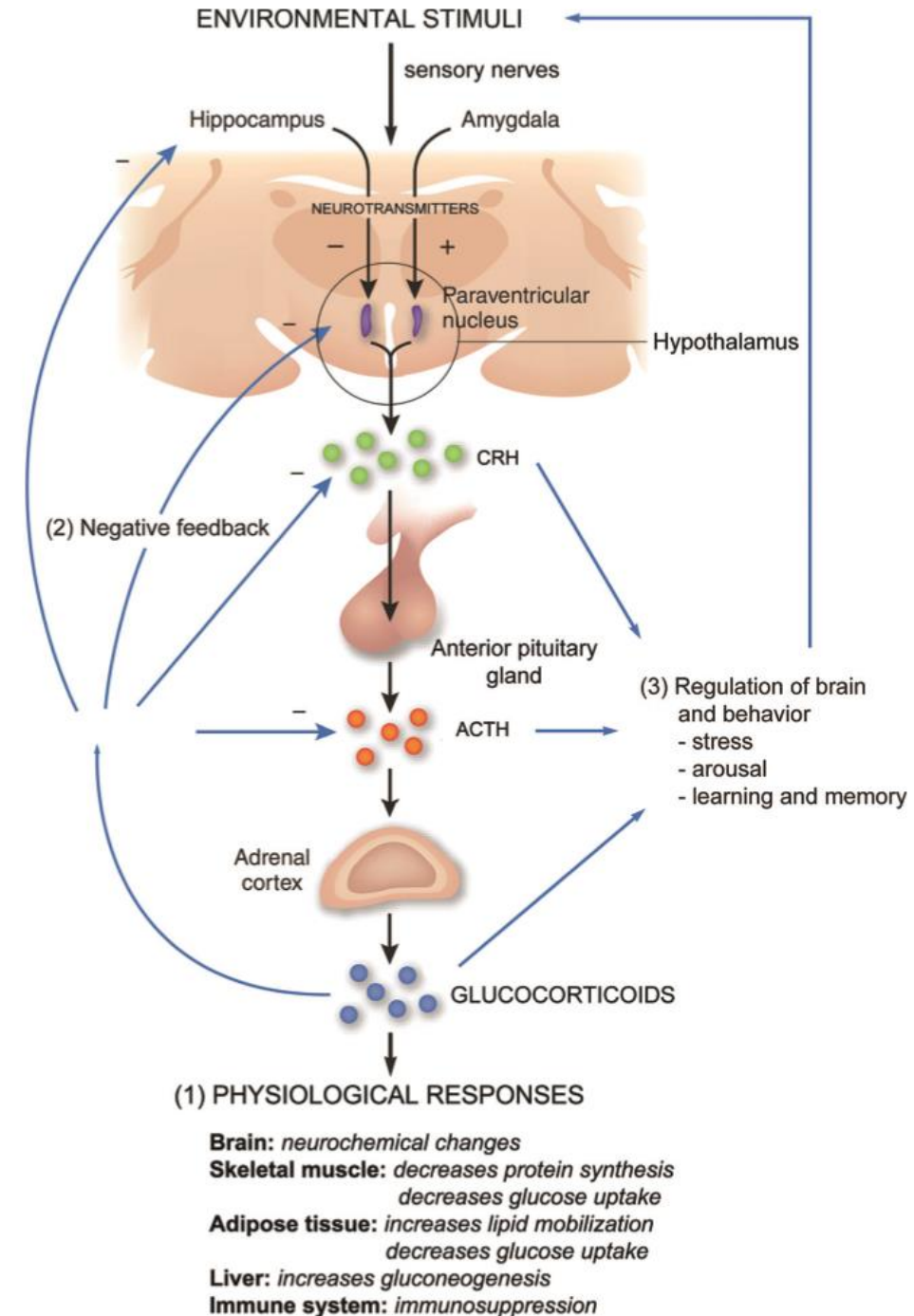


Obecné principy endokrinních funkcí.

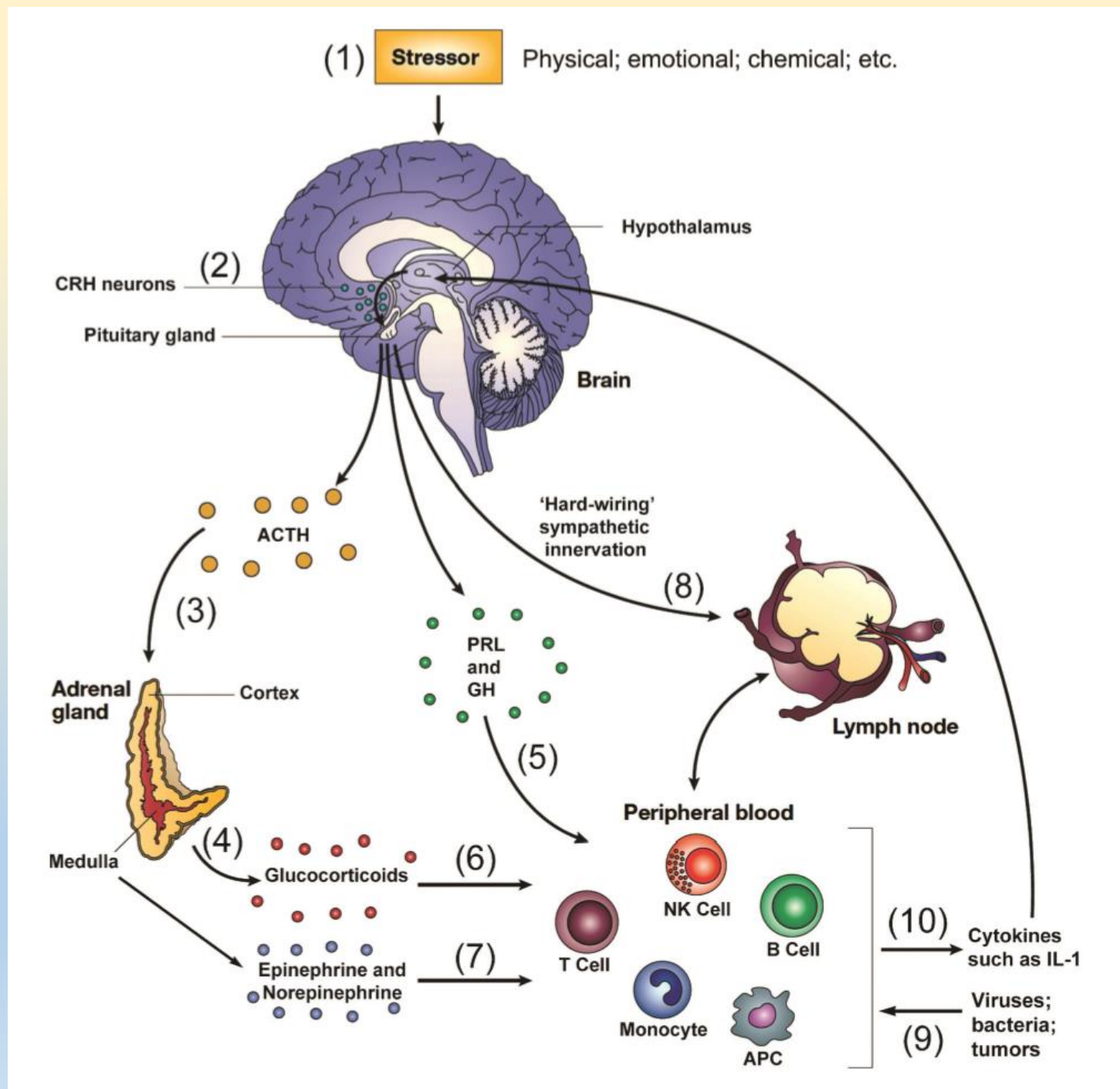
Integrační systémy organismu

- Integrace a koordinace = zajištění integrity a činnosti organismu na všech úrovních vzhledem k měnícím se podmínkám zevního a vnitřního prostředí
- **Humorální systém**
- **Nervový systém**
- **Imunitní systém**



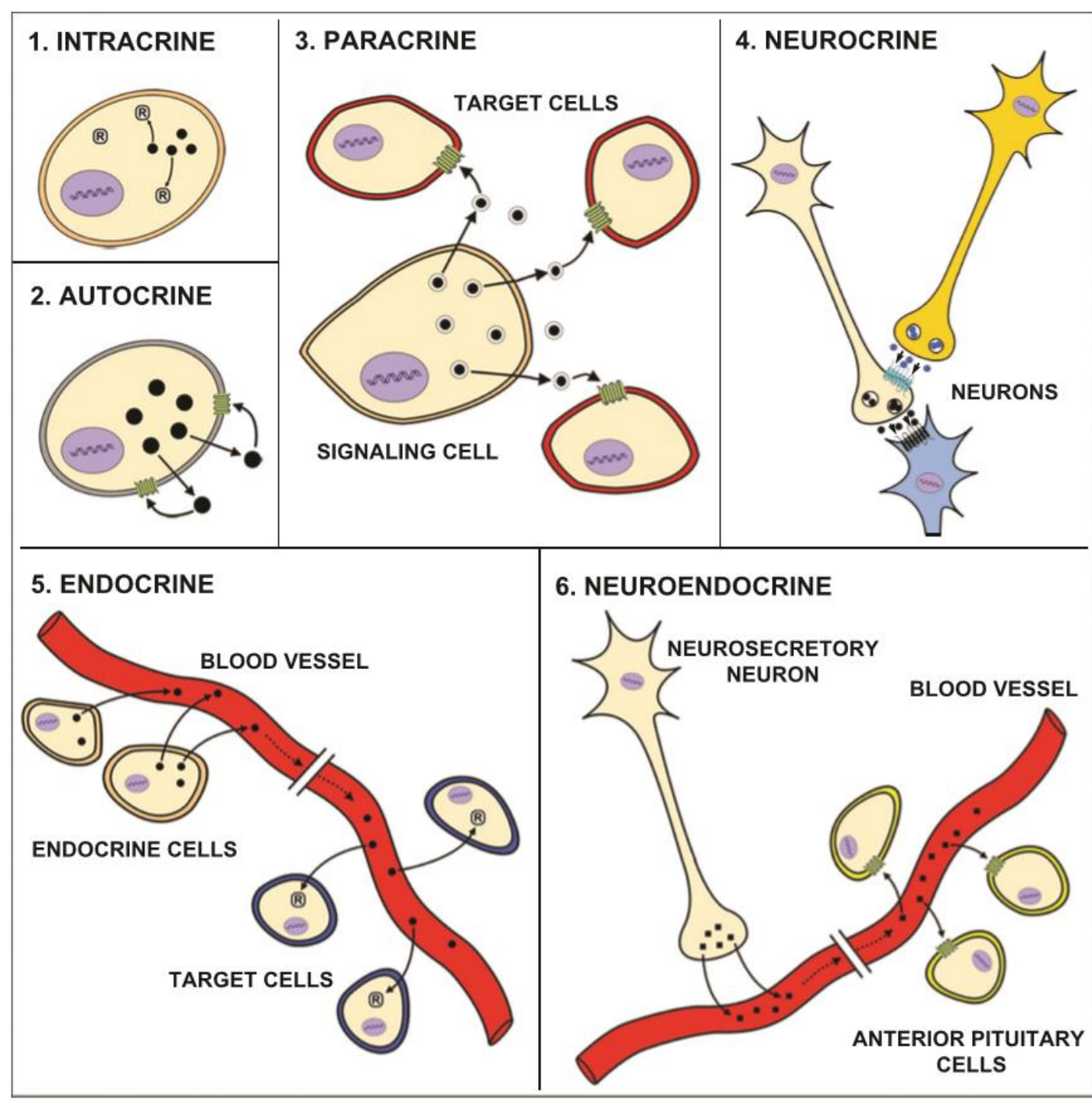
Žádný ze systémů
nepracuje nezávisle na
ostatních = funkční
integrace

- Hormony
- Neurohormony
- Neurotransmitery
- Parakrinně (autokrinně) působící
působky



Jak spolu buňky komunikují?

- Intrakrinie
- Autokrinie
- Parakrinie
- Neurokrinie
- Endokrinie
- Neuroendokrinie



endokrinie

zdroj



žláza

- syntéza/sekrece
- žádné ovlivnění specifičnosti účinku

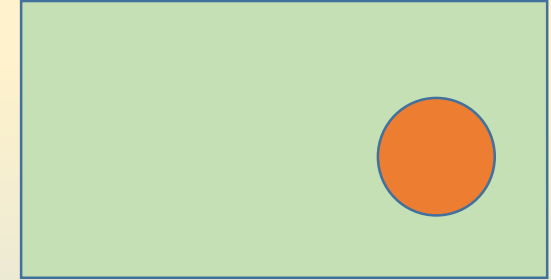
prostředí



krev

- univerzální prostředí
- diluce a interakce

cílová buňka



- receptor = specifičnost
- buněčná odpověď
 - počet receptorů
 - signální dráhy
 - další ligandy
 - metabolizace ligandu/receptoru

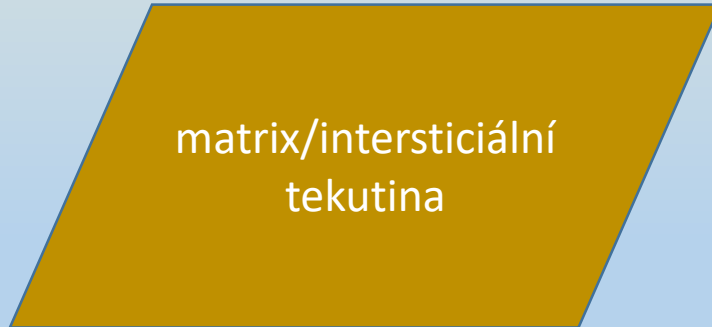
parakrinie, autokrinie

buňka

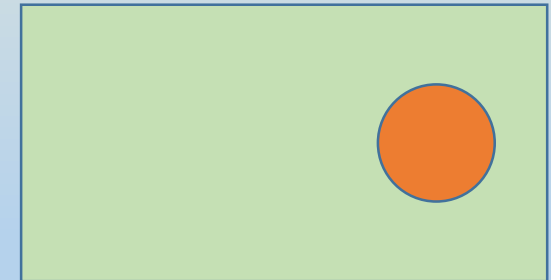


- syntéza/sekrece
- hlavní determinant cílové buňky (dáno lokalizací)

matrix/intersticiální tekutina



- difuze
- vazebné proteiny
- proteázy
- komponenty extracellulární matrix

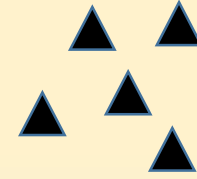


- specifičnost a senzitivita
- difuzní bariéra
- determinanty gradientu
- inhibiční signální dráhy
- vliv dalších ligandů
- vazebné proteiny

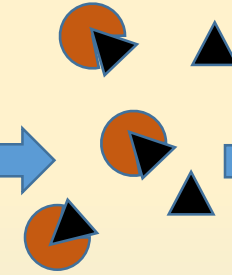
parakrinie



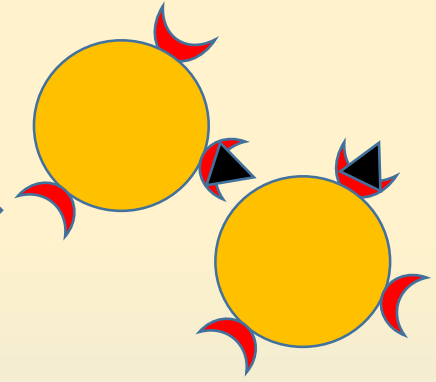
Intersticiální tekutina



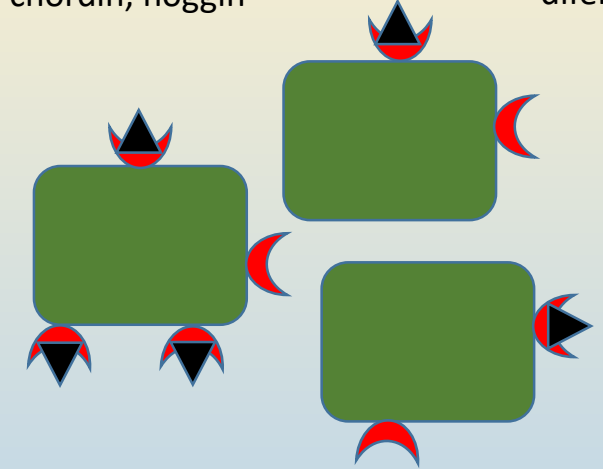
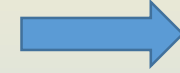
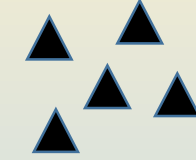
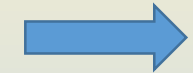
BMP4



proteázy, chordin, noggin

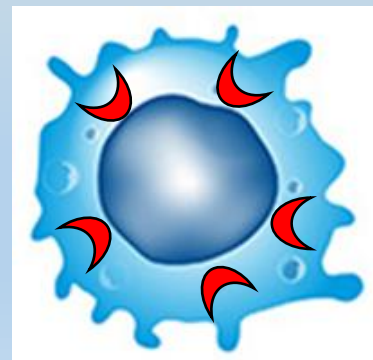


diferenciace



kostní formace

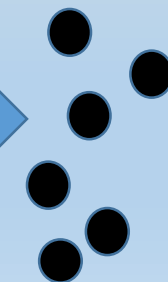
autokrinie



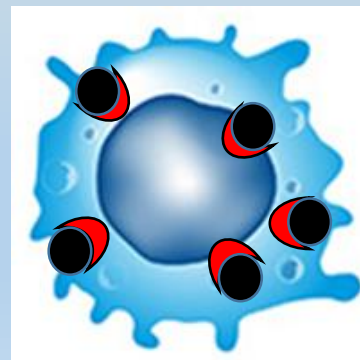
makrofág



Intersticiální tekutina/IVF



1,25-[OH]₂D₃

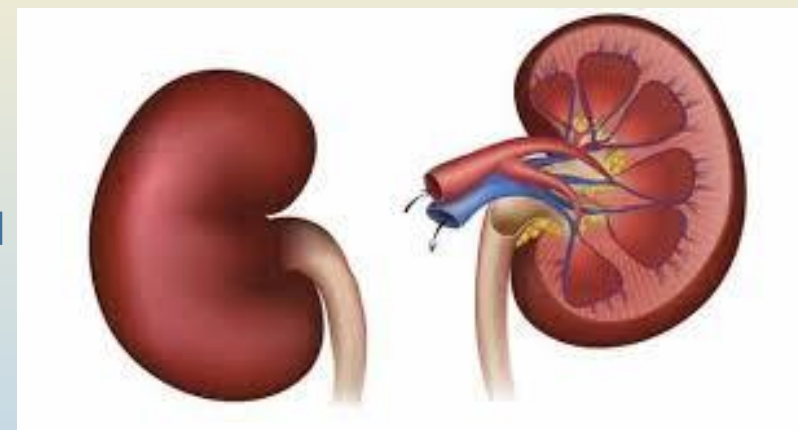
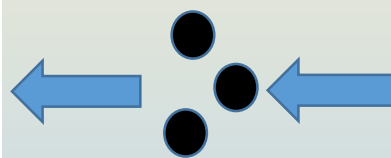
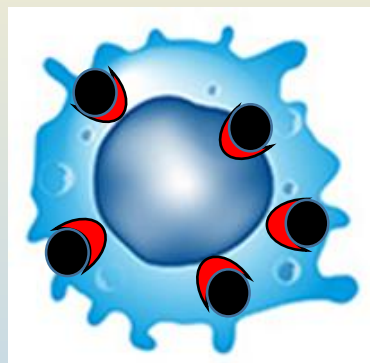
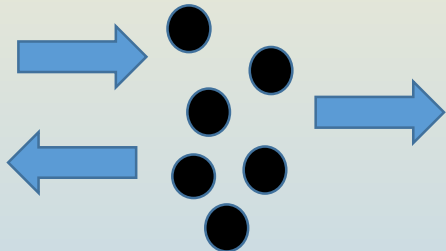
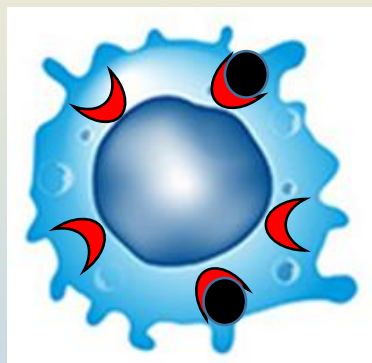


antimikrobiální peptidy

autokrinie

parakrinie

endokrinie



makrofág

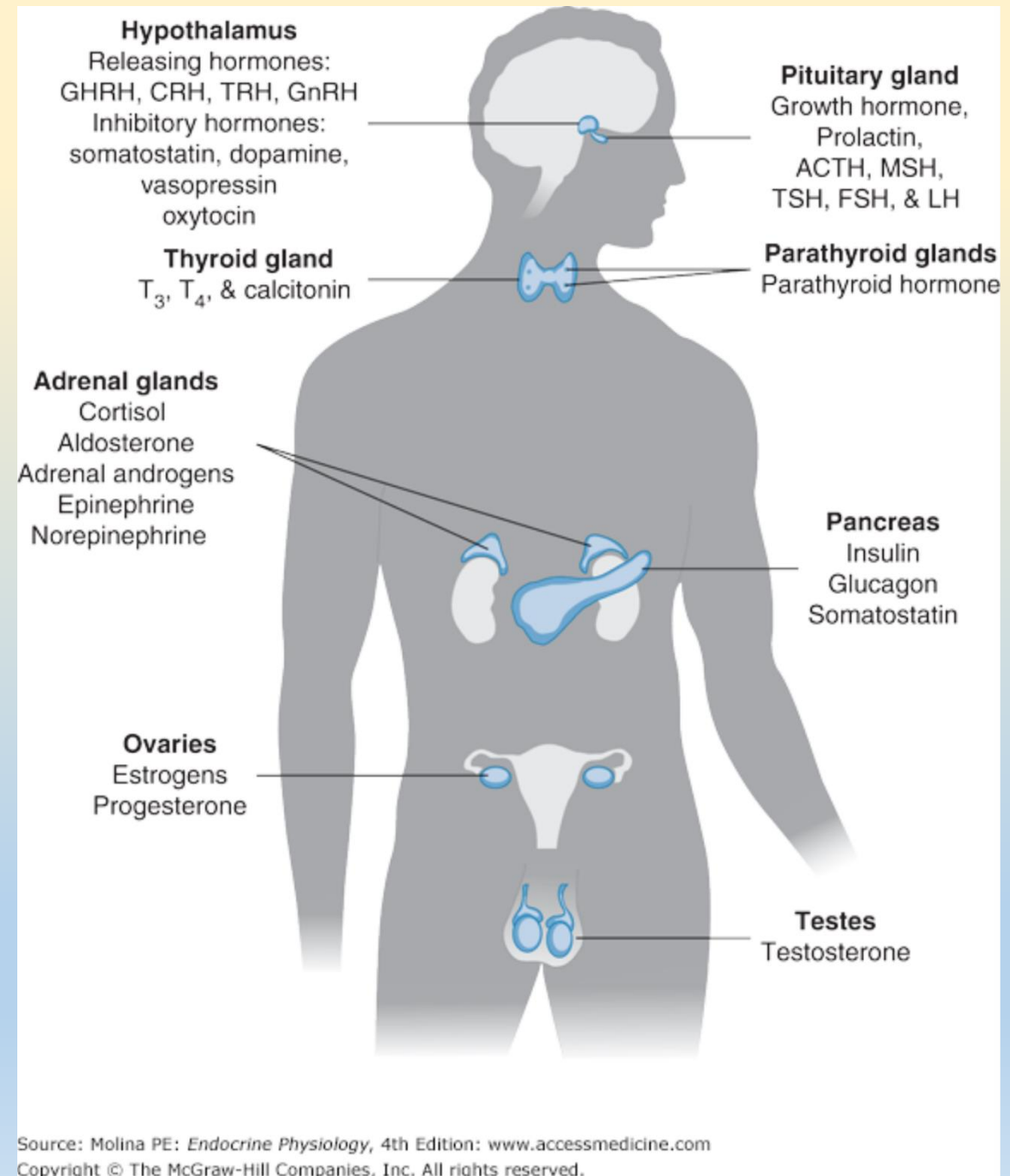
$1,25\text{-[OH]}_2\text{D}_3$

$1,25\text{-[OH]}_2\text{D}_3$

ledvina – proximální tubulus

Hormony

- Starling 1905 - *sekretin*
- Glandotropní hormony
- Aglandotropní hormony
- Cílové buňky
- Limitovaná doba působení



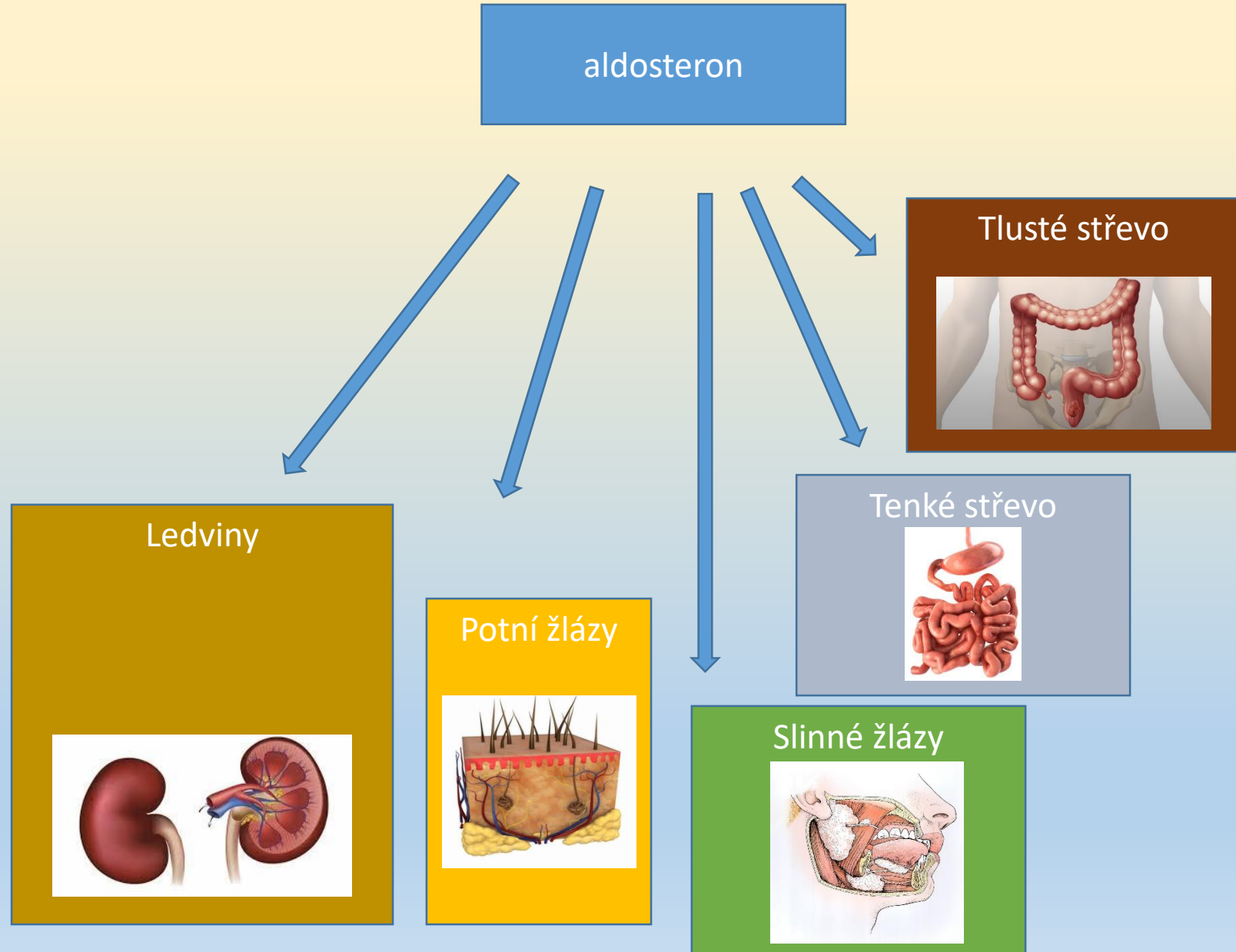
Chemická povaha hormonů

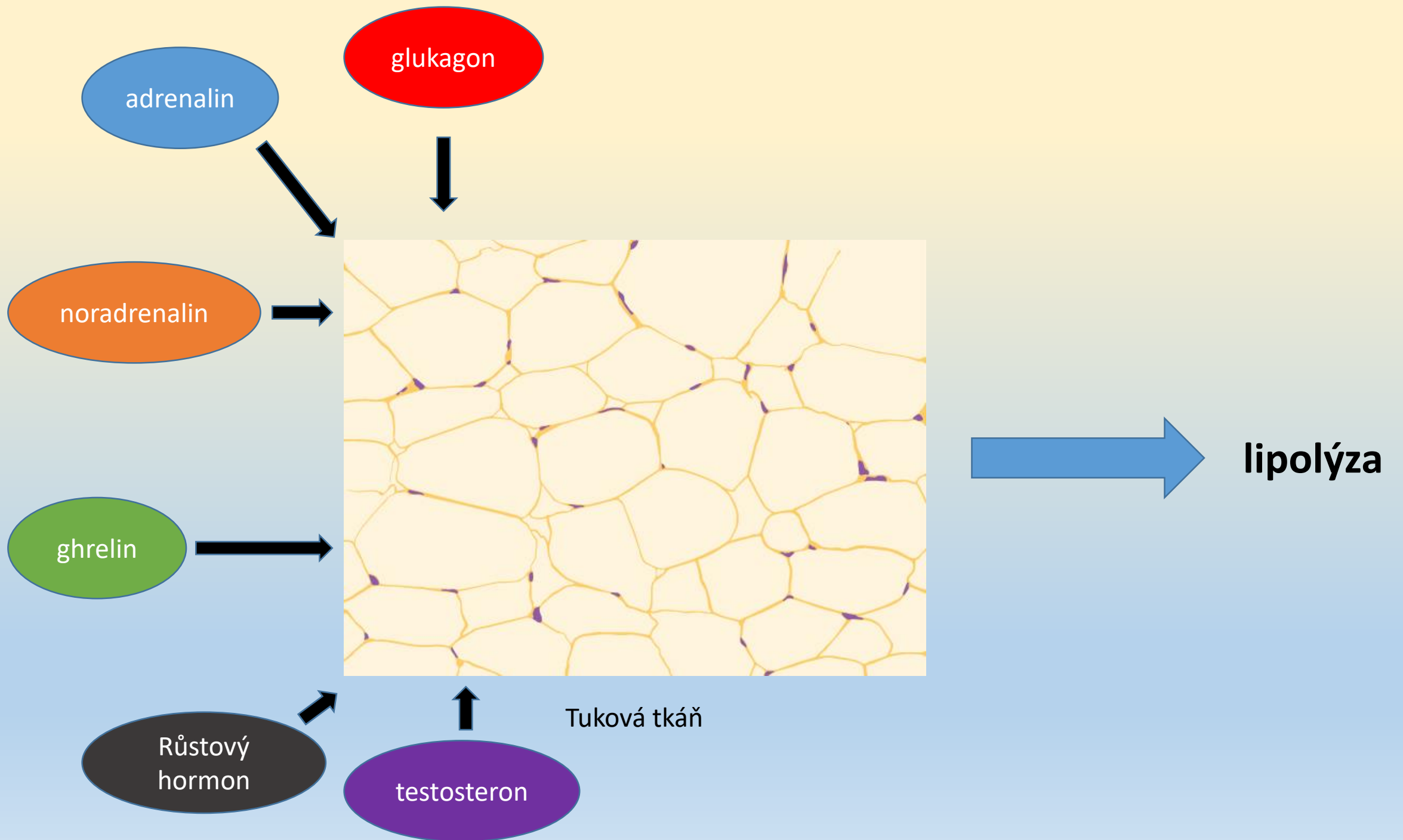
Hormon - charakteristika	Peptidy - proteiny	Katecholaminy	Steroidní hormony	Tyreoidální hormony
F-CH vlastnosti	hydrofilní	hydrofilní	lipofilní	lipofilní
syntéza	proteosyntéza	modifikace Tyr	prekurzory CH	modifikace Tyr
zásoba	sekreční granula	sekreční granula	není	koloid
sekrece	řízená exocytóza	řízená exocytóza	difúze	difúze
transport	volné	volné/ slabě vázané	vázané	vázané
eliminační poločas	krátký (4 – 40 – 170 min)	velmi krátký (2 – 3 min)	středně dlouhý (až 180 min)	Dlouhý (20 hod – 7 dní)
receptory	membránové	membránové	cytosolové	jaderné
účinek	krátkodobý	velmi krátkodobý	dlouhodobý	dlouhodobý
buněčná odpověď	rychlá	velmi rychlá	pomalá	pomalá

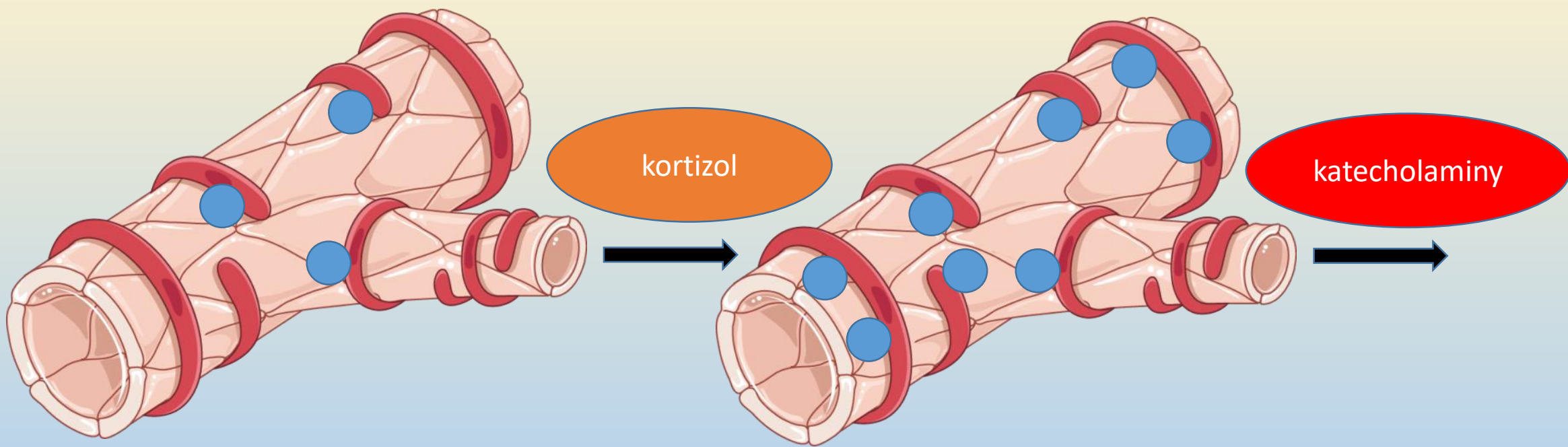
CHEMICKÁ STRUKTURA HORMONŮ URČUJE JEJICH BIOSYNTÉZU, SKLADOVÁNÍ, UVOLNĚNÍ, TRANSPORT, POLOČAS ELIMINACE, ZPŮSOB ELIMINACE A MECHANISMUS ÚČINKU NA CÍLOVÉ BUŇKY

Hormony

- Pleiotropní účinek
- Multiplicita
- Permisivní působení





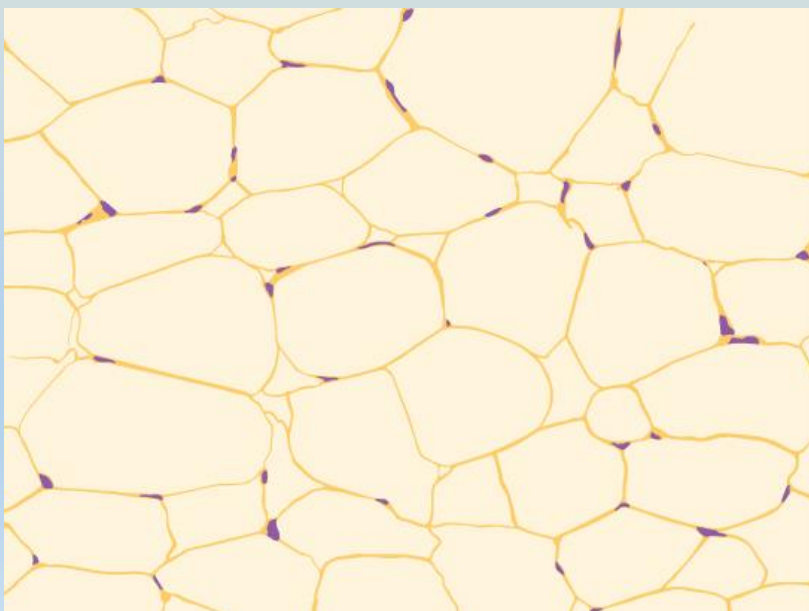


Arteriola – α_2 receptory

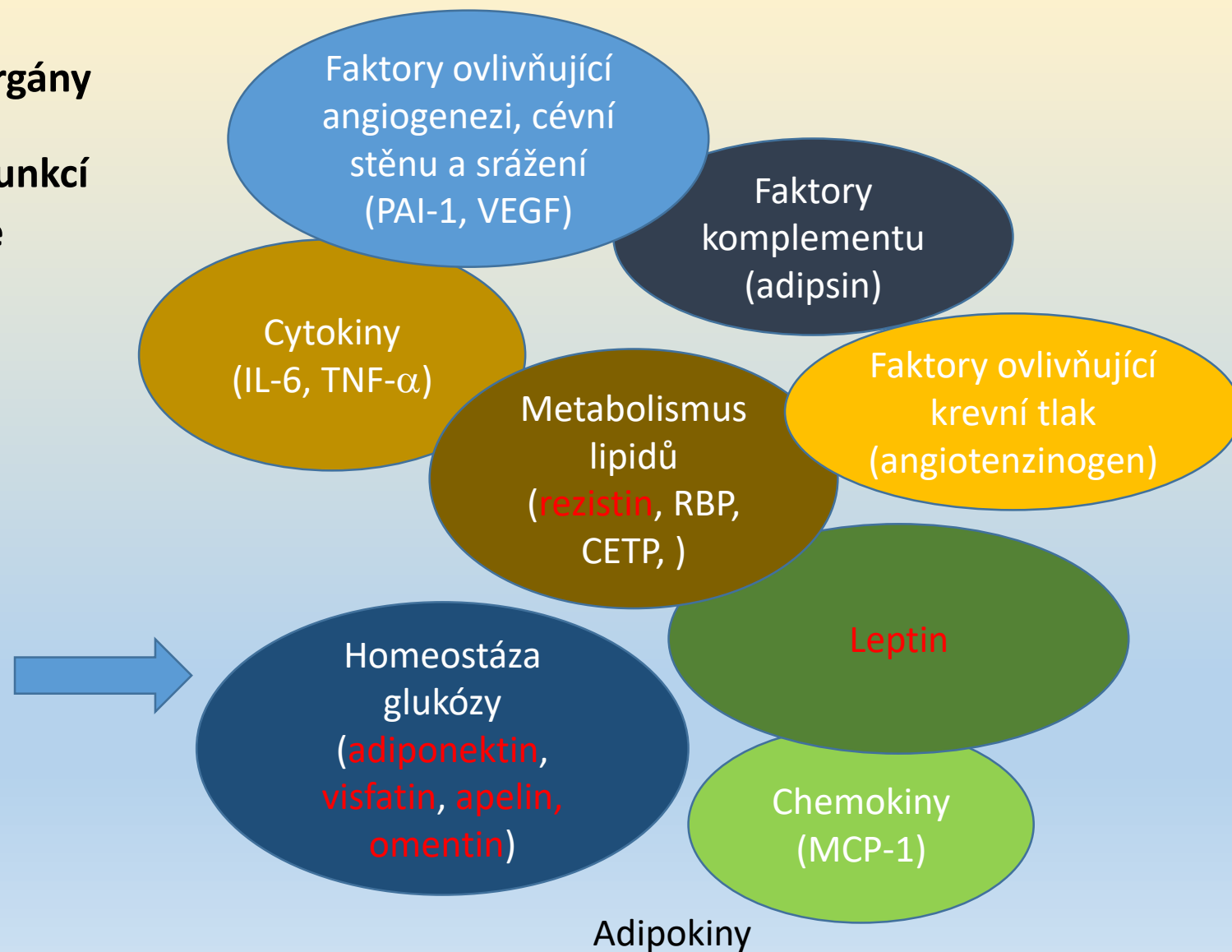
vazokonstrikce

Endokrinní orgány

- specializované buňky – specializované orgány (endokrinní)
- „sekreční“ buňky – orgány s endokrinní funkcí
- buňky bez specializované sekreční funkce
- buňky konvertující prekurzory hormonů



Tuková tkáň



Klinické aspekty

• Produkce hormonů nádory – PARANEOPLASTICKÉ SYNDROMY

Nádory plic

- ADH (hyponatrémie)
- ACTH (Cushingův syndrom)
- PTHrP (hyperkalcémie)

Nádory jater a ledvin

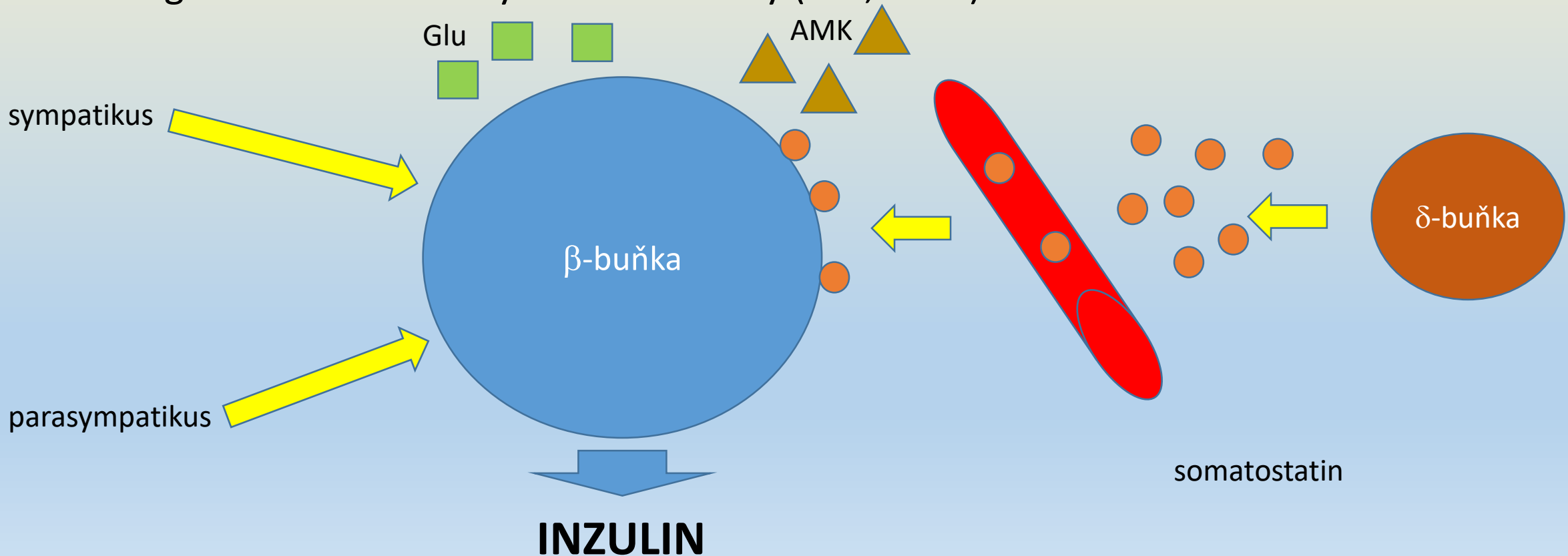
- erythropoietin
(polycytémie)

Nádory GIT

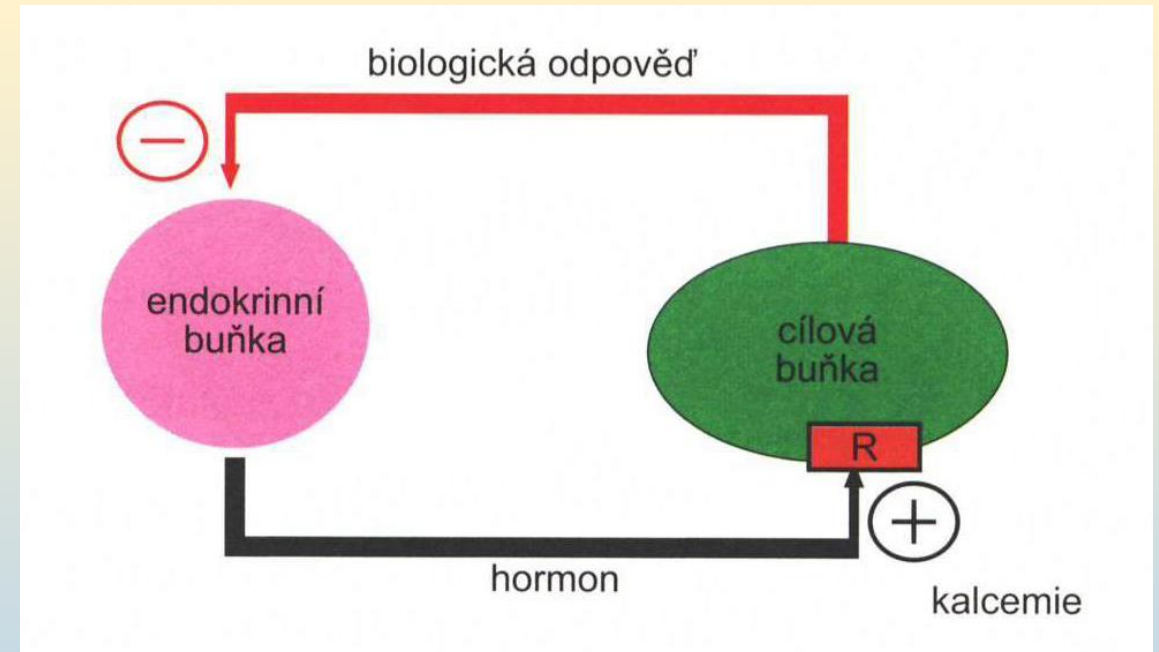
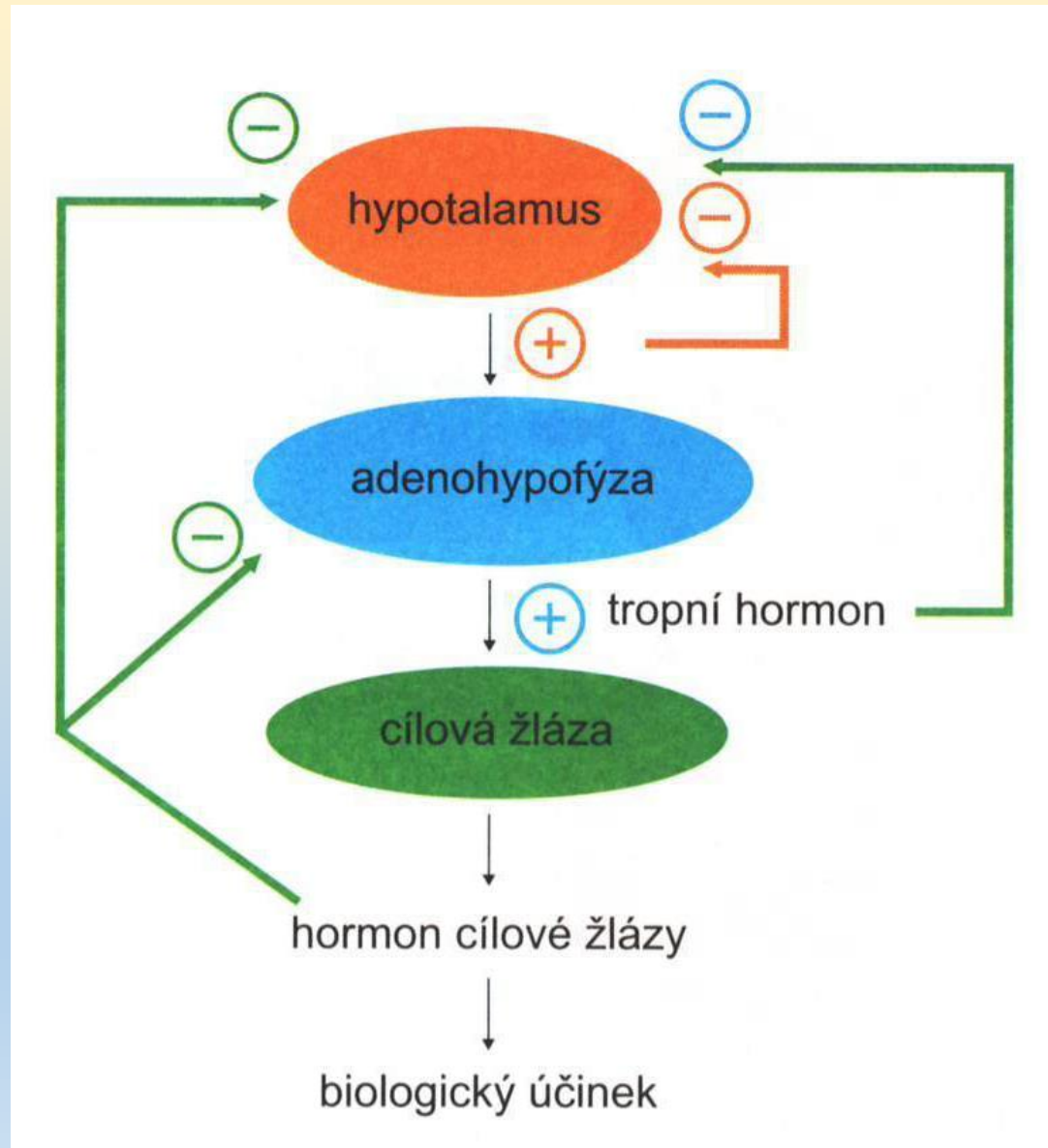
- ACTH (Cushingův syndrom)

Sekrece hormonů a její regulace

- Neurální kontrola
 - hypothalamus
 - sympatikus, parasympatikus
- Hormonální kontrola
- Regulace sekrece ionty nebo substráty (Glu, AMK)



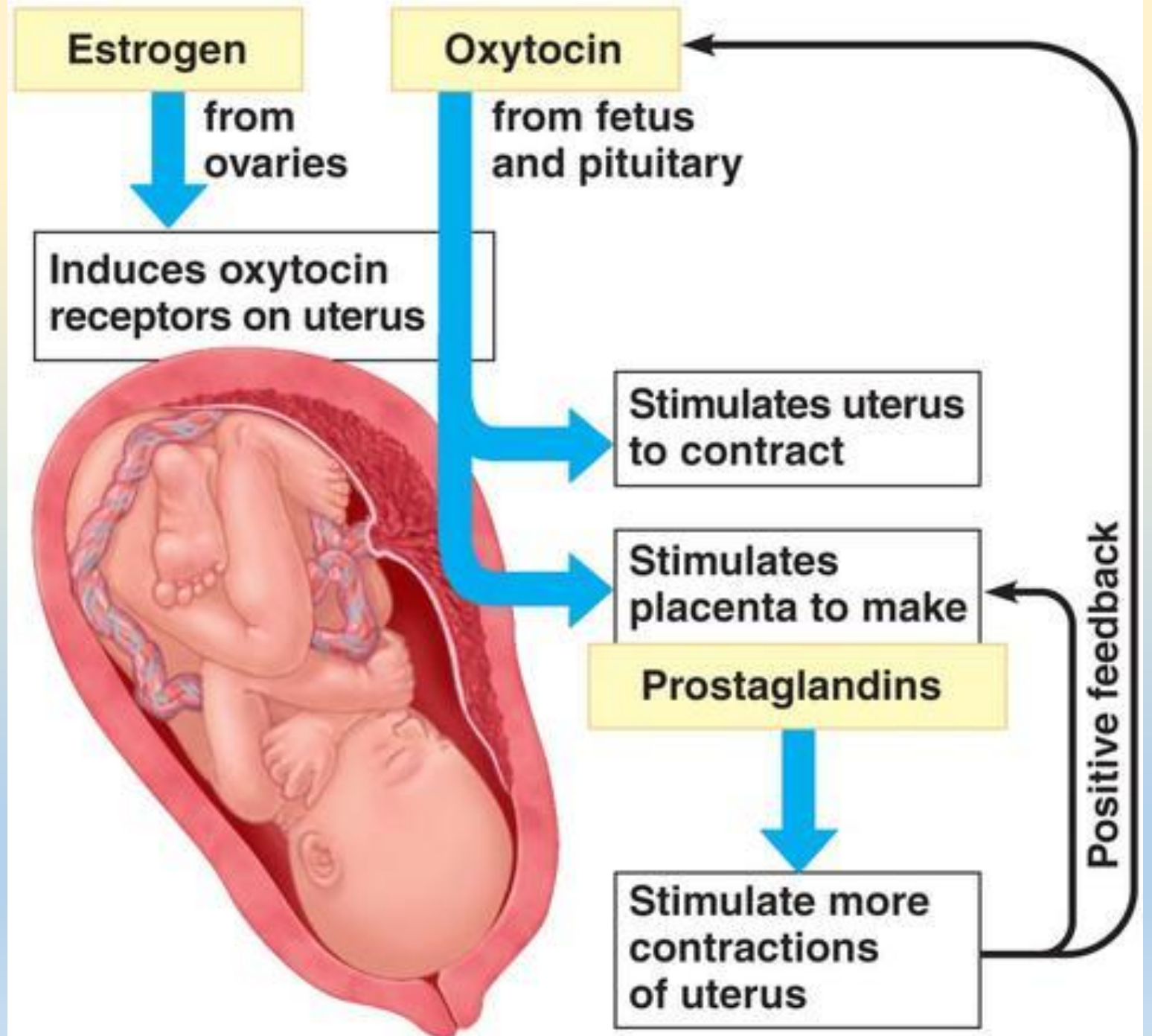
Sekrece hormonů je regulována zpětnovazebně



Zpětná vazba
Negativní X Pozitivní
Jednoduchá X Složitá

Převzato. Kittnar et al. Lékařská
fyziologie. 1. vydání. Grada 2011.

Pozitivní zpětná vazba – proč?



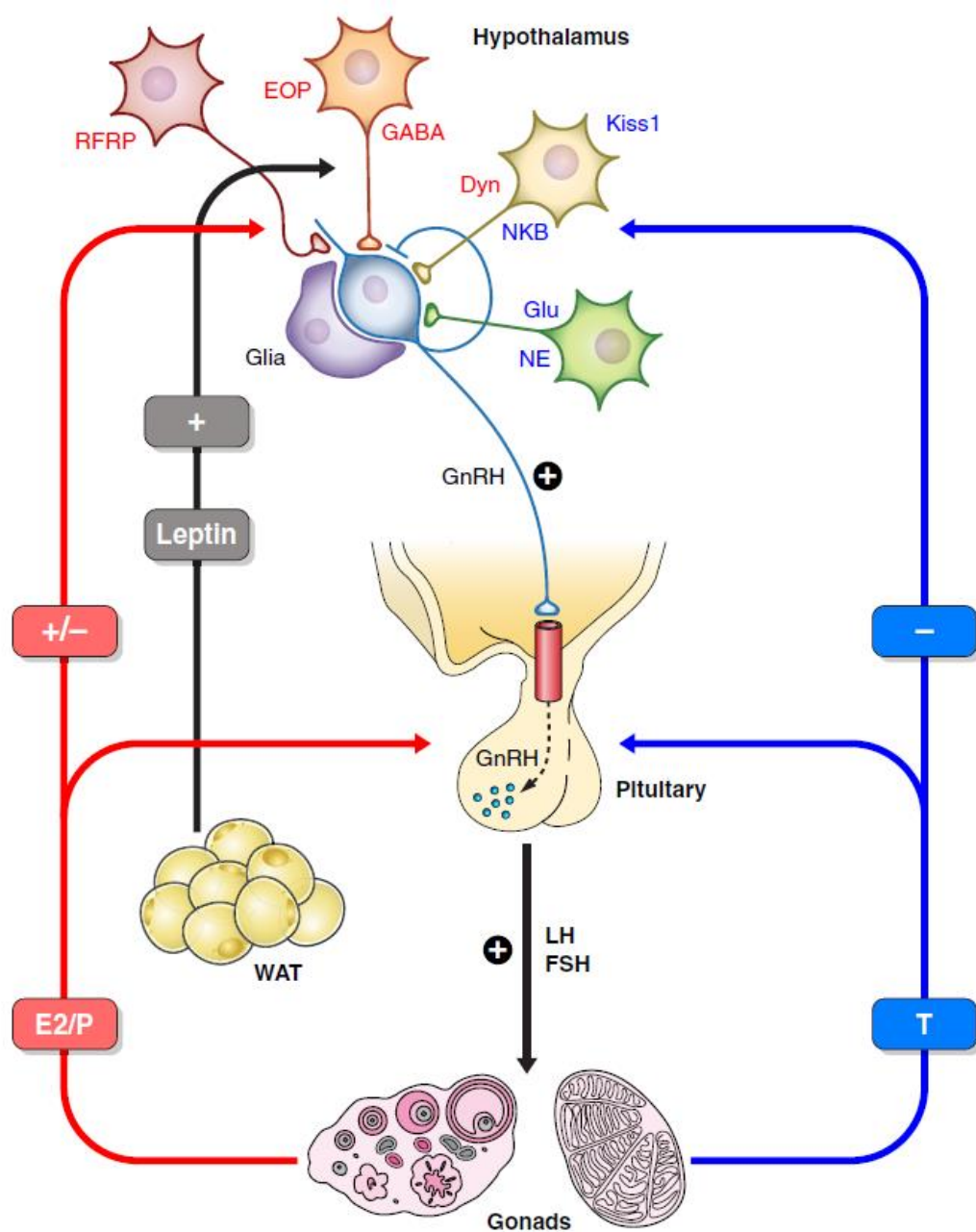
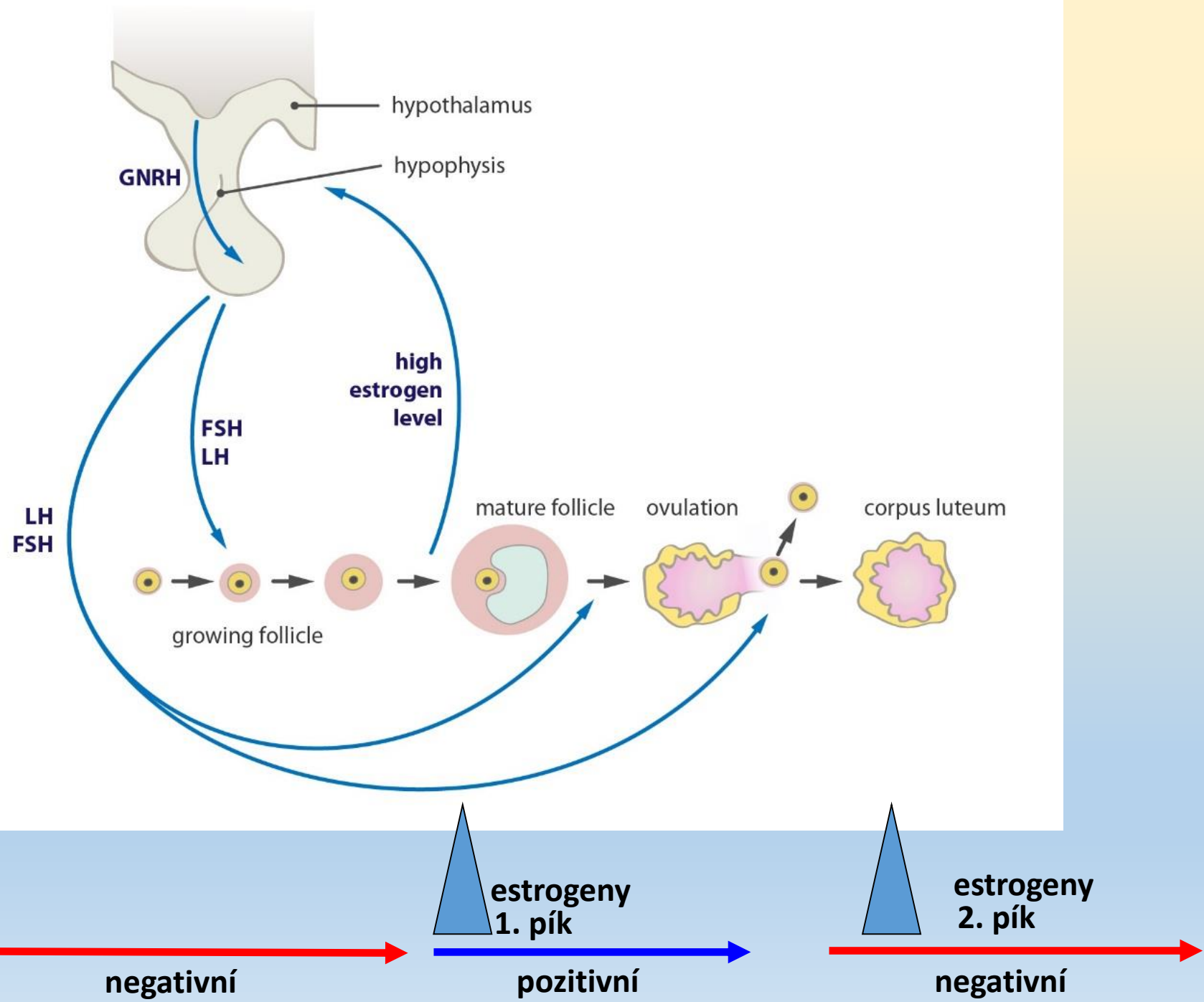


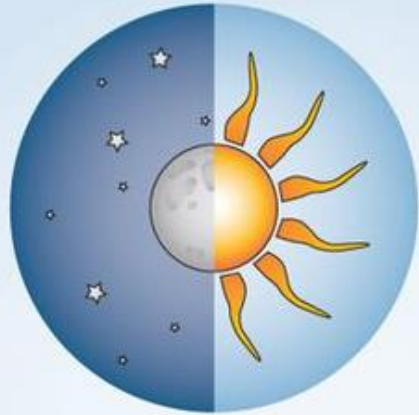
FIGURE 1. Neurobiology of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Schematic presentation of the major elements of the neuroendocrine axis controlling reproduction: the HPG axis. Hypothalamic GnRH neurons, which receive trans-synaptic and glial inputs, release GnRH to the hypophysial portal blood system. In turn, GnRH dictates the pulsatile secretion of gonadotropins, LH and FSH, that stimulate the maturation and regulate the function of the gonads; note that in the scheme, both the ovary and testis are presented. These major hormonal elements are connected via feed-forward and feedback regulatory loops. The function of the HPG axis is under the regulation of several peripheral signals that include gonadal steroids, responsible for feedback control: testicular testosterone (T) conducts inhibitory actions on GnRH/gonadotropin secretion (negative feedback), whereas ovarian steroids, mainly estradiol (E2) and progesterone (P), can carry out both negative- and positive-feedback actions depending on the stage of the ovarian cycle. Other peripheral regulators of the HPG axis are metabolic hormones; among those, the prominent stimulatory/missive roles of leptin, produced by the white adipose tissue (WAT), are depicted. Some of the central transmitters involved in the control of the HPG axis are also shown: predominant inhibitory transmitters are depicted in red, whereas excitatory factors are labeled in blue. Among the excitatory signals to GnRH neurons, Kiss1 neurons are highlighted. Please note that to concise presentation, discrimination between direct and indirect afferents to GnRH neurons is not made in the figure. Likewise, for sake of simplicity, some of the stimulatory and inhibitory signals to GnRH neurons are depicted in the same neurons; except for the Kiss1/NKB/Dyn neurons, this does not denote necessarily coexpression of these molecules in the same cells. Glu, glutamate; GABA, γ -aminobutyric acid; EOP, endogenous opioid peptides; NE, norepinephrine; NKB, neurokinin-B; Dyn, dynorphin; RFRP, RF-related peptides. [Adapted from Roa and Tena-Sempere (377).]

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., Tena-Sempere, M., 2012. KISSPEPTINS AND REPRODUCTION: PHYSIOLOGICAL ROLES AND REGULATORY MECHANISMS. *Physiological Reviews*. 92, 1235-1316.



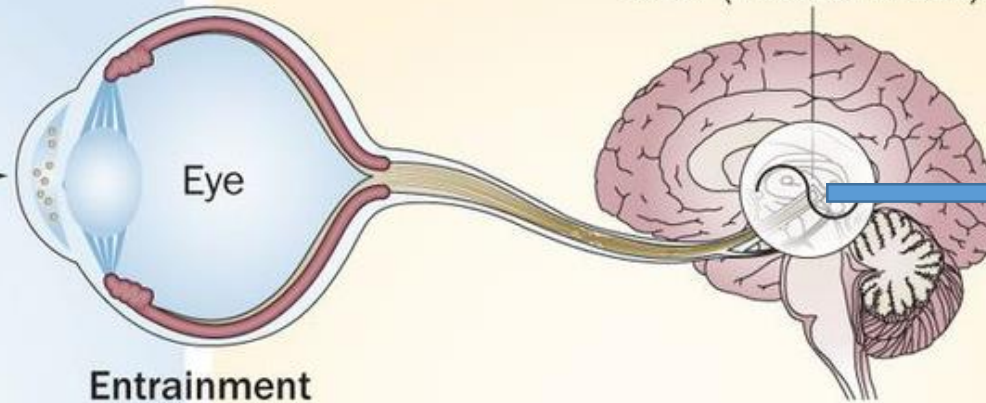
Cyklické změny sekrece hormonů

External 24h light–dark cycle



Photic Zeitgeber

Endogenous circadian rhythm



Entrainment

Synchronization

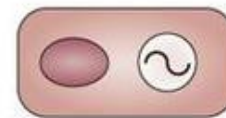
Nonphotic Zeitgeber

- Sleep–wake cycle
- Physical activity
- Social time
- Meals

Peripheral oscillators



Cellular oscillators



SCN:

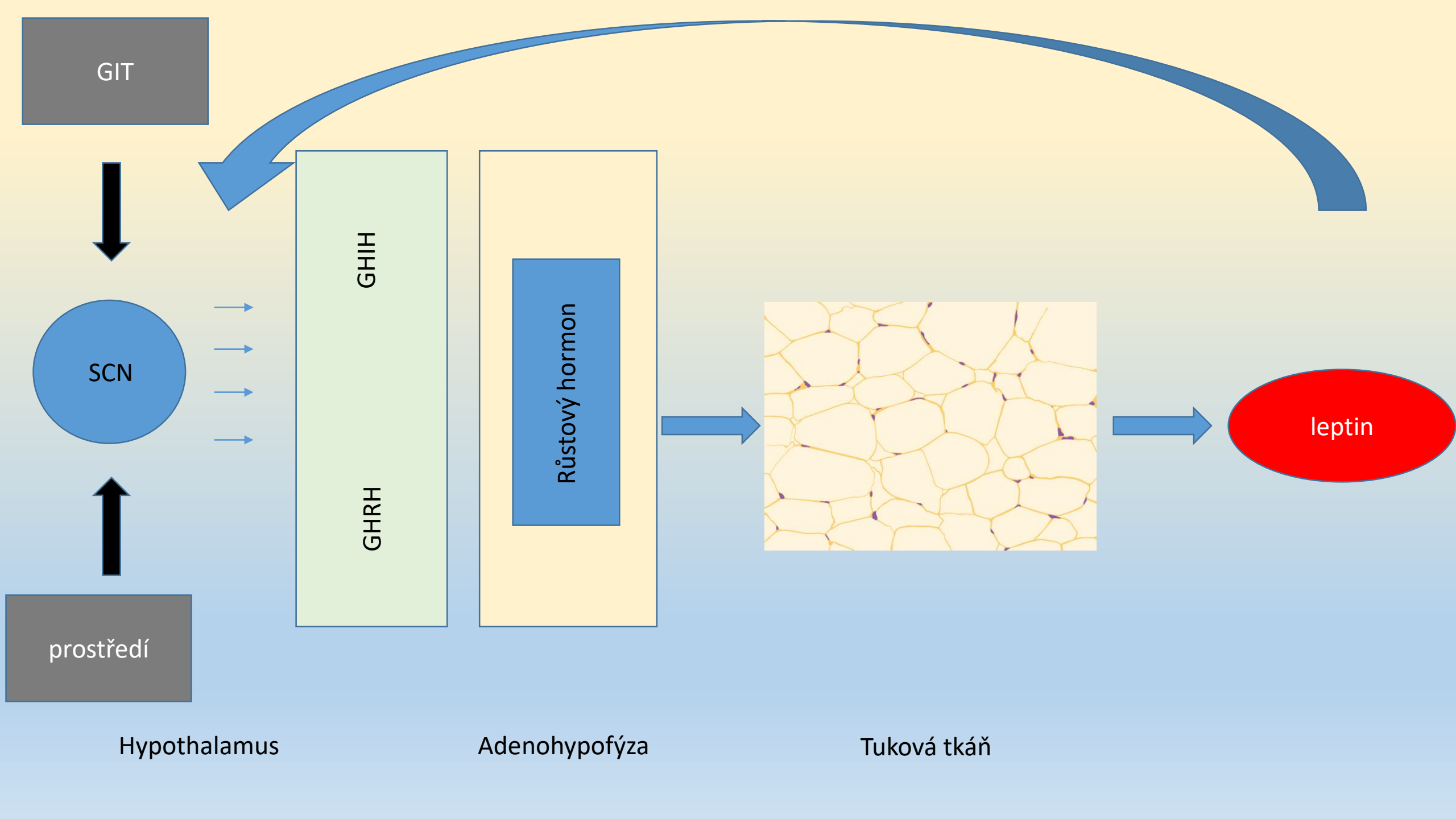
- Aference – sítnice
- Eference – jádra hypothalamu

- Melatonin
- ADH
- ACTH – kortisol
- Inzulín
- Ghrelin
- Adiponektin
- Leptin

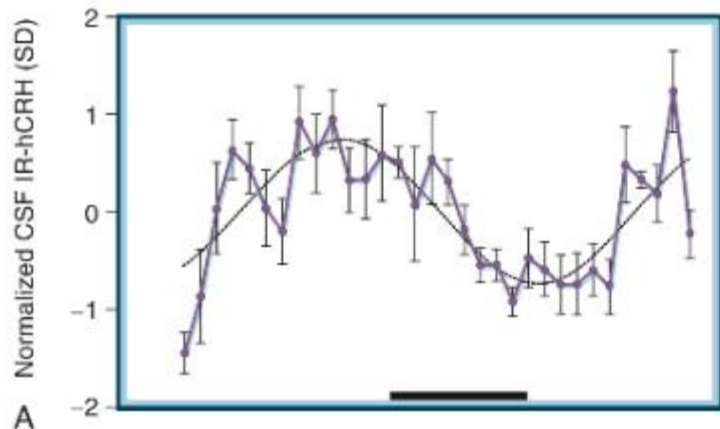
Nervové/hormonální
= SNC-dependentní

Sytost/hlad

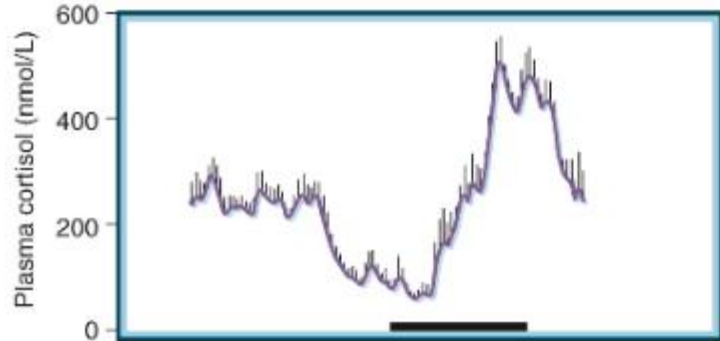
Tělesná teplota



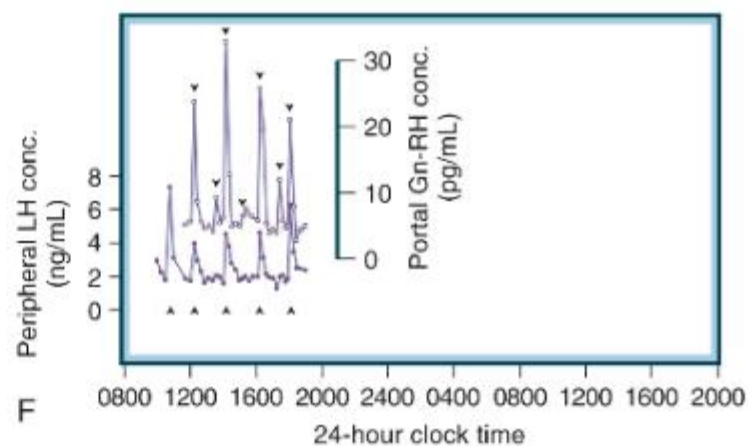
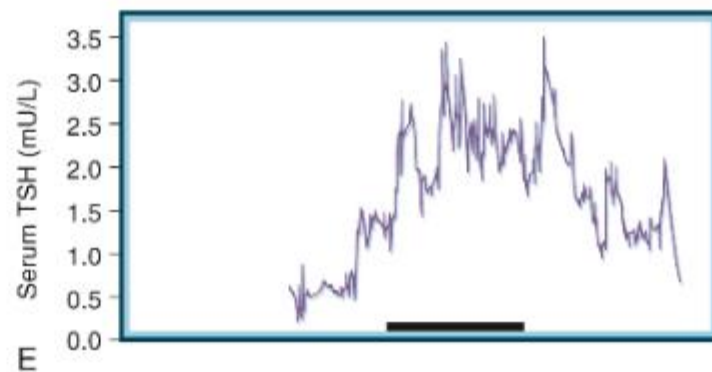
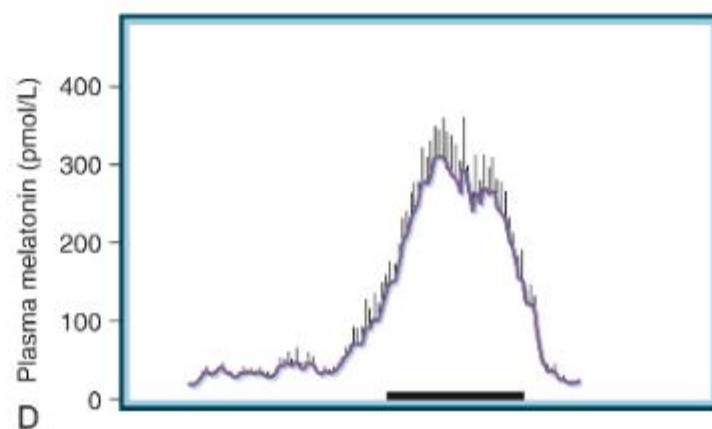
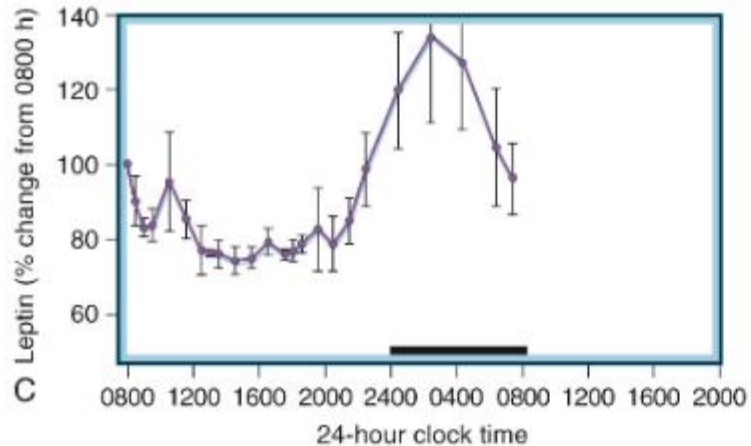
CRH



kortizol



leptin



melatonin



thyrotropin

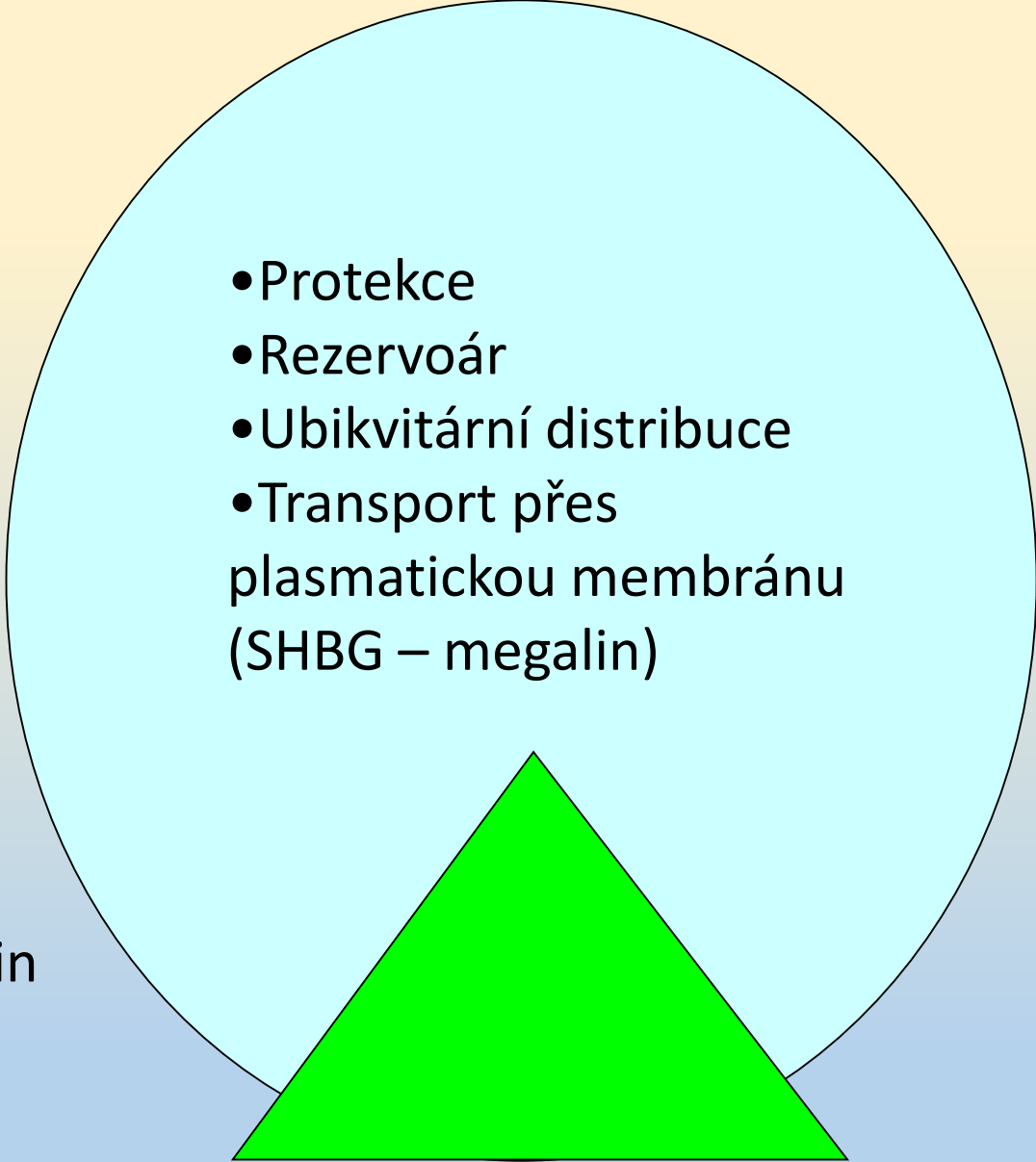


LH



Transport hormonů

- Chemická povaha hormonu
- Vazba na transportní protein(y) a její význam
 - Albumin
 - Globuliny
 - Specifické proteiny – TBG, SHBG, CBG
- Síla vazby
- „Alternativnost“ vazby – TBG versus transthyretin

- 
- Protekce
 - Rezervoár
 - Ubikvitární distribuce
 - Transport přes plasmatickou membránu (SHBG – megalin)

MEZI HORMONEM A TRANSPORTNÍM PROTEINEM SE USTAVUJE DYNAMICKÁ ROVNOVÁHA

Eliminace hormonů

- Odlišná doba setrvání v cirkulaci
- Metabolizace
 - Cílovými buňkami
 - Enzymovými systémy v krvi
 - Orgány – zejména játra
- Eliminace
 - Játra
 - Ledviny

FÁZE I

- Hydroxylace, dekarboxylace
- Oxidace, redukce

FÁZE II

- Glukuronidace
- Sulfatace
- Methylace
- Konjugace s glutathionem

metabolizace



Cévní řečiště



žluč

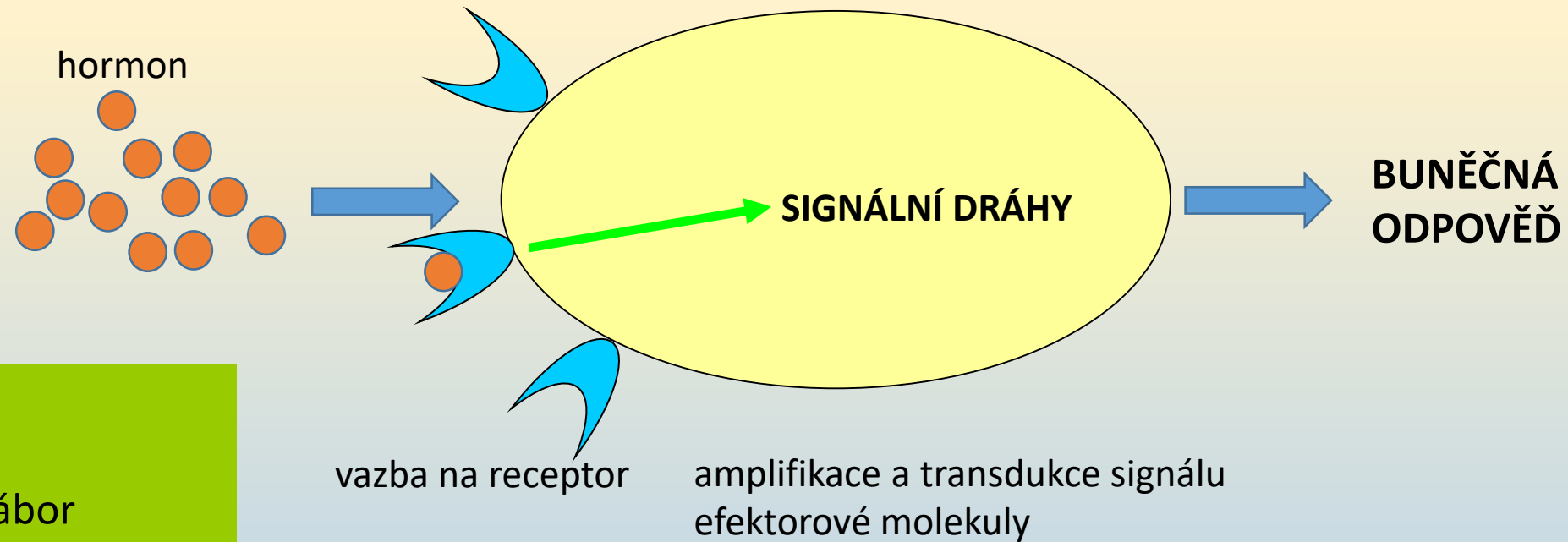


moč

eliminace

Hormony a buněčná odpověď

- Cílové buňky
- Specifičnost
- Vysoká afinita
- Selektivita



MECHANISMY

Konformační změny

Fosforylace/defosforylace + nábor proteinů

Vazba GTP (G proteiny)

Vazba cAMP (efektorové proteiny)

Generování molekul s prekurzory v PM

Nekovalentní vazba Ca^{2+}

vazba na receptor

amplifikace a transdukce signálu
efektorové molekuly

% obsazených receptorů
konformační změna

synergie

antagonismus

možná ztráta citlivosti

regulace zpětnovazebnými systémy

BUNĚČNÁ ODPOVĚĎ JE ZPROSTŘEDKOVÁNA PŘÍSLUŠNÝMI RECEPTORY

Regulace buněčné odpovědi na úrovni receptorů

- Downregulace
- Upregulace
- Homologní desensitizace
- Heterologní desensitizace

Fosforylace (specifické kinázy)
Defosforylace (specifické fosfatázy)
Modifikace proteiny inhibované signální dráhy

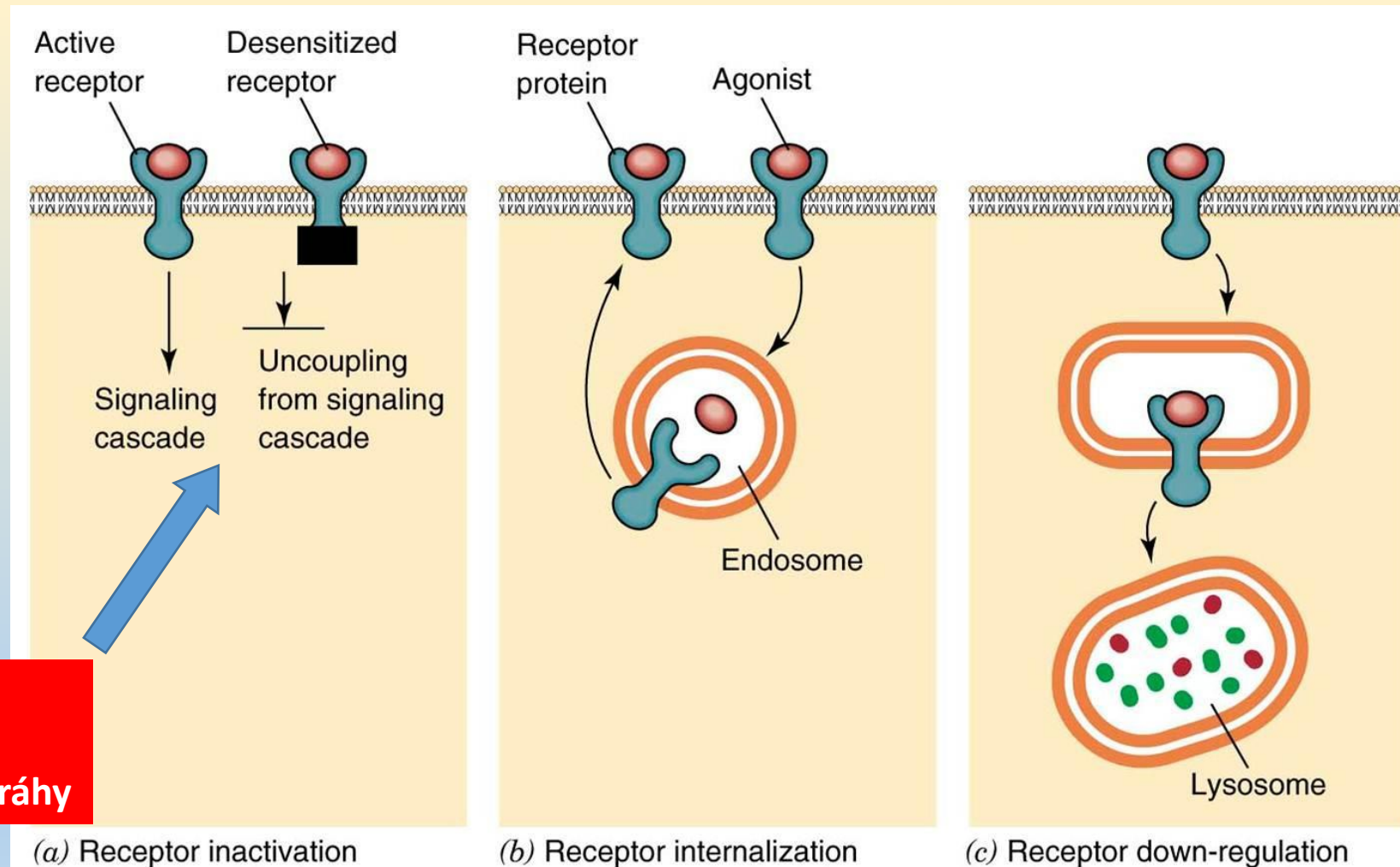


Figure 13.10. Major mechanisms for the termination of receptor-dependent signal transduction.

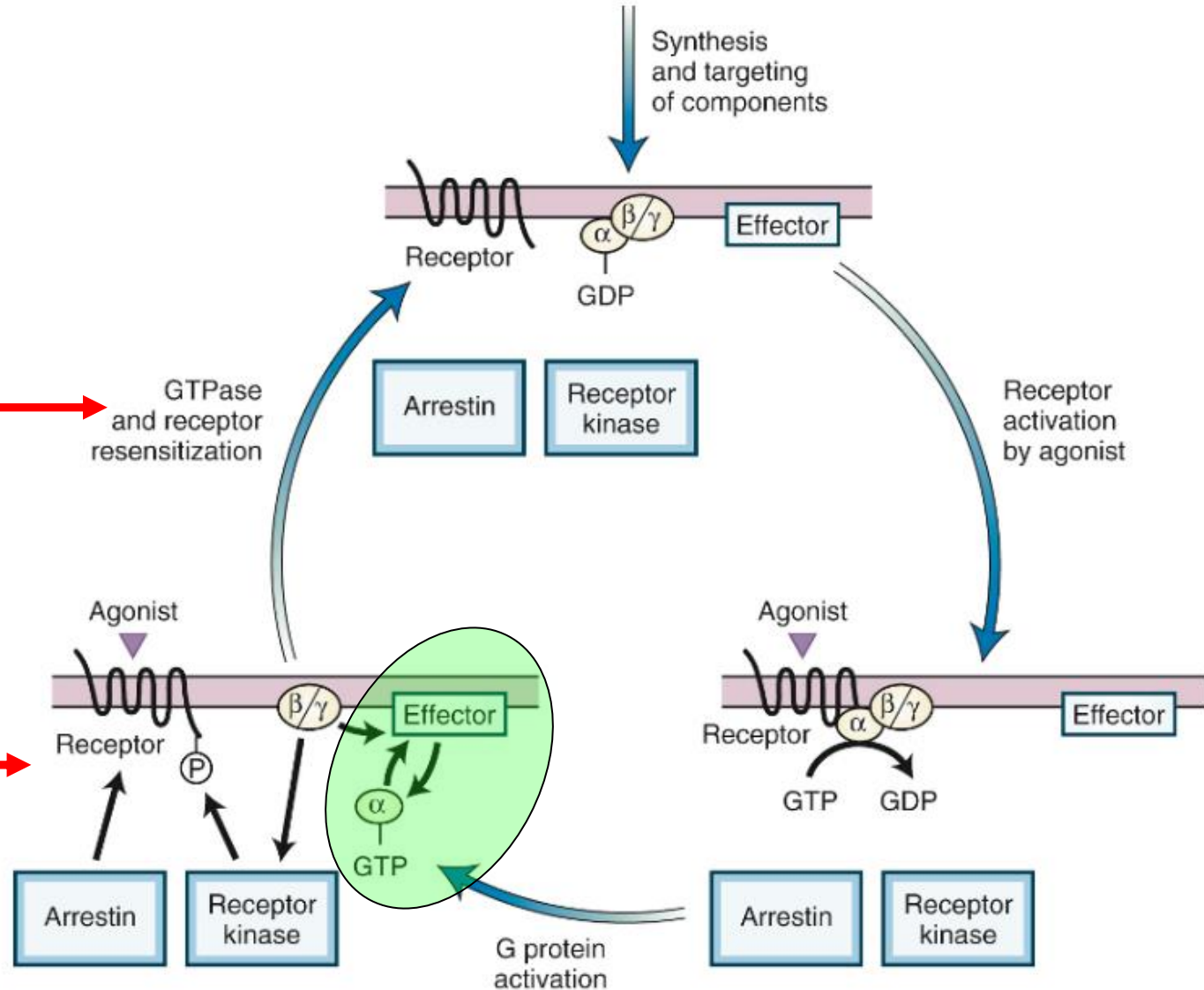
Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations, Sixth Edition, Edited by Thomas M. Devlin. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Inc.

Sensitizace a desensitizace receptorů spřažených s G proteinem

- α podjednotka s GTPázovou aktivitou

- resensitizace

- desensitizace



Hormony – proteiny a peptidy

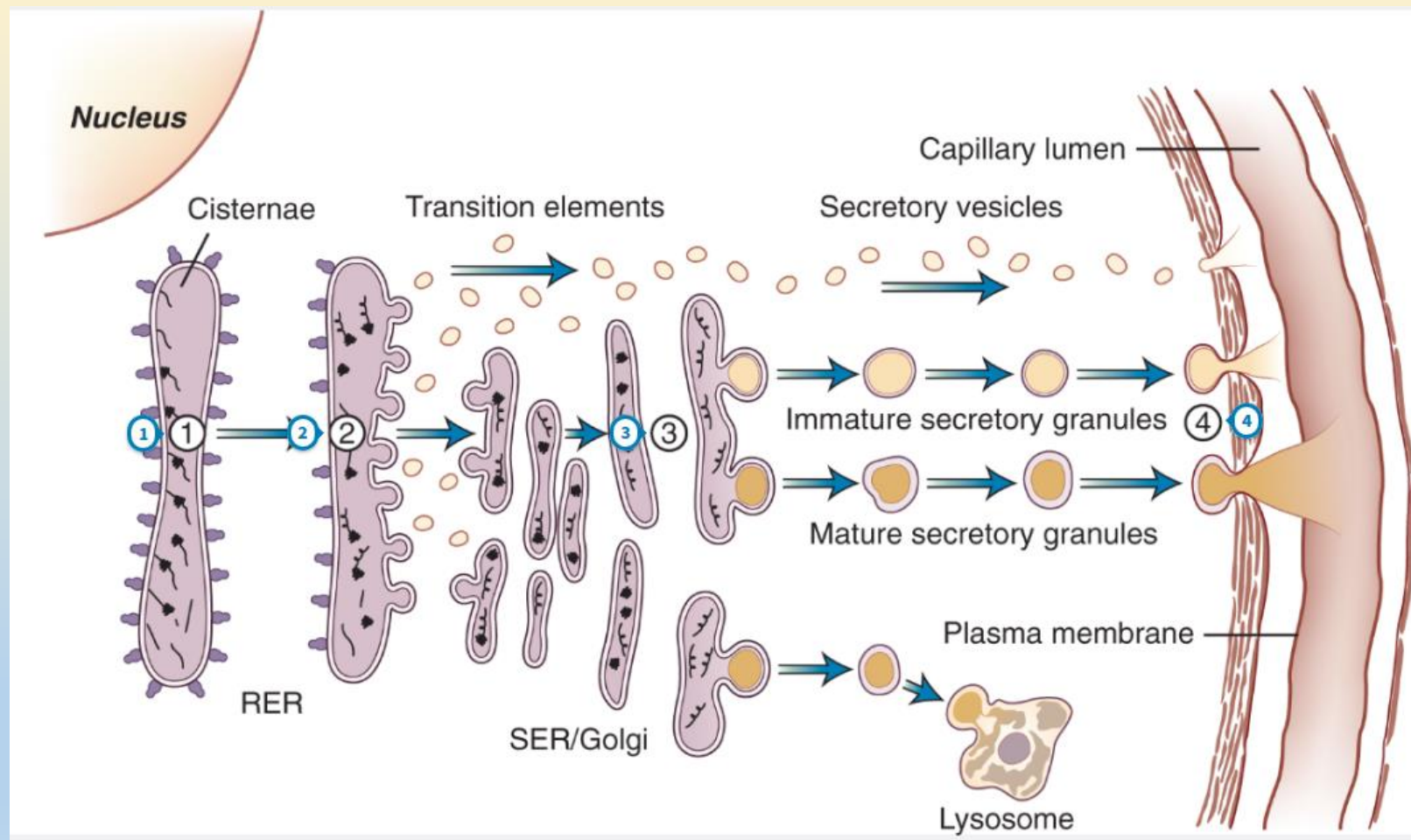
„klasické“ hormony

Hormony produkované
nespecializovanými buňkami

Př. *adipokiny*

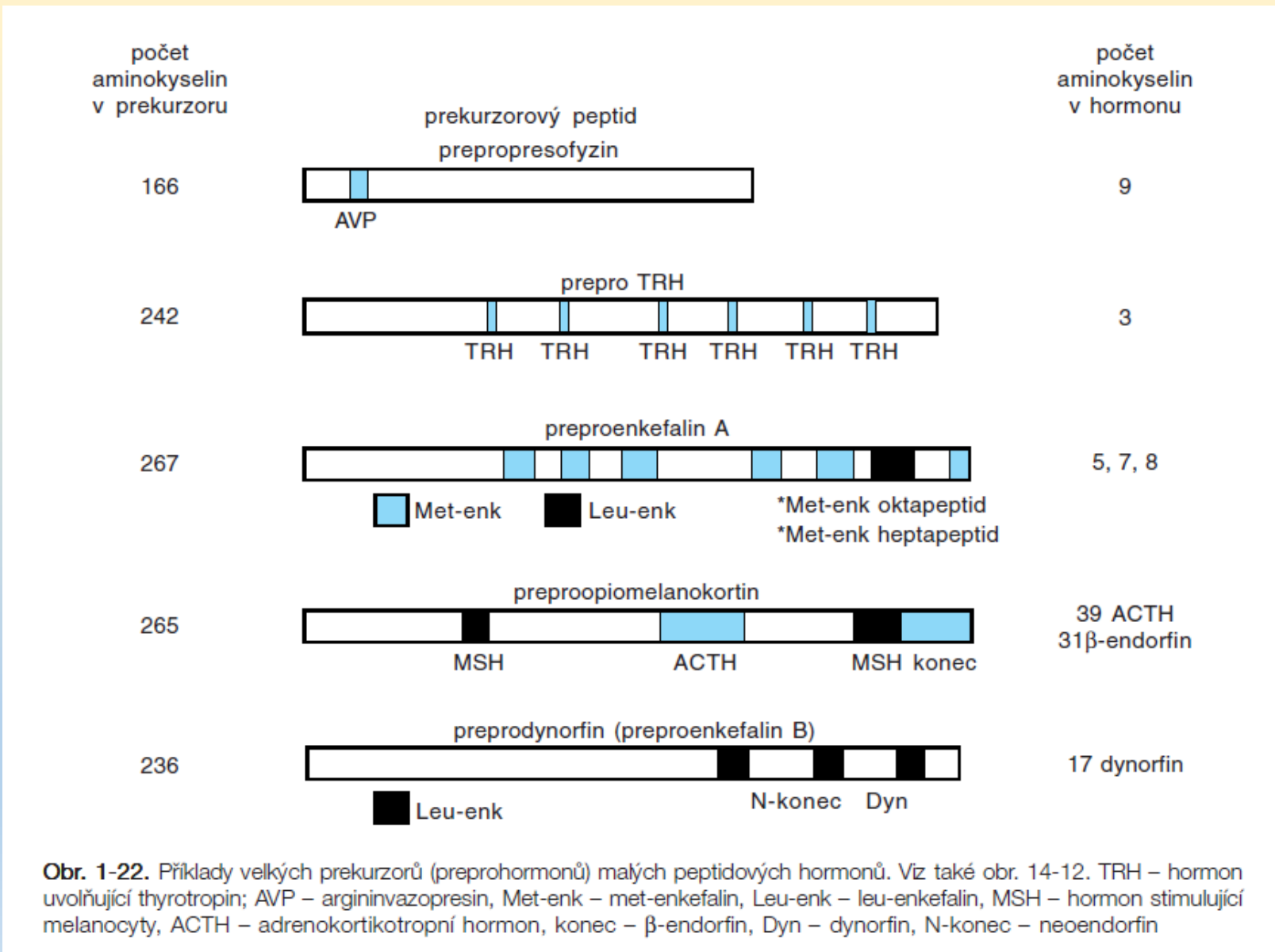
Parakrinně/autokrinně
působící peptidy

Receptory asociované s
plasmatickou membránou



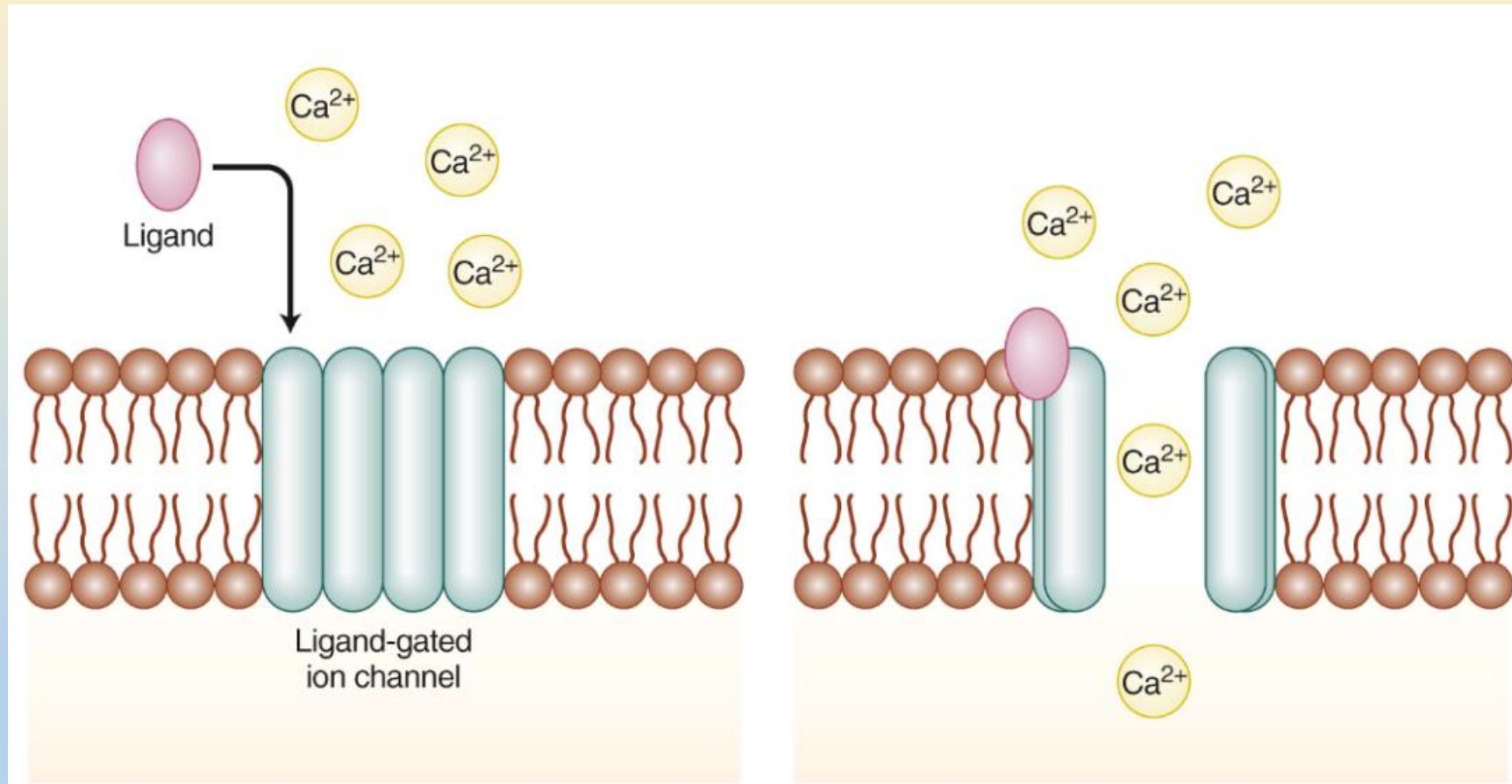
preprohormon – prohormon – hormon (+ fragmenty)

Peptidové hormony jako součást preprohormonů



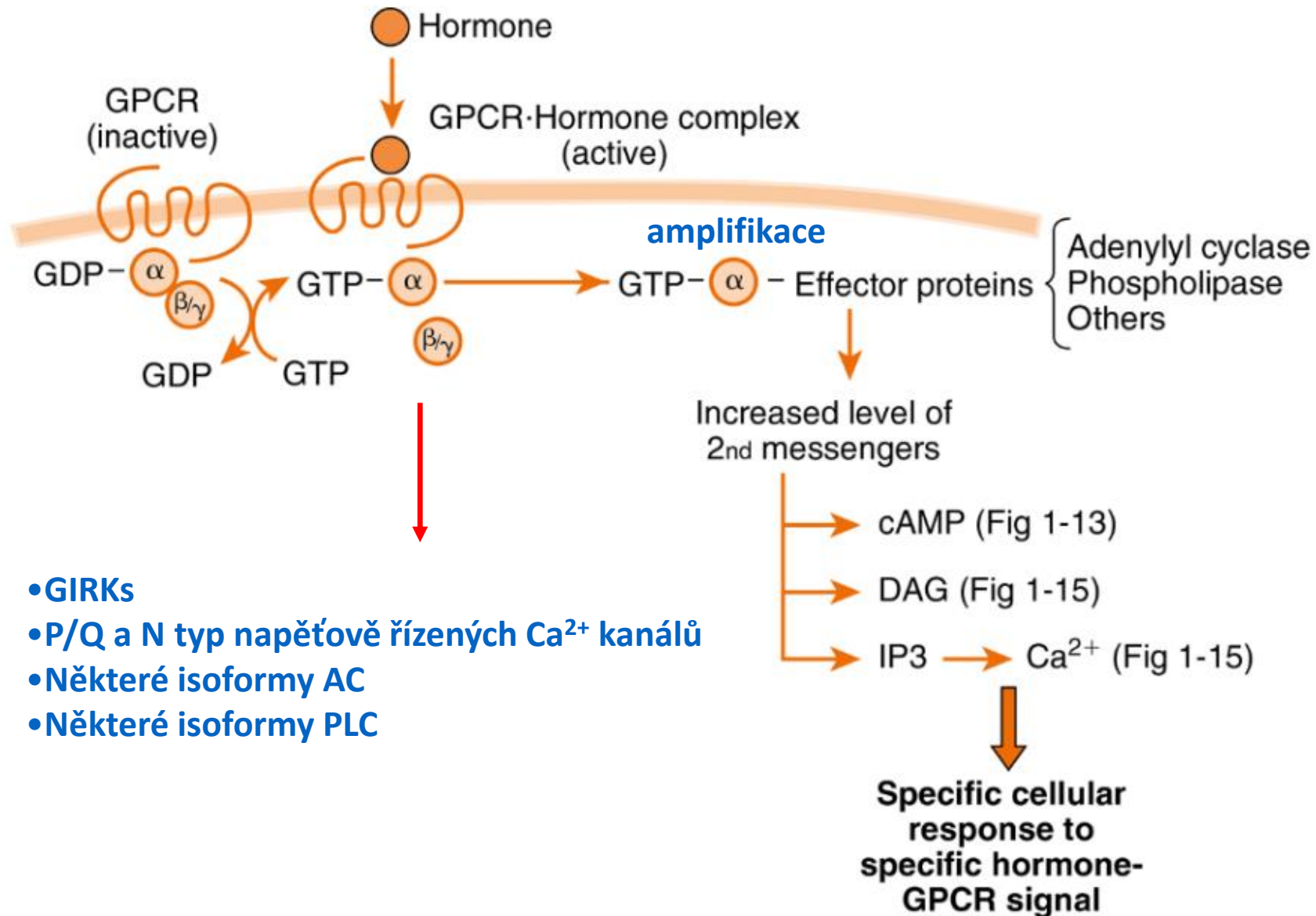
Převzato. Ganong, W. F. Přehled lékařské fyziologie. 20. vydání. Galén 2005.

Ligandem vrátkované iontové kanály



SEKRECE HORMONŮ HYPOTHALAMU PO VAZBĚ LIGANDU (NEUROTRANSMITERU) PŘÍSLUŠNÉHO TYPU

Receptory spřažené s G proteinem (GPCR)



- **GIRKs**
- **P/Q a N typ napětově řízených Ca^{2+} kanálů**
- **Některé isoformy AC**
- **Některé isoformy PLC**

Receptory spřažené s G proteinem (GPCR)

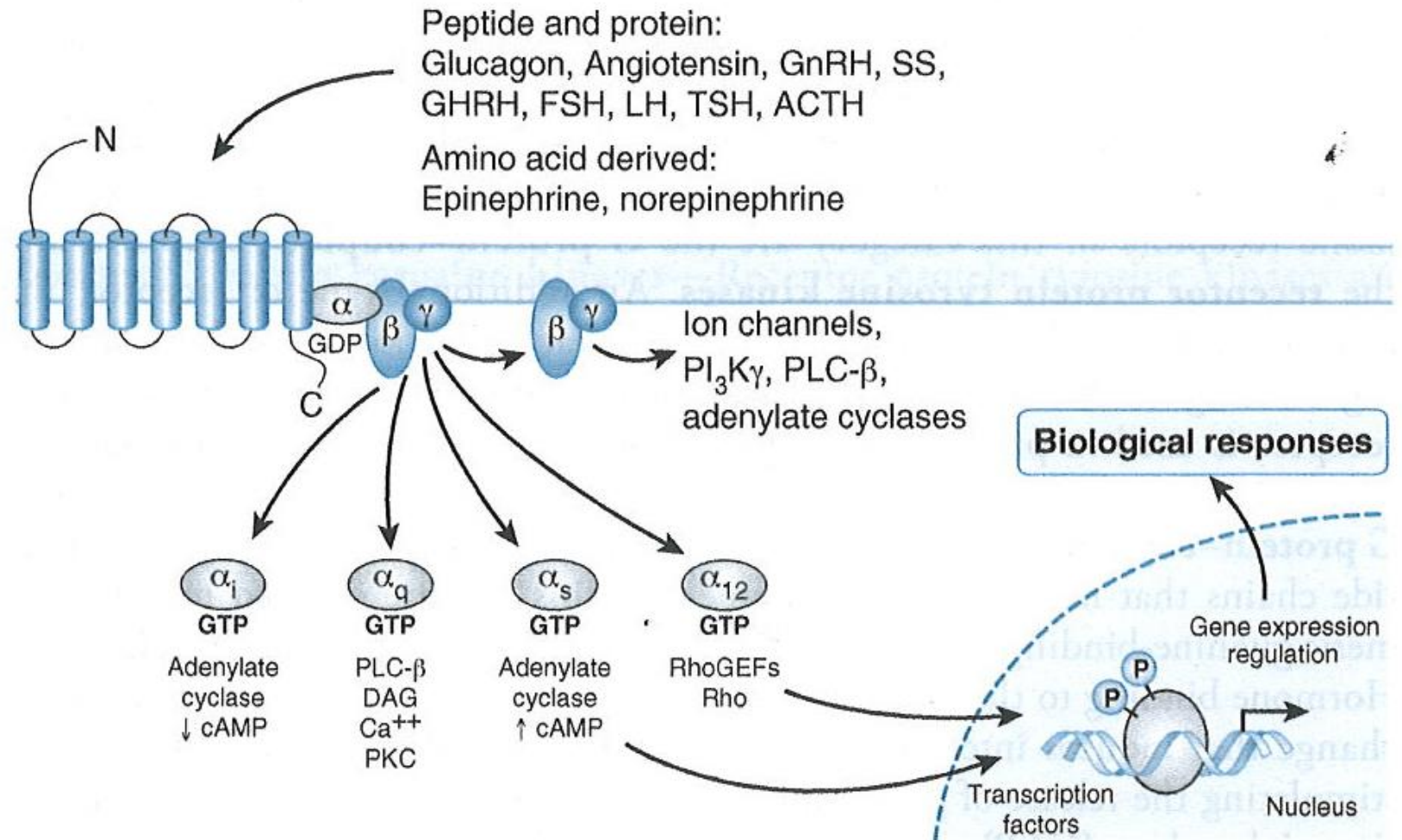
$G_s - G_{s'}$, G_{olf} – aktivace AC

G_i – inhibice AC

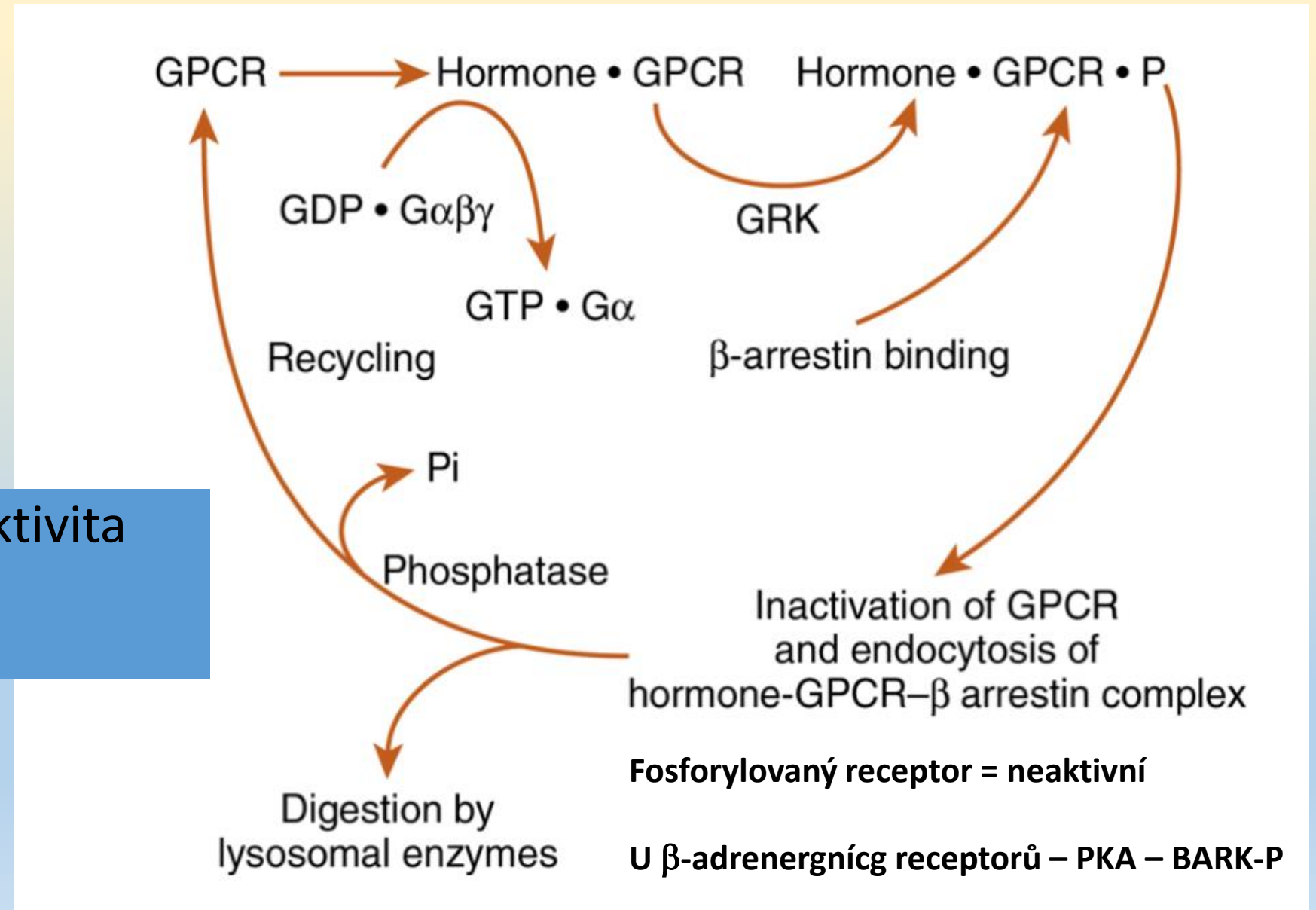
- G_o (2, mozek)
- G_t (2, fotorec. – cAMP-PDE)
- G_z (inhibice K^+ kanálů)

$G_{q/11}$ – aktivace PLC β

$G_{12/13}$ – inhibice a aktivace RhoGEF

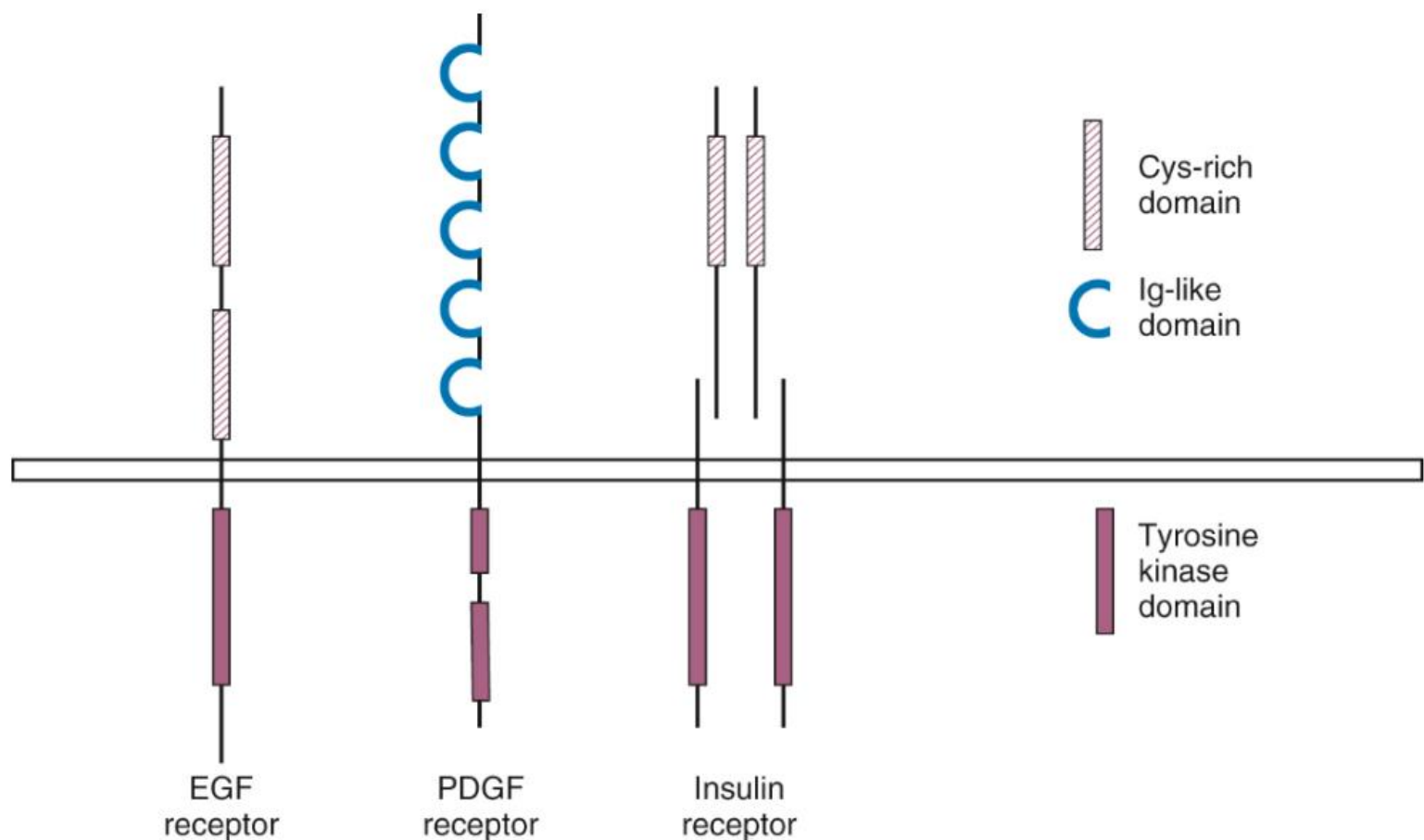


Ukončení aktivace a limitace buněčné odpovědi



- Vlastní GTPázová aktivita
- Endocytóza

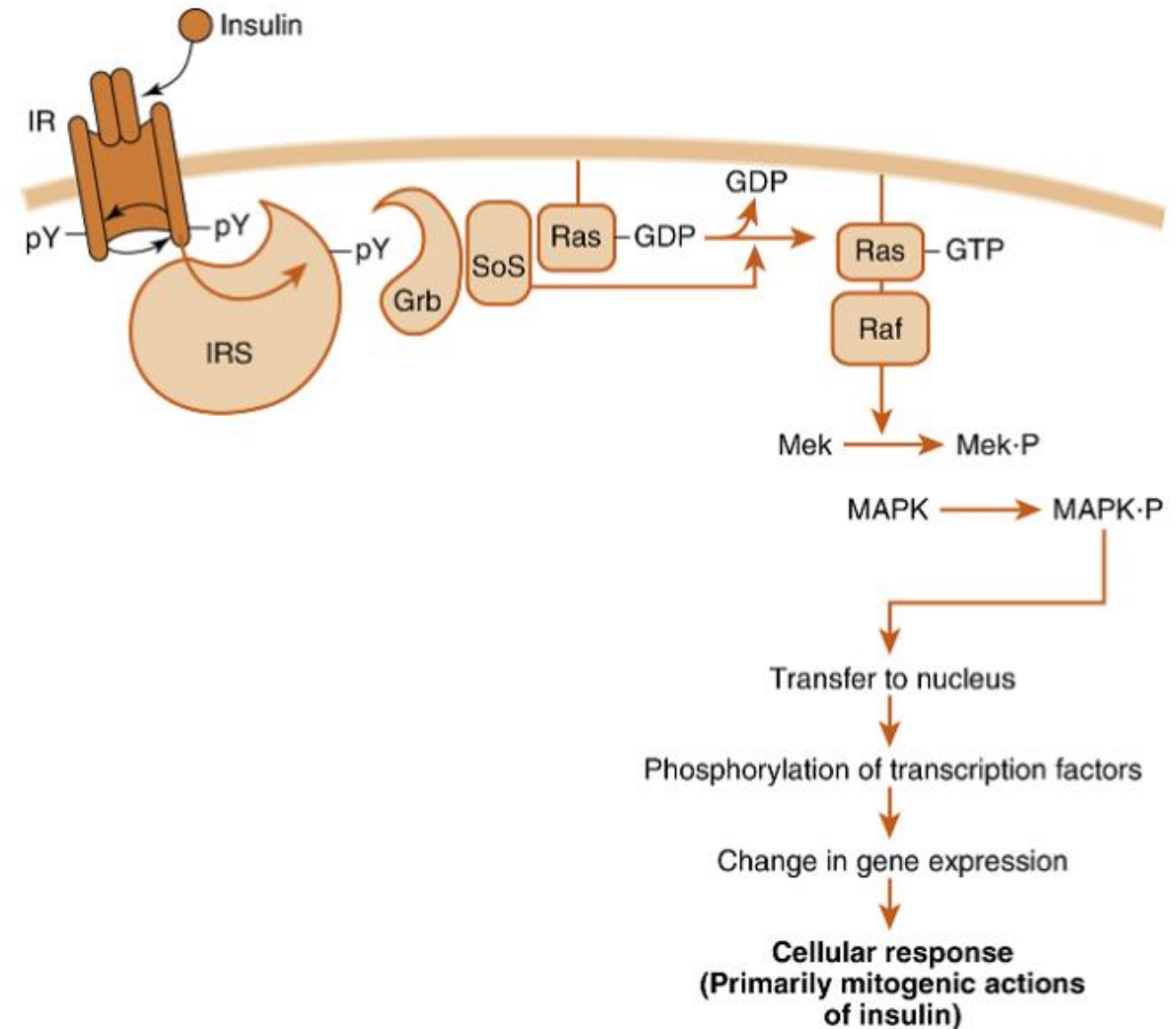
Receptorové tyrosinkinázy



- 58 RTKs/20 podrodin
- Po vazbě ligandu obvykle nastává dimerizace
- ATP jako zdroj P pro fosforylaci intracelulárních domén/asociovaných proteinů
- Inzulin
- IGF-1/2

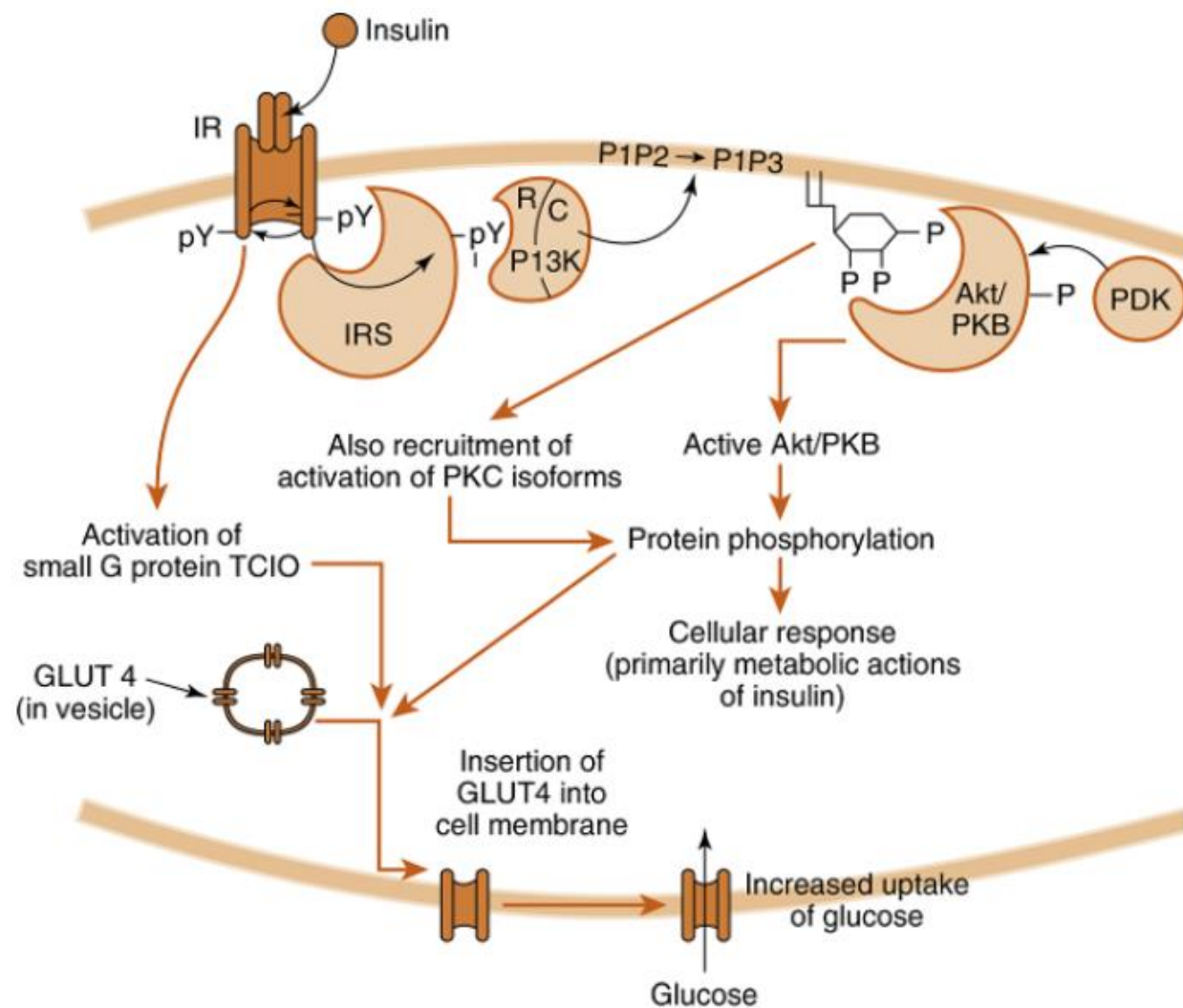
Inzulínový receptor – genomické účinky

- IRS = insulin receptor substrate
- Grb = adaptorový protein (growth factor receptor-bound protein)
- SoS = Son of sevenless homolog
- Ras = malé proteiny chovající se jako GTPázy (schopnost vázat GTP)
- Raf = serin/threonin-specifické proteinkinázy



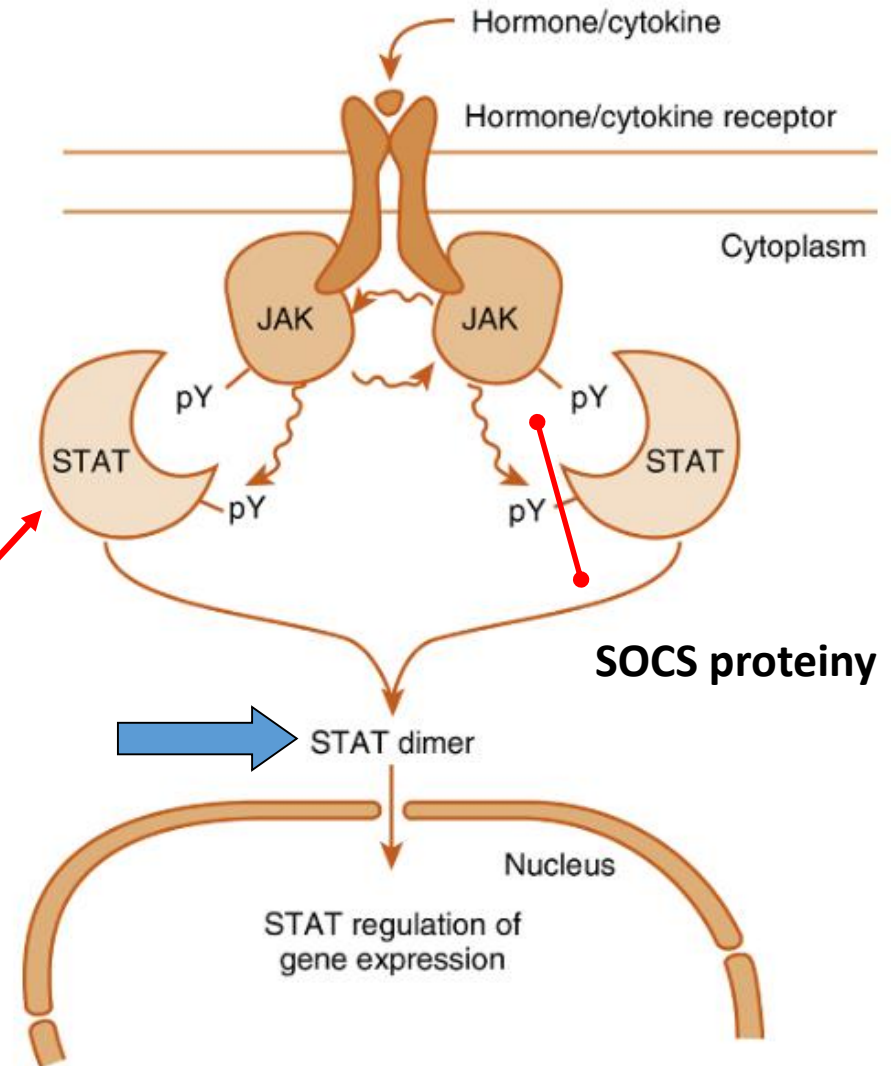
Inzulínový receptor – metabolické účinky

- P13K = fosfatidylinositol-3-kináza
- Akt = proteinkináza B



Receptory asociované s cytosolickými TK

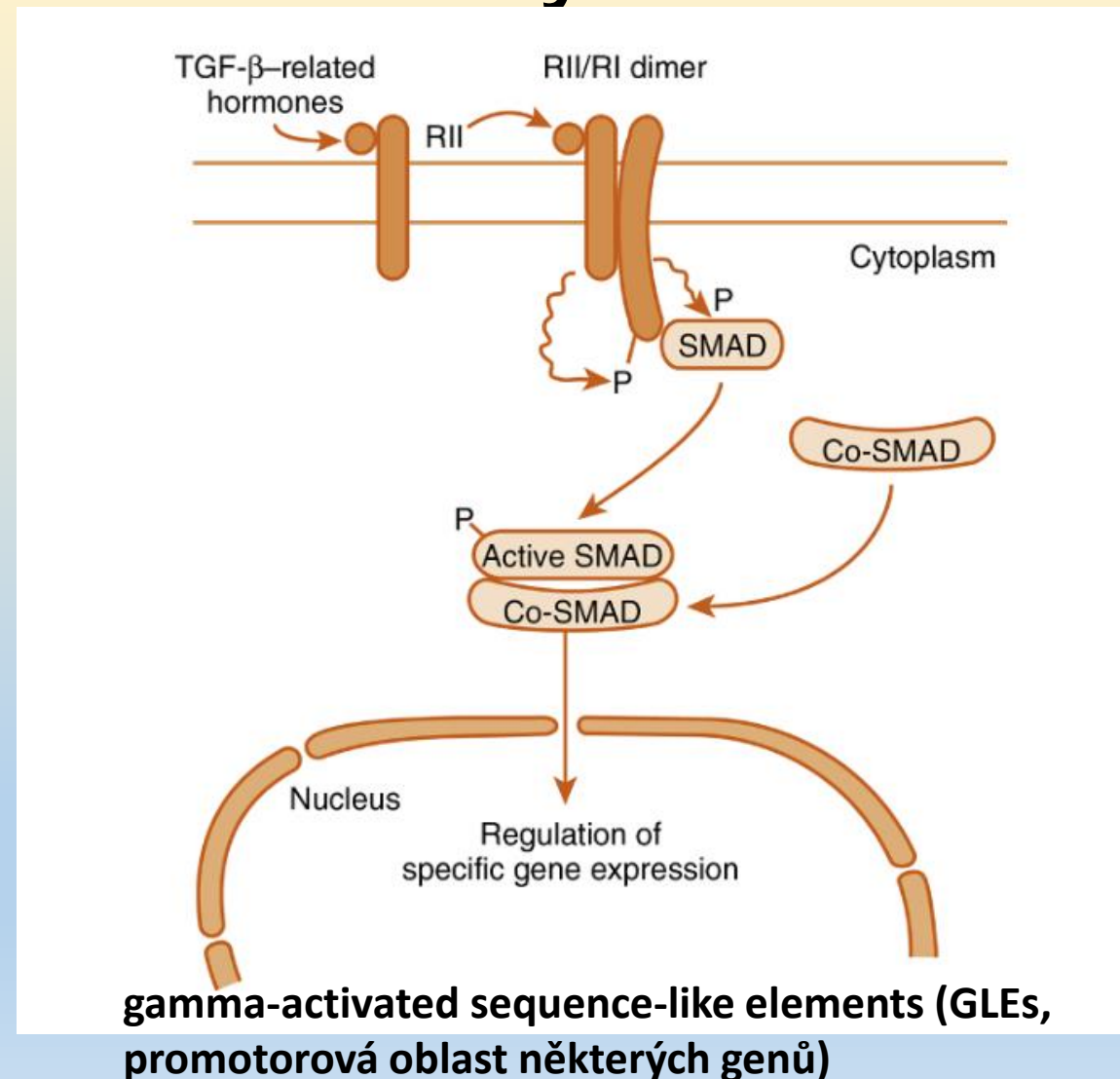
- GH, prolaktin, leptin, erythropoietin
- Dimerní receptory BEZ vlastní TK aktivity
- Asociace s JAK kinázou
- Po vazbě ligandu – dimerizace, transfosforylace, aktivace



signal transducers and activators of transcription

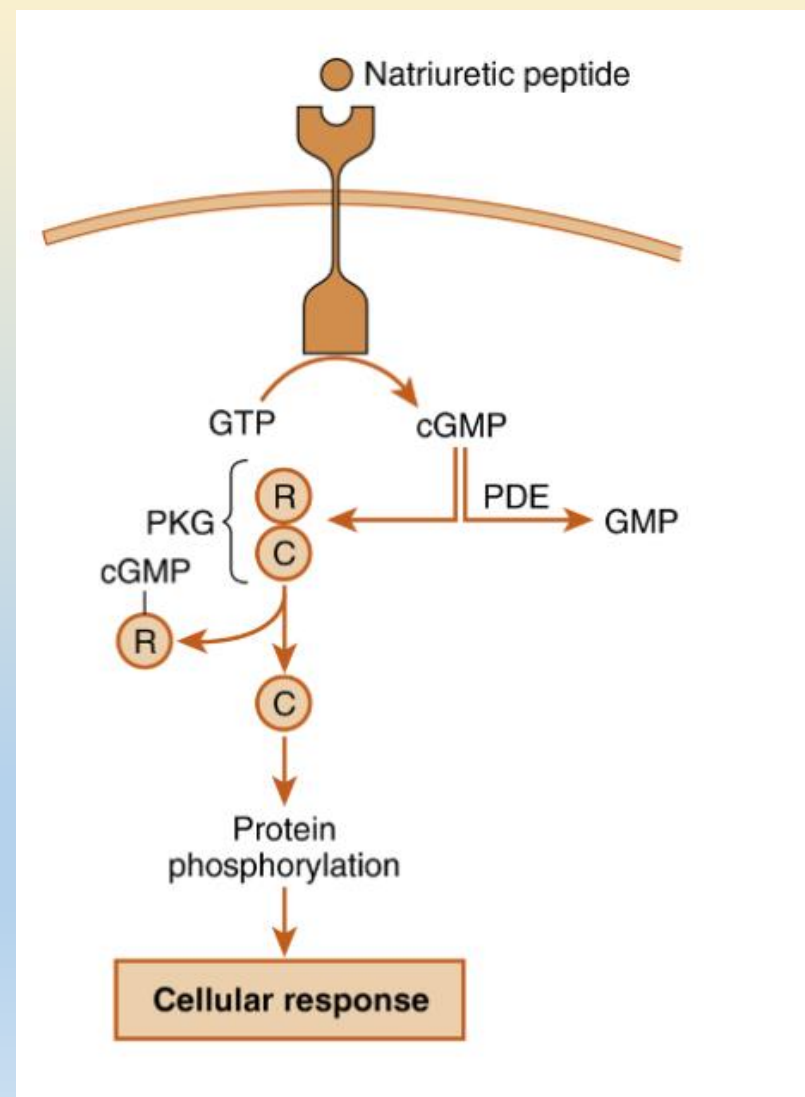
Receptorové serin/threonin kinázy

- Antimulleriánský hormon, inhibitin
- Forma disociovaného heterodimeru
- SMAD = „latent transcription factors“



Receptorové guanylát cyklázy

- Natriuretické peptidy
- ANP, BNP, CNP



Přenos signálu – systém druhých poselů

HORMON = PRVNÍ POSEL

INTRACELULÁRNÍ SIGNÁLNÍ MOLEKULA GENEROVANÁ PO VAZBĚ HORMON-RECEPTOR = DRUHÝ POSEL

• cAMP

- TSH, glukagon, ACTH, hormony hypothalamu, ADH a další
- Proteinkináza A
- Modulace signálních drah kompartmentalizací (A-kinase anchoring proteins (AKAPs))

• cGMP

- ANP, BNP, CNP
- NO jako signální molekula
- Proteinkináza G

• DAG a IP₃

- PIP₂ – fosfolipáza C systém

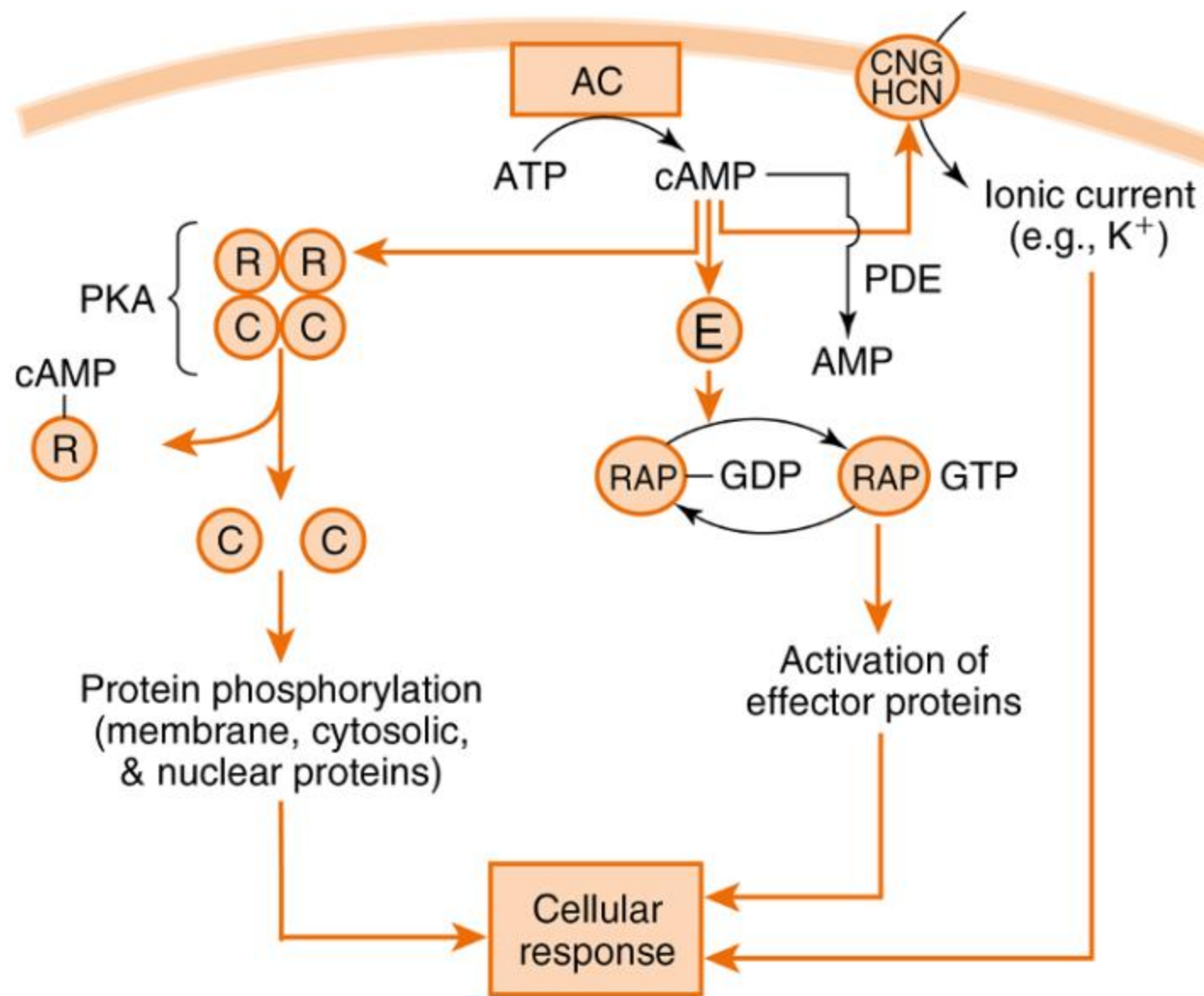
• Ca²⁺

- Ca²⁺/Ca²⁺-kalmodulin

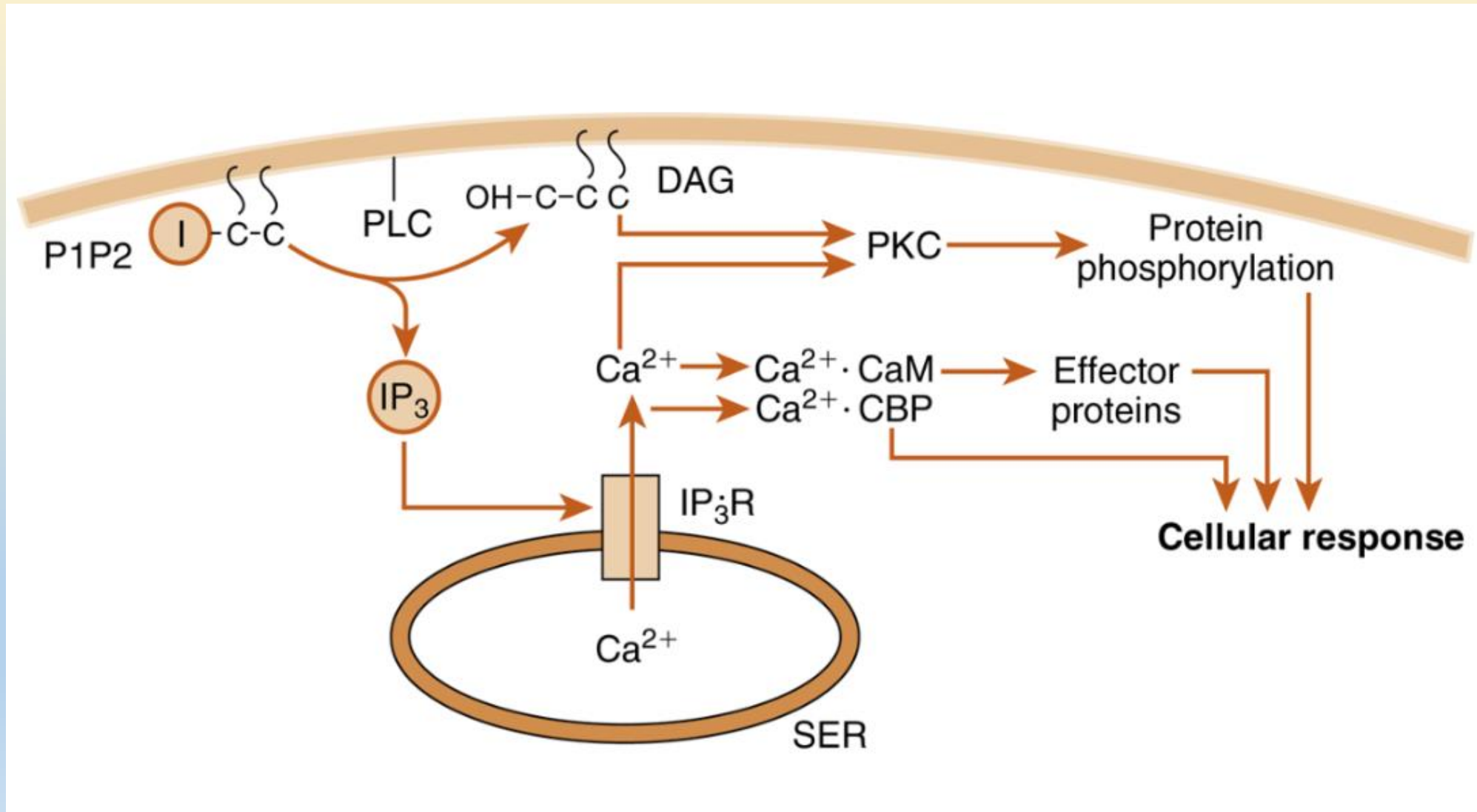
EXTRACELULÁRNÍ SIGNÁL MUSÍ BÝT PŘEVEDEN DO INTRACELULÁRNÍ ODPOVĚDI

System AC - cAMP

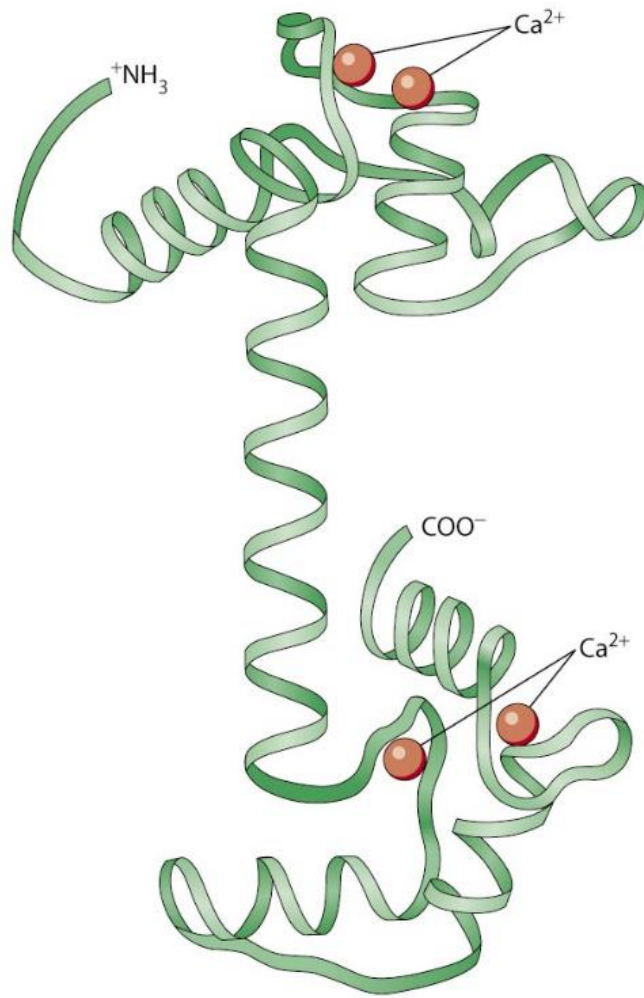
- PKA
- CREB (cAMP-responsive element-binding protein)
- Epac (E) jako další efektorová molekula (exchange protein activated by cAMP)
- cyclic nucleotide gated (CNG) channels
- hyperpolarization-activated cyclic nucleotide modulated (HCN) channels
- fosfodiesterázy



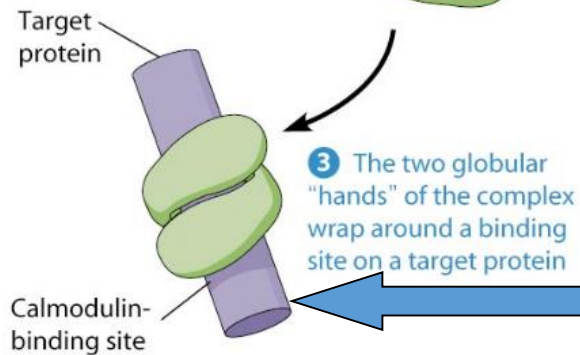
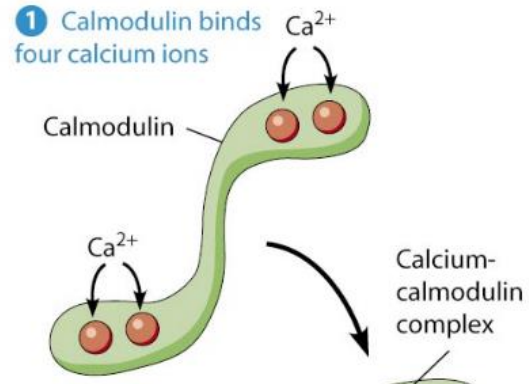
System PLC - DAG a IP₃



System Ca^{2+} - kalmodulin



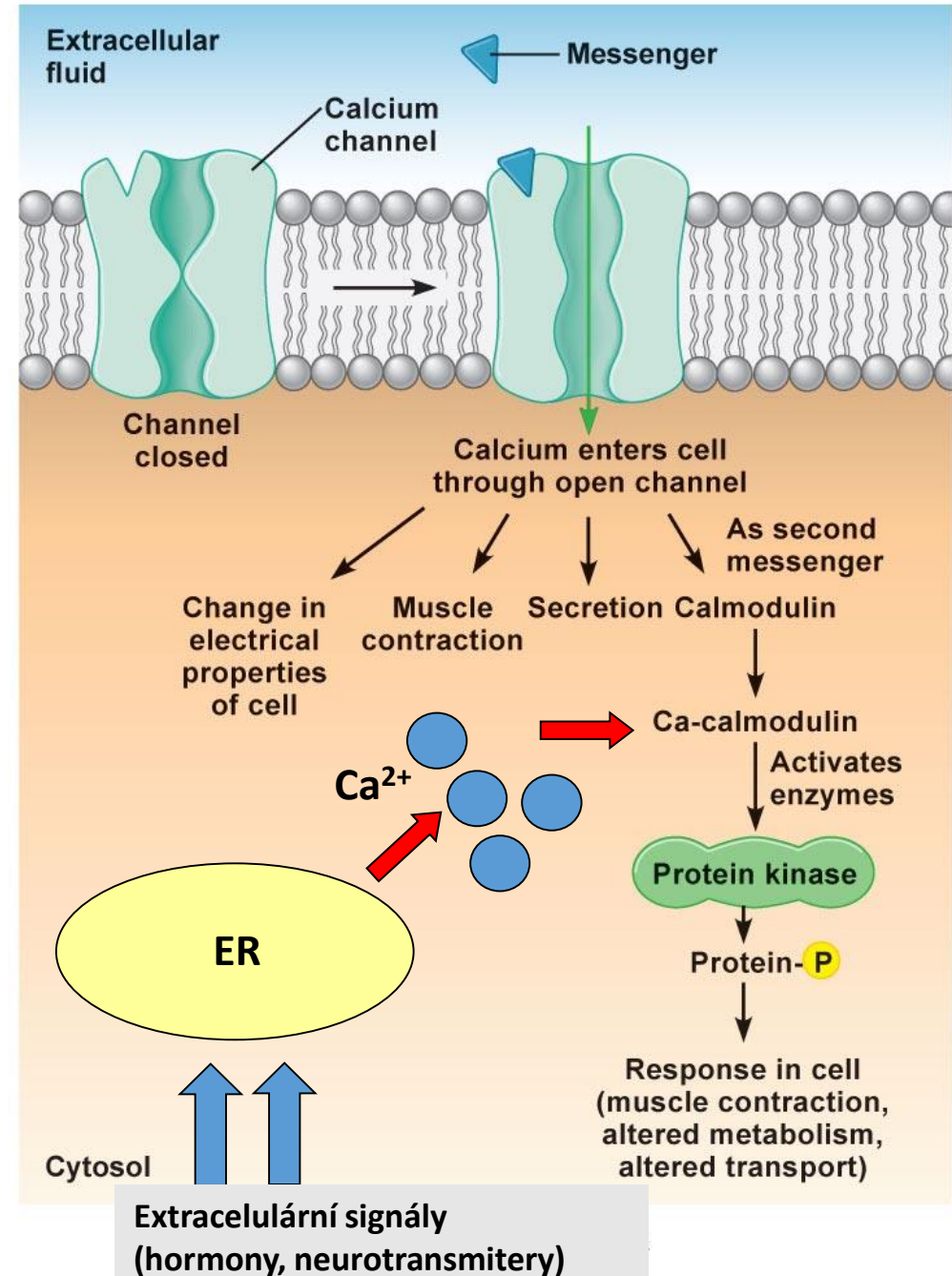
(a) Structure of Ca^{2+} -calmodulin complex



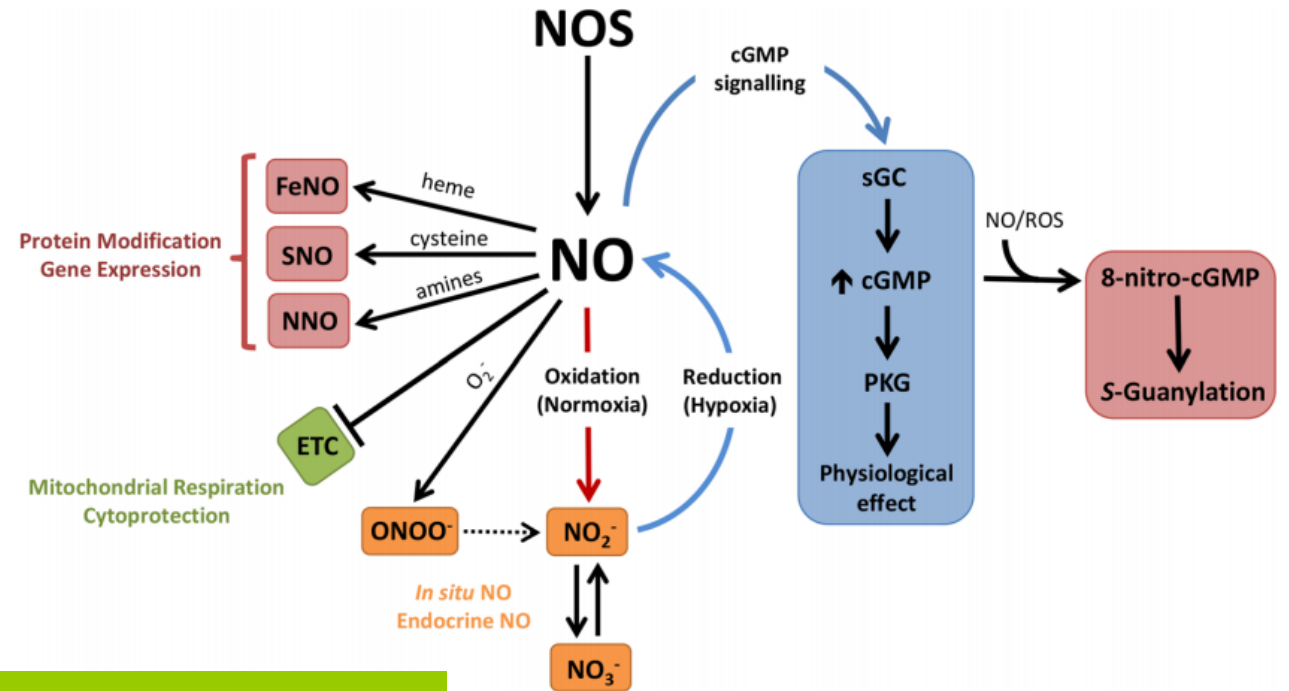
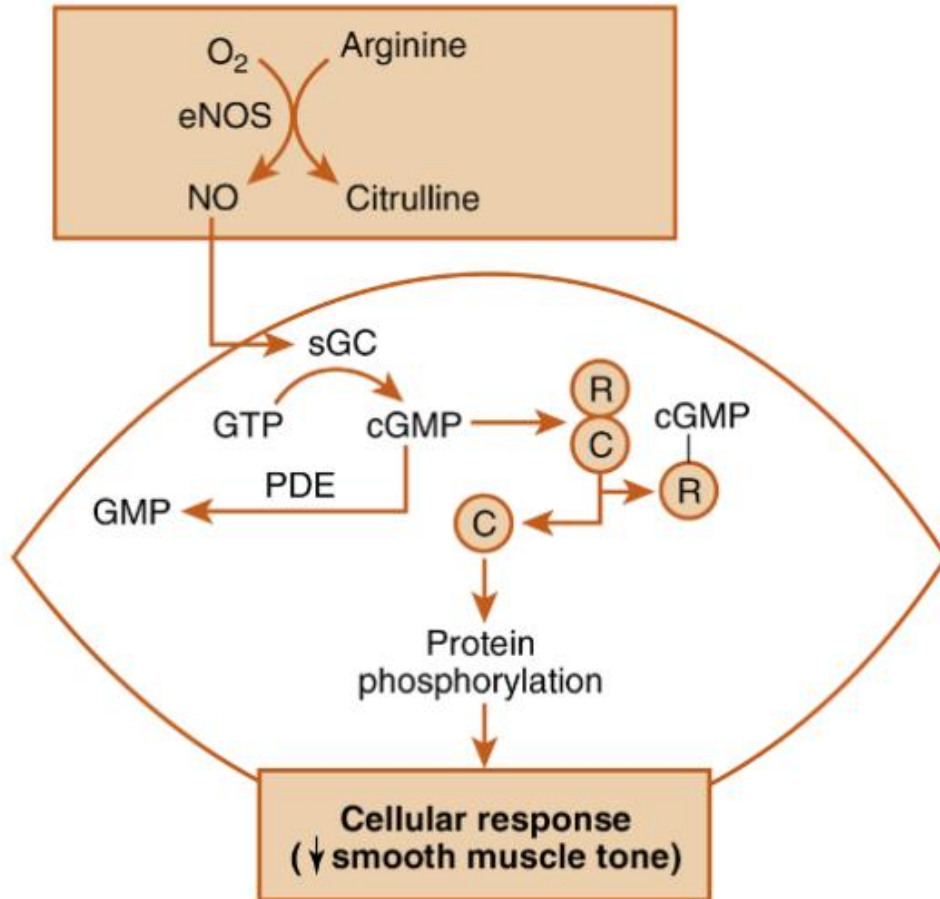
(b) Function of Ca^{2+} -calmodulin complex

Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

kalmodulin-dependentní kinázy

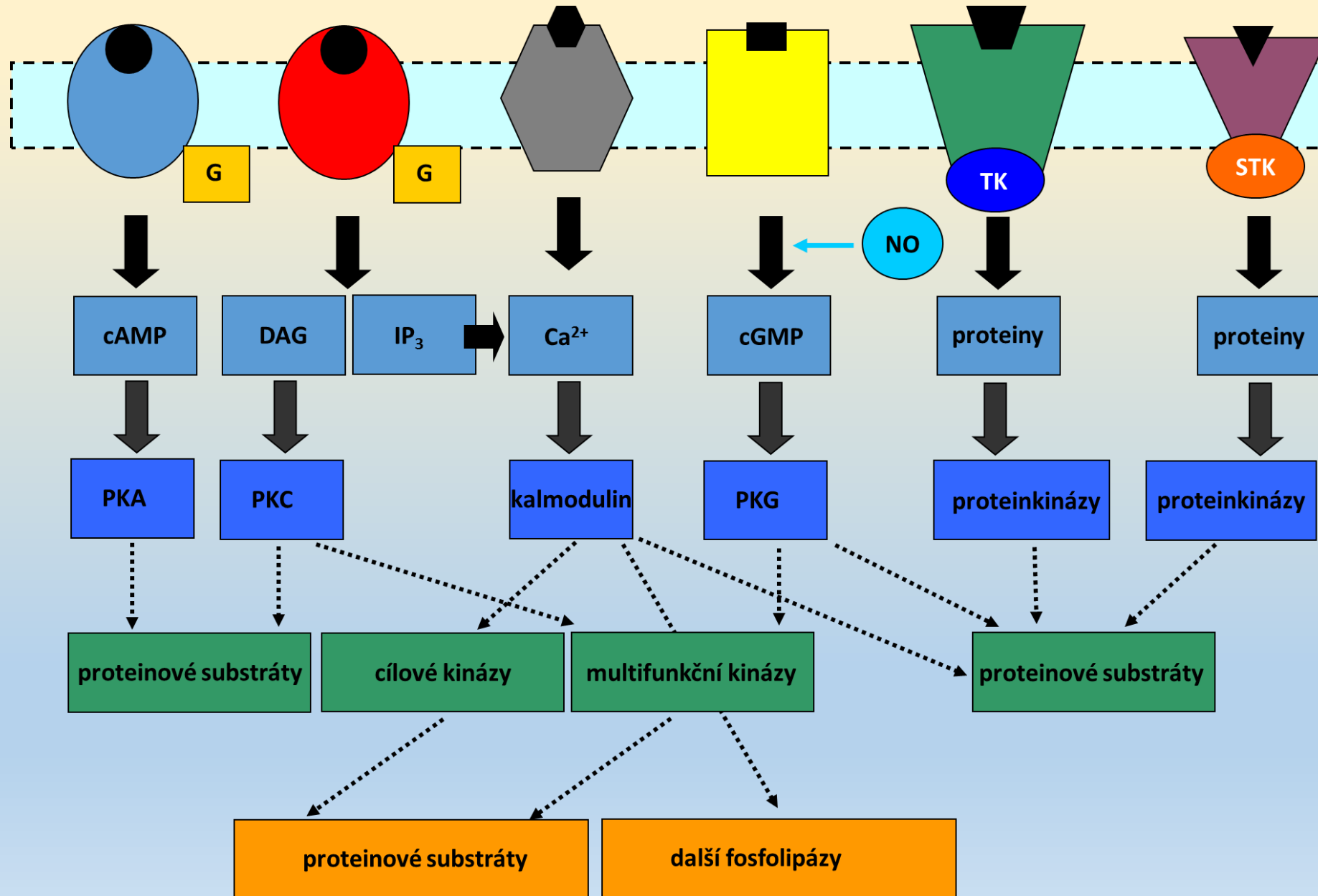


NO jako signální molekula - cGMP



- eNOS
- nNOS
- iNOS

Shrnutí – membránové receptory a asociované systémy



Klinické aspekty

- Syndromy rezistencí k hormonům (př. IR, IGF-1, TR β)
- Syndromy způsobené mutacemi CPCRů a G proteinů
 - ADH – nefrogenní diabetes insipidus
 - ACTH – familiární ACTH rezistence
 - GnRH – hypogonadotropní hypogonadismus
 - FSH – hypergonadotropní ovariální dysgeneze
 - LH – mužský pseudohermafroditismus
 - Melanokortin 4 – obezita
 - PTH/PTHrP – Blomstrandova letální chondrodysplazie

Hormony působící přes jaderné receptory

HORMONY

- Hormony štítné žlázy – TR α/β ← heterodimery
 - Estrogeny – ER α/β
 - Testosteron - AR
 - Progesteron - PR
 - Aldosteron - MR
 - Kortizol - GR
- homodimery

PRODUKTY METABOLISMU A XENOBIOTIKA

- Mastné kyseliny – PPAR α,β,γ
- Oxysteroly – jaterní X receptor LXR α,β
- Žlučové kyseliny - BAR
- Hem – RevErb α,β
- Fosfolipidy – homolog jaterního receptoru LRH-1, SF-1
- Xenobiotika – pregnanový X receptor PXR
 - konstitutivní androstanový receptor CAR

VITAMÍNY

- 1,25-[OH]2D3 - VDR
- All-*trans*-retinová kyselina – RA receptory α,β,γ
- 9-*cis*-retinová kyselina – retinoid X receptor RXR α,β,γ

- Orphan „sirotčí“ receptory
- Variantní receptory

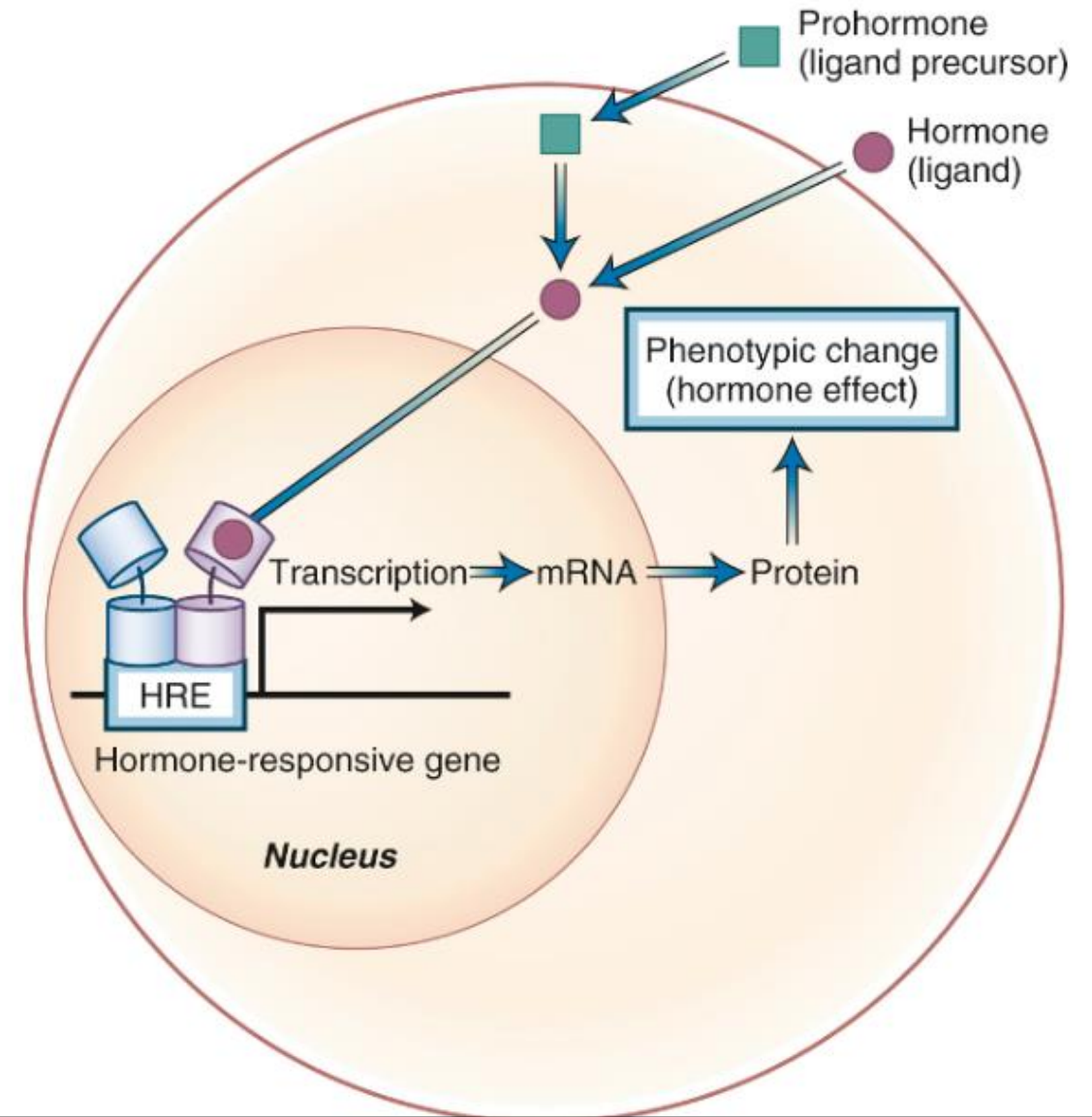
Vysvětlení některých účinků a patologií

Obecný mechanismus účinku hormonů působících přes jaderné receptory

- Vysoká afinita vazby ligandu = dáno strukturou R
- Rozeznání specifické promotorové oblasti
- Dimerizace receptorů (homodimery, heterodimery)
- Remodelace chromatinu pro genovou expresi (HDAC)
- Genová exprese ve výsledku snižena, nebo zvýšená

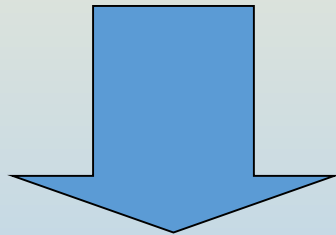
PROČ POUZE JADERNÉ RECEPTORY?

- Syntéza v cytoplasmě
- Zde setrvávají do vazby ligandu, nebo transport do J

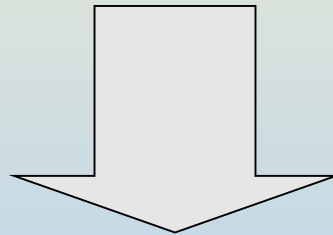


- Regulační mechanismus – modifikace a počet receptorů
- Významný parametr – selektivita cílových buněk
- Tkáňově specifické faktory, koaktivátory a korepresory

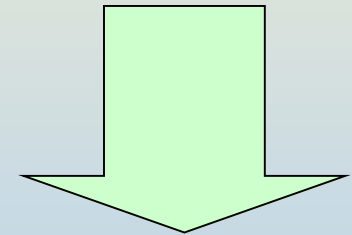
Jaderné receptory



- Vazba s koregulatorními proteiny (nezávislá na ligandu)
- Fosforylační místa



- Vazba s DNA (zinkové prsty)
- Dimerizace
- ERE, PRE, GRE, MRE, ARE

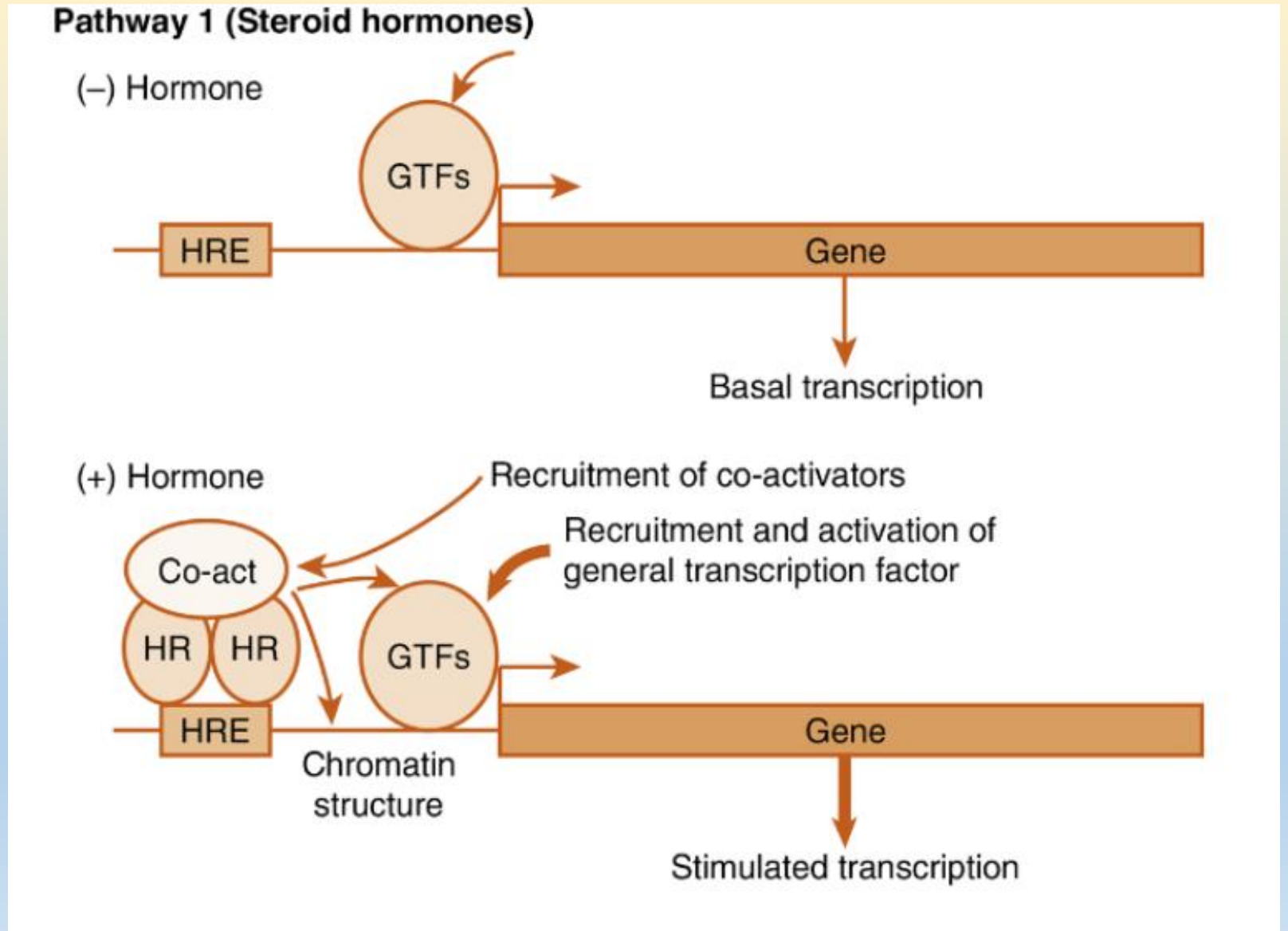


- Vazba ligandu (agonista, antagonist)
- Vazba s koregulatorními proteiny (závislá na ligandu)
- Dimerizace
- Jaderná translokace
- Asociace s chaperony (HSP)

Příklad – steroidní hormony

GTFs = obecné transkripční faktory
(remodulátory chromatinu)

HAT = histon acetyltransferáza



Příklad – hormony štítné žlázy

THRs, VDR, PPARs, RXRs

THR = heterodimer

hormon



základní transkripce

hormon

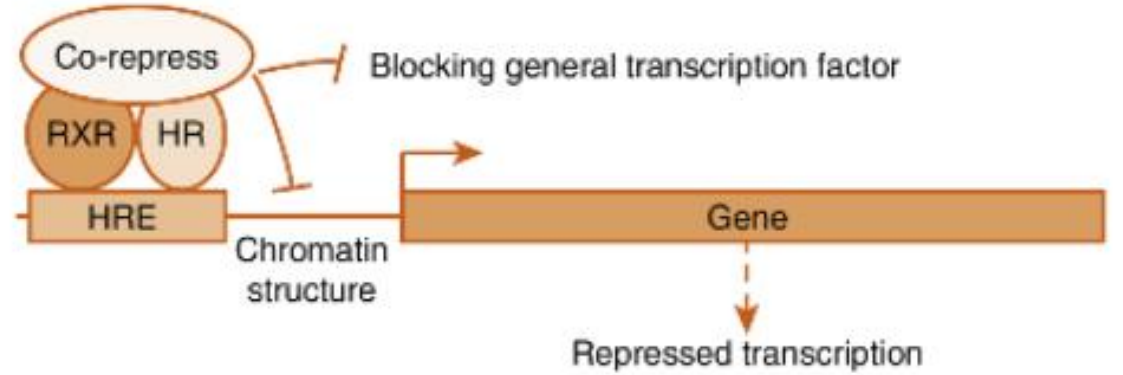
+
RA



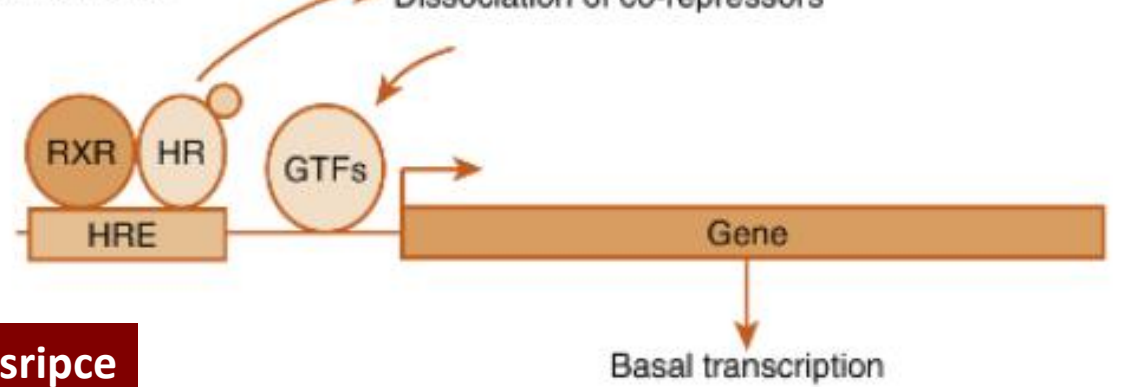
stimulovaná transkripce

Pathway 2 (Thyroid hormones, vitamin D, PPARs)

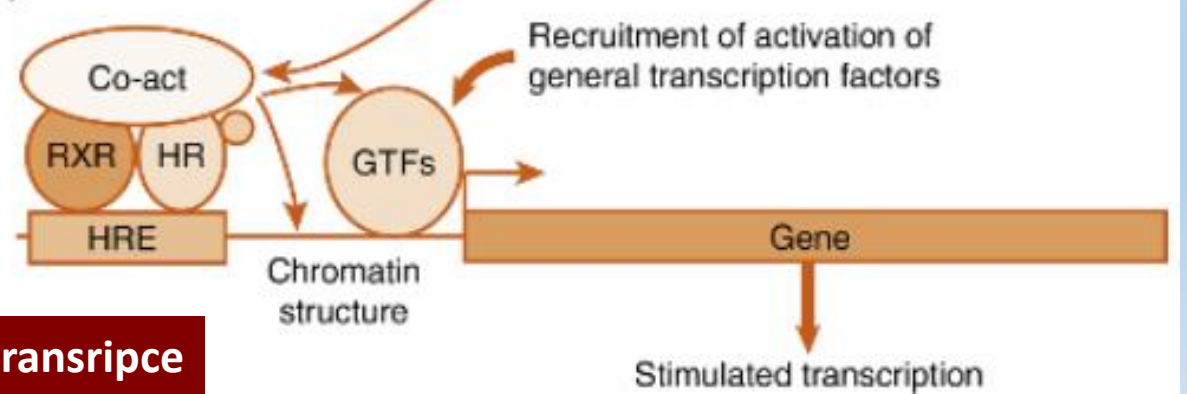
(-) Hormone



(+) Hormone



(+) Hormone



Ukončení účinku hormonu

Receptorem zprostředkovaná endocytóza a následná degradace v lysozómu

Fosforylace/defosforylace receptoru nebo proteinů signální dráhy

Ubikvitinace a proteosomální degradace

Vazba regulačního faktoru na příslušný protein (enzym)

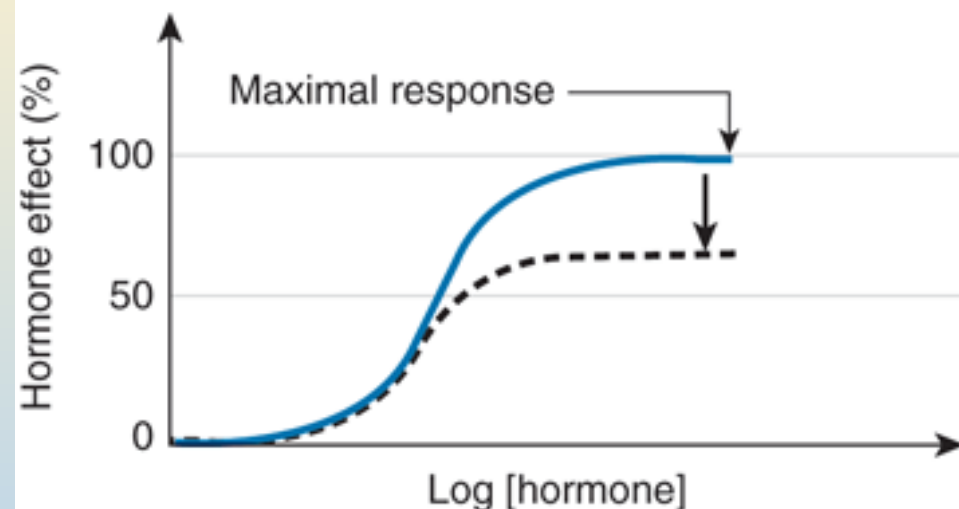
Vnitřní enzymová aktivita a její regulace

Klinické aspekty

- Nadprodukce hormonů
- Nedostatečná produkce hormonů
- Změny citlivosti cílových tkání a/nebo změna buněčné odpovědi
- Zvýšená inaktivace nebo degradace hormonů
- Nedostatečná produkce nebo zvýšená degradace transportních proteinů
- Změny produkce transportních hormonů při fyziologických stavech (těhotenství)

Klinické aspekty

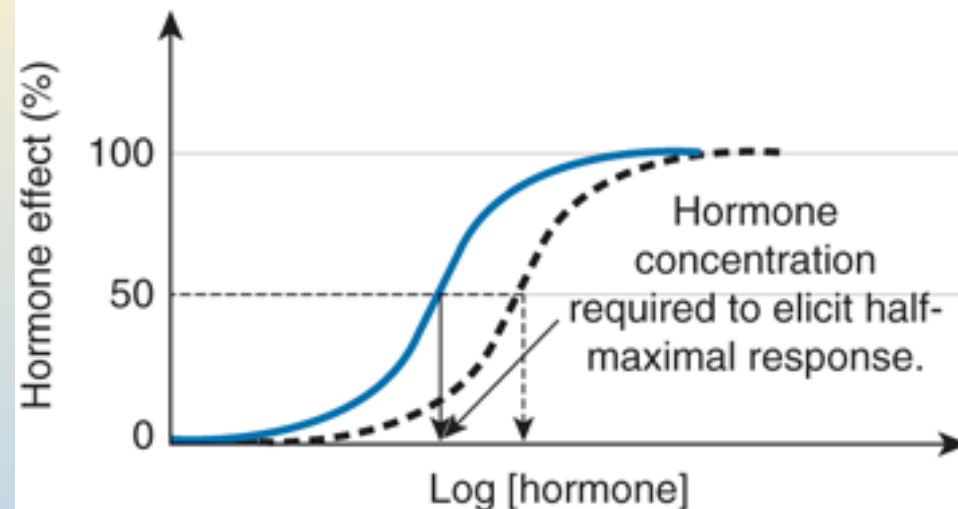
A. Decreased hormone responsiveness



Source: Molina PE: *Endocrine Physiology*, 4th Edition: www.accessmedicine.com
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

- Snížení počtu receptorů
- Snížení koncentrace enzymu aktivujícího hormon
- Zvýšení koncentrace nekompetitivního inhibitoru
- Snížení počtu cílových buněk

B. Decreased hormone sensitivity



Source: Molina PE: *Endocrine Physiology*, 4th Edition: www.accessmedicine.com
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

- Snížení afinity hormonu k receptoru
- Snížení počtu receptorů
- Zvýšená rychlost degradace hormonu
- Zvýšená koncentrace antagonistů/competitivních inhibitorů

Měření hladiny hormonů v krvi

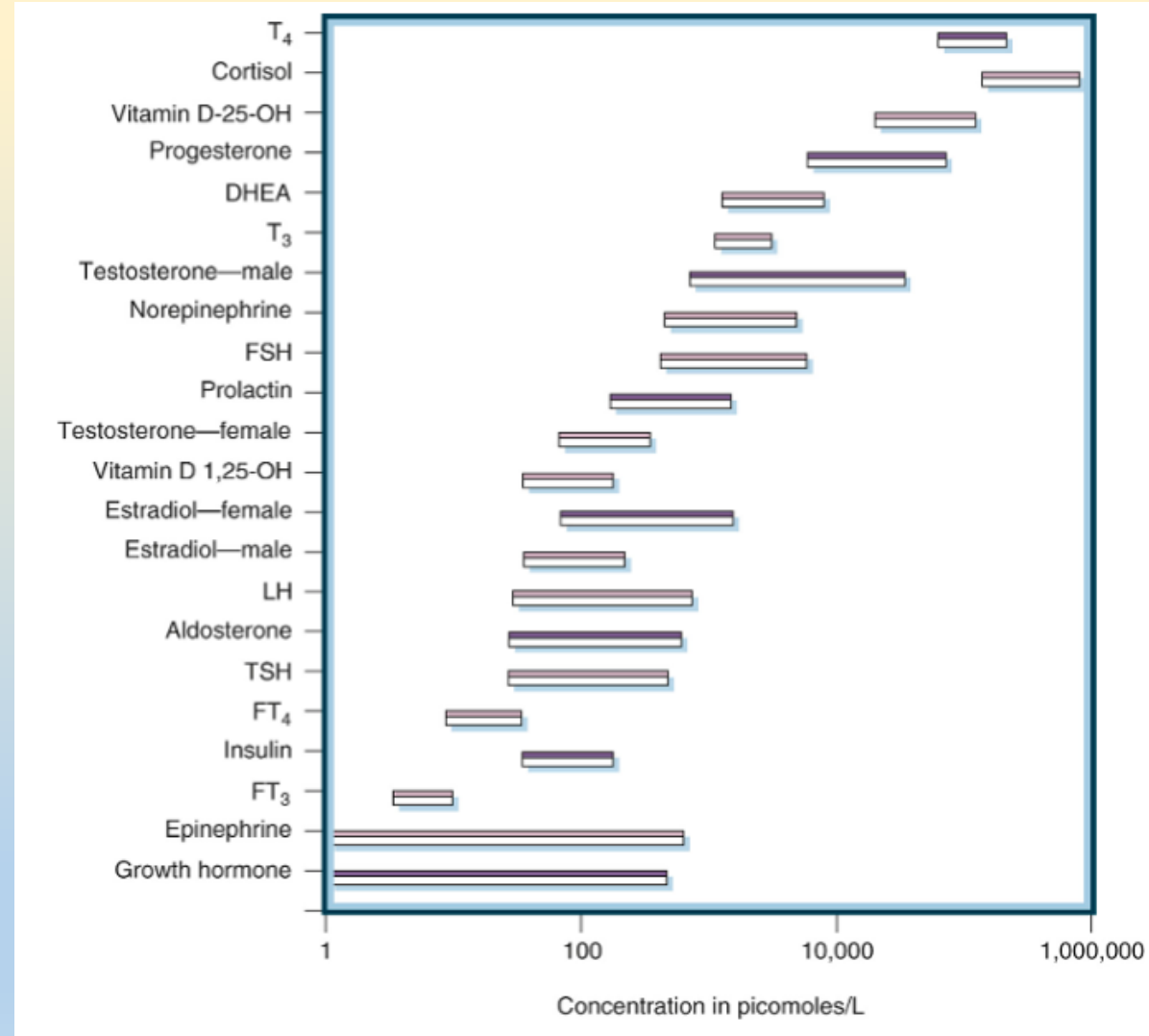
-ZNAČNÉ POŽADAVKY NA CITLIVOST METOD
-ŠIROKÉ KONCENTRAČNÍ ROZPĚTÍ

Metody založené na interakci antigen-protilátka
-Požadavky na protilátku (poly- X monoklonální)
-Monoklonální protilátky = specifické epitopy
-Radioaktivně značené protilátky
-Nutnost kvantifikace!
-RIA, ELISA

Metody založené na HPLC-MS

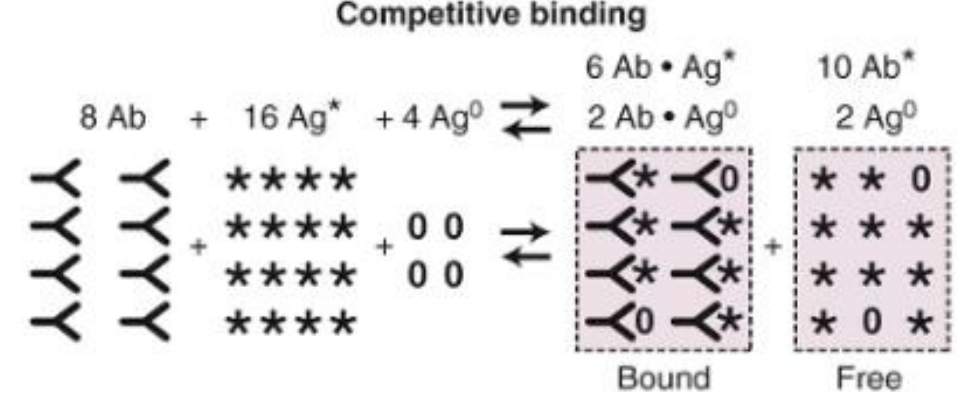
Metody založené na nukleových kyselinách
-Hybridizační techniky
-Restrikční fragmentační elektroforéza, sekvenování

Aplikace separačních technik – volné X vázané hormony
- dialýza



EXTRÉMNĚ NÍZKÁ HLADINA HORMONŮ V KRVÍ

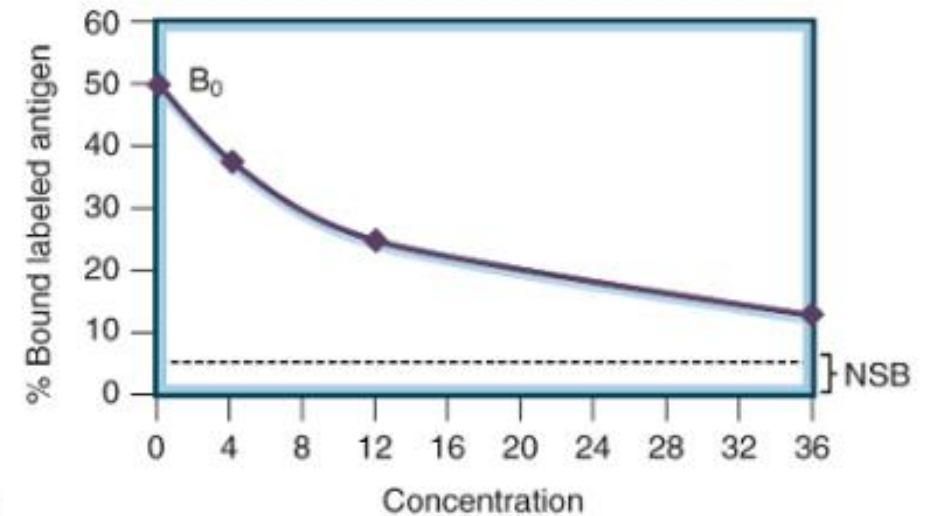
RIA = radioimunoanalýza



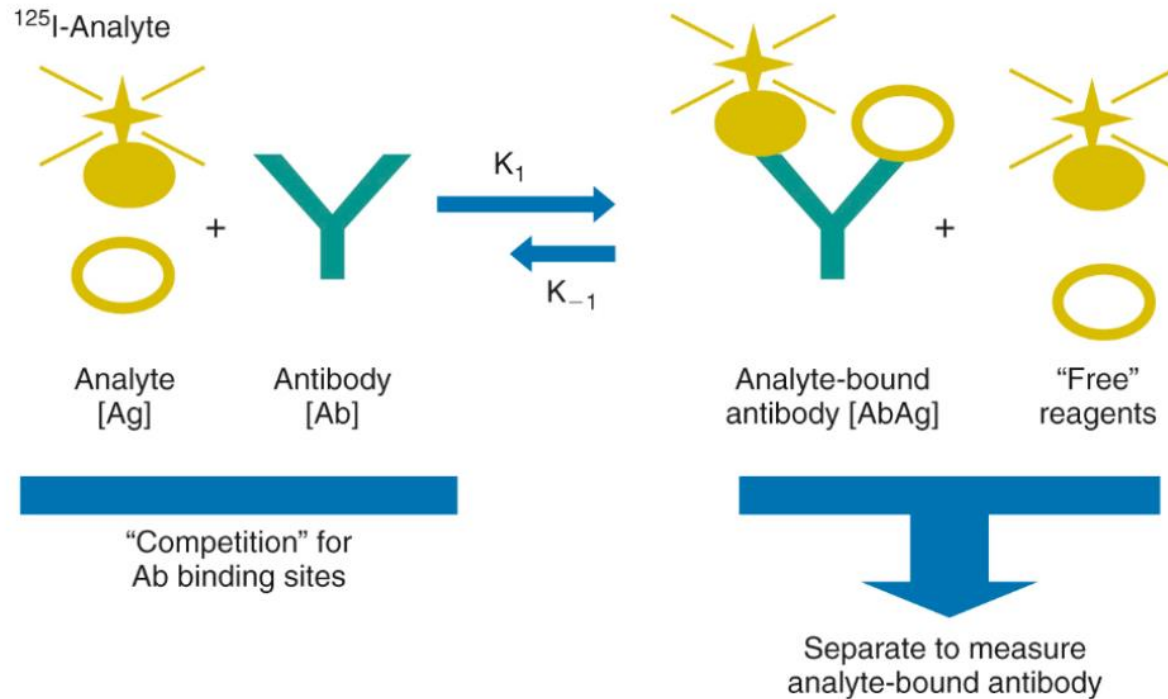
Calibration of standards

Ab	Ag*	Ag ⁰	Ab · Ag*	Ab · Ag ⁰	Ag* + Ag ⁰
8	16	0	8	0	8 0
8	16	4	6	2	10 2
8	16	12	4	4	12 8
8	16	36	2	6	14 30
Constant		Variable	Bound		Free

A



$$\text{Antibody affinity} = K_1/K_{-1} = [\text{AbAg}]/[\text{Ab}][\text{Ag}]$$



HPLC-MS

