



Fyziologie buněčných systémů

A. Kozubík J. Hofmanová

The slide features a white background with decorative blue circles of various sizes in the corners. A large blue 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.

Úvodní informace

(východiska a modely)

ÚEB (oddělení/ specializace)

1) Fyziologie a imunologie živočichů



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

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



Pracoviště PŘF MU

Kasárna, Terezy Novákové 64, Brno - Řečkovice



**Oddělení
Fyziologie
a imunologie živočichů**



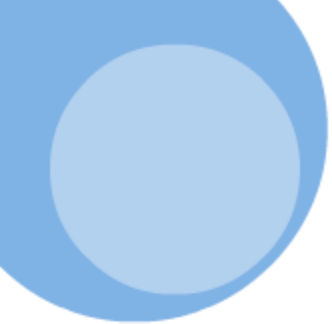
Nový Univerzitní kampus





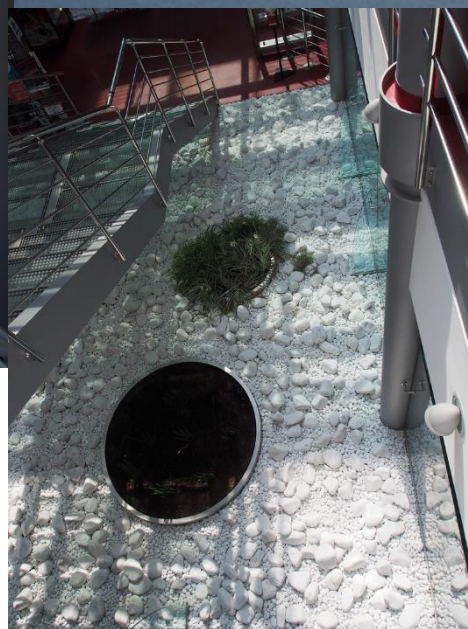
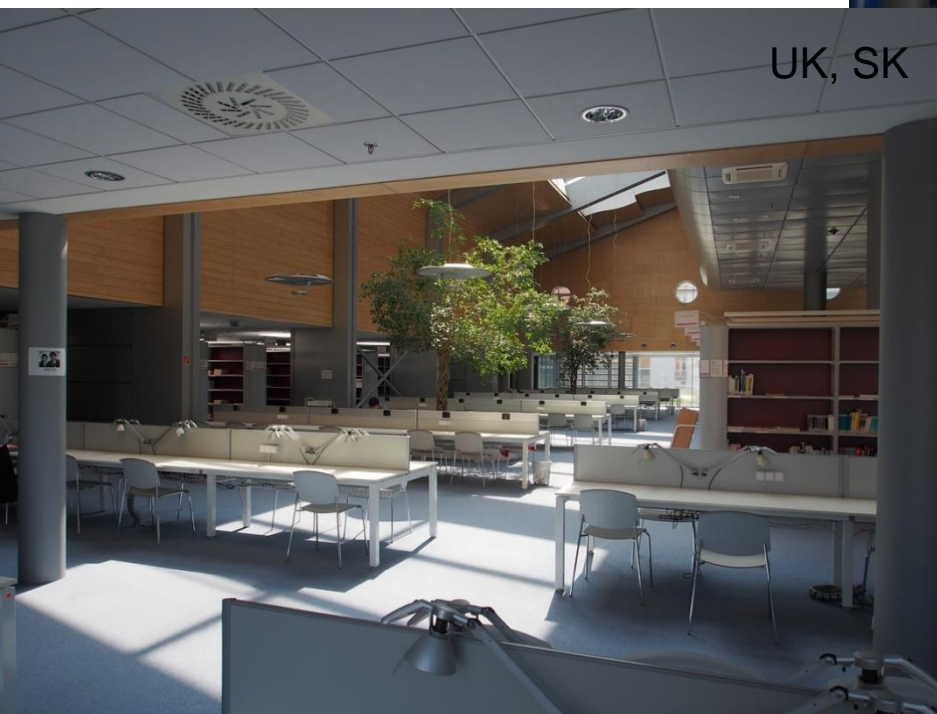
Biomedicínský komplex - FN



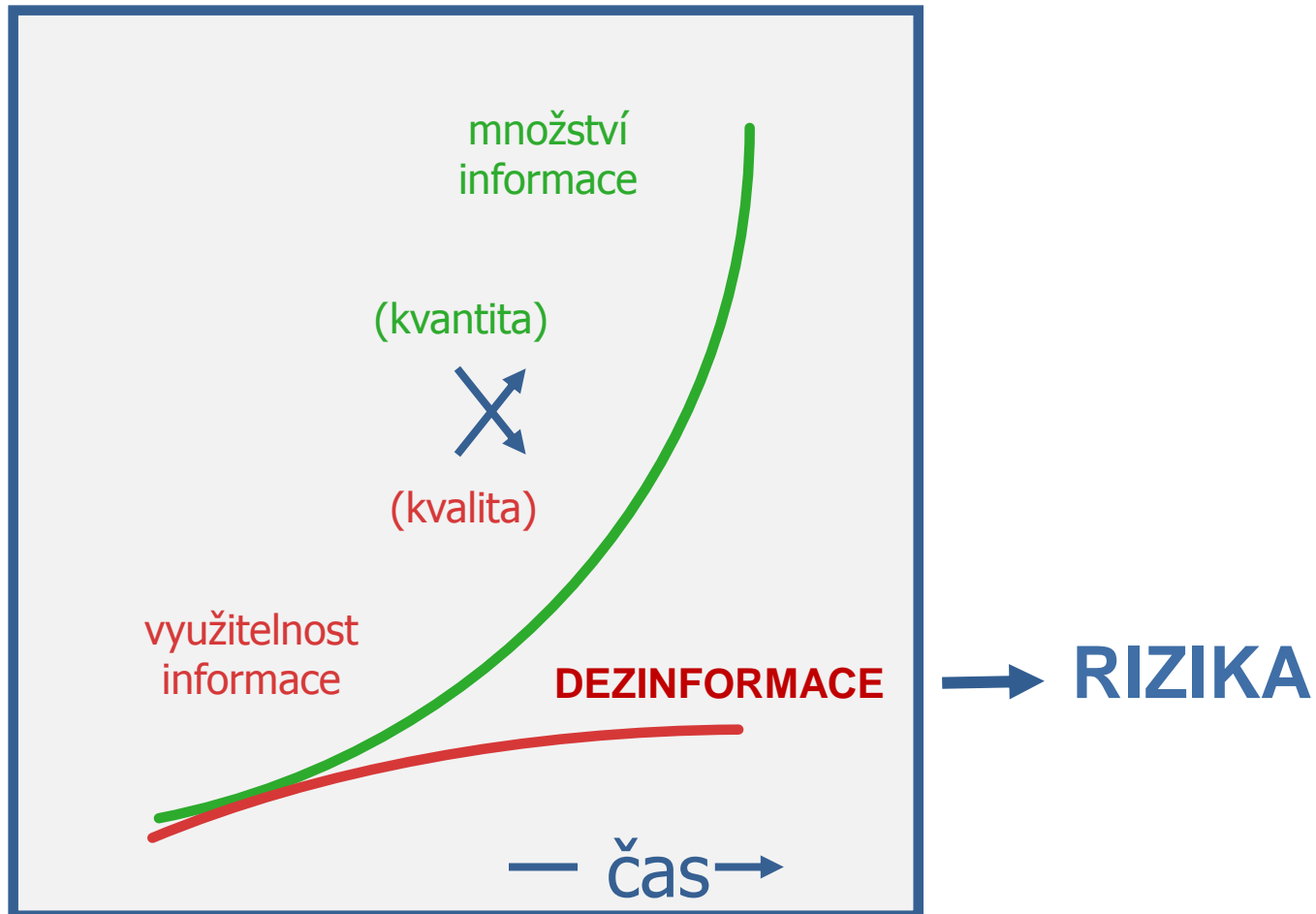


UK, SK

Nová univerzitní knihovna



Nestabilní systémy (svět prohlubujících se nerovnováh)



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

G. Ch. Lichtenberg

The slide features a white background with decorative blue circles of various sizes in the corners. The top-left corner has a single circle. The top-right corner has a cluster of overlapping circles. The bottom-left corner has a larger cluster of overlapping circles. The bottom-right corner has a single small circle.

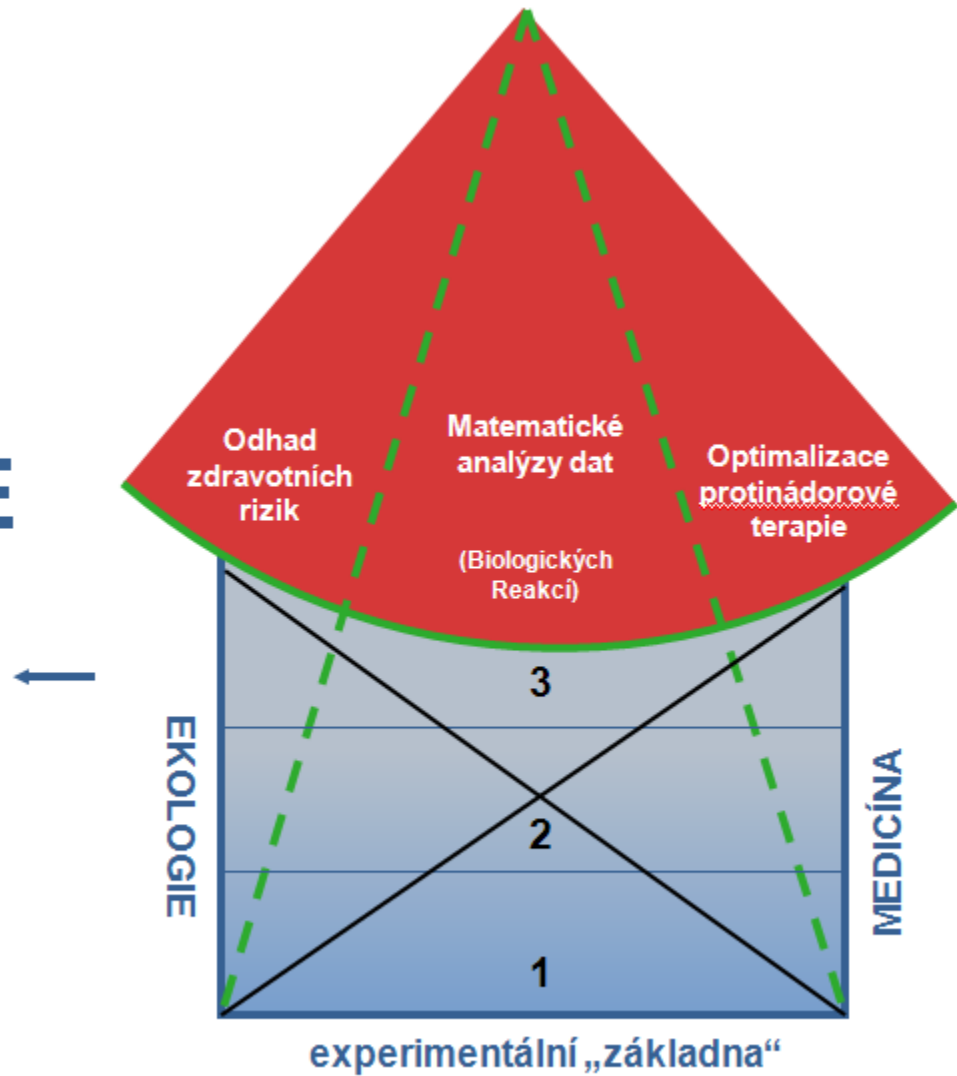
Složení a zaměření oddělení

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

Doc. 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 VÝZKUMU

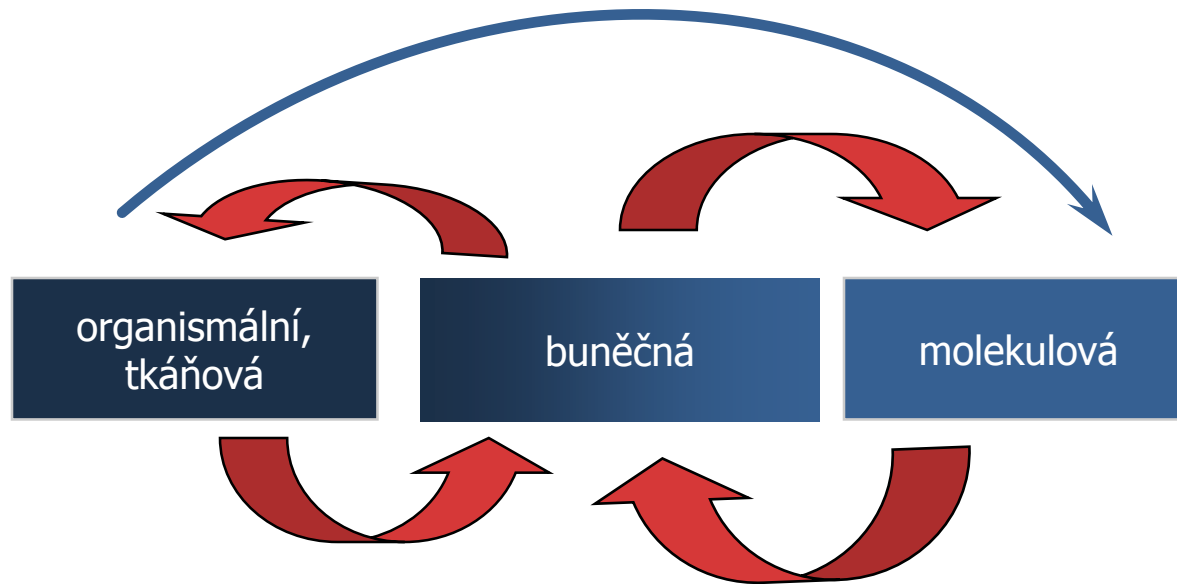
Poznání mechanismů působení látek lipidové povahy, zejména VNMK a jejich derivátů

v mezi/vnitrobuněčných komunikacích podílejících se *v regulaci cytokinetiky* (proliferace, diferenciaci a apoptózy v čase) v kontextu jejich interakcí s

- fyziologickými regulátory růstu,
- environmentálními polutanty
- vybranými farmaky

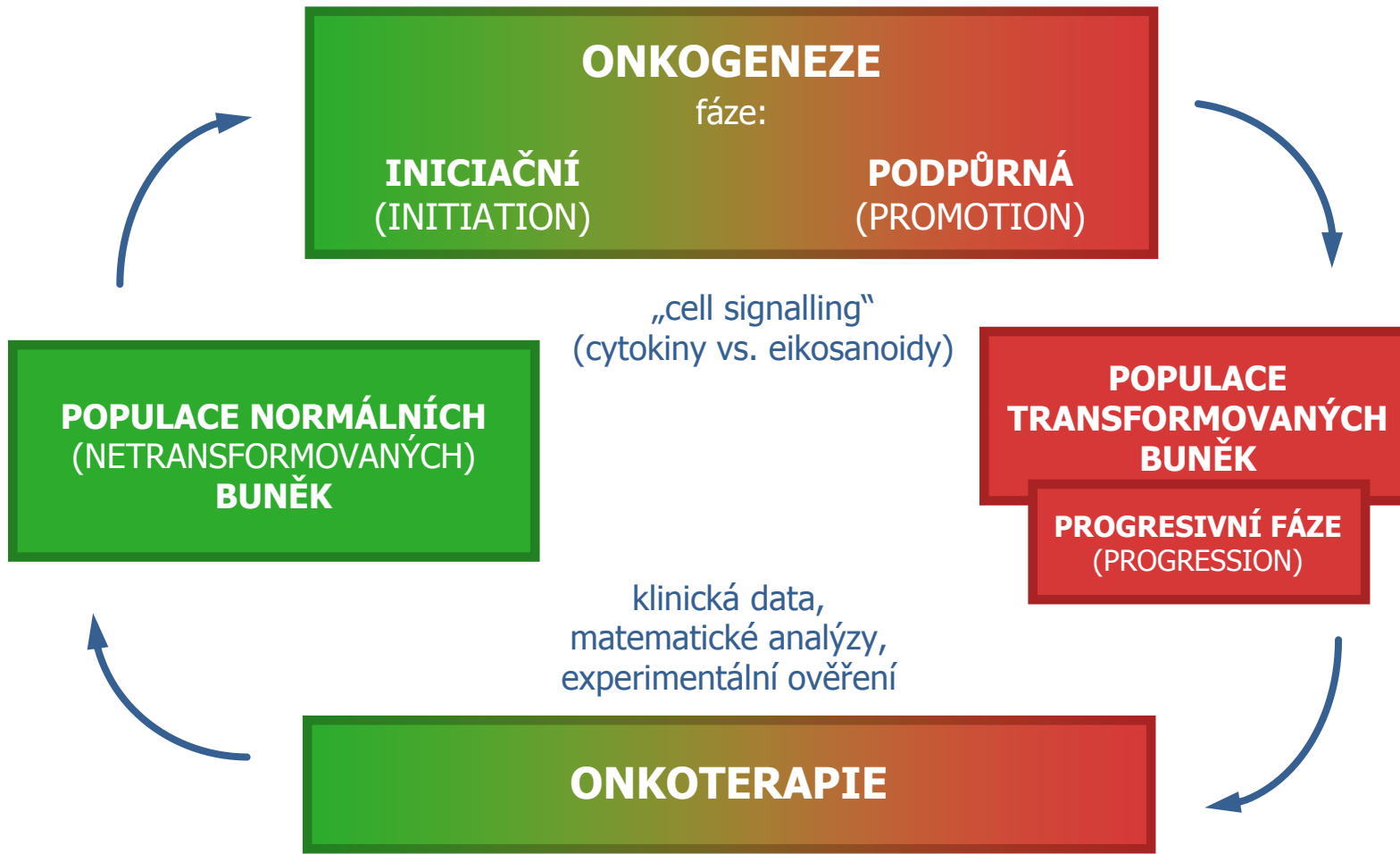
Některé praktické cíle: Kromě obecného poznání využít tyto znalosti pro přípravu lipidových nutričních preparátů, případně cytostatik.

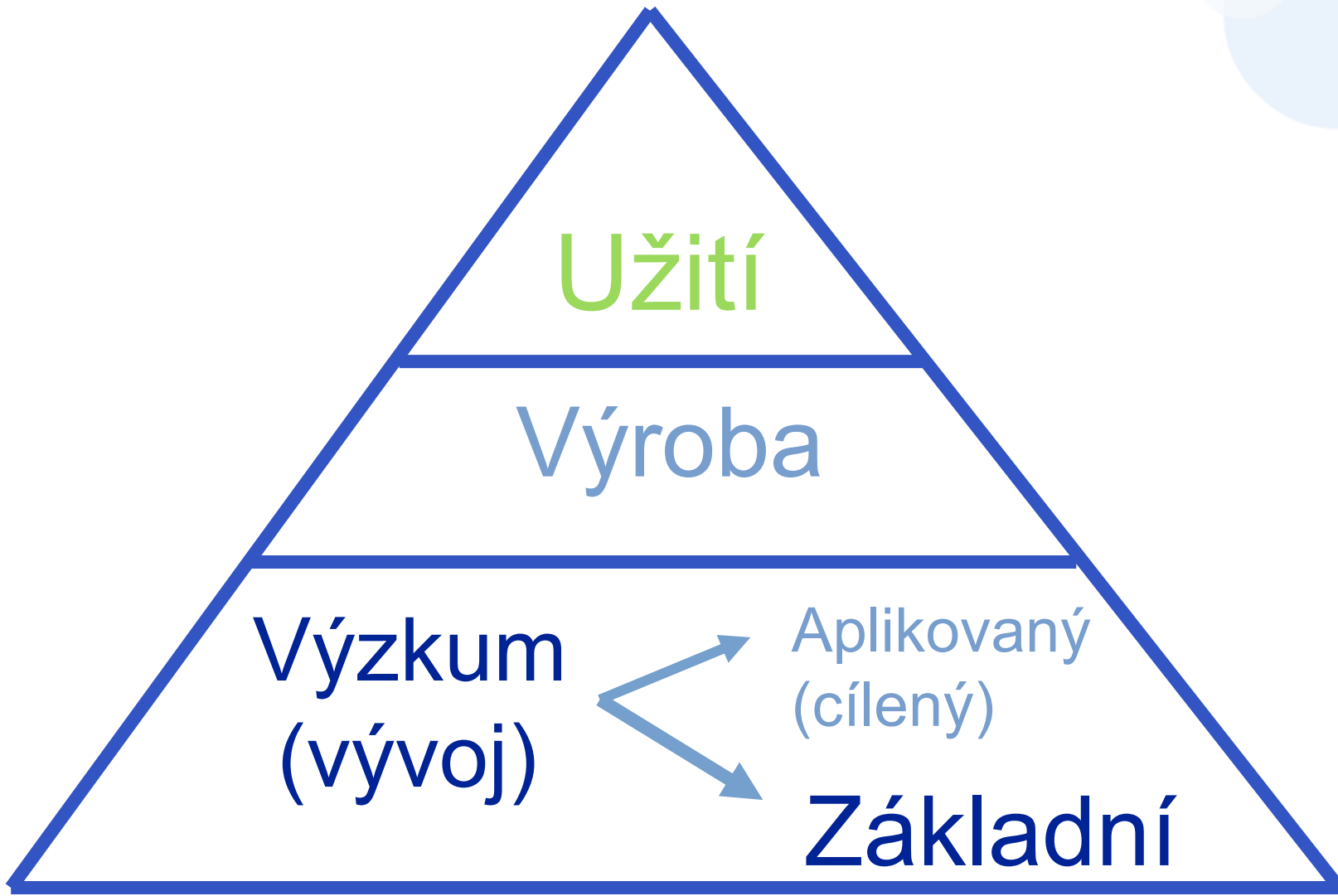
Organismus jako komplexní hierarchický systém



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

Výzkumné cíle a oblasti praktického využití





Užití

Výroba

Výzkum
(vývoj)

Aplikovaný
(cílený)

Základní

Kvalitní data – základ experimentálních věd

Přehled metod a metodologií

(ucelený systém)

Hlavní METODY používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

FM - (fluorescenční) **konfokální 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 – real time PCR

RG - radiografie

ELFO – agarózová elektroforéza

FACS - **F**luorescence-**A**ctivated **C**ell **S**orting

(průtoková cytometrie včetně „cell sortingu“)

KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP LEICA



Metodologie
využívají nejmodernější zařízení



FACS ARIA SORP II



Metodologie
využívají nejmodernější zařízení



Výhody

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

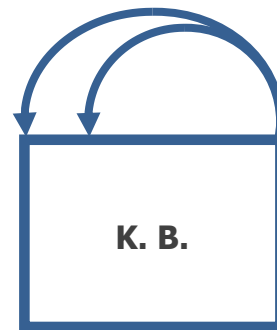
TYPY PROLIFERUJÍCÍ

expandující, neopouštějí
populaci, množí se



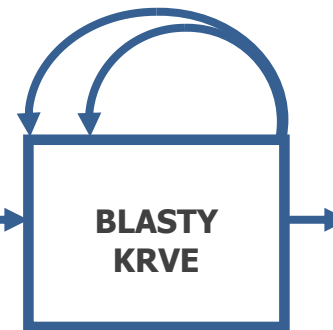
populace coby zdroj
buněk pro jiné populace

c. konstantní

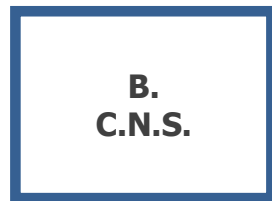


Tranzitní populace, ve
které se buňky pomnoží

c. konstantní



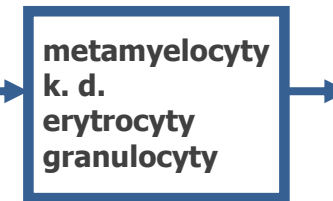
TYPY NEPROLIFERUJÍCÍ



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 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

BIOLOGICKÉ MODELY:

Buňky tzv. **intenzívně proliferujících populací**
(zejména *buňky křetvorné*),

anebo

buňky nádorové

(*leukemické, střevních epitelů, prostaty, etc.*)



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

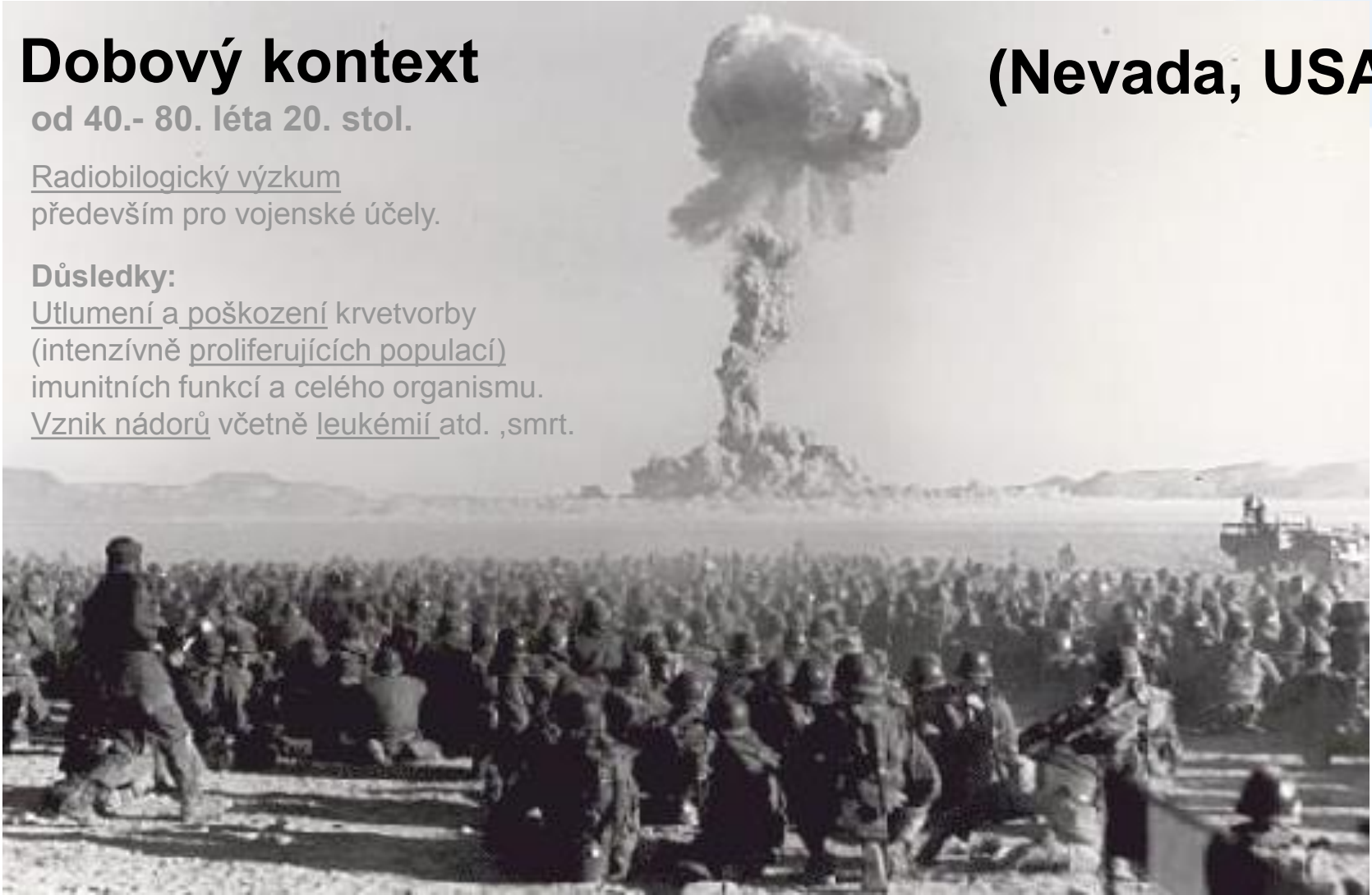
od 40.- 80. léta 20. stol.

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.

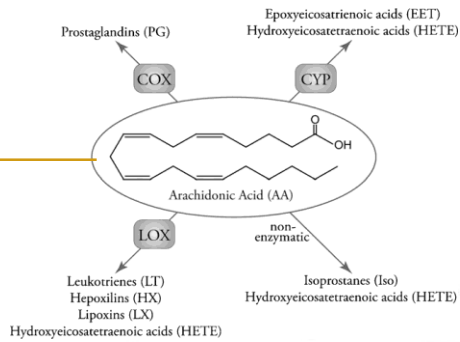
Důsledky:

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

Využití ozáření jako modelu pro studium regenerace krvetvorných funkcí

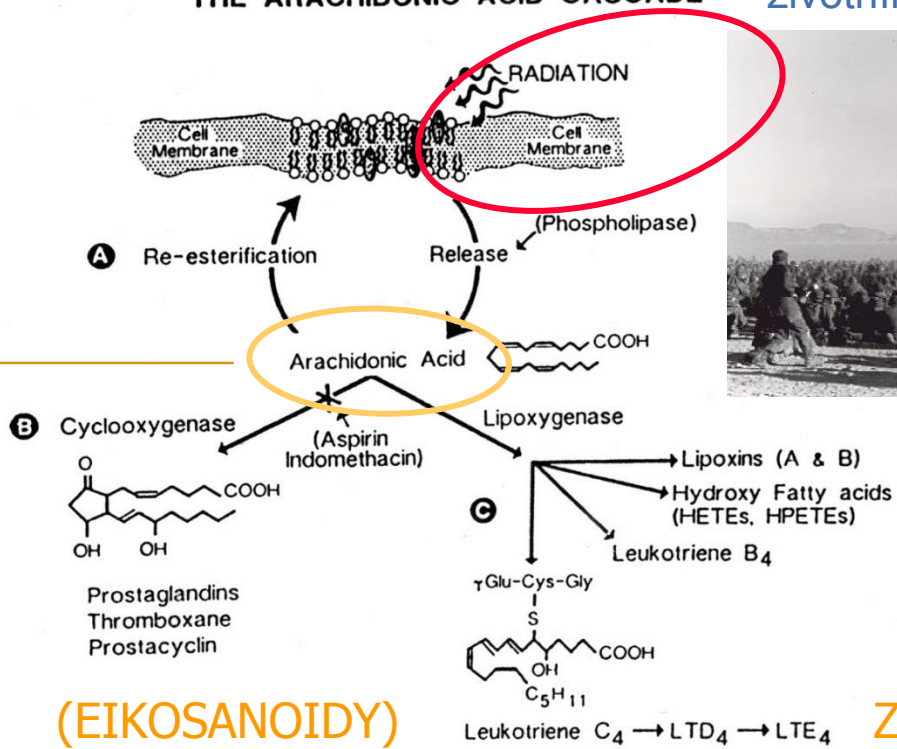
***Princip,
volba dávky,
volba druhu laboratorního zvířete (myš)
Metoda CFU-S***

KOMPLEXNÍ ODPOVĚĎ



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

BIOLOGICAL MEDIATORS THE ARACHIDONIC ACID CASCADE



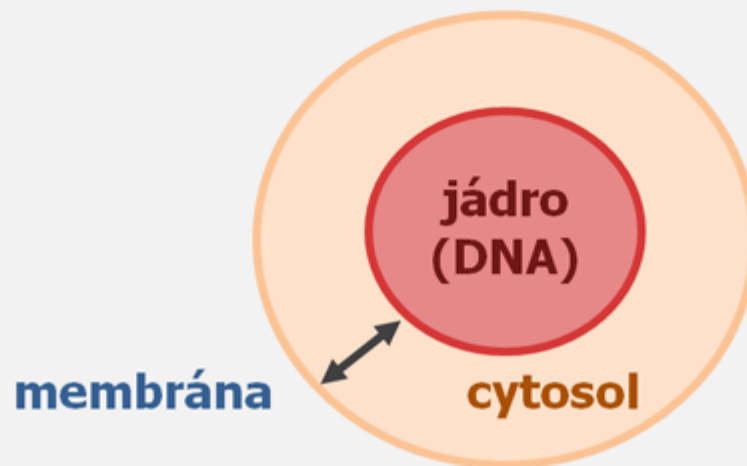
(EIKOSANOIDY)

Záněť, karcinogeneze

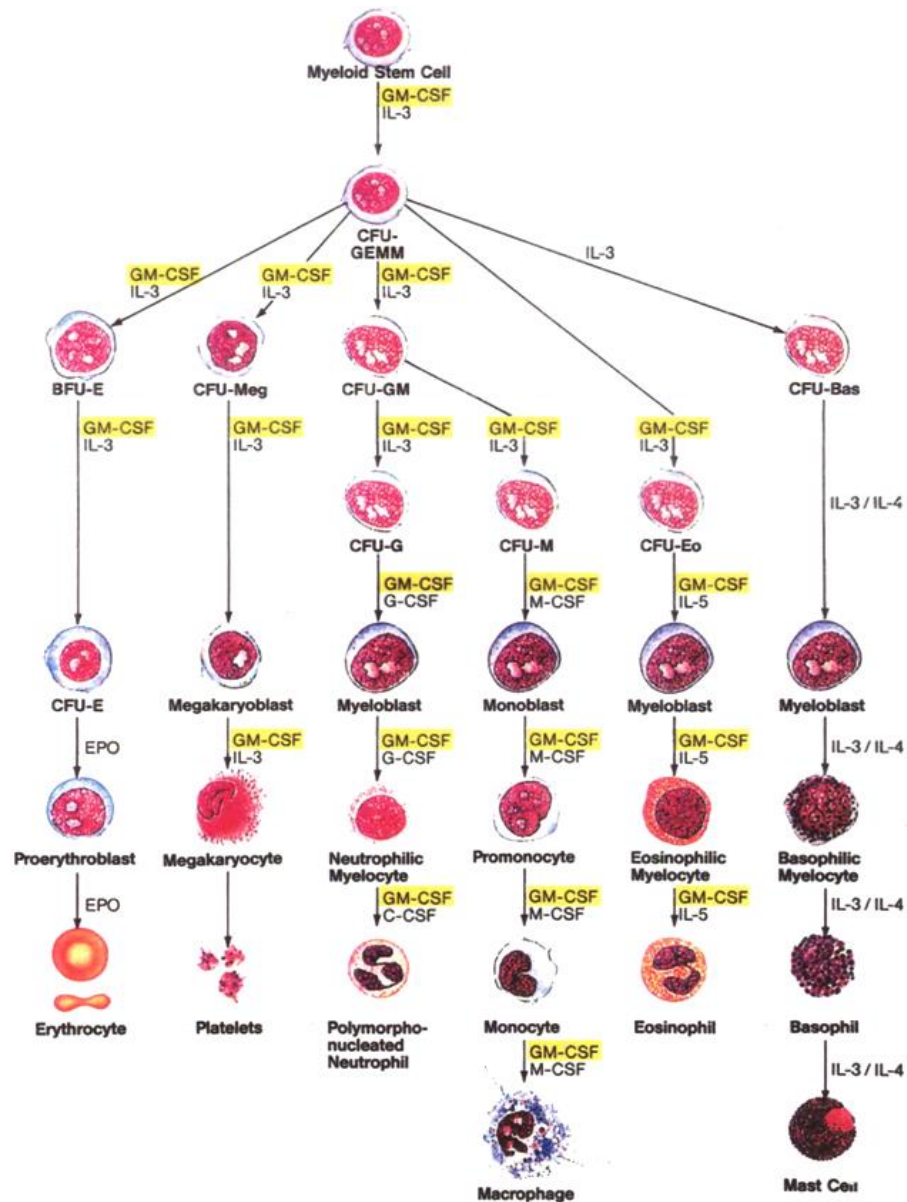
FAKTORY SPECIFICKÉ



FAKTORY NESPECIFICKÉ



The early acting growth factor which maximises host defense



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 nekrózou

Seznam používaných zkratk kmenových buněk:

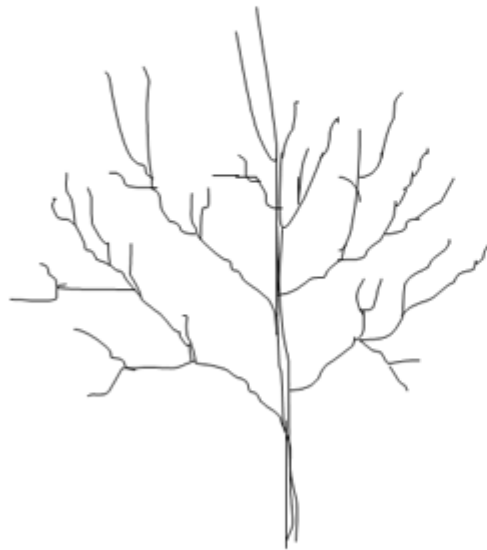
BFU-E -	<i>burst forming unit - erythroid</i> (jednotka vytvářející explozivně vznikající kolonie erytroidní řady). Velmi nezralá kmenová buňka erytroidní řady.
CFU-BL -	<i>colony forming cell - B - lymphocyte</i> (buňka vytvářející kolonie lymfocytů B).
CFU-C - (GM-CFC)	<i>colony forming unit - culture</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 prolifерující v difúzních komůrkách.)

Polyklonální charakter kostních buněk

Přirovnání kmenové buňky ke stromu

a – kmenová buňka v embryonální době

b – kmenová buňka v dospělosti

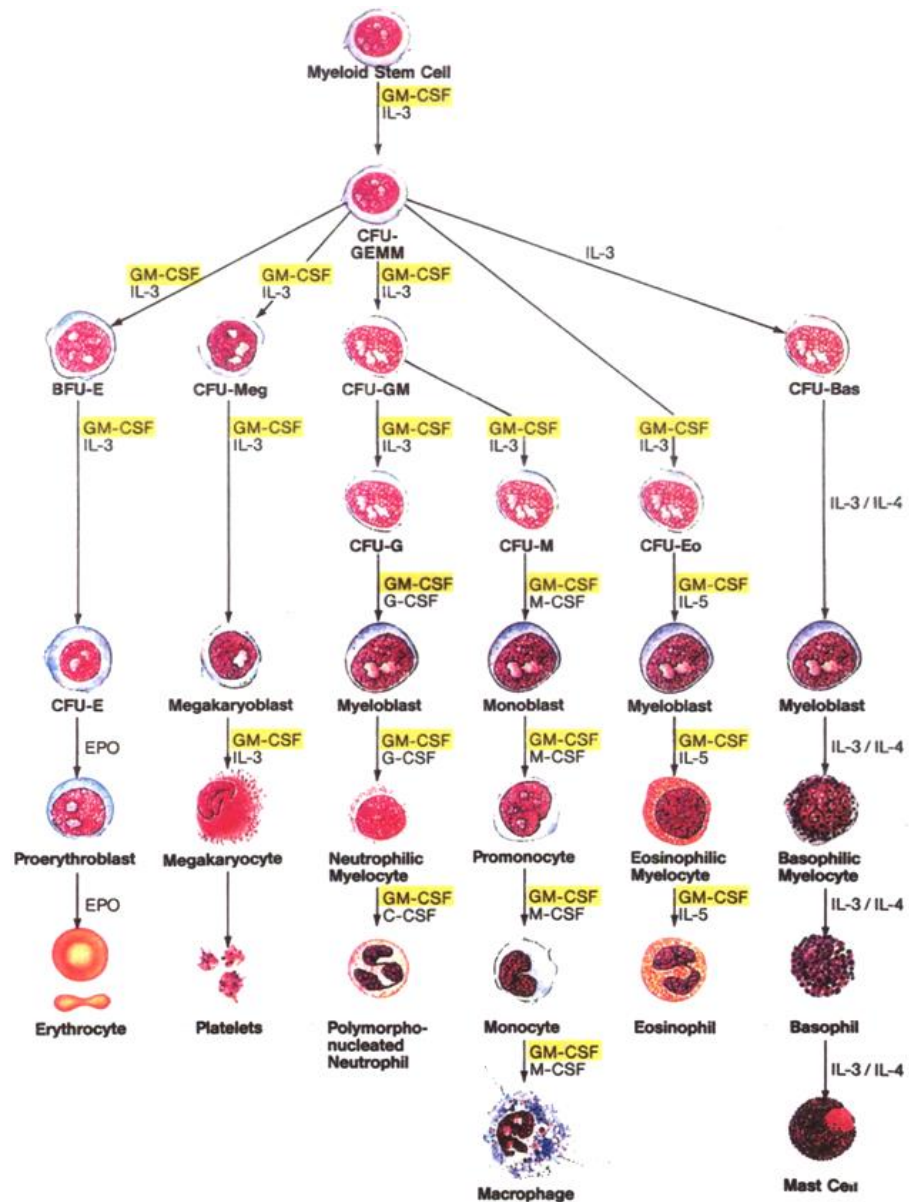


a



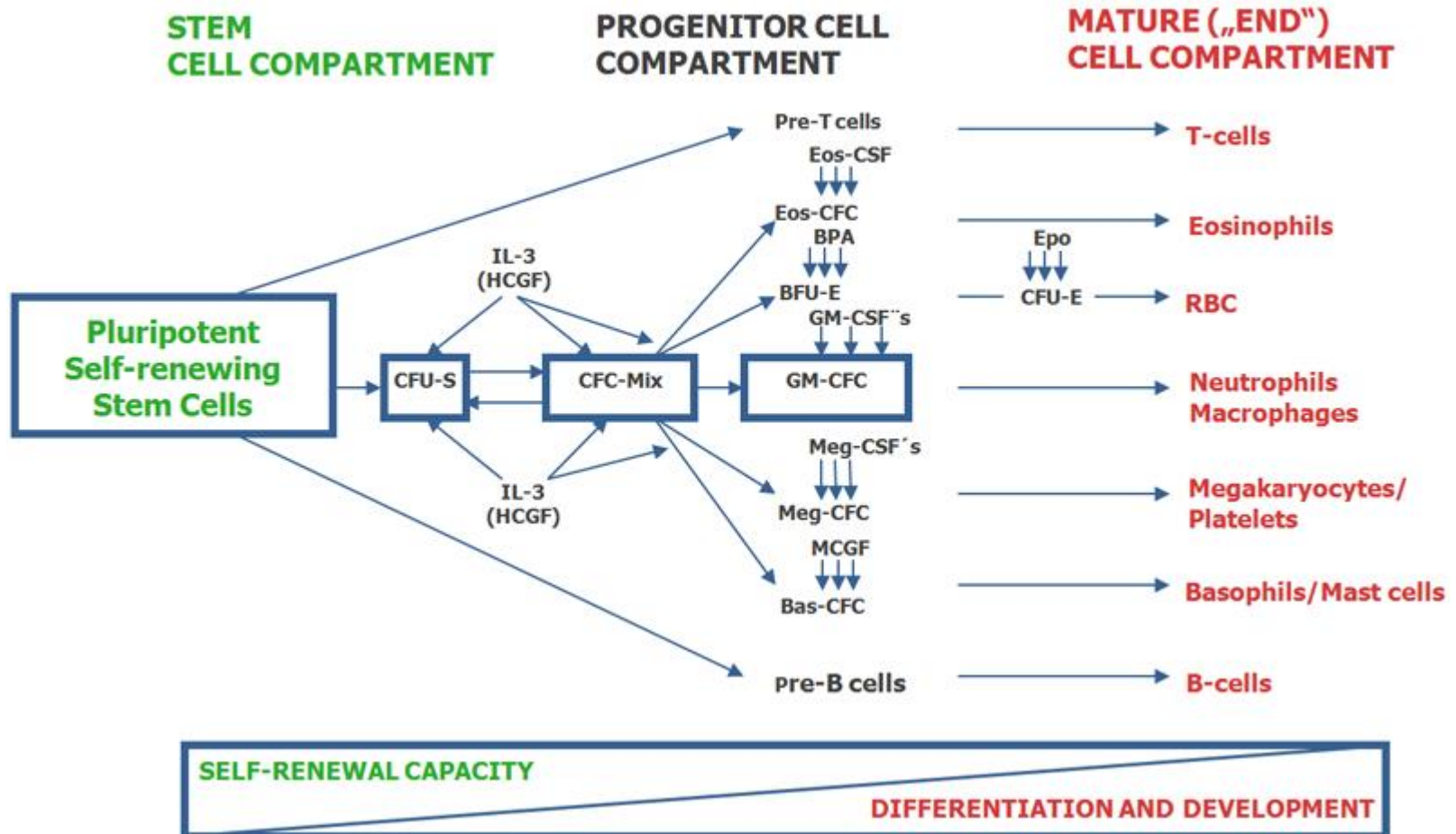
b

The early acting growth factor which maximises host defense

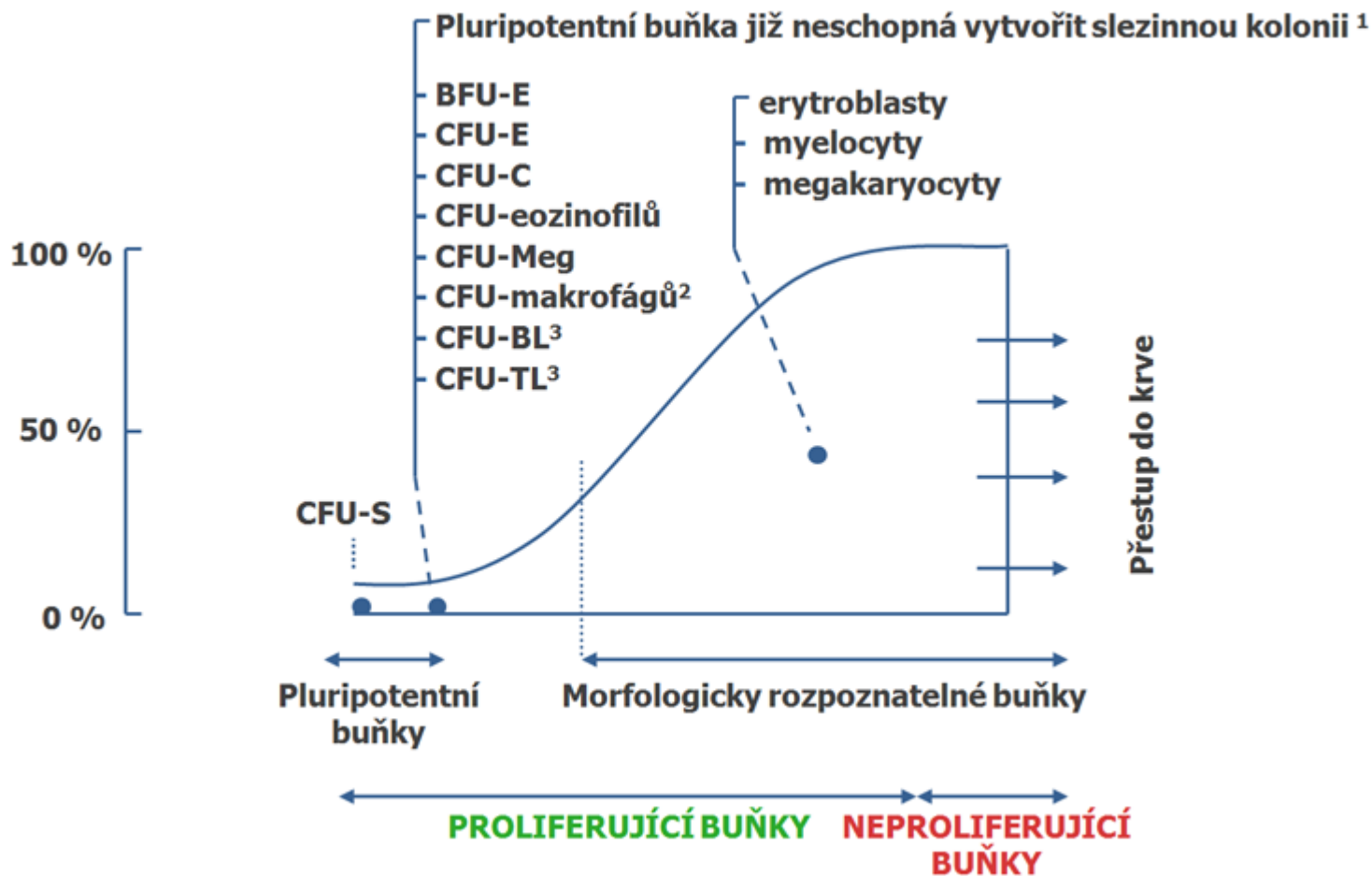


Struktura hemopoetického systému

T.M.Dexter and M.Moore



HEMATOPOETICKÉ BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ

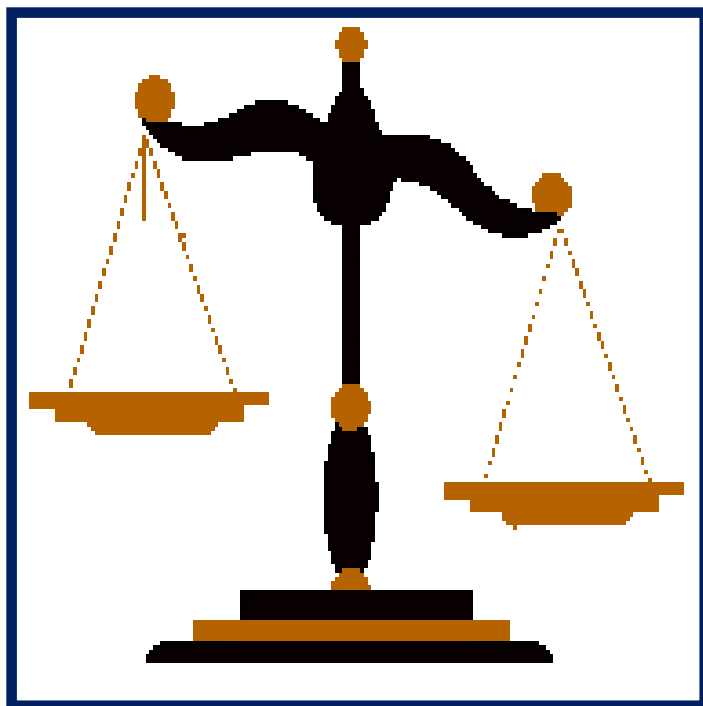


Obř. 8. Schéma kvantitativního zastoupení různých prekurzorů krevních buněk v krvetvorné tkáni.

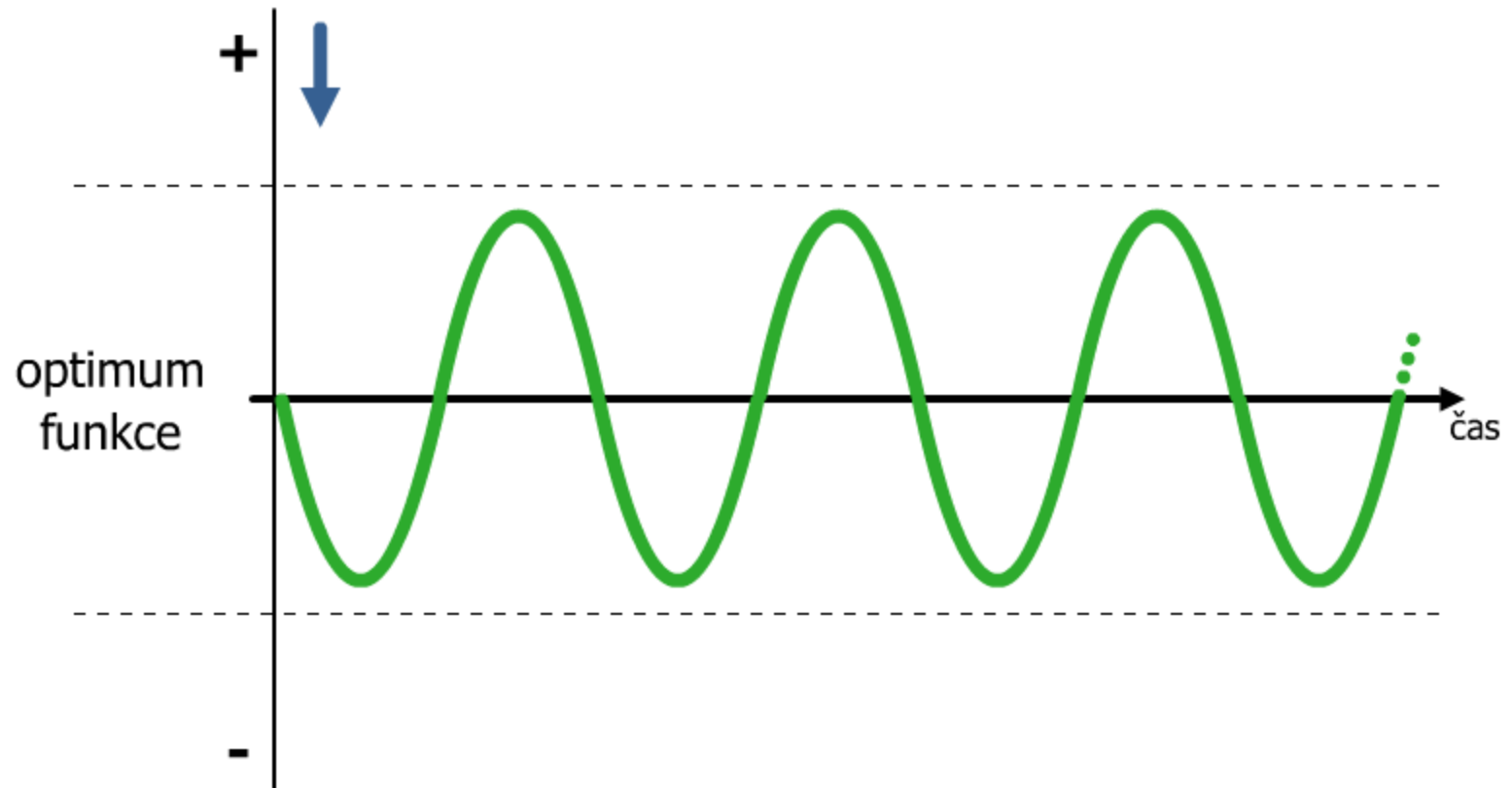
¹ Podle *Gregorové a Henkelmana* (1977)

² Podle *MacVittieho a Provazníka* (1978)

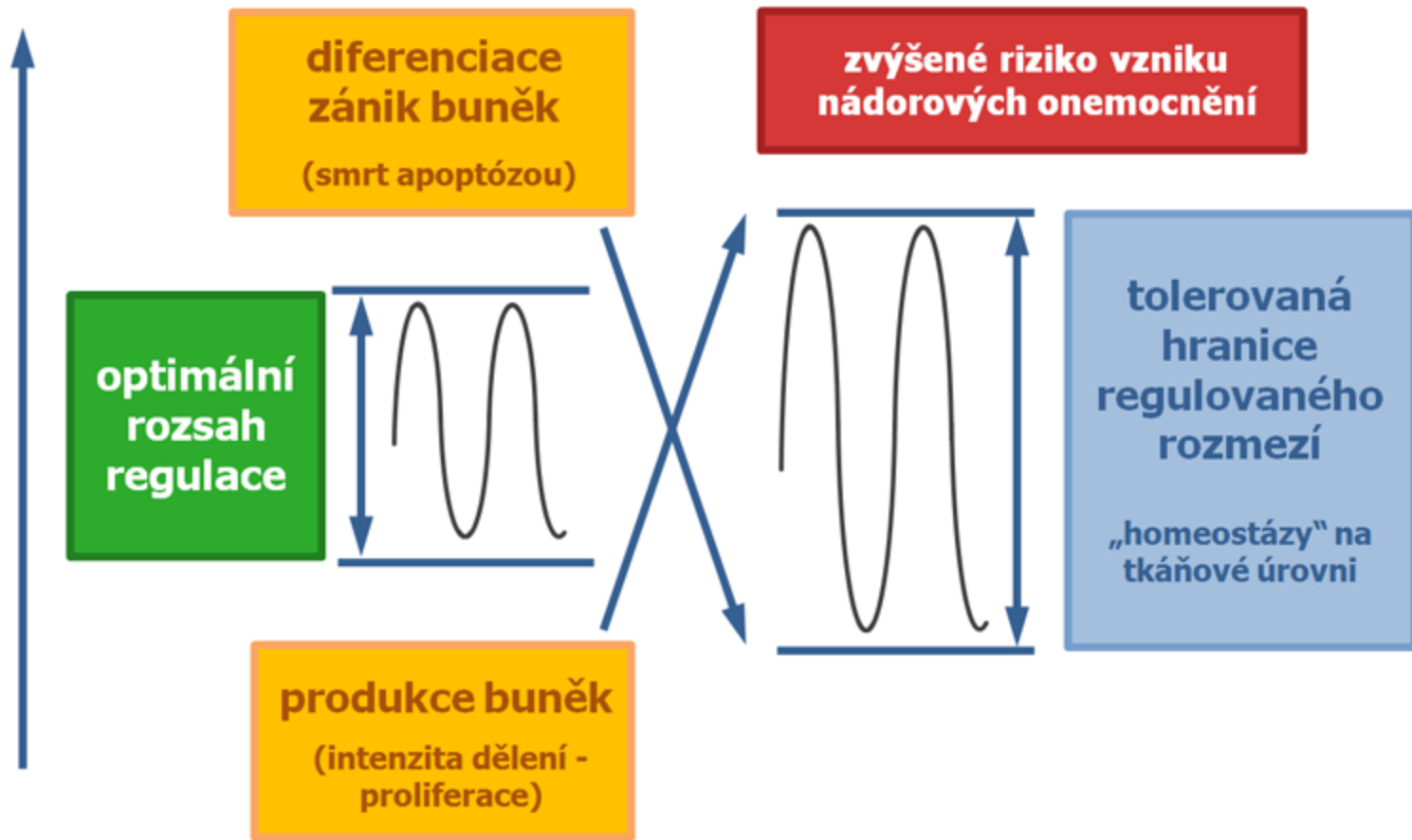
³ Nejsou odvozeny od CFU-S



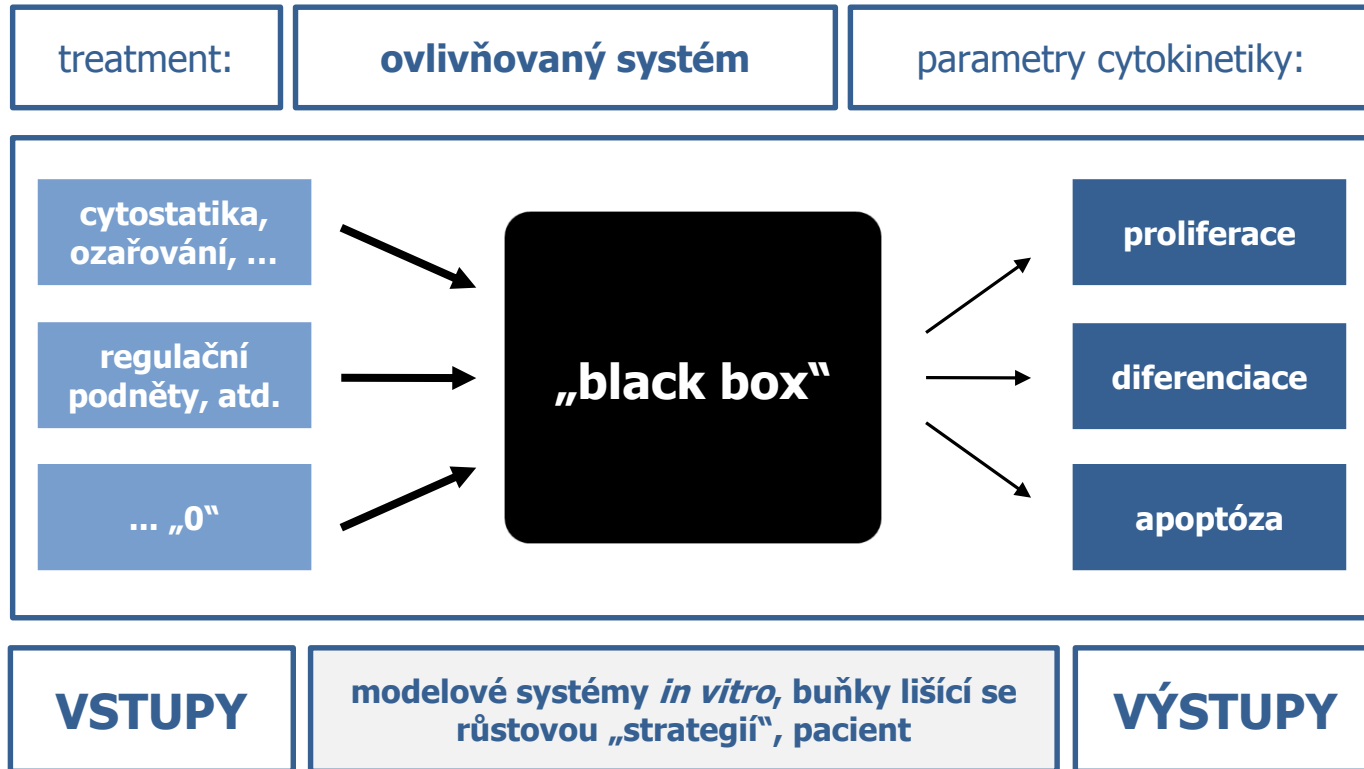
Dosažení dynamické rovnováhy



POČET BUNĚK V POPULACI



Jednoduché, snadno měřitelné
integrální ukazatele

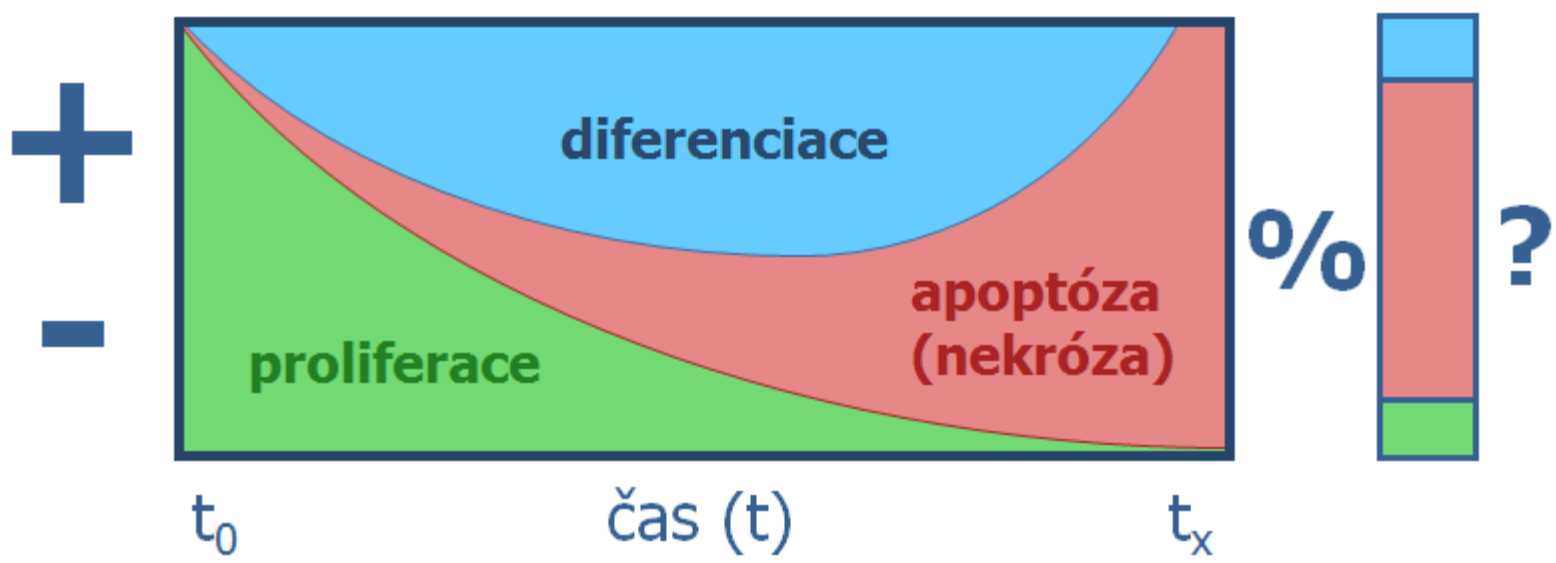


některá
OBECNÁ VÝCHODISKA,

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

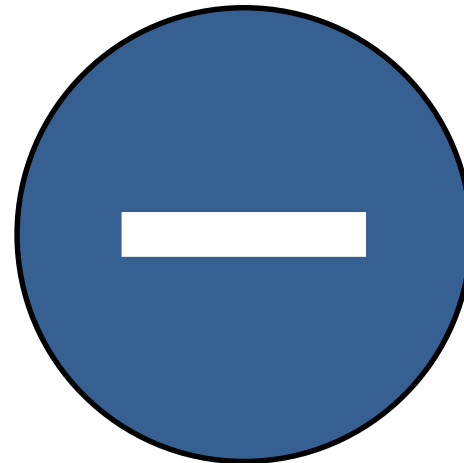
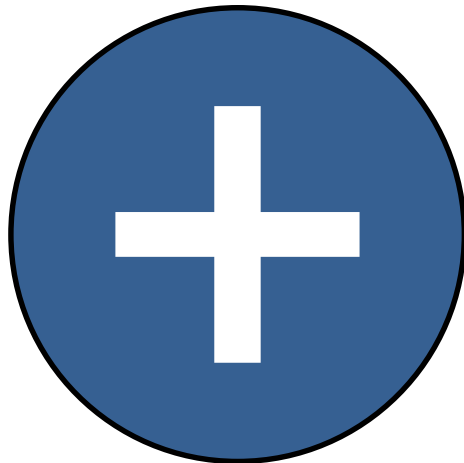
- Zachování rovnováhy v nejširším slova smyslu mezi produkcí buněk (intenzitou proliferace) a jejich úbytkem (např. smrtí apoptózou) je podmínkou pro zachování homeostázy na tkáňové úrovni.
- Proto změny v intenzitě proliferace, diferenciace a apoptózy po působení jakýchkoli podnětů, jež mohou tyto procesy 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)

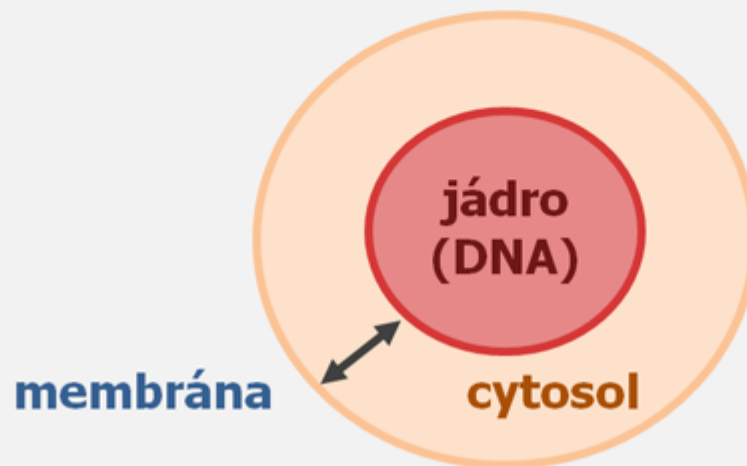
Výsledek působení mnohočetných zpětných vazeb

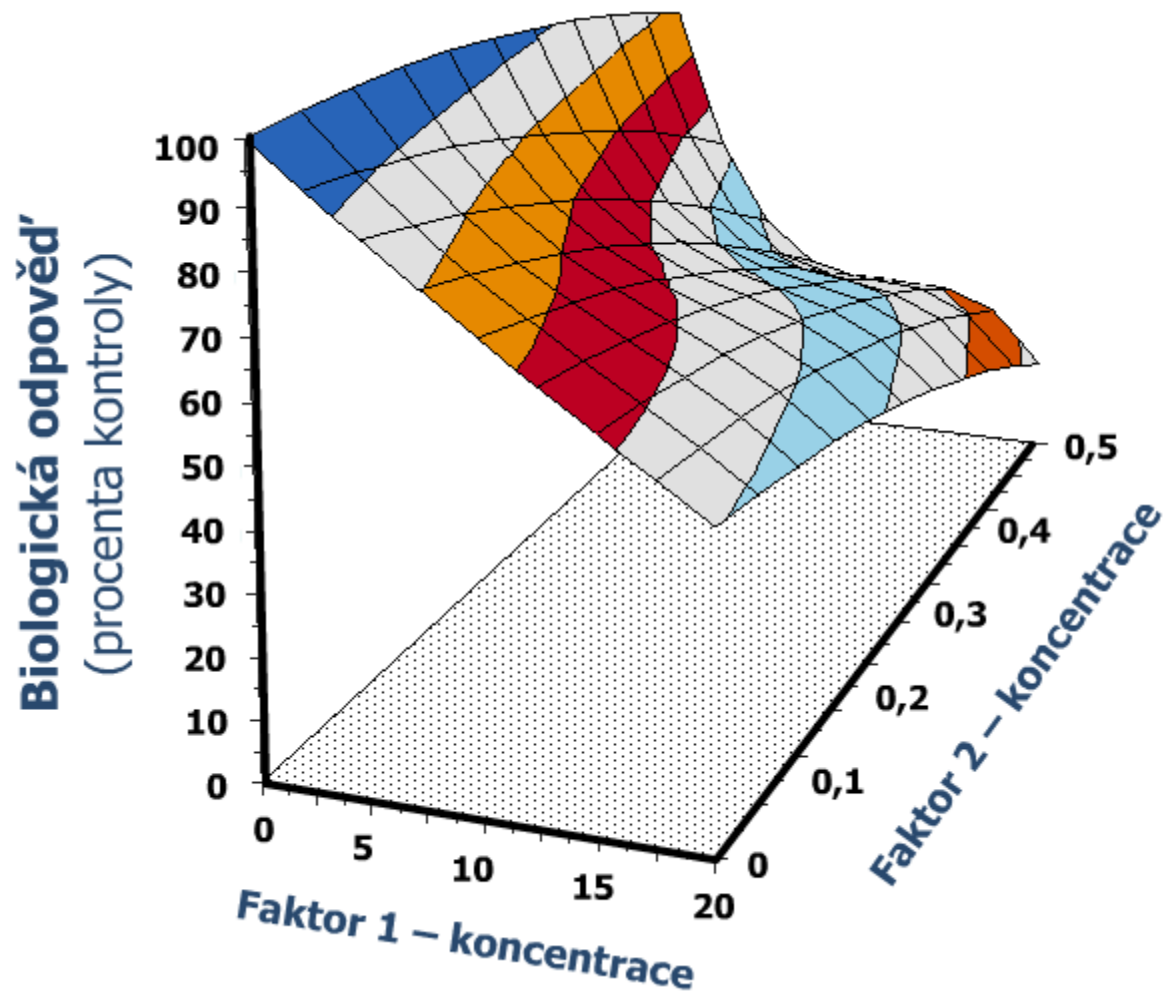


FAKTORY SPECIFICKÉ



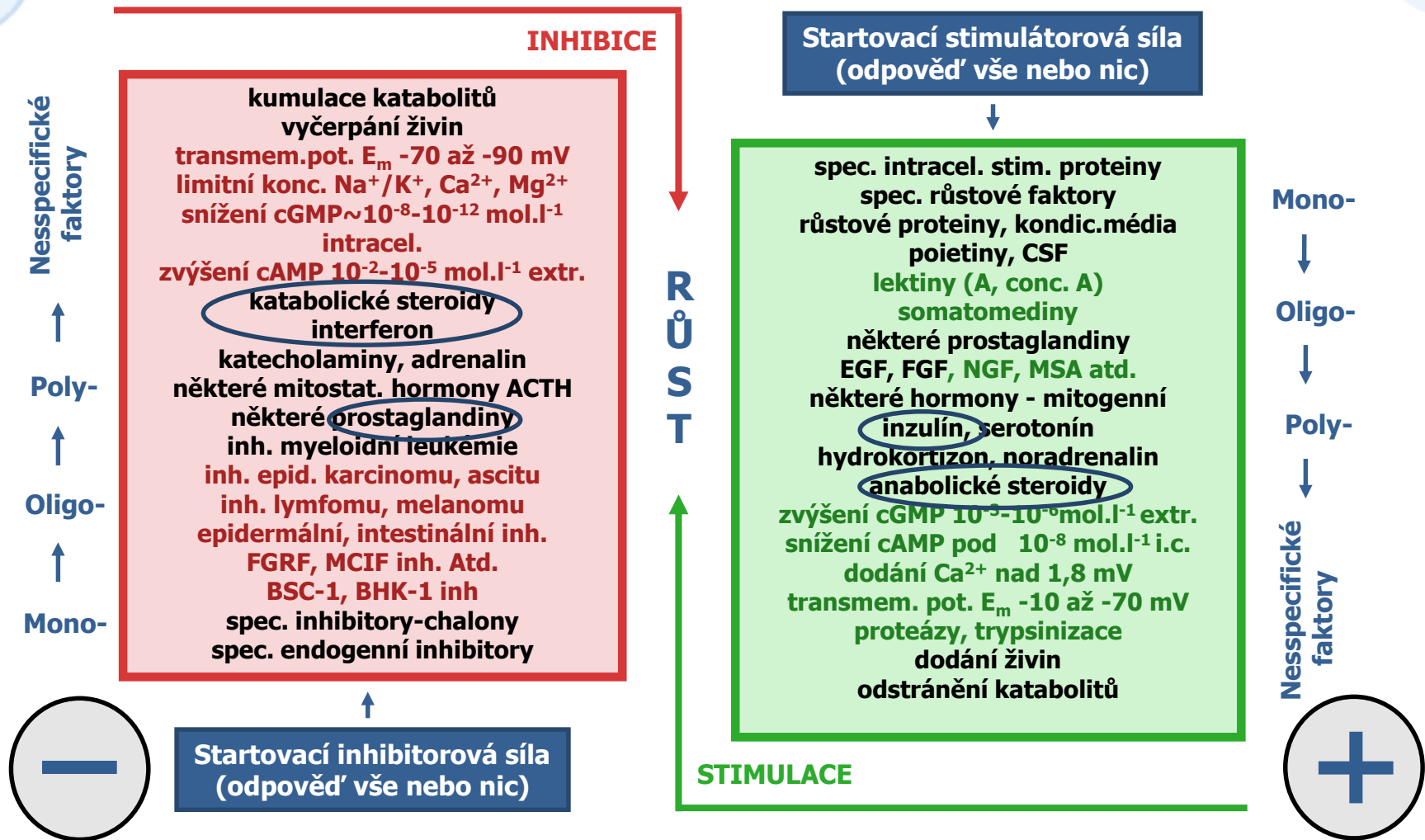
FAKTORY NESPECIFICKÉ





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

REGULACE „NORMÁLNÍHO“ RŮSTU

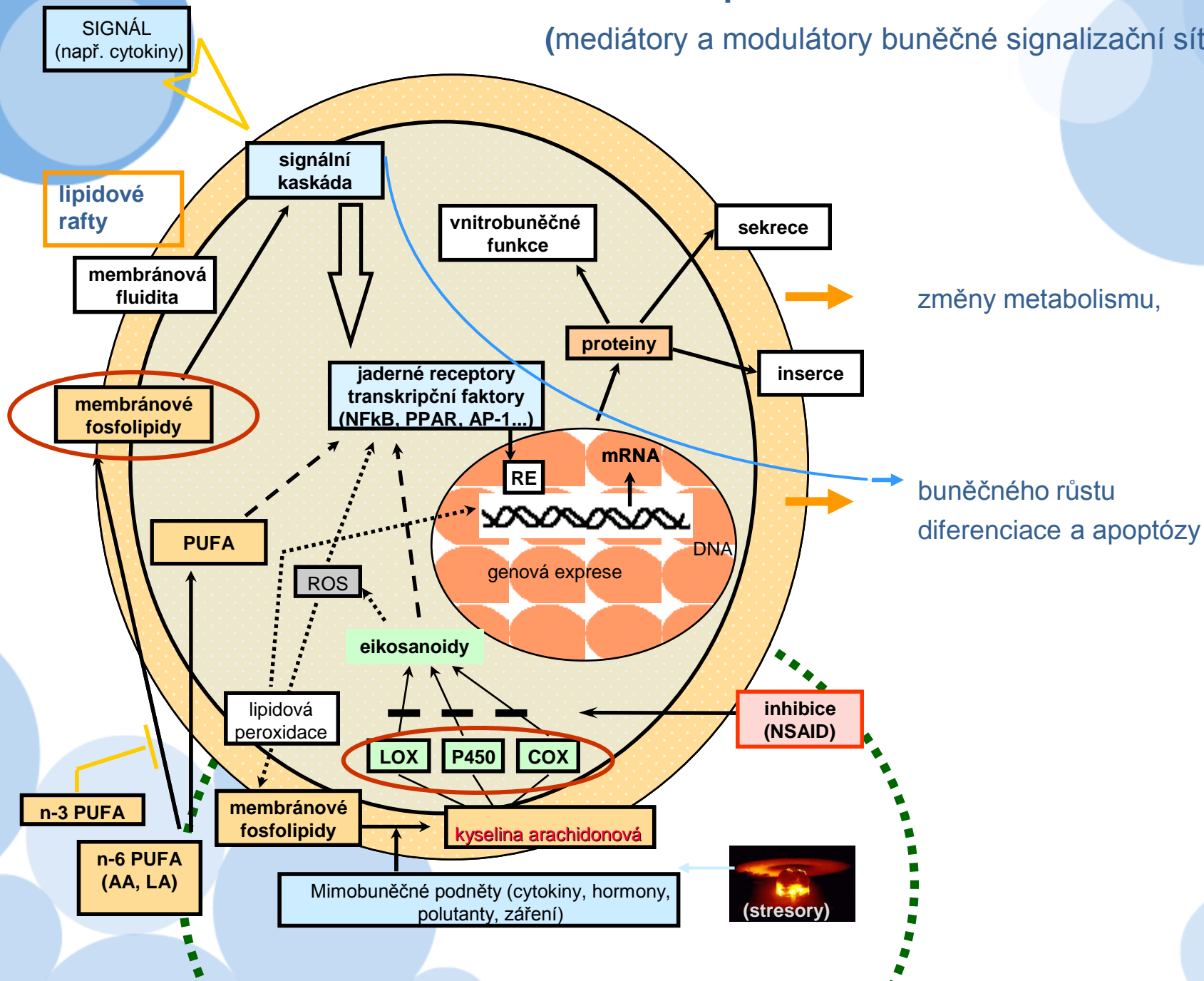


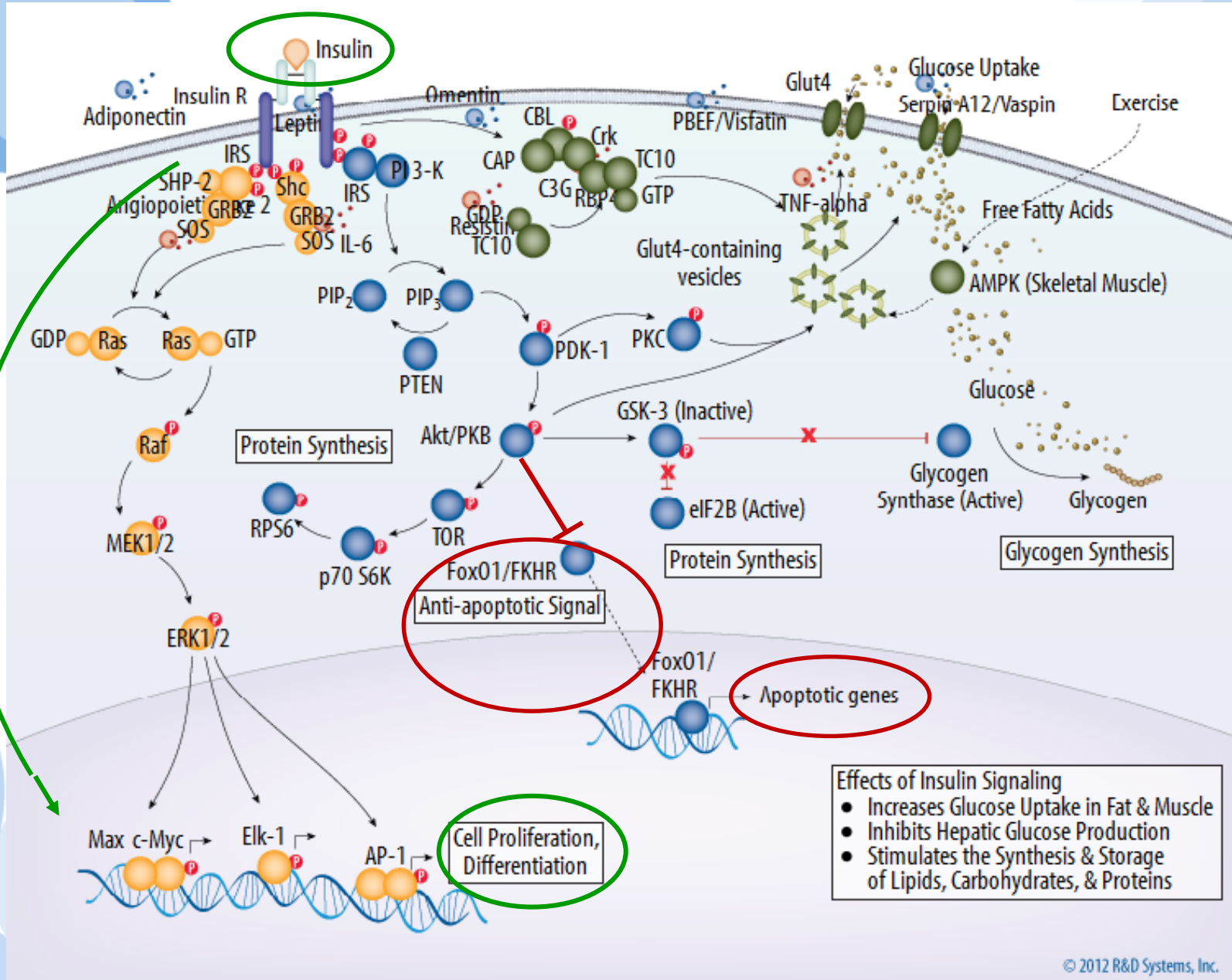
1A Schematické znázornění stimulace a inhibice růstu specifickými a nesespecifickými faktory. Převaha pozitivního nebo negativního signálu rozhoduje o výsledné stimulaci nebo inhibici závisí na metabolické a růstové aktivitě buněk, typu buněk a dalších podmínkách - viz text. Specifické růstové účinky 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, FGFR-specifické inhibitory daných buněčných linií.

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

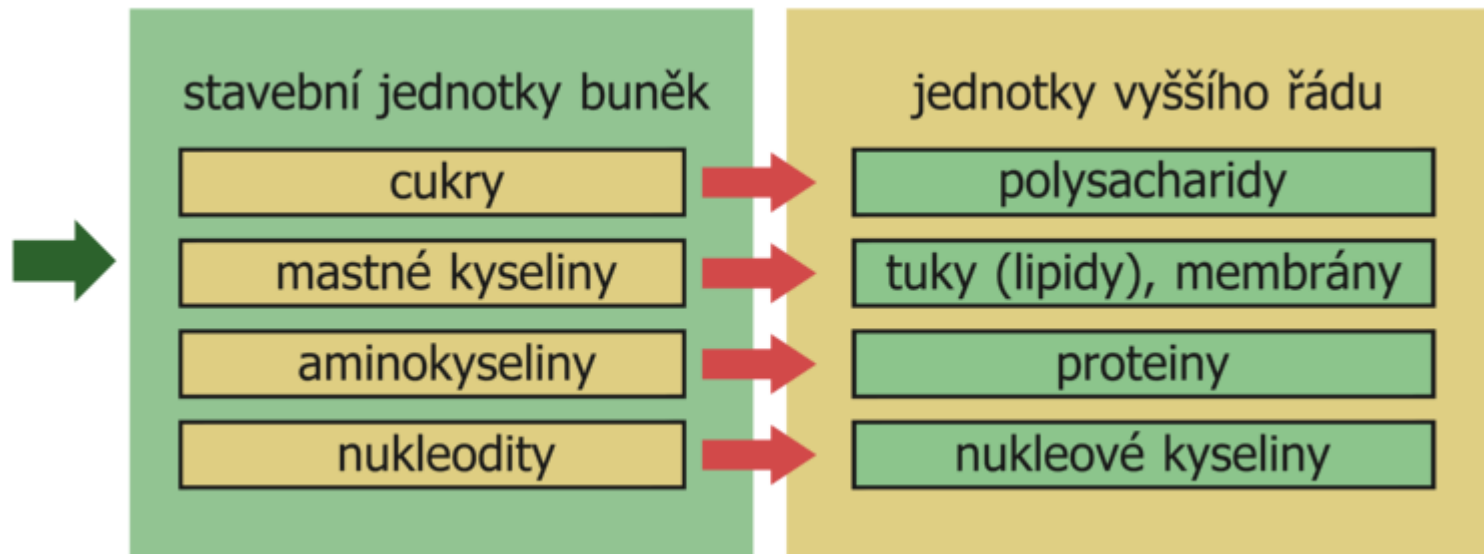
MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY působení ω -3 a ω -6 VNMK

(mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě)





Čtyři nejdůležitější skupiny malých organických molekul v buňkách





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