

**MUNI**  
**MED**

# **Buňka x Zánět x Hojení**

# Buňka

Mitochondriální funkce/disfunkce

ROS

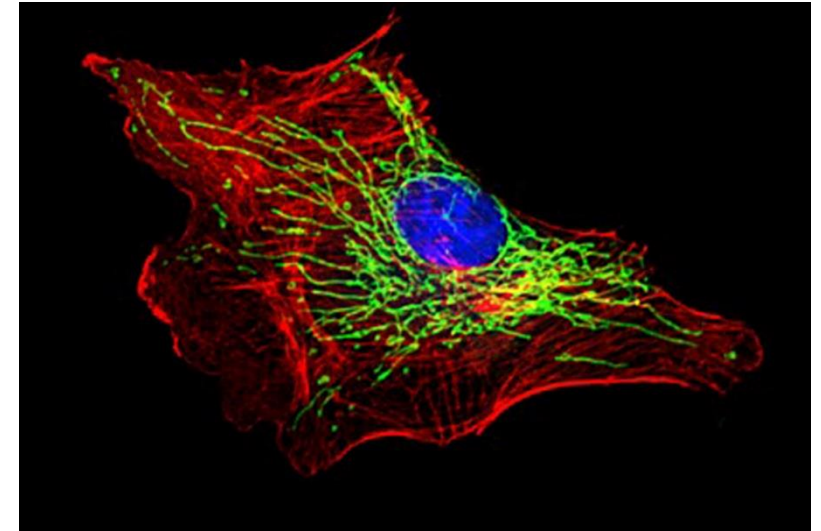
Hypoxie

Lysosomální funkce/disfunkce

Buněčná smrt

# Mitochondrie

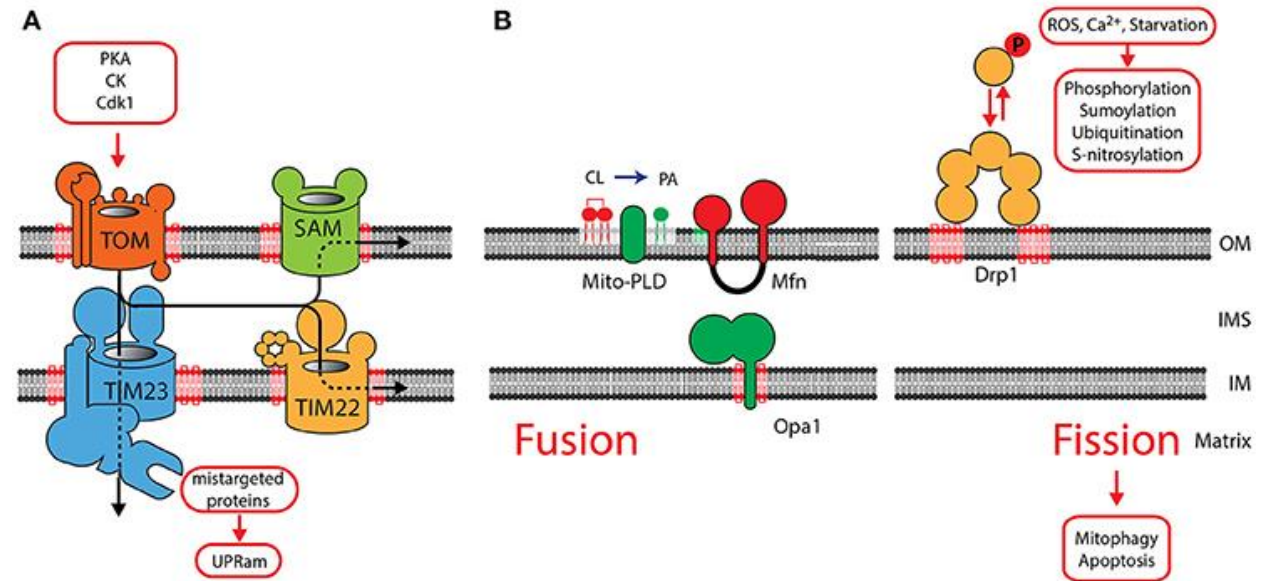
- Produkce ATP k pokrytí buněčných potřeb
- Metabolismus aminokyselin
- Regulace redoxních dějů buňky
- Syntéza hemu
- Diferenciace a aktivace procesů imunitních buněk
- Výsadní role v programu buněčné smrti



Mitochondriální síť

# Mitochondriální „fusion and fission“

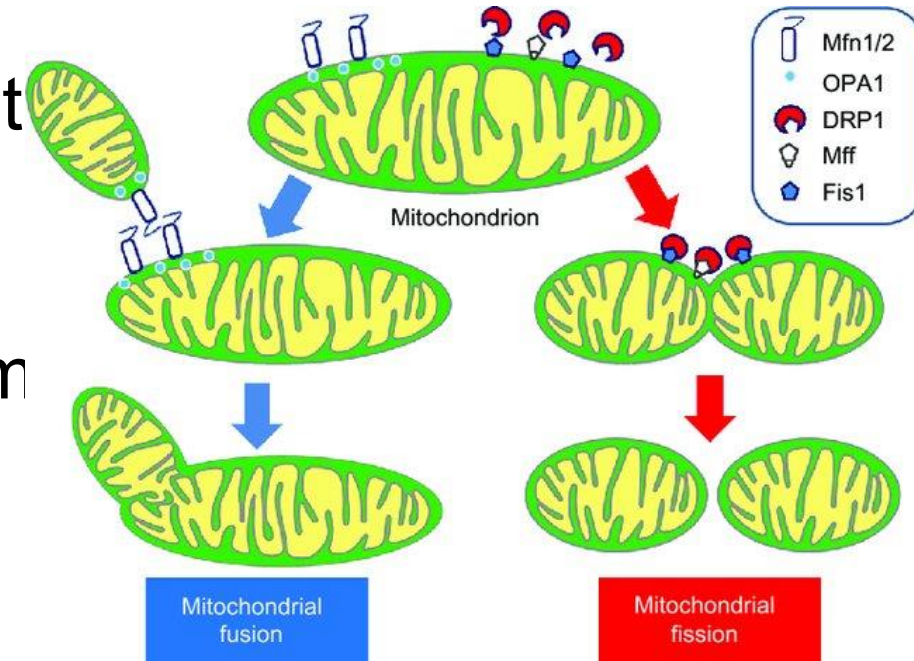
- Proces odpovídající na extra- a intracelulární změny
- Změny dodávky živin, energie nebo redox stavu, během diferenciaci „cell-type dependent“ charakteru



Front. Cell Dev. Biol., 2017

# Mitochondriální fúze a štěpení

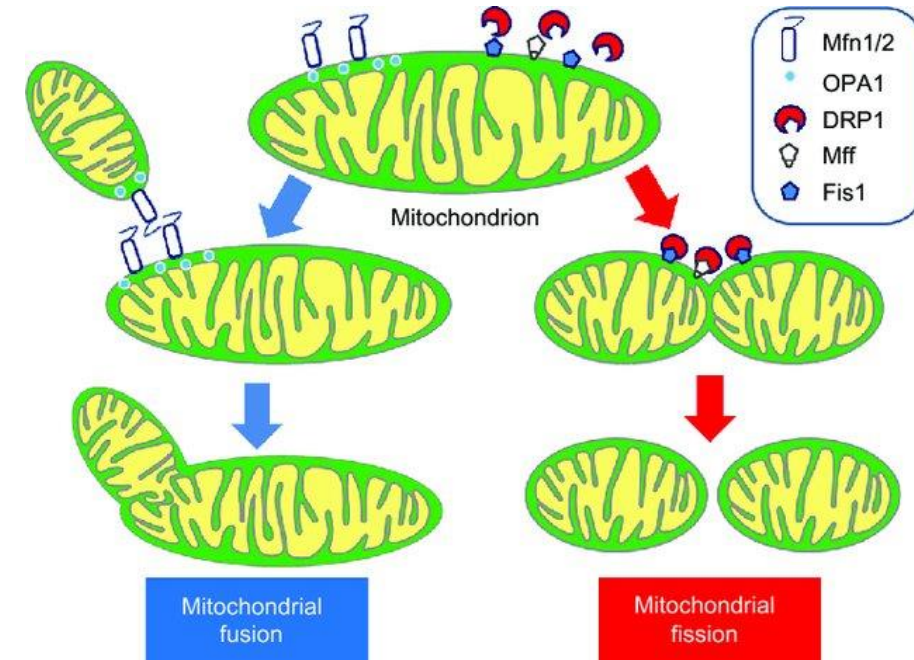
- Odpověď na metabolický/patogenní podnět
- **FÚZE = autonomní integrace**
- 1. fúze vnější membrány mezi 2 sousedním mitochondriemi
  - Řízené - mitofusin 1 a 2
- 2. fúze vnitřní membrány
  - cardiolipin, dynamin-like GRPase optic atrophy (OPA)
- důležité pro udržení integrity mitochondriální DNA a buněčné dýchání



Research Reports in Clinical Cardiology 2014(default):111

# Mitochondriální fúze a štěpení

- ŠTĚPENÍ
- důležité pro mitochondriální dědičnost pro dceřinné buňky během buněčného dělení
- při poškození a odstranění - poškozené mitochondrie „usnadňují“ své odstranění pomocí **mitofagie**



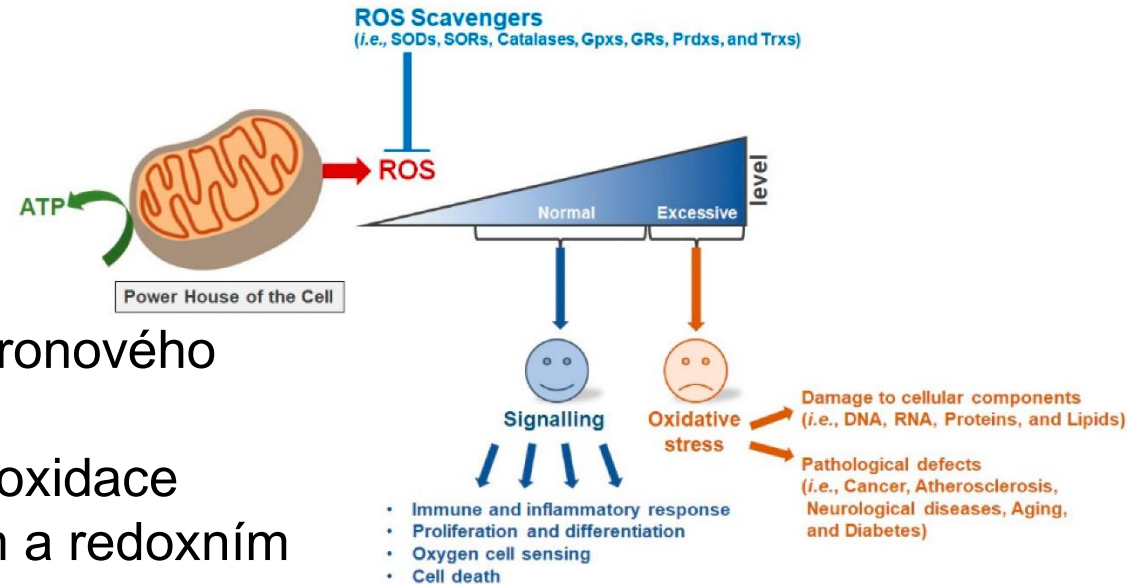
Research Reports in Clinical Cardiology 2014(default):111

# Mitochondrie a ROS

- produkce reaktivních forem kyslíku
  - generované mitochondriemi prostřednictvím elektronového transportního řetězce
  - vedlejší produkt při produkci energie, důsledek  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, vystavení záření, světlu, kovům a redoxním látkám

## – ROS funkce:

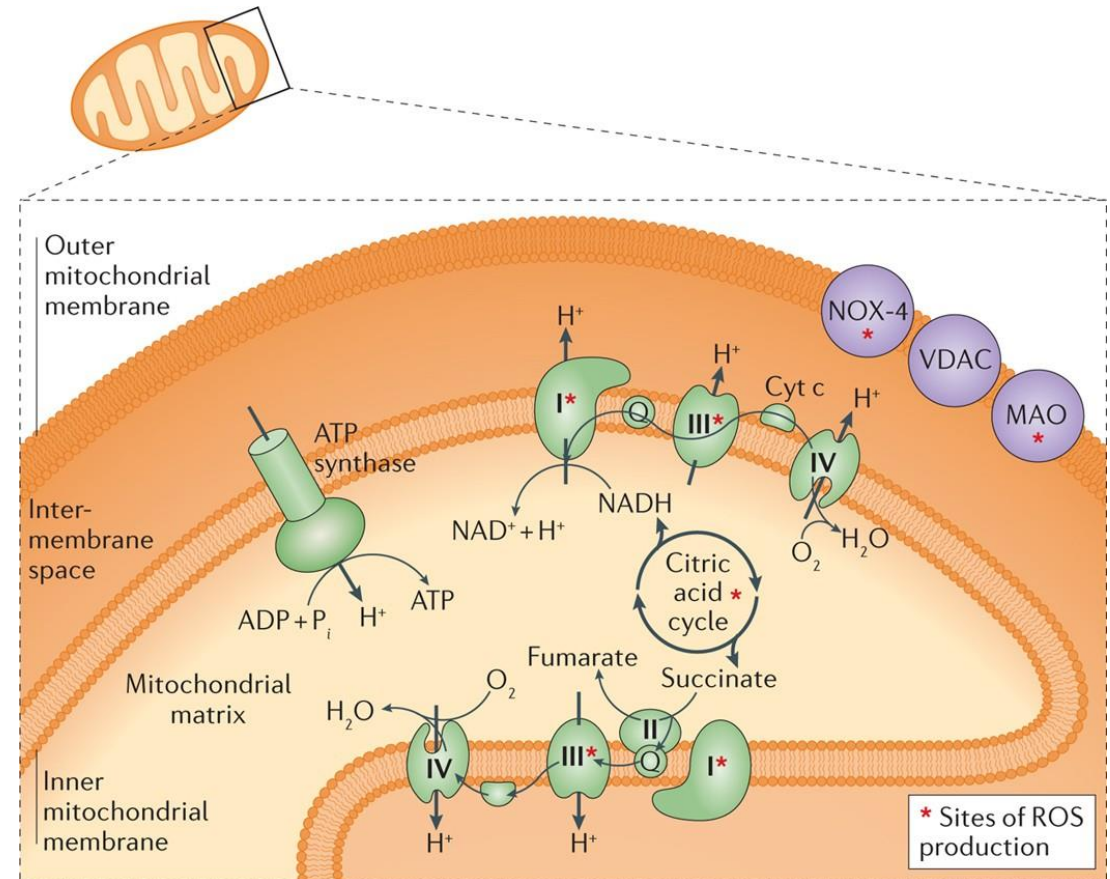
- druzí poslové v různých signálních drahách
    - Imunitní buňky:  $\text{Ca}^{2+}$ -NFAT signální dráha – kritická pro aktivaci T lymfocytů.
  - ROS mohou také ničit bakteriální patogeny, ale
- 
- pokud jsou nadměrně produkovány - poškodí produkující buňku nebo sousední buňky.



*Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(18), 4407

# Místa produkce ROS

- mitochondriální ROS (mROS) jsou produkovány jako vedlejší produkty bioenergetického metabolismu
- Cyt c, cytochrome c; MAO, monoamine oxidase; NOX-4, NADPH oxidase 4; VDAC, voltage-dependent anion channel



Nature Reviews | Cardiology



# Oxidační stres

– výsledek nerovnováhy mezi

**produkcí ROS a antioxidaací**

– patologické změny u živých organismů

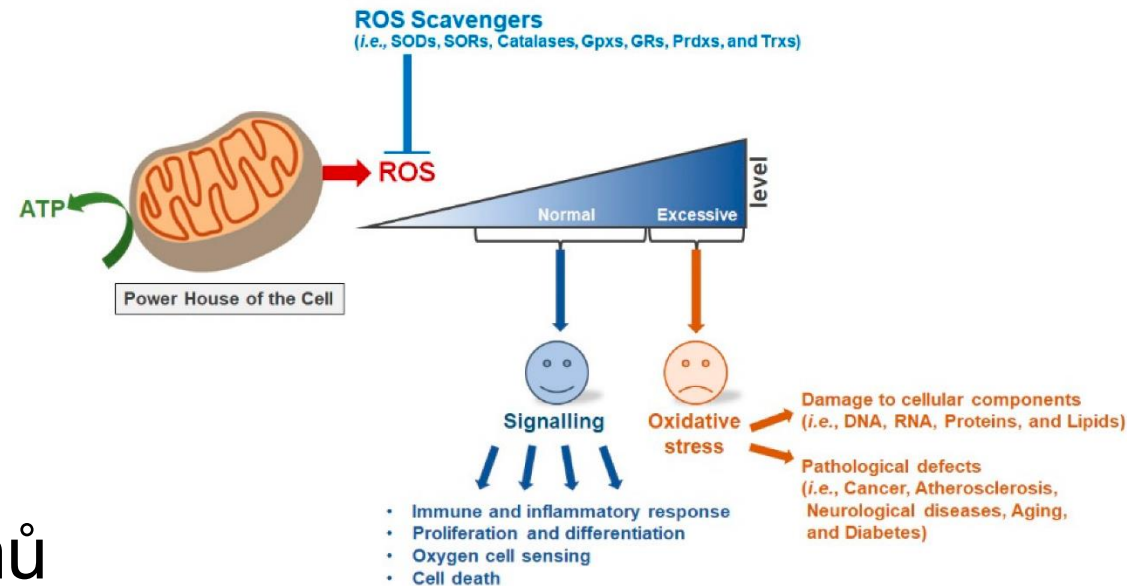
– rakovina, ateroskleróza, neurologické nemoci, stárnutí a cukrovka, poškození buněčných složek (DNA, RNA, lipidy, a proteiny)

– ne-enzymatická obrana:

– flavonoidy, vitaminy (A, C, and E), a glutathion

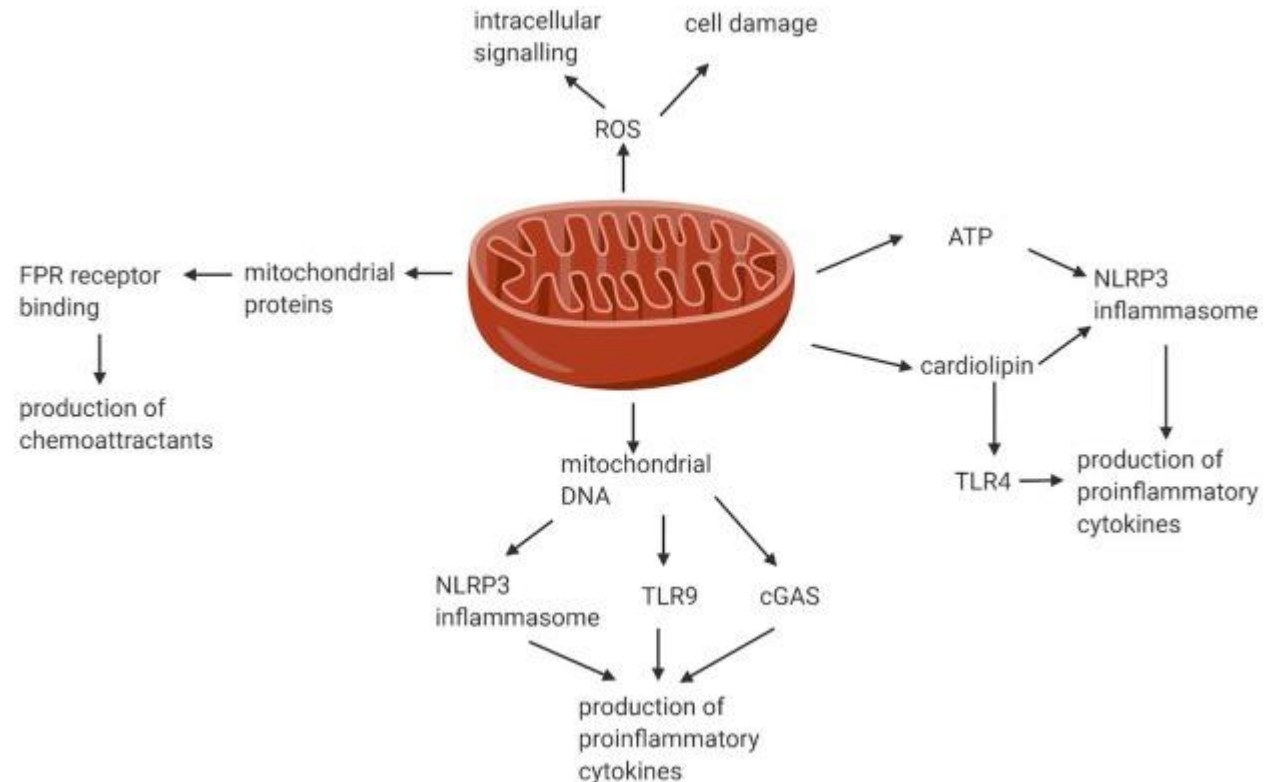
– enzymatické antioxidanty:

– Superoxide dismutase (SOD), superoxide reductase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, peroxiredoxins (Prdxs), and thioredoxins (Trx)



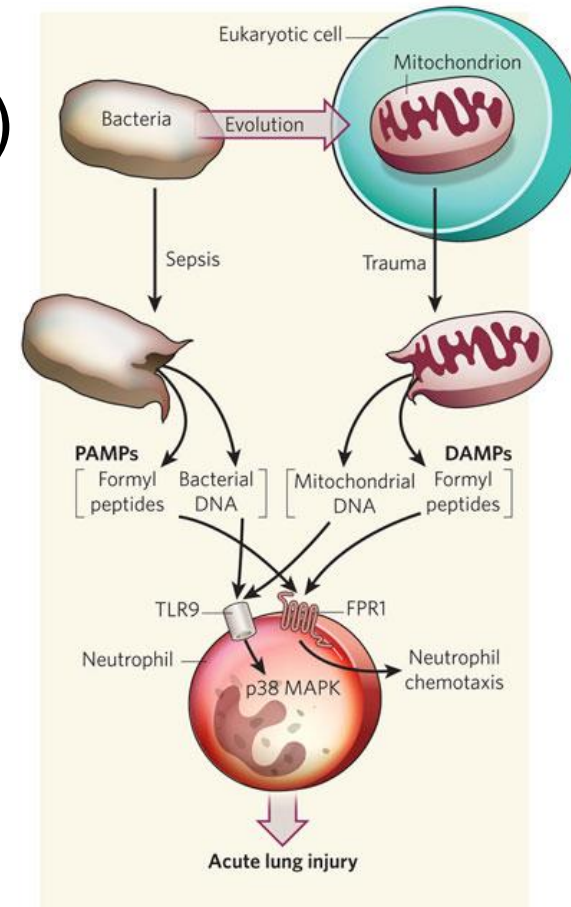
# Vliv mitochondrií na imunitní reakci

- mitochondriální DAMPs
  - v extracelulárním prostoru a v cirkulaci.
- mitochondriální proteiny
  - FRP receptory - produkce chemoatraktantů.
- mitochondriální ROS
  - intracelulární signalizace, poškození buněk.
- mitochondriální ATP a Kardiolipin
  - aktivují NLRP3 inflammasom nebo TLR4 - produkci prozánětlivých cytokinů.
- mitochondriální DNA
  - aktivuje TLR9, NLRP3 inflammasomy nebo dráhu cGAS - produkce prozánětlivých cytokinů.



# Mitochondrie - indukce imunitní odpovědi

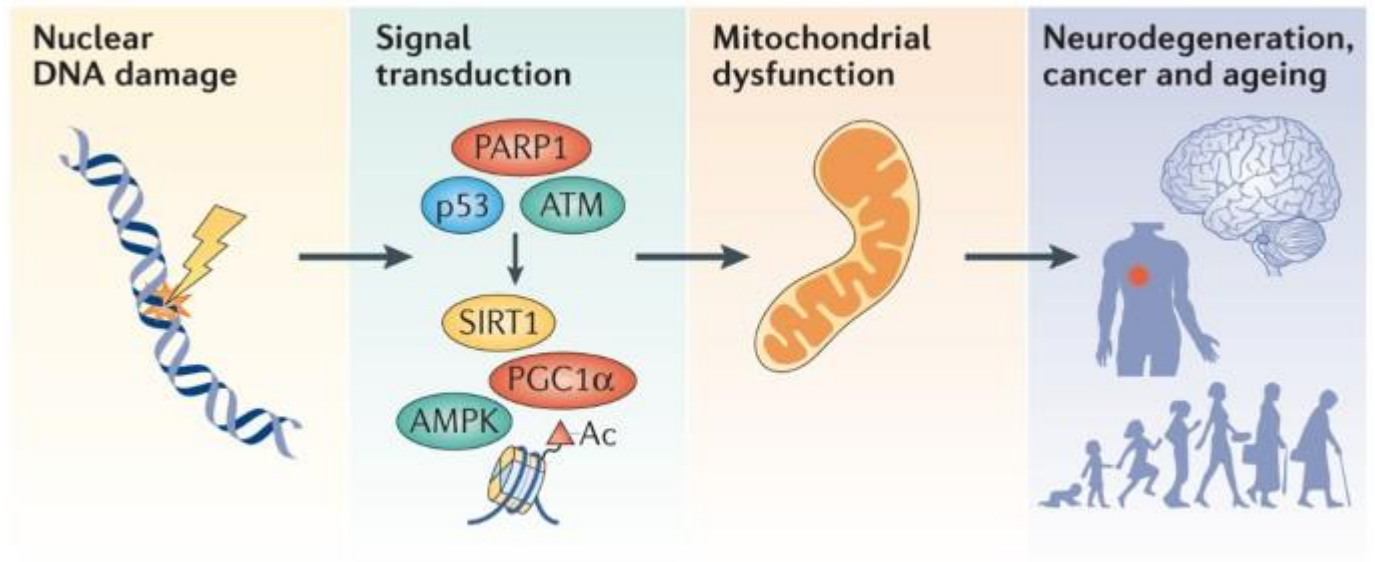
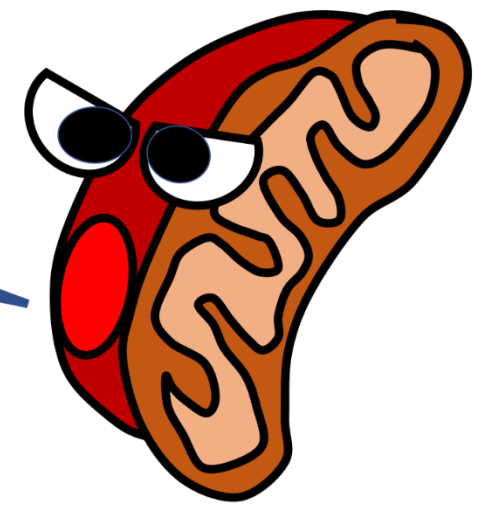
- „mitochondrial danger associated molecules“ (DAMPs) that resemble structures of bacterial derived pathogen associated molecular patterns (PAMPs)
  - mitochondriální DAMPS - mitochondrial DNA with hypomethylated CpG motifs, specific lipid present in prokaryotic bacteria and mitochondria, i.e. cardiolipin.
- via DAMPs mitochondrie řídí imunitní odpověď
- mitochondriální DAMPs - **negativní vliv**- uvolňovány poškozenými buňkami bez přítomnosti infekce - nežádoucí zánětlivá reakce, která vede k poškození tkání a dysfunkci orgánů



Nature Education 3(9):15

# Mitochondriální disfunkce

Are you calling me dysfunctional?



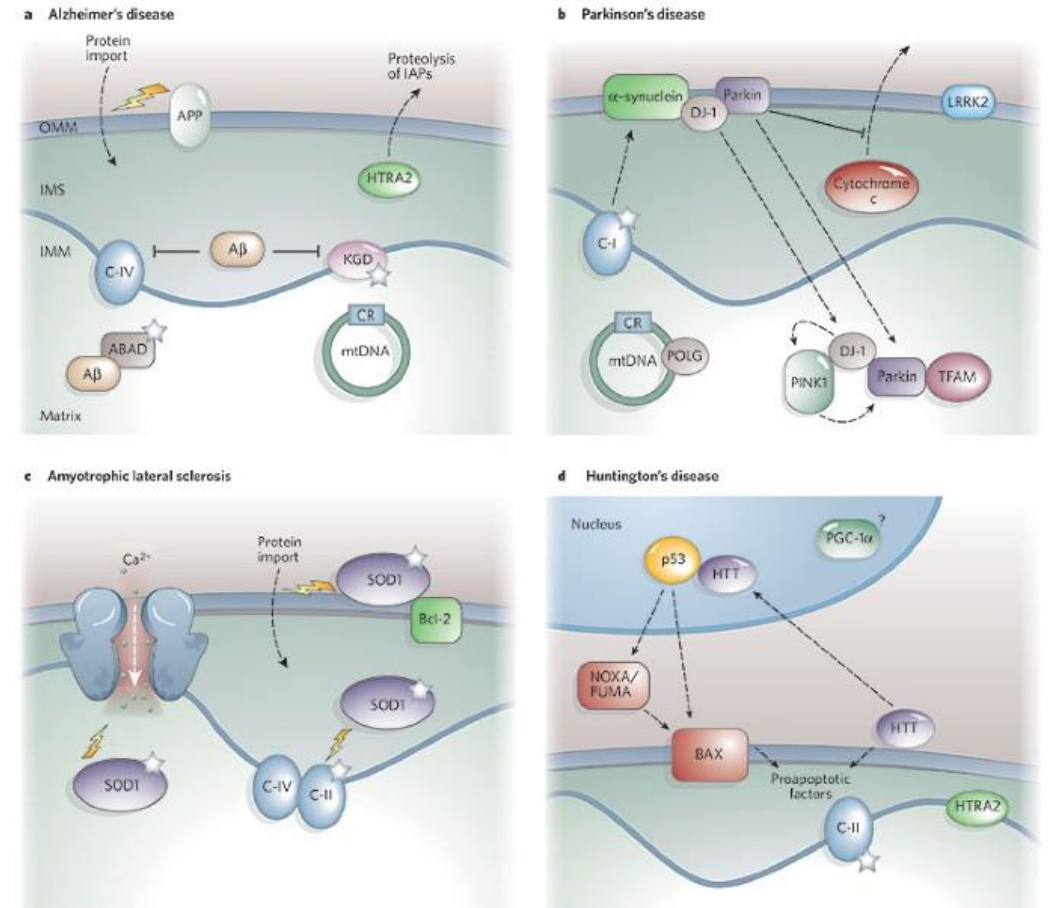
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

# Mitochondriální disfunkce



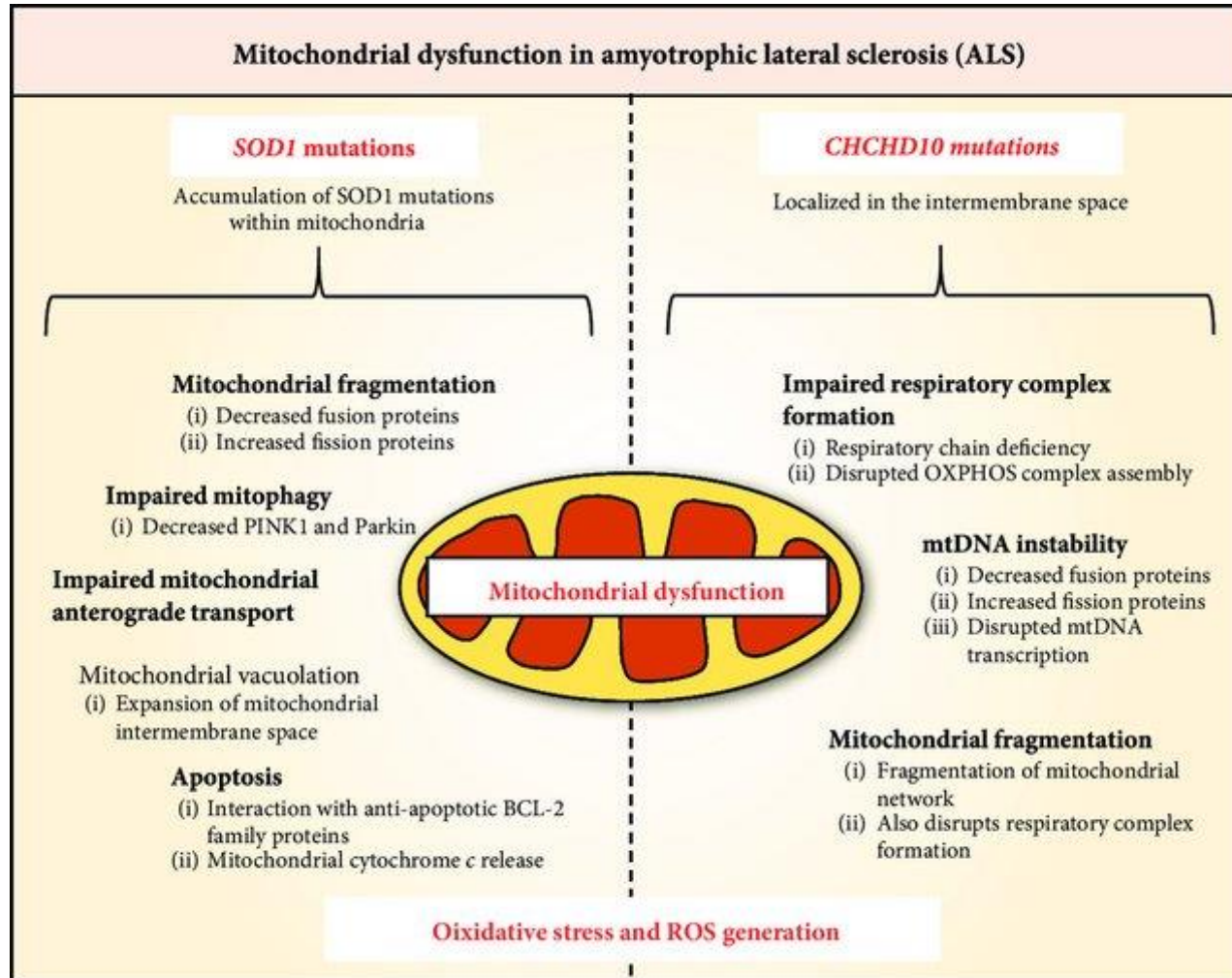
# Mitochondriální disfunkce

- mutace v mitochondriální DNA a oxidační stres - rizikový faktor pro neurodegenerativní onemocnění
  - mitochondriální dysfunkce se objevuje brzy a působí kauzálně v patogenezi onemocnění
- pro nemoc specifické proteiny interagují s mitochondriemi



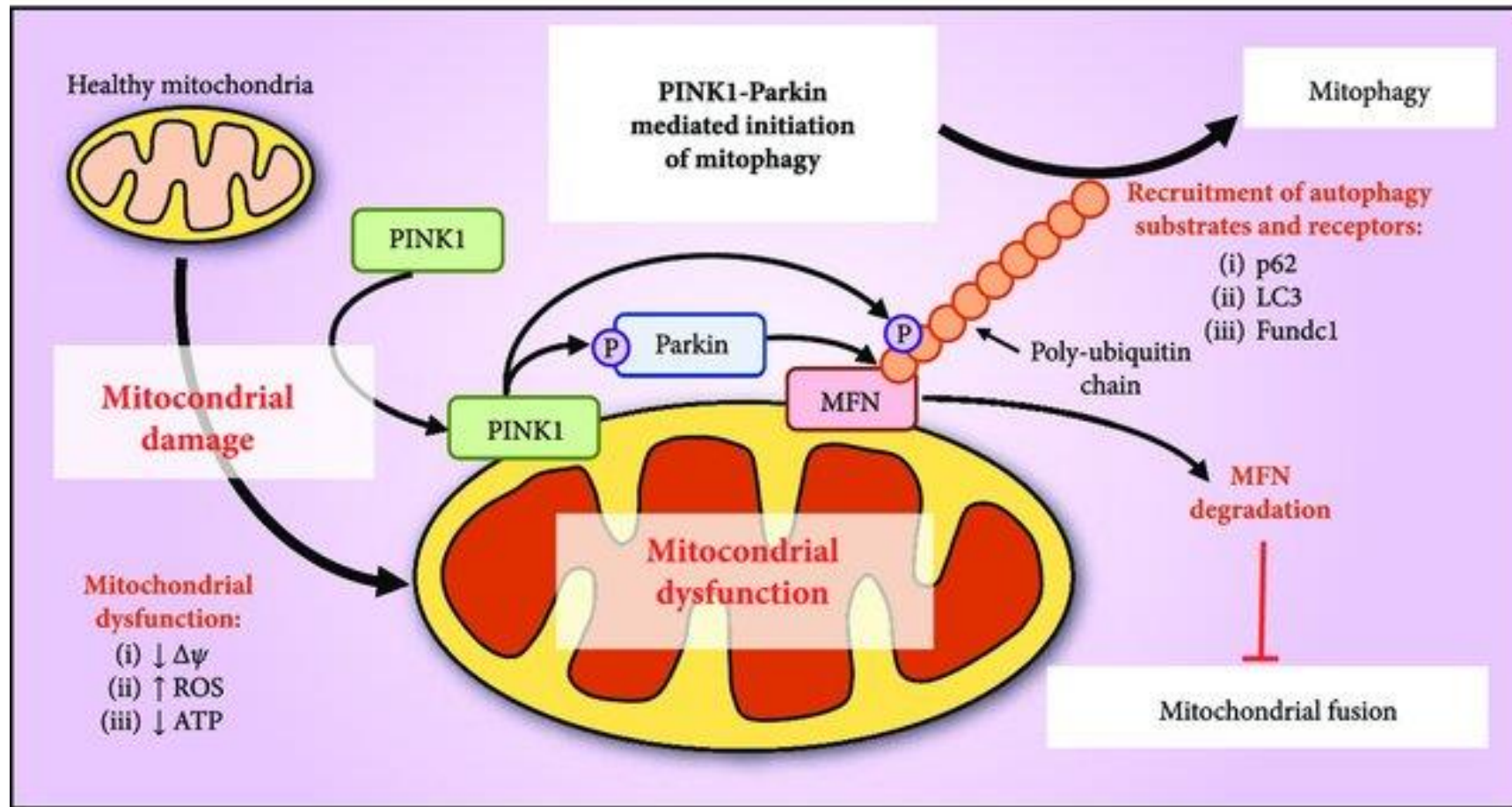
*Nature* volume 443, pages787–795(2006)

# Oxidační stres



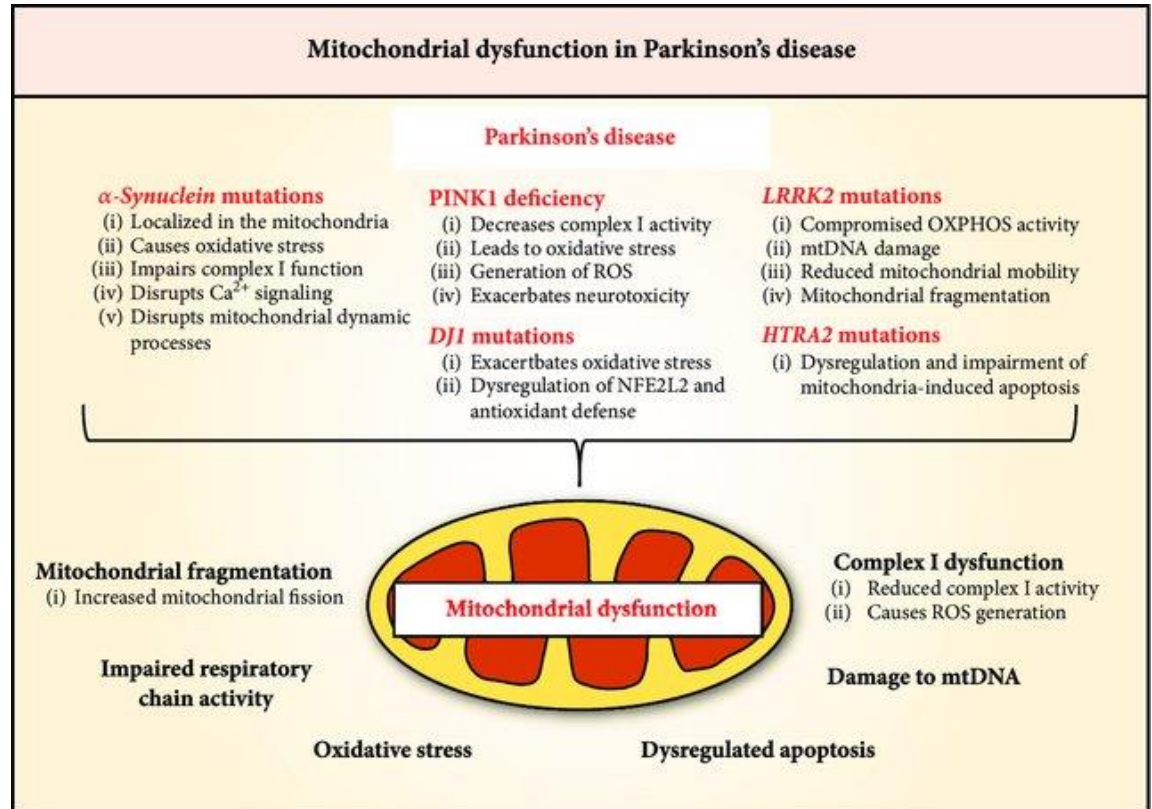
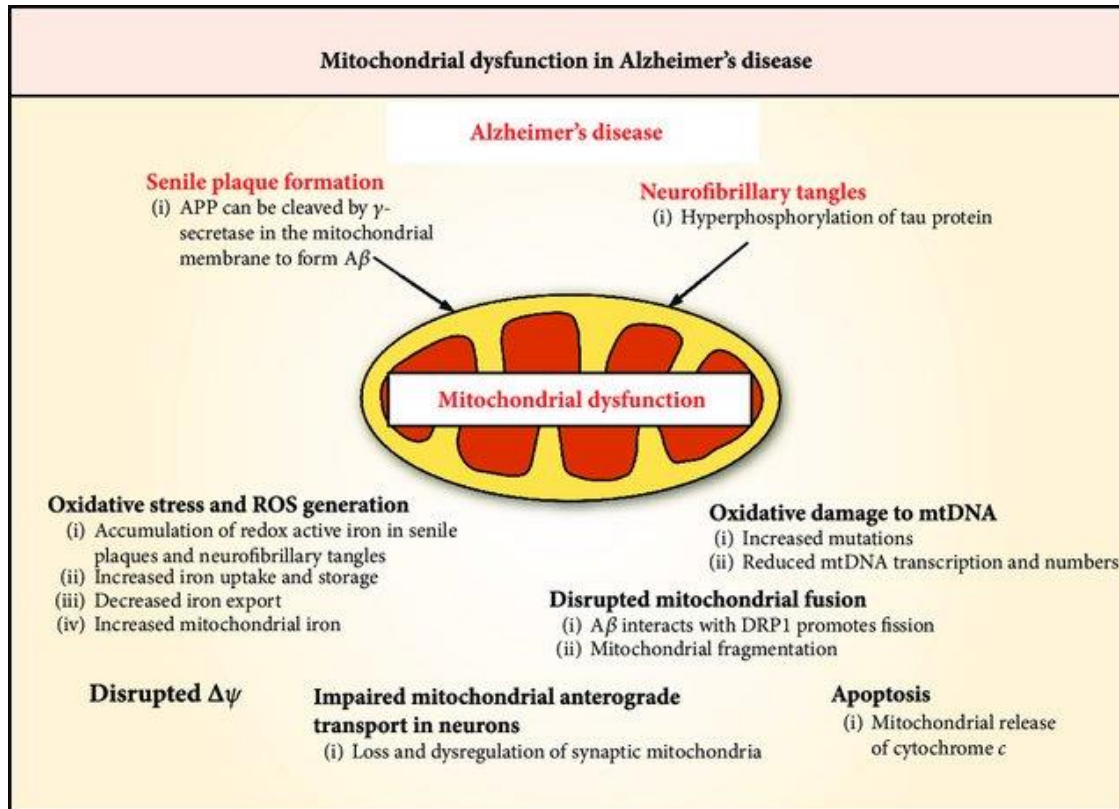
Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019

# Mitochondriální disfunkce

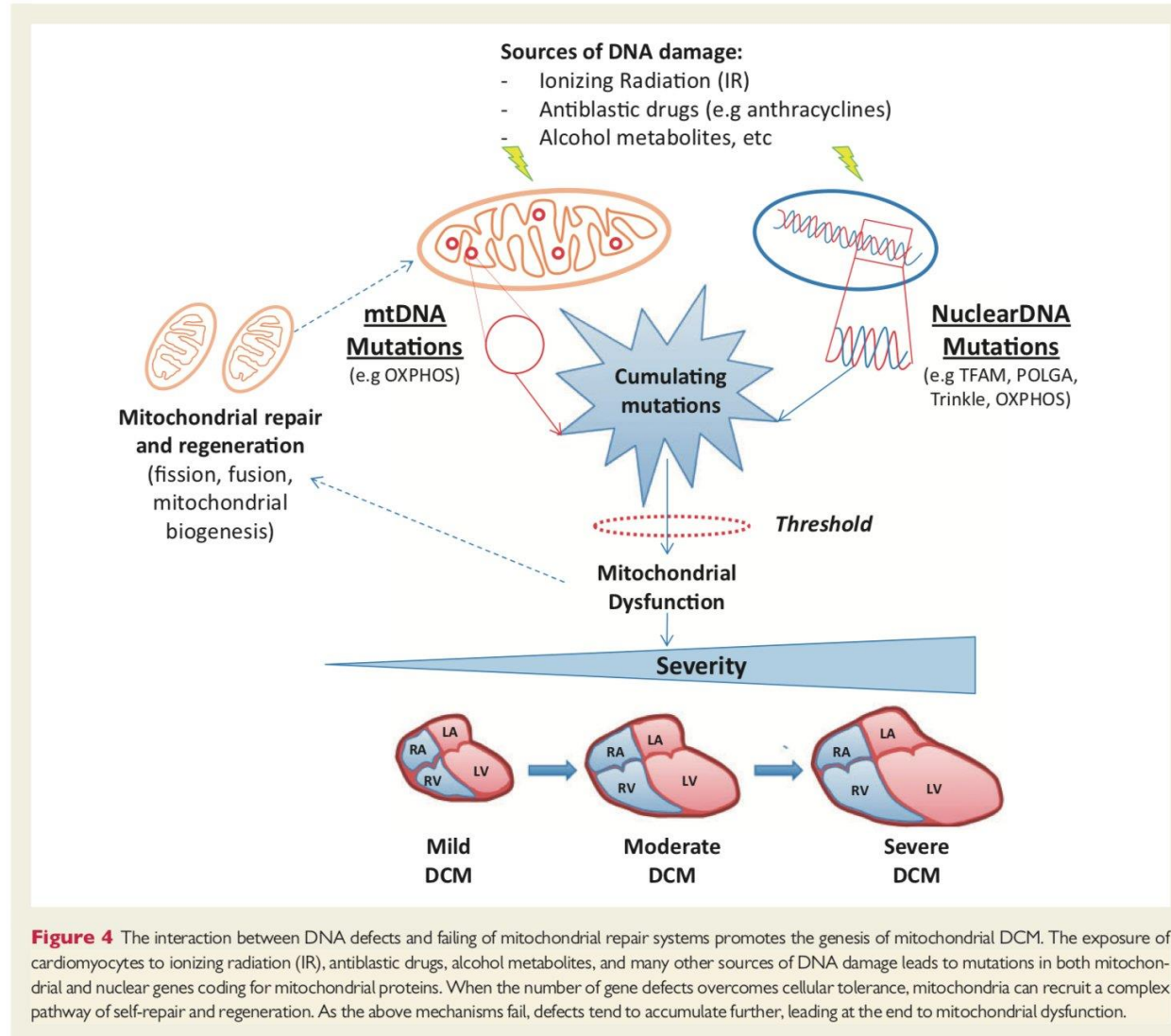




# Mitochondriální disfunkce

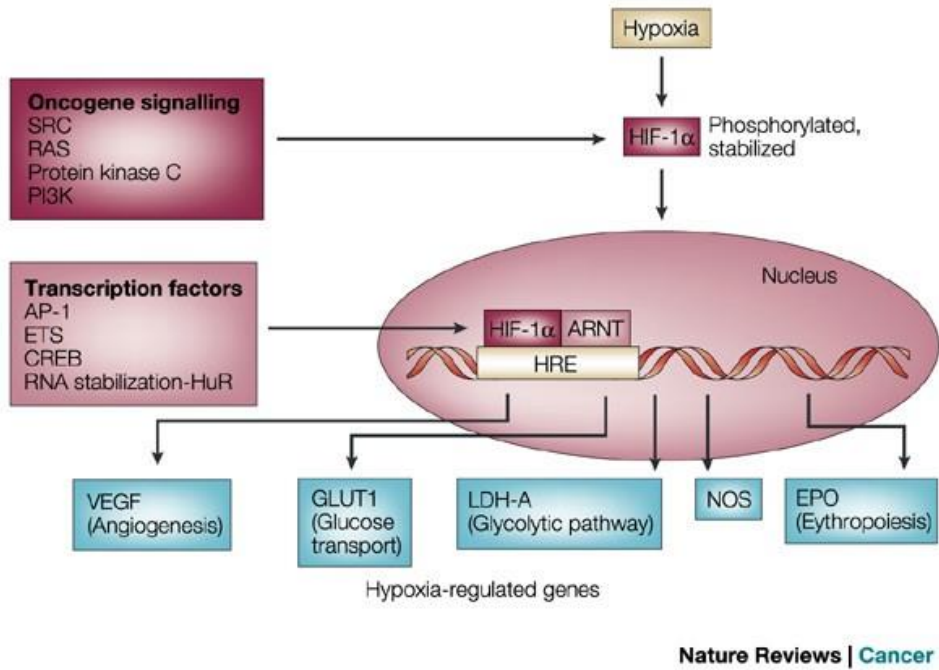


# Mitochondrial dysfunction and heart

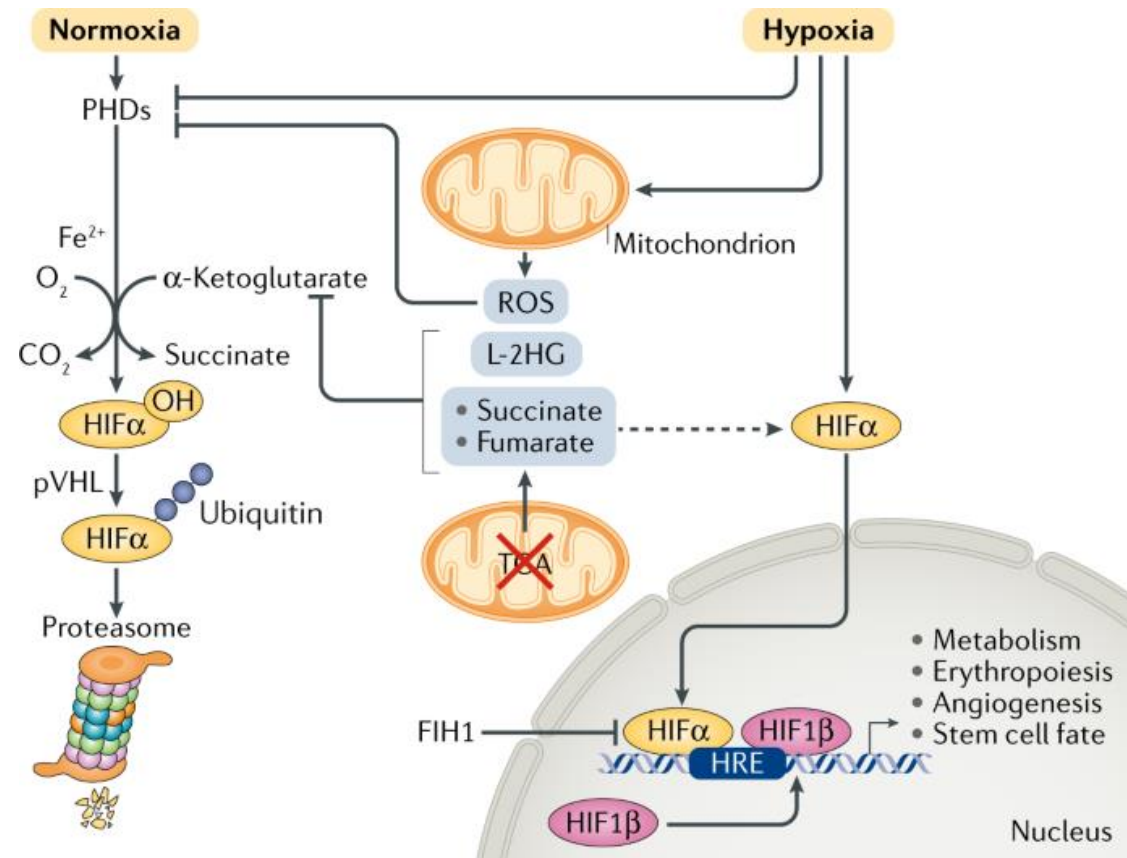


**Figure 4** The interaction between DNA defects and failing of mitochondrial repair systems promotes the genesis of mitochondrial DCM. The exposure of cardiomyocytes to ionizing radiation (IR), anticancer drugs, alcohol metabolites, and many other sources of DNA damage leads to mutations in both mitochondrial and nuclear genes coding for mitochondrial proteins. When the number of gene defects overcomes cellular tolerance, mitochondria can recruit a complex pathway of self-repair and regeneration. As the above mechanisms fail, defects tend to accumulate further, leading at the end to mitochondrial dysfunction.

# Mitochondrie a hypoxie



Nature Reviews Cancer volume 2, pages38–47(2002)

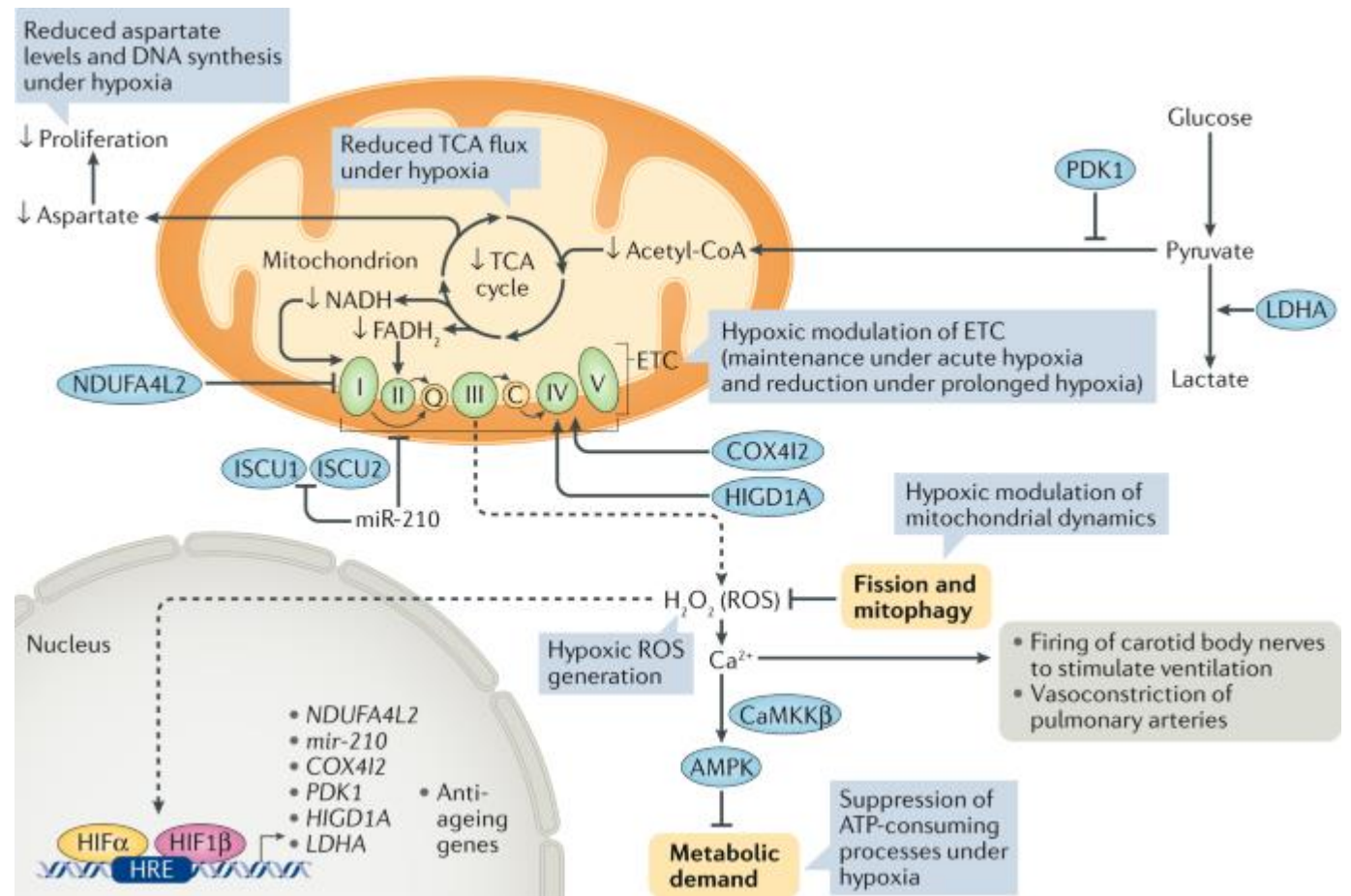


# Mitochondrie a hypoxie

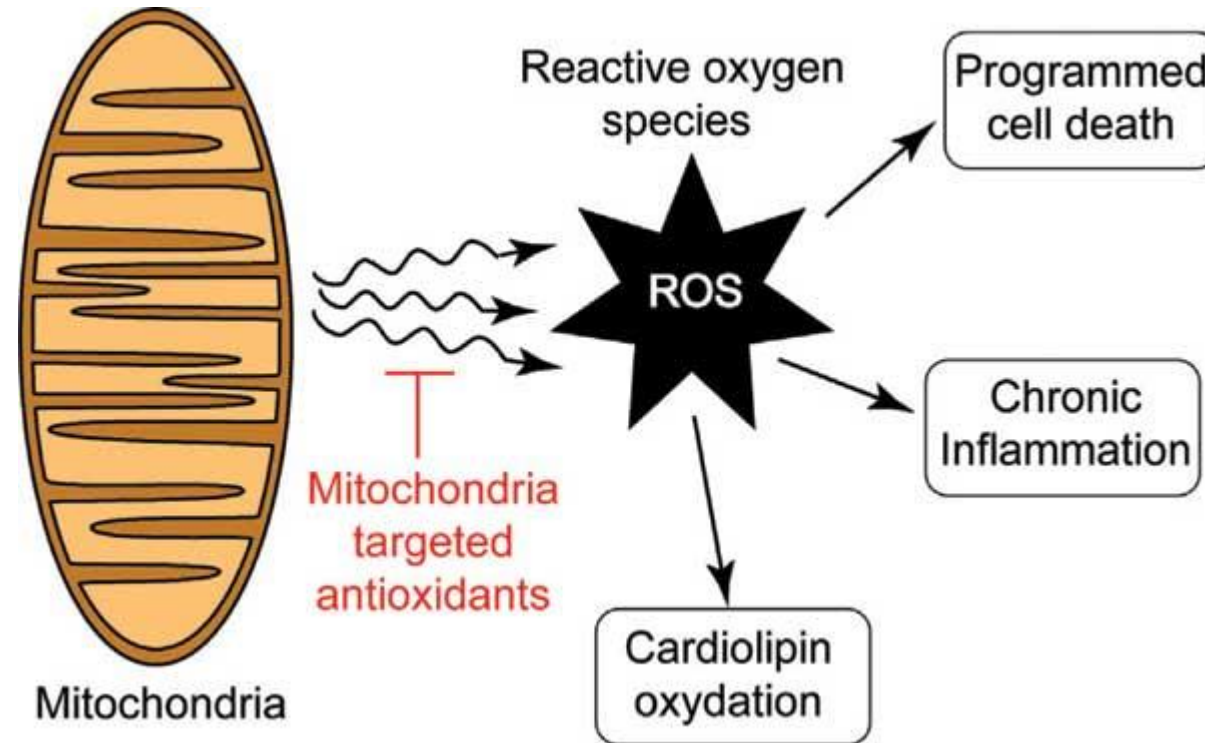
## – Akutní vs. chronická

- decreased flux through the tricarboxylic acid (TCA) cycle
- activity of the electron transport chain (ETC)
- hypoxia-induced ROS, ...

## – nízký vs. limitní/žádný O<sub>2</sub>

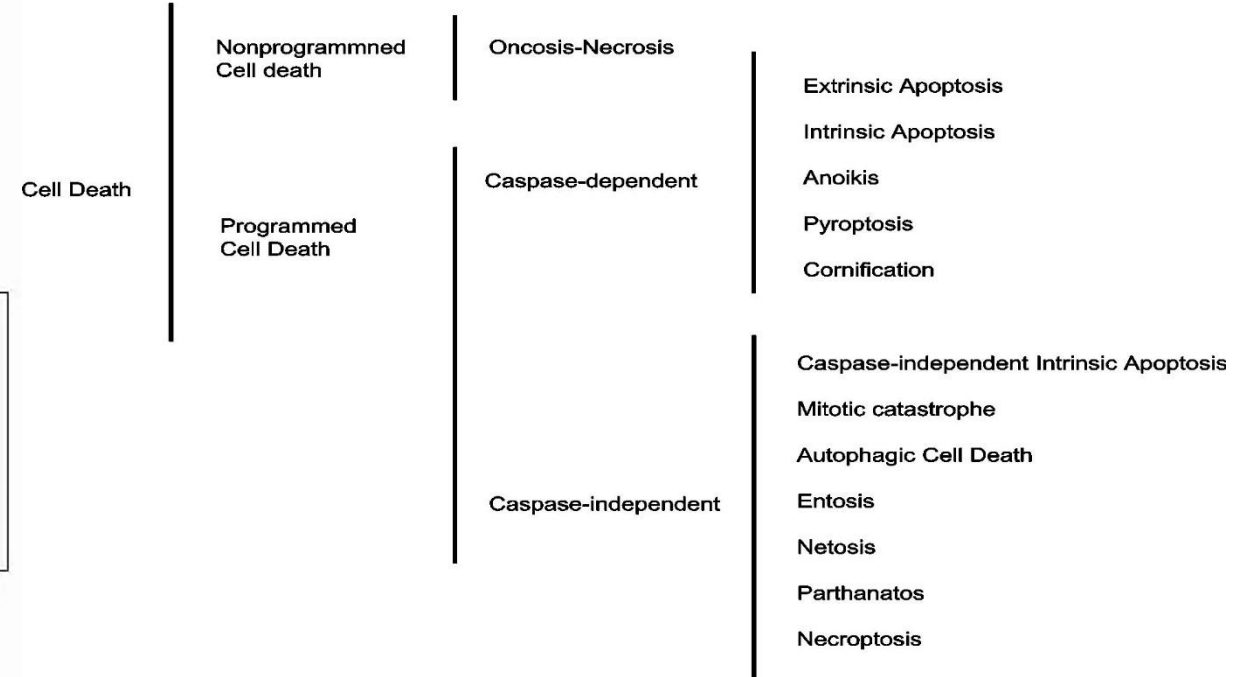
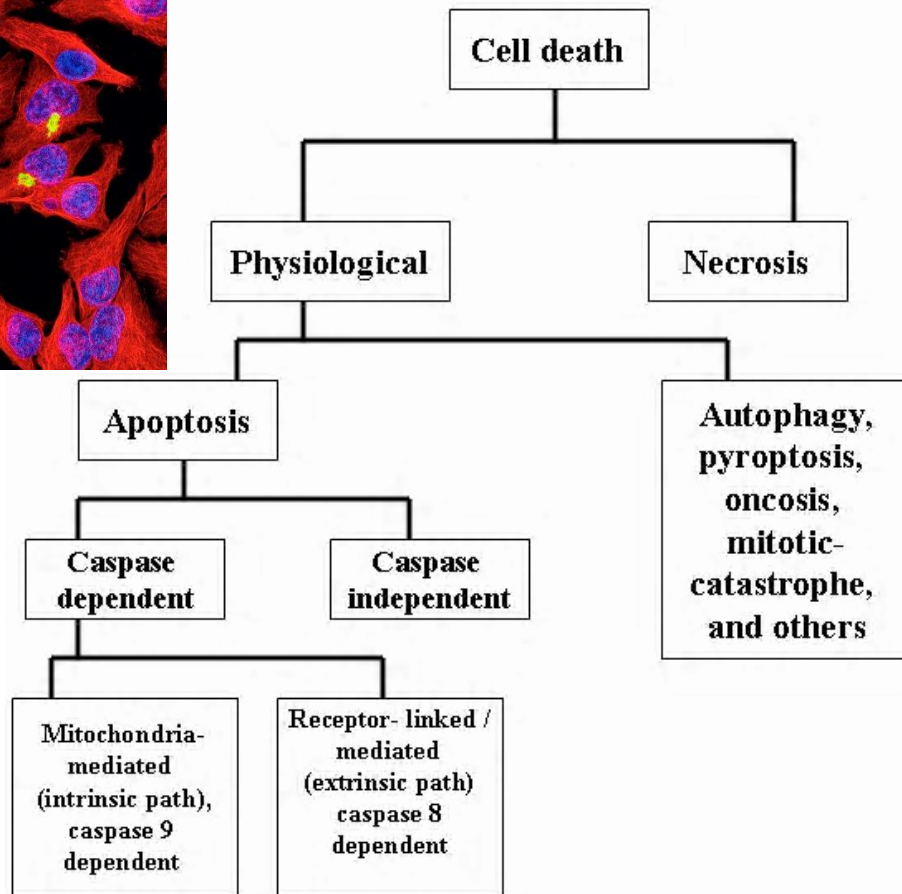
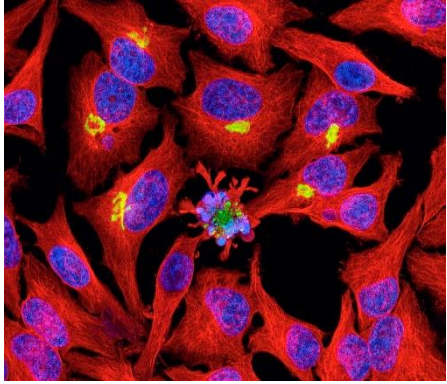


# Buněčná smrt



Current Aging Science Volume 10 , Issue 1 , 2017

# Buněčná smrt



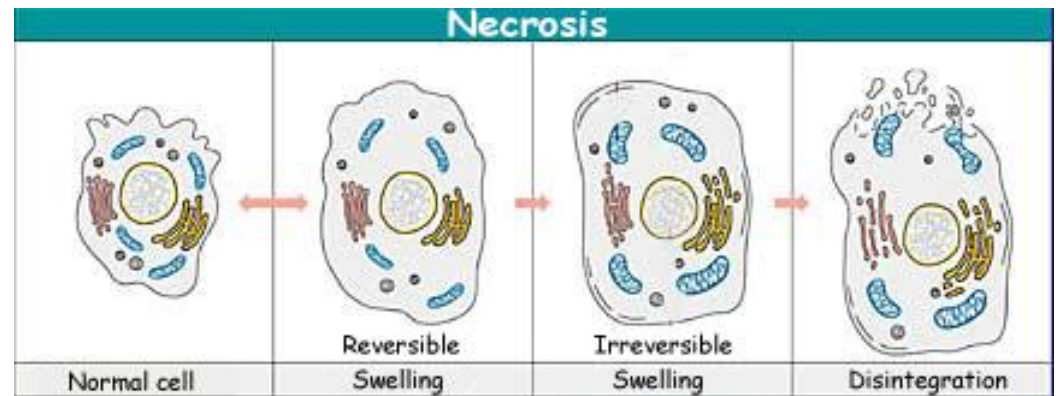
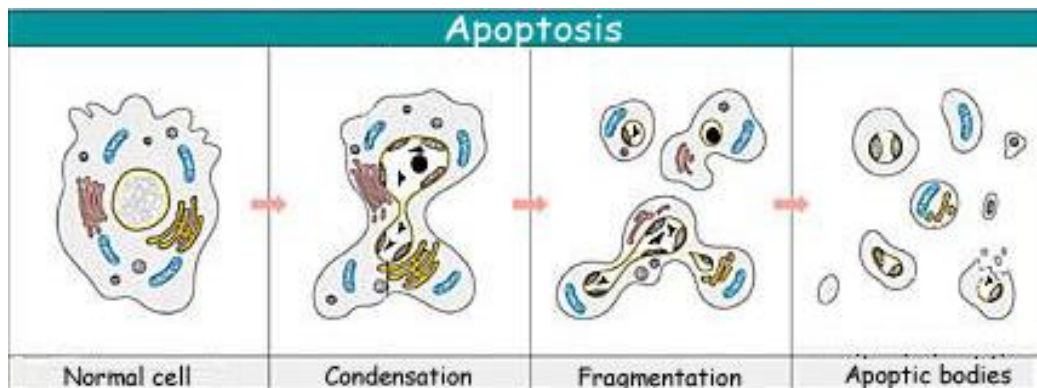
# Apoptóza versus nekróza

## Apoptóza:

programovaný proces  
kondenzace chromatinu - fragmentace jádra  
odbourání cytoskeletu („scvrknutí“ buňky)  
fragmentace chromozomální DNA (180 bp)  
mitochondrie zůstávají intaktní  
buněčná membrána se vychlipuje  
umírající buňka je fagocytována sousedními buňkami

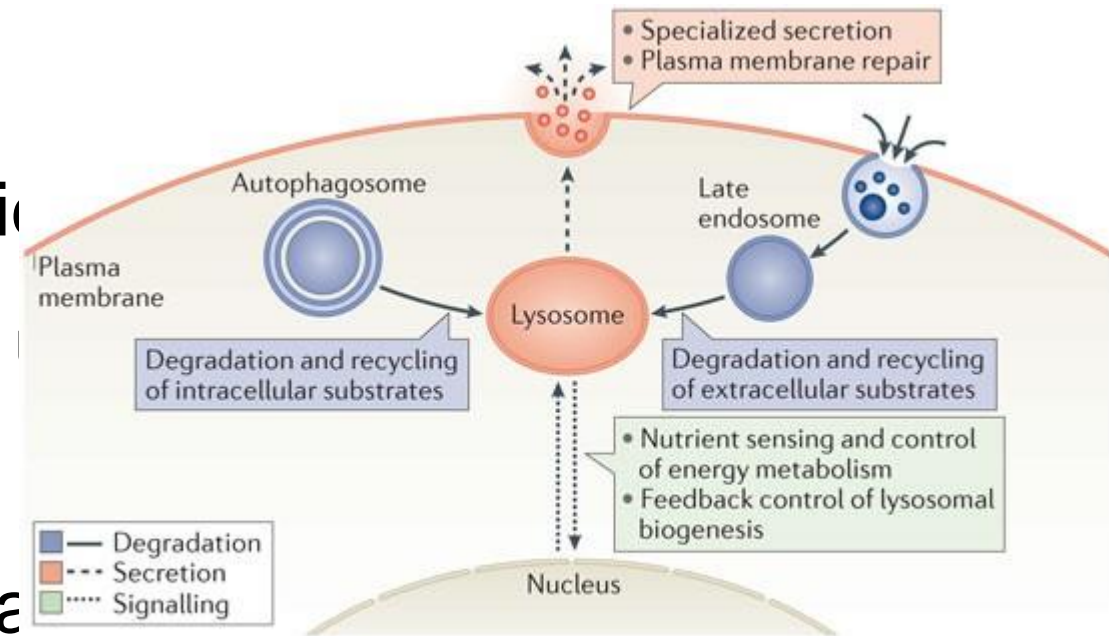
## Nekróza:

smrt buňky obvykle vyvolaná zraněním  
bobtnání organel  
poškození mitochondrií  
celková dezintegrace buňky  
uvolnění nitrobuněčných komponent  
vznik zánětu



# Signály z lysozomu: řídicí centrum pro buněčnou clearance a energetický metabolismus

- degradace a recyklace buněčného odpadu
- prostřednictvím endocytózy a autofagie
- Lysozomální a autofagická dysfunkce
  - lysosomal storage diseases (LSDs) and
  - common neurodegenerative diseases
- defektní buněčná clearance a akumulace toxického materiálu



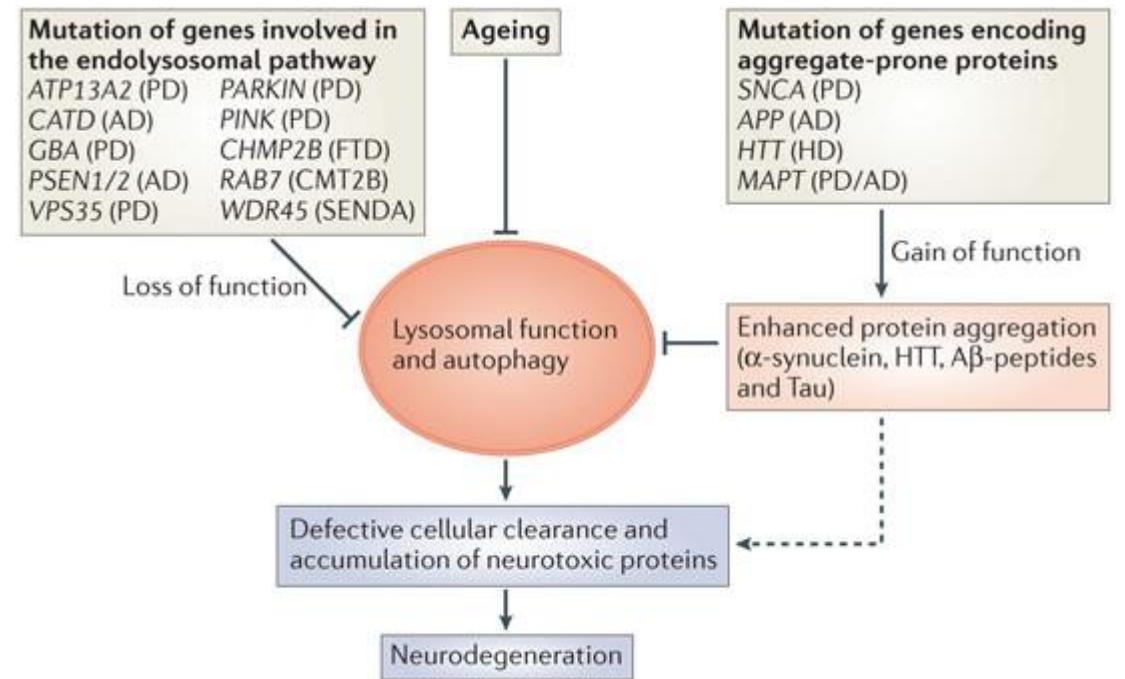
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 14, pages283–296(2013)



# Defektní buněčná clearance u neurodegenerativních onemocnění

- mutace se ztrátou funkce genů zapojených do lysozomálně-autofagické dráhy
- mutace se získáním funkce proteinů náchylných k agregátům
  - zvýšená agregace proteinů a poškození lysozomálně-autofagických drah

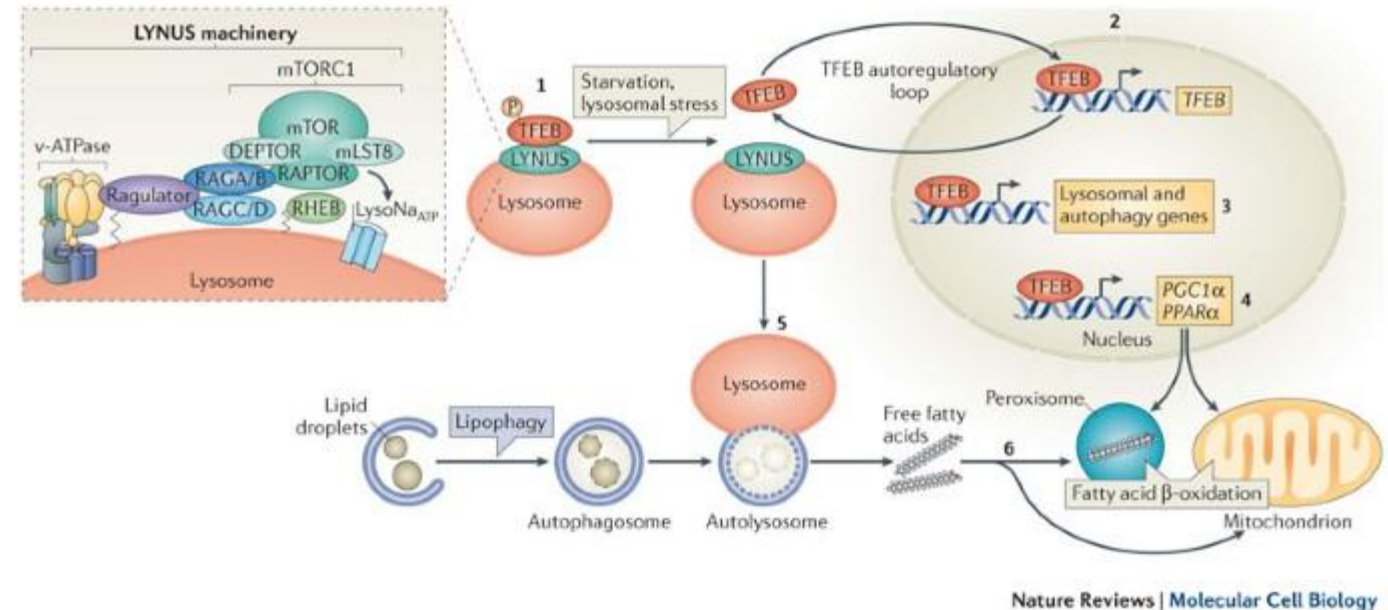


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 14, pages 283–296 (2013)

# Lysosomy a hladovění

- omezená dostupnost živin a zprostředkovává odpověď hladovění regulací katabolismu lipidů
- používají také nádorové buňky



Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 14, pages283–296(2013)

# Zánět

Zánět

Reakce akutní fáze

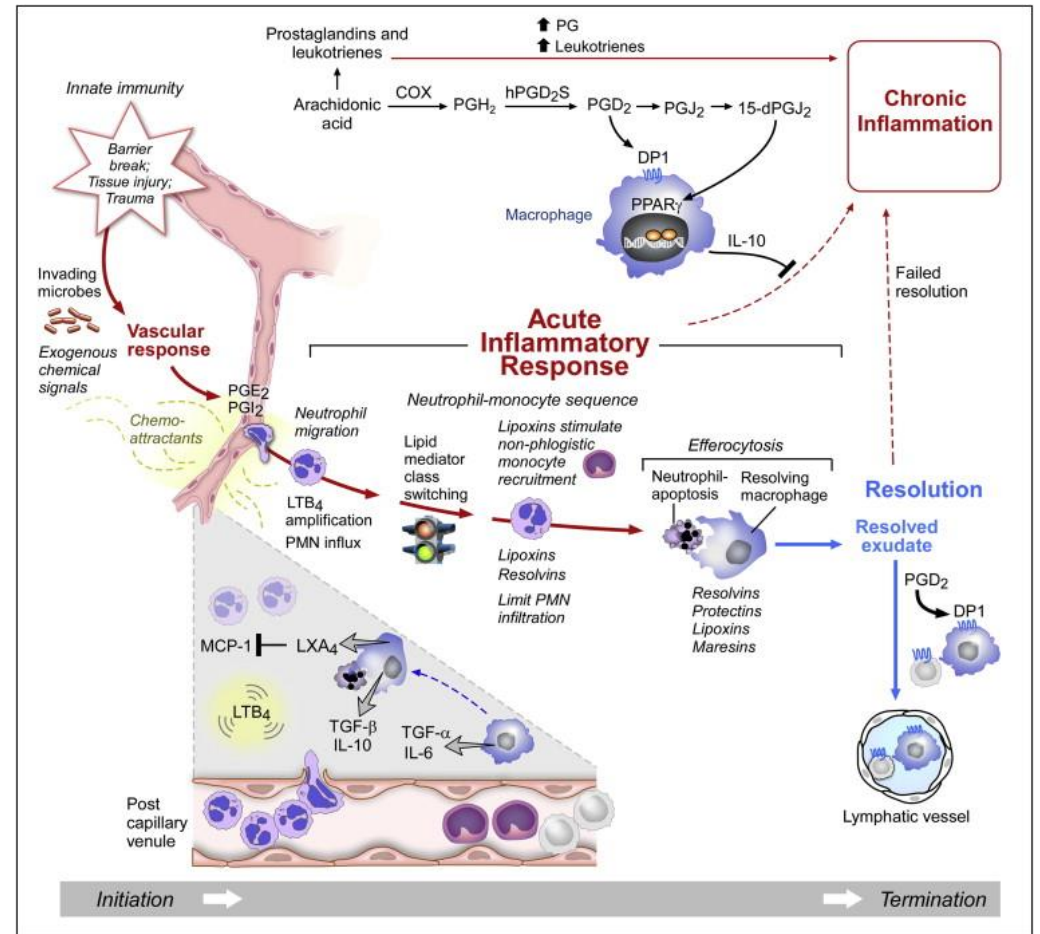
Cytokiny, chemokiny

# Zánět

- je soubor reakcí , které se objevují po tkáňovém poškození nebo infekci nebo imunologické stimulaci jako obrana proti cizím, nebo alterovaným vlastním substancím.
- Zánětlivé reakce zahrnují četné biochemické a celulární alterace, jejichž rozsah koreluje s rozsahem iniciálního traumatu. Nevhodná aktivace zánětlivých odpovědí jako bazální příčina nemocí.

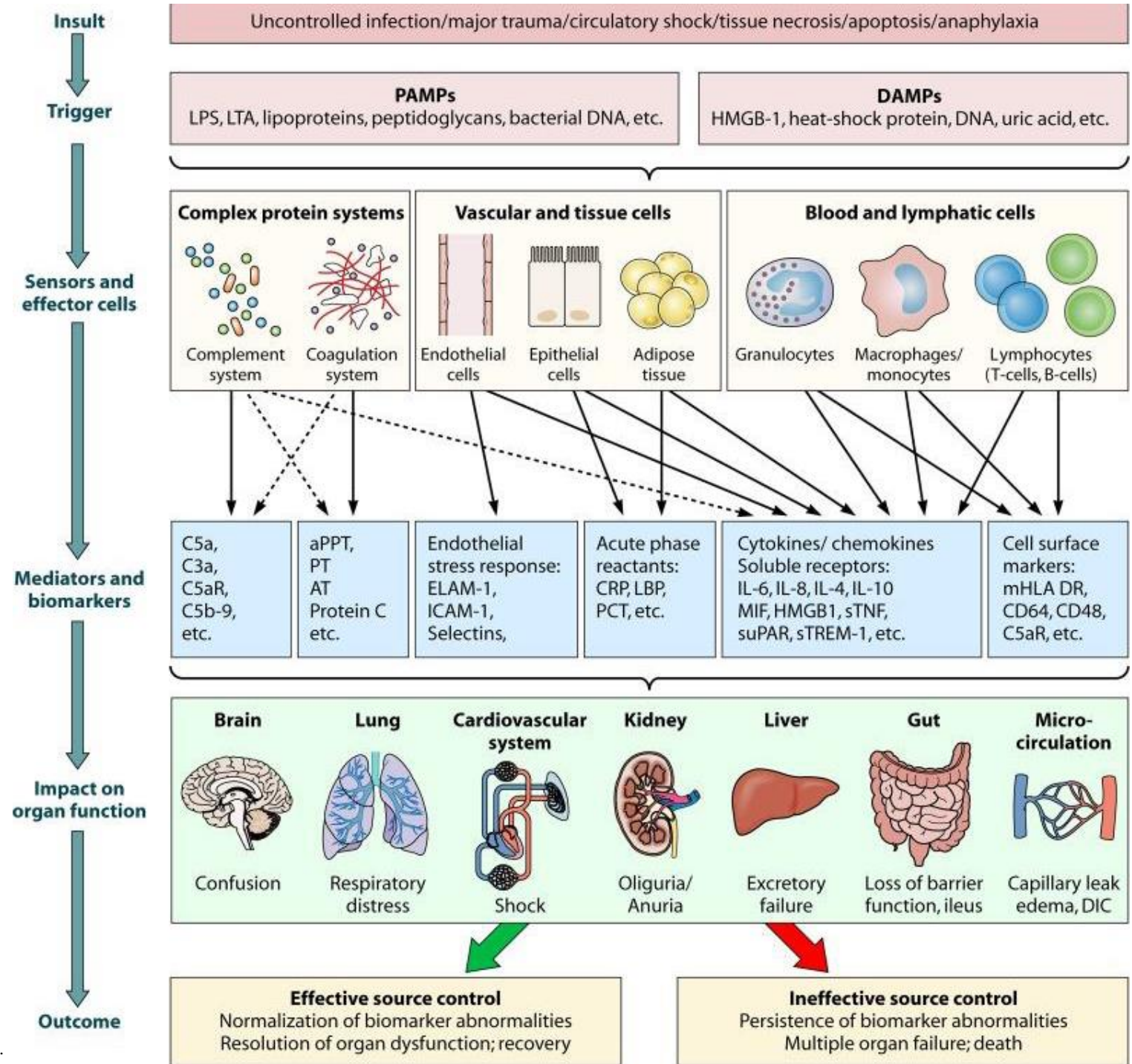
# Zánět

- Reakce živého organismu na poškození.
- 3 hlavní funkce:
  - Tvorba akutního zánětlivého exsudátu. Ten přináší proteiny, tekutinu a buňky z krve do poškozené oblasti, kde posiluje lokální obranyschopnost.
  - Destrukce a eliminace příčinného činitele (např. bakterií, pokud jsou přítomny).
  - Rozklad a likvidace poškozené tkáně (debris).



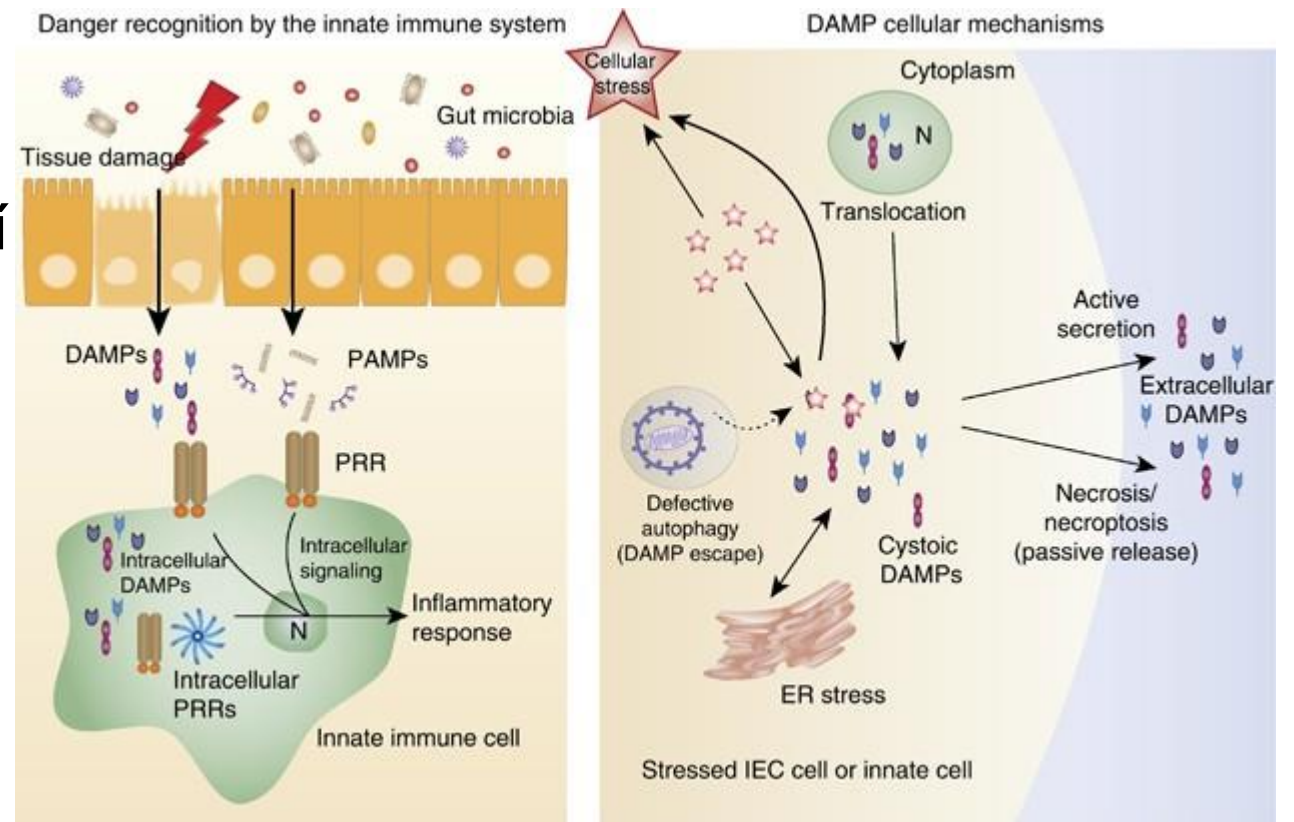
# Etiologie a patogeneze

- Fyzikální poškození
- Chemické látky
- Biologické poškození (např. mikroorganismy).



# Rozpoznání nebezpečí vrozeným imunitním systémem

- PRR, jako je TLR, NLR a RAGE, signalizuje nebezpečí spojené s infekcí prostřednictvím rozpoznání evolučně konzervovaných PAMP na patogenech nebo sterilního poškození prostřednictvím rozpoznání DAMP.
- Aktivace buněčného povrchu nebo intracelulárních PRR vede k intracelulární signalizaci a zánětlivým odpovědím

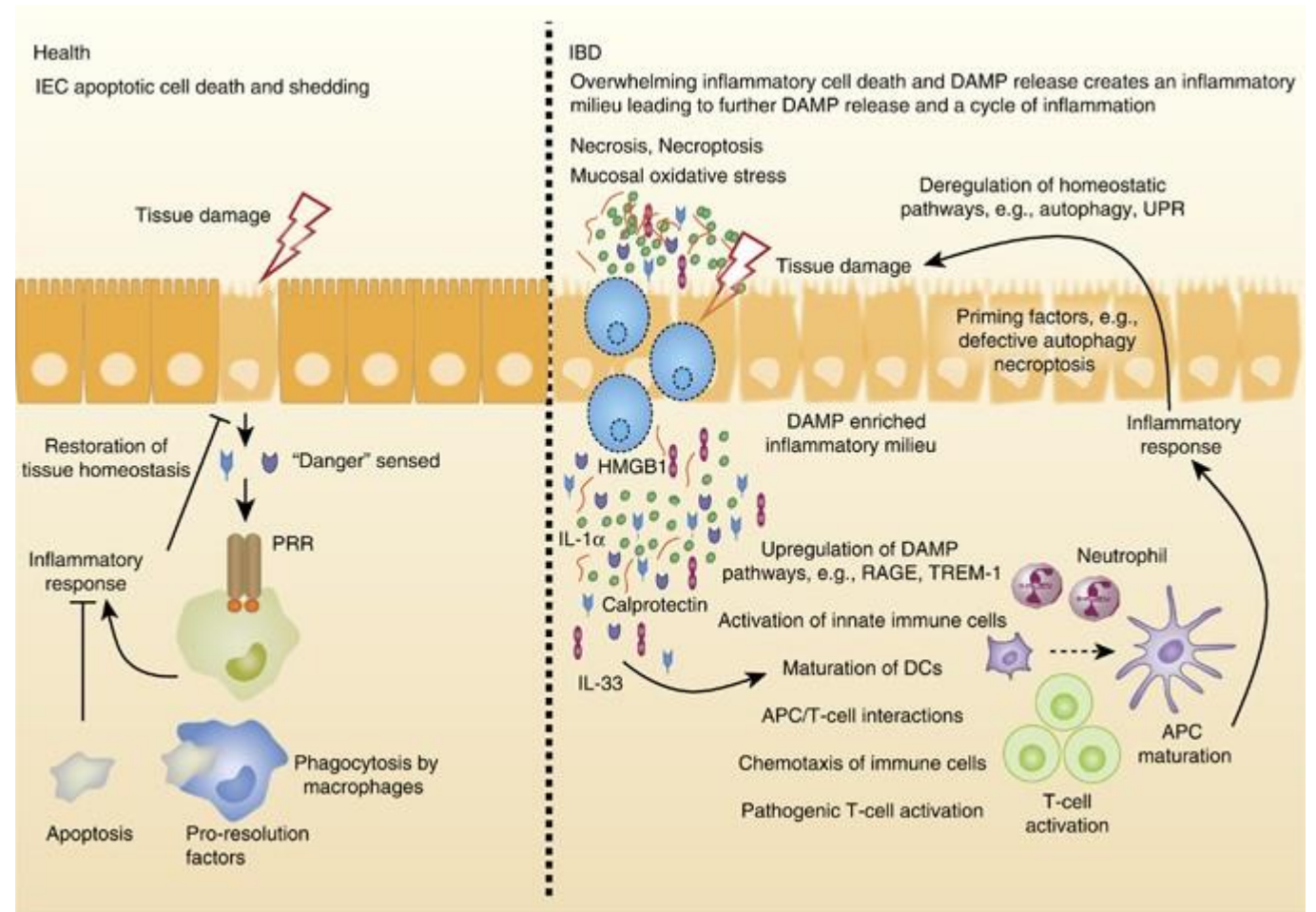


*Mucosal Immunology* volume 9, pages567–582 (2016)



# Příspěvek DAMP k zánětlivé odpovědi u IBD

- neapoptotická buněčná smrt, slizniční oxidační stres a deregulace homeostatických drah vedou k ohromujícímu uvolnění DAMP, což vytváří prozánětlivé prostředí



*Mucosal Immunology* volume 9, pages567–582 (2016)

# Typy zánětu

- Akutní
- Chronický
  
- Lokální
- Systémový

# SYSTÉMOVÉ A MÍSTNÍ KLINICKÉ SYMPTOMY AKUTNÍHO ZÁNĚTU

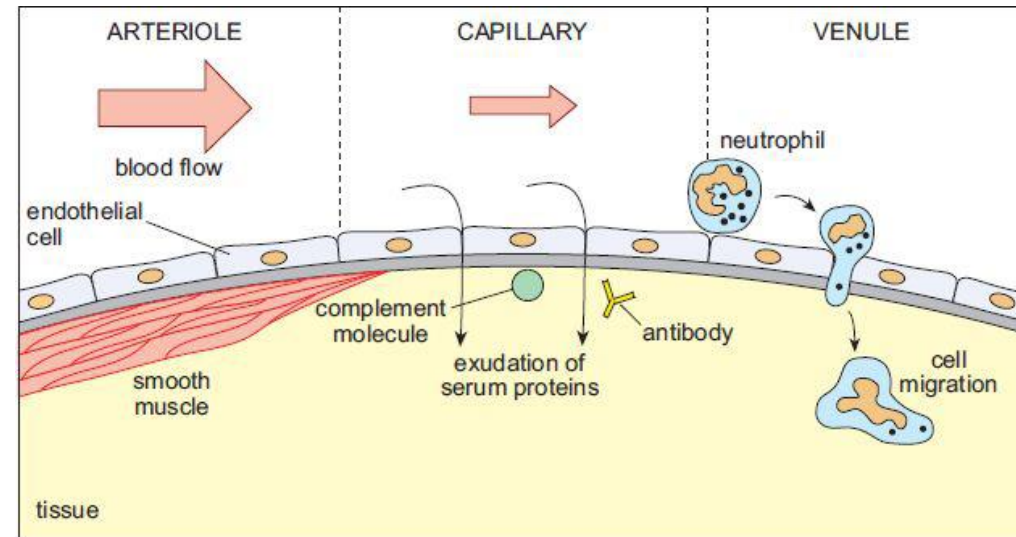
| Lokální příznaky | Systémové příznaky   |
|------------------|----------------------|
| calor            | horečka              |
| rubor            | tachykardie          |
| dolor            | hyperventilace       |
| tumor            | únavnost             |
| functio laesa    | ztráta chuti k jídlu |

# PŘÍZNAKY ZÁNĚTU A KORESPONDUJÍCÍ CHEMICKÉ MEDIÁTORY

| Zánětlivá odpověď          | Chemický mediátor                               |
|----------------------------|---|
| Otok, zčervenání, zteplání | Histamin, PG, LT, bradykinin                    |
| Tkáňové poškození          | Lysosomy, látky z M a dalších zánětlivých buněk |
| Chemotaxe                  | Komplement, chemokiny                           |
| Bolest                     | Prostaglandiny, bradykinin                      |
| Horečka                    | IL-1 a IL-6                                     |
| Leukocytóza                | TNF a IL-8                                      |

# Lokální zánětlivé reakce

- Zvýšený průtok krve oblastí poškození
- Zvýšení permeability cév
- Řízený a přímý influx a selektivní akumulace různých efektorových buněk z periferní krve v místech poškození
  - a/rychlá, nespecifická(antigenně) fagocytární odpověď-neutrofily
  - b/pozdní odpověď- monocyty- makrofágy, specifické T a B lymfocyty+ exsudace plasmy



# Dynamika zánětlivé reakce

- Aktivované zánětlivé buňky (M-M, T,B lymfocyty) samy produkují protektivní a prozánětlivé molekuly.
- Zánětlivé buňky exprimují zvyšující se počet buněčných povrchových proteinů a glykoproteinů, tzv. adhesivních molekul.
- Aktivované endoteliální buňky exprimují receptory pro adhesivní molekuly. Počet těchto receptorů je regulován a umožňuje precizní směrování požadovaného počtu cirkulujících leukocytů do místa zánětu.
- Celulární přichycení (“attachment”) imunitních buněk k endotelu v cévách v oblasti zánětu zabraňuje možnosti, že by mohly místo zánětu minout, a je klíčovým krokem pro extravazaci.

# AKUTNÍ ZÁNĚT-TYPY PODLE EXSUDÁTU

- Serózní
- Katarální
- Fibrinózní
- Hemorhagický
- Purulentní
- Membranózní
- Pseudomembranózní
- Nekrotizující (gangrenózní) zánět

# SYSTÉMOVÉ MANIFESTACE ZÁNĚTU

1. Horečka
2. Reakce akutní fáze



opsonin

Like the inflammation marker C Reactive Protein (CRP)

Justin Root



# PŘÍZNAKY ZÁNĚTU A KORESPONDUJÍCÍ CHEMICKÉ MEDIÁTORY

| Zánětlivá odpověď          | Chemický mediátor                               |
|----------------------------|---|
| Otok, zčervenání, zteplání | Histamin, PG, LT, bradykinin                    |
| Tkáňové poškození          | Lysosomy, látky z M a dalších zánětlivých buněk |
| Chemotaxe                  | Komplement, chemokin                            |
| Bolest                     | Prostaglandiny, bradykinin                      |
| Horečka                    | IL-1 a IL-6                                     |
| Leukocytóza                | TNF a IL-8                                      |

# Systemové manifestace zánětu

## → Horečka

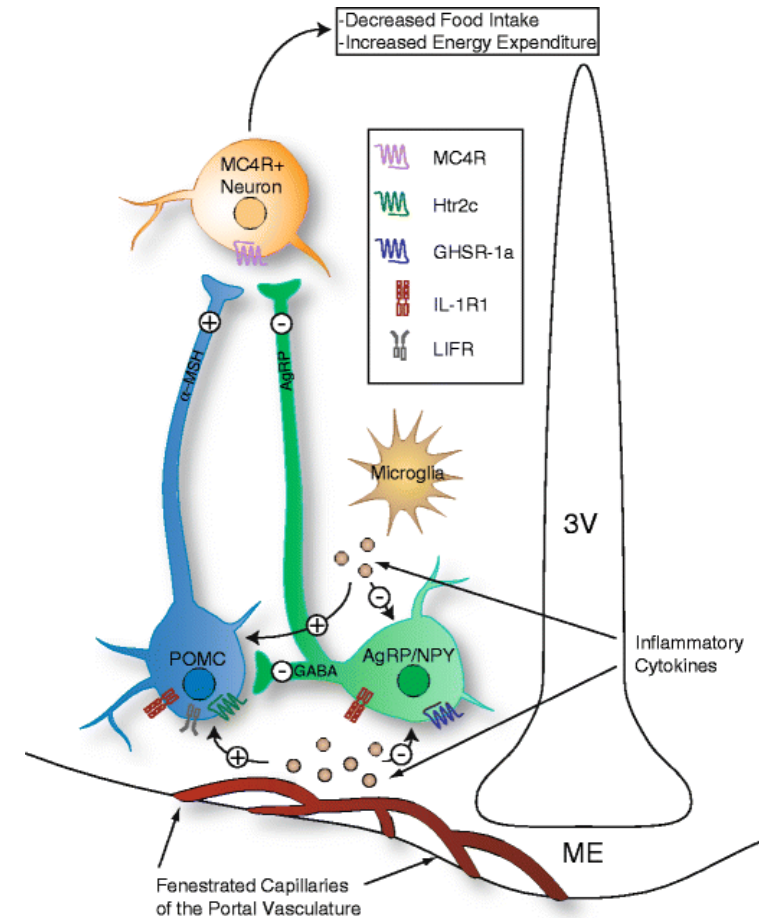
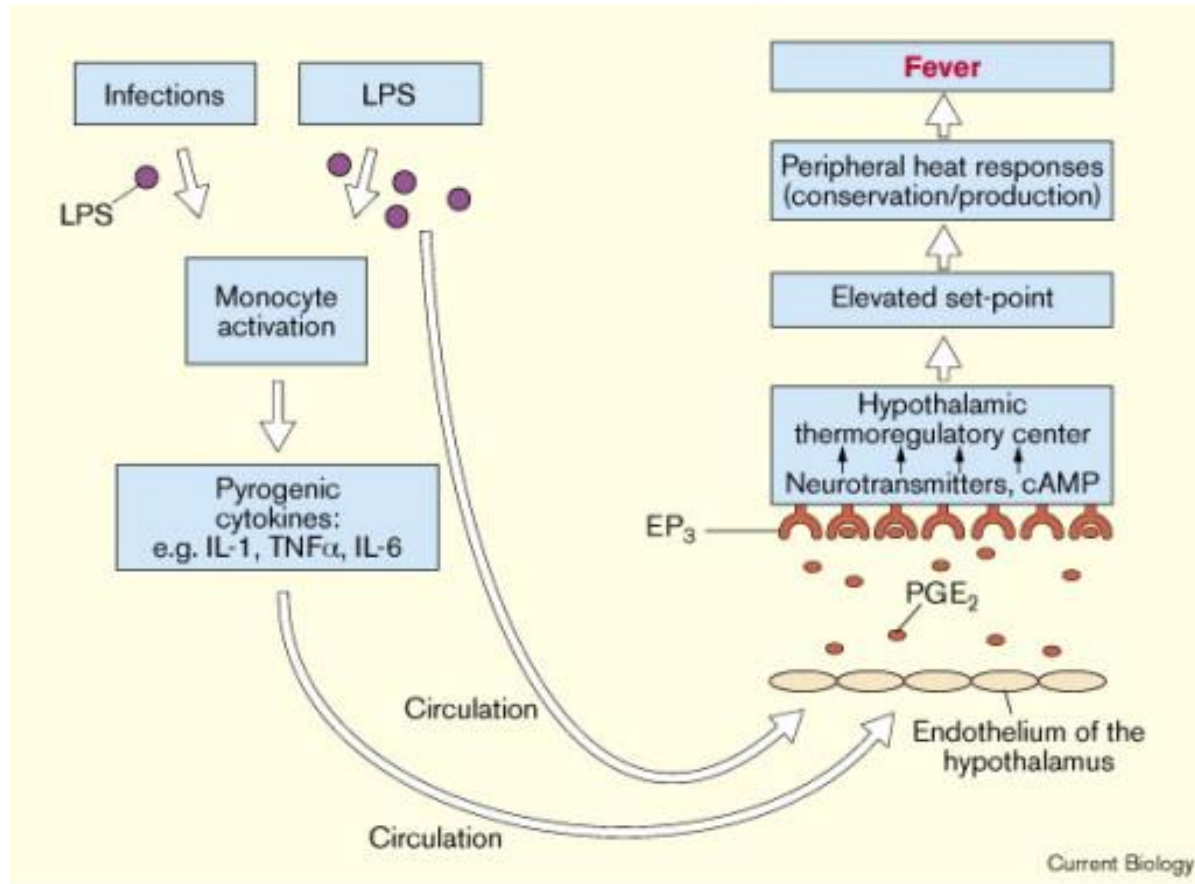
Polymorfonukleáry a makrofágy produkují endogenní pyrogeny, které resetují termoregulační centrum v hypotalamu na vyšší teplotu. Uvolnění endogenních pyrogenů je stimulováno fagocytózou, endotoxiny a imunitními komplexy.

## → Klinické symptomy

Únava, anorexie, nausea. Ztráta hmotnosti u chronického zánětu.

Zduření lokálních nebo systémových lymfatických uzlin se objevuje pravidelně; splenomegálie u některých specifických infekcí (např. malárie, infekční mononukleóza).

# Systemové manifestace zánětu



# SYSTÉMOVÉ PŘÍZNAKY AKUTNÍHO ZÁNĚTU

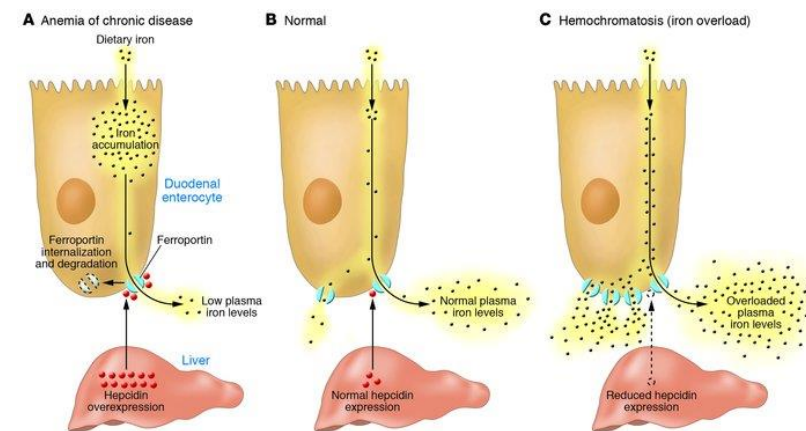
## – Hematologické změny

- Zrychlená sedimentace erytrocytů. Častý nespecifický příznak systémového zánětu.
- Leukocytóza
- Neutrofilie se objevuje u pyogenních infekcí a tkáňové destrukci; eozinofilie u parazitárních infekcí;
- Lymfocytóza u chronických infekcí (např. TBC), u mnoha virálních infekcí
- Monocytóza u infekční endokarditidy a některých bakteriálních infekcí (TBC)
- Anémie
  - Ztráta do zánětlivého exsudátu (ulcerativní kolitis);
  - Hemolýza (v přítomnosti bakteriálních toxinů)
  - „anémie u chronických zánětlivých onemocnění“ jako důsledek toxického útlumu kostní dřeně.

## – Amyloidóza

- Dlouhotrvající chronický zánět (např. u revmatoidní artritidy) může zvýšit sérový amyloid A protein (SAA), což může vést k depozici amyloidu do tkání

# Anémie chronických chorob vs. anémie z nedostatku železa



*J Clin Invest.* 2007;117(7):1755-1758. <https://doi.org/10.1172/JCI32701>.

|                              | Anémie chronických chorob | Anémie z nedostatku železa |
|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Serum Iron                   | Reduced                   | Reduced                    |
| Transferrin                  | Reduced to normal         | Increased                  |
| Transferrin Saturation       | Reduced                   | Reduced                    |
| Ferritin                     | Normal to increased       | Reduced                    |
| Soluble transferrin receptor | Normal                    | Increased                  |
| Cytokine level               | Increased                 | Normal                     |
| Hepcidin                     | Increased                 | Reduced                    |
| Bone marrow iron stores      | Normal to increased       | Reduced                    |
| Erythrocytes                 | Normal, microcytes        | Microcytes                 |

| Změny při zánětu | Zvýšení  | Pokles   |
|------------------|--|--|
| Buněčné          | Fagocytující buňky<br>(v krvi i místně)  | Erytrocyty   |
| Metabolické      | Proteiny akutní fáze<br>serová Cu<br>katabolismus bílkovin<br>glukoneogeneze     | Sérové Fe, sérový Zn<br>syntéza albuminu<br>transtyretin, transferin |
| Endokrinní       | glukagon<br>insulin<br>ACTH<br>GH<br>T4<br>kortisol<br>aldosteron<br>vasopressin | T3<br>TSH  |

# Reakce akutní fáze

- Je systémová reakce na lokální nebo systémový imunologický stres způsobený infekcí, tkáňovým poškozením, traumatem nebo neoplastickým růstem.
- V místě léze uvolňují lokální prozánětlivé buňky neutrofilů a makrofágy- prozánětlivé cytokiny (TNF- $\alpha$ / $\beta$ , IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , IL-6, INF- $\alpha$ / $\gamma$  a IL-8) do krve.
- Tyto cytokiny aktivují různé cílové buňky, což vede k aktivaci hypotalamu, redukci sekrece růstového hormonu a dalším dějům charakterizovaným jako horečka, anorexie a katabolismus svalových buněk.
- Při dostatečně vysoké hladině prozánětlivých cytokinů (zejména IL-6) v periferní krvi játra odpovídají změnou exprese proteinů akutní fáze.

# Reakce akutní fáze

- Metabolické změny: pokles LDL a HDL v krvi, nárůst ACTH a glukokortikoidů, aktivace komplementu, pokles hladin  $\text{Ca}^{++}$ , Zn, Fe, vitaminů rozpustných v tucích a změny v koncentracích proteinů akutní fáze.
- Smysl reakce: zábrana mikrobiálního růstu a pomoc při obnově homeostázy (limitace poškození navozených vlastním zánětlivým procesem).



# Proteiny akutní fáze

- Je třída proteinů, jejichž plasmatická koncentrace stoupá (**pozitivní proteiny akutní fáze**) nebo klesá (**negativní proteiny akutní fáze**) v odpovědi na tkáňové poškození.
- Tato reakce se nazývá reakce akutní fáze (AFR).

TABLE 1. HUMAN ACUTE-PHASE PROTEINS.

**Proteins whose plasma concentrations increase**

Complement system  
C3  
C4  
C9  
Factor B  
C1 inhibitor  
C4b-binding protein  
Mannose-binding lectin  
Coagulation and fibrinolytic system  
Fibrinogen  
Plasminogen  
Tissue plasminogen activator  
Urokinase  
Protein S  
Vitronectin  
Plasminogen-activator inhibitor 1  
Antiproteases  
 $\alpha_1$ -Protease inhibitor  
 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin  
Pancreatic secretory trypsin inhibitor  
Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitors  
Transport proteins  
Ceruloplasmin  
Haptoglobin  
Hemopexin  
Participants in inflammatory responses  
Secreted phospholipase A<sub>2</sub>  
Lipopolysaccharide-binding protein  
Interleukin-1-receptor antagonist  
Granulocyte colony-stimulating factor  
Others  
C-reactive protein  
Serum amyloid A  
 $\alpha_2$ -Acid glycoprotein  
Fibronectin  
Ferritin  
Angiotensinogen

**Proteins whose plasma concentrations decrease**

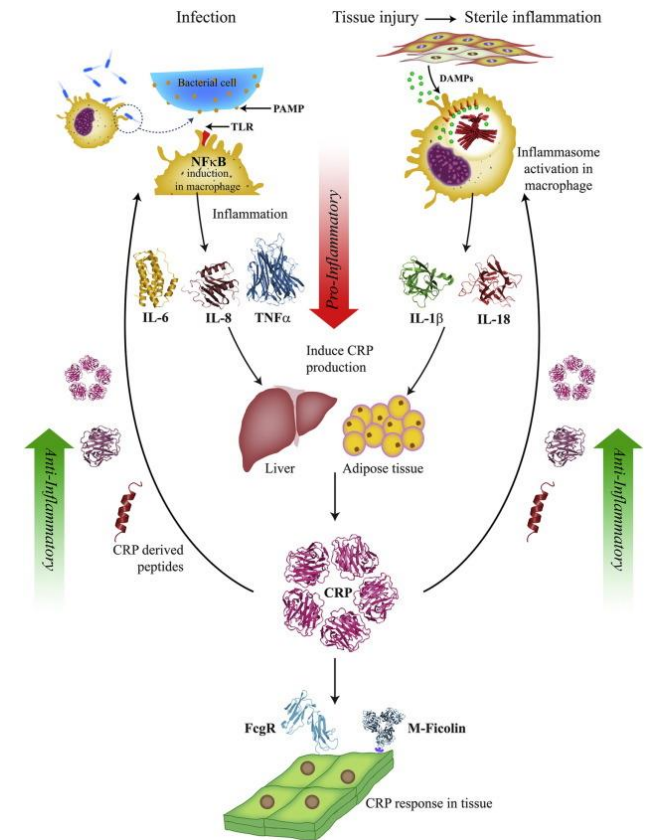
Albumin  
Transferrin  
Transthyretin  
 $\alpha_2$ -HS glycoprotein  
Alpha-fetoprotein  
Thyroxine-binding globulin  
Insulin-like growth factor I  
Factor XII

# Pozitivní proteiny akutní fáze

- (1) ceruloplasmin a složka komplementu C3
- (2) haptoglobin, fibrinogen, a-globuliny a LPS-binding proteinázy
- (3) C-reaktivní protein a sérový amyloid A

## – Funkce:

- Oponizace a vylučování bakterií a jejich produktů
- Aktivace komplementu
- Vylučování volného hemoglobinu a radikálů

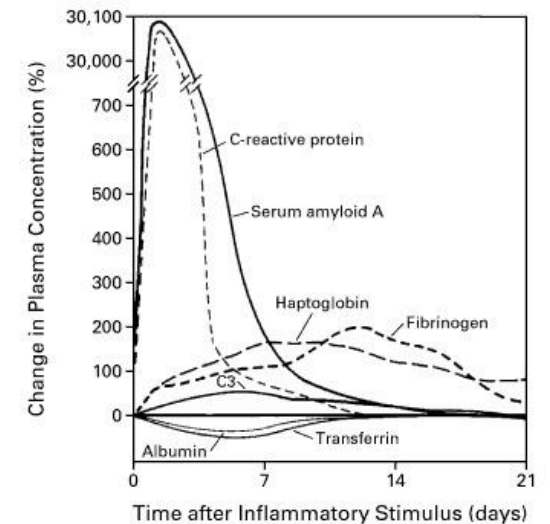
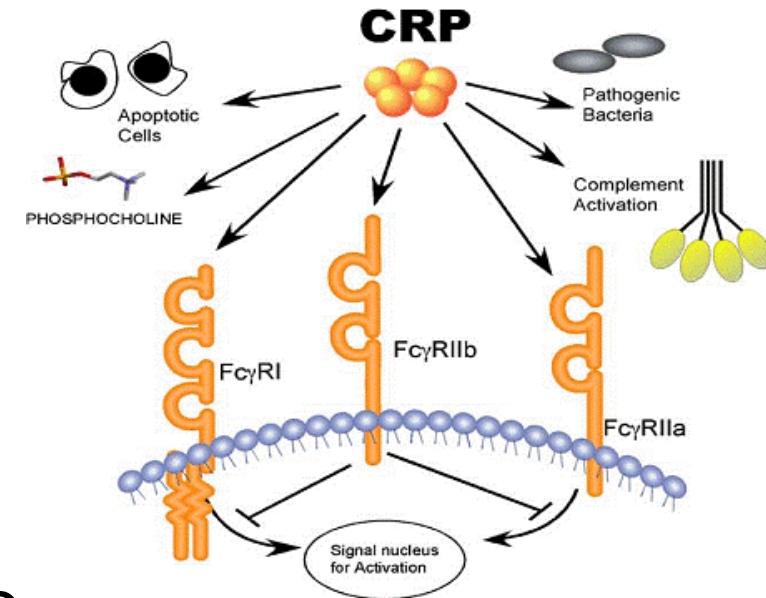


Biotechnology Advances Volume 34, Issue 3, May–June 2016

| <b>Funkce</b>                          | <b>Protein akutní fáze</b>                              | <b>Nárůst v průběhu</b> |
|--|---|-------------------------|
| Inhibitory proteáz                     | Alfa 1-antitrypsin                                      | 4 x                     |
|  | Alfa 1-antichymotrypsin                                 | 6 x                     |
| Koagulační proteiny (serin proteinázy) | fibrinogen<br>prothrombin<br>factor VIII<br>plasminogen | 8 x                     |
| Složky komplementu                     | C1s<br>C2b<br>C3, C4, C5<br>C9<br>C5b                   | 2 x                     |
| Transportní proteiny                   | haptoglobin   | 8 x                     |
|  | hemopexin   | 2 x                     |
|  | feritin   | 4 x                     |
| Scavengerové proteiny                  | ceruloplasmin   | 4 x                     |
| Různé                                  | alfa1-kyselý glykoprotein (orosomukoid)                 | 4 x                     |
|  | serum amyloid A protein                                 | 1000 x                  |
|  | C-reactive protein                                      | 1000 x                  |

# C-reaktivní protein

- CRP aktivuje komplement
- CRP se váže na chromatin pocházející z mrtvých buněk a na zbytky buněk, který je nutno z cirkulace odstranit fagocytózou, a to přímo, vazbou na receptory Fc, C3b nebo CRP.
- Inhibice destičkové agregace snižuje riziko trombózy.
- CRP se váže na LDL.

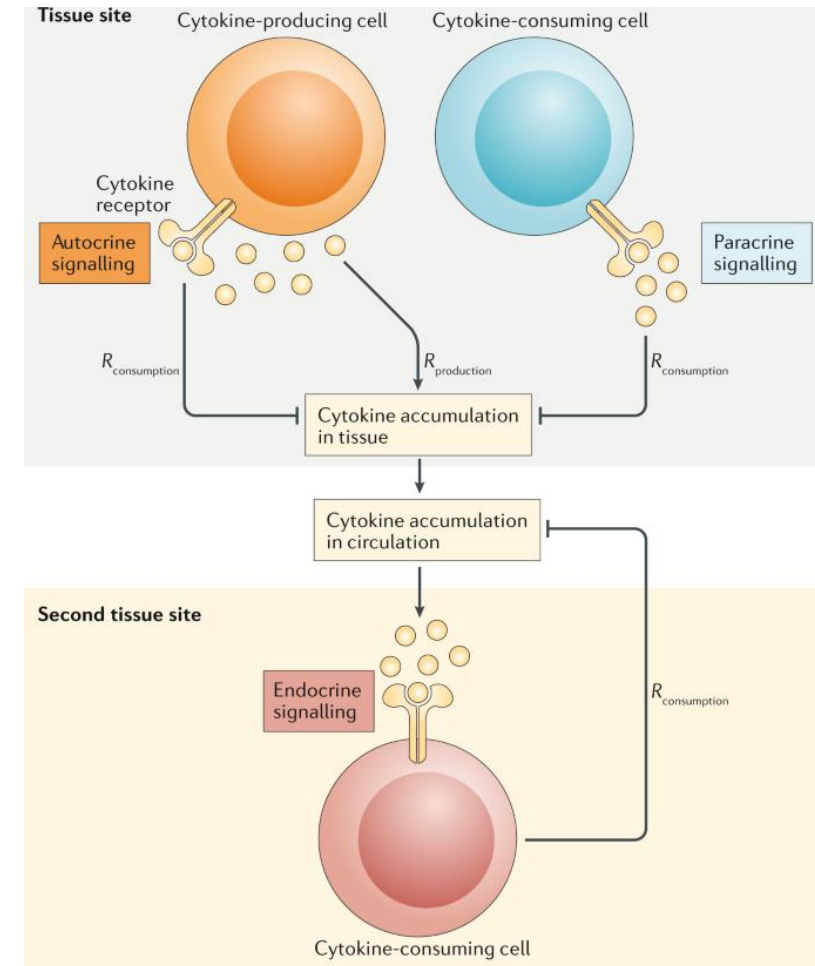


# Negativní proteiny akutní fáze

- Pokles albuminu, transferinu, kortisol-binding globulinu, transthyretinu a vitamin A binding proteinu vedou dočasně ke zvýšené nabídce volných hormonů, které se na tyto bílkoviny obvykle vážou.
- Transthyretin (prealbumin vážící thyroxin, transportuje hormony štítné žlázy z plexus choroideus do mozkomíšního moku) inhibuje produkci IL-1 $\beta$  monocyty a endoteliálními buňkami. Jeho pokles je tedy možno považovat za prozánětlivý mechanismus. Tyto změny krevních bílkovinných profilů zřejmě částečně souvisí s hladověním a katabolismem ve svalech. Jde také o nabídku aminokyselin pro produkci pozitivních proteinů akutní fáze.

# Cytokiny

- Definice je problematická. Podle dnešních kritérií se považuje za generické jméno velmi variabilní skupiny solubilních proteinů a peptidů, které fungují jako humorální působky v piko- až nM koncentracích a které modulují funkční aktivity jednotlivých buněk a tkání za fyziologických a patofyziologických podmínek. Tyto procesy také modifikují interakci mezi buňkami přímo a ovlivňují procesy v extracelulární matrix.



*Nature Reviews Immunology* **volume 19**, pages205–217(2019)

# Cytokiny

- Působí také jako růstové faktory (mitogenně nebo antimitogenně), jako celulární „survival“ faktory (zabraňující apoptóze) a jako faktory transformační.
- Glykoproteiny sekretované buňkami klasickými sekrečními cestami. Mnohé ve formě vázané na membrány. Rovnováha mezi solubilními a membránovými formami zřejmě sama o sobě regulujícím faktorem. Většina se neskládá v buňkách (kromě TGF $\beta$  a PDGF v destičkách).

# Rozdíly mezi cytokiny a peptidovými hormony

- Cytokiny působí na širší spektrum buněk než hormony
- Cytokiny nejsou produkovány specializovanými buňkami organizovanými do specializovaných žláz
- Místa jejich sekrece primárně neurčují místo jejich cílového působení (některé cytokiny jsou totožné s enzymy-PD-ECGF)



# Cytokiny

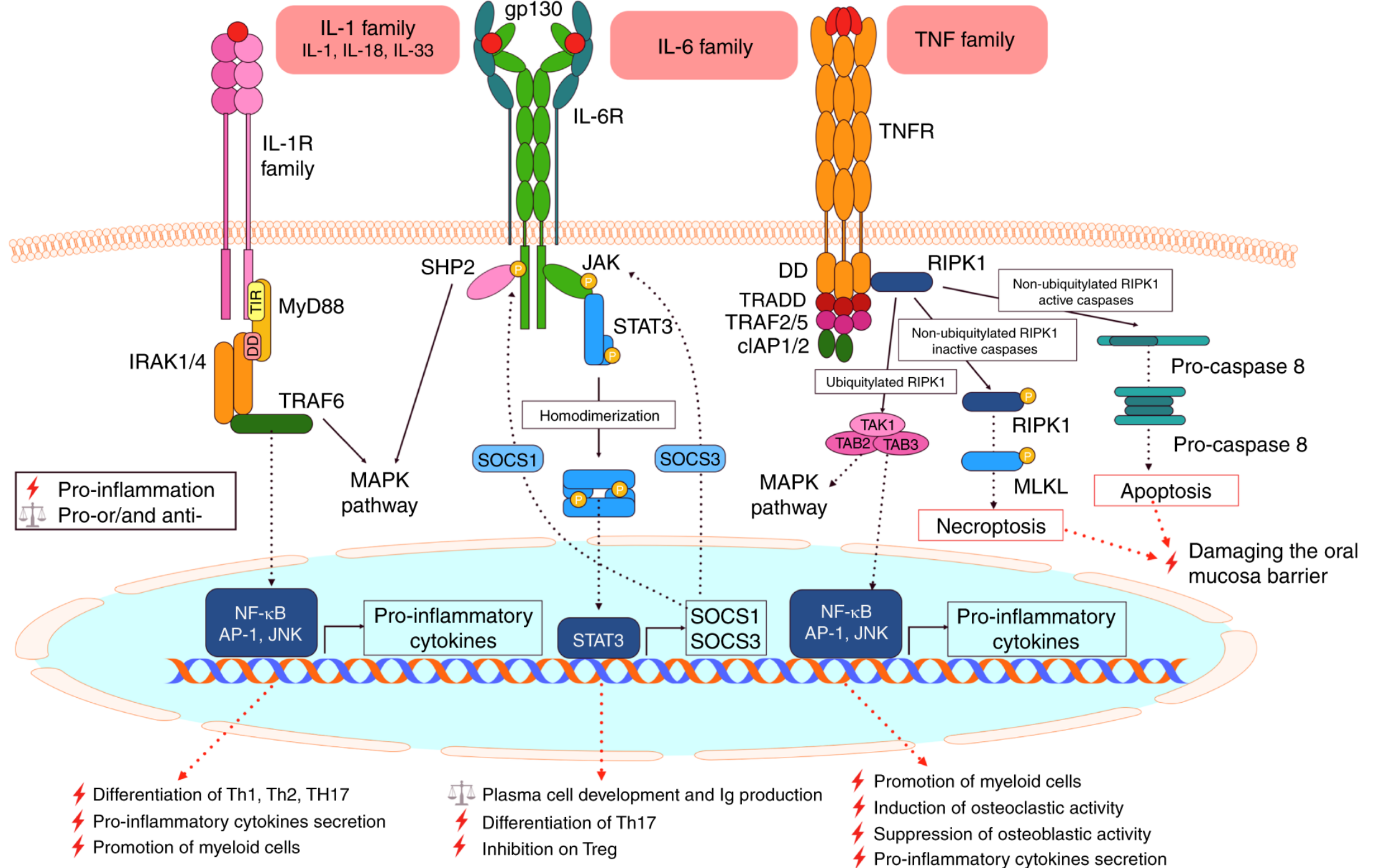
➤ Nenavozují odpověď přímo. Stimulují nebo inhibují produkci specifických DNA vazných proteinů, které kontrolují expresi dalších genů. Cytokin ve vazbě na receptor vyvolává (hod) expresi ***immediate early response genes (IEG)***, několik set). Genové produkty těchto genů se pak vážou na promotorové elementy tzv. ***delayed early response genes (DEG)***.

# Cytokiny

- ***pleiotropní***, tj. vykazují několikeré biologické aktivity.
- Cytokiny s mnohonásobnými účinky se často ve svých aktivitách přesahují a jednotlivé buňky vstupují do interakce s nimi zdánlivě identickým způsobem.
- Jsou tedy ***funkčně nahraditelné, nebo alespoň částečně funkčně kompenzovatelné.***

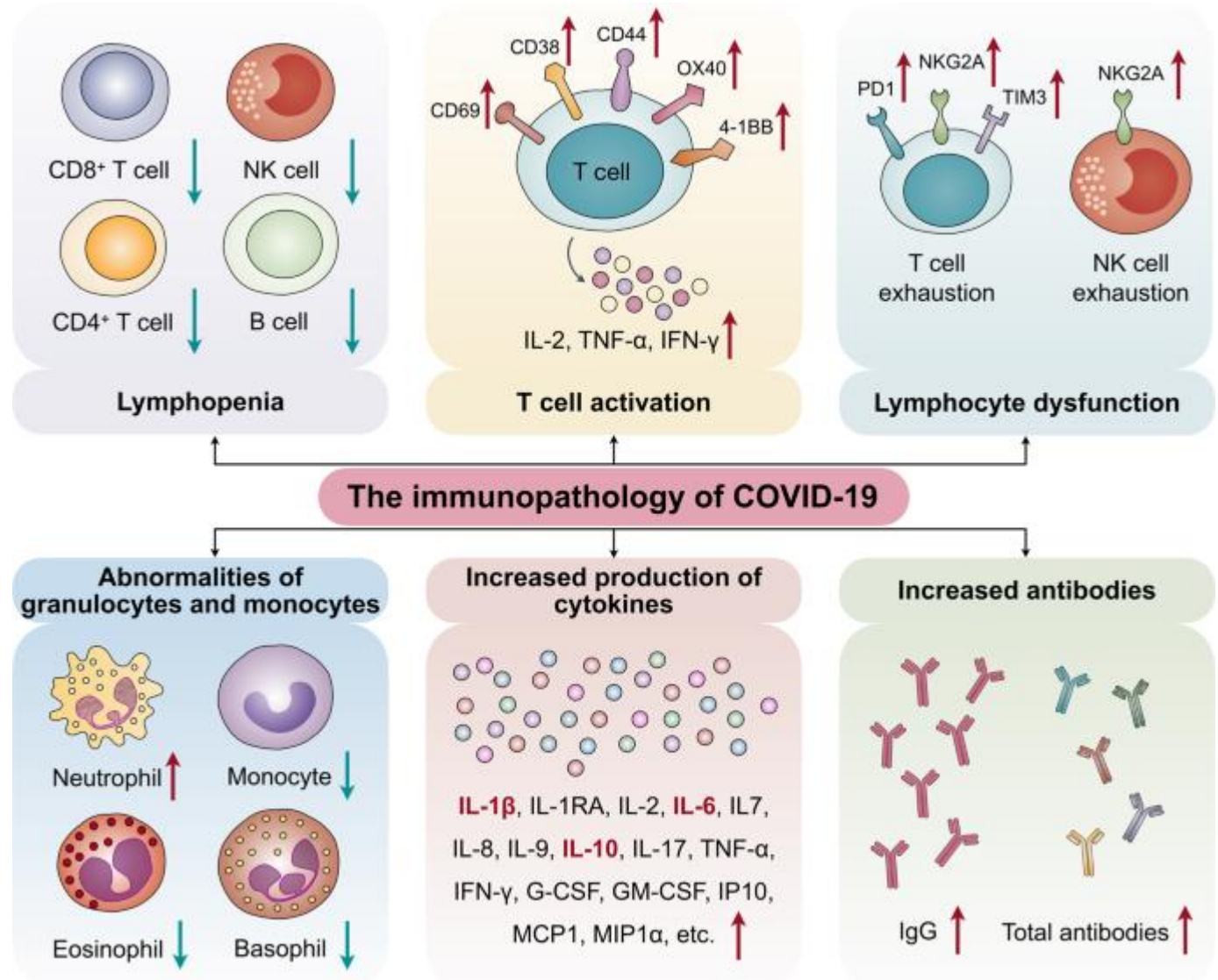
# Cytokiny

- Účinné modulátory během embryogeneze a organogeneze. Jejich aktivity v pozdějším životě se mohou od působení v tomto období výrazně lišit.
- Typy cytokinů (nazvy často podle buněčného původu nebo první objevené funkce:
- Interleukiny, lymfokiny, monokiny, interferony, CSF aj.

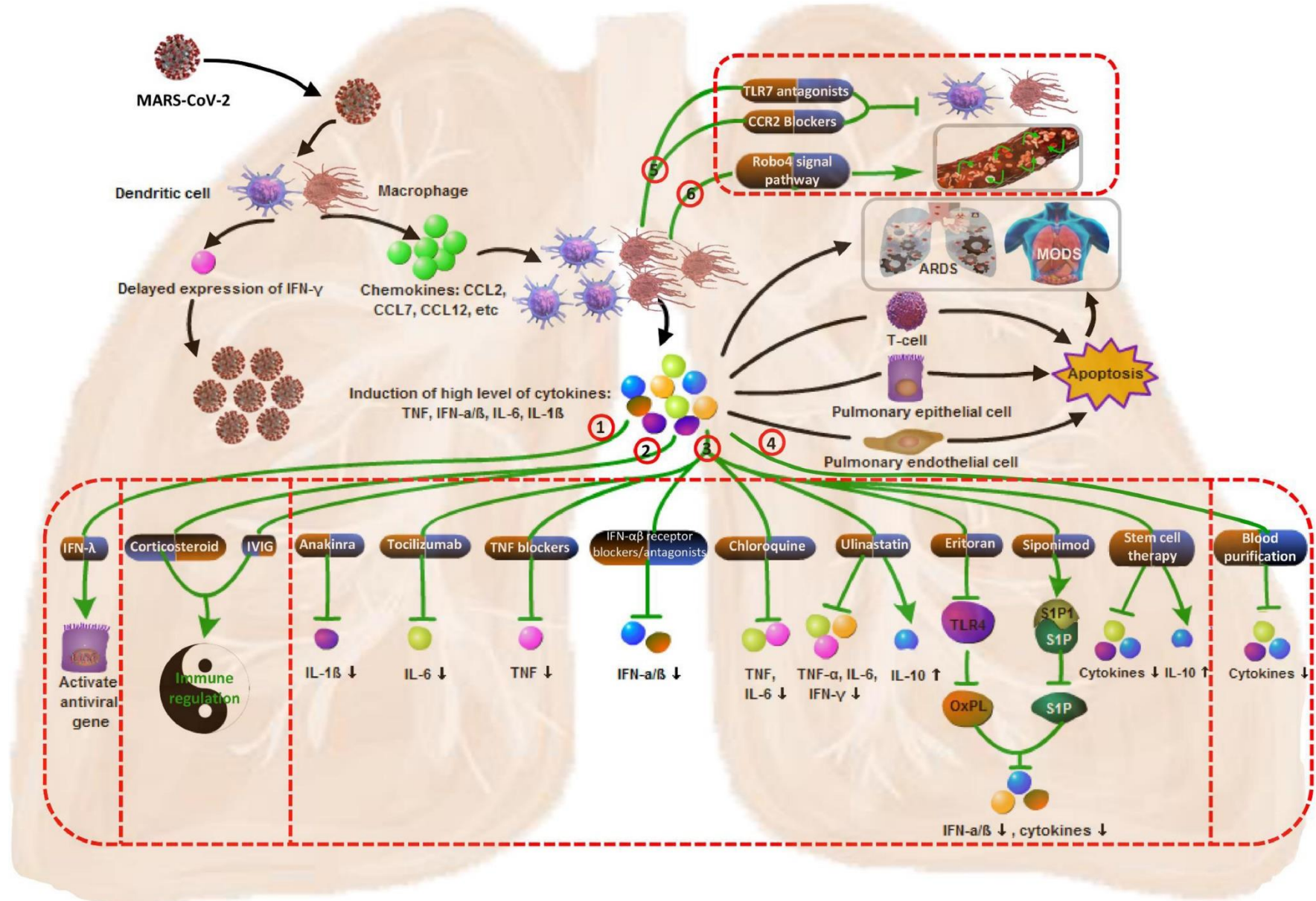


## “cytokine storm”

- extreme increase in inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interferon-inducible protein-10 (IP10), monocyte chemotactic protein 1 (MCP1), macrophage inflammation protein-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ .



Signal Transduction and Targeted Therapy volume 5, Article number: 128 (2020)



# Chemotaxe

- Je řízený pohyb buněk v koncentračním gradientu solubilních extracelulárních látek.
- Chemotaktické faktory, **chemotaxiny** nebo **chemoatraktanty**.
- **Pozitivní chemotaxe**=buňky směřují do míst s vyšší koncentrací chemotaktických faktory (CHF).
- **Negativní chemotaxe**=buňky se pohybují od míst s vyšší koncentrací CHF.
- **Chemokineze**=buňky se pohybují neřízeně
- **Chemoinvaze**=buňky se pohybují přes bazální membránu

# Chemotakticky aktivní faktory

– Funkce:

→ Účast v imunitní odpovědi

→ Zánět

→ Hojení ran

→ Celkové systémové reakce po tkáňovém nebo  
orgánovém poškození



# Chemotakticky aktivní faktory

→ C5A

→ Oligopeptidy bakteriálního původu

→ Intermediální produkty lipidových metabolismů (AA a LTB4)

→ Cytokiny, růstové faktory

→ Chemokiny

# Chemotakticky aktivní faktory

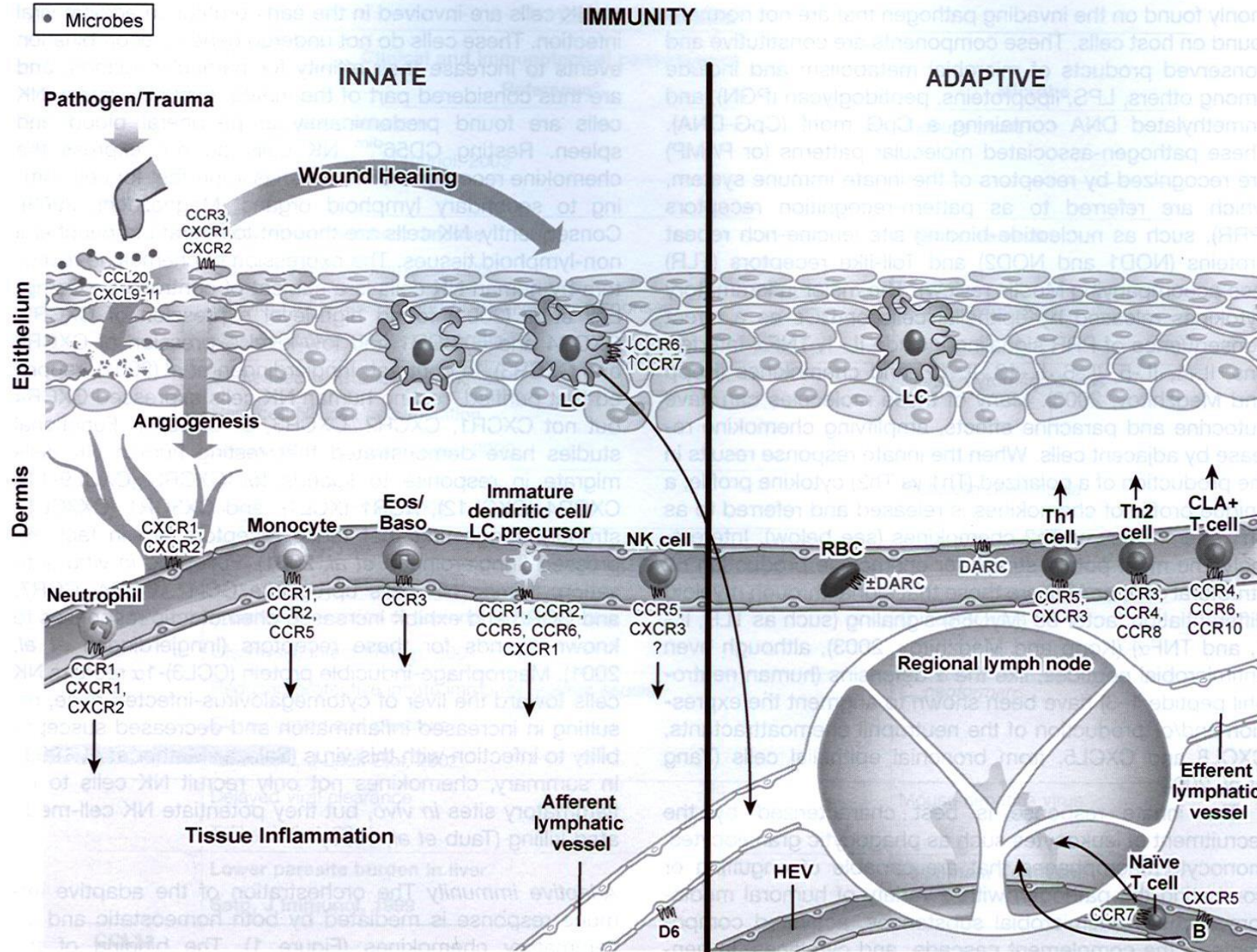
- Biologická aktivita těchto faktorů je řízena pomocí specifických receptorů na buněčném povrchu, jejich exprese je pozitivně nebo negativně modulována téměř všemi cytokiny.
- V chemotaktické odpovědi buněk se aktivně účastní také extracelulární matrix, celulární adhesivní molekuly, cytoskelet a některé nízkomolekulární substance.

# Chemokiny

→ Tvoří rodinu cytokinů, indukovatelných prozánětlivou aktivací. 8-10kDa, 20-50% sekvenční homologie, podobná genetická a terciární struktura. Všechny tyto proteiny poskytují množství konzervovaných **cysteinových** zbytků, které se účastní v tvorbě intramolekulárních disulfidových vazeb.

# Funkce chemokinů

- 1. esenciální mediátory normálního pohybu leukocytů
- 2. podpora zánětu
- 3. indukce chemotaxe
- 4. aktivace zánětlivých buněk
  - ⇒ a/ aktivace granulocytů a makrofágů s následným oxidativním vzplanutím, degranulací a releasem lysosomálních enzymů
  - ⇒ b/ovlivnění imunitních buněk k odpovědi na suboptimální množství zánětlivých mediátorů
  - ⇒ c/ mocné uvolňovací faktory pro histamin z bazofilů
- 5. indukce proliferace a aktivace NK (CHAK-chemokine-activated killer)
- 6. modulace hemopoézy (BFU-E, CFU-GH, CFU-GEMM)
- 7. modulace angiogenezy
- 8. modulace nádorového růstu
- 9. účast v patogeneze infekcí viry HIV (chemokiny mohou suprimovat infekci HIV-1, chemokinové receptory slouží prostřednictvím



MUNI  
MED

**Hojení**

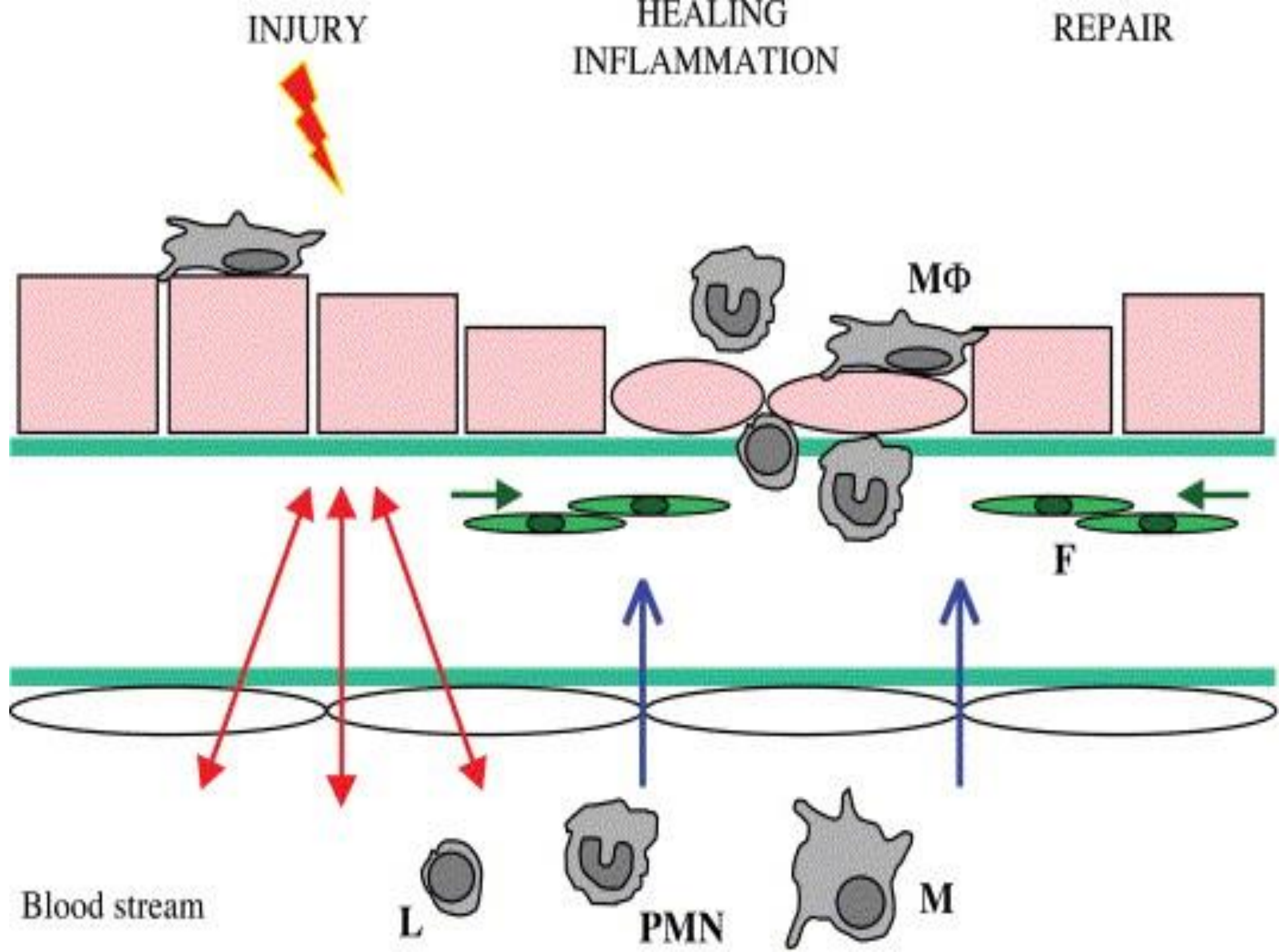
# Hojení ran

- Je opravný proces, který navazuje na poškození kůže a měkkých tkání.
- Hojení je interakce komplexní kaskády buněčných reakcí, které vedou k obnovení povrchu, rekonstrukci a o obnovení napětí poškozené tkáně.
- Hojení je systémový proces, tradičně popisovaný třemi fázemi:  
**zánět, proliferace, remodelace**

# Hojení ran

- **Zánětlivá fáze:** vytváří se trombus a zánětlivé buňky odstraní debris poškozené tkáně.
- **Proliferační fáze: epitelizace, fibroplazie a angiogeneze;** vytváří se granulační tkáň a rána se začíná stahovat.
- **Remodelační fáze:** Kolagenní vlákna vytváření pevné vazby s jinými kolagenními vlákny a molekulami bílkovin: tak se zvyšuje napětí v jizvě.

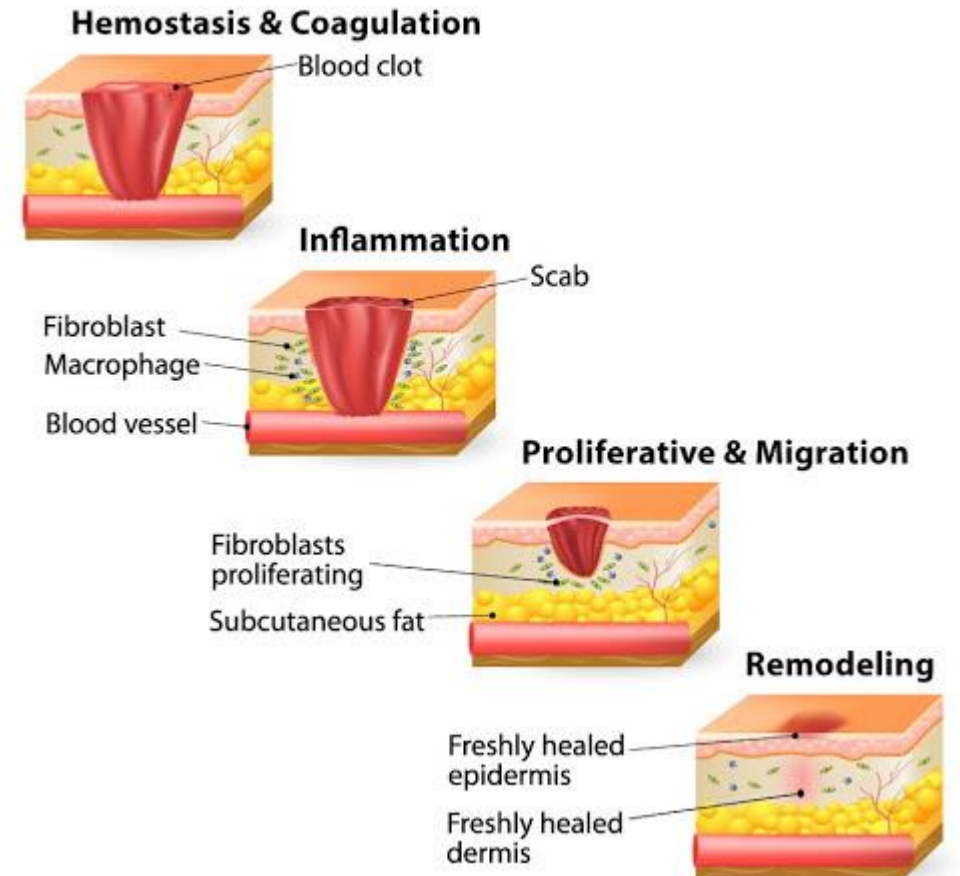




# I. Zánětlivá fáze

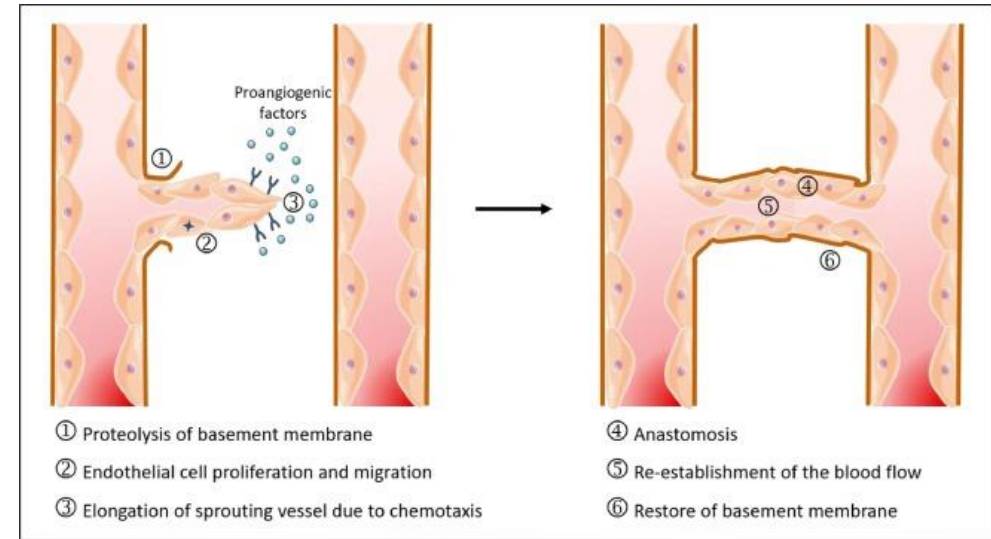
- Trvání: od poškození 2-5 dní
- Hemostáza
- Vazokonstrikce
- Agregace destiček
- Koagulace
- **Zánět**
- Vazodilatace
- Fagocytóza

## WOUND HEALING



## II. Proliferační fáze

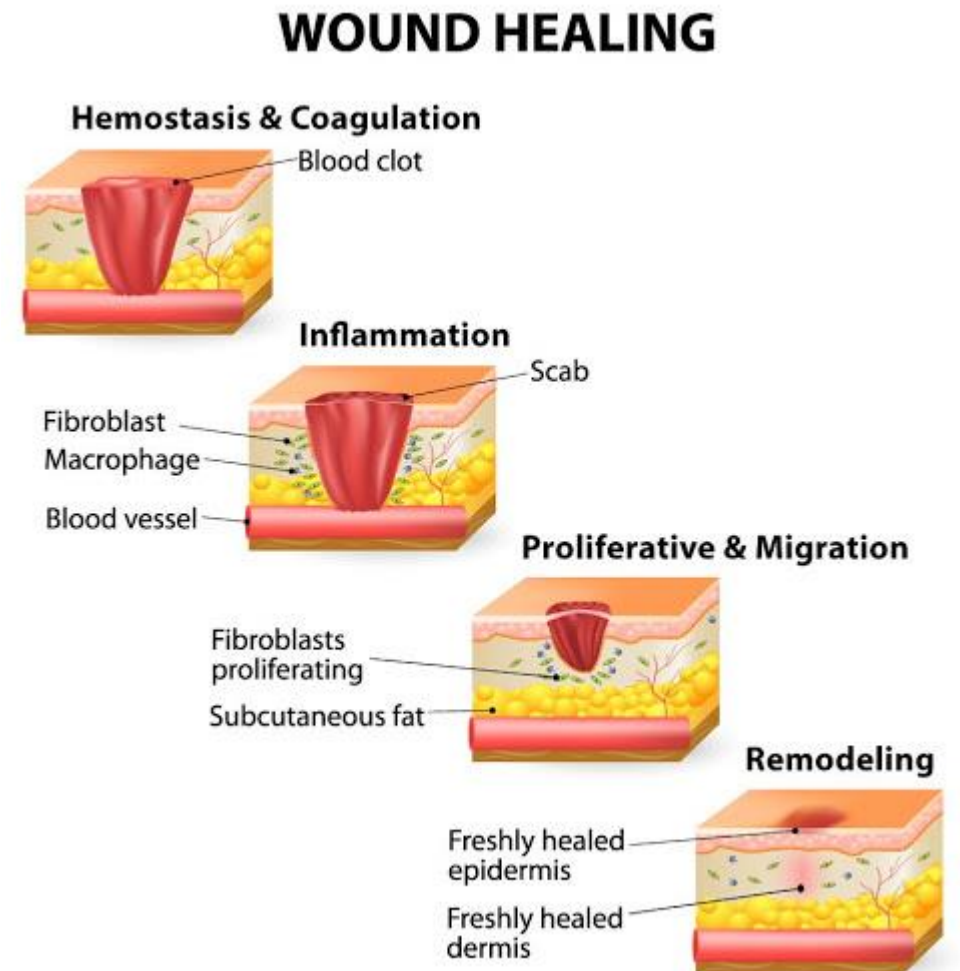
- Trvání: 2 dny až 3 týdny
- **Granulace**
- Fibroblasty vytvářejí kolagen
- tkáň vyplňuje defekt a vede k neovaskularizaci
- **Kontrakce**
- Konce ran se slepují a redukují defekt
- **Epitelizace**
- se uskutečňuje ve vlhkém prostředí
- Buňky cestují až 3 cm ve všech směrech



Journal of Theoretical Biology 459, 2018, 1-17

# III. Remodelující fáze

- tři týdny až 2 roky
- vytváří se nový kolagen, který zvyšuje tenzní napětí v jizvě.
- Jizevnatá tkáň je přesto nanejvýš z 80% stejně silná jako tkáň původní.



# Tvorba jizvy

- Proces hojení je velmi podobný ve všech tkáních a je relativně nezávislý na typu poškození, malá variabilita je v relativním podílu různých elementů, které se na výsledku hojení podílejí.
- Konečným produktem hojení je **jizva**. Jedná se o relativně avaskulární a acelulární masu kolagenu, která slouží k obnovení tkáňové integrity, síly a funkce.
- **Zpoždění** v procesu hojení vede k dlouhodobému nezhojenému defektu, zatímco
- **abnormální proces hojení** vede k tvorbě abnormálních jizev.

# Zánětlivá fáze

- Tělo rychle odpovídá na jakékoliv narušení kožního povrchu.
- Na začátku procesu hojení se rozvíjí vaskulární a celulární odpověď na poškození.
- Hlubší poranění kůže vede k poškození mikrocirkulace a následnému krváčení.
- Během sekund se dochází k vazokonstrikci v místě poškození, která má za cíl omezit místně krváčení.
- V průběhu minut se krváčení zastavuje pomocí aktivace primární hemostázy (aktivace a agregace destiček) a koagulace (tvorba trombu).

# Zánětlivá fáze

- ✓ **Vazokonstrikce** rozvíjející se v důsledku incize kůže se rozvíjí pod vlivem adrenalinu, noradrenalinu, prostaglandinů, serotoninu a tromboxanů. Vazokonstrikce způsobí dočasné vyblednutí rány a slouží k redukci krváčení po tkáňovém poškození.
- ✓ Endoteliální buňky se **retrahují** a tím odkrývají subendoteliální kolagen, na němž jsou schopny se **uchytit krevní destičky**.
- ✓ **Adheze destiček** na exponovaný kolagen a **adhezivita destiček** vůči ostatním destičkám se uskutečňuje prostřednictvím **adhezivních glykoproteinů**: fibrinogenu, fibronektinu, trombospondinu a von Willebrandova factoru.

# Zánětlivá fáze

- **Destičky** také uvolňují *chemoatrakční faktory* pro:
- **Neutrofily**
  - ✓ omezují infekci
  - ✓ povolávají makrofágy.
- **Makrofágy**
  - ✓ štěpí a odstraňují tkáňovou debrís
  - ✓ aktivují odpověď fibroblastů
- Zánětlivá fáze trvá asi 24 hod. Navazuje na ni proliferativní fáze hojivého procesu



# Zánětlivá fáze

- Adhese, aktivace a agregace destiček vede k tvorbě bílého trombu (destičky+fibrin).
- ✓ Adhese destiček na exponovaný kolagen vede k jejich aktivaci, jejímž důsledkem je degranulace. V průběhu degranulace se uvolňují *chemotaktické a růstové faktory*:
  - ✓ *platelet-derived growth factor (PDGF)*
  - ✓ *proteázy*
  - ✓ *vazoaktivní látky (ADP, serotonin, histamin).*

# Zánětlivá fáze

- Následuje *aktivace koagulační kaskády* - vede k aktivaci trombinu, který aktivuje fibrinogen na fibrin.
- Trombin podporuje také *migraci zánětlivých buněk* do místa poškození prostřednictvím *zvýšené cévní permeability*.
- **Produkce fibrinu** je pro proces hojení ran zcela zásadní a **je primární složkou ranné matrix**, do které migrují zánětlivé buňky, destičky a plasmatické proteiny. Odstranění fibrinu komplikuje hojení ran.

# Zánětlivá fáze

- Výsledkem aktivace *primární* (destičky) a *sekundární hemostázy* (aktivace koagulačních kaskád) v průběhu procesu hojení ran je tvorba sraženiny v místě poškození.
- Tvorba sraženiny se omezuje na trvání a místo tkáňového poškození.
- Tvorba sraženiny ustává, jak ustává aktivace hemostázy. Následně je plasminogen aktivován na plasmin, který **stimuluje fibrinolýzu** a dále pomáhá v lýze buněk v místě poškození.
- Tvorba sraženiny je místně omezována prostřednictvím endoteliálních buněk, které produkují *prostacyklin PGI<sub>2</sub>* (antiagregační a vazodilatační účinky). V místě poškození se uplatňují také *faktory přirozené antikoagulace* (**antitrombin III** vyvazuje aktivované vitamin-K dependentní koagulační faktory, **protein C a protein S** vážou aktivované faktory V a VIII).

# Proliferační fáze

- Na povrchu rány se během 24-72 hodin ***epidermální buňky*** dostávají do mitotické aktivity. Tyto buňky pak migrují přes povrch rány.
- ***Fibroblasty*** proliferují v hlubších vrstvách rány. Tyto fibroblasty začínají syntetizovat malé množství kolagenu, který představuje jakési “lešení“ usnadňující migraci a další proliferaci fibroblastů.

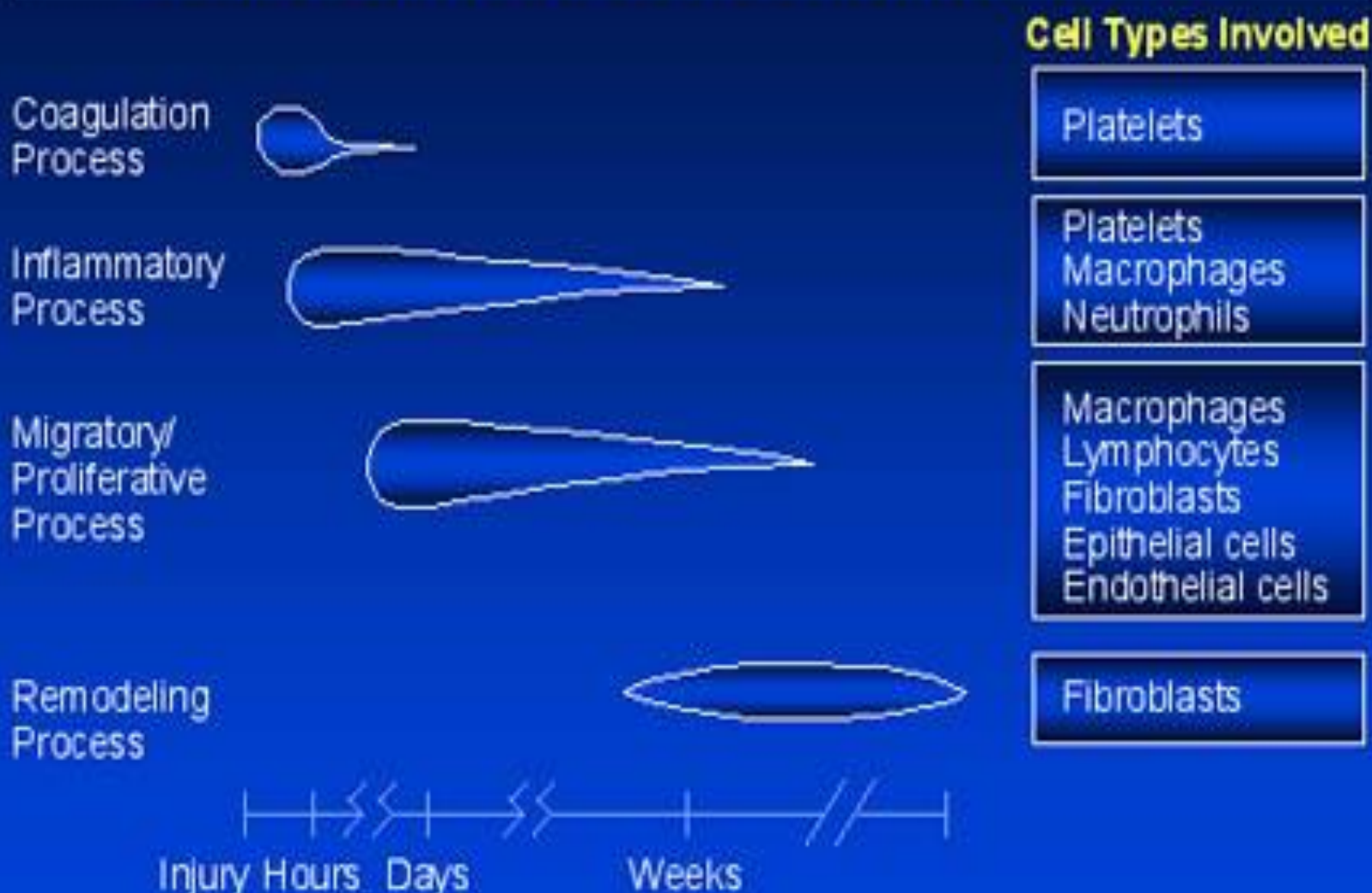
# Proliferační fáze

- **Granulační tkáň** se skládá
- z kapilárních kliček nově vznikajících ve vyvíjející se kolagenní matrix
- objevuje se v hlubších vrstvách rány.
- Proliferační fáze trvá od 24 do 72 hodin a přechází do remodelační fáze procesu hojení

# Proliferační fáze

- Za 4 až 5 dní od poškození začínají **fibroblasty** produkovat velké množství **kolagenu a proteoglykanů**.
- **Kolagenní vlákna** leží původně náhodně, později jsou organizována do pevných svazků.
- **Proteoglykany** podporují tvorbu kolagenních vláken, ale přesně není jejich role dosud známa. Za 2-3 týdny zhojená rána odolává normální zátěži, ale odolnost rány se buduje ještě několik dalších měsíců. Fibroblastická fáze trvá 15-20 dní a potom se rána dostává do remodelační fáze hojení.

# COMPONENTS OF WOUND HEALING



# Proliferační fáze Migrace. Angiogeneze

- Tvorba cév
- Začíná jako pupeny endoteliálních buněk
- Proces progreduje směrem k ráně podél kyslíkového gradientu
- Nezralé cévy se diferencují do kapilár, arteriol a venul
- Makrofágy a keratinocyty poskytují angiogenetické stimuly



# Proliferační fáze Epitelizace

- Epidermis se rekonstruuje z okrajů ran a zbytků vlasových folikulů (z keratinocytů)
- Keratinocyty putují přes místo rány
- Během migrace a po ní se neodermis diferencuje a stratifikuje
- Epitelizaci pomáhá vlhké prostředí

# Proliferační fáze - Fibroplasie

## Fibroblasty

- migrují do místa rány a replikují se
- jsou dominantním typem buněk v okrajích rány
- syntetizují a ukládají kolagen a proteoglykany

## Depozice matrix závisí na

- dostupnosti kyslíku
- substrátů
- růstových faktorů

# Remodelační fáze

- Během remodelační fáze fibroblasty opustí místo rány a kolagen je remodelován do organizovanější matrix.
- Tenzní napětí zhojené rány se zvyšuje až do jednoho roku po poškození. Kožní defekty mají výsledně 70-80% původní „síly“.

# Hojení se může zpozdít několika faktory:

- Ischémie
- Suché okolí rány
- Infekce
- Cizí tělesa
- Protizánětlivá terapie
- Nutriční deficity

# Místní faktory ovlivňující hojení ran

- Mechanické poškození
- Infekce
- Edém
- Místní podmínky (vlhkost, pH ...)
- Ischémie/nekróza
- Ionizující záření
- Nízká pO<sub>2</sub>
- Cizí tělesa

# Regionální faktory ovlivňující hojení ran

- Arteriální insuficience
- Venózní insuficience
- Neuropatie

# Systemové faktory ovlivňující hojení ran

- Neadekvátní perfúze
- Zánět
- Výživa
- Metabolické nemoci
- Imunosuprese
- Nemoci pojivové tkáně
- Kouření

# Hojení: akutní rány

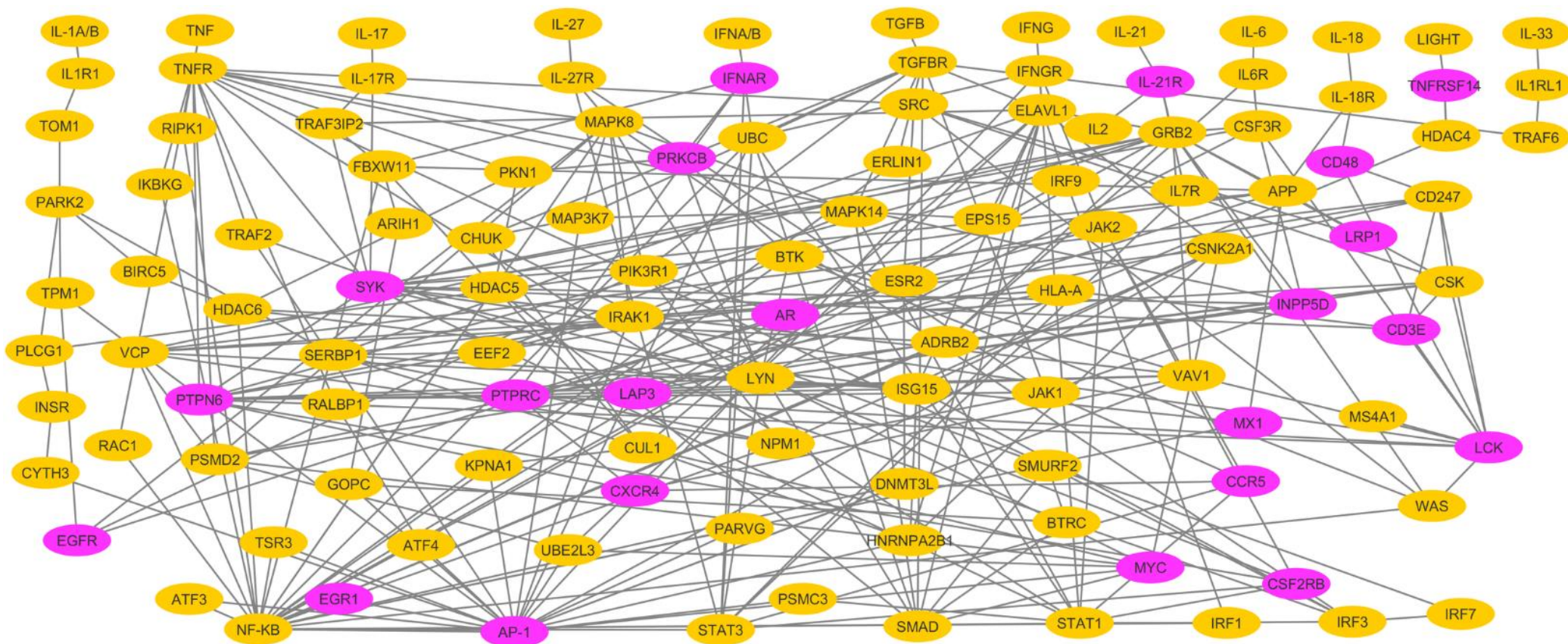
- Akutní rána se obvykle hojí kontinuálně a v odhadnutelném časovém horizontu
- Obyčejně se hojí *per primam*
- Zvýšená reaktivita během hojení akutních ran:
  - Keloidy
  - Hypertrofické jizvy



# Hojení: chronické defekty

- V případě selhání nebo opoždění hojivého procesu
- Neodpovídavost na normální růstové signály
- Opakované trauma, špatná perfúze /oxygenace tkání, excesivní zánět
- Systémová onemocnění
- Genetické faktory

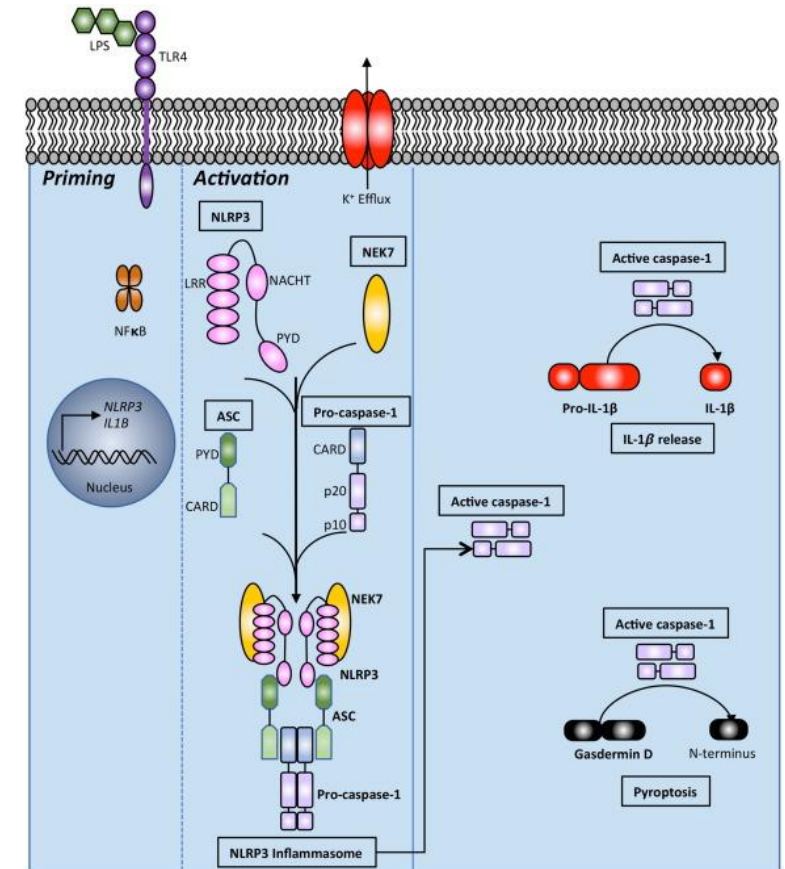
Děkuji za pozornost



„I just need a closer look...“

# Inflamasom

- Multiproteinové komplexy, které se aktivují při zánětu.
- Inflamasom se obvykle skládá z cytoplasmatické senzorové molekuly (NLRP3), adaptačního („apoptosis associated specklike protein containing caspase recruitment domain“) proteinu a efektorové prokaspázy-1.
- Inflamasom reguluje aktivaci kaspázy -1, což má za následek sekreci interleukinu- 1 $\beta$  a interleukinu-18.
- K aktivaci inflamasomu **vedou infekce, stres nebo jiné imunologické signály, které se účastní zánětu.**
- NLRP3 inflamasom se účastní imunologických regulací, interakcí receptor-ligand během zánětu, „microbialassociated molecular patterns“, „danger“ a „pathogen associated molecular patterns“.
- Účastní se taky cytokinových a chemokinových zánětlivých reakcí v PNS a CNS.



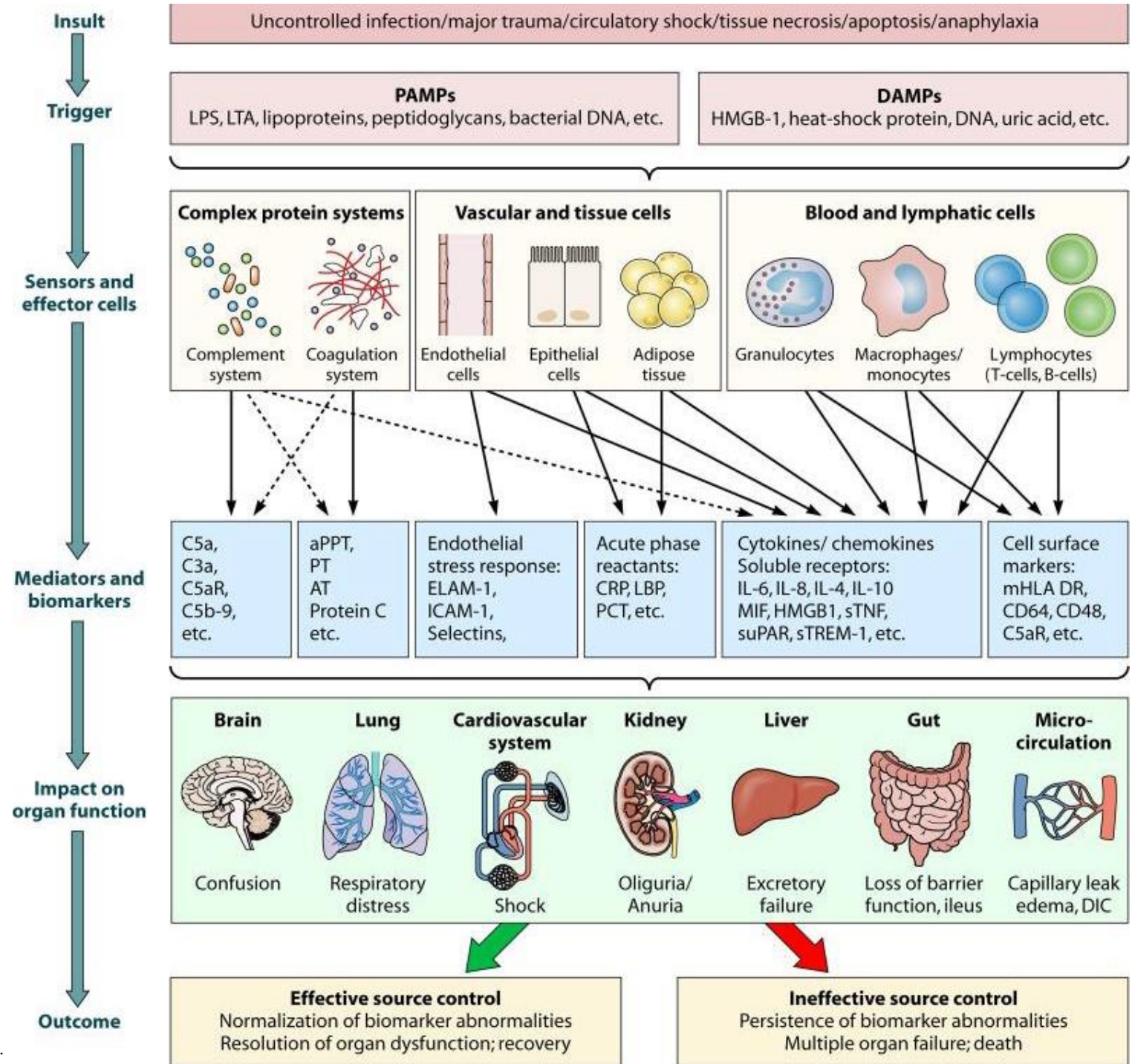
J Mol Biol. 2017 Oct 12. pii: S0022-2836(17) 30471-0. doi: 10.1016/j.jmb.2017.10.001

# „THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME“ (SIRS)

- Klinická manifestace nespecifického zánětu, významná příčina morbidity a mortality a vedoucí příčina smrti na jednotkách intenzivní péče.
- SIRS může být iniciován mnoha příčinami, včetně infekce, závažnost kolísat až k život ohrožujícímu stavu.

# Závažné poškození nebo infekce

- Závažné poškození nebo infekce začínají tím, že jsou rozpoznány alarminy, které se primárně skládají z mikrobiálních produktů a poškozené tkáně.
- Vrozený imunitní systém na základě vrozených rekogničních receptorů (PRRs – „pattern recognition receptors“) rozpoznává cizí antigeny a poškozené buňky. PRRs jsou exprimovány na mnoha buněčných liniích (myeloidní, endoteliální a epiteliální).
- PRRs detekují konzervované mikrobiální komponenty zvané „pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)“, stejně jako hostitelské molekuly derivované z poškozených buněk, známě jako „damage-associated molecular patterns (DAMPs)“.



# PRRS

- PRRs zahrnují Toll-like receptory (TLRs), C-type lectin receptory (CLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptory (NLRs), retinoic-acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptory (RLRs) a receptor pro získané produkty glykaces (RAGE).
- Velký počet, diverzita a redundance se uplatňují v rámci optimalizace imunitní odpovědi.

# PRRS

- Na základě rozpoznání hostitelských PAMPs nebo DAMPs PRRs iniciují komplexní soubor signálních událostí , které indukují hostitelskou obranyschopnou odpověď. Jedná se o povolávání a fosforylaci intracelulárních intermediálních látek, což vede částečně k aktivaci genů okamžité odpovědi.
- PRRs aktivace a následná signalizace vede k nescifickým i pro patogen specifickým buněčným odpovědím, které mají zajistit eliminaci stresorů nebo prevenci jejich uplatnění. Těmito stresory jsou mikrobiální infekce nebo tkáňové poškození.
- Suprese mikrobiální replikace, invaze Mb do tkání a diseminace z místa infekce zahrnují mnoho buněk vrozeného imunitního systému: neutrofily (PMNs), monocyty/makrofágy ( $M\phi$ ), dendritické buňky (DCs), natural killer (NK) buňky a innate lymphoid cells (ILCs) . Tyto buňky hrají klíčovou roli v časně zánětlivé odpovědi.

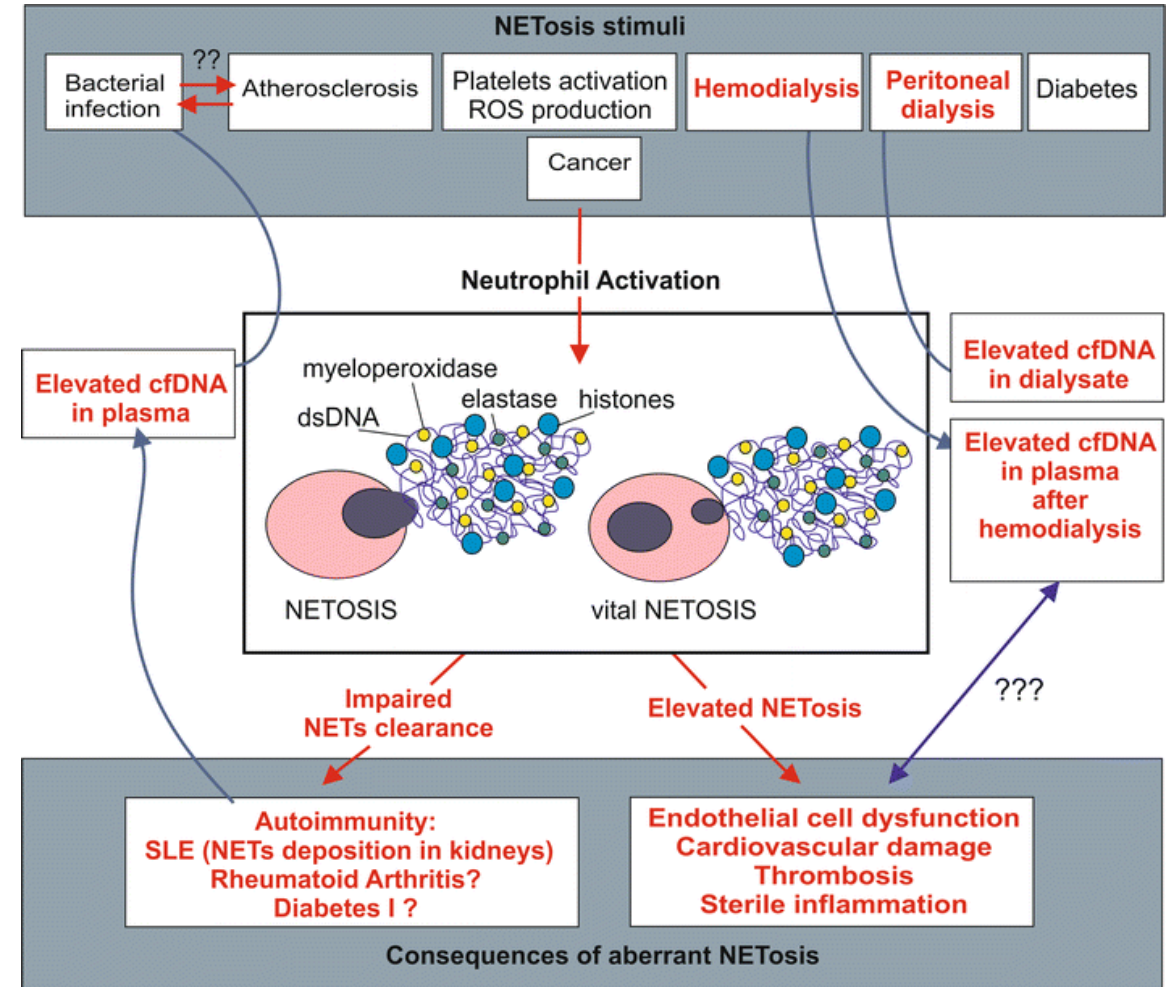


# Toll-like receptory

- Zatím u člověka známo 13 různých TLRs.
- Některé exprimovány na plasmatické membráně buněk (TLRs 1, 2, 4, 5, 6) jako konstantní součást lokálního prostředí
- Jiné jsou v endosomálních kompartmentech (TLRs 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13), kde vnímají signály nebezpečí pro hostitele, mikrobiální proteiny a nukleové kyseliny.
- TLRs na plasmatických membránách detekují vnější mikrobiální komponenty a cirkulující signály poškození, jako jsou lipopolysacharidy (LPS), fosfolipidy, zymosan, flagellin, peptidoglycan, S100A8/9 a „endogenous high-mobility group box (HMGB)“ nukleární proteiny z buněk poškozených distresem.
- Cytoplasmatické TLRs detekují virové nebo mikrobiální nukleové kyseliny a mitochondriální nukleové kyseliny asociované se poškozením buňky.
- TLRs hrají centrální roli v iniciaci vrozené imunitní odpovědi ve spolupráci s jinými PRRs prostřednictvím různých i přesahujících se pathways.

# NETosis and pathophysiology of disorders

- Neutrophil extracellular traps (NETs) are formed by activated neutrophils during the process of NETosis in which the nuclear material is released into extracellular space, including DNA molecules, citrullinated histones, and neutrophil granule enzymes, such as elastase. This material forms networks that are able not only to physically entrap bacteria but also to provide elevated concentration of bactericidal components.



# Nádorové buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt

zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou x nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů  
zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou x nádorové buňky přežívají i s poškozenou DNA  
rezistence k apoptóze je jedním z důvodů prodloužené životaschopnosti nádorových buněk

# Apoptóza a nádory

zvýšená exprese bcl-2 zaznamenána u různých pevných nádorů, leukémií i lymfomů

zvýšená exprese bcl-2 je nepříznivý faktor: zvýšená odolnost na chemoterapii

terapie zaměřené na ovlivnění apoptózy se mohou uplatnit při léčbě některých nádorových i nenádorových chorob

