

MUNI
MED

Buňka x Zánět x Hojení

Buňka

Mitochondriální funkce/disfunkce

ROS

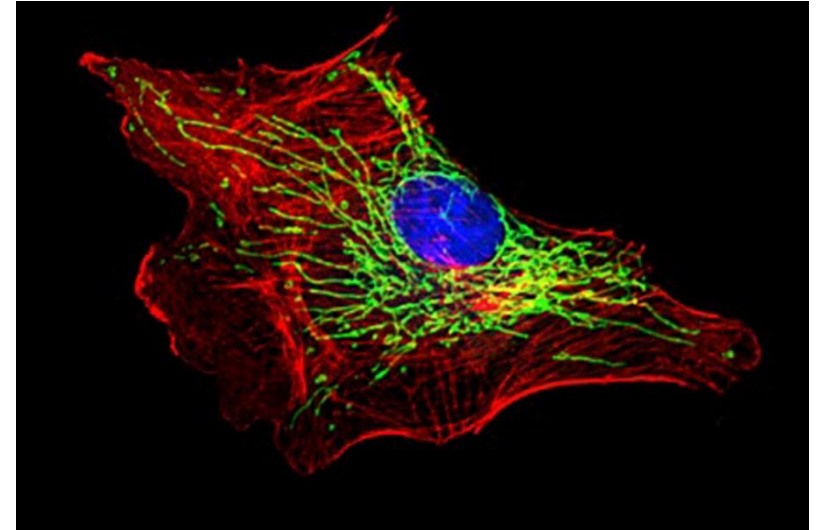
Hypoxie

Lysosomální funkce/disfunkce

Buněčná smrt

Mitochondrie

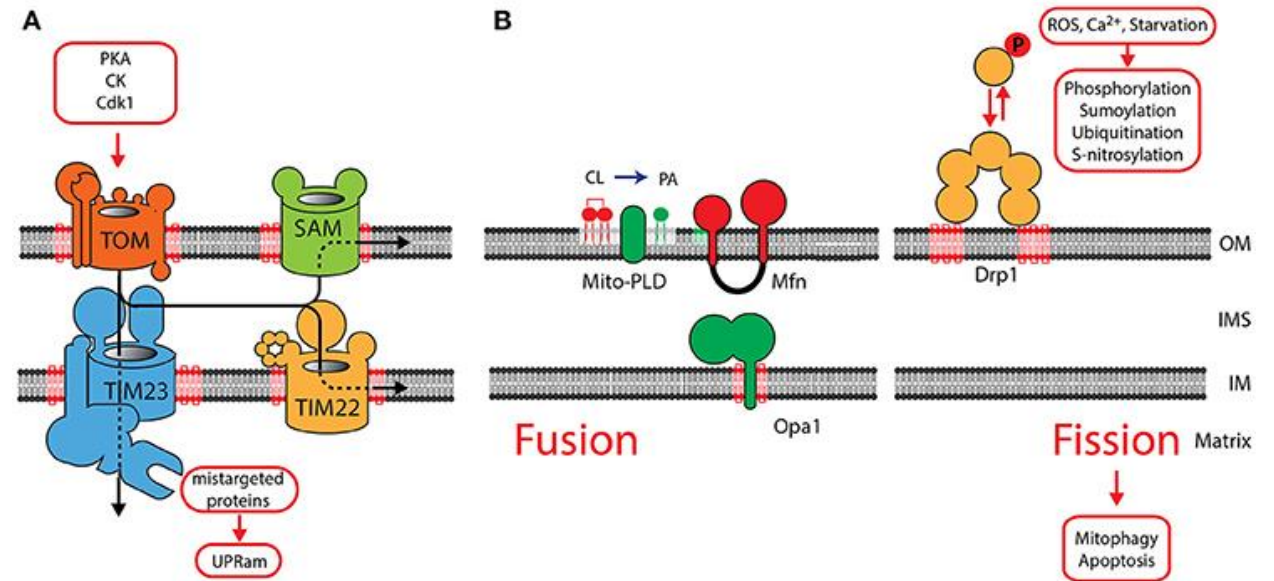
- Produkce ATP k pokrytí buněčných potřeb
- Metabolismus aminokyselin
- Regulace redoxních dějů buňky
- Syntéza hemu
- Diferenciace a aktivace procesů imunitních buněk
- Výsadní role v programu buněčné smrti



Mitochondriální síť

Mitochondriální „fusion and fission“

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



Front. Cell Dev. Biol., 2017

Mitochondriální fúze a štěpení

– Odpověď na metabolický/patogenní podnět

– **FÚZE = autonomní integrace**

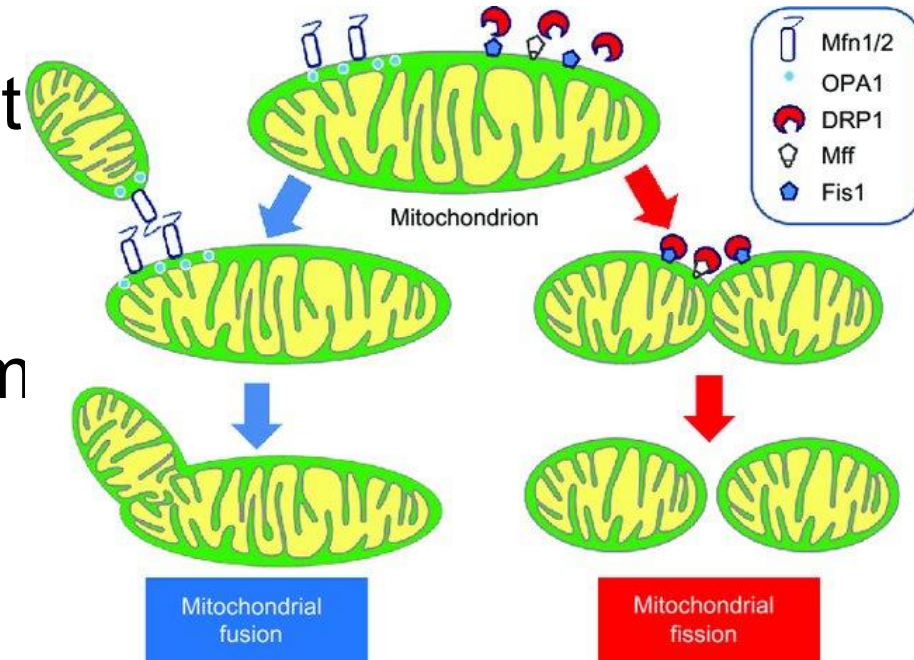
– 1. fúze vnější membrány mezi 2 sousedním mitochondriemi

– Řízené - mitofusin 1 a 2

– 2. fúze vnitřní membrány

– cardiolipin, dynamin-like GRPase optic atrophy (OPA)

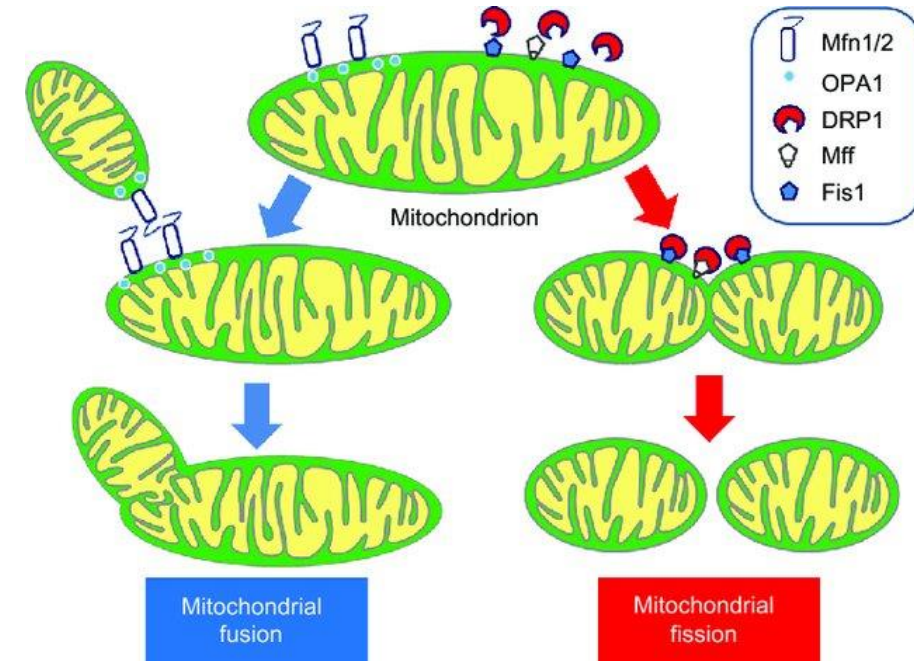
– důležité pro udržení integrity mitochondriální DNA a buněčné dýchání



Research Reports in Clinical Cardiology 2014(default):111

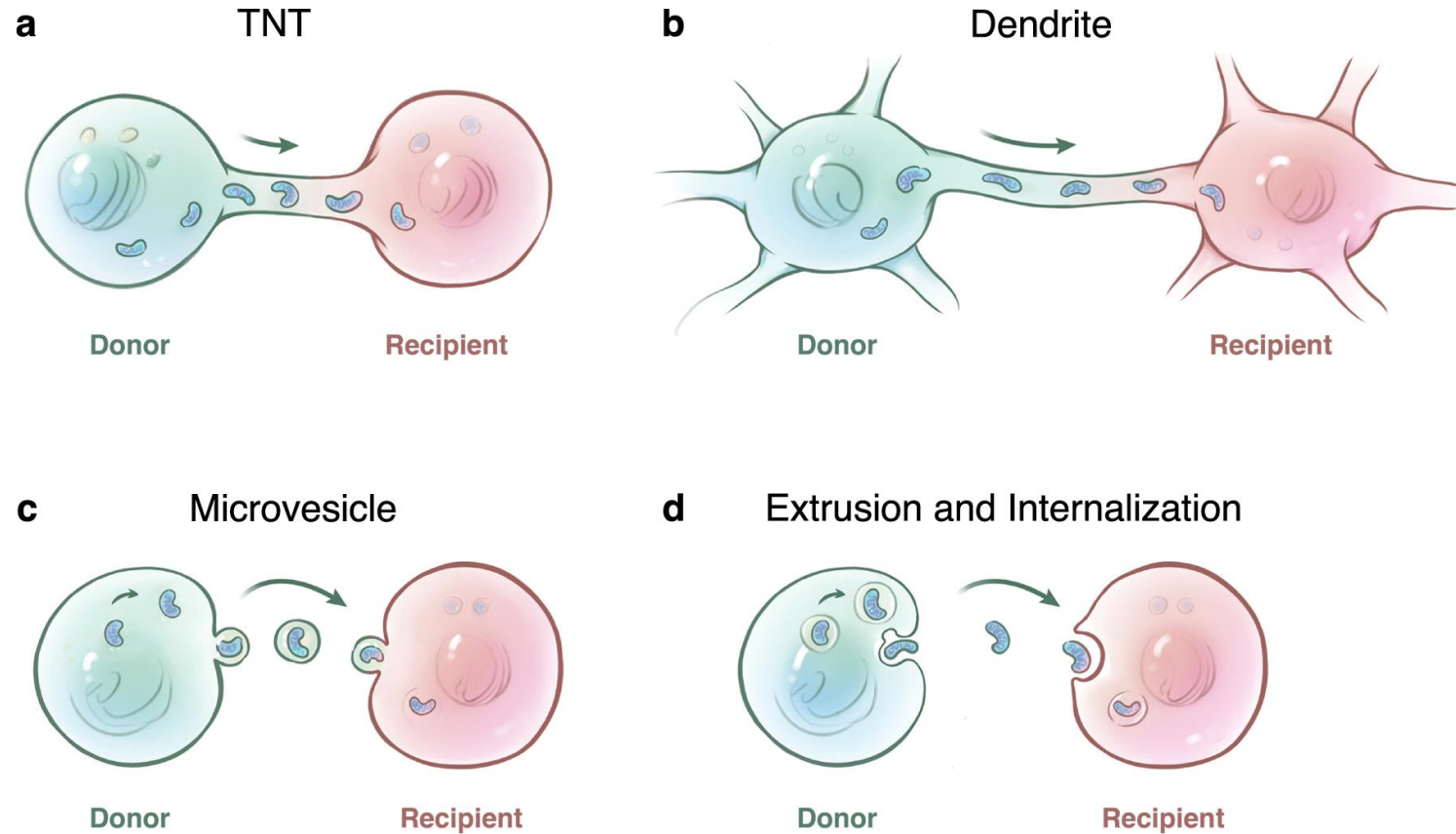
Mitochondriální fúze a štěpení

- 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

Způsoby přenosu mitochondrií z buněk do buněk



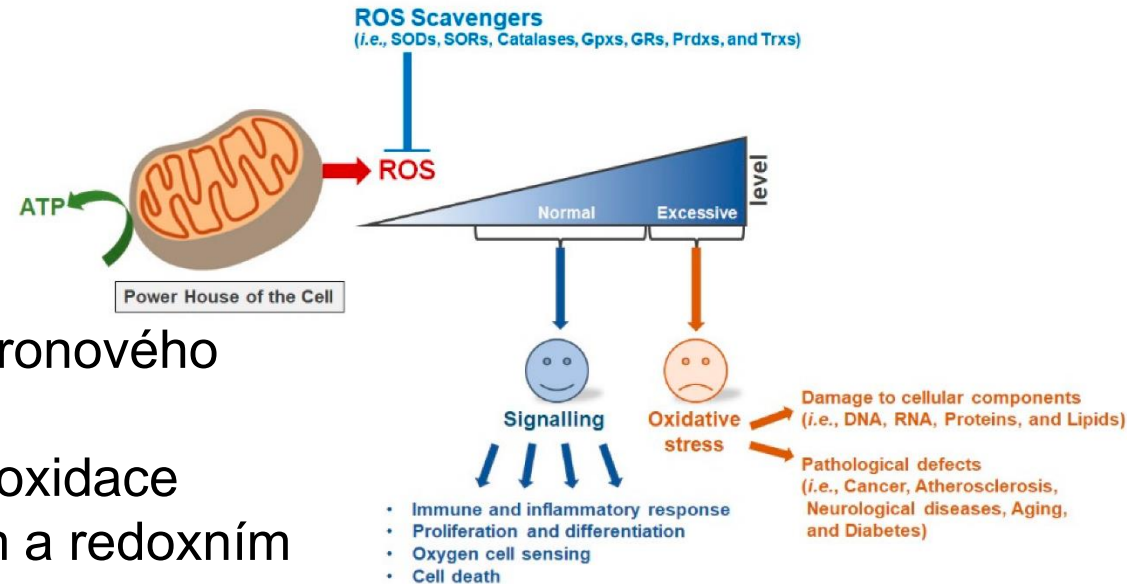
a TNT is a membranous tubular protrusion that extends from the plasma membrane, with a variety of diameters between 50 and 1500 nm and lengths from several tens to hundreds of microns. TNT is the most popular route of mitochondrial transfer between the connected cells. **b** Dendrite is another form of the membranous protrusion. Some cells with dendrites (e.g., osteocytes) are connected to each other via intrinsic dendrites to form an intercellular network, which provides a highway for mitochondrial transfer. **c** Microvesicles formed by blebbing of the cellular plasma membrane were reported as another route for mitochondrial transfer. **d** Free mitochondria alone can be extruded or internalized without carriers, which provides a possible route for intercellular mitochondrial transfer

Mitochondrie a ROS

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

– ROS funkce:

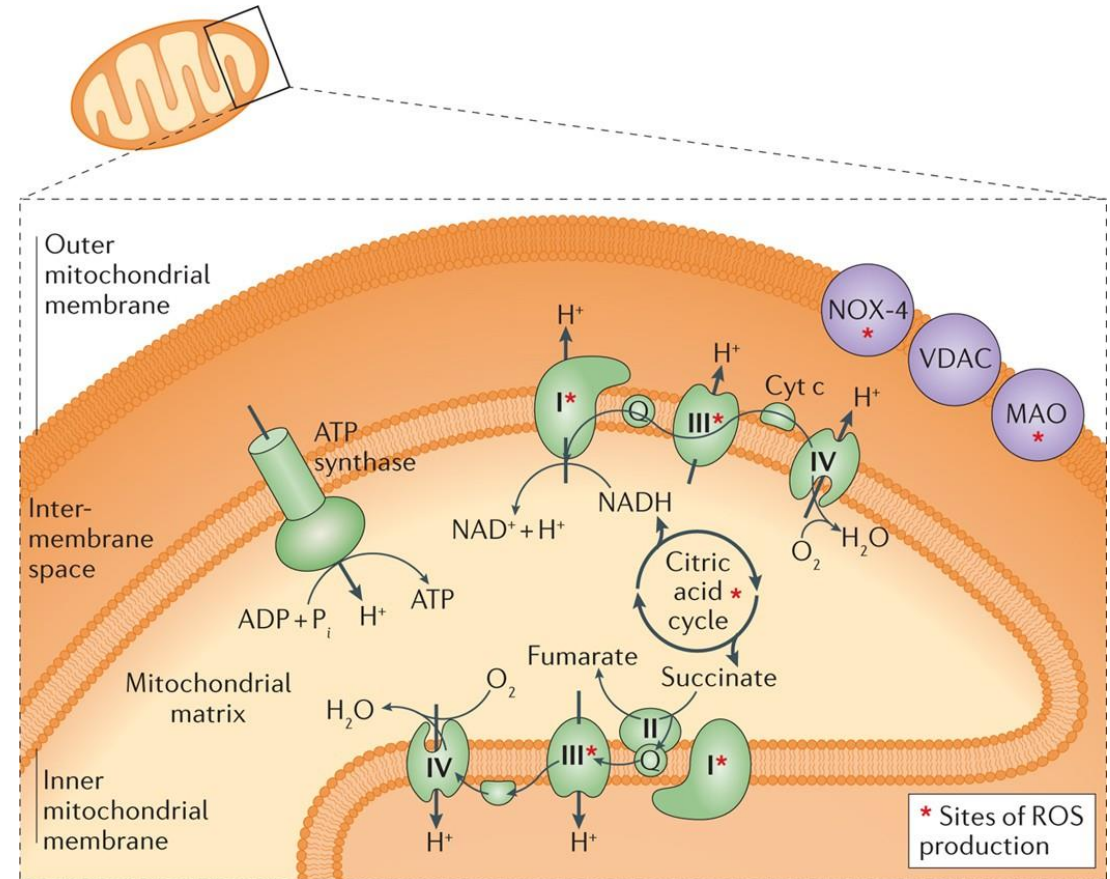
- druzí poslové v různých signálních drahách
 - Imunitní buňky: Ca^{2+} -NFAT signální dráha – kritická pro aktivaci T lymfocytů.
- ROS mohou také ničit bakteriální patogeny, ale
- pokud jsou nadměrně produkovány - poškodí produkující buňku nebo sousední buňky.



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

Místa produkce ROS

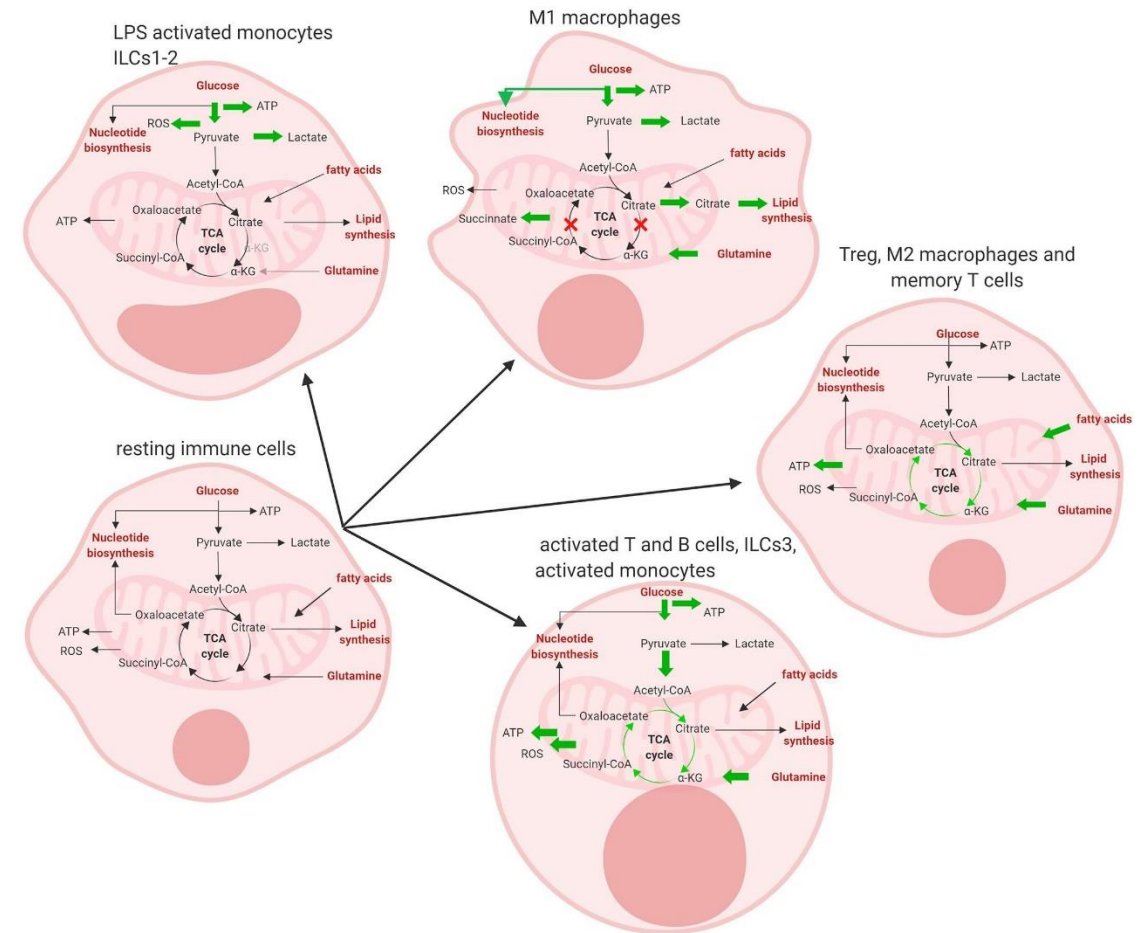
- mitochondriální ROS (mROS) jsou produkovány jako vedlejší produkty bioenergetického metabolismu
- Cyt c, cytochrome c; MAO, monoamine oxidase; NOX-4, NADPH oxidase 4; VDAC, voltage-dependent anion channel



Nature Reviews | Cardiology

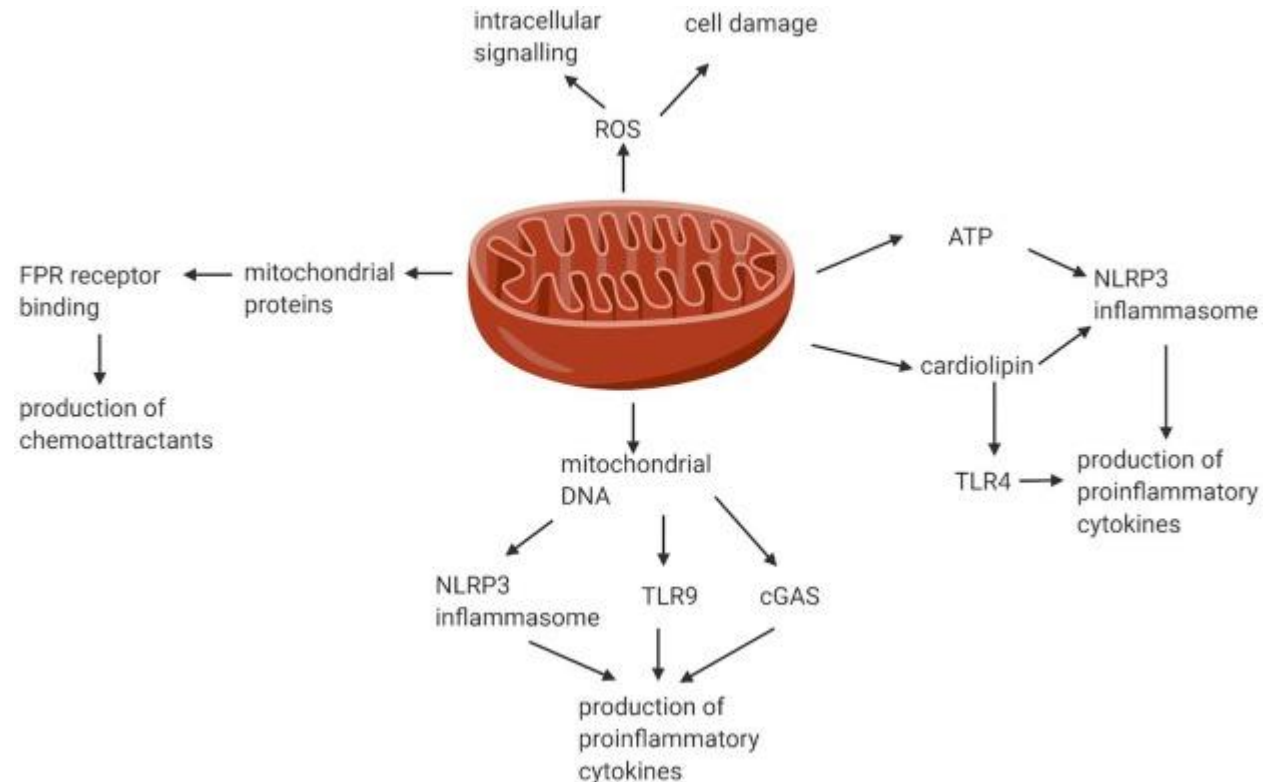
Mitochondrie, ROS a imunitní buňky

- prozánětlivé buňky - aktivované monocyty a aktivované T a B buňky – glykolýza
- regulační buňky - regulační T lymfocyty nebo M2 makrofágy - zvyšující mitochondriální funkci a beta-oxidaci



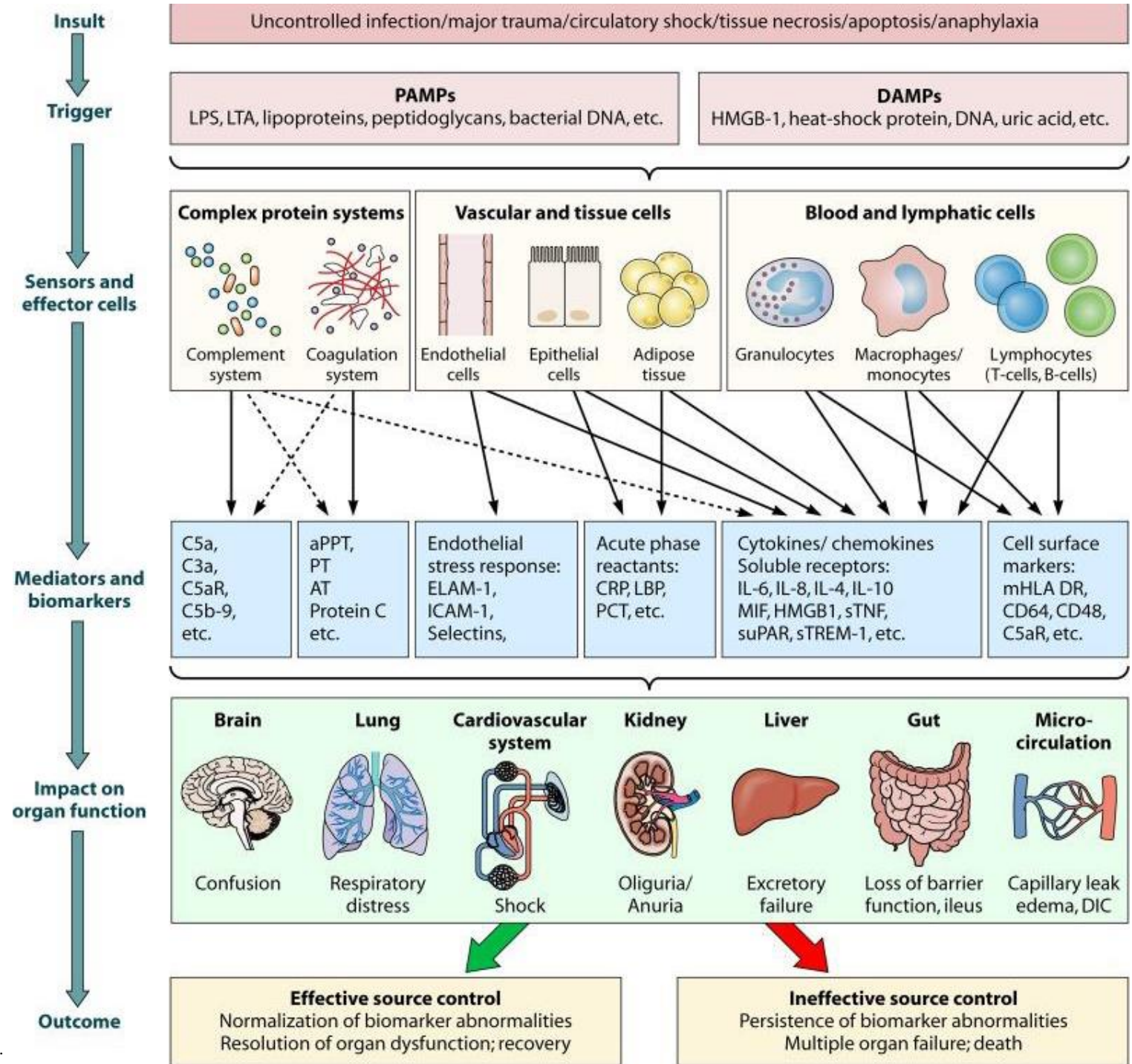
Vliv mitochondrií na imunitní reakci

- 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



Oxidační stres

– výsledek nerovnováhy mezi

produkcí ROS a antioxiací

– patologické změny u živých organismů

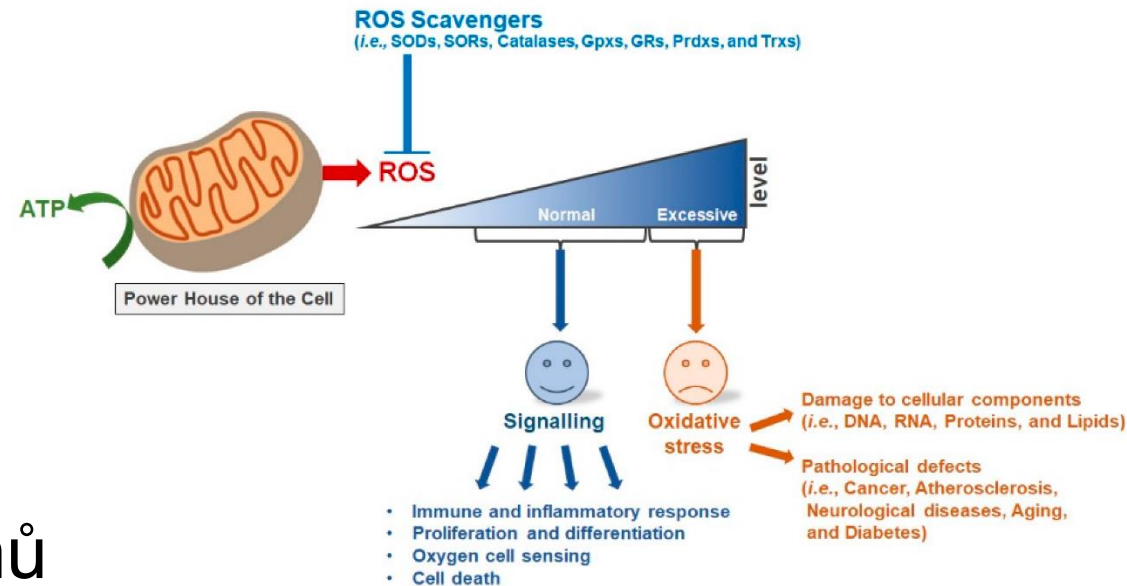
– rakovina, ateroskleróza, neurologické nemoci, stárnutí a cukrovka, poškození buněčných složek (DNA, RNA, lipidy, a proteiny)

– ne-enzymatická obrana:

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

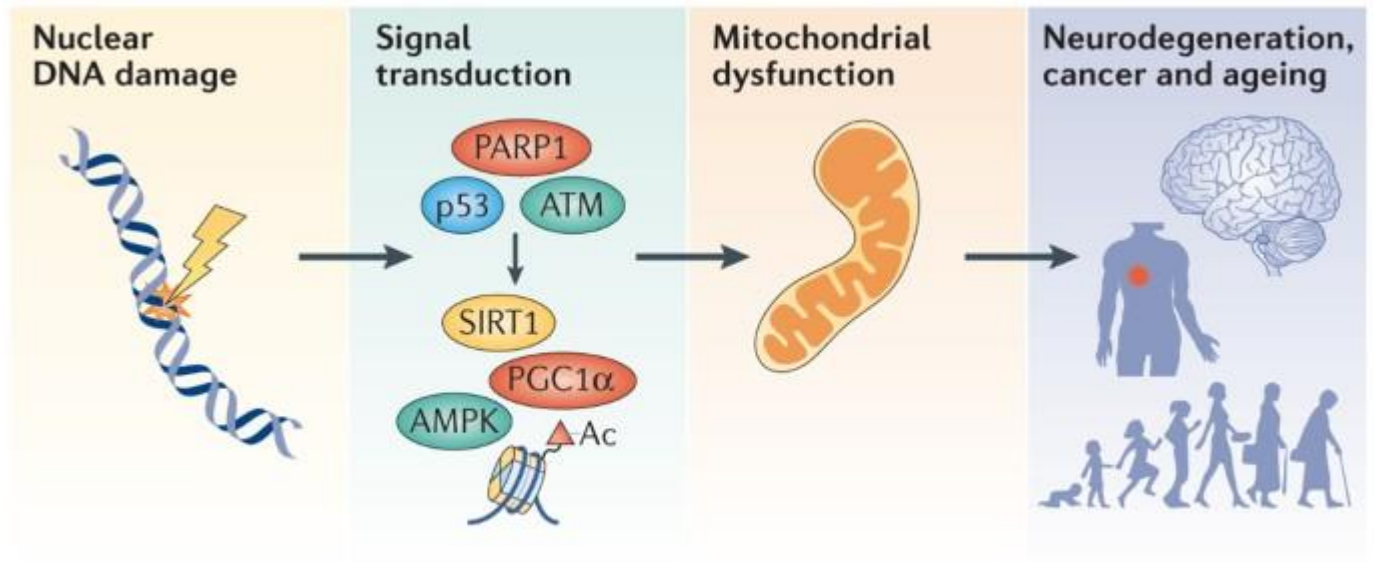
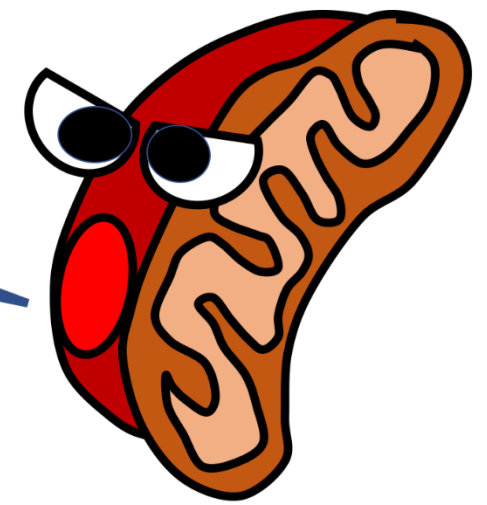
– enzymatické antioxianty:

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



Mitochondriální disfunkce

Are you calling me dysfunctional?



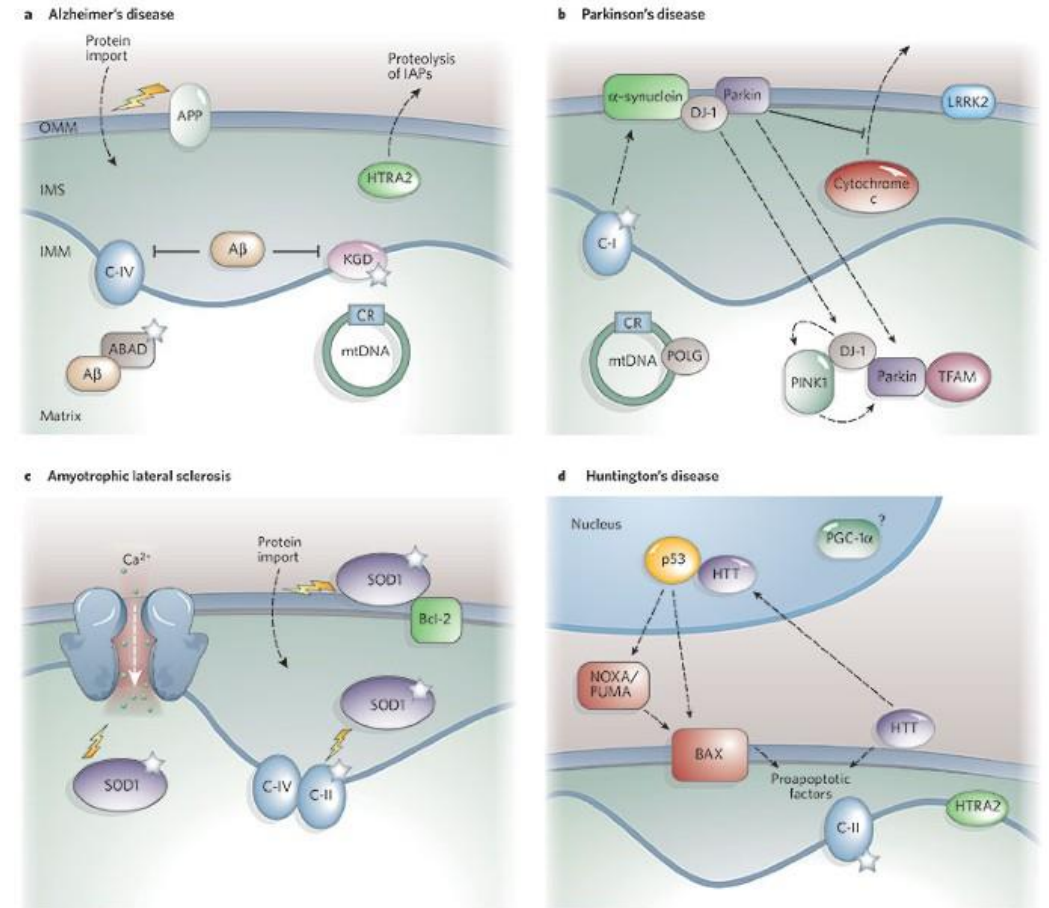
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Mitochondriální disfunkce



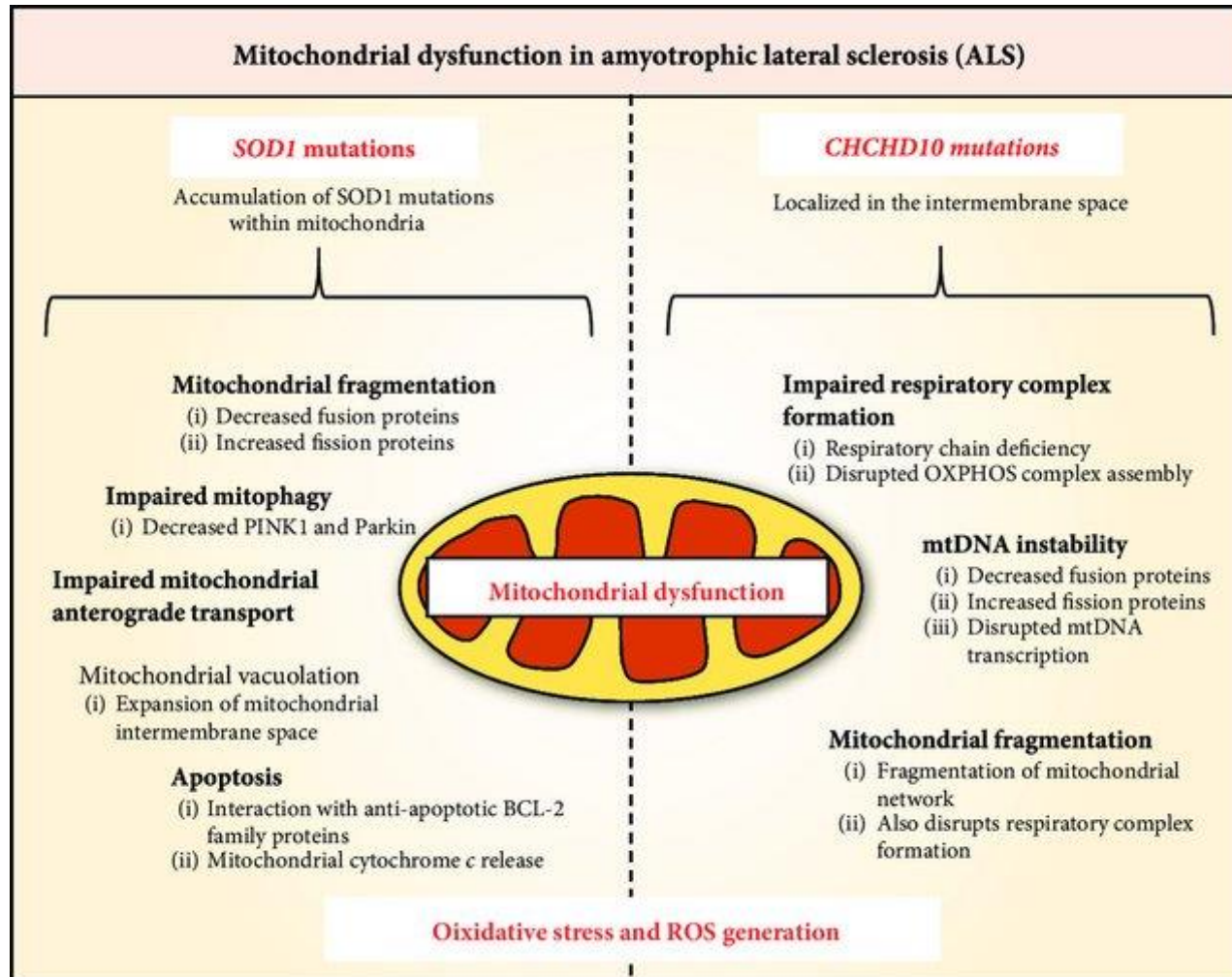
Mitochondriální disfunkce

- 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



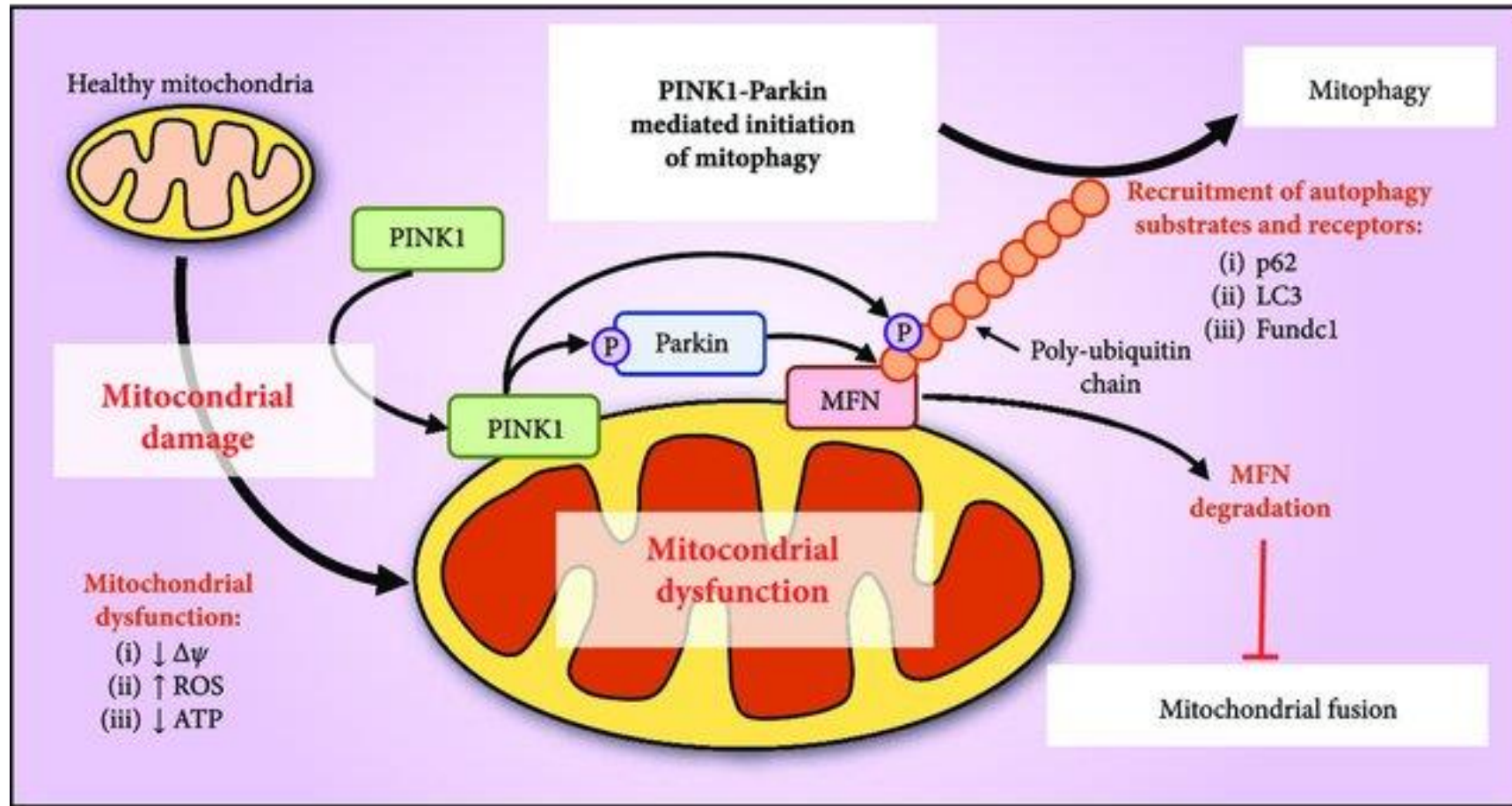
Nature volume 443, pages787–795(2006)

Oxidační stres

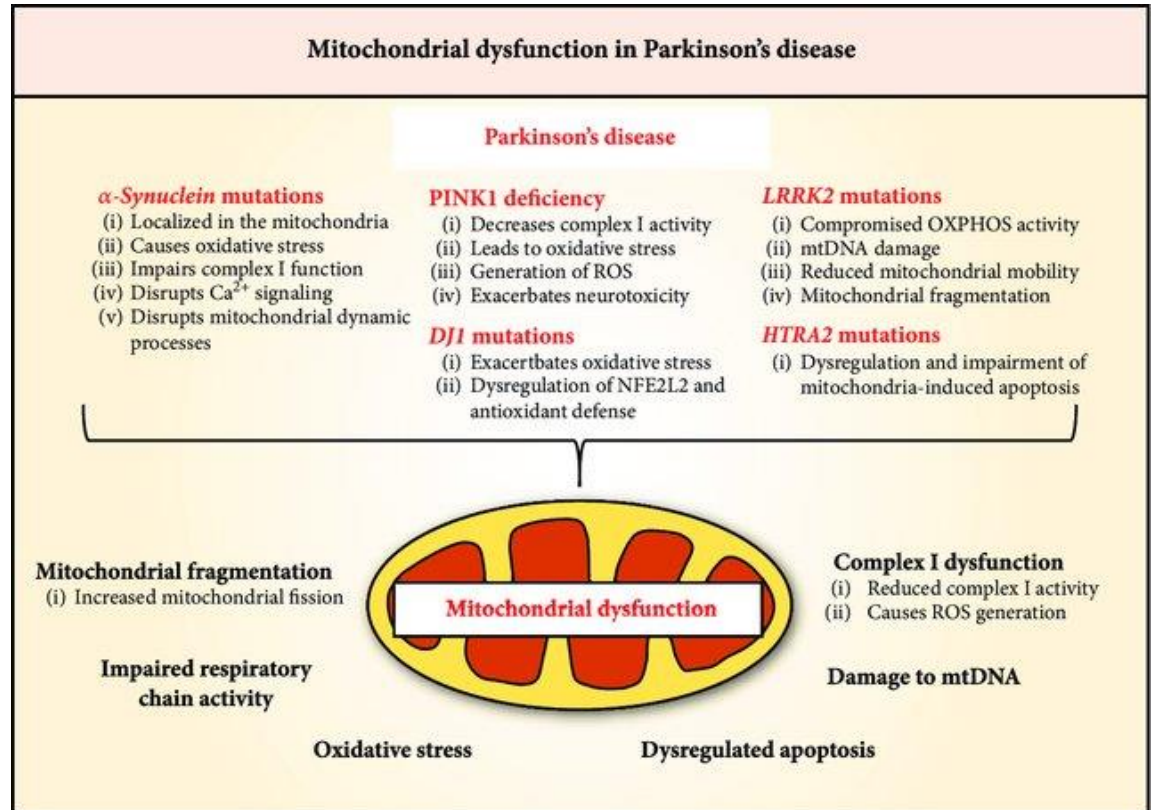
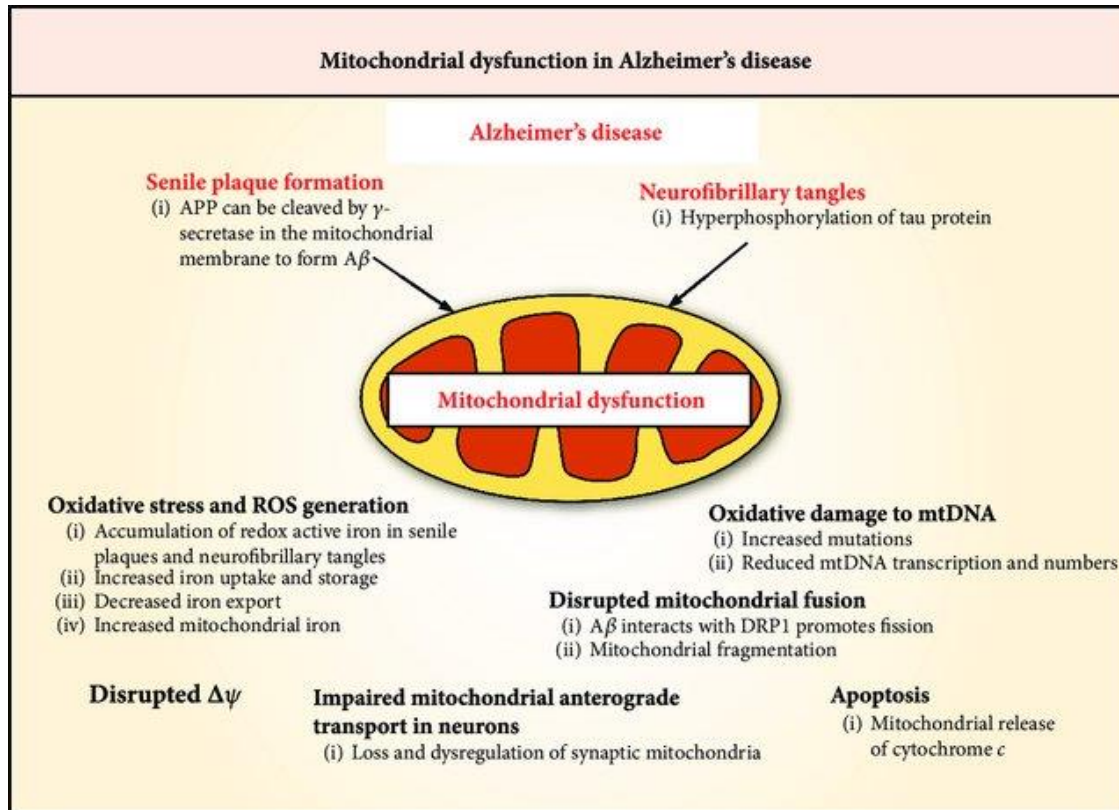


Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019

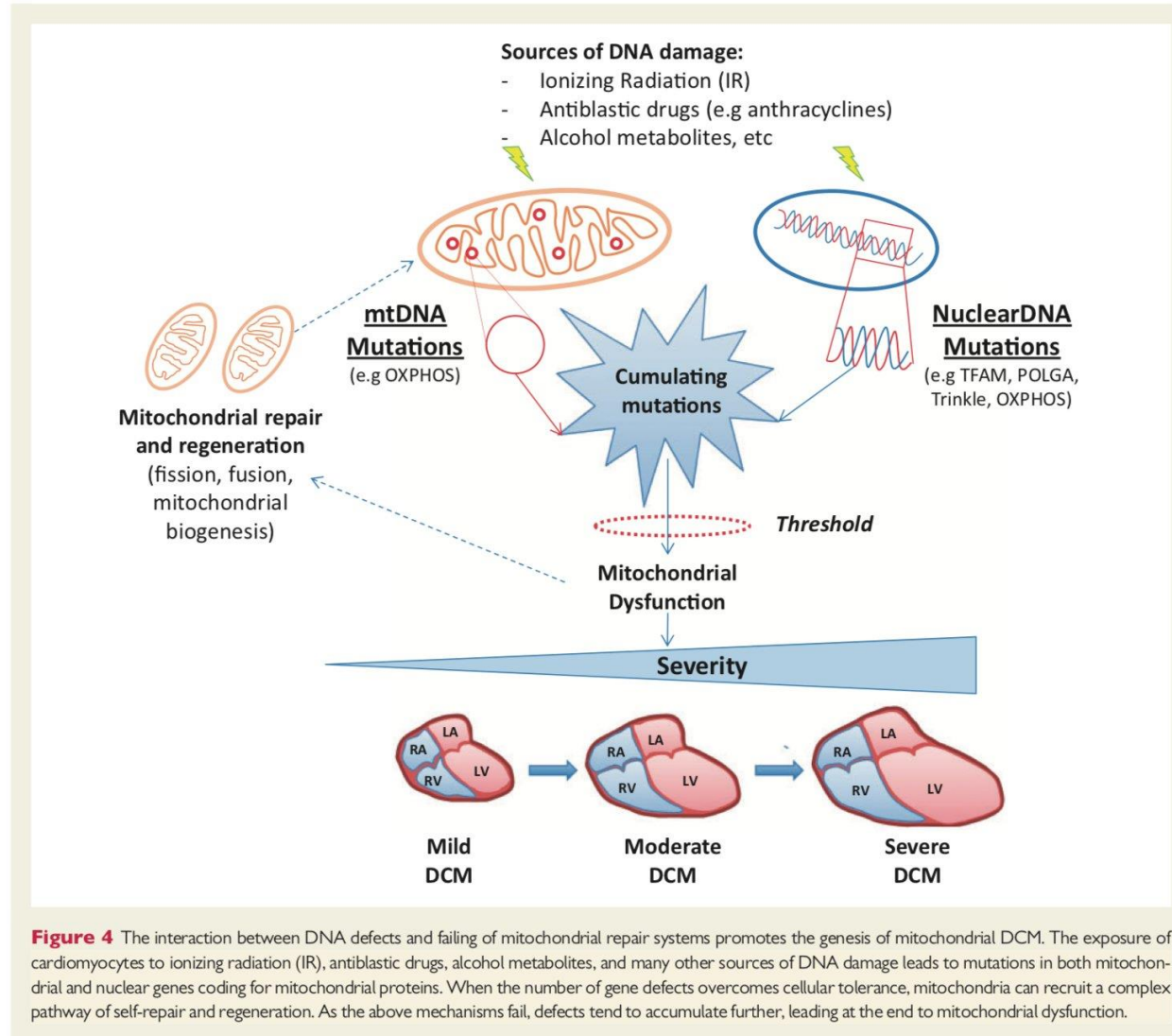
Mitochondriální disfunkce



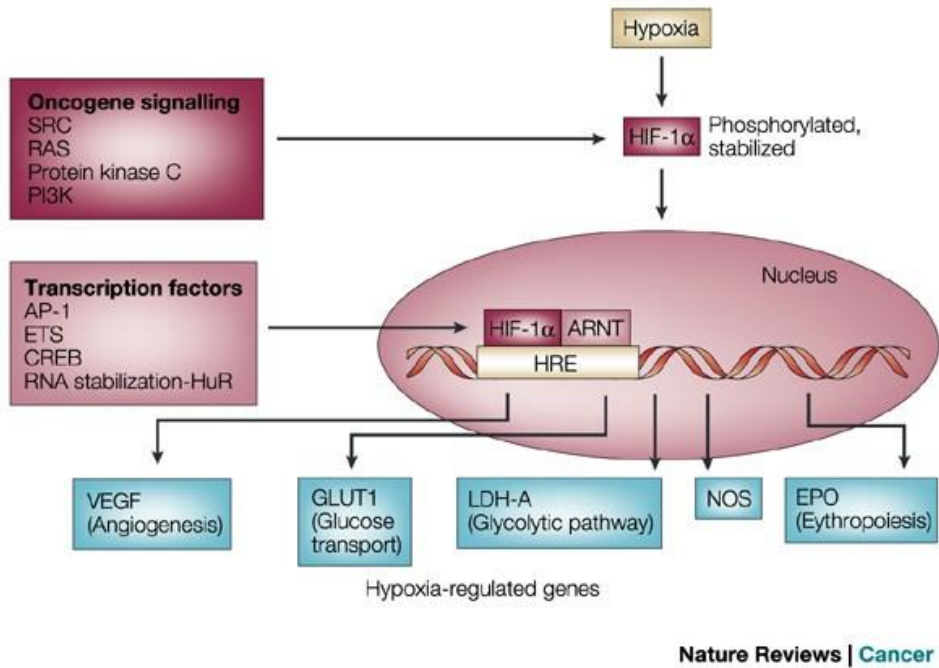
Mitochondriální disfunkce



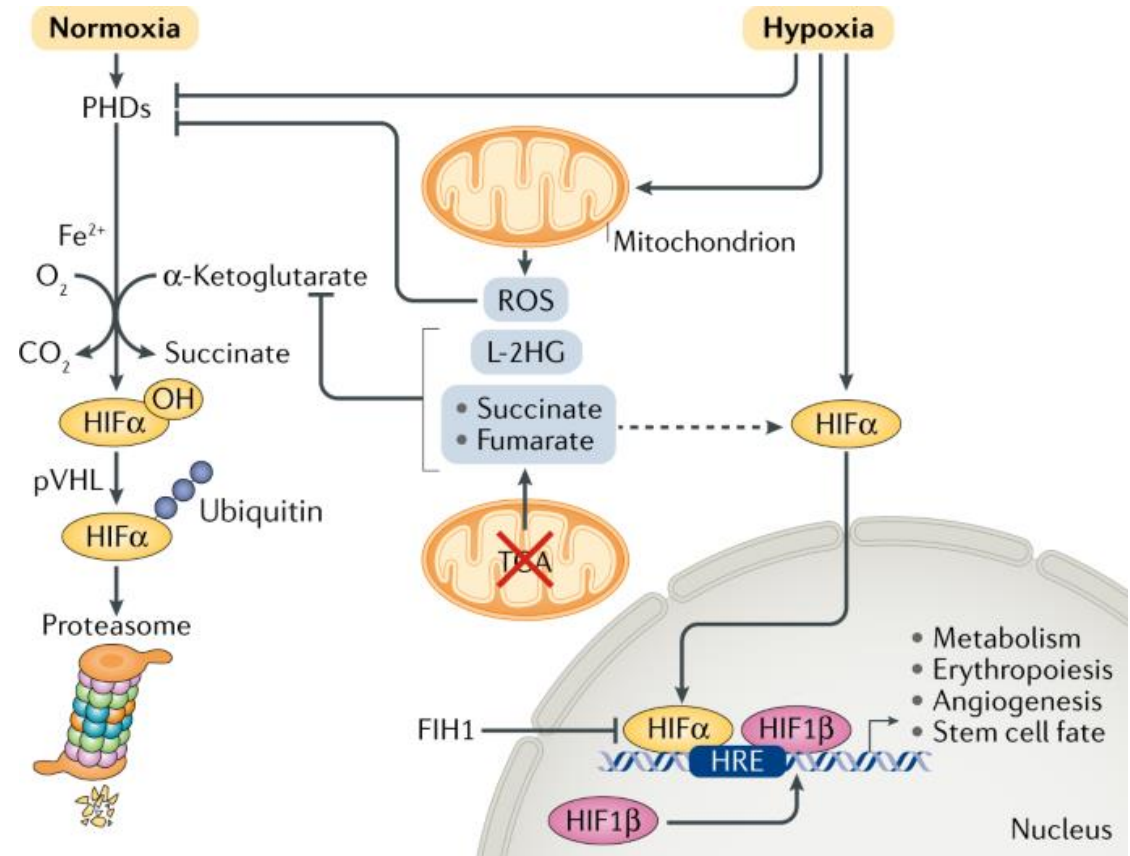
Mitochondrial dysfunction and heart



Mitochondrie a hypoxie



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

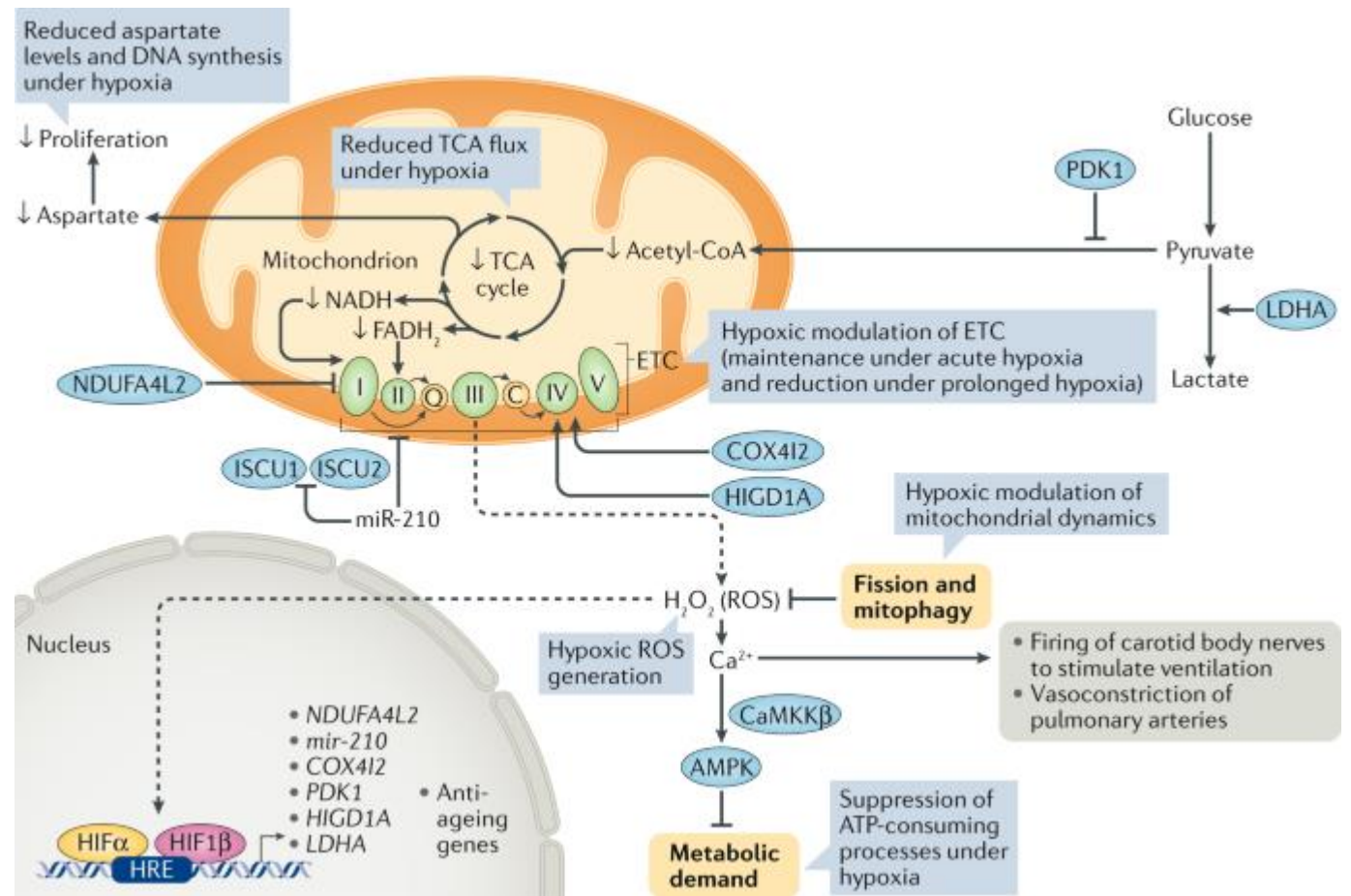


Mitochondrie a hypoxie

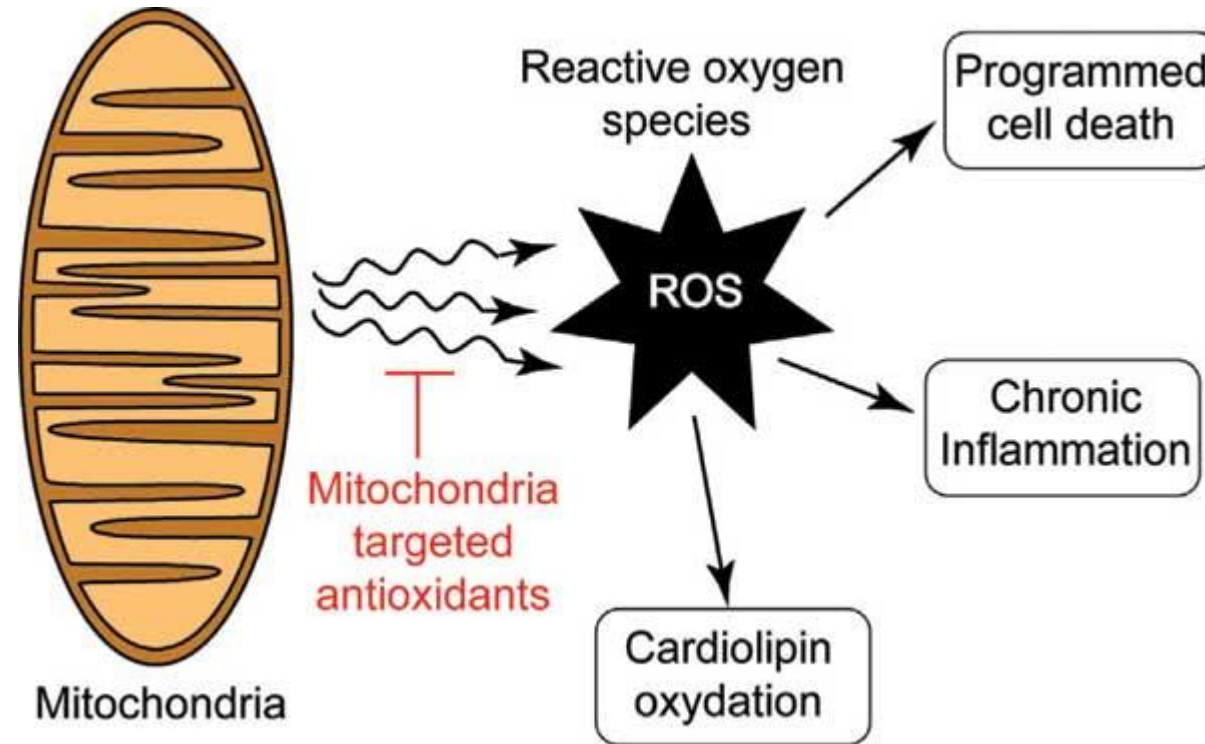
– Akutní vs. chronická

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

– nízký vs. limitní/žádný O₂

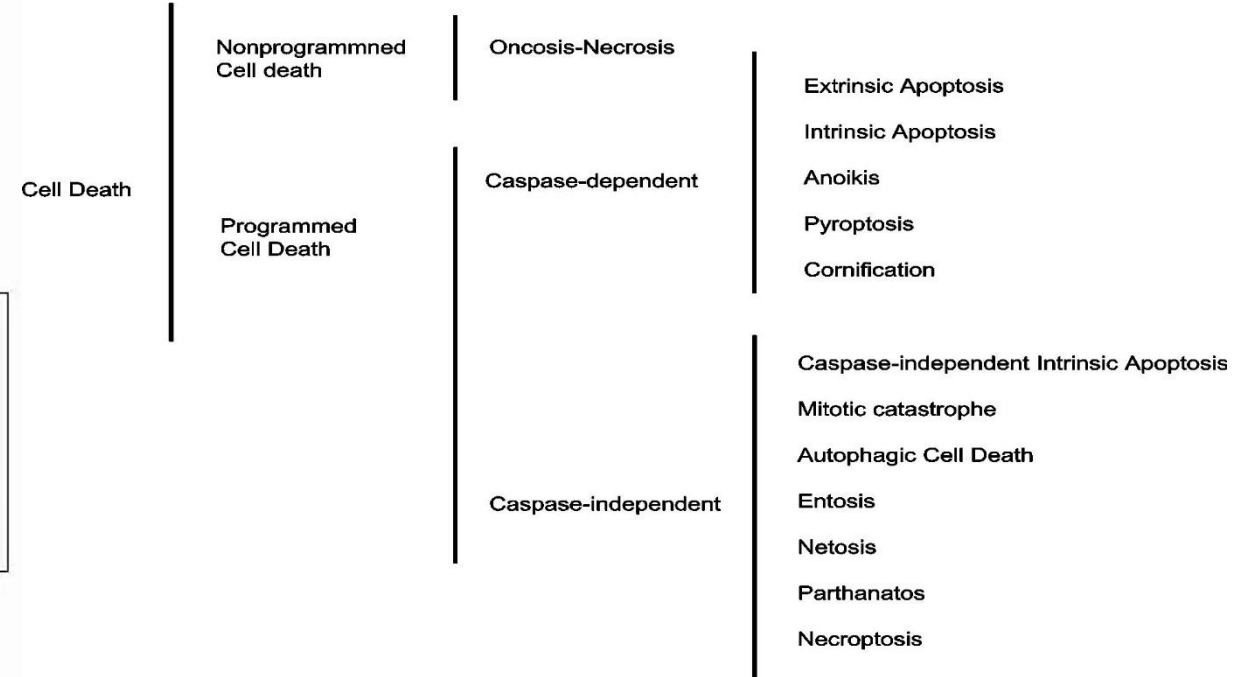
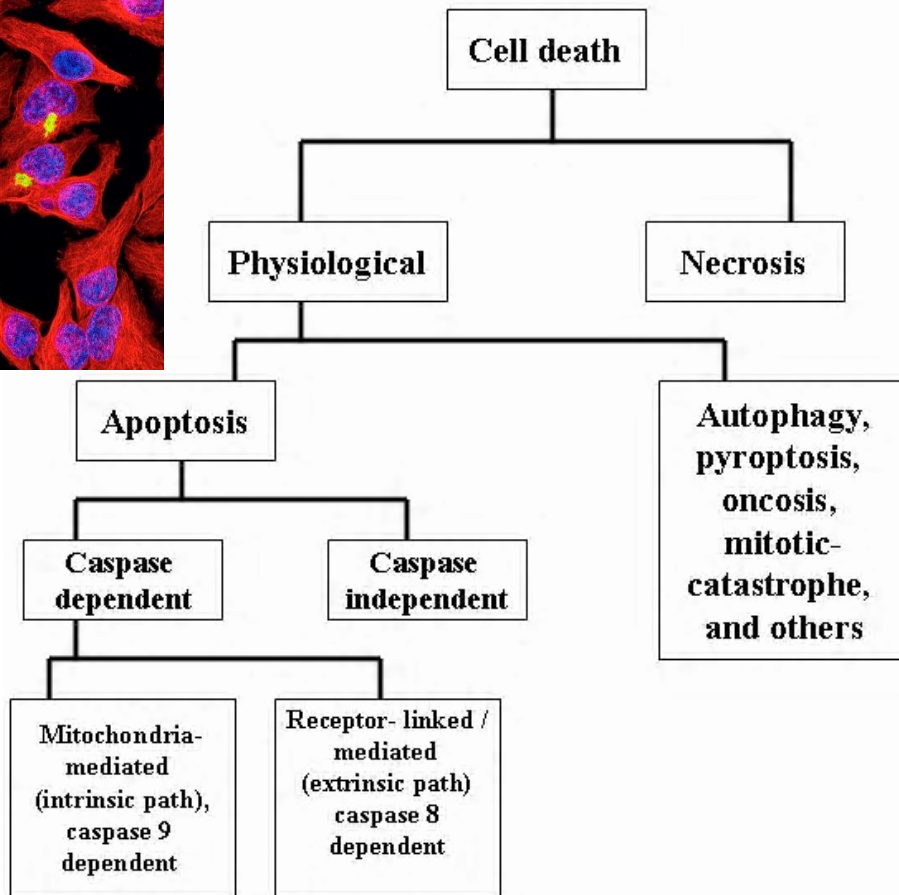
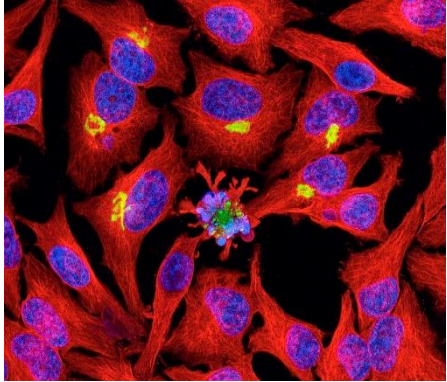


Buněčná smrt



Current Aging Science Volume 10 , Issue 1 , 2017

Buněčná smrt



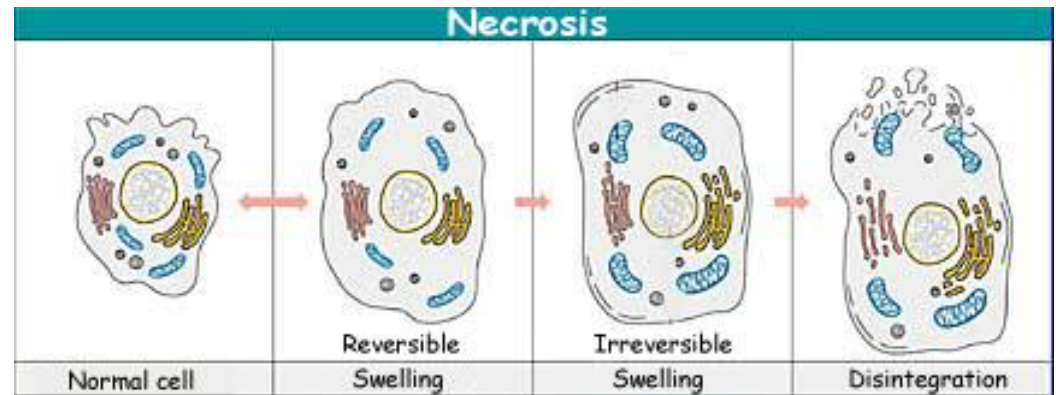
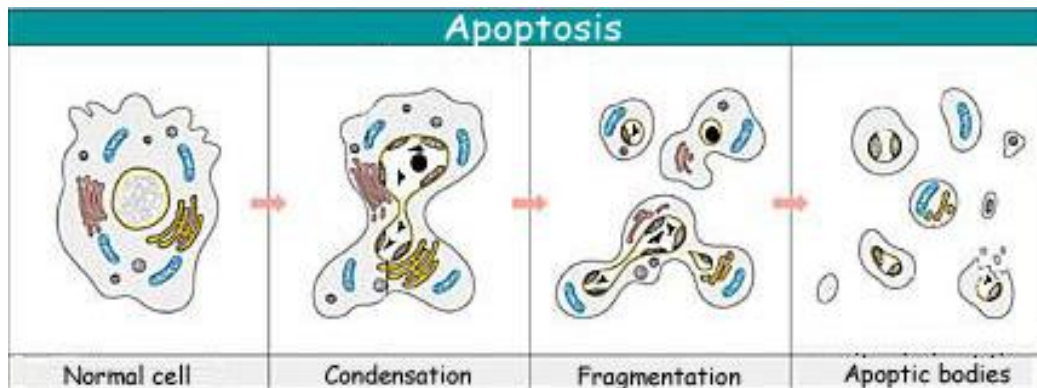
Apoptóza versus nekróza

Apoptóza:

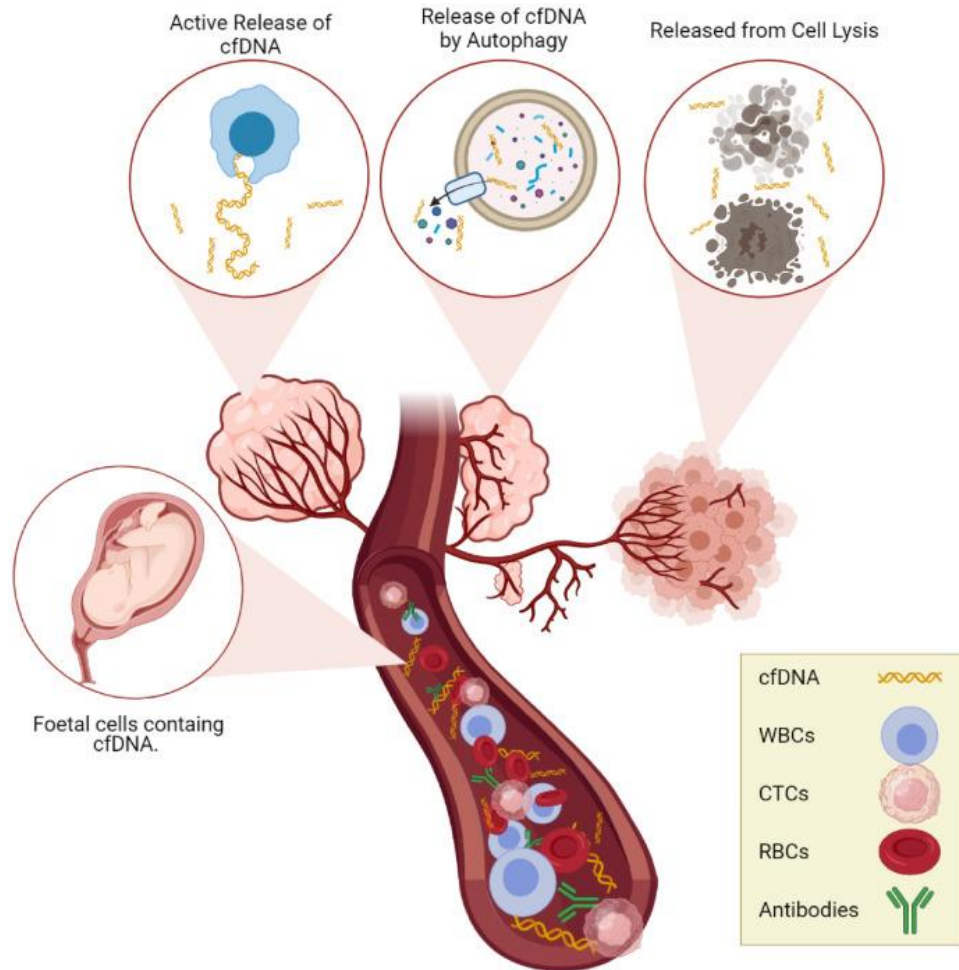
programovaný proces
kondenzace chromatinu - fragmentace jádra
odbourání cytoskeletu („scvrknutí“ buňky)
fragmentace chromozomální DNA (180 bp)
mitochondrie zůstávají intaktní
buněčná membrána se vychlipuje
umírající buňka je fagocytována sousedními buňkami

Nekróza:

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



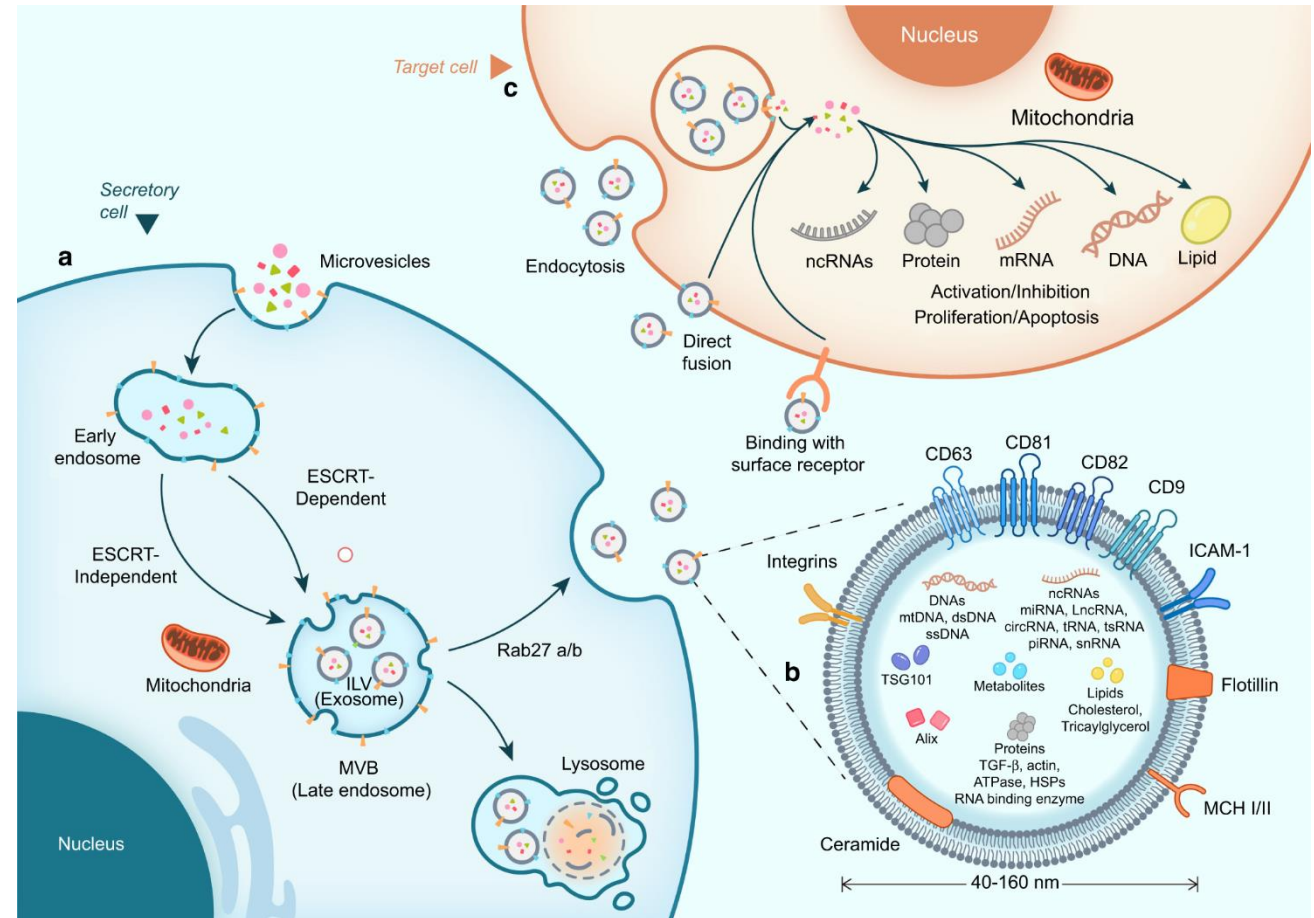
Volná DNA



- Buněčné procesy, od lýzy buněk po uvolnění DNA, jsou hlavními místy pro syntézu cfDNA.
- cfDNA se často využívá pro diagnostiku a prognózu rakoviny a příbuzných onemocnění
 - Je přítomna v fetálních tekutinách, kde slouží jako důležitý biomarker pro diagnostiku abnormalit a prenatalní analýzy – příkladem je Downův syndrom

Exosomy

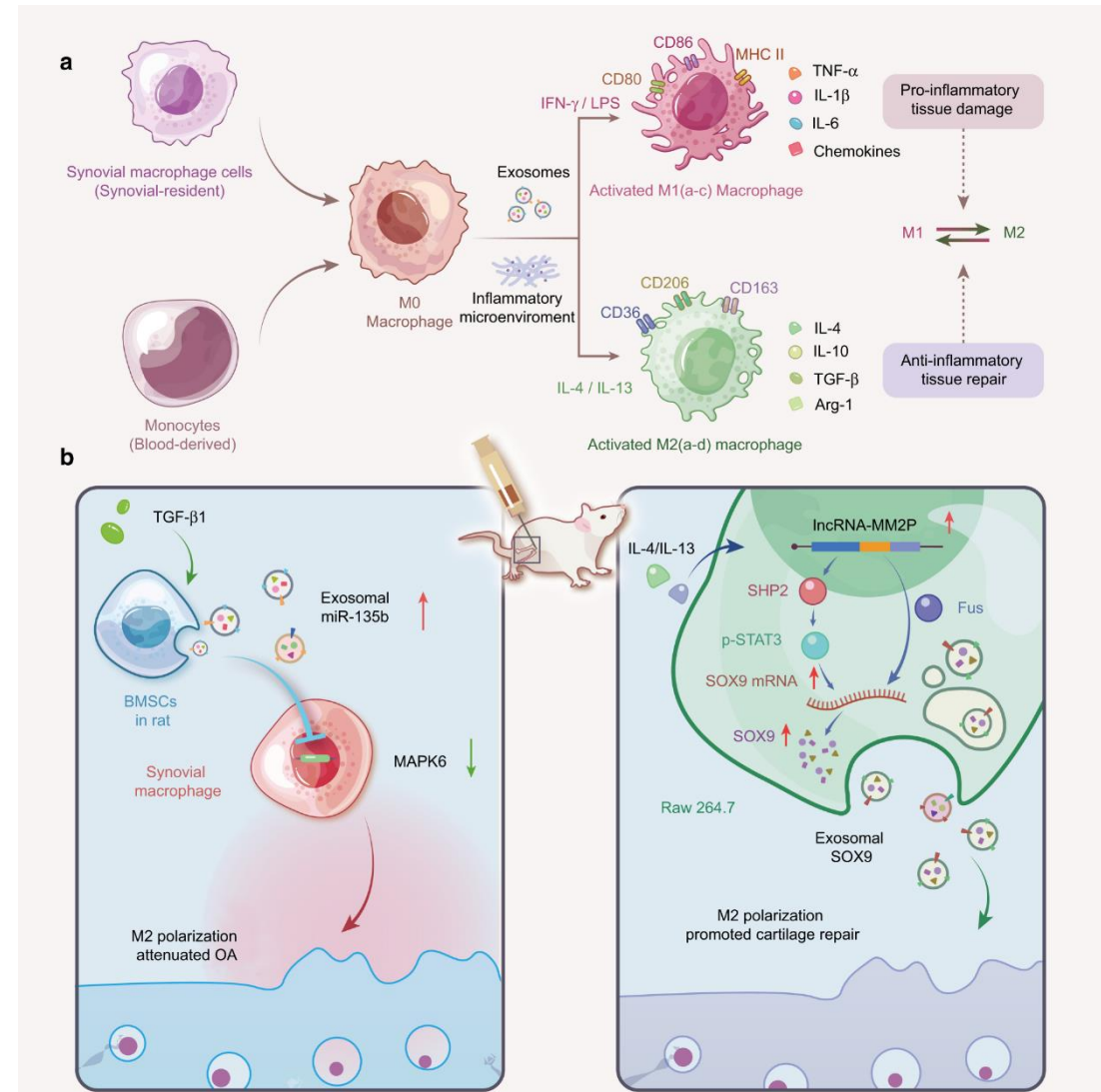
- obsahují různé vnitřní složky a variabilní náklad, který může zahrnovat proteiny, lipidy, metabolity a DNA až po ncRNA
- iniciuje biologické reakce a fenotypové změny v cílových buňkách
 - carrying anabolic/catabolic and anti-/proinflammatory factors
- exosomy slouží jako klíčové médium pro mezibuněčnou komunikaci



International Journal of Oral Science volume 14, Article number: 40 (2022)

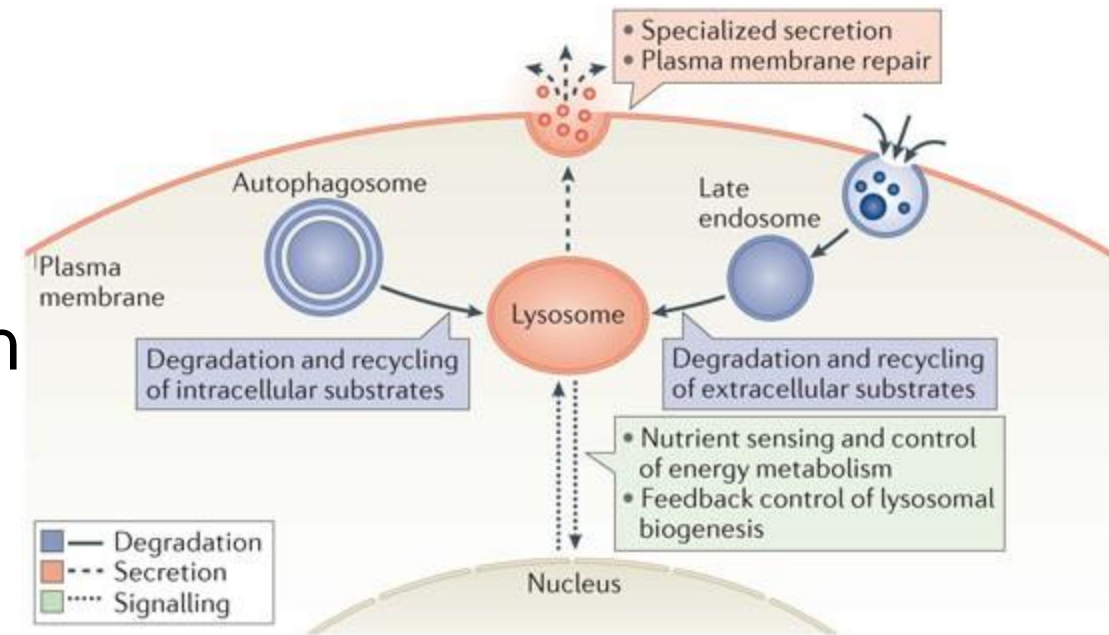
Exosomy v terapii

- Progrese osteoartrózy (OA) může být zmírněna usnadněním přepnutí makrofágů z prozánětlivého fenotypu M1 na protizánětlivý fenotyp M2



Signály z lysozomu: kontrolní centrum buněčné clearance a energetického metabolismu

- degradation and recycling of cellular waste
- via endocytosis and autophagy
- Lysosomal and autophagy dysfunction
 - lysosomal storage diseases (LSDs) and
 - common neurodegenerative diseases
- defective cellular clearance and accumulation of toxic material

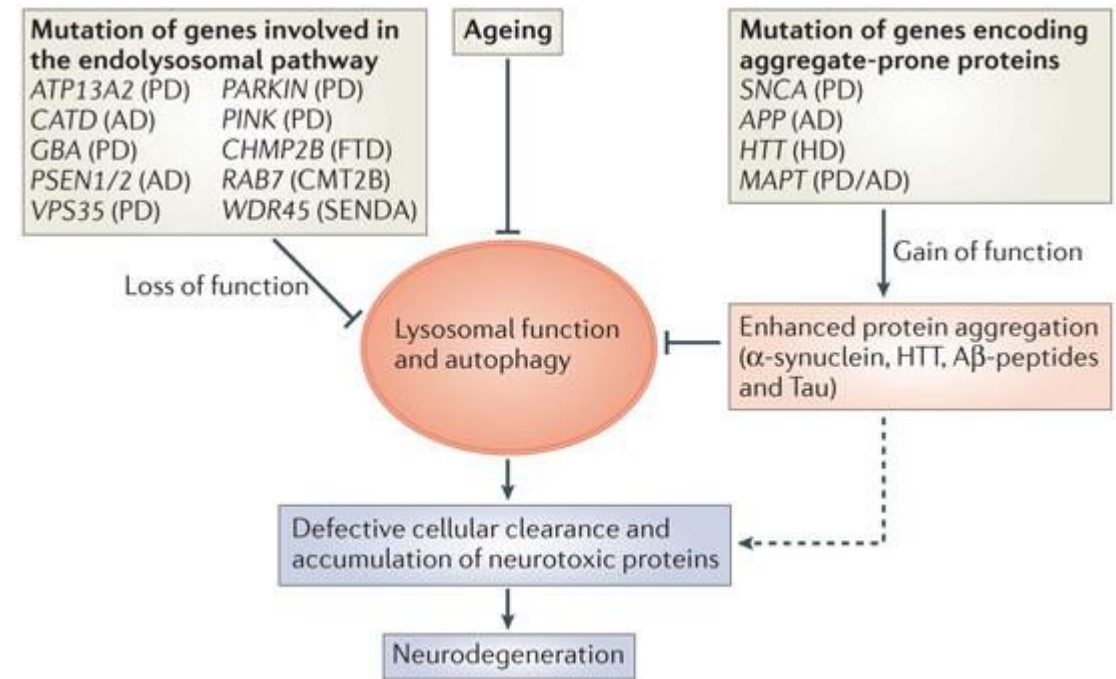


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

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

Defektní buněčná clearance u neurodegenerativních onemocnění

- loss-of-function mutace genů zapojených do lysozomálně-autofagické dráhy
- gain-of-function mutace u proteinů náchylných k agregaci
 - zvýšená agregace proteinů a narušení lysozomálně-autofagických drah

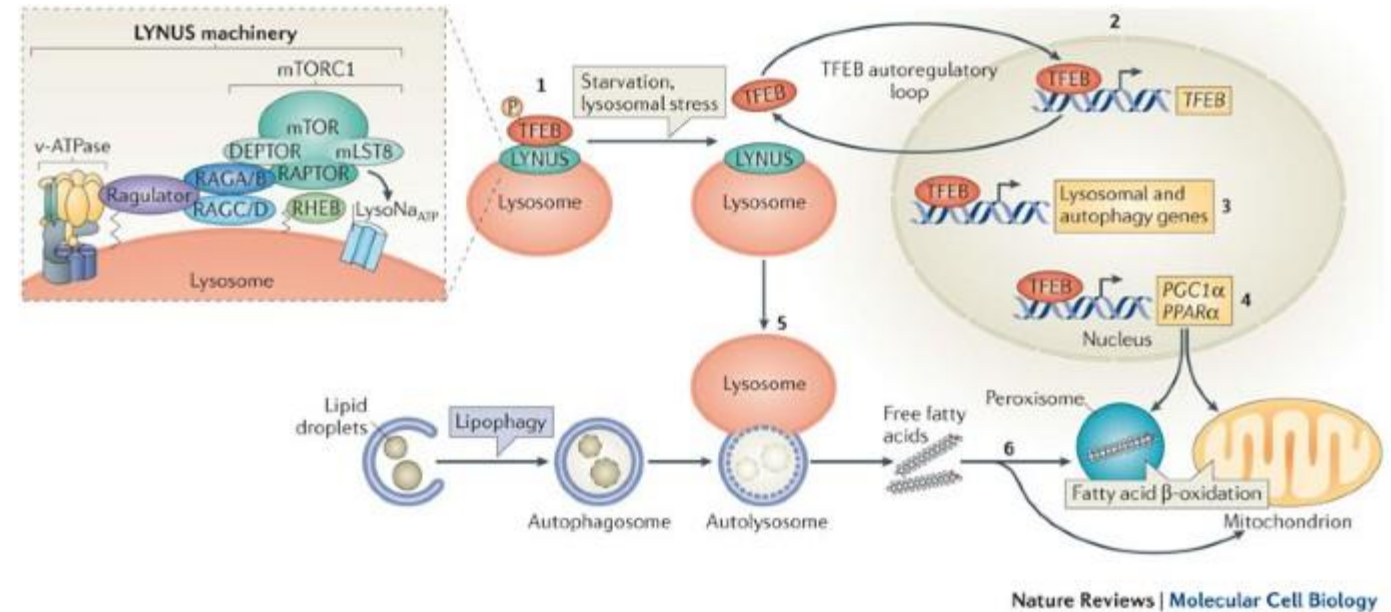


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

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

Lysosomy a hladovění

- omezená dostupnost živin a zprostředkování odpovědi na hladovění regulací katabolismu lipidů
- nádorové buňky



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

Zánět

Zánět

Reakce akutní fáze

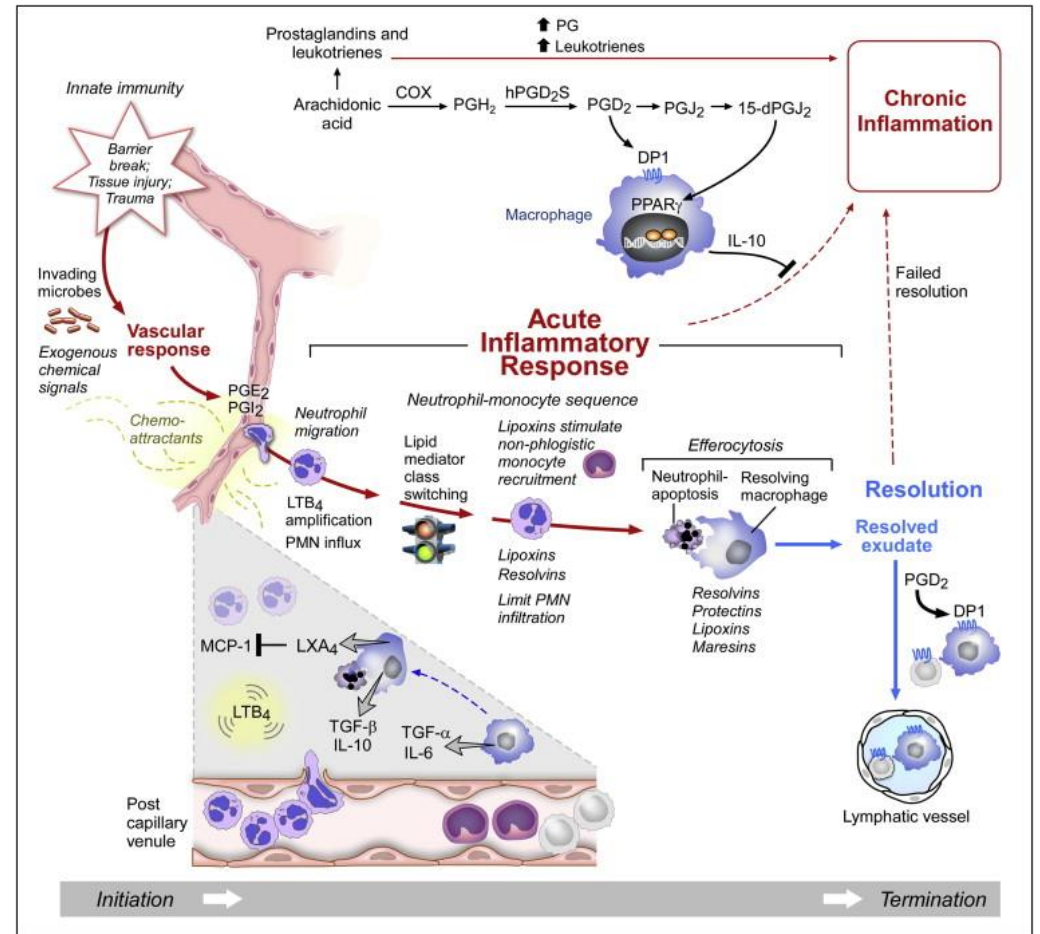
Cytokiny, chemokiny

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).

Typy zánětu

- Akutní
- Chronický

- Lokální
- Systémový

SYSTÉMOVÉ A MÍSTNÍ KLINICKÉ SYMPTOMY AKUTNÍHO ZÁNĚTU

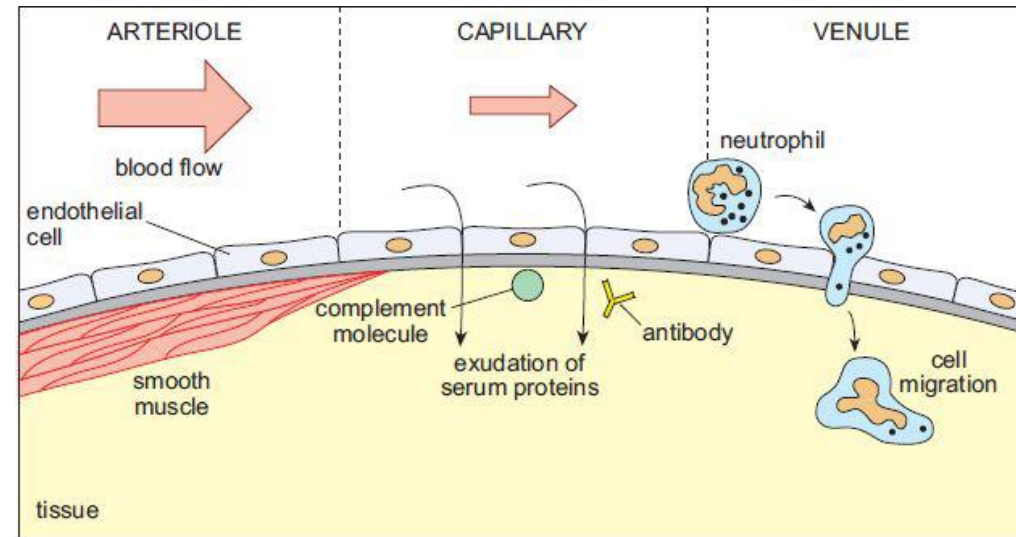
Lokální příznaky	Systémové příznaky
calor	horečka
rubor	tachykardie
dolor	hyperventilace
tumor	únavnost
functio laesa	ztráta chuti k jídlu

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

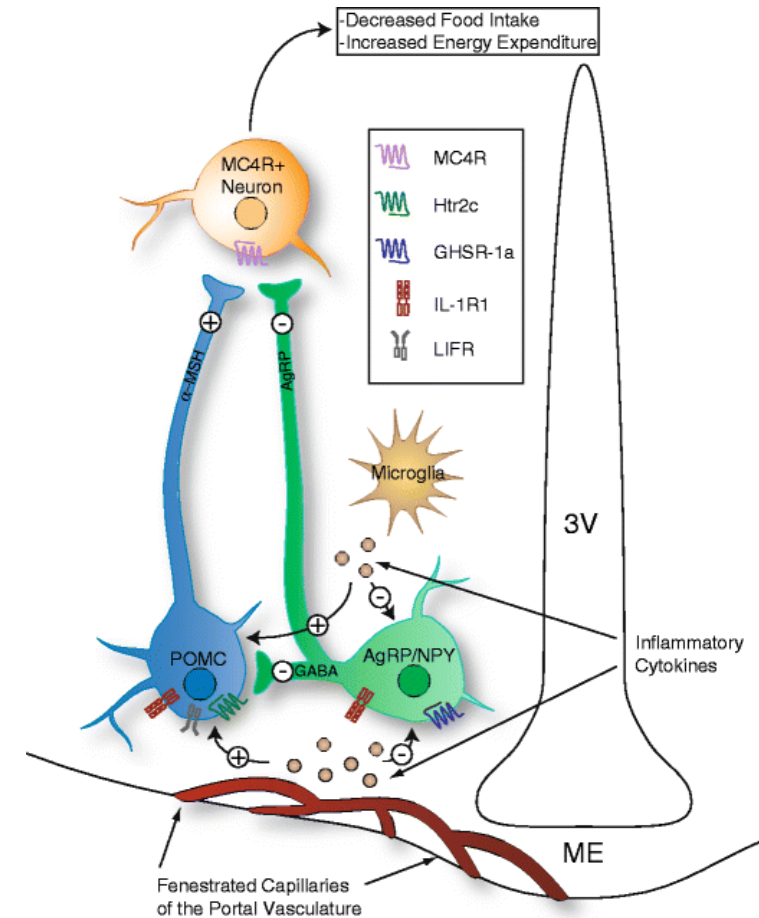
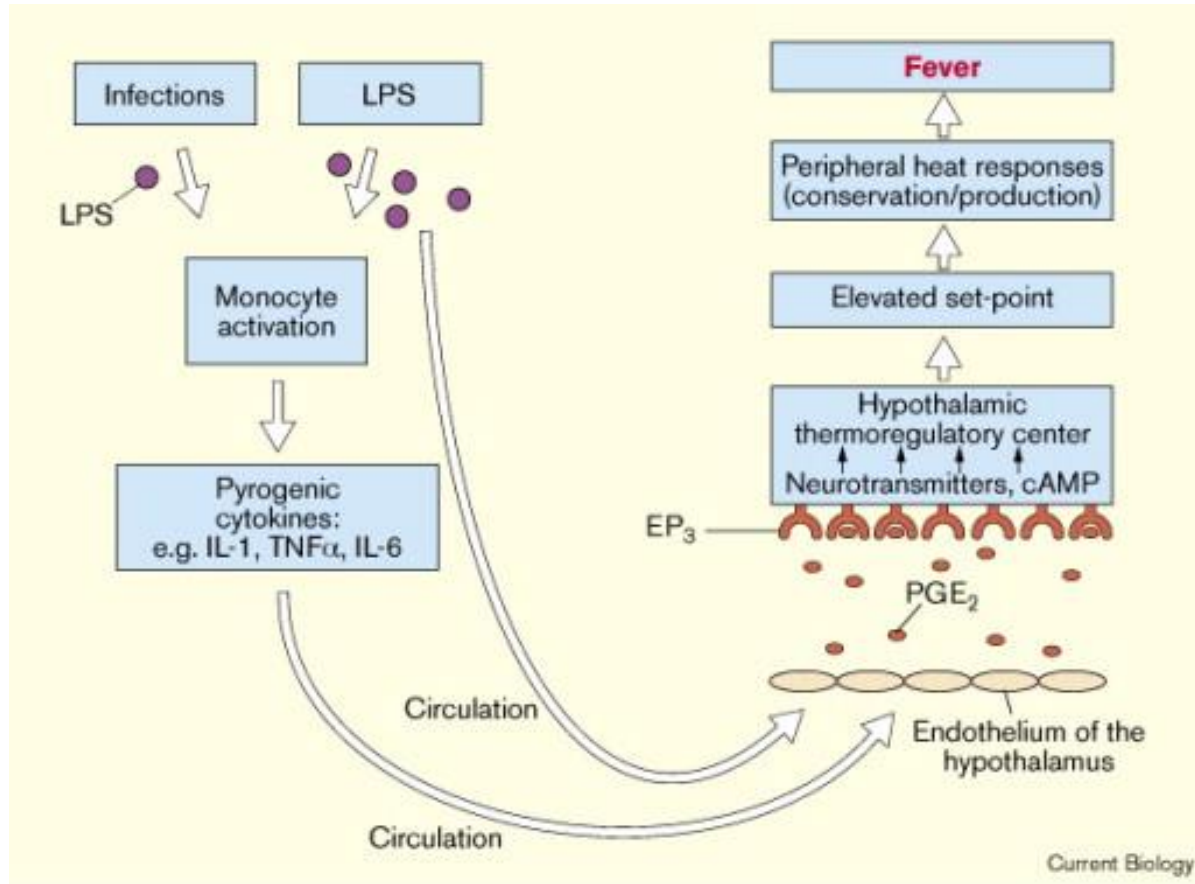
Polymorfonukleáry a makrofágy produkují endogenní pyrogeny, které resetují termoregulační centrum v hypotalamu na vyšší teplotu. Uvolnění endogenních pyrogenů je stimulováno fagocytózou, endotoxiny a imunitními komplexy.

→ 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

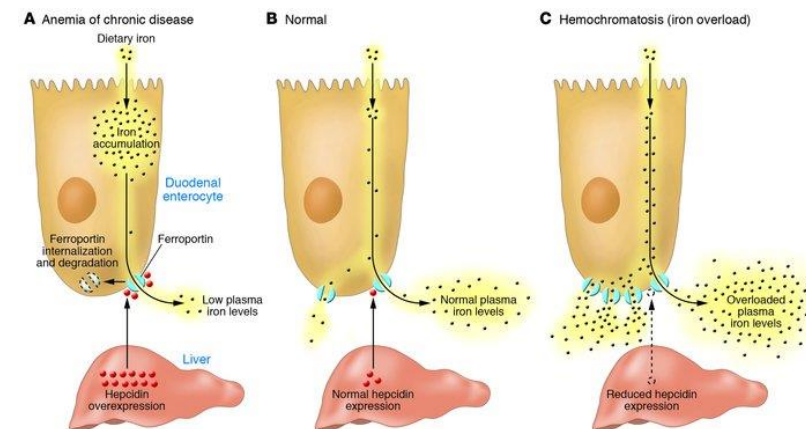
– Hematologické změny

- 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 (v krvi i místně)	Erytrocyty
Metabolické	Proteiny akutní fáze serová Cu katabolismus bílkovin glukoneogeneze	Sérové Fe, sérový Zn syntéza albuminu transtyretin, transferin
Endokrinní	glukagon insulin ACTH GH T4 kortisol aldosteron vasopressin	T3 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- α / β , IL-1 α / β , IL-6, INF- α / γ a IL-8) do krve.
- Tyto cytokiny aktivují různé cílové buňky, což vede k aktivaci hypotalamu, redukcii 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 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
 α_1 -Protease inhibitor
 α_1 -Antichymotrypsin
Pancreatic secretory trypsin inhibitor
Inter- α -trypsin inhibitors
Transport proteins
Ceruloplasmin
Haptoglobin
Hemopexin
Participants in inflammatory responses
Secreted phospholipase A₂
Lipopolysaccharide-binding protein
Interleukin-1-receptor antagonist
Granulocyte colony-stimulating factor
Others
C-reactive protein
Serum amyloid A
 α_1 -Acid glycoprotein
Fibronectin
Ferritin
Angiotensinogen

Proteins whose plasma concentrations decrease

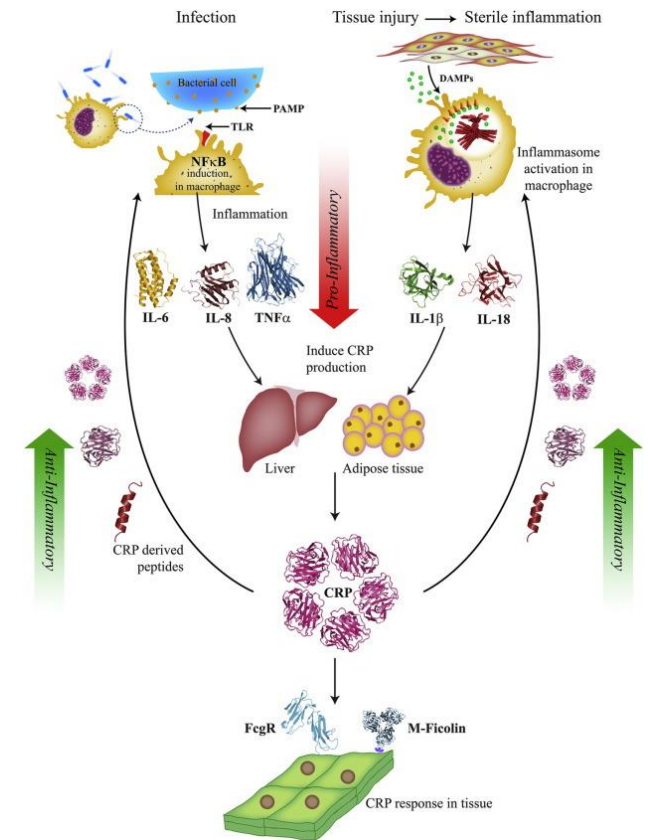
Albumin
Transferrin
Transthyretin
 α_2 -HS glycoprotein
Alpha-fetoprotein
Thyroxine-binding globulin
Insulin-like growth factor I
Factor XII

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 vychytávání bakterií a jejich produktů
- Aktivace komplementu
- Vychytávání volného hemoglobinu a radikálů

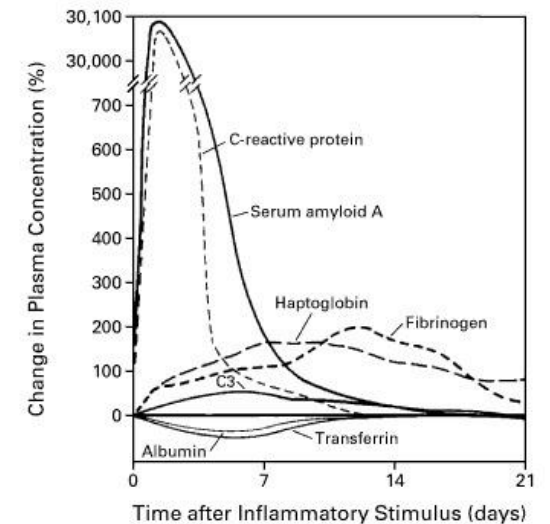
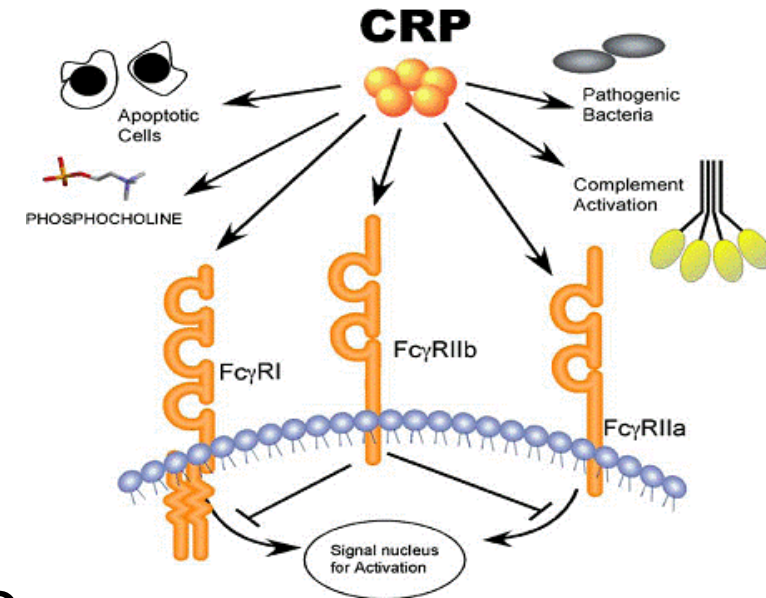


Biotechnology Advances Volume 34, Issue 3, May–June 2016

Funkce	Protein akutní fáze	Nárůst v průběhu
Inhibitory proteáz	Alfa 1-antitrypsin	4 x
	Alfa 1-antichymotrypsin	6 x
Koagulační proteiny (serin proteinázy)	fibrinogen prothrombin factor VIII plasminogen	8 x
Složky komplementu	C1s C2b C3, C4, C5 C9 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.

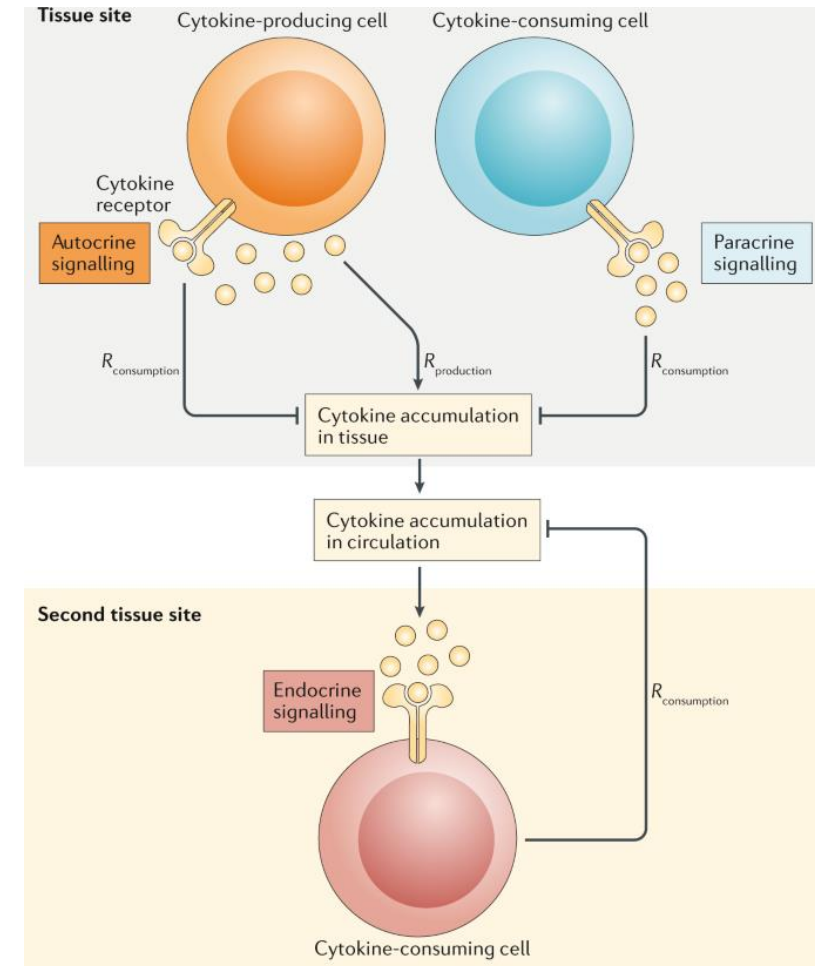


Negativní proteiny akutní fáze

- 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 β 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 β 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

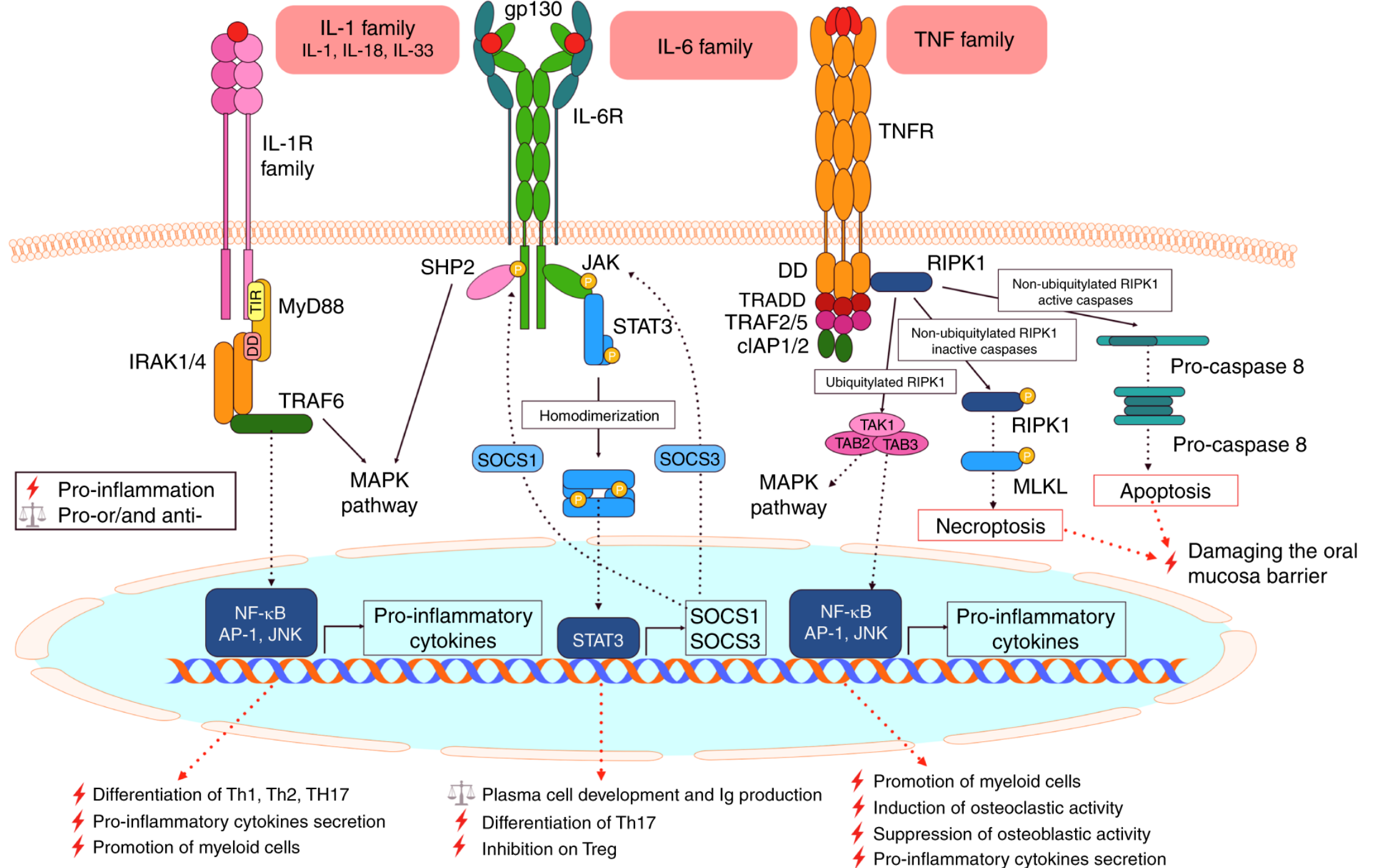
➤ Nenavozují odpověď přímo. Stimulují nebo inhibují produkci specifických DNA vazných proteinů, které kontrolují expresi dalších genů. Cytokin ve vazbě na receptor vyvolává (hod) expresi ***immediate early response genes (IEG)***, několik set). Genové produkty těchto genů se pak vážou na promotorové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

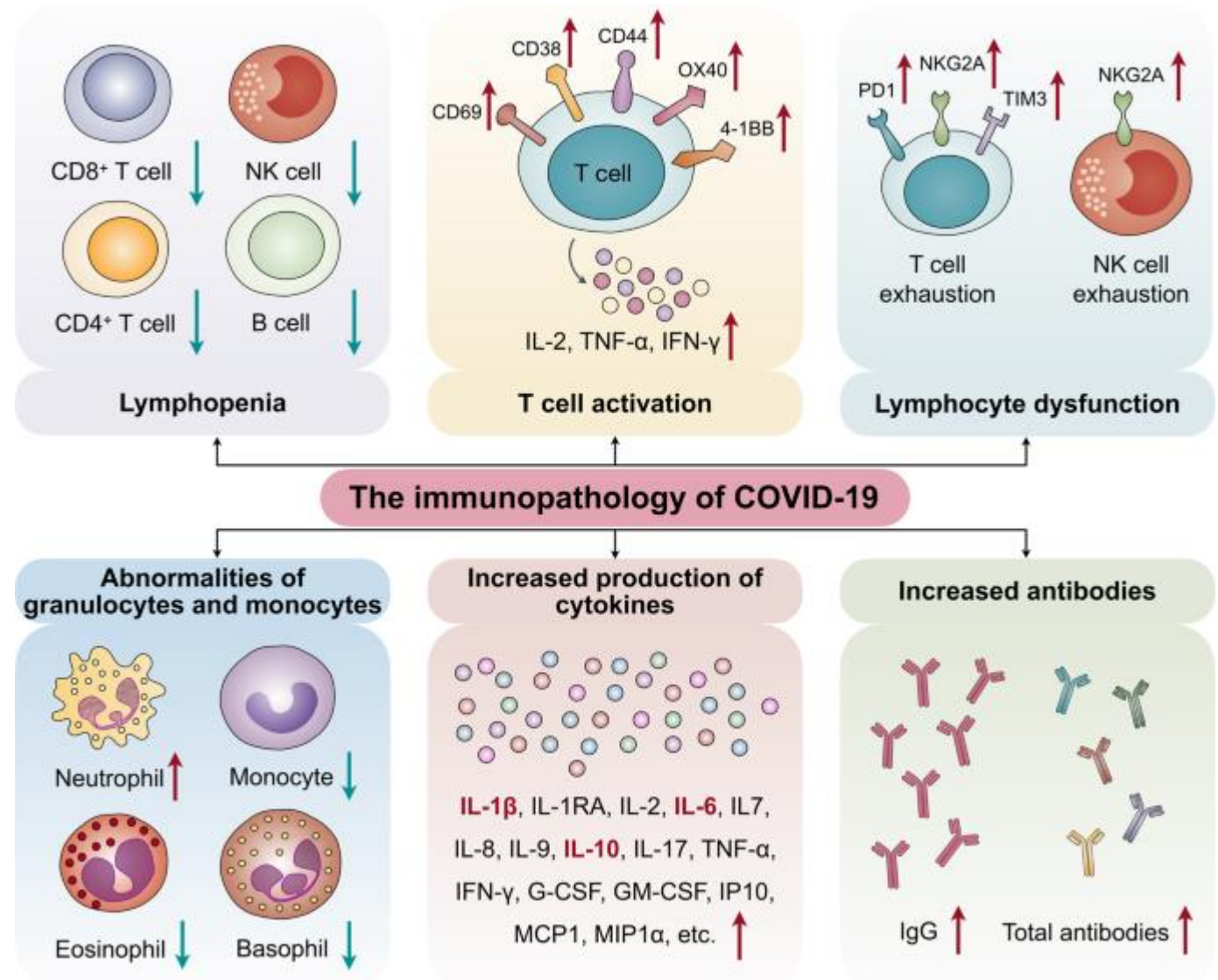
Cytokiny

- 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.

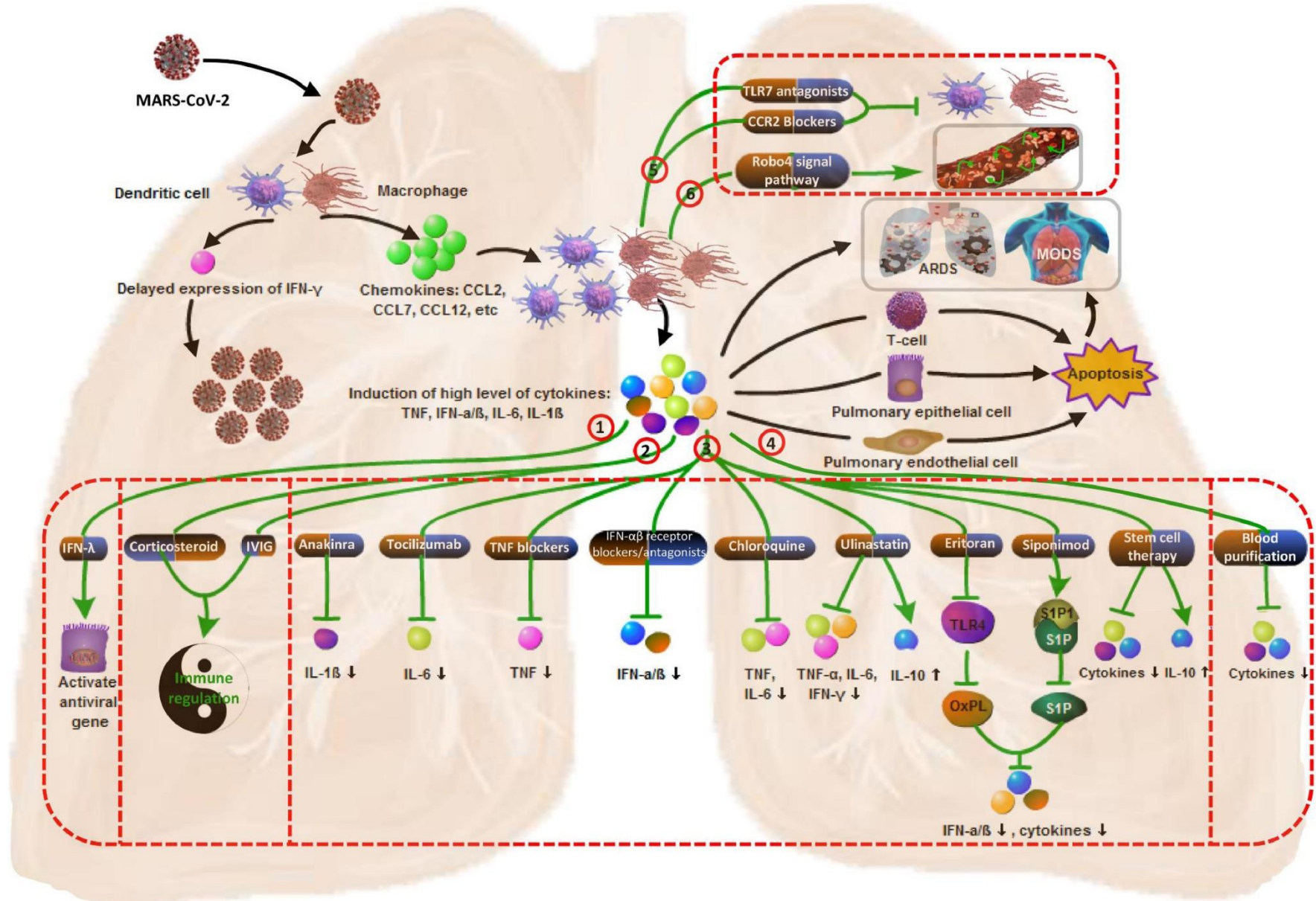


“cytokine storm”

- extreme increase in inflammatory cytokines, including IL-1 β , 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 α , IFN- γ , and TNF- α .



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

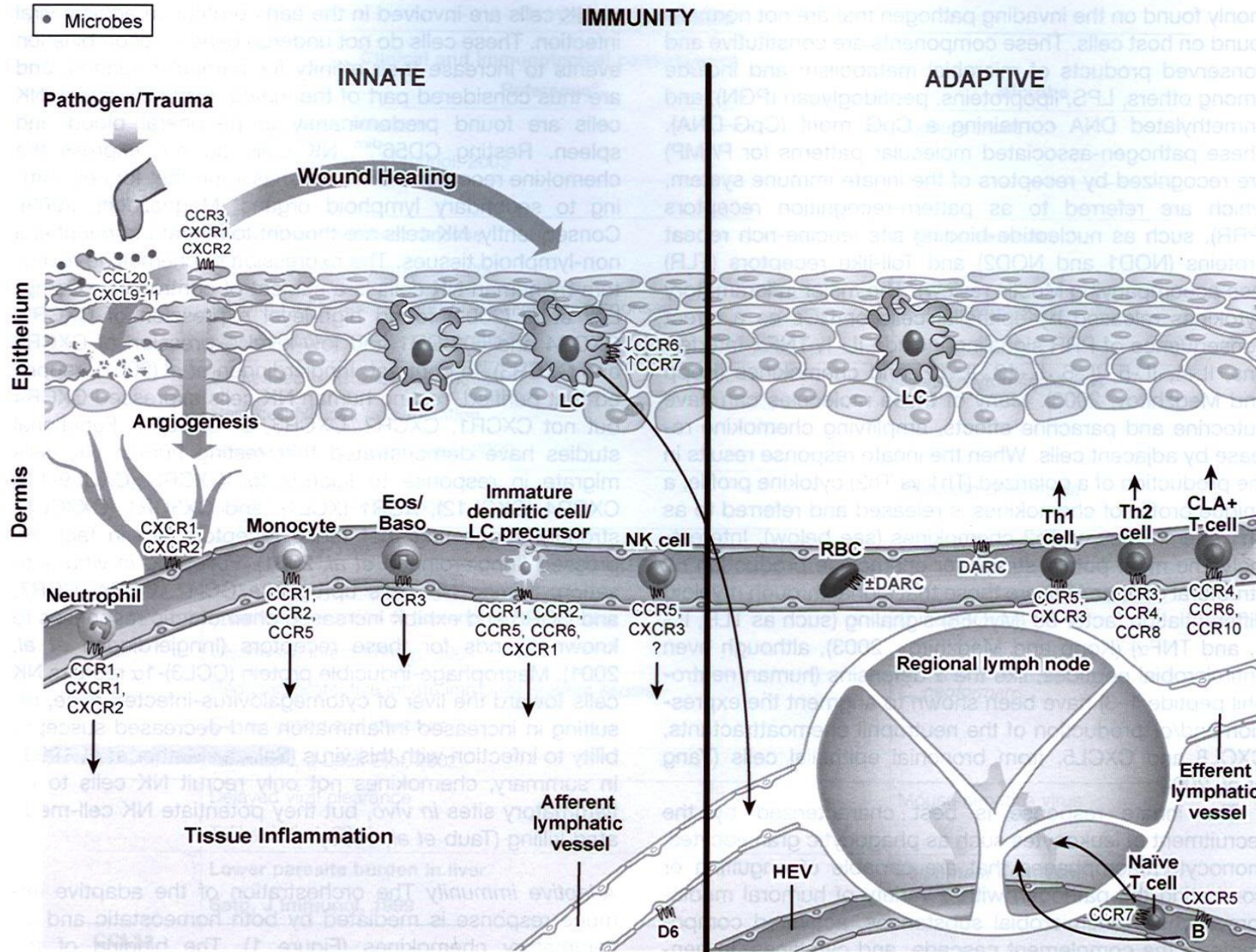
- Biologická aktivita těchto faktorů je řízena pomocí specifických receptorů na buněčném povrchu, jejich exprese je pozitivně nebo negativně modulována téměř všemi cytokiny.
- V chemotaktické odpovědi buněk se aktivně účastní také extracelulární matrix, celulární adhesivní molekuly, cytoskelet a některé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

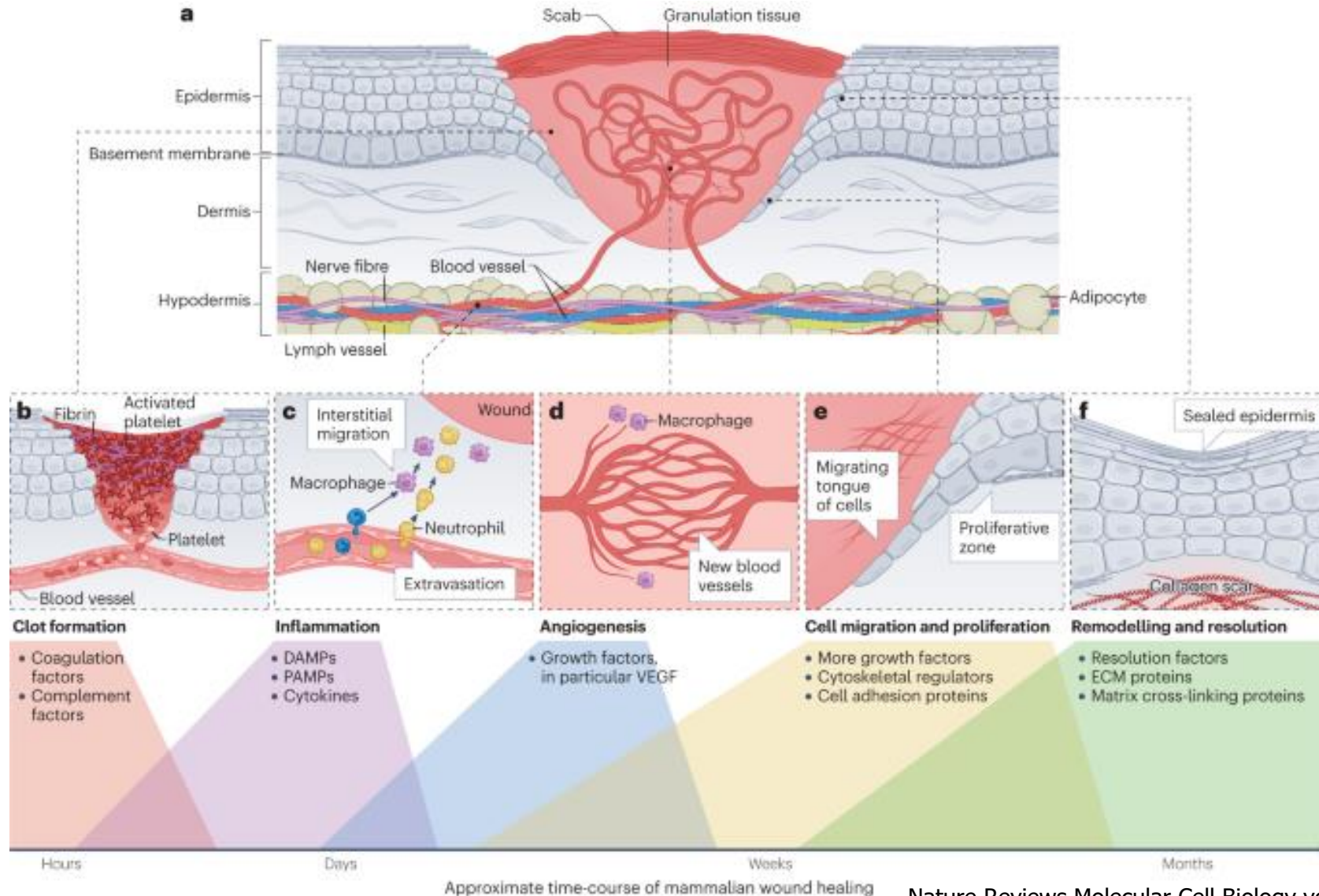
Hojení ran

- 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.

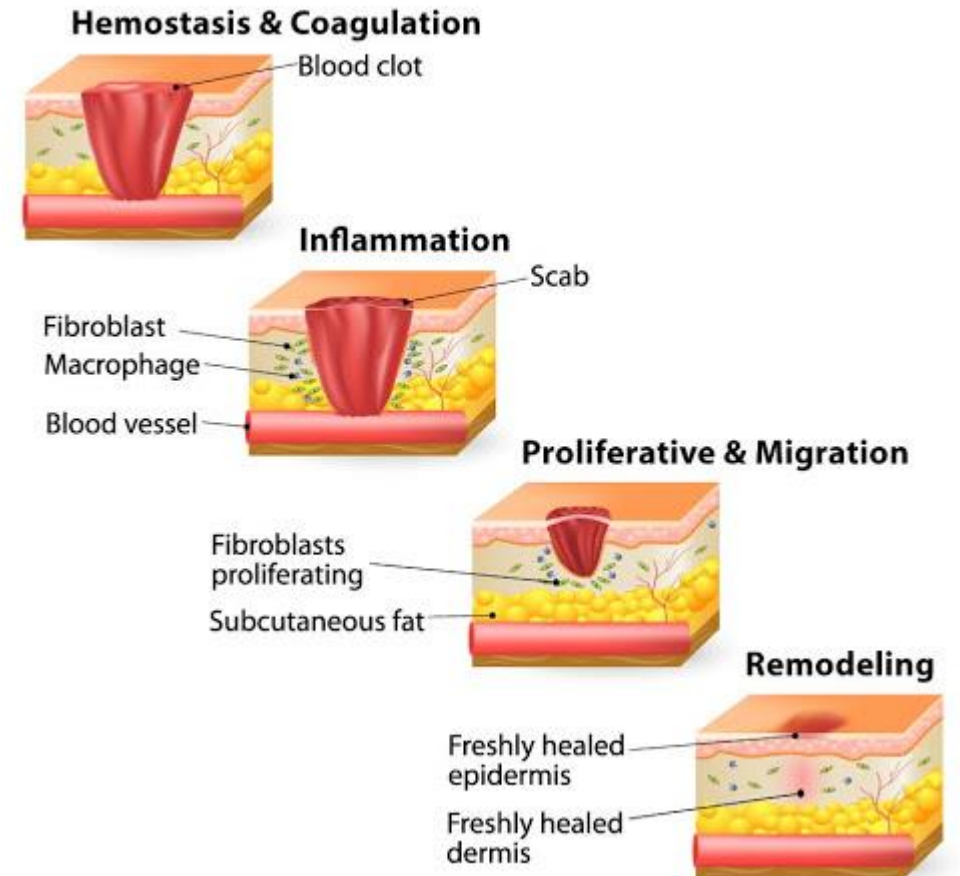
Phases of wound healing



I. Zánětlivá fáze

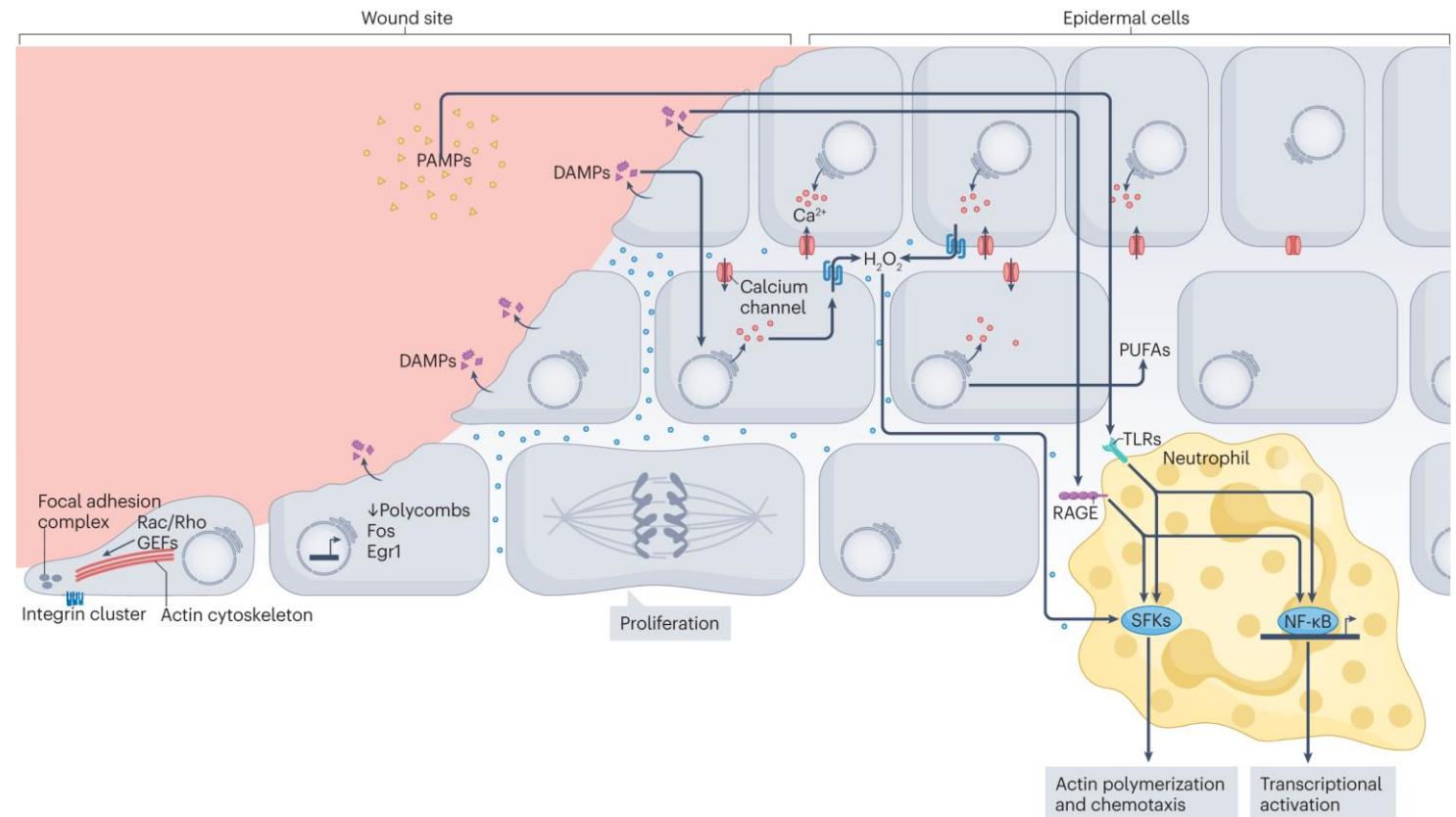
- Trvání: od poškození 2-5 dní
- Hemostáza
- Vazokonstrikce
- Agregace destiček
- Koagulace
- **Záněť**
- Vazodilatace
- Fagocytóza

WOUND HEALING



Activation of inflammation

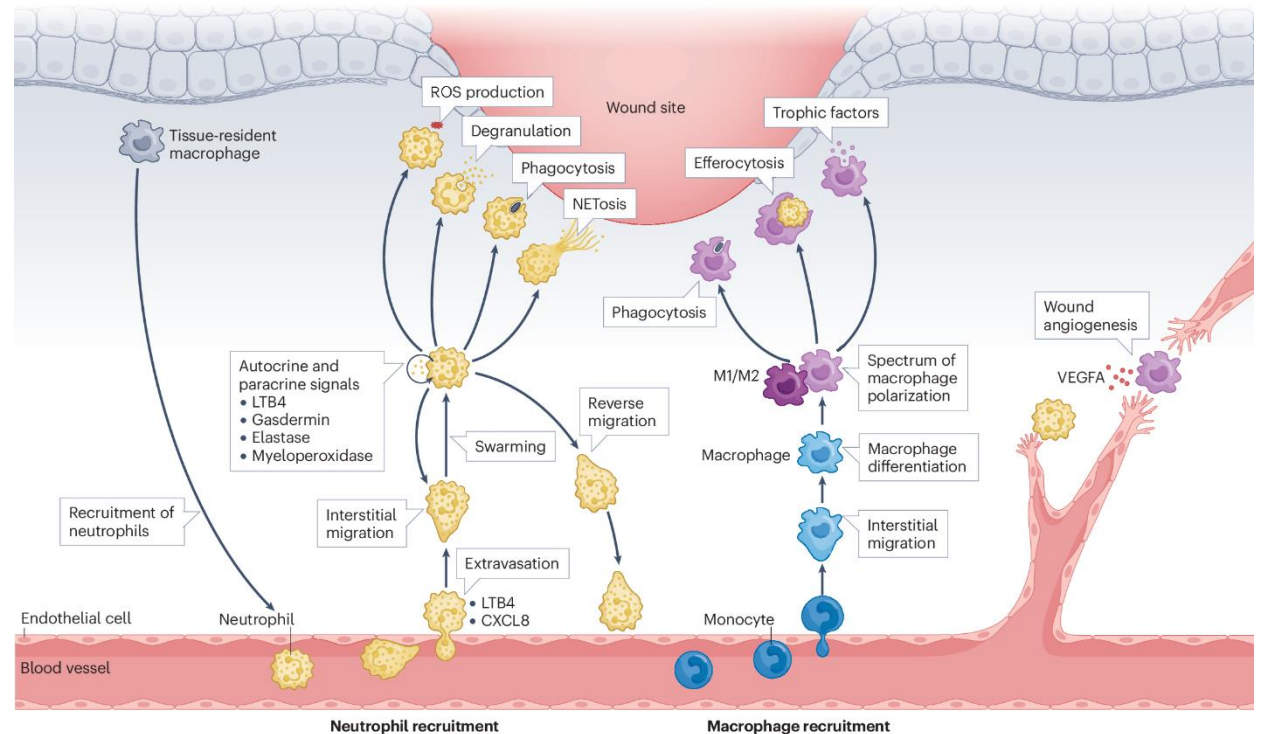
- damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) from damaged neighbouring cells and microorganisms, and both will activate various Toll-like receptors (TLRs) and receptors such as receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)
- DAMPs or any membrane damage to wound edge cells will trigger Ca^{2+} influx into the cytoplasmic space
- Ca^{2+} wave and the release of ROS generated by Nox (NADPH oxidase) and Duox (dual oxidase) enzymes



Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 25, pages599–616 (2024)

Wound inflammatory response and the roles of neutrophils and macrophages

- Neutrophils are recruited
 - passively through blood loss or by active extravasation from the vasculature.
- macrophages
 - local tissue residents or derive from extravasating monocytes from the vasculature.
- Extravasated immune cells migrate interstitially towards the wound following gradients of different inflammatory signals such as H_2O_2 , DAMPs and PAMPs.
 - at the site of the wound - release signals to recruit more inflammatory cells



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:
- **Neutrofilly**
 - ✓ omezují infekci
 - ✓ povolávají makrofágy.
- **Makrofágy**
 - ✓ štěpí a odstraňují tkáňovou debris
 - ✓ 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

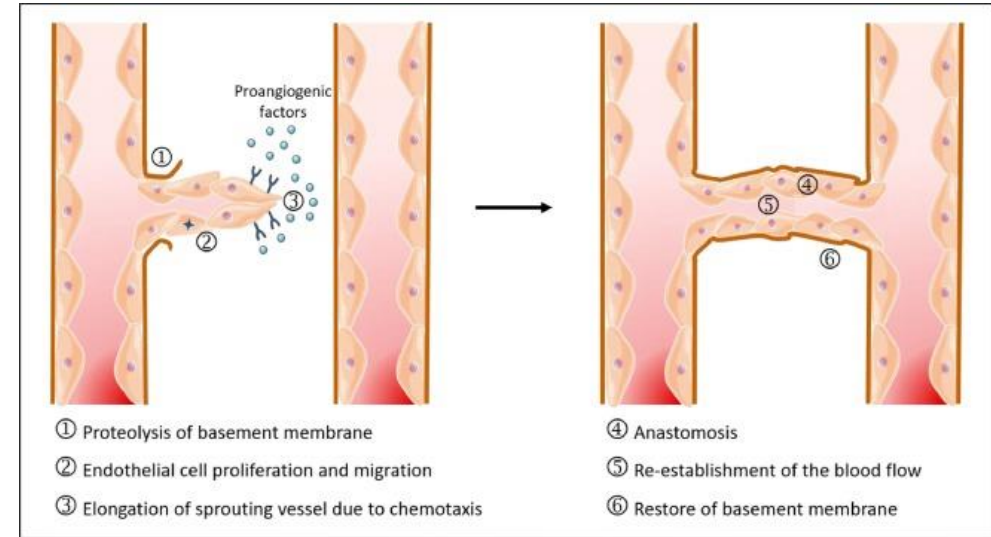
- Následuje *aktivace koagulační kaskády* - vede k aktivaci trombinu, který aktivuje fibrinogen na fibrin.
- Trombin podporuje také *migraci zánětlivých buněk* do místa poškození prostřednictvím *zvýšené cévní permeability*.
- **Produkce fibrinu** je pro proces hojení ran zcela zásadní a **je primární 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 PGI₂* (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).

II. Proliferační fáze

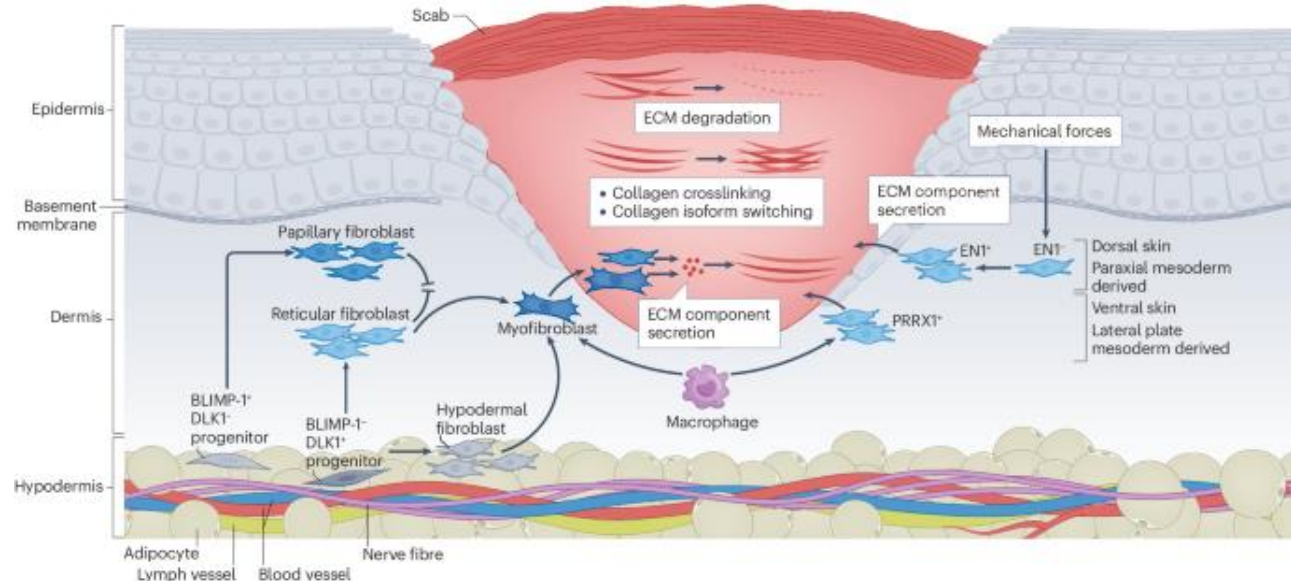
- **Trvání: 2 dny až 3 týdny**
- **Granulace**
- Fibroblasty vytvářejí kolagen
- tkáň vyplňuje defekt a vede k neovaskularizaci
- **Kontrakce**
- Konce ran se slepují a redukují defekt
- **Epitelizace**
- se uskutečňuje ve vlhkém prostředí
- Buňky cestují až 3 cm ve všech směrech



Journal of Theoretical Biology 459, 2018, 1-17

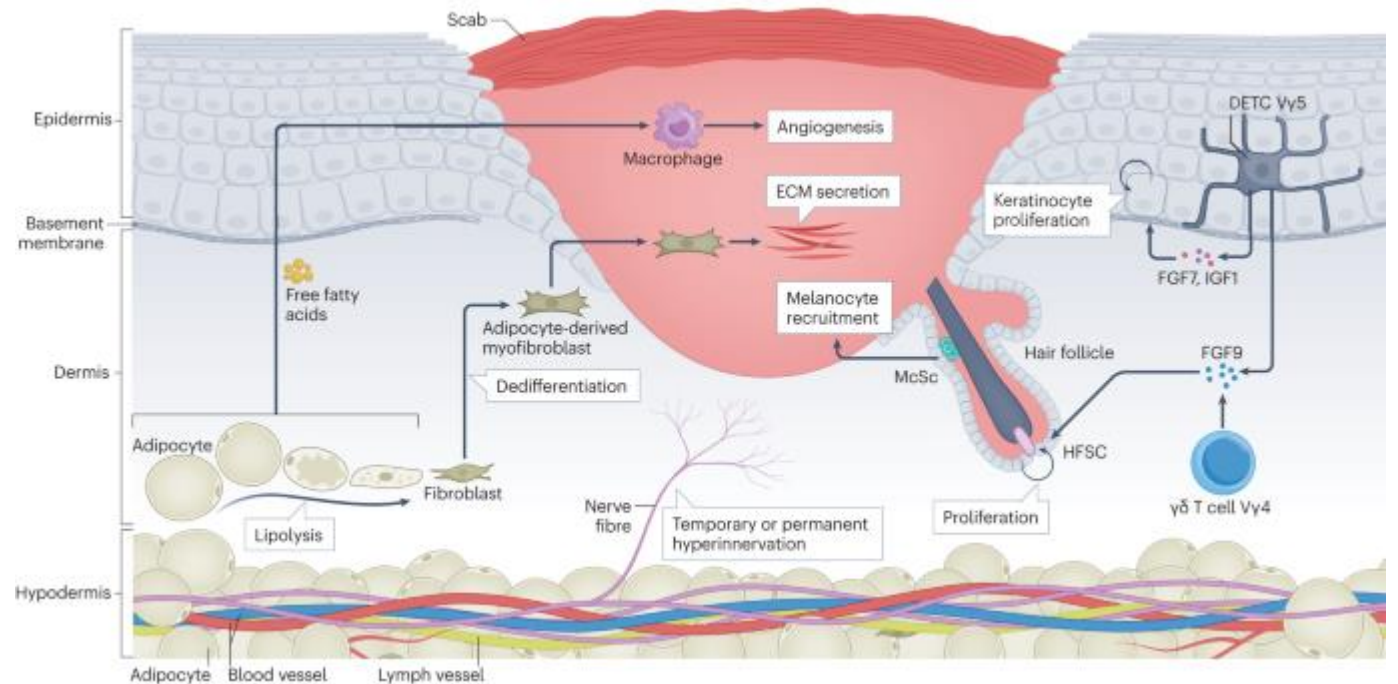
Role of fibroblasts

- Various fibroblastic lineages from different anatomical locations contribute to the deposition of wound matrix mediated by mechanical signals and signals from inflammatory macrophages
- microanatomical cellular differences in contribution to scarring,
- gross anatomical locations of the body have different predispositions to scarring, with some sites being very prone to scarring, for example, the back, whereas other sites, most notably the mouth, tend to be almost scar resistant



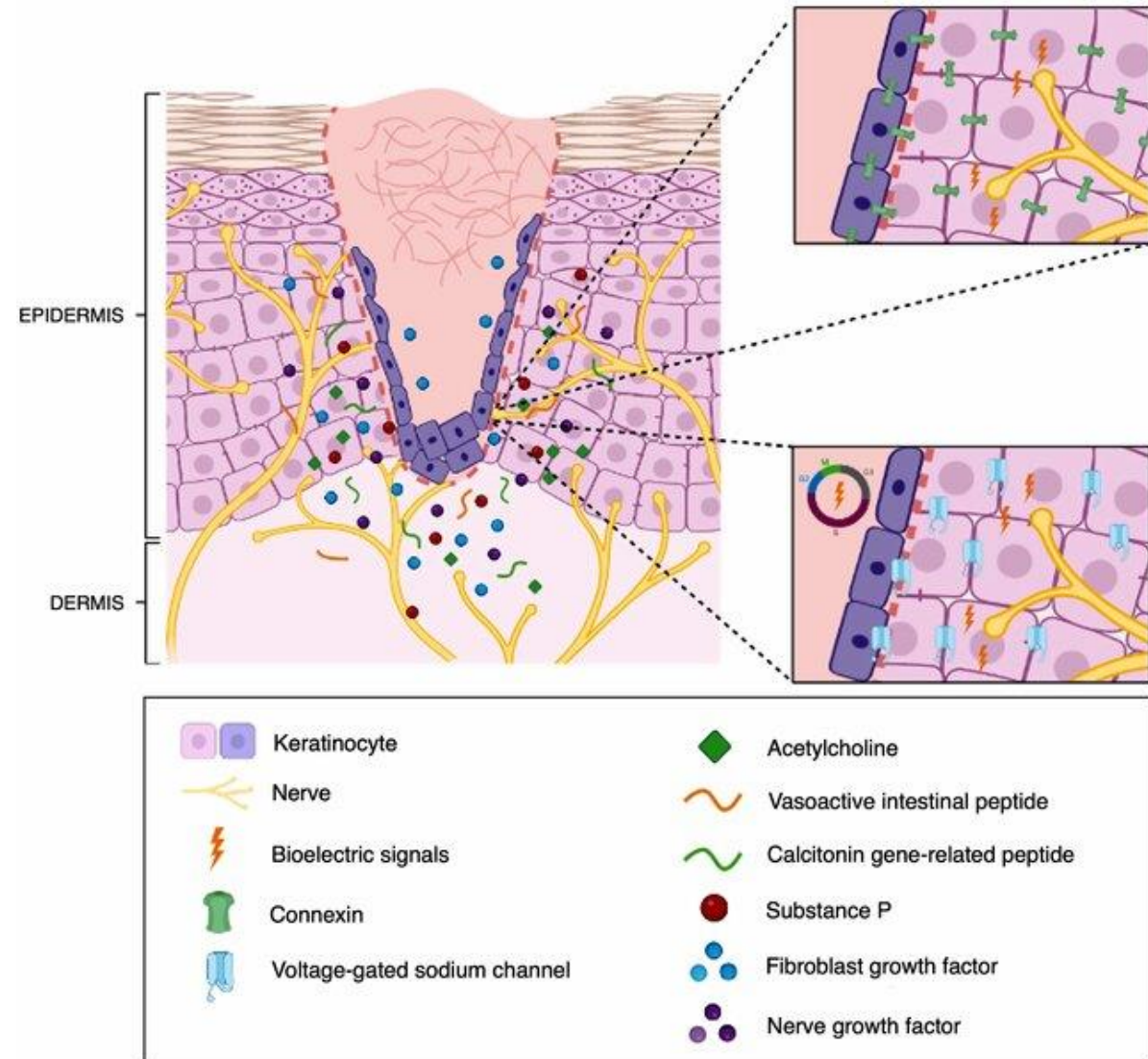
Roles of other cell types in wound healing

- adipocytes at the wound edge
 - undergo lipolysis and release free fatty acids that activate macrophages and induce angiogenesis
 - dedifferentiate to become myofibroblasts and then migrate into the wound bed and secrete extracellular matrix (ECM) components
- melanoblasts and melanocytes
- mast cells
- neurones



Nerves are important

- Nerve fibers infiltrate the epidermis and dermis of the skin. After injury, nerves secrete growth factors, neurotransmitters and neuropeptides, modulate gap junction expression, and influence bioelectric signaling to drive keratinocyte proliferation and migration during reepithelialization and wound healing.



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.

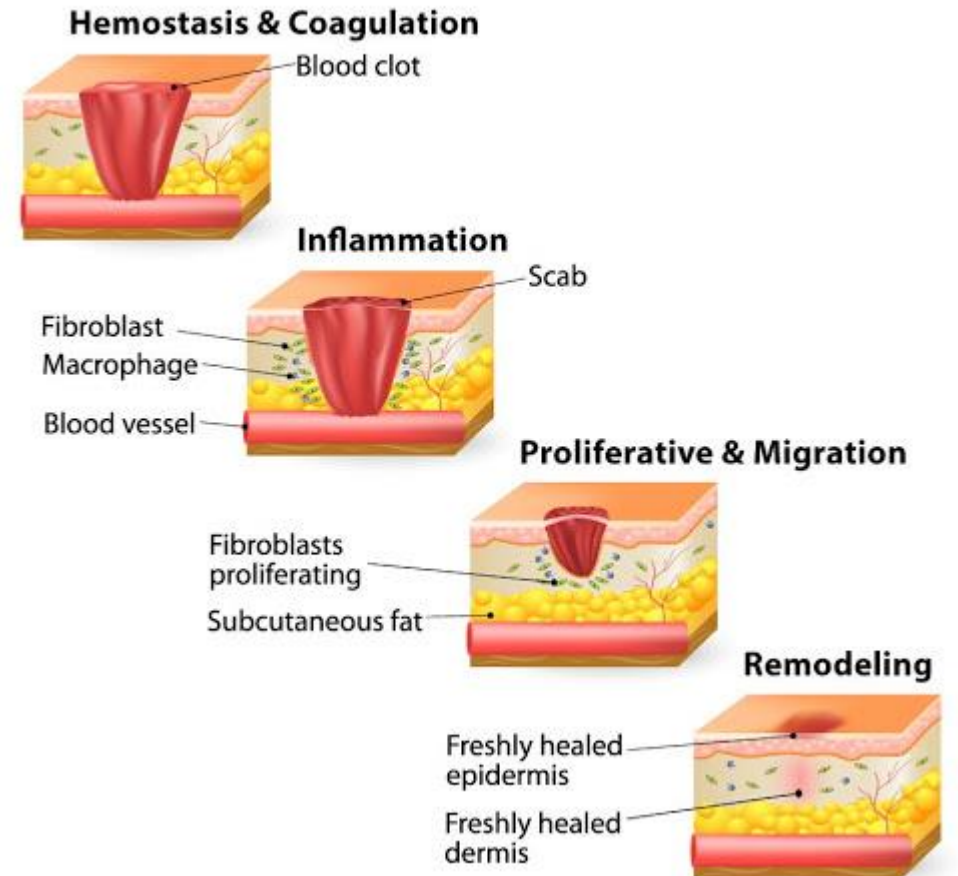
Proliferační fáze Epitelizace

- 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

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.

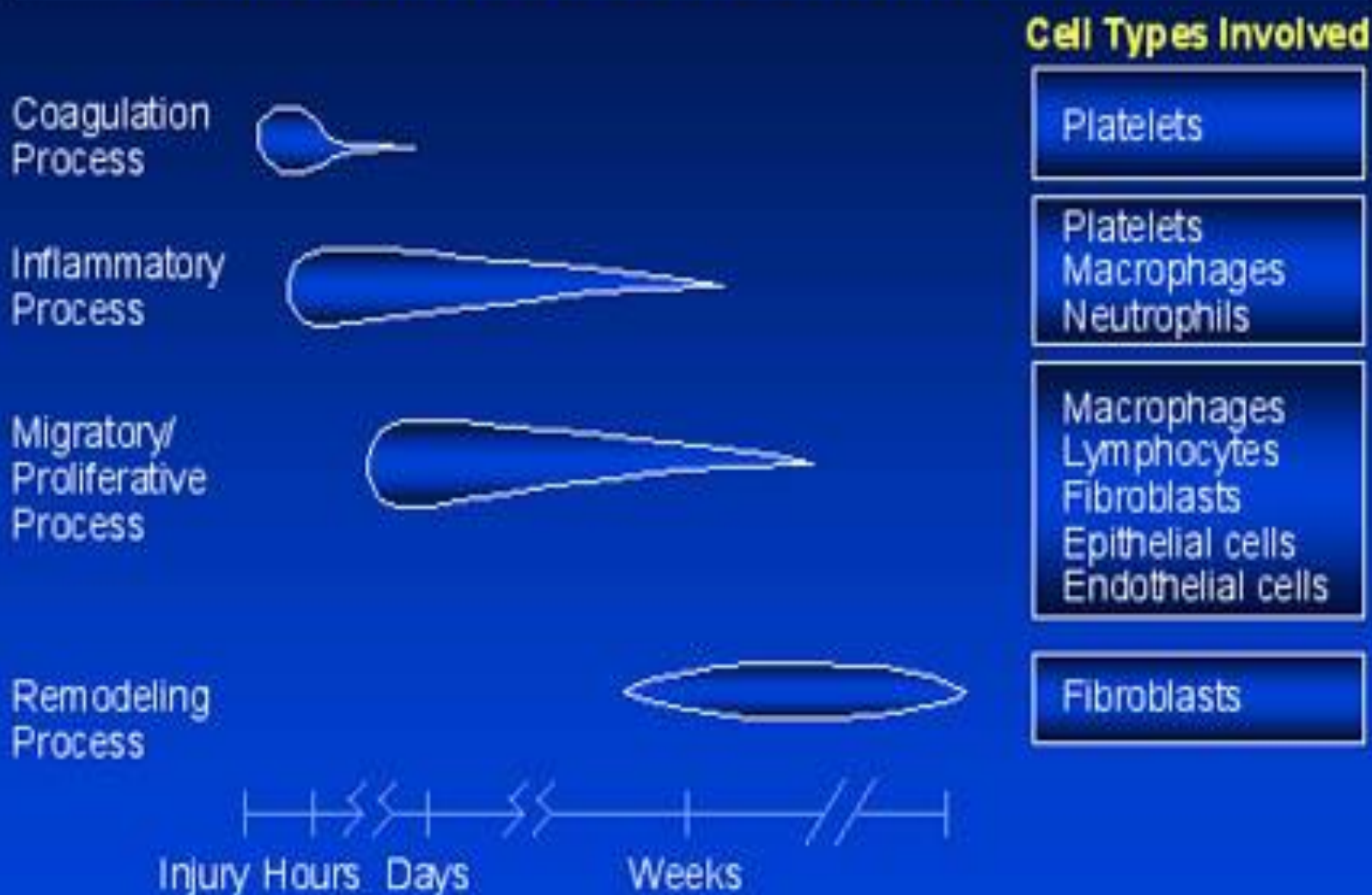
WOUND HEALING



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.

COMPONENTS OF WOUND HEALING



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 zpozdit 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 pO₂
- 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

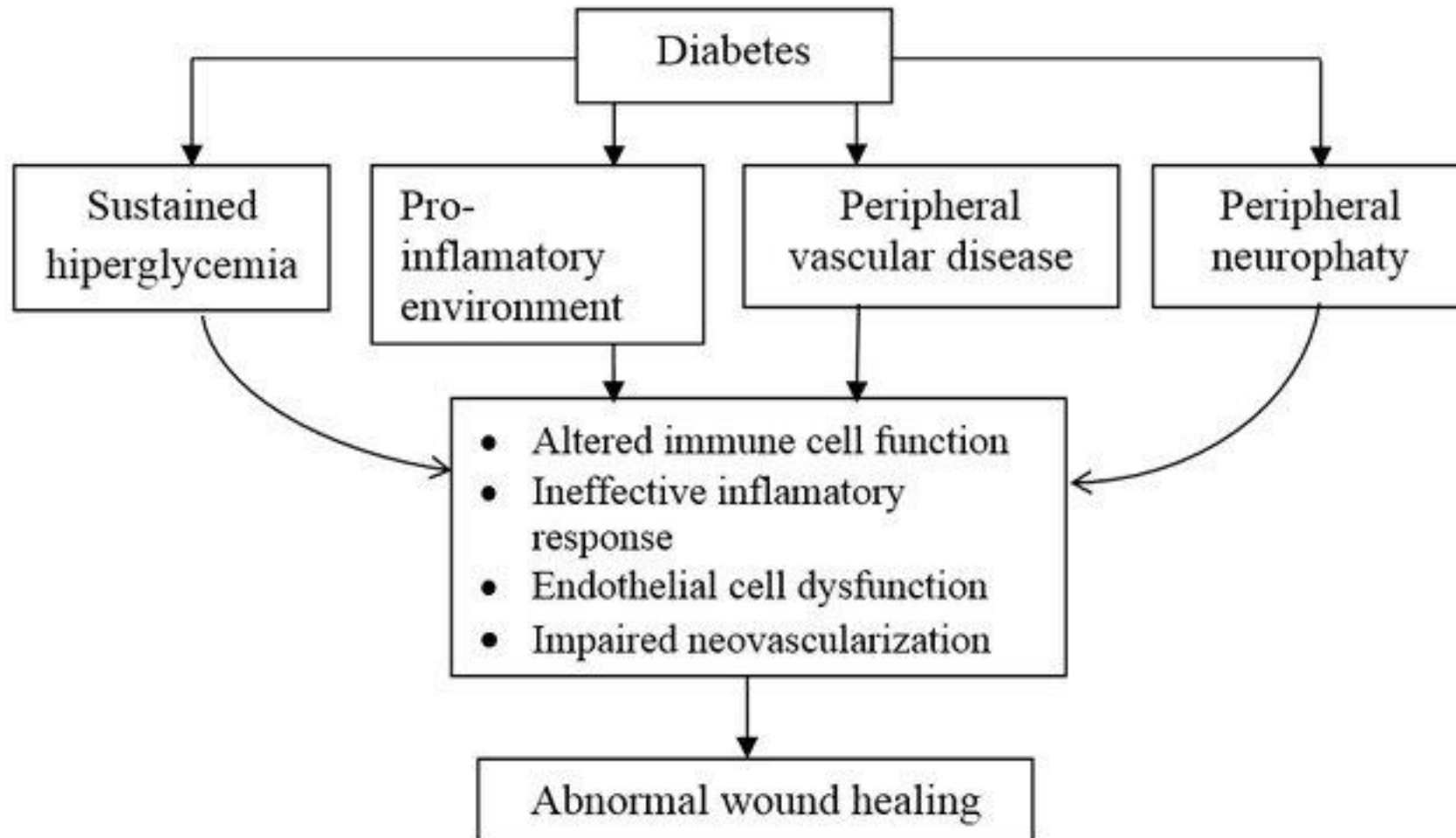
Hojení: akutní rány

- 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

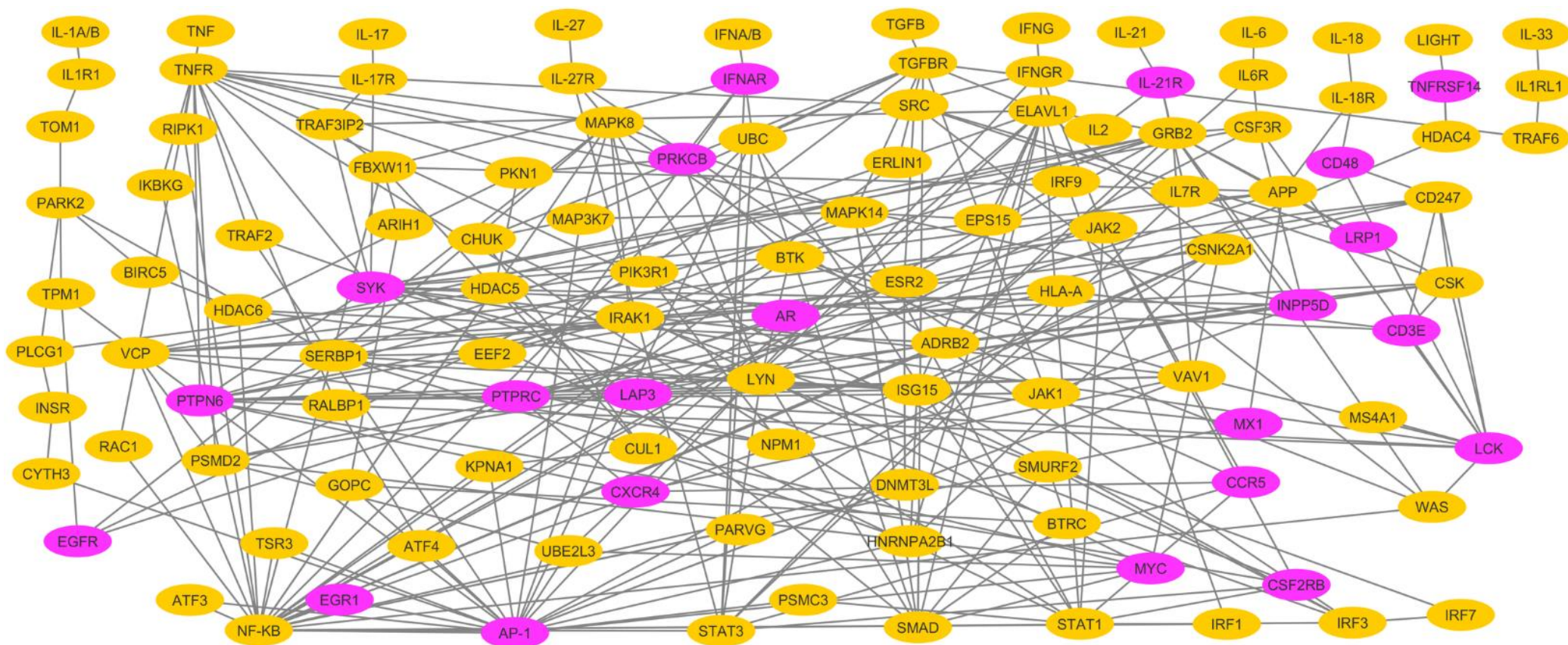
Hojení: chronické defekty

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

Hojení u DM



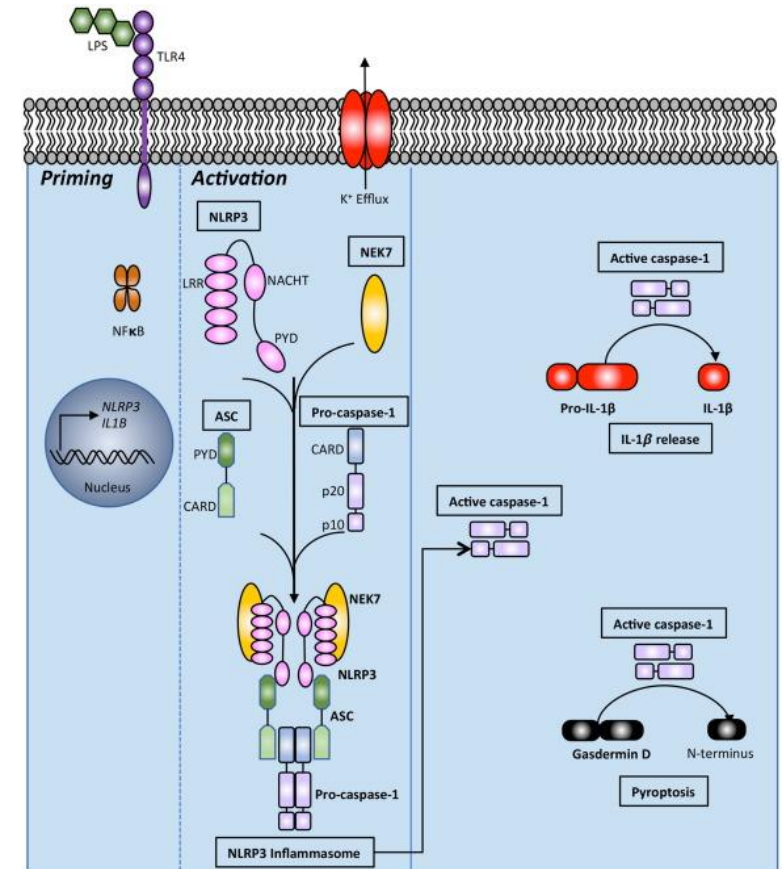
Děkuji za pozornost



„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 β 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

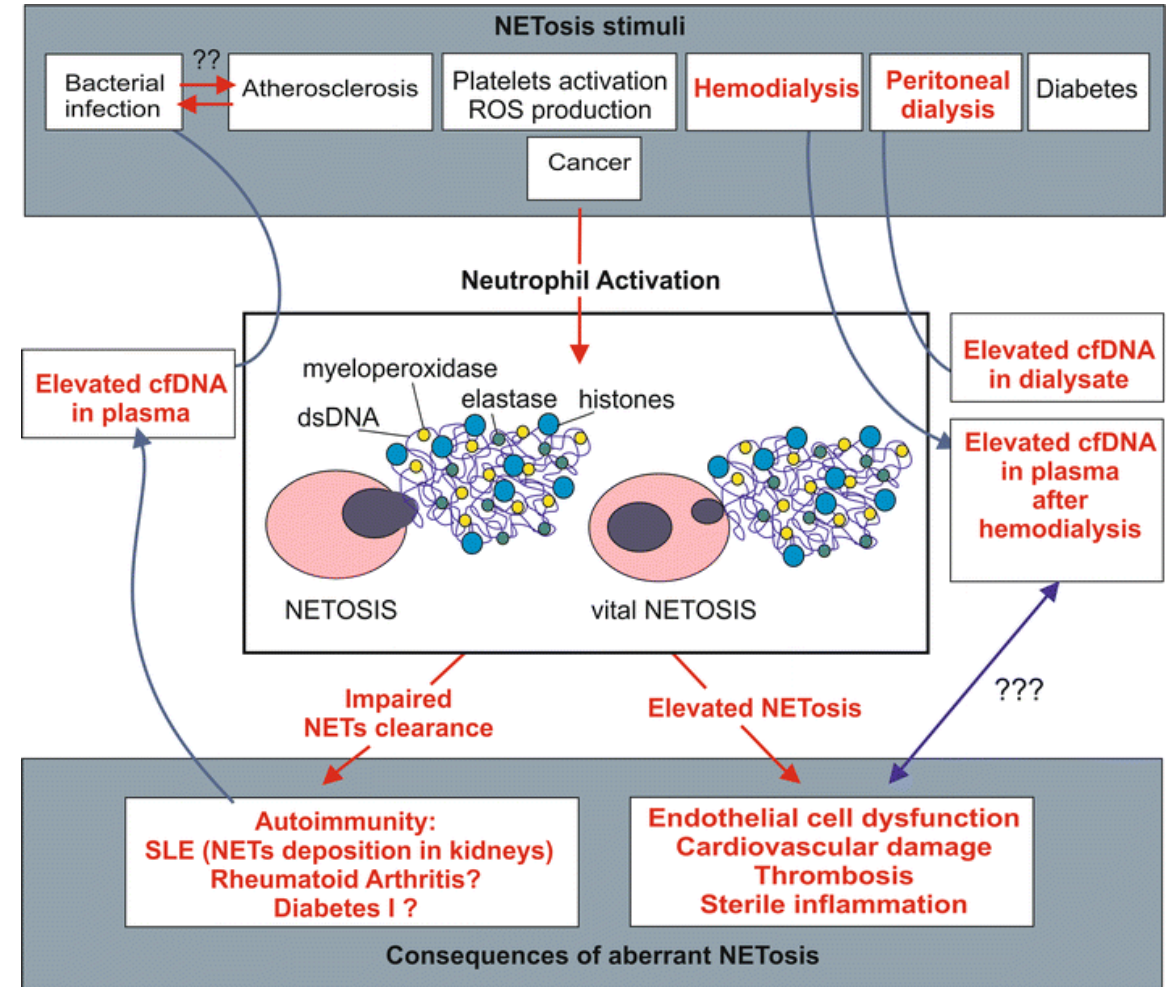
- Na základě rozpoznání hostitelských PAMPs nebo DAMPs PRRs iniciují komplexní soubor signálních událostí , které indukují hostitelskou obranyschopnou odpověď. Jedná se o povolávání a fosforylaci intracelulárních intermediálních látek, což vede částečně k aktivaci genů okamžité odpovědi.
- PRRs aktivace a následná signalizace vede k nespecifickým 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

