**Organizácia na úrovni atómov a molekúl** (mikroelementy, makroelementy, voda, minerálne látky, lipidy, proteíny, sacharidy, nukleové kyseliny)

- 50 otázok TEST (26 bodov)

- predtermín, posledná prednáška (18.12)

**CYTOLÓGIA**

gr. *kytos* - malý ohraničený celok, *logos* - veda

(1. polovica 19.storočia)

- náuka o bunke

- je súčasťou bunkovej biológie

prekrýva sa: morfológia, fyziológia, chémia, biochémia

**zakladatelia**: J. Schlieden, T. Schwann, J.E. Purkyňe (1837-1839 - bunková teória)

**skúma:** veľkosť, tvar, štruktúru

funkciu, rozmnožovanie

starnutie a odumieranie buniek

**delenie**: molekulárna cytológia (činnosť buniek na molekulovej úrovni)

cytomorfológia (štruktúra a zložka buniek)

cytofyziológia (činnosť buniek, ich deje a funkcie, rast a delenie buniek)

cytopatológia (ultraštruktúra, tvar a zmeny za chorobných/experimentálnych podmienok)

**HISTÓRIA**

- zostrojenie jednotlivých mikroskopov v 17. storočí

- výroba šošoviek

= bratia Hans a Zacharis Jassenovci (1550): húsiči skla, prvé mikroskopy

= Galileo Galilei (1564-1642)

= Francisco Stelluti (1630)

= Marcelo Malpighi, Nehemiah Grew (1660)

= R. Brown (1831)

= F. Fontana (1730-1805): mytóza

**R. Hooke (1665)**

- prvýkrát opísal bunku (pozorvanie mŕtvych buniek)

- skúmal korok (kôra stromu) prostredníctvom mikroskopu, bunky pozostávali z malých komôrok, boli však neživé (bunkové steny)

**Anton van Leeuwenhoek (1675)**

- prvý raz pozoroval živé bunky, fanatický pozorovateľ

- objav prvokov, baktérií, spermií

- začiatok mikrobiológe

- mikroskop zväčšoval 300x

- v danom čase nikto nemal takýcto mikroskop

**Henri Milne-Edwards (1823) a Henri Dutrochet (1824)**

- hlbšie poznatky, francúzski biológovia

- prehlasujú bunku za univerzálnu jednotku života, na základe svojich pozorovaní a pozorovaní iných vedcov vyvodili tento záver a že všetky živé veci sú zložené z buniek

- sú základom pre bunkovú teóriu

**Jan Evangelista Purkyňe (1837)**

- jeho práca sa zhodovala s ich závermi

- živočíšna bunka je zrniečko s obsahom jadra

- aj R pletivá sa skladajú z buniek

- prispel do histológie, ako prvý použil mikrotón (zariadenie, ktoré umožňuje robiť ultratenké rezy pletív zafixované a zaliate do parafínovch voskov)

**Matthias Schleiden (1838) a Theodor Schwann (1839)**

- botanik, zoológ

- R a Ž bunka

- v článkoch písali o veciach, na ktoré prišli

- bunka bola univerzána jednotka všetkých živých tkanív, pletív

- bunky vznikajú delením už existujúcich buniek

- bunková teória

**R. Virchov (1855)**

- pridal niečo viac k bunkovej teórii, tvrdí, že bunkové delenie závisí od delenia jadra (*omnis celula e celula* - každá bunka vzniká z bunky)

- bunka je základná jednotka štruktúry a funkcie

**Max Schultze (1861)**

- zdokonaľovala sa mikroskopia, zdokonaľovali sa závery bunkovej teórie

- bunka je hlúčik protoplazmy obdarený všetkými vlastnosťami života a obsahujúci jadro

**E. Grundmann (1964)**

- bunka je najmenšia funkčná jednotka živej hmoty, zložená z častí, ktoré sú vo vzájomnej rovnováhe a spĺňajú kritériá prejavu života - metabolizmus, rozmnožovanie a dráždivosť

**BUNKA**

- základná stavebná jednotka živej hmoty, základná jednotka života

- malá, membránou ohraničená jednotka, naplnená koncentrovaným vodným roztokom chem.zlúčenín a vybavené schopnosťou vytvárať kópie samej seba

- nemusia sa vyskytovať vždy naraz

**5 základných prejavov života:** rozmnožovanie

diferenciácia

rast (prijíma a spotrebúva živiny)

metabolizmus

pohyblivosť (u prvokov je to na inej úrovni ako u buniek v pletivách a tkanivách, Vn pohyblivosť)

dráždivosť

- izolované bunky sú najjednoduchšia forma života

- vyššie organizmy - rozsiahle bunkové mestá

- nič menšie ako je bunka nemôže byť nazvané živým

- vírusy obsahujú niektoré rovnaké typy molekúl ako bunky, ale nemajú bunkovú štruktúru a schopnosť rozmnožovať sa vlastných úsilím

**Funkcie bunky**

rozhodujúce činiteľe pre funkciu bunky: množstvo E a surovín

informácie zakódované v génoch

Vn a Vo faktory (ovplyvňujú prístup ku genetickej informácii)

hlavné funcie bunky: diferenciácia buniek

medzibunková komunikácia

adhézia buniek

**=> diferenciácia buniek**

- dochádza k nej v priebehu fylogenézy, starnutia, dospievania

- je to séria jednotlivých krokov medzi bunkovými cyklami

- upresnenie štruktúry a funkcie buniek

sprievodné javy: ak sa bunka diferencuje, delí sa menej často, má menej schopností, a tie, ktoré jej ostali sú účinnejšie

- k diferenciácii nedochádza náhle

- vieme ju odvodiť od buniek, ktoré obsahuje

- najnápadnejšími zmenami sú zmeny na expresii génov

**=> medzibunková komunikácia**

- pre spevnenie komplexných funkcíí je nutná komunikácia súborov buniek v tkanivách, orgánoch a orgánových sústavách

- komunikačná stratégia sa vytvára už v skorej embryogenéze

- mnoho typov medzibunkovej komunikácie

priama:

- prenos signálov vyžaduje dočastný fyzický kontakt buniek, trvalý alebo dočastný, zavisí od tkaniva

- oblasti kontaktu sa vyznačujú špecializovanými štruktúrami bunkovej membrány - *spojovacie komplexy*

- spojovacie komplexy pre prepojenie - *fyzická komunikácia*

- spojovacie komplexy - *nexy* - kanály pre prenos el. a chem. signálov

nepriama:

- prenášanie signálov z bunky na bunku, aj keď bunky nie sú v kontakte

- hormóny, rastové faktory signálnych molekúl

**=> adhézia buniek**

- mnohé funcie bunky závisia na adhézii buniek

- dochádza medzi sebou

- spojenie medzi cytoskeletom susednch buniek

= intercelulárne väžby sprostreekované transmembránovými proteínimi - **kadheríny**

= kadheríny pripojené k cytoskeletu prostredníctvom adaptovaných proteínov

- adhézia bunky k substrátu - väzba medzi cytoskeletom kolagénovými vláknami a extracelulárnej matrix - **integríny**

= integríny pripojené k cytoskeletu (resp. extracelulárnej matrix) prostredníctvom adaptovaných proteínov

**Úrovne pozorovania buniek**

**1. Makroskopická**

- mnohobunkové organizmy a orgány

pozorovací prístroj: oko (rozlišovacia schopnosť 0,2mm)

disciplíny: morfológia, makroskopická anatómia

**2. Mikroskopická**

- bunky (0,2mm-0,2μm)

pozorovací prístroj: rôzne druhy mikroskopov (7 typov vedieť)

disciplíny: časť cytológie, histológia (mikroskopická anatómia)

**3. Submikroskopická**

- bunkové štruktúry, makromolekuly, nadmolekulové komplexy

veľkosť: 0,2 μm. - 0,2-0,5 nm

pozorovací prístroj: elektrónový mikroskop

disciplíny: cytológia, časť molekulovej biológie

**4. Amikroskopická**

- molekuly, atómy a ich častice

- rontgenova štruktúrna analýza, F-CH metódy

veľkosť: 0,2 - 0,5 nm

disciplíny: fyzikálna chémia, biofyzika, molekulárna biológia

**- svetelným mikroskopom pozorujeme iba mikrometre, nie nanometre**

**Metódy skúmania buniek**

- bunkové, tkanivové a orgánové kultúry

- izolácia jednotlivých súčastí organizmov za riadených podmienok

*In vitro* - v skle (umelé podmienky)

*In vivo* - v živom

- pozorovanie účinkov rôznych zásahov

- štádium embryonálnej diferenciácie a morfogenézy

**Pozorovanie štruktúry a funkcie buniek**

- dostupnosť výberu vhodných metód

- jedna metóda je čiastková informácia, dobré je, ak je tých metód viac

= jedna nám nepovie všetko

= viacero metód: stavba, všeobecné i špeciálne procesy v bunke

- logické spracovanie čiastkových faktov

**1. mikroskopické metódy**

- štúdium morfológie a fyziológie buniek

- dôkaz existencie niektorých organizmov (baktérie, prvoky)

- svetelná mikroskopia

- elektrónová mikroskopia (neumožňuje pozorovanie živých objektov)

**2. fluorescenčná mikroskopia**

- fluochróm

- detekcia primárnej fluorescencie (autofluorescencia) a sekundárnej (umelo vytvorené látky fluoresceín, deriváty akridínu, propídium jodid)

- laser, aby sa vyemitovala fluorescencia

**3. konfokálna mikroskopia**

- vylepšený fluorescenčný mikroskop

- eliminácia svetla pochádzajúceho z tých vrstiev preparátu, ktoré sa nenachádzajú v rovine podľa ostrosti objektívu (vylepšujú obraz)

- porozuje aj v Z osi

**Analýza životnosti buniek (viability)**

- určenie počtu živých buniek vo vzorke

- sledovanie integrity cytoplazmatickej membrány

- schopnosť živých buniek eliminovať vitálne farbivo (trypánová modrá, eozín)

- pomocou svetelného mikroskopu vieme zistiť počet živých buniek sledovanej vzorky

**Stanovenie metabolickej aktivity buniek**

- kolorimetrické stanovenie premeny tetrazoilových solí (MTT, XTT, WST-1) na ich produkt formazán

**Prietoková cytometria**

- imunofenotypizácia buniek

- hydrodynamické zaostrovanie, indukcia a detekcia fluorescencie

- excitačný zdroj svetla (laser) a deketory

- možnosť sledovania viacerých parametrov naraz

**Sortovanie buniek**

lymfocyty, monocyty granuloctyy: na základe signálu, el. vodivosti,el. náboja si viem roztriediť jednotlivé do skúmavky a pracovať s nimi samostatne

**Imagestream system = mikroskop + cytometer**

- každá jedna bunka prechádzajúca laserom je viditeľná

**Frakcionácia buniek**

- dostaneme sa dovnútra bunky ku proteínom, atď.

- mechanické rozbíjanie buniek

- separácia ich súčastí pomocou centrifugácie (diferenciálna, hustotnom gradiente) pre analýzy el. mikroskopie a biochémie

Mechanické rozbíjanie:

- používajú sa homogenizátory, osmotický šok, ultrazvuková vibrácia, pretláčanie buniek cez sitká

*médium v homogenizačnej nádobe:* vhodné zloženie iónov bez obsahu zložiek, v ktorých sa izolované štruktúry rozpúštaju

Diferenciálna centrifugácia:

- rôzne odstredivé sily v rôznych časových intervaloch

- oddelenie roztoku (supernatanu) od sedmentu častíc na dne skúmavky

- nepresné oddelenie látok s podobnými sedimentačnými vlastnosťami

- jadrá, mitochondrie, lyzozómy, mikrozómy (úlomky), ribozómy

supernant:

Centrufugácia v hustotnom gradiente:

- homogenát prevrstvený gradientovým roztokom (sacharózy)

- smerom ku dnu skúmavky sa hustota roztoku zvyšuje

- odstreďovanie, až kým zložky

**Separácia buniek**

- rozrušenie medzibunkovej hmoty a spojení

- používajú sa proteolytické enzýmy (trypsín, kolagenéza)

- EDTA (etyléndiamíntetraoctová)

- získanie suspenzie jednotlivých buniek z tkanív

**Elektroforéza**

- separácia molekúl (DNA, RNA, proteíny) v el. poli

**Membránový prenos - blotting**

- identifikácia molekúl separovaných elektroforézou

- nothern blot (RNA)

- southern blot (DNA)

- western blot (proteíny)

prenos: kapilárky (filtračný papier)

elektroforetický (el.prúd)

vákuový (vákuová pumpa)