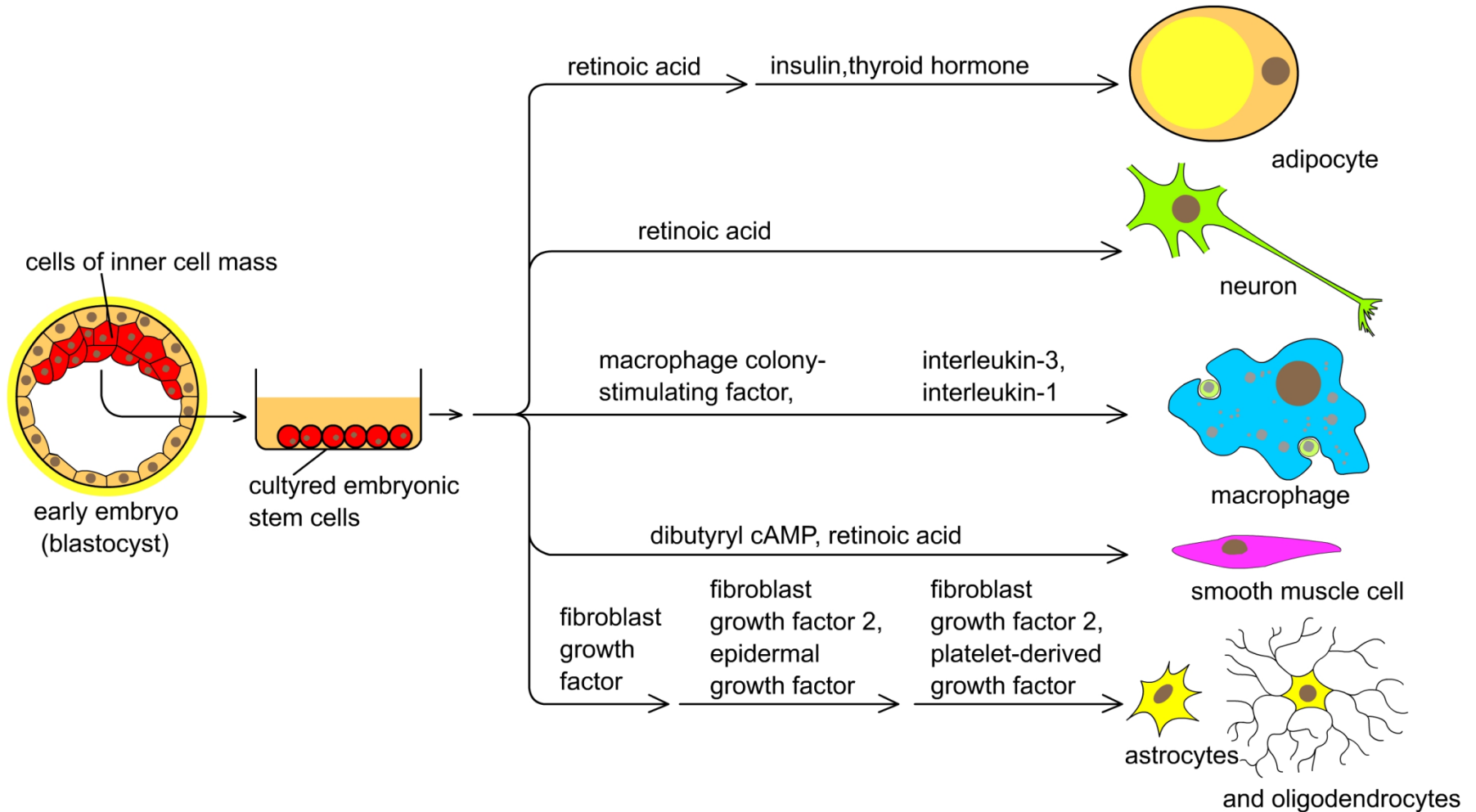
- lokalizovány ve většině tkání jako zdroj bb. pro neustálou obnovu, nahrazování a hojení tkáně
- pluripotentní, tzn. dávají vznik několika typům bb. specifické tkáně ale ne ostatních tkání resp. jakýmkoliv
  - tuto schopnost mají pouze embryonální KB, nicméně jakási univerzalita existuje ale je omezená
- funkčně identická obnova = **regenerate**
  - rychlá - epidermis, střevní epitel, krevní elementy, endometrium, ...
  - pomalá – hepatocyty, epitely ledvinných tubulů, ...
- jestliže nejsou KB přítomny, pak není regenerace možná a poškozená tkáň se hojí pomocí vazivové tkáně resp. glie = **reparace**
  - kardiomyocyty po infarktu
  - svalové bb. po laparotomii
  - neurony po mozkové mrtvici
- příklady adultních KB
  - pluripotentní hematopoietická
    - všechny typy krevních elementů
  - stromální (mesenchymální)
    - obnova kosti (osteoblasty), chrupavky, adipocyty, ...
  - další (mamární, intestinální, ...)



# Příklad somatické pluripotentní KB - hematopoéza



# Diferenciace KB





I DIED WAITING FOR  
EMBRYONIC STEM CELL  
RESEARCH TO FIND A CURE.  
WHAT ABOUT YOU?

I WAS THE  
EMBRYO

GARY BASEMAN  
THE INDIVIDUALS STAR  
©2004 CREATORS AND.

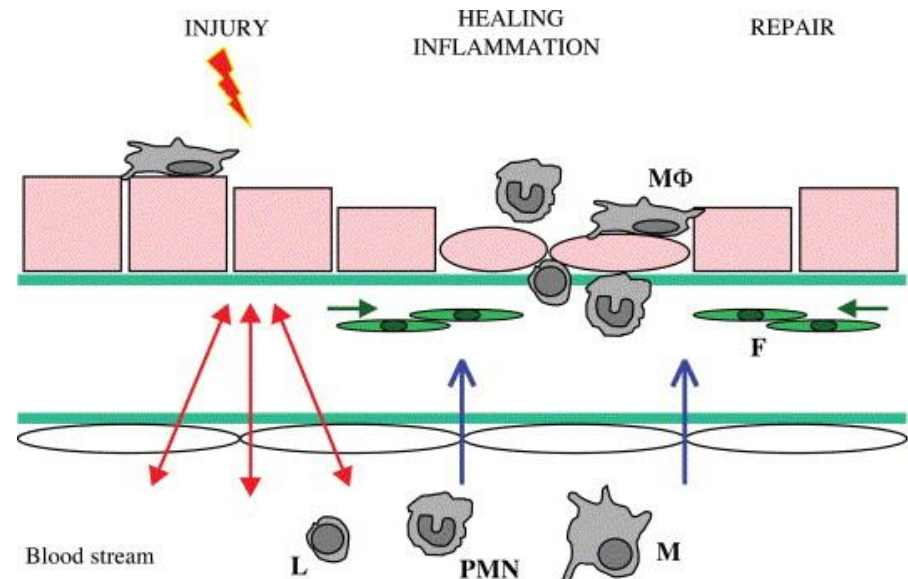
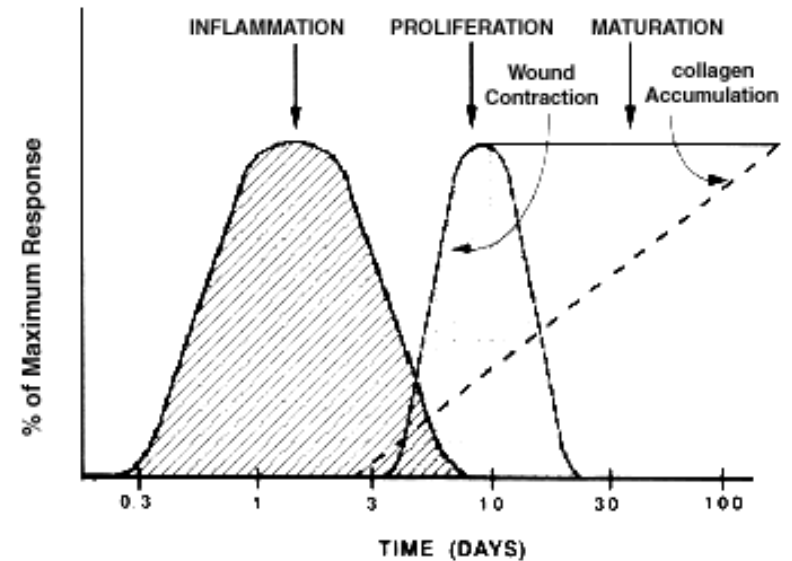


# Poškození tkání (bez ohledu na příčinu)

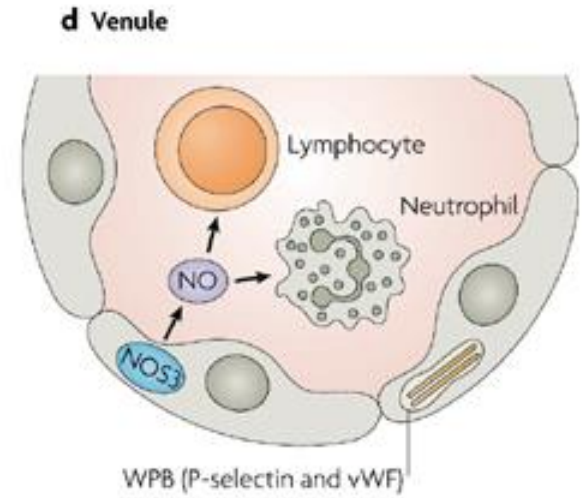
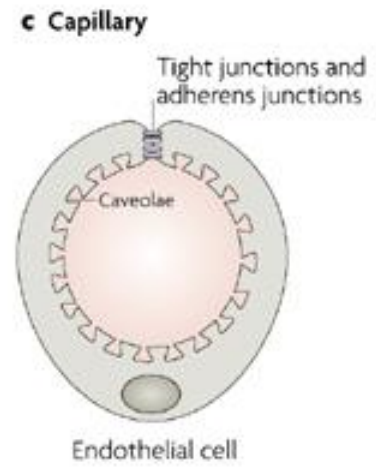
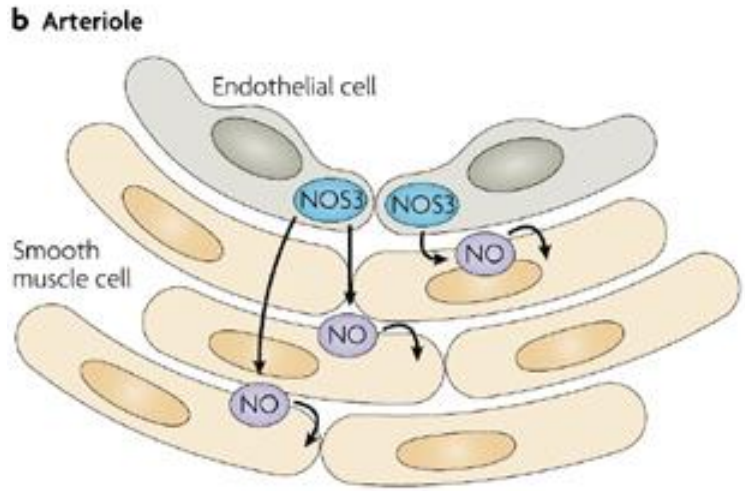
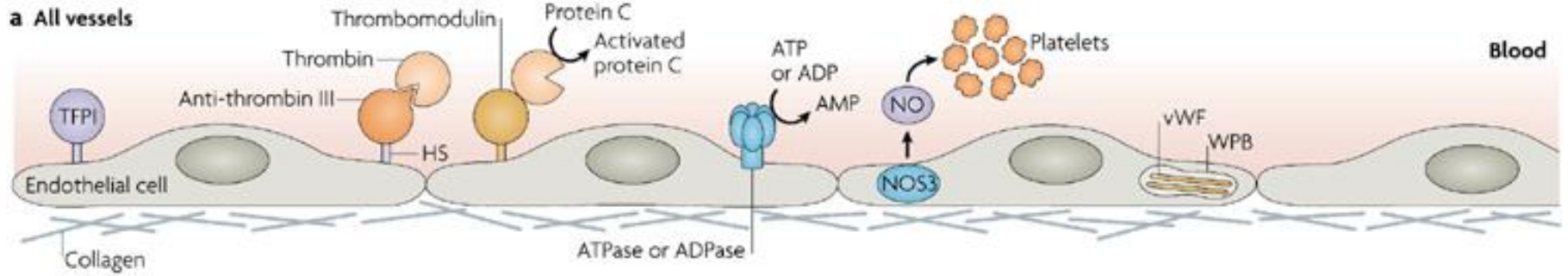
- z hlediska rozsahu
  - ojedinělé poškození několika bb. (apoptóza nebo nekróza)
  - masivní (apoptóza nebo nekróza)
- z hlediska průběhu
  - akutní
    - např. ak. hepatotoxicita, kritická ischemie (infarkt), lýza komplementem,
  - chronické
    - např. imunologicky (b. autoimunita), hypoxicky, mechanicky, ...
- průběh procesu hojení a o jeho výsledku rozhoduje
  - typ tkáně (proliferující vs. neproliferující)
  - způsob poškození (apoptóza vs. nekróza)
  - rozsah zánětové reakce (výraznější proteolytická destrukce)
  - (ne)zachování stromatu tkáně (např. retikulinová kostra jater. parenchymu, stroma kostní dřeně, bazální membrána epitelů, ...)
  - individuální okolnosti daného jedince (komorbidity, stav nutrice, event. imunideficit, kr. zásobení tkáně a inervace aj.)

# Odpořed' tkání na poškození – hojení (ran)

- hojení je sekvenční proces směřující k obnovení celistvosti tkáně, jejich tenzních vlastností a funkce (pokud možno)
- stadia
  - (1) **hemostáza**
    - primární a sekundární hemostáza
    - téměř paralelně fibrinolýza
  - (2) **akutní záněť**
    - s cílem eliminovat příp. invadující mikroorganismy
    - a samozřejmě odstranit poškozenu a nekrotickou tkáň a buněčné debris
  - (3) následovaný **proliferací**
    - (a) restitucí ad integrum (= **regenerace**)
    - (b) hojením **reparací**
      - epithelizace, fibroplazie, angiogeneze
      - **maturace** jizvy
  - příp. nepříznivý průběh může vést k chronickému zánětu



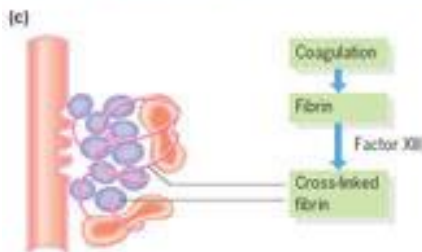
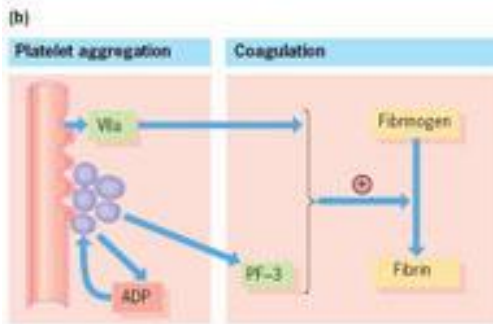
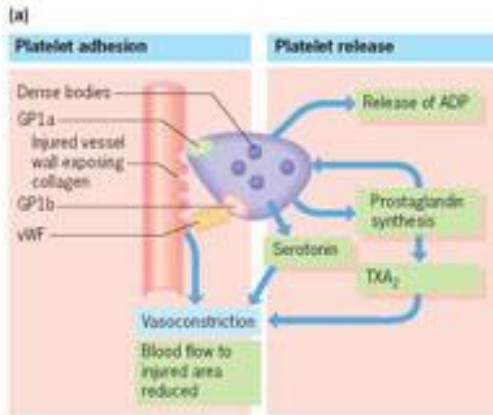
# Endotel



# Endothelium: physiological role

- endothelial cells (ECs) normally inhibit coagulation of the blood
- tissue factor pathway inhibitors (TFPIs) prevent the initiation of coagulation by blocking the actions of the factor-VIIa–tissue-factor complex
- anti-coagulant heparan sulphate proteoglycans (HS) bind anti-thrombin III to be capable of inhibiting any thrombin molecules generated by the coagulation cascade
- thrombomodulin binds thrombin and converts its substrate specificity from cleavage of fibrinogen (the key step in forming a blood clot) to cleavage and activation of protein C
  - activated protein C is an enzyme that destroys certain clotting factors and inhibits coagulation
- key processes to prevent platelet activation (and therefore coagulation) include inactivation of thrombin, conversion of ATP to inert AMP through the action of ATPases and ADPases, and blocking the physical interaction between platelets and collagen, which can activate platelets
- sequestration of von Willebrand factor (vWF), a protein that strengthens the interaction of platelets with the basement membrane, by keeping it within their storage granules, known as Weibel–Palade bodies (WPB)
- nitric oxide (NO), generated by nitric-oxide synthase further inhibits platelet activation
- arterial endothelial cells have a major role in regulating blood flow by controlling the tone of smooth muscle cells in the medial layer of the vessel wall
- capillary endothelial cells are the principal regulators of transendothelial extravasation of plasma proteins (tight junctions and adherens junctions)
- venular endothelial cells form the principal site of leukocyte trafficking from the blood into the tissues

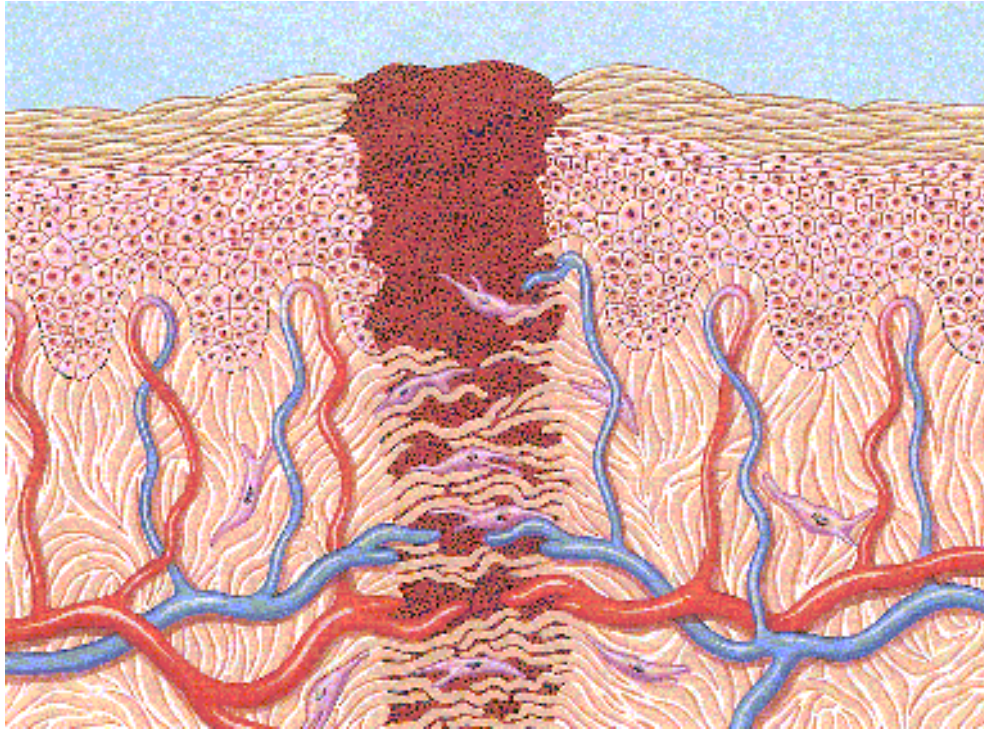
# (1) Haemostasis: platelet plug formation & vasoconstriction



- protection against excessive bleeding = aggregation of platelets results in the formation of the **primary platelet plug**
- endothelial cells retract to expose the subendothelial collagen surfaces
- platelets attach to these surfaces
- aggregation and attachment to exposed collagen surfaces activates the platelets
- activation enables platelets to degranulate and release chemotactic and **growth factors**, such as platelet-derived growth factor (PDGF), proteases, and vasoactive agents (eg. serotonin, histamine)
- adherence to exposed collagen surfaces and to other platelets occurs through adhesive glycoproteins: fibrinogen, fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor



# Krevní sraženina (koagulum)

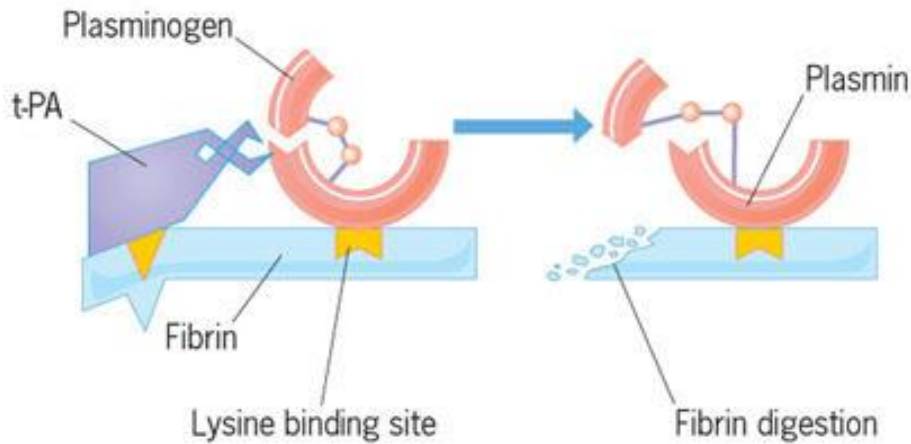


- **fibrin je nezbytnou součástí hojení rány a je základní komponentou primitivní matrix** v ráně, ve které jsou imobilizovány kr. destičky (jako zdroj růstových faktorů) a do které imigrují zánětové bb. a plazmatické proteiny
  - odstranění koagula nebo neschopnost jeho tvorby (poruchy kr. srážení vedoucí k hypokoagulaci) zhoršují hojení rány

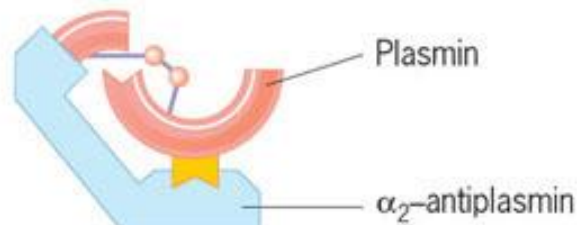


# (1) Haemostasis vs. fibrinolysis

(a) Conversion of plasminogen to plasmin



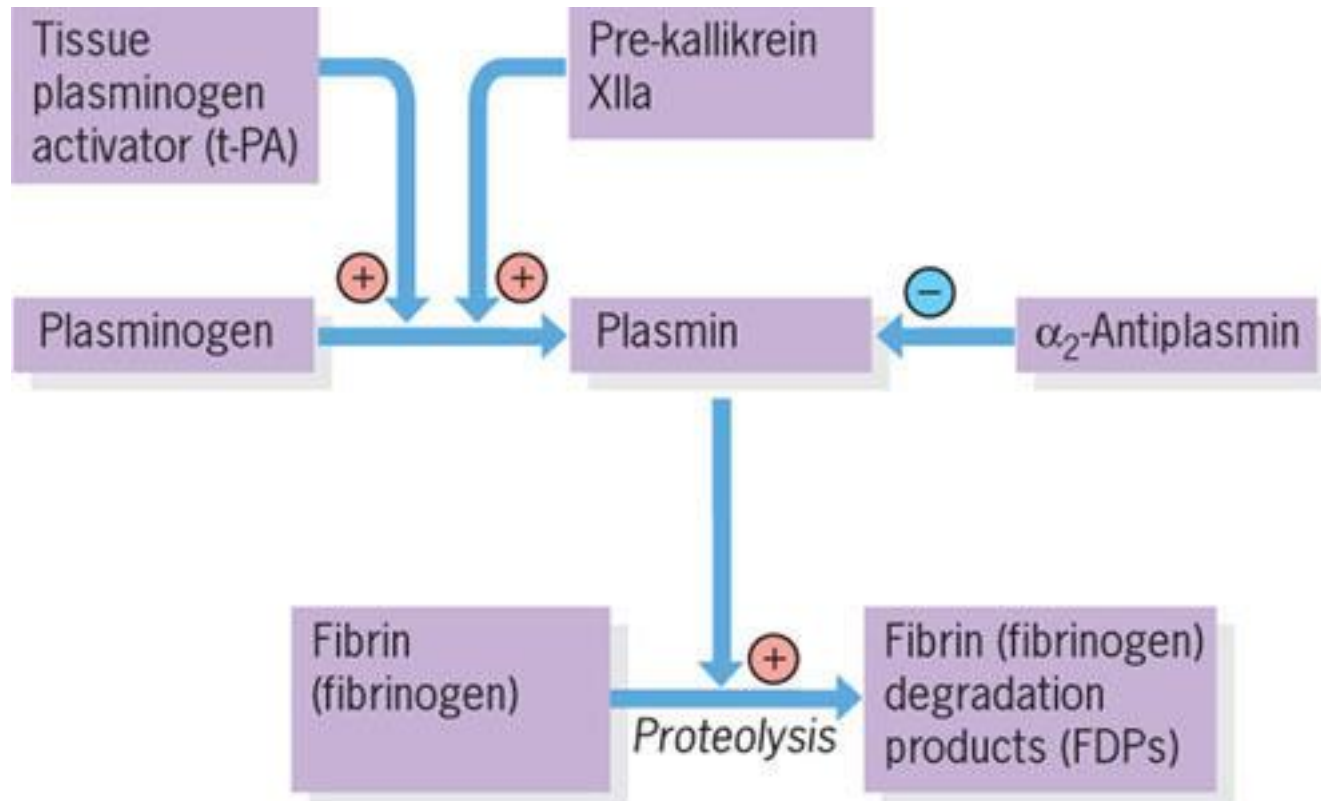
(b) Plasmin  $\alpha_2$ -antiplasmin complex



© Elsevier Science Ltd

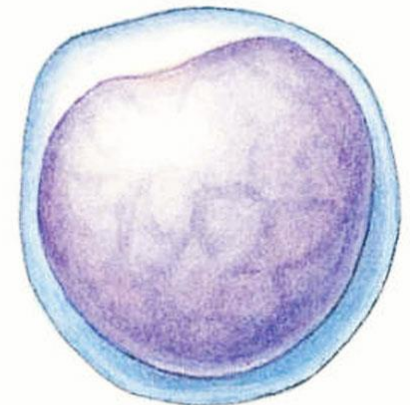
- clot formation dissipates as its stimuli dissipate
  - clot formation is limited to the site of injury because uninjured nearby endothelial cells produce prostacyclin, an inhibitor of platelet aggregation
- extent of coagulation is regulated by the action of:
  - fibrinolytic system
    - plasminogen is converted to plasmin, a potent enzyme dissolving blood clot
  - anticoagulant system
    - in the uninjured areas, antithrombin III binds vitamin K-dependent coagulation factors
    - protein C binds factors of the coagulation cascade, namely, factors V and VII

# Fibrinolýza

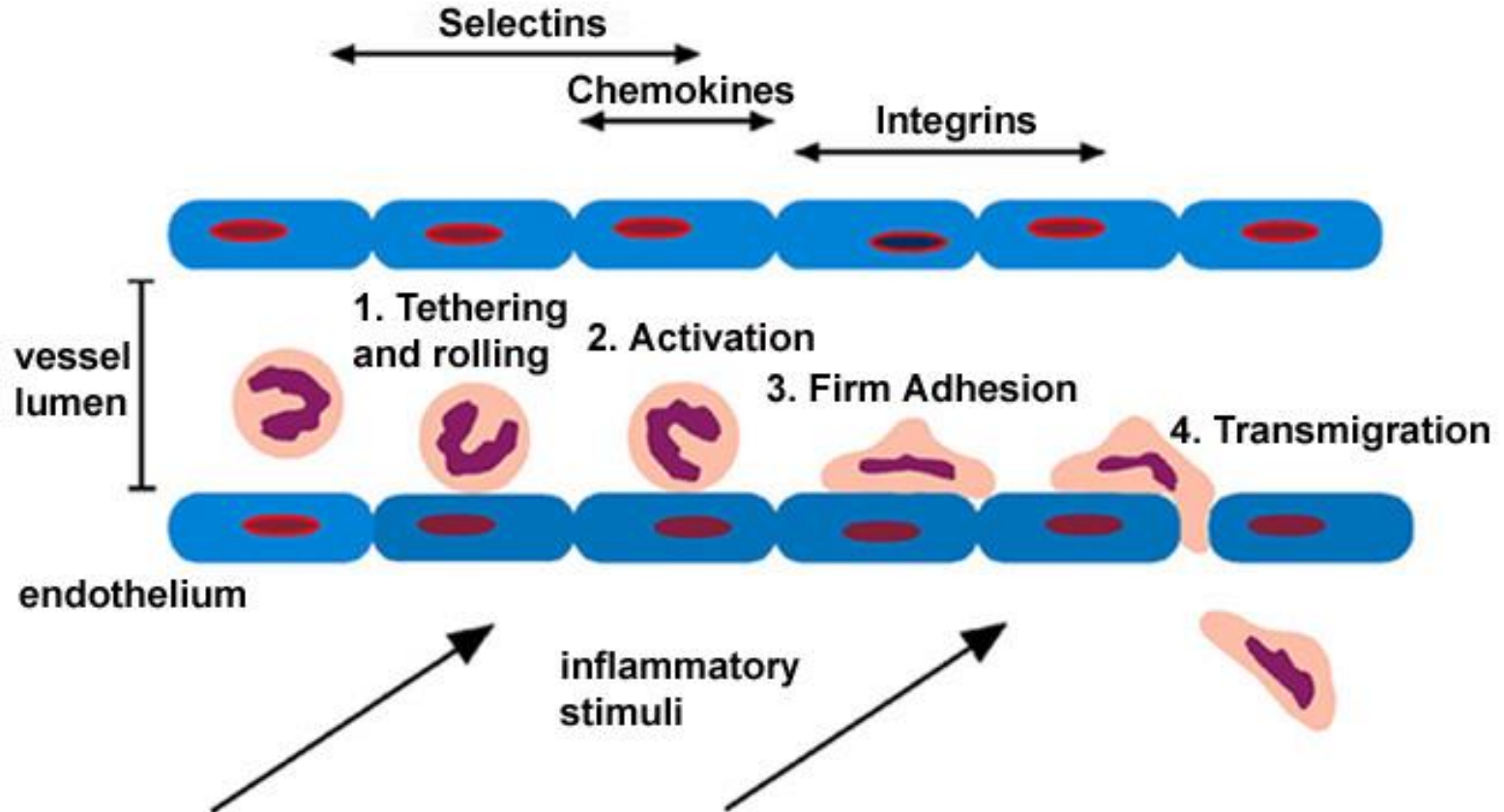


## (2) Akutní zánět (1. – 2. den)

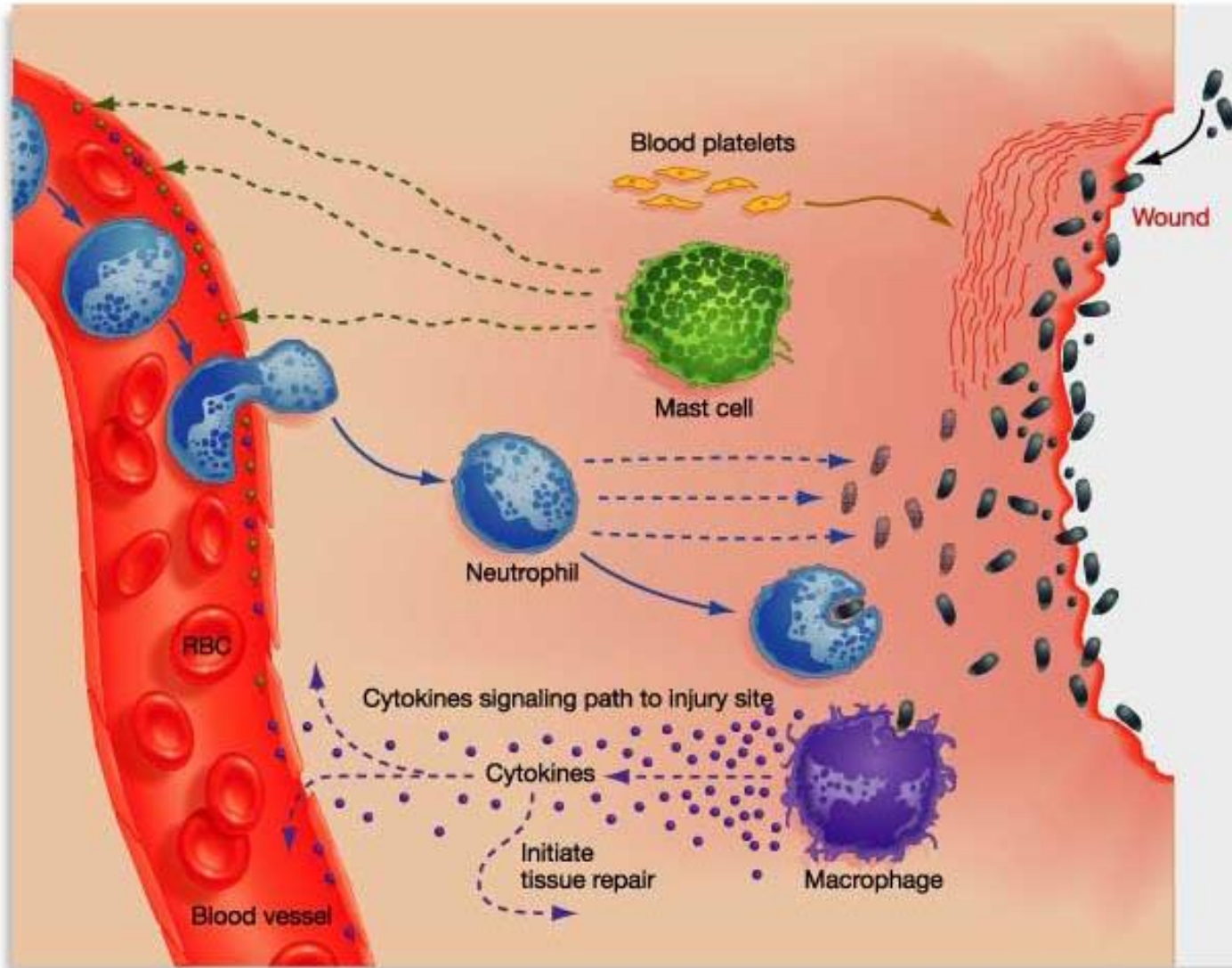
- initial response to tissue damage
- relatively non-specific
  - excess of immune system to the damaged area
    - change of endothelial permeability (exudate)
    - adhesion and extravasation of immune cells
      - selectins, adhesive molecules (VCAM, ICAM, ...)
    - chemotaxis
  - elimination of dead tissue
    - proteolysis (lysozomal enzymes), phagocytosis, ROS
  - protection against infection
    - initially **PMNs (phagocytosis)** – dye in site (= pus)
    - later **monocytes/macrophages** (phagocytosis, cytokines, initiation of tissue repair)
      - cytokines – completion of inflammation
      - growth factors – tissue repair
  - specific immune system (**lymphocytes**) not always necessary
    - viral infections
    - chronic inflammation



# Aktivovaný endotel vs. zánětlivé bb.



# (2) Acute inflammation



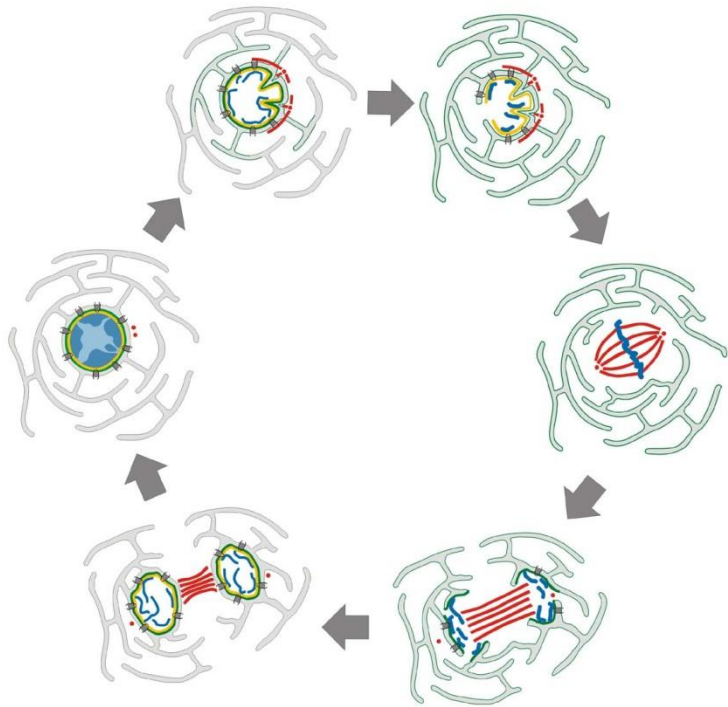
1. Bacteria and other pathogens enter wound.
2. Platelets from blood release blood-clotting proteins at wound site.
3. Mast cells secrete factors that mediate vasodilation and vascular constriction. Delivery of blood, plasma, and cells to injured area increases.
4. Neutrophils secrete factors that kill and degrade pathogens.
5. Neutrophils and macrophages remove pathogens by phagocytosis.
6. Macrophages secrete hormones called cytokines that attract immune system cells to the site and activate cells involved in tissue repair.
7. Inflammatory response continues until the foreign material is eliminated and the wound is repaired.

## (3a) Restituce ad integrum (= regenerace)

- nejlepší možný výsledek = restorace normální struktury a funkce bez tvorby jizvy
  - přirozený zájem regenerativní medicíny
- nastává při minimálním zasažení stromatu tkáně když dominuje zejm. defekt epitelu
- faktory favorizující regeneraci
  - typ tkáně
    - tj. labilní a stabilní
  - rychlá eliminace vyvolávající příčiny
    - vč. infekce
  - rychlé odstranění debris
  - dobrá perfúze a inervace tkáně

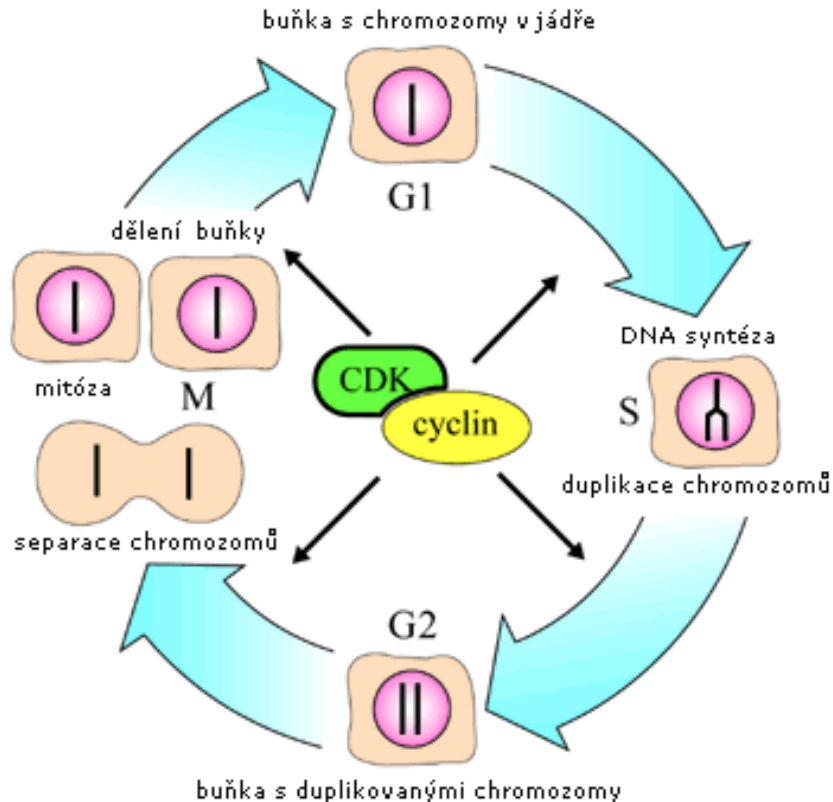


# Hojení = dělení bb. = buněčný cyklus



- buněčný cyklus (4 fáze)
  - cyklická souhra reakcí zajišťujících růst buňky (G1- a G2 - fáze), DNA replikaci (S-fáze) a mitózu (M-fáze)
- b. cyklus probíhá při
  - bezchybném provedení jednotlivých kroků
    - správnost reakcí je kontrolována ve 3 kontrolních bodech
      - v G1-fázi - po skončení předcházející M-fáze
      - v G2-fázi – po skončení replikace
      - v M-fázi - metafáze
  - dostatku energetických substrátů
  - **dostatku zevních (mitogenních) stimulů**
    - **růstové faktory**
      - EGF, TGF $\beta$ , PDGF, VEGF, bFGF, ...
    - **mezibuněčná signalizace**
- přirozeně je inhibován (bb. v G0-fázi)
  - kontaktní inhibicí
  - produkty supresorových genů
    - inhibitory cdc (např. p21)
  - nedostatkem růstových faktorů
- porucha regulace → nádorové bujení

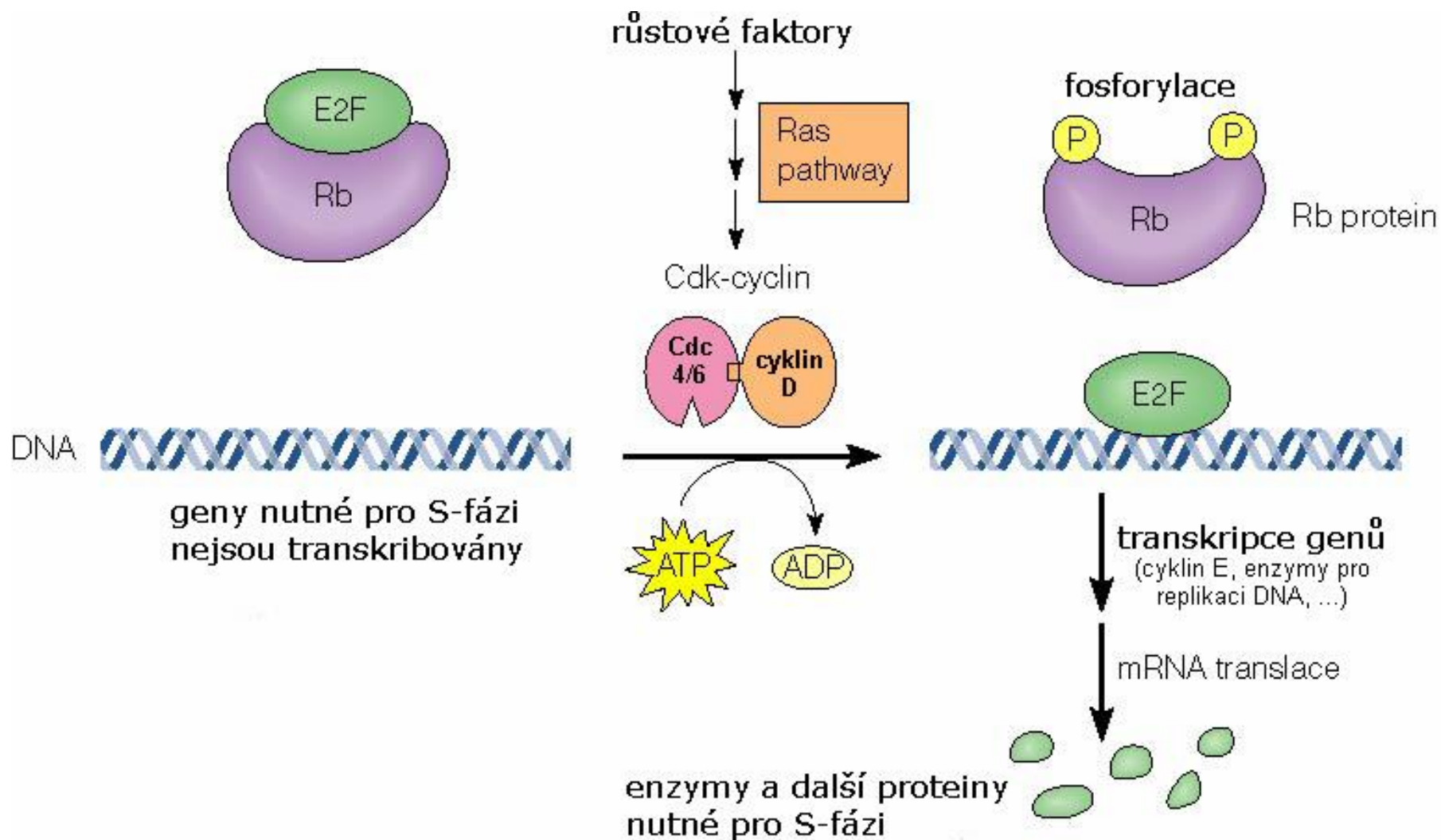
# Regulace buněčného cyklu



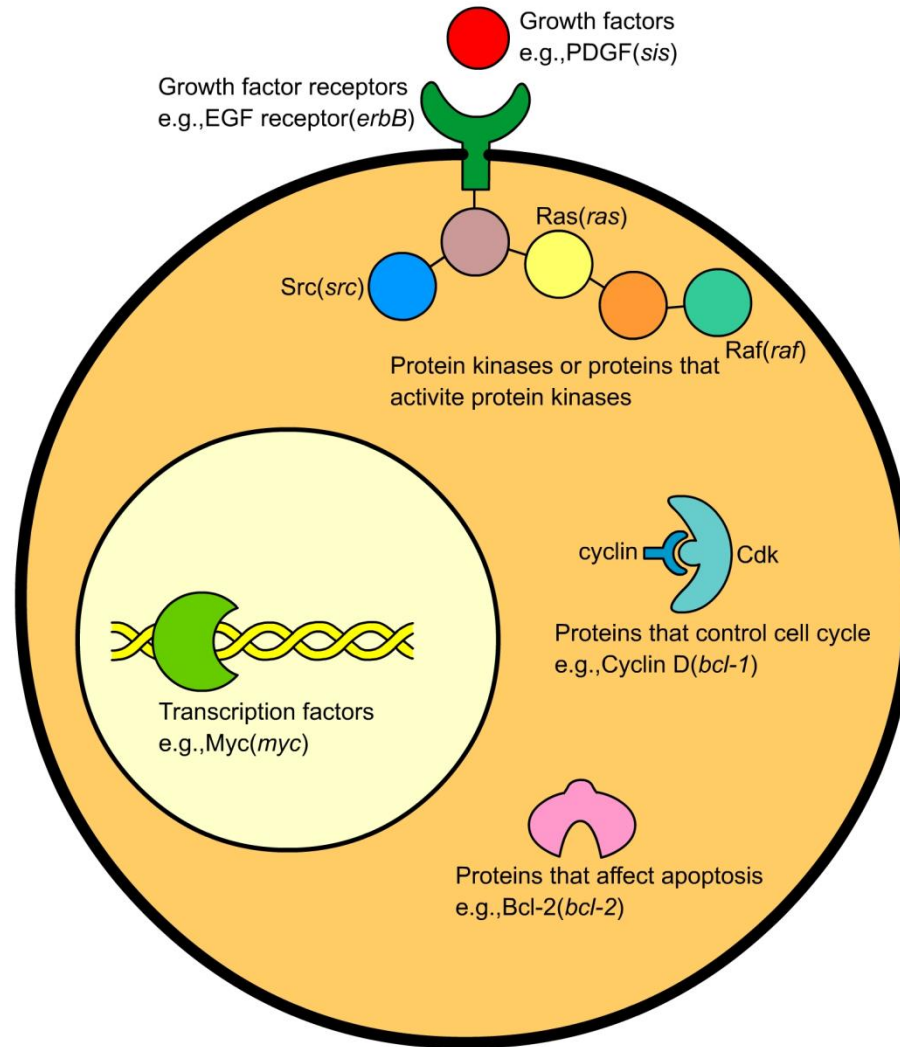
- A) produkty (proto)onkogenů
  - růstové faktory
  - receptory růstových faktorů
  - G-proteiny
  - membránové tyrozinkinázy (např. Abl)
  - cytoplasmatické signální proteiny (např. Raf)
  - transkripční faktory (např. jun, fos, myc)
  - cykliny
  - cyklin-dependentní proteinkinázy (cdk)
- (B) produkty supresorových genů
  - Rb
  - p53
  - p21
  - ...
- (C) produkty genů kódujících DNA reparační enzymy
  - mismatch reparaace
  - excisní reparaace
  - homologní rekombinace



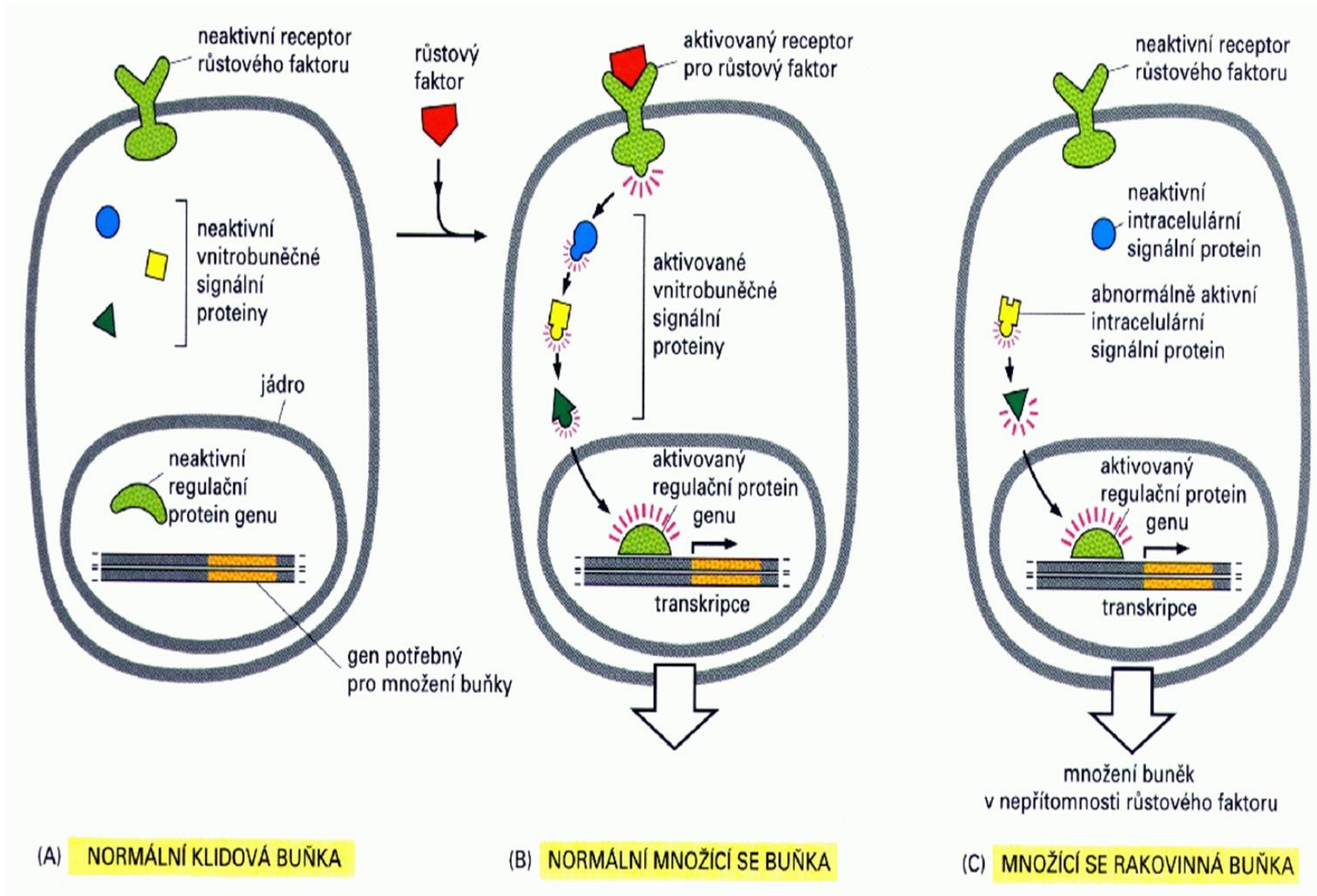
# Rb protein (Rb/E2F G<sub>1</sub> checkpoint)



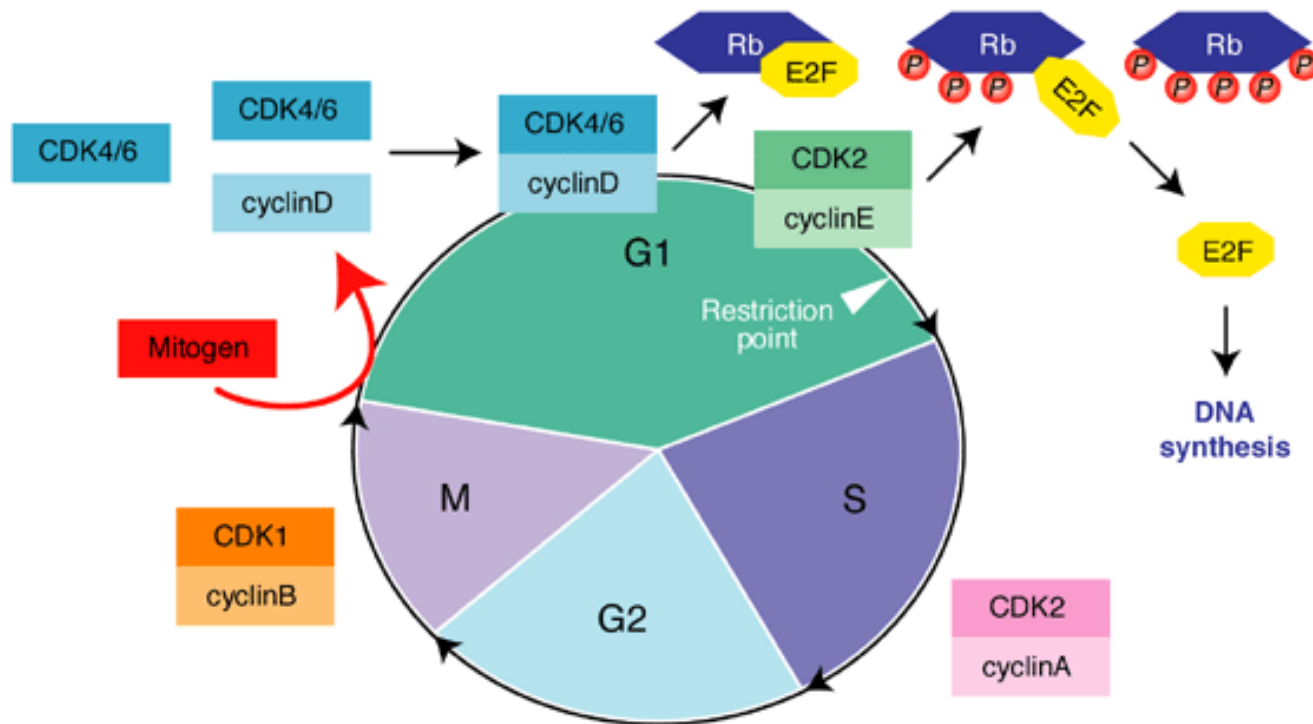
# Adultní bb. jsou závislé na signálech z okolí pokud se mají dělit – protoonkogeny!!



# Důsledek mutací protoonkogenů



# Shrnutí – nastartování b. cyklu

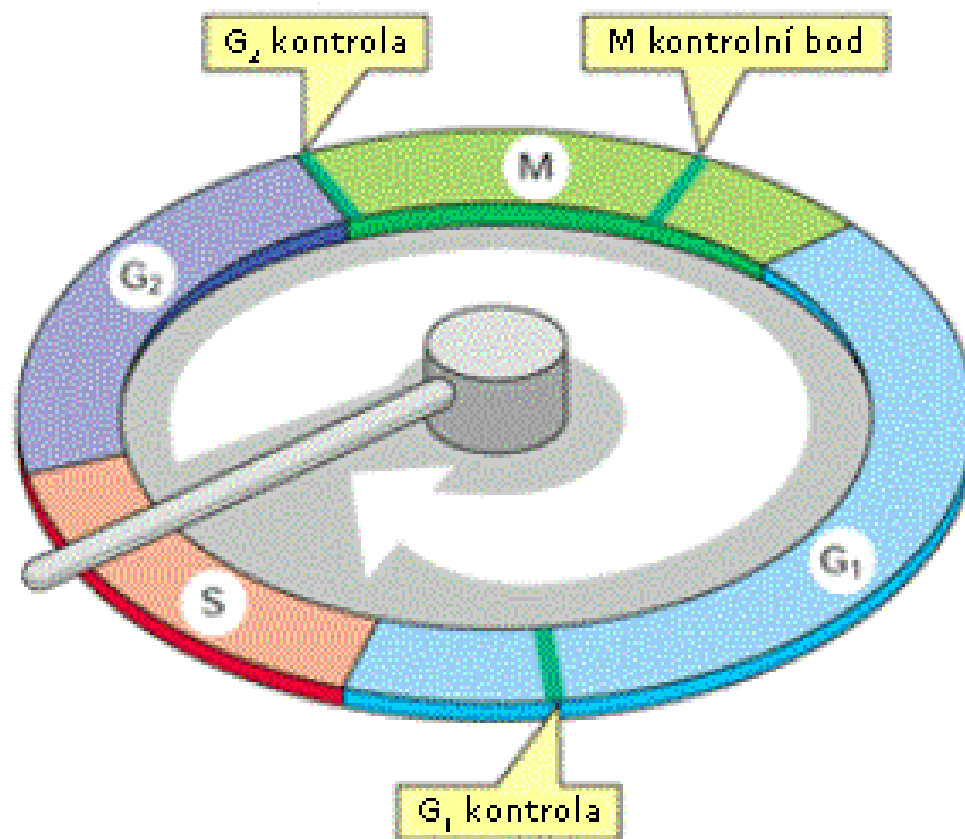


- mitogeny startují b. cyklus indukci cyklinu D a inaktivací Rb proteinu
  - průběh cyklu je koordinován postupnou aktivací jednotl. CDKs a jejich podjednotek – cyklinů (oscilujících mezi rychlou syntézou a degradací)
  - exprese cyklinu D (a do jisté míry cyklinu E) indukovaná mitogeny představuje začátek cyklu (neplatí pouze u embryonálních kmenových bb.)
    - cyclin D- a cyclin E-dependentní kinázy fosforylují a tak blokují Rb protein, hl. kontrolní bod přechodu G1 do S fáze
  - inaktivace Rb proteinu představuje moment, kdy b. cyklus přestává být závislý na mitogenech
    - inaktivací Rb se uvolní E2F transkripční faktory, které stimulují expresi dalších cyklinů a ostatních genů nutných pro DNA syntézu

# Kontrolní body b. cyklu

- je veškerá DNA replikována?
- je příznivé prostředí?
- je buňka dostatečně velká?

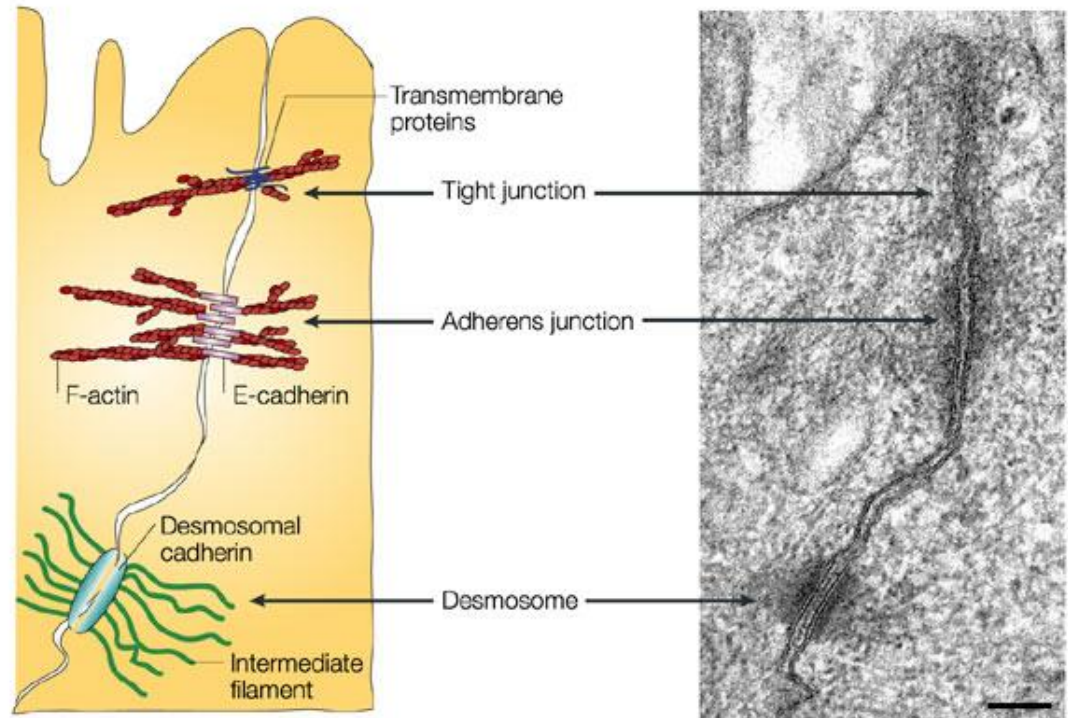
- jsou všechny chromozomy spojeny ve vřeténku?



- je buňka dostatečně velká?
- je prostředí příznivé?

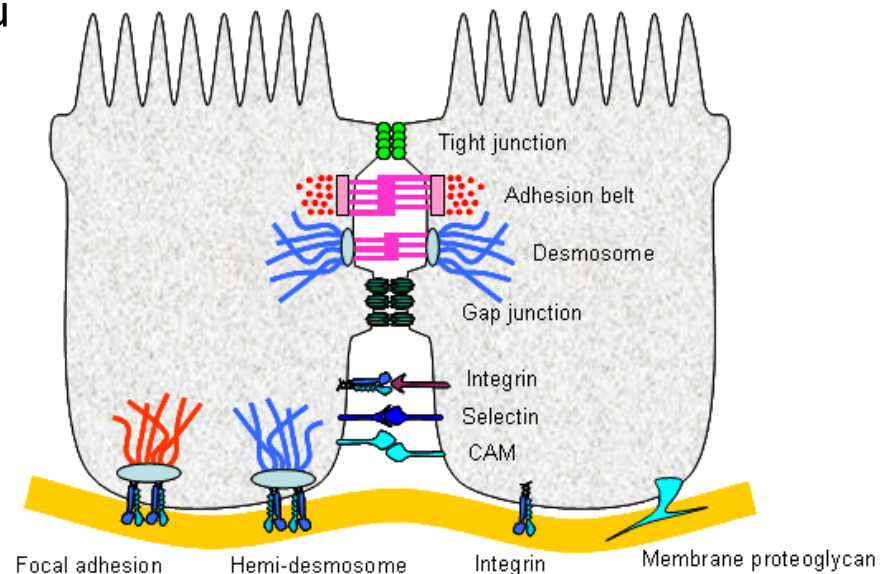
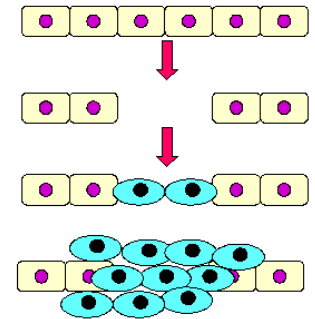
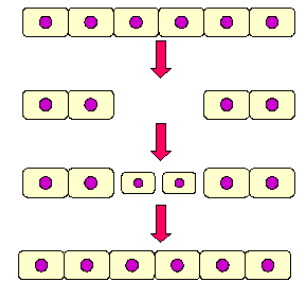
# Mezibuněčné spoje / komunikace

- Tight junctions
  - transmembrane proteins that link to the actin cytoskeleton and prevent the leakage of small molecules through intercellular spaces
- Adherens junctions
  - homophilic interactions between E-cadherin molecules connected to the actin network through catenins
  - function to coordinate the actin cytoskeleton across an epithelial sheet
- Desmosomes
  - desmosomal cadherins linked to intermediate filaments
  - integrate the intermediate-filament network across the epithelial sheet
- Gap junctions
  - directly connects the cytoplasm of two cells, which allows various molecules and ions to pass freely between cells

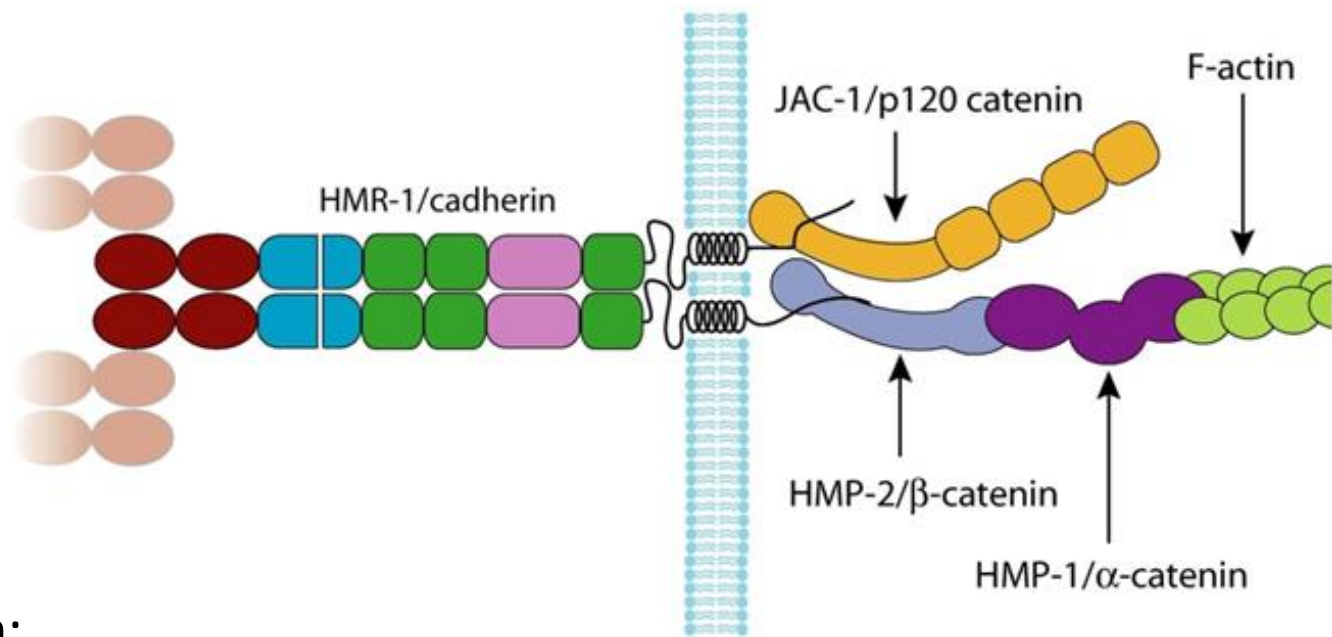


# Kontaktní inhibice

- = po dosažení souvislosti tkáně (každá buňka má svého souseda) se proliferace zastaví i při dalším působení mitogenů
  - u nádorů ne!
- na kontaktní inhibici se aktivně podílejí proteiny mezibuněčných spojů, komunikující s cytoskeletem buňky a dalšími signálními proteiny
  - integriny – spojení bb. s ECM
  - cadheriny – spojení bb. mezi sebou



# Princip “kontaktní inhibice”



- E-cadherin:
  - Ca<sup>+</sup>-dependentní trans-membránový protein epiteliálních bb.
  - 5 cadherinových repeatů (EC1-EC5) v extracelulární doméně
  - 1 transmembránová doména
  - intracel. doména vážící β- a α-cateniny a násl. aktinový cytoskelet
  - v epitel. bb. konstantně regenerován a 5-hod. na b. povrchu
  - ztráta E-cadherinu je spojena s progresí tumoru a metastazováním
    - v důsl. hypermetylace, hypoxie (aktivace PI3K dráhy), microRNA atd.
  - **volné cateniny fungují jako onkogeny (Wnt dráha)**

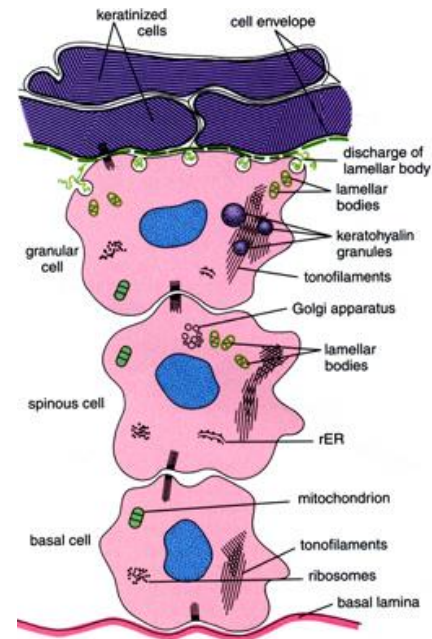
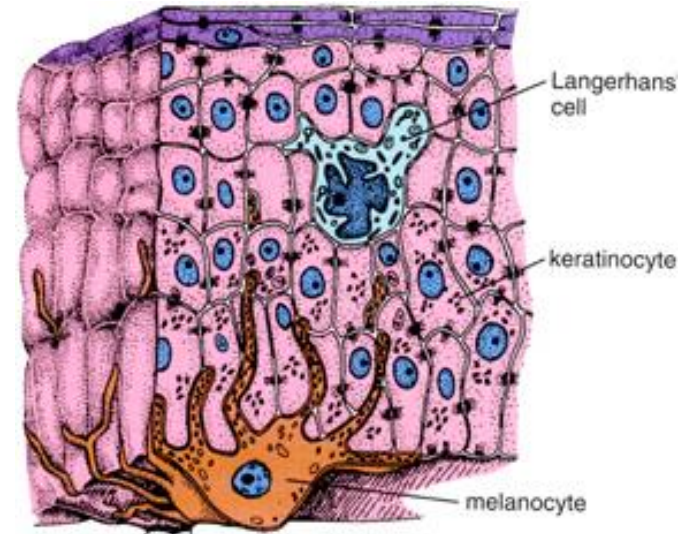


# (3b) Reparace

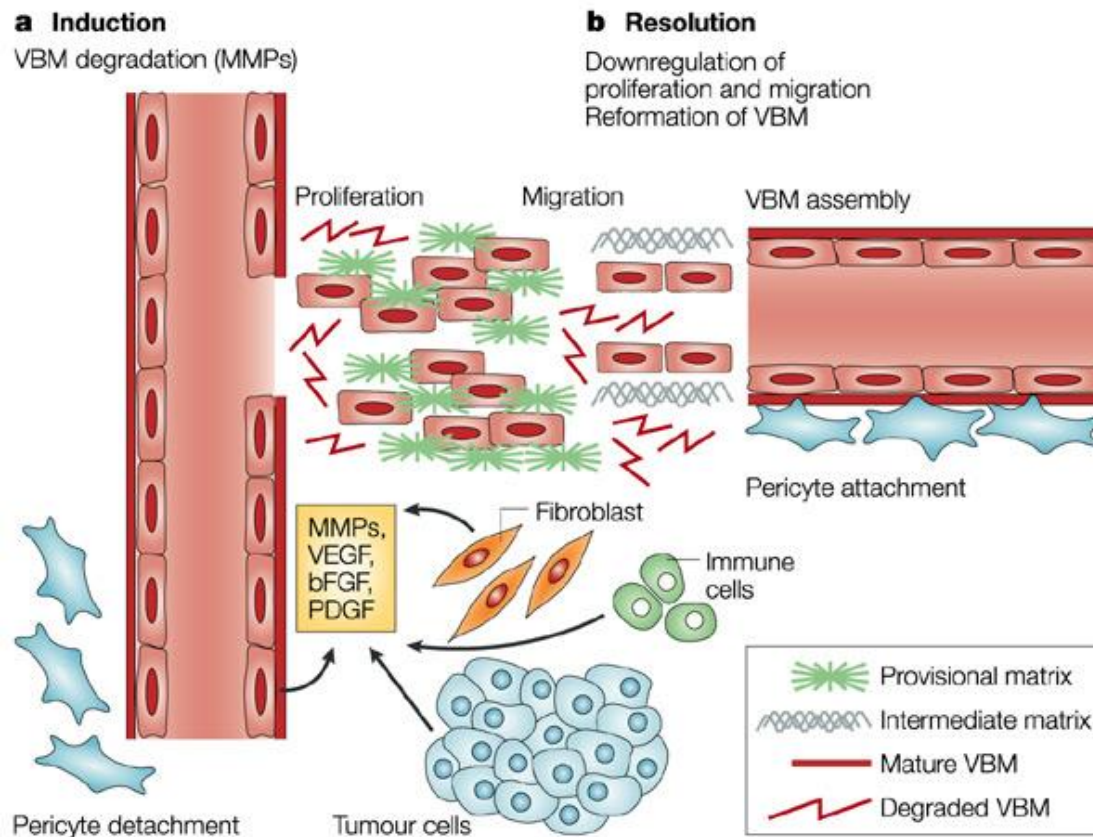
- typ hojení následující zásadní poškození tkáně zahrnující více b. typů a stroma
- vede k tvorbě jizvy
- fáze
  - proliferace (3. – 4. den)
    - epitelizace
    - angiogeneze
    - fibrotizace
      - toto vše se podílí na tvorbě tzv. granulační tkáně
      - rána se začíná kontrahovat
  - maturace
    - kolagen tvoří cross-links mezi sebou a s dalšími proteiny

# Proliferation phase: epithelisation

- on the surface of the wound, epithelial cells burst into mitotic activity within 24 to 72 hours
  - stimulated by growth factors (eg. EGF)
- epithelia / keratinocytes migrate and proliferate from the wound margins (and hair follicles)
- later, differentiation and stratification occurs



# Proliferation phase: angiogenesis

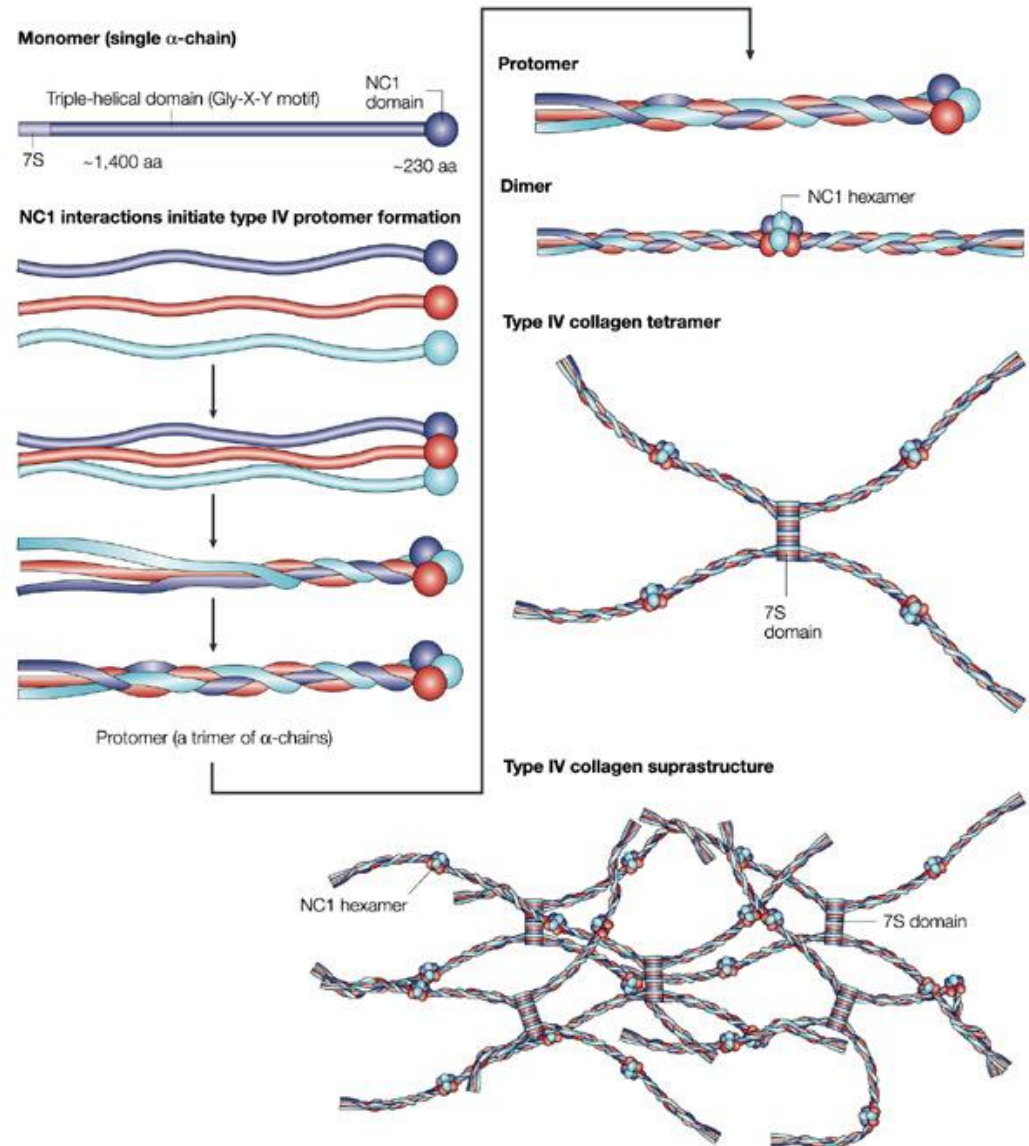


Nature Reviews | Cancer

- growth angiogenic factors (VEGF) released upon hypoxia stimuli
- budding and proliferation of endothelial cells

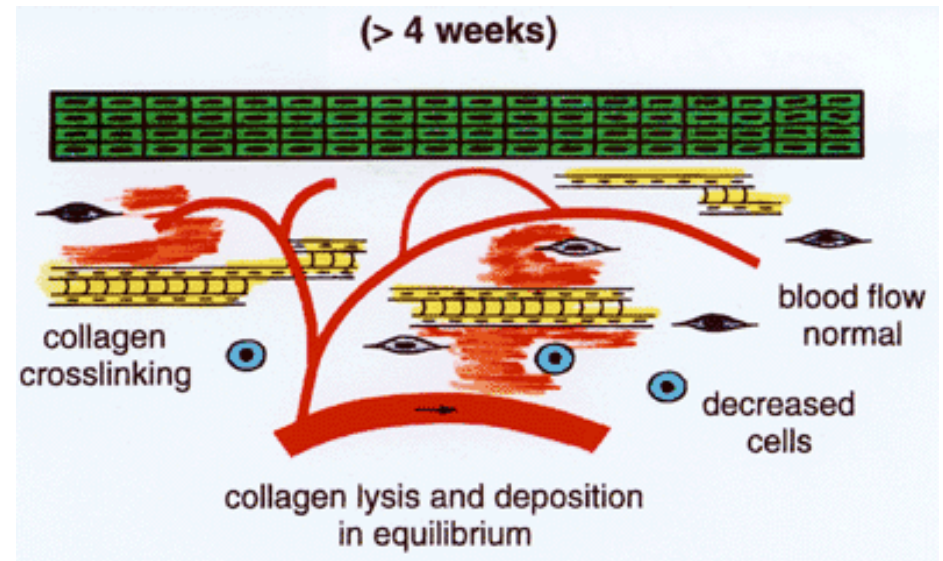
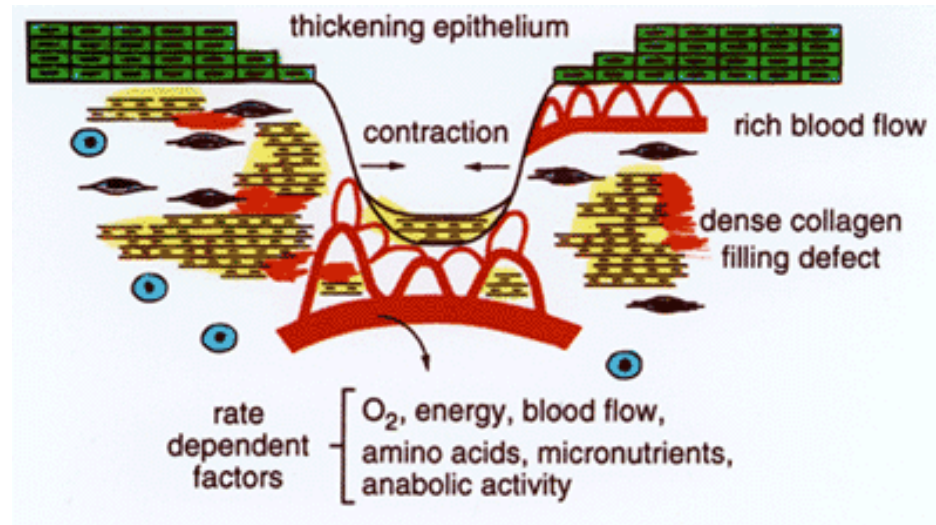
# Proliferation phase: fibrotisation

- fibroblasts proliferate in the deeper parts of the wound
  - begin to synthesize small amounts of collagen which acts as a scaffold for migration and further fibroblast proliferation
- granulation tissue, which consists of capillary loops supported in this developing collagen matrix, also appears in the deeper layers of the wound
- proteoglycans appear to enhance the formation of collagen fibers, but their exact role is not completely understood
- within two to three weeks, the wound can resist normal stresses, but wound strength continues to build for several months
- the proliferation phase lasts from 15 to 20 days and then wound healing enters the maturation phase

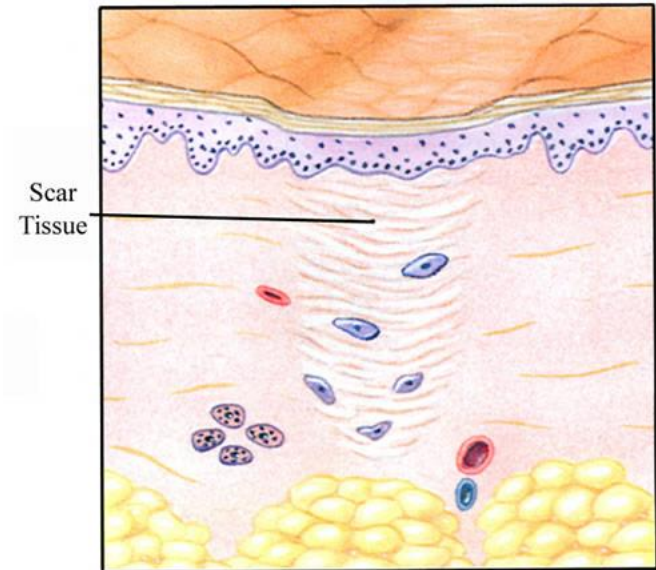
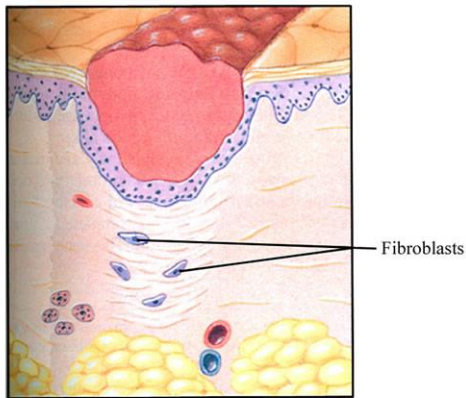
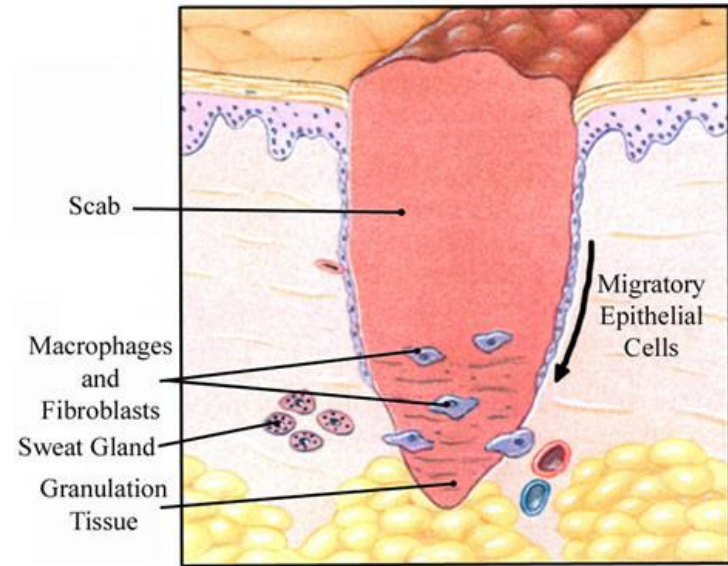
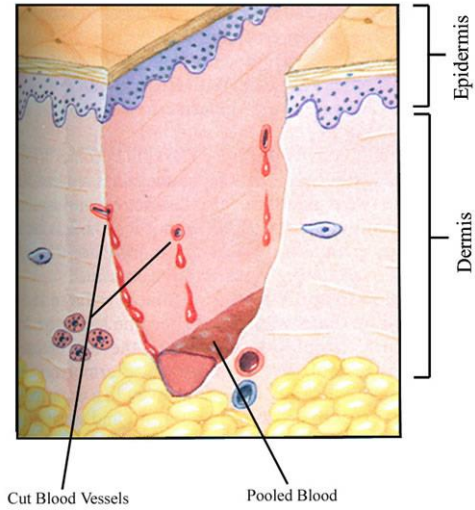


# Maturation phase

- fibroblasts leave the wound and collagen is remodeled into a more organized matrix
- wound contracts
  - tensile strength of collagen increases for up to one year following the injury
  - while healed wounds never regain the full strength of uninjured skin, they can regain up to 70 to 80% of its original strength
- wound remodeling (scar maturation)
  - increasing collagen crosslinking, resulting in increased strength
  - action of collagenase to begin breaking down excess collagen accumulation
  - regression of the lush network of surface capillaries as metabolic demands diminish
  - decreasing proteoglycan and, in turn, wound water content



# Shrnutí



# Patologický průběh hojení ran

- poruchy srážení krve a destiček
- malnutrice
- proteokatabolický stav
- imunodeficit
- ischemie a neuropatie v oblasti rány
- infekce
- nadměrná fibrotizace (kožní rány)
  - hypertrofická jizva
  - keloid
    - abnormální jizva „rostoucí“ za hranice původního poškození kůže
    - některé etnické skupiny mají vyšší riziko
      - 15-krát častější u vysoce pigmentovaných (Afro-Američané nebo Hispánci)

všechny tyto okolnosti  
mohou vést k chronické  
ráně / hojení



# (3c) Chronická rána / hojení

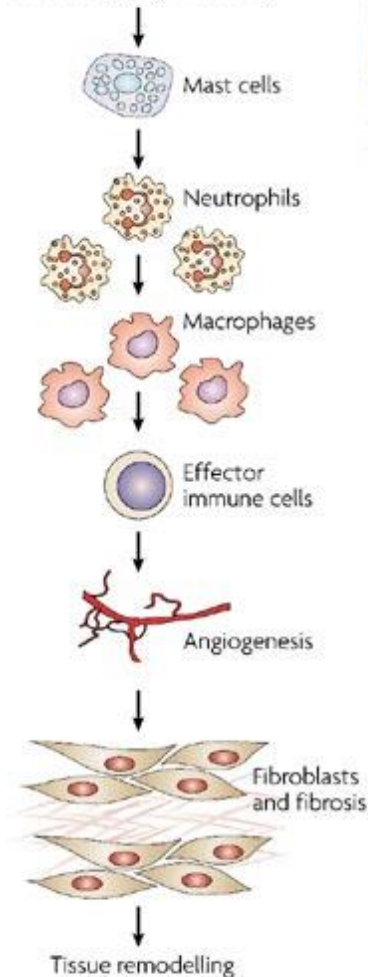
- selhání nebo zpomalení hojení a neodpovídavost na normální regulační faktory
- důvody
  - lokální
    - stálá traumatizace
    - cizí těleso
    - špatná perfuze/oxygenace (makro- a mikroangiopatie, neuropatie)
    - excesivní/chronická infekce
  - systémové
    - malnutrice (zejm. proteinová) a karence vit. C
    - proteokatabolismus
      - např. Cushingova nemoc - exces glukokortikoidů
    - imunodeficit / imunosuprese
      - zejm. nedostatek neutrofilních granulocytů či jejich dysfunkce
    - systémové choroby (zejm. diabetes mellitus)
      - kombinace mikro- a makroangiopatie, neuropatie, infekce a hyperglykemie samotné
    - genetické příčiny



# Wound healing vs. carcinogenesis

## a Acute inflammation

Stimulus (injury, infection)



## b Carcinogenesis

