

Fyziologie buněčných systémů

A. Kozubík J. Hofmanová

ÚEB (oddělení/ specializace)

1) Fyziologie a imunologie živočichů



- **Představení kolektivu**
- **Východiska**
- **Současné zaměření**
- **Metody a přístupy**



Pracoviště PŘF MU

Kasárna, Terezy Novákové 64, Brno - Řečkovice



MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ



BFÚ ↔ PŘF MU

ŘEŠENÍ a další postup

Diverzifikace na dvou úrovních:

1) Mezioborová (2 systémy),

2) Odborného směřování (2-3 problematiky)
Náročné, ale možné

Diverzifikovaný systém – pro většinu stabilnější,
méně závislý na jakémkoli neočekávaném vývoji

The slide features a light blue background with decorative elements consisting of several overlapping circles of varying sizes and opacities in shades of blue, located in the corners.

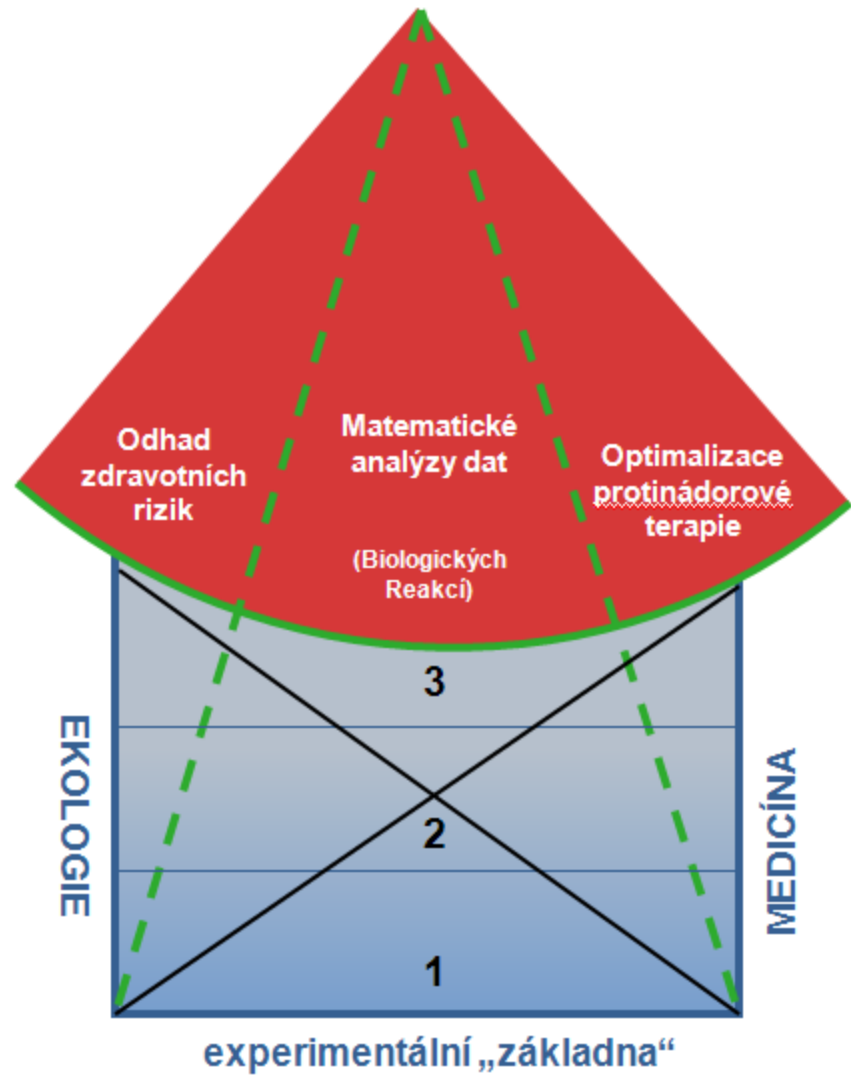
Složení a zaměření oddělení

TOXICOLOGIE

↑
EKOTOXIKOLOGIE

Regulace cytokinetiky
(proliferace, diferenciace, apoptózy)

- 1 – molekulární
- 2 – buněčná
- 3 – systémová úroveň (organismus, populace, ekosystém)



Fyziologie buňky (buněčné signalizace)

Doc. A. Kozubík

Doc. J. Hofmanová

Dr. V. Bryja

Dr. P. Krejčí

Dr. J. Procházková

Dr. K. Souček

Dr. J. Pacherník

(Doc. S. Kozubek, Dr. J. Vondráček, Dr. M. Machala, Dr. Vaculová atd.)

Imunologie obratlovců a bezobratlých

Doc. A. Lojek

Doc. A. Žákovská

Dr. P. Hyršl

(Dr. L. Kubala, Dr. M. Číž, Dr. J. Turánek, atd...)

Fyziologie smyslového vnímání

Doc. M. Vácha

NĚKTERÉ HLAVNÍ CÍLE SOUČASNÉHO VÝZKUMU

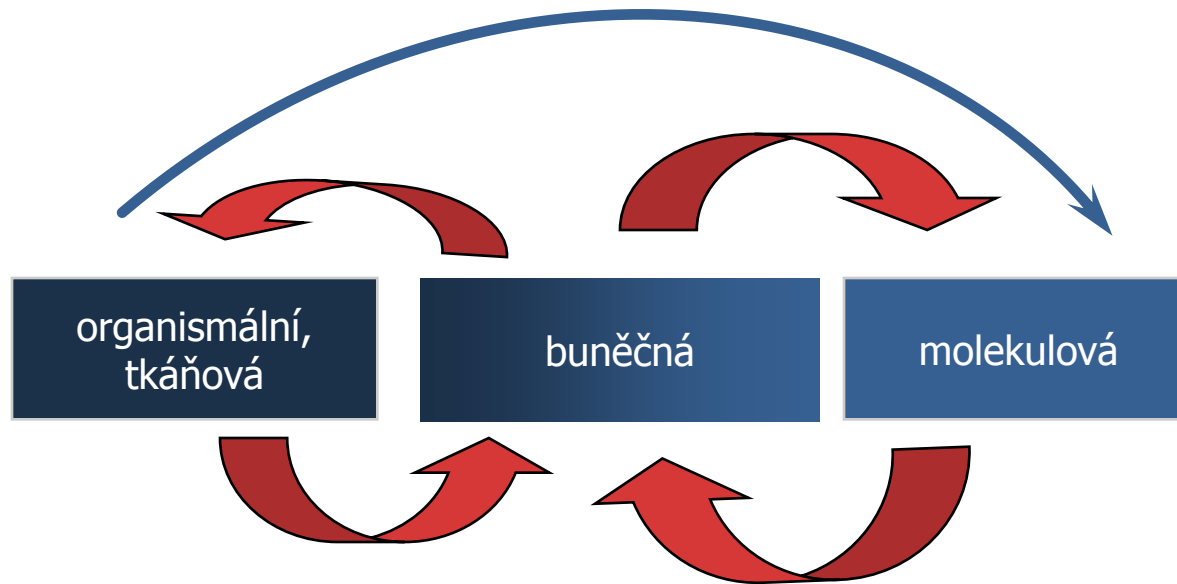
Poznání mechanismů působení látek lipidové povahy, zejména **VNMK a jejich derivátů**,
v mezi/vnitrobuněčných komunikacích podílejících se

v regulaci cytokinetiky (proliferace, diferenciace a apoptózy)
v kontextu jejich interakcí s

- fyziologickými regulátory růstu,
- environmentálními polutanty
- vybranými farmaky.

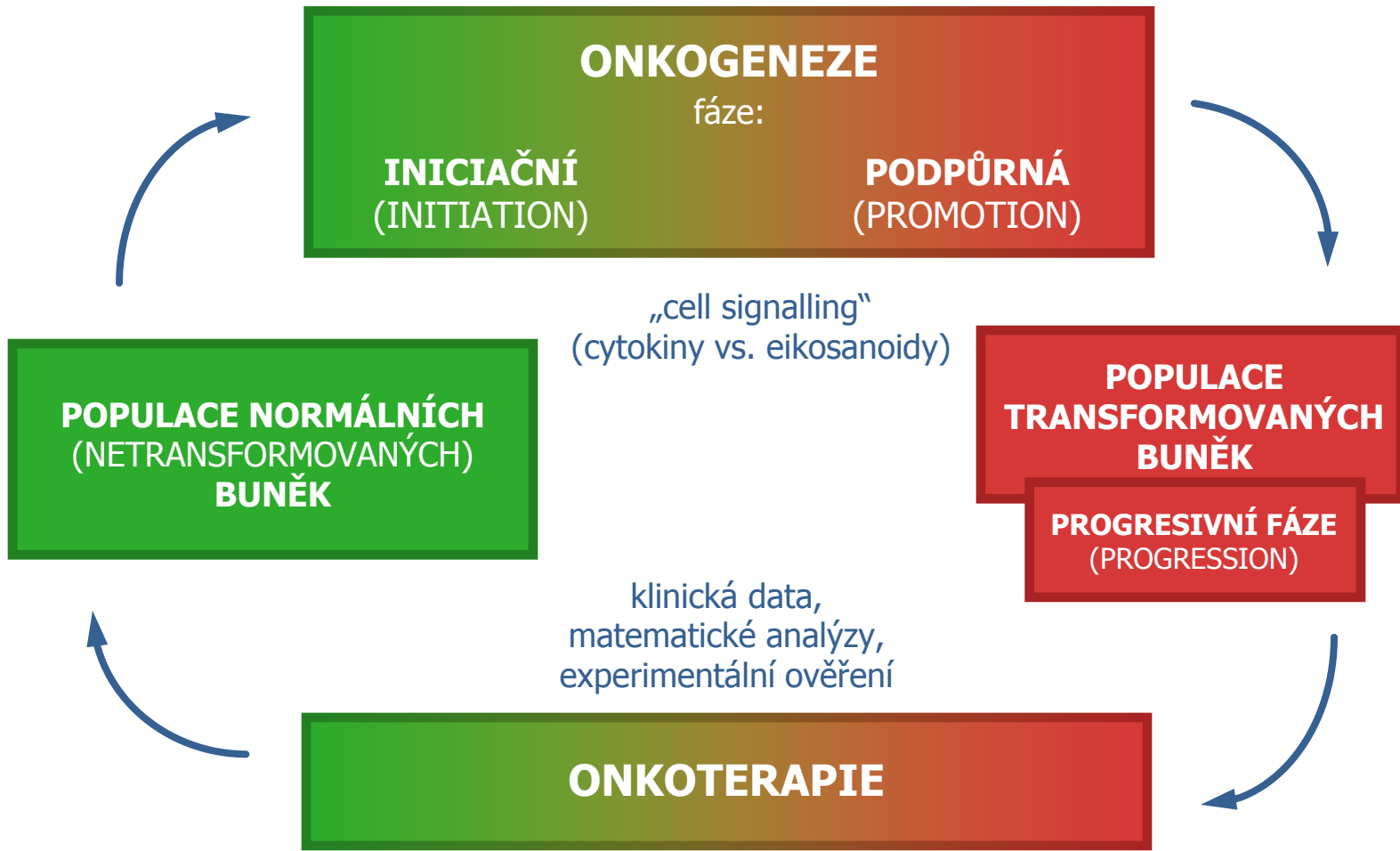
Jedním z praktických cílů je využít tyto znalosti v rámci přípravy
lipidových nutričních preparátů, případně cytostatik.

Organismus jako komplexní hierarchický systém



Nelze oddělovat (naopak nutno usilovat)
studium na jednotlivých úrovních organizace systému
Obtížně realizovatelné v rámci jedné laboratoře

Výzkumné cíle a oblasti praktického využití



Negenotoxické hepatokarcinomy

(nádorové promotory, hormony, TCDD)

Negativní mutagenicita
(Nereagují s DNA)

GST-P: glutathion S-transferáza -
placentární forma

Nízká dávka

Vysoká dávka

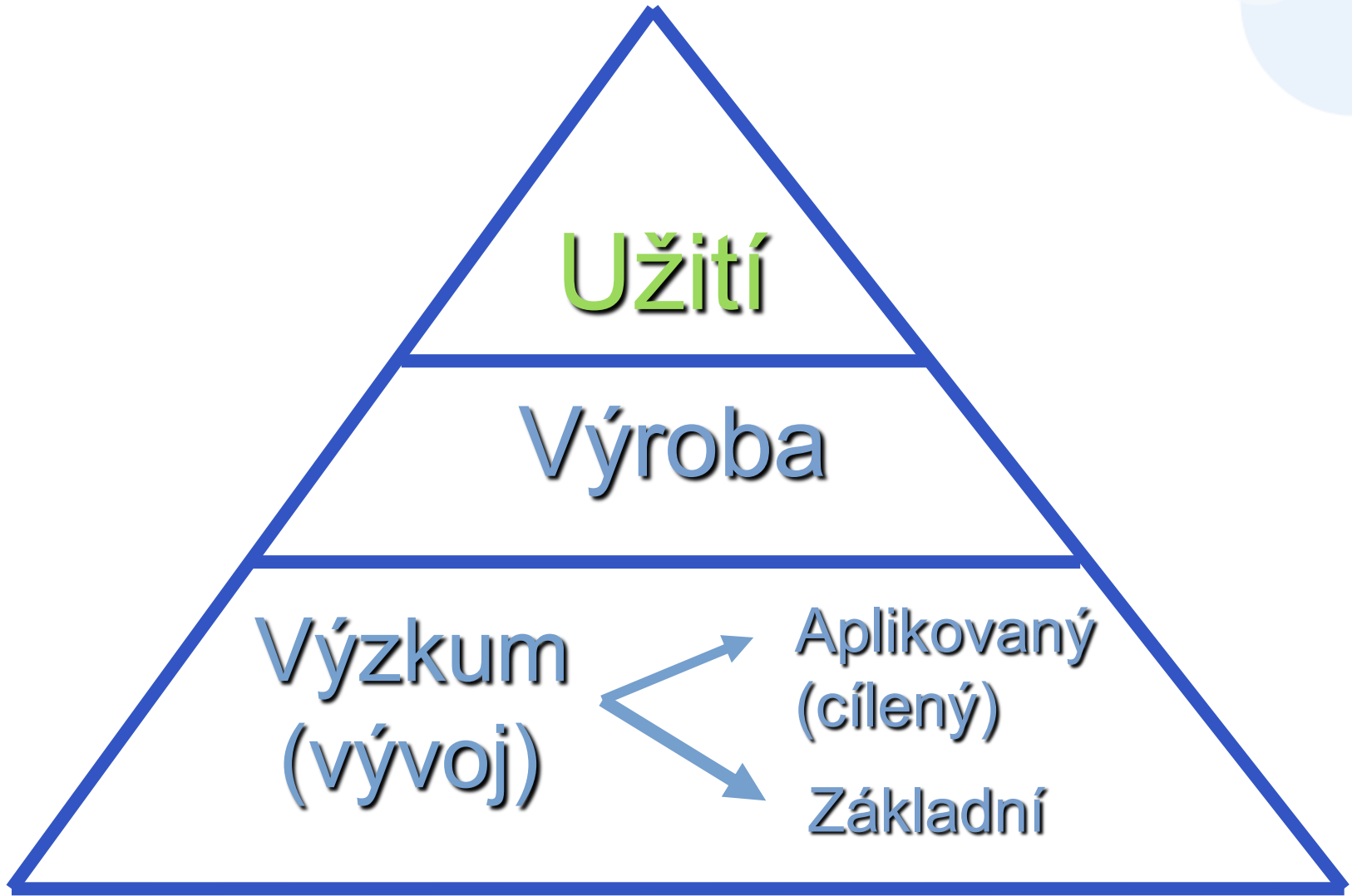
Inhibice oxidativního stresu
Indukce reparace DNA
Inhibice proliferace v oblastech GST-P⁺ ohnisek
Suprese apoptózy
Protektce GJIC
Aktivace detoxifikačních systémů v játrech
(CYP2C11, P-450 NADPH oxidoreduktáza)
Buněčná signalizace
(GABA, MAP kinázy)

Indukce oxidativního stresu
(P-450, ROS, 8-OHdG)
Indukce reparace DNA
Zvýšení proliferace v oblastech GST-P⁺
ohnisek
Indukce apoptózy
Inhibice GJIC
Inhibice CYP2C11

Hormetický efekt na karcinogenezi
(Inhibice GST-P⁺ ohnisek a rozvoje nádoru)

Promoce karcinogeneze
(Indukce GST-P⁺ ohnisek a rozvoje nádoru)

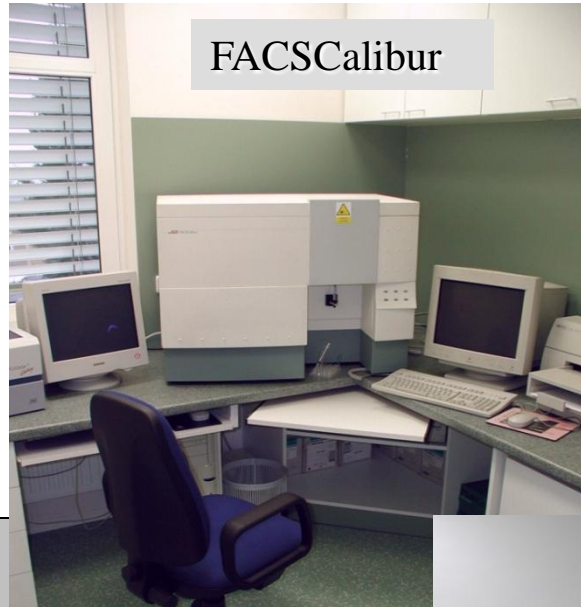
Přesné prahování karcinogenicity



Přehled metod a metodologií (ucelený systém)

Viz „Metody“

FACSCalibur



FCM:
jedna ze základních metod

FACS ARIA SORP II



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA

Metodologie založené na nejmodernějších zařízeních

Výhody FCM

- Možnost analýz a třídění živých buněk !!! (UV lasery)
a jejich postoupení pro další
- „Multicolour analyses“
- Optimum poměru automatizace / versatilita

Metody používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

Legenda: FACS - průtoková cytometrie včetně „cell sortingu“

FM - fluorescenční mikroskopie

SM - světelná mikroskopie

WB - western blotting

FM - fluorimetrie (FluoStar)

CM - kolorimetrie (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometrie (VUVEL, Lojek)

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

ELFO – agarózová elektroforéza

SYLABUS pro studenty

4. ročníku fyziologie živočichů a obecné zoologie, mol. biologie, chemie životního prostředí a ekotoxikologie, výběrová přednáška pro doktorandy

- n - Stručný úvod do teorie systémů
- n - Negativní a pozitivní zpětná vazba
- n - Základní pojmy, parametry cytotkinetiky (proliferace, diferenciacce, apoptóza)
- n - Typy buněčných populací
- n - Kmenové a diferencované kompartmenty.
Totipotentní, pluripotentní, progenitorové, komitované
diferencované buněčné populace
- n - Autokrinní, parakrinní a endokrinní regulace
- n - Buněčný cyklus a jeho regulace
- n - Faktory ovlivňující buněčné dělení, cytokiny, růstové faktory a inhibitory, jejich specifita
a rovnováha jejich působení
- n - Struktura plasmatické membrány a její funkce v regulaci buněčné proliferace a diferenciacce
- n - Vysoce nenasycené mastné kyseliny a eikosanoidy
- n - Transdukce signálů a exprese genetické informace
- n - Úloha fosfolipidových komponent v transdukci signálů růst modulujících látek
- n - Mechanismus účinku hormonů a tkáňových mediátorů (cytokiny a "chalony").
- n - Regulace proliferace, diferenciacce, apoptózy

Krvetvorný systém a jeho funkce

- n Hemopoéza (lymfopoéza, myelopoéza, erythropoéza, megakaryocytopoéza)
- n Funkce diferencovaných krevních elementů - monocyty, makrofágy - fagocytóza;
- n Vztah imunitního systému k dalším fyziologickým funkcím (zánětu apod.)

Homeostáza, zdraví a nemoc

- n Organismus jako hierarchický systém, spolupůsobení nervové, endokrinní a humorální soustavy
- n Příklady systémových reakcí jako jsou stres, zánět apod. a jejich význam z hlediska zdraví a nemoci
- n Škodlivé faktory vnějšího prostředí a jejich vliv na zdraví lidské populace

Doporučená literatura

Cell Physiology Source Book, ed. N. Sperelakis Academic Press Inc., 1995

B. Alberts et al.: Molecular Biology of the Cell, 3rd edition, Garland Publish. Inc., New York 1994

Biochemie, B., Voet, J.G. Voetová: Victoria Publishing, Praha, 1990

Molecular Cell biology, J.E. Darnell: Eds. Darnell, Lodish, Baltimore, 2nd edition, Scientific American Books Inc., New York 1990

J. Neuwirt, E. Nečas: Kmenové buňky a krevní choroby, Avicenum Praha 1981

Základy buněčné biologie – úvod do molekulární biologie buňky, B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Espero Publishing, (orig. 1998)

Klinická imunologie, J. Krejsek, O. Kopecký, Nucleus HK, 2004

J. Vácha: Problém normálnosti v biologii a lékařství, Avicenum, Praha 1980

J. Šterzl: Imunitní systém a jeho fyziologické funkce, Čs. Imunol. Společnost, Praha 1993

The slide features a white background with decorative blue circles in the corners. A large circle is in the top-left, a cluster of overlapping circles is in the top-right, a cluster of overlapping circles is in the bottom-left, and a single small circle is in the bottom-right.

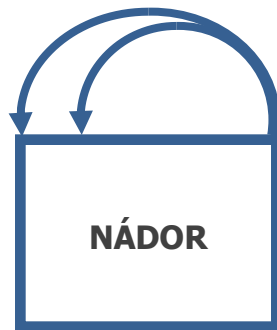
POJMY A MODELY

Typy buněčných populací

podle Gilberta a Lajthy (1965)

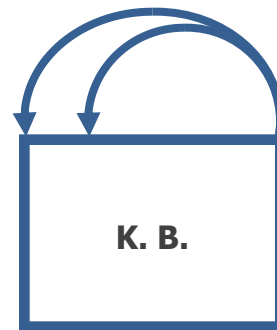
TYPY PROLIFERUJÍCÍ

expandující, neopouštějí
populaci, množí se



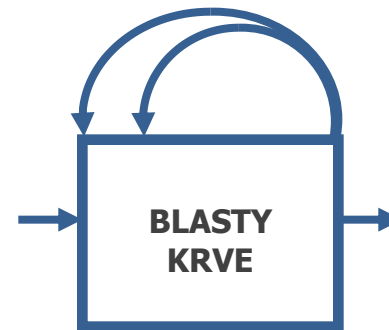
populace coby zdroj
buněk pro jiné populace

c. konstantní

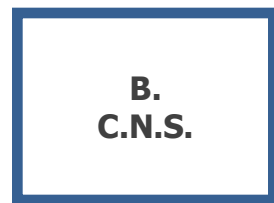


Tranzitní populace, ve
které se buňky pomnoží

c. konstantní



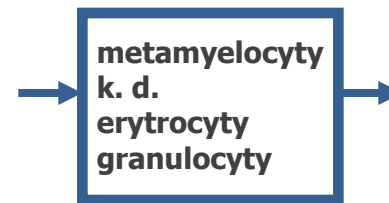
TYPY NEPROLIFERUJÍCÍ



stacionární
c. konstantní



stále ubývá



typ průchozí (tranzitní)
c. konstantní

Tabulka 1

Dělení buněčných populací podle intenzity obnovy u dospělé myši

1. Statické populace bez známek obnovy během života:

- neurony všech typů
- srdeční svalové buňky
- odontoblasty
- Sertoliho buňky

2. Velmi pomalu se obnovující buněčné populace:

Během života se obnoví jen část populace:

- hladké svalové buňky
- gliové buňky
- osteocyty
- buňky ledvinných tubulů
- buňky dřeně nadledvinek
- hlavní buňky žaludeční sliznice
- intersticiální buňky Leydigovy
- buňky hnědé tukové tkáně

3. Rychle se obnovující buněčné populace:

A. Ne příliš rychle se obnovující populace. Populace, která se během života zcela obnoví, ale za dobu delší než 30 dní:

- hepatocyty a litorální buňky
- epitelová výstelka dýchacího traktu
- buňky slinných žláz
- buňky pankreatu
- buňky v kůře nadledvinek
- parietální buňky žaludeční sliznice
- pojivové buňky v kůži

B. Velmi rychle se obnovující buněčné populace. Všechny se obnoví za dobu kratší než 30 dní:

- střevní epitel
- krvetočné buňky, prekursori krevních buněk
- epidermis
- kornea
- epitelová výstelka ústní dutiny a esofagu
- povrchový epitel žaludeční sliznice
- seminiferální epitelová tkáň

C. Buňky nádorové

MODELY:

Buňky tzv. intenzívně proliferujících populací

(zejména b. krvetvorné a b. střevních epitelů).

a buňky nádorové

(PRAKTICKÉ SOUVISLOSTI)



Jestliže dojde k celotělové expozici organismu ionizujícím zářením, může dojít k rozvoji tzv. nemoci ozáření – manifestaci tzv. **RADIAČNÍHO SYNDROMU. Jeho průběh závisí na dávce ozáření**

Dobový kontext

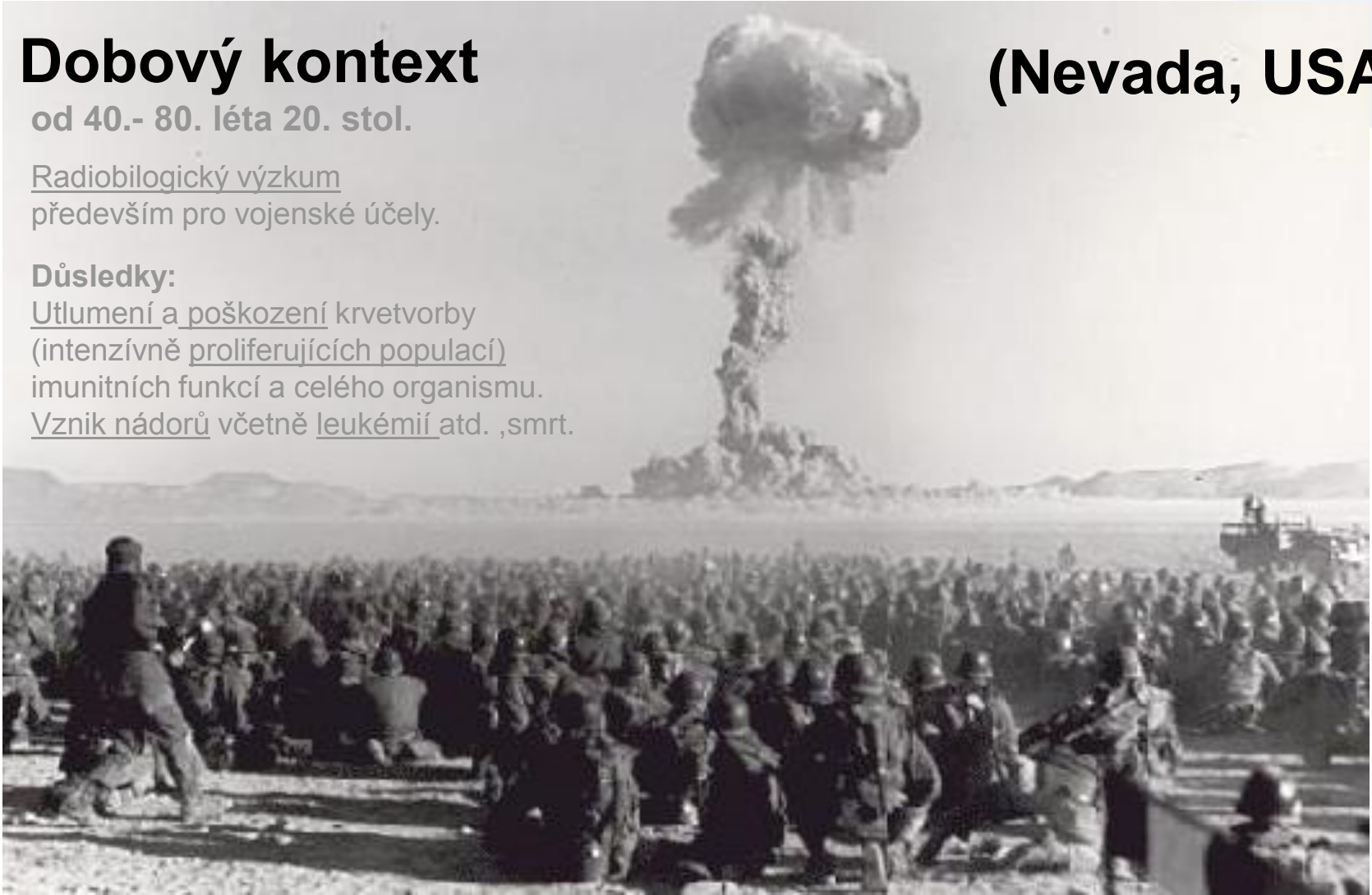
od 40.- 80. léta 20. stol.

Radiobiologický výzkum
především pro vojenské účely.

Důsledky:

Utlumení a poškození krvetvorby
(intenzívně proliferujících populací)
imunitních funkcí a celého organismu.
Vznik nádorů včetně leukémií atd. ,smrt.

(Nevada, USA)



Jestliže dojde k celotělovému vystavení ionizujícímu záření, dochází k rozvoji tzv. **RADIAČNÍHO SYNDROMU** provázeného devastujícími účinky na organismus

Formy nemoci z ozáření (myš)

dávka hlavní oblasti postižení

Dřeňová forma.....0.1- 6 Gy.....Kmenové buňky K.D.

Střevní forma5 – 10 Gy.....Epitely, zejména střeva

Centrálně nervová forma....100 Gy.....Viz výše včetně C.N.S.

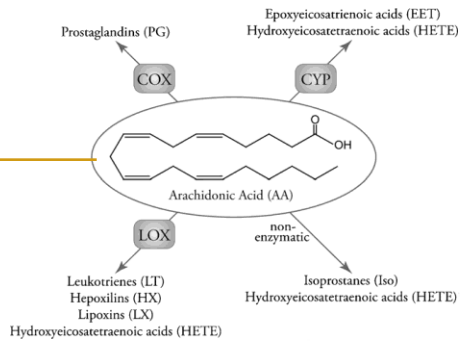
Důsledky:

silné poškození intenzívně proliferujících populací, organismu, imunitních funkcí a celého systému:

proliferativní choroby, leukémie, smrt.

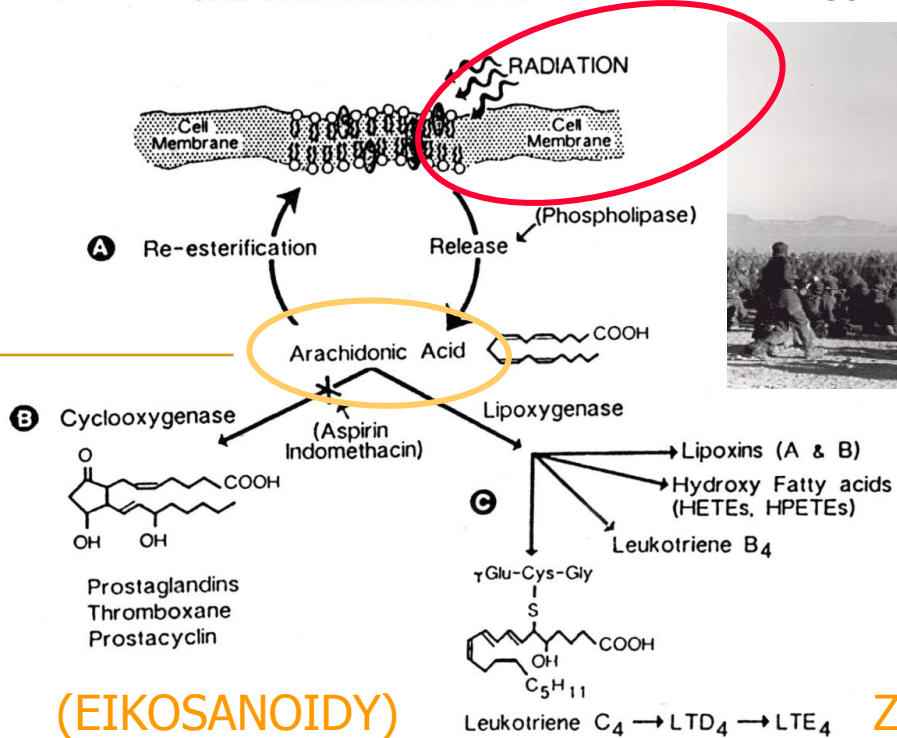
Využití ozáření jako modelu pro studium regenerace krvetvorných funkcí

**Princip,
volba dávky,
volba druhu laboratorního zvířete (myš)
Metoda CFU-S**



BIOLOGICAL MEDIATORS

THE ARACHIDONIC ACID CASCADE



Fosfolipidový metabolismus a působení ionizujícího záření (škodlivých faktorů životního prostředí)



(EIKOSANOIDY)

Záněť, karcinogeneze

Typy regulací

(růstu a buněčných funkcí)

1) Hormonální (endokrinní) regulace

Regulátor – hormon je produkován buňkami žláz s vnitřní sekrecí do krevního řečiště
Ovlivňuje funkce buněk, které mohou být značně vzdáleny od míst syntézy hormonu.

Hormon – je tedy produkován za účelem kontroly činnosti buněk než těch, které jej produkuje

2) Parakrinní regulace

Mechanismus působení spočívá v tom, že růstový faktor (regulátor) – tkáňový mediátor (regulátor místního působení) je syntetizován jedním typem b. poté je transportován do extracelulárního prostoru a ovlivňuje funkce buněk v nejbližším okolí.

(často jediná možnost vzhledem k velmi krátkému poločasu rozpadu)

3) Autokrinní regulace

je možná tehdy, jestliže jsou buňky schopny jak syntetizovat tak i reagovat na určitý (růstový) regulátor.

Pozn.: autokrinní model je součástí konceptu vysvětlujícího abnormální regulaci nádorového růstu.

Předpokládá, že nádorově změněné buňky produkují stimulační růstové faktory nadměrném množství, na které samy odpovídají. Tak se autostimulují ve smyslu aktivace proliferace.

Apoptóza: programovaná buněčná smrt, nevede k zánětu

Nekróza: neprogramovaná buněčná smrt, je příčinou zánětu
(odlišný průběh biochemických reakcí, rozdílná morfologie)

Proliferace:

je ekvivalentem buněčného dělení

(tzn. zvýšení počtu kvalitativně totožných buněk)

Diferenciace:

„rozrůžňování buněk“ (vznik kvalitativně odlišných buněk)

Růst

zvětšení „objemu“ buňky, buněčné populace (tkáně nebo organismu).

Je důsledkem:

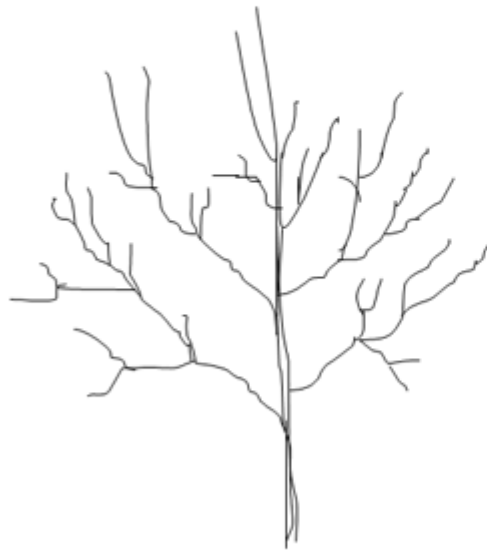
- a) zvětšení velikosti buněk při zachování konstantní velikosti populace
- b) zvětšení počtu buněk (proliferace) bez změn v objemu buněk
- c) zvýšení počtu buněk i jejich objemu
- d) odumírání apoptózou nebo nekrotózou

Polyklonální charakter kostních buněk

Přirovnání kmenové buňky ke stromu

a – kmenová buňka v embryonální době

b – kmenová buňka v dospělosti



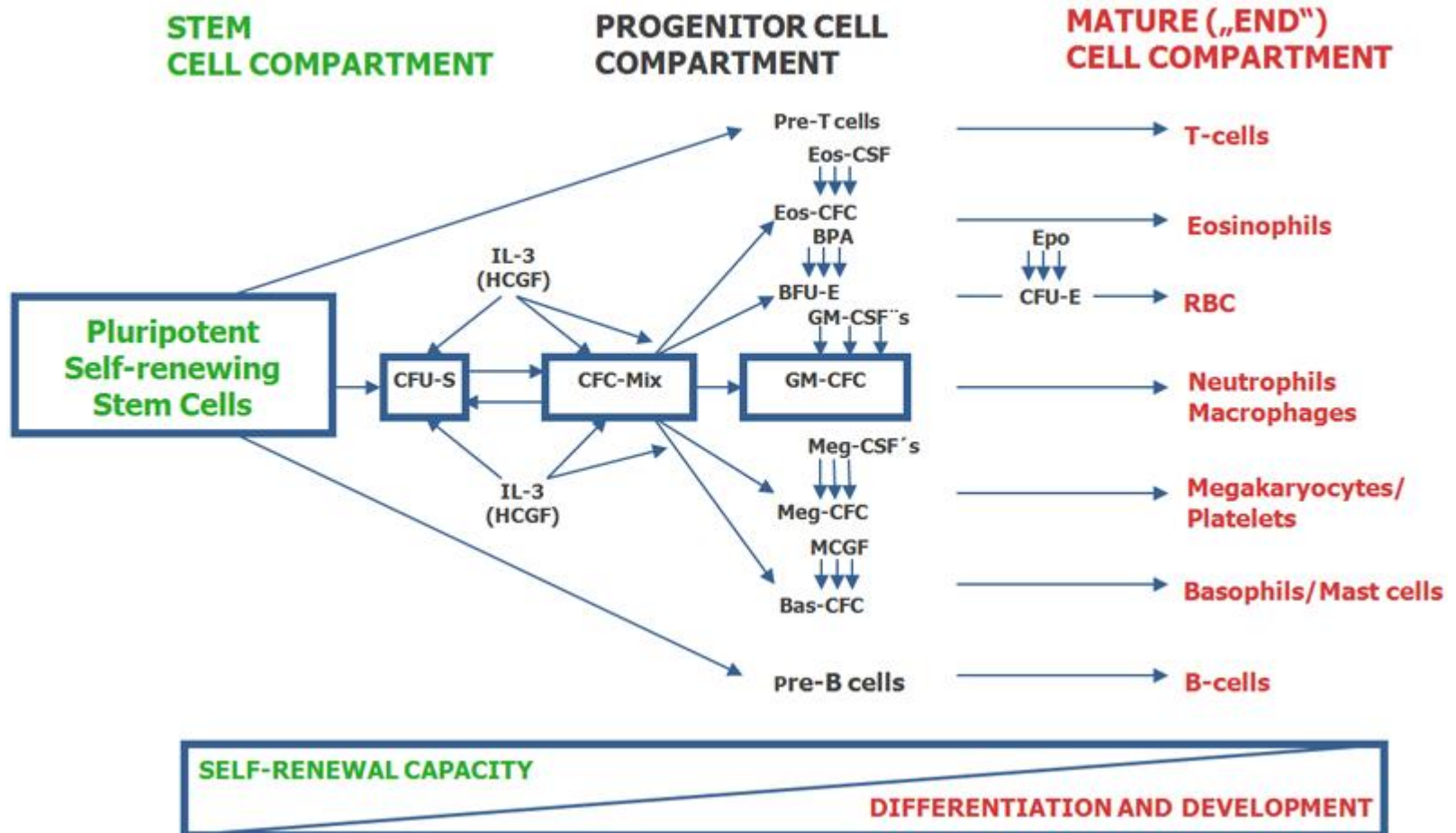
a



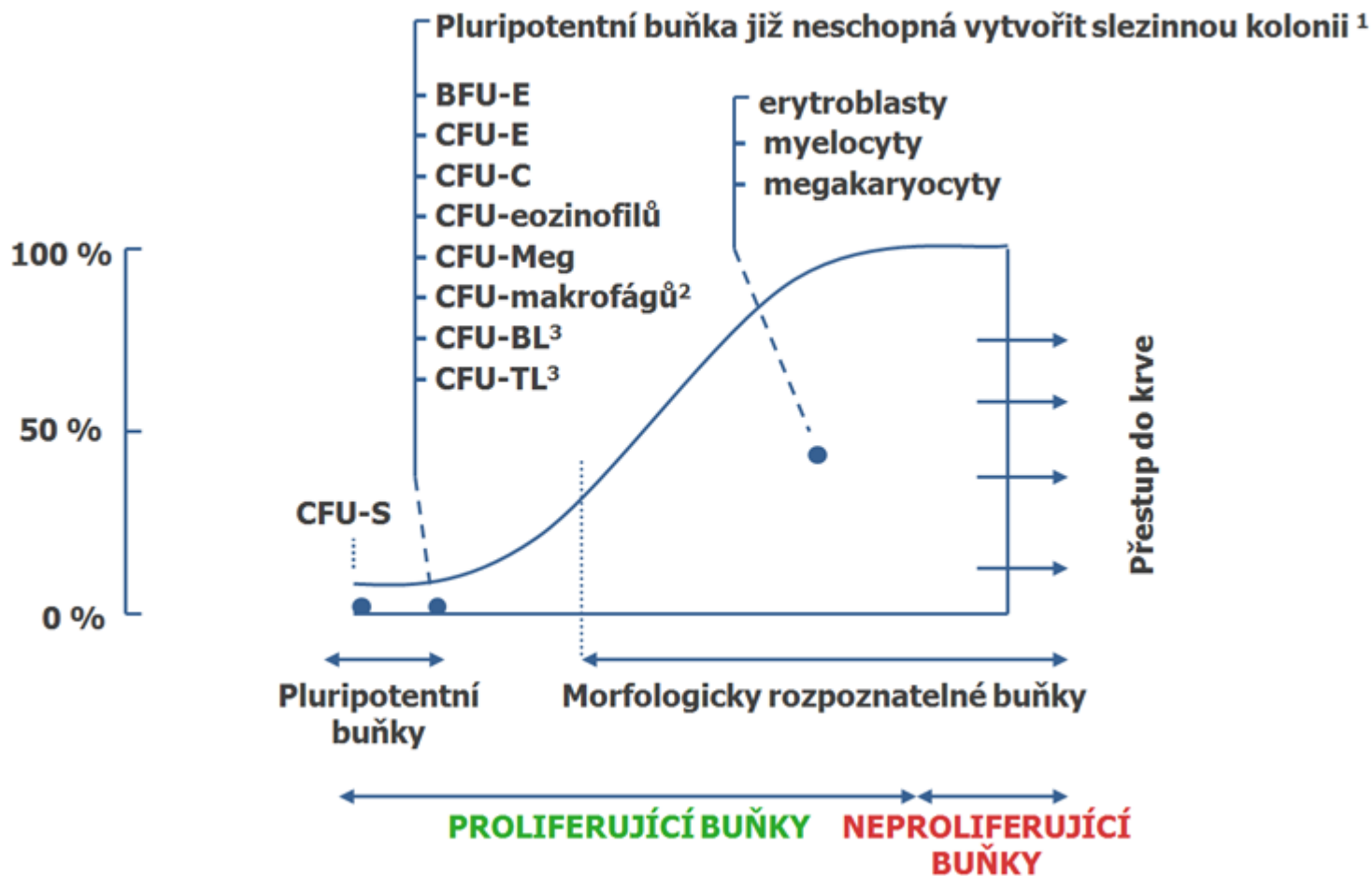
b

The structure of the hemopoietic system

T.M.Dexter and M.Moore



HEMATOPOETICKÉ BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ

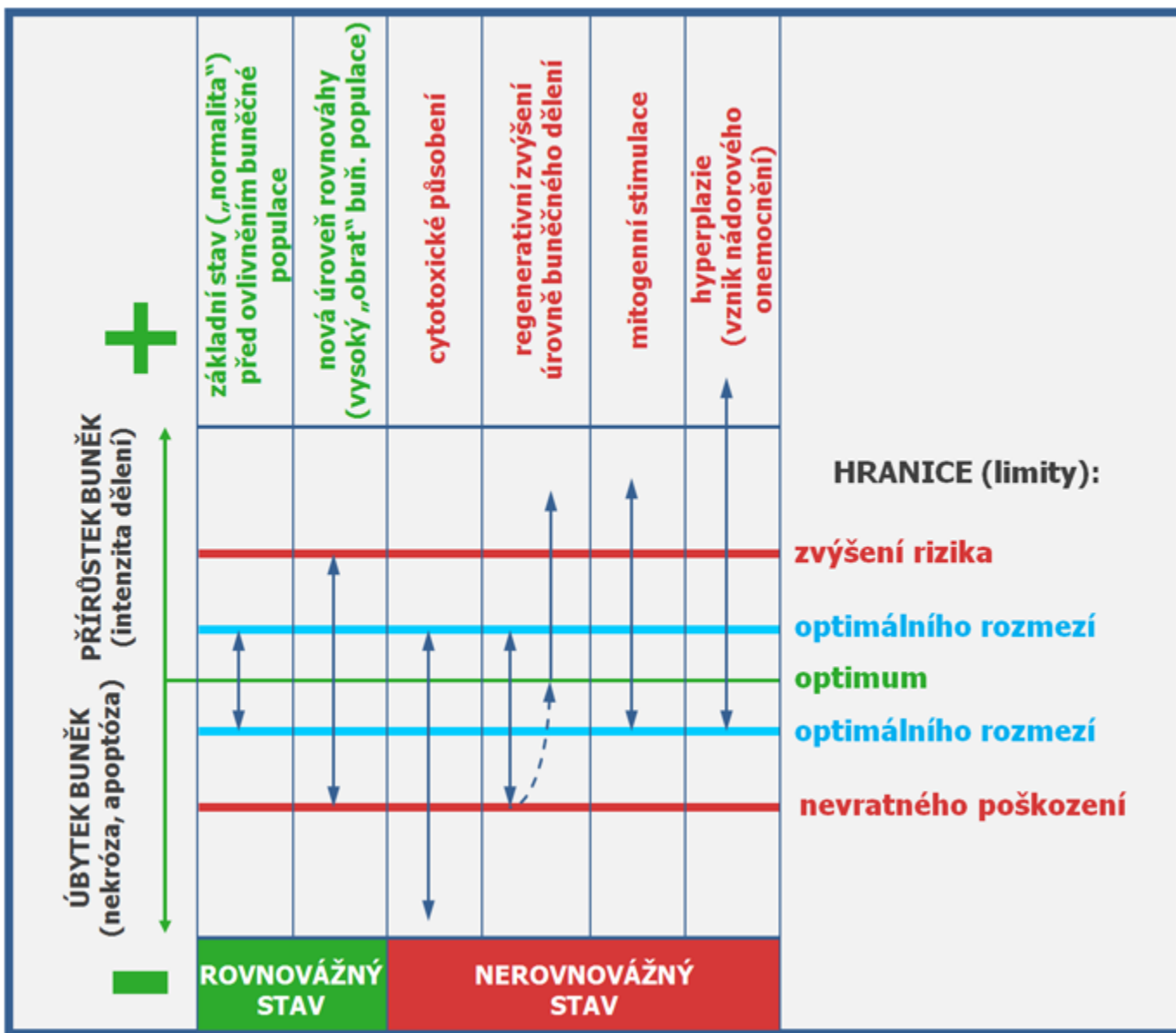


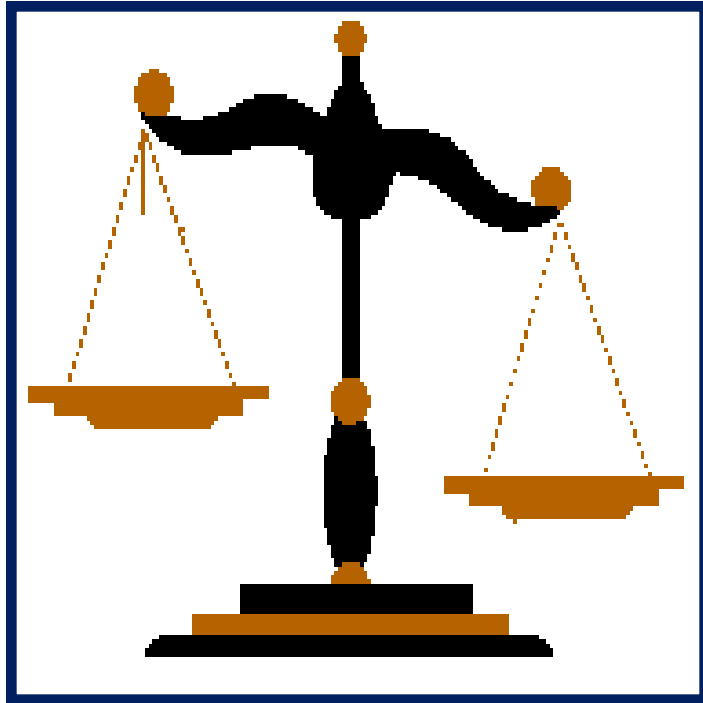
Obř. 8. Schéma kvantitativního zastoupení různých prekurzorů krevních buněk v krvetvorné tkáni.

¹ Podle *Gregorové a Henkelmana* (1977)

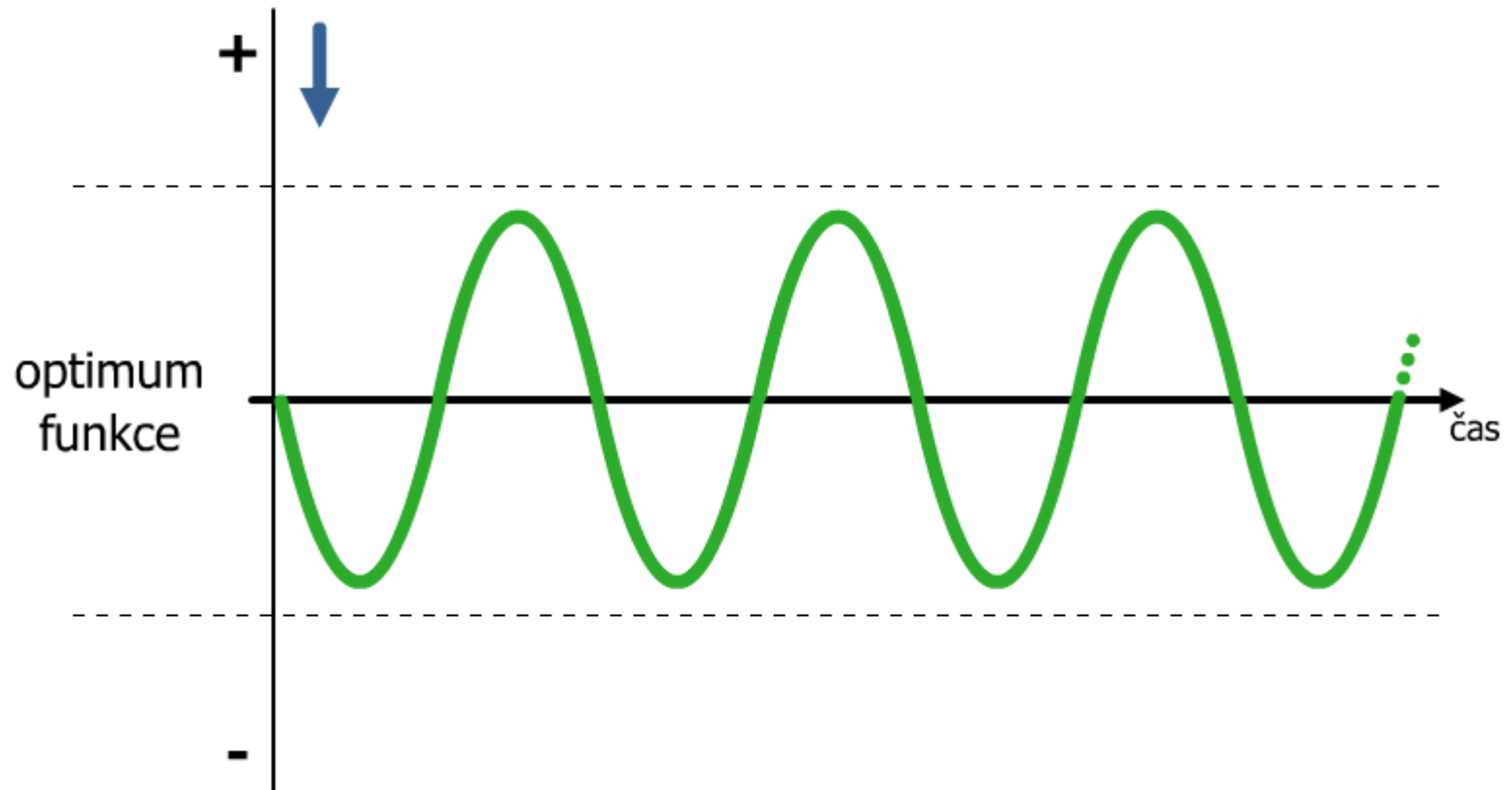
² Podle *MacVittieho a Porvaznika* (1978)

³ Nejsou odvozeny od CFU-S

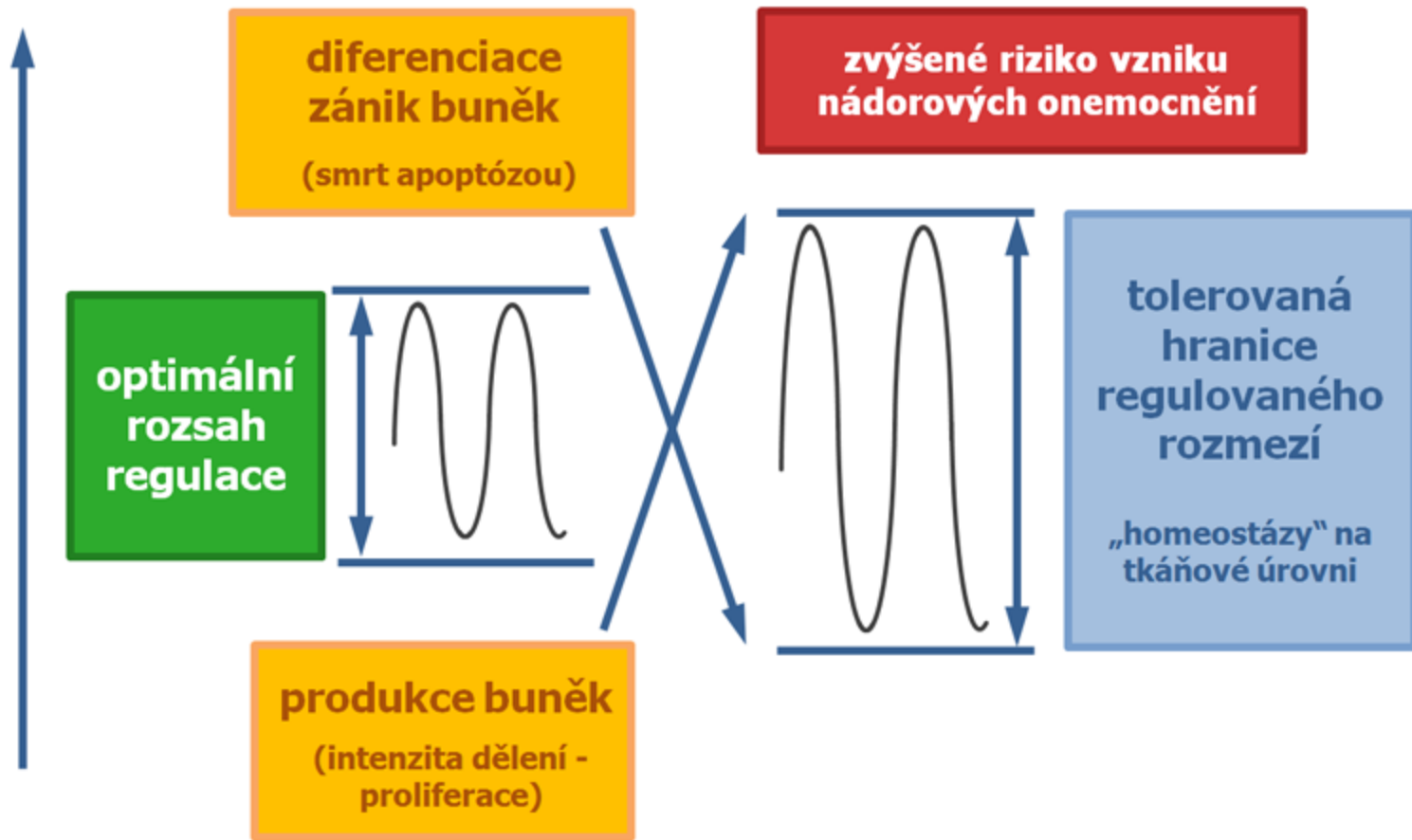


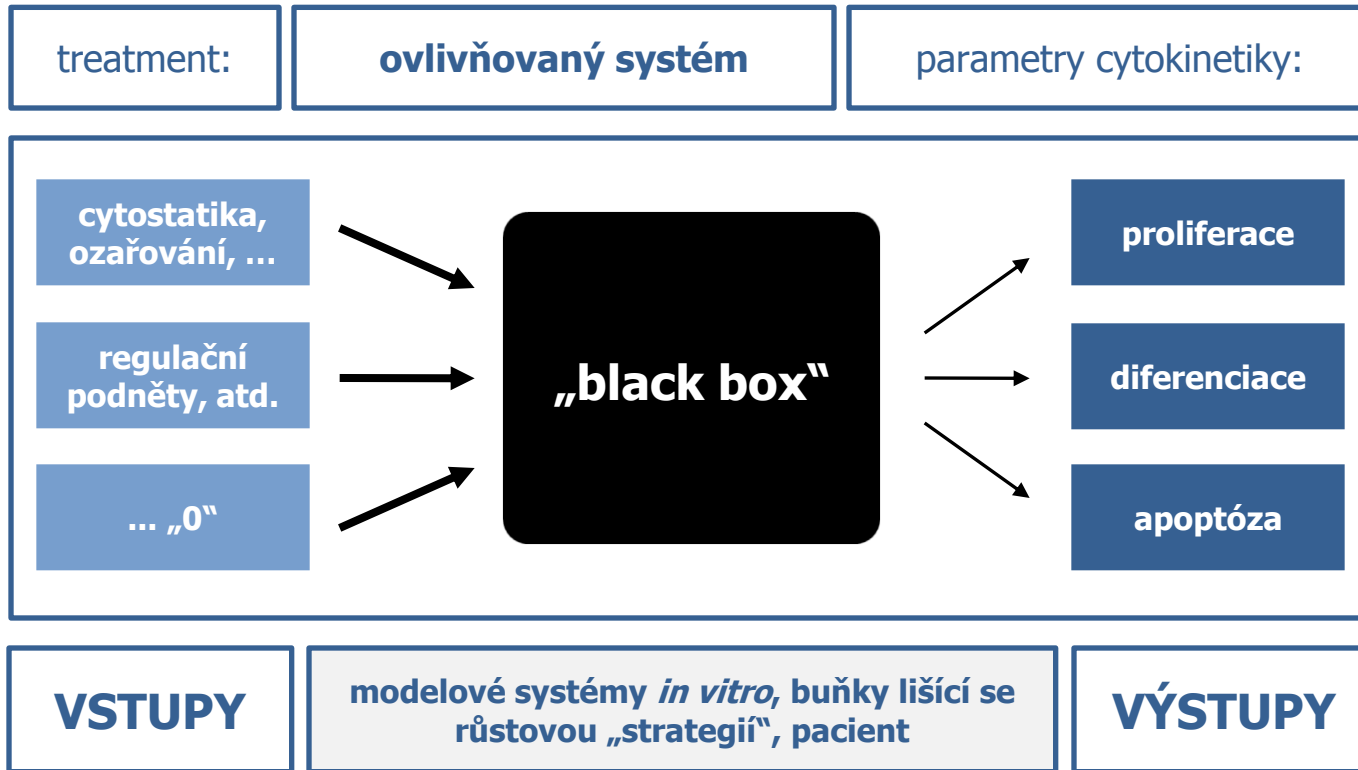


Dosažení dynamické rovnováhy



POČET BUNĚK V POPULACI



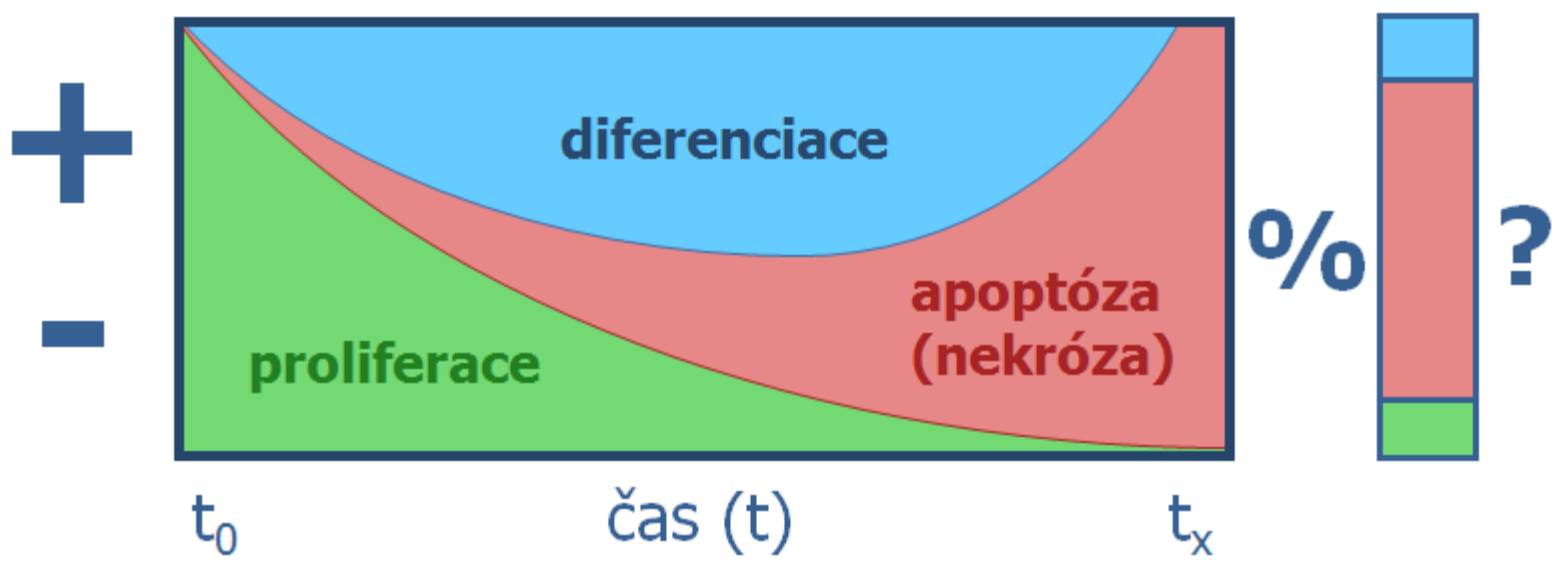


některá
OBEČNÁ VÝCHODISKA,

**DŮLEŽITÁ PRO POSTIŽENÍ CHOVÁNÍ A SMĚROVÁNÍ BUNĚČNÝCH
POPULACÍ, Z NICHŽ LZE VYCHÁZET, MOHOU BÝT TATO:**

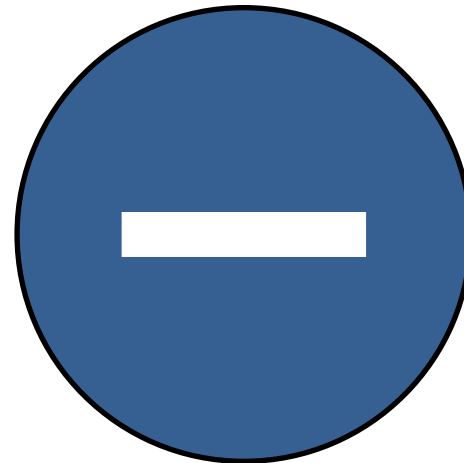
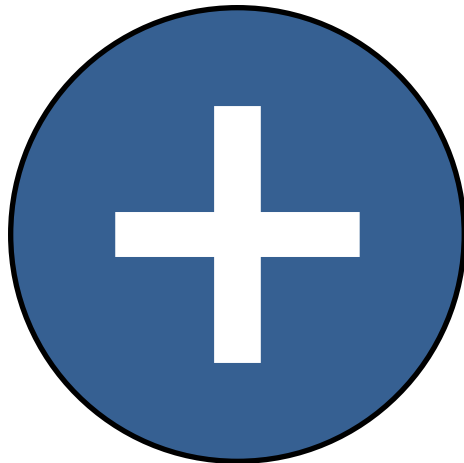
- Zachování rovnováhy v nejširším slova smyslu mezi produkcí buněk (intenzitou proliferace) a jejich úbytkem (např. smrtí apoptózou) je podmínkou pro zachování homeostázy na tkáňové úrovni.
- Proto změny v intenzitě proliferace, diferenciace a apoptózy po působení jakýchkoli podnětů, jež mohou tyto procesy ovlivnit, lze chápat jako integrální ukazatele porušení této homeostázy.
- Vhodný způsob detekce těch změn, které vedou k trvalejšímu porušení rovnováhy mezi produkcí a úbytkem buněk může celkově odrážet nejen poruchy, které jsou základem tzv. proliferativních chorob (nádorových onemocnění), ale být i ukazatelem procesů vedoucích k obnově porušené rovnováhy.
- Parametry, jimiž lze postihnout tyto tendence, by proto měly být předmětem zájmu nejen teoreticky orientovaných pracovníků, ale i laboratoří zabývajících se účinky škodlivých látek vnějšího prostředí, šlechtitelských a zejména klinicky orientovaných laboratoří.

Parametry cytokinetiky



Rovnováha (homeostáza)

Výsledek působení mnohočetných zpětných vazeb



FAKTORY SPECIFICKÉ

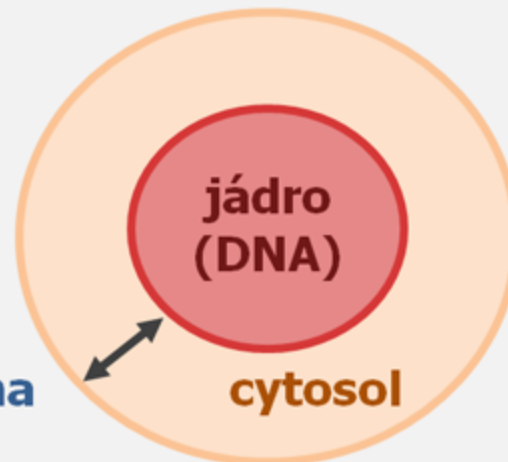
-



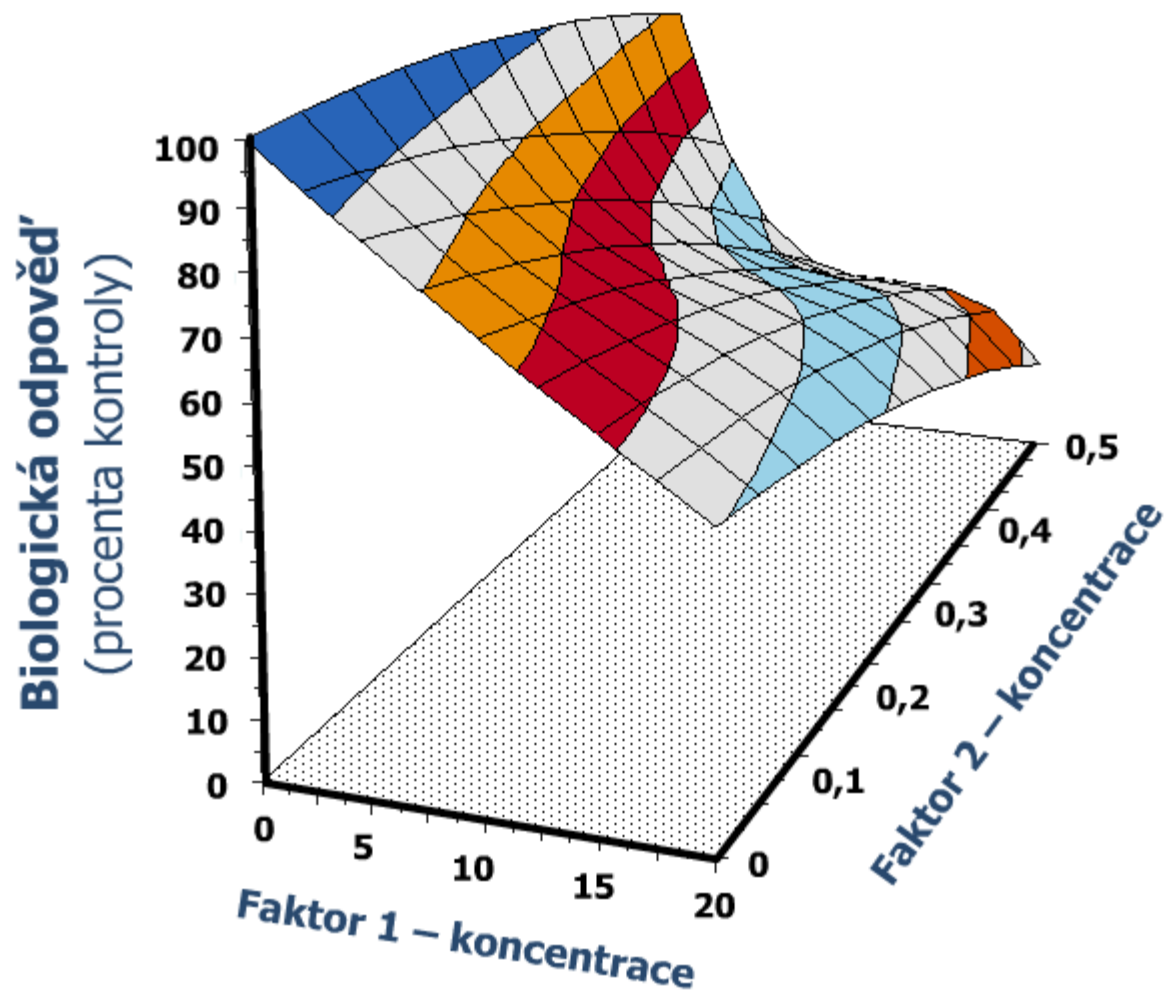
+

FAKTORY NESPECIFICKÉ

membrána

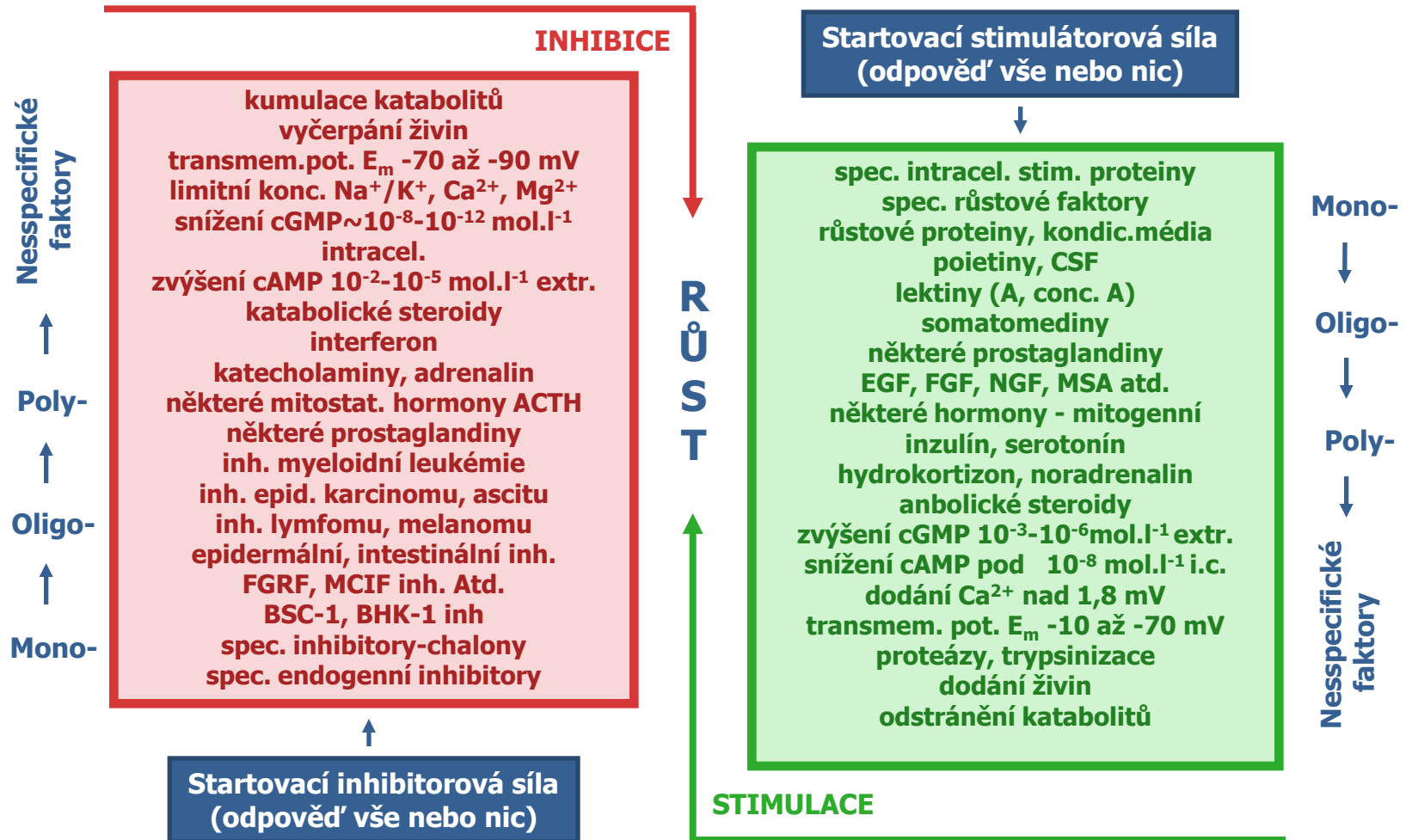


cytosol



Příklad interakce dvou faktorů (data: Eur. J. Pharmacol. 316, 349–357, 1996.)

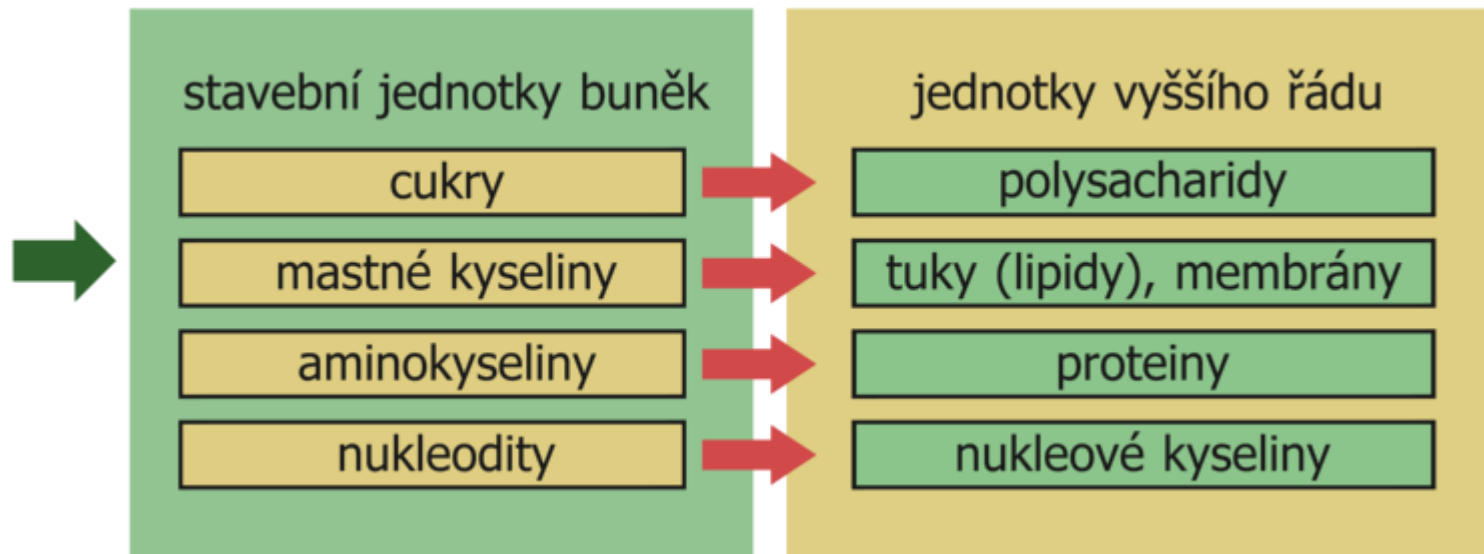
REGULACE „NORMÁLNÍHO“ RŮSTU

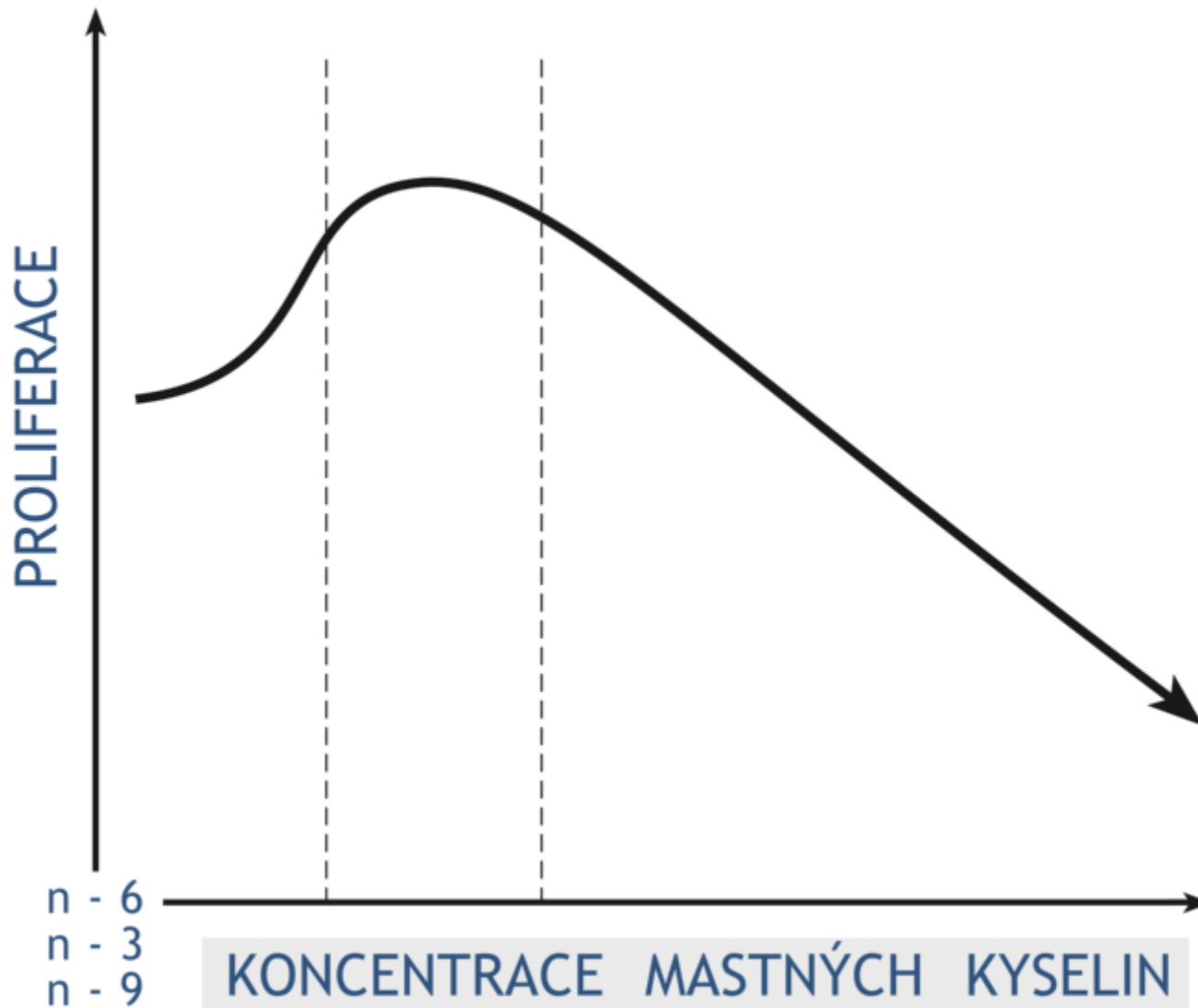


1A Schematické znázornění stimulace a inhibice růstu specifickými a nespecifickými faktory. Převaha pozitivního nebo negativního signálu rozhoduje o výsledné stimulaci nebo inhibici závisí na metabolické a růstové aktivitě buněk, typu buněk a dalších podmínkách - viz text. Specifické růstové účinky vnějšího prostředí buněk zahajují specifické růstové faktory (specifické stimulatory) a specifické endogenní inhibitory (chalony). CSF-kolonie stimulační faktor, EGF-epidermální růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, NGF-nervový růstový faktor, MSA-multiplikační stimulační aktivita, cAMP-cyklický 3'5'-guanosinmonofosfát, BSC-1, BHK-1, MCIF, FGRF-specifické inhibitory daných buněčných linií.

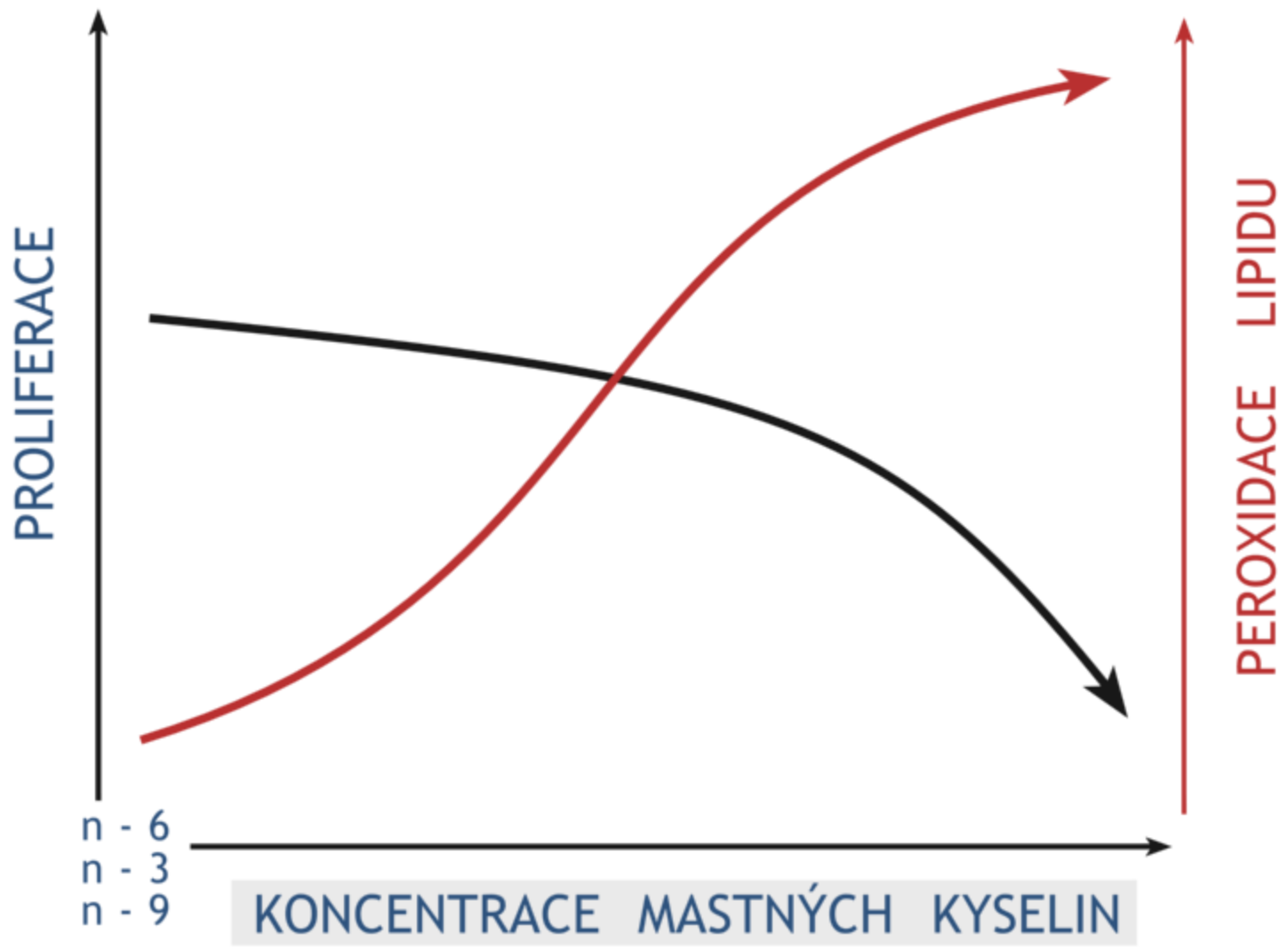
Regulace a inhibice růstu normálních a nádorových buněk, Fremuth F., SPN, Praha, 1986

Čtyři nejdůležitější skupiny malých organických molekul v buňkách

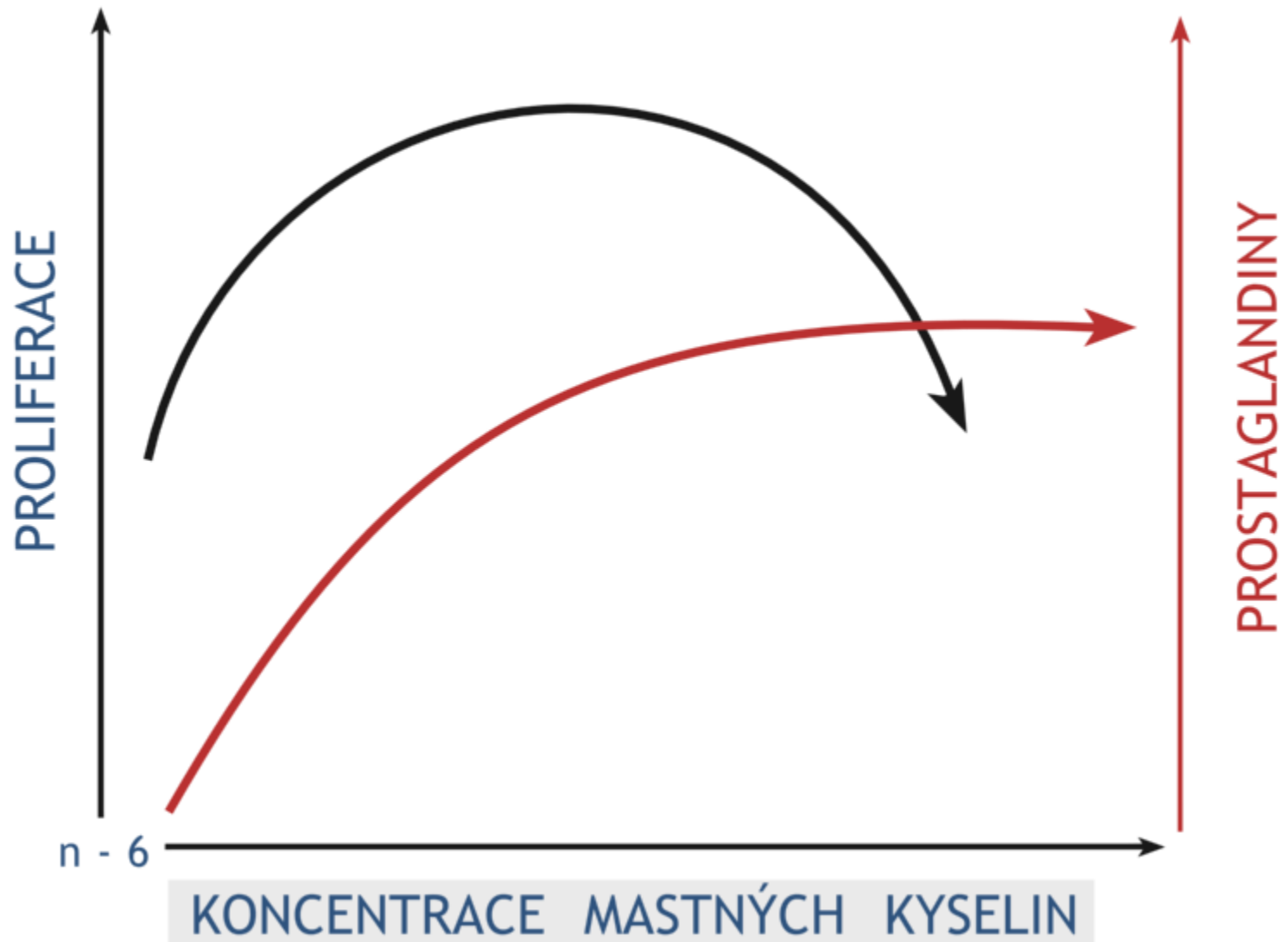




D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

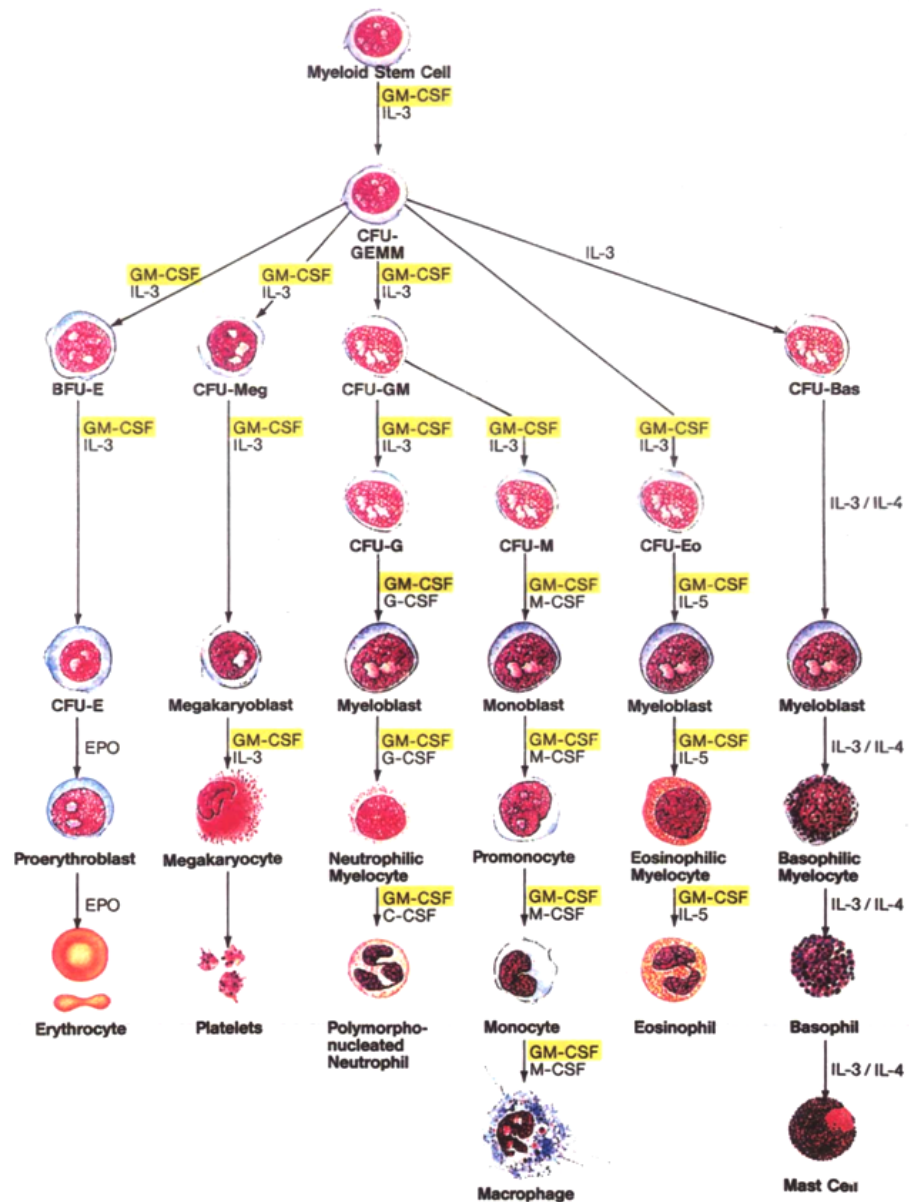


D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984



D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984

The early acting growth factor which maximises host defense



T.M.Dexter and M.Moore

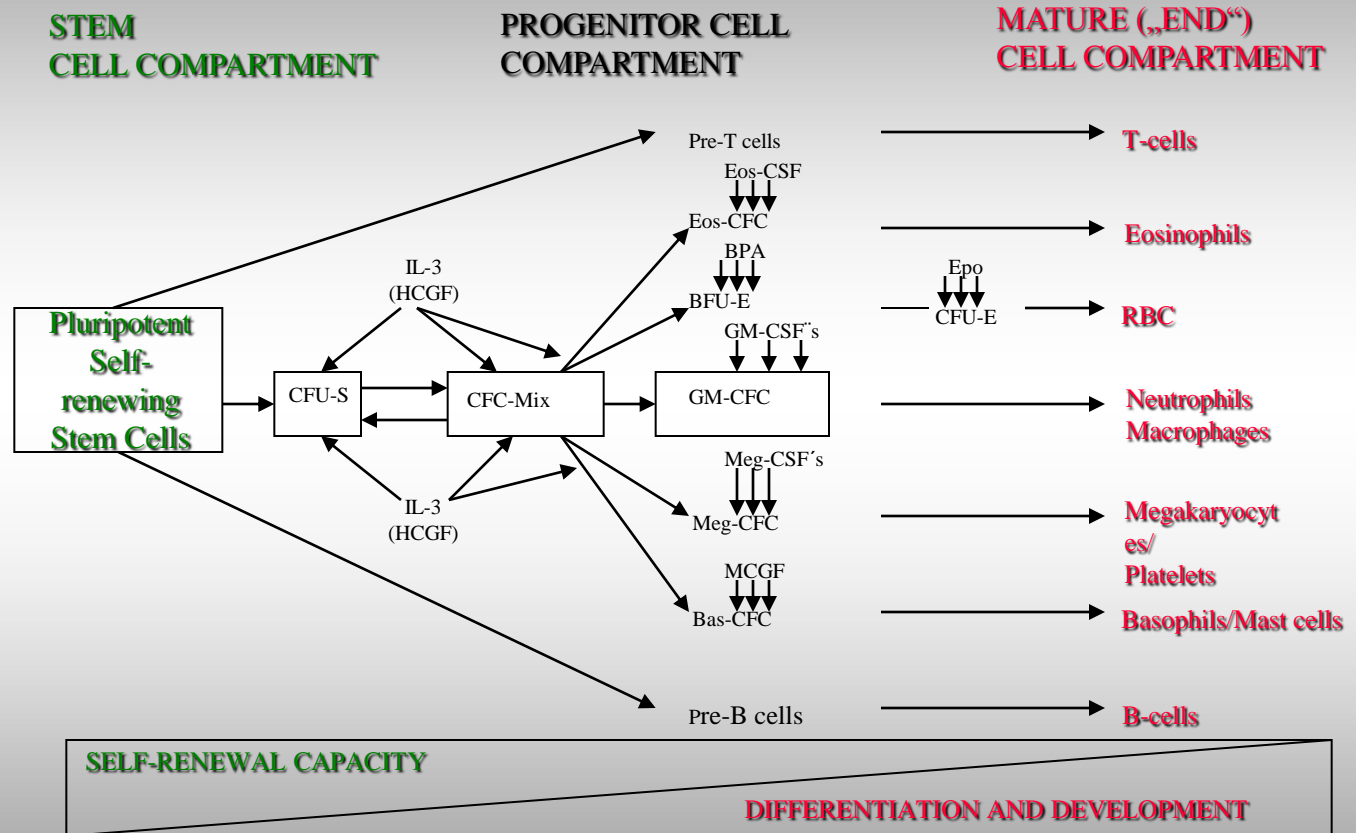
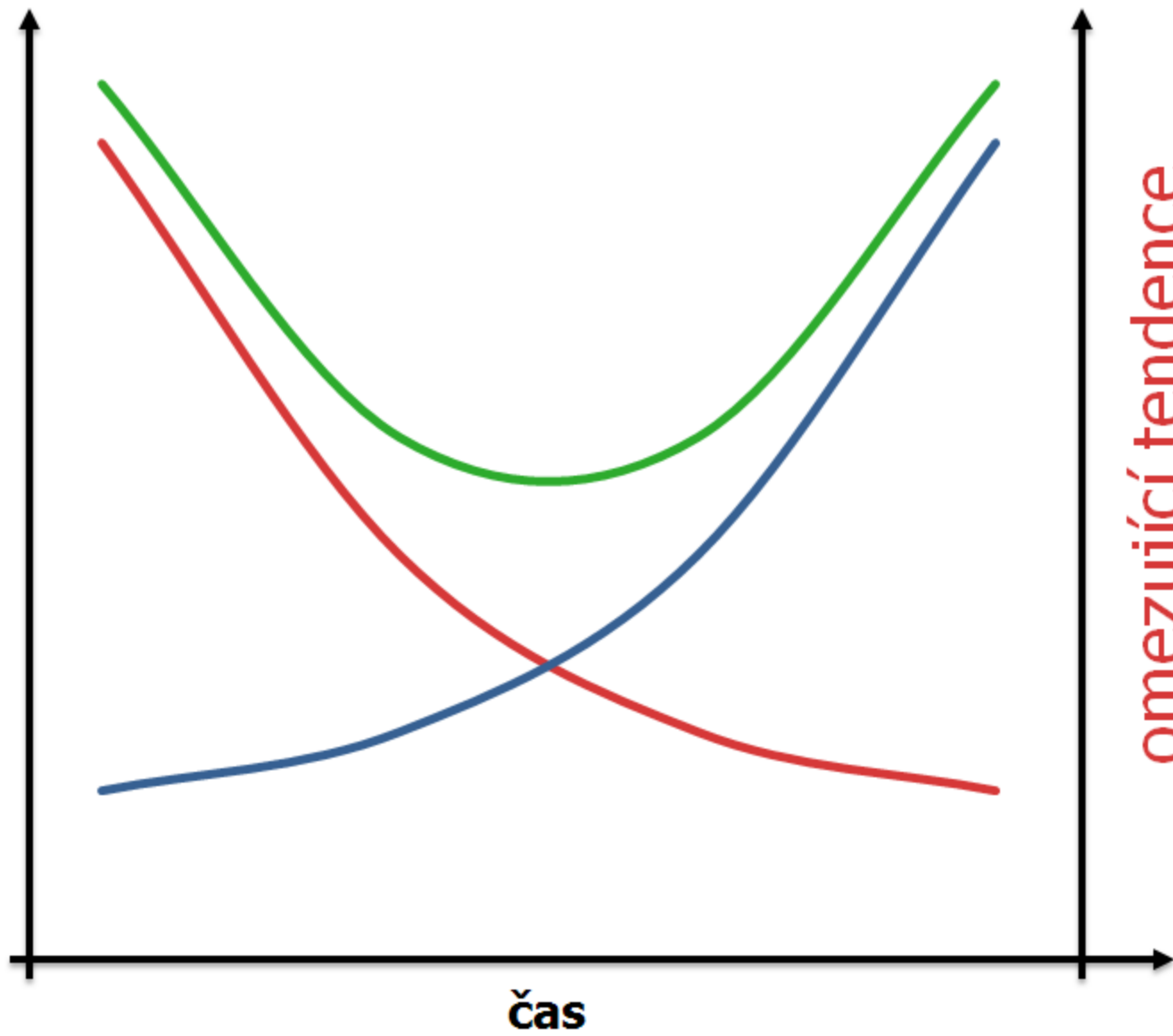


Fig. 1. The structure of the hemopoietic system

Seznam používaných zkratek kmenových buněk:

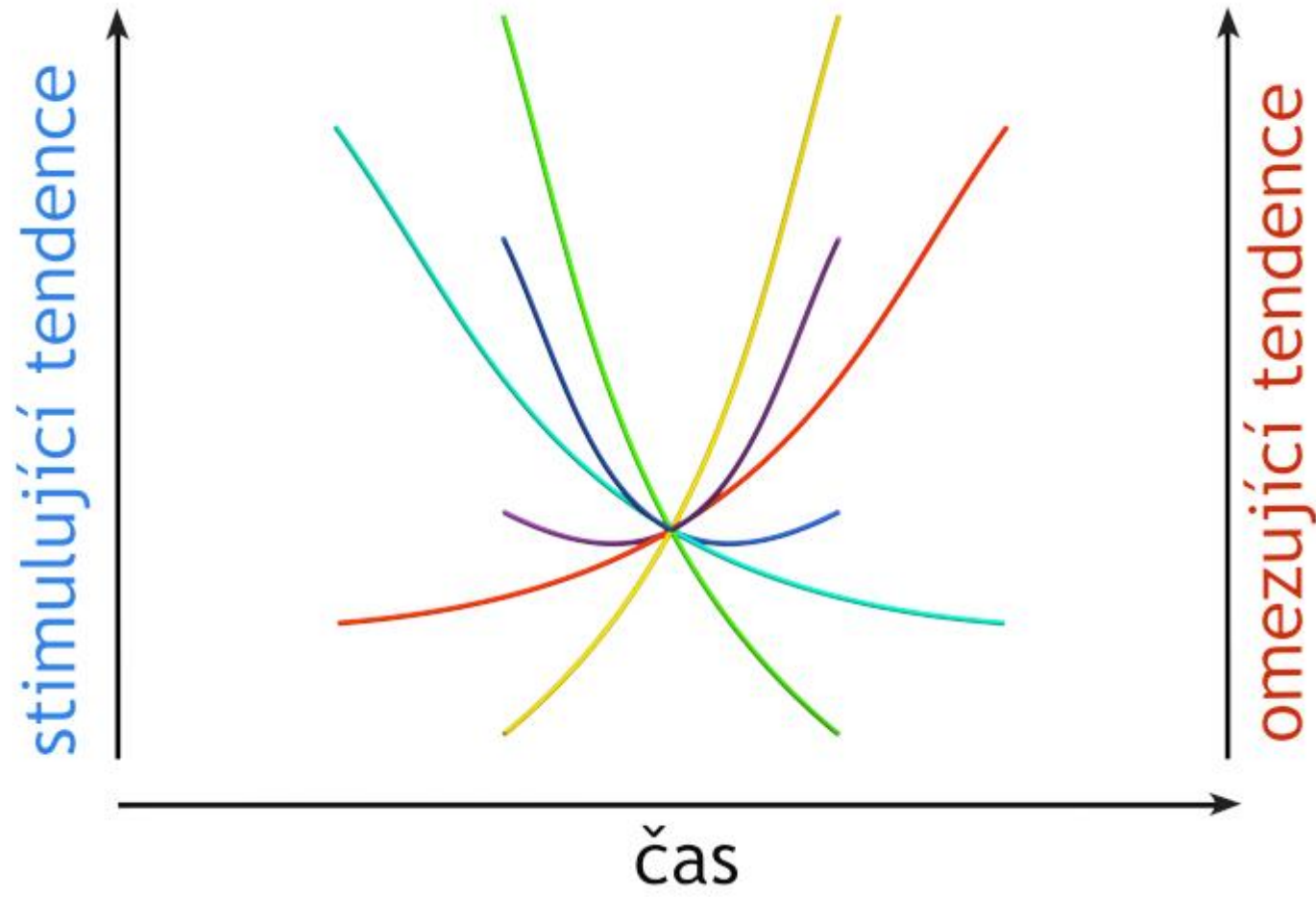
BFU-E -	<i>burst forming unit - erythroid</i> (jednotka vytvářející explozivně vznikající kolonie erytroidní řady). Velmi nezářká kmenová buňka erytroidní řady.
CFU-BL -	<i>colony forming cell - B - lymphocyte</i> (buňka vytvářející kolonie lymfocytů B).
CFU-C - (GM-CFC)	<i>colony forming unit - culture</i> (jednotky vytvářející kolonie v kultuře). Kmenová buňka bílé řady, v poslední době stále častěji používaná zkratka GM-CFC – <i>granulocyte macrophage-colony forming cell</i> (buňka vytvářející kolonie pro granulocyty a makrofágy).
CFU-E -	<i>colony forming unit - erythroid</i> (jednotka vytvářející kolonie erytroidní řady.) . Kmenová buňka erytroidní řady
CFU-Meg-	<i>colony forming unit - megakaryocyte</i> (jednotka vytvářející kolonie megakaryocytů). Kmenová buňka erytroidní řady.
CFU-S - (CFU - GEMM)	<i>colony forming unit - spleen</i> (jednotka vytvářející kolonie ve slezině). Nejběžnější používaná zkratka pro hemopoetickou pluripotentní kmenovou buňku.
DCPC –	<i>diffusion chamber progenitor cell</i> (kmenová progenitorová buňka proliferující v difúzních komůrkách.)

stimulující tendence

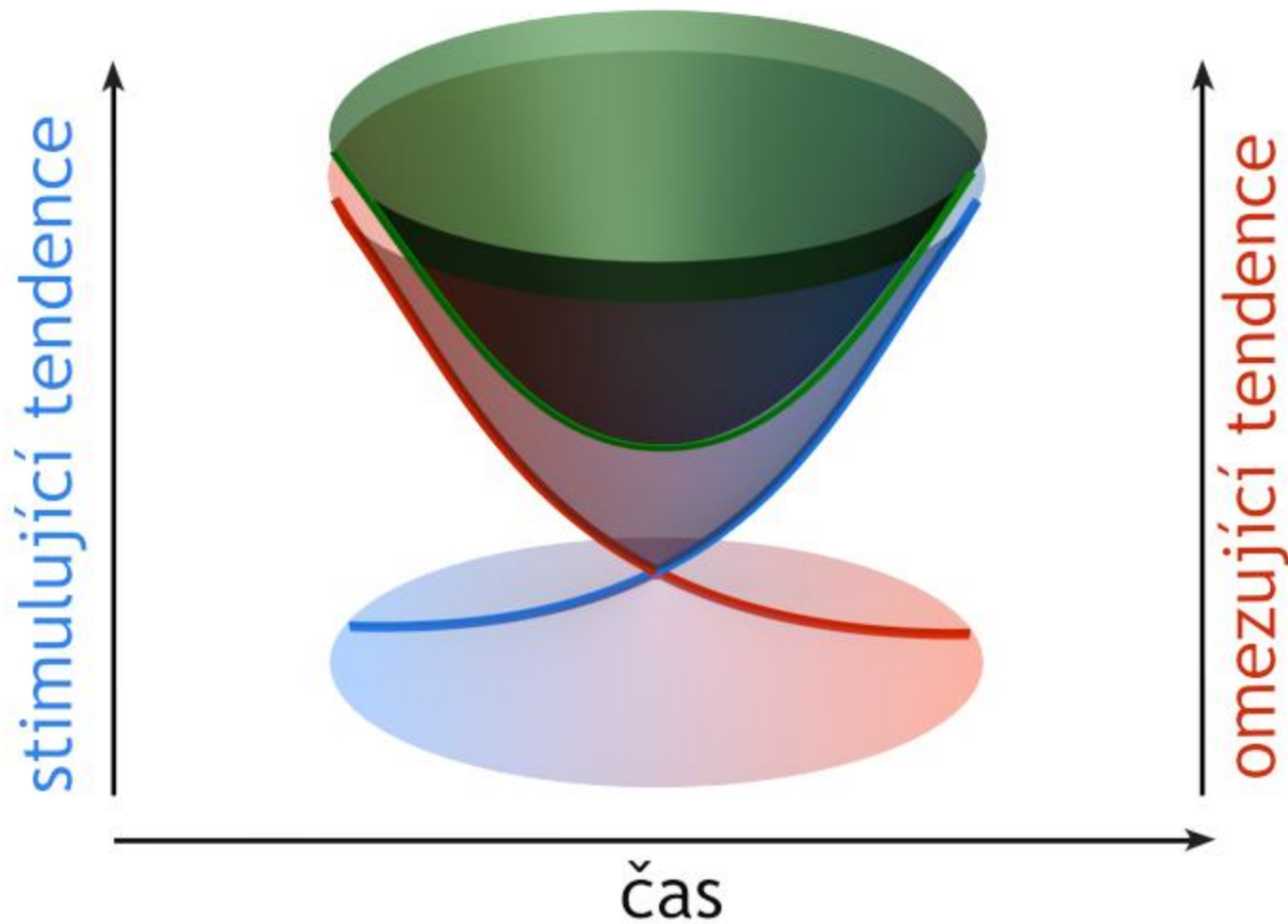


omezující tendence

čas

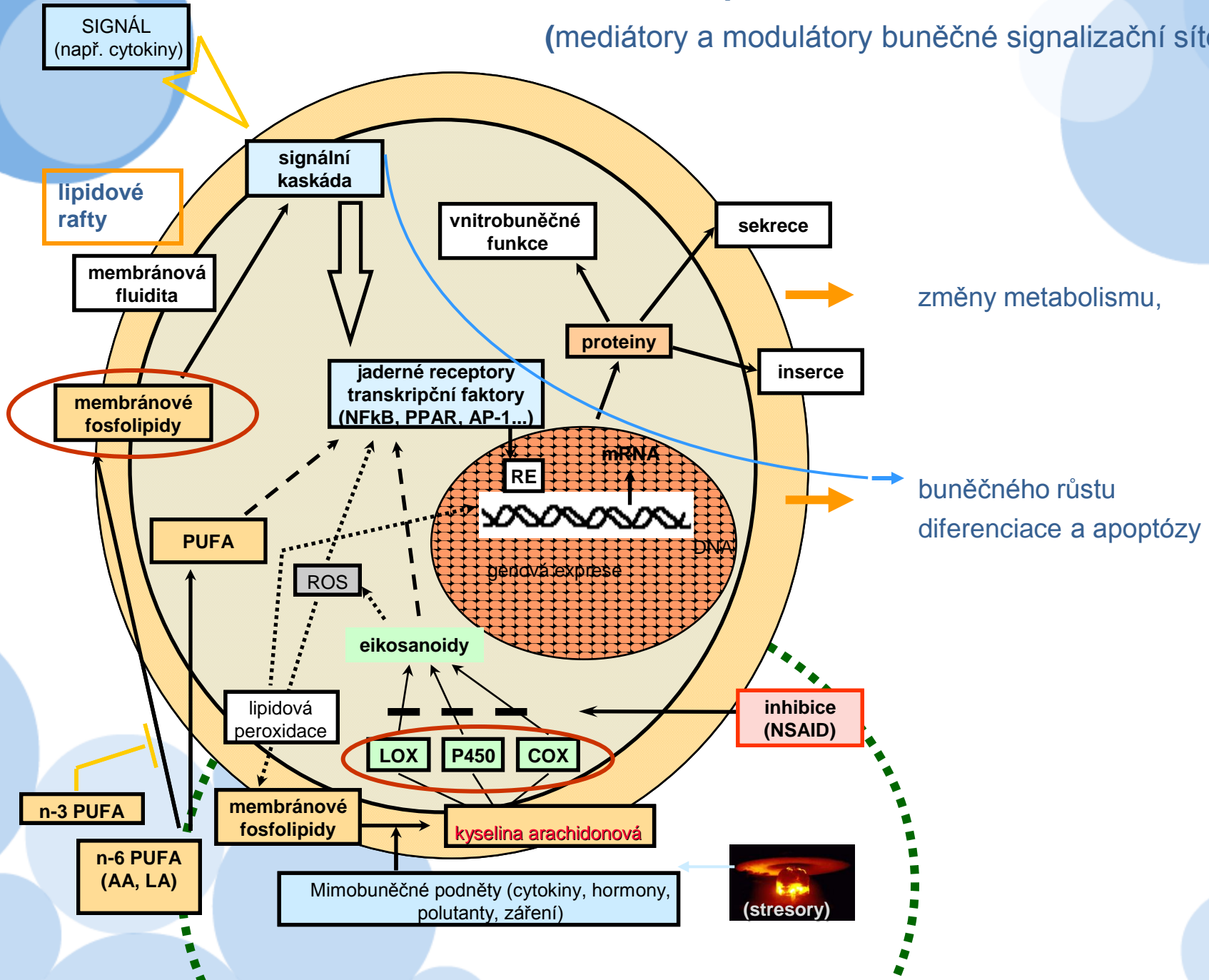


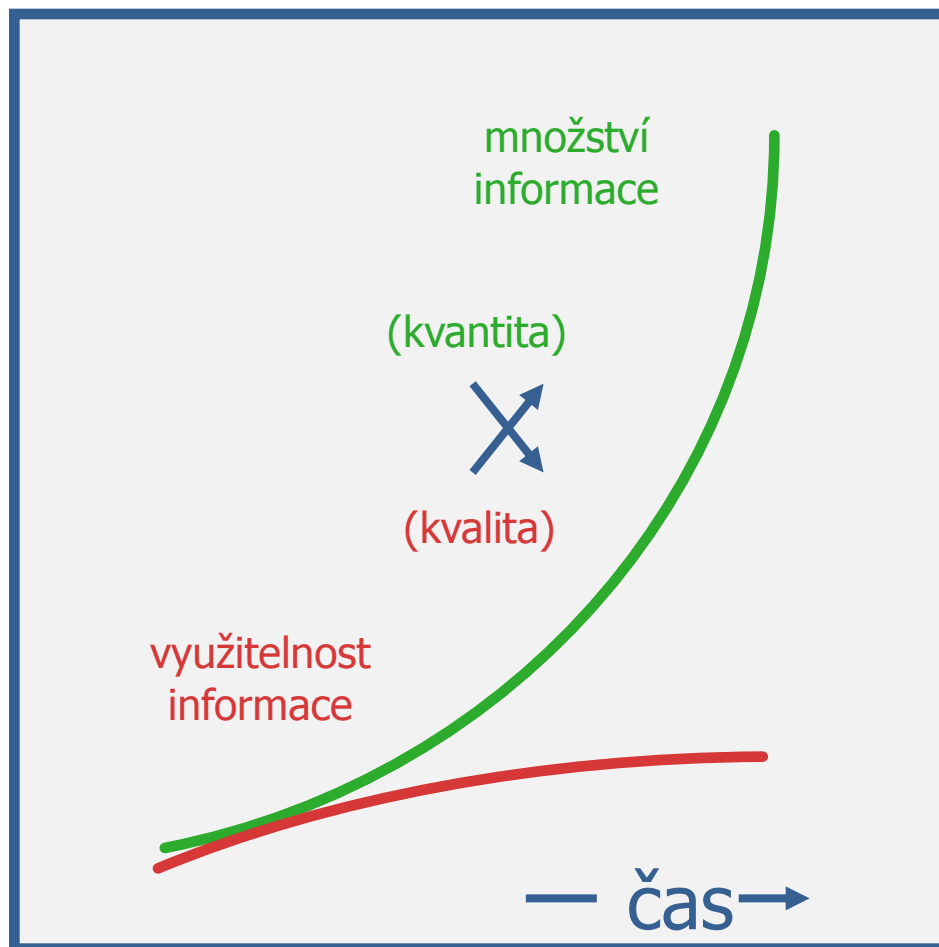
Nutnost vyváženosti



MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 a ω -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)





„Moudrost člověka lze měřit podle starostlivosti, s níž myslí na věci budoucí nebo na konec.“

G. Ch. Lichtenberg

Co by mělo být rozhodováno nejdřív:

Proč chceme studovat, jaký je opravdový zájem?

Na základě čeho se rozhodujeme?

Kdy začít a proč?

Kde začít?

Jaké máme možnosti uplatnění

po skončení studia?



Nabídka studia bcl., dipl. i DSP na našem oddělení
(na pracovištích PŘF i AVČR v Brně)