

ÚVOD

Orálna patofyziológia umožňuje lepšie pochopenie vzniku a patogenézy ochorení ústnej dutiny a tým aj kauzálnu terapiu týchto chorôb. Ich diagnostika obyčajne nie je problémom pre skúseného zubného lekára, ani ich empirická terapia, ale úplne inú dimenziu naberá problém v nových podmienkach a pri súčasnom spôsobe života. Nové stravovacie návyky, konzumácia veľkého množstva sladkých nápojov a sladkostí, konzumácia zvýšeného množstva dentoagresívnych požívatín, nárast fajčenia, užívanie alkoholu významne prispievajú k zmenám a výkyvom v optimálnom zložení prostredia ústnej dutiny, ako osobitného ekosystému. Následkom všeobecného oslabenia obranných mechanizmov organizmu môžu mať typické ochorenia ústnej dutiny priebeh a príznaky aj mimo ústnu dutinu (často aj celkové), alebo môžu byť príčinou resp. predisponujúcim faktorom iných neorálnych ochorení. Na druhej strane to platí aj opačne, mnohé neorálne choroby môžu mať prejavy v ústnej dutine, alebo zvýšiť predispozíciu na choroby ústnej dutiny. Zubný lekár môže byť prvým, ktorý zistí typické symptómy niektorých ochorení, ktoré nie sú predmetom zubného lekárstva, ale ich rozpoznanie môže často zachraňovať život pacientov. Zubný lekár sa môže pri výkone svojho povolania často stretnúť s prejavmi určitých chorôb, napr. ICHS (infarkt myokardu) alebo anafylaktický šok, a jeho kvalifikovaný prístup (na úrovni kvalitnej a kvalifikovanej prvej lekárskej pomoci) je tiež život zachraňujúci.

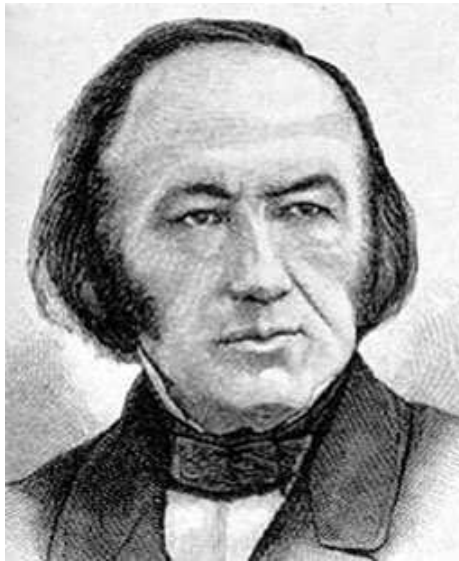
KORENE PATOLOGICKEJ FYZIOLÓGIE A JEJ POSTAVENIE V MEDICÍNE

Patologická fyziológia je pomerne mladý medicínsky odbor. Základné kamene novej disciplíny položil zakladateľ modernej experimentálnej medicíny, **Claude Bernard** (obr. 1.). V knihe *Introduction á l'étude de la médecine expérimentale* (Úvod do štúdia experimentálnej medicíny, 1865) charakterizoval nový vedný odbor týmito slovami: „*Experimentálna medicína, čo je synonymum medicíny vedeckej, môže sa rozvinúť iba tak, že jej vedecký duch bude viac a viac prenikať do lekárskeho kruhu. Jediné, čo je podľa môjho názoru potrebné na dosiahnutie tohto cieľa, je poskytnúť mládeži dôkladné vzdelanie v experimentálnej fyziológii. Tým nechcem tvrdiť, že experimentálna fyziológia je základom medicíny – o tomto predmete som sa vyjadril inde –, chcem len povedať, že experimentálna fyziológia je najvedeckejšia časť medicíny a že mladí lekári si jej štúdiom osvoja vedecké návyky, ktoré potom prenesú do výskumu v patológii i v terapii.*“

Podľa súčasného názoru patologická fyziológia je lekárska disciplína, ktorá sa zaoberá **funkčnými zmenami ľudského organizmu počas choroby**. Patologická fyziológia na rozdiel od patologickej anatómie (ktorá je morfológickou disciplínou) je **experimentálna veda**. Spája molekulové, biochemické, subcelulárne a bunkové

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

aspekty lekárskej vedy do jedného celku a je nevyhnutná na pochopenie podstaty chorôb. Tvorí most medzi teoretickými a klinickými odbormi medicíny.



obr. 1. – Claude Bernard (1813-1878)

Podstatu patologickej fyziológie je možné pochopiť najľahšie krátkym prehľadom jej hlavných cieľov a metód.

Patologická fyziológia :

- Skúma príčiny a podmienky rozvoja patologických pochodov a chorôb (**etiológia**).
- Skúma súvislosti medzi príčinami chorôb a regulačnými, obrannými a adaptačnými pochodmi organizmu (**patogenéza**).
- Skúma mechanizmy, ktoré vedú k vyliečeniu z choroby alebo k smrti (**sanogenéza, tanatogenéza**).

K dosiahnutiu tohto cieľa:

- Používa modely na pochopenie podstaty chorôb a patologických pochodov. (Najčastejšie sú to pokusy na zvieratách).
- Konfrontuje výsledky získané pomocou týchto modelov (pokusov) s poznatkami z klinickej praxe.
- Zovšeobecňuje a syntetizuje poznatky získané rôznymi metódami, stavia hypotézy a teórie o základných zákonitostiach patologických pochodov a choroby ako celku.

Liečenie chorôb patrí medzi najstaršie uvedomelé ľudské aktivity. **Medicína je jedinečné povolanie**, lebo jej predmetom je živý ľudský organizmus. Odborná časť lekárskej činnosti je nerozlučne spätá s ostatnými aspektmi ľudského a spoločenského života. Vzájomný vzťah vedy a medicíny charakterizoval *Walsh McDermott* v úvode Cecil Textbook of Medicine takto: „Medicína nie je veda, ale učené povolanie, ktoré má hlboké korene v mnohých odvetviach vedy a je predurčená na využitie pre blaho ľudstva“. Pri hodnotení významu patologickej fyziológie pre lekársku vedu nesmieme

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

zabudnúť, že vedecký charakter dnešnej medicíny je výsledkom pokroku, ktorý sa uskutočnil len nedávno. Liečenie chorôb bolo dlhé stáročia založené skoro výlučne na skúsenosti. Staré pravidlo *"ubi pus, ibi evaqua"* nič nehovorí o príčine a podstate hnisania, len odporúča vypustenie hnisu.

Tento zákrok samozrejme zmierni ťažkosti chorého a môže pomôcť aj obranným silám organizmu v boji proti chorobe. Napriek skúsenostiam nahromadeným za dlhé stáročia a úprimnej snahe pomôcť trpiacim zo strany lekárov starých čias väčšina diagnóz bola nepresná, o príčinách chorôb sa vedelo málo a liečba bola často riskantná a z dnešného pohľadu prinajmenšom nezmyselná. Napriek tomu, že určitý pokrok nastal už od XVI. storočia (tabuľka 1), celková situácia sa začala meniť až v minulom storočí. Prudký rozvoj základných vied o živote (mikrobiológie, biochémie, neskôr vznik molekulevej biológie a genetiky) mal obrovský podiel na premene medicíny do tej podoby, ako ju dnes poznáme. Je však pozoruhodné, že vedci a profesori stredovekých univerzít boli tak isto presvedčení o vedeckosti dobovej medicíny, ako sme my v súčasnosti, čo nás nabáda k opatrnosti.

Tab. 1. – Významné objavy a výsledky v medicíne XVI.-XVIII. Storočia

Presný anatomický atlas <i>De humanis corporis fabrica</i>	Andreas Vesalius, 1543
Založenie „novovekej“ chirurgie <i>La Méthode de traicter les playes.</i> <i>Livres de la chirurgie avec le magasin des instruments nécessaires á icelle</i>	Ambroise Paré, 1545 a 1564
Správny popis krvného obehu <i>Excirtatio anatomica de motu cordis</i>	William Harvey, 1628
Zavedenie pojmu reflex	René Descartes, 1644
Objav kapilárnej siete a červených krviniek	Marcello Malpighi, 1661, 1665
Objavenie mikroskopického života <i>Allezijne naturkundige Aerkem</i>	Anthony van Leeuwenhoek, 1696
K príčinám chorôb cez morfológický obraz <i>De sedibus et causis morborum per anatomem indagatis</i>	Giovanni Battista Morgagni, 1761
Objav a zavedenie perkusie	Joseph Leopold Auenbrugger, 1761
Očkovanie proti kiahňam	Edward Jenner, 1796

Napriek obrovskému pokroku vedeckej medicíny je ešte stále veľa chorôb s neznámou príčinou, nedostatočne objasnenou patogenézou a bez možnosti úspešnej kauzálnej liečby (Rácz a spol., 1996). Okrem toho vyriešenie určitého problému nikdy nie je konečným výsledkom. Po objavení mikroorganizmov ako príčiny mnohých ochorení bolo potrebné ozrejmiť otázky spojené s citlivosťou a odolnosťou organizmu na infekčné noxy. Po geniálnom – z hľadiska vtedajšieho stavu vedeckého poznania – popise zákonov genetiky *Mendelom* sme museli dlho čakať na objasnenie materiálnej podstaty dedičnosti a v súčasnosti sa usilovne skúma genetické a epigenetické pozadie jednotlivých ochorení. Pokrok v aplikovanej genetike, epigenetike a molekulevej biológii je však nerozlučne spätý napredovaním základných vied.

Počet známych ochorení sa neustále zvyšuje, a na tom má značný podiel práve vedecký prístup k medicíne, konkrétne zavedenie nových postupov do diagnostiky a hlbšia analýza patogenézy chorôb. O mnohých ochoreniach, ktoré nedávno sme považovali za jednotné **nozologické jednotky**, vysvitlo, že sú to rôzne choroby s

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

podobnou symptomatológiou ale odlišnou etiológiou a patogenézou (napr. cukrovka, vysoký krvný tlak a i.). Lepším poznaním ochorení sa preto počet problémov, ktoré je potrebné vyriešiť vedeckým bádáním, neznižuje, ale naopak, zvyšuje.

Ďalším dôležitým problémom, ktorý vzniká stále hlbším a detailnejším prenikaním vedeckých metód do medicíny, je vzťah **celku a časti**. Výskum v dnešnej medicíne sa dostáva až na úroveň molekúl a elektrónov. Výsledky dosiahnuté na poli molekulovej biológie a príbuzných disciplín majú obrovský význam z hľadiska objasnenia a možnej liečby doteraz neliečiteľných ochorení, ale tento prístup zároveň skrýva v sebe nebezpečie, že sa stratíme v detailoch. Dobrý, vedecky erudovaný lekár musí byť schopný z týchto detailov poskladať celkový obraz o činnosti ľudského organizmu v zdraví a chorobe a práve patologická fyziológia, ktorá v druhej polovici nášho storočia prenikla hlboko do každej oblasti klinickej medicíny, je tým pevným základom, ktorý umožňuje usporiadať črepy mozaiky do uceleného obrazu.

Ide v podstate o ucelený pohľad a integráciu poznania na úrovni:

- **funkcie jednotlivých buniek** (molekulová medicína),
- **postihnutých orgánov a orgánových systémov**,
- **celého organizmu**.

Väzba medzi patologickou fyziológiou a ostatnými disciplínami dnešnej medicíny sa odráža aj v časovom slede jednotlivých predmetov pri štúdiu na lekárskej fakulte. Patologická fyziológia nasleduje po základných morfológických a funkčných predmetoch a po získaní vedomostí z patobiochémie, po zvládnutí základov molekulovej medicíny, beží súbežne s patologickou anatóniou a predchádza štúdiu klinických disciplín. Vzťah medzi morfológickými a funkčnými disciplínami je vzťahom **formy a funkcie**. Ak sa pozrieme na štyri oddiely srdca a na srdcové chlopne (anatónia), ľahko pochopíme jeho čerpadlovú funkciu (fyziológia). Na molekulovej úrovni rozdiel medzi tvarom a činnosťou sa stráca. Štruktúru a funkciu nukleových kyselín, enzýmov, polysacharidov a lipidov študujeme v rámci jednej disciplíny (biochémia). Aplikácia poznatkov získaných počas štúdia lekárskej chémie a biochémie na úroveň celého organizmu sa uskutočňuje v rámci štúdia **patobiochémie** alebo v **základoch molekulovej medicíny**.

Patologická fyziológia je funkčná disciplína, ale bez jej morfológického protikladu, patologickej anatónie stráca zmysel. Kto nevie, ako sú poškodené dvojčipe chlopne po prekonaní reumatickej horúčky, bude mať ťažkosti pri pochopení hemodynamiky pri mitrálnej stenóze. Ďalšia veľmi úzka spojitosť existuje medzi fyziológiou a patologickou fyziológiou. Najprv sa musíme oboznámiť s **normou** (fyziológia) a len potom je možné študovať a pochopiť **abnormálny** alebo **patologický stav** (patologická fyziológia).

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

V prvých rokoch štúdia medicíny budúci lekári nevyšetrujú a neliečia chorých. Väčšinou sedia v posluchárňach alebo v knižnici a pracujú v laboratóriách. V každodennej klinickej praxi budú priamo užívať len malú časť obrovského množstva poznatkov vyžadovaných na skúškach z anatómie, histológie, biochémie alebo fyziológie. Ale **teoretické vedomosti** získané v prvých rokoch sú základňou **praktickej kompetencie** budúceho lekára. Hranice moderných vedeckých lekárskejších odborov nie sú ostré – často používajú spoločné metódy a študujú tie isté problémy z mierne odlišných hľadísk. Okrem základných disciplín, s ktorými budúci lekár sa stretne pri štúdiu medicíny, existujú aj hraničné disciplíny. Najbližší príbuzní patologickej fyziológie sú **experimentálna patológia a klinická fyziológia**. Prvá z nich kladie väčší dôraz na experimentálne prístupy, druhá na klinické štúdie, ale medzi nimi a patologickou fyziológiou je značné prekryvanie. Patologická fyziológia sa delí na dve časti – na **všeobecnú a špeciálnu patologickú fyziológiu**.

Hlavné časti **všeobecnej patologickej fyziológie** sú nasledujúce:

- **Nozológia** – zaoberá sa definíciou a všeobecnými zákonitosťami choroby ako celku a klasifikáciou chorôb.
- **Etiológia** – študuje príčiny chorôb a podmienky ich vzniku.
- **Patogenéza** – zaoberá sa zákonitosťami rozvoja chorobných pochodov, chorôb, a príznakov choroby.

Odlíšenie etiológie od patogenézy danej choroby niekedy môže robiť ťažkosti na začiatku štúdia patologickej fyziológie (Fölsch a spol., 2003). Etiológia hľadá odpoveď na otázku, **prečo** sa dané ochorenie vyskytuje a patogenéza študuje to, **ako** sa choroba rozvíja. V klinickej praxi sa často používa výraz "**etiopatogenéza**", ktorá zahŕňa príčinu a rozvoj choroby v logickom slede.

- **Sanogenéza** a **tanatogenéza** sú kapitoly úzko späté s patogenézou. Študujú mechanizmy vedúce k uzdraveniu alebo k fatálnemu koncu.

Z praktického hľadiska do všeobecnej časti patologickej fyziológie sú zaradené aj kapitoly pojednávajúce o **typických patologických pochodoch** ako je napr. starnutie, hypoxia, zápal, špecifické a nešpecifické obranné mechanizmy.

Špeciálna časť patologickej fyziológie je rozdelená podľa systémov a orgánov, ako je napríklad patologická fyziológia srdcovo-cievneho systému, krvi, nervového systému, atď.

Definícia patofyziológie (Hanáček a spol., 2014). Patofyziológia je moderný integratívny biomedicínsky odbor vybudovaný na výsledkoch základného a klinického výskumu, pomocou ktorých objasňuje mechanizmy zodpovedné za iniciáciu, progresiu a zánik patologických procesov, čím vytvára základný predpoklad pre ich pochopenie a

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

racionálne ovplyvnenie. Patologická fyziológia tvorí „*virtuálny most*“ medzi štúdiom teoretických a klinických disciplín (Hanáček a spol., 2014).

MOLEKULOVÁ PATOLOGICKÁ FYZIOLÓGIA

Molekulová patologická fyziológia vysvetľuje a objasňuje:

- poškodenie bunky,
- mechanizmy vedúce ku zmenenej funkcii takto poškodených buniek, vyúsťujúcich buď do reparácie poškodenia, adaptácie na poškodenie alebo k smrti bunky.

Poškodenie jednotlivých buniek potom môže vyústiť do poškodenia tkanív, orgánov a systémov, čiže organizmu ako celku. Preto je potrebné patogenézu chorôb študovať na všetkých jej úrovniach, t.j. na úrovni:

- **funkcie jednotlivých buniek** (molekulová biológia bunky)
- **buniek a tkaniva** (molekulová biológia a patologická fyziológia)
- **orgánov a orgánových sústav** (molekulová medicína a patologická fyziológia)
- **organizmu ako celku** (molekulová medicína a patologická fyziológia).

Na základe uvedeného je možné konštatovať, že molekulové základy chorobných procesov (molekulovej medicíny) využívajú poznatky:

- **biochémie a patobiochémie,**
- **molekulovej biológie a genetiky,**
- **molekulovej imunológie a cytológie**

a predstavujú základ pre štúdium **patologickej fyziológie**, ktorá sa zaoberá základnými mechanizmami patologických procesov a javov a je mostom medzi teoretickými a klinickými disciplínami.

Cieľom je poukázať na dôležitosť a opodstatnenosť základných disciplín pre klinickú prax a naučiť chápať základné mechanizmy a vedieť ich situovať a aplikovať pri systémových a multifaktoriálnych ochoreniach. To bude nesmierne dôležité pre pochopenie princípov interakcie etiologického činiteľa a organizmu, patogenézy a pri cielenej kauzálnej terapii ochorení (Janoušek a spol., 1990).

Najdôležitejšie aspekty poškodenia sú:

- etiológia, t.j. príčina poškodenia
- patogenéza, t.j. mechanizmus rozvoja poškodenia
- morfológické zmeny, t.j. štrukturálne poškodenia vyvolané v bunkách, tkanivách a orgánoch tela
- funkčné následky morfológických zmien, t.j. klinický dopad.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Len v úzkej integrácii týchto aspektov je možné vysvetliť patomechanizmus vzniku následkov poškodenia (chorôb), ich priebeh, resp. možnosti racionálneho terapeutického zásahu.

S molekulovými základmi chorobných procesov sa zaoberá interdisciplinárna veda – **molekulová medicína**, ktorá oproti biochémiu a molekulovej biológii rieši aj zmeny biochemických dejov počas patologických procesov, stavov alebo chorôb. Toto je ale veľmi zjednodušená predstava. V skutočnosti sú molekulové základy chorobných procesov skôr akýmsi mostom medzi biochémiou, molekulovou genetikou a patologickou fyziológiou smerom ku klinickým odborom. Preto podľa nášho názoru musí byť prístup k výučbe takejto disciplíny komplexný, založený na analýze a vysvetlení problému tak z aspektu biochemického pohľadu, ako aj z aspektu potrieb klinického lekára. Len takýto bilaterálny prístup a pohľad na problémové okruhy molekulových základov chorobných procesov môže poskytnúť študentovi medicíny takú základňu poznatkov, ktoré bude môcť efektívne zúročiť v ďalšom štúdiu a zároveň mu poskytnú aj dobre východisko pre tzv. "medicínske myslenie". V rámci predmetu sa zároveň poukazuje na najnovšie poznatky vedy týkajúce sa medicíny.

Je možné konštatovať, že molekulové základy bazálnych biologických procesov sú už známe, napr.:

- 📖 štruktúra dvojitého helixu DNA,
- 📖 tok informácií od génu po proteín,
- 📖 trojdimenziálna štruktúra a mechanizmus funkcie mnohých bielkovín,
- 📖 detaily ciest (dráh) intermediárneho metabolizmu,
- 📖 molekulová štruktúra energi tvoriacich látok,
- 📖 molekulová štruktúra látok detekujúcich biologické signály,
- 📖 molekulová štruktúra látok prenášajúcich informácie,
- 📖 technológia rekombinantnej DNA otvorila knihu genomu 📖.

Jednoznačne bolo prijaté, že medzi rôznymi hladinami organizácie života je jednotný molekulový vzor:

- **stavebné prvky,**
 - ✳️ **tok genetickej informácie a**
 - ★ **tok energie (ATP)**
- sú rovnaké.**

Na medicínu mala mimoriadny vplyv molekulová biochémiu v:

- ✓ spoznaní a vysvetlení regulácie expresie génu
- ✓ poznání molekulových základov poškodenia etiologickým faktorom (efektívna terapia)
- ✓ klinicko-laboratórnej diagnostike

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- ✓ terapeutickom využití techniky rekombinantnej DNA (výroba bielkovín s terapeutickým účinkom – napr. inzulínu)
- ✓ racionálnom plánovaní nových liečiv.

Nové teórie a molekulové techniky nám umožnili:

- ✂ upriamiť sa na nové výzvy biológie a medicíny,
- ✂ umelé oplodnenie (*in vivo*, *in vitro*),
- ✂ priblížiť sa k spoznaniu molekulových základov pamäte ???
- ✂ pochopiť molekulové základy duševných chorôb (napr. *m. Alzheimer, schizofrénia*).

Nekovalentné väzby sú jednou zo základných podmienok života. Reverzibilné interakcie biomolekúl sú sprostredkované nasledovnými nekovalentnými väzbami:

- ✂ elektrostatickými,
- ✂ iónovými
- ✂ vodíkovými,
- ✂ van der Waalsovými (tabuľka 2).

Tab. 2 – Dĺžka a pevnosť jednotlivých typov väzieb:

Druh väzby	Dĺžka (nm)	pevnosť väzby (kJ/mol)	
		vo vákuu	Vo vode
Kovalentná	0,15	376	376
Nekovalentná:			
- iónová	0,25	334	13
- vodíková	0,30	17	4
- van der Waalsová	0,35	0,4	0,4

Veľmi dôležité je si uvedomiť, také problémy ako je skutočná hmotnosť a relatívna hmotnosť, kde základný vzťah je charakterizovaný vzťahom:

$$m_{\text{skutočná}} = M_r \cdot u$$

kde $u = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$ (u sa zároveň rovná aj 1 Da)

Zaujímavé sú aj zmeny objemu pri zmene skupenstva. napr.: 1 mol vody vo forme tekutiny má objem 18 ml, ale to isté množstvo vody vo forme plynu zaberá objem 22410 ml (V prípade, že zmena skupenstva nie je doprevádzaná zmenou objemu, mení sa tlak viac ako 1 000 násobne!!!).

Osobitné postavenie má aj molekulová organizácia buniek. Bunka ako základná jednotka života sa vyznačuje (Alberts a spol., 1998):

❖ Samozáchovou:

- * metabolizmus
- * génová expresia
- * štruktúrna organizácia

❖ Reprodukciou:

- * bunkový cyklus
- * bunková proliferácia

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

❖ Komunikáciou:

- * signálne molekuly
- * príjem signály
- * vyslanie signálu

❖ Usporiadáním do tkaniva:

- * organizácia
- * funkcia.

Poškodenie môže byť vyvolané:

- ☒ exogénnymi faktormi (fyzikálne, chemické, biologické)
- ☒ endogénnymi faktormi (genetické, psychické).

Úroveň poškodenia môže byť:

→ Bunková:

- úroveň jadrových génov (chromozómová),
- úroveň mtDNA (extrachromozómová),
- postranlačná úroveň (membrány, receptory, transportné systémy, iónové kanály, enzýmy a pod.),
- regulačná úroveň (intracelulárne disbalancie).

↪ obyčajne končí:

- reparáciu,
- adaptáciu,
- nekrózou,
- apoptózou.

- Tkanivová (interakcie bunka-bunka, bunka-extracelulárna matrix).
- Orgánová.
- Systémová (organizmus, interakcia nervového – endokrinného – imunitného systému).

Najvšeobecnejšie procesy lokalizovateľné na všetky úrovne sú: zápal, stres, homeostáza, porucha acidobázy a pod.).

Živé organizmy, ako otvorené termodynamické systémy, udržujú svoj rovnovážny stav (homeostázu) voči neustálym zmenám vonkajšieho a vnútorného prostredia kontinuálne (steady-state). Prežitie, čiže udržanie tohto rovnovážneho stavu je prvoradou úlohu **regulačných mechanizmov organizmu** (Touger-Decker a spol., 2004). V biologických systémoch sa regulácia deje väčšinou **spätnou väzbou (feed-back)**.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Organizmus s dobrými adaptačnými schopnosťami reaguje na podnety prostredia (vonkajšieho i vnútorného) úpravou tokov látok a energie na udržanie steady-state homeostázy. Pri narušení adaptačnej schopnosti na podnety hovoríme v pravom slova zmysle o chorobe.

Definitívne narušenie rovnovážneho stavu vedie k postupnému narastaniu entropie organizmu až ku smrti. Úlohou medicíny je túto narušenú rovnováhu navrátiť do pôvodného stavu, alebo sa o to aspoň pokúsiť.

Zachovanie rovnovážneho stavu tokov regulovaného systému (udržanie zdravia) je závislé na:

✦ Integrite jednotlivých častí regulačného systému alebo celého systému:

napr. v prípade hypo- alebo hyperfunkcií endokrinného systému, u starých jedincov sa regulačná kapacita významne znižuje.

✦ Stimuloch, ktoré na systém pôsobia:

napr. extrémne podnebie, fyzická záťaž, trauma môžu prevýšiť možnosti kapacity regulačného systému.

Organizmus s dobrou adaptačnou schopnosťou reaguje na opakujúce sa alebo trvalé vonkajšie podnety zmenou rovnovážnych pomerov substrátových tokov, tak aby tieto zabezpečili v nových podmienkach maximálne šance na prežitie, resp. zabezpečenie reprodukčnej schopnosti (napr. adaptácia biotransformačného systému, vytvorenie znášanlivosti ku výkyvom teplo↔zima, vznik antibiotikorezistencie u baktérií).

Adaptačná schopnosť druhu, jedinca na molekulovej úrovni je obyčajne geneticky determinovaná a predstavuje biochemický základ evolúcie. Narušenie tejto adaptačnej schopnosti je vlastne patologický proces, patologický stav alebo choroba. Hlavným cieľom medicínskej praxe je úprava a predchádzanie vzniku zníženej regulačnej schopnosti organizmu a tým zníženej adaptability. To vo väčšine prípadoch sa nedá riešiť spätno-väzobným mechanizmom (v biologickom poňatí), len riadením (napr. aplikácia inzulínu podľa vypracovaného programu kompenzácie pri diabetes mellitus). Spätná väzba by tu mohla byť reprezentovaná laboratórnymi vyšetreniami. Účinnosť takéhoto feed-backu samozrejme nemôže mať úroveň skutočnej biologickej spätnej väzby. Najbližšie k biologickým feed-back mechanizmom stojí využitie biosenzorov v medicínskej praxi, ich možnosti sú ale zatiaľ skôr na úrovni výskumu (napr. glukózový senzor, pacemakery rôzneho typu).

Adaptačné reakcie na úrovni organizmu dobre odrážajú v prípade určitých stimulov narušujúcich homeostázu, otázky životaschopnosti, a otázky podriadenosti, resp. nadriadenosti určitých systémov. Z hľadiska prežitia dôležité orgány (napr.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

mozog, srdce), resp. ich funkciu sa snaží organizmus chrániť a udržať aj na úkor iných systémov (napr. obehovou redistribúciou, alebo dobre to vystihuje aj glukoneogéza).

Narušenie rovnováhy regulačného systému následkom stimulu, nedostatočná alebo chýbajúca (v biologickom i materiálnom zmysle) supraindividuálna výpomocná regulácia (skôr riadenie) znamená narušenie homeostázy (toky substrátov), ktorá môže končiť stratou rovnováhy. Tým začína proces vedúci ku strate usporiadanosti systému (smrti).

Časová relácia tohto je vo významnej miere závislá od odchýleného ukazateľa:

- ☞ kyslík, určité ióny – minúty,
- ☞ iné parametre – dni, týždne až roky.

Smrť je v zmysle termodynamiky zánik kontinuálneho príjmu energie (po biochemickej stránke chápané ako základný metabolizmus) z prostredia organizmom, na udržania vyššej miery usporiadanosti než má prostredie. Po tom už môžu prebiehať len exergonické procesy, ktoré entropiu ďalej zvyšujú. Rýchlosť zvyšovania entropie závisí od:

☞ Stupňa usporiadanosti skúmaného systému:

- ☞ na úrovni molekúl a kompartmentov je rýchla,
- ☞ na úrovni bunky a tkanív je pomalšia,
- ☞ na úrovni orgánov a orgánových sústav je ešte pomalšia,

☞ Stability danej štruktúry:

- ☞ v prípade nervového a parenchýmového tkaniva rýchla,
- ☞ v prípade spojovacieho tkaniva a chrupiek pomalšia,
- ☞ v prípade kostí, zubov je extrémne pomalá.

☞ Od faktorov prostredia:

- ☞ teploty,
- ☞ vlhkosti,
- ☞ prítomnosti alebo neprítomnosti kyslíka.

Rast entropie bývalého živého organizmu trvá dovtedy, kým sa pomer jeho prvkov a zlúčenín nerovná prostrediu. Pri vysokých teplotách (napr. kremácia) rast entropie prebieha mimoriadne rýchle.

BUNKOVÁ SIGNALIZÁCIA A JEJ REGULÁCIA

Cieľom tejto kapitoly je zhrnutie poznatkov vzťahujúcich sa na reguláciu funkcií živej bunky. Tieto sú dôležité pre pochopenie regulácie metabolizmu, regulácie expresie génov, pri štúdiu interakcie nervového, endokrinného a imunitného systému. Po preštudovaní tejto kapitoly musíme mať jasno v tom, aké sú úrovne regulácie, kde

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

sa tieto stretávajú z aspektu neurológie, endokrinológie, imunológie, molekulovej biológie a biochémie (Berridge, 2014). Musíme si uvedomiť aj to, aké základné princípy sa uplatňujú v biologických regulačných systémoch, napr.:

- ✦ Signály.
- ✦ Receptory:
 - ☞ ich úlohu,
 - ☞ ich triedenie,
 - ☞ a ich funkciu.
- ✦ Mechanizmy signálnej transdukcie:

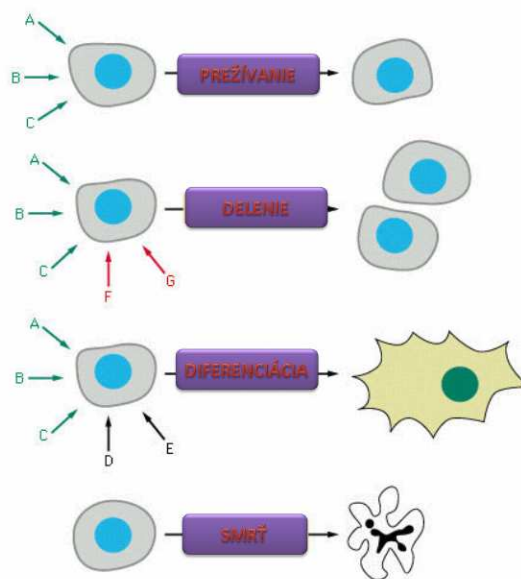
ich štruktúru a logiku, ktoré ako nejaký zosilňovač spájajú v organizme receptory (niekoľko tisíc) a im prináležiace biologické odpovede.

Štúdium tejto kapitoly spočiatku môže vyvolať dojem komplikovanosti a neprehľadnosti. Neslúži na memorovanie (čiže mechanické naštudovanie) ale na demonštráciu mnohorakosti ciest signálnej transdukcie v organizme. Obyčajne nadobudne plný zmysel táto časť až po preštudovaní a pochopení celku. Samozrejme prednášky a seminárne cvičenia budú v tomto ohľade neodmysliteľné.

Každá bunka v mnohobunkovom živočíšnom organizme je programovaná z hľadiska vývoja, diferenciácie, schopnosti odpovedať na špecifické signály, ktoré pôsobia v rôznych kombináciách a regulujú správanie sa bunky, determinujú či bunka bude žiť alebo odumrie, či sa bunka bude deliť alebo zostane v trvalej stacionárnej fáze (G_0). Väčšina týchto signálov pôsobí parakrinnou signalizáciou, v ktorej sú lokálne mediátory rýchlo uvoľňované a deštruované alebo imobilizované, a pôsobia len na susediace bunky. Centrálna kontrola je prítomná pri endokrinnnej signalizácii, keď endokrinnými bunkami sekretované hormóny sú prenášané krvným obehom k terčovým bunkám v tele, a synaptická signalizácia, kde neurotransmitéry sekretované nervovými bunkami pôsobia lokálne na postsynaptické bunky prostredníctvom axónového kontaktu. Signalizujúce bunky musia sekretovať extracelulárne signálne molekuly alebo exprimovať na svojom povrchu ligandy, pre ktoré sa nachádzajú komplementárne receptorové proteíny na terčových bunkách. Takto tieto môžu tieto signály registrovať a reagovať na ne programovanou a charakteristickou cestou. Niektoré malé hydrofóbne signálne molekuly, ako steroidné hormóny, tyroidné hormóny a retinoidy prestupujú (difundujú) cez cytoplazmatickú membránu terčových buniek a aktivujú intracelulárne receptorové proteíny, ktoré priamo regulujú transkripciu špecifických génov. Niektoré rozpustené plyny, ako NO a CO tiež pôsobia ako lokálne mediátory tak, že difundujú cez cytoplazmatickú membránu terčových buniek a aktivujú intracelulárne enzýmy – obyčajne guanylát cyklázu, ktorá zvyšuje hladinu cGMP v terčových bunkách. Väčšina extracelulárnych signálnych proteínov je hydrofilná a sú schopné aktivovať receptorové proteíny len na povrchu terčových

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

buniek. Tieto receptory potom pôsobia ako transducéry signálu do vnútorného prostredia buniek a tak menia vlastnosti terčových buniek. Rozlišujeme tri hlavné rodiny cytoplazmatických povrchových receptorov, ktoré prenášajú extracelulárny signál rôznymi cestami. Receptory viazané na iónové kanály sú transmitérom vrátkované iónové kanály, ktoré sa otvárajú a zatvárajú ihneď po nadviazaní neurotransmitéru, a takto reagujú na neurotransmitér. Receptory spojené s G-proteínmi sú nepriamo aktivované alebo inaktivované enzýmami viazanými na cytoplazmatickú membránu alebo iónové kanály cez GTP-väzobné proteíny (G-proteíny). Receptory viazané na enzým účinkujú priamo ako enzým alebo sú spojené s enzýmom. Enzýmy sú obyčajné proteínkinázy, ktoré fosforylujú špecifické proteíny v terčových bunkách. Prostredníctvom kaskády prísne regulovaných fosforylácií proteínov, vzniká celý rad proteínov zabezpečujúcich prenos signálu z povrchu buniek do jadra, a tým ovplyvňujú expresiu špecifických génov a následne menia chovanie sa buniek. Krížovou komunikáciou medzi rôznymi signálnymi kaskádami sú schopné bunky integrovať rôzne signály, ktoré zachytávajú z prostredia (obr. 2).



Obr. 2 – Účinok signálov z prostredia

Jednou z dôležitých funkcií buniek v mnohobunkovom organizme je preto koordinácia všetkých procesov, ktoré umožňujú existenciu organizmu ako celku (Ništiar a spol., 2005). Táto koordinácia je podmienená schopnosťou dorozumievania sa medzi bunkami pomocou správ t.j. **signálov** a schopnosti buniek reagovať na prijaté signály na základe pomerne komplikovaného **signálno-transdukčného mechanizmu**.

Signálna transdukcia je jednou z najštudovanejších a najdynamickejšie sa rozvíjajúcich oblasti molekulej biochémie. Poznatky v tejto oblasti sa zdvojnásobujú každé 3-4 roky. V posledných rokoch bolo v tejto oblasti udelených 5 Nobelových cien za:

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- ▣ za objav fosforylácie bielkovín a G proteínov,
- ▣ za vypracovanie patch clamp techniky
- ▣ za objav dopamínu a jeho receptoru a mechanizmu účinku
- ▣ vo výhľade Nobelová cena popis nukleárných receptorov.

S jednoduchou signalizáciou (komunikáciou) medzi bunkami sa stretávame už u jednobunkových organizmov. Túto skutočnosť sme preukázali aj na našom pracovisku pri štúdiu prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Ako príklad uvedieme výsledky našich štúdií, pri ktorých sme zistili, že vystavenie prvoka toxickej látke (organofosfát dichlórvos) v dávke LD₅₀ (t.j. dávka, ktorá usmrťí polovicu buniek vystavených jeho účinku), prežívajúce prvoky získajú odolnosť voči tejto toxickej látke (adaptácia), ktorú udržia po niekoľko sto generácií (imprinting?). Pri zmiešaní prvokov, ktorí boli vystavený toxickej noxe a prežili s prvokmi, ktoré sa s toxickou látkou nikdy nestretli, získajú tieto schopnosť odolať toxickej látke od ošetrovaných (pomocou signalizácie, čiže komunikácie medzi bunkami).

Význam a priebeh transdukcie (predávania, odovzdávania) signálov u mnohobunkových organizmov je rovnaký ako u jednobunkových, ale realizuje sa na omnoho komplikovanejšej úrovni (časovo-priestorovej sieti). Bunky mnohobunkových organizmov sú vystavené obrovskému množstvu signálov v mnohomiliónových kombináciách, ktoré prichádzajú ku bunke z obklopujúceho extracelulárneho prostredia, od okolitých alebo aj vzdialenejších buniek alebo vznikajú aj v samotných bunkách. Bunky sú potom geneticky naprogramované tak, že môžu reagovať na signály selektívne podľa svojho špecifického charakteru (diferenciácie) a vývojového štádia organizmu. Prenos signálov v bunkách až k ich definitívnej realizácii v podobe expresie génov je umožnený zložitým **signálno-transdukčným systémom**.

Signál

Bunky vyšších živočíchov sa dorozumievajú prostredníctvom obrovského počtu **signálnych molekúl** (Davies, 2016). Signály ale môžu byť aj podnety nechemickej povahy (v niektorých prameňoch sa tieto za signály nepovažujú, ale o čom by potom boli baroreceptory, rádioreceptory a pod.). Väčšina signálnych molekúl je secernovaná bunkami – tzv. **signalizujúcimi bunkami**, a to exocytózou alebo difúziou cez cytoplazmatickú membránu, a následne sú prepravované k terčovým bunkám. Niektoré signálne molekuly však zostávajú viazané k extracelulárneho matrix alebo ku povrchu secernujúcej bunky a ovplyvňujú tak len tie bunky, ktoré sú v bezprostrednej blízkosti extracelulárny signál secernujúcej, resp. ligand exprimujúcej bunky alebo sa jej priamo dotýkajú. Tento kontaktný spôsob prenosu signálov je veľmi dôležitý počas vývoja a pri imunitnej odpovedi. Jeho molekulová podstata je však veľmi podobná molekulovej podstate signalizácie na diaľku.

Signály delíme na:

① **Vonkajšie signály:**

✦ Podľa pôvodu:

▲ Z vonkajšieho prostredia:

- ★ svetlo,
- ★ pach,
- ★ živina,
- ★ zvuk,
- ★ teplo.

▲ Z buniek organizmu:

- ★ neuropeptidy,
- ★ neurotransmitéry,
- ★ hormóny,
- ★ metabolity,
- ★ cytokíny,
- ★ antigény a protilátky,
- ★ plyny.

▲ Z okolia buniek:

- ★ dotýkajúce sa bunky,
- ★ iónové zloženie,
- ★ zloženie plynov a pod.

✦ Podľa štruktúry:

▲ Peptidy:

- ★ glukagón,
- ★ vazopresín,
- ★ oxytocín.

▲ Aminokyseliny alebo ich deriváty:

- ★ serotonín,
- ★ tryptamín,
- ★ GABA,
- ★ histamín,
- ★ glutamát.

▲ Uhľovodíky:

- ★ glukóza.

▲ Lipidy:

- ★ PAF (*platellet activating factor*),
- ★ steroidné hormóny,
- ★ retinol,
- ★ prostanoidy.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

▲ Nukleozidy a nukleotidy:

- ★ adenoín,
- ★ ATP.

▲ Plyny:

- ★ NO
- ★ CO.

▲ Fotóny:

- ★ svetlo.

▲ Ióny:

- ★ Ca²⁺.

✦ Podľa mechanizmu účinku:

▲ Nepenetrujúce (lipofóbne - hydrofilné):

- ★ účinkujúce cez receptory viazané na membránach.

▲ Penetrujúce (lipofilné - hydrofóbne):

- ★ účinkujúce na cytoplazmatické terče (ciele),
- ★ účinkujúce prostredníctvom jadrových receptorov.

🕒 **Signály vznikajúce v bunke:**

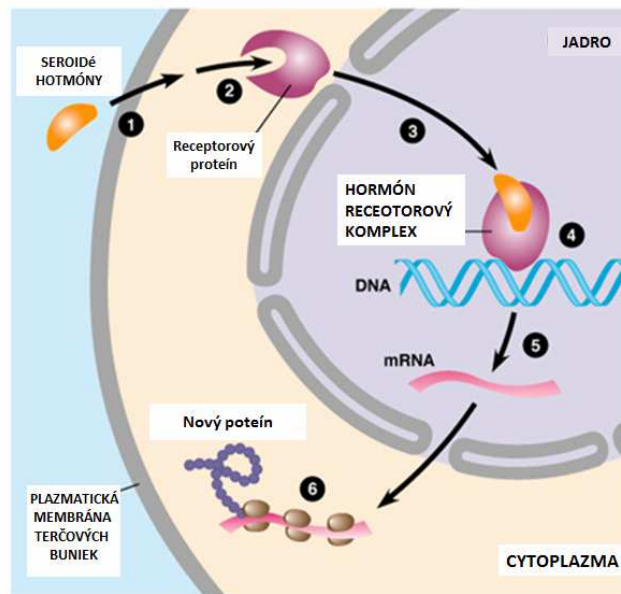
Dnes vieme ešte veľmi málo o signálnej transdukcii vo vnútri bunky. Tieto signály informujú o vnútorných pomeroch v bunke. Často sú to metabolity. Takou informáciou je poškodenie DNA, intracelulárna koncentrácia iónov, objem bunky a pod.

Lipofilné signálne substancie: Sem je možné zaradiť steroidné hormóny, tyroidné hormóny, retinoidy a α -ekdyson (steroidný hormón aktivujúci transkripciu génov potrebných pre zahájenie metamorfózy u hmyzu). Všetky tieto látky sú malé hydrofóbne molekuly, ktoré sa navzájom líšia, tak po stránke chemickej štruktúry ako i funkcie. Účinkujú však podobným spôsobom. Lipofilné signálne substancie sú po svojom vzniku secernované do krvného riečišťa. V krvnej plazme zotrávajú niekoľko hodín (steroidy) až niekoľko dní (tyroxín). Sú zle rozpustné vo vodných roztokoch a preto sú v krvi pevne ale reverzibilne viazané na bielkovinové nosiče. Takto sú prenesené z miesta vzniku ku terčovým bunkám, kde sa z väzby uvoľňujú. Do terčovej bunky vstupujú plazmatickou membránou jednoduchou difúziou. V bunke sa reverzibilne viažu na proteíny vnútrobunkových receptorov. Ich účinok je dlhodobý. Do tejto skupiny signálnych látok je možné zaradiť aj niektoré malé molekuly, ako sú oxid dusnatý (NO) a oxid uhoľnatý (CO). Tieto molekuly tiež ľahko prechádzajú plazmatickou membránou, kde regulujú aktivitu špecifických vnútrobunkových proteínov (obr. 3).

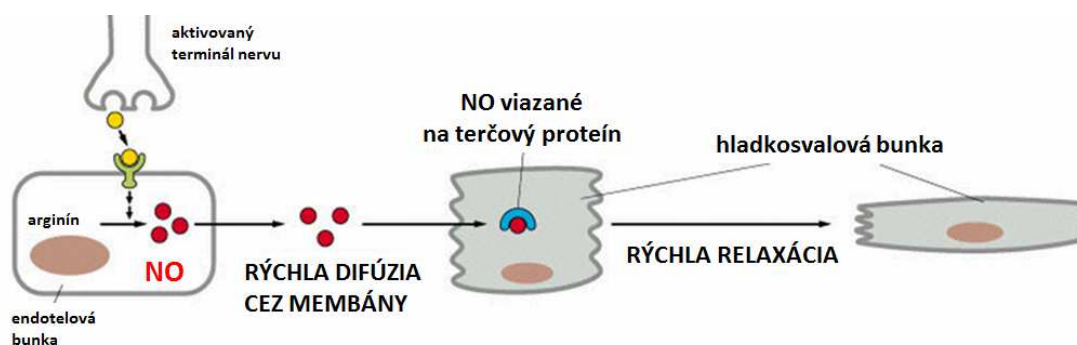
NO je produkovaný dezamináciou aminokyseliny arginínu NO syntázou (obr. 4). Do susedných buniek vstupuje priamo difúziou plazmatickými membránami. Účinkuje len lokálne, nakoľko jeho trvanie je krátke (Tab. 2.3). V priebehu 5-10 sekúnd je v extracelulárnom priestore premenený na nitráty a nitrity. V mnohých terčových

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

bunkách, ako sú napr. endoteliové bunky, reaguje s guanylátcyklázou, prostredníctvom ktorej stimuluje produkciu cGMP v bunke. Jeho účinky sa prejavujú v priebehu niekoľkých sekúnd, nakoľko obrat cGMP je veľký. Rýchla produkcia cGMP z GTP guanylátcyklázou je vyvážená rýchlou degradáciou cGMP fosfodiesterázou. Stejným spôsobom, tj. stimuláciou guanylátcyklázy, účinkuje aj **CO**. Typickým príkladom je relaxačný účinok NO na bunky hladkej svaloviny endotelu ciev, alebo ako lokálneho mediátora makrofágov a neutrofilov aktivovaných mikroorganizmami. Prostredníctvom takto stimulovaných buniek sa NO podieľa na zabíjaní mikroorganizmov.



Obr. 3 – Mechanizmus účinku steroidných hormónov. 1. Prechod cez membránu. 2. Naviazanie na cytoplazmaticky receptorový proteín. 3. Prestup do jadra. 4. Vytvorenie hormón receptorového komplexu. 5. Transkripcia 6. Translácia.



obr. 4 – Účinok NO

Eikozanoidy sú signálne molekuly, ktoré sa u dospelých cicavcov zúčastňujú predovšetkým autokrinnej signalizácie, resp. aj parakrinnej (Dennis a Norris, 2015). Sú to prevažne deriváty nenasýtenej mastnej kyseliny, kyseliny arachidonovej, ktorá je uvoľňovaná z fosfolipidov membrán po ich štiepení fosfolipázami. Sú nepretržite syntetizované v plazmatickej membráne buniek všetkých tkanív a uvoľňované do ich

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

prostredia, kde sú rýchlo degradované. Aspirín a iné protizápalové látky ich syntézu inhibujú. Eikozanoidy ovplyvňujú kontrakciu hladkej svaloviny, agregáciu trombocytov, zúčastňujú sa v procesoch pri bolestiach a zápaloch. Syntéza eikozanoidov stúpa po aktivácii buniek poškodením tkaniva alebo po účinku určitých typov chemických signálov. V dôsledku toho zvýšená hladina eikozanoidov v mieste ich sekrécie ovplyvňuje jak bunky, ktoré ich secernovali, tak aj bunky v ich bezprostrednom okolí.

Tab. 3 – Príklady pre NO indukovanú biologickú odpoveď

NO produkujúca bunka	Signál	Terčová bunka a jej biologická odpoveď
Cievny endotel	Acetylcholín ADP, trombín endotoxín, cytokín	Relaxácia hladkej svaloviny cievnej steny
Neurón	Neurotransmitter	cievna hladká svalovina (erekcia penisu)
Neurón	pri krvácaní do mozgu Glu neurotransmitter	odumieranie neurónov
Makrofág	Antigén	Odumretie fagocytovanej bunky

Lipofóbne signálne substancie: Všetky signálne substancie rozpustné vo vode a nerozpustné v tukoch ako aj niektoré v tukoch rozpustné, nemôžu voľne difundovať cez plazmatickú membránu a tak sa viazať na vnútrobunkové receptory. V dôsledku toho sa viažu na membránové receptory uložené v plazmatickej membráne. Medzi lipofóbne signálne substancie je možné zaradiť proteohormóny (inzulín, glukagón, rastové hormóny) a nízkomolekulové látky (aminokyseliny, adrenalín, noradrenalín, nukleotidy). Ich účinok je obyčajne bezprostredný a trvá len veľmi krátko. Bunky reagujú prevažne v priebehu niekoľkých sekúnd, v niektorých prípadoch aj milisekúnd (neurotransmitéry). Avšak malé peptidické rastové faktory navodia zmeny v génovej expresii väčšinou až v priebehu niekoľkých minút a ich účinok môže pretrvávať aj niekoľko dní. Tieto faktory sú nutné pre rast a diferenciáciu špecifických bunkových typov.

Receptor

Terčová bunka (*target cell*) je schopná reagovať na molekuly signálnej látky len prostredníctvom špecifických proteínov – **receptorov**. Signálne molekuly, ktoré sa špecifickým spôsobom viažu k týmto receptorom sa nazývajú **ligandy** a s proteínmi receptorov vytvárajú **ligand-receptorové komplexy**.

Za **receptor** považujeme **špecifický rozpoznávací element** (obyčajne viazaný na membránu alebo voľne sa vyskytujúci v cytoplazme).

Receptory sú proteíny, ktoré sú schopné špecificky viazať signálne molekuly.

Receptory môžu byť uložené:

→ v plazmatickej membráne - **membránové receptory**,

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

→ v cytosole (alebo v jadre) - **vnútrobunkové receptory**.

Podľa spôsobu prevodu (transdukcie) signálu z extracelulárneho prostredia do vnútra bunky do podoby vnútrobunkových signálov membránové receptory rozdeliť na tri základné typy:

- ⇒ **iónové kanály,**
- ⇒ **receptory spojené s aktiváciou G proteínov,**
- ⇒ **receptory s enzýmovou aktivitou.**

Význam **väzby na receptor** je základným procesom pre zahájenie signálnej transdukcie. Je závislý od:

- špecificity väzby,
- dávky (sily) signálu,
- zosilnenia.

Vieme že:

- rovnaký typ receptora sa môže vyskytovať na rôznych bunkách, čo umožňuje zosúladiť funkciu viacerých typov buniek naraz,
- počtom receptorov, resp. inhibíciou receptorov je možné regulovať to, aké signály bude daná bunka vnímať.

Na druhej strane stejný signál môže aktivovať rozličné receptory. Napr.:

- ⊗ 9-cis-retinol – RXR α,β,γ ; RAR α,β,γ ⇒ čo vedie k aktivácii rôznych génov.
- ⊗ acetylcholín – nikotínergne ⇒ Na⁺ kanáliky,
– muskarínergne ⇒ fosfolipáza C.
- ⊗ adrenalín – α_1 ⇒ fosfolipáza C
adrenalín – α_2 ⇒ adenylátcyklázu inhibujúci
adrenalín – β_1 ⇒ adenylátcyklázu aktivujúci
adrenalín – β_2 ⇒ adenylátcyklázu aktivujúci.

Najtypickejší je účinok acetylcholínu, ktorý u priečne pruhovaných svalov vyvolá kontrakciu, u myokardu relaxáciu a u sekretorických buniek sekréciu.

Signálna transdukcia

Proces (kaskáda dejov), ktorý sa odohráva od nadviazania na receptor po biologickú odpoveď nazývame **signálna transdukcia**. Je veľa receptorov a tým aj veľa rôznych biologických odpovedí. Medzi oboma zabezpečuje prepojenie pomerne málopočetných, podobnou logikou pracujúcich signálotransdukčných sústav. Ich triedenie sa robí na základe receptora.

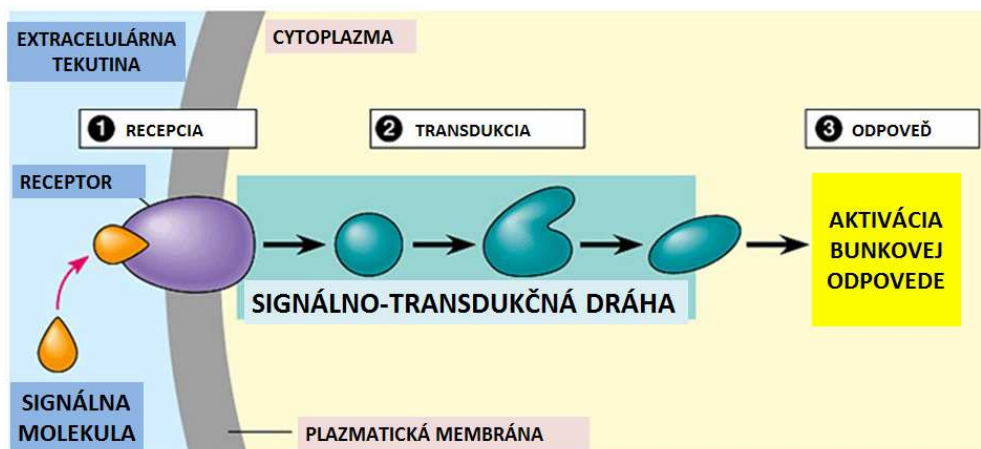
Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

V mnohobunkovom organizme je možné komunikáciu medzi bunkami pomocou extracelulárnych signálov rozdeliť do nasledovných krokov (obr. 5):

1. syntéza sprostredkujúcej látky (signálu),
2. secernácia signálnej molekuly z produkujúcej bunky,
3. transport signálu k terčovej bunke,
4. detekcia (zachytenie) signálu terčovou bunkou,
5. transdukcia a transport k zodpovedajúcej výkonnej štruktúre,
6. vytvorenie odpovede,
7. ukončenie účinku signálnej molekuly (eliminácia signálnej molekuly).

Na regulačné mechanizmy je charakteristická ich citlivosť, čo môže byť pomerom signálu a ním vyvolanej biologickej odpovede. K zabezpečeniu toho sa vyvinuli rôzne spôsoby zosilňovania, ako:

- ∞ koncentrácia substrátu,
- ∞ alostéria,
- ∞ interkonverzný cyklus,
- ∞ substrátový cyklus,
- ∞ kaskádový systém.



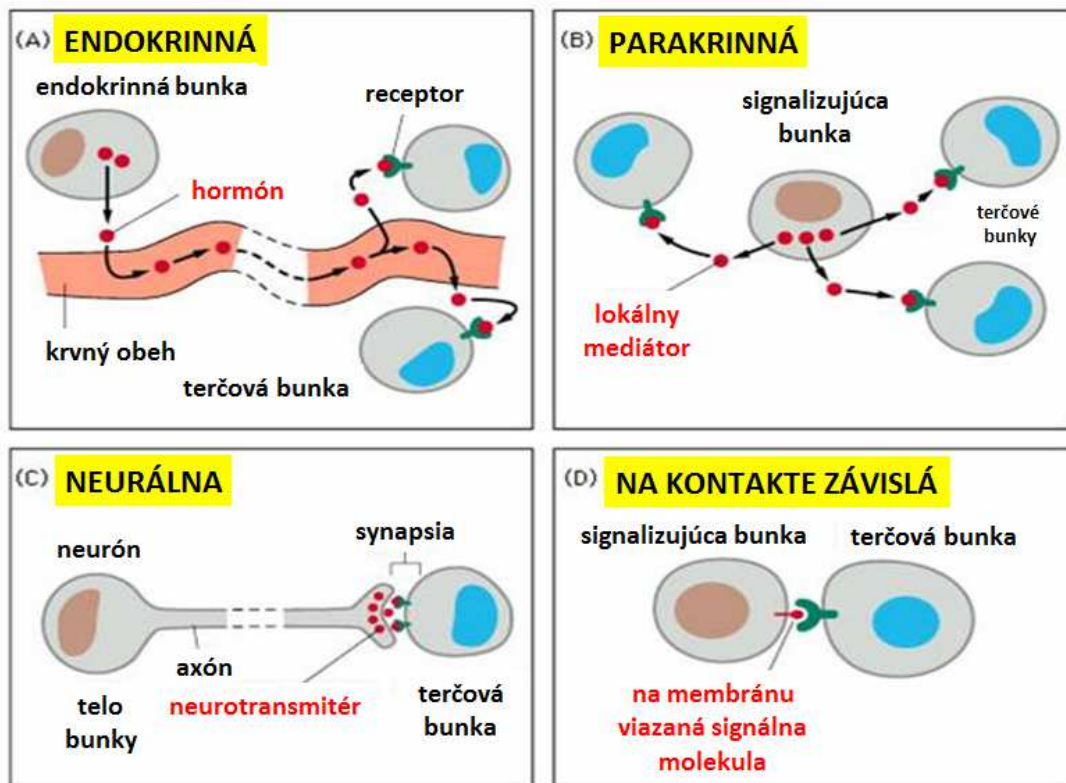
obr. 5 – Základné etapy spracovania signálu

Signálna transdukcia vedúca k štiepeniu glykogénu obsahuje všetky uvedené zosilňovacie mechanizmy:

- * alostériu: regulácia glykogén fosforylázy pomocou AMP, ATP a glukózou,
- * substrátový cyklus: vzniká medzi glykogén fosforylázou a glykogén syntetázou,
- * interkonverzný cyklus: tak glykogén fosforyláza ako aj kináza je regulovaná fosforyláciou,
- * kaskáda: adenylát cykláza → cAMP → fosforylázová kináza → glykogén fosforyláza.

Signálna transdukcia a jej charakterizácia

Komunikácia medzi bunkami (obr. 6):



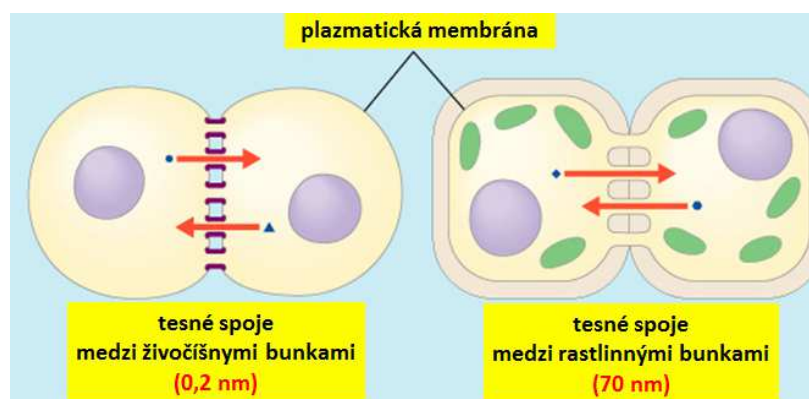
obr. 6 – Medzibunková signalizácia.

Sa realizuje prostredníctvom sekrétovaných molekúl:

- parakrinná signalizácia,
- endokrinná signalizácia,
- synaptická signalizácia.

Prostredníctvom molekúl viazaných na plazmatickú membránu (Beňačka a spol., 2004):

- bunková adhézia,
- bunkové spoje (junction) a extracelulárna matrix (obr. 2.7).



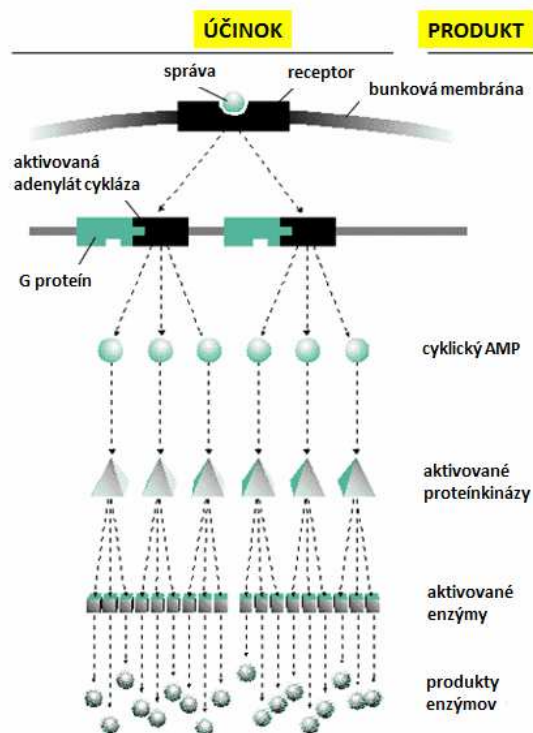
obr. 7 – Tesné spoje medzi bunkami

Receptory a hydrofóbnosť signálnych molekúl:

Receptory na povrchu buniek a hydrofilné signálne molekuly:

- Typy povrchových receptorov buniek.
- Prvý posol (príslušný hormón, externý signál).
- Druhý posol (vnútorný signál):
 - cAMP ako druhý posol (G proteíny a syntéza cAMP, regulácia G proteínov, cAMP a degradácia glykogénu).
 - Ca^{++} ako druhý posol (kalcium väzobný proteín, kalmodulín).
 - Inozitol trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG) ako druhý posol.
- Tretí posol: proteín a proteínfosfatáza.
- Štvrtý posol: transkripčné faktory (posli v jadre).

Celý tento proces má za účel vnútrobunkové zosilnenie (amplifikáciu) signálu (obr. 8).



obr. 8 – Signálno transdukčná kaskáda (amplifikácia)

Intracelulárne receptory a hydrofóbnosť signálne molekuly:

- Difúzia do bunky.
- Vázba na intracelulárny receptor.
- Indukcia konformačnej zmeny receptoru.

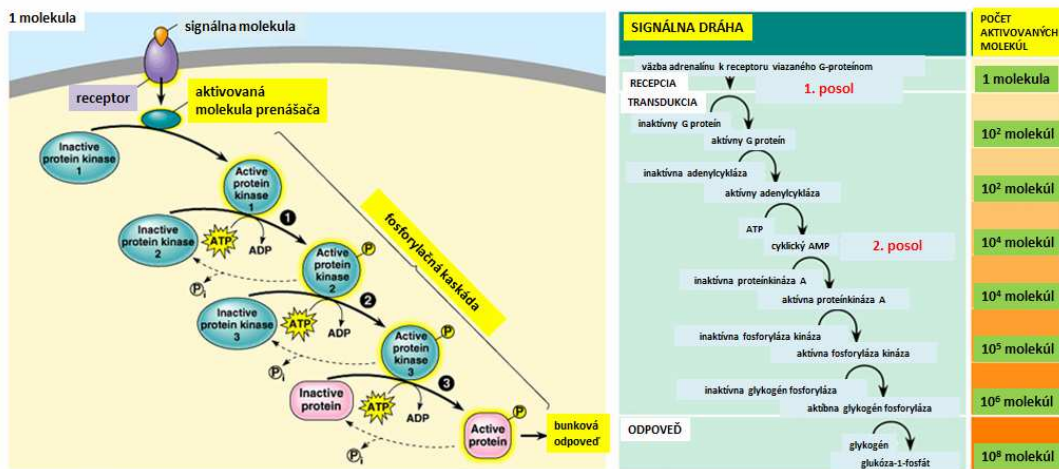
Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- Aktivovaný receptorový komplex vstupuje do jadra.
- Väzba k „response“ elementu DNA (napr. HRE, *hormone response element*).

Amplifikácia signálu

Kaskáda intracelulárnych dejov a amplifikácia extracelulárneho signálu (obr. 9):

- rýchly turnover intracelulárnych mediátorov,
- „všetko alebo nič“ účinok chemického signálu,
 - kooperativita,
 - aktivácia jedného enzýmu inhibíciou druhého katalyzujúceho opačnú reakciu.



Obr. 9 – Vnútrobnková signalizačná kaskáda (amplifikácia signálu).

Adaptácia terčovej bunky a jej mechanizmus:

- down-regulácia receptorov
 - sekvestráciou receptoru,
 - degradáciou receptoru,
 - receptorom sprostredkovaná endocytóza.

Inaktivita receptoru.

Inaktivita všetkých receptorových bielkovín.

Signalizácia bunka-bunka:

- prežívanie mnohobunkového organizmu závisí od funkcie intracelulárneho komunikačného networku, ktorý koordinuje rast, diferenciáciu a metabolizmus buniek v rozličných tkanivách a orgánoch,
- iné dôležité mechanizmy prostredníctvom ktorých môžu bunky komunikovať - pomocou extracelulárnych **signálnych molekúl**,

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- tieto špecifické substancie sú syntetizované a uvoľňované **signalizujúcimi bunkami** a vyvolávajú špecifickú odpoveď len v **terčových bunkách** ktoré majú receptor pre signálne molekuly,
- extracelulárne signálne molekuly môžu difundovať do krvi a byť krvou transportované.

Sumarizácia: Komunikácia extracelulárnymi signálmi zahrňuje šesť krokov:

1. syntézu a
2. uvoľnenie signálnej molekuly signalizujúcou bunkou
3. transport signálu k terčovej bunke
4. detekciu signálu špecifickým receptorovým proteínom
5. a zmenu v metabolizme bunky alebo v spustení expsie génu komplexom receptor-signálna molekula
6. odstránenie signálu, najčastejšie po ukončení odpovede bunky (biologický efekt).

Aj mnohé mikroorganizmy komunikujú prostredníctvom sekrétovaných molekúl (**feromónov**).

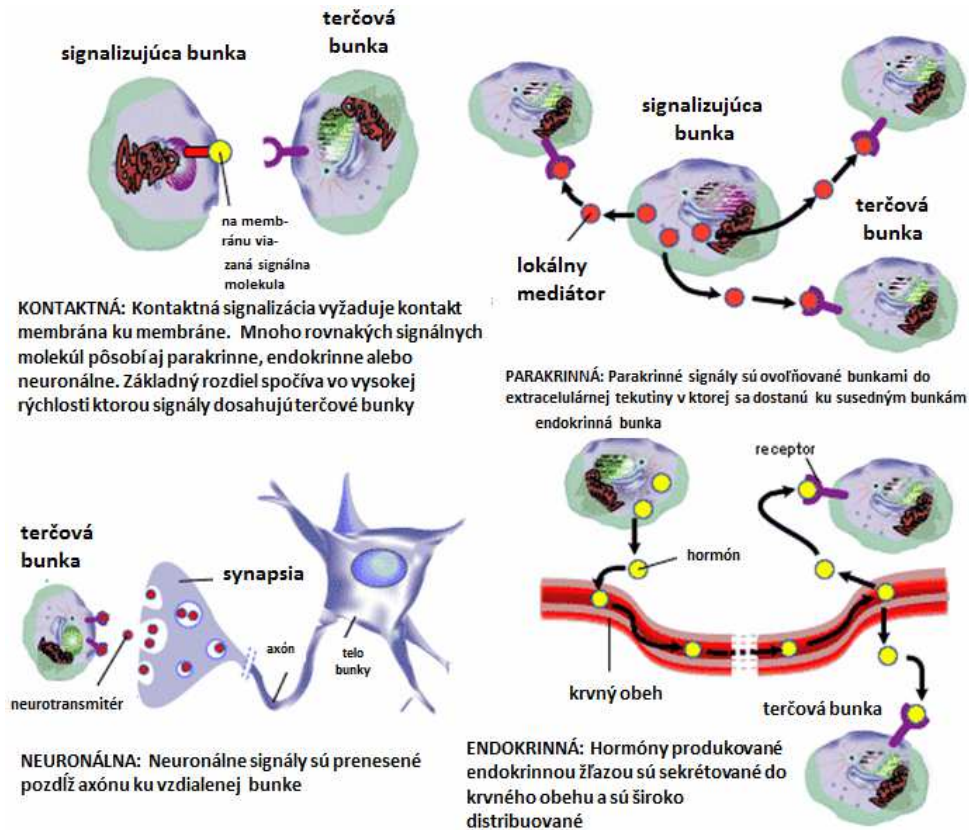
Pre rastliny a živočíchy sú veľmi dôležité extracelulárne signálne molekuly pôsobiace v **blízosti** organizmu.

Signálne molekuly u živočíchov

- Signalizácia extracelulárne sekretovanými molekulami môže byť trojakého typu:
- endokrinná,
 - parakrinná a
 - autokrinná

naviac, niektoré proteíny na povrchu jednej bunky (ligand) môžu slúžiť ako signál pre susednú bunku.

- **Endokrinná signalizácia** – signálne molekuly pôsobia na terčovú bunku vzdialenú od miesta ich syntézy, ktorým obyčajne sú bunky endokrinných žliaz (obr. 10).
- **Parakrinná signalizácia** – signálne molekuly pôsobia len na bunky v blízkosti signalizujúcej bunky.
- **Autokrinná signalizácia** – bunka odpovedá na signálnu molekulu, ktorú sama produkuje.



Obr. 10 – Základné spôsoby signalizácie

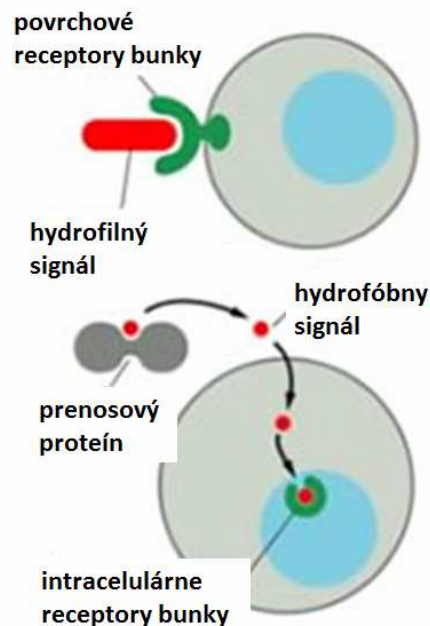
Receptorové proteíny a väzba ligandu:

- Odpoveď bunky na určitú extracelulárnu signálnu molekulu závisí od jej väzby na špecifický **receptorový proteín** lokalizovaný na povrchu terčovej bunky, alebo v jej cytozole resp. v jadre.
- Signálna molekula je **ligand**, ktorý je komplementárny s príslušným miestom receptora.
- Väzba ligandu na receptor vyvolá konformačnú zmenu receptora, čo iniciuje sekvenciu reakcií vedúcich k zmene funkcie bunky.
- Odpoveď bunky alebo tkaniva na špecifické hormóny je daný špecificitou hormónového receptora, ktorý svojou konformačnou zmenou po väzbe ligandu spustí intracelulárne reakcie.
- Receptorové proteíny sú charakterizované **väzbovou špecificitou** pre určité ligandy – a následkom toho komplex receptor-ligand vyvolá **efektorovú špecificitu**.
- Ligandy vo väčšine systémov ligand-receptor okrem nadviazania sa na receptor už nevykonávajú iné úlohy.
- Terčová bunka obyčajne modifikuje alebo odbúra ligand.

Hormóny:

Existujú tri veľké skupiny hormónov (obr. 11):

1. malé lipofilné molekuly, ktoré difundujú cez plazmatickú membránu a interagujú s intracelulárnymi receptormi,
2. hydrofilné alebo
3. lipofilné molekuly ktoré sa nadväzujú na receptor na cytoplazmatickej membráne buniek.



Obr. 11– Extracelulárne signálne molekuly viažuce sa k povrchovým a intracelulárnym receptorom

1. **Lipofilné hormóny:**

- Difundujú cez plazmatickú membránu a interagujú s receptormi v cytosole alebo v jadre.
- Výsledné komplexy hormón-receptor sa viažu na oblasti DNA kontrolujúce transkripciu a tak vplývajú na expresiu špecifických génov.
- Medzi tieto patria steroidy, tyroxín a kyselina retinová.

2. **Vo vode rozpustné hormóny:**

- Nedifundujú cez plazmatickú membránu ale viažu sa na **povrchové receptory bunky**.
- Sú známe dva skupiny:
- peptidové hormóny, zložené od niekoľkých aminokyselín až po proteíny,
- malé molekuly s nábojom, ktoré sú deriváty aminokyselín a fungujú ako hormóny a neurotransmitéry.
- Účinok hormónov viažucich sa na povrchové receptory je obvyčajne krátkodobý, perzistujú len krátko.

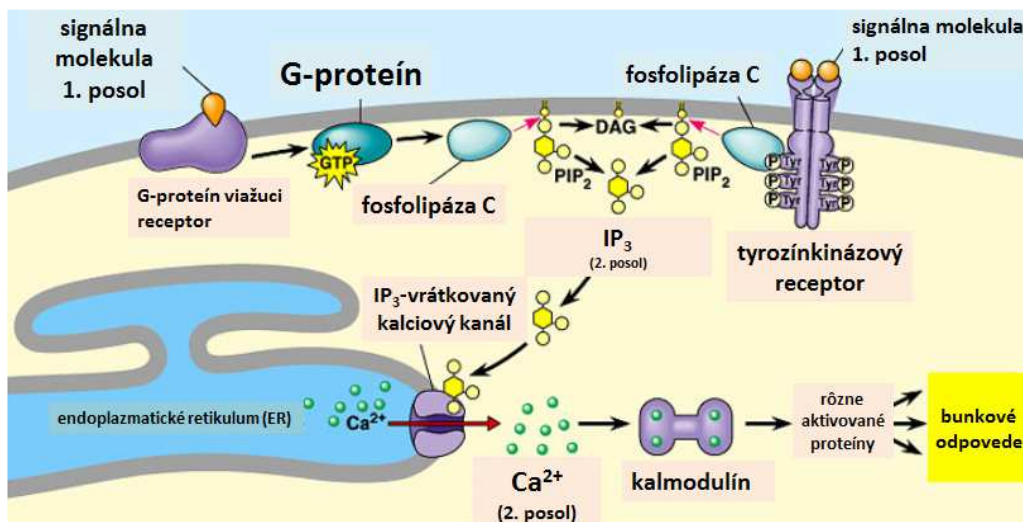
- Účinok peptidových rastových faktorov ovšem môže pretrvávať aj niekoľko dní.

3. Lipofilné hormóny s receptorom na povrchu buniek:

- Ide najmä o hormóny patriace k prostaglandínom.
- Poznáme 16 typov patriacich do 9 rôznych chemických tried, označovaných PGA - PGI.
- Modulujú odpoveď na iné hormóny.

Účinok hormónov a druhé posly (obr. 12):

- Väzba ligandov k rôznym povrchovým receptorom na bunkách vedie ku krátkodobému zvýšeniu (alebo zníženiu) koncentrácie intracelulárnych signálnych molekúl nazývaných **druhé posly**.
- Najdôležitejšie druhé posly: 3',5'-cyklický AMP (cAMP), 3',5'-cyklický GMP (cGMP), 1,2-diacylglycerol (DAG), inozitol 1,4,5-trifosfát (IP₃) a Ca²⁺.
- Zvýšené koncentrácie jedného alebo viacerých druhých poslov sa spúšťa po väzbe hormónu na receptor a vedie k zmenenej aktivite jedného alebo viacerých enzýmov alebo bielkovín neenzýmovej povahy.
- Odstránenie alebo odbúranie ligandu alebo druhotného posla, alebo inaktivácia ligand viažúceho receptora môže ukončiť odpoveď bunky na extracelulárny signál.



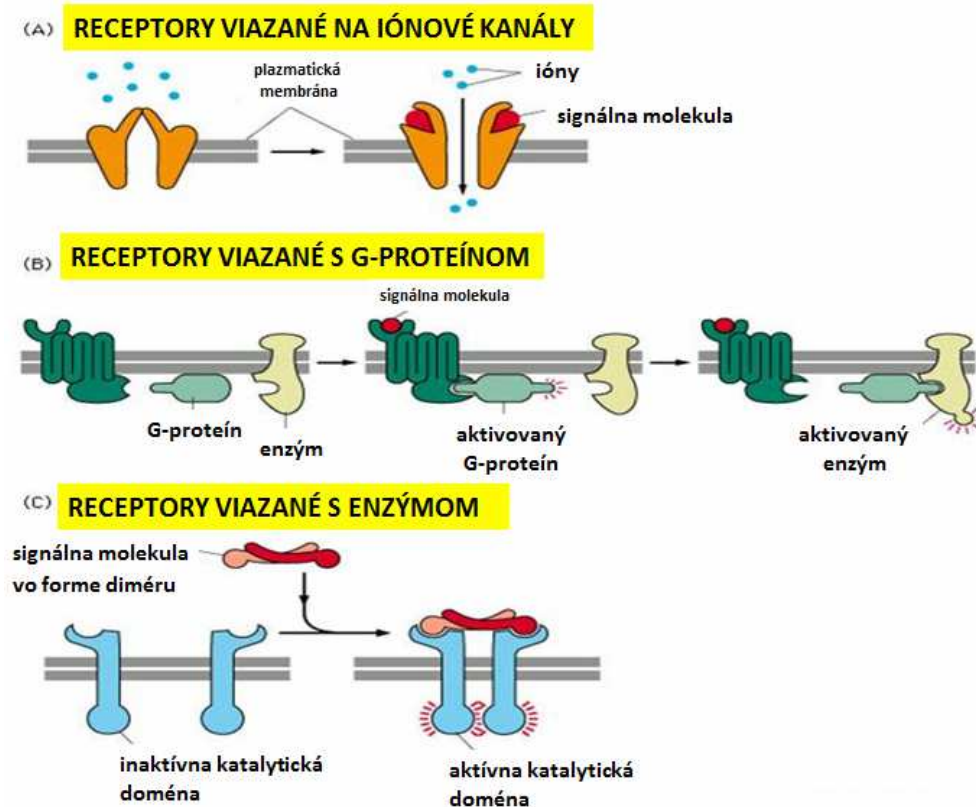
Obr. 12 – Úloha druhých poslov v signálnej transdukcii

Triedy povrchových receptorov bunky:

- Je možné ich zaradiť do niekoľkých tried (obr. 13):

 1. S G-proteínmi spojené receptory.
 2. Iónovo kanálové receptory.
 3. Receptory nemajúce katalytickú aktivitu ale priamo spojené s cytosolovými tyrozínovými proteinkinázami.

4. Receptory s enzýmovou aktivitou (RTKs - receptorové tyrozínové kinázy).



Obr. 13 – Hlavné triedy povrchových bunkových receptorov

Syntéza, uvoľňovanie a odbúravanie hormónov:

- Vzhľadom na ich výrazný účinok, hormóny a neurotransmitéry musia byť prísne regulované.
- Uvoľňovanie a odbúravanie niektorých signálnych molekúl je regulovaná ich rýchlou tvorbou a krátkodobým účinkom; v prípade iných je ich účinok pomalší ale vyvolávajú dlhodobjší účinok.

Peptidové hormóny a katecholamíny:

- Rýchla odpoveď na zmeny vnútorného a vonkajšieho prostredia je sprostredkovaná obvyčajne peptidovými hormónmi a katecholamínmi.
- Všetky peptidové hormóny, vrátane inzulínu a adrenokortikotropného hormónu (ACTH) sú syntetizované ako väčšie polypeptidy, ktoré sú štiepené špecifickými proteázami a až po tom sa z nich tvorí aktívna molekula, ktorá je potom ihneď transportovaná do sekréčnej vakuoly.
- Stimulácia signalizujúcich buniek neurotransmitermi alebo hormónmi vyvolá okamžitú exocytózu peptidových hormónov do okolitej extracelulárnej tekutiny alebo do krvi.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- Uvoľnené catecholamíny sú inaktivované rôznymi enzýmami alebo vycyтанé bunkami.
- Iničiálne účinky týchto signálnych substancií na terčové bunky trvajú len sekundy alebo minúty.

Steroidné hormóny a tyroxín:

- Steroidy produkujúce bunky majú malé zásoby hormónového prekursoru, ale nemajú aktívny, zrelý hormón.
- Ak sú stimulované, bunky premenia prekursor na aktívny hormón, ktorý difunduje cez plazmatickú membránu do krvi.
- Podobne **tyreoglobulín**, jódovaný prekursor tyroxínu je uskladnený v tyroidných folikuloch.
- Nakoľko signalizujúce bunky produkujúce tyroxín a steroidné hormóny, uskladňujú len málo aktívneho hormónu, uvoľňujú ho pomaly v priebehu hodín až dní.
- Tieto hormóny, nakoľko sú vo vode slabozpustné, sú transportované v krvi prostredníctvom proteínových prenášačov; pevne viazané aktívne hormóny sú odbúravané len pomaly.

G-proteíny sú membránové bielkovinové komplexy viažuce guanínové nukleotidy (GDP, GTP). Sú členmi veľkej rodiny s GTP-ázovou aktivitou do ktorej patrí aj elongačný faktor Tu a veľká skupina proteínov okolo 20-25 kD, ako napr. p21 - ras, rho/rac, rab a ran, ktoré sú významné pri proliferácii buniek. Oproti ostatným GTP-ázam, ktoré pozostávajú len z jednej podjednotky, G-proteíny majú tri subjednotky:

- ✿ α – 14 základných typov a 23 štiepením mRNA, 39-52 kDa
- ✿ β – 5 základných typov, 35-37 kDa,
- ✿ γ – 7 základných typov, 8-10 kDa.

Na regulácii iónových kanálov sa zúčastňujú:

- ✗ priamou väzbou (R-G-K)
- ✗ nepriamou väzbou cez fosfolipidy.

Vplývajú na kanály typu:

- ✿ voltážno-dependentné a
- ✿ ligandovo aktivované.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Z hľadiska štruktúry G-proteíny delíme:

- ☛ Heterotrimerické G-proteíny, 130 proteínov v 5 triedach.
- ☛ Monomerické G-proteíny, 30 proteínov v 5 triedach.

K membránam sa pripájajú lipidovým chvostom (α :myristoilovaným, γ :prenylovaným).

Okrem cytoplazmatickej membrány sú G-proteíny významné aj vo vnútrobunkových membránach a zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii membránového transportu vo všetkých membránach bunky, a preto sú mimoriadne dôležité pri niektorých chorobách (tabuľka 4).

Tab. 4 – Vzťah G-proteínov k chorobám

OCHORENIE	defektný G-proteínový receptor	defektný G-proteín
familiárna hyperkalciurická hyperkalciémia	BoCa receptor	
Hypertyreoidizmus	tyreotropný receptor	
Včasná puberta	LH receptor	
X-viazaný diabetes insipidus	V2 vazopresinový receptor	
Farbosleposť	rodopsinový receptor	
vrodené chýbanie glukokortikoidov	ACTH receptor	
Albrightová osteodystrofia		$G_{s\alpha}$
McCune-Albrightov syndróm		$G_{s\alpha}$
Hypofýzárne tumory		$G_{s\alpha}$
tumory hypofýzy, štítnej žľazy, nadobličky, vaječníkov		$G_{i\alpha}$

Čiže G-proteíny sú významné pre:

- zosilnenie signálu,
- pre viacsmerovú signálnu transdukciu a
- ako vbudovaný vypínačový systém.

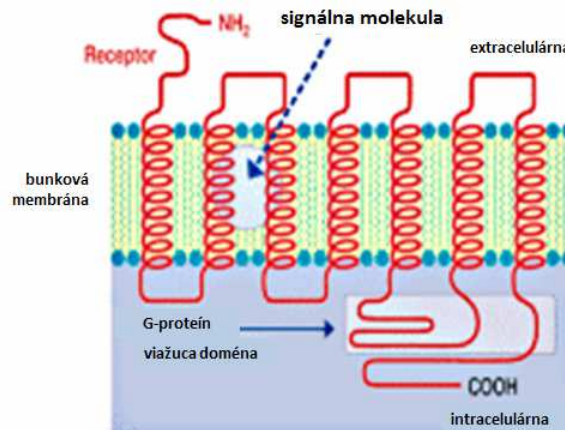
Ostatné GTPázy (spúšťané vnútrobunkovými alebo vonkajšími signálmi) sa zúčastňujú iných transdukčných procesov. Majú jednu štruktúrnu podjednotku. Forma viazaná ku GTP je aktívnou konformáciou. V takom prípade sa viažu k terčovým proteínom a stimulujú ich činnosť. Ich vypnutie reguluje endogénna GTP-ázová aktivita.

Z monomerických G-proteínov je potrebné ešte spomenúť:

- ☛ Ras proteíny - zabezpečujú prenos z tyrozínkinázových receptorov a Ser/Thr kinázy. Mutácia neurofibromínu vyvolá neurofibromatózu.
- ☛ Rab proteíny - regulujú rýchlosť vezikulárneho transportu medzi intracelulárnymi kompartmentmi.
- ☛ Rho/Rac proteíny - zúčastňujú sa organizácie cytoskeletu.
- ☛ Tu proteín - podieľa sa na regulácii proteosyntézy.
- ☛ Ran proteíny - zúčastňujú sa na procesingu karyoskeletu, na procesingu RNA, na transporte bielkovín do jadra a na regulácii bunkového cyklu.

Receptory viazané s G-proteínmi so siedmymi transmembránovými doménami:

- Mnohé z povrchových membránových receptorov cicavčích buniek sprostredkujú aktiváciu signálnej transdukcie prostredníctvom G-proteínov (obr. 2.14).
- G-proteíny potom aktivujú efektorové enzýmy, ktoré uvoľňujú intracelulárny druhotný posol.



Obr. 14 – G proteínom spriahnuté receptory

Väzba adrenalínu k receptoru:

- Adrenalín a noradrenalín - sú známe aj ako produkty drene nadobličky.
- Počas stresu majú všetky tkanivá zvýšenú potrebu glukózy a mastných kyselín.
- Tieto metabolické energetické zdroje sa môžu dostať do krvi po rýchlom odbúraní glykogénu v pečeni (glykogenolýza) a triacylglycerolov v tukovom tkanive (lipolýza).
- U cicavcov uvoľnenie glukózy a mastných kyselín môže byť spustené adrenalínom a noradrenalínom ich nadviazaním na β -adrenergné receptory na povrchu pečňových a tukových buniek.
- Vo všetkých bunkách rôznych tkanív je špecifickou odpoveďou nadviazania adrenalínu alebo noradrenalínu uvoľnenie intracelulárneho cAMP, následkom aktivácie adenylát cyklázy.
- Väzba rôznych hormónov na ich receptory môže tiež viesť k tvorbe cAMP a charakteristickej tkanivovošpecifickej odpovedi.

Hormónové analóga:

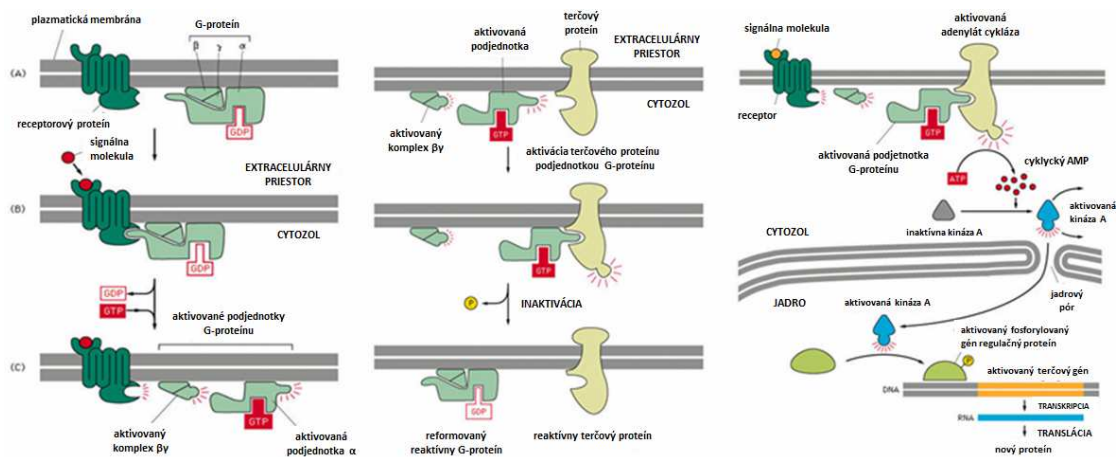
- Poznáme dva triedy hormónových analógov:
- **Agonisti**, ktoré majú podobnú funkciu ako hormón a po väzbe na receptor vyvolajú normálnu odpoveď.
- **Antagonisti**, ktoré po väzbe na receptor nevyvolajú hormónu podobný účinok.
- Porovnanie molekulovej štruktúry a aktivity rôznych agonistov a antagonistov katecholamínov ukázalo, že určitá časť hormónu je potrebná pre väzbu na β -adrenergný receptor a iná časť je potrebná pre indukciu bunkovej odpovede.

Trimerické signálno-transdukčné G_s proteíny:

- β -adrenergné receptory na rôznych typoch cicavčích buniek sprostredkujú tkanivovú špecifickú odpoveď.
- Iničiálna odpoveď po nadviazaní adrenalínu je často totožná: elevácia intracelulárnej hladiny cAMP.
- Toto zvýšenie cAMP je následkom aktivácie adenylát cyklázy - na membránu viazaného enzýmu s dvoma katalytickými doménami na cytozolovej strane plazmatickej membrány.
- Vzťah medzi väzbou hormónu na vonkajšiu doménu receptora a aktiváciou adenylát cyklázy je zabezpečený trimerickým **stimulačným G proteínom** (G_s) ktorý funguje ako transducér signálu.

• **Cyklovanie G_s :**

- * G proteíny prenášajúce signály z takých sedem transmembránovo doménových receptorov, ako je β -adrenergný receptor, pozostávajú z troch subjednotiek, označovaných α , β a γ (obr. 15).



obr. 2.15 – Signalizácia prostredníctvom G proteínov

- * Ligand neviažuca α subjednotka G_s ($G_{s\alpha}$) sa viaže ku GDP a vytvára komplex s β a γ subjednotkami.
- * Hormóny alebo agonisty nadviazaním na receptor vyvolajú zmenu konformácie receptora, čo vedie k odpojeniu sa GDP od $G_{s\alpha}$ a jeho fosforyláciu na GTP.
- * Táto aktivácia je krátkodobá, nakoľko GTP sa väzbou na $G_{s\alpha}$ hydrolyzuje na GDP, čo vedie znova k asociácii $G_{s\alpha}$ s $G_{\beta\gamma}$ a ku inaktivácii adenylát cyklázy.
- * G_s proteín takto preskakuje v závislosti od toho či sa viaže s GDP alebo GTP medzi dvoma membránovými proteínmi.
- * G_s funguje ako **transducer signálu**, vo vzťahu k adenylát cykláze, na základe konformačnej zmeny receptora spustenom nadviazaním príslušného hormónu.

• **Amplifikácia hormónového signálu:**

- * **Amplifikácia** je možná nakoľko aj receptor aj G_s proteín môže rýchlo difundovať v plazmatickej membráne.
- * Jednoduchý komplex receptor-hormón vyvolá konverziu asi 100 inaktívnych G_s molekúl na aktívne.
- * Rozsah amplifikácie je veľmi ťažké exaktne merať - väzba jednej molekuly hormónu na jeden receptor môže vyvolať syntézu prinajmenej niekoľko sto molekúl cAMP na každý komplex receptor-hormón do doby kým sa komplex rozpadne a aktivácia adenylát cyklázy prestane.

• **Terminácia bunkovej odpovede:**

- * Úspešná signalizácia vyžaduje aby odpoveď terčových buniek na hormón bola rýchlo ukončená a cirkulujúci hormón bol odstránený.
- * **Terminácia** odpovede na hormón registrovaný β -adrenergnými receptormi je facilitovaná poklesom afinity receptoru, k čomu dôjde ak G_s je konvertovaný z inaktívnej do aktívnej formy.
- * GTP nadviazané na $G_{s\alpha}$ je rýchlo hydrolyzovaný, čím sa končí aktivácia adenylát cyklázy a tým bunková odpoveď, výmúč prípad ak koncentrácia hormónu zostane vysoká a budú sa tvoriť nové komplexy receptoru a hormónu.
- * Kontinuálna prítomnosť hormónu je potrebná pre kontinuálnu aktiváciu adenylát cyklázy.

• **$G_{s\alpha}$ patrí do GTPázovej superrodiny:**

- * Objasnenie cyklovania medzi aktívnou a inaktívnou formou $G_{s\alpha}$ umožnilo štúdium iného podobného a v intracelulárnej signálnej transdukcii dôležitého proteínu nazývaného **Ras**.
- * Oba $G_{s\alpha}$ aj Ras sú členmi rodiny intracelulárnych zapínačových proteínov nazývaných **GTPázová superrodina**.
- * Aktivácia Ras spustená nadviazaním rôznych hormónov na ich receptory prebieha v dvoch krokoch: disociáciou z väzby s GDP a následnou väzbou s GTP.
- * Dezaktivácia Ras prebieha tiež v dvoch krokoch: väzbou **GTP-ázu aktivujúceho proteínu** (GAP) ku komplexu Ras-GTP a hydrolýzou GTP za uvoľnenia P_i a GAP.
- * Normálny, intaktný $G_{s\alpha}$ GAP-podobnej domény je napojený na Ras-podobnú doménu v mieste kde sa GAP viaže ku Ras-GTP komplexu počas cyklizácie Ras proteínu.
- * Interakcia komplexu receptor-ligand s G_s vyvoláva konformačnú zmenu v $G_{s\alpha}$ -GDP ktorý facilituje uvoľnenie GDP z väzby.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

• **Adenylát cykláza:**

- * G proteíny sú veľmi mnohostranné a vedia modulovať aktivitu stejného efektorového proteínu pri rôznych komplexoch receptor-hormón.
- * U mnohých typov buniek, väzba rôznych hormónov k ich receptorom vyvoláva aktiváciu adenylát cyklázy.
- * Aktivácia adenylát cyklázy a hladiny cAMP sú priamo úmerné celkovej koncentrácii $G_{S\alpha}$ -GTP uvoľnených z väzby po nadviazaní hormónov k ich špecifickým receptorom.
- * Niektoré bunky môžu hladiny cAMP regulovať účinkom rôznych hormónov.

Adenylát cykláza: má 5 izoenzýmov. Katalizuje premenu ATP na cAMP.

cAMP fosfodiesteráza: hladina cAMP okrem rýchlosti vzniku je určená aj rýchlosťou jeho štiepenia, čo zabezpečuje cAMP fosfodiesteráza.

cAMP aktivuje **proteínkinázu A**, ktorá môže fosforylovať:

- enzýmy,
- receptory, hlavne steroidné receptory,
- štrukturálne bielkoviny - troponín, kináza ľahkého reťazca myozínu,
- iónové kanály - kalciový kanál regulovaný prostredníctvom IP_3 , chloridový kanál v epitelových bunkách (porucha \Rightarrow cystická fibróza),
- nukleárne regulačné proteíny – promotérová oblasť génov (viď kapitolu o genetike) regulovaných cAMP obsahuje na cAMP odpovedajúci prvok (CRE = *cAMP related element*). Je to transkripčný faktor s Leu-zipsovou štruktúrou a viaže sa k nej bielkovina viažúca CRE (CREB, *cAMP related element binding protein*). Ak je proteínkinázou A fosforylovaná, dimerizuje a stimuluje prepis génu.

cAMP v čuchovom epitely pôsobí na iónový kanál: účinkom pachov 7-transmembránový receptor aktivuje adenylát cyklázu. Vznikajúci cAMP sa viaže ku Na^+ kanálom, otvorí ich, čo vedie k depolarizácii.

Prečo sa mohol stať cAMP dobrou signálnou molekulou?

1. Vzniká z bežne sa vyskytujúcej molekuly - ATP. Reakcia má jeden krok a hydrolýzou PP_i je jednosmerná.
2. cAMP nie je súčasťou ani jednej metabolickej cesty, preto je jeho koncentrácia regulovateľná nezávisle od nich.
3. Má celý rad takých bočných reťazcov, ktorými sa vie špecificky naviazať na bielkovinu a túto alostericky regulovať.

cAMP (cyklický adenosín monofosfát) sprostredkovaná cesta prenosu signálu je pionierska vo výskume signálovej transdukcie. Tento mechanizmus dal zrod prvému sekundárnemu poslovi (*second messenger*, **cAMP**), prvej serín/treonín špecifickej proteínkinázy (**proteínkináza A**), prvej guaninnukleotid viažucej bielkovine (**G_s**-

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

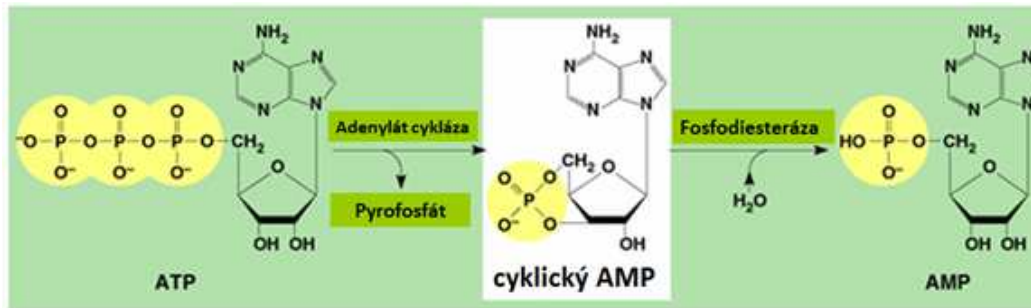
proteín). Jedným z centrálnych prvkov prenosu signálu je **adenylátcykláza**. Tento enzým lokalizovaný do bunkovej membrány je regulovaný heterotrimernými G-nukleotid viažúcimi proteínmi (G-proteíny, buď stimulačné alebo inhibičné). Vo väzbe s GTP sprostredkujú stimulačný alebo inhibičný účinok komplexu ligand-receptor. Adenylát cykláza z ATP tvorí cAMP, ktorý ako sekundárny messenger aktivuje **cAMP-dependentnú proteinkinázu A (PKA)**. Katalytické C podjednotky, uvoľňujúce sa od R podjednotiek inaktívneho regulačného komplexu R_2C_2 fosforylujú mnohé cytoplazmatické cieľové proteíny, časť sa translokuje do jadra a fosforyláciou transkripčného faktora (CREB) viazaného ku špecifickej enhancer oblasti génov (CRE) regulovaných prostredníctvom cAMP vyvolávajú rýchlu a dočasnú aktiváciu génu. cAMP sprostredkováva intracelulárny účinok viacerých hormónov (adrenalín, vazopresín, glukagón ai.). Nakoľko CRE sekvencia obsahuje veľký počet génov, komplexné génaaktivačné mechanizmy sú dobrým vysvetlením pre pleiotrópny účinok cAMP.

Procesy regulované prostredníctvom adenylát cyklázy:

- ☼ Pečeň: glykogenolýza, glykoneogenéza, glykolýza, syntéza lipidov, β -oxidácia, syntéza cholesterolu.
- ☼ Hormón adrenalín.
- ☼ Tukové tkanivo: lipolýza. Hormóny: adrenalín, ACTH, glukagón a TSH.
- ☼ Svalovina: glykogenolýza (adrenalín).
- ☼ Kôra nadobličiek: syntéza steroidných hormónov, sekrécia aldosterónu regulovaného ACTH.
- ☼ T bunky: inhibícia delenia.
- ☼ Tymocyty: odumretie.
- ☼ Čuchový epitel: čuch.
- ☼ Črevný epitel: sekrécia Cl^- .
- ☼ Hladká svalovina: inhibícia kontrakcie.
- ☼ Štítna žľaza: syntéza a sekrécia tyroxínu (TSH).
- ☼ Vaječníky: sekrécia progesterónu (LH).
- ☼ Kosti: rezorpcia anorganickej hmoty (parathormón).
- ☼ Srdce: stupňovanie frekvencie a sily kontrakcie (adrenalín).
- ☼ Obličky: znižovanie spätnej resorpcie vody (vazopresín).

cAMP v regulácii bunkového metabolizmu:

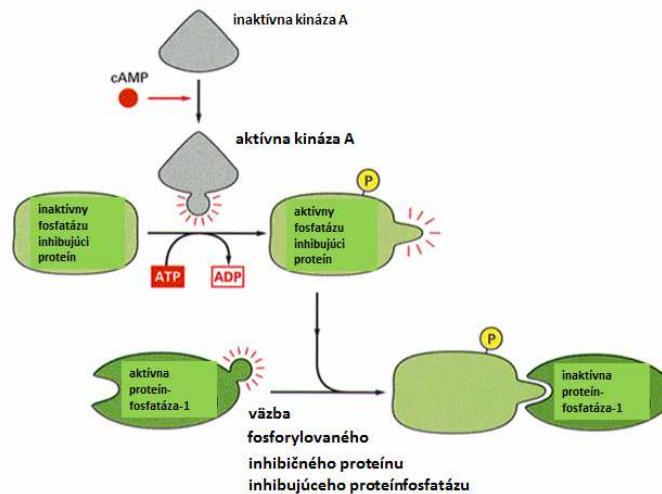
- * cAMP je druhý posol pre mnohé hormóny a účinky zvýšenej hladiny cAMP sa značne odlišujú u rôznych typov buniek (obr. 16).



obr. 2.16 – cAMP

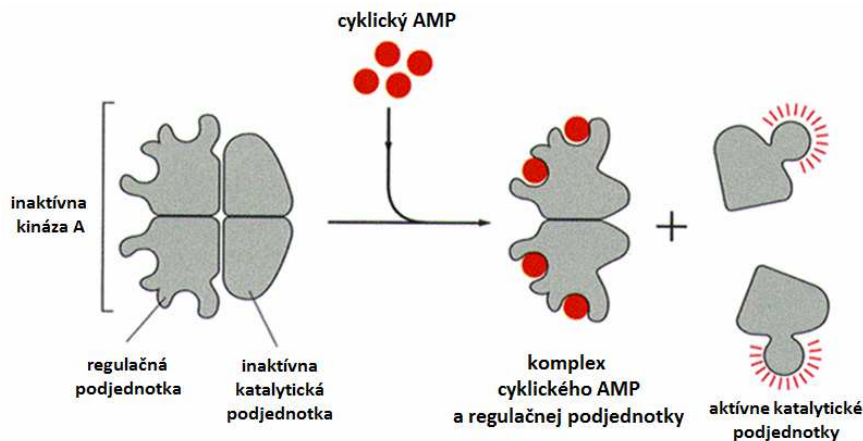
cAMP a proteínkinázy:

- * Rôzne účinky cAMP sú realizované prostredníctvom účinku **cAMP-dependentných proteínkináz** (cAPKs alebo proteínkináza A alebo PKA, obr. 17).



obr. 2.17 – Účinok proteínkinázy A

- * Proteínkinázy prenášajú terminálnu fosfátovú skupinu z ATP na hydroxylovú skupinu serínu, treonínu a tyrozínu príslušného substrátového proteínu.
- * cAPKs sú tetraméry - pozostávajú z dvoch regulačných (R) podjednotiek a dvoch katalytických (C) podjednotiek (obr. 18).

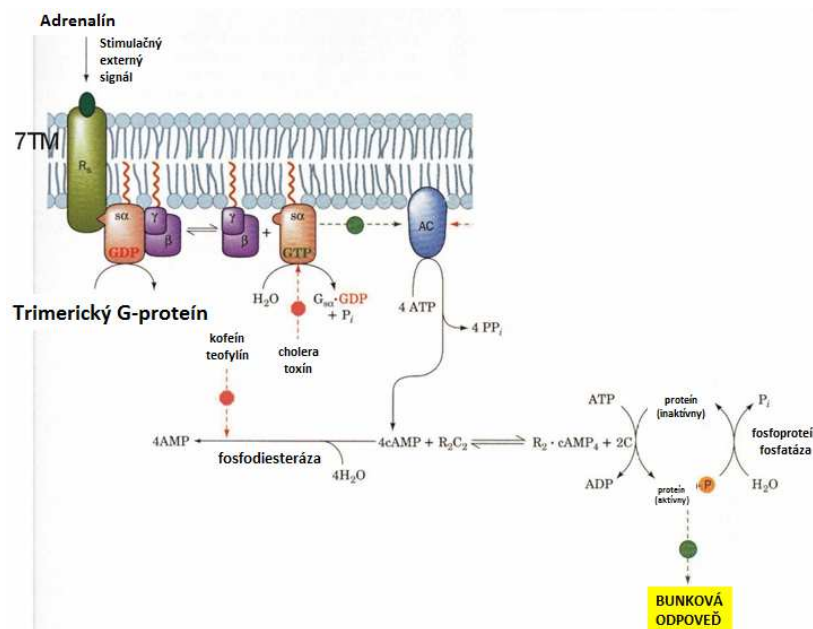


obr. 18 – Proteínkináza A

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- * Ak sú v tetramerickej forme, cAPKs sú enzymaticky inaktívne.
- * Každý typ proteínkinázy druhotného posla je inhibovaný väzbou peptidovej sekvencie k aktívnemu miestu.
- * Táto peptidová sekvencia môže byť časťou rôznych regulačných subjednotiek (R subjednotky v cAPKs), alebo môže byť časť **regulačnej domény** v tom polypeptidovom reťazci, ktorý obsahuje aktívne miesto.
- * Väzba druhotného posla k inaktívnej kináze vyvolá konformačnú zmenu, ktorá vedie k uvoľneniu väzby časti regulačnej domény od aktívneho miesta kinázy, alebo k disociácii regulačnej subjednotky.
- * V opačnom prípade, aktívne miesto kinázy je voľné a enzýmy sú aktivované.

Adrenalín (obr. 19)



obr. 19 – Všeobecný molekulový mechanizmus účinku adrenalínu

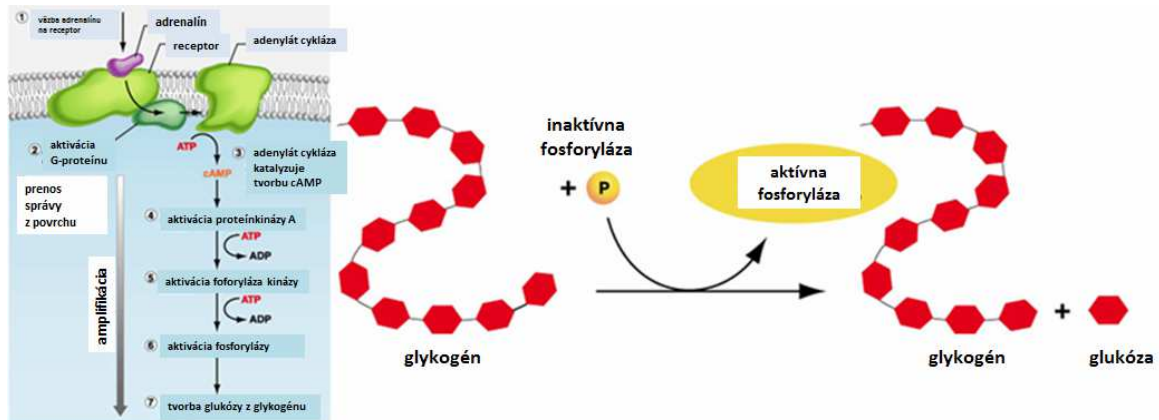
- * cAMP-dependentné proteínkinázy indukujú rôzne účinky v závislosti na časti substrátového proteínu ktorý fosforylujú.
- * Prvá opísaná cAMP sprostredkovaná bunková odpoveď bola uvoľnenie glukózy z glykogénu.
- * Glykogén je hlavnou zásobnou formou glukózy v tele a je uložený najmä v svaloch a v pečeni.
- * Glykogén je syntetizovaný jednou skupinou enzýmov a odbúraný druhou.
- * Primárnym medziproduktom syntézy glykogénu je **uridín difosfoglukóza**, produkovaná z glukózy tromi enzýmami katalyzovanými reakciami.
- * Glukózový zbytok UDP-glukózy je prenesený glykogén syntázou na voľnú -OH skupinu štvrtého uhlíka poslednej glukózy na rastúcom reťazci glykogénu.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- * Degradácia glykogénu zahrňa postupné odstraňovanie glukózových zvyškov zo stejného konca glykogénového reťazca.
- * Táto **fosforolytická reakcia** je katalyzovaná glykogénfosforylázou, kde je fosfát pridaný k výťažku glukóza-1-fosfátu.

cAMP-dependentná proteínkináza:

- * V svalových a pečeneových bunkách, adrenalínom zvýšené hladiny cAMP stimulujú premenu glykogénu na glukóza-1-fosfát dvoma cestami:
- * inhibíciou syntézy glykogénu
- * a stimuláciou degradácie glykogénu.
- * V prítomnosti cAMP, oddelená C subjednotka cAPK fosforyluje **glykogén syntázu**, konvertujúcu ju na veľmi málo aktívny enzým a inhibuje tak syntézu glykogénu (obr. 20).
- * Aktívna C subjednotka fosforyluje a aktivuje ďalšiu proteínkinázu, **glykogén fosforylázovú kinázu**.
- * Tento enzým potom fosforyluje **glykogén fosforylázu**, tým, že ju premení na aktívnu formu, ktorá degraduje glykogén na glukóza-1-fosfát.
- * Opačný proces mediuje **fosfoproteín fosfatáza**, ktorá odstraňuje fosfátové reziduá z glykogén syntázy a z glykogén fosforylázovej kinázy a glykogén fosforylázy.



obr. 20 – Syntéza a štiepenie glykogénu

Kinázové kaskády:

- * Séria proteínových fosforylácií a defosforylácií vytvára **kaskádu**, alebo sériu reakcií v ktorých proteín katalyzujúci jeden krok je aktivovaný (alebo inhibovaný) produktom predchádzajúceho kroku (obr. 9).
- * Kaskáda umožňuje aby celá skupinu enzýmami katalyzovaných reakcií bola regulovaná jedným typom molekuly.
- * Kaskáda vykoná obrovskú amplifikáciu pôvodne malého signálu.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Bunková odpoveď na cAMP:

- * Účinky cAMP na syntézu a degradáciu glykogénu sú ohraničené najmä na svalové a pečeneňové bunky, kde sa glykogén ukladá do zásoby.
- * V skutočnosti všetky eukaryotické bunky mediujú účinkom cAMP jednu alebo niekoľko cAMP-dependentných proteínkináz.
- * Odpoveď určitých bunkových typov na zvýšenie hladín cAMP závisí na substrátovej špecificite cAMP-dependentných proteínkináz, ktoré bunka obsahuje a na substrátoch pre exprimované cAPKs.
- * U rôznych buniek, zvýšenie intracelulárnej cAMP je indukované rôznymi hormónmi, napr. ACTH v bunkách kôry nadobličky a FSH v bunkách vaječníkov.
- * Podobne ako stimulácia adrenálnom u svalových buniek a pečeneňových buniek, nadviazanie ACTH alebo FSH na ich G_s -spojeným receptorom aktivuje adenylát cyklázu, čo vedie k zvýšeniu hladín cAMP, ktorá aktivuje cAMP-dependentné proteínkinázy.

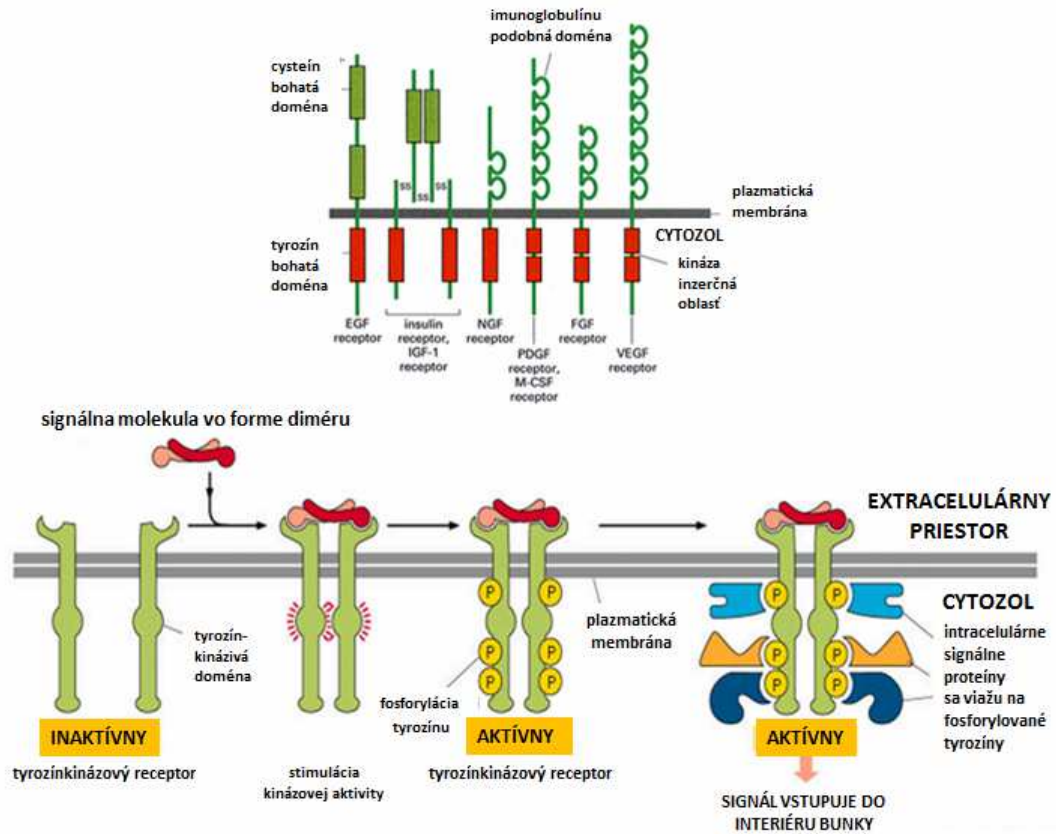
Rastové faktory sú molekuly polypeptidového charakteru a pôsobia prostredníctvom receptorov na povrchu bunky, ktoré ovplyvňujú široké spektrum celulárnych procesov v terčovách bunkách (reguláciu bunkového cyklu, diferenciáciu tkanív, prežitie, metabolické procesy). Vnútro-bunkový prenos signálov ich prostredníctvom je intenzívne študovaný, veď poruchy týchto procesov sú spojené s mnohými ochoreniami (zhubné nádory, vývinové poruchy, endokrinopatie a pod.).

Ich receptormi sú transmembránové proteíny s **tyrozínkinázovou aktivitou** (obr. 21). Následkom nadviazania rastových faktorov podľahnú receptory konformačnej zmene, dimerizujú sa a ich katalytické miesto sa aktivuje. Receptor sa autofosforyluje a vzniknuté bočné fosfotyrozínové reťazce viažu špecifické signálové bielkoviny z cytozolu, ktoré receptor na tyrozíne fosforyluje a tým aktivuje. Také bielkoviny sprostredkovávajú signál ku gaunínnukleotid viažucím Ras proteínom uloženým na vnútornej ploche membrány.

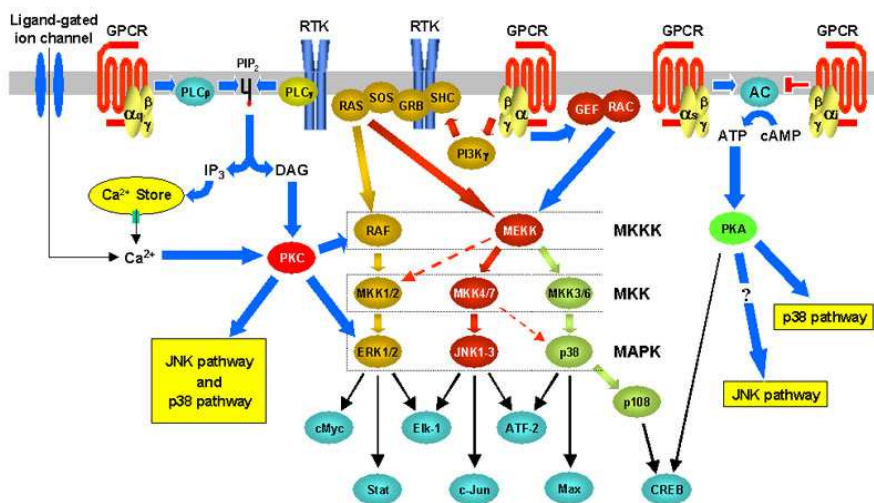
Tu sa GDP mení na ATP, čo znamená aktiváciu, ktorá spustí cytoplazmatickú proteínfosforylačnú kaskádu, ktorých posledné prvky **mitogénom aktivované proteínkinázy (MAPK)** prenesú aktivačnú vlnu do bunkového jadra (obr. 22). Tu sa fosforylujú špecifické transkripčné faktory, čo vyvolá rýchly prepis viacerých génov (tzv. gény včasnej odpovede). Medzi syntetizovanými proteínmi sú cyklíny, ktoré aktivujú dôležité faktory regulácie bunkového cyklu – tzv. cyklín-dependentné kinázy (CDK). Z hľadiska zahájenia delenia buniek sú najdôležitejšie **G_1 cyklín/CDK komplexy**. Tieto dostanú bunky z G_0 fázy znova do G_1 fázy a spustia replikáciu DNA. V tomto období je dôležitý retinoblastómový proteín (pRb), produkt jedného zo supresorických génov (pRb). **Rb-proteín** udržuje bunku v kľudovom štádiu, blokuje činnosť génov potrebných ku replikácii DNA. Ale ak komplex G_1 cyklín/Cdk fosforyluje Rb-proteín, gény S-fázy sa

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

uvoľnia spod supresie. Medzi ich produktmi sú replikáciu katalyzujúce DNA-polymerázy, transkripčné faktory s mitogénnym účinkom – Myc protoonkogén a cyklíny. Náhly vzostup množstva týchto proteínov dostane bunku do S-fázy.



obr. 21 – Receptory s tyrozínkinázovou aktivitou a ich funkcia



obr. 22 – Úloha mitogénom aktivovaných kináz (MKKK, MKK, MAPK)

Väčšinou sa táto forma signálnej transdukcie odohráva pri rastových a proliferačných signáloch bunky. Po väzbe hormónu (napr. inzulín) nasleduje:

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

◆ Dimerizácia a autofosforylácia receptoru. Tyrozínkinázové receptory často heterodimerizujú, čoho prednosťou je:

- rozšíri sa počet substrátov a aktivovaných transdukčných dráh,
- že napomáhajú v zmiešaných receptorových komplexoch interakciám rôznych za bežných podmienok sa nestretávajúcich substrátov,
- že sa ovplyvňuje doba signalizácie receptoru,
- ovplyvňuje sa rýchlosť defosforylácie receptoru a substrátu.

◆ Internalizácia receptoru, čo je dôležité napr. pre kontrolu glukózového transportéru.

Inzulínreceptorový substrát (IRS) je bielkovina s PH doménou, ktorá fosforyluje na tyrozínových podjednotkách. SH2 domény majú význam pre väzbu na tyrozínkinázy alebo pri väzbe inzulínreceptorového substrátu. Viazuce sa bielkoviny môžu byť:

- ✘ src (proteínkináza)
- ✘ vav (proteínkináza)
- ✘ abl (proteínkináza)
- ✘ PtdIns3 kináza
- ✘ PLC_γ
- ✘ GAP (ras inaktivujúci)
- ✘ GRB2 (adaptérová bielkovina).

Každá viažuca sa bielkovina spustí osobitnú cestu signálnej transdukcie, z ktorých je každá potrebná pre delenie buniek a pre zložité mechanizmy diferenciácie buniek. Z týchto ciest spomenieme len dve (PLC a ras cestu).

Proteíny viažuce sa k SH3 doméne obsahujú na prolín bohaté úseky. Cesty signálnej transdukcie spúšťané **tyrozínkinázovým receptorom**:

- 1 signálna transdukcia spustená PLC_γ
- 2 fosfatidylinozitol-3 kináza modifikuje fosfolipidy membrán, a umožní väzbu bielkovín s PH doménou,
- 3 Ras cesta, pri Tyr fosfát tyrozínkinázy rozpozná bielkovina GRB2 (dokujúci proteín) s SH2 doménou. Prostredníctvom dvoch SH3 domén sa pripája k úsekom SOS proteínu bohatých na prolín a aktivuje ich. SOS vymení na ras proteíne v membráne GDP za GTP. GTP-ras (aktívny) viaže k sebe z cytozolu raf (proteínkináza) a tým ju aktivuje. Takto aktivovaná raf spúšťa kaskádu proteínkináz (MAP kinázová kaskáda), ktoré vyvolajú aktiváciu celého radu MAP (*mitogen activated protein*) ich fosforyláciou. Tieto proteíny sú také enzýmy, cytoskeletové proteíny, iónové kanály a nukleárne faktory, ktoré sú významné v bunkovom delení.

Aj 7-transmembránové proteíny môžu spustiť ras cestu prostredníctvom tyrozínkinázových receptorov a zahájiť bunkovú proliferáciu. Tieto receptory vyvíjajú

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

svoju činnosť prostredníctvom $G_{\beta\gamma}$. Plne neobjasneným spôsobom (snáď prostredníctvom aktivácie src tyrozínkinázy) môžu vyvolať fosforyláciu adaptérového proteínu Shc, ku ktorému sa viaže GFB2 a potom SOS.

Aktivácia tyrozínkinázovej cesty sa môže preniesť na cytoskelet. Takéhoto reorganizovania cytoskeletu sa zúčastní asi 70 aktín regulujúcich bielkovín. Tieto regulujú nasledovné cykly:

- ⚙️ polymerizácia monomerného (G) aktínu na vlákňitý (F aktín),
- ⚙️ krížová väzba F aktínu,
- ⚙️ reverzibilná väzba aktínových štruktúr na membránu.

Tieto sa odohrávajú hlavne účinkom profilínu a MARCKS.

Zaujímavý je aj prenos tyrozínkinázou mediovaných signálov na bunkové jadro.

- ♣️ Nukleárne proteínkinázy a fosfatázy sa aktivujú, a už existujúce transkripčné faktory fosforylujú a defosforylujú. V niektorých prípadoch (napr. NFkB) kľudový nukleárny faktor je viazaný s cytosolovou inhibičnou podjednotkou. Po fosforylácii (PKC fosforyluje NFkB) sa inhibičná podjednotka odštiepi a nukleárny faktor sa dostáva do jadra.
- ♣️ Modifikovaný transkripčný faktor stupňuje vlastnú syntézu, alebo syntézu iného transkripčného faktoru.
- ♣️ Už existujúce aktivované a novovznikajúce transkripčné faktory vytvárajú komplexy, a vo forme heterodimérov spúšťajú prepis nových génov.

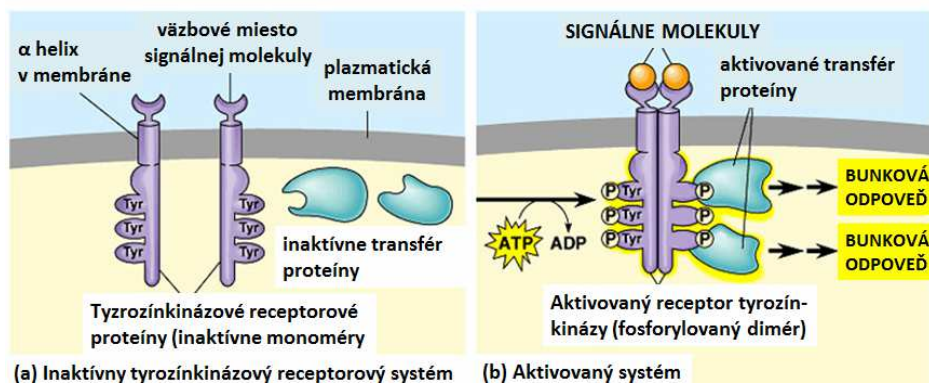
Všetky tieto procesy vedú k vypnutiu cAMP cesty.

Úlohu tyrozínfosfatáz v regulácii tyrozínkinázovej cesty je možné zhrnúť nasledovne:

- ♥ Môžu vypnúť cestu odbúraním tyrozínfosfátu.
- ♥ Niekoľko z nich funguje v ceste tak, že odstráni z cytosolovej tyrozínkinázy inhibičný tyrozínfosfát. V inaktívnom stave tyrozínfosfát je viazaný k SH2 skupine enzýmu a bráni tomu, aby kináza rozpoznala tyrozínfosforylovaný receptor alebo sa dostala ku substrátu (napr. CD45).
- ♥ Môžu sa cesty zúčastniť aj tak, že sú súčasťou komplexu tyrozínkinázový receptor - substrát.

Receptorové tyrozín kinázy (RTKs):

- * RTKs (obr. 23) predstavujú veľkú a dôležitú triedu bunkovo-povrchových receptorov ktorých ligandy sú rozpustné alebo na membránu sa viažúce peptidové/proteínové hormóny ako napr. inzulín a epidermálny rastový faktor.



obr. 23 – Tyrozínkinázové receptory

- * Ligand viažuci sa k takému typu receptoru (RTKs) stimuluje proteíny tyrozínkinázovú aktivitu receptoru, ktorá potom stimuluje signálo transdukčnú kaskádu vedúcu ku zmenám fyziologie bunky alebo k zmene expresivity génov.
- * RTK signálne cesty majú široké spektrum funkcií vrátane regulácie proliferácie a diferenciácie buniek, promóciu prežívania buniek, a usmerňovanie metabolizmu buniek.
- * Fosfotyrozínové zvyšky aktivovaných RTKs hrajú rozhodujúcu úlohu v transdukcii hormónových signálov k intracelulárnym signálnym molekulám.
- * Niektoré RTKs fosforylujú aj také proteínové substráty, ktoré sú komponentami iných signálnych dráh.

SH2-obsahujúce proteíny:

- * Dva rôzne triedy proteínov sú asociované s cytoplazmatickou doménou aktivovaných RTKs, a to:
 1. **Adaptérové proteíny** ktoré spájajú aktivovaný receptor k iným signálnym molekulám ale nemajú významnú signálnu vlastnosť.
 2. Enzýmy obsiahnuté v signálnej ceste.
- * Tieto proteíny sa viažu k rôznym fosfotyrozínovým zvyškom na RTKs prostredníctvom konzervatívnych polypeptidových domén, nazývaných **Src homologná 2 (SH2) doména**.
- * Trojdimenzionálne štruktúry SH2 domén u rozličných proteínov sú veľmi podobné.
- * Každá väzba k rôznym sekvenciám sa realizuje v oblasti fosfotyrozínových reziduí aminokyselín.

Ras proteín:

- * Ras proteíny patria ku GTPázovej superrodine intracelulárných zapínačových proteínov.
- * Ras proteíny zohrávajú centrálnu úlohu v transdukcii signálov z mnohých RTKs ku kaskáde Ser/Thr-kináz ktorých funkciou je kontrola rastu a diferenciácie bunky.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- * Ako vlastne vedie väzba rastového faktoru (EGF) s RTK (EGF receptor) k aktivácii Ras?
- * Kľúčové väzby zabezpečujú dva cytozolové proteíny, a síce: GRB2 a Sos.
- * SH2 doména GRB2 sa viaže na špecifické fosfotyrozínové zvyšky aktivovaného EGF receptoru.
- * GRB2 obsahuje aj dve SH3 domény, ktoré sa viažu na Sos a aktivujú ho.
- * GRB2 funguje ako adaptérový proteín pre EGF receptor.

Sos proteín:

- * GRB2 obsahuje jednu SH2 doménu, ktorou sa viaže k fosfotyrozínovému zvyšku na RTKs, a dve SH3 domény, ktorými sa viaže k Sos, guanín nukleotidový výmenný faktor.
- * SH3 domény, ktoré obsahujú ~55-70 aminokyselinových zvyškov, sú prítomné u veľkého počtu signálnych molekúl.
- * Po hormónom indukovanej aktivácii RTK, sa vytvorí komplex obsahujúci aktivovanú RTK, GRB2 a Sos na cytozolovej strane plazmatickej membrány.
- * Aktivácia receptora vedie k relokizácii Sos z cytoplazmy do membrány, čím sa Sos dostane do blízkosti svojho substrátu (na membránu viazaný Ras proteín).

V prípade niektorých G-proteínov je terčovým proteínom **fosfolipáza C**. Po stimulácii zodpovedajúceho receptora na povrchu bunky, fosfolipáza C štiepi svoj substrát, ktorým je do vnútornej vrstvy bunkovej membrány lokalizovaný **fosfatidyl-inozitol bifosfát (PIP₂)**. Vznikajú tým dva druhotné sekundárne posli. **Diacylglycerol (DAG)** ako lipid zostáva v membráne a terčové proteíny aktivuje tak, že ich pritiahne k membráne. Pre DAG sú terčovými proteínmi enzýmy skupiny serín/treoninšpecifických **proteínkináz C (PKC)**. Enzýmy PKC majú mnoho terčových proteínov, následkom ich aktivácie sa fosforylujú aj transkripčné faktory. Jedným z nich je **aktivačný proteín-1 (AP-1)**, ktorý sa viaže k promótorovej oblasti mnohých génov a tým ich aktivuje.

Druhý smer cesty prostredníctvom fosfolipázy C zaisťuje vo vode rozpustný sekundárny posol **inozitol trifosfát (IP₃)**, ktorý vzniká z PIP₂. Pre IP₃ sú terčom Ca⁺⁺-kanály na endoplazmatickom retikule, ktoré otvára tým že sa na ne viaže, a nahromadené vápnikové ióny sa vylejú do cytozolu, kde významne zvýšia hladinu Ca⁺⁺ (za normálnych okolností je hladina vápnikových iónov v cytozole nízka). Ca⁺⁺ prostredníctvom **kalmodulínu** aktivujú **kalmodulín-dependentné kinázy (CaMK)** a tieto fosforylujú okrem mnoho iných terčových bielkovín aj CREB transkripčný faktor a spôsobujú aktiváciu génu.

Fosfolipáza C (PLC) sa môže aktivovať tak prostredníctvom G-proteínu ako i cez fosforyláciu (Tyr) proteínu. Následkom toho z fosfatidyl-inozitol 4,5-difosfátu

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

viazaného na membránu vzniká na membránu viazaný diacylglycerol (DAG) a do cytosolu sa uvoľňujúci inozitol-1,4,5-trifosfát (IP₃).

IP₃ otvára Ca²⁺ kanál na endoplazmatickom retikule, čo vedie k zvýšeniu hladín voľných Ca²⁺ v cytozole.

V membránových depotoch Ca²⁺ nachádzame:

- ☒ pumpy, ktoré sekvestrujú Ca²⁺,
- ☒ vápnik viažuce proteíny (kalsekvestrín, kalretikulín),
- ☒ IP₃ alebo ryanodinové receptory.

Kalciová odpoveď pozostáva z dvoch častí: prv sa otvorí IP₃ receptor, následkom čoho sa z intracelulárnych depotov uvoľní veľa Ca²⁺, potom sa uvoľnia na bunkovej membráne kalciové kanály (následkom aktivácie s IP₃ alebo IP₄) potom začína masívny influx vápnika do bunky z extracelulárneho priestoru.

Prečo sa stal vápnik dobrým druhotným poslom?

1. Lebo jeho koncentrácie udržiava bunka na nízkej hladine. Je to preto, lebo bunka obsahuje veľa organofosfátu (fosfátové estery), ktoré by sa mohli vápnikom vyzrážať.
2. Silne sa viaže k bielkovinám.
3. Jeho väzba je selektívna.

Terče vápnika sú:

- ⌘ kalmodulínom regulované bielkoviny,
- ⌘ nie kalmodulínom regulované bielkoviny.

Diacylglycerol aktivuje enzým **proteínkinázu C**, ktorá má viacero podtypov.

Substráty proteínkinázy C sú najmä:

- ∩ Receptory na povrchu bunky: EGF, inzulín, CD3.
- ∩ Enzýmy: raf1 kináza, GAP-p21ras.
- ∩ Iónové kanály: Na⁺/H⁺ výmena.
- ∩ Bielkoviny zúčastnené v regulácii bunkového cyklu: DNA topoizomeráza.
- ∩ Nukleárne faktory: NFκB.
- ∩ Cytoskeletárne bielkoviny: MARCKS.

Prečo je dobré ak sa tvoria dva molekuly poslov?

Závisí to samozrejme od typu bunky, ale:

- ⌘ Dva signály môžu svoj účinok vzájomne zosilňovať.
- ⌘ Vápnik zodpovedá za včasné, PKC za dlhodobé účinky.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

☞ Vápnik sa zúčastňuje signalizácie, PKC fosforyluje len receptor, čím sa zúčastňuje na jeho desenzibilizácii.

Niekoľko dôležitejších mechanizmov regulovaných prostredníctvom PKC:

- ☐ Glykogenolýza v pečeni (adrenalin α_1 , vazopresín).
- ☐ Agregácia trombocytov (PAF, tromboxán).
- ☐ Sekrécia serotonínu trombocytmi (PAF, tromboxán).
- ☐ Sekrécia histamínu mastocytmi (IgE).
- ☐ Sekrécia pankreatickej šťavy (cholecystokinín).
- ☐ Sekrécia inzulínu.
- ☐ Sekrécia amylázy (acetylcholín).
- ☐ Sekrécia adrenalinu bunkami nadobličky.
- ☐ Sekrécia aldosterónu nadobličkami (angiotenzín II).
- ☐ Kontrakcia hladkej svaloviny (acetylcholín).
- ☐ Zahájenie delenia buniek.
- ☐ Diferenciácia buniek.
- ☐ Programovaná smrť buniek (T bunkový receptor).

Ostatné fosfolipázy: ich regulačný mechanizmus je málo známy, ako napr. fosfolipázy katalyzujúcej hydrolýzu fosfatidylinozitol difosfátu. Ich funkcia často dopĺňa IP₃ systém. Zatiaľ čo účinkom fosfolipázy C vznikajúci DAG vyvolá krátkodobú aktiváciu PKC, DAG vznikajúci účinkom ostatných fosfolipáz zodpovedá za niekoľkohodinovú aktiváciu PKC.

Diacylglycerol môže vznikáť z fosfatidylcholínu:

- účinkom PLC,
- účinkom PLD + fosfatidyl fosfatázy.

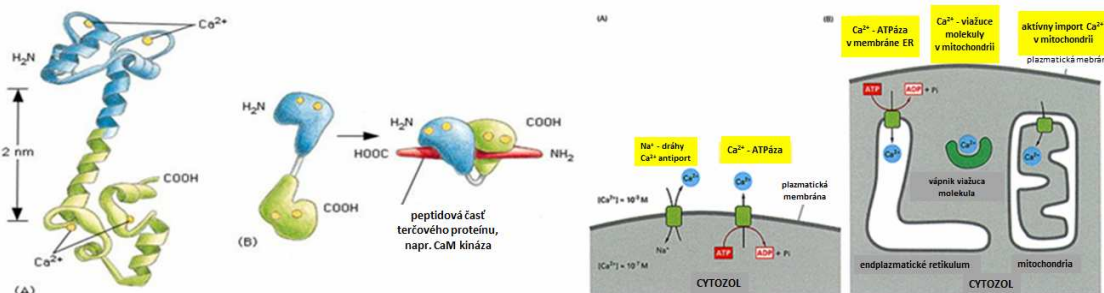
Účinkom PLA₂ vzniká lyzofosfatidylcholín a mastná kyselina. Diacylglycerol sa môže účinkom PLA₂ štiepiť ďalej na monoacylglycerol a kyselinu arachidonovú.

Iné druhotné posly:

- ☼ Tri iné molekuly, Ca²⁺, inozitol 1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG) pôsobia ako druhotné posly v signálnych dráhach aktivujúc tak sedem transmembránové receptory ako aj RTKs.
- ☼ Aj IP₃ aj DAG sú tvorené zo stejného prekursoru, a signálna transdukcia prostredníctvom týchto druhotných poslov sa nazýva **inozitol-lipidová dráha** (obr. 12).
- ☼ Všetky tieto druhotné posly interagujú v komplexnom obvode na reguláciu dôležitých mechanizmov (krokov) rastu a diferenciácie buniek.

Celularne účinky vápnika:

- ☼ Väčšina intracelulárnych iónov vápnika je sekvestrovaná v mitochondriách a endoplazmatickom retikule alebo v iných cytoplazmatických vezikulách.
- ☼ Lokálne zvýšenie cytozolovej hladiny voľného vápnika je kritické vzhľadom k jeho funkcii ako druhotného posla.
- ☼ Malé zvýšenie cytozolovej hladiny Ca^{2+} , často sprostredkovanéj zvýšením IP_3 , spúšťa celý rad bunkových odpovedí.
- ☼ U eukaryotických buniek bol zistený malý cytozolový proteín nazývaný **kalmodulín**, ktorý sprostredkoval mnohé celularne účinky iónov Ca^{2+} (obr. 24).

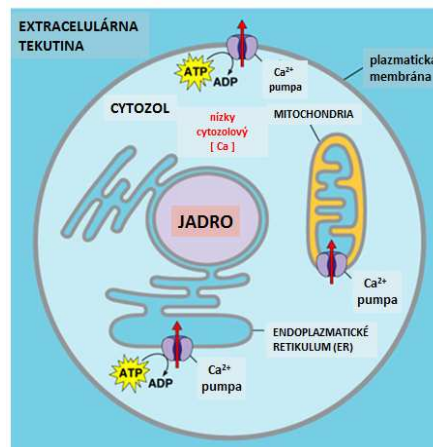


obr.24 – Kalmodulín a vápnik v bunke

- ☼ Každá molekula kalmodulínu viaže kooperatívnym spôsobom štyri Ca^{2+} .
- ☼ Nakoľko väzba Ca^{2+} je kooperatívna, už malé zmeny cytozolovej hladiny Ca^{2+} vedú k významným zmenám hladín aktívneho kalmodulínu.

Ióny Ca^{2+} a cAMP:

- ☼ Stimulácia nervových buniek nervovým impulsom vyvolá uvoľňovanie iónov Ca^{2+} zo sarkoplazmatického retikula a zvýšenie cytozolovej koncentrácie Ca^{2+} (obr. 25).



obr. 25 – Rozloženie vápnika v bunke

- ☼ Vzostup Ca^{2+} spúšťa svalovú kontrakciu a stimuluje degradáciu glykogénu na glukóza-1-fosfát, ktorá dodáva potrebnú energiu pre dlhodobú kontrakciu.
- ☼ Degradácia a syntéza glykogénu sú modulované β -adrenergnou aktiváciou cAMP kaskády.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- ✿ U mnohých iných buniek ako svalové, vzostup hladiny cytozolového Ca^{2+} zvyšuje rýchlosť vylučovania Ca^{2+} z bunky pomocou pumpy až do veľmi rýchleho navodenia pôvodného stavu.
- ✿ Tento rýchly pokles hladín Ca^{2+} je spôsobený aktiváciou Ca-kalmodulínu mitochondriovou Ca^{2+} ATPázou.

Inozitol 1,4,5-trifosfát:

- ✿ Ca^{2+} je do cytozolu uvoľnený z endoplazmatického retikula a iných intracelulárnych mechúrikov.
- ✿ Mechanizmus: vzostup cytozolovej hladiny Ca^{2+} je často vyvolaný hydrolýzou niektorých fosfolipidov, napr. fosfatidylinozitol 4,5-bifosfátu (PIP_2), jedného z mnohých inozitolových fosfolipidov z cytozolovej strany plazmatickej membrány.
- ✿ Hydrolýzou PIP_2 enzýmom plazmatickej membrány **fosfolipázou C** (PLC) vznikajú dva sôložité produkty:
 - ✿ 1,2-diacylglycerol (DAG) a
 - ✿ inozitol 1,4,5-trifosfát (IP_3).
- ✿ Väzba hormónov k určitým receptorom so siedmymi transmembránovými doménami spriahnutými s G-proteínmi vedie ku aktivácii PLC.
- ✿ Takto následkom stimulácie terčovej bunky hormónom, IP_3 difunduje na povrch endoplazmatického retikula, kde sa viaže ku špecifickému receptoru pre IP_3 , ktorý je proteín Ca^{2+} kanálu, zložený zo štyroch identických podjednotiek, každá obsahujúca IP_3 väzbové miesto.
- ✿ Nadviazanie IP_3 vyvolá otvorenie kanálu, čo umožní výstup Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do cytosolu.
- ✿ Počas druhotnej tvorby sa IP_3 hydrolyzuje na **inozitol 1,4-difosfát**, molekulu, ktorá vyvolá uvoľňovanie Ca^{2+} iónov z endoplazmatického retikula.
- ✿ Toto je veľmi rýchlo ukončené ak nie je účinkom PLC tvorené IP_3 naďalej.

Uvoľnenie intracelulárneho Ca^{2+} :

- ✿ Okrem na IP_3 citlivých Ca^{2+} kanálov, svalové bunky a neuróny exprimujú Ca^{2+} kanály nazývané **ryanodinové receptory (RYRs)**.

1,2-diacylglycerol a proteínová kináza C:

- ✿ Hydrolýza fosfatidylinozitol 4,5-difosfátu následkom nadviazania hormónu k cytoplazmatickému receptoru vedie ku tvorbe IP_3 a iných druhotných poslov, napr. 1,2-diacylglycerolu (DAG).
- ✿ DAG zostáva spojený s membránou.
- ✿ Základnou funkciou DAG je aktivácia rodiny proteínových kináz plazmatickej membrány, nazývané **proteínová kináza C**.
- ✿ Aktivácia proteínovej kinázy C závisí od iónov Ca^{2+} a DAG.

Multiplexné signálne cesty:

- Dva triedy cytoplazmatických povrchových receptorov a dva signálno-transdukčné dráhy indukované stimuláciou ligandom týchto receptorov:
- receptory spojené s G_s proteínmi sa viažu k adenylát cykláze, ktorá tvorí cAMP,
- receptory spojené s tyrozínovými kinázami viazanými k Ras proteínu.
- Aktivácia jednotlivých tried receptorov obyčajne vedie k tvorbe rôznych druhotných poslov, a oba triedy receptorov aktivujú alebo inhibujú tvorbu mnohých z tých istých druhotných poslov, vrátane Ca^{2+} , inozitol fosfátov a DAG.
- Signalizačná zložitosť a mnohorakosť.

RTKs a fosfolipáza C γ

- Určité enzýmy sa môžu viazať k zvyškom cytozolových fosfotyrozínov a aktivovať rým RTKs prostredníctvom ich SH2 domén.
- Väzba týchto enzýmov k aktivovaným RTKs lokalizuje ich do blízkosti svojich substrátov v cytoplazmatickej membráne.

Rôzne G proteíny prenášajú signály zo sedem transmembránovo-doménových receptorov na rôzne efektorové proteíny:

- Rôzne G proteíny sa viažu k rozličným efektorovým proteínom.
- Bolo objasnené, že trimerické G proteíny spriahnuté so sedem transmembránovými receptormi sa viažu k rôznym proteínom ako, iónové kanály, adenylát cykláza, PLC, cGMP-špecifické fosfodiesterázy vo fotorecepčných bunkách.
- Stimulácia receptorov spojených s G proteínmi môže modulovať veľa bunkových funkcií.
- Nakoľko stejné bunky exprimujú rôzne G proteíny, je ťažké určiť, ktorý G proteín sprostredkováva účinok daného ligandu.
- Prítomnosť rôznych G_α podjednotiek v jednotlivých bunkách umožňuje, že jeden a ten istý ligand môže vyvolať signálnu transdukciiu viacerých efektorových proteínov.

Týmto mechanizmom pôsobí rodopsín a fotoreceptory. Nachádzajú sa v diskoch retinocytov. Skladajú sa z 11-cisretinalu ako prostetickej skupiny a opsínu (7-transmembránovo doménová bielkovina). 11-cisretinal je väzbou Schiffovej bázy kovalentne pripojený k proteínu. Aminoterminálny koniec je nasmerovaný do vnútra disku, C-terminálny smerom do cytosolu. Tento prenáša signál v smere G-proteínu. Svetlo izomerizuje 11-cisretinal na transretinal. To podstatne zmení geometriu retinalu (fotón sa mení na atómový pohyb), Schiffová báza sa deprotonuje a transretinal sa oddelí. K ďalšiemu stimulu sa transretinal musí redukovať na transretinol, a potom v tme sa oxiduje a izomerizuje na 11-cisre-tinal. Nedostatok vitamínu A (prekurzor 11-cisretinalu) vyvolá vĺčiu slepotu.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Farebné videnie je umožnené troma receptormi v čapíkoch, absorbujúcich modré, červené a zelené svetlo. Videné farby sú výsledkom zmesi týchto troch základných farieb. Fotoreceptory čapíkov majú štruktúru 7-transmembránových proteínov a obsahujú 11-cisretinal. Ich primárna proteínová štruktúra je veľmi podobná. Spektrálny rozdiel medzi zeleným a červeným receptorom je určený prakticky troma hydroxylovými skupinami blízko retinalu.

Signálna transdukcia aktivovaného receptora pokračuje špecifickým G-proteínom - **transducínom**. Jeden receptor je schopný aktivovať až 500 G-proteínov a tak vzniká 500 T_{α} -GTP (zosilnenie 1:500). S GTP viazaný transducín aktivuje **cGMP fosfodiesterázu (PDE)**. V tme sú dve katalytické podjednotky PDE (α a β) inhibované inhibičnou y podjednotkou. T_{α} -GTP aktivuje PDE tým, že vyvolá oddelenie inhibičnej podjednotky. Katalytický turnover PDE je 4200 s^{-1} . Vznikajúci cGMP aktivuje v plazmatickej membráne otvorenie Na^+ kanálu. Kanál je multimer pozostávajúci z 80 kDa podjednotiek. Otvorenie kanálu po naviazaní cGMP je silne kooperatívne a rýchlo reaguje na zmeny koncentrácie cGMP. Pokles koncentrácie cGMP vedie k zatvoreniu kanálu, do bunky nevstupuje viac Na^+ (jeden fotón zabráni vstupu jedného miliónu Na^+ , čo už je tretí krok zosilnenia) a nastáva hyperpolarizácia (nakoľko súčasne pracuje Na^+ vypumpujúca Na/K ATP-áza).

Vypnutie signálnej cesty videnia:

1. Transretinal sa odpojí z receptoru.
2. Receptor je fosforylovaný rodopsín kinázou, na fosforylovaný receptor sa naviaže arestinový proteín a blokuje PDE.
3. Transducín sa vypína následkom aktivity endogénnej GTPázy (aktivitu tohto enzýmu zvyšuje fosducín).
4. Guanylát cykláza je aktivovaná poklesom intracelulárnej hladiny Ca^{2+} (cGMP sa regeneruje). Pokles hladín Ca^{2+} je vyvolané tým, že cGMP okrem sodíkového reguluje aj kalciový kanál.
5. Zvýšená hladina cGMP otvára Na^+ a Ca^{2+} kanál.

Inzulínový receptor:

- Za bežných podmienok hladina glykémie je regulovaná dvoma hormónmi, inzulínom a glukagónom.
- Oba hormóny sú produkované bunkami **Langerhansových ostrovčekov** pankreasu.
- Inzulín je syntetizovaný a sekretovaný β bunkami ostrovčekov, a znižuje hladinu glukózy v krvi.
- Glukagón je peptidový reťazec obsahujúci 29 aminokyselín, produkovaný α bunkami pankreasu.
- Glukagón má opačný účinok ako inzulín, zvyšuje hladinu glukózy v krvi stimuláciou glykogenolýzy v pečeni.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

- Inzulínový receptor má tyrozínkinázovú aktivitu a patrí k RTK, ale signálne transdukčná dráha indukovaná inzulínom sa zásadne líši od RTK-mediovaných dráh.

Inzulín môže pôsobiť krátkodobo a dlhodobo:

- Bezprostredný účinok glukózy zahŕňa zvýšenie rýchlosti príjmu glukózy z krvi do svalových buniek a adipocytov zahrnutých v metabolizme glukózy.
- Dlhodobá expozícia inzulínu vyvolá zvýšenú expresiu pečenečných enzýmov, ktoré syntetizujú glykogén a enzýmov adipocytov, ktoré syntetizujú triacylglyceroly.
- Inzulín účinkuje aj ako rastový faktor pre mnohé bunky.
- Mnohé rast promočné účinky inzulínu sú skôr vyvolané jeho väzbou na receptor pre **inzulínu podobný rastový faktor 1 (IGF-1)**, ako na vlastný inzulínový receptor.
- IGF-1, ktorý má podobnú štruktúru a sekvenciu ako inzulín, je tvorený najmä v pečeni ako odpoveď na STH, primárny regulátor rastu organizmu.
- Jednotlivé hormóny sa viažu k cudzím receptorom stonásobne menej tesne, ako ku vlastným receptorom.

Signálna dráha inzulínu:

- Začína 130 kDa polypeptidom, nazývaným **substrát inzulínového receptoru 1 (IRS1)** obsahujúcom tyrozínové zvyšky, ktoré sa môžu rýchlo fosforylovať po stimulácii bunky inzulínom.
- Väčšina ostatných RTKs nefosforyluje IRS1; ale IGF-1 receptor ho fosforyluje.
- IRS1 sa neviaže k inzulínovému receptoru (IR).
- Fosforylovaný IRS1 (nie IR), sa viaže k SH2 doménam mnohých proteínov, vrátane GRB2, PI-3 kinázy a Syp.
- V signálnych cestách za účasti väčšiny ostatných RTKs, tieto proteíny sa priamo viažu na fosfotyrozínové zvyšky cytozolových domén receptoru.

Inzulín a glukagón spolupracujú:

- Glukagón je uvoľnený z α buniek ostrovčekov pankreasu ako odpoveď na nízke hladiny glukózy v krvi a nízke hladiny inzulínu.
- Schopnosť metabolizovať glukózu bunkami je regulovaná počas periódy hojnosti a nedostatku nastavením koncentrácie inzulínu a glukagónu v krvi.
- Ak glukóza v krvi vystúpi nad hladiny 4,5-5,0 mmol/l, β bunky pankreasu reagujú uvoľnením inzulínu do krvi.
- Ak hladina glukózy klesne pod $\sim 4,0$ mmol/l, α bunky začnú sekretovať glukagón do krvi.

Signálna transdukcia vyvolaná cytokínmi a interferónmi

Povrchové receptory jednej skupiny rastových faktorov – **cytokínové** (erythropoietin, interleukíny, interferóny, rastový hormón ai.) **receptory** nemajú tyrozínkinázovú aktivitu, napriek tomu väzba ich ligandov je doprevádzaná rýchlou tyrozínovou fosforyláciou celulárnych bielkovín. Dimerizáciu ich receptorov je totiž doprevádzaná naviazaním a aktiváciou **Janusových kináz (JAK)**. Tieto enzýmy majú dve kinázové domény a sú „bohovia brán a dvier“ ciest signálnej transdukcie vedúcej do bunky. JAK-enzýmy realizujú tyrozínovú fosforyláciu sami na sebe, na receptore a na takých transkripčných faktoroch, ktoré signál prenesú do jadra bunky a tam vyvolajú aktiváciu génov. Tieto sú **STAT proteíny** (*signal transducers and activators of transcription*).

Signály z povrchu bunky sa dostávajú rôznymi cestami ku genómu, stimulujú rôzne, ale väčšinou prekrývajúce sa skupiny génov. Dobrým príkladom je Fos-protoonkogén, ktorého ledva 300 bp promótorová oblasť predstavuje pre takmer všetky popísané cesty konečnú stanicu signálnej transdukcie, čiže je enhancérom cieľu. A aby bola situácia ešte komplikovanejšia, jeho produkt Fos-protein, je jednou z štruktúrnych jednotiek AP-1 faktoru.

Receptorom je hydrofóbná doména bez aktivity. Receptor sa môže skladať z jedného alebo dvoch reťazcov. Účinkom ligandu sa di- alebo trimerizuje.

Sprostredkovaná môže byť:

✘ **Tyrokinázovou cestou:** ligandy sú: interleukíny, erythropoetín, interferón, prolaktín a ďalšie. Aktiváciu tejto cesty môžu vyvolať aj také nie tyrozínkinázové receptory (s jednou hydrofóbnou doménou), ktoré aktivujú nie receptorové, ale cytosolové tyrozínkinázy (Janus – proteínkinázová rodina). Aktivovaná JaK (Janusová kináza) fosforyluje:

⌘ inzulínreceptorový substrát, ktorý sa potom viaže s proteínmi s SH2 doménou ako PLC β , PI3 kináza, shc (adaptérový proteín, ras MAP kinázová cesta),

⌘ nukleárne Stat proteíny (transkripčné faktory). Po tyrozínovej fosforylácii sa Stat proteíny dimeralizujú a translokujú sa do bunkového jadra.

✘ **Proteázovou cestou bunkovej smrti:** známe ligandy sú TNF (tumor nekrotizujúci faktor) a Fas ligand. Po väzbe receptoru a ligandu sa realizuje trimerizácia cez doménu bunkovej smrti. K receptoru sa viaže adaptérová bielkovina (funkcia totožná s GRB2) názvu FADD (*Fas associated death domain*), ktorý má dve domény bunkovej smrti. Druhá doména viaže k sebe ďalšiu proteázu cez doménu bunkovej smrti na proteáze a aktivuje ju. Spustí sa vlastne proteázová kaskáda.

✗ **Sfingomyelinázová cesta:** známe ligandy: IL-1, TNF, Fas ligand, interferón. Väzba medzi receptorom a sfingomyelázou nie je známa, ale inhibítory proteáz blokujú bunkovú smrť a uvoľnenie ceramidu. Čiže je možné, že proteázová kaskáda uvoľnenie ceramidu aktivuje:

sfingomyelín
↓ *sfingomyelináza*
ceramid → singozín → inhibícia PKC
↓ *ceramidáza*
od ceramidu závislá proteínkináza a fosfatáza, a PKC ☒.

V experimente sa dokázalo, že podaním ceramidu je možné zastaviť diferenciáciu a bunkový cyklus, a následne indukovať apoptózu.

Signálna transdukcia cez receptory notch typu

Tieto notch (zárez, vrub) receptory sa zúčastňujú v inhibícii diferenciácii. Väzba ligandu vyvolá takú konformačnú zmenu v intracelulárnej doméne receptoru, aby ten mohol byť štiepení proteázou. Odštiepený peptid sa dostáva do bunkového jadra, heterodimerizuje s dokujúcim proteínom a stimuluje syntézu celého radu antagonistickým bielkovín, ktoré blokujú funkciu génov zúčastnených v diferenciácii.

❶ **Hormónové jadrové receptory:**

Hormóny a vitamíny pôsobiace cez známe jadrové receptory:

- * hormóny so steránovou kostrou,
- * kyselina retinová,
- * hormóny štítnej žľazy,
- * 15-deoxy-prostaglandín I₂,
- * D-vitamín.

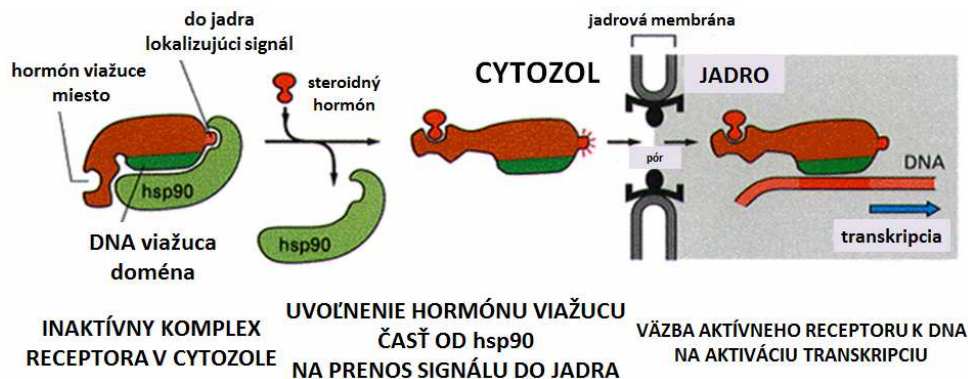
Jadrové receptory majú obvyčajne štruktúru zinkového prstu (pozri reguláciu génu). Steroidné receptory sú receptorové homodiméry, oproti tomu ostatné jadrové receptory so známym ligandom tvoria heterodimer s RXR (ktorého ligandom je kyselina 9-cisretinová). Tieto diméry rozpoznávajú špecifické úseky DNA (hormón responzívny prvok, HRE). To je AGGTCA v rôznych motívoch v prípade nesteroidných receptorov, u steroidných sú to 3 nukleotidmi oddelené palindromné štruktúry. Na väzbe s DNA sa zúčastňuje jeden zo zinkových prstov, druhý je potrebný k dimerizácii. V časti heterodiméroch je RXR tichým partnerom (ku aktivácii génu sa nevyžaduje kyselina 9-cisretinová), v iných prípadoch môžu byť oba receptory aktivované na sebe nezávisle, a prítomnosť dvoch rôznych ligandov pôsobí synergicky. Preto veľa ciest je pod kontrolou derivátov vitamínu A.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

V neprítomnosti ligandu sa receptory prítomná v jadre viažu k rôznym bielkovinám a silne inhibujú bazálnu transkripčnú aktivitu promoteru. Receptory steroidných hormónov sa nachádzajú v cytozole a vytvárajú veľké multiproteínové komplexy so chaperónovými bielkovinami (hsp90, hsp56), ktoré udržujú receptor v inaktívnej forme ale v konformácii schopnej rozpoznať ligand. Chaperóny sú dôležité aj pri funkcii receptorov.

Po väzbe ligandu z receptorov v jadre bunky sa oddelí represor a receptor interaguje s transkripčnými bielkovinami v okolí TATA boxu. V prípade steroidných receptorov sa receptor transportuje do jadra vo forme dimeru. Popri tom, že tieto receptory prostredníctvom svojich transaktivačných domén priamo regulujú transkripčnú aktivitu, môžu aj bez tejto domény ovplyvňovať prepis génov. V týchto prípadoch môžu heterodimerizovať s inými receptormi alebo transkripčnými faktormi a inhibovať alebo stupňovať ich funkciu (steroidný receptor môže vytvoriť trimer s fos/jun-om).

② **Bunka registruje stresové signály prostredníctvom faktoru tepelného šoku.** Receptorom je faktor tepelného šoku, ktorý je transkripčný faktor štruktúry leucínového zipsu. V kľudovom stave tvorí s hsp70 inaktívny komplex, najmä v cytozole. Následkom aktivácie (stresový signál) sa hsp70 oddelí a na faktore tepelného šoku sa trimerizujú a translokujú sa do jadra bunky (obr. 26). Tu rozpoznávajú prvky tepelnošokovej odpovede na promótoroch a spustia syntézu bielkovín tepelného šoku.



obr. 26 – Hsp a stresový signál

③ Často môže ísť o **polypeptidové posly**. Bielkoviny vylúčené jednou bunkou sa cez špecifický transportný systém dostanú do druhej cez bunkovú a jadrovú membránu a v bunkovom jadre spustia syntézu špecifických cieľových génov.

To ako určitý extracelulárny činiteľ ovplyvní funkciu génov cieľovej bunky závisí od toho, či je schopný preniknúť cez bunkovú membránu. To nie je problémom pre malé lipofilné molekuly, ktoré po nadviazaní sa na cytoplazmatické alebo nukleárne receptory ovplyvňujú expresiu génu. Členov **superrodiny steroidného receptora** okrem hormónov a vitamínov využívajú aj tkanivovú diferenciáciu regulujúce

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

morfogénne deriváty retínu a hormóny štítnej žľazy. Tieto intracelulárne receptory sú **transkripčné faktory závislé od ligandu**, a svoj gény regulujúci účinok realizujú po väzbe im zodpovedajúceho agens.

Prototypom tejto receptorovej rodiny je cytozolový proteín - **glukokortikoidový receptor**. V nestimulovanej bunke je prítomný v inaktívnej forme vo väzbe s proteínom tepelného šoku (hsp). Účinkom hormónu sa uvoľní steroidreceptorový komplex a translokuje sa do jadra a viaže sa k promótorovým oblastiam takých génov, ktoré obsahujú pre glukokortikoidy špecifický enhancérový prvok (HRE, *hormone responsive element*). HRE-oblasti steroidmi regulovaných génov sú konsenzné sekvencie. Nie sú úplne totožné, vykazujú odchýlky aj v schopnosti viazať receptor alebo v sile. Receptor sa viaže vo forme diméru, a keďže existuje viac izomérov receptorovej bielkoviny, môžu tvoriť homo- a heterodiméry. Regulácia hormón senzitivných génov je diferencovaná, a mimoriadne jemné indukčné rozdiely môžu byť v prípade niektorých génov.

Regulácia a jej úrovne

Regulácia je zložitý biologický proces, ktorý zaistí homeostázu organizmu za neustále sa meniacich podmienok vonkajšieho a vnútorného prostredia.

Úrovne regulácie (základné hladiny):

- **molekulová** - regulácia molekúl v organizme (aktivácia, inhibícia),
- **celulárna** - regulácia počtu a priestorového usporiadania molekúl organizmu schopných alebo neschopných (inhibovaných) funkcie,
- **tkanivová - orgánová** - regulácia počtu, priestorového rozloženia a funkcie buniek typických pre tkanivo alebo orgán,
- **neuro-humorálna** - zľadnenie činnosti všetkých orgánov organizmu za pôsobenia podnetov z prostredia.

Regulácia na ktoromkoľvek z uvedených stupňov znamená reguláciu funkcie bunky (aj keď sú aj extracelulárne regulačné mechanizmy, ako napr. zrážanie krvi).

Regulačný mechanizmus začína signálom (informáciou) **pôsobiacou na bunku z prostredia, alebo vznikajúcim vo vnútri bunky**.

Smer informácie je:

signál ⇒ receptor ⇒ zosilňovací s. ⇒ registračný s. ⇒ biol. odpoveď

proces signálnej transdukcie.

Inými slovami sa proces signálnej transdukcie deje v **signálno-transdukčnom systéme**. K tomuto systému patria predovšetkým proteíny povrchových a vnútrobunkových

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

receptorov, proteínofosfatázy a G proteíny. Pomocou uvedených proteínov, aktivovaných nadviazaním sa špecifických signálov, bunka reaguje špecifickým spôsobom podľa príslušnej genetickej informácie – **proliferáciou, diferenciaciou** alebo inou **špecifickou funkciou**. Väčšina buniek vyšších živočíchov je však naprogramovaná aj na nutnú prítomnosť **špecifických signálov**, ktoré jej umožnia prežiť. Pokiaľ tieto signály nie sú prítomné, vedie to obyčajne k aktivácii sebaovražedného programu bunky, ktorá odumiera. Tento proces, pokiaľ je geneticky kódovaný sa nazýva programovaná bunková smrť – **apoptóza**. Rôzne typy buniek vyžadujú rôzne skupiny signálov pre prežitie a tým je ich existencia obmedzená na rôzne prostredia v tele.

VŠEOBECNÁ CHARAKTERISTIKA SIGNÁLNEJ TRANSDUKCIE

Na základe uvedených faktov je zrejmé, že **signálna transdukcija sa realizuje tromi hlavnými molekulovými mechanizmami:**

✂ Prostredníctvom **sekundárnych poslov** (napr. cAMP, Ca⁺⁺, IP₃), ktoré sú samostatné v priestore oddelené malé, difundabilné molekuly, ktoré sú vo vode rozpustné a preto sa dobre pohybujú v cytozole a zasiahnu terčové proteíny. Druhá skupina sekundárnych poslov je skupina apolárnych membránových komponentov, ktoré aktivujú tým, že terčové proteíny pritiahnu k membráne (napr. DAG a iný sekundárny poslovia lipidového charakteru).

✂ Mimoriadne dôležitým mechanizmom signálnej transdukcie je **fosforylácia bielkovín**. V signálnom procese jednej bunky sa zúčastnia stovky serín/treonín a tyrozín-špecifických proteínkináz.

✂ Stále viac sa dostáva do popredia aj dôležitosť **makromolekulových vzťahov**: napr. interakcie proteín-proteínové (napr. ligand-receptor, receptor-adapter, adapter-terčový proteín), väzba transkripčných faktorov ku DNA je nutná pre transmembránové, transcytoplazmatické a nukleárne signálne transdukcie.

Jednou z kľúčových otázok signálnej transdukcie je **špecifita**, čiže ako sa zrealizuje na extracelulárny signál tkanivovo špecifická odpoveď? Špecifita je zabezpečená súčinnosťou viacerých mechanizmov:

- ✂ expresiou tkanivovo špecifických transdukčných proteínov,
- ✂ tvorbou špecifických transdukčných komplexov a voľnosťou „prechodných“ ciest,
- ✂ konformáciou určitých chromatinových oblastí vznikajúcich počas tkanivovej diferenciacie, ktorá určuje prístupnosť niektorých génov (napr. imprinting),
- ✂ aktivácia bunkovo špecifických transkripčných faktorov,
- ✂ stimulácia promótorov prostredníctvom multiplexných regulačných prvkov.

Následkom všetkých týchto mechanizmov jeden a ten istý ligand môže v rôznych bunkách vyvolať diferencovanú expresiu génov a tým odlišnú fenotypovú odpoveď.

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

Signál počas transdukcie sa zosilňuje - **amplifikuje**, nakoľko jej proximálne prvky sú schopné stimulovať naraz veľký počet distálnych proteínov. Napr. MAPK kaskáda podľa odhadov je schopná na desaťtisíc násobnú amplifikáciu. Preto niekedy reaguje bunka aj na drobný signál dramaticky.

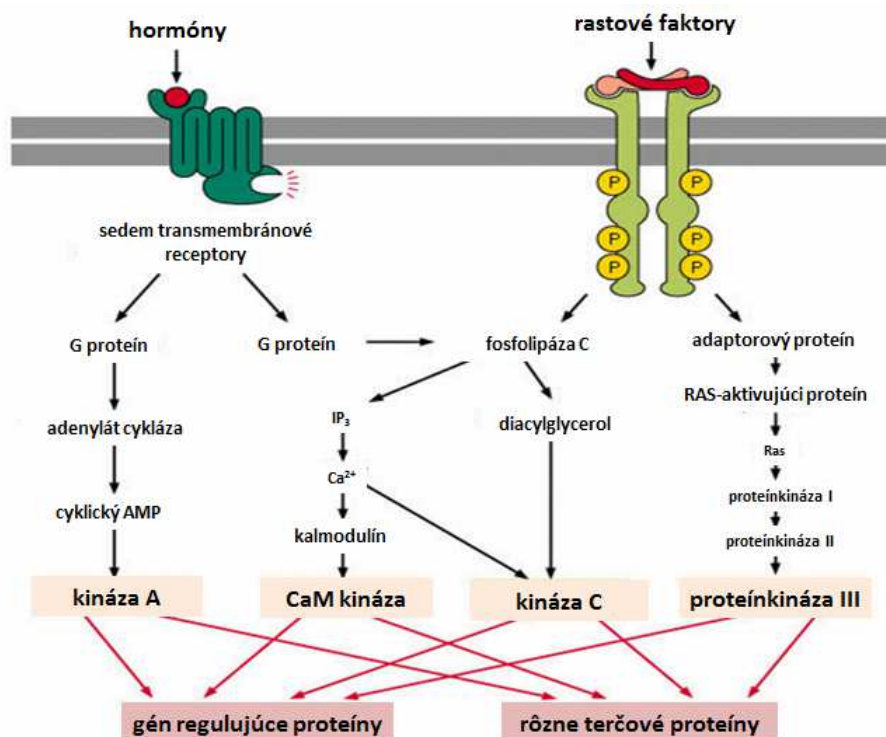
Dôležitou charakteristikou signálnej transdukcie je **regulovateľnosť**, čiže aktivácia každej signálnej molekuly musí byť nasledovaná podľa možnosti rýchlou inaktiváciou. V ľudskom organizme:

- ☞ doteraz známych asi 2 000 proteínkináz vyvažuje asi 1 000 proteinfosfatáz,
- ☞ adenylátcyklázou tvorený cAMP je odstránený fosfodiesterázou,
- ☞ Ras-proteín je aktivovaný guaninnukleotid vymieňacím faktorom, a inaktivovaný GTP-ázu aktivujúcim proteínom,
- ☞ Ca^{++} vracia späť do endoplazmatického retikula Ca^{++} -pumpa.

Narušenie aktivačno-inaktivačnej rovnováhy má vážne následky:

→ pri transdukcii mitogénneho signálu aktivácia protoonkogénov, alebo strata funkčnosti supresorických bielkovín vedie k nekontrolovanému deleniu buniek, ku vzniku nádoru.

Signály v organizme v skutočnosti nepostupujú presne podľa vyššie popísaných ciest k jadru, ale na mnohých bodoch sa stretávajú, spájajú, rozdeľujú sa, tvoriac tak zložitú sieť. Hovoríme tu o tzv. **dialógu** jednotlivých mechanizmov, čo mnohonásobne zvyšuje jemnosť regulácie (obr. 27).



obr. 27 – Interakcia medzi signálnymi dráhami (signálotransdukčný dialóg)

Ništiar, F., Rácz, O., Beňačka, R.:
POSTAVENIE PATOFYZIOLÓGIE V ZUBNOM LEKÁRSTVE

O interakcii ciest signálnej transdukcie hovoríme vtedy, ak prvok jednej cesty signálnej transdukcie ovplyvňuje činnosť prvku inej cesty signálnej transdukcie.

Môže mať formy:

- Inhibícia:** jeden signál inhibuje iným signálom vyvolanú biologickú odpoveď.
- Potencujúci účinok:** jeden signál sám osebe nevyvolá biologickú odpoveď, ale stupňuje účinok vyvolaný iným signálom.
- Zvyšujúci účinok:** oba signály sú schopné samotné vyvolať biologickú odpoveď, ale ak pôsobia spoločne, biologická odpoveď je silnejšia.
- Synergizmus:** k vyvolaniu biologickej odpovede je potrebná prítomnosť dvoch signálov.

Hladiny interakcie môžu byť na úrovni:

- receptoru,
- G-proteínu,
- enzýmu produkujúceho sekundárny posol,
- enzýmu inhibujúceho sekundárny posol,
- terča sekundárneho posla,
- jadra,
- proteínfosfatázy.

LITERATÚRA:

1. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A. et al.: *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publ., Ústí nad Labem, **1998**, 630 s.
2. Beňačka, R., Ništiar, F., Rácz, O.: *Základy molekulovej medicíny II*. Vysokoškolské učebné texty LF UPJŠ. Košice, **2004**, p. 1-88.
3. Berridge, M.J.: *Cell Signalling Biology*. **2014**, doi:10.1042/csb0001001
4. Davies, K.J.: Adaptive homeostasis. *Mol. Aspects Med.*, **2016**, Apr 22. pii: S0098-2997(16)30023-1. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.007
5. Dennis, E.A., Norris, P.C.: Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 15, **2015**, p. 511-523.
6. Fölsch, U.R., Kochsiek, K. Schmidt, R.F.: *Patologická fyziologie*. Grada - Avicenum, Praha, **2003**, 48 - 60.
7. Hanáček, J., Plevková, J., Tatár, M., Brozmanová, M.: *Patologická Fyziológia. Vybrané kapitoly. Elektronická učebnica pre študentov všeobecného lekárstva s kazuistikami*. ISBN: 978-80-89544-79-0, Ústav patologickej fyziológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine, **2014**, 409 strán.
8. Janoušek, V. a kol.: *Patologická fyziologie pro stomatology*. Avicenum, Praha, **1990**.
9. Ništiar, F., Beňačka, R., Rácz, O.: *Základy molekulovej medicíny III*. Vysokoškolské učebné texty LF UPJŠ. Košice, **2005**, s. 1-72.
10. Rácz, O., Ništiar, F., Riemerová, M. a spol.: *Všeobecná patologická fyziológia*. Amicus, Košice, **1996**, s. 1-110.
11. Touger-Decker, R., Sirois, D.A., Mobley, C.C. (Eds.): *Nutrition and Oral Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, **2004**, p. 1-379.