



Fyziologie buněčných systémů

A. Kozubík J. Hofmanová

ÚEB (oddělení/ specializace)

1) Fyziologie a imunologie živočichů



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



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 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.

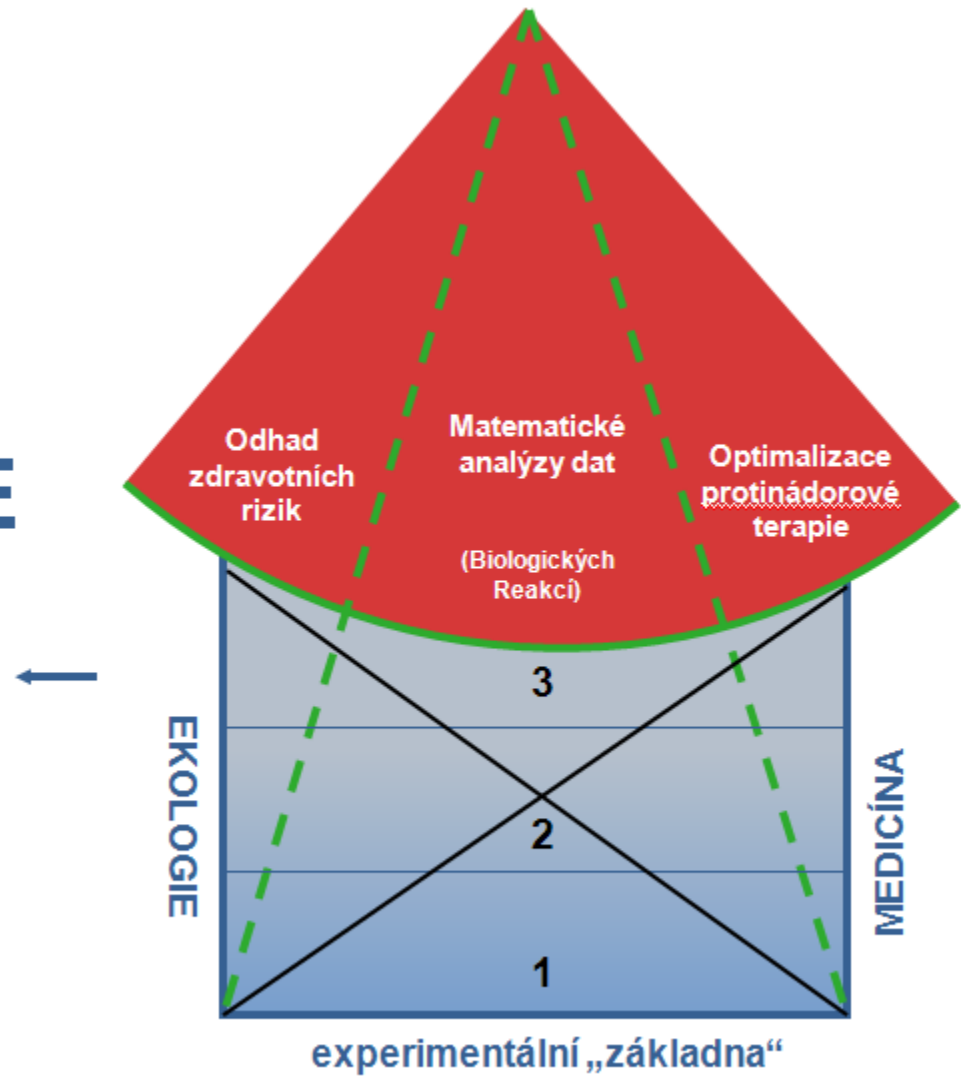
Složení a zaměření oddělení

TOXICOLOGIE

↑
EKOTOXIKOLOGIE

Regulace cytokinetiky
(proliferace, diferenciace, apoptózy)

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



Fyziologie buňky (buněčné signalizace)

prof. A. Kozubík

prof. J. Hofmanová

Dr. V. Bryja

Dr. P. Krejčí

Dr. J. Procházková

Dr. K. Souček

Dr. J. Pacherník

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

Imunologie obratlovců a bezobratlých

Doc. A. Lojek

Doc. A. Žáková

Dr. P. Hyršl

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

Fyziologie smyslového vnímání

Doc. M. Vácha

NĚKTERÉ HLAVNÍ CÍLE SOUČASNÉHO VÝZKUMU

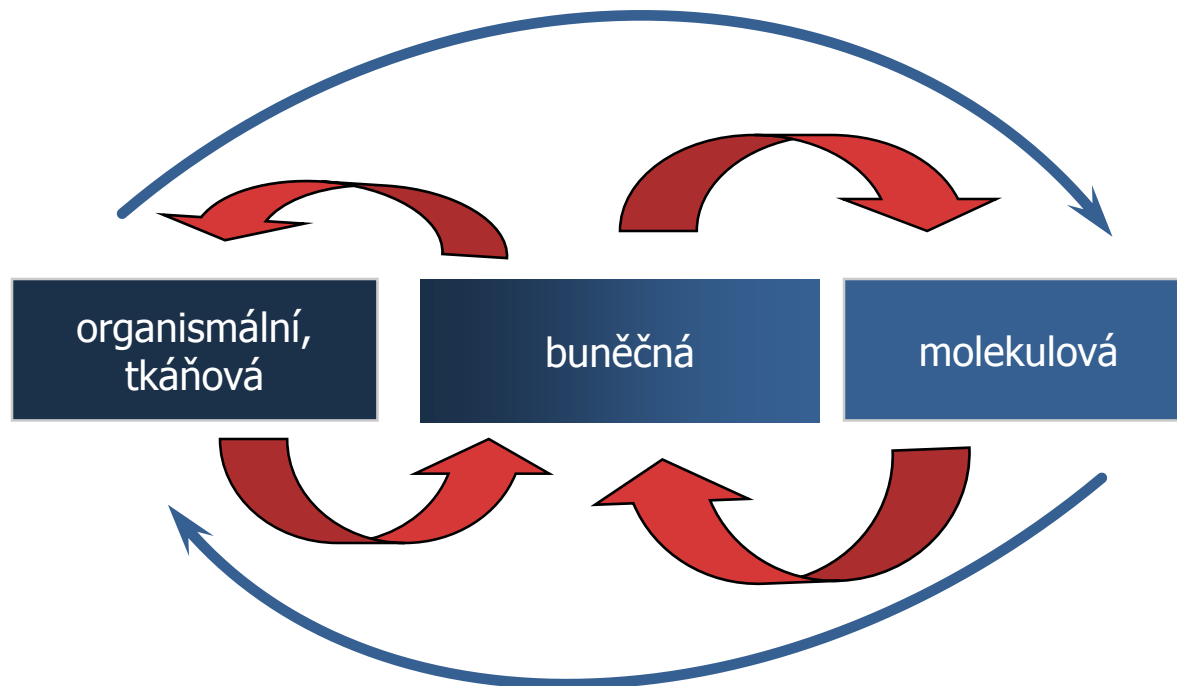
Poznání mechanismů působení látek lipidové povahy, zejména VNMK a jejich derivátů, *v mezi/vnitrobuněčných komunikacích* podílejících se

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

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

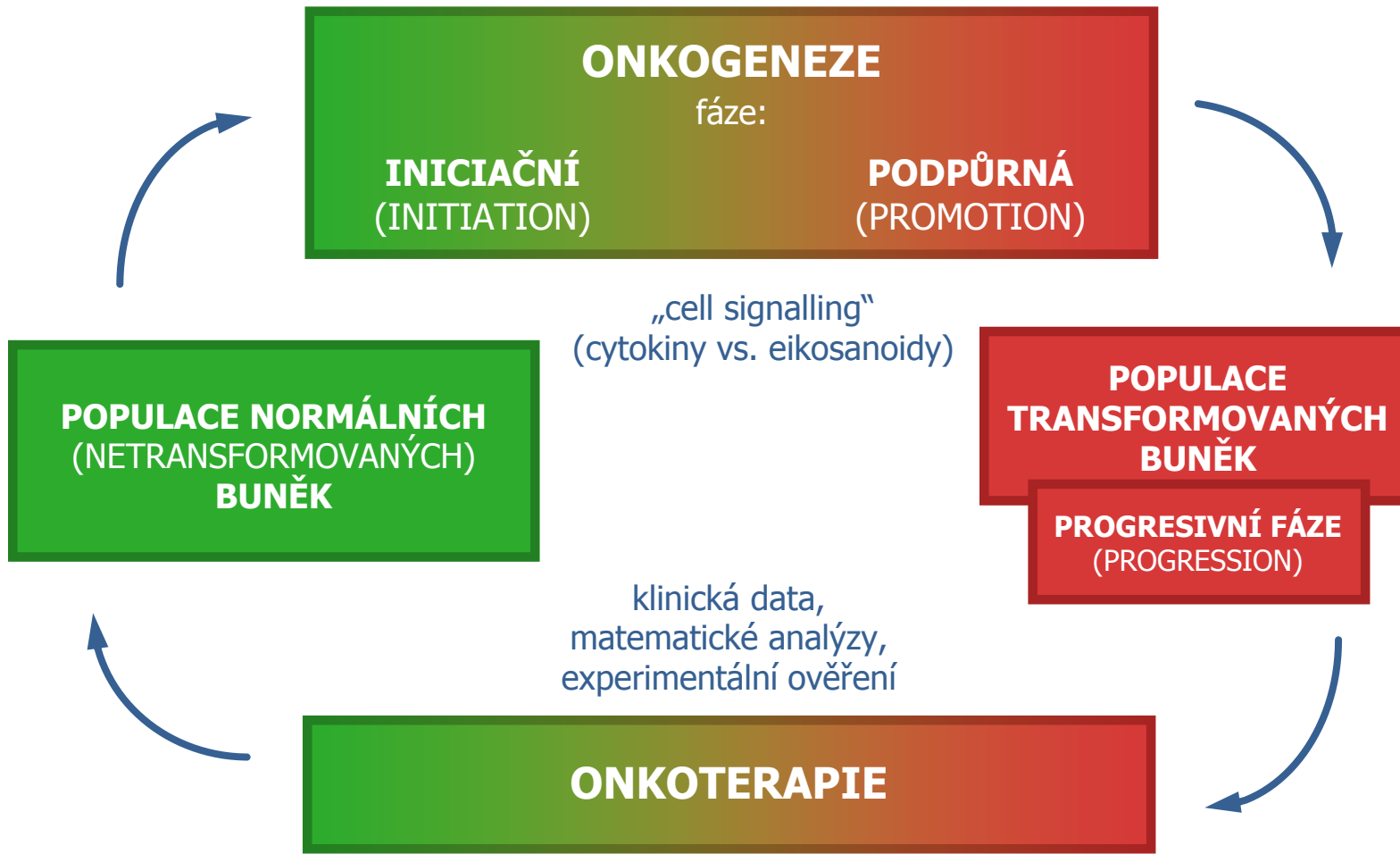
Jedním z praktických cílů je využít tyto znalosti v rámci přípravy lipidových nutričních preparátů, případně cytostatik.

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





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.

Přehled metod a metodologií (ucelený systém)

Hlavní METODY používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

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

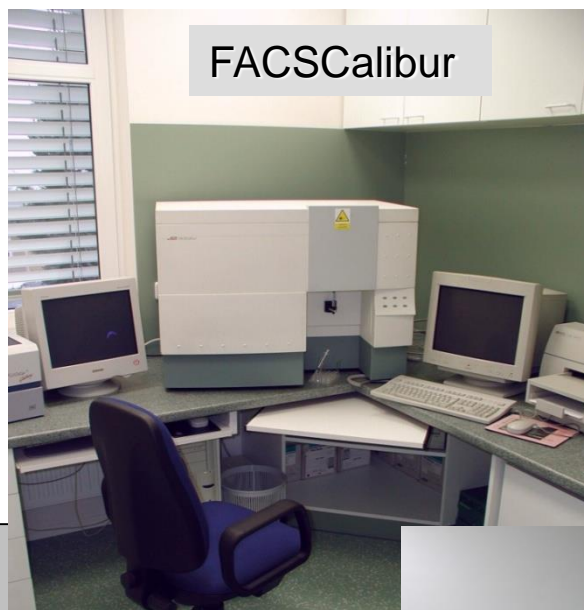
RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

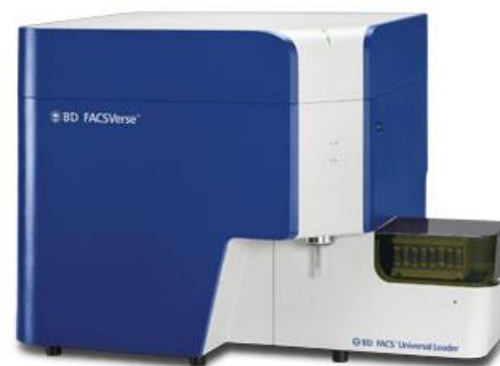
ELFO – agarózová elektroforéza

FACS - Fluorescence-activated cell sorting

(průtoková cytometrie včetně „cell sortingu“)



FACSCalibur



FACSVerse

FACS ARIA SORP II



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA

Metodologie využívají nejmodernější zařízení

Výhody

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

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, erytropoéza, 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, zdroje I.

Nezbytné je absolvovat výklad – vlastní poznámky

+ jakákoli MODERNÍ učebnice

- Biochemie
- Molekulární biologie
- Buněčné biologie

Starší 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

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

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

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

Recentní literatura II.

Apoptosis - Physiology and Pathology (ISBN: 9780521886567 Rok vydání: 2011)

Editor: John C. Reed

Author: Douglas R. Green

Vydavatelství: Cambridge UP

<http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/cell-biology-and-developmental-biology/apoptosis-physiology-and-pathology>

Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms (ISBN 978-0-879698-88-1 Rok vydání: 2011)

By Douglas R. Green, St. Jude Children's Research Hospital

http://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=14030831131413924&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdataarg=884

The Molecular Basis of Cancer (ISBN: 978-1-4557-4066-6, Rok vydání: March 2014)

Autor: John Mendelsohn, Peter Howley, Mark Israel, Joe Gray

Imprint: Saunders

<http://www.elsevier.com/books/the-molecular-basis-of-cancer/mendelsohn/978-1-4557-4066-6>

The Biology of Cancer (ISBN: 9780815342205, Rok vydání: 2013)

Autor: Weinberg R.

Vydavatelství: Garland Science

<http://www.malecentrum.cz/9780815342205-the-biology-of-cancer/>

Molecular Cell Biology, 7th ed. (ISBN: 9781464109812, Rok vydání: 2013)

Autor: Lodish H.

Vydavatelství: W.H. Freeman

<http://www.malecentrum.cz/9781464109812-molecular-cell-biology-7th-ed/>

Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, 6/e, International Edition (ISBN: 9781451101508 Rok vydání: 2010)

Author: Michael H. Ross

Vydavatelství: Lippincott Williams

<http://www.malecentrum.cz/9781451101508-histology-a-text-and-atlas-with-correlated-cell-and-molecular-biology-6/e-international-edition/>

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition (ISBN 978-1-936113-01-9, Rok vydání: 2014)

• 814 pp., illus. (42 4C, 134 B&W), index

http://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=14030882921652554&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdataarg=982

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

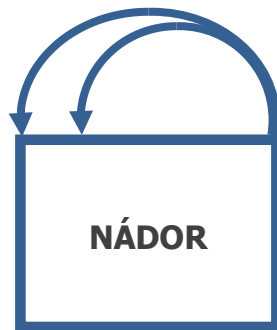
POJMY A MODELY

Typy buněčných populací

podle Gilberta a Lajthy (1965)

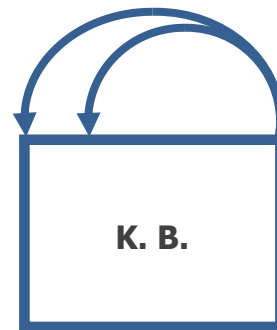
TYPY PROLIFERUJÍCÍ

expandující, neopouštějí
populaci, množí se



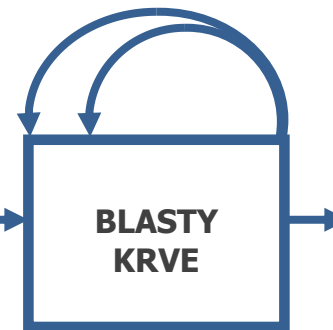
populace coby zdroj
buněk pro jiné populace

c. konstantní

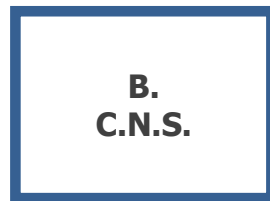


Tranzitní populace, ve
které se buňky pomnoží

c. konstantní



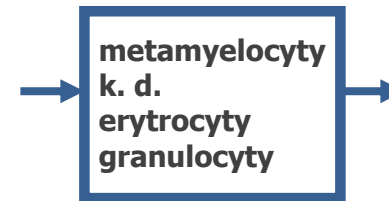
TYPY NEPROLIFERUJÍCÍ



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 dřene 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, prekursory 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



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

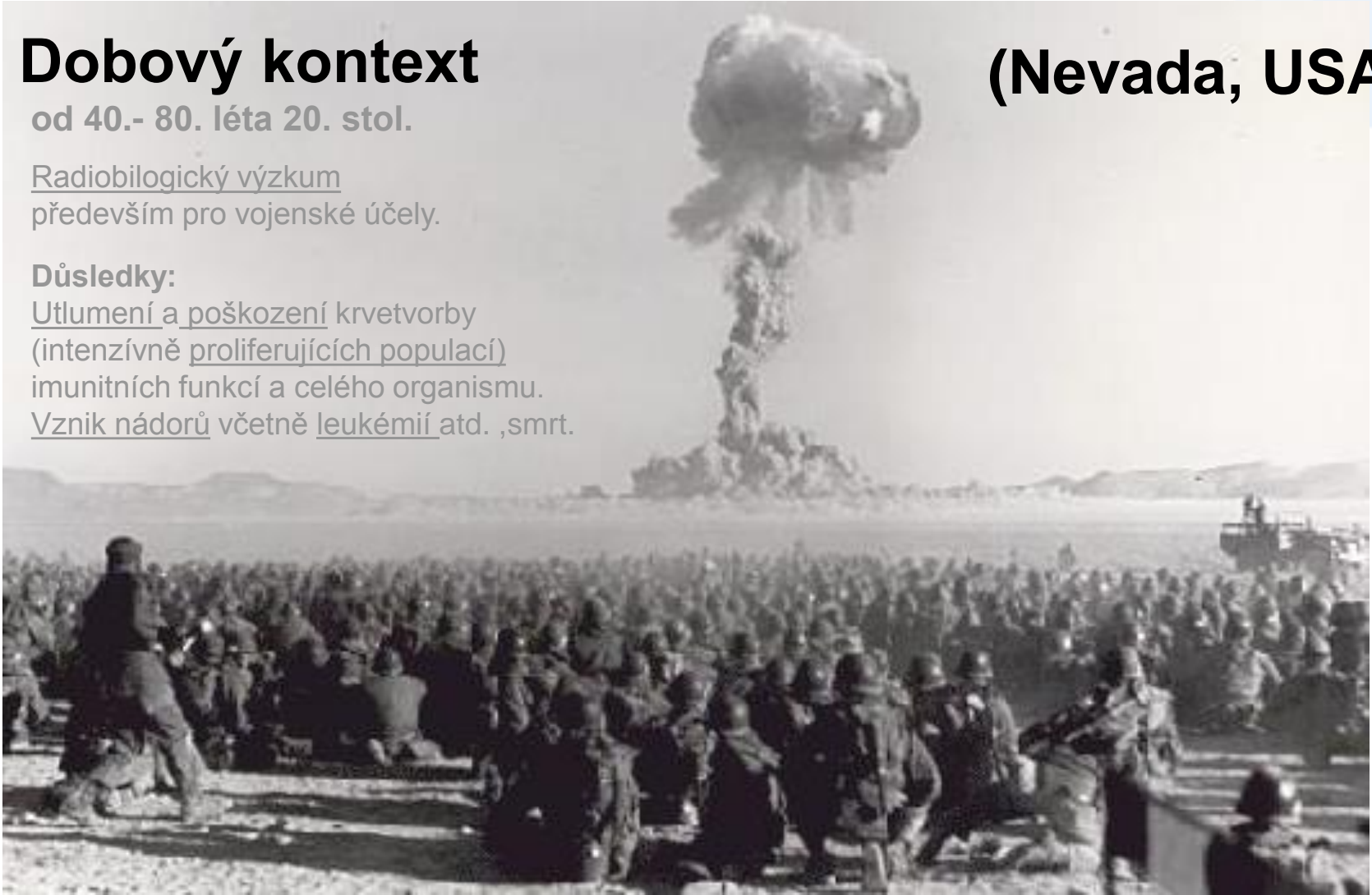
od 40.- 80. léta 20. stol.

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

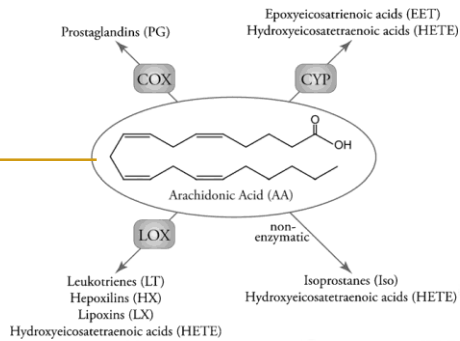
Centrálně nervová forma....100 Gy.....Viz výše včetně C.N.S.

Důsledky:

**silné poškození intenzívně proliferujících populací, organismu, imunitních funkcí a celého systému:
proliferativní choroby, leukémie, smrt.**

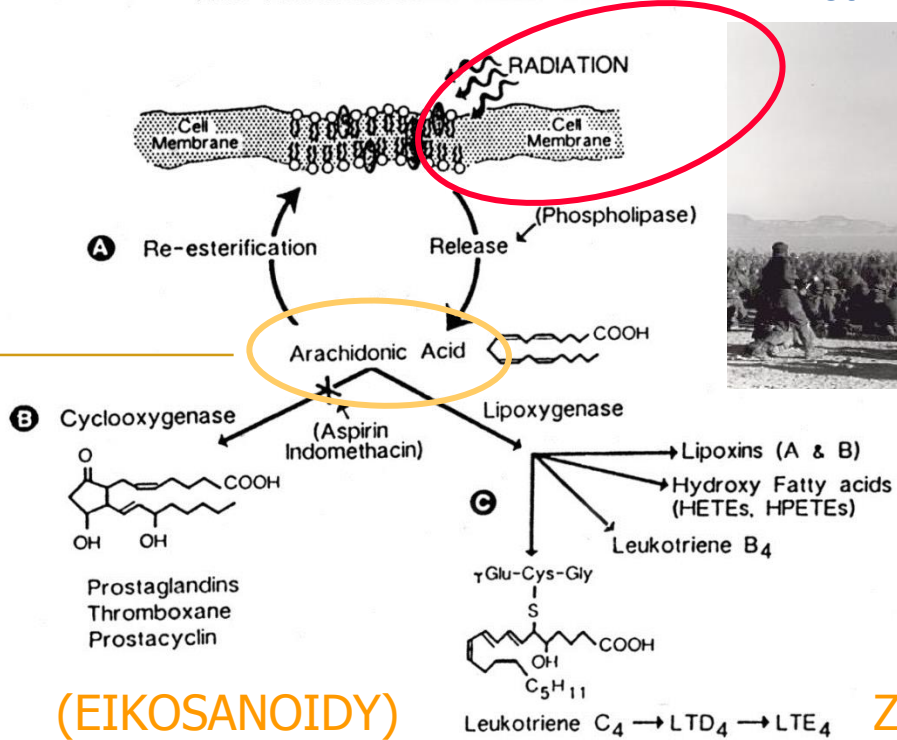
Využití ozáření jako modelu pro studium regenerace krvetvorných funkcí

***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 f-ce 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 produkuje 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:

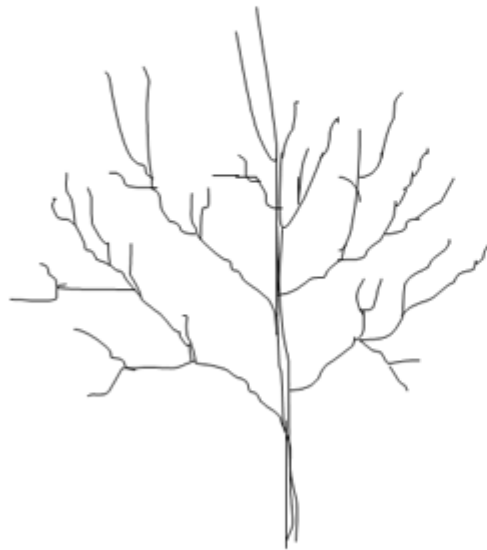
- a) zvětšení velikosti buněk při zachování konstantní velikosti populace
- b) zvětšení počtu buněk (proliferace) bez změn v objemu buněk
- c) zvýšení počtu buněk i jejich objemu
- d) odumírání apoptózou nebo nekrózou

Polyklonální charakter kostních buněk

Přirovnání kmenové buňky ke stromu

a – kmenová buňka v embryonální době

b – kmenová buňka v dospělosti



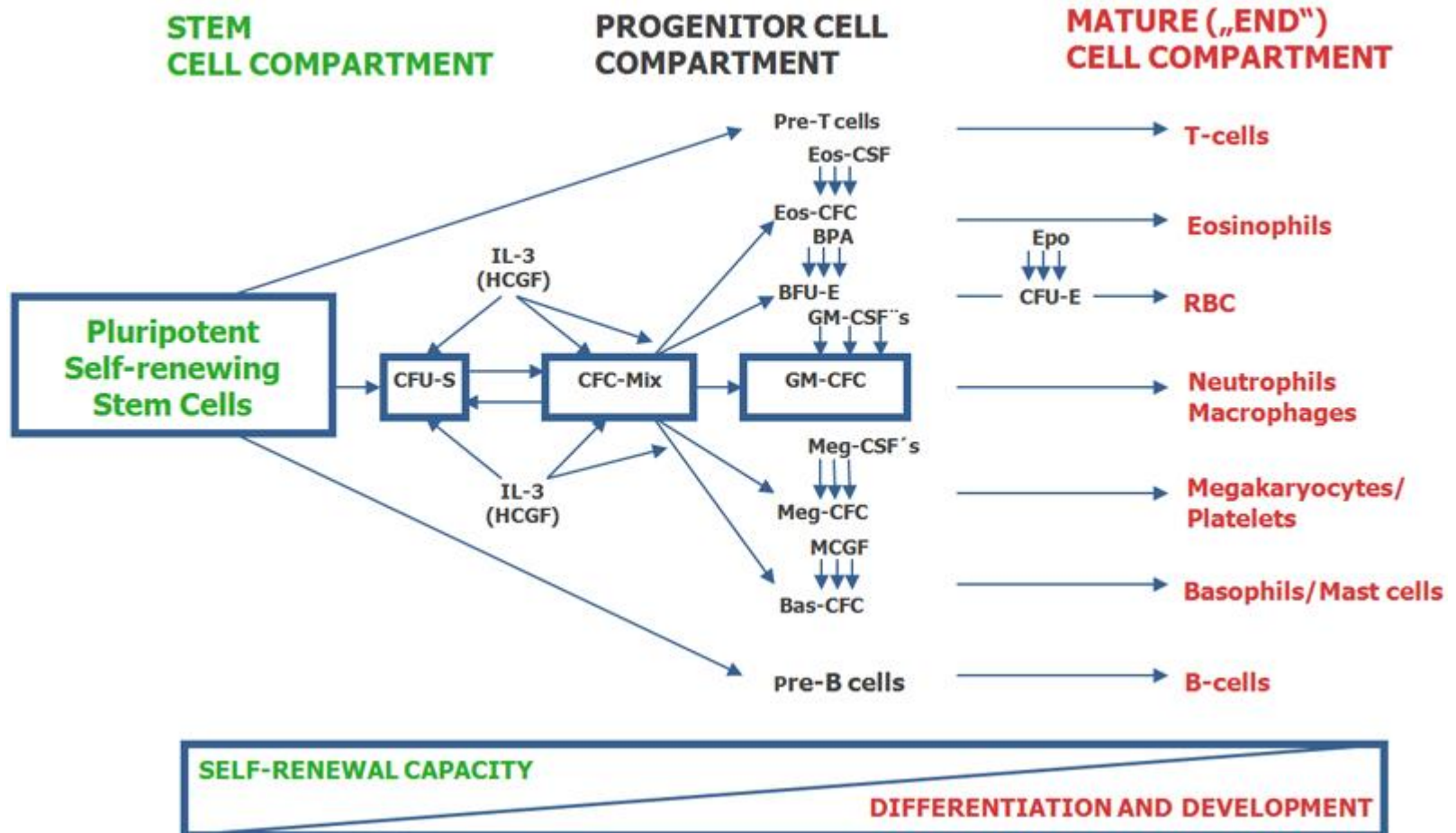
a



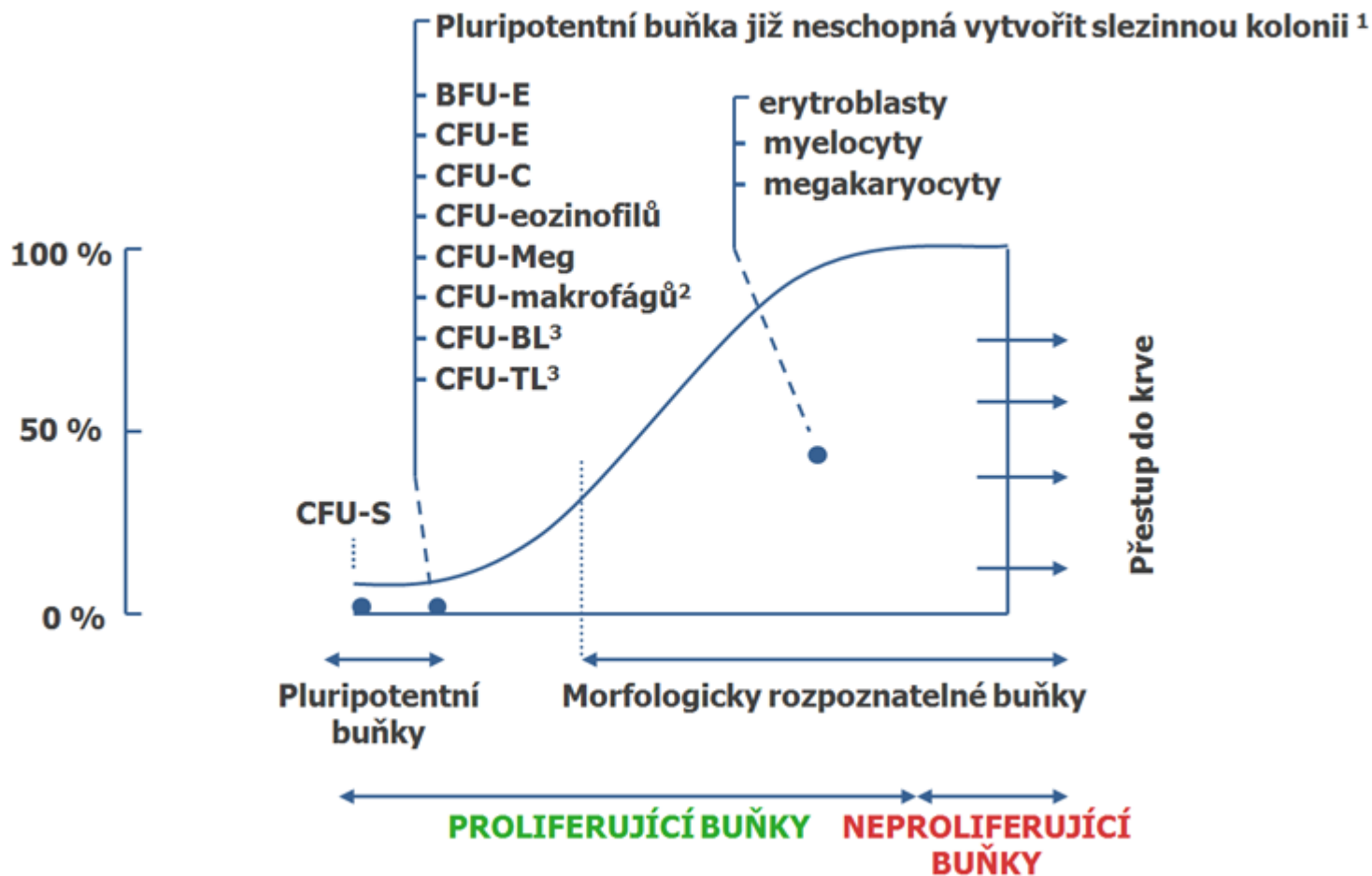
b

The structure of the hemopoietic system

T.M.Dexter and M.Moore



HEMATOPOETICKÉ BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ

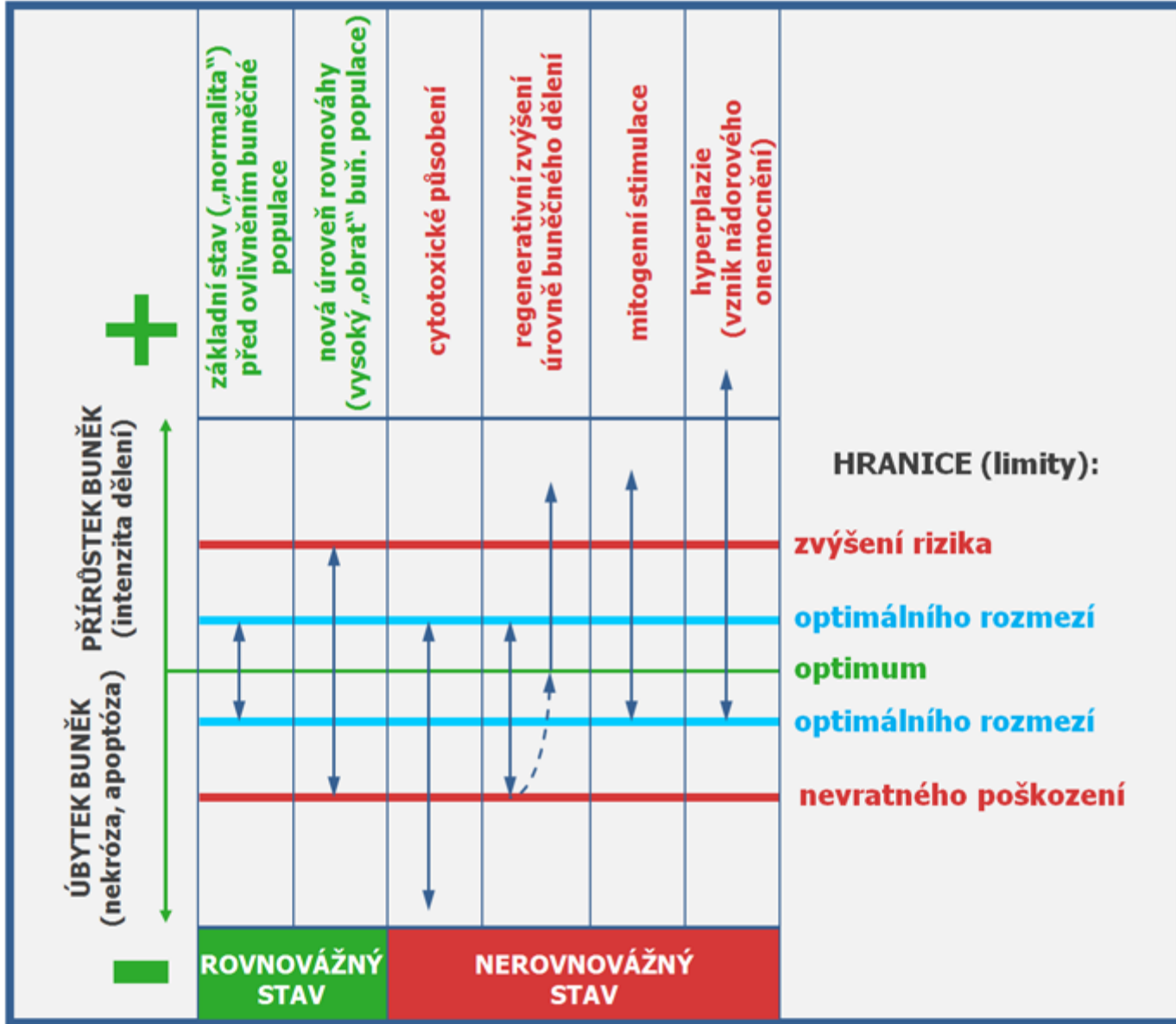


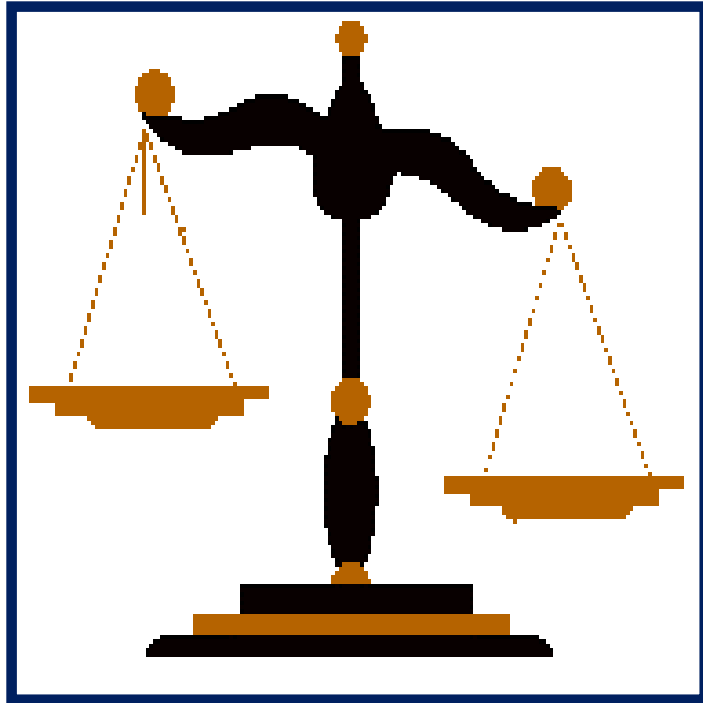
Obr. 8. Schéma kvantitativního zastoupení různých prekurzorů krevních buněk v krvetvorné tkáni.

¹ Podle *Gregorové a Henkelmana* (1977)

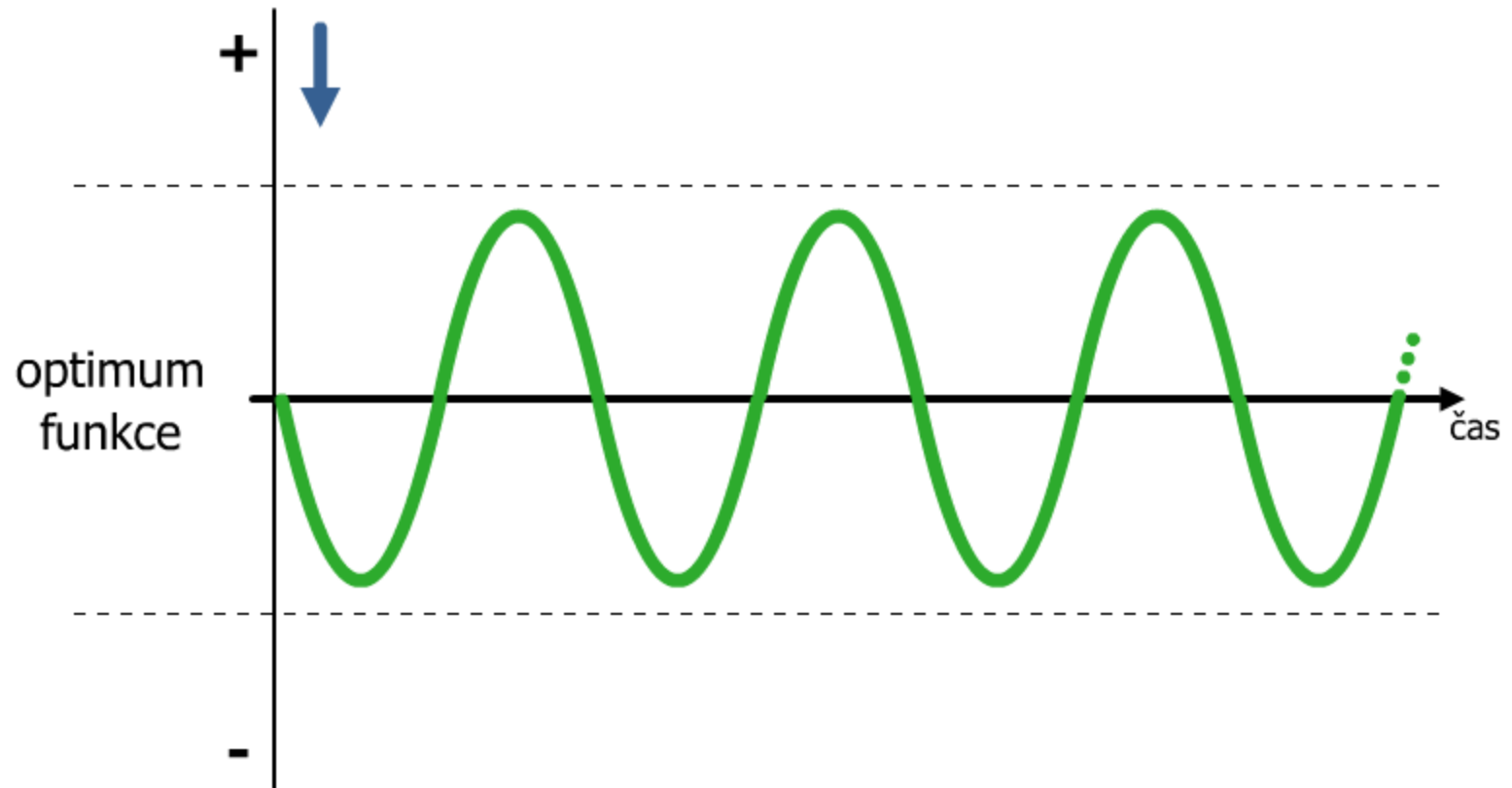
² Podle *MacVittieho a Porvaznika* (1978)

³ Nejsou odvozeny od CFU-S

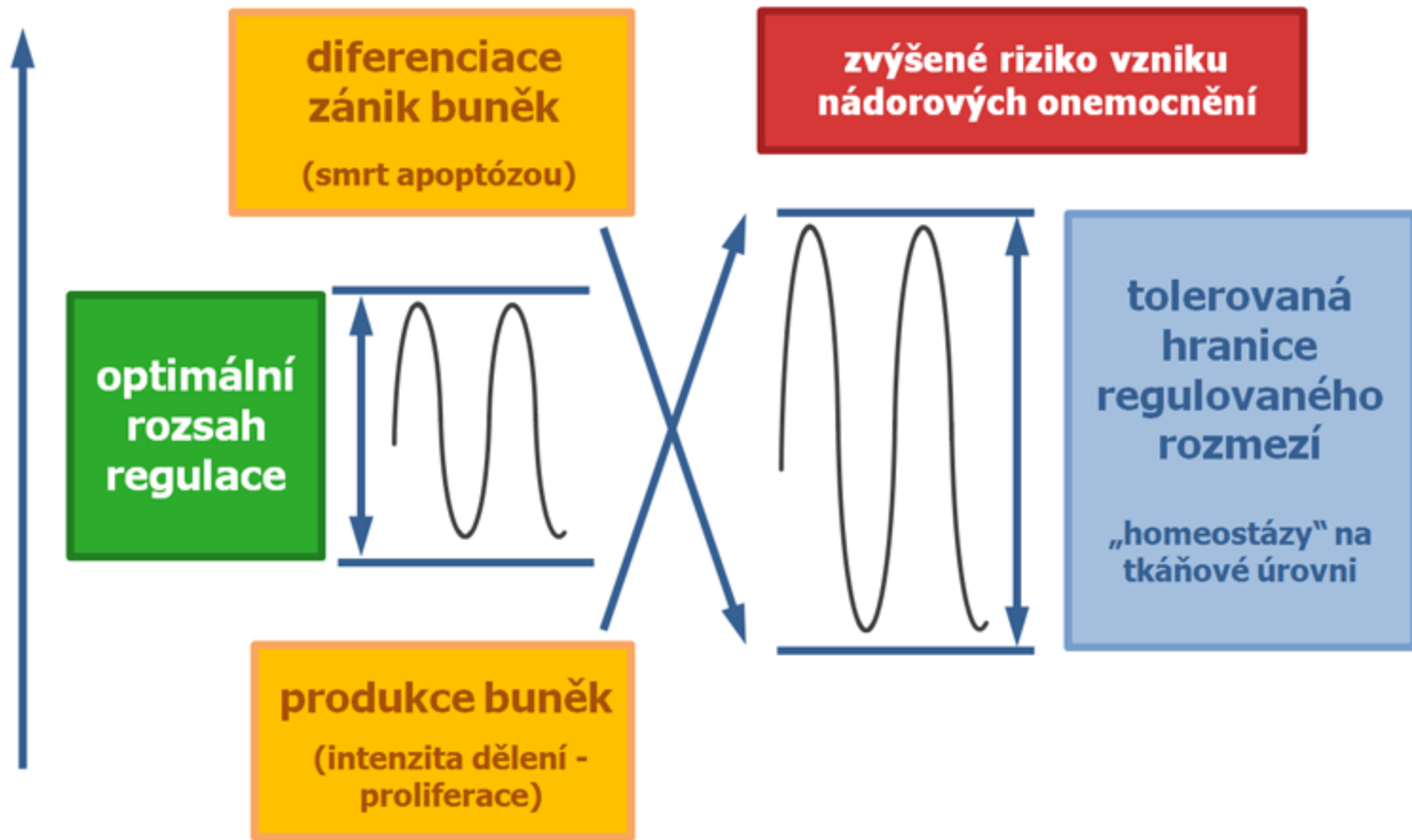


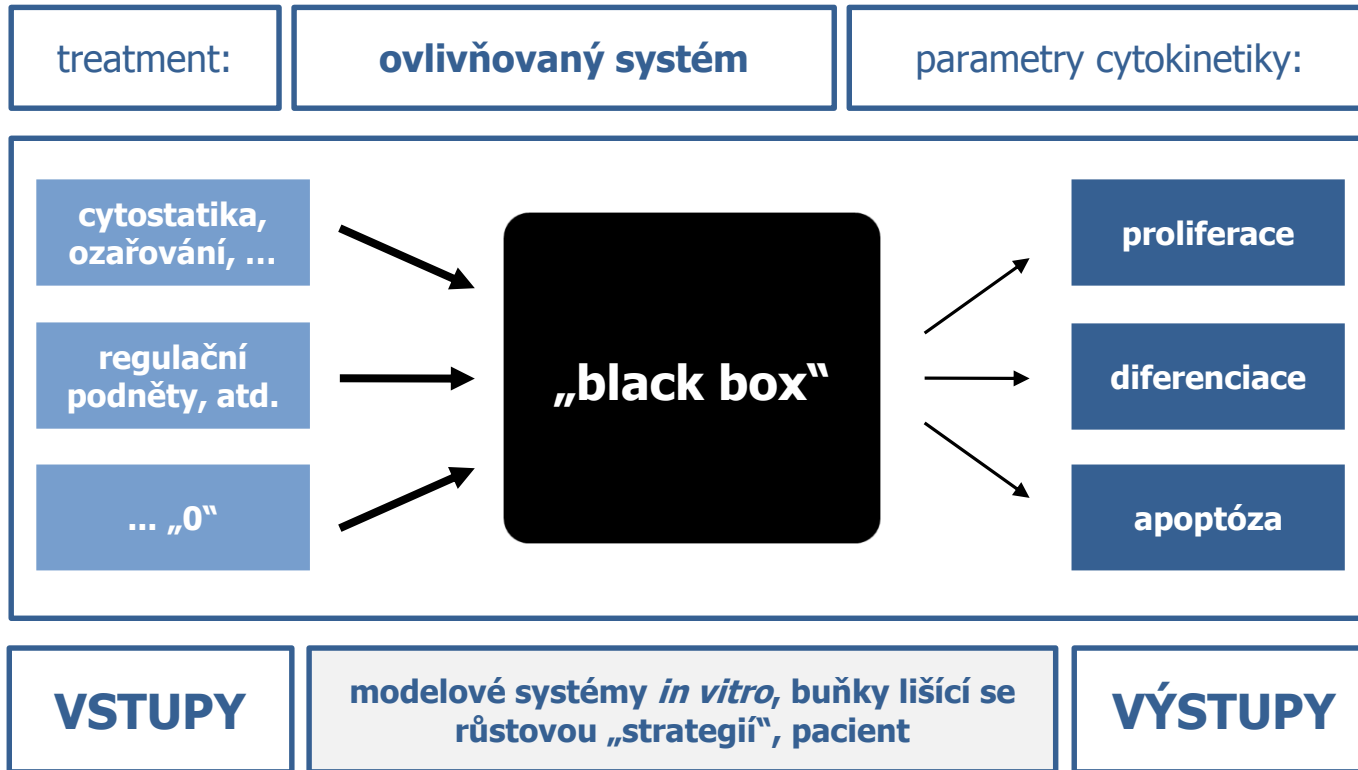


Dosažení dynamické rovnováhy

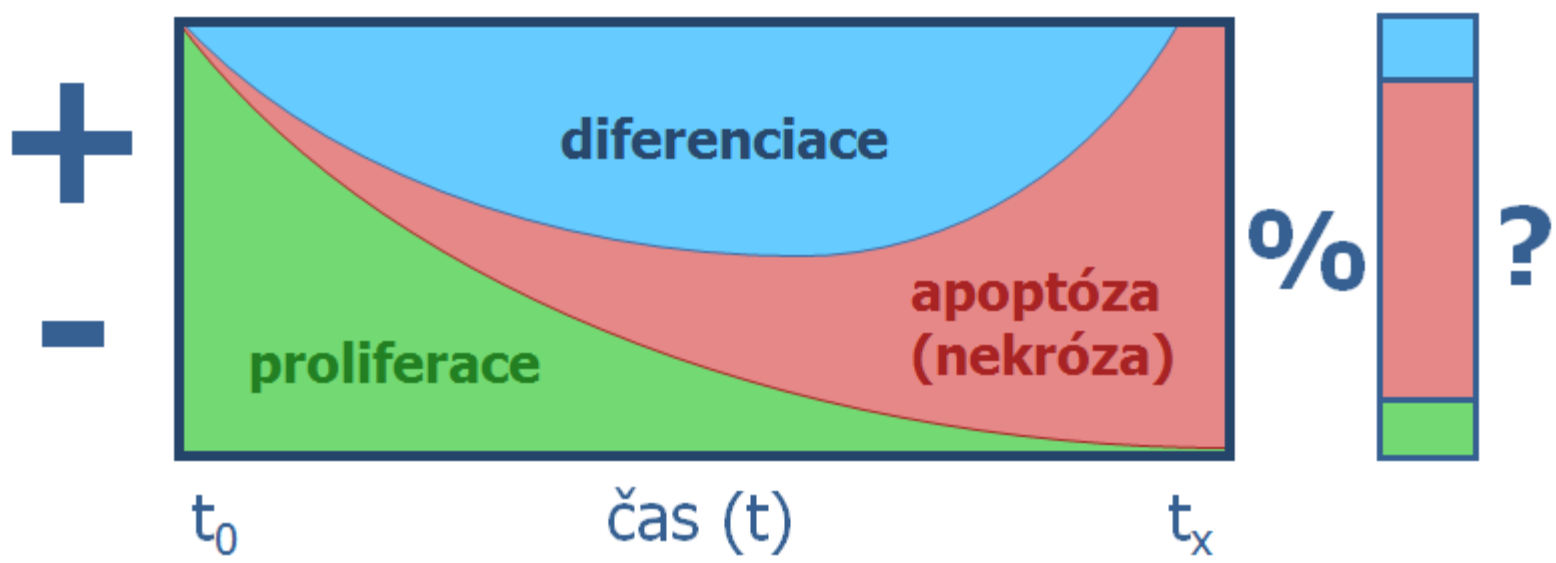


POČET BUNĚK V POPULACI



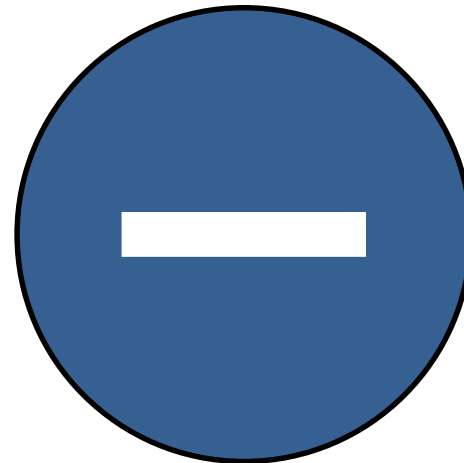
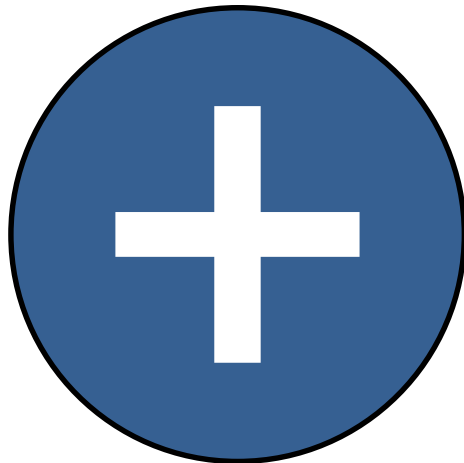


Parametry cytokinetiky



Rovnováha (homeostáza)

Výsledek působení mnohočetných zpětných vazeb



FAKTORY SPECIFICKÉ

-



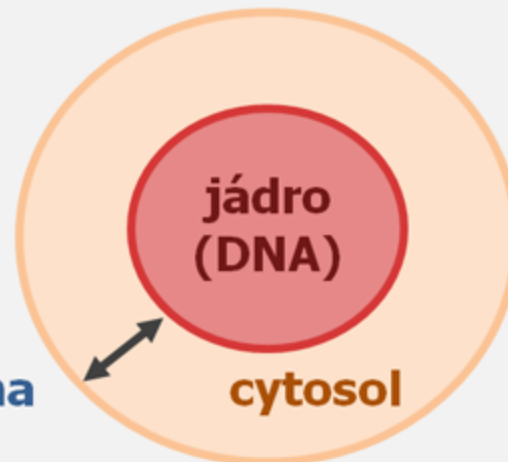
růst



+

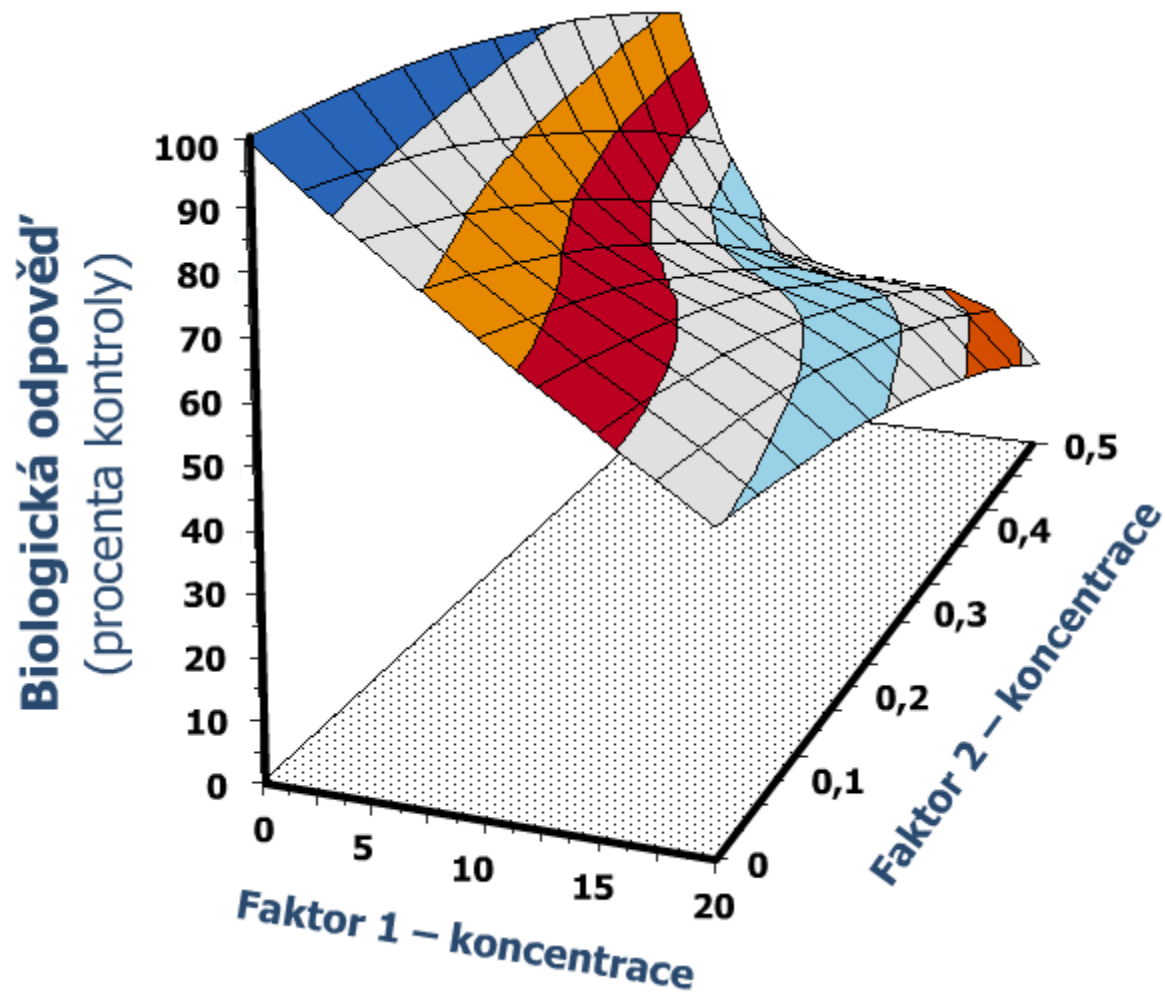
FAKTORY NESPECIFICKÉ

membrána



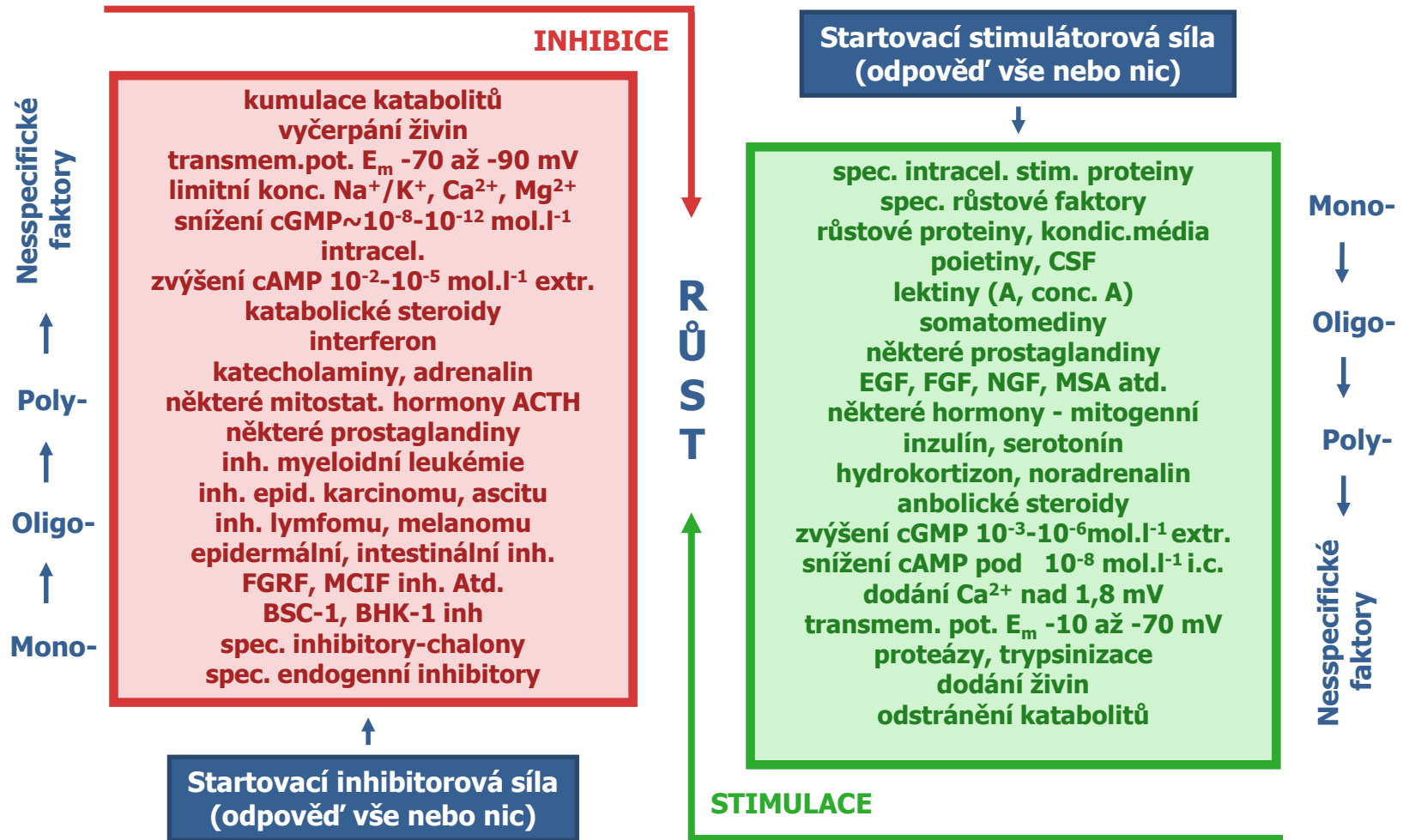
jádro
(DNA)

cytosol



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

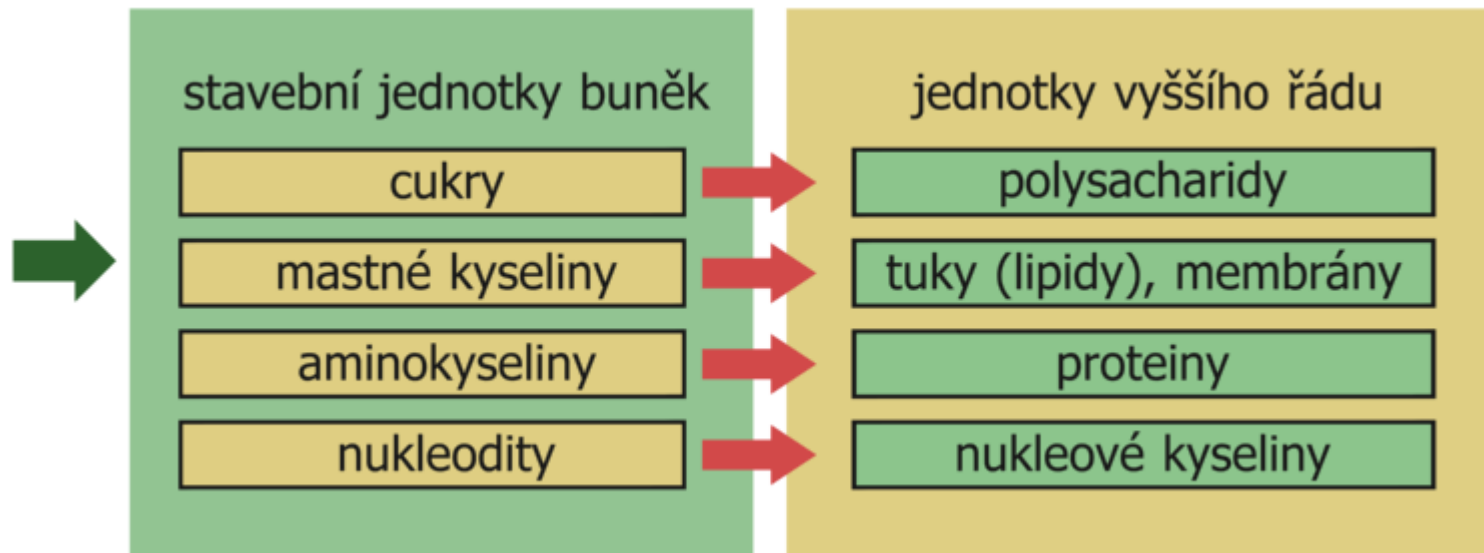
REGULACE „NORMÁLNÍHO“ RŮSTU

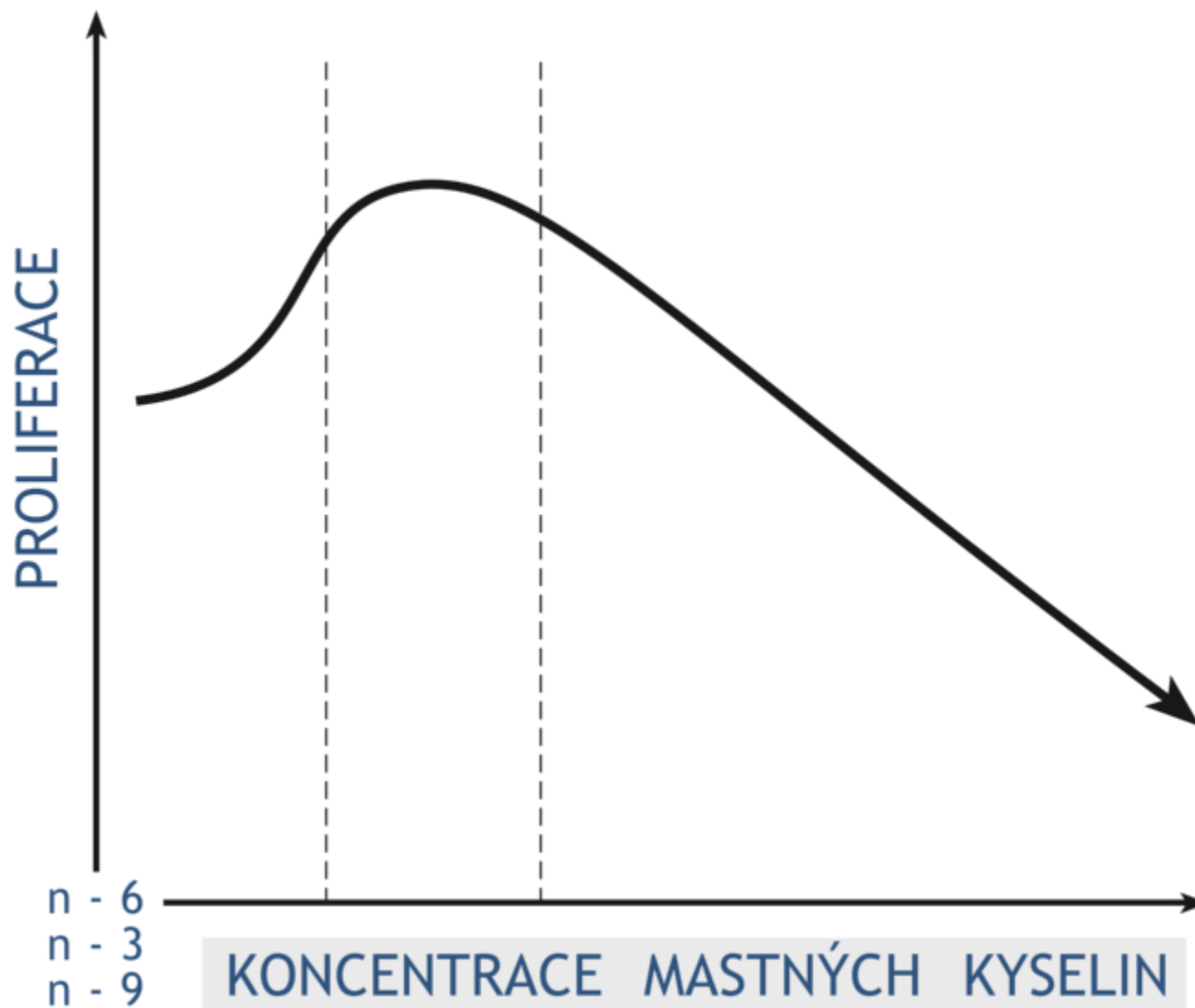


1A Schematické znázornění stimulace a inhibice růstu specifickými a nespecifickými faktory. Převaha pozitivního nebo negativního signálu rozhoduje o výsledné stimulaci nebo inhibici závisí na metabolické a růstové aktivitě buněk, typu buněk a dalších podmínkách - viz text. Specifické růstové účinky vnějšího prostředí buněk zahajují specifické růstové faktory (specifické stimulatory) a specifické endogenní inhibitory (chalony). CSF-kolonie stimulující 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.

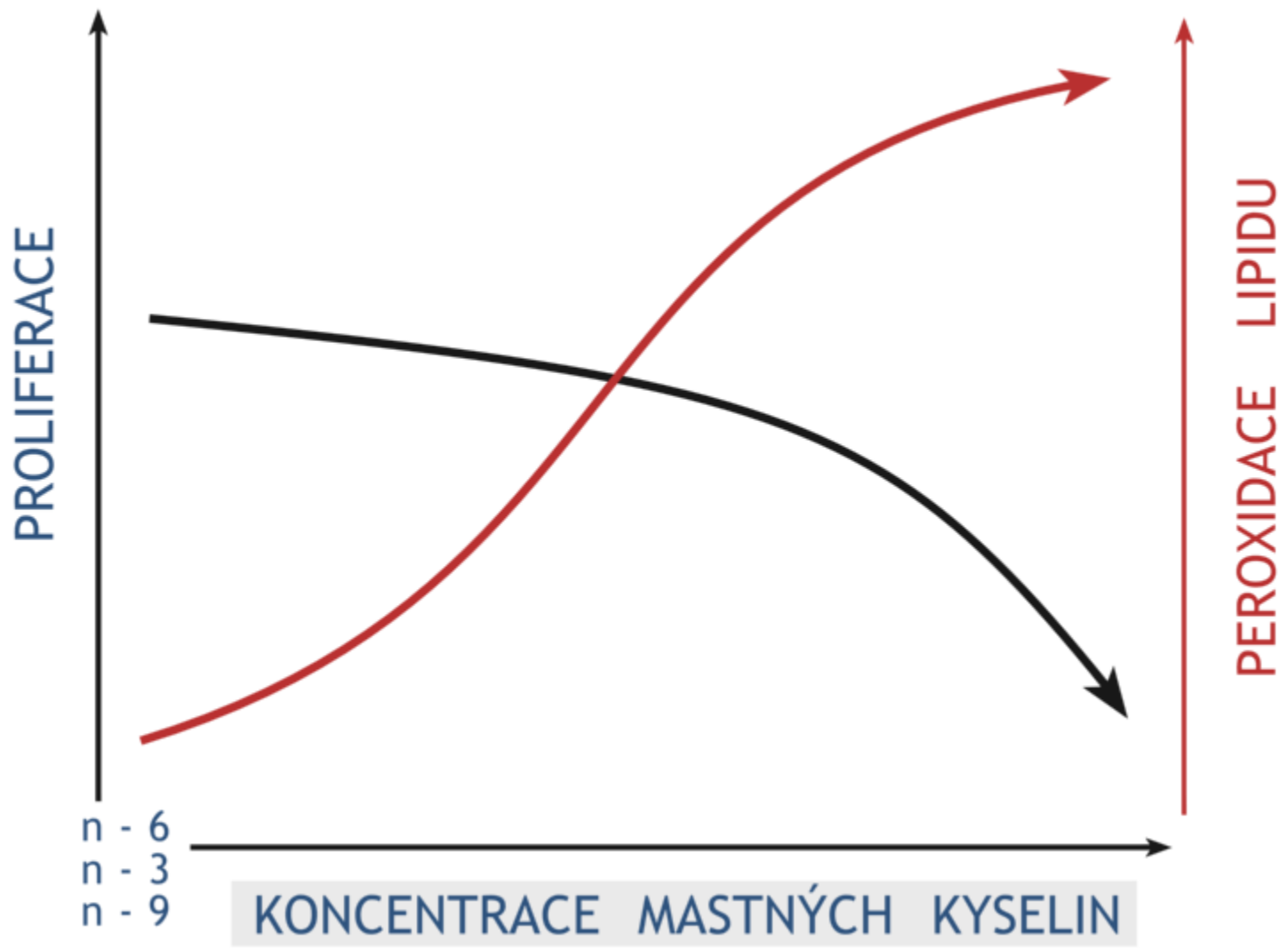
Regulace a inhibice růstu normálních a nádorových buněk, Fremuth F., SPN, Praha, 1986

Čtyři nejdůležitější skupiny malých organických molekul v buňkách

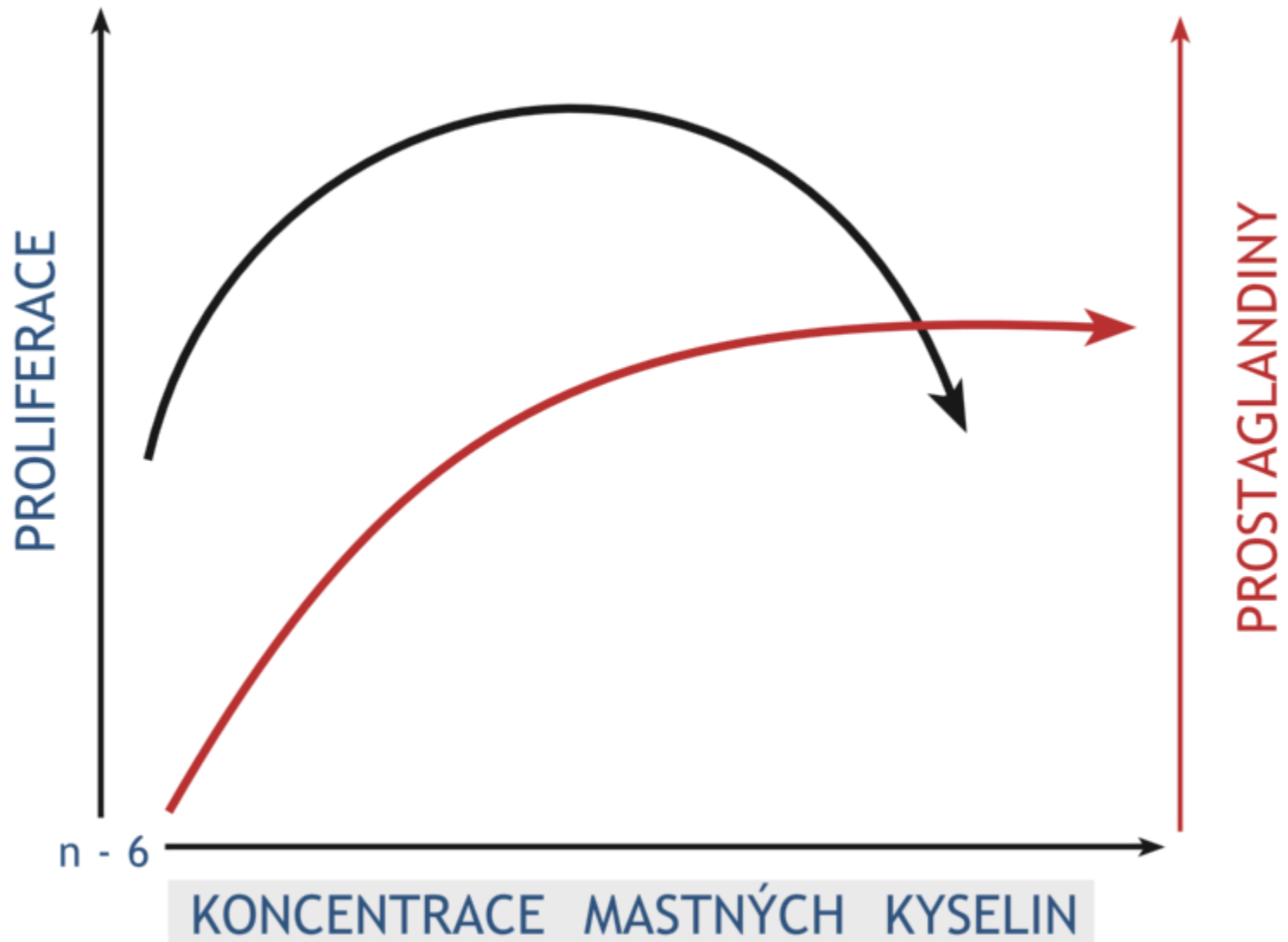




D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984



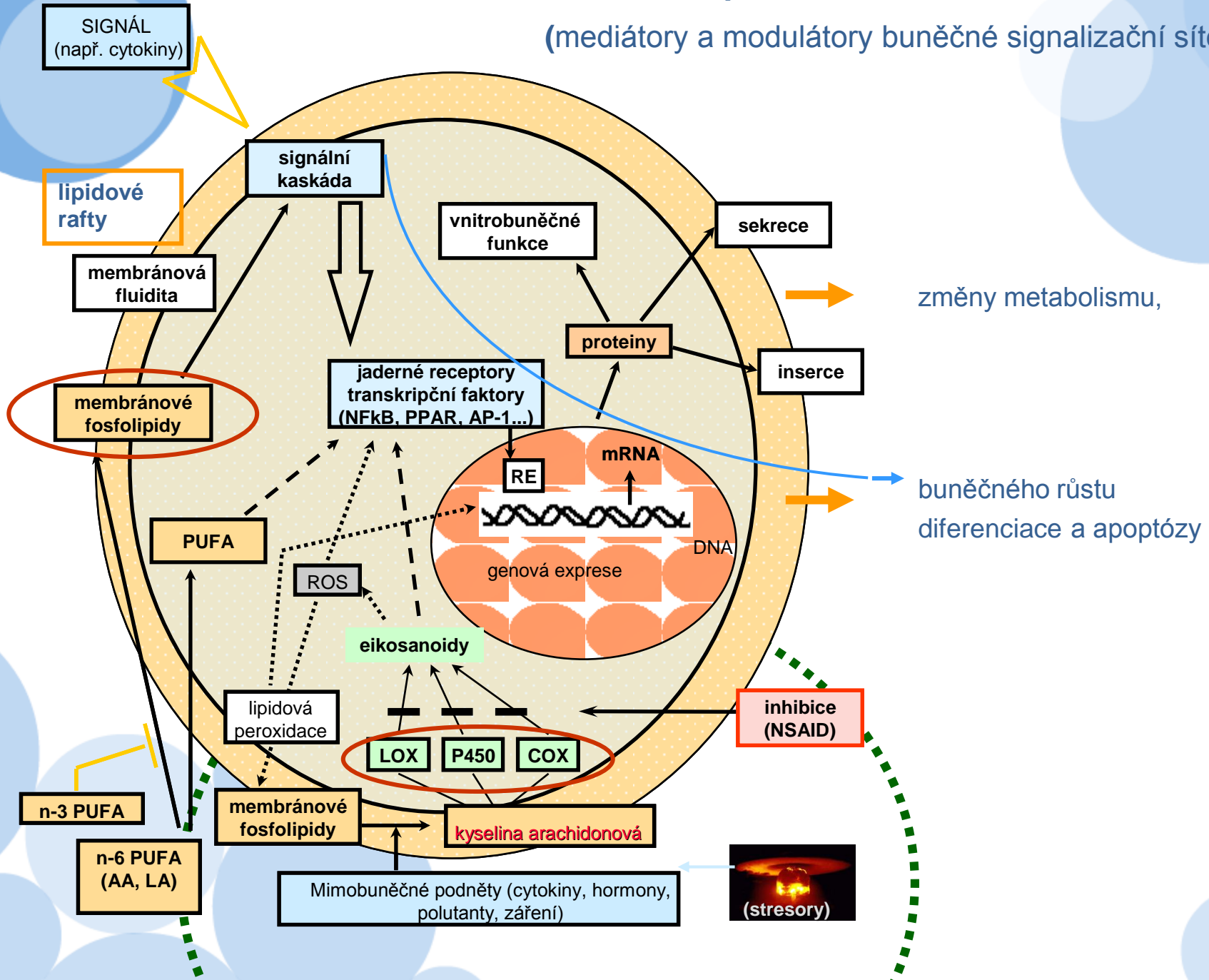
D.G.Cornwell and N.Morisaki, Free Radicals in Biology. Vol.6, 1984



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

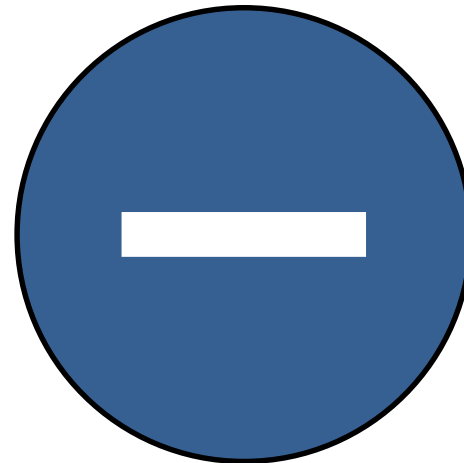
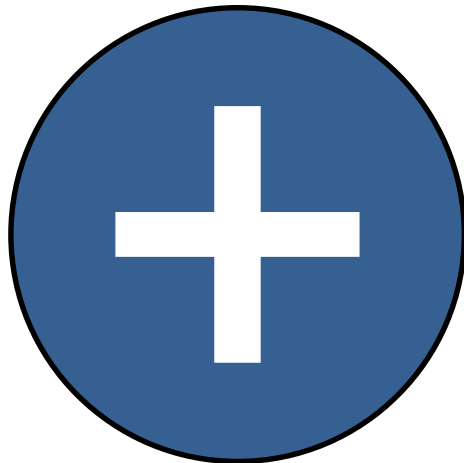
MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 a ω -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)

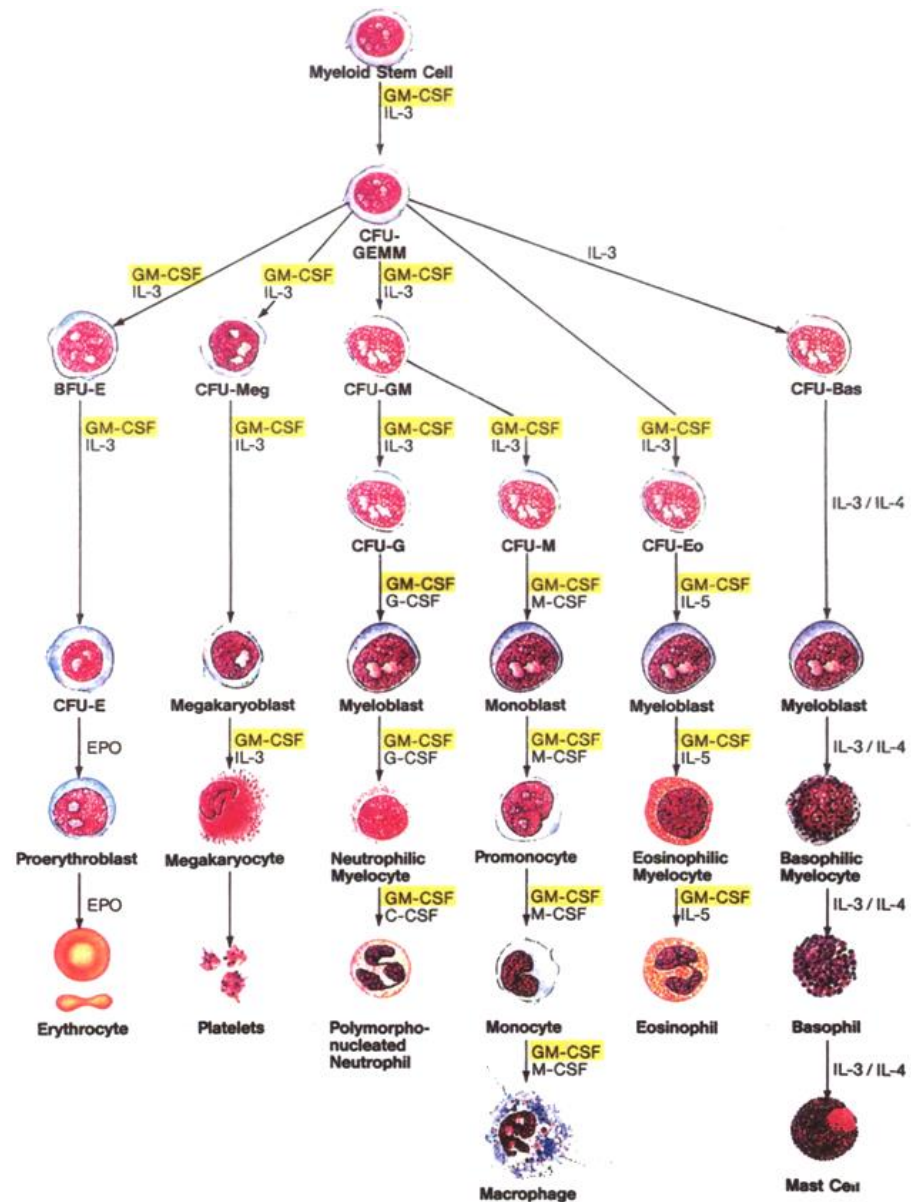


Rovnováha (homeostáza)

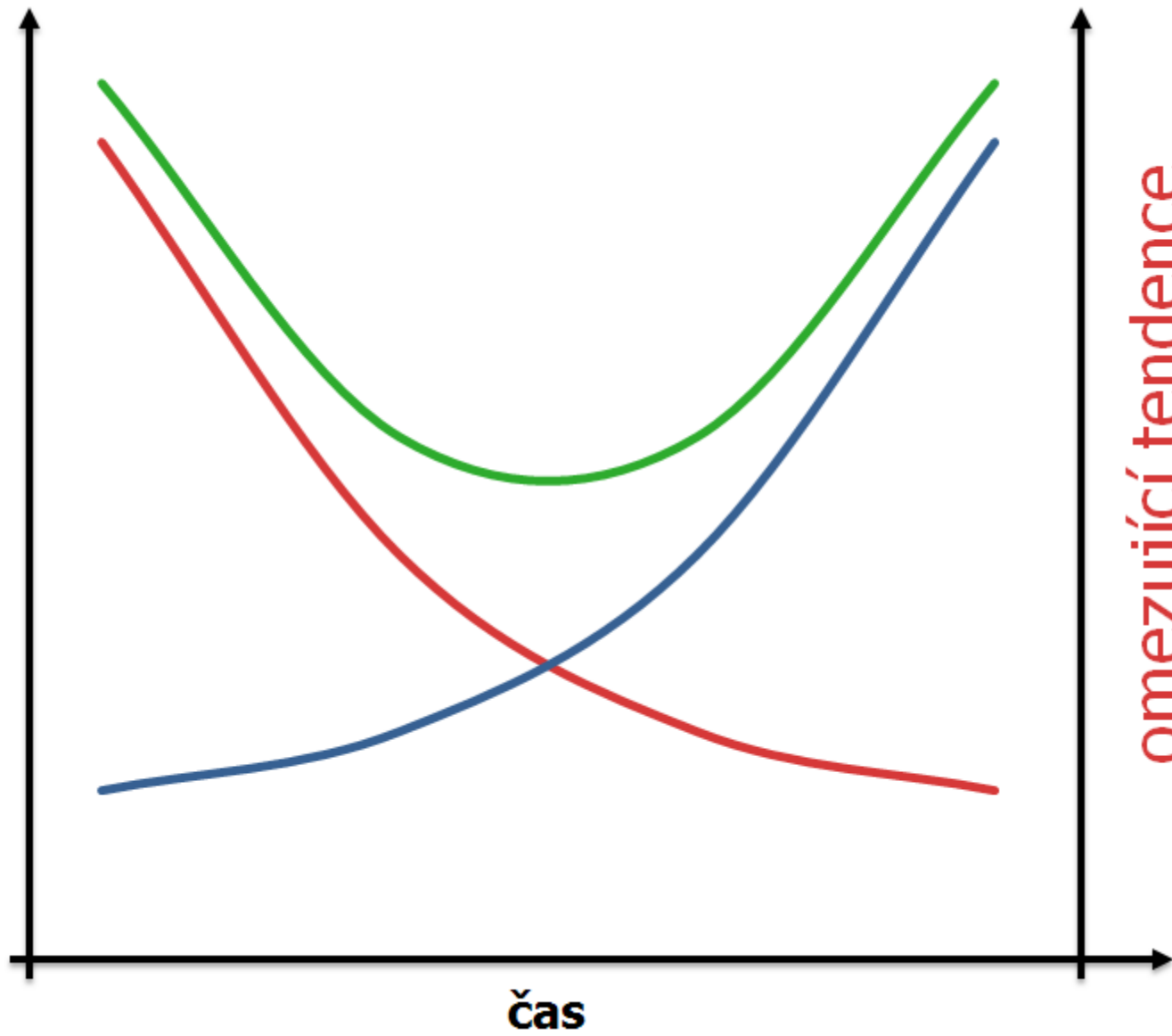
Výsledek působení mnohočetných zpětných vazeb



The early acting growth factor which maximises host defense

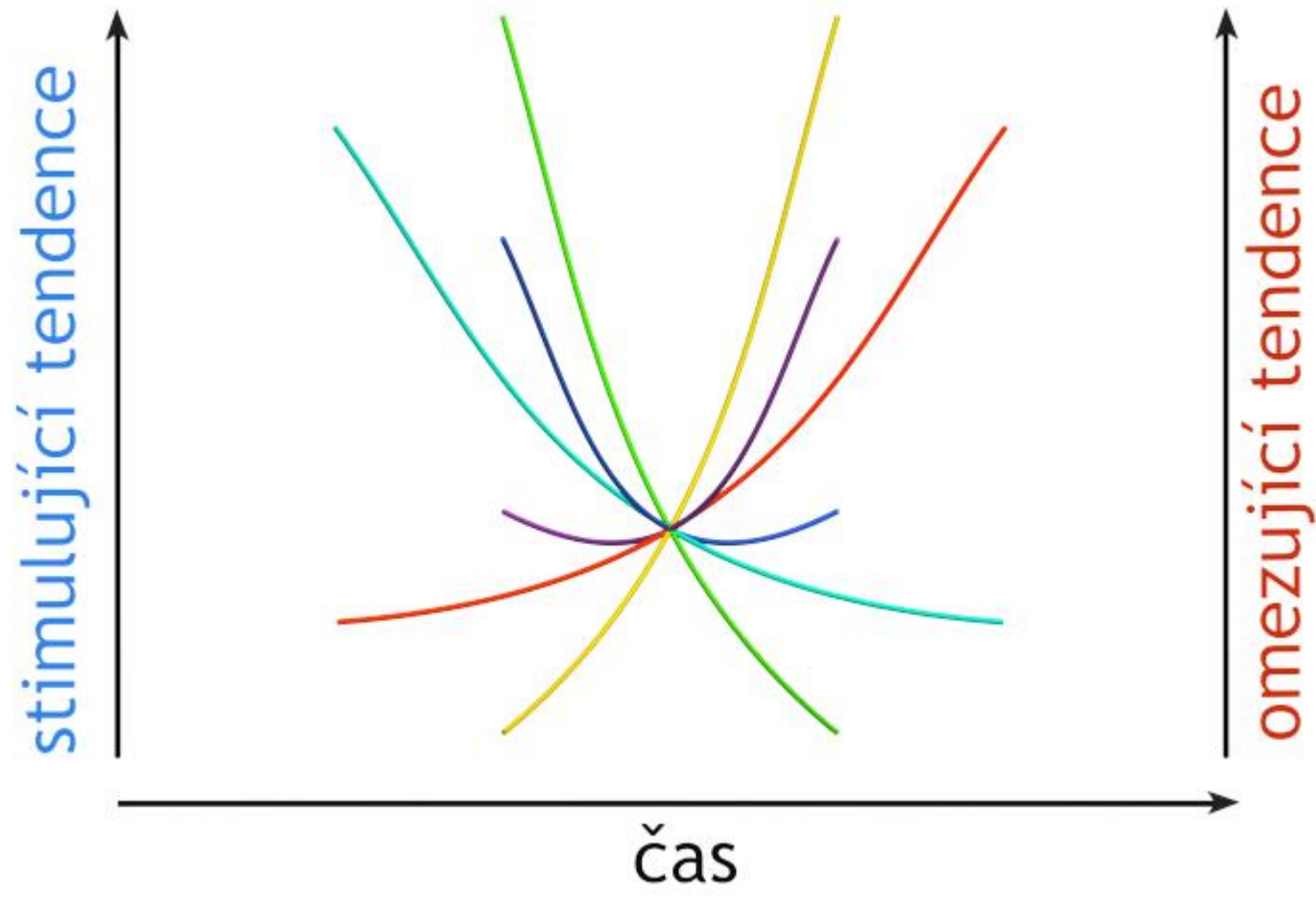


stimulující tendence

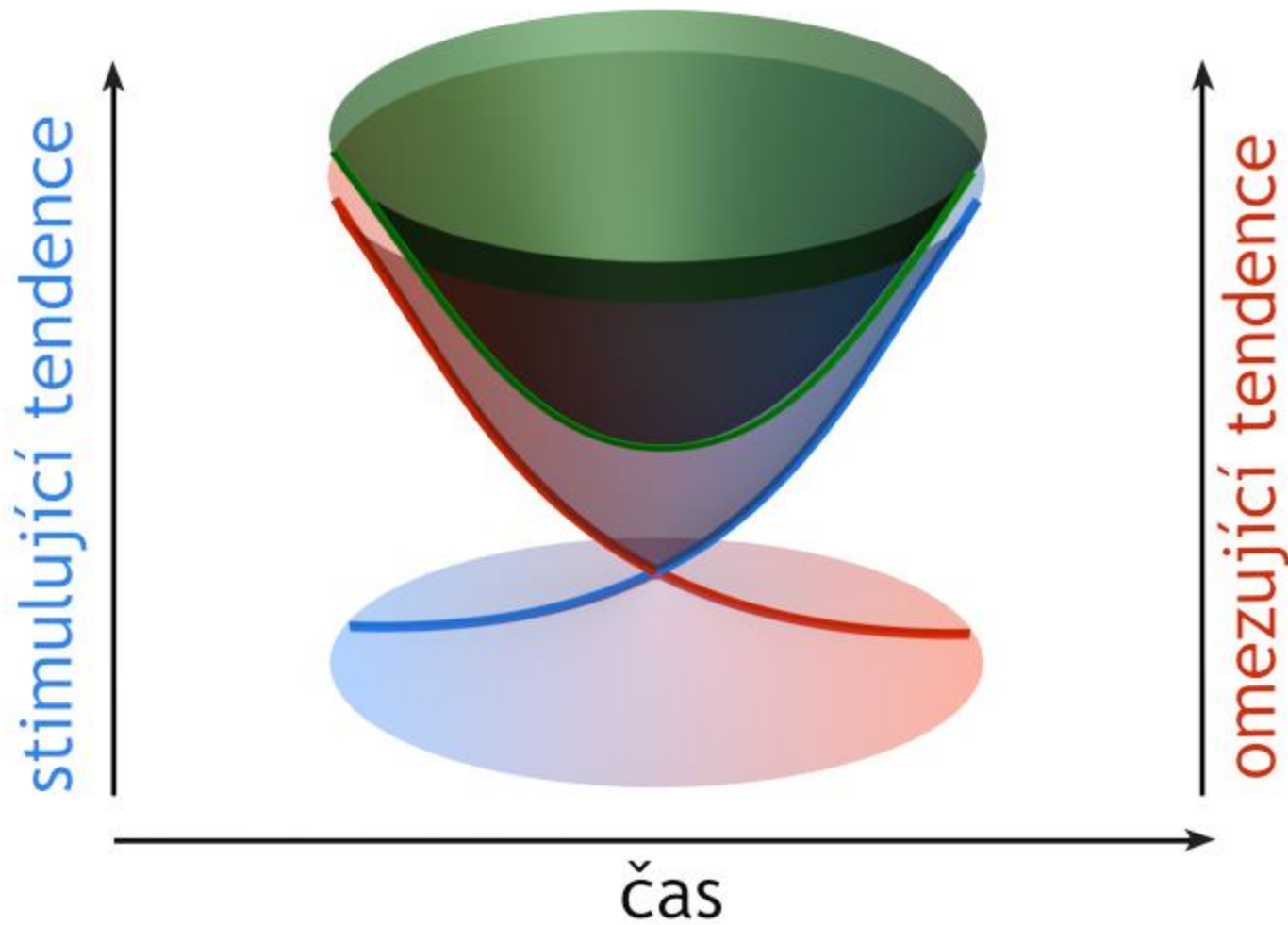


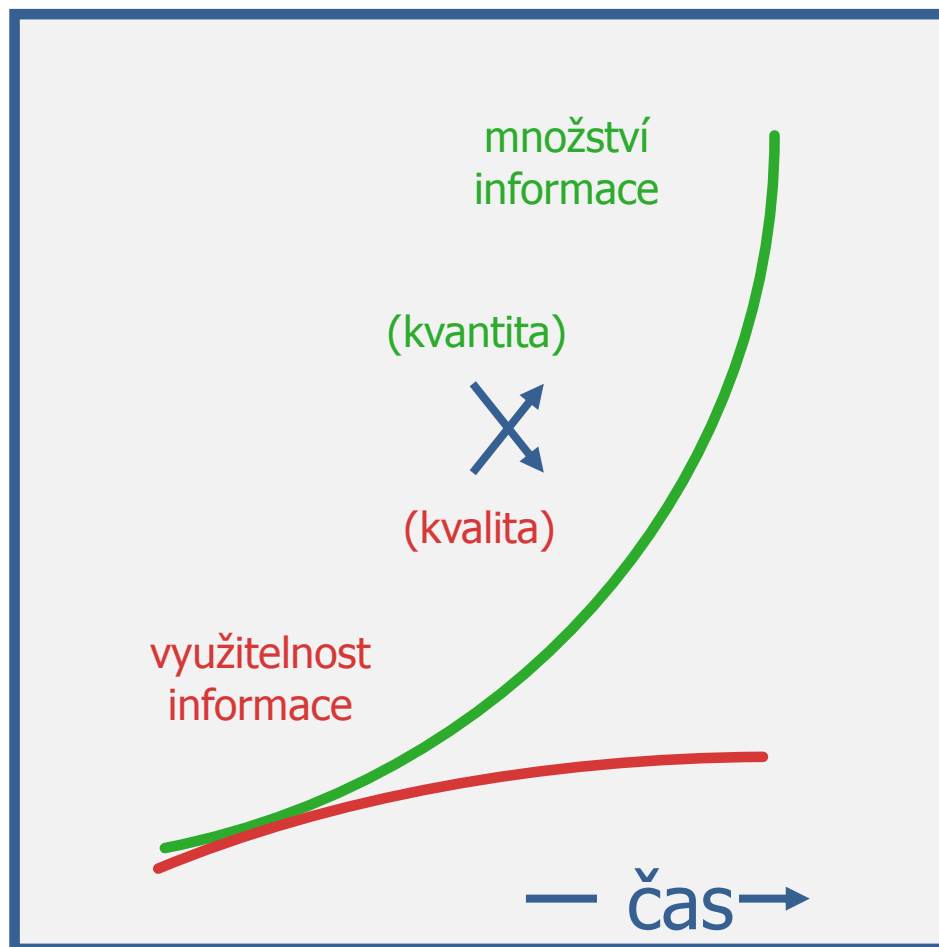
omezující tendence

čas



Nutnost vyváženosti





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

G. Ch. Lichtenberg



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