

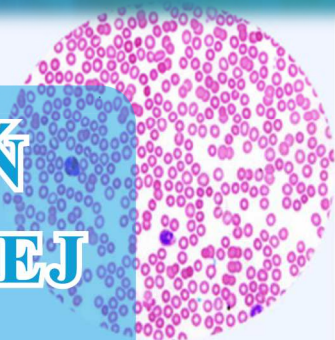
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

SKRYPT DO ĆWICZEŃ Z BIOLOGII MEDYCZNEJ

dla Studentów I roku Analityki medycznej



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

**SKRYPT DO ĆWICZEŃ
Z BIOLOGII MEDYCZNEJ**

dla Studentów I roku Analityki medycznej



**WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY**

Warszawa 2026

Praca zbiorowa pod redakcją dr Ewy Szyp-Sochackiej

Autorzy – Zespół dydaktyczny Katedry i Zakładu Biochemii i Farmakogenomiki,
Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Mgr Daria Berezowska

Dr Sławomir Białek

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Monika Czerwińska

Dr Wioletta Olejarz

Mgr Sylwia Lewandowska-Pachecka

Dr Ewa Szyp-Sochacka

Wydano za zgodą Uczelnianej Rady ds. Kształcenia WUM

ISBN 978-83-7637-670-7

Projekt okładki Ewa Szyp-Sochacka

Wydano w Sekcji Druków Uczelnianych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

tel. (22) 57 20 329

e-mail: wydawnictwo@wum.edu.pl

www.drukiuczelniane.wum.edu.pl

Spis treści:

Zasady bezpieczeństwa pracy w pracowni Biologii medycznej 6

CZEŚĆ PRAKTYCZNA 8

Instrukcja obsługi pipety automatycznej krok po kroku:..... 9

Rozdział 1. Mikroskopia świetlna – analiza morfologii bakterii 13

Budowa mikroskopu świetlnego i zasady mikroskopowania..... 14

Budowa i klasyfikacja bakterii 16

Analiza składu gatunkowego i morfologii bakterii występujących w probiotykach 30

Rozdział 2. Budowa i funkcje tkanek zwierzęcych – analiza mikroskopowa 31

Techniki przygotowywania preparatów mikroskopowych 31

Analiza struktur komórkowych, przy użyciu mikroskopu..... 33

Budowa i funkcje tkanek..... 37

Tkanka mięśniowa.....43

Tkanka łączna51

Rodzaje tkanki tłuszczowej.....53

Rodzaje tkanki chrzęstnej56

Rodzaje tkanki kostnej.....60

Tkanka nerwowa69

Znaczenie osmozy w komórkach zwierzęcych..... 72

Rozdział 3. Biochemiczne podstawy diagnostyki laboratoryjnej 78

Rozdział 4. Genetyczne i biochemiczne podstawy wybranych chorób genetycznych 87

Genetyczne podstawy wybranych chorób..... 90

Niedokrwistość sierpowata90

Choroba Huntingtona91

Fenyloketonuria.....91

Alkaptonuria93

Tyrozynemia93

Albinizm94

Hemofilia95

Talasemia97

Galaktozemia97

Choroba Taya-Sachsa98

Glikogenozy.....99

Daltonizm100

Zespół kociego krzyku (Cri du Chat).....100

Zespół łamliwego chromosomu X101

Aberracje chromosomowe liczbowe – aneuploidie.....101

Rozdział 5. Pasożyty człowieka – przystosowania, cykle rozwojowe i diagnostyka 105

Pasożytnicze protisty człowieka..... 108

Rzęsistek pochwoy (*Trichomonas vaginalis*).....108

Ameba (*Entamoeba histolytica*).....109

Świdrowce (*Trypanosomatidae*)109

Zarodźce (*Plasmodium*).....111

| | |
|---|------------|
| Toxoplasma (<i>Toxoplasma gondii</i>) | 113 |
| Przywry (<i>Trematoda</i>) | 115 |
| Motylca wątrobowa (<i>Fasciola hepatica</i>)..... | 116 |
| Przywra krwi (<i>Schistosoma haematobium</i>) | 117 |
| Włosogłówka ludzka (<i>Trichuris trichiura</i>)..... | 119 |
| Owsik ludzki (<i>Enterobius vermicularis</i>)..... | 121 |
| Włosień kręty (<i>Trichinella spiralis</i>)..... | 122 |
| Glista ludzka (<i>Ascaris lumbricoides hominis</i>) | 124 |
| Tasiemce (<i>Cestoda</i>)..... | 126 |
| Tasiemiec uzbrojony (<i>Taenia solium</i>)..... | 128 |
| Tasiemiec nieuzbrojony (<i>Taenia saginata</i>)..... | 129 |
| Tasiemiec bąblowcowy (<i>Echinococcus granulosus</i>)..... | 130 |
| Brudogłowiec szeroki (<i>Diphyllobothrium latum</i>)..... | 131 |
| Instrukcje ćwiczeń laboratoryjnych | 132 |
| Ćwiczenie 1. Obserwacje mikroskopowe – morfologia bakterii | 133 |
| Ćwiczenie 2. Obserwacje mikroskopowe – budowa i funkcje tkanek zwierzęcych..... | 138 |
| Ćwiczenie 3. Obserwacje mikroskopowe – podziały komórkowe | 146 |
| Ćwiczenie 4. Reakcje barwne w identyfikacji związków organicznych | 151 |
| Ćwiczenie 5. Obserwacje mikroskopowe – wybrane pasożyty człowieka | 162 |
| | |
| CZĘŚĆ TEORETYCZNA | 168 |
| | |
| Rozdział 1. Preparatyka histologiczna, barwienie i metody badania komórek..... | 169 |
| Preparatyka histologiczna | 172 |
| Wykorzystanie barwników do wykrywania lipidów | 176 |
| Metody badania komórek | 177 |
| Analityczne metody rozdziału struktur komórkowych..... | 182 |
| Zaburzenia budowy i funkcji organeli komórkowych – przykłady chorób..... | 184 |
| | |
| Rozdział 2. Regulacja cyklu komórkowego | 186 |
| Etapy cyklu komórkowego | 189 |
| Regulacja cyklu komórkowego | 192 |
| Molekularne mechanizmy regulujące zmianę etapu w cyklu życiowym komórki..... | 194 |
| Biologiczne granice cyklu komórkowego | 198 |
| | |
| Rozdział 3. Etapy embriogenezy i determinacja płci | 200 |
| Gametogeneza | 202 |
| Etapy rozwoju zarodkowego | 205 |
| Genetyczne podstawy determinacji płci biologicznej..... | 208 |
| | |
| Rozdział 4. Podstawy genetyki i typy dziedziczenia | 211 |
| Genetyka klasyczna a genetyka molekularna..... | 211 |
| Diagnostyka chorób dziedzicznych..... | 211 |
| Onkologia – diagnostyka i leczenie nowotworów | 212 |
| Podstawowe pojęcia..... | 212 |
| Zastosowanie w praktyce..... | 220 |
| Przykłady przypadków klinicznych | 221 |
| Odpowiedzi:..... | 223 |

| | |
|--|------------|
| Rozdział 5. Grupy krwi, dziedziczenie układów grupowych | 224 |
| Układy grupowe krwi – wprowadzenie | 225 |
| Wybrane grupy krwi | 226 |
| Układ ABO | 226 |
| Układ Rh..... | 230 |
| Dziedziczenie układów grupowych..... | 233 |
| Dziedziczenie w układzie AB0 | 233 |
| Dziedziczenie w układzie Rh..... | 235 |
| Konflikt serologiczny | 236 |
| Konflikt serologiczny w układzie ABO..... | 236 |
| Konflikt serologiczny w układzie Rh | 237 |
| Konflikt serologiczny w układzie Kell | 239 |
| Zasady krwiolecznictwa..... | 239 |
| | |
| Rozdział 6. Mutacje i genetyka populacyjna w medycynie | 240 |
| Klasyfikacja mutacji:..... | 241 |
| Mutageny..... | 246 |
| Diagnostyka chorób genetycznych..... | 249 |
| Genetyka populacji..... | 249 |
| | |
| Spis rycin..... | 253 |
| Spis tabel..... | 260 |

Zasady bezpieczeństwa pracy w pracowni Biologii medycznej

1. Każdy student zobowiązany jest do zapoznania się z Zasadami Bezpieczeństwa Pracy w pracowni biochemicznej i stosowania się do nich podczas pracy w laboratorium.
2. W czasie pracy laboratoryjnej student zobowiązany jest do stosowania odpowiedniej odzieży ochronnej (zapięty czysty fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe, obuwie na płaskim obcasie).
3. Student zobowiązany jest do dbałości o sprzęt oraz szkło laboratoryjne wykorzystywane w trakcie zajęć.
4. Należy zachować szczególną ostrożność przy pracy z materiałem biologicznym, a zużyty sprzęt jednorazowego użytku (np. końcówki) umieszczać w specjalnie do tego celu przeznaczonych, oznakowanych pojemnikach.
5. Stężone roztwory kwasów i zasad odmierzamy używając do tego specjalnych pipet, wykonując wymienione powyżej czynności pod sprawnie działającym wyciągiem.
6. Do każdego rodzaju roztworu pobieranego z butelki należy stosować oddzielne jednorazowe końcówki.
7. Ze względu na zagrożenie zanieczyszczeniem nigdy nie należy wlewać z powrotem do butelki roztworu uprzednio z niej pobranego.
8. W przypadku oparzenia lub skaleczenia należy natychmiast zgłosić zaistniały fakt do asystenta prowadzącego ćwiczenie.
9. Należy zachować szczególną ostrożność w trakcie pracy z wirówkami – nieprawidłowe równoważenie probówek lub zatrzymywanie wirówki podczas pracy grozi trwałym okaleczeniem!

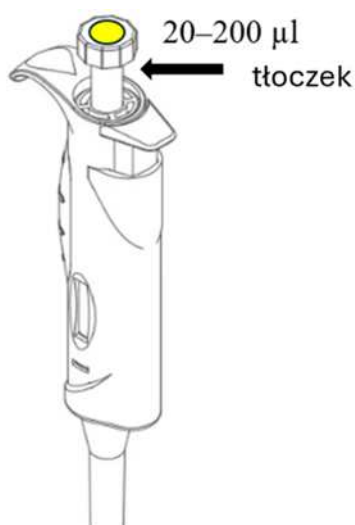
10. W trakcie zajęć laboratoryjnych student powinien zachować czystość i porządek w miejscu pracy (na stołach laboratoryjnych mogą znajdować się wyłącznie materiały niezbędne do pracy).
11. Torby i plecaki oraz kurtki/płaszczki powinny być pozostawiane w miejscach specjalnie do tego przeznaczonych.
12. W laboratorium obowiązuje bezwzględny zakaz spożywania posiłków, picia napojów oraz palenia papierosów.
13. Po zakończeniu zajęć student powinien starannie uporządkować miejsce pracy, umyć i schować szkło, przetrzeć blat stołu wodą, wytrzeć, zdjąć rękawiczki, fartuch roboczy i natychmiast umyć ręce.

CZEŚĆ PRAKTYCZNA

Instrukcja obsługi pipety automatycznej krok po kroku:

Pipeta automatyczna, jest jednym z podstawowych narzędzi laboratoryjnych, służącym do precyzyjnego odmierzenia i przenoszenia cieczy. Prawidłowe jej użycie ma kluczowe znaczenie dla dokładności wyników oraz trwałości sprzętu.

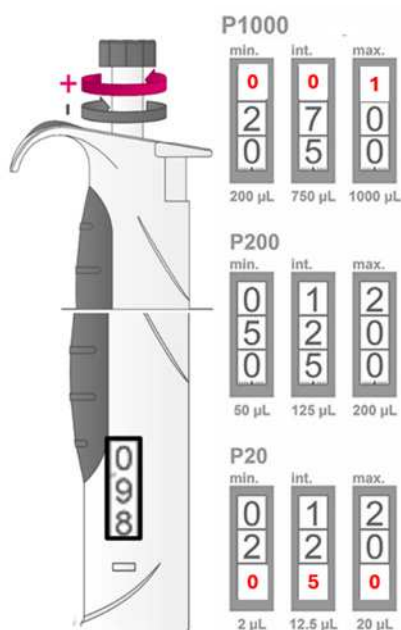
1. Dobierz odpowiednią pipetę



- Wybierz pipetę o zakresie odpowiadającym objętości, którą chcesz odmierzyć (np. 20–200 μl lub 100–1000 μl).

Uwaga! Objętość pipety umieszczona jest na powierzchni tłoczka i często oznaczona innym kolorem tłoczka.

2. Ustaw żądaną objętość



- Obróć pokrętko regulacji do momentu aż na wyświetlaczu pipety pojawi się właściwa wartość.

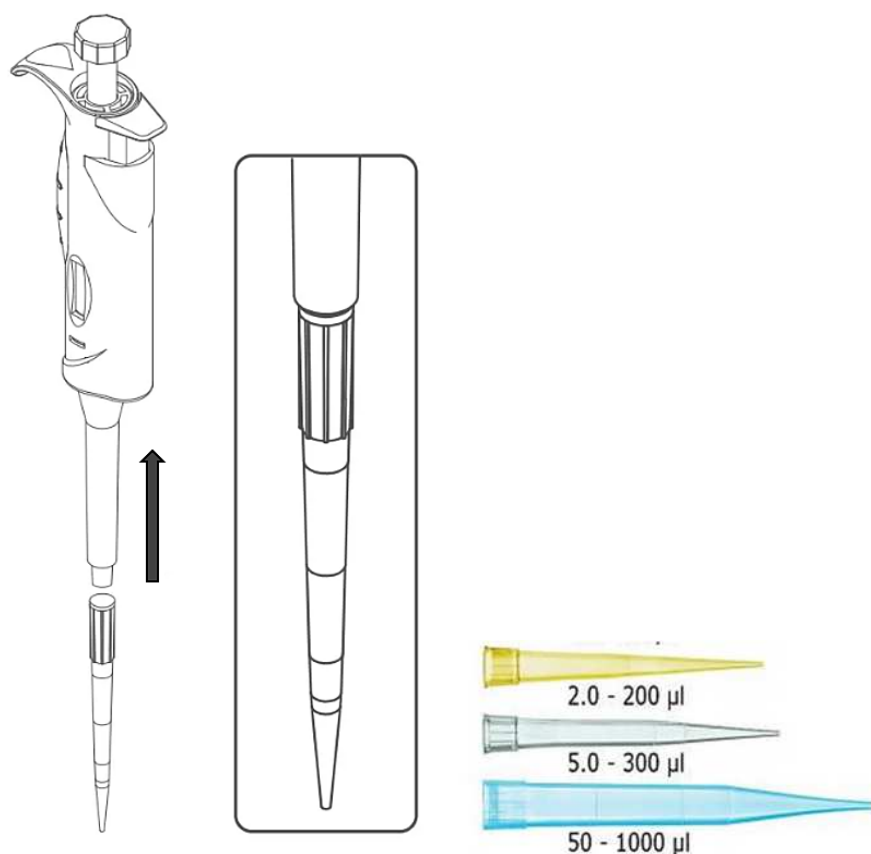
Uwaga! Objętość należy ustawiać wyłącznie w zakresie roboczym danej pipety (np. P 1000 μ l, P200 itd.)

Zabrania się ustawiania objętości poza dopuszczalnym zakresem, gdyż może to prowadzić do trwałego uszkodzenia mechanizmu pipety.

Regulacji dokonuje się płynnie, unikając gwałtownych ruchów pokrętłem.

3. Załóż końcówkę (tip)

- Wciśnij końcówkę na stożek pipety, mocno dociskając, aby zapewnić szczelność.



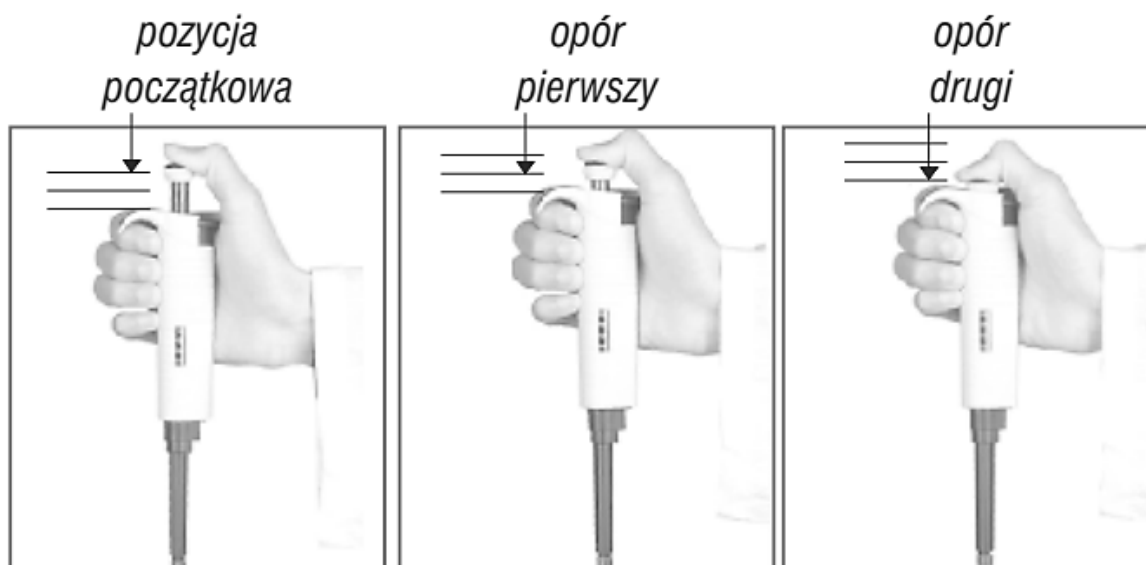
Do różnych pojemności pipety dopasowane są odpowiednie końcówki. Kolor przycisku pipety najczęściej odpowiada kolorowi opakowania końcówek, co ułatwia dobór odpowiedniego rozmiaru (np. żółty przycisk = żółte końcówki).

Systemy kolorów mogą się nieznacznie różnić w zależności od producenta pipet

Uwaga! Końcówki należy wymieniać po każdym użyciu, aby uniknąć kontaminacji (zanieczyszczenia próbki).

4. Pobranie cieczy

- Naciśnij tłok do pierwszego oporu (pozycja pobierania).
- Zanurz końcówkę pipety w cieczy (2-3 mm poniżej powierzchni) **utrzymując pipetę pionowo.**
- Powoli zwolnij tłok, aby nabrać ciecz do końcówki.

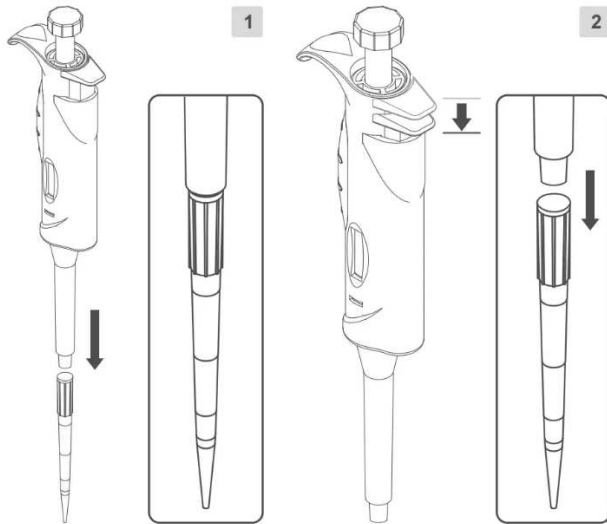


5. Dozowanie cieczy

Ustaw pipetę w pozycji pionowej nad naczyniem

- Umieść końcówkę nad naczyniem docelowym.
- Naciśnij tłok do pierwszego oporu, aby oddać zaplanowaną objętość.

- Następnie naciśnij tłok do drugiego oporu, aby usunąć resztki cieczy z końcówki.
 - Wyjmij pipetę z naczynia i puść tłok.
6. Wyrzucenie końcówki
- Naciśnij przycisk do wyrzucania tipów nad pojemnikiem na odpady.



7. Dobre praktyki

Po wykonaniu pracy przechowuj pipetę pionowo na statywie.

<https://manuals.plus/pl/fmcg/pipet4u-pro-micro-volume-pipette-manual>

Instrukcja obsługi – MLPettePlus 2013.12.cdr

Rozdział 1.

Mikroskopia świetlna – analiza morfologii bakterii

Cel ćwiczeń:

- Utrwalenie umiejętności posługiwania się mikroskopem
- Nauka przygotowania preparatu w kropli spłaszczonej
- Obserwacja komórek bakteryjnych z użyciem olejku immersyjnego
- Nauka wykonywania dokumentacji graficznej obrazu mikroskopowego
- Obserwacja komórek bakteryjnych występujących w probiotykach oraz jogurcie
- Zebranie podstawowych informacji dotyczących funkcji i składu mikrobiomu w organizmie człowieka

Zajęcia z biologii medycznej rozpoczynamy od mikroskopowania. Mikroskopia stanowi jedno z podstawowych narzędzi współczesnej biologii i medycyny. Umożliwiła odkrycie mikroorganizmów oraz rozwój kluczowych dziedzin nauki, takich jak mikrobiologia, histologia, cytologia czy immunologia.

Wynalezienie mikroskopu:

1. Umożliwiło odkrycie mikroorganizmów

Dzięki mikroskopowi Antoni van Leeuwenhoek (XVII w.) jako pierwszy zobaczył bakterie, pierwotniaki, plemniki i komórki krwi. Rozpoczął się rozwój mikrobiologii i obalono wcześniejsze poglądy (np. teorię samoródtwa).

2. Rozwinęło teorię komórkową

Mikroskop pozwolił Schleidenowi i Schwannowi w XIX w. sformułować teorię, że komórka jest podstawową jednostką budowy organizmów.

To podejście zmieniło sposób patrzenia na organizm człowieka z poziomu organów i tkanek na poziom komórkowy.

3. Pozwoliło badać tkanki i komórki

Nastąpił rozwój histologii i cytologii i możliwość diagnozy chorób poprzez badanie wycinków tkanek, co stało się podstawą dzisiejszej diagnostyki histopatologicznej.

4. Doprowadziło do zrozumienia chorób zakaźnych

Obserwacje mikroskopowe umożliwiają identyfikację patogenów. Robert Koch i Louis Pasteur wykorzystali mikroskop do udowodnienia, że choroby zakaźne są powodowane przez mikroorganizmy.

5. Rozwój diagnostyki laboratoryjnej

Obserwacja komórek krwi, moczu, preparatów tkanek stała się możliwa w rutynowej diagnostyce. Badania mikroskopowe stały się podstawowym narzędziem w hematologii, parazytologii, mikrobiologii.

6. Umożliwiło lepsze zrozumienie procesów biologicznych

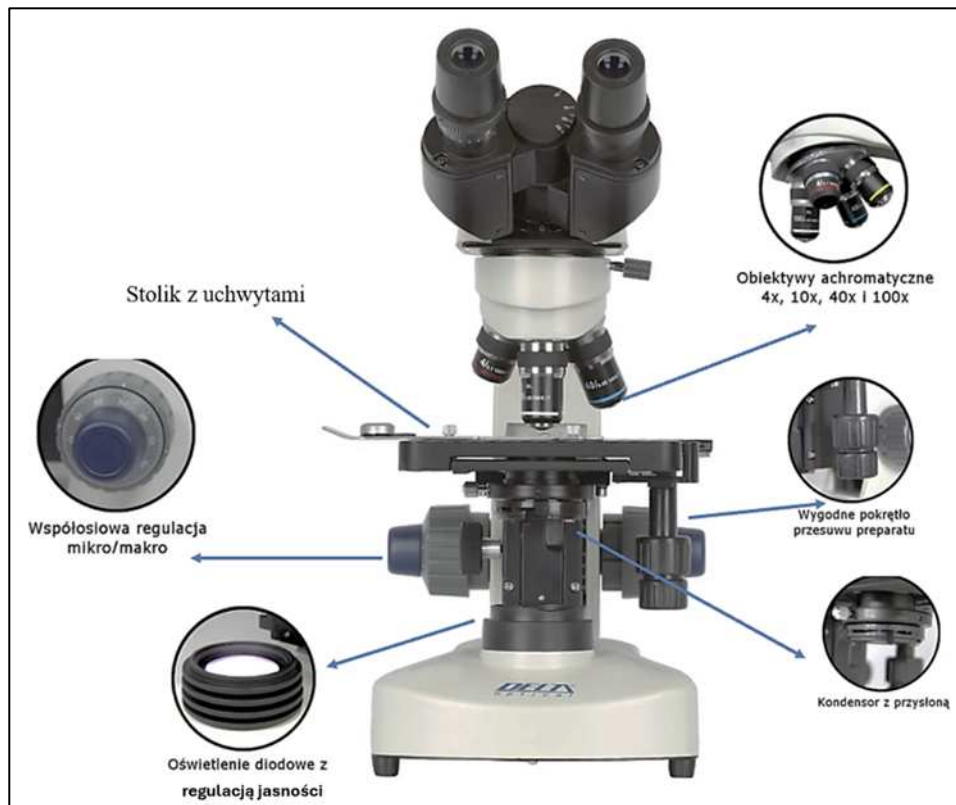
Dzięki mikroskopowi odkryto mitozę, mejozę, organelle komórkowe, a to pozwoliło wyjaśnić mechanizmy dziedziczenia, rozmnażania i powstawania nowotworów.

7. Przyspieszyło rozwój nowych terapii i szczepionek

Identyfikacja patogenów pozwoliła na opracowanie szczepionek i antybiotyków ukierunkowanych na konkretne mikroorganizmy.

Budowa mikroskopu świetlnego i zasady mikroskopowania

Podczas ćwiczeń z biologii medycznej wykorzystywać będziemy mikroskopy świetlne. Zapoznanie się z budową i funkcjami poszczególnych elementów mikroskopu pozwoli na sprawne wykonywanie zadań oraz uzyskanie dobrych obrazów oglądanych preparatów.



Ryc. 1. Budowa mikroskopu

Przed rozpoczęciem obserwacji należy delikatnie oczyścić szkiełko z preparatem stałym oraz okulary i obiektywy.

Preparat stały lub preparat przyżyciowy umieszczamy na stoliku szkiełkiem nakrywkowym skierowanym do góry. Preparat mocujemy na stoliku za pomocą metalowych uchwytów.

Po włączeniu źródła światła, przy użyciu pokrętła przesuwu preparatu ustawiamy szkiełko, tak, aby wiązka światła przechodziła przez jego środek. Ustawienie ostrości należy rozpocząć od ustawienia najkrótszego obiektywu o powiększeniu $5\times$. Następnie obracając pokrętłem makro (śruba makrometryczna) należy ustawić wysokość stolika tak aby otrzymany obraz był wyraźny.

Dla uzyskania optymalnego powiększenia obrazu ustawiamy kolejne obiektywy: $10\times$, $40\times$ i $100\times$. Obserwując jednocześnie obraz przez wybrany obiektyw, za pomocą śrub makrometrycznej i mikrometrycznej ustawiamy ostrość obrazu.

Precyzyjnego ustawienia ostrości należy dokonać przy pomocy pokrętła ruchu drobnego (śruba mikrometryczna). Ruch śrubą makrometryczną przy zastosowaniu obiektywów o dużych powiększeniach tj. 40× czy 100×, gdy preparat znajduje się blisko obiektywu, grozi zniszczeniem preparatu i uszkodzeniem soczewki obiektywu. W takim przypadku należy posługiwać się śrubą mikrometryczną.

Przy pomocy pokrętła dioptryjnego lewego okularu możemy dostosować jakość obrazu do wzroku użytkownika.




Obiektyw do stosowania z olejkim immersyjnym oznaczony jest jako „OIL” a jego powiększenie wynosi 100×. Po przesunięciu głowicy rewolweru niewielką ilość olejku immersyjnego (1 kropla) należy nanieść na szkiełko nakrywkowe i ustawić obiektyw na wyjściowej pozycji, tak, aby soczewka obiektywu zanurzyła się w kropli olejku. Immersja jest przykładem techniki, która na drodze fizycznej zwiększa zdolność rozdzielczą mikroskopu optycznego. Immersja polega na umieszczeniu między preparatem a obiektywem kropli specjalnego olejku o współczynniku załamania światła podobnym do szkła (1,5–1,6). Dzięki temu światło nie rozprasza się na granicy szkło-powietrze, lecz przechodzi płynnie do soczewki. Powstaje wyraźniejszy obraz, bo rośnie apertura numeryczna obiektywu – czyli zdolność mikroskopu do rozróżniania drobnych szczegółów. Po zakończonej obserwacji należy każdorazowo usunąć olejek immersyjny z obiektywu i preparatu.

Budowa i klasyfikacja bakterii

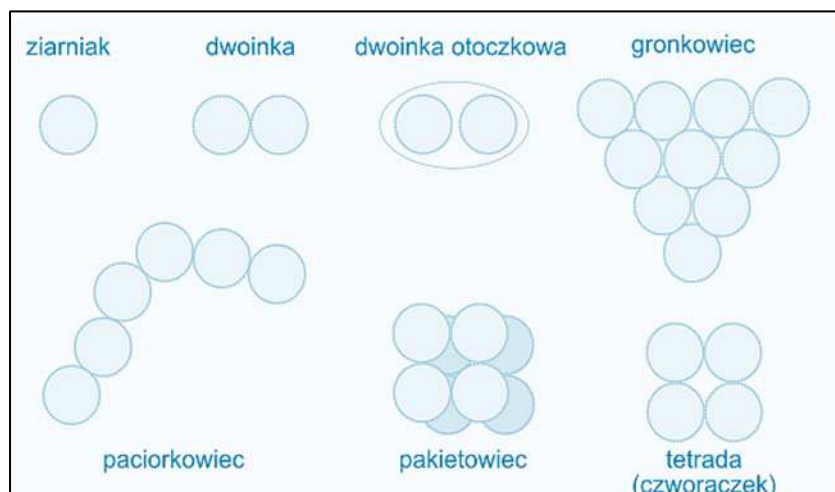
Według współczesnego systemu taksonomicznego, opartego na genetycznym stopniu pokrewieństwa, organizmy klasyfikuje się do jednej z 3 domen: bakterie, archeony, eukarionty. Organizmy należące do domeny *Bacteria* i *Archaea* nie posiadają wyodrębnionego jądra komórkowego. Ich materiał genetyczny (pojedyncza, kolistą, 2-niciową cząsteczką DNA) znajduje się w obszarze

komórki określanej jako nukleoid. Ze względu na typ budowy komórkowej, bakterie i archeony, należą zatem do grupy *Procaryota* (prokaryoty).

Budowa komórki bakteryjnej a szczególnie struktura ściany komórkowej wpływa na kształt bakterii. Ze względu na morfologię bakterie można podzielić na 3 podstawowe grupy:

-  Ziarenkowce o kulistym kształcie komórek
-  Pałeczki i laseczki o kształcie wydłużonym
-  Krętki, charakteryzujące się spiralnym kształtem komórek.

Niezależnie od kształtu bakterie mogą występować w połączeniu, tworząc charakterystyczne skupiska. Kiedy po podziałach, komórki bakterii nie rozchodzą się, lecz skleją się dzięki adhezji powierzchniowej i obecności lepkiej warstwy polisacharydów tworzących otoczkę śluzową, powstają charakterystyczne dla poszczególnych gatunków skupiska.



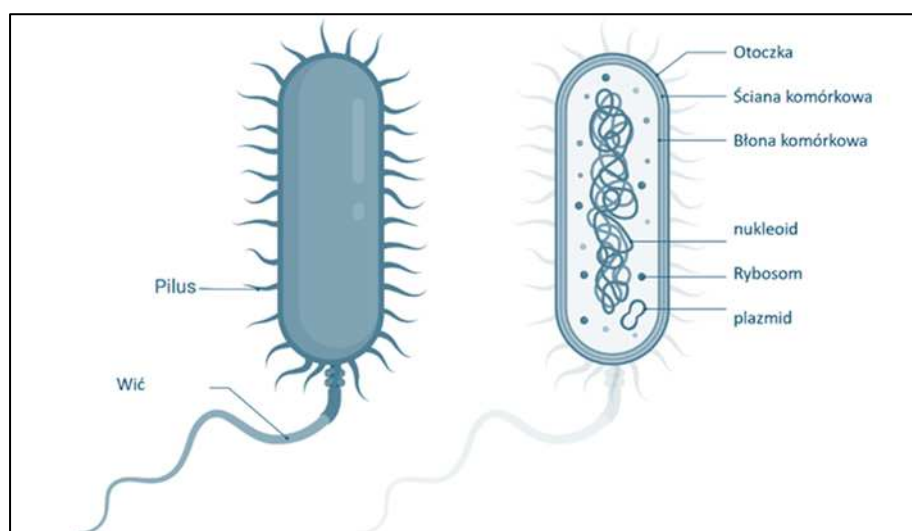
Ryc. 2. Formy skupisk bakterii (https://pl.wikipedia.org/wiki/Kszta%C5%82t_bakterii-)

Charakterystyczne konfiguracje, jak grona, łańcuszki czy pakiety mają istotne znaczenie diagnostyczne i taksonomiczne.

Tabela 1. Formy skupisk bakterii z przykładami gatunków

| Opis | Przykład bakterii |
|-------------|-------------------------------|
| Dwoinki | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| Paciorkowce | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| Gronkowce | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Tetrazy | <i>Micrococcus luteus</i> |
| Pakietowce | <i>Sarcina ventriculi</i> |

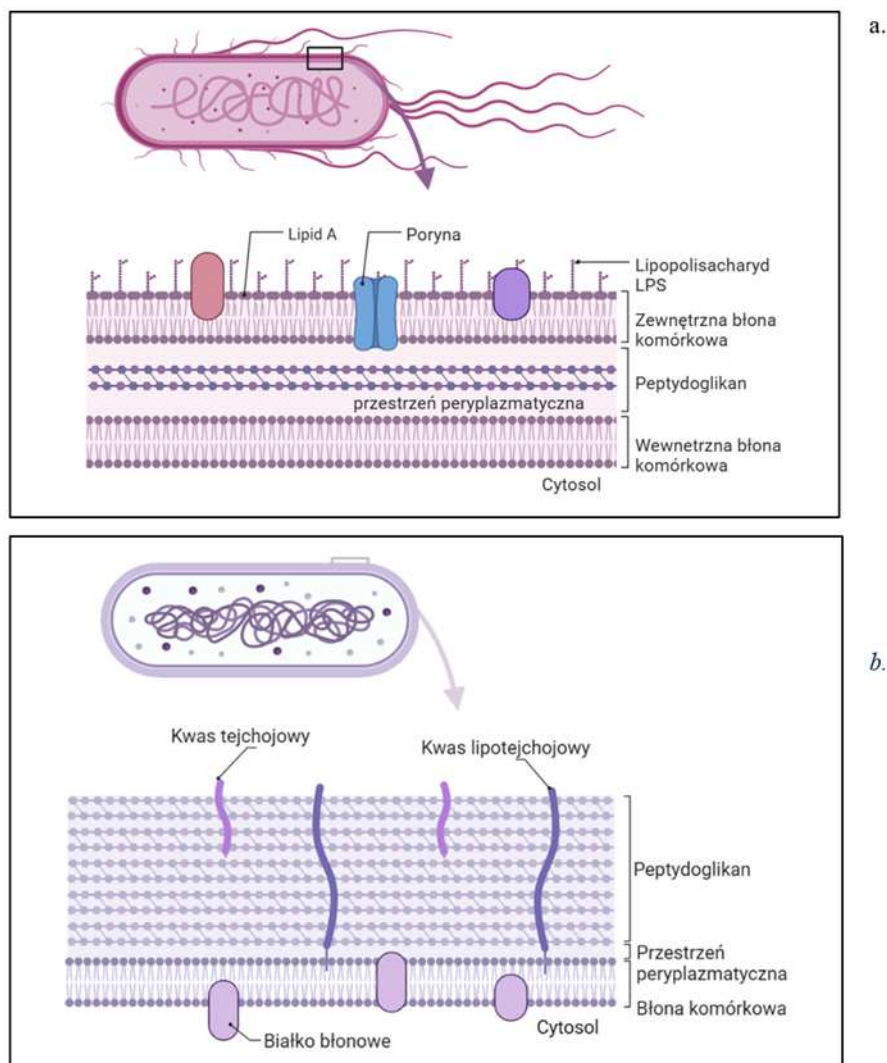
Protoplast komórki bakteryjnej od środowiska zewnętrznego chroni, zbudowana głównie z polisacharydów, galaretowata **otoczka śluzowa (glikokaliks)**. Jej skład jest zróżnicowany i decyduje o właściwościach antygenowych. Otoczka śluzowa chroni komórki przed utratą wody, ale także hamuje fagocytozę przez makrofagi. Lepka konsystencja otoczki pozwala na tworzenie kolonii, przyleganie (adhezja) do struktur gospodarza oraz tworzenie biofilmu na różnych powierzchniach. Biofilm bakterii zwiększa oporność na działanie mechanizmów obronnych gospodarza i antybiotyków.



Ryc. 3. Schemat budowy komórki bakteryjnej <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5ffdfb47420acf00a02c5e53-structural-overview-of-a-bacterial-cell> – modyfikacja autora

Kluczowym elementem utrzymującym kształt komórki jest **ściana komórkowa**. Rusztowanie ściany komórkowej bakterii zbudowane jest z polimeru

– peptydoglikanu, zwanego mureiną. Peptydoglikan składa się z łańcuchów polisacharydowych, utrzymywanych przez mostki peptydowe (sieciowanie). Łańcuchy polisacharydowe zbudowane są z N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Do wytworzenia wiązań poprzecznych w peptydoglikanie niezbędne są aminokwasy diaminowe. Wiązanie poprzeczne jest wytwarzane między wolną aminą, np. L-lizyny a D-alaniną w czwartej pozycji kolejnego łańcucha. Peptyd łączący jest produkowany enzymatycznie bez udziału rybosomów. Jego synteza jest skomplikowana, przebiega etapowo, a uczestniczą w niej enzymy, takie jak transglikolazy, transpeptydazy, DD-karbokypeptydazy. Te ostatnie są określane mianem białek wiążących penicylinę, ponieważ są celem dla penicyliny i innych antybiotyków β -laktamowych. Na wszystkich etapach sieciowania ściany komórkowej specyficzne antybiotyki mogą blokować proces, dzięki czemu możliwe jest zatrzymanie wzrostu lub śmierć komórek bakteryjnych. Peptydoglikan jest konieczny do utrzymania struktury komórki bakteryjnej, rozmnażania i przeżycia w zróżnicowanych warunkach środowiskowych.



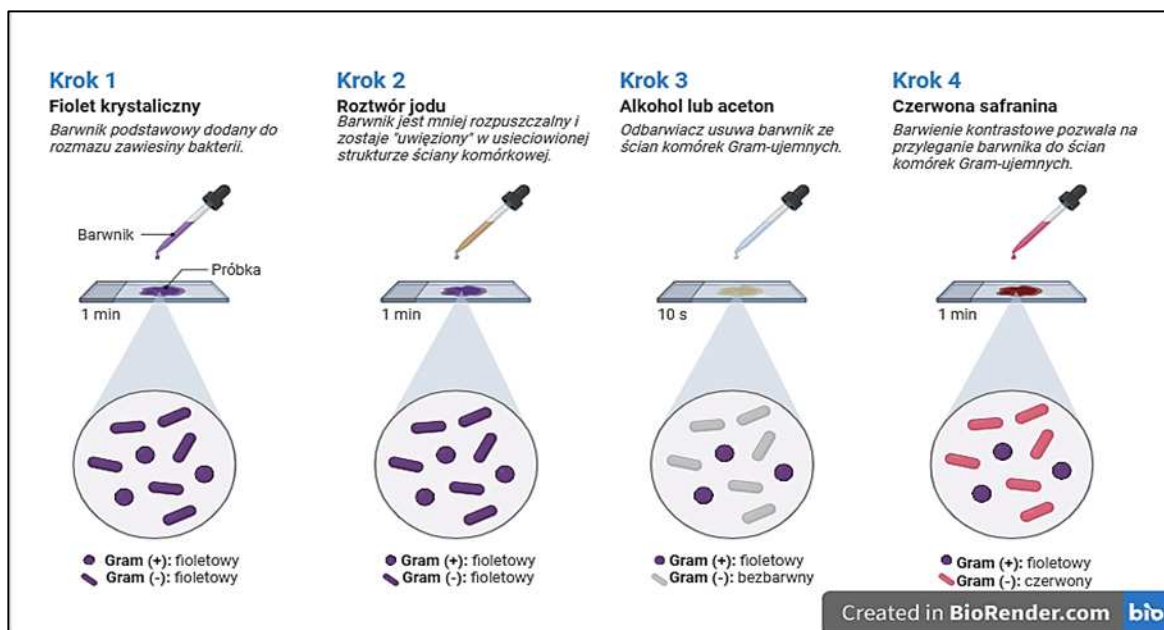
Ryc. 4. Różnice pomiędzy bakteriami: a. G (-) i b. G (+)

<https://app.biorender.com/illustrations/686c20542cc776c057cec695> – modyfikacja autora

Liczba warstw peptydoglikanu oraz pozostałe składniki ściany komórkowej są podstawą do podziału bakterii na dwie grupy Gram-dodatnich (G+) i Gram-ujemnych (G-). Bakterie Gram(+) charakteryzują się grubą (150–500Å) ścianą komórkową, która składa się głównie z wielowarstwowego peptydoglikanu otaczającego błonę cytoplazmatyczną. W przeciwieństwie do bakterii Gram(+), bakterie Gram(-) poza cienką warstwą peptydoglikanu (stanowiącej 5–10% masy całej ściany komórkowej) są dodatkowo otoczone błoną zewnętrzną, która stanowi unikatową dla tego typu bakterii strukturę. Różnice pomiędzy tymi grupami bakterii mają znaczenie w mikrobiologii

klinicznej i są wykorzystywane w metodzie opisanej przez duńskiego lekarza Chrystiana Grama a znanej jako barwienie Grama. Barwienie Grama jest szybką, wiarygodną i prostą metodą. Jej wykonanie zajmuje ok. 10 minut.

Ze względu strukturę i różnice w budowie pomiędzy grupami bakterii, ściana komórkowa jest najważniejszym elementem diagnostycznym oraz decydującym o doborze terapii. Bakterie Gram (-), w metodzie Grama, barwią się na kolor różowy lub czerwony, natomiast bakterie z grupy Gram (+) na kolor fioletowy. W barwieniu Grama fiolet krystaliczny z jodem tworzy duże kompleksy i zostaje zatrzymany w grubej warstwie peptydoglikanu. Aceton używany w następnym etapie, niszczy zewnętrzną błonę bakterii Gram (-) i wymywa kryształki fioletu z cienkiej warstwy peptydoglikanowej.



Ryc. 5. Schemat barwienia Grama; utworzono w BioRender.com

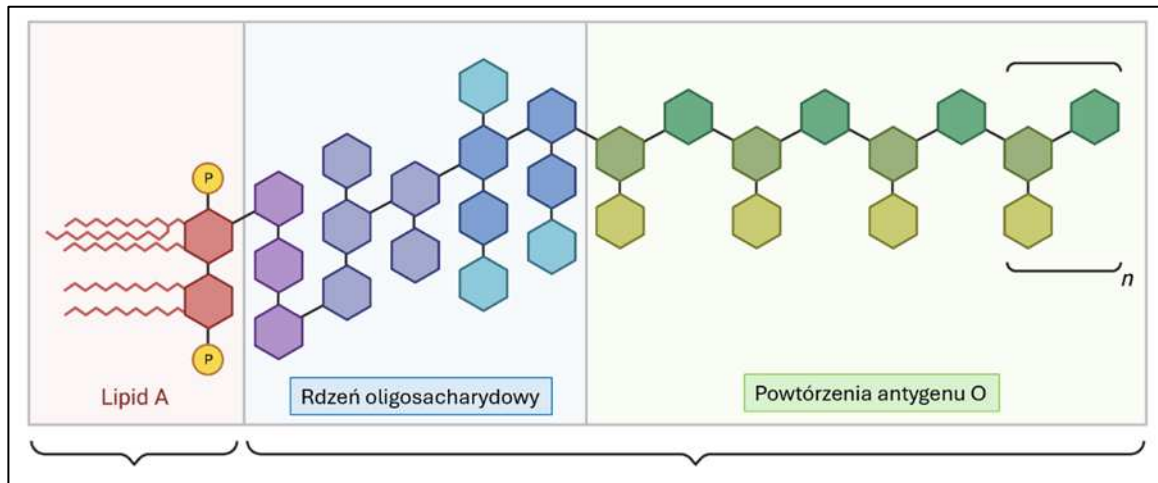
Bakterie Gram (-) zostają zabarwione przez drugi barwnik, jakim jest czerwona safranina. W języku angielskim funkcjonuje określenie "P-Purple-Positive", czyli fioletowy – dodatnie, który ułatwia zapamiętanie wyników barwienia w metodzie Grama.

Różnice w budowie ściany komórkowej bakterii mają wpływ także na mechanizmy chorobotwórczości oraz odporność na terapie antybiotykowe. Bakterie Gram (-) z powodu złożonej struktury ściany komórkowej, są bardziej odporne poprzez utrudniony dostęp leków, jak i zdolność do aktywnej neutralizacji antybiotyków. Zewnętrzna błona komórkowa tych bakterii stanowi bowiem fizyczną barierę ograniczającą transport dużych hydrofobowych cząsteczek a obecne w błonie poryny utrzymują selektywny transport związków. Dodatkowo pomiędzy błoną zewnętrzną a błoną cytoplazmatyczną znajduje się przestrzeń peryplazmatyczna. W przestrzeni peryplazmatycznej bakterii Gram(-) znajdują się enzymy – β -laktamazy, które rozkładają antybiotyki β -laktamowe (np. penicyliny, cefalosporyny). Istotną rolę w połączeniu obu części błony odgrywają dwuwartościowe kationy magnezu i wapnia. Dlatego środki chelatujące jak np. kwas etylenodiaminotetraoctowy – EDTA lub niektóre antybiotyki (polimyksyny) mają zdolność przerwania ciągłości błony zewnętrznej. Specyficzna część zewnętrzna błony komórkowej składa się głównie z lipopolisacharydu (LPS). LPS jest uwalniany, gdy bakteria obumiera lub ulega rozpadowi (np. podczas leczenia antybiotykami), intensywnie stymuluje wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną, dlatego określany jest jako endotoksyna. W organizmie aktywuje limfocyty B, makrofagi, komórki dendrytyczne, co skutkuje uwolnieniem wielu niespecyficznych markerów stanu zapalnego, takich jak interleukina (IL-1, IL-6) czy czynniki martwicy nowotworów (TNF). Uwolnienie dużych ilości endotoksyny do krwioobiegu prowadzi do reakcji rozsianej koagulacji wewnątrznacyniowej (reakcja Shwartzmana) i wstrząsu septycznego, niewydolności narządowej a nawet śmierci.

W skład cząsteczki LPS wchodzi trzy podjednostki:

- lipid A
- polisacharydowy rdzeń
- antygen O

Lipid A ma najistotniejsze znaczenie dla przeżycia bakterii oraz determinuje aktywność endotoksyczną. Jego szkielet składa się z ufosforylowanych disacharydów glukozaminowych oraz z kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe umożliwiają zakotwiczenie w błonie, a fosforany łączą jednostki LPS w agregaty. Rdzeń składa się z 9–12 cząsteczek cukrów.



Ryc. 6. Schemat budowy jednostki LPS. Obraz zmodyfikowany z BioRender.com

Do rdzenia przymocowany jest również antygen O wychodzący na zewnątrz komórki. Antygen O pod względem chemicznym jest liniowym polisacharydem zbudowanym z ok. 50–100 cukrów. Im krótszy łańcuch antygeny O (np. w rodzaju *Neisseria*), tym wyższa wrażliwość bakterii na składniki układu dopełniacza. Ponadto cukry w łańcuchu bocznym determinują różnice antygenowe. Endotoksyny bakteryjne są stosowane jako podstawowy induktor stanu zapalnego w warunkach *in vitro*.

W skład ściany komórkowej bakterii Gram (+) poza peptydoglikanem wchodzi związane kowalencyjnie kwasy tejchojowe i lipotejchojowe oraz złożone wielocukry (tzw. wielocukry C). Kwasy tejchojowe są polimerami fosforanów polioli (np. glicerolu) o charakterze anionowym, natomiast kwasy lipotejchojowe posiadają resztę kwasu tłuszczowego zakotwiczoną w błonie cytoplazmatycznej. Są one antygenami powierzchniowymi wykrywanymi przez

specyficzne przeciwciała. Dzięki temu jest możliwa identyfikacja serotypu bakteryjnego. Kwasy tejchojowe i lipotejchojowe nie występują w ścianie bakterii Gram(-).

Tabela 2. Elementy tworzące zewnętrzną ochronę komórek bakterii Gram (-) i ich funkcje

| Warstwa | Skład | Funkcja |
|-------------------------------------|---|--|
| Błona zewnętrzna | Lipidy, fosfolipidy, białka (np. poryny), LPS | Bariera dla antybiotyków, odporność chemiczna, immunogenność |
| LPS (lipopolisacharyd) | Lipid A (toksyczny), rdzeń cukrowy, | Działa jako endotoksyna → gorączka, wstrząs |
| Peptydoglikan | Cienka warstwa między błonami | Ochrona mechaniczna, zachowanie kształtu |
| Przestrzeń peryplazmatyczna | Enzymy (β -laktamazy), transportery | Degradacja leków, detoksykacja |
| Błona cytoplazmatyczna (wewnętrzna) | Fosfolipidy, białka | Transport, synteza ATP |

Bakteryjna błona cytoplazmatyczna – to półprzepuszczalna bariera, uczestniczy w oddychaniu i transporcie. Od wewnątrz w skład błony wchodzi aktynopodobne filamenty utrzymujące kształt bakterii i wytwarzające ścianę poprzeczną podczas podziału komórkowego.

Cytoplazma – z rybosomami i nukleoidem (DNA), w którym zlokalizowany jest chromosom bakteryjny występujący w postaci pojedynczej, dwuniciowej struktury kolistej. W cytoplazmie bakterii występują plazmidy, czyli małe, koliste, pozachromosomalne struktury DNA, obecne głównie u bakterii Gram-ujemnych. Bakterie nie mają histonów ani uformowanych nukleosomów.

Rybosom bakteryjny (70S) – zbudowany jest z dwóch jednostek o masie sedymentacji 30S i 50S, jest celem leków przeciwbakteryjnych.

Struktury powierzchniowe – jak rzęski, fimbrie, otoczki – często związane z chorobotwórczością (wirulencją):

- Rzęski przypominają bicz o średnicy 15–20 nm, są zbudowane z helikalnie skręconych podjednostek białkowych zwanych flagelinami, które są napędzane siłą potencjału błonowego. Dzięki zakotwiczeniu za pomocą ciałka

podstawowego, rzęski umożliwiają ruch komórki w kierunku składników odżywczych (chemotaksja) i oddalanie od czynników toksycznych

- Fimbrie (pili, syn. adhezyny) – rodzaj włókien zbudowanych z białka – piliny, mają średnicę 3–8 nm, a przy tym mogą osiągać długość przekraczającą długość komórki (15–20 μm). Pili umożliwiają adhezję do innych komórek bakteryjnych lub komórek gospodarza, a także wymianę fragmentów bakteryjnych chromosomów

Przetrwalniki są formami bakterii w stanie uśpienia, które powstają w niesprzyjających warunkach środowiskowych (podwyższona temperatura, promieniowanie, środki chemiczne) z komórek w stanie wegetatywnym. Często są charakterystycznie zlokalizowane w komórce, co pozwala na identyfikację szczepu. Przetrwalniki są odwodnionymi strukturami, w których znajdują się:

- kompletna kopia chromosomu
- minimalna ilość białek i rybosomów
- wysokie stężenie jonów wapnia
- błona wewnętrzna
- dwie warstwy peptydoglikanowe
- otoczka zewnętrzna zawierająca białko podobne do keratyny

W obrazie mikroskopowym od przetrwalników odbija się światło, dlatego widać je jako jasne elementy.

Wirulencja bakterii (inaczej: zjadliwość) to zdolność do wywoływania choroby u gospodarza. Im wyższa wirulencja, tym bakteria jest bardziej agresywna, łatwiej pokonuje mechanizmy obronne organizmu i wywołuje cięższe objawy infekcji.

Wirulencja zależy od obecności tzw. **czynników wirulencji**, które:

- pomagają bakteriom przylegać do komórek gospodarza
- unikać czynników układu odpornościowego
- uszkadzać tkanki lub wytwarzać toksyny

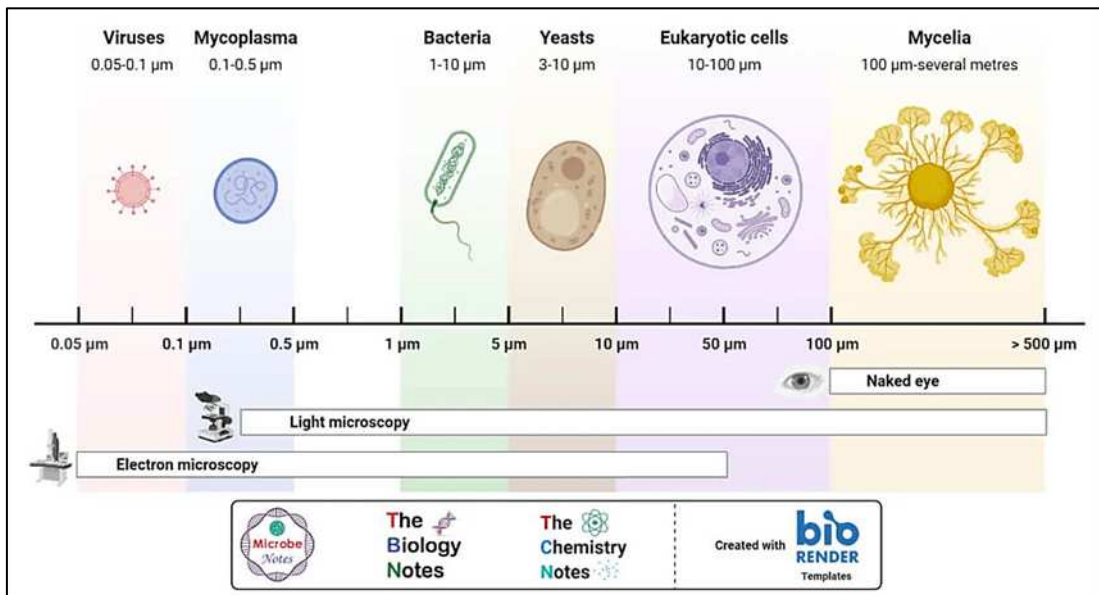
Wirulencję można mierzyć np. jako **LD₅₀** (dawka śmiertelna dla 50% zakażonych zwierząt). Im niższe LD₅₀, tym wyższa wirulencja.

Tabela 3. Mechanizm działania poszczególnych czynników wirulencji

| Czynnik wirulencji | Funkcja wirulencyjna | Przykład |
|----------------------------------|--|---|
| Otoczka | Chroni przed fagocytozą | <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| Fimbrie (pile adhezyjne) | Umożliwiają przyczepianie się do nabłonka | <i>E. coli</i> |
| Rzęski (flagella) | Ruchliwość – kolonizacja i penetracja tkanek | <i>Helicobacter pylori</i> |
| Toksyny (np. LPS, egzotoksyny) | Uszkadzają komórki gospodarza | <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Vibrio cholerae</i> |
| Enzymy (proteazy, kolagenazy) | Niszczące bariery tkankowej | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| Peptydoglikan i kwasy teichojowe | Działanie prozapalne | <i>Staphylococcus aureus</i> |

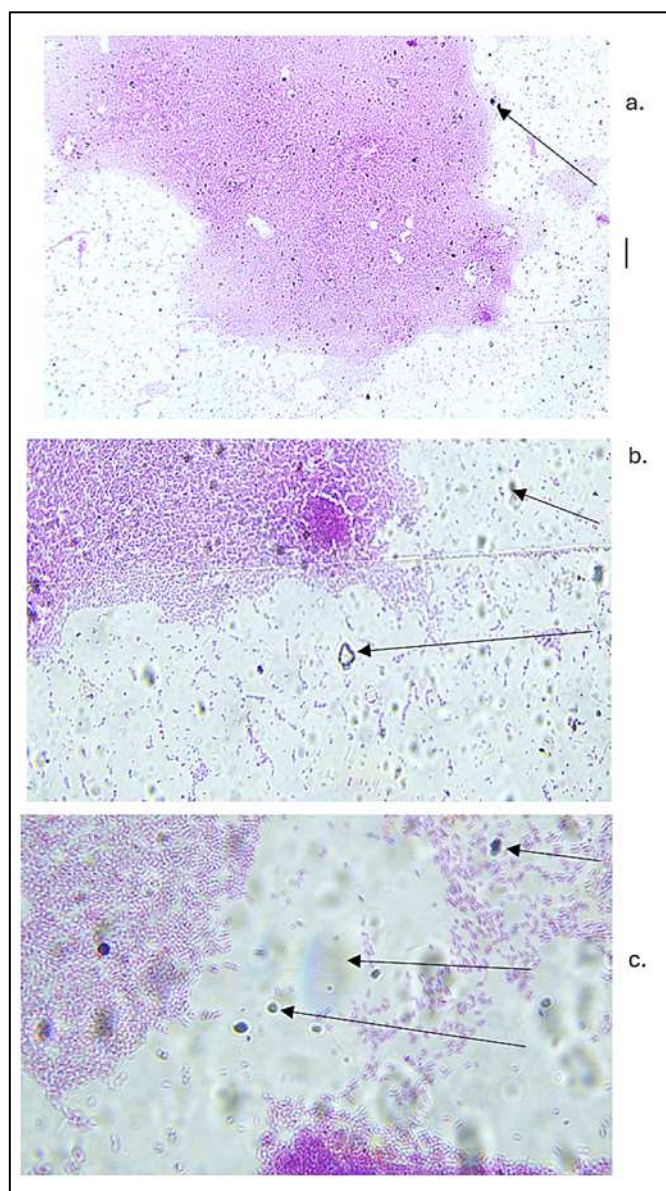
Obserwacja preparatów stałych i dokumentacja

Większość bakterii ma średnicę od 0,2 do 2,0 μm i długość od 2 do 8 μm . Miarą używaną dla mikroorganizmów jest mikrometr (μm); 1 μm = 0,001 milimetra; 1 nanometr (nm) = 0,001 μm . Dlatego podczas obserwacji bakterii będziemy używać największego powiększenia mikroskopu ustawiając obiektyw 100 \times .



Ryc. 7. Porównanie wielkości wirusów, bakterii, drożdży i komórek człowieka
<https://microbeonline.com/size-of-bacteria/>

W obserwacji preparatów pod mikroskopem pewnych trudności dostarczają artefakty. Artefakty mikroskopowe to struktury lub zakłócenia, które nie są częścią obserwowanego preparatu biologicznego, ale mogą być błędnie zinterpretowane jako elementy komórkowe. Powstają one zazwyczaj w wyniku błędów podczas przygotowywania preparatu, nieprawidłowego użytkowania mikroskopu lub zanieczyszczeń.



Ryc. 8. Pałeczka duru (*Salmonella Typhi*) – różne powiększenia: a. 120×; b. 480×; c. 1200×. Strzałki wskazują obecne w polu widzenia artefakty

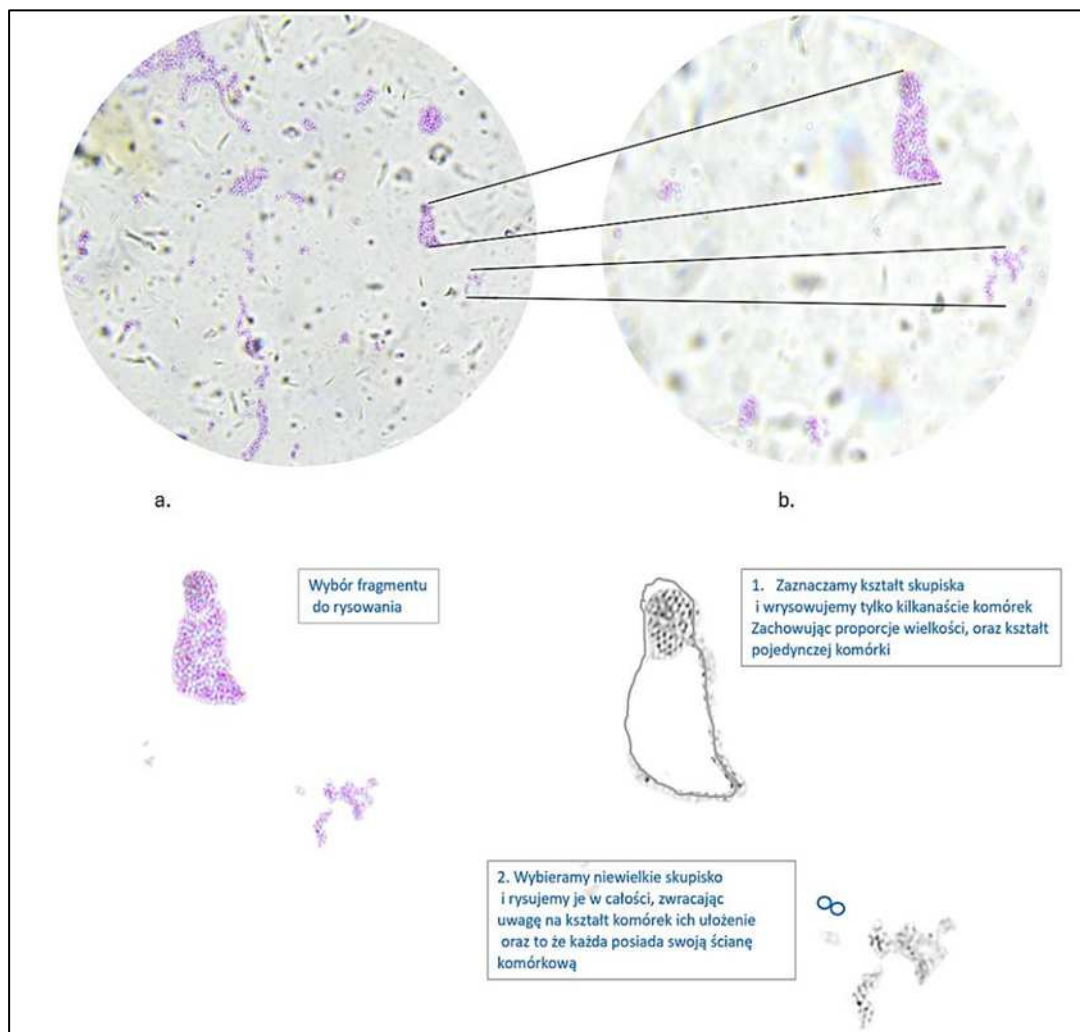
Na rycinie 8, pokazano zdjęcia preparatu pałeczki duru w 3 różnych powiększeniach. Możemy zaobserwować, że obecne artefakty utrudniają obserwację szczególnie przy największym powiększeniu. Dlatego w obserwacjach mikroskopowych bardzo ważne jest odróżnienie obecnych w polu widzenia zakłóceń od właściwego obrazu oraz dokładne przygotowanie preparatu.

Podczas obserwacji preparatów należy zwracać uwagę na: kształt komórek (ziarenkowce, pałeczki), ułożenie (łańcuszki, skupiska, pojedynczo) oraz wielkość

i proporcje. Formą zapisu danych z obserwacji jest rysunek. Pozwala on utrwalić obserwację, pomaga odróżnić istotne struktury od artefaktów (ponieważ zmusza do uważnej analizy obrazu), uczy rozpoznawania cech diagnostycznych, takich jak: kształt bakterii, sposób ułożenia, obecność przetrwalników.

Dlatego dokumentacja rysunkowa powinna być wykonana zgodnie z regułami rysunku biologicznego:

- schematycznie i proporcjonalnie
- z odpowiednimi podpisami: nazwa preparatu, powiększenie, pod którym dokonano obserwacji, zaobserwowane struktury
- wiernie oddający obserwowane cechy



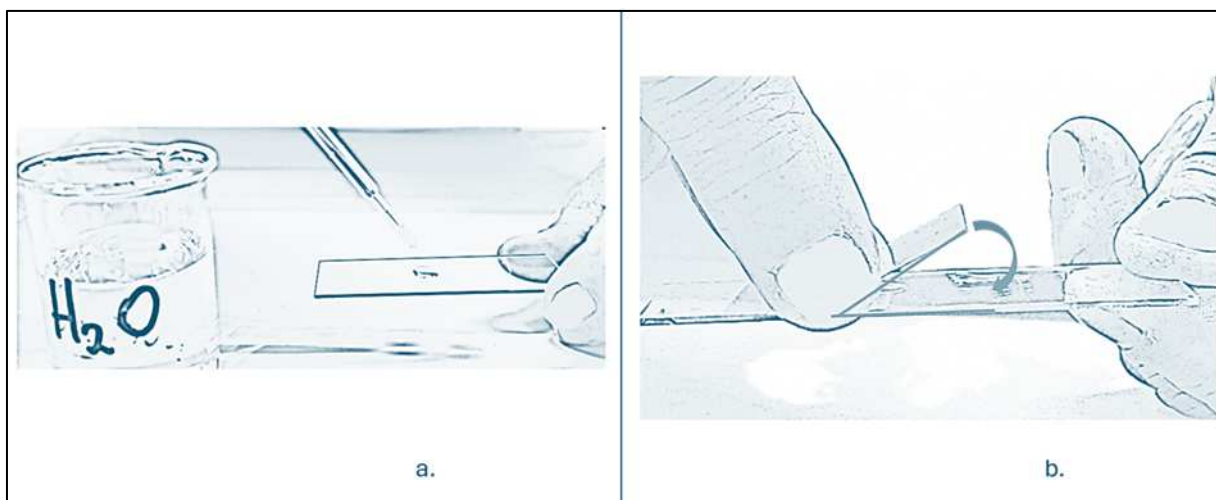
Ryc. 9. Instrukcja wykonania rysunku obrazu oglądanego pod mikroskopem

Rysuj tylko to, co faktycznie widzisz, unikaj dodawania struktur,
które są tylko domniemane ☹️

Analiza składu gatunkowego i morfologii bakterii występujących w probiotykach

Preparaty przyżyciowe należy przygotować według poniższej instrukcji.

1. Na szkiełko podstawowe nanieś kroplę wody
2. W kropli rozprowadź roztwór zawierający bakterie probiotyczne
3. Przyłóż szkiełko nakrywkowe i nakryj kroplę zmniejszając kąt nachylenia szkiełka, uważając, aby nie uwięzić pod szkiełkiem pęcherzyków powietrza



Ryc. 10. Etapy przygotowania preparatu w kropli spłaszczonej

Rozdział 2.

Budowa i funkcje tkanek zwierzęcych – analiza mikroskopowa

Cel ćwiczeń:

- Ocena struktury, kształtu, wielkości i wzajemnego układu komórek w wybranych tkankach zwierzęcych
- Utrwalenie wiadomości o budowie i funkcjach tkanek: nabłonkowej, mięśniowej, łącznej właściwej, tłuszczowej, chrzęstnej, kostnej i nerwowej
- Analiza struktury tkanek wpływającej na ich funkcję

W organizmie człowieka są setki różnych komórek, różniących się rozmieszczeniem, wielkością, kształtem, budową i funkcją. Skrawki tkanki oglądane pod mikroskopem będą wyglądały inaczej w zależności od sposobu ich przygotowania (barwienia, cięcia) oraz powiększenia.

Ludzki narząd wzroku jest wrażliwy na zmiany intensywności i częstotliwości światła, dlatego bez odpowiedniego barwienia nie ma możliwości zobrazowania poszczególnych struktur komórkowych oglądanych pod mikroskopem świetlnym.

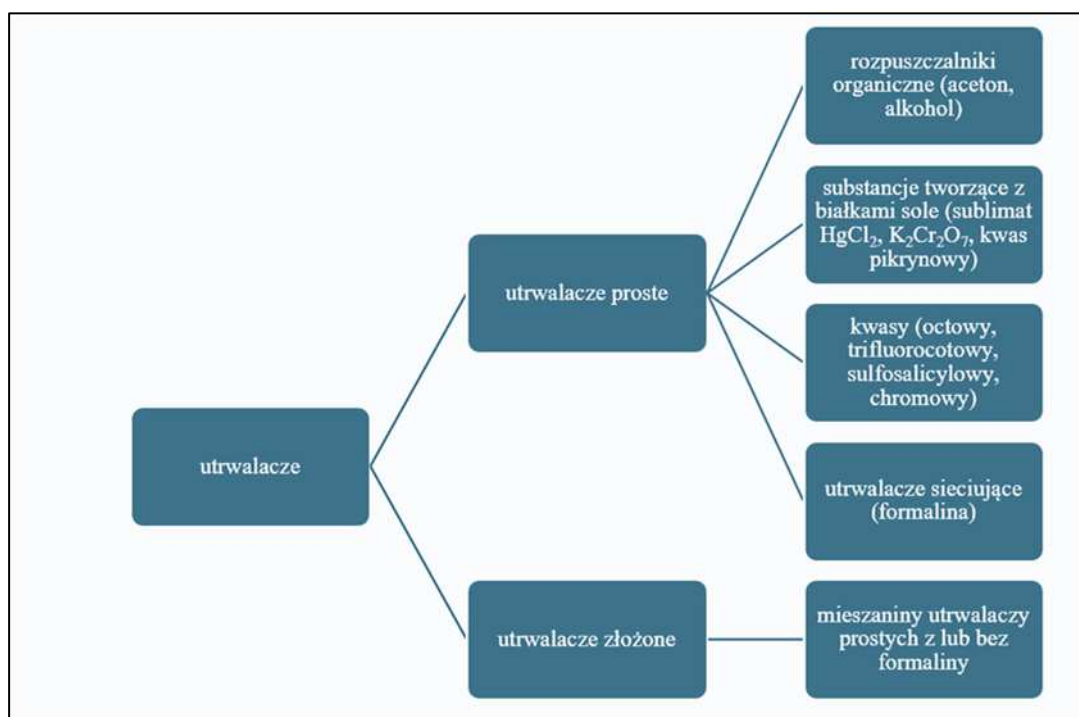
Techniki przygotowywania preparatów mikroskopowych

Tkanki przeznaczone do badania histologicznego utrwalą się natychmiast po pobraniu. Utrwalanie ma na celu zdenaturowanie lub wytrącenie białek, a także unieczynnienie enzymów. W przeciwnym przypadku następuje proces autolizy, czyli samostrawienia, spowodowany aktywnością enzymów hydrolitycznych i proteolitycznych. Pobrany wycinek tkanki powinien być odpowiedniej wielkości i grubości, aby utrwalacz szybko i równomiernie

penetrował tkankę. Natomiast stosowane metody utrwalania nie utrwalają lipidów. Działanie utrwalaczy polega na:

- odwodnieniu tkanek i usunięciu substancji tłuszczowych
- tworzeniu soli i utwardzeniu tkanek
- obniżeniu pH i zmianie stopnia uwodnienia białek, ich żelowaniu i wytrącaniu
- usieciowaniu białek

W efekcie materiał zostaje utrwalony bez naruszenia jego struktury i częściowe zachowanie treści komórkowej.



Ryc. 1. Klasyfikacja utrwalaczy

Formalina – wodny roztwór formaldehydu, jest utrwalaczem uniwersalnym. Proces utrwalania polega na utworzeniu struktury sieciowej między cząsteczkami białka z preparatu oraz mostków metylowych między formaldehydem a tymi białkami. Formalina dobrze utrwała jądra komórkowe i cytoplazmę oraz tkanki bez nadmiernego obkurczania oraz optymalnie je utwardza w zależności od czasu i zastosowanego stężenia.

Alkohol absolutny (spirytus bezwodny, tj. o niewielkiej zawartości wody <0,2%) pozwala na szybkie utrwalenie, zmienia strukturę tkanek na skutek odwodnienia, a także rozpuszcza cukry. Podobne działanie wykazuje etanol 95%, który jest używany wraz z formaliną czy lodowatym kwasem octowym (kwas octowy o stężeniu 99,5%). Ten ostatni może być wykorzystywany w badaniach morfologicznych składników komórkowych, np. jądra komórkowego.

Innymi metodami utrwalania są:

- liofilizacja tkanek (odwadnianie gwałtownie zamrożonych tkanek w próżni poprzez sublimację kryształków lodu)
- mrożenie tkanek (tworzenie dużych kryształów lodu, które rozrywają komórki)

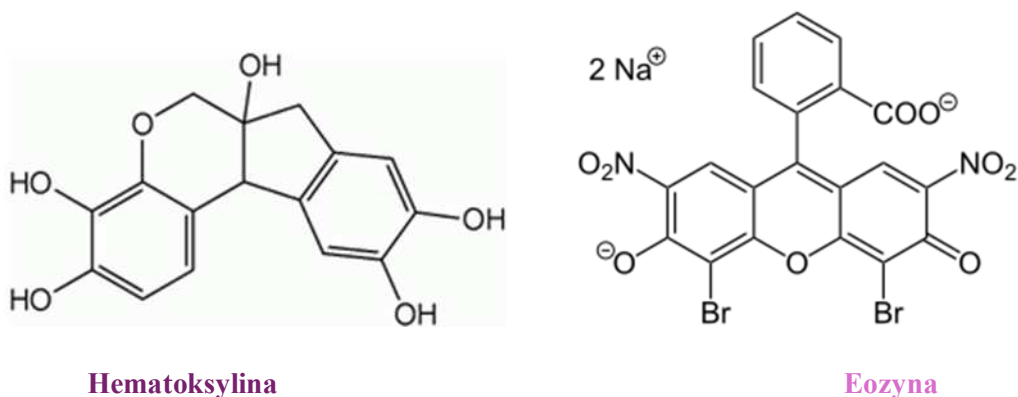
Środowisko, w którym zanurzony jest badany materiał ma istotne znaczenie dla prześwietlenia, czyli rozjaśnienia preparatu. Możliwe jest to dzięki zmianom warunków fizycznych związanych z wysokim współczynnikiem załamania światła lub działania chemicznego, które pozwala na rozpuszczenie niektórych składników w preparacie lub też odbarwienie.

Odczynniki, które poprzez działanie chemiczne umożliwiają obserwację cienkich, przejrzystych tkanek nazywane są prześwietlaczami. Woda jako prześwietlacz jest cieczą obojętną, w której zostają zachowane kształt, wielkość, struktura i barwa tkanek. Innym przykładem prześwietlacza jest roztwór wodzianu chloralu, który z kolei szybko przenika przez tkanki, wypiera powietrze, rozpulchnia i rozjaśnia tkanki ciemno zabarwione, a także rozpuszcza ziarna skrobi czy białka; tłuszcze najpierw zbierają się w krople, a następnie rozpuszczają się; nie rozpuszcza kryształów, np. szczawianu wapnia.

Analiza struktur komórkowych, przy użyciu mikroskopu

Bez odpowiedniego barwienia nie ma możliwości zobrazowania poszczególnych struktur komórkowych oglądanych pod mikroskopem świetlnym. Odpowiedni dobór barwników oraz ich selektywna absorpcja przez poszczególne struktury

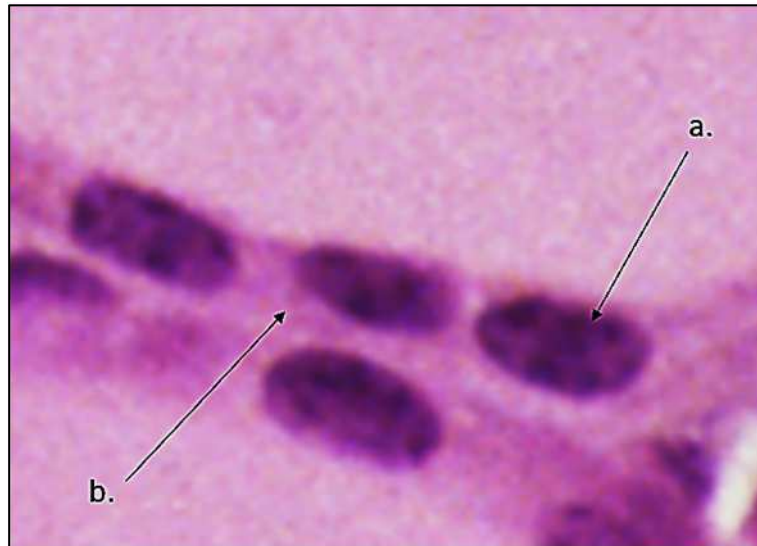
komórkowe umożliwia uwidocznienie charakterystycznych elementów komórki. W typowym barwieniu histologicznym używane są 2 barwniki o różnych właściwościach: hematoksylina (H – barwiąca struktury na kolor fioletowy) i eozyna (E – barwiąca na kolory od czerwonego do różowego).



Ryc. 2. Struktury chemiczne hematoksyliny i eozyny

W środowisku wodnym związki te dysocjują. W zależności od oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy jonami barwnika, a strukturami komórki, struktury te, uzyskują odpowiednie zabarwienie. Fioletowe, jeśli oddziałują z kompleksami hematoksyliny (charakter zasadowy) i różowe z anionami eozyny (charakter kwasowy). Struktury komórki barwiące się hematoksyliną określane są jako zasadochłonne (bazofilne) a barwiące się eozyną kwasochłonne (eozynofilne). Obserwowane na preparacie zabarwienie struktur komórkowych dostarcza informacji o chemicznej naturze budujących je związków oraz pozwala na rozróżnienie poszczególnych organelli komórkowych.

Jądro komórkowe barwi się, przy udziale hematoksyliny na kolor niebiesko-fioletowy, ze względu na zawartość kwasów nukleinowych z ujemnie naładowanymi resztami kwasu fosforowego. Natomiast cytoplazma, ze względu na obecność białek obdarzonych ładunkiem dodatnim, oddziałujących z anionami eozyny barwi się na kolor różowy.



Ryc. 3. Fot. Komórki nabłonka sześciennego tarczycy – widać wybarwione na kolor fioletowy jądro komórkowe – a, oraz różowo zabarwioną cytoplazmę – b. Powiększenie $\times 480$

Do przeprowadzania reakcji mikrochemicznych, które pozwalają na wykrycie specyficznych związków chemicznych obecnych w tkankach czy, np. w u postaciowanych elementach moczu, stosowane są m.in. odczynniki, takie jak:

Płyn Lugola (wodny roztwór jodu w KI) – ziarna skrobi przyjmują zabarwienie niebieskofioletowe,

Jodyna (roztwór jodu, zwykle 1–3%, w stężonym etanolu 90° z dodatkiem KI jako środka stabilizującego) – barwi glikogen na kolor ciemnobrązowy.

Sudan III, Sudan IV – barwią krople tłuszczu na kolor pomarańczowoczerwony, czerwony lub różowy,

Safranina – barwi struktury komórkowe i ich składniki, w barwieniu Grama pełni rolę barwnika kontrastowego, pozwalającego na zróżnicowanie bakterii Gram (+) i Gram (-),

Fiolet krystaliczny – umożliwia obserwację struktur komórkowych, w metodzie Grama służy do różnicowania bakterii,

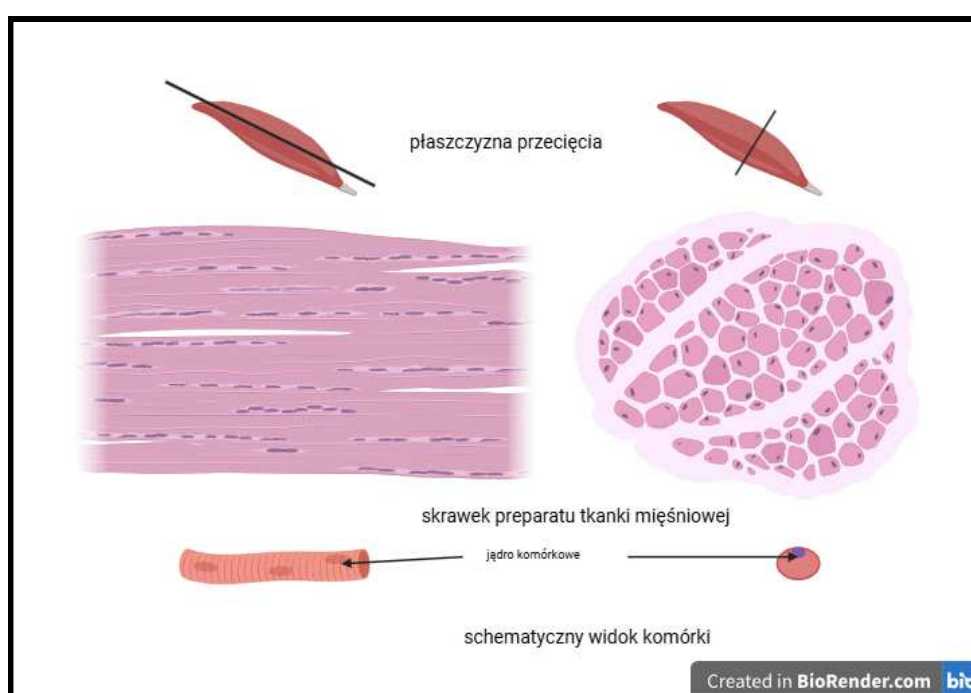
Błękit metylenowy – barwi śluzę na niebiesko, wybiórczo barwi jądra komórkowe i inne elementy komórkowe,

Czerwień obojętna – barwi śluz na różowo, służy do barwienia tkanek w sposób zróżnicowany w zależności od pH,

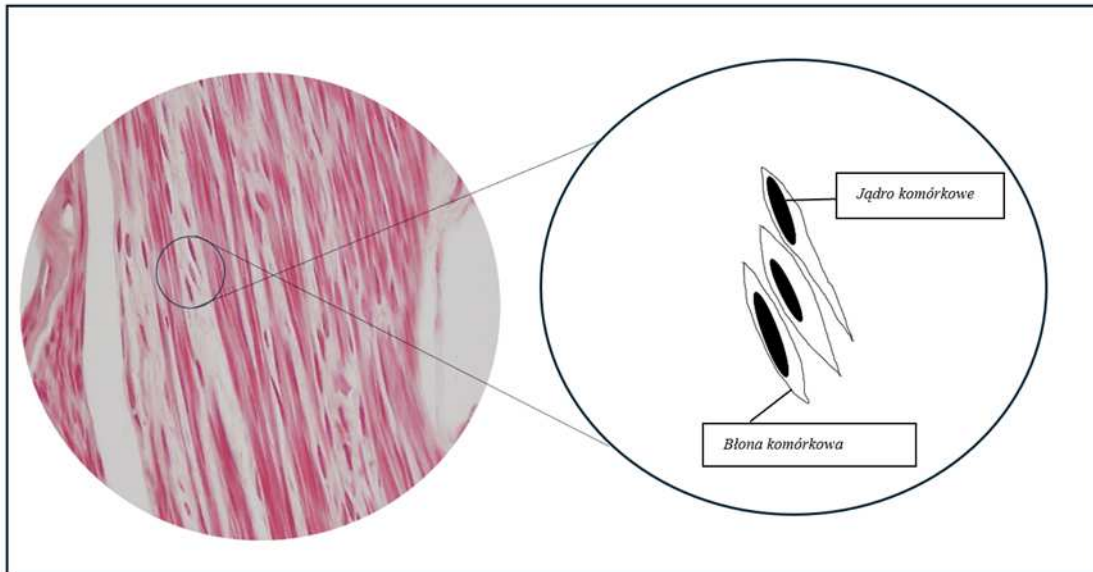
Barwnik Sedi-Stain – różnicuje komórki żywe od martwych, uwidacznia ziarnistości w komórkach, zwłaszcza w leukocytach (metoda Sternheimera-Malbina).

Trudnością w interpretacji pod mikroskopem obrazu jest obserwacja tylko skrawka tkanki. Przygotowanie preparatu, jego grubość oraz sposób cięcia mają wpływ na różnice w wyglądzie komórek oglądanych pod mikroskopem.

Doskonałym sposobem analizy obserwowanego pod mikroskopem preparatu jest wykonanie rysunku. Jest on nie tylko dokumentacją obrazu, ale także daje możliwość ujęcia wszystkich charakterystycznych elementów tkanki, zrozumienia wzajemnego ułożenia komórek w narządzie, czyli przeniesienie dwuwymiarowego obrazu mikroskopowego na trójwymiarową rzeczywistość.



Ryc. 4. Różnice w wyglądzie preparatu oraz komórek tkanki mięśniowej szkieletowej wynikające z różnego sposobu przygotowania preparatu



Ryc. 5. Dokumentacja rysunkowa preparatu tkanki mięśnia gładkiego z uwzględnieniem cech charakterystycznych: kształtu komórek i jądra komórkowego

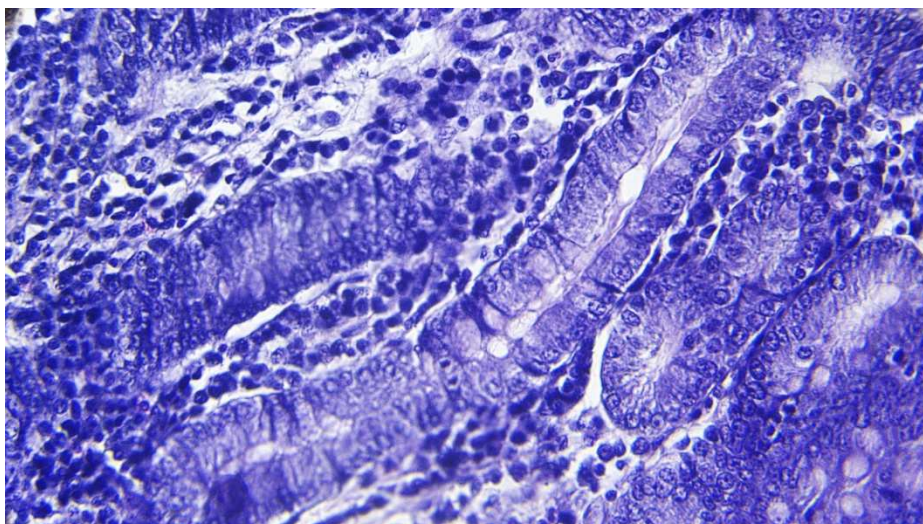
Budowa i funkcje tkanek

Tkanka – wyspecjalizowane grupy komórek występujące u organizmów wyższych, przystosowane do pełnienia określonej funkcji, zależne od innych tkanek. Grupy tkanek są wzajemnie połączone tworząc narządy. W organizmie ludzkim występują cztery podstawowe tkanki: nabłonkowa, łączna, nerwowa i mięśniowa.

Tkanka nabłonkowa

Tkanka nabłonkowa (epithelium) stanowi jedną z podstawowych tkanek organizmu człowieka i odgrywa kluczową rolę w:

- tworzeniu zewnętrznej pokrywy ciała i ochronie przed wpływem środowiska zewnętrznego (naskórek),
- wyściełaniu jam i narządów wewnętrznych,
- wydzielaniu (sekrecja) związków chemicznych, hormonów, enzymów (nabłonek gruczołowy),
- wchłanianiu (absorpcja) i transporcie składników odżywczych,



Ryc. 6. Nabłonek walcowaty jelita. Obraz pod mikroskopem 480×

Komórki tkanki nabłonkowej są ściśle ułożone, tworząc zwarte warstwy oddzielone od leżących poniżej tkanek łącznych cienką błoną podstawną (basal lamina), która pełni funkcję podporową i filtracyjną. Charakterystyczną cechą jest brak lub niewielka ilość substancji międzykomórkowej. Powierzchnia komórek nabłonkowych pokryta jest różnej grubości glikokaliksem zbudowanym z białek i polisacharydów. W zależności od funkcji, powierzchnia komórek może być wyposażona w specjalne aparaty, takie jak mikrokosmki, rzęski lub stereocilia. Ponadto dzięki wyspecjalizowanym strukturom możliwe są ściśle połączenia między przylegającymi komórkami, z błoną podstawną, a także funkcjonalna komunikacja międzykomórkowa. Połączenia zamykające (ściśle *tight junctions*) znajdują się w górnych częściach komórek, wzdłuż ich obwodu. Połączenia zwierające (*adhering junctions*) są bardzo odporne na rozrywanie i umożliwiają łagodzenie skutków działania sił mechanicznych. Przykładem połączeń zwierających są plamki zwierające: desmosomy, łączące sąsiednie komórki ze sobą i hemidesmosomy, łączące komórkę nabłonkową z błoną podstawną. Trzeci typ połączeń między komórkami nabłonka to połączenia komunikujące (*nexus*) pozwalające na wymianę jonów nieorganicznych i cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie. W nabłonkach nie występują naczynia krwionośne,

a zakończenia nerwowe (czuciowe) znajdują się pomiędzy komórkami nabłonka. Odżywianie odbywa się na drodze dyfuzji z naczyń krwionośnych znajdujących się w tkance łącznej.

Tkanki nabłonkowe klasyfikuje się według pełnionej funkcji, liczby warstw komórek oraz kształtu komórek powierzchniowych:

Ze względu na główną funkcję:

- **Nabłonek pokrywający** (wyściełający)
- **Nabłonek gruczołowy**

Ze względu na liczbę warstw:

1. **Nabłonek jednowarstwowy** – zbudowany z pojedynczej warstwy komórek, zwykle pełniący funkcje filtracyjne, resorpcyjne i wydzielnicze;
 - **nabłonek wielorzędowy** – to nabłonek jednowarstwowy zawierający komórki, których jądra znajdują się na różnych wysokościach;
2. **Nabłonek wielowarstwowy** – zbudowany z wielu warstw, zapewnia ochronę mechaniczną.

Ze względu na kształt komórek:

- **Płaski** – komórki szerokie i cienkie (np. śródbłonek, opłucna)
- **Sześcienny** – komórki równej wysokości i szerokości (np. nabłonek kanalików nerkowych)
- **Walcowaty** – komórki wysokie, często z mikrokosmkami lub rzęskami (np. nabłonek jelita cienkiego)

Ze względu na charakter powierzchni:

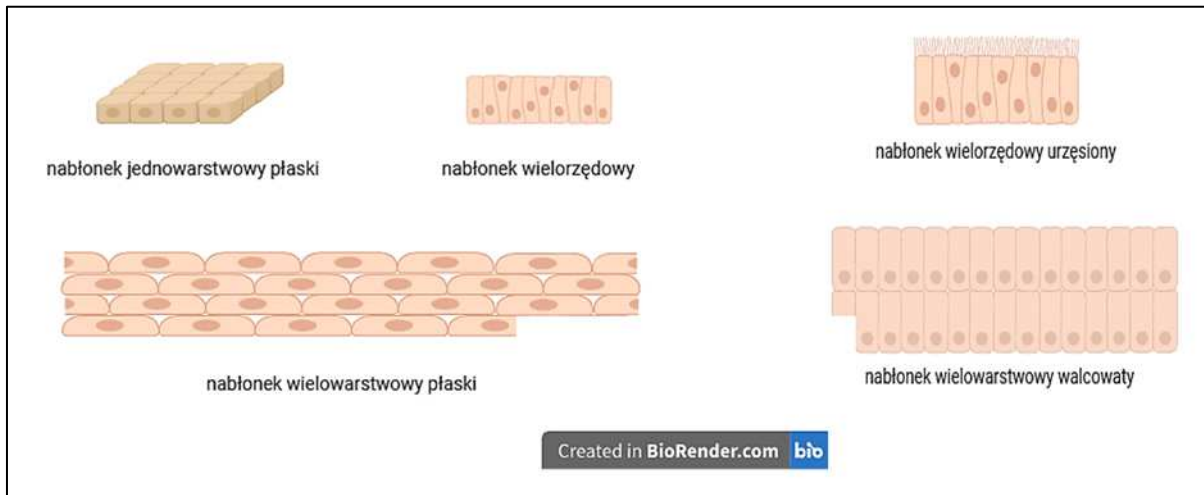
- **Urzęsiony** – na powierzchni komórek nabłonkowych znajdują się rzęski
- **Zrogowaciały** – zewnętrzna warstwa komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego ulega zrogowaceniu

Dodatkowo wyróżnia się:

- **Nabłonek przejściowy** – charakterystyczny dla dróg moczowych, o zmiennym kształcie komórek w zależności od stopnia wypełnienia

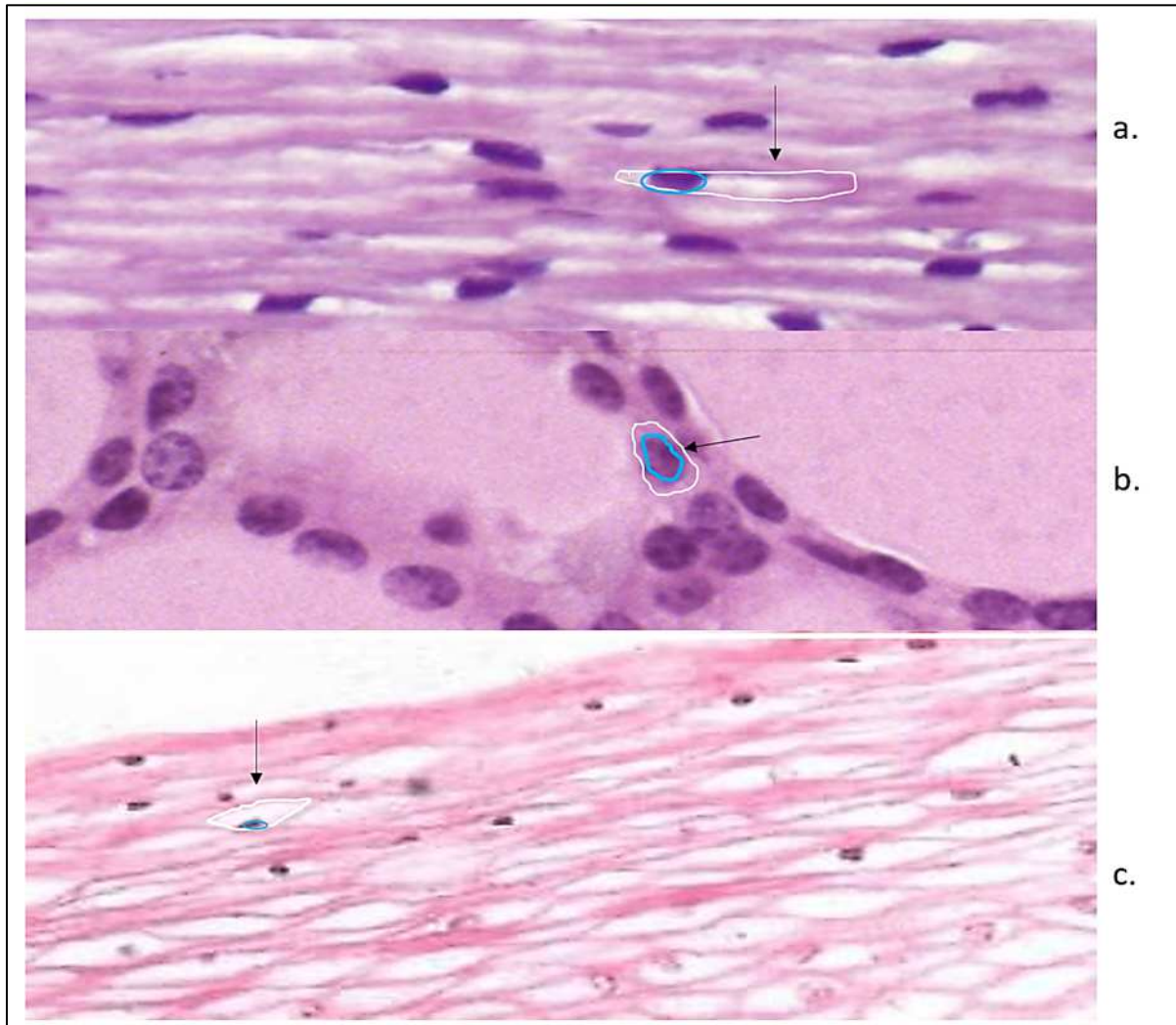
narządu; komórki na powierzchni są duże, sześciennie, często dwujądrowe (tzw. komórkami baldaszkowatymi)

- **Nabłonek wielorzędowy** – wszystkie komórki spoczywają na błonie podstawnej, ale nie wszystkie osiągają powierzchnię (np. nabłonek dróg oddechowych)



Ryc. 7. Rodzaje nabłoneków; utworzone w BioRender.com

Pod mikroskopem świetlnym różne typy nabłonka różnią się liczbą warstw, wysokością komórek i obecnością specjalnych struktur. W barwieniu hematoksyliną i eozyną (H&E) cytoplazma komórek nabłonkowych barwi się na różowo, a jądra, zlokalizowane najczęściej u podstawy komórek, są ciemnoniebieskie. Komórki nabłonka jednowarstwowego walcowatego charakteryzują się wyraźną polaryzacją struktur – siateczka śródplazmatyczna gładka, aparat Golgiego i pęcherzyki wydzielnicze w pobliżu powierzchni komórki, w przeciwieństwie do jądra i mitochondriów zlokalizowanych u podstawy komórki. Komórki nabłonka wielorzędowego leżą na błonie podstawnej, ale nie wszystkie sięgają powierzchni, dlatego jądra komórkowe występują na różnych poziomach.



Ryc. 8. Obraz spod mikroskopu 3 typy tkanki nabłonkowej z zaznaczonymi charakterystycznymi cechami dla funkcji poszczególnych tkanek. Powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe. a. Nabłonek, wielowarstwowy, płaski rogówki – komórki wydłużone, leżą w wielu warstwach ściśle do siebie przylegają, duże, spłaszczone jądro komórkowe, b. nabłonek, jednowarstwowy, sześcienny tarczycy – komórki ściśle przylegają, owalne jądro komórkowe zajmuje prawie całą komórkę, która na przekroju przypomina kształtem kwadrat, c. nabłonek wielowarstwowy skóry – wiele warstw ciasno ułożonych komórek

Występowanie i funkcje tkanki nabłonkowej determinowane są przez cechy budowy.

Tabela 1. Główne rodzaje nabłonek występujących w organizmie ludzkim

| Rodzaj nabłonka | Występowanie | Funkcja |
|--|--|--|
| jednowarstwowy płaski | naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne, pęcherzyki płucne, jamy ciała | transport prostych związków chemicznych, wymiana gazowa, filtracja |
| jednowarstwowy walcowaty | przewód pokarmowy, macica, jajowód | wchłanianie i wydzielanie |
| jednowarstwowy sześcienny | odcinki wydzielnicze wielu gruczołów (np. tarczycy), kanaliki nerkowe | wydzielanie, aktywny transport jonów |
| wielorzędowy (najczęściej rzęskowy) | drogi oddechowe | przemieszczanie śluzu, zanieczyszczeń, patogenów, komórek jajowych, plemników; produkcja śluzu (komórki kubkowe) |
| wielowarstwowy płaski | skóra, rogówka | ochrona |
| wielowarstwowy walcowaty | spojówka oka, przewody wyprowadzające np. ślinianek i gruczołu mlekowego | ochrona |
| gruczołowy | gruczoł tarczycy, ślinianki | wydzielanie |

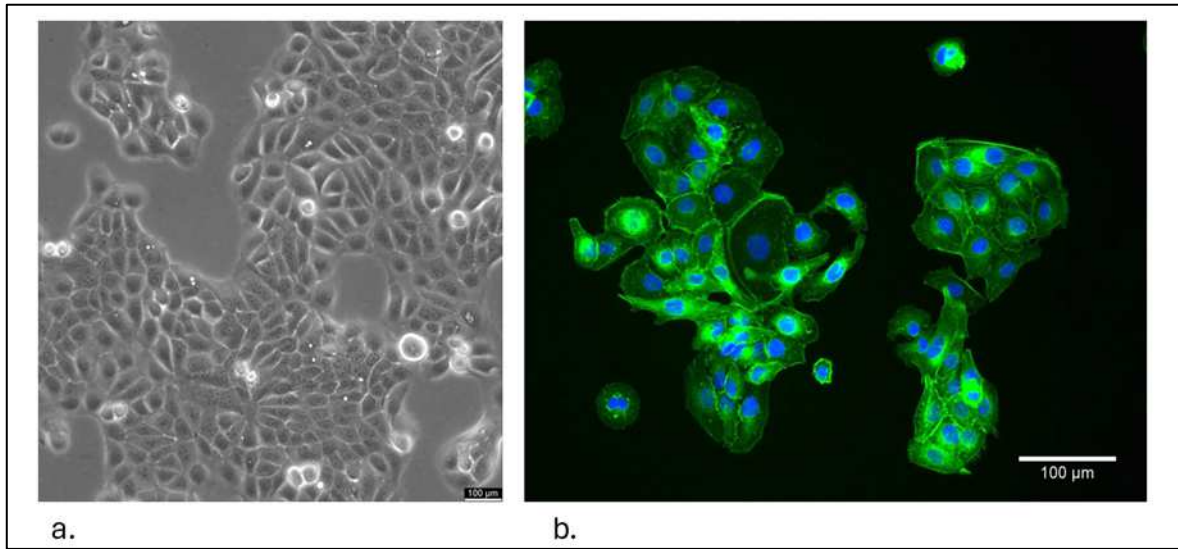
Nabłonkowe linie komórkowe w badaniach naukowych

Komórki nabłonkowe mają dużą zdolność do regeneracji i różnicowania, co znajduje zastosowanie w badaniach nad nowotworzeniem, gojeniem ran i inżynierią tkankową. Zastosowanie linii komórkowych umożliwia również prowadzenie badań toksykologicznych, farmakologicznych, a także testowanie biokompatybilności nowych materiałów i substancji biologicznie czynnych.

W badaniach *in vitro* powszechnie wykorzystuje się ustalone linie komórkowe nabłonkowe, które stanowią cenne narzędzie w modelowaniu procesów fizjologicznych i patologicznych:

- **HaCaT** – linia keratynocytów ludzkiej skóry, wykorzystywana w badaniu starzenia się komórek, produkcji cytokin i profili ekspresji genów związanych ze starzeniem się i chorobami przewlekłymi
- **Caco-2** – ludzkie komórki nabłonka jelita grubego, używane do badania absorpcji leków i toksyn

- **HeLa** – linia wyizolowana w 1951 r. z komórek raka szyjki macicy **Henrietty Lack**, linia nieśmiertelna tj. zdolna do nieskończonych podziałów mitotycznych; najczęściej stosowana w badaniach biologii komórek nowotworowych, komórki tej linii znacznie różnią się od komórek prawidłowych nabłonka szyjki macicy



Ryc. 9. Linia komórkowa HaCaT (Cytion) jako przykład często wykorzystywanej linii komórkowej w badaniach naukowych; a. obraz w mikroskopie stereoskopowym kontrastowo-fazowym, b. obraz w mikroskopie fluorescencyjnym w celu wizualizacji struktur komórkowych; Niebieski kolor – jądra komórkowe przy użyciu DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol), który wiąże się z DNA; Zielony kolor – cytoszkielet (Phalloidyna sprzężona z fluorochromem np. FITC) – wiąże się z filamentami aktynowymi.
<https://www.cytion.com/pl/Komorki-HaCaT/300493>

Tkanka mięśniowa

Tkanka mięśniowa to wysoce wyspecjalizowana tkanka zwierzęca, której główną funkcją jest generowanie siły i ruchu poprzez skurcz. Składa się z komórek mięśniowych (miocytów), które cechują się obecnością miofilamentów: aktyny i miozyny, umożliwiających aktywny skurcz. Tkanka mięśniowa bierze udział nie tylko w ruchach całego ciała, ale także w czynnościach narządów wewnętrznych (np. perystaltyce jelit, skurczu naczyń, czynności skurczowej

serca). Pomiedzy komórkami mięśniowymi występują elementy tkanki łącznej, gdzie docierają naczynia krwionośne, naczynia włosowate oraz nerwy.

Podstawowymi strukturami w komórce mięśniowej (z grec. „*sárx*” ciało, mięśnie) są:

Sarkolemma – błona komórkowa,

Sarkoplazma – cytoplazma,

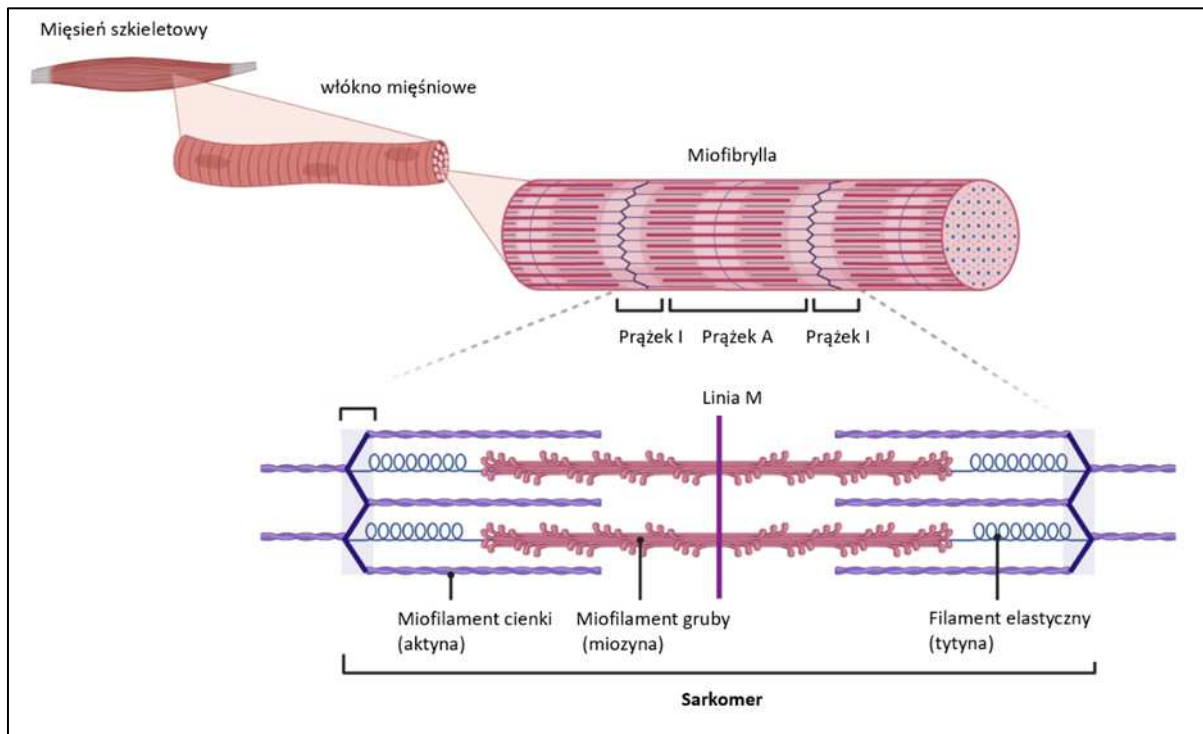
Siateczka sarkoplazmatyczna – gładka siateczka śródplazmatyczna.

Sarkopenia z kolei oznacza zespół charakteryzujący się utratą masy mięśniowej i funkcji mięśni szkieletowych, występujący zwykle u osób powyżej 60 r.ż.

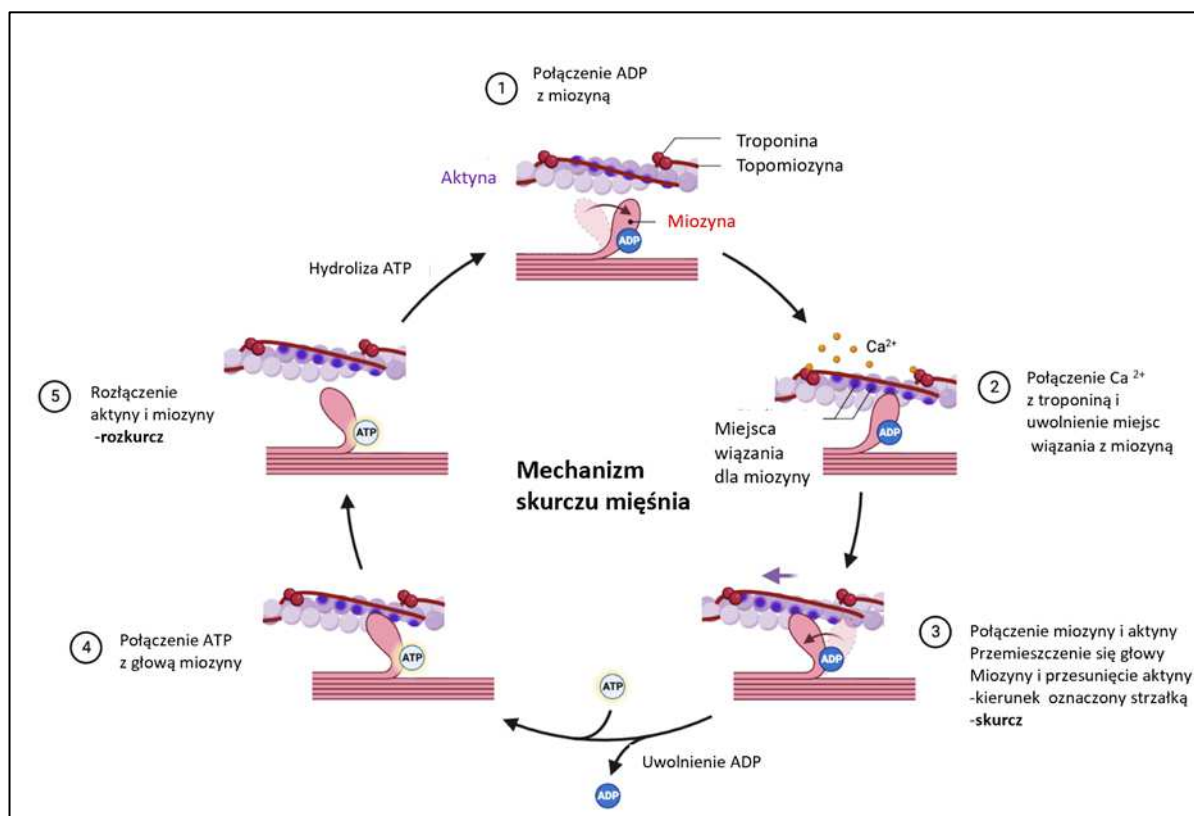
Wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje tkanki mięśniowej:

- **Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana szkieletowa**

Zbudowana z długich, cylindrycznych i wielojądrzastych włókien mięśniowych. Jądra położone są peryferyjnie bezpośrednio pod błoną komórkową. Głównym składnikiem włókna mięśniowego jest aparat kurczliwy utworzony z równolegle ułożonych włókienek mięśniowych (miofibryle), których podstawową jednostką strukturalną jest sarkomer. Pomiedzy miofibrylami występują mitochondria, siateczka sarkoplazmatyczna, ziarna glikogenu, krople lipidów oraz nieliczne lizosomy. Miofibryle, utworzone z miofilamentów, ułożone są wzdłuż długiej osi włókna mięśniowego. Skurcz tkanki mięśniowej szkieletowej jest zależny od woli. Obecna w mięśniach szkieletowych odpowiedzialnych za ruchy ciała.



Ryc. 10. Schemat budowy włókna mięśniowego. Tkanka mięśniowa charakteryzuje się wyraźnym poprzecznym prążkowaniem widocznym w mikroskopie świetlnym, wynikającym z regularnego układu miofilamentów cienkich i grubych i różnego przechodzenia światła przez te struktury. Te charakterystyczne odcinki zwane prążkami występują w obrębie sarkomeru. Wyróżnia się prążki: I, A, H, M, Z, które poza aktyną i miozyną są zbudowane ze specyficznych białek, m.in. α -aktynina, desmina, białka M i C, nebulina. Obraz z BioRender zmodyfikowany

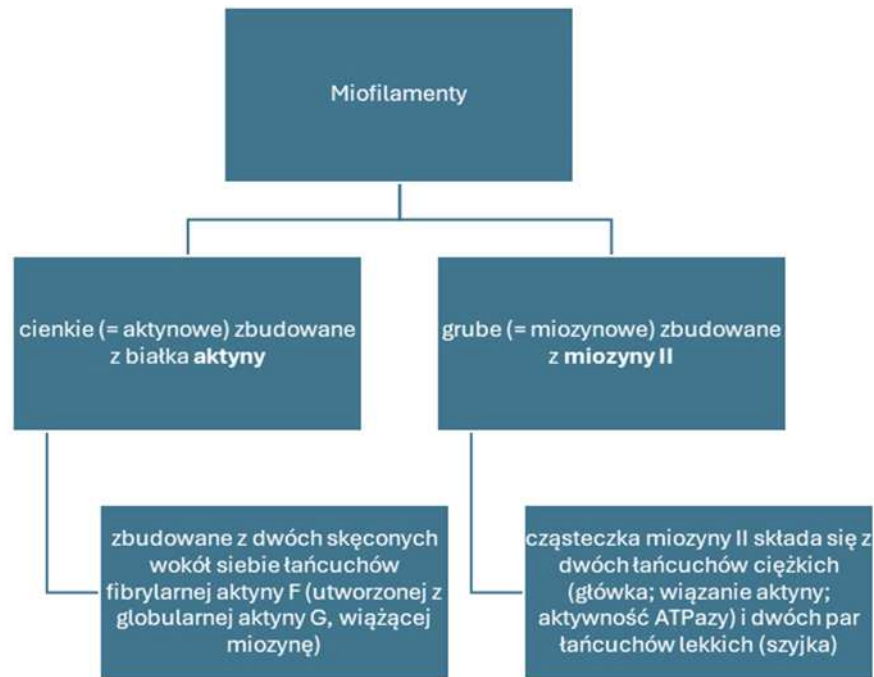


Ryc. 11. Schemat mechanizmu skurczu mięśnia. Obraz z BioRender zmodyfikowany

W obrębie sarkomerów występują również białka regulatorowe, takie jak troponiny:

- **troponina C** – wiąże wapń
- **troponina I** – hamuje wiązanie aktyny do miozyny
- **troponina T** – wiąże się z tropomiozyną, która w czasie rozkurczu zapobiega wiązaniu się główek miozynowych z miofilamentem aktynowym

Troponiny zapewniają prawidłowy mechanizm skurczu komórki mięśniowej. Sercowe izoformy troponin T i I (cTnT i cTnI) odgrywają kluczową rolę w diagnostyce uszkodzenia mięśnia sercowego, np. w zawale serca.



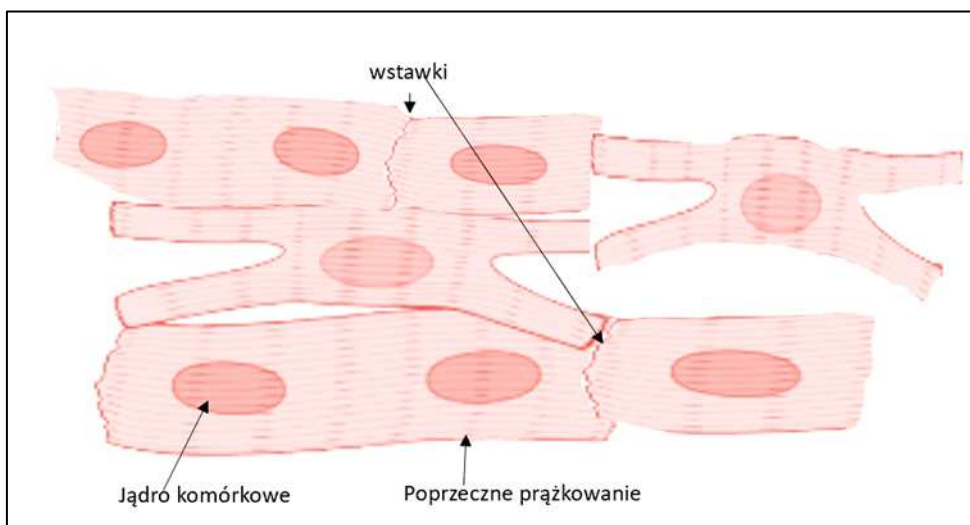
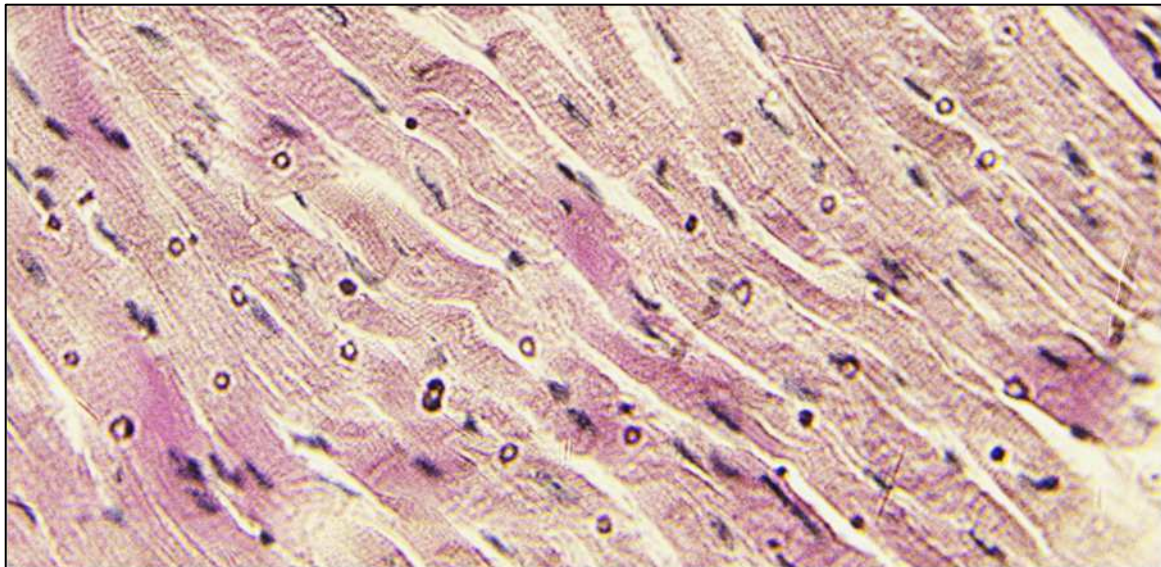
Ryc. 12. Rodzaje miofilamentów

- **Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana serca**

Występuje w ścianie przedsionków i komór serca. Zbudowana z krótkich, rozgałęzionych komórek jedno- lub dwujądrowych, tępo zakończonych, połączonych wstawkami (interkalowanymi dyskami). W obrębie wstawki znajdują się specyficzne połączenia międzykomórkowe: obwódki przylegania, desmosomy oraz połączenia szczelinowe (neksus, ang. *gap junction*) umożliwiające szybki przepływ impulsów elektrycznych między komórkami. Komórki mięśnia sercowego nazywane są też **kardiomiocytami** (włókna mięśniowe sercowe). Aparat kurczliwy włókna mięśniowego sercowego tworzą miofibryle zbudowane z sarkomerów. W odróżnieniu od mięśni szkieletowych miofibryle mogą rozgałęziać się i łączyć z sąsiadującymi miofibrylami. W przypadku uszkodzenia kardiomiocyty mają ograniczone możliwości regeneracji.

Prążkowanie jest widoczne, jednak komórki są mniej regularne niż w mięśniach szkieletowych. Skurcze są rytmiczne i niezależne od woli, kontrolowane przez układ bodźcotwórczo-przewodzący serca. W mięśniu

sercowym można również wyróżnić zmodyfikowane kardiomiocyty, czyli włókna Purkinjego oraz komórki mioendokrynowe w prawym przedsionku serca (w ziarnistościach – przedsionkowy czynnik natiuretyczny).



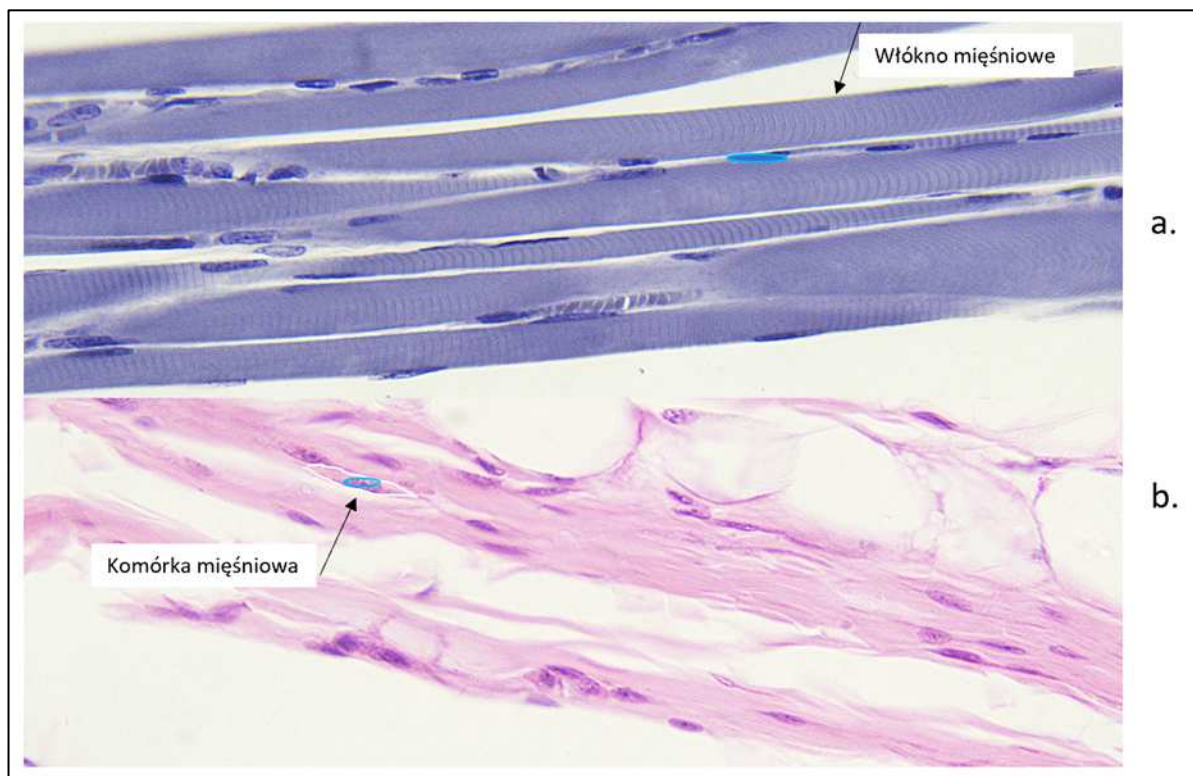
Ryc. 13. Kardiomiocyty obraz spod mikroskopu powiększenie $480\times$ i schemat budowy komórek mięśnia serca. Obraz schematu z BioRender zmodyfikowany

- **Tkanka mięśniowa gładka**

Zbudowana z wrzecionowatych komórek jednojądrzastych, bez widocznego prążkowania. Obecna w mocnych i elastycznych ścianach narządów wewnętrznych (jelita, pęcherz, macica, naczynia krwionośne). Jej główną funkcją jest

wzmacnianie narządów oraz czynność skurczowa. Skurcz jest niezależny od woli i może być wywoływany m.in. przez bodźce hormonalne lub autonomiczny układ nerwowy.

Komórki mięśni gładkich zwane **miocytami** mają wrzecionowaty kształt. Jądro jest zlokalizowane w centrum komórki. Komórki otoczone są błoną podstawną. Pomiedzy nimi występują synapsy elektryczne (neksus). Pod mikroskopem nie obserwuje się poprzecznego prążkowania. Aparat kurczliwy wykazuje uporządkowaną budowę różniącą się od sarkomerowej. Miofilamenty biegną skośnie do osi komórki. Miofilamenty są zakotwiczone dzięki taśmom gęstym, zlokalizowanym po wewnętrznej stronie błony komórkowej oraz ciałkom gęstym, znajdującym się w cytoplazmie wewnątrz komórki. Taśmy oraz ciała gęste zbudowane są ze specyficznych białek, takich jak α -aktynina, filamina i winkulina. Ponadto sarkolemma komórki mięśniowej gładkiej wytwarza niewielkie wpuklenia w głąb cytoplazmy, tzw. jamki, które ułatwiają przeniesienie sygnału z powierzchni komórki do cytoplazmy. Szczególnie rozbudowana jest siateczka śródplazmatyczna, która stanowi magazyn jonów wapnia niezbędnych do skurczu i związania z kalmoduliną (w mięśniach gładkich brak troponin).



Ryc. 14. Obraz pod mikroskopem tkanki mięśniowej szkieletowej powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim, jądro komórkowe, a. i mięśniowej gładkiej b. z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi; Mięśnie szkieletowe: widoczne poprzeczne prążkowanie, wielojądrzaste komórki ułożone równolegle. Mięśnie gładkie: jednorodne, wrzecionowate komórki z centralnym jądrem, brak prążkowania

Linie komórkowe tkanki mięśniowej w badaniach naukowych

Tkanka mięśniowa odgrywa kluczową rolę w fizjologii człowieka i stanowi ważny obiekt badań patologii mięśni, chorób metabolicznych, starzenia oraz odpowiedzi na terapię farmakologiczną. W histologii jest jednym z podstawowych tematów służących do nauki strukturalno-funkcjonalnej organizacji organizmu. W badaniach *in vitro* powszechnie stosuje się ustalone linie komórkowe mięśniowe, m.in.:

- **C2C12** – mysie mioblasty, najczęściej wykorzystywana linia do badań różnicowania komórek mięśni szkieletowych.
- **L6** – szczurze mioblasty; linia komórkowa służąca do badań rozwoju, regeneracji i fizjologii mięśni, a także metabolicznych, dotyczących wychwyty glukozy i szlaków sygnałowych insuliny; wykazują ekspresję

receptorów insuliny i mogą być wykorzystywane do badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw insulinooporności i cukrzycy.

- **RD** – komórki ludzkich mięśni prążkowanych, pochodzące z mięśniakomięsa, stosowane w badaniach patogenezy mięśniaków.
- **SkMC** – ludzkie pierwotne komórki mięśni szkieletowych, dobrze odzwierciedlające warunki *in vivo*.

Tkanka łączna

Tkanka łączna stanowi jedną z podstawowych tkanek zwierzęcych i pełni zróżnicowane funkcje strukturalne, metaboliczne, transportowe oraz obronne. W przeciwieństwie do innych tkanek, składa się z niewielkiej liczby komórek osadzonych w obfitej substancji (istocie, macierzy) międzykomórkowej, którą tworzą włókna (kolagenowe, sprężyste i siateczkowe) oraz istota podstawowa, zbudowana z glikozaminoglikanów, proteoglikanów, glikoprotein. Różnorodność składu i proporcji tych elementów decyduje o typie i właściwościach specyficznej tkanki łącznej. W preparatach histologicznych kolagen typu I zwykle barwi się kwasochłannie (eozynofilnie), a kolagen typu III we włóknach siateczkowych można zwizualizować za pomocą soli metali (argentofilnie). W celu obserwacji włókien sprężystych wykonuje się barwienie rezorcyną lub orceiną, gdyż włókna te są odporne na działanie kwasów i zasad, nie uwidaczniają się podczas rutynowego barwienia histologicznego.

Do funkcji tkanki łącznej należą:

- tworzenie szkieletu organizmu
- tworzenie zrębu większości narządów
- modelowanie oraz utrzymywanie kształtu narządów
- ochrona mechaniczna narządów i innych tkanek
- hematopoeza (wytwarzanie erytrocytów, leukocytów, trombocytów)
- transport substancji odżywczych i produktów metabolizmu
- ochrona organizmu przed związkami chemicznymi i patogenami

Tkankę łączną dzieli się na cztery główne grupy:

1. Tkanka łączna właściwa

Pełni funkcje podporowe, odżywcze, regeneracyjne i obronne. Dzieli się na:

- **tkankę łączną właściwą luźną (wiotką)** – bogata w komórki (**fibroblasty**, makrofagi, komórki tuczne), zawiera cienkie włókna kolagenowe i sprężyste. Pod mikroskopem widoczna jest w postaci komórek i włókien ułożonych luźno, w sposób nieuporządkowany; przestrzenie międzykomórkowe są obszerne. Tkanka ta gromadzi się wokół naczyń, nerwów i narządów (przelyk), dzięki czemu zapewnia im pewną ruchomość. Występuje również w przestrzeniach międzykomórkowych w błonach śluzowych (warstwa wewnętrzna np. przewodu pokarmowego), tkance podskórnej lub w błonach surowiczych (opłucna, otrzewna, osierdzie).
- **tkankę łączną właściwą zbitą o utkaniu regularnym lub nieregularnym** – charakteryzuje się obecnością nieznacznej ilości istoty podstawowej i komórek, natomiast licznych, ściśle upakowanych włókien, głównie kolagenowych.
 - *tkanka zbita o utkaniu regularnym* buduje ścięgna, więzadła oraz powięźcie; włókna ułożone są w równoległe, ściśle upakowane w pęczki zbudowane z włókien kolagenowych typu I. Pomiędzy pęczkami znajdują się w szeregach głównie dojrzałe fibroblasty produkujące białka macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagenazy, metaloproteinazy). Włókna sprężyste występują w niewielkiej ilości.
 - *tkanka zbita o utkaniu nieregularnym* występuje w warstwie siateczkowatej skóry właściwej oraz tworzy torebki narządów wewnętrznych; włókna ułożone są w sposób nieuporządkowany; występują włókna sprężyste i komórki między pęczkami.

2. Tkanka łączna tłuszczowa – składa się z komórek magazynujących lipidy. Komórki tłuszczowe nazywane są **adipocytami**. Między grupami adipocytów znajduje się tkanka łączna właściwa luźna, naczynia krwionośne oraz nerwy.

Do funkcji tkanki tłuszczowej należą:

- magazynowanie energii – komórki tłuszczowe przechowują nadmiar energii w postaci triglicerydów, które mogą być uwalniane w trakcie głodzenia lub wysiłku fizycznego
- izolacja termiczna – tkanka tłuszczowa działa jako izolator w tkance podskórnej, utrzymując temperaturę ciała i zapobiegając utracie ciepła
- ochrona narządów wewnętrznych – chroni przed urazami mechanicznymi narządy, takie jak nerki, serce czy jelita
- regulacja metabolizmu – tkanka tłuszczowa pełni także funkcje endokrynne, wydzielając hormony, takie jak leptyna, adiponektyna, które mają wpływ na apetyt, metabolizm oraz insulinooporność

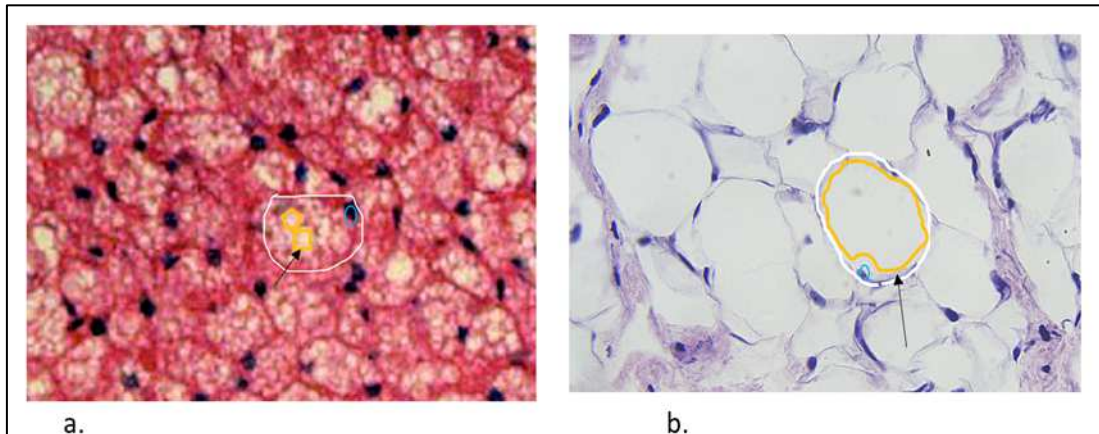
Rodzaje tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa dzieli się na dwa główne typy: tkankę tłuszczową żółtą, brunatną, a dodatkowo wyróżnia się tkankę beżową.

- Tkanka tłuszczowa żółta (biała) – jest najpowszechniejszym rodzajem tkanki tłuszczowej u dorosłych, u których magazynuje energię i odpowiada za izolację termiczną w tkance podskórnej. W obrazie makroskopowym ma barwę żółtą, dzięki barwnikom zwanym lipochromami. W obrazie mikroskopowym obserwuje się adipocyty (uformowane z preadipocytów) z jedną dużą kroplą tłuszczu wypychającą organelle komórkowe w tym jądro komórkowe, aparat Golgiego, siateczkę śródplazmatyczną i gładką na obwód komórki. Podczas rutynowego barwienia kropli tłuszczu nie widać, ponieważ ulega on wypłukaniu przez rozpuszczalniki organiczne. Wówczas wewnątrz komórek tłuszczowych widać puste miejsce. Jest rozmieszczona nierównomiernie w organizmie, modelując w ten sposób kształt ciała. W obrębie tkanki tłuszczowej zachodzą procesy metaboliczne, takie jak lipogeneza – tworzenie lipidów, lipoliza – rozkład tłuszczów. Lipidy są

transportowane w postaci związanej z białkami – chylomikronów lub lipoprotein. Procesy zachodzące w tkance tłuszczowej żółtej podlegają regulacji hormonalnej: adrenalina i glukagon aktywują lipolizę, a insulina – hamuje ją. Tkanka tłuszczowa produkuje również cytokiny (adipokiny), np. leptynę, która hamuje apetyt.

- Tkanka tłuszczowa brunatna (brązowa) – występuje głównie u noworodków i niemowląt, chociaż w mniejszej ilości może być obecna także u dorosłych, zwłaszcza w obrębie okolic łopatek, szyi, śródpiersia oraz dużych tętnic. Komórki tej tkanki zawierają liczne mniejsze krople tłuszczu oraz dużą liczbę mitochondriów, które nadają jej charakterystyczną brązową barwę. Tkanka tłuszczowa brunatna pełni ważną funkcję w termogenezie, generując ciepło w wyniku rozkładu tłuszczu, co pomaga w utrzymaniu ciepłoty ciała. W procesie termogenezy istotną rolę odgrywa termogenina – białko kanałowe UCP-1. Tkanka tłuszczowa brunatna jest bardziej rozwinięta u osób szczupłych, a jej komórki nie pochodzą z preadipocytów, ale mają wspólne pochodzenie z miocytami.
- Tkanka tłuszczowa beżowa – towarzyszy zwykle tkance tłuszczowej żółtej, tworząc wysepki w jej obrębie. Posiada cechy tkanki żółtej i brunatnej: adipocyty charakteryzują się obecnością w cytoplazmie licznych kropli tłuszczu, dużej liczby, mitochondriów oraz niskim stężeniem termogeniny. Powstają w procesie transdyferencji pod wpływem długotrwałej ekspozycji na niską temperaturę, wysiłek fizyczny, hormony lub leki przeciwcukrzycowe.



Ryc. 15. Obraz pod mikroskopem tkanki tłuszczowej powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe, żółtym krople lipidów a. tkanka tłuszczowa brunatna b. tkanka tłuszczowa żółta z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi

1. Tkanka łączna – podporowa

Odpowiada za funkcje mechaniczne i szkieletowe.

- **Tkanka chrzęstna** – jest jednym z typów tkanki łącznej, charakteryzującym się wysoką elastycznością i zdolnością do amortyzacji wstrząsów, dzięki czemu pełni ważną rolę w strukturach podporowych organizmu. Tkanka ta nie zawiera naczyń krwionośnych ani nerwów (*tkanka awaskularna*). Jej główną funkcją jest wspieranie innych tkanek, umożliwienie ruchu stawów oraz ochrona przed urazami mechanicznymi. Tkanka chrzęstna występuje w krążkach międzykręgowych, chrząstkach stawowych, nosowych i usznych, a także w strukturach szkieletowych w okresie rozwoju.

Tkanka chrzęstna składa się z komórek zwanych **chondrocytami**, które są osadzone w substancji międzykomórkowej – macierzy chrzęstnej. Macierz ta jest zbudowana z wodnego żelu, który zawiera włókna kolagenowe, elastynowe oraz proteoglikany. Ułożone w grupach komórki chrzęstne otoczone są substancją międzykomórkową, która nadaje tkance elastyczność, twardość i sprężystość. Chondroblasty to młode chondrocyty,

które rozpoczynają produkcję chrząstki, natomiast chondroklasty to komórki resorbujące macierz chrzęstną.

Pod mikroskopem komórki chrzęstne są owalne lub okrągłe, z jądrem leżącym centralnie w obrębie komórki. W zależności od rodzaju chrząstki, macierz międzykomórkowa może być bardziej gęsta (jak w chrząstce szklistej) lub bardziej luźna (jak w chrząstce sprężystej).

Tkanka chrzęstna pełni w organizmach zwierzęcych (w tym u człowieka) następujące funkcje:

- amortyzacja i ochronna – dzięki swojej elastyczności i zdolności do odkształcania się, chrząstka działa jak amortyzator, chroniąc stawy przed uszkodzeniami mechanicznymi
- podpora strukturalna – chrząstka stanowi ważny element budulcowy wielu struktur szkieletowych, takich jak nos, uszy, krtań czy części szkieletu zarodkowego
- zapewnienie ruchomości stawów – w chrząstkach stawowych, zwłaszcza w chrząstce szklistej, zmniejsza się tarcie pomiędzy powierzchniami stawowymi, co pozwala na swobodny ruch stawów
- różnicowanie i wzrost – w okresie wzrostu organizmu chrząstka pełni rolę materiału przejściowego pomiędzy tkanką chrzęstną a kostną, uczestnicząc w tworzeniu kości (np. w miejscach wzrostu kości długich)

Rodzaje tkanki chrzęstnej

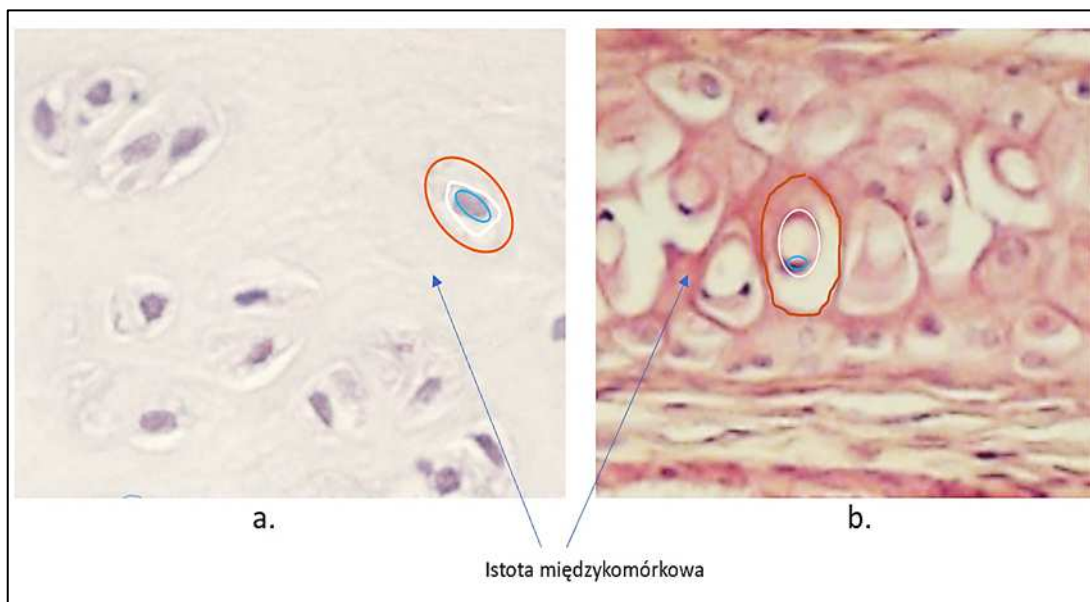
Tkanka chrzęstna dzieli się na trzy główne typy, które różnią się między sobą składem macierzy oraz funkcjami:

- Tkanka chrzęstna szklista – jest najczęściej występującym rodzajem tkanki chrzęstnej. Występuje w miejscach, gdzie wymagane jest zapewnienie elastyczności oraz amortyzacji, takich jak powierzchnie stawowe, chrząstka nosowa, chrząstki żeber, a także w niektórych odcinkach dróg oddechowych (krtań, tchawica). Macierz tej tkanki jest

gładka, przezroczysta i zawiera gęsto upakowane włókna kolagenowe typu II. Chondrocyty są rozmieszczone w grupach (izogenicznych) w obrębie tzw. jam chrzęstnych (*lacunae*). W obrazie mikroskopowym chrząstka szklista ma charakterystyczny, jednorodny wygląd, z mało wyraźnymi włóknami kolagenowymi. Komórki w chrząstce mają zmienną wielkość i kształt w zależności od ich ułożenia. Małe komórki o wrzecionowatym kształcie występują na obwodzie, a komórki duże i kuliste zlokalizowane są we wnętrzu. Na powierzchni chrząstki występuje ochrzęstna, która jest tkanką łączną właściwą zbitą o utkanu nieregularnym.

- *Tkanka chrzęstna włóknista* – występuje w miejscach, które wymagają wyjątkowej wytrzymałości na rozciąganie i ściskanie (krążki międzykręgowe, łąkotki stawowe, spojenie łonowe). Charakteryzuje się obecnością licznych, grubo upakowanych włókien kolagenowych typu I, które zapewniają jej odporność na naprężenia mechaniczne. Komórki chrzęstne są rozmieszczone w regularnych rzędach, oddzielone grubymi włóknami kolagenowymi. Pod mikroskopem tkanka ta wygląda na bardziej włóknistą i ma widoczne, szerokie pasma włókien kolagenowych.
- *Tkanka chrzęstna sprężysta* – występuje w strukturach, które wymagają elastyczności, takich jak małżowina uszna, trąbka słuchowa, nagłośnia, oraz w niektórych częściach dróg oddechowych. Charakteryzuje się obecnością włókien sprężystych (elastynowych), które nadają jej dużą elastyczność. W porównaniu do chrząstki szklistej, macierz chrzęstna sprężysta zawiera więcej włókien sprężystych, które nadają tkance zdolność do powrotu do pierwotnego kształtu po rozciągnięciu. Włókna kolagenowe typu II są cienkie. W obrazie mikroskopowym wyraźnie widoczna jest sieć włókien sprężystych, które są bardziej rozproszone niż włókna kolagenowe w innych typach tkanki chrzęstnej.

Rozmieszczenie chondrocytów jest podobne jak w tkance chrzęstnej szklistej, choć grupy izogeniczne są mniej liczne.



Ryc. 16. Obraz pod mikroskopem tkanki chrzęstnej, powiększenie $\times 480$; białym kolorem – oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe, pomarańczowym – jamkę chrzęstną; a. chondrocyty tkanki chrzęstnej szklistej; b. chondrocyty tkanki chrzęstnej sprężystej z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi

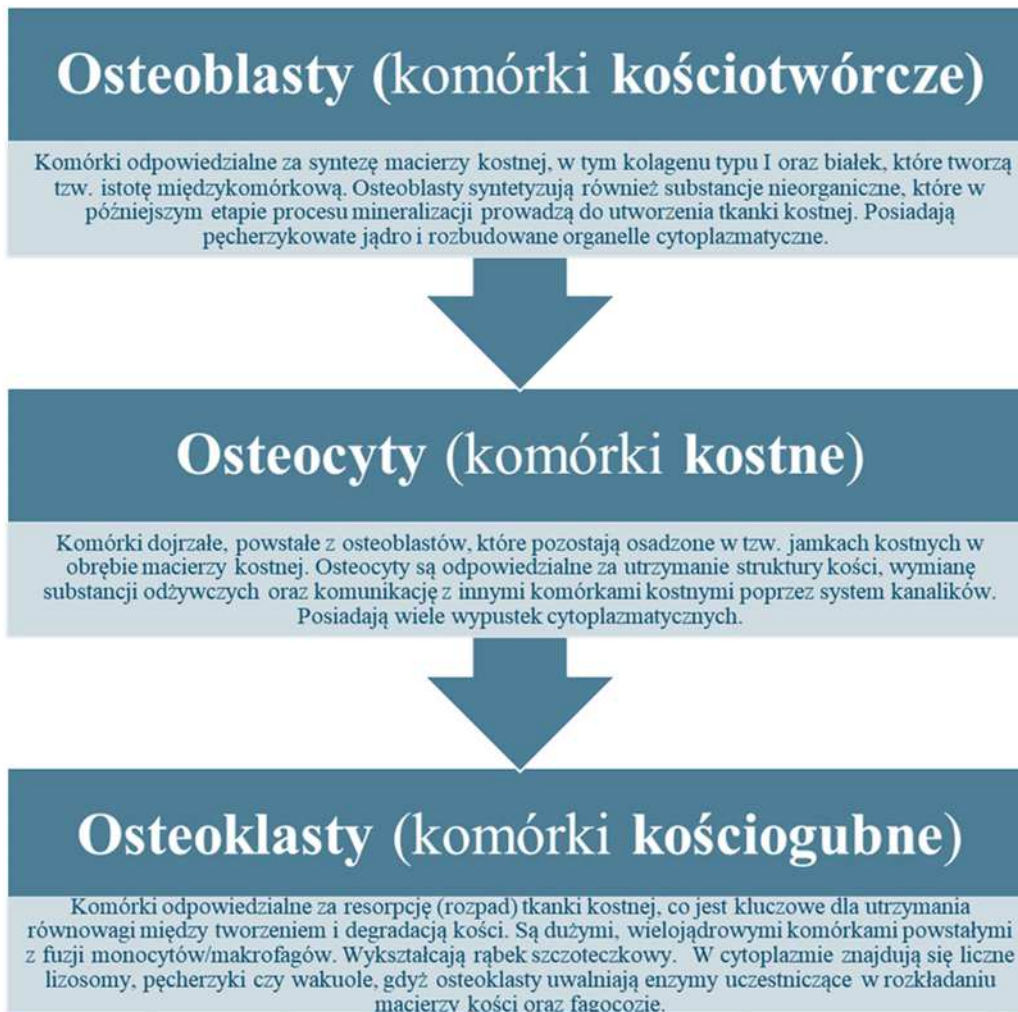
Tkanka kostna – stanowi podstawową część szkieletu, zapewniając wsparcie strukturalne, ochronę narządów wewnętrznych (klatka piersiowa, czaszka), a także umożliwia ruch. Jest również miejscem magazynowania związków mineralnych (wapnia) i pełni rolę w hematopoezie, tworząc mikrośrodowisko do tworzenia komórek krwi w szpiku. Tkanka kostna składa się z komórek kostnych osadzonych w zorganizowanej macierzy międzykomórkowej, która zawiera składniki organiczne (**osteoid**) oraz nieorganiczne składniki mineralne, głównie fosforan wapnia w postaci kryształów hydroksyapatytu. W skład bezpostaciowej substancji organicznej wchodzi proteoglikany oraz białka niekolagenowe (osteonektyna, osteokalcyna). Zewnętrzną powierzchnię kości pokrywa tkanka łączna właściwa, zwana okostną.

Komórki kostne dzielą się na trzy główne typy: **osteoblasty**, **osteocyty**, **osteoklasty**. Dodatkowo wyróżnia się **komórki osteogenne**, które jako komórki progenitorowe mają zdolność do różnicowania się w osteoblasty i odgrywają kluczową rolę w procesie regeneracji kości.

Macierz kostna, zwana także substancją międzykomórkową, jest głównie złożona z kolagenu typu I oraz substancji nieorganicznych. Pod mikroskopem, w preparacie histologicznym, tkanka kostna wykazuje charakterystyczną strukturę. W dojrzałej tkance kostnej zbitej, włókna ułożone są ściśle a koncentryczne warstwy zmineralizowanej macierzy kostnej (blaszki kostne) tworzą kanał Haversa w którym przebiegają naczynia krwionośne oraz nerwy.

Tkanka kostna pełni szereg kluczowych funkcji w organizmach zwierzęcych:

- podpora strukturalna – kości stanowią szkielet, który utrzymuje kształt ciała i umożliwia prawidłowe ułożenie narządów wewnętrznych
- ochrona narządów – tkanka kostna pełni rolę ochronną, zwłaszcza w przypadku kości czaszki, żeber czy miednicy, chroniąc mózg, serce, płuca i inne narządy wewnętrzne przed urazami mechanicznymi
- magazynowanie minerałów – kości przechowują związki mineralne, w tym wapń i fosfor, które mogą być uwalniane do krwi w razie potrzeby, co jest kluczowe dla utrzymania homeostazy mineralnej
- tworzenie mikrośrodowiska dla hematopoezy – w szpiku kostnym, który znajduje się w przestrzeniach kości gąbczastej, zachodzi produkcja komórek krwi – erytrocytów, leukocytów i trombocytów
- ruch – kości, w połączeniu z mięśniami, stanowią dźwignię umożliwiającą wykonywanie ruchów, co jest podstawą funkcjonowania układu ruchu



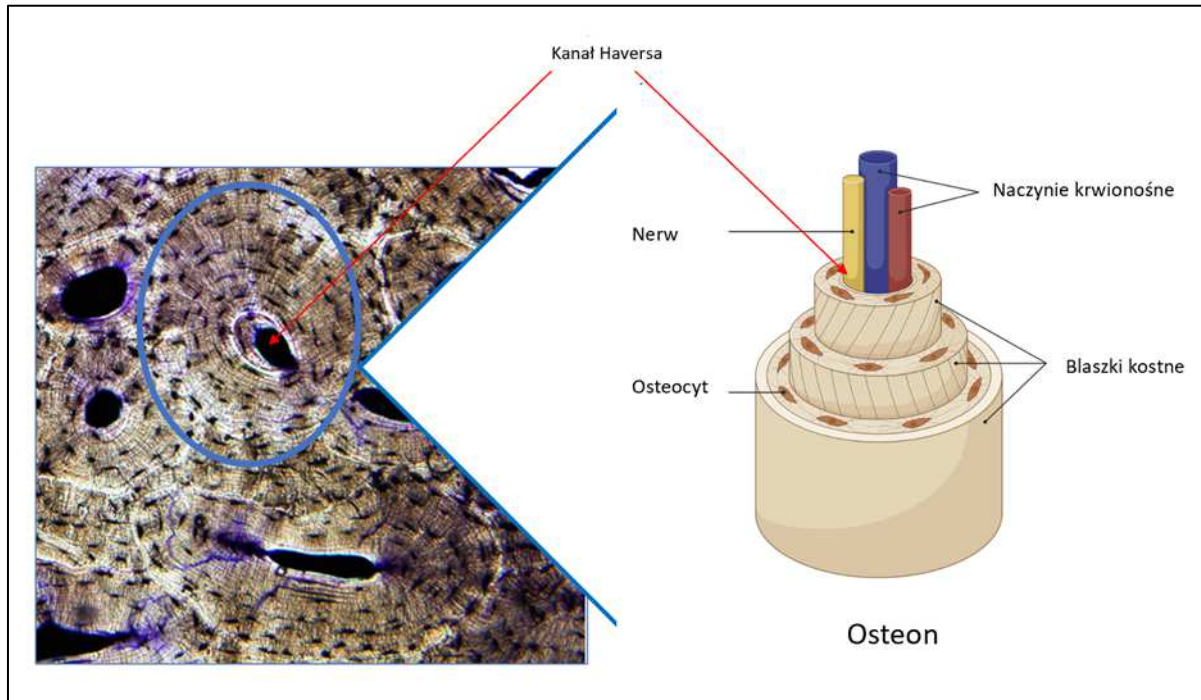
Ryc. 17. Rodzaje i funkcje komórek tkanki kostnej

Rodzaje tkanki kostnej

Tkanka kostna dzieli się na dwa główne typy w zależności od struktury i funkcji:

- *Tkanka kostna zbita* – jest gęsta, twarda i stanowi główną część trzonów kości długich oraz zewnętrzną warstwę innych kości (płaskich). Jest to najbardziej zorganizowana postać tkanki kostnej. W kości zbitej widoczny jest tzw. system Haversa – osteon, w którym centralne miejsce stanowi kanał Haversa (kanał osteonu)
- *Tkanka kostna gąbczasta* – ma luźniejszą strukturę i występuje w nasadach kości długich, w kręgach oraz wewnątrz kości płaskich.

Z rozgałęziających się blaszek kostnych tworzą się belecзки, które są odpowiedzialne za wytrzymałość mechaniczną przy jednoczesnym zmniejszeniu masy kości. W tej tkance przestrzenie między beleczkami wypełnione są szpikiem kostnym, w którym zachodzi hematopoeza



Ryc. 18. Budowa osteonu. Obraz pod mikroskopem tkanki kostnej zbitej z widocznymi osteonami. Schemat budowy osteonu BioRender – obraz zmodyfikowany

4. Krew – tkanka łączna płynna

Krew jest tkanką łączną płynną, pełniącą fundamentalną rolę w organizmach zwierzęcych, szczególnie w zakresie transportu gazów oddechowych, substancji odżywczych, metabolitów oraz hormonów. Dodatkowo krew uczestniczy w obronie organizmu przed patogenami, w procesach krzepnięcia oraz w regulacji temperatury ciała. Krew składa się z osocza, w którym zawieszony są elementy morfotyczne, w tym krwinki czerwone, białe oraz płytki krwi.

- **Osocze** – stanowi około 55% objętości krwi i jest płynem złożonym głównie z wody (około 90%), elektrolitów, białek osocza (w tym albumin, globulin, fibrynogenu), substancji odżywczych (glukoza, aminokwasy,

tluszcze), hormonów oraz produktów przemiany materii (mocznik, kwasy tłuszczowe, kreatynina). Osocze uczestniczy w transporcie, umożliwiając rozpuszczanie i dostarczanie substancji do różnych tkanek i narządów.

Surowica to płyn, który powstaje w wyniku oddzielenia od krwi wszystkich elementów morfotycznych (krwinek, płytek krwi) oraz fibrynogenu, białka odpowiedzialnego za krzepnięcie. Jest to osocze, w które pozbawione jest składników odpowiedzialnych za proces hemostazy (krzepnięcia).

Surowica zawiera więc wszystkie białka osocza z wyjątkiem fibrynogenu oraz elementy rozpuszczone w osoczu, takie jak elektrolity, hormony, produkty przemiany materii czy przeciwciała.

- **Elementy morfotyczne krwi** – stanowią około 45% objętości krwi i obejmują:
 - Erytrocyty (krwinki czerwone)
 - Leukocyty (krwinki białe)
 - Trombocyty (płytki krwi)

Krew pełni w organizmach szeregi istotnych funkcji, w tym:

- transport gazów oddechowych – erytrocyty transportują tlen z płuc do tkanek i dwutlenek węgla z tkanek do płuc
- obrona organizmu – leukocyty uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej, eliminując patogeny i komórki nowotworowe
- hemostaza – trombocyty są kluczowe w procesach krzepnięcia, zapobiegając utracie krwi po uszkodzeniu naczyń krwionośnych
- regulacja temperatury ciała – krew transportuje energię cieplną wytworzoną w mięśniach, pomagając w utrzymaniu stałej temperatury ciała

Tabela 2. Podstawowe różnice między osoczem a surowicą

| OSOCZE | SUROWICA |
|---|---|
| Obecność fibrynogenu | |
| Osocze zawiera wszystkie białka krwi, w tym fibrynogen, który odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi. | Surowica to płyn, w którym <u>fibrynogen oraz włókna fibryny zostały usunięte</u> , ponieważ fibrynogen został zużyty w procesie krzepnięcia. |
| Proces pozyskiwania | |
| Osocze uzyskuje się przez odwirowanie pełnej krwi z antykoagulantem (np. heparyną), dzięki czemu krew nie ulega krzepnięciu, a wszystkie jej składniki, w tym fibrynogen, pozostają w płynnej postaci. | Surowica jest produktem uzyskiwanym po naturalnym procesie krzepnięcia krwi, w wyniku czego krew tworzy skrzep, a płynna część, po oddzieleniu skrzepu, stanowi surowicę. |
| Zawartość składników | |
| Osocze zawiera fibrynogen, inne białka osocza, elektrolity, hormony, produkty przemiany materii oraz rozpuszczone gazy. | Surowica jest płynem pozbawionym fibrynogenu i innych białek związanych z krzepnięciem. Zawiera jednak elektrolity, hormony, metabolity oraz rozpuszczone gazy. |
| Zastosowanie | |
| Osocze wykorzystywane jest głównie w terapii transfuzjologii, szczególnie do uzupełnienia czynników krzepnięcia lub w przypadkach ciężkich oparzeń oraz w diagnostyce laboratoryjnej np. do oceny wydolności szlaków krzepnięcia. | Surowica wykorzystywana jest głównie w diagnostyce laboratoryjnej, zwłaszcza w testach serologicznych (np. wykrywanie przeciwciał) oraz w badaniach biochemicznych, ponieważ jest pozbawiona składników zaangażowanych w krzepnięcie. |
| Podsumowanie | |
| Osocze to płynna część krwi, która zawiera wszystkie składniki, w tym fibrynogen, odpowiedzialny za proces krzepnięcia. | Surowica to płyn powstały po krzepnięciu krwi, pozbawiony fibrynogenu oraz elementów biorących udział w krzepnięciu. |

Elementy morfotyczne krwi

- *Erytrocyty (krwinki czerwone)*

Są najliczniejszymi komórkami krwi ($4,5\text{--}5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$).

Ich charakterystyczny dwuwklęsły kształt zapewnia dużą powierzchnię do wymiany gazów oddechowych. Erytrocyty są pozbawione jądra, a ich cytoplazma wypełniona jest hemoglobina, która wiąże tlen. Erytrocyty nie posiadają aparatu Golgiego, siateczki śródplazmatycznej, mitochondriów i rybosomów. Młode postaci erytrocytów (retikulocyty) zawierają czasem agregaty rybosomów, które z barwnikami zasadowymi tworzą obraz siateczki.

Pod mikroskopem erytrocyty są okrągłymi, elastycznymi komórkami o średnicy około 7–8 μm , które w preparatach barwionych metodą May-Grunwalda-Giemsy, mają charakterystyczny pomarańczowo-czerwony kolor; najczęściej erytrocyty można obserwować już pod małym powiększeniem 10 \times .

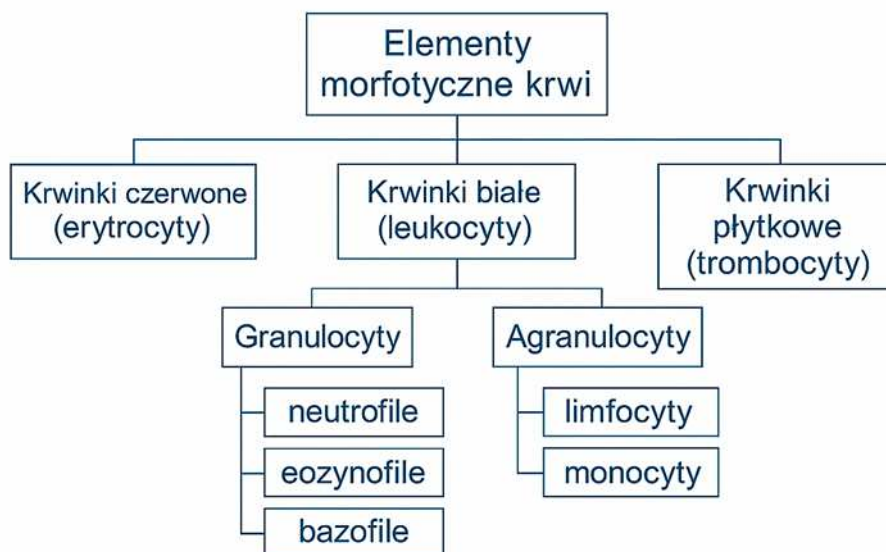
Proces aglutynacji erytrocytów to hemaglutynacja, a uszkodzenie krwinek z towarzyszącym wydostawaniem się z nich hemoglobiny – hemoliza.

- Leukocyty (krwinki białe)

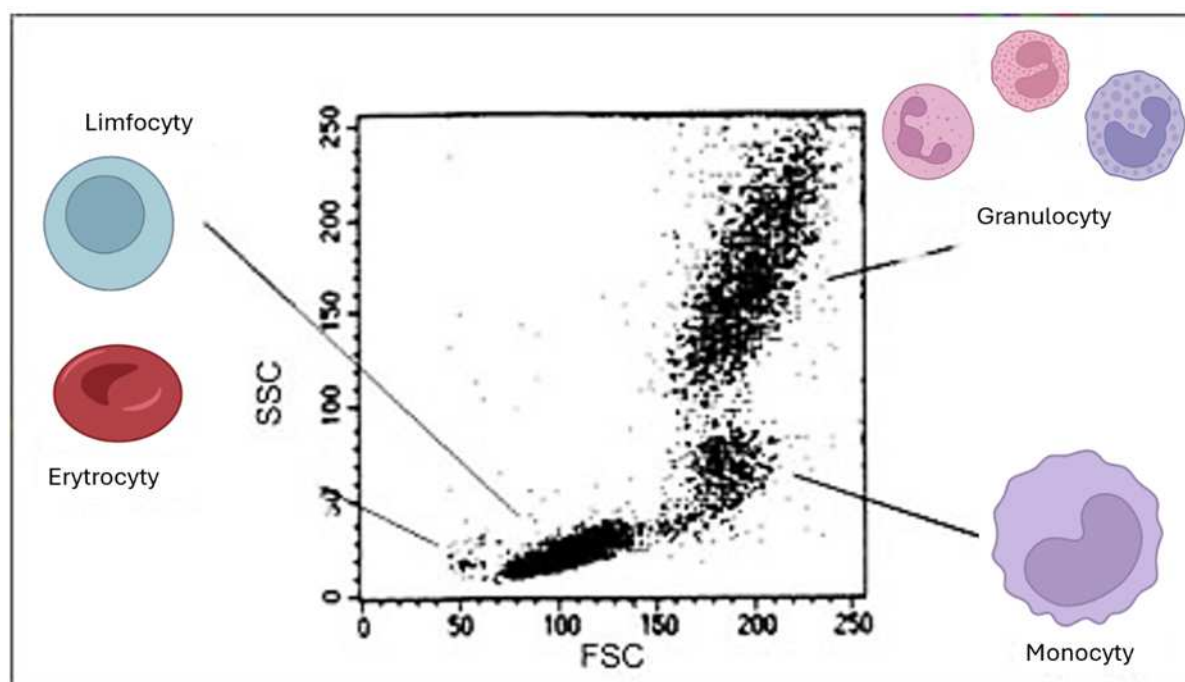
Pełnią funkcję obronną organizmu, uczestnicząc w odpowiedzi immunologicznej, usuwając patogeny, martwe komórki i inne substancje szkodliwe. Do grupy leukocytów zaliczane są różne typy komórek, różniących się morfologią i funkcją:

- **Neutrofile** (granulocyty obojętnochłonne) – są najliczniejszym typem leukocytów (do 70%), odpowiedzialnymi za fagocytozę bakterii i drobnoustrojów; ich jądro jest wielokłapowane (złożone z kilku /2–5/ połączonych płatów); cytoplazma jest jasna, zawiera liczne ziarnistości (widoczne w powiększeniu 100 \times), które wybarwiają się na różowo
- **Eozynofile** (granulocyty kwasochłonne) – uczestniczą w reakcjach alergicznych i obronie przed pasożytami (stanowią tylko ok. 3%); charakterystyczną cechą jest jądro dwupłatowe, złożone z dwóch płatów połączonych pasemkiem chromatyny oraz obfita cytoplazma, w której znajdują się kwasochłonne ziarnistości zabarwione na kolor różowo-czerwony, znacznie większe od ziarnistości neutrofilowych
- **Bazofile** (granulocyty zasadochłonne) – biorą udział w reakcjach alergicznych, uwalniając histaminę i heparynę; mają duże, zasadochłonne ziarna barwy ciemnofioletowej w cytoplazmie oraz małe, nierówne jądro, które może być przesłonięte ziarnistościami cytoplazmatycznymi; bazofile są trudne do znalezienia w obrazie mikroskopowym (1 bazofil na 200 granulocytów)

- **Limfocyty** (ok. 30–35% populacji leukocytów) – stanowią kluczowy element odpowiedzi immunologicznej specyficznej; dzielą się na limfocyty T, B oraz komórki NK, które rozpoznają antygeny i produkują przeciwciała; limfocyty są małymi komórkami o okrągłym jądrze w kolorze niebiesko-fioletowym i wąskim pasie cytoplazmy (jasnoniebieska)
- **Monocyty** (ok. 5–8% populacji leukocytów) – pełnią funkcje fagocytarne, a ich różnicowanie w makrofagi umożliwia usuwanie patogenów i zniszczonych komórek; są większe od erytrocytów i limfocytów; charakteryzują się obecnością dużego, nerkowatego lub owalnego jądra z zagłębieniami; jądra barwią się mniej intensywnie niż jądra limfocytów; cytoplazma (jasnoniebieska) występuje w znacznej ilości
- Trombocyty (płytki krwi) – są fragmentami cytoplazmy megakariocytów, odpowiedzialnymi za procesy krzepnięcia (koagulacja). Średnio ich liczba wynosi $150\text{--}450 \times 10^3/\mu\text{l}$. Uczestniczą w tworzeniu skrzepów (struktury zbudowane z sieci włókien fibryny, czyli włóknika), które zapobiegają krwawieniu z uszkodzonych naczyń. Trombocyty są bezjądrzaste i mają nieregularny kształt. W obrazie mikroskopowym (większe powiększenie, ok. 40×) są to małe, owalne lub okrągłe struktury; średnica płytki stanowi ok. 1/5 średnicy erytrocytu). Środkowa część płytki jest zasadochłonna, a obwodowa – kwasochłonna.



Ryc. 19. Klasyfikacja elementów morfotycznych krwi



Ryc. 20. Schematyczny obraz (cytogram) rozkładu elementów morfotycznych krwi w zależności wielkości komórek FSC (ang. forward scatter channel – rozproszenie przednie) i obecności ziarnistości SSC (ang. side scatter channel – rozproszenie boczne) uzyskany w cytometrze przepływowym. Źródło: Stachurska A., Fabijańska-Mitek J. „Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunohematologicznej ocenie krwinek czerwonych”. *Postępy Nauk Medycznych* 7/2012, 583–588

Limfę (chłonkę) klasyfikuje się jako tkankę łączną płynną. Limfa to płyn tkankowy, który powstaje w przestrzeniach międzykomórkowych jako przesącz osocza krwi. Następnie jest on odprowadzany przez naczynia limfatyczne. Zawiera wodę, elektrolity, białka (niższe stężenie białek, w tym fibrynogenu, niż w osoczu), tłuszcze głównie w postaci chylomikronów a także limfocyty i makrofagi (brak erytrocytów).

Głównymi funkcjami limfy są:

1. **Odtwarzanie objętości krwi** – zwraca do układu krwionośnego płyn tkankowy, białka i inne składniki, które przedostały się do przestrzeni międzykomórkowych
2. **Transport tłuszczów** – przenosi chylomikrony wchłonięte w jelicie cienkim do krwi
3. **Funkcja immunologiczna** – limfa przenosi limfocyty i antygeny do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do aktywacji odpowiedzi odpornościowej
4. **Utrzymanie homeostazy** – reguluje gospodarkę płynową w organizmie i zapobiega obrzękom

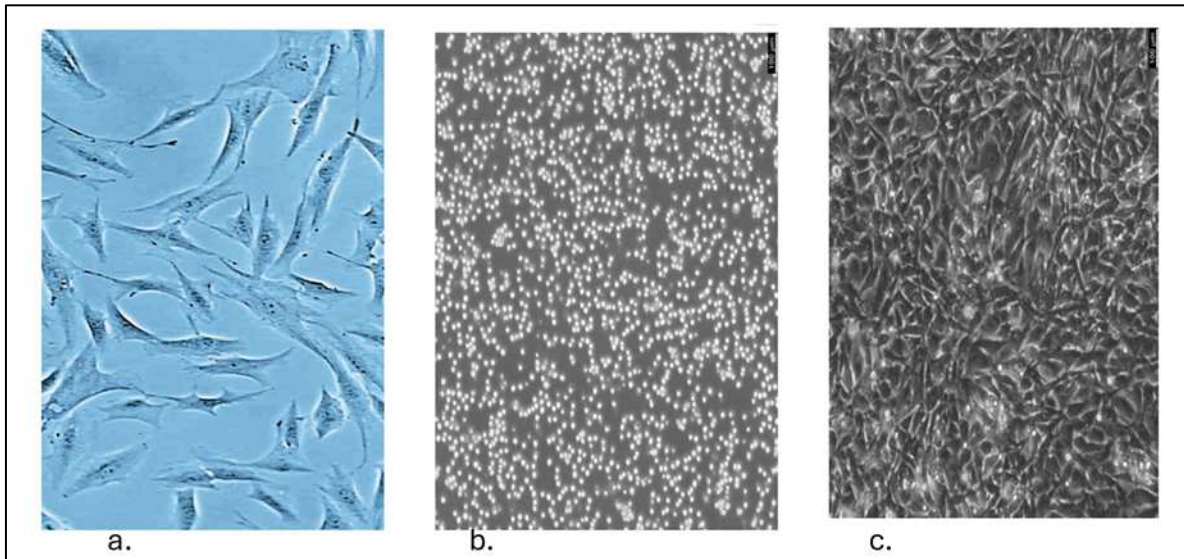
Linie komórkowe tkanki łącznej stosowane w badaniach naukowych

Tkanka łączna, ze względu na swoją różnorodność, stanowi ważny element strukturalny i funkcjonalny organizmu. Jej znajomość jest niezbędna do zrozumienia wielu procesów fizjologicznych i patologicznych, co czyni ją istotnym przedmiotem badań naukowych oraz praktyki klinicznej.

W badaniach eksperymentalnych wykorzystuje się m.in.:

- **NHDF** – pierwotne normalne ludzkie fibroblasty skórne wykorzystywane w badaniach procesów gojenia ran czy dermatologicznych w zakresie chorób takich jak twardzina, włókniakomięsak, zwłóknienie, skóra pergaminowata barwnikowa; istotne dla badań nad rakiem, regeneracją tkanek

- **NIH/3T3** – fibroblasty mysie, powszechnie stosowane do badań proliferacji, apoptozy i różnicowania
- **MG-63, SaOS-2** – linie komórek osteoblastycznych pochodzenia nowotworowego, stosowane w badaniach nad nowotworami kości i modelowania procesów kostnienia
- **CHON-001** – linia chondrocytów stosowana w badaniach chrząstki
- **RAW264.7** – linia komórkowa mysich makrofagów pochodząca z guza myszy, wywołana przez wirus białaczki mysiej Abelsona. Są powszechnie stosowane w badaniach nad stresem oksydacyjnym, stanami zapalnymi i aktywnością przeciwbakteryjną
- **THP-1** – spontanicznie unieśmierteliona linia komórek podobnych do monocytów pochodząca z krwi obwodowej jednorocznego pacjenta z białaczką monocytową, jest wykorzystywana w badaniach immunologicznych i nowotworowych, m.in. funkcji monocytów i makrofagów, mechanizmów, szlaków sygnałowych, w tym aktywacji cytokin i modulacji immunologicznej, a także w badaniu transportu składników odżywczych i leków; komórki THP-1 mogą ulegać polaryzacji do makrofagów M1 lub M2
- **3T3-L1** – pochodzące z mysiego adipocytu, powszechnie używane do badania procesów różnicowania komórek tłuszczowych
- **hMSCs** – pochodzące z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych, które mogą różnicować się w adipocyty



Ryc. 21. Przykładowe linie komórkowe często wykorzystywane w badaniach naukowych; obraz w mikroskopie kontrastowo-fazowym; a. NHDF – Normal Human Dermal Fibroblast (PromCell) promocell.com/us_en/normal-human-dermal-fibroblasts-nhdf.html; b. THP-1 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-THP-1/300356; c. 3T3-L1 (Cytion) cytion.com/pl/komorki-3T3-L1/400107

Tkanka nerwowa

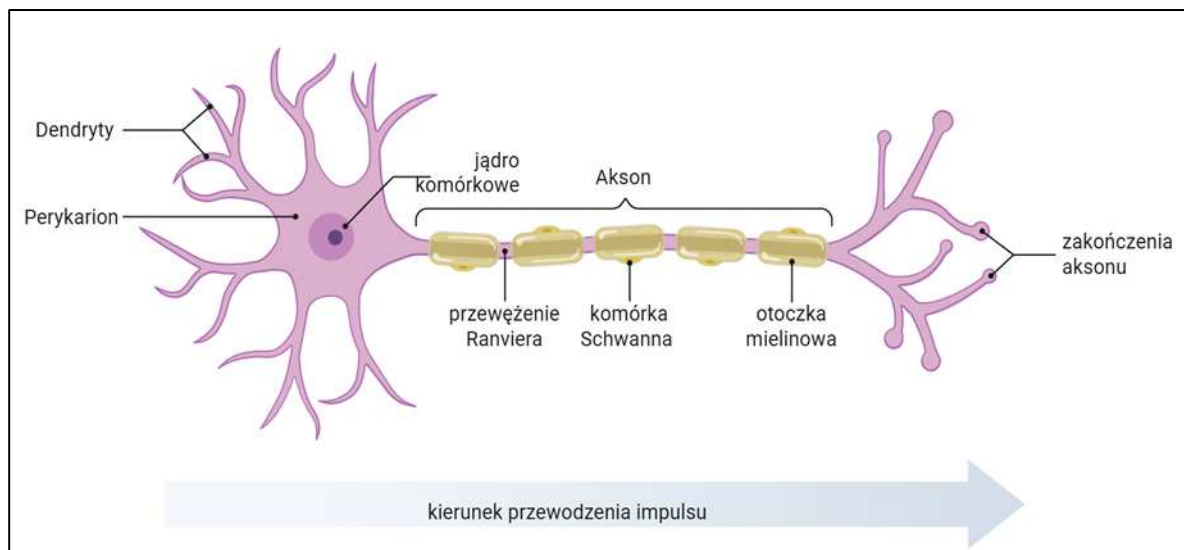
Tkanka nerwowa jest wyspecjalizowaną tkanką, która umożliwia komunikację pomiędzy różnymi częściami ciała, a także koordynację działań fizjologicznych.

Tkanka nerwowa pełni szereg istotnych funkcji w organizmach zwierzęcych:

- przewodzenie impulsów nerwowych – neurony są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów elektrycznych, które pozwalają na szybką komunikację pomiędzy narządami
- przetwarzanie informacji – neurony wchodzi w interakcje, tworząc sieci, które przetwarzają informacje sensoryczne i motoryczne, np. integracja sygnałów w mózgu w celu podjęcia czynności motorycznych
- utrzymanie homeostazy – komórki glikowe, zwłaszcza astrocyty, pełnią rolę w utrzymaniu odpowiedniego środowiska jonowego, odżywianiu neuronów oraz usuwaniu zbędnych produktów metabolicznych

- izolacja i przyspieszanie przewodzenia impulsów – komórki glejowe, takie jak oligodendrocyty i komórki Schwanna, wytwarzają osłonki mielinowe, które przyspieszają przewodzenie impulsów elektrycznych w aksonach

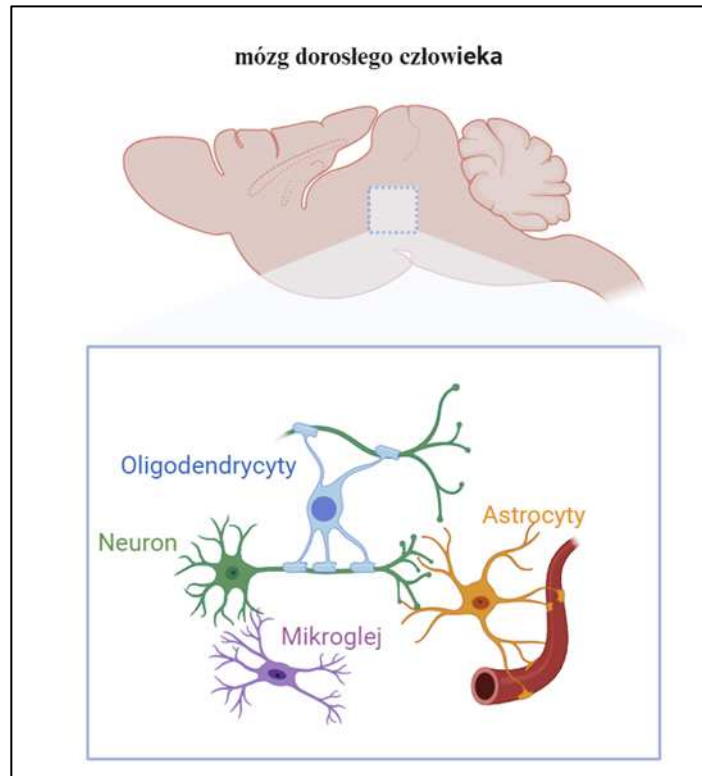
Tkanka nerwowa składa się głównie z dwóch typów komórek: **neuronów** oraz **komórek glejowych**.



Ryc. 22. Budowa neuronu: Ciało komórki nerwowej (perykarion) – zawiera jądro komórkowe oraz organelle niezbędne do funkcjonowania komórki. Ciało komórki nerwowej jest zazwyczaj owalne lub nieregularne. Dendryty – rozgałęzione wypustki cytoplazmatyczne, które odbierają bodźce z innych komórek nerwowych lub receptorów sensorycznych. Akson – pojedyncza, długa wypustka osiowa komórki nerwowej, która przewodzi impulsy nerwowe od ciała komórki do innych neuronów lub efektorów (np. mięśni, gruczołów). Akson może być otoczony osłonką mielinową, co przyspiesza przewodzenie impulsów. Komórki Schwanna (lemocyty) – odpowiedzialne za wytwarzanie mieliny w obwodowym układzie nerwowym. Każda komórka Schwanna tworzy osłonkę mielinową wokół jednego aksonu. BioRender – obraz zmodyfikowany

W obrazie mikroskopowym, tkanka nerwowa prezentuje się jako gęsto upakowane komórki o różnej wielkości i kształcie. Komórki nerwowe barwią się czterotlenkiem osmu na fioletowo, natomiast pęcherzykowate jądro pozostaje słabo wybarwione.

Komórki glejowe – stanowią wsparcie strukturalne, odżywcze oraz ochronne dla neuronów.

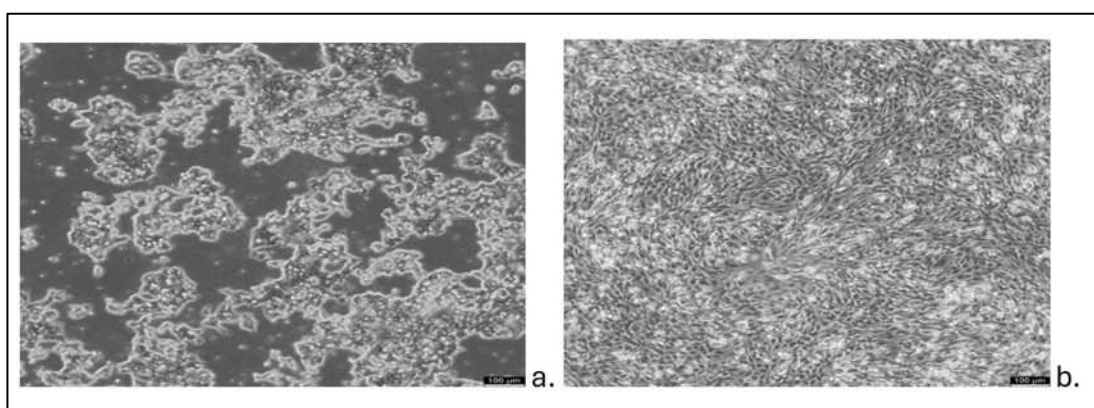


Ryc. 23. Komórki glejowe OUN: Astrocyty – komórki o gwiazdzistym kształcie (liczne wypustki), które pełnią rolę w utrzymaniu homeostazy jonowej, regulacji przepływu krwi w mózgu, odżywianiu oraz ochronie neuronów przed toksynami; Oligodendrocyty – komórki, które w ośrodkowym układzie nerwowym wytwarzają mielinę, tworząc osłonki mielinowe wokół aksonów, co zwiększa szybkość przewodzenia impulsów nerwowych. Mikroglej (mezoglej) – komórki pełniące funkcję obronną, działając jako makrofagi w ośrodkowym układzie nerwowym, usuwając zniszczone komórki oraz patogeny BioRender – obraz zmodyfikowany

Linie komórkowe wykorzystywane w badaniach naukowych

Badania na modelach komórek nerwowych są kluczowe dla zrozumienia mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, a także w kontekście badań nad regeneracją nerwów. W badaniach naukowych w zakresie neurobiologii stosuje się różne linie komórkowe, które pozwalają na badanie mechanizmów neurobiologicznych oraz testowanie potencjalnych terapii.

- **PC12** – linia komórkowa pochodząca z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura; stanowi mieszaninę komórek neuroblastycznych i eozynofilowych; syntetyzuje, przechowuje i uwalnia noradrenalinę i dopaminę; stosowana w badaniach nad proliferacją i różnicowaniem komórek nerwowych oraz neuroplastycznością
- **C6** – typ komórek glejowych o morfologii fibroblastów i pochodzi z glejaka szczura Wistar-Furth; jest często wykorzystywana w badaniach neuro-onkologicznych
- **OLN-93k** – linia komórek oligodendrogleju pochodząca z pierwotnych kultur glejowych mózgu szczura; wykorzystywana do badania specyficznych mechanizmów regulujących proliferację i różnicowanie oligodendrocytów w warunkach *in vitro* oraz oddziaływań molekularnych z innymi komórkami układu nerwowego



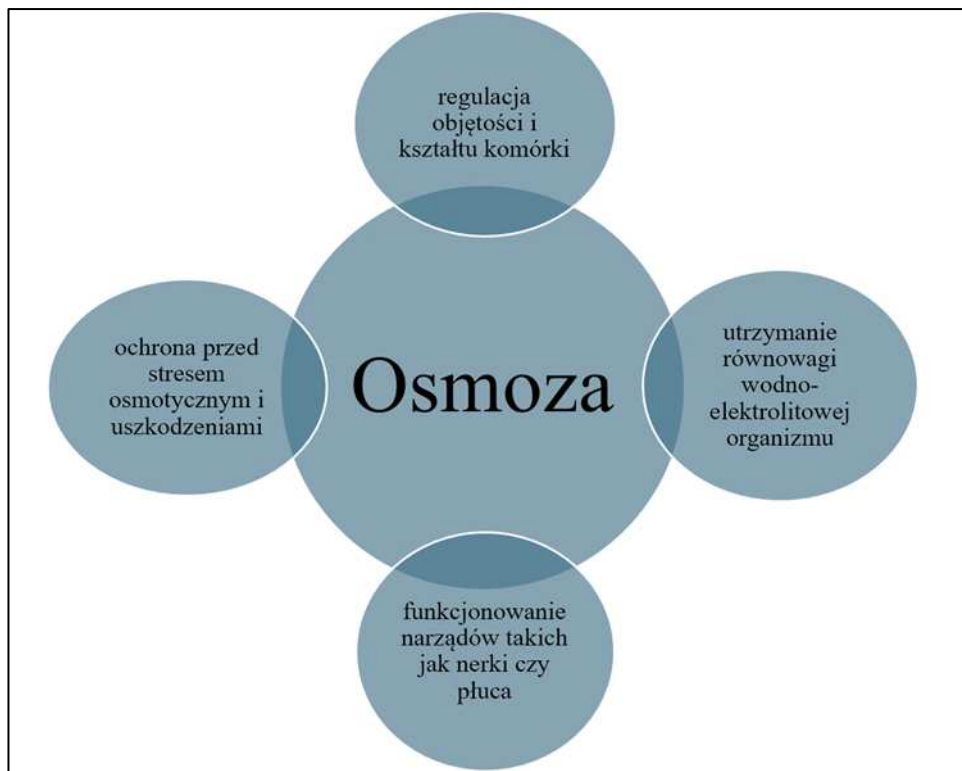
Ryc. 24. Przykładowe linie komórkowe wykorzystywane w badaniach naukowych z zakresu neurobiologii; obraz w mikroskopie kontrastowo-fazowym; a. PC12 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-PC-12/500311; b. C6 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-C6/500142

Znaczenie osmozy w komórkach zwierzęcych

Osmoza jest podstawowym zjawiskiem warunkującym życie komórek. W komórkach zwierzęcych proces ten jest szczególnie istotny, ponieważ brak ściany komórkowej czyni je bardziej wrażliwymi na zmiany środowiska

osmotycznego. Zrozumienie mechanizmów osmozy i roli akwaporyn (kanały wodne) i innych kotransporterów ma kluczowe znaczenie nie tylko dla fizjologii, ale także dla diagnostyki i terapii zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej.

Proces osmozy stanowi jedno z fundamentalnych zjawisk fizjologicznych warunkujących homeostazę komórek w organizmach żywych. Szczególne znaczenie ma on w odniesieniu do erytrocytów, które jako pozbawione jądra i organelli komórki są wyjątkowo wrażliwe na zmiany ciśnienia osmotycznego otaczającego środowiska.

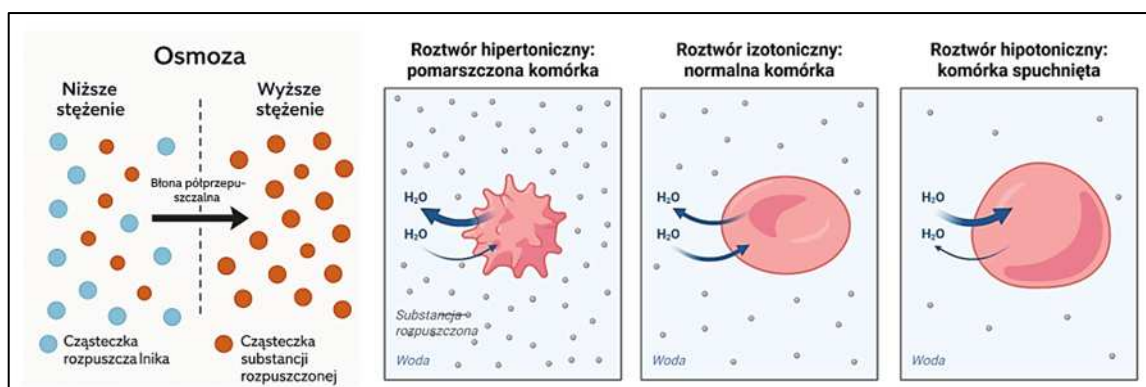


Ryc. 25. Rola procesu osmozy w organizmie

Półprzepuszczalna błona erytrocytów umożliwia swobodny przepływ wody, przy jednoczesnym kontrolowanym transporcie jonów, co pozwala na utrzymanie ich charakterystycznego, dwuwklęsłego kształtu oraz elastyczności niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania w krążeniu.

Osmoza to proces fizykochemiczny polegający na spontanicznym przemieszczaniu się cząsteczek rozpuszczalnika (najczęściej wody) przez błonę półprzepuszczalną

z roztworu o niższym stężeniu substancji rozpuszczonej (hipotonicznego) do roztworu o wyższym stężeniu (hipertonicznego). Błona półprzepuszczalna przepuszcza wodę, natomiast ogranicza transport wielu cząsteczek i jonów rozpuszczonych w wodzie. Podstawą tego procesu jest gradient stężeń substancji rozpuszczonych oraz ciśnienie, które należy użyć do zahamowania dalszego przyrostu wody, określane jako ciśnienie osmotyczne. W wyniku różnicy stężeń substancji rozpuszczonej po obu stronach błony układ dąży do wyrównania tych stężeń, co prowadzi do osiągnięcia stanu równowagi osmotycznej – wówczas przepływ wody ustaje, ponieważ ciśnienie osmotyczne po obu stronach błony jest wyrównane. Inaczej mówiąc, jeśli komórka otoczona jest stężonym roztworem, w jej wnętrzu powstaje ciśnienie osmotyczne, od którego zależy siła pobierania wody. W roztworze hipertonicznym traci wodę, kurczy się i ulega odwodnieniu. W roztworze hipotonicznym komórka pęcznieje i może ulec osmolizie. Utrzymanie prawidłowej objętości komórki jest możliwe dzięki aktywnemu transportowi jonów (np. pompa Na^+/K^+ -ATPaza) oraz kanałom wodnym – akwaporynom.



Ryc. 26. Istota procesu osmozy przez błonę półprzepuszczalną. a, b, c procesy zachodzące w erytrocytach znajdujących się w różnych roztworach. Proces osmoregulacji na przykładzie krwinek czerwonych. Utworzone w <https://BioRender.com>. Zaburzenia równowagi osmotycznej prowadzą do istotnych zaburzeń morfologicznych i czynnościowych krwinek. W środowisku hipotonicznym erytrocyty ulegają obrzękowi i hemolizie, natomiast w warunkach hipertonicznych dochodzi do ich odwodnienia, kurczenia się i utraty zdolności transportowych. Strzałki pokazują kierunek przepływu wody. BioRender – obraz zmodyfikowany

Procesy osmotyczne stanowią nie tylko podstawowy mechanizm fizjologiczny, ale także istotny element w diagnostyce i patofizjologii chorób. Zjawisko osmozy jest wykorzystywane w terapii nerkozastępczej, zarówno na drodze hemodializy, kiedy krew pacjenta jest przepompowywana poza ustrój do dializatora (tzw. sztuczna nerka), jak i na drodze dializy otrzewnowej, w której otrzewna jest wykorzystywana jako błona dializacyjna – wówczas do jamy otrzewnej wprowadza się płyn dializacyjny o odpowiednim składzie osmotycznym (np. roztwory glukozy).

Poza ogromnym znaczeniem terapii nerkozastępczej osmoza wywołana dializą otrzewnową może pomóc w leczeniu przeciążenia płynami u pacjentów z oporną na leczenie niewydolnością serca.

Tabela 3. Znaczenie warunków izosmotycznych w procedurach laboratoryjnych

| Procedura | Dlaczego ważne są warunki izosmotyczne? | Następstwa błędów |
|--|--|---|
| Pobieranie krwi do próbki | Zachowanie prawidłowego kształtu i objętości erytrocytów; unikanie hemolizy już w momencie pobrania. | Hemoliza in vitro → fałszywie podwyższony poziom K^+ , LDH, enzymów wątrobowych; niemożność wykonania części badań. |
| Przechowywanie próbki krwi | Utrzymanie stabilności erytrocytów i parametrów hematologicznych. | Obrzęk erytrocytów, hemoliza; zafałszowanie wyników morfologii (MCV ↑, Hct ↓). |
| Przygotowanie rozmazów krwi | Erytrocyty muszą zachować naturalny kształt do oceny morfologicznej. | Zmiany artefaktowe: obrzęk, fragmentacja, trudność w ocenie mikroskopowej. |
| Barwienie preparatów | Roztwory barwiące powinny być izotoniczne, aby nie wywołać osmotycznych zmian w erytrocytach. | Pęcznienie lub kurczenie się krwinek, artefakty w obrazie barwienia. |
| Badania biochemiczne (osocze/serum) | Prawidłowa integralność erytrocytów zapobiega uwolnieniu składników wewnątrzkomórkowych. | Hemoliza → fałszywe wyniki (hiperkaliemia, wzrost aktywności enzymów). |

Z osmozą jest także związany transport wody w jelicie, gdzie woda jest transportowana przez nabłonek przy braku przezłonowych różnic ciśnienia osmotycznego. Ze względu na rozpad białek i cukrów osmolarność w jelicie

po posiłku może osiągnąć wartości wyższe od osmolarności osocza krwi. Mimo to woda przemieszcza się ze światła jelita do krwioobiegu i dziennie u człowieka w jelitach wchłaniane jest ok. 8 l wody oraz 1 mol D-glukozy. Uważa się, że to glukoza, stymulując transport sodu przez błonę szczoteczkową enterocytów (kotransport Na^+ i D-glukozy przez kotransporter SGLT1), napędza tzw. lokalną osmozę. Woda podąża zatem za transportem cukru i soli do krwioobiegu. Te wzajemne powiązania między transportem glukozy, soli i wody stanowią podstawę terapii stosowanej w leczeniu biegunek wydzielniczych w przebiegu cholery czy doustnej terapii nawadniającej. W takich przypadkach stosuje się doustne roztwory soli fizjologicznej zawierające glukozę. Kotransporter sodowo-glukozowy 1 (SGLT1) może wpływać na transport wody, a przepuszczalność wody przez SGLT1 jest niezależna od wielkości i kierunku gradientu. Szacuje się, że w każdym enterocycie znajduje się ok. 250 tys. kopii tego białka.

Stres osmotyczny może także pełnić funkcję regulatora prawidłowego funkcjonowania komórek. W odpowiedzi na zmiany w środowisku osmotycznym dochodzi bowiem do zmiany ekspresji genów i aktywności metabolicznej komórek. Zmiany osmolalności zewnątrzkomórkowej zmieniają objętość komórki, a w konsekwencji – stężenie wewnątrzkomórkowych makrocząsteczek, które jest kluczowym parametrem wpływającym na organizację przestrzenną i ciśnienie w jądrze komórkowym. Stres hiperosmotyczny kurczy jądro komórkowe i powoduje, że przyjmuje ono nieregularny kształt, podczas gdy stres hipoosmotyczny powoduje jego pęcznienie do rozmiaru ograniczonego przez rozciągnięcie blaszki jądrowej i nadaje mu gładki, okrągły kształt. Indukowane osmotycznie zmiany w strukturze wewnętrznej i układzie chromatyny, a także zmiany w błonie jądrowej i porach jądrowych, prawdopodobnie wpływają na transkrypcję genów i/lub transport jądrowo-cytoplazmatyczny. Taki mechanizm regulacyjny funkcjonuje w celu ochrony tkanek i narządów układu mięśniowo-szkieletowego, nerek, układu sercowo-naczyniowego i płuc, a także komórek poddanych urazowi osmotycznemu, np. po urazie mechanicznym. W celu

wyjaśnienia tego procesu i reakcji komórek na zmiany osmolalności w badaniach często wykorzystuje się komórki tkanki chrzęstnej. Tkanka chrzęstna reaguje na sygnały fizyczne, a chrząstka wręcz wymaga obciążenia stawów w celu zachowania homeostazy. Wykazano, że stres osmotyczny poza zmianą ekspresji genów, zmienia organizację aktyny oraz sygnalizację wapniową w chondrocytach stawowych i może generować transdukcję obciążenia mechanicznego w aktywność biologiczną. Stres osmotyczny może także oddziaływać na jądro poprzez demontaż cytoszkieletu aktynowego w wyniku stresu hipoosmotycznego. Można zatem wnioskować, że istnieje fizyczne połączenie między macierzą zewnątrzkomórkową a genomem, a stres osmotyczny może również oddziaływać na genom poprzez bezpośredni szlak biofizyczny. Konsekwencją jest zmiana kondensacji chromatyny, a tym samym zmiany w transkrypcji genów.

Rozdział 3.

Biochemiczne podstawy diagnostyki laboratoryjnej

Cel ćwiczeń:

- Zapoznanie się z historią testów diagnostycznych
- Zapoznanie się z podstawowymi zasadami pracy w laboratorium
- Wykonanie podstawowych reakcji identyfikujących związki organiczne

Diagnostyka laboratoryjna określana mianem medycyny laboratoryjnej, analityki medycznej, analityki klinicznej jest dyscypliną medycyny, której zadaniem jest analiza składu chemicznego i parametrów fizykochemicznych krwi, moczu, wymazów czy wydzielin oraz innych materiałów pobranych od pacjenta. Celem diagnostyki jest dostarczenie obiektywnych danych niezbędnych do podjęcia odpowiedniej profilaktyki, diagnozowania, monitorowania terapii i prognozowania chorób. Rozwój tej dziedziny odzwierciedla postęp wiedzy biochemicznej, technologicznej i medycznej. Niniejszy rozdział przedstawia najważniejsze odkrycia i wynalazki, które ukształtowały tę dyscyplinę, od starożytnych obserwacji po nowoczesne techniki biologii i chemii.

Początki chemii klinicznej sięgają starożytności. Analiza płynów ustrojowych, głównie moczu (łac. *urina*) była pierwszą formą diagnostyki. Hipokrates był jednym z pierwszych uczonych, który podjął się próby wyjaśnienia zależności pomiędzy właściwościami płynów ustrojowych a stanem zdrowia człowieka. Zajmował się właściwościami moczu w kontekście teorii humorów zakładającej, że wzajemne stosunki, pomiędzy istniejącymi czterema płynami ciała (humorami) – krwią, żółtą żółcią, śluzem (flegmą) i czarną żółcią wypełniającymi ludzki organizm, determinują zdrowie człowieka. W zaburzeniach tej równowagi upatrywano przyczynę wielu chorób. U podstaw metod

diagnostycznych moczu leżała ocena wyglądu, zapachu, a nawet smaku moczu, który wskazywać miała na lokalizację schorzenia i stan chorego.

W odróżnieniu od Hipokratesa, Galen wysunął śmiały jak na tamte czasy wniosek, że mocz jest filtratem krwi powstającym w nerkach. Pomimo tak nowoczesnych też w swych badaniach opierał się tylko na obserwacji cech fizycznych moczu, a nie na analizie jego składu chemicznego.

Wynalezienie na przełomie XVI i XVII wieku pierwszych mikroskopów optycznych, oraz ich udoskonalenie przez Antoniego van Leeuwenhoek'a i Roberta Hooke'a, pozwoliło poznać świat komórek i mikroorganizmów. Stworzyło także możliwość mikroskopowej analizy płynów ustrojowych m.in. moczu. W XVIII i XIX wieku mikroskopowe badanie moczu zaczęło się rozwijać jako standardowa procedura diagnostyczna. Możliwa była identyfikacja poszczególnych elementów upostaciowanych w osadzie moczu np. erytrocytów, leukocytów, komórek nabłonka, wałeczek (odlewy kanalików nerkowych) czy kryształów i bakterii.

Kolejny przełom w diagnostyce nastąpił dopiero w XVIII i XIX wieku, kiedy to prace Antoine Lavoisier'a i wielu innych chemików położyły podwaliny pod chemię ilościową. Wynikiem tego była możliwość przeprowadzania precyzyjniejszych analiz, pozwalających dokonywać identyfikacji i pomiaru konkretnych substancji chemicznych, takich jak np. białka, glukozy, elektrolitów w płynach biologicznych (krwi, moczu i innych). To właśnie wtedy chemia kliniczna zaczęła wyodrębniać się jako samodzielna dyscyplina na pograniczu medycyny i chemii. W Niemczech w pierwszej połowie XIX wieku chemia kliniczna zaczęła być praktykowana stając się w 1840 roku przedmiotem akademickim. W tym okresie rozpoczęło prace nad badaniami składu krwi np. oznaczaniem żelaza i białek. Pod koniec XIX wieku w wielu klinikach i szpitalach zaczęły powstawać dedykowane laboratoria kliniczne. XIX wiek to także czas pojawienia się prostych testów chemicznych do oznaczania podstawowych składników krwi i moczu.

Współcześnie chemia kliniczna, będąc jedną z podstawowych dziedzin diagnostyki laboratoryjnej, zajmuje się precyzyjną oceną składu biochemicznego płynów ustrojowych i tkanek organizmu ludzkiego. Najczęściej badanymi materiałami są krew oraz mocz. Do monitorowania przebiegu chorób oraz oceny skuteczności leczenia zastosowanie znalazły także inne materiały biologiczne wykorzystywane w chemii klinicznej takie jak płyn mózgowo-rdzeniowy, wydzieliny i wydaliny (np. kał i pot) czy rzadziej stosowane fragmenty tkanek. Wyniki badań laboratoryjnych pomagają poznać ogólny stan zdrowia pacjenta i w razie potrzeby, zaplanować leczenie. W XX wieku nastąpił prawdziwy rozwój medycyny laboratoryjnej. Wynalezienie fotometrii, metod elektroforetycznych, chromatografii umożliwiło szybszą i precyzyjną analizę parametrów biochemicznych. Ostatnie lata XXI wieku, spowodowane dalszym rozwojem technologii m.in. wynalezienie najnowszej generacji mikroskopów elektronowych oraz zautomatyzowanie analizatorów laboratoryjnych, spowodowały skrócenie oczekiwania na wyniki z jednoczesną możliwością wykrywania i identyfikacji śladowych ilości parametrów biochemicznych w badanym materiale klinicznym.

Pierwsze testy diagnostyczne opierały się na reakcjach chemicznych zachodzących w materiale biologicznym, takich jak mocz czy krew. Już w XVII wieku zauważono, że obecność białka w moczu może świadczyć o chorobie nerek – zjawisko to opisał Dekkers Leiden, obserwując powstawanie osadu białkowego po dodaniu kwasu octowego. W wieku XIX Johann Florian Heller opracował klasyczny test pierścieniowy Hellera, w którym po dodaniu stężonego kwasu azotowego na granicy cieczy pojawia się biały pierścień, świadczący o obecności albuminy w moczu. Podobnie w diagnostyce cukrzycy ogromne znaczenie miały reakcje redukcji miedzi. Karl Trommer i Hermann Fehling opracowali próby Trommera i Fehlinga, oparte na redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ przez cukry redukujące, co prowadziło do powstania czerwonego osadu tlenku miedzi(I). Dzięki tym reakcjom po raz pierwszy możliwe było potwierdzenie obecności glukozy w moczu pacjentów z cukrzycą. W połowie XIX wieku Ferdinand Rose

i niezależnie od niego polski fizjolog Gustaw Piotrowski opisali reakcję biuretową, polegającą na tworzeniu kompleksu jonów miedzi (II) z wiązaniami peptydowymi w środowisku alkalicznym. Fioletowe zabarwienie roztworu stało się podstawą do ilościowego oznaczania białek w surowicy krwi i do dziś stanowi jeden z klasycznych testów biochemicznych. Reakcje te stały się fundamentem metod kolorymetrycznych, a następnie spektrofotometrycznych, które w XX wieku zrewolucjonizowały diagnostykę laboratoryjną.

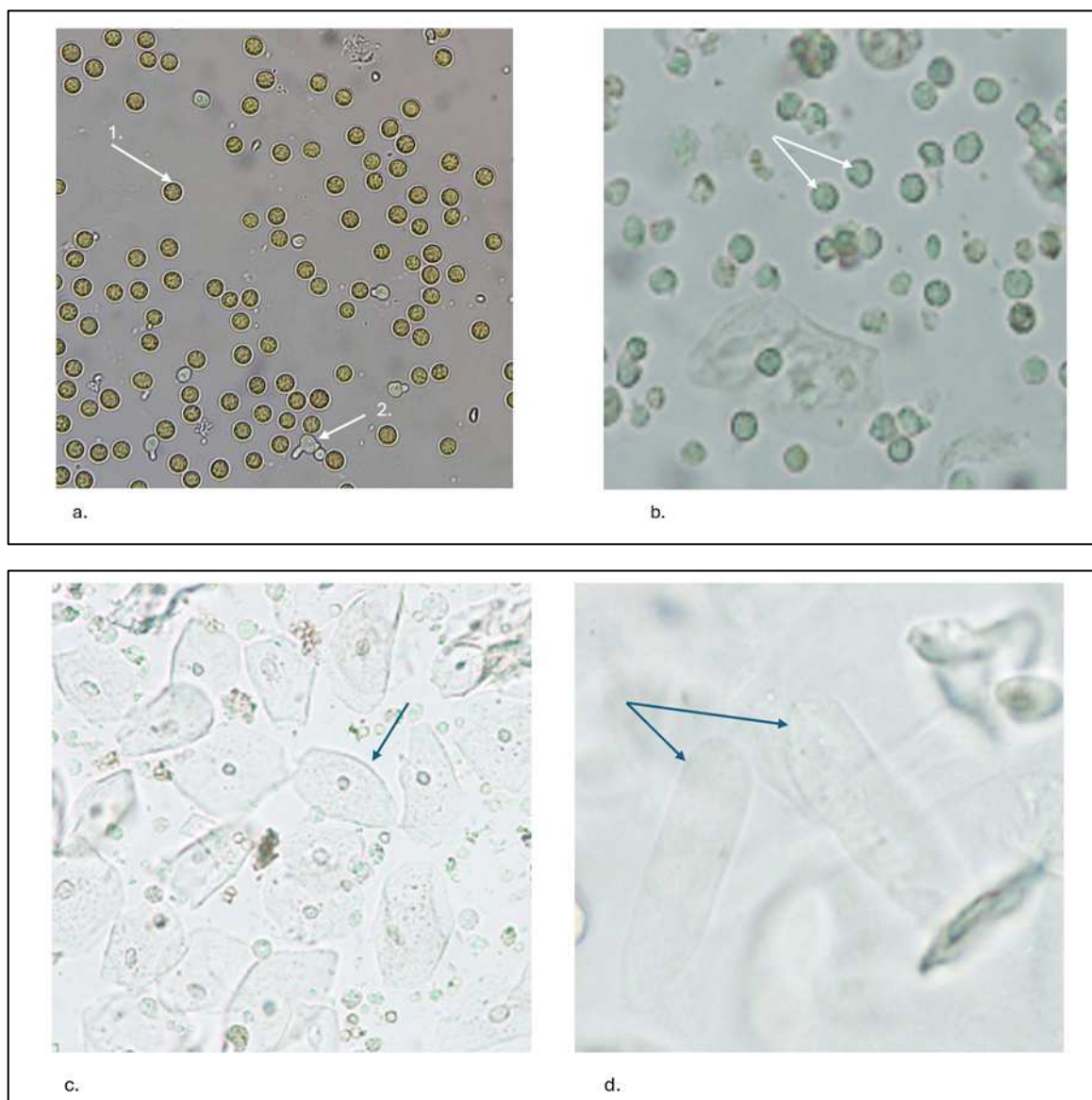
Dzisiejsze badanie ogólne moczu zgodnie z zalecaniami towarzystw diagnostyki laboratoryjnej obejmuje ocenę paskową (tzw. „sucha chemia”) oraz ocenę mikroskopową osadu. Obecnie podstawą badania moczu w każdym laboratorium są testy paskowe.



Ryc. 1. Paskowy test moczu. Fot. Ajay Kumar Chaurasiya

Testy paskowe składają się z dwóch elementów: paska z tworzywa sztucznego (niereaktywnego chemicznie) oraz naniesionych na niego pól testowych. Zmiany zabarwienia pól testowych są wynikiem reakcji zachodzących pomiędzy odczynnikami (pokrywającymi pola testowe) a konkretnymi związkami zawartymi w analizowanym materiale. W laboratoriach do rutynowego badania moczu stosowane są paski zawierające 10 pól odczynnikowych, dzięki którym

można oznaczyć: ciężar właściwy pH, krew, esterażę leukocytową, azotyny, białko, glukozę, ketony, bilirubinę i urobilinogen.



Ryc. 2. Analiza mikroskopowa moczu, mikroskop świetlny, powiększenie 400×

a. Erytrocyty (1) i drożdżaki (2) widoczne w moczu pod mikroskopem. fot. Ajay Kumar Chaurasiya.

<https://pharmacopola.pl/mikroskopowe-badanie-moczu/>;

b. Leukocyty widoczne w moczu pod mikroskopem; preparat niebarwiony; Źródło: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej dotyczące badania upostaciowanych elementów moczu w medycznym laboratorium diagnostycznym,

c. komórki nabłonka płaskiego widoczne w moczu pod mikroskopem Preparat niebarwiony;

d. Waleczki szkliste Komórki nabłonka płaskiego widoczne w moczu pod mikroskopem Preparat niebarwiony. Źródło: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej dotyczące badania upostaciowanych elementów moczu w medycznym laboratorium diagnostycznym

Tabela 1. Przykładowe rodzaje materiałów biologicznych i wybrane parametry wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej

| Material kliniczny | Rodzaj wykonywanych badań | Przykładowe parametry |
|--|--|---|
| krew | morfologia | Krwinki czerwone (erytrocyty), krwinki białe (leukocyty – z podziałem na 5 frakcji: neutrofile, limfocyty, monocyty, eozynofile, bazofile), płytki krwi (trombocyty), wraz z wskaźnikami ich wielkości (MCV, MCH, MCHC), ilości hemoglobiny (Hb), hematokrytu (HCT) i parametrów płytek (MPV, PDW, P-LCR) |
| | badania biochemiczne | poziom glukozy, kreatyniny, lipidogram, |
| | układ krzepnięcia | koagulogram |
| mocz | badanie ogólne | parametry fizyczne (barwa, przejrzystość, ciężar właściwy, pH), chemiczne (białko, glukoza, ciała ketonowe, bilirubina, urobilinogen, azotyny) oraz elementy morfotyczne i mikrobiologiczne w osadzie (erytrocyty, leukocyty, nabłonki, bakterie, kryształki, wałeczki, grzyby) |
| | posiew | |
| kał | badanie ogólne | krew utajona, stany zapalne |
| | badania mikrobiologiczne | bakterie, pasożyty |
| ślina | badanie ogólne | hormony (kortyzol, progesteron, estrogeny), monitorowanie niektórych leków |
| płyny ustrojowe (płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, limfa) | badanie ogólne | białko, glukoza, sód, potas, magnez, jony chlorkowe, pH erytrocyty, leukocyty |
| wymazy (materiał pobierany z gardła, nosa, ran czy dróg rodnych) | badanie mikrobiologiczne | identyfikacji patogenów |
| wydzieliny z przewodu pokarmowego (sok żołądkowy dwunastniczy, trzustkowy, żółć) | badanie treści | śluz, żółć, soki trawienne (żołądkowy, trzustkowy), krew lub ropę w kale |
| fragmenty tkanek (biopsje) | badania histopatologiczne i cytologiczne | ocena zmienionych chorobowo komórek i tkanek |

Badanie ogólne moczu pozwala ocenić pracę nerek i dróg moczowych. Pomaga wykryć cukrzycę, choroby wątroby i inne schorzenia. Badanie

bakteriologiczne moczu (test mikrobiologiczny, posiew) pozwala wykryć bakterie (lub grzyby) w moczu. Przeprowadzenie posiewu moczu jest szczególnie istotne w przebiegu chorób infekcyjnych. Jest on kluczowym badaniem w diagnozowaniu zakażeń dróg moczowych (ZUM).

Podobnie jak w przypadku moczu, ocena laboratoryjna innych płynów ustrojowych, takich jak np. krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, opierają się na badaniach fizykochemicznych i mikroskopowych. Dzięki tym badaniom możemy dokładnie ocenić stężenie białka, glukozy, ciał ketonowych, bilirubiny, kreatyniny, aktywność enzymów, a także sprawdzić obecność elementów upostaciowanych (komórki i kryształki).

Nowoczesne systemy laboratoryjne pozwalają szybko badać enzymy, elektrolity, lipidy i inne parametry metaboliczne. Dzięki temu możliwa jest szybka ocena stanu zdrowia pacjenta oraz potwierdzenie lub wykluczenie choroby. Badania płynów ustrojowych są szeroko wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej. Pomagają w rozpoznawaniu i ocenie przebiegu chorób neurologicznych, reumatologicznych oraz nowotworowych.

Badanie kału jest nieinwazyjną analizą stolca. Wykonując analizę makroskopową, mikroskopową i chemiczną tego materiału biologicznego ocenia się prawidłowość funkcjonowania układu pokarmowego. Badanie to jest kluczowym narzędziem diagnostycznym w wykrywaniu problemów jelitowych przy biegunkach, bólach brzucha czy podejrzeniu raka jelita grubego czy trzustki. Pozwala ono wykryć pasożyty, bakterie, krwawienia, stany zapalne.

Interpretacja wyników badań z zakresu chemii klinicznej wymaga dobrej znajomości fizjologii i patofizjologii procesów metabolicznych. Odchylenia od wartości referencyjnych mogą wskazywać na zaburzenia funkcji narządów, procesy zapalne, choroby metaboliczne, zatrucia lub inne stany patologiczne. Chemia kliniczna odgrywa kluczową rolę w diagnostyce chorób wątroby, nerek, serca, trzustki oraz zaburzeń endokrynologicznych i metabolicznych.

Tabela 2. *Kalendarium kamieni milowych w chemii klinicznej (1694–XXI w.) K. Klimasz, P.J. Tomasik „Kamienie milowe w chemii klinicznej”*

| Rok / Okres | Odkrycie / Postać | Znaczenie dla diagnostyki laboratoryjnej |
|-------------|---|--|
| 1694 | Dekkers Frederik | Zaobserwował, że mocz zawierający białko tworzy osad podczas gotowania z kwasem octowym – początek badań nad białkomoczem |
| 1674–1776 | Thomas Willis / Matthew Dobson | Wykazali obecność cukru w moczu chorych na cukrzycę – narodziny biochemicznej diagnostyki cukrzycy |
| 1789 | Antoine François de Fourcroy | Odkrycie cholesterolu – początek chemii lipidów |
| 1830–1833 | Gerardus Mulder, Ferdinand Rose | Opisanie reakcji biuretowej – pierwsze ilościowe oznaczenie białka |
| 1841–1849 | Karl Trommer, Hermann von Fehling | Próby Trommera i Fehlinga – klasyczne reakcje wykrywania cukrów redukujących w moczu |
| 1844 | Johann Florian Heller | Opracował test pierścieniowy Hellera do wykrywania albuminy w moczu |
| 1847 | Henry Bence Jones | Odkrycie białka Bence Jonesa w moczu – początek diagnostyki szpiczaka mnogiego |
| 1850 | Carl Schmidt | Jedne z pierwszych analiz składu elektrolitowego krwi – oznaczenia potasu, sodu, fosforu i wapnia; wprowadzenie pojęcia równowagi elektrolitowej |
| 1854 | Jules Duboscq | Budowa pierwszego kolorymetru – początek obiektywnego pomiaru barwy |
| 1868 | Max Jaffé | Reakcja Jaffego – kolorymetryczne oznaczanie kreatyniny; podstawa oceny czynności nerek |
| 1884 | Paul Ehrlich | Reakcja bilirubiny z kwasem diazowym – początki oznaczania bilirubiny w diagnostyce chorób wątroby |
| 1901–1906 | Paul Ehrlich, Richard Bauer | Wprowadzenie testów na urobilinogen i galaktozę – ocena funkcji wątroby i metabolizmu węglowodanów |
| 1904–1922 | Otto Knut Folin | Wprowadził kolorymetrię do chemii klinicznej; opracował ilościowe metody oznaczania mocznika, kwasu moczowego, kreatyniny i białka |
| 1910 | A. Grigaut (reakcja Liebermanna-Burcharda) | Pierwsza metoda kolorymetryczna oznaczania cholesterolu |
| 1930 | Hubert D. Kay | Pierwsza metoda oceny aktywności fosfatazy alkalicznej – początek enzymologii klinicznej |

| Rok / Okres | Odkrycie / Postać | Znaczenie dla diagnostyki laboratoryjnej |
|--------------|---|--|
| 1938 | Michael Samogyi | Opracowanie metody oznaczania amylazy – diagnostyka chorób trzustki |
| 1940–1955 | Wróblewski, LaDue, Karmen | Opracowanie metod oznaczania ALT, AST, LDH i CPK – podstawowe enzymy w diagnostyce serca i wątroby |
| 1949 | Alf Lund | Fluorymetryczna metoda oznaczania adrenaliny – początek endokrynologii laboratoryjnej |
| 1980–1990 | Metody immunoturbidymetryczne (np. CRP) | Skrócenie czasu oznaczeń, wzrost czułości i specyficzności metod |
| Koniec XX w. | Wprowadzenie metod immunochemicznych i fizykochemicznych | Rozwój chromatografii, elektroforezy kapilarnej i spektrometrii mas – rewolucja w toksykologii i biochemii klinicznej |
| XXI w. | Proteomika, metabolomika, diagnostyka molekularna | Przejęcie od analizy pojedynczych parametrów do systemowego obrazu funkcjonowania organizmu |
| XXI w. | wprowadzenie diagnostyki Point-of-Care Testing (POCT) | umożliwienie wykonywania badań przy łóżku pacjenta lub w warunkach ambulatoryjnych (np. glukometry) |
| obecnie | systemy Informacji Laboratoryjnej (LIS) | komputeryzacja laboratoriów i cyfryzacja wyników badań (wyniki dostępne online) usprawniły zarządzanie danymi i komunikację z lekarzem i pacjentem |
| obecnie | rozwój sztucznej inteligencji (AI) i bioinformatyki w diagnostyce, rozwój diagnostyki <i>in vitro</i> | wsparcie w interpretacji złożonych wyników i identyfikacji nowych biomarkerów |

Rozdział 4.

Genetyczne i biochemiczne podstawy wybranych chorób genetycznych

Cel ćwiczeń:

- Zapoznanie się z etiologią wybranych chorób genetycznych
- Analiza mechanizmów powstawania objawów w enzymopatiach i proteinopatiach
- Metody diagnostyki wybranych chorób
- Zapoznanie się z międzynarodową klasyfikacją enzymów CE

Choroby genetyczne stanowią zróżnicowaną grupę jednostek chorobowych, których wspólnym mianownikiem jest obecność zmian (mutacji) w materiale genetycznym. Mutacja obecna w DNA komórek rozrodczych jest przekazywana potomstwu, prowadząc do zaburzenia funkcjonowania komórek, tkanek lub całych układów. Ta sama choroba genetyczna u różnych pacjentów może wynikać z różnych mutacji w obrębie danego genu (lub nawet w kilku różnych genach), co prowadzi do zmiennego obrazu klinicznego. Dlatego choroby genetyczne często cechuje duża różnorodność mutacji i zmienność objawów. Pacjentów ze wszystkimi zaburzeniami genetycznymi, także z chorobami rzadkimi o podłożu genetycznym, przyjmują poradnie genetyczne. Wizyta w poradni genetycznej wymaga skierowania do poradni genetycznej od lekarza POZ lub lekarza specjalisty. Listę poradni oraz wiadomości niezbędne do przygotowania się do wizyty w poradni genetycznej można znaleźć na stronie:

<https://chorobyrazadkie.gov.pl/pl/swiadczeniodawcy/poradnie>

W zależności od przyjętego kryterium choroby genetyczne można podzielić na kilka głównych grup:

Klasyfikacja według ilości genów wpływających na pojawienie się choroby

- **Choroby jednogenowe (monogenowe)** – spowodowane mutacją w pojedynczym genie. Mogą być dziedziczone w sposób autosomalny lub sprzężony z chromosomem X
- **Choroby wielogenowe (wieloczynnikowe)** – wynikają z interakcji wielu genów i czynników środowiskowych

Klasyfikacja według sposobu dziedziczenia choroby

- **Dziedziczenie autosomalne dominujące**, objawy choroby pojawiają się przy obecności jednej kopii zmutowanego genu (płásawica Huntingtona, zespół Marfana)
- **Dziedziczenie autosomalne recesywne**, choroba ujawnia się tylko wtedy, gdy obecne są dwie kopie zmutowanego allelu (fenyloketonuria, galaktozemia, tyrozynergia)
- **Dziedziczenie sprzężone z chromosomem X:**
 - **Recesywne**, głównie u mężczyzn (hemofilia, dystrofia mięśniowa Duchenne'a)
 - **Dominujące**, mogą dotyczyć obu płci, ale często cięższy przebieg u mężczyzn (np. zespół łamliwego chromosomu X)
- **Dziedziczenie mitochondrialne** związane z mutacjami w mtDNA, które przekazywane są tylko przez matkę. Choroby te dotyczą tkanek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym (układ nerwowy, mięśnie)

Dwie ważne grupy chorób genetycznych stanowią **enzymopatie** i **proteinopatie**.

Enzymopatie to grupa chorób genetycznych spowodowanych defektami w genach kodujących enzymy. Enzymopatie mogą być przyczyną wielu chorób np. fenyloketonuria, alkaptonuria czy glikogenez. Mutacja w genie kodującym

białko enzymatyczne, prowadzi do produkcji niefunkcjonalnego, częściowo funkcjonalnego enzymu lub całkowitego jego braku. W ten sposób dochodzi do zaburzenia szlaków metabolicznych i gromadzenia się toksycznych intermedatów lub niedoboru niezbędnych produktów.

W opisach chorób spowodowanych mutacją w genie kodującym białko enzymatyczne obok nazwy enzymu znajduje się jeszcze kod liczbowy – numer EC w postaci: **EC x.x.x.x**

Jest to sposób klasyfikacji enzymów **EC (Enzyme Commission)**, który opisuje je według reakcji, jaką katalizują. Każda cyfra kodu oznacza inny poziom klasyfikacji:

1. Pierwsza cyfra – główna klasa enzymu (rodzaj reakcji):

- 1 – oksydoreduktazy (reakcje utleniania i redukcji)
- 2 – transferazy (przenoszenie grup chemicznych)
- 3 – hydrolazy (reakcje hydrolizy)
- 4 – liazy (rozkład bez udziału wody)
- 5 – izomerazy (przekształcanie w izomery)
- 6 – ligazy (łączenie cząsteczek z udziałem ATP)
- 7 – translokazy (transport jonów lub cząsteczek przez błony)

2. Druga cyfra – podklasa (bardziej szczegółowy typ reakcji)

3. Trzecia cyfra – podpodklasa (dokładniejsze określenie substratów/grup)

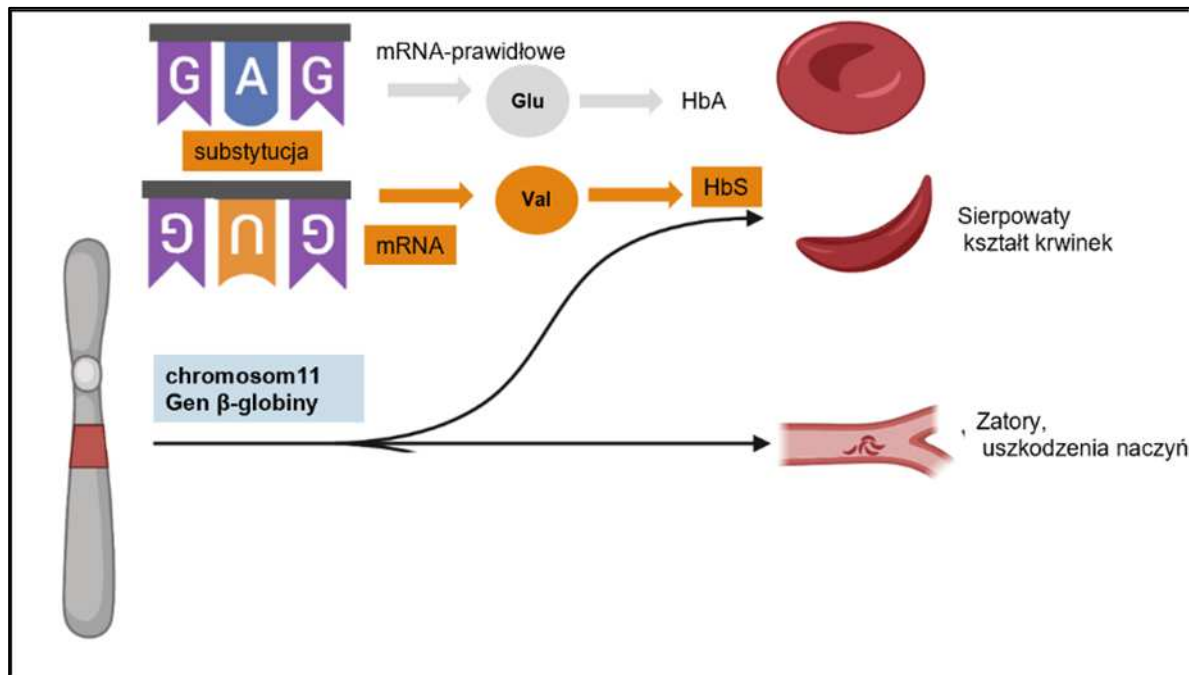
4. Czwarta cyfra – numer porządkowy enzymu w tej kategorii

Proteinopatie to choroby wynikające z nieprawidłowej budowy, fałdowania lub agregacji białek. Mogą dotyczyć zarówno białek enzymatycznych, jak i strukturalnych czy sygnałowych. W wielu proteinopatiach, szczególnie neurodegeneracyjnych, nieprawidłowo sfałdowane białka tworzą nierozpuszczalne agregaty, które odkładają się w tkankach, zakłócając ich funkcje i prowadząc do uszkodzenia komórek.

Genetyczne podstawy wybranych chorób

Niedokrwistość sierpowata

Niedokrwistość sierpowata to wrodzona choroba krwi, charakteryzująca się nieprawidłową budową hemoglobiny, prowadzącą do zaburzeń funkcji czerwonych krwinek.



Ryc. 1. Molekularny mechanizm powstawania objawów w anemii sierpowatej

W anemii sierpowatej, punktowa mutacja w genie kodującym łańcuch β -globiny w strukturze hemoglobiny (HbA), prowadzi do powstania hemoglobiny S (HbS). Mutacja polegająca na zastąpieniu Glu (kwas glutaminowy, aminokwas o charakterze hydrofilowym) \rightarrow Val (waliną, aminokwasem o charakterze hydrofobowym) w łańcuchu β hemoglobiny, powoduje odsłonięcie hydrofobowych powierzchni i prowadzi do wzajemnego „sklejania się” cząsteczek HbS i powstawania długich włókien (polimerów) deformujących erytrocyty, nadając im kształt sierpa.

Objawy choroby

Sierpowate erythrocyty są mniej elastyczne, łatwiej ulegają hemolizie i blokują naczynia krwionośne, prowadząc do udarów, niedotlenienia tkanek, niewydolności nerek.

Choroba Huntingtona

Choroba Huntingtona to postępujące, schorzenie neurodegeneracyjne. Objawy zazwyczaj ujawniają się między 30 a 50 rokiem życia. Za rozwój choroby odpowiada mutacja w genie HTT – kodującym huntingtynę – kluczowe białko dla rozwoju układu nerwowego. Gen HTT znajduje się na chromosomie 4. W wyniku mutacji powstaje wiele nadmiernych powtórzeń sekwencji CAG w genie HTT. Powstała w ten sposób patologiczna postać białka – huntingtyny, gromadzi się w neuronach, prowadząc do ich degeneracji. Choroba dziedziczona jest autosomalnie dominująco.

Objawy choroby

Początkowo występują subtelne problemy poznawcze, emocjonalne oraz lekkie zaburzenia ruchowe. Wraz z postępem choroby pojawiają się mimowolne ruchy (pląsawica), problemy z koordynacją, spowolnienie ruchowe, a także zaburzenia zachowania i otępienie. U młodszych pacjentów częściej dominuje sztywność mięśni i spowolnienie, bez typowych ruchów pląsawicznych.

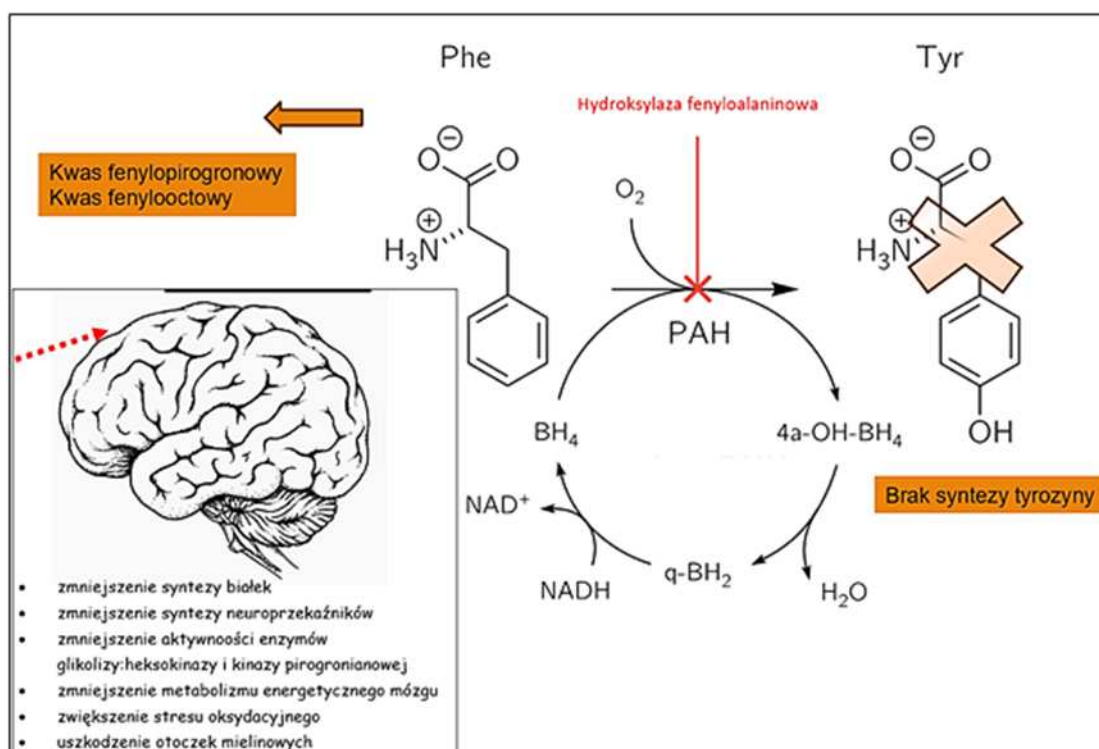
Fenyloketonuria

Fenyloketonuria (PKU) to genetyczna choroba metaboliczna dziedziczona autosomalnie recesywnie. Powstaje wskutek mutacji genu kodującego enzym hydroksylazę fenyloalaninową PAH (EC 1.14.16.1), niezbędną do przemiany aminokwasu fenyloalaniny w tyrozynę. Defekt enzymatyczny (tzw. blok enzymatyczny – sytuacja, w której działanie danego enzymu w szlaku metabolicznym jest zahamowane) prowadzi do alternatywnego metabolizmu fenyloalaniny, w wyniku którego powstają toksyczne związki takie jak,

kwas fenylopirogronowy, kwas fenylooctowy. Nagromadzenie tych substancji powoduje objawy choroby i prowadzi do zaburzenia neuroprzebieżnictwa i rozwoju umysłowego.

Objawy choroby

Objawy choroby wynikające z niedoboru tyrozyny oraz nagromadzenia się toksycznych związków alternatywnego metabolizmu fenyloalaniny dotyczą zaburzeń neurologicznych takich jak: niepełnosprawność intelektualna, opóźnienie rozwoju motorycznego, napady padaczkowe, zaburzenia chodu i postawy, hipotonia mięśniowa, oraz ze strony układu pokarmowego. Charakterystyczny „mysi” zapach ciała i moczu powstaje w wyniku nagromadzenia się kwasu fenylopirogronowego i fenylooctowego. U kobiet z fenyloketonurią, które nie przestrzegają diety w ciąży, może dojść do uszkodzenia płodu: małogłowia, wad serca i opóźnienia rozwoju.



Ryc. 2. Molekularny mechanizm powstawania objawów w fenyloketonurii

Alkaptonuria

Alkaptonuria (AKU) to rzadka choroba genetyczna spowodowana zaburzeniem metabolizmu tyrozyny. Powstaje w wyniku mutacji w genie HGD, zlokalizowanym na chromosomie 3, kodującego enzym: oksydazę kwasu homogentyzynowego (EC 1.13.11.5). Mutacje te prowadzą do bloku enzymatycznego i gromadzenia się kwasu homogentyzynowego (HGA) w organizmie. Choroba dziedziczona jest autosomalnie recesywnie.

Objawy choroby

Pierwszym zauważalnym symptomem jest ciemnienie moczu po pozostawieniu go na powietrzu. W dorosłym wieku u chorych pojawia się ochronoza niebieskawo-czarne przebarwienia tkanki łącznej, szczególnie w skórze i chrząstkach, a także zmiany zwyrodnieniowe stawów, głównie dużych i kręgosłupa, prowadzące do bólu i ograniczenia ruchomości. Mogą wystąpić także zwapnienia zastawek serca i tkanek miękkich oraz przebarwienia twardówek oczu.

Tyrozynemia

Tyrozynemia to rzadka choroba metaboliczna dziedziczona autosomalnie recesywnie, wynikająca z zaburzeń rozkładu aminokwasu tyrozyny. Wyróżnia się trzy typy choroby:

- **Typ I (wątrobowo-nerkowy)** najczęstszy, związany z brakiem hydroksylazy fumaryloacetoocetowej (FAH)
- **Typ II (oczno-skórny, zespół Richnera-Hanharta)** deficyt aminotransferazy tyrozynowej (TAT)
- **Typ III** bardzo rzadki spowodowany blokiem enzymatycznym dioksygenazy kwasu 4hydroksyfenylopirogronowego (HPD)

Za tyrozynemię typu I odpowiadają mutacje w genie FAH, kodującym hydrolazę fumaryloacetoocetową (FAH, EC 3.7.12), znajdującym się na 15 chromosomie. Typ II jest efektem wad w genie TAT, kodującym

aminotransferazę (EC 2.6.1.5) (chromosom 16), natomiast typ III wynika z mutacji w genie HPD, kodującym dioksygenazę kwasu 4-hydroksyfenylopirogronowego (EC 1.13.11.27).

Objawy choroby

Typ I: gromadzenie toksycznych metabolitów powoduje uszkodzenia wątroby i nerek. U niemowląt mogą wystąpić wymioty, biegunki, żółtaczka, powiększenie wątroby, zaburzenia wzrostu i krzepnięcia. W późniejszym okresie grozi marskość i rak wątrobowokomórkowy.

Typ II: ostre zmiany skórne (bolesne nadżerki na dłoniach i stopach) oraz objawy okulistyczne (fotofobia, zaczerwienienie i owrzodzenia rogówki), często z upośledzeniem umysłowym.

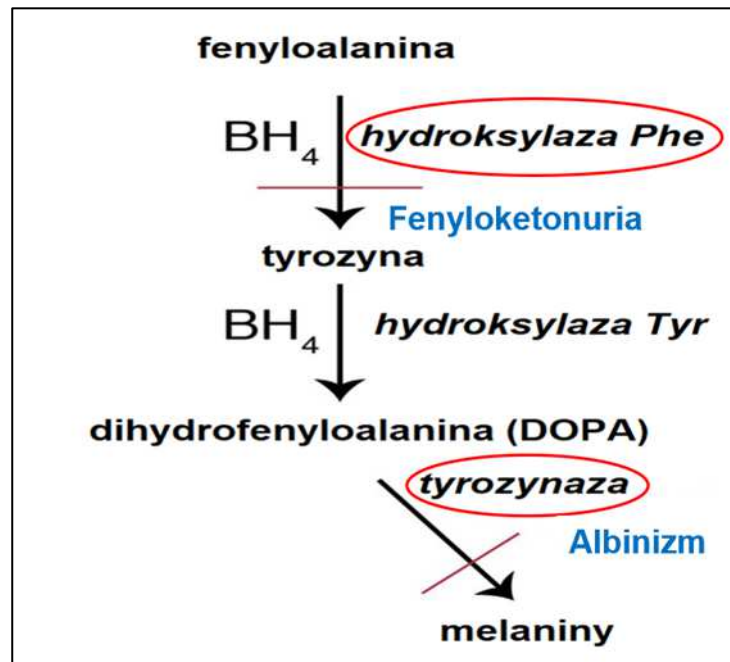
Typ III: zaburzenia neurologiczne, takie jak drgawki, ataksja i opóźnienie rozwoju intelektualnego.

Albinizm

Albinizm to genetyczne zaburzenie polegające na całkowitym lub częściowym braku melaniny, barwnika odpowiedzialnego za kolor skóry, włosów i tęczówek. Choroba jest dziedziczona autosomalnie recesywnie, najczęściej związana z mutacjami w genie kodującym enzym tyrozynazę (EC 1.14.18.1), kluczowy w produkcji melaniny. W efekcie melanocyty występują, ale melanina nie jest prawidłowo wytwarzana. Wyróżnia się kilka typów albinizmu, różniących się stopniem i rodzajem niedoboru pigmentu.

Objawy choroby

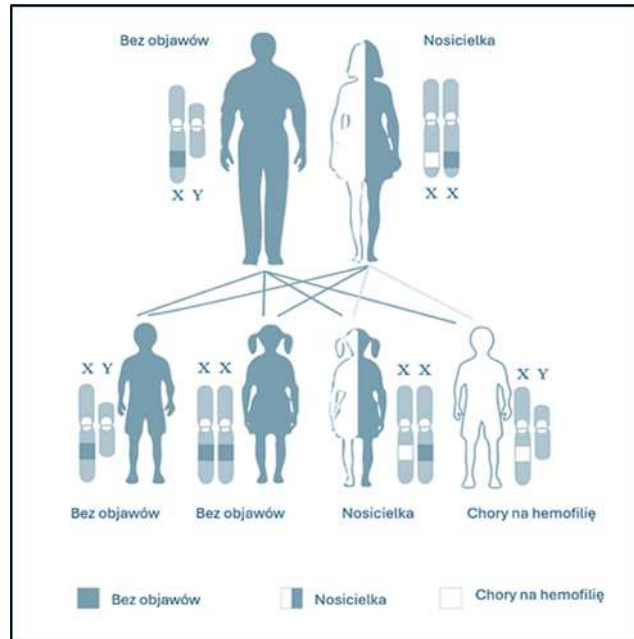
Główne symptomy dotyczą skóry i oczu. Skóra jest bardzo jasna, a brak ochrony pigmentowej powoduje wysoką wrażliwość na promieniowanie UV, częste oparzenia i zwiększone ryzyko raka skóry. W obrębie oczu obserwuje się światłowstręt, oczopląs, zaburzenia ostrości widzenia i zmiany anatomiczne siatkówki oraz nerwu wzrokowego.



Ryc. 3. Uproszczony schemat metabolizmu fenyloalaniny z zaznaczonymi blokami enzymatycznymi powodującymi fenyloketonurię i albinizm

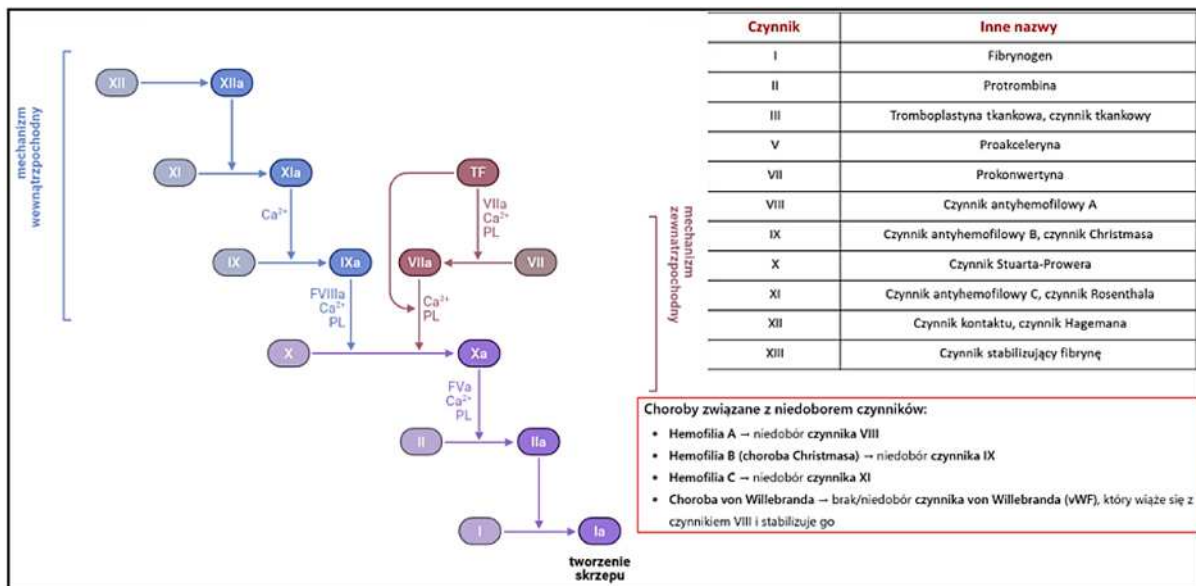
Hemofilia

Hemofilia to dziedziczna choroba krwi z grupy osoczowych skaz krwotocznych, spowodowana wrodzonym brakiem lub niedoborem czynników krzepnięcia. Czynniki krzepnięcia to białka (głównie enzymy) i inne substancje obecne we krwi, które biorą udział w kaskadzie krzepnięcia, prowadząc do powstania stabilnego skrzepu i zatrzymania krwawienia. Większość z nich to nieaktywne proenzymy produkowane w wątrobie, które aktywują się kolejno jeden po drugim w reakcji łańcuchowej.



Ryc. 4. Schemat dziedziczenia hemofilii A – choroby sprzężonej z płcią. Rysunek zmodyfikowany za <https://simple.wikipedia.org/wiki/Haemophilia>

Mutacje w genach czynnika VIII (hemofilia A) i czynnika IX (hemofilia B) powodują brak odpowiednich czynników krzepnięcia i są chorobami sprzężonymi z chromosomem X. Hemofilia C dziedziczona jest autosomalnie recesywnie i jest związana z mutacją genu dla czynnika XI na chromosomie 4.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający wzajemne relacje czynników w kaskadzie oraz powiązanie niedoboru czynników krzepnięcia ze skazą krwotoczną

Objawy choroby

U zdrowych osób uszkodzenie naczyń prowadzi do szybkiego tworzenia skrzepu zapobiegającego krwawieniu. U osób z hemofilią ten proces jest zaburzony, co skutkuje wydłużonym krwawieniem – zarówno zewnętrznym, jak i wewnętrznym. Hemofilia jest klinicznie niejednorodna i ma różny stopień nasilenia, zależny od stężenia czynnika krzepnięcia w osoczu: łagodna, ze stężeniem od 6 do 30% normy; umiarkowana, ze stężeniem od 2 do 5% normy; oraz ciężka, ze stężeniem poniżej 1% normy. Pacjenci z łagodną hemofilią zwykle krwawią nadmiernie tylko po urazach lub operacjach, podczas gdy pacjenci z ciężką hemofilią mają średnio 20–30 epizodów spontanicznego lub nadmiernego krwawienia rocznie po niewielkich urazach, szczególnie w stawach i mięśniach.

Talasemia

Talasemia, zwana również niedokrwistością śródziemnomorską, to wrodzona choroba krwi, polegająca na zaburzonej syntezie hemoglobiny. Występuje głównie w krajach regionu Morza Śródziemnego, Azji Południowo-Wschodniej, Afryki i Bliskiego Wschodu, a także w innych częściach świata w wyniku migracji.

Choroba wynika z mutacji genów odpowiedzialnych za produkcję łańcuchów globiny: alfa lub beta. Dziedziczona jest autosomalnie recesywnie.

Objawy choroby

Nasilenie objawów zależy od liczby mutacji w genach dla globin. Do najczęstszych objawów należą: przewlekła anemia, zmęczenie, bóle mięśni i kończyn, powiększenie wątroby, śledziony oraz węzłów chłonnych. W ciężkich postaciach mogą występować deformacje kości, kamica nerkowa i zależność od transfuzji krwi.

Galaktozemia

Galaktozemia to rzadka choroba metaboliczna ujawniająca się już w okresie noworodkowym. Choroba dziedziczona jest autosomalnie recesywnie. Najcięższa

postać galaktozemii wynika z mutacji w genie GALT (urydyliilotransferaza galaktozo-1-fosforanu EC 2.7.7.12) – zlokalizowanym na chromosomie 9, kodującym enzym niezbędny do dalszego metabolizmu galaktozy. Lżejsze formy związane są z mutacjami w genach GALK1 (galaktokinaza EC2.7.1.6), GALE (epimeraza UDP-galaktoza/UDP-glukoza EC 5.1.3.2) lub GALM (mutarotaza galaktozowa EC 5.1.3.3), które również biorą udział w przemianach galaktozy.

Objawy choroby

Pierwsze symptomy pojawiają się zwykle kilka dni po urodzeniu: wymioty, biegunki, żółtaczka, powiększenie wątroby, zaburzenia krzepnięcia. U dzieci nieleczonych może dojść do uszkodzenia mózgu, zaćmy, a nawet śmierci.

Choroba Taya-Sachsa

Choroba Taya-Sachsa to rzadka, dziedziczna choroba neurodegeneracyjna z grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Schorzenie jest wynikiem mutacji w genie HEXA, odpowiedzialnym za syntezę enzymu beta-heksozaminidazy A (EC 3.2.1.52), biorącego udział w rozkładzie gangliozydu GM2. W wyniku niedoboru enzymu substancja ta gromadzi się w neuronach, powodując ich uszkodzenie. Dziedziczenie ma charakter autosomalny recesywny.

Objawy choroby

Pierwsze symptomy pojawiają się zwykle między 3 a 6 miesiącem życia i obejmują spowolnienie rozwoju ruchowego, osłabienie mięśni, utratę wzroku oraz nadmierną drażliwość. W miarę postępu choroby dochodzi do drgawek, trudności w przelknięciu i oddychaniu. W badaniu okulistycznym często stwierdza się charakterystyczny objaw „czerwonej wisienki” na siatkówce. Rzadsza postać choroby może ujawniać się w wieku młodzieńczym lub dorosłym, z łagodniejszym przebiegiem.

Glikogenozy

Glikogenozy, czyli choroby spichrzania glikogenu, to grupa dziedzicznych zaburzeń metabolicznych, w których dochodzi do nieprawidłowego gromadzenia glikogenu w komórkach. Przyczyną tych chorób są mutacje w genach kodujących enzymy biorące udział w syntezie lub rozkładzie glikogenu, co prowadzi do jego nadmiernego odkładania się lub niemożności jego prawidłowego przetwarzania. W zależności od tego, który enzym jest uszkodzony, glikogen gromadzi się głównie w wątrobie lub mięśniach, powodując zaburzenia gospodarki energetycznej organizmu.

➤ **Glikogenoza typu I (choroba von Gierkego, GSD I)**

Choroba dziedziczona jest autosomalnie recesywnie. Mutacja w genie G6PC – kodującym glukozy-6-fosfatazę (EC 3.1.3.9), powoduje brak możliwości przekształcenia glukozy-6-fosforanu w glukozę i eksportu jej z wątroby do komórek ciała w stanie głodu. Blok enzymatyczny prowadzi do ciężkich zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej.

Objawy choroby

Pojawiają się zwykle w niemowlęctwie i dotyczą zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej takich jak: kwasica mleczanowa, hiperurykemia, hiperlipidemia. Dzieci często mają „okrągłą twarz”, niski wzrost, cienkie kończyny i powiększony brzuch – objaw wynikający z powiększenia wątroby hepatomegalia. Nieleczona choroba prowadzi do ciężkiej hipoglikemii, kwasicy i powikłań wielonarządowych.

➤ **Choroba Pompego (Glikogenoza typu II, GSD II)**

Choroba dziedziczona jest autosomalnie recesywnie. Spowodowana mutacjami genu GAA, kodującego kwaśną α -glukozydazę (EC 3.2.1.20).

Enzym ten katalizuje rozkład glikogenu w lizosomach komórek tkanki mięśniowej. Skutkiem mutacji jest gromadzenie glikogenu wewnątrz lizosomów, zwłaszcza w mięśniach.

Objawy choroby

Objawy zależą od wieku wystąpienia i obejmują: osłabienie mięśni (hipotonia), kardiomiopatie, trudności w jedzeniu i oddychaniu. W postaci niemowlęcej bez leczenia rokowanie jest złe (zwykle zgon w 1. roku życia). Obecnie jednak zastosowanie enzymatycznej terapii zastępczej – glukozydazy alfa znacznie poprawia przeżywalność i funkcjonowanie mięśni.

Daltonizm

Daltonizm to zaburzenie widzenia barw, polegające najczęściej na trudności z rozróżnianiem koloru czerwonego i zielonego. Najczęściej daltonizm jest dziedziczny i wynika z mutacji genów odpowiedzialnych za barwniki wzrokowe znajdujących się na chromosomie X. Z tego powodu mężczyźni chorują znacznie częściej niż kobiety. Mutacje te zaburzają działanie czopków siatkówki odpowiadających za percepcję barw szczególnie czerwieni i zieleni.

Objawy choroby

Typowym objawem jest trudność w odróżnianiu barw, najczęściej zielonej od czerwonej. Osoby z łagodniejszymi postaciami mogą nie być świadome zaburzenia. W najcięższej postaci (monochromatyzm) świat odbierany jest w odcieniach szarości.

Zespół kociego krzyku (Cri du Chat)

Zespół kociego krzyku (Cri du Chat) to rzadka choroba genetyczna, której nazwa pochodzi od charakterystycznego, wysokotonowego płaczu niemowląt przypominającego miauczenie kota. Przyczyną choroby jest częściowa utrata materiału genetycznego na krótkim ramieniu chromosomu 5 (delecja 5 p). Wielkość ubytku bywa zmienna, im większy, tym poważniejsze objawy. W regionie tym znajdują się m.in. geny związane z rozwojem mózgu i układu nerwowego.

Objawy choroby

Noworodki z zespołem wykazują obniżone napięcie mięśniowe, trudności z karmieniem, niską masę urodzeniową i problemy z oddychaniem. Typowy jest wysoki, monotony płacz, który zmienia się po kilku tygodniach. Śmiertelność jest wysoka, choć część pacjentów dożywa dorosłości, charakteryzując się głęboką niepełnosprawnością intelektualną i małogłowiem.

Zespół łamliwego chromosomu X

Zespół łamliwego chromosomu X to najczęstsza genetyczna przyczyna upośledzenia umysłowego. Przyczyną choroby jest mutacja dynamiczna w genie FMR1, znajdującym się na długim ramieniu chromosomu X. Mutacja polega na nadmiernym powieleniu sekwencji trójnukleotydu CGG. Osoby zdrowe mają do 54 powtórzeń, premutacja obejmuje zakres 55–200, a pełna mutacja przekracza 200 powtórzeń. Gen FMR1 koduje białko FMRP, ważne dla funkcjonowania neuronów. Jego niedobór powoduje objawy neurologiczne i poznawcze.

Objawy choroby

U chłopców z pełną mutacją obserwuje się zwykle umiarkowaną lub głęboką niepełnosprawność intelektualną, opóźnienie rozwoju mowy i ruchowego, cechy autystyczne oraz charakterystyczne rysy twarzy (wydłużona twarz, duże uszy, wystająca żuchwa). Typowe są także powiększone jądra, obniżone napięcie mięśniowe i objawy neurologiczne, takie jak drżenie czy ataksja w starszym wieku. U dziewczynek objawy są zazwyczaj łagodniejsze, może wystąpić lekkie upośledzenie umysłowe, problemy z koordynacją, trudności językowe i zaburzenia hormonalne prowadzące do niepłodności.

Aberracje chromosomowe liczbowe – aneuploidie

Aneuploidie powstają głównie w wyniku błędów podczas podziałów komórkowych, przede wszystkim w mejozie. Najczęstszym mechanizmem powstawania aneuploidii

jest nondysjunkcja – proces polegający na nieprawidłowym rozchodzeniu się chromosomów lub chromatyd siostrzanych do komórek potomnych.

Tabela 1. Choroby genetyczne powstające w wyniku mutacji wpływających na liczbę chromosomów

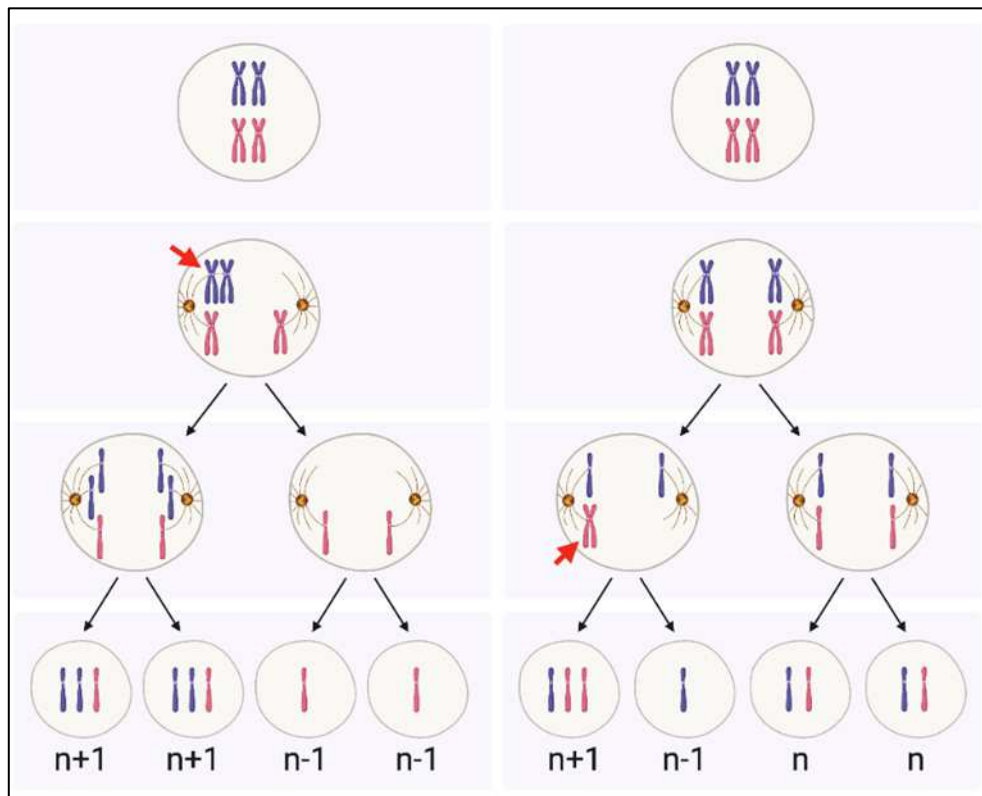
| Nazwa choroby | Rodzaj aberracji | Najważniejsze objawy | Rokowanie |
|---|--|---|---|
| Zespół Downa (trisomia 21) | +1 chromosom 21 | Obniżone napięcie mięśni, charakterystyczna twarz, wady serca, niepełnosprawność intelektualna o różnym stopniu | Stosunkowo dobre; większość chorych dożywa dorosłości |
| Zespół Edwardsa (trisomia 18) | +1 chromosom 18 | Niska masa urodzeniowa, wady serca, nerek, charakterystyczna pozycja dłoni, ciężka niepełnosprawność | Bardzo złe; większość dzieci umiera w 1. roku życia |
| Zespół Patau (trisomia 13) | +1 chromosom 13 | Ciężkie wady OUN, rozszczepy twarzy, wady serca, polidaktylia | Bardzo złe; zgony zazwyczaj w pierwszych miesiącach życia |
| Zespół Turnera (45,X) | monosomia chromosomu X | Niski wzrost, nieprawidłowy rozwój jajników, bezpłodność, obrzęki limfatyczne, wady serca | Dobre; prawidłowa inteligencja, normalna długość życia przy leczeniu, bezpłodność |
| Zespół Klinefeltera (najczęstszy- 47,XXY ponadto 48, XXXY; 49, XXXXY; mozaikowy 46,XY/47,XXY) | Zwielokrotnienie I. chromosomów X u mężczyzn | Wysoki wzrost, ginekomastia, hipogonadyzm, niepłodność | Bardzo dobre; normalna długość życia, bezpłodność |
| Zespół XXX (47,XXX) | Trisomia chromosomu X u kobiet | Często brak objawów, możliwe trudności w nauce, wysoki wzrost | Dobre; prawidłowa płodność u większości |
| Zespół XYY (47,XYY) | Trisomia chromosomu Y u mężczyzn | Wysoki wzrost, czasem trudności w uczeniu się, zwykle brak poważnych objawów | Dobre; prawidłowa płodność i długość życia |

Kiedy zaburzenie nastąpi w I podziale mejotycznym i nie dojdzie do rozdziału chromosomów homologicznych:

- jedna gameta otrzymuje oba chromosomy homologiczne
- druga gameta nie dostaje żadnego

Jeśli nieprawidłowości nastąpią w II podziale mejotycznym – brak rozdziału chromatyd siostrzanych spowoduje zmienioną liczbę chromatyd siostrzanych w gametach. W obu przypadkach po zapłodnieniu:

- powstają trisomie (2 od jednego rodzica + 1 od drugiego)
- lub monosomie (brak chromosomu od jednego rodzica)



Ryc. 6. Schemat przedstawiający procesy nieprawidłowego rozchodzenia się gamet podczas podziałów mejozycznych – nondysjunkcji oraz ich następstwa w tworzeniu gamet. BioRender – obraz zmodyfikowany

Diagnostyka chorób genetycznych opiera się na połączeniu badań przesiewowych, testów molekularnych, cytogenetycznych i biochemicznych, które pozwalają wykrywać zarówno nieprawidłowości w liczbie chromosomów, jak i mutacje w obrębie pojedynczych genów. W Polsce szczególną rolę pełnią badania przesiewowe noworodków, obejmujące kilkadziesiąt chorób metabolicznych oraz SMA, dzięki czemu możliwe jest rozpoznanie wielu zaburzeń jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych. Istotne znaczenie mają również przesiewowe badania prenatalne, takie jak USG, czy nieinwazyjne testy NIPT, które oceniają ryzyko wystąpienia aneuploidii i innych wad rozwojowych u płodu. Ostateczne potwierdzenie chorób genetycznych wymaga jednak metod bardziej precyzyjnych, takich jak analiza kariotypu, badania molekularne – PCR i techniki FISH wykorzystywane do oceny struktury chromosomów. Uzupełnieniem tych procedur są badania biochemiczne,

które określają aktywność enzymów i stężenie metabolitów, co jest szczególnie ważne w diagnostyce chorób metabolicznych. Dzięki połączeniu tych metod możliwe jest zarówno wczesne wykrywanie nieprawidłowości, jak i precyzyjne ustalenie typu mutacji odpowiedzialnej za daną chorobę.

Tabela 2. Porównanie metod diagnostycznych wybranych chorób genetycznych

| Choroba | Materiał biologiczny | Metody diagnostyczne |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| Zespół XYY (Jacobsa) | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Zespół Turnera | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Zespół Klinefeltera | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Trisomia chromosomu X (XXX) | Krew obwodowa (limfocyty) | Wykrywanie aberracji liczbowych i strukturalnych, skupia się na analizie kariotypu lub technikach cytogenetycznych np. FISH |
| Zespół Downa | Krew obwodowa, kosmówka, amniocyty | |
| Zespół Edwardsa | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Trisomia 16 | Kosmówka, amniocyty | |
| Trisomia chromosomu 15 | Krew obwodowa, kosmówka | |
| Zespół Patau | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Zespół kociego krzyku (Cri du Chat) | Krew obwodowa (limfocyty) | |
| Daltonizm | Krew obwodowa | Identyfikacja mutacji w pojedynczych genach, identyfikacja konkretnych wariantów genetycznych z użyciem metody PCR i sekwencjonowania |
| Choroba Huntingtona | Krew obwodowa | |
| Hemofilia | Krew obwodowa | |
| Albinizm | Krew obwodowa | |
| Galaktozemia | Krew z pięty, krew obwodowa | Diagnostyka biochemiczna aktywności enzymów i stężenia metabolitów (szczególnie w badaniach przesiewowych noworodków) |
| Tyrozynemia | Krew z pięty, mocz | |
| Alkaptonuria | Mocz, krew obwodowa | |
| Fenyloketonuria (PKU) | Krew z pięty | |

Techniki diagnostyczne w genetyce – wyjaśnienie nazw

FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) – technika, w której do chromosomów w komórkach przyłącza się fluorescencyjnie znakowane sondy DNA, specyficzne dla określonych fragmentów genomu. Dzięki temu można szybko sprawdzić obecność/nieobecność danego chromosomu, delecji, duplikacji czy translokacji.

PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy) – służy do powielania określonego fragmentu DNA w próbówce. Uzyskane miliony kopii danego genu, służą do dalszej analizy (np. mutacji).

Sekwencjonowanie DNA – polega na ustaleniu dokładnej sekwencji nukleotydów (A, T, G, C) w badanym genie lub genomie. Pozwala wykrywać mutacje punktowe, insercje, delecje.

Test enzymatyczny – badanie aktywności konkretnego enzymu w krwi, surowicy, fibroblastach lub leukocytach.

Analiza kariotypu – polega na analizie zestawu chromosomów (liczby i struktury) w komórkach pacjenta. Najczęściej wykonuje się je na limfocytach krwi obwodowej, które są stymulowane do podziału i zatrzymywane w metafazie. Chromosomy barwi a następnie liczy i ocenia pod kątem aberracji.

Rozdział 5.

Pasożyty człowieka – przystosowania, cykle rozwojowe i diagnostyka

Cel ćwiczeń:

- Poznanie podstawowych rodzajów pasożytnictwa oraz najważniejszych grup pasożytów człowieka
- Nauka rozpoznawania form inwazyjnych i diagnostycznych pasożytów
- Analiza cykli życiowych pasożytów z wykorzystaniem schematów i rycin
- Zapoznanie z typowymi drogami zakażenia oraz wybranymi mechanizmami patogenezy chorób pasożytniczych

Kryteria klasyfikacji pasożytnictwa

Pasożyty można klasyfikować na podstawie różnych cech. Poniżej przedstawiono najważniejsze kryteria podziału pasożytów.

1. Relacja przestrzenna pasożyt-żywiciel

- **Pasożyty zewnętrzne (ektopasożyty)** bytują na powierzchni ciała żywiciela, lub przebywają w jamach komunikujących się ze środowiskiem zewnętrznym (np. jama ustna, jamy skrzelowe) np. wszy, pchły, pijawki, kleszcze
- **Pasożyty wewnętrzne (endopasożyty)** żyją wewnątrz organizmu żywiciela, w jego narządach lub tkankach, np. wątrobie, krwi, mięśniach (np. *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*)
- **Parazytoidy** typowe dla niektórych owadów, np. muchówek składających jaja w ciele larw innych owadów larwy parazytoidów rozwijają się w ich wnętrzu, żywią się tkankami gospodarza

2. Stopień uzależnienia od żywiciela

- **Pasożyty obligatoryjne (bezwzględne)** niezdolne do życia poza organizmem żywiciela. Muszą przebywać w ciele gospodarza przez cały cykl życia. Przykłady: tasiemce (*Taenia saginata*), owsik ludzki (*Enterobius vermicularis*)
- **Pasożyty fakultatywne (względne)** mogą okresowo prowadzić życie pasożytnicze, ale nie jest ono konieczne do ich przetrwania. Przykłady: komary, kleszcze przebywają na żywicielu jedynie w celu pobrania pokarmu

3. Czas trwania relacji pasożyt – żywiciel

- **Pasożyty stałe** pozostają związane z gospodarzem przez całe swoje życie (np. wszy, niektóre tasiemce)
- **Pasożyty czasowe** kontakt z żywicielem następuje jedynie na czas pobierania pokarmu (np. dorosłe komary, pijawki). Ich larwy mogą prowadzić życie wolnożyjące
- **Pasożyty okresowe** pasożytniczy tryb życia prowadzą tylko w wybranych etapach cyklu rozwojowego. Przykładowo, niektóre owady pasożytują wyłącznie jako larwy, a dorosłe formy prowadzą życie wolne

4. Liczba gatunków żywicieli

- **Monokseniczne** pasożytujące wyłącznie na jednym gatunku żywiciela. Przykład: owsik ludzki, występujący tylko u człowieka
- **Oligokseniczne** mogą żyć na kilku spokrewnionych gatunkach gospodarzy. Przykład: tasiemiec nieuzbrojony (*Taenia saginata*), którego postać larwalna, rozwija się w organizmie bydła domowego (np. krowa), a ostatecznym żywicielem jest człowiek
- **Polikseniczne** zdolne do bytowania na szerokim spektrum gatunków. Przykład: pijawki, mogące żerować na człowieku, psie, ptakach

Pasożyty, w zależności od swojego cyklu życiowego i wymagań środowiskowych, mogą zasiedlać bardzo różne miejsca w organizmie żywiciela.

Miejsce to określa się mianem **ontohabitatu**. Ontohabitat to konkretne miejsce, w którym pasożyt żyje.

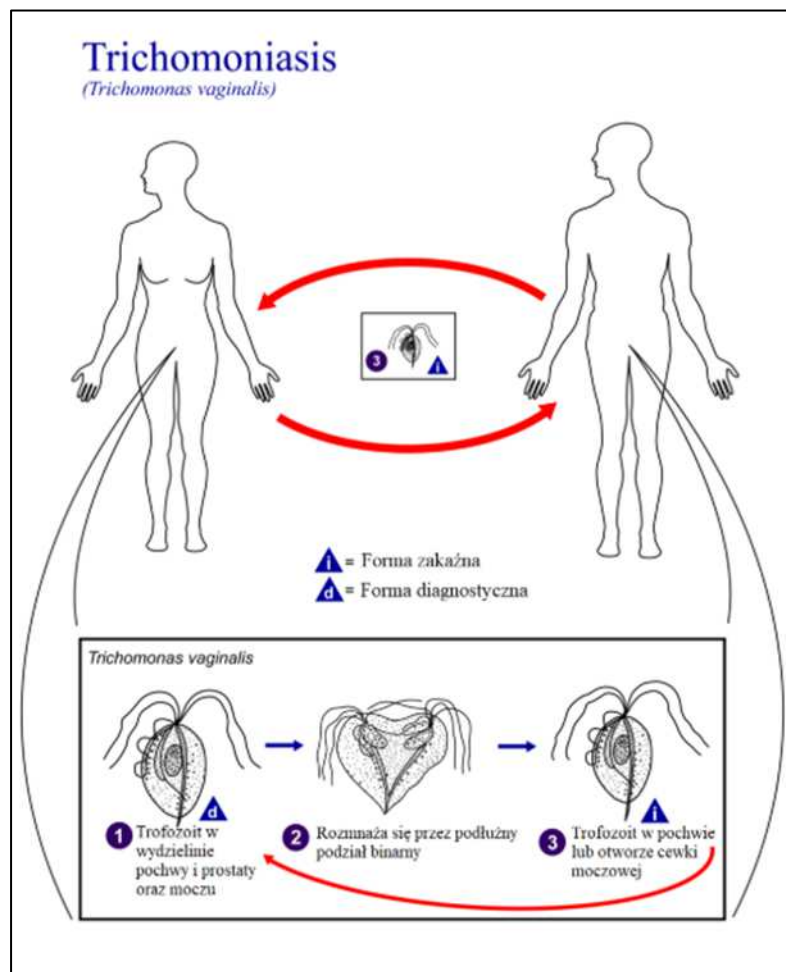
Zasiedlenie organizmu przez pasożyta może prowadzić do rozwoju choroby, określanej jako parazytoza. Dla jej wystąpienia konieczne jest wcześniejsze wniknięcie pasożyta do organizmu, czyli tzw. **inwazja pasożytnicza**. Do zakażenia dochodzi przez określone **wrota zakażenia**, takie jak jama ustna (np. w wyniku spożycia skażonego pokarmu lub wody, tzw. droga *per os*), skóra (np. przez ukłucie owada), a także błony śluzowe. Źródłami zakażenia mogą być skażona woda, brudne ręce, sierść zwierząt, zanieczyszczona odzież lub pościel.

W wielu przypadkach istotną rolę w przenoszeniu pasożytów odgrywają **wektory**, czyli organizmy, które same nie wywołują choroby, lecz pośredniczą w transmisji pasożyta. Najczęściej są to stawonogi (np. komary, muchy, kleszcze, wszy, pchły). Niektóre tylko mechanicznie przenoszą pasożyta a inne są też niezbędnym elementem jego cyklu życiowego. Aby pasożyt mógł skutecznie zainfekować organizm gospodarza, musi występować w odpowiedniej postaci, zwanej **formą inwazyjną**. Może nią być np. trofozoit: aktywna, ruchliwa forma zdolna do odżywiania się i rozmnażania, lub **cysta**: forma przetrwalna, odporna na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych, umożliwiającą przetrwanie poza organizmem.

Pasożytnicze protisty człowieka

Rzęsistek pochwy (*Trichomonas vaginalis*)

| Klasyfikacja | Pierwotniaki (<i>Protozoa</i>) |
|---------------------------------|--|
| Występowanie | Kosmopolityczny |
| Ontohabitat | U kobiet: pochwa, szyjka macicy, cewka moczowa; u mężczyzn: żołądz, napletek, cewka, prostata, nasieniowody |
| Droga zakażenia | Kontakty seksualne; rzadziej pośrednia (ręczniki, pościel, narzędzia ginekologiczne); możliwa transmisja okołoporodowa |
| Przystosowanie do pasożytnictwa | 5 wici i błona falująca; aksostyl; zdolność adhezji do nabłonka |
| Forma inwazyjna | Trofozoit |
| Forma diagnostyczna | Trofozoit |
| Choroba | Rzęsistkowica |
| Material/Metodyka diagnozy | Preparat bezpośredni (wydzielina pochwy/cewki), hodowla, barwienie Giemsy testy antygenowe, materiał: wydzielina z pochwy lub cewki moczowej |



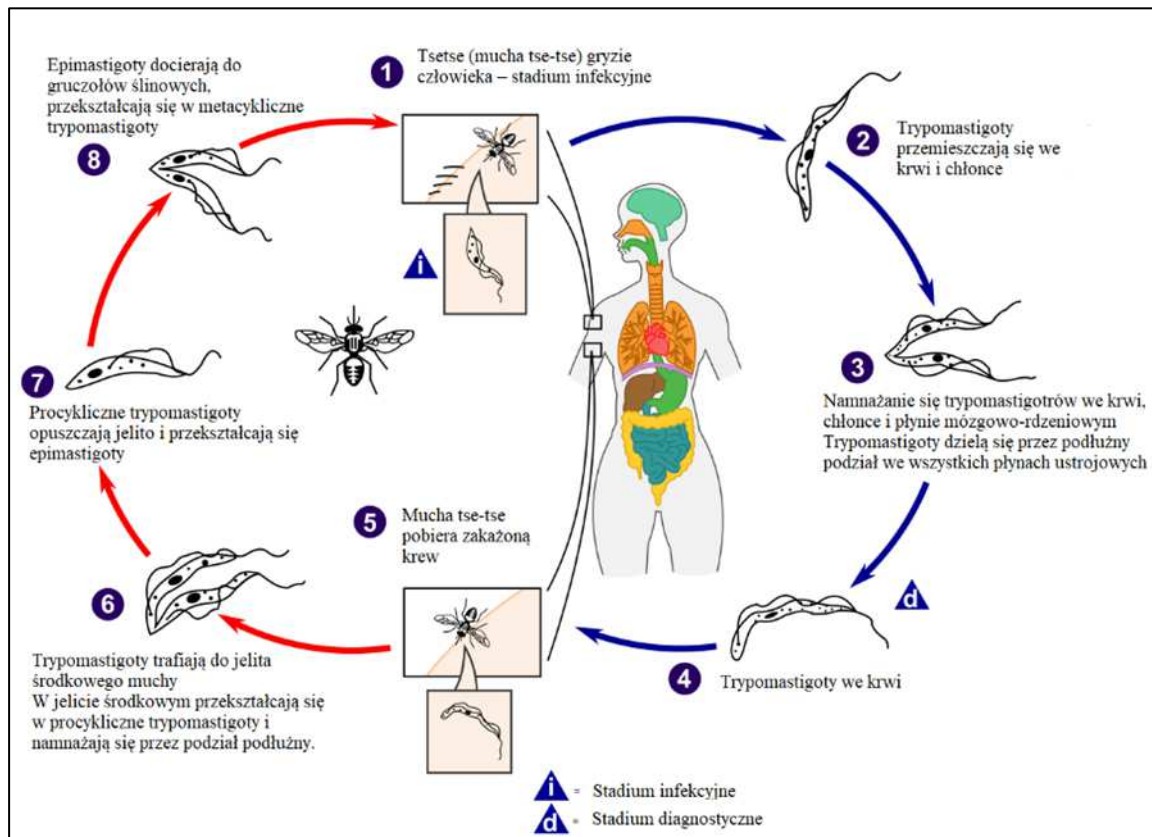
Ryc. 1. Cykl życiowy rzęsistka pochwowego (*Trichomonas vaginalis*) https://pl.wikipedia.org/wiki/Rz%C4%99sistek_pochwowy#/media/Plik:Trichomoniasis_01.png zmodyfikowana

Ameba (*Entamoeba histolytica*)

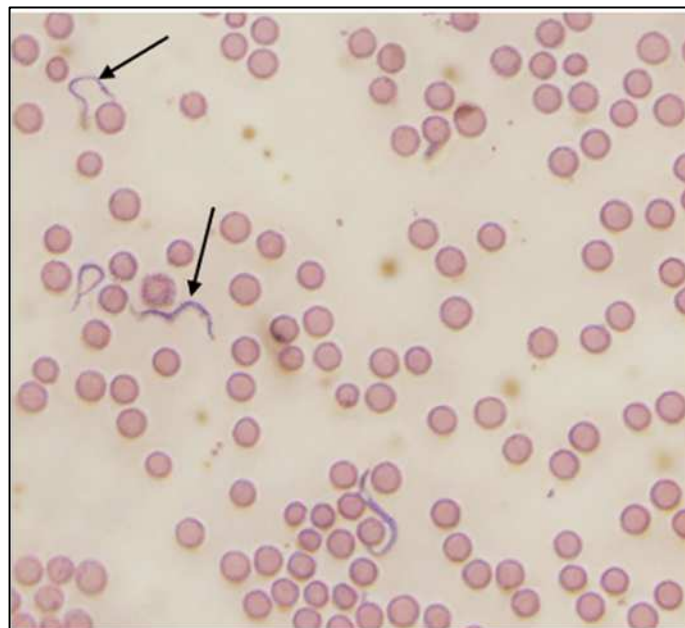
| | |
|--|--|
| Klasyfikacja | Pierwotniaki (<i>Protozoa</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczna, częstsza w krajach o niskiej higienie |
| Ontohabitat | Jelito grube; postacie tkankowe w wątrobie, płucach, mózgu |
| Droga zakażenia | Droga pokarmowa (cysty w żywności, wodzie) |
| Rozmnażanie | Bezpłciowe (podział komórki na trofozoity) |
| Przystosowanie do pasożytnictwa | Tworzenie odpornych cyst, |
| Forma inwazyjna | Cysta |
| Forma diagnostyczna | Cysty i trofozoity w kale; trofozoity w ropniach |
| Choroba | Pełzakowica jelitowa i pozajelitowa |
| Material/Metodyka diagnozy | Badanie kału, testy antygenowe, PCR |

Świdrowce (*Trypanosomatidae*)

| | |
|-----------------------------------|--|
| Kategoria | Informacje |
| Klasyfikacja | Pierwotniaki (<i>Protozoa</i>) |
| Występowanie | Afryka, Azja, Ameryka |
| Ontohabitat | krew |
| Droga zakażenia | Wektor: mucha tse-tse |
| Rozmnażanie | Bezpłciowe |
| Przystosowanie | Kinetoplast, zmienność antygenowa |
| Forma inwazyjna | Trypomastigota |
| Forma aktywna | Trypomastigota |
| Forma diagnostyczna | Trypomastigota |
| Choroba | Śpiączka afrykańska (<i>T. gambiense</i> i <i>T. rhodesiense</i>), choroba Chagasa (<i>T. cruzi</i>), choroba surra (<i>T. evansi</i>) |
| Material/Metodyka diagnozy | Krew, płyn mózgowo-rdzeniowy |



Ryc. 2. Cykl życiowy świdrowca gambijskiego (*Trypanosoma gambiense*)
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_African_life_cycle_CDC.jpg
 modyfikowane

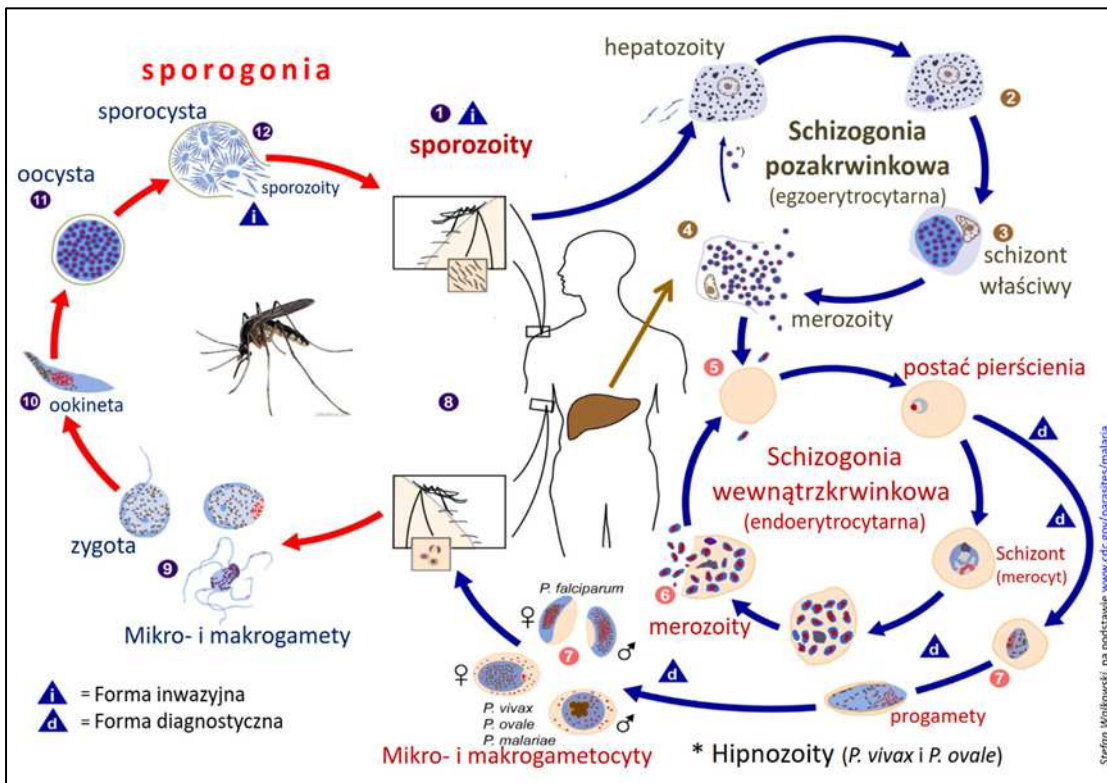


Ryc. 3. Świdrowce (*Trypanosomatidae*) strzałkami oznaczono postacie trypomastigota obecne w rozmazie krwi, obraz spod mikroskopu, powiększenie 480×

Zarodźce (*Plasmodium*)

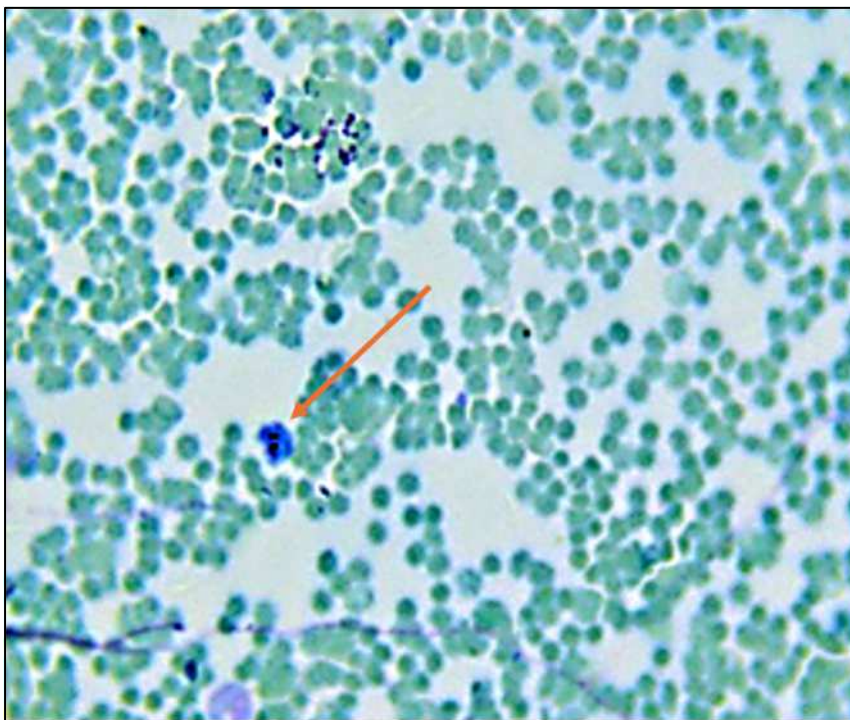
Plasmodium to rodzaj jednokomórkowych protistów. Są to obligatoryjne pasożyty wewnątrzkomórkowe, których cykl życiowy przebiega z udziałem dwóch żywicieli: owada (samicy komara z rodzaju *Anopheles*) oraz kręgowca, w tym człowieka. Pięć gatunków zarodźca powoduje różne rodzaje malarii (zimnicy), różniące się przebiegiem oraz objawami.

| Kategoria | Informacje |
|---|---|
| Klasyfikacja | Pierwotniaki (<i>Protozoa</i>) Rodzaj: <i>Plasmodium</i> |
| Gatunki wywołujące malarię u człowieka | Zarodziec sierpowy (<i>Plasmodium falciparum</i>) Zarodziec ruchliwy (<i>Plasmodium vivax</i>) Zarodziec pasmowy (<i>Plasmodium malariae</i>) Zarodziec owalny (<i>Plasmodium ovale</i>) Zarodziec małpi (<i>Plasmodium knowlesi</i>) |
| Występowanie | występuje endemicznie w regionach tropikalnych i subtropikalnych, głównie w Afryce Subsaharyjskiej (90% przypadków), Azji Południowo-Wschodniej oraz Ameryce Południowej i Środkowej |
| Ontohabitat | Hepatocyty, krew |
| Droga zakażenia | Komar z rodzaju: <i>Anopheles</i> |
| Rozmnażanie | Bezpłciowe, płciowe, z niektórych merozoitów tworzą się gametocyty, a z nich gamety: męskie i żeńskie |
| Przystosowanie | Obecność apicoplastu i kompleksu apikalnego, zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej |
| Forma inwazyjna | Sporozoit (dla człowieka) |
| Forma diagnostyczna | Trofozoity, schizonty, gametocyty we krwi obwodowej |
| Choroba | <i>P. falciparum</i> – malaria tropikalna (złośliwa) <i>P. vivax</i> – malaria trydniowa <i>P. ovale</i> – malaria trydniowa (łagodna) <i>P. malariae</i> – malaria czterodniowa <i>P. knowlesi</i> – malaria odzwierzęca |
| Material/Metodyka diagnozy | Krew |



Ryc. 4. Cykl życiowy zarodźców *Plasmodium* ssp.

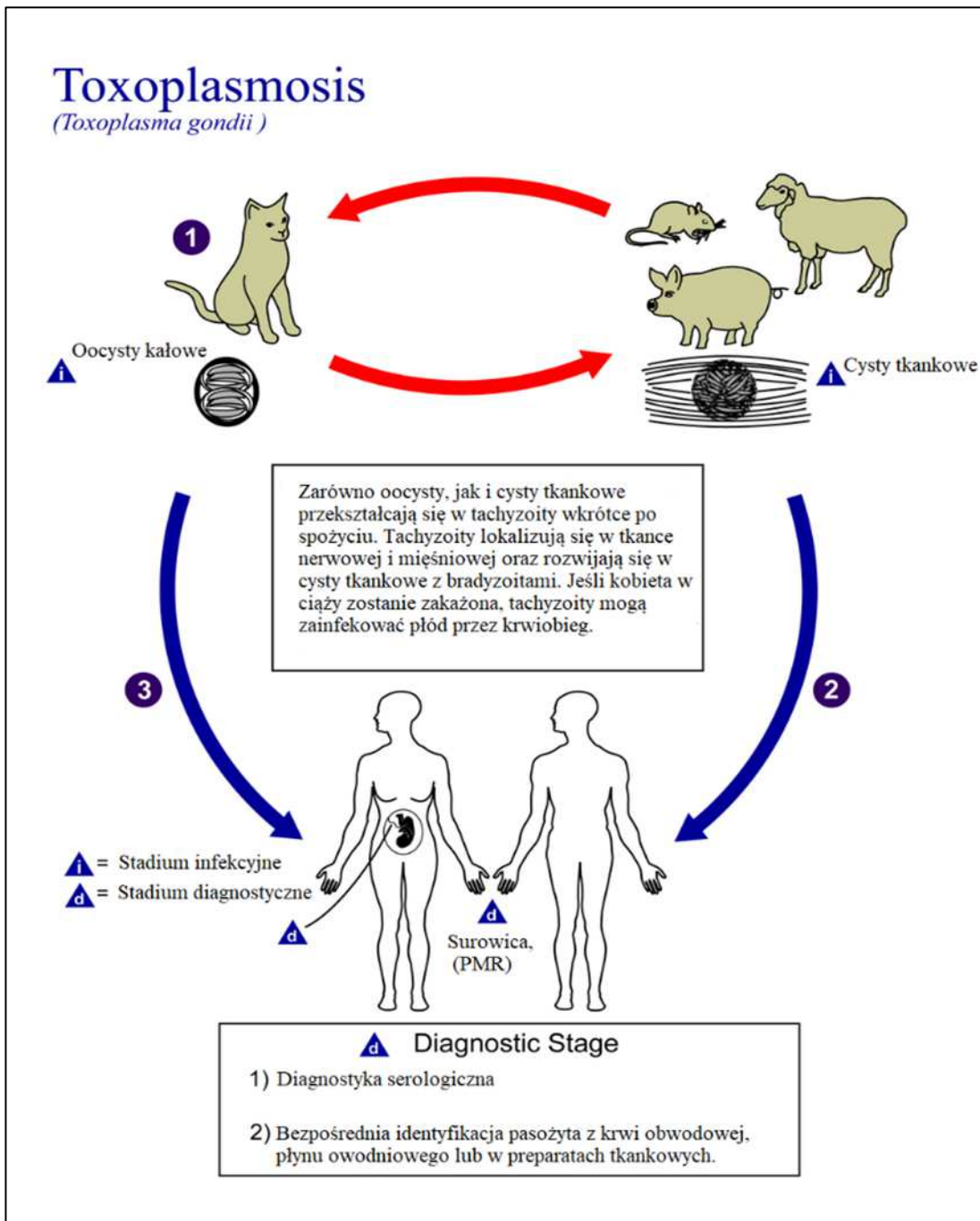
<https://pl.wikipedia.org/wiki/Malaria#/media/Plik:Plasmodium-cykl-rozwojowy.jpg>



Ryc. 5. Zarodek pasmowy (*Plasmodium malariae*), strzałką oznaczono merozoit rozrywające krwinkę, obraz spod mikroskopu, powiększenie 480×

Toxoplasma (*Toxoplasma gondii*)

| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------------|--|
| Klasyfikacja | Pierwotniaki (Protozoa) |
| Występowanie | Kosmopolityczne |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny: kotowate (enterocyty jelita cienkiego). Żywiciele pośredni: człowiek oraz inne ssaki/ptaki (mięśnie, mózg, siatkówka, tkanki narządowe) |
| Droga zakażenia | Spożycie oocyst z zanieczyszczonej gleby/wody/warzyw; spożycie cyst tkankowych w surowym lub niedogotowanym mięsie; transmisja przezłożyskowa; rzadziej transfuzje lub transplantacje |
| Rozmnażanie | Bezpłciowe (endodyogonia) w żywicielu pośrednim; rozmnażanie płciowe w enterocytach kotowatych |
| Przystosowanie | Tworzenie przetrwalnych cyst tkankowych, modulacja odpowiedzi immunologicznej gospodarz |
| Forma inwazyjna | Dla człowieka: oocysta (zawierająca sporozoitę) lub cysta tkankowa (bradyzoity) |
| Forma diagnostyczna | Tachyzoity (rzadko widoczne w tkankach), cysty tkankowe; najczęściej wykrywa się jednak przeciwciała IgM/IgG lub DNA pasożyta |
| Choroba | Toksoplazmoza |
| Metodyka/Metodyka diagnozy | Krew (serologia, PCR), płyn owodniowy (PCR), rzadziej tkanki z biopsji |



Ryc. 6. Cykl życiowy toksoplazmy (*Toxoplasma gondii*),
 (https://en.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii#/media/File:Toxoplasma_gondii_Life_cycle_PHIL_3421_lores.png modyfikowana)

Przywry (*Trematoda*)

Przywry to pasożyty z grupy płazińców, które mogą zakażać ludzi i zwierzęta. Charakteryzują się skomplikowanym cyklem rozwojowym z udziałem żywicieli pośrednich i ostatecznych. Zwykle bytują w wątrobie, jelitach lub naczyniach krwionośnych. Są obojnakami i posiadają przyssawki, dzięki którym przyczepiają się do tkanek gospodarza.

Przykłady gatunków przywr:

- **Przywra wątrobowa (*Fasciola hepatica*)**

Zakażenie następuje po spożyciu skażonej wody lub roślin wodnych. Larwy przemieszczają się do wątroby, gdzie mogą uszkadzać mięsz i drogi żółciowe, prowadząc do zapaleń, krwotoków, a nawet marskości.

- **Przywra krwi (*Schistosoma haematobium*)**

Pasożyt bytuje w naczyniach krwionośnych człowieka. Zakażenie możliwe głównie w rejonach tropikalnych. Larwy przenikają przez skórę w czasie kontaktu z wodą.

- **Przywra jelitowa (*Fasciolopsis buski*)**

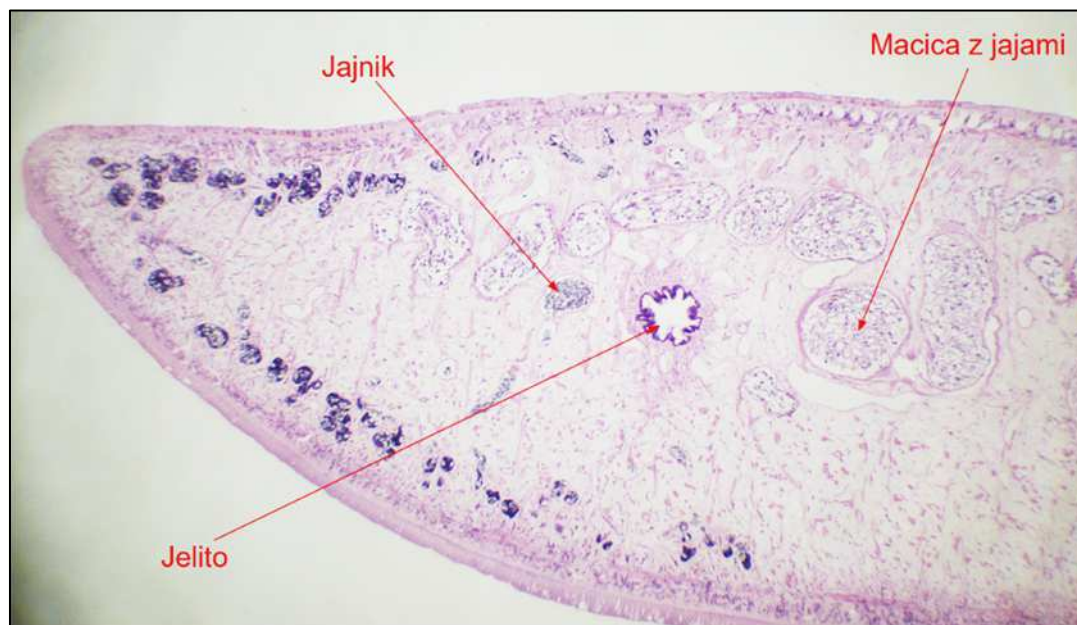
Występuje głównie w Azji Południowo-Wschodniej. Zakażenie następuje drogą pokarmową. Pasożytuje w jelitach, osiągając duże rozmiary.

- **Przywra chińska (*Clonorchis sinensis*)**

Zakażenie następuje przez spożycie niedogotowanych ryb słodkowodnych. Pasożyt bytuje w przewodach żółciowych i może prowadzić do przewlekłych problemów trawiennych, a nawet raka wątroby.

Motylica wątrobowa (*Fasciola hepatica*)

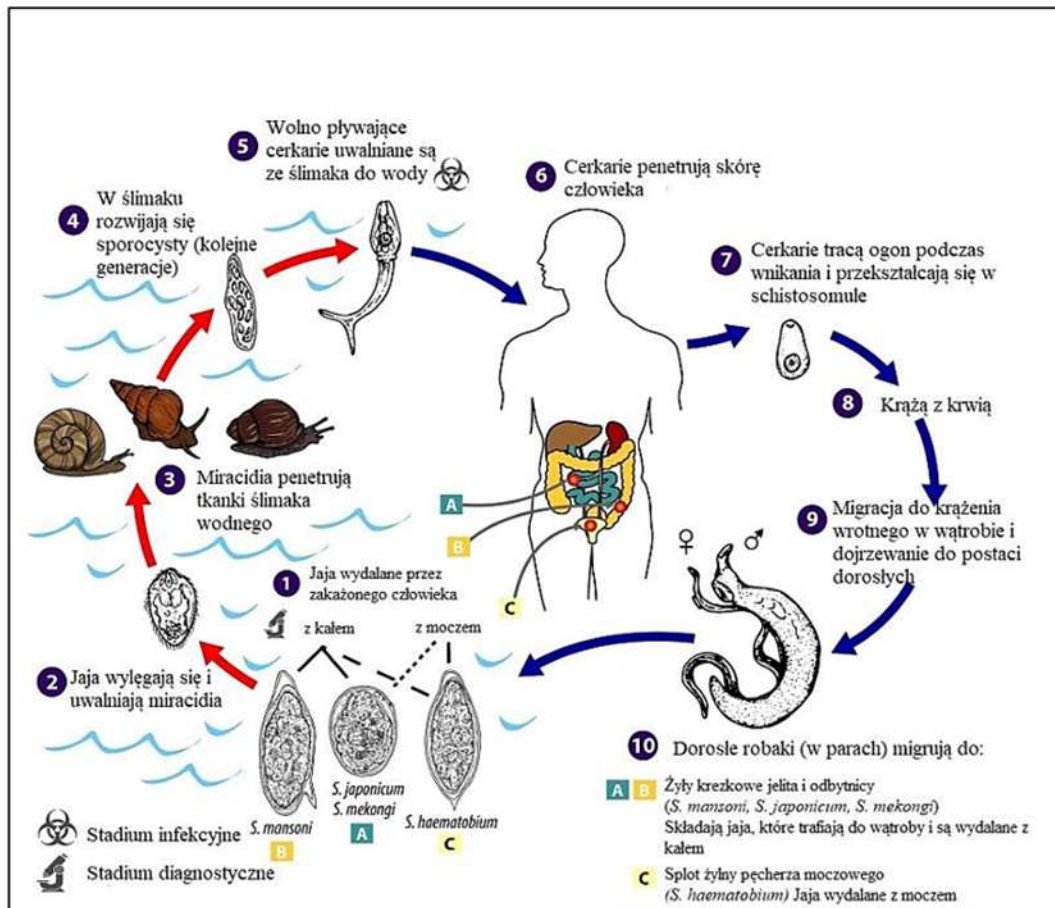
| | |
|------------------------------------|---|
| Kategoria | Informacje |
| Klasyfikacja | Plazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | kosmopolityczne |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny: ssaki roślinożerne (głównie bydło, owce), człowiek – drogi żółciowe, wątroba. Żywiciel pośredni: ślimaki wodne (głównie <i>Galba truncatula</i>) |
| Droga zakażenia | Spożycie surowych roślin wodnych, wody skażonej metacerkariami |
| Rozmnażanie | Płciowe (obojnak) |
| Przystosowanie | Przyssawki (gębowa i brzuszna) do przytwierdzenia się w drogach żółciowych, zdolność do penetracji tkanek wątroby, odporność larw na środowisko wodne, produkcja licznych jaj |
| Forma inwazyjna | Metacerkaria |
| Forma diagnostyczna | Jaja |
| Choroba | Fascjoloza |
| Metodyka /Metodyka diagnozy | Kał, serologia |



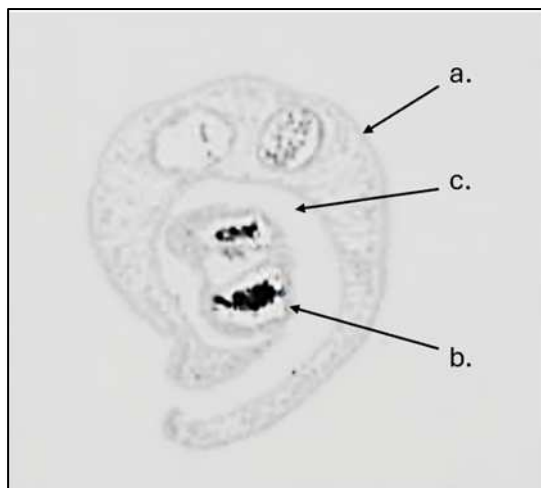
Ryc. 7. Motylica wątrobowa (*Fasciola hepatica*) przekrój poprzeczny, obraz spod mikroskopu powiększenie 120×

Przywra krwi (*Schistosoma haematobium*)

| Kategoria | Informacje |
|------------------------------------|---|
| Klasyfikacja | Plazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | Afryka oraz Bliski Wschód |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny (człowiek): żyły miednicy małej, głównie spłot żylny pęcherza moczowego. Żywiciel pośredni: ślimaki wodne z rodzaju <i>Bulinus</i> |
| Droga zakażenia | Aktywna penetracja skóry przez cercarie podczas kontaktu człowieka z zanieczyszczoną wodą |
| Rozmnażanie | Płciowe w naczyniach żylnych człowieka – produkcja jaj wydalanych z moczem |
| Przystosowanie | Rozdzielność płciowa (samiec i samica), wydłużony kształt umożliwiający pasożytnictwo w naczyniach krwionośnych, zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza (maskowanie antygenów), aktywna penetracja skóry przez cercarie |
| Forma inwazyjna | Cercarie (wolno pływające larwy w wodzie) |
| Forma diagnostyczna | Jaja |
| Choroba | Schistosomoza układu moczowego (bilharczoza moczowa). Długotrwałe zakażenie może prowadzić do włóknienia pęcherza, kamicy, a w konsekwencji — do raka płaskonabłonkowego pęcherza |
| Materiały/Metodyka diagnozy | Mocz (badanie osadu); w przewlekłych infekcjach pomocne są testy serologiczne, cystoskopia, USG pęcherza |



Ryc. 8. Cykl życiowy przywry krwi (*Schistosoma haematobium*)
<https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html> modyfikowana

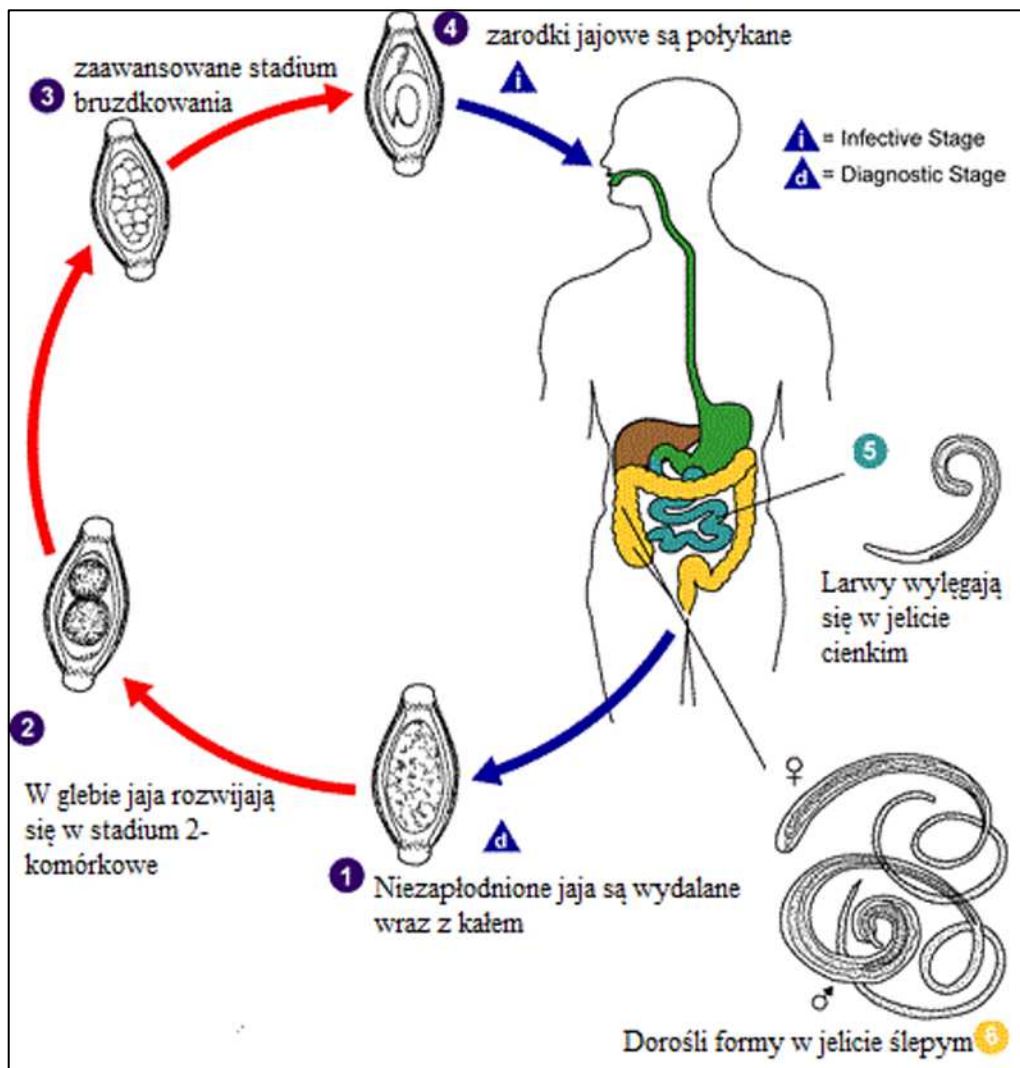


Ryc. 9. Przywra krwi (*Schistosoma haematobium*)
 przekrój poprzeczny. a. samiec, b. samica

Obraz spod mikroskopu powiększenie 480×. Samce i samice tworzą trwałe pary (w kopulacji) na całe życie, wyglądając jak pojedynczy, cylindryczny robak. Samiec: – płaszczony ciało tworzy c. kanał ginekofoalny, rowek, w którym przebywa samica. Samica-cylindryczne ciało, żyje zwinięta w kanale samca.

Włosogłówka ludzka (*Trichuris trichiura*)

| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------------|---|
| Klasyfikacja | Nicień (<i>Nematoda</i>) |
| Występowanie | Strefa tropikalna i subtropikalna |
| Ontohabitat | Jelito grube, głównie kątnica i wyrostek robaczkowy |
| Droga zakażenia | Droga oralna – połknięcie inwazyjnych jaj obecnych w glebie, na nieumytych warzywach lub rękach |
| Rozmnażanie | Płciowe |
| Przystosowanie | Przednia część ciała umożliwia wniknięcie w błonę śluzową jelita; zdolność do długiego przeżywania jaj w środowisku |
| Forma inwazyjna | Jajo |
| Forma diagnostyczna | Jaja |
| Choroba | Trichurioza |
| Metodyka/Metodyka diagnozy | Kał |

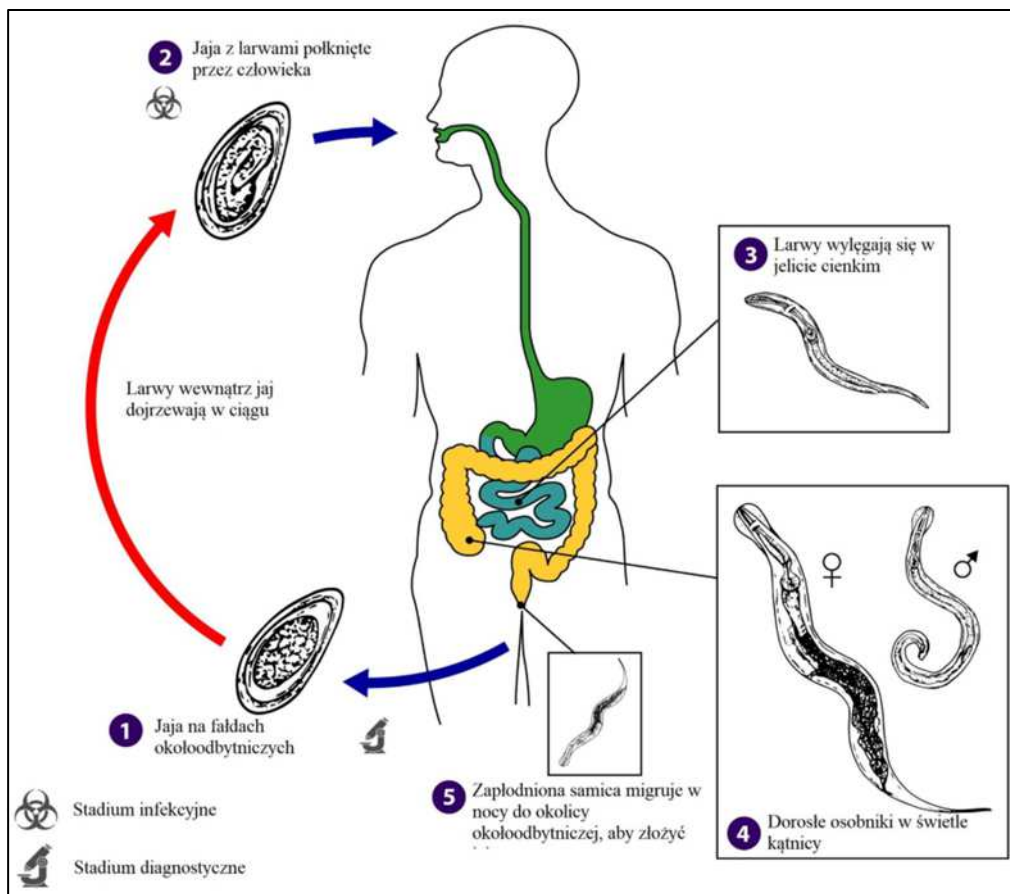


Ryc. 10. Cykl życiowy włosogłówki ludzkiej

https://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Trichuriasis_lifecycle.jpg modyfikowana

Owsik ludzki (*Enterobius vermicularis*)

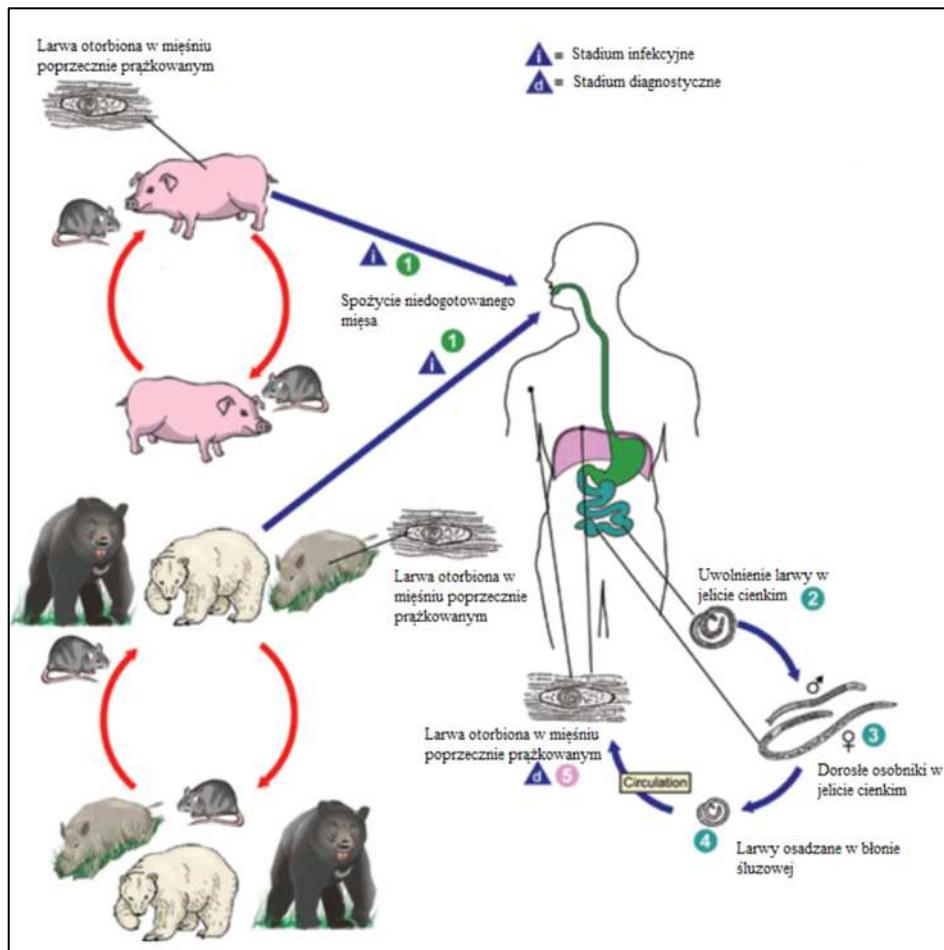
| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------|--|
| Klasyfikacja | Nicienie (<i>Nematoda</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczny |
| Ontohabitat | Człowiek – jelito grube, głównie kątnica, wyrostek robaczkowy oraz okolice odbytu (gdzie samice składają jaja) |
| Droga zakażenia | Droga oralna, rzadko inhalacyjna – połknięcie lub wdychanie jaj; autoinwazja przez drapanie okolicy odbytu i przeniesienie jaj na rękach |
| Rozmnażanie | Płciowe – samice wędrują nocą do okolicy odbytu, gdzie składają tysiące jaj |
| Przystosowanie | Krótkie cykle życiowe, duża liczba jaj, składanie jaj w okolicy odbytu (łatwe rozprzestrzenianie), bardzo lekkie i lepkie jaja |
| Forma inwazyjna | Jajo |
| Forma diagnostyczna | Jaja |
| Choroba | Owsica |
| Metodyka /Metodyka diagnozy | Wymaz z okolicy odbytu (test taśmy celofanowej); rzadziej jaja lub dorosłe osobniki widoczne na bieliźnie lub skórze |

Ryc. 11. Cykl rozwojowy owsika ludzkiego (*Enterobius vermicularis*)

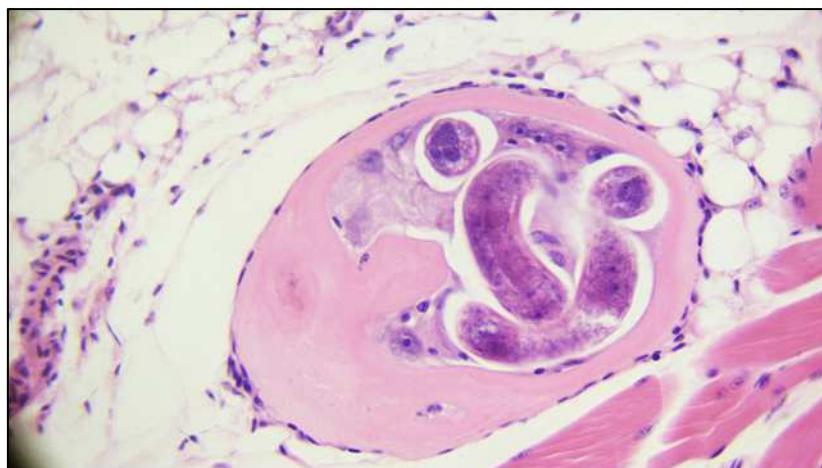
<https://www.cdc.gov/dpdx/enterobiasis/index.html>

Włosień kręty (*Trichinella spiralis*)

| | |
|-----------------------------------|--|
| Kategoria | Informacje |
| Klasyfikacja | Nicenie (<i>Nematoda</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczny |
| Ontohabitat | Jelito cienkie – dorosłe osobniki Mięśnie poprzecznie prążkowane – larwy otorbione (L1) |
| Droga zakażenia | Spożycie surowego lub niedogotowanego zakażonego mięsa (najczęściej wieprzowiny lub mięsa dzika) zawierającego larwy w cystach |
| Rozmnażanie | Płciowe w jelicie cienkim człowieka |
| Przystosowanie | Tworzenie odpornych cyst w mięśniach; zdolność larw do migracji przez ścianę jelita i układ krwionośny |
| Forma inwazyjna | Larwa |
| Forma diagnostyczna | Larwy |
| Choroba | Włośnica (Trichinelloza) |
| Materiały/Metodyka diagnoz | Krew (serologia), bioptat mięśniowy; w kontroli weterynaryjnej – próbki mięsa badane metodą trawienia |



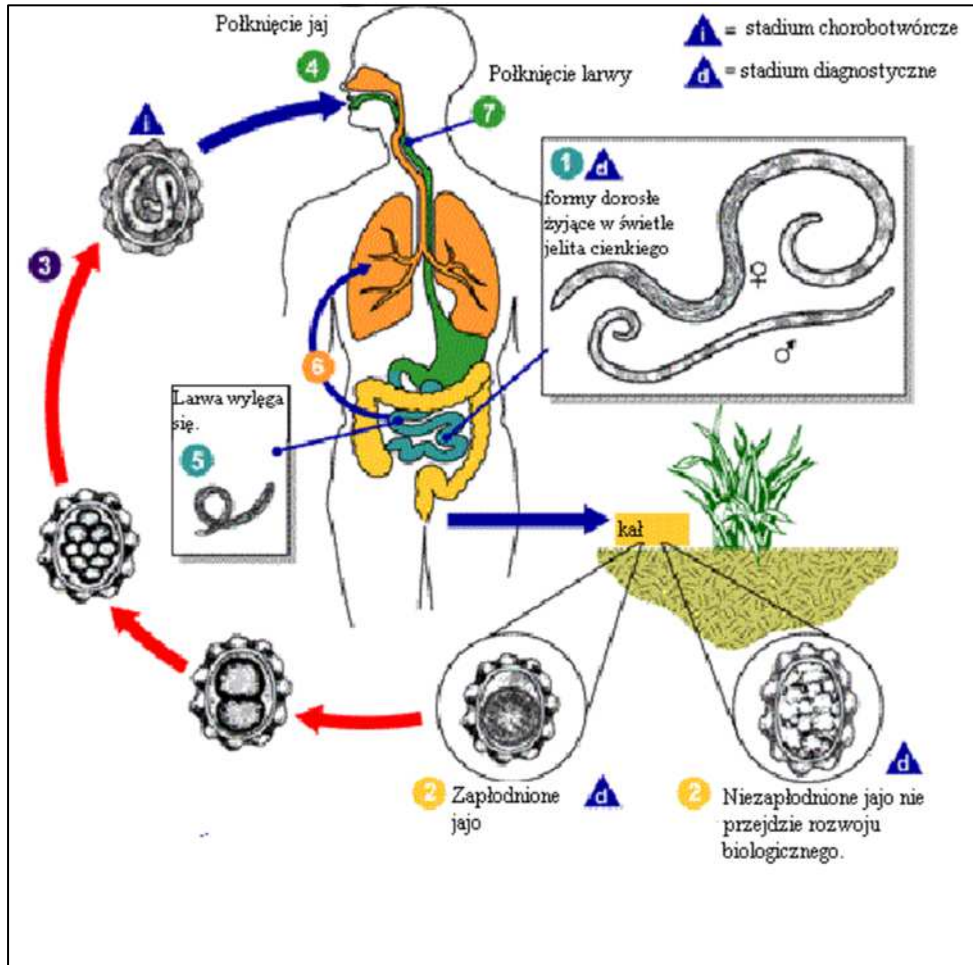
Ryc. 13. Cykl życiowy włośnia krętego (*Trichinella spiralis*)
<https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html>



Ryc. 13.a. Włoseń kręty (*Trichinella spiralis*) larwy w mięśniach. Obraz spod mikroskopu powiększenie 480×

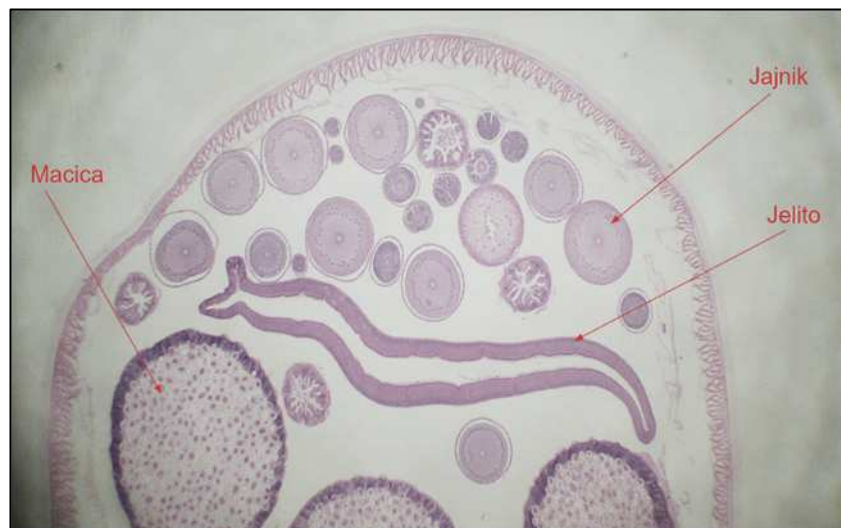
Glista ludzka (*Ascaris lumbricoides hominis*)

| Kategoria | Informacje |
|------------------------------------|--|
| Klasyfikacja | Nicienie (<i>Nematoda</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczna |
| Ontohabitat | Człowiek – jelito cienkie (postać dorosła). Larwy migrują przez wątrobę, serce i płuca |
| Droga zakażenia | Droga pokarmowa – połknięcie jaj inwazyjnych obecnych w glebie, wodzie lub na zanieczyszczonych warzywach |
| Rozmnażanie | Płciowe |
| Przystosowanie | Produkcja ogromnej liczby jaj; gruba, odporna otoczka jaj przetrwająca w glebie; zdolność larw do migracji przez tkanki gospodarza |
| Forma inwazyjna | Jajo |
| Forma diagnostyczna | Jaja w kale |
| Choroba | Glistnica (askarioza) |
| Materiały/Metodyka diagnozy | Kał (badanie koproskopowe) |



Ryc. 14. Cykl życiowy glisty ludzkiej (*Ascaris lumbricoides*)

https://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Glista_ludzka.GIF



Ryc. 15. Glista ludzka (*Ascaris lumbricoides hominis*) przekrój poprzeczny. Widoczne przekroje przez jajnik i macicę oraz jelito. Obraz spod mikroskopu, powiększenie 120×

Tasiemce (*Cestoda*)

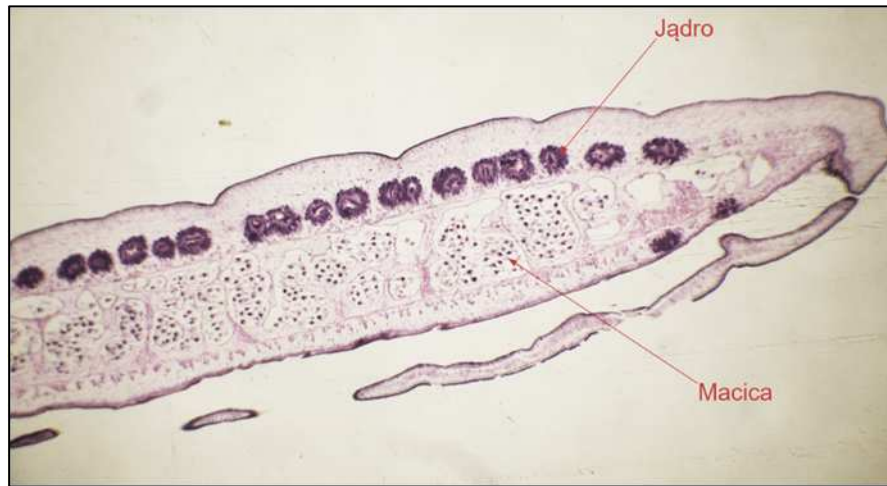
Tasiemce (*Cestoda*) to pasożytnicze płazińce, które w stadium dorosłym bytują w jelicie cienkim kręgowców, w tym człowieka. Tasiemczyce (teniozy) to choroby pasożytnicze wywoływane przez różne gatunki tasiemców. Wyróżniamy wiele gatunków tasiemców, które różnią się budową, cyklem życiowym i lokalizacją w organizmie.

Rodzaje tasiemców chorobotwórczych dla człowieka:

- **Tasiemiec uzbrojony (*Taenia solium*)** osiąga do 3 m długości, wyposażony w haczyki i przyssawki. Do zakażenia dochodzi po zjedzeniu mięsa wieprzowego zawierającego larwy (wągry).
- **Tasiemiec nieuzbrojony (*Taenia saginata*)** większy (do 5 m), pozbawiony haczyków. Zarażenie następuje po spożyciu niedogotowanej wołowiny zawierającej wągry. W Polsce odpowiada za większość przypadków tasiemczycy.
- **Tasiemiec karłowaty (*Hymenolepis nana*)** mały pasożyt (ok. 3–4,5 cm), do organizmu trafia z zanieczyszczoną żywnością lub przez brudne ręce.
- **Bruzdogłowiec szeroki (*Diphyllobothrium latum*)** największy tasiemiec ludzkiego przewodu pokarmowego (nawet do 15 m). Źródłem zakażenia są surowe lub niedogotowane ryby będące żywicielami pośrednimi tego tasiemca.
- **Bąbłowiec (*Echinococcus*)** jego larwy wywołują bąbłowicę, która może przybierać formę jedno- lub wielokomorową. Choroba rozwija się najczęściej po spożyciu jaj pasożyta wydalanych przez psy lub lisy. Zakażenie prowadzi do tworzenia torbieli w różnych narządach np. w wątrobie, płucach.

Tasiemce są pasożytami wewnętrznymi ich dorosłe formy bytują w jelicie cienkim a larwalne w różnych narządach. Nie mają przewodu pokarmowego, pobierają substancje odżywcze całą powierzchnią ciała pokrytą mikrokosmkami. Ciało składa się z główki (*scolex*) z narządami czepnymi, szyjki oraz członowego

tułowia (strobila) z dojrzałymi proglotydami zawierającymi narządy rozrodcze. Pasożyty te mogą żyć w organizmie człowieka nawet kilkadziesiąt lat.



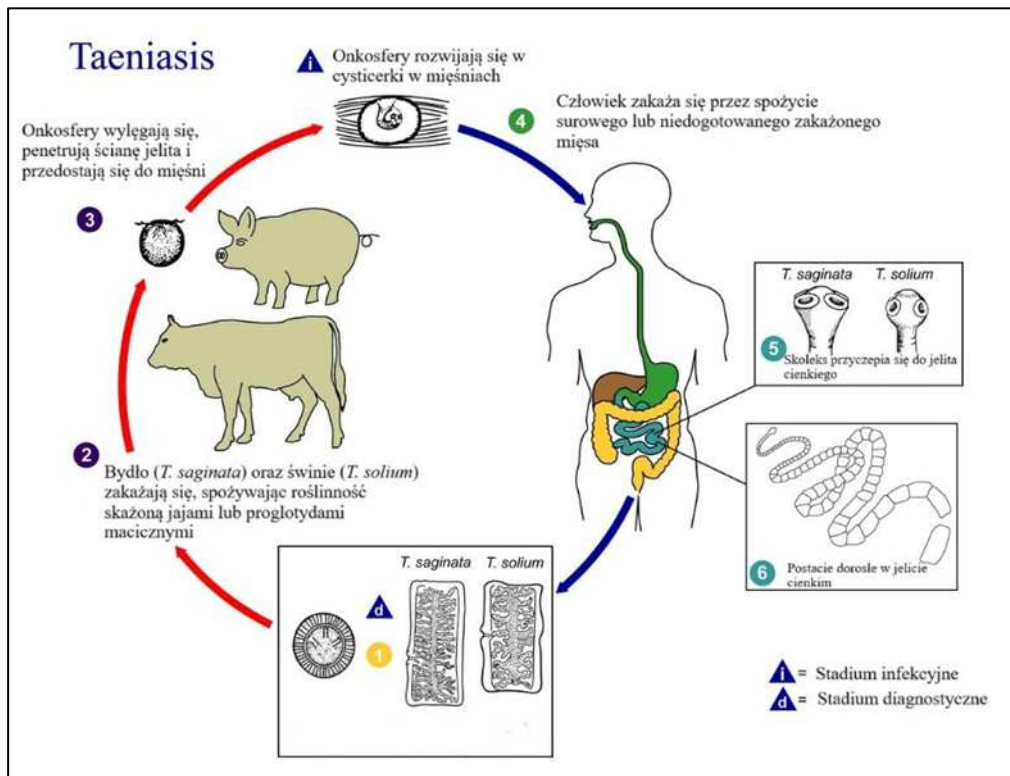
Ryc. 16. Człon tasiemca *Taenia ssp.*, przekrój poprzeczny, powiększenie 480×



Ryc. 17. Jaja tasiemca. *Taenia ssp.*, przekrój poprzeczny, powiększenie 120×

Tasiemiec uzbrojony (*Taenia solium*)

| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------|--|
| Klasyfikacja | Płazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczne |
| Ontohabitat | U człowieka (żywiciel ostateczny): jelito cienkie – postać dorosła. W przypadku zjedzenia jaj tego gatunku, nie wągrów znajdujących się w mięsie, człowiek staje się żywicielem pośrednim a larwy osadzają się w tkankach takich jak: np. mięśnie, mózg, oko, zamiast rozwijać się w dojrzałego pasożyta w jelicie. U świni (żywiciel pośredni): mięśnie – larwy (<i>cysticerci</i>) |
| Droga zakażenia | Zjedzenie mięsa wieprzowego zawierającego larwy (wągry) |
| Rozmnażanie | Płciowe (obojnaki) |
| Przystosowanie | Obecność skoleksa z podwójnym uzbrojeniem (haczyki + przyssawki); zdolność produkcji licznych proglotydy i jaj; odporność jaj na warunki środowiska; zdolność larw do penetracji tkanek i otorbiana się |
| Forma inwazyjna | Dla tasiemczycy: larwa (wągier) w mięsie świni |
| Forma diagnostyczna | Tasiemczyca: jaja i proglotydy w kale |
| Choroba | Tasiemczyca (obecność dorosłego tasiemca). Wągrzyca (<i>Cysticercosis</i>) |
| Materialy/Metodyka diagnozy | Kał (koproskopia), proglotydy; krew (serologia) |



Ryc. 18. Cykl życiowy tasiemca uzbrojonego (*T. solium*) i nieuzbrojonego (*T. saginata*)
https://pl.wikipedia.org/wiki/Tasiemiec_nieuzbrojony#/media/Plik:Taenia_solium_Life_cycle.tif
 if modyfikowany

Tasiemiec nieuzbrojony (*Taenia saginata*)

| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------|--|
| Klasyfikacja | Plazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczne |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny (człowiek): jelito cienkie – forma dorosła. Żywiciel pośredni (bydło): mięśnie – larwy (cystycerci) |
| Droga zakażenia | Spożycie surowej lub niedogotowanej wołowiny zawierającej larwy (wągry) |
| Rozmnażanie | Płciowe (obojnaki) |
| Przystosowanie | Silne przyssawki skoleksa (brak haczyków – „nieuzbrojony”), wydłużone i spłaszczone ciało ułatwia absorpcję pokarmu, masowa produkcja proglotydy |
| Forma inwazyjna | Wągry |
| Forma diagnostyczna | Jaja i proglotydy w kale |
| Choroba | Tasiemczyca |
| Materiały/Metodyka diagnozy | Próbka kału (badania koproskopowe), proglotydy; można także badać mięso bydła (kontrola weterynaryjna) |

Tasiemiec bąblowcowy (*Echinococcus granulosus*)

| Kategoria | Informacje |
|-----------------------------|--|
| Klasyfikacja | Płazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczne |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny: pies i inne psowate – jelito cienkie (postać dorosła). Żywiciele pośredni: owce, bydło, świnie, – narządy wewnętrzne (wątroba, płuca) – torbiele bąblowcowe. Człowiek jako żywiciel przypadkowy |
| Droga zakażenia | Połknięcie jaj znajdujących się w środowisku skażonym kałem psa (gleba, sierść, żywność, woda) |
| Rozmnażanie | Płciowe |
| Przystosowanie | Tworzenie torbieli bąblowcowych zawierających protoskoleksy, długotrwałe przeżywanie jaj w środowisku, zdolność larw do penetracji tkanek i rozwoju w dużą, wielokomorową zmianę torbielowatą |
| Forma inwazyjna | Jajo |
| Forma diagnostyczna | U człowieka: torbiel bąblowcowa widoczna w badaniach obrazowych; protoskoleksy i elementy torbieli w materiale biopsyjnym |
| Choroba | Bąblowica jednojamowa (echinokokoza typu cystowego) |
| Materiały/Metodyka diagnozy | Badania obrazowe (USG, CT, MRI), surowica (testy serologiczne), materiał operacyjny z torbieli |



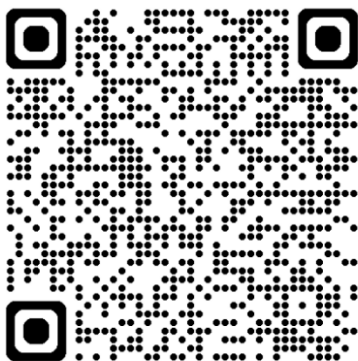
Ryc. 19. Przekrój przez cystę larwalną *Echinococcus* (torbiel bąblowcową, inaczej cystę hydatidową). Obraz z pod mikroskopa powiększenie 48×. Torbiel larwalna (cysta bąblowcowa) – cała centralna struktura, warstwa laminowana – zewnętrzna, gruba, różowa warstwa ściany torbieli, warstwa rozrodcza – cienka warstwa tuż pod warstwą laminowaną, Torebki łęgowe – wewnętrzne pofalowane struktury w świetle torbieli

Bruzdogłowiec szeroki (*Diphyllobothrium latum*)

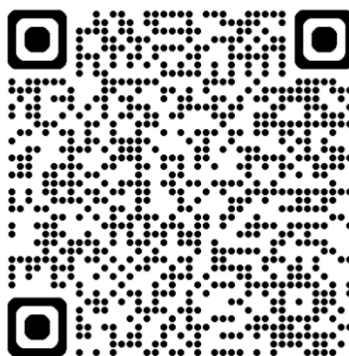
| Kategoria | Informacje |
|------------------------------------|---|
| Klasyfikacja | Plazińce (<i>Platyhelminthes</i>) |
| Występowanie | Kosmopolityczne |
| Ontohabitat | Żywiciel ostateczny (człowiek, ssaki rybożerne): jelito cienkie – postać dorosła. Żywiciele pośredni: skorupiaki (<i>Cyclops</i>) – procerkoid. ryby słodkowodne – plerocerkoid |
| Droga zakażenia | Spożycie surowej lub niedogotowanej ryby zawierającej plerocerkoid |
| Przystosowanie | Długość ciała sięgająca nawet 10–15 m; bruzdy przyssawkowe (botria) do przytwierdzenia; produkcja ogromnej liczby jaj; złożony cykl z dwoma żywicielami pośrednimi |
| Forma inwazyjna | Plerocerkoid |
| Forma aktywna | Dorosły tasiemiec w jelicie cienkim człowieka |
| Choroba | Difylobotrioza |
| Rozmnażanie | Płciowe |
| Forma diagnostyczna | Jaja w kale; czasem proglotydy |
| Materiały/Metodyka diagnozy | Kał (koproskopia, wykrycie jaj lub członów tasiemca) |

Instrukcje ćwiczeń laboratoryjnych

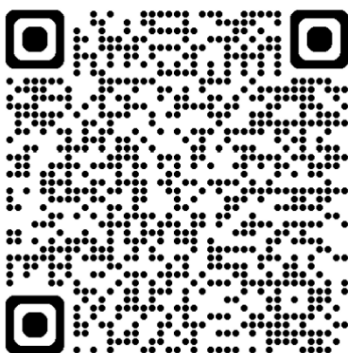
Ćwiczenie 1



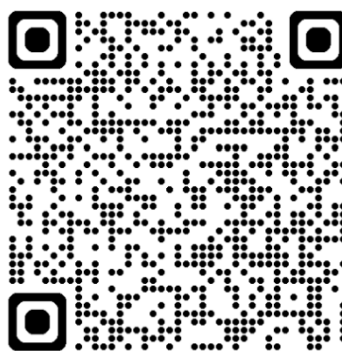
Ćwiczenie 2



Ćwiczenie 3



Ćwiczenie 4



Ćwiczenie 5



| | | |
|--------------------------|---------------|------------------|
| _____ Imię i nazwisko | _____ data | podpis asystenta |
| _____ Nr albumu | | |

ĆWICZENIE 1.

OBSERWACJE MIKROSKOPOWE

– MORFOLOGIA BAKTERII

Cel:

- Identyfikacja kształtów komórek bakteryjnych i ich układów przestrzennych
- Nabycie umiejętności rozpoznawania bakterii na preparatach stałych i przyżyciowych mikroskopowych
- Potwierdzenie obecności żywych kolonii bakterii w jogurcie oraz w pobiotyku

Przygotowanie mikroskopu: sprawdzenie czystości optyki, ustawienie oświetlenia, rozpoczęcie obserwacji od małego powiększenia.

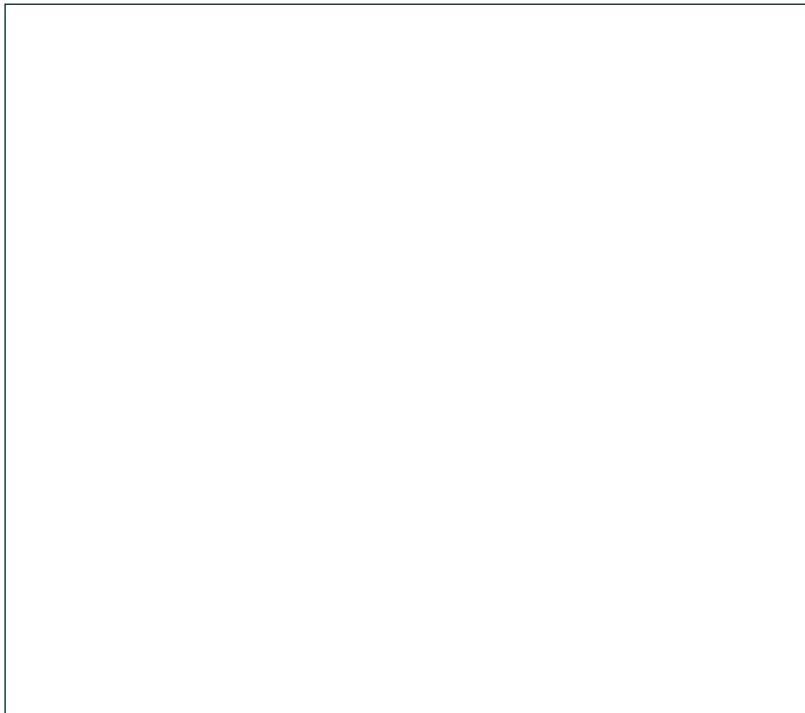
1. Obserwacje morfologii przy użyciu mikroskopu świetlnego na preparatach barwionych

Każda obserwacja powinna być udokumentowana w formie rysunku biologicznego. Rysunek powinien być odpowiednio duży, centralnie umieszczony i zachować rzeczywiste proporcje.

Ćwiczenie 1

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nr. 1. Nazwa gatunku.....

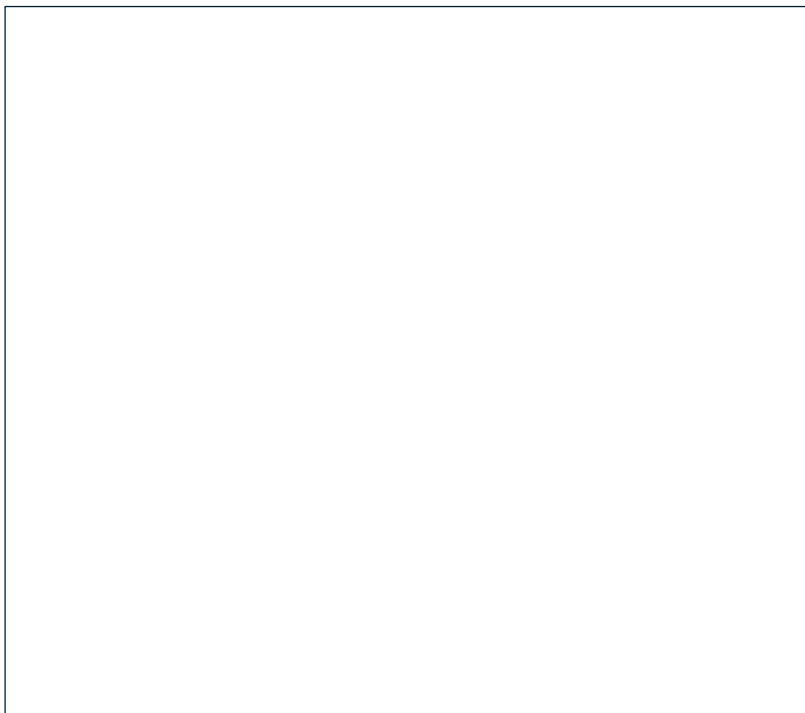


*Informacje dotyczące
rozpoznanego kształtu komórek
i ich ułożenia*

-
-
-
-
-
-
-

Powiększenie:.....

Nr. 2. Nazwa gatunku.....

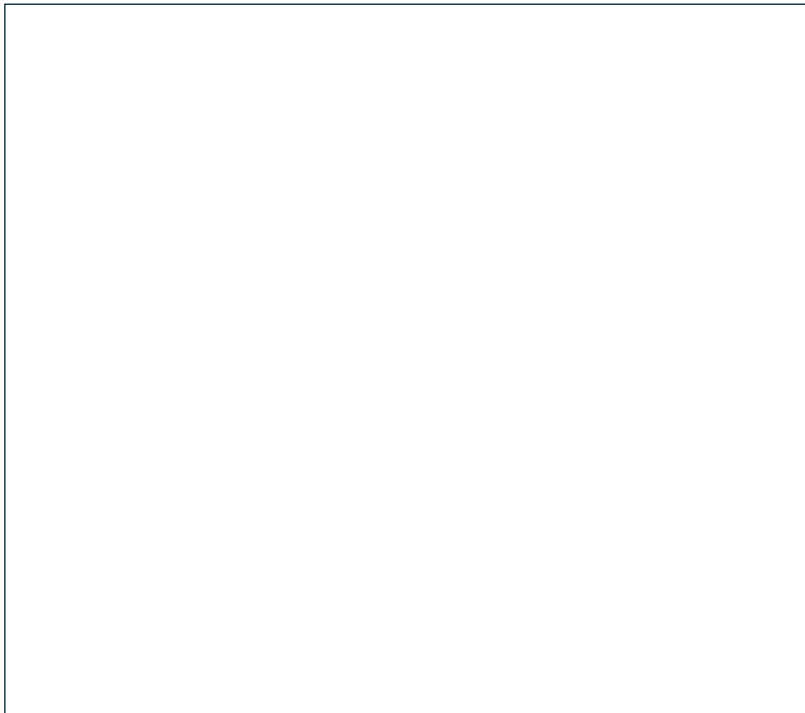


*Informacje dotyczące
rozpoznanego kształtu komórek
i ich ułożenia*

-
-
-
-
-
-
-

Powiększenie:.....

Nr. 3. Nazwa gatunku.....

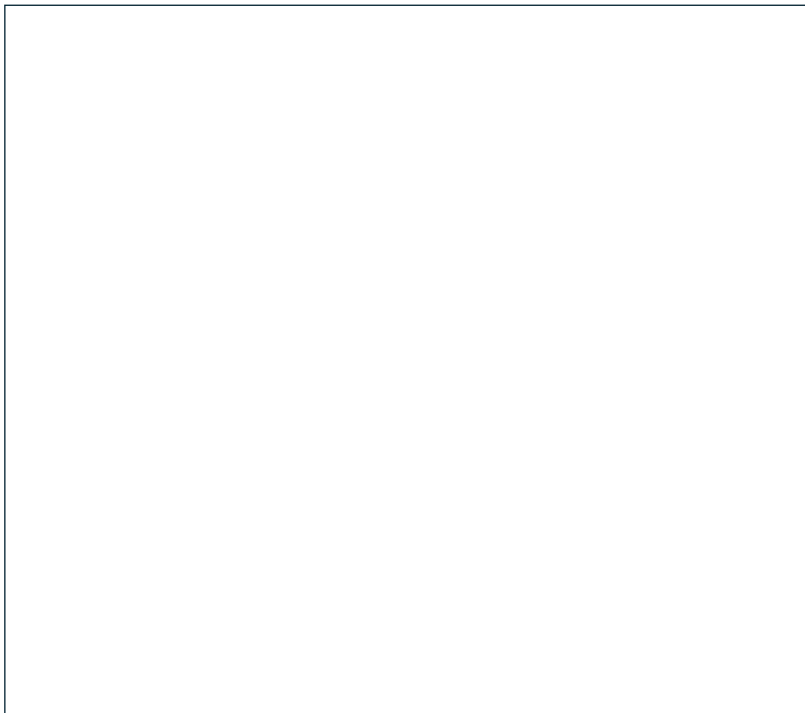


*Informacje dotyczące
rozpoznanego kształtu komórek
i ich ułożenia*

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Powiększenie:.....

Nr. 4. Nazwa gatunku.....



*Informacje dotyczące
rozpoznanego kształtu komórek
i ich ułożenia*

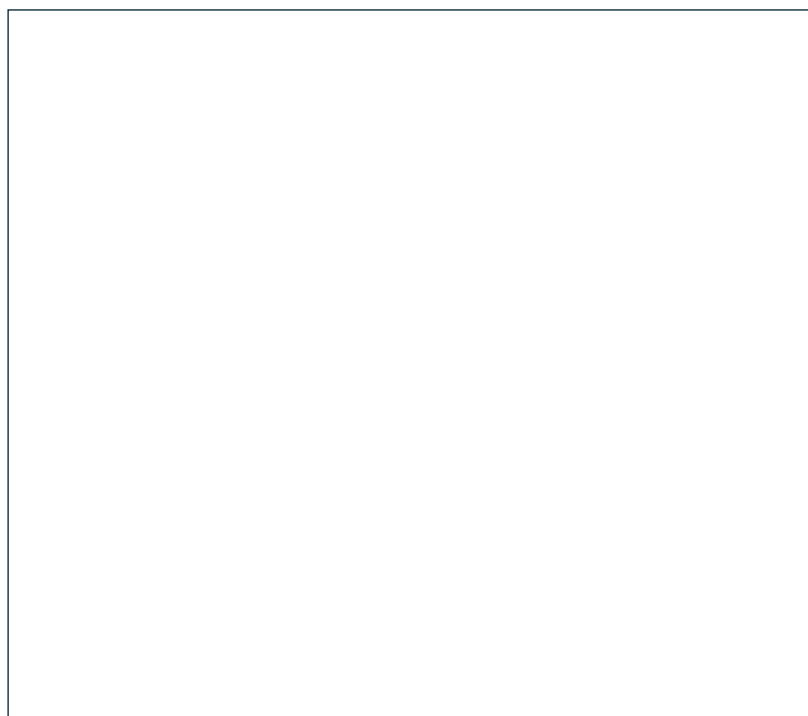
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Powiększenie:.....

Ćwiczenie 1

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nr. 5. Nazwa gatunku.....



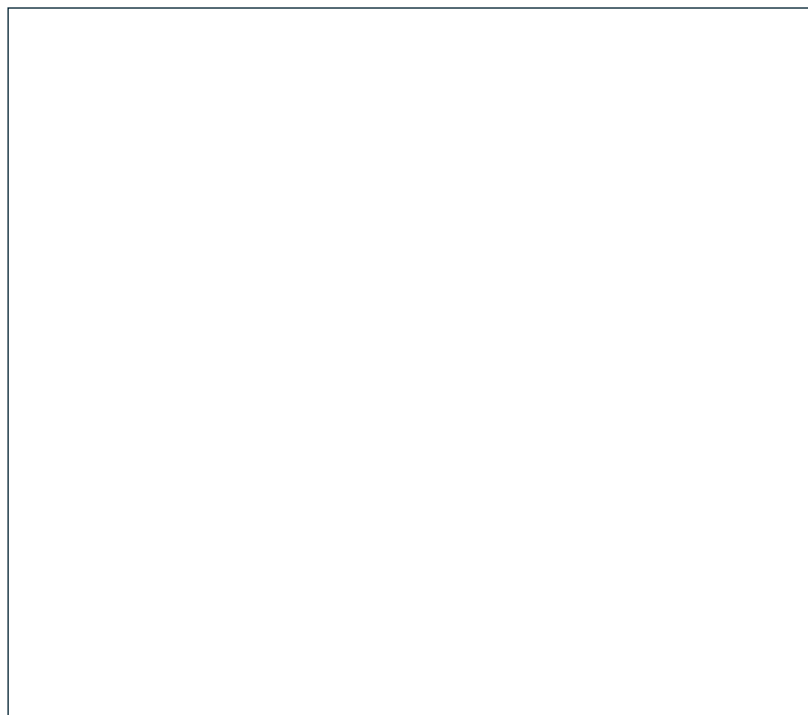
*Informacje dotyczące
rozpoznanego kształtu komórek
i ich ułożenia*

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Powiększenie:.....

2. Analiza składu bakterii w jogurcie i w probiotyku

2.1. Nanieś kroplę roztworu jogurtu na szkiełko podstawowe i przykryj szkiełkiem nakrywkowym, uważając, aby usunąć powietrze z preparatu. Narysuj obserwowane kształty bakterii



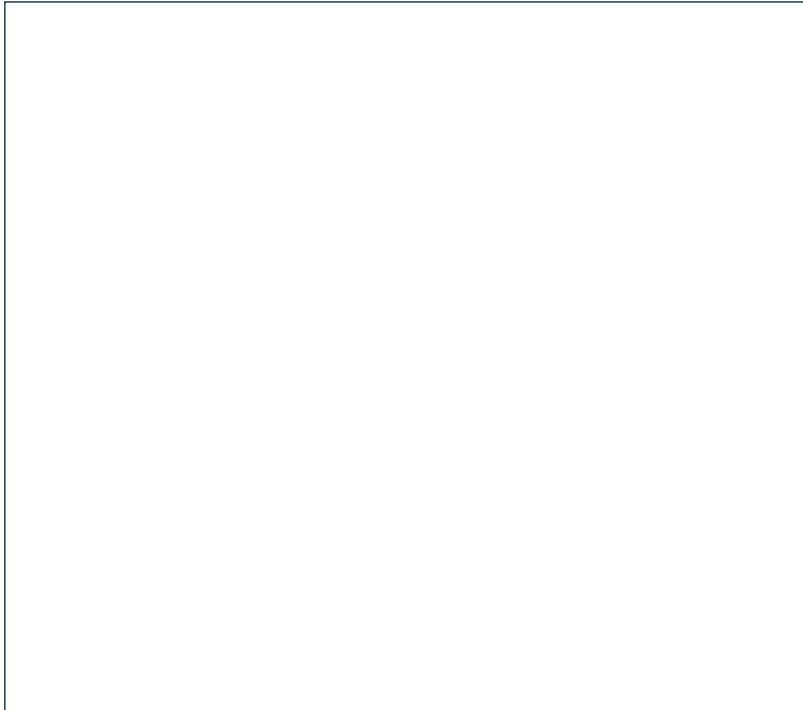
Czy są obecne żywe kultury bakterii?

Jakie formy komórek można zaobserwować?

Ile różnych form można zaobserwować?

Powiększenie:.....

2.2. Nanieś kroplę roztworu probiotyku na szkiełko podstawowe i przykryj szkiełkiem nakrywkowym, uważając, aby usunąć powietrze z preparatu. Narysuj obserwowane kształty bakterii



Czy są obecne żywe kultury bakterii?

Jakie formy komórek można zaobserwować?

Ile różnych form można zaobserwować?

Powiększenie:.....

| | | |
|--------------------------|---------------|---------------------------|
| _____ Imię i nazwisko | _____ data | _____ podpis asystenta |
| _____ Nr albumu | | |

ĆWICZENIE 2.

OBSERWACJE MIKROSKOPOWE

– BUDOWA I FUNKCJE

TKANEK ZWIERZĘCYCH

Cel:

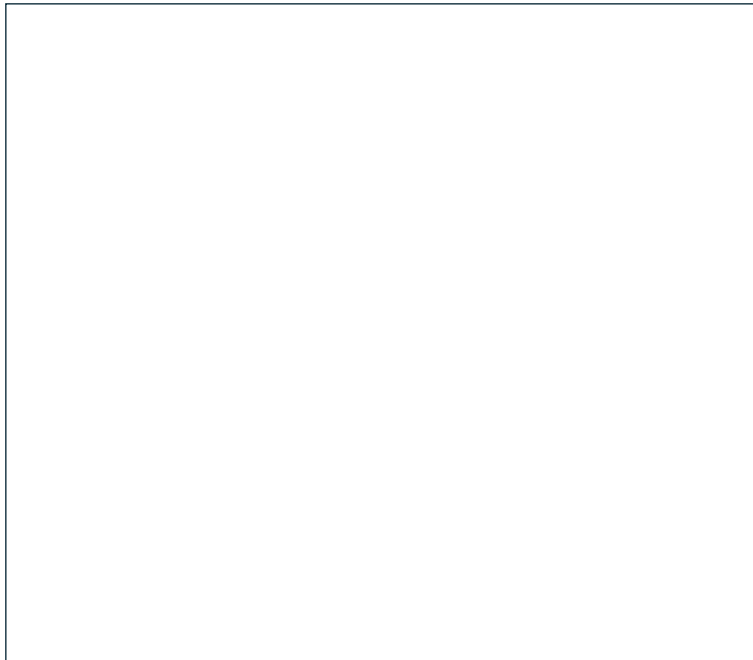
- Doskonalenie umiejętności obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego
- Doskonalenie umiejętności dokumentacji obrazu spod mikroskopu
- Opis i interpretacja obserwowanych struktur
- Powiązanie budowy komórek z funkcjami jakie pełni tkanka

Przygotowanie mikroskopu: sprawdzenie czystości optyki, ustawienie oświetlenia, rozpoczęcie obserwacji od małego powiększenia.

1. Obserwacja i dokumentacja struktury podstawowych typów tkanek

1.1 Tkanka nabłonkowa: należy zwrócić uwagę na liczbę warstw komórek, kształt komórek, ilość substancji międzykomórkowej oraz wielkość i kształt jądra komórkowego. Zaznacz strzałką i podpisz na rysunku cechy charakterystyczne dla obserwowanego preparatu

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....

.....

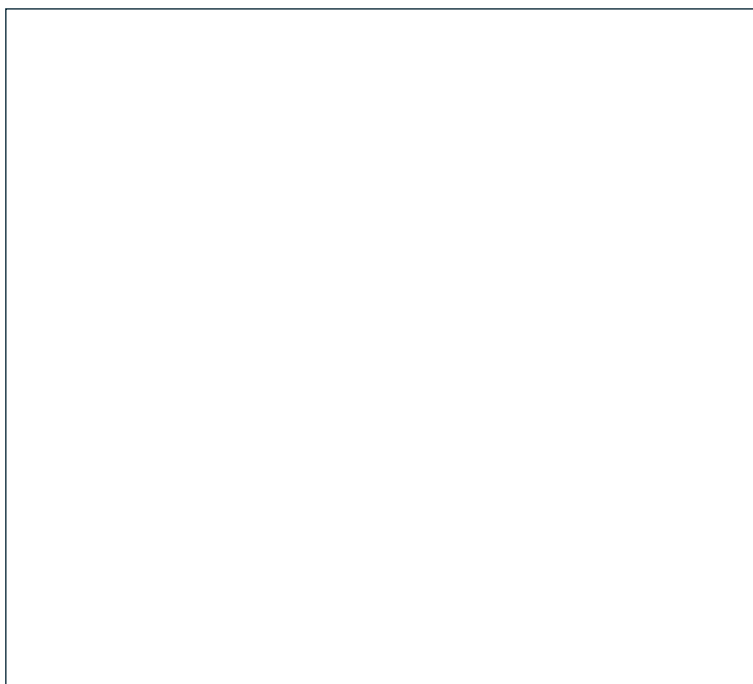
Cechy charakterystyczne:.....

.....

.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....

.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....

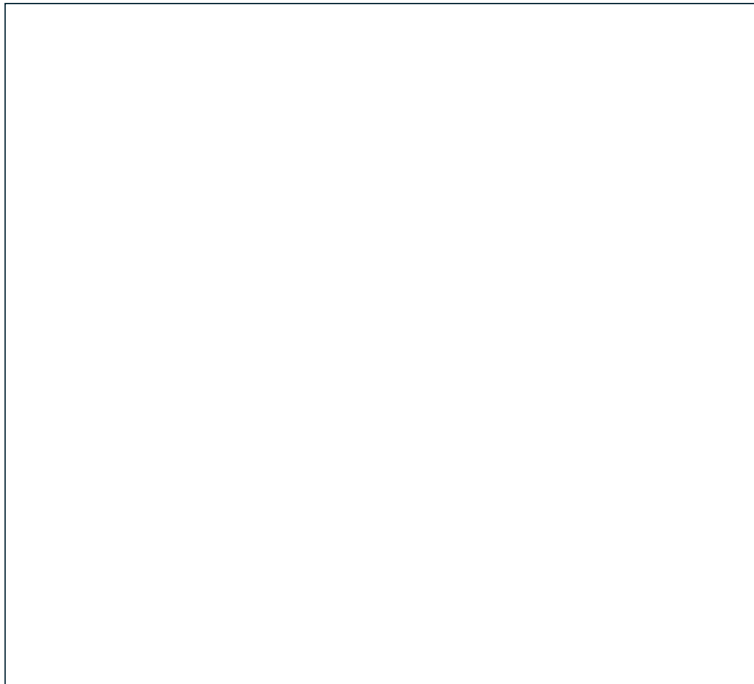
.....

Powiększenie:.....

Ćwiczenie 2

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

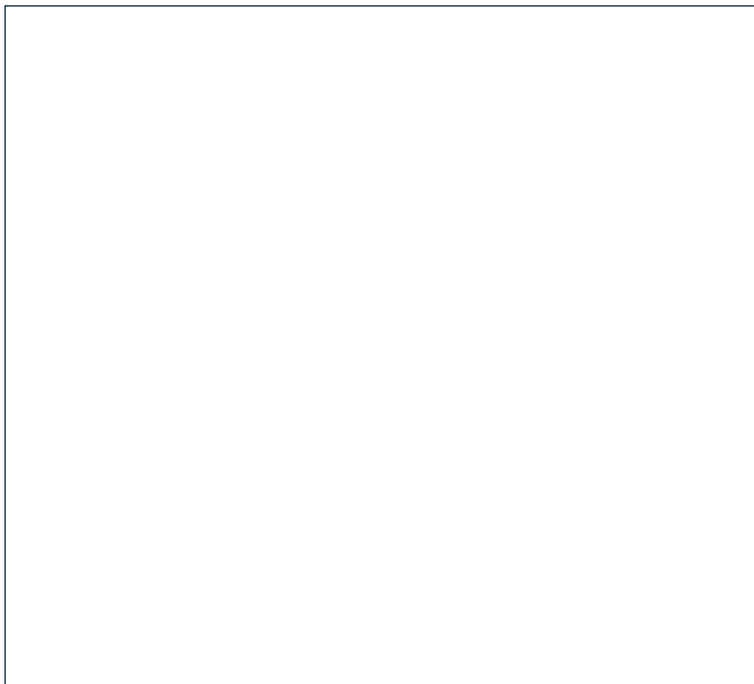
Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

1.2 Tkanka łączna: należy zwrócić uwagę na kształt i ułożenie komórek, obecność, umiejscowienie, wielkość, kształt i ilość jąder komórkowych, odstępy między komórkami wskazujące na ilość istoty międzykomórkowej.

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

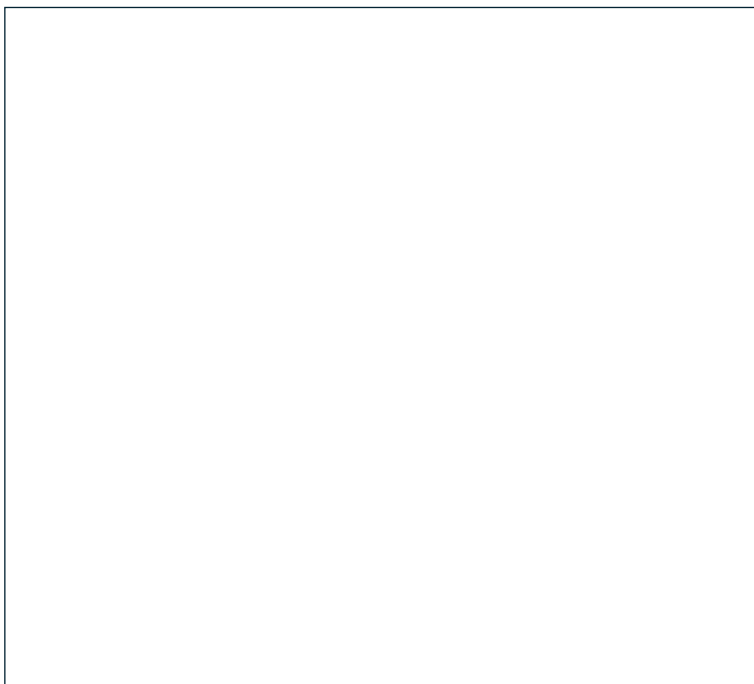
.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

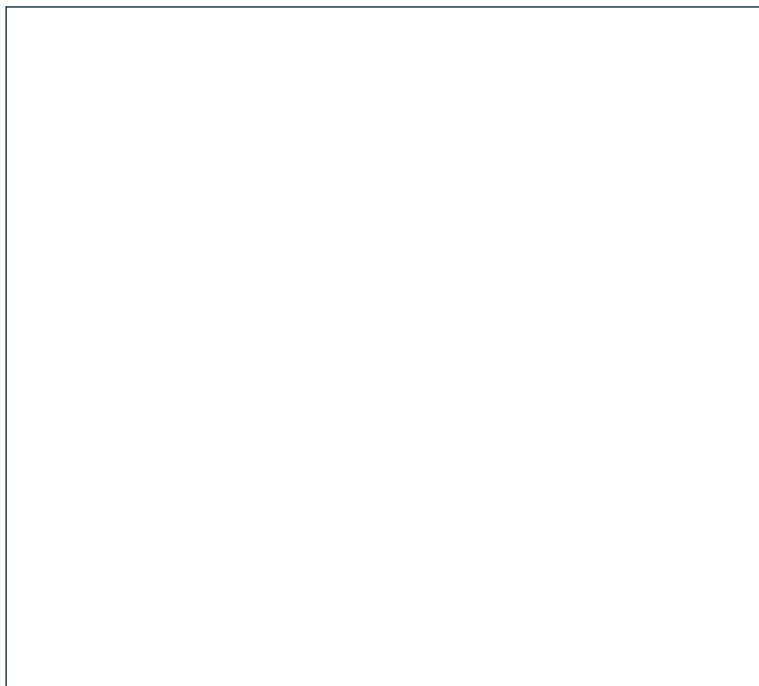
.....
.....

Powiększenie:.....

Ćwiczenie 2

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

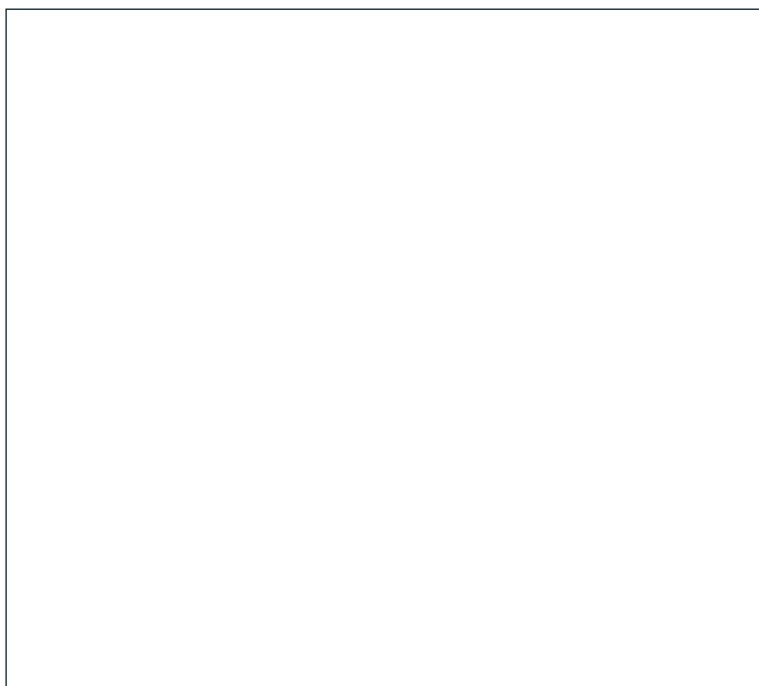
.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

1.3. Tkanka mięśniowa: należy zwrócić uwagę na kształt komórek i ułożenie komórek, umiejscowienie i liczbę jąder komórkowych, występowanie prążków.

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

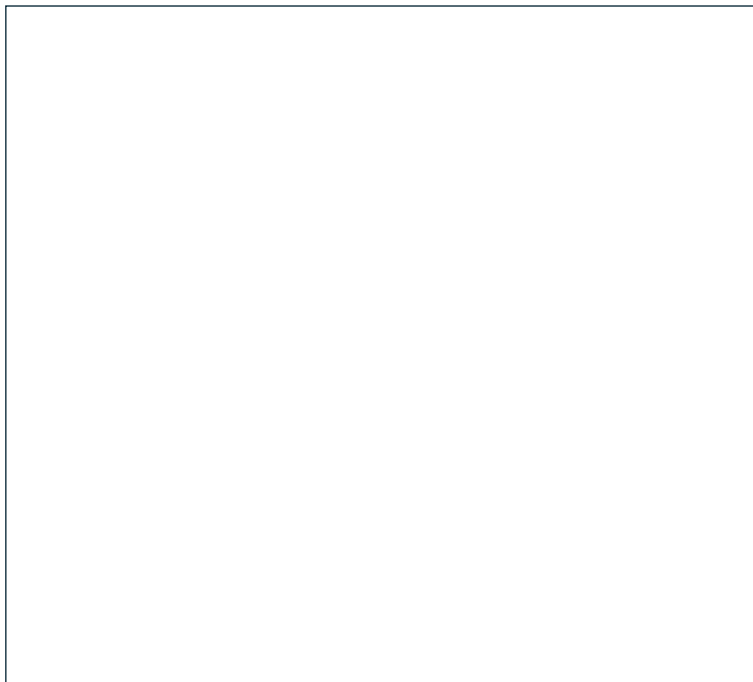
.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

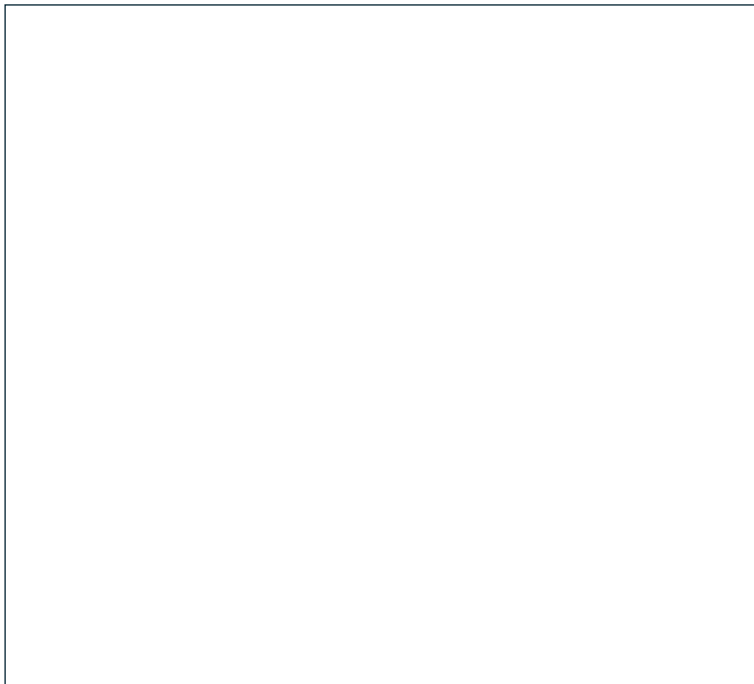
.....
.....

Powiększenie:.....

Ćwiczenie 2

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....
.....

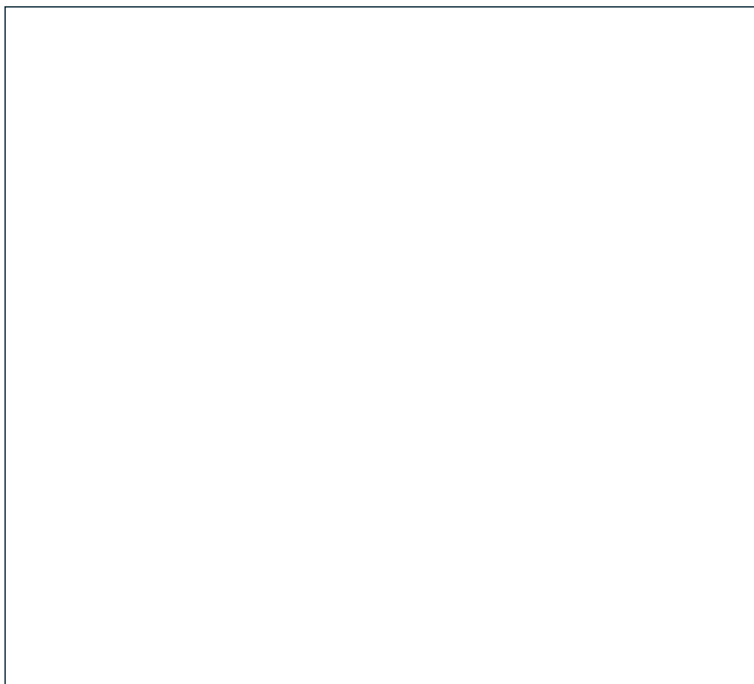
Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

1.4. Tkanka nerwowa; należy rozpoznać obecność osłonki mielinowej i przewężenia Ranviera.

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

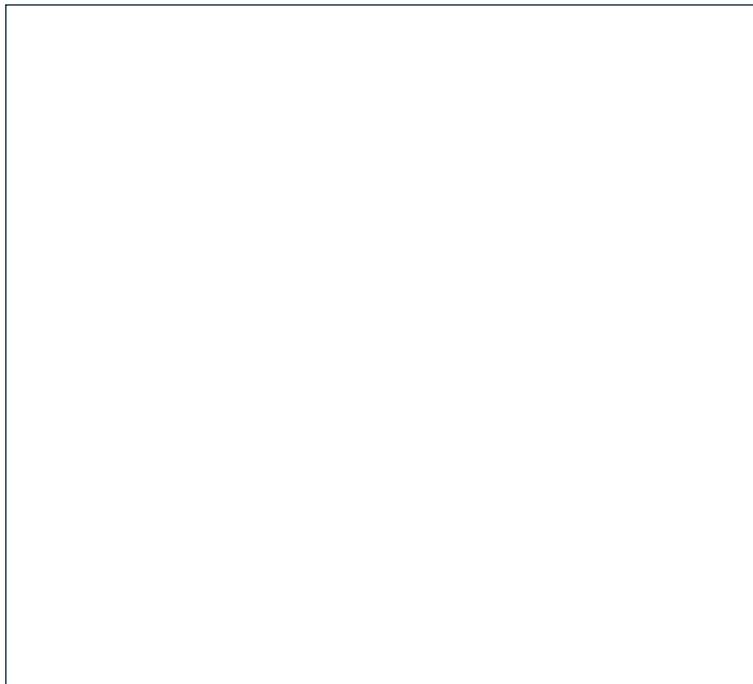
.....
.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....
.....

Powiększenie:.....

Nazwa.....



Funkcja tkanki:.....

.....

.....

Cechy charakterystyczne:.....

.....

.....

.....

Powiększenie:.....

| | | |
|--------------------------|---------------|---------------------------|
| _____ Imię i nazwisko | _____ data | _____ podpis asystenta |
| _____ Nr albumu | | |

ĆWICZENIE 3.

OBSERWACJE MIKROSKOPOWE

– PODZIAŁY KOMÓRKOWE

Cel:

- Doskonalenie umiejętności obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego
- Doskonalenie umiejętności dokumentacji obrazu spod mikroskopu
- Rozpoznawanie charakterystycznych cech faz podziału mitotycznego i mejotycznego
- Identyfikacja struktur odpowiedzialnych za gametogenezę
- Rozróżnianie stadiów rozwojowych komórek płciowych

Przygotowanie mikroskopu: sprawdzenie czystości optyki, ustawienie oświetlenia, rozpoczęcie obserwacji od małego powiększenia.

1. Obserwacja i dokumentacja podziału mitotycznego

Narysuj pojedynczą komórkę z charakterystycznym ułożeniem chromosomów i wpisz cechy charakterystyczne, po których można rozpoznać tą fazę

| Profaza | Metafaza | Anafaza | Telofaza |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | |
| Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne |

Ćwiczenie 3

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

2. Obserwacja i dokumentacja podziału mejotycznego

Narysuj pojedynczą komórkę z charakterystycznym ułożeniem chromosomów i wpisz cechy charakterystyczne, po których można rozpoznać tą fazę.

| Profaza I | Metafaza I | Anafaza I | Telofaza I |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | |
| Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne |

| Profaza II | Metafaza II | Anafaza II | Telofaza II |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | |
| Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne | Cechy charakterystyczne |

Ćwiczenie 3

Kierunek: *Analityka medyczna – Biologia medyczna*
Katedra i Zakład *Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

3.2. Preparat histologiczny: jajnik (przekrój poprzeczny) Obserwację należy rozpocząć od powiększenia 40×–60× i stopniowo przechodzić do większych powiększeń, identyfikując struktury od ogólnych do szczegółowych. Rysując należy zachować proporcje

| | |
|--|--|
| <p>Powiększenie 40×–60×</p> <p>Oznaczenie:</p> <p>Liczne pęcherzyki jajnikowe w różnych stadiach</p> | |
| <p>Powiększenie 400×–480×</p> <p>Oznaczenie:</p> <p>szczególne budowy pęcherzyka: oocyt osłonka przejrzysta (<i>zona pellucida</i>) komórki ziarniste jama pęcherzyka (<i>antrum</i>)</p> <p>ciałko żółte (jeśli obecne)</p> | |

| | | |
|--------------------------|---------------|---------------------------|
| _____ Imię i nazwisko | _____ data | _____ podpis asystenta |
| _____ Nr albumu | | |

ĆWICZENIE 4.

REAKCJE BARWNE W IDENTYFIKACJI ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

Cel:

- Poznanie chemicznych podstaw reakcji barwnych (ninhydrinowej, biuretowej, Molischa, Trommera i Legala)
- Rozróżnianie związków organicznych (aminokwasy I- i II-rzędowe, białka, cukry redukujące i nieredukujące, ketony, lipidy) na podstawie ich właściwości chemicznych
- Uświadomienie znaczenia diagnostycznego wykrywania białka, cukrów i ciał ketonowych (acetonu) w materiale biologicznym (moczu) w kontekście jednostek chorobowych (np. cukrzyca, nefropatie)

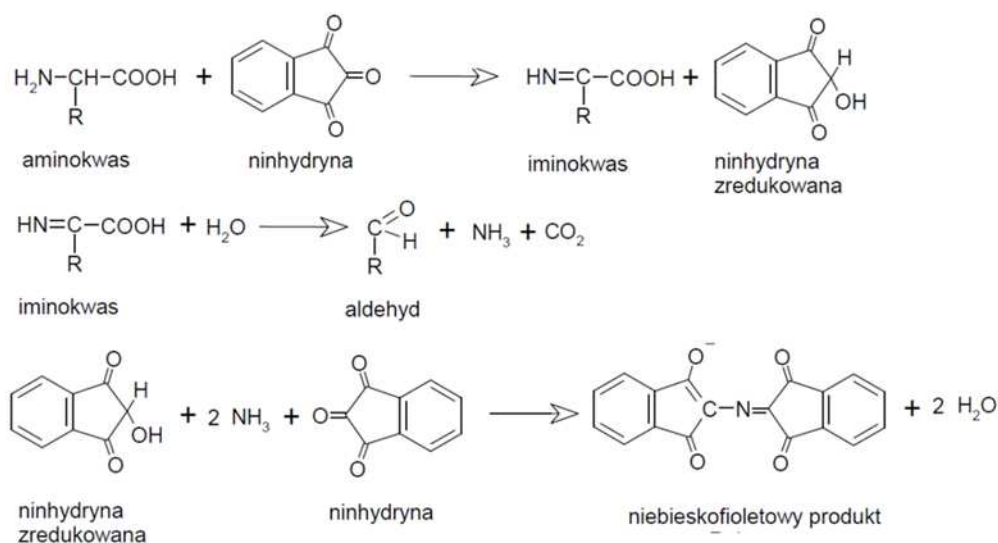
1. Wykrywanie aminokwasów i białek w materiale biologicznym

Reakcja ninhydrinowa

Ninhydryna jest związkiem o właściwościach silnie utleniających, prowokującym reakcje oksydacyjnej dekarboksylacji i dezaminacji aminokwasów. Produktami reakcji są: aldehyd krótszy o jeden atom węgla od aminokwasu podlegającego przemianom, CO₂, NH₃ oraz zredukowana forma ninhydriny (deoksyninhydryna). Większość aminokwasów w reakcji z ninhydryną tworzy produkty o barwie fioletowo-niebieskiej. Takie zabarwienie świadczy o obecności w strukturze aminokwasów I-rzędowych grup aminowych. Aminokwasy, które posiadają II-rzędową grupę aminową, np. prolina, podczas reakcji z ninhydryną tworzą produkty o barwie żółtej. Hydroksyprolina tworzy kompleks o barwie różowej.

Ćwiczenie 4

Kierunek: *Analityka medyczna – Biologia medyczna*
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM



Powstający ostatecznie barwny produkt jest wynikiem reakcji następczej, w której cząsteczki powstałej deoksyninhydryny tworzą barwnik azowy z cząsteczkami ninhydryny utlenionej, zastosowanej w nadmiarze, oraz z uprzednio powstałym amoniakiem.

Przygotuj 6 próbek i postępuj zgodnie z poniższą tabelą:

| odczynnik | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| woda destylowana | 0,5 ml | – | – | – | – |
| roztwór glicyny | – | 0,5 ml | – | – | – |
| roztwór proliny | – | – | 0,5 ml | – | – |
| roztwór albuminy | – | – | – | 0,5 ml | – |
| badana próbka moczu | – | – | – | – | 0,5 ml |
| 1% roztwór ninhydryny w acetonie | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| próbki ogrzewaj w termobloku przez 5 minut | | | | | |

Po zakończeniu ogrzewania, w przypadku pozytywnego wyniku próby, w próbce pojawia się fioletowo-niebieskie zabarwienie.

Obserwacje:

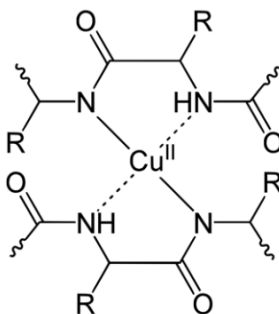
Wnioski:

Reakcja biuretowa

Białka oraz peptydy zawierające co najmniej dwa wiązania peptydowe tworzą w środowisku zasadowym z jonami Cu^{2+} barwne związki. W środowisku zasadowym następuje tautomeryzacja wiązania peptydowego z wytworzeniem formy enolowej zdolnej do dysocjacji. Jon Cu^{2+} tworzy wiązania z sąsiednimi grupami enolowymi, a ponadto wiązania koordynacyjne z atomami azotu. W wyniku tych reakcji powstaje kompleks o barwie fioletowej. Intensywność jego barwy jest wprost proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych. Zakres czułości tej metody wynosi od 10 mg białka/ml badanej próby.

Ćwiczenie 4

Kierunek: *Analityka medyczna – Biologia medyczna*
Katedra i Zakład *Biochemii i Farmakokinetyki WUM*



Związek kompleksowy o barwie
czerwonofioletowej lub niebieskofioletowej

Przygotuj 6 probówek i postępuj zgodnie z poniższą tabelą:

| odczynnik | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| woda destylowana | 0,5 ml | – | – | – | – |
| roztwór glicyny | – | 0,5 ml | – | – | – |
| roztwór proliny | – | – | 0,5 ml | – | – |
| roztwór albuminy | – | – | – | 0,5 ml | – |
| badana próbka moczu | – | – | – | – | 0,5 ml |
| odczynnik biuretowy | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| próbówki pozostaw w temperaturze pokojowej na 30 minut | | | | | |

Po zakończeniu ogrzewania, w przypadku pozytywnego wyniku próby, w probówce pojawia się zabarwienie fioletowo-granatowe.

Obserwacje:

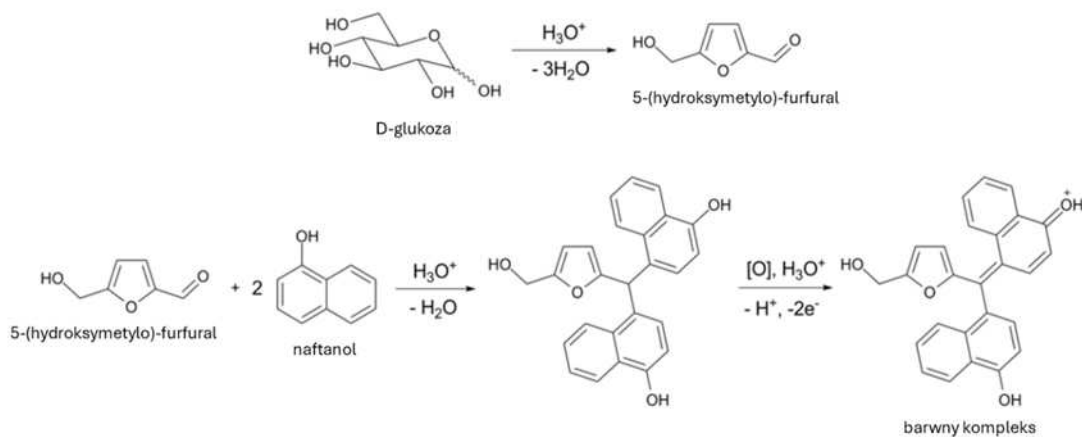
Wnioski:



2. Wykrywanie cukrów materiale biologicznym

2.1. Reakcja Molisha

Reakcja Molicha to ogólna reakcja pozwalająca na wykrycie cukrów, zarówno wolnych jak i związanych. Ujemny wynik wyklucza obecność cukru, dodatni zaś nie zawsze jest wystarczający do jego stwierdzenia, gdyż podobną reakcję dają aldehydy, aceton i inne związki. Reakcja Molischa polega na kondensacji pochodnych furfuralowych (utworzonych przez odwodnienie i cyklizację cukru w środowisku stężonego kwasu mineralnego) z α -naftolem, co przejawia się powstaniem czerwono-fioletowego zabarwienia, na granicy faz pojawia się fioletowo-różowy pierścień.



Ćwiczenie 4

Kierunek: *Analityka medyczna – Biologia medyczna*
Katedra i Zakład *Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Przygotuj 5 probówek i postępuj zgodnie z poniższą tabelą:

| odczynnik | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|----------|----------|----------|----------|
| woda destylowana | 0,5 ml | – | – | – |
| roztwór glukozy | – | 0,5 ml | – | – |
| roztwór skrobi | – | – | 0,5 ml | – |
| badana próbka moczu | – | – | – | 0,5 ml |
| 2% etanolowy roztwór α -naftolu | 2 krople | 2 krople | 2 krople | 2 krople |
| ostrożnie podwarstwić stężonym H_2SO_4 , nie mieszać | | | | |

Obserwacje:

Wnioski:

2.2. Reakcja Trommera

Związki zawierające grupę aldehydową redukują $\text{Cu}(\text{OH})_2$ do ceglastoczerwonego Cu_2O (odcień zależy od warunków reakcji).



Jeśli badana substancja nie zawiera grupy aldehydowej, bądź występuje w znikomym stężeniu, wówczas zawartość próbki czernieje po dłuższym ogrzewaniu na skutek termicznego rozkładu $\text{Cu}(\text{OH})_2$ do CuO (czarny osad). W przypadku pozytywnego wyniku próby wytrąca się ceglastoczerwony osad Cu_2O .

Przygotuj 5 probówek i postępuj zgodnie z poniższą tabelą:

| odczynnik | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|----------|----------|----------|----------|
| woda destylowana | 0,5 ml | – | – | – |
| roztwór glukozy | – | 0,5 ml | – | – |
| roztwór skrobi | – | – | 0,5 ml | – |
| badana próbka moczu | – | – | – | 0,5 ml |
| 2% roztwór wodny CuSO_4 | 2 krople | 2 krople | 2 krople | 2 krople |
| dodawaj kroplami 2 M roztwór NaOH do wytrącenia $\text{Cu}(\text{OH})_2$ | | | | |
| doprowadź zawartość probówki do wrzenia | | | | |

Obserwacje

Wnioski

| |
|--|
| |
|--|

3. Wykrywanie związków ketonowych

3.1. Reakcja Legala

Metyloketony (np. aceton) tworzą charakterystyczne zabarwienie z nitroprusydkiem sodowym ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Reakcja Legala, odznaczająca się dużą czułością, wykorzystywana jest m.in. do wykrywania związków ketonowych w moczu, w przypadku cukrzycy. W przypadku pozytywnego wyniku próby pojawia się ciemnoczerwone zabarwienie. Przygotuj 3 probówki i postępuj zgodnie z poniższą tabelą:

| odczynnik | 1 | 2 | 3 |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| woda destylowana | 0,5 ml | – | – |
| aceton | – | 0,5 ml | – |
| badana próbka moczu | – | – | 0,5 ml |
| nitroprusydek sodowy | 2 krople | 2 krople | 2 krople |
| dodaj 5 kropli 2 M roztworu NaOH | | | |

Obserwacje

Wnioski

4. Wykrywanie związków zapasowych w komórkach drożdży

Barwienie glikogenu w komórkach drożdży

Przygotuj zawiesinę drożdży w wodzie destylowanej.


- rozprowadź niewielką ilość roztworu badanych drożdży w kropli
- płynu Lugola umieszczonej na środku szkiełka przedmiotowego
- przykryj preparat szkiełkiem nakrywkowym i po 2–3 minutach obejrzyj pod mikroskopem

Protoplazma komórki barwi się na kolor jasnożółty,
glikogen – na kolor brunatny.

Ćwiczenie 4

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Obserwacje: rysunek spod mikroskopu



Obserwacje



Wnioski

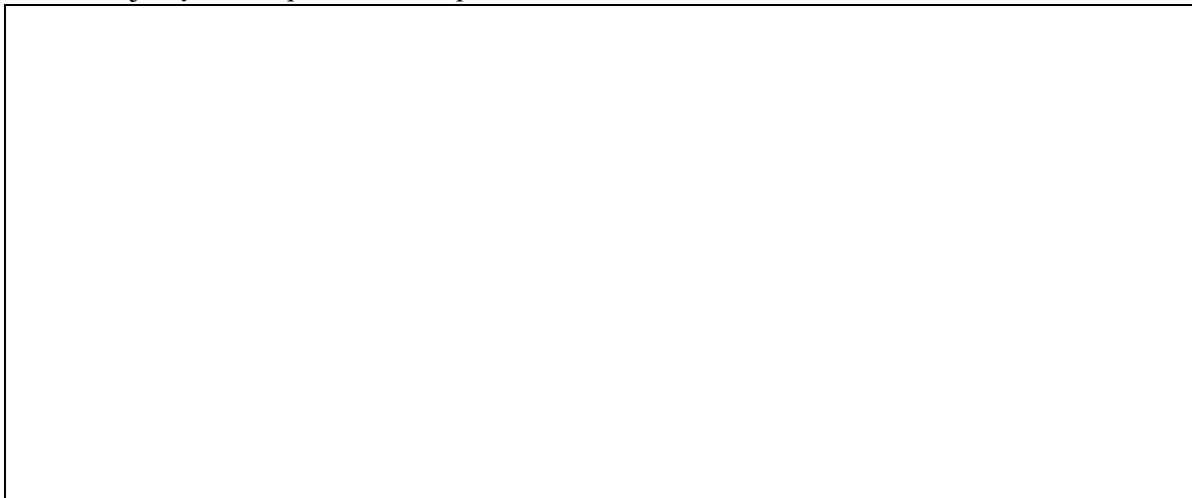


Barwienie lipidów w komórkach drożdży

- przygotuj na szkiełku podstawowym rozmaz zawiesiny drożdży i wysusz go w powietrzu; • pokryj rozmaz 0,3% roztworem czerni Sudanu B w 70% etanolu i pozostaw do wybarwienia przez 30 minut
- zlej barwnik i osusz preparat
- spłucz szkiełko 50% wodnym roztworem alkoholu etylowego
- przepłucz szkiełko wodą, wysusz i obejrzyj pod mikroskopem

Granulki tłuszczu barwią się na kolor niebiesko – szary
cytoplazma komórki na kolor błądy jasnorożowy

Obserwacje: rysunek spod mikroskopu



Wnioski:



| | | |
|--------------------------|---------------|---------------------------|
| _____ Imię i nazwisko | _____ data | _____ podpis asystenta |
| _____ Nr albumu | | |

ĆWICZENIE 5.

OBSERWACJE MIKROSKOPOWE

– WYBRANE PASOŻYTY CZŁOWIEKA

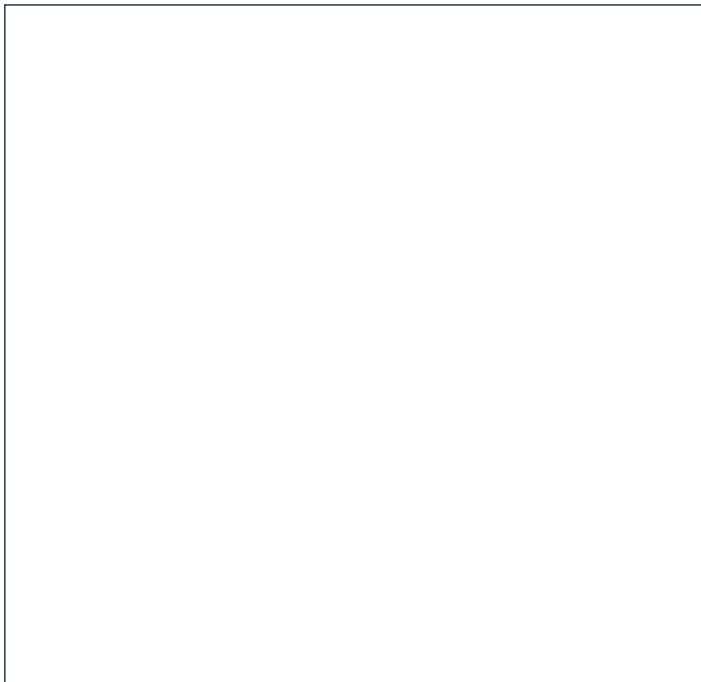
Cel:

- Doskonalenie umiejętności obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego
- Doskonalenie umiejętności dokumentacji obrazu spod mikroskopu
- Opis i interpretacja obserwowanych struktur
- Rozpoznawanie form inwazyjnych i diagnostycznych wybranych pasożytów człowieka
- Utrwalenie wiadomości o przystosowaniach do pasożytniczego trybu życia

Przygotowanie mikroskopu: sprawdzenie czystości optyki, ustawienie oświetlenia, rozpoczęcie obserwacji od małego powiększenia.

**1. Obserwacja i dokumentacja preparatów pasożytów należących do pierwotniaków
(Protozoa)**

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

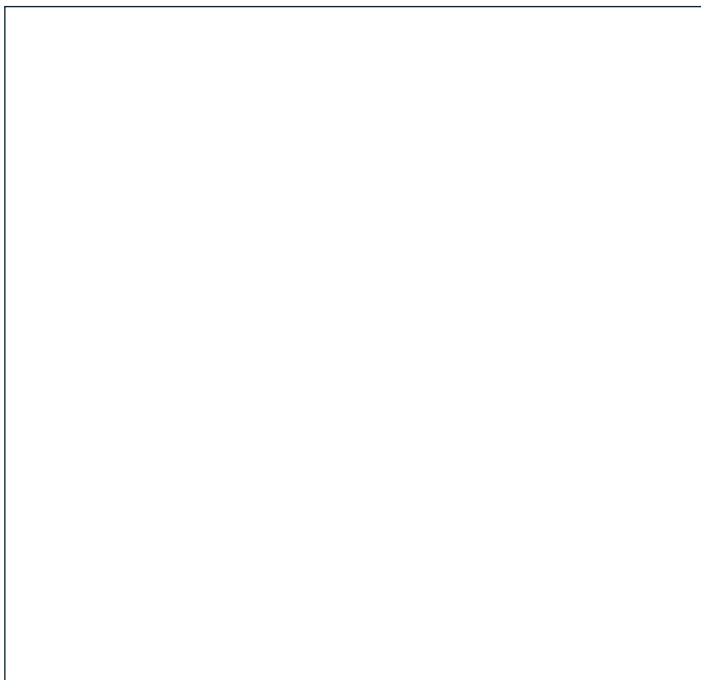
Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

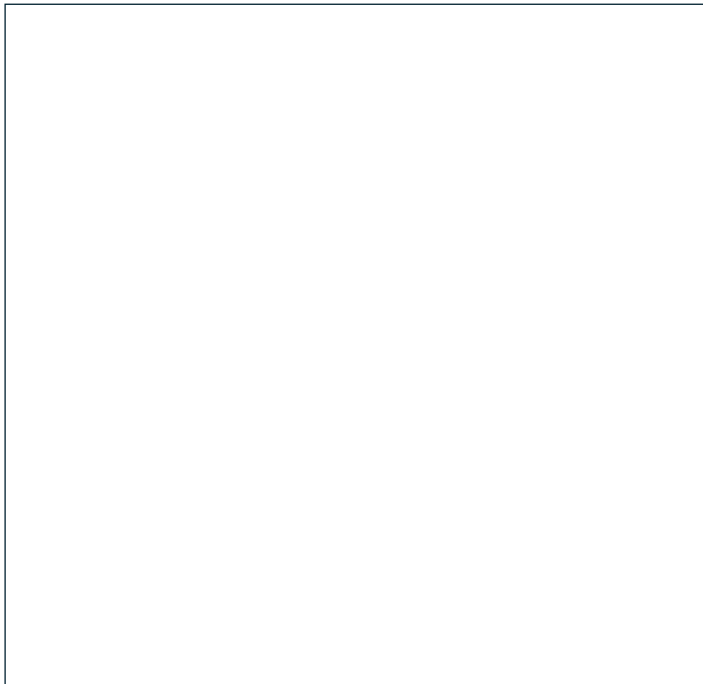
.....

Ćwiczenie 5

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

**2. Obserwacja i dokumentacja preparatów pasożytów należących do płazińców
(Platyhelminthes)**

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

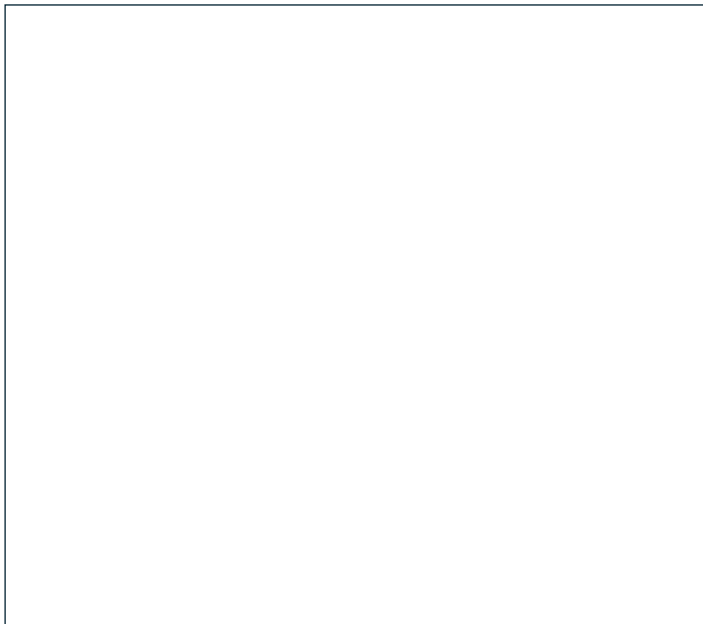
Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

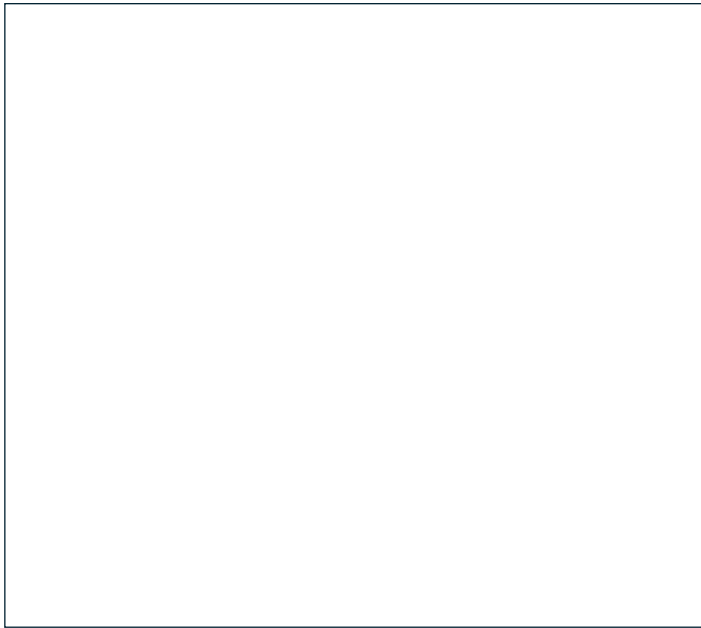
Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

Forma diagnostyczna.....

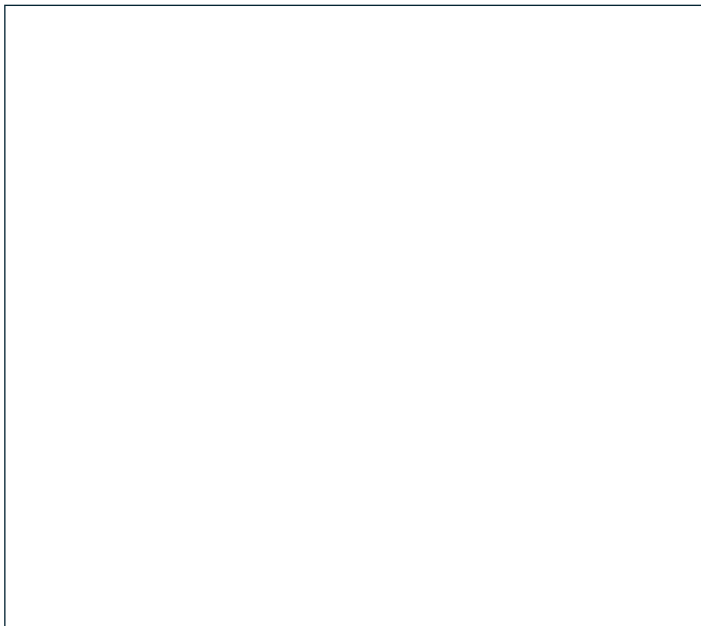
Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

3. Obserwacja i dokumentacja preparatów pasożytów należących do nicieni (*Nematoda*)

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

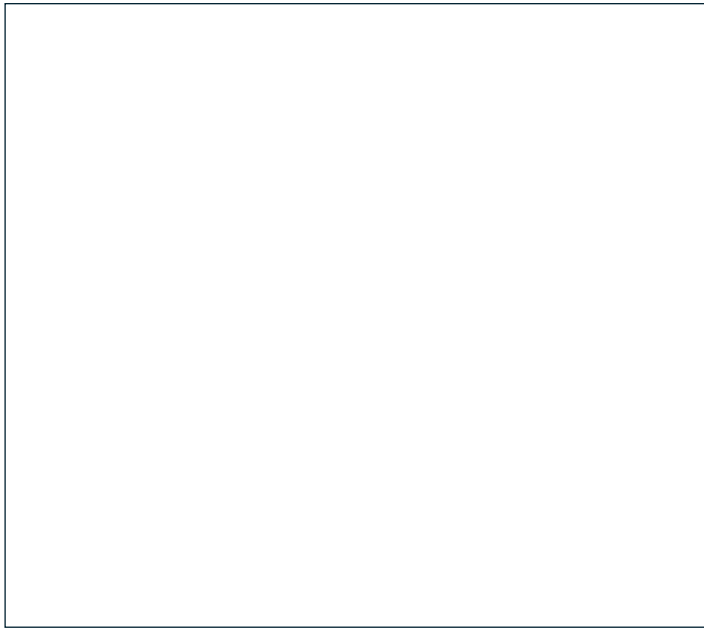
Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Ćwiczenie 5

*Kierunek: Analityka medyczna – Biologia medyczna
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakokinetyki WUM*

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

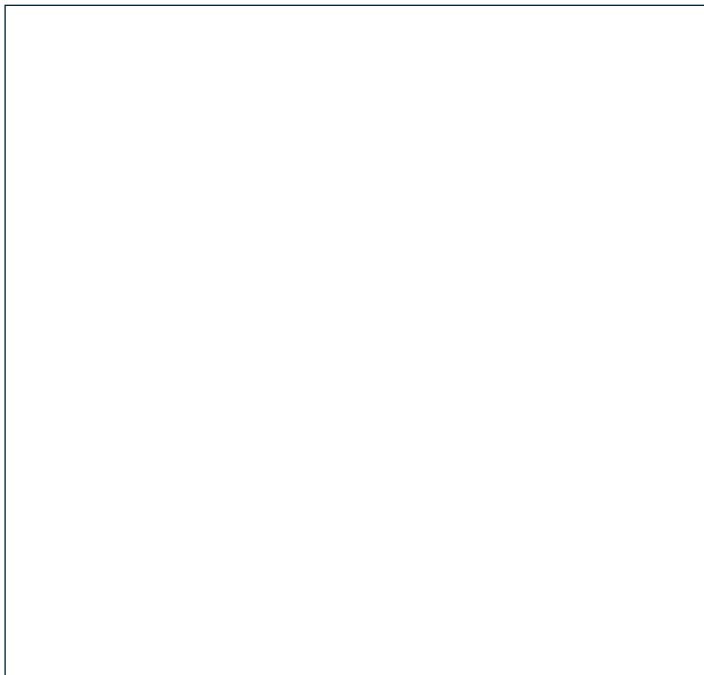
Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

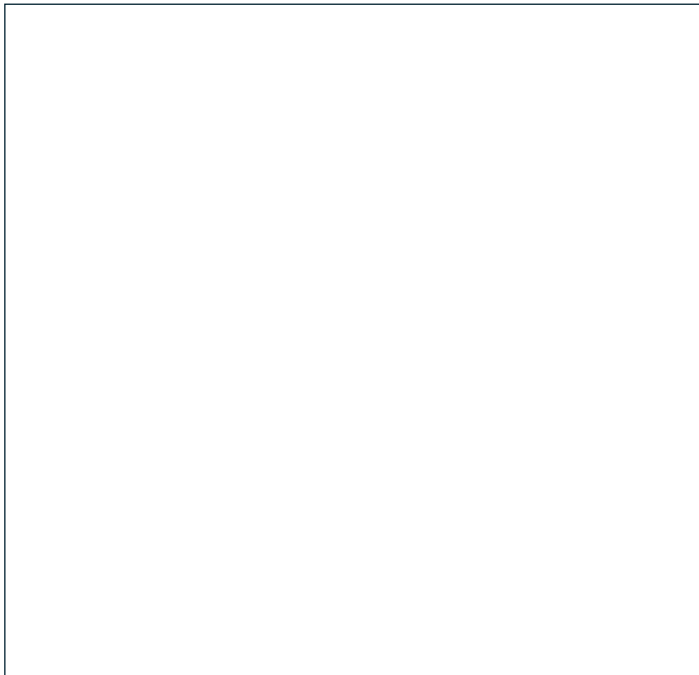
Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

Nazwa pasożyta.....



Obserwowana forma:.....

Ontohabitat:.....

Forma inwazyjna.....

Forma diagnostyczna.....

Człowiek jest żywicielem:.....

Opis cech widocznych w preparacie:.....

.....

CZEŚĆ TEORETYCZNA

Rozdział 1.

Preparatyka histologiczna, barwienie i metody badania komórek

Cel ćwiczeń:

- Poznanie podstawowych metod preparatyki histologicznej
- Poznanie standardowych technik w badaniach biologii i biochemii komórek
- Utrwalenie wiadomości o funkcjonowaniu i budowie komórek

Podstawowe pojęcia

Fluorescencja: zjawisko fizyczne polegające na tym, że substancja pochłania promieniowanie o określonej długości fali (najczęściej światło UV lub niebieskie), a następnie emituje światło o dłuższej długości fali (o mniejszej energii), często w zakresie światła widzialnego

Barwnik fluorescencyjny: (fluorochrom, fluoroform) to związek chemiczny, który po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali ulega fluorescencji, emitując światło o dłuższej długości fali. Fluorochrom może specyficznie wiązać się z określonymi cząsteczkami lub strukturami biologicznymi

Homogenizacja: proces rozdrabniania materiału, w wyniku którego powstaje jednorodna mieszanina, tzw. homogenat

Liza: rozpad komórek pod wpływem czynników uszkodzających ściany i błony komórkowe, prowadzący do śmierci komórki i uwolnienia jej zawartości

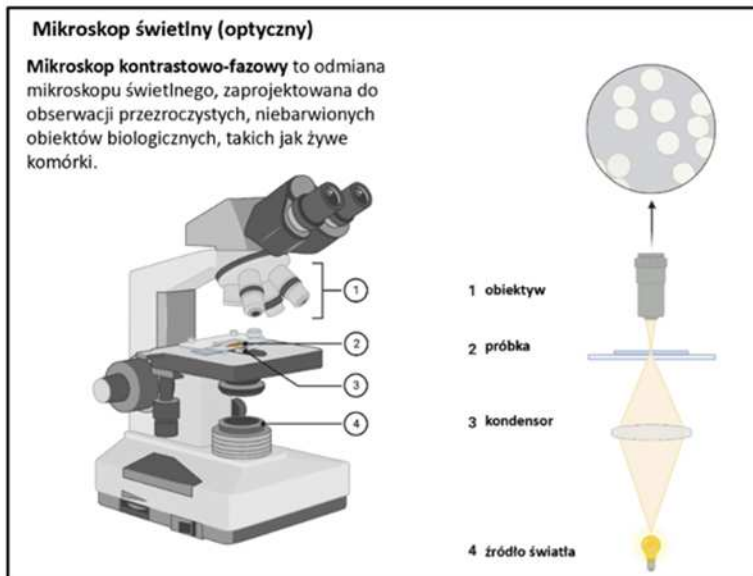
Supernatant: warstwa roztworu nad osadu uzyskana po wirowaniu jednorodnej mieszaniny

Wirowanie różnicowe: metoda wirowania próbek w coraz większym przyspieszeniu, najczęściej stosowana metoda rozdzielania homogenatu na frakcje, w których rozdziela się poszczególne organelle na podstawie różnicy ich gęstości i rozmiarów.

Preparatyka biologiczna stanowi kluczowy etap badań mikroskopowych, ponieważ sposób przygotowania materiału biologicznego bezpośrednio warunkuje jakość, rozdzielczość oraz interpretację uzyskanego obrazu. Zastosowanie różnych typów mikroskopów: świetlnych, konfokalnych, elektronowych transmisyjnych oraz skaningowych, wymaga odmiennych procedur utrwalania, barwienia i obróbki preparatów, wynikających z różnic w mechanizmie powstawania obrazu oraz rodzaju wykorzystywanego promieniowania.

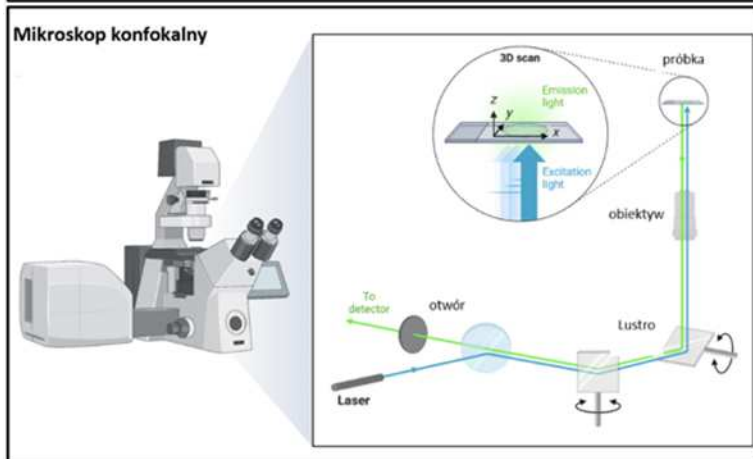
W mikroskopii świetlnej możliwe jest stosowanie zarówno preparatów żywych, jak i utrwalonych, często barwionych klasycznymi barwnikami histologicznymi. Z kolei mikroskopia elektronowa wymaga zaawansowanych, wieloetapowych procedur preparatyki, obejmujących m.in. odwodnienie, kontrastowanie metalami ciężkimi oraz pracę w warunkach próżni, co wyklucza obserwację materiału żywego.

Podczas ćwiczeń z biologii medycznej wykorzystywane będą wyłącznie mikroskopy świetlne, ale omawiane techniki preparacyjne oraz przedstawiane ryciny różnych mikroskopów i obrazy mikroskopowe, pozwolą zobrazować różnice, a także możliwości poszczególnych metod.

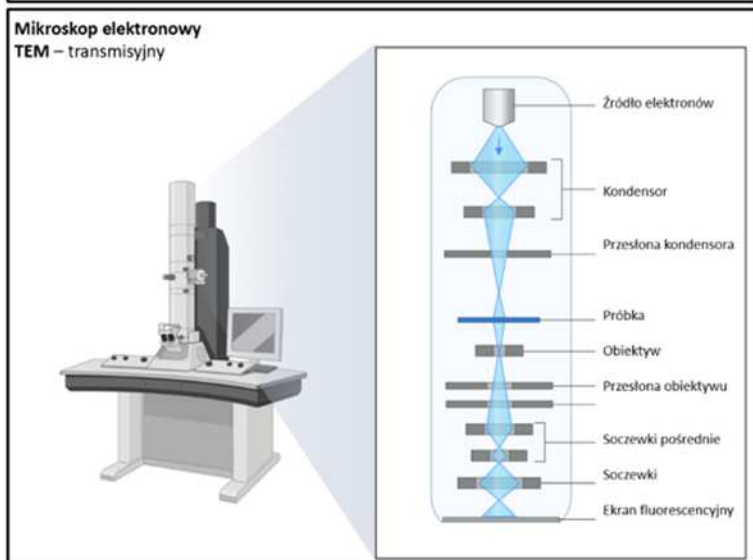


Zastosowanie:

Obserwacja komórek,
 tkanek, mikroorganizmów
 Diagnostyka
 (np. histologia, cytologia)



Badania biologii komórki
 i molekularnej
 Obrazowanie struktur
 wewnątrzkomórkowych
 Analiza przestrzenna (3D)
 tkanek



Ultrastruktura komórek
 i organelli
 Wirusy, rybosomy, błony
 biologiczne

Ryc. 1. Porównanie mechanizmu powstawania obrazu i zastosowania różnych typów mikroskopów. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

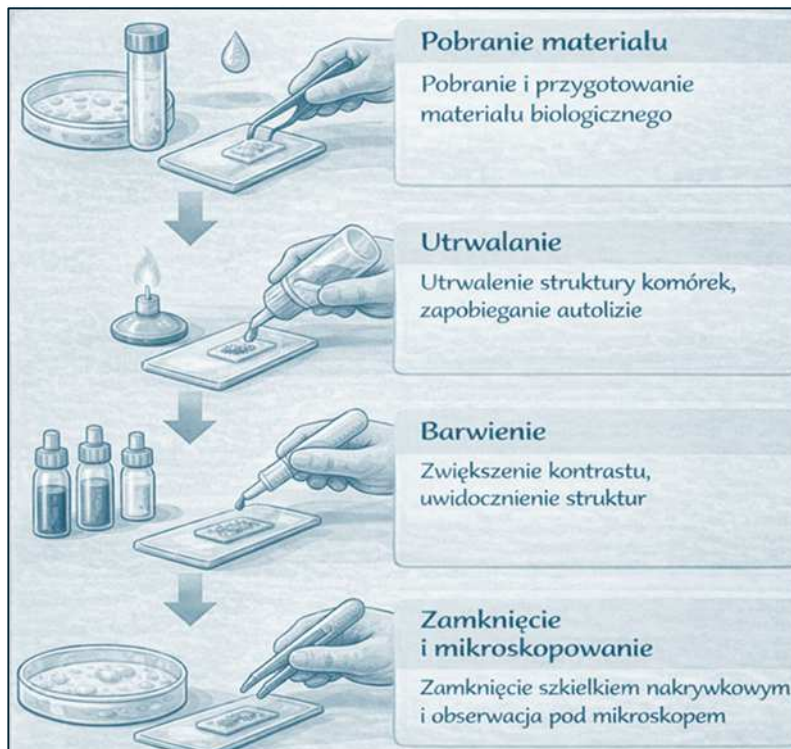
Tabela 1. Porównanie charakterystycznych właściwości różnych typów mikroskopów

| Typ | Świetlny | Konfokalny | Elektronowy |
|----------------|--|---|--|
| Źródło światła | Światło widzialne | Laser | Elektrony |
| Rozdzielczość | Niska | Średnia–wysoka | Bardzo wysoka |
| Preparat | Preparaty żywe lub utrwalone Często barwione ¹ Proste, szybkie przygotowanie, | Preparaty znakowane fluorochromami Zwykle preparaty utrwalone, czasem żywe komórki Bardziej złożone przygotowanie niż w mikroskopie świetlnym | Preparaty martwe Odwodnione, utrwalone, kontrastowane metalami ciężkimi Wymagane środowisko próżniowe Bardzo czasochłonne przygotowanie |
| Obraz 3D | Nie | Tak | Nie (SEM – pozornie 3D) |

Preparatyka histologiczna

Wykonanie preparatu jest podstawą badań histologicznych i cytologicznych. Odpowiednie przygotowanie preparatu umożliwia obserwację pod mikroskopem bardzo małych i często przezroczystych struktur. Jest to proces etapowy i przed umieszczeniem na szkiełku mikroskopowym konieczne jest odpowiednie pobranie materiału i przygotowanie skrawków.

W zależności od rodzaju materiału biologicznego oraz rodzaju planowanej obserwacji możemy przygotować różne typy preparatów. Rodzaje preparatów możemy podzielić ze względu na trwałość (trwałe i nietrwałe), sposób przygotowania (np. rozmazy, skrawki mrożone) lub cel barwienia (np. histochemiczne, fluorescencyjne).



- fragment tkanki, rozmaz krwi, hodowla komórek
- zatrzymuje procesy życiowe i rozkład; chemiczne: formalina, paraformaldehyd; fizyczne: wysoka temperatura, mrożenie
- np. hematoksylina – eozyna (H&E)
- medium montażowe + szkiełko nakrywkowe

Ryc. 2. Ogólny schemat przygotowania preparatów mikroskopowych. W. Olejarsz, opracowanie własne z wykorzystaniem ChatGPT (OpenAI)

Większość struktur biologicznych jest bezbarwna i trudno odróżnić poszczególne elementy, dlatego dla ich uwidocznienia, rozróżnienia organelli komórkowych oraz zwiększenia kontrastu, stosuje się różne barwniki.

Tabela 2. Porównanie cech preparatów utrwalonych i przyżyciowych

| Cecha | Preparaty utrwalone (trwale) | Preparaty przyżyciowe (nietrwale) |
|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Stan materiału | komórki martwe | komórki żywe |
| Utrwalanie | tak (formalina, alkohol) | nie |
| Przygotowanie | utrwalanie → cięcie → barwienie | świeży materiał w kropli wody |
| Trwałość | długotrwałe | krótkotrwałe |
| Barwienie | często stosowane | zwykle brak |
| Ruch komórek | brak | obecny |
| Co obserwujemy | budowę komórek i tkanek | procesy życiowe |
| Przykłady | tkanki, narządy | ameba, ruch rzęsek |

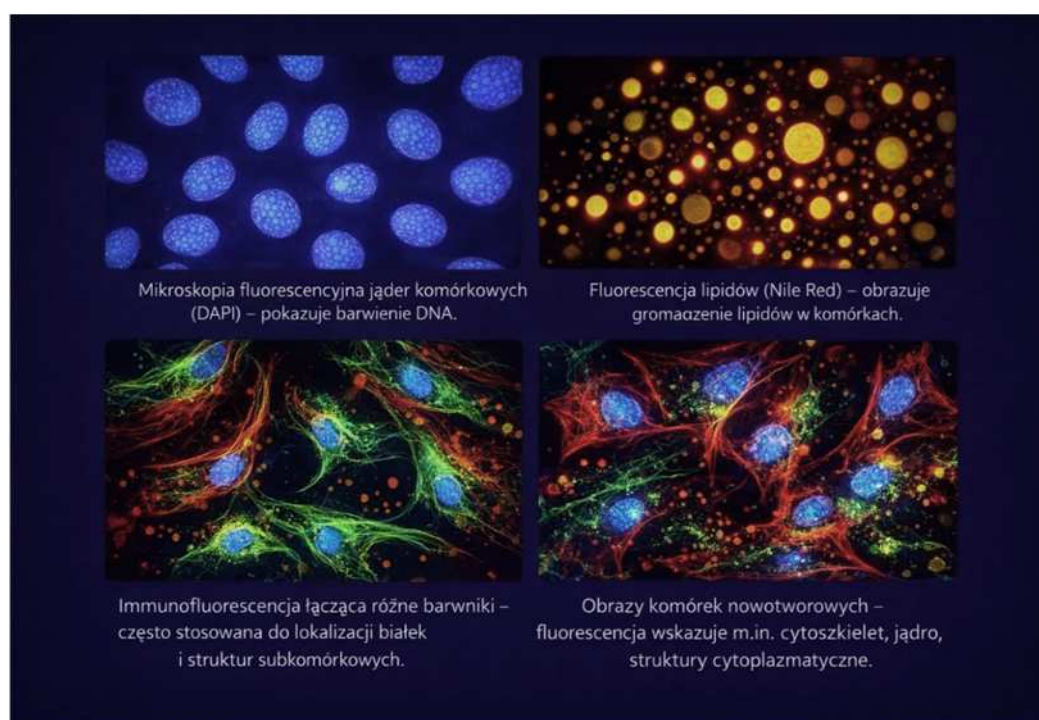
Jeżeli badania wymagają precyzyjnego zlokalizowania konkretnych struktur lub cząsteczek i obserwowania ich w świetle fluorescencyjnym (o wysokim

kontraście na czarnym tle) stosuje się fluorochromy. Z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych można zlokalizować konkretną cząsteczkę białka, receptor, antygen, śledzić procesy zachodzące w komórkach w czasie rzeczywistym (np. ruch organelli) oraz wyróżnić wiele struktur komórkowych.

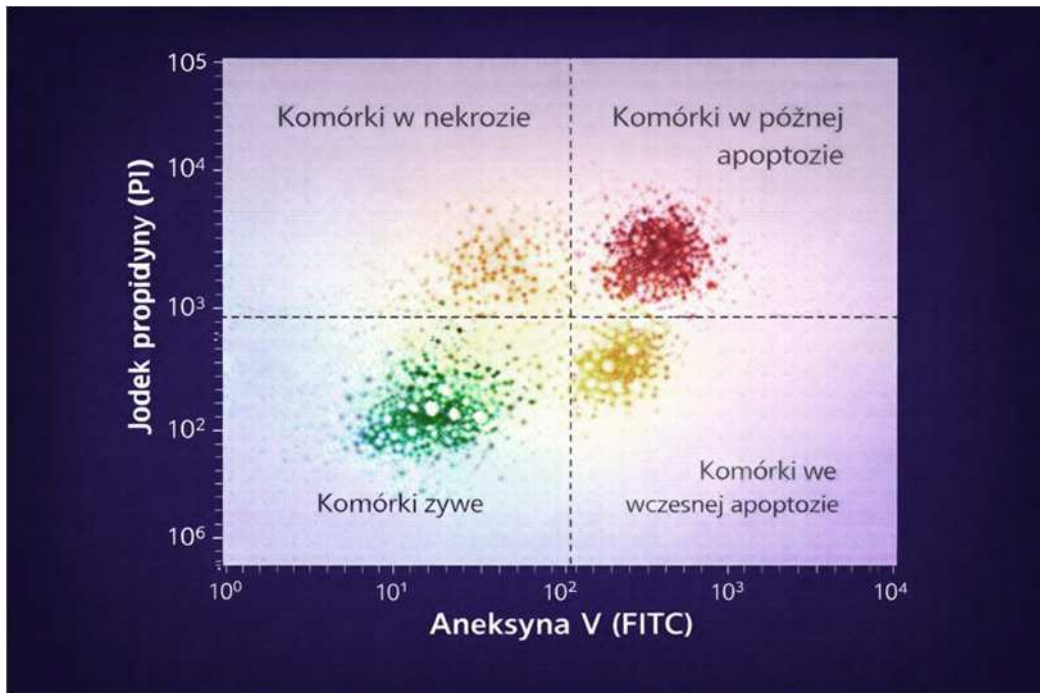
Fluorescencja polega na zdolności niektórych cząsteczek do pochłaniania energii światła o krótszej długości fali (np. UV lub niebieskiego), a następnie emisji światła o dłuższej długości fali (np. zielonego, czerwonego).

Proces ten przebiega w trzech etapach:

1. Wzbudzenie – cząsteczka barwnika pochłania światło wzbudzające.
2. Krótki stan wzbudzony – energia zostaje częściowo rozproszona.
3. Emisja fluorescencji – barwnik emituje światło o mniejszej energii, które jest rejestrowane przez mikroskop fluorescencyjny.



Ryc. 3. Przykładowe obrazy mikroskopii fluorescencyjnej przedstawiające barwienie jąder komórkowych (DAPI), lipidów (Nile Red) oraz immunofluorescencję struktur subkomórkowych. Ilustracje mają charakter schematyczny i nie przedstawiają rzeczywistych danych eksperymentalnych. Opracowanie własne W. Olejarz z wykorzystaniem narzędzia ChatGPT (OpenAI)



Ryc. 4. Przykładowy diagram punktowy cytometrii przepływowej przedstawiający barwienie komórek Aneksyną V (FITC) i jodkiem propidyny (PI). Opracowanie własne W. Olejarz z wykorzystaniem narzędzia ChatGPT (OpenAI)

Tabela 3. Zestawienie wybranych fluorochromów

| Fluorochrom | Mechanizm / lokalizacja | Zastosowanie | Kolor emitowanego światła |
|-----------------------------|---|--|--|
| MitoTracker | Akumuluje się w mitochondriach zależnie od potencjału błony | Obrazowanie funkcji mitochondriów, dynamika organelli | ■ czerwony / ■ zielony / ■ pomarańczowy (zależnie od wersji) |
| ER-Tracker | Wiąże się specyficznie do ATP-czułych kanałów ER | Obrazowanie sieci ER | ■ zielony |
| LysoTracker | Akumuluje się w kwaśnym środowisku lizosomów | Obrazowanie lizosomów | ● czerwony / ● zielony (najczęściej czerwony) |
| BODIPY Ceramide | Integruje się w błony aparatu Golgiego | Obrazowanie aparatu Golgiego | ● zielony |
| Hoechst / DAPI | Wiążą DNA | Barwienie jąder komórkowych, analiza cyklu komórkowego | ● niebieski |
| Jodek propidyny (PI) | Wnika tylko do komórek z uszkodzoną błoną | Obrazowanie martwych komórek | ● czerwony |

Wykorzystanie barwników do wykrywania lipidów

Szczególne zastosowanie w badaniach metabolizmu lipidów, chorób metabolicznych oraz identyfikacji tłuszczu w mikrobiologii i botanice, mają barwniki o charakterze niepolarnym tzn. lipidofilne.

Do barwienia lipidów służą barwniki rozpuszczalne w lipidach, które selektywnie gromadzą się w strukturach bogatych w tłuszcz. Ich zastosowanie umożliwia mikroskopową obserwację zgromadzonych lipidów w adipocytach, wątrobie lub tkankach roślinnych.



Ryc. 5. Wykorzystanie barwników do wykrywania lipidów. W. Olejarz, opracowanie własne z wykorzystaniem ChatGPT (OpenAI)

Lipidofilne barwniki zabarwiają krople tłuszczu w komórkach na intensywnie czerwono (**Sudan III, IV**) lub czarno (**Sudan Black B**).

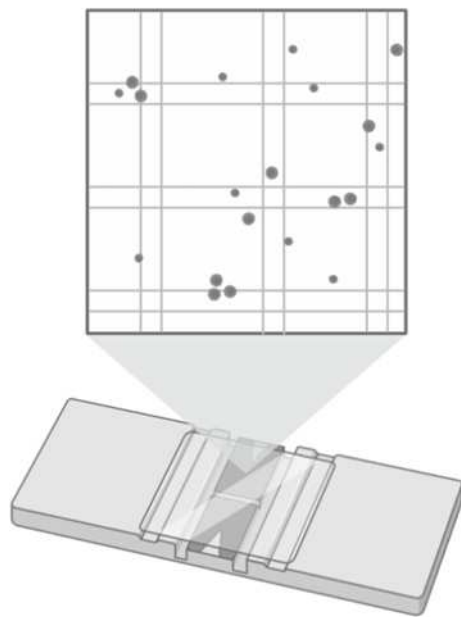
Olejan O (Oil Red O) to barwnik często stosowany w histologii i badaniach na liniach komórkowych do wykrywania lipidów w cytoplazmie. Nadaje lipidom, szczególnie triglicerydom, intensywnie czerwoną barwę.

Nile Red to fluorescencyjny barwnik, który wykazuje silną fluorescencję w środowisku hydrofobowym. Ponieważ intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości lipidów. Pozwala na analizę lipidów metodami mikroskopii fluorescencyjnej lub przepływowej cytometrii.

Metody badania komórek

Ocena liczby komórek

Hemocytometry to specjalistyczne szkiełka mikroskopowe z wygrawerowaną siatką, używane w laboratoriach do precyzyjnego liczenia komórek w zawiesinie (np. krwi, bakterii, drożdży) pod mikroskopem. Przykładem jest komora Bürkera.



Komora Bürkera to szklana płytką mikrometryczna z wgłębieniem, na dnie którego znajduje się ryflowana siatka o znanej geometrii i wymiarach. Siatkę tworzą kwadraty o określonej powierzchni i głębokości (zwykle 0,1 mm), co umożliwia obliczenie liczby komórek w jednostce objętości.

Ryc. 6. Komora Bürkera

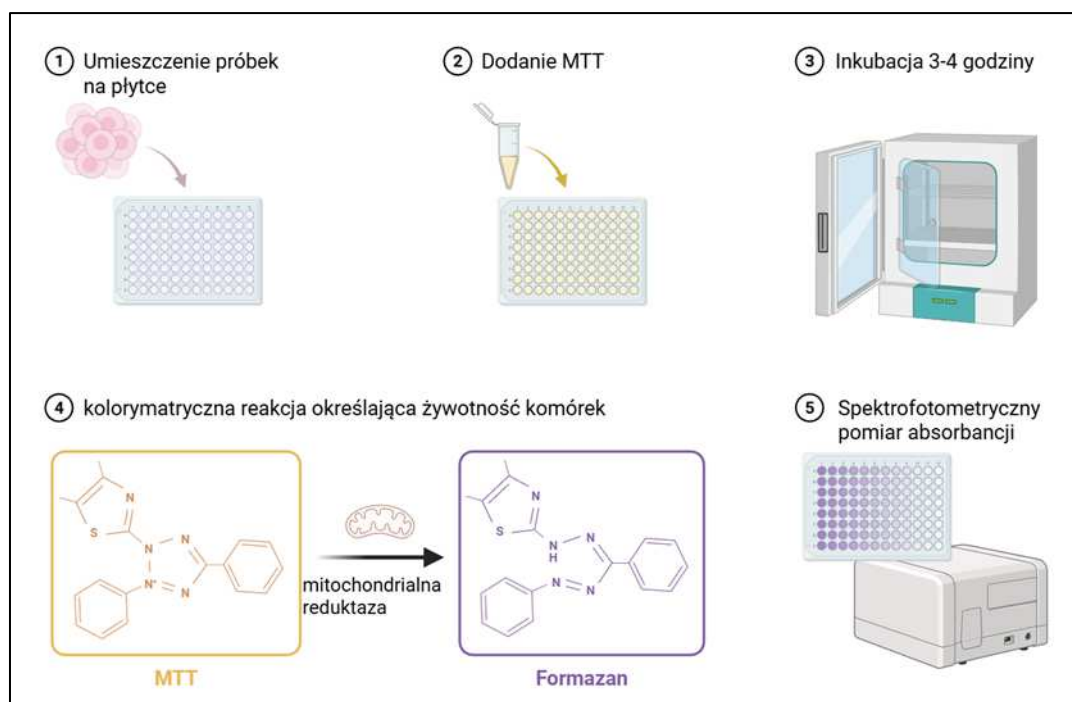
Liczba komórek w kwadracie \times współczynnik rozcieńczenia \times odpowiedni współczynnik przeliczeniowy (zależny od wymiarów kwadratu) = liczba komórek w jednostce objętości.

Hemocytometry wykorzystuje się do oceny liczby komórek w hodowlach *in vitro* (np. linie komórkowe), liczenia krwinek (czerwonych, białych, płytek krwi) w diagnostyce laboratoryjnej, badań hematologicznych

i mikrobiologicznych. Próbkę naniesione na siatki zliczeniowe komory Bürkera mogą być używane do dalszych eksperymentów, np. cytometrii przepływowej, testów żywotności komórek, eksperymentów immunologicznych.

Ocena żywotności komórek – test MTT (tetrazolium, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl) -2,5-difenylo-tetrazolu, sól tetrazolowa)

Test MTT wykorzystuje zdolność żywych komórek do metabolizowania barwników dzięki aktywnym mitochondriom. MTT jest żółtym barwnikiem, który wnika do wnętrza komórki i pod wpływem enzymów mitochondrialnych – głównie dehydrogenaz – jest redukowany do nierozpuszczalnego, fioletowego kryształu formazanu. Kryształy te następnie rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku (np. DMSO), a powstały roztwór można zmierzyć spektrofotometrycznie. Intensywność fioletowego koloru jest proporcjonalna do liczby żywych i metabolicznie aktywnych komórek.



Ryc. 7. Schemat wykonania testu MTT. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

Test MTT wykonuje się w badaniach żywotności i proliferacji komórek, najczęściej po zastosowaniu:

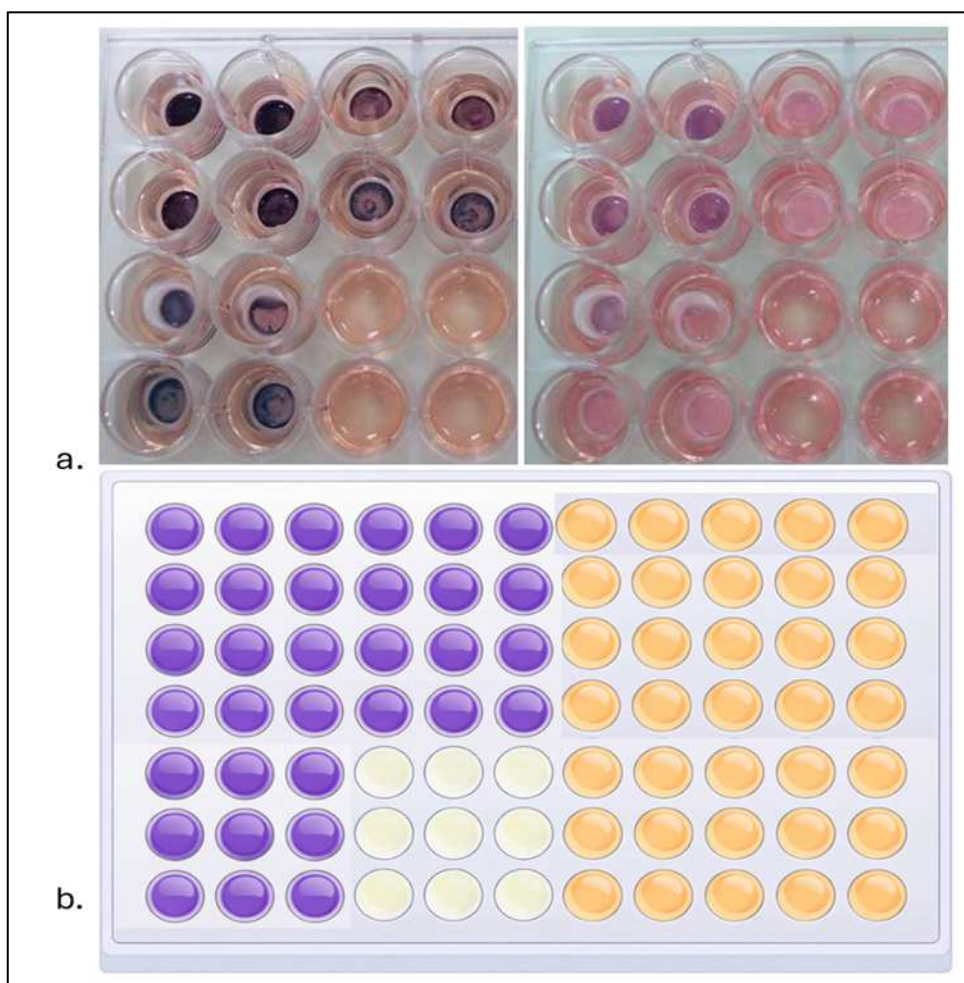
- leku,
- związku chemicznego,
- ekstraktu roślinnego,
- warunków stresowych (np. niedotlenienie, promieniowanie).

Celem testu jest sprawdzenie:

- czy badana substancja jest toksyczna dla komórek,
- jak wpływa na aktywność metaboliczną i przeżywalność komórek,
- czy komórki się namnażają, czy ich liczba spada.

Test MTT przeprowadza się najczęściej na płytkach 96-dołkowych, ponieważ:

- każdy dołek zawiera oddzielną próbkę (np. inne stężenie związku),
- umożliwia to porównanie wielu warunków jednocześnie,
- łatwo wykonać próby kontrolne (kontrola dodatnia i ujemna).

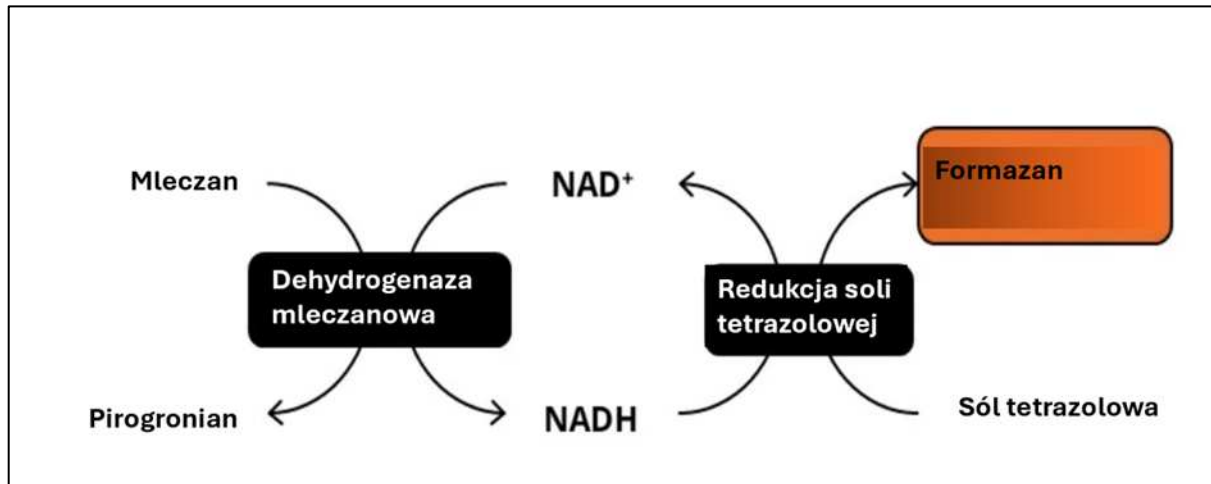


Ryc. 8. Interpretacja testu MTT; a. zdjęcie płytki; Żywe, metabolicznie aktywne komórki redukują żółty MTT do fioletowego formazanu-imi więcej żywych komórek, tym ciemniejszy fioletowy kolor w dołku. Jasny kolor lub jego brak oznacza małą liczbę żywych komórek lub ich obumarcie. b. schemat pokazujący sposób interpretacji testu: **Fioletowy kolor** – żywe komórki, **Jasnożółty/bezbarwny kolor** – martwe komórki, **Jasnopomarańczowy kolor** – metabolicznie nieaktywne komórki

Ocena żywotności komórek – test LDH (dehydrogenazy mleczanowej)

Test LDH służy do oceny uszkodzenia komórek i ich śmierci poprzez pomiar aktywności enzymu – dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianego z cytoplazmy do podłoża hodowlanego. LDH katalizuje reakcję przekształcania mleczanu do pirogronianu z udziałem NAD^+ , tworząc NADH. Aby wykryć obecność LDH, stosuje się dodatkową reakcję barwną z tetrazolium, w której NADH redukuje tetrazolium do nierozpuszczalnego, kolorowego formazanu. Intensywność barwy, mierzonej spektrofotometrycznie, jest proporcjonalna

do liczby martwych lub uszkodzonych komórek, co pozwala ilościowo ocenić cytotoksyczność badanej substancji.



Ryc. 9. Schemat reakcji wykorzystywanych do testu żywności komórek LDH

Test LDH jest często stosowany równolegle z testem MTT, aby uzyskać pełniejszy obraz stanu komórek.

Test LDH wykonuje się, gdy celem jest ocena:

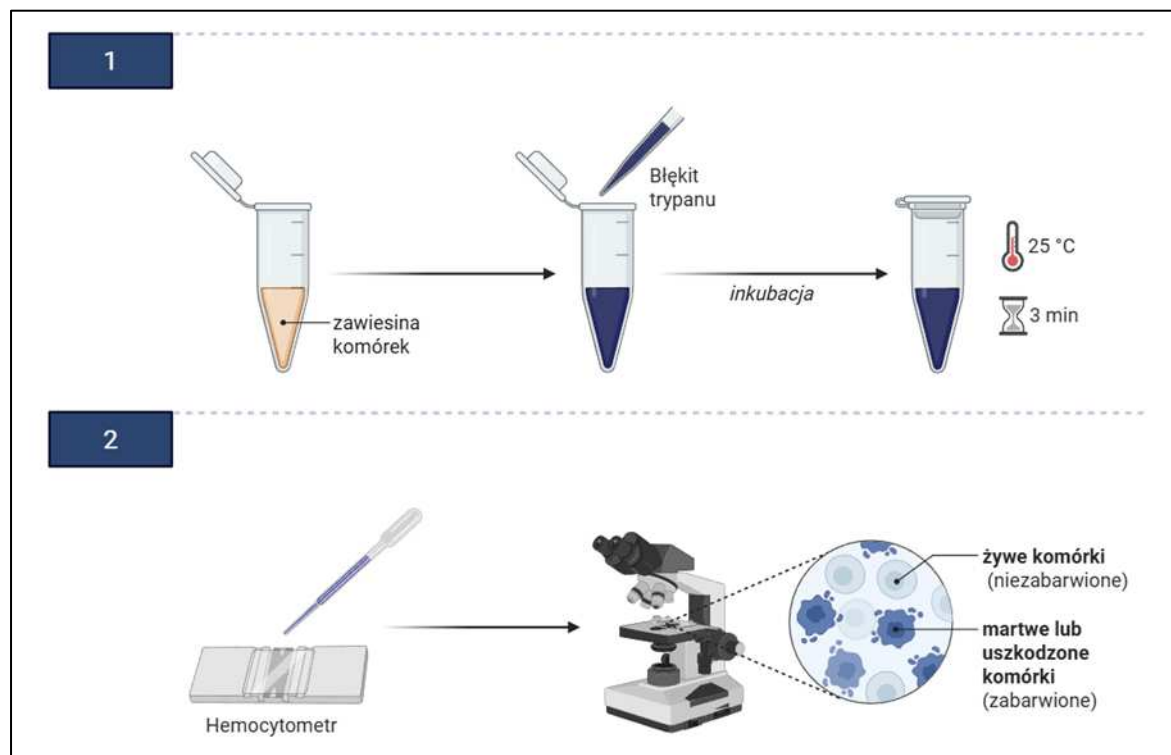
- uszkodzenia błony komórkowej
- cytotoksyczności badanej substancji
- stopnia śmierci komórek (martwica, późna apoptoza)

W teście LDH nie bada się bezpośrednio komórek, lecz supernatant z dołków płytki. Formazan odpowiada za widoczny kolor (żółty → pomarańczowy → czerwony). Im więcej martwych/uszkodzonych komórek, tym więcej LDH w podłożu i kolor uzyskany w reakcji barwnej intensywniejszy.

Ocena żywności komórek – barwienie błękitem trypanu

Metoda ta opiera się na właściwości błony komórkowej jaką jest półprzepuszczalność. Trypan jest barwnikiem, który nie przenika przez nienaruszoną błonę komórkową. Żywe komórki pozostają bezbarwne, natomiast w martwych i w komórkach o uszkodzonej błonie komórkowej następuje

przechodzenie barwnika do wnętrza cytoplazmy. Takie komórki stają się niebieskie. Liczenie komórek pod mikroskopem pozwala określić procent komórek żywych i martwych w próbce.

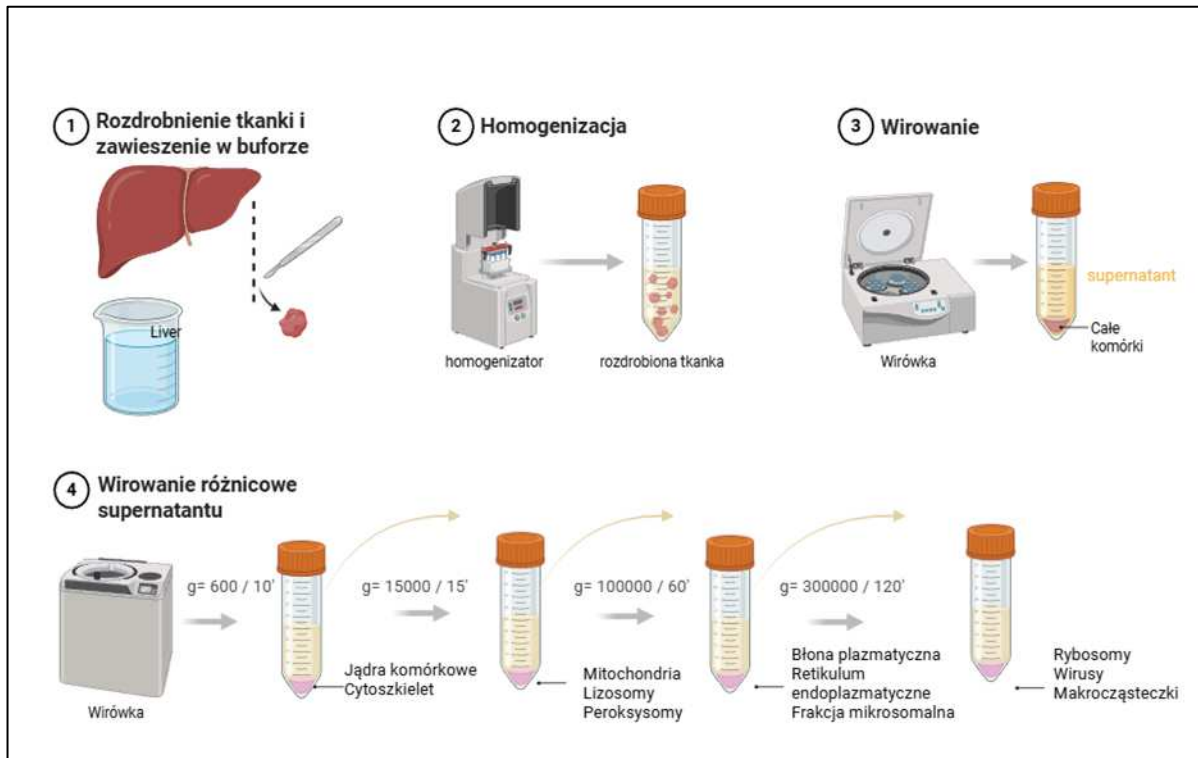


Ryc. 10. Schemat przedstawiający etapy barwienia błękitem trypanu. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

Analityczne metody rozdziału struktur komórkowych

Wirowanie różnicujące nie jest samodzielna metodą diagnostyczną, lecz kluczowym etapem przygotowania próbki. Bez niego ogromna część badań laboratoryjnych w ogóle nie byłaby możliwa np. rozdzielenie krwi na frakcje. Po odwirowaniu krwi: osocze (z antykoagulantem) lub surowica (bez antykoagulantu) oddzielają się od elementów morfotycznych (erytrocyty, leukocyty, płytki). Wirowanie stosuje się także do usunięcia resztek tkanek, skrzepów, zanieczyszczeń, tak aby analiza była dokładna i powtarzalna. W badaniach cytologicznych lub mikrobiologicznych, pozwala na zagęszczenie

materiału badawczego i większą efektywność badań biochemicznych. Np. odseparowanie od reszty komórki frakcji mitochondriów, umożliwia skuteczne badanie funkcji tych organelli m.in. aktywności enzymów, wydajności łańcucha oddechowego, bez niebezpieczeństwa, że zbyt niewielkie stężenia badanych substancji ulegną rozcieńczeniu w całkowitej objętości komórki.



Ryc. 11. Etapy frakcjonowania komórek za pomocą wirowania różnicującego. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

W analityce medycznej wirowanie różnicujące wykonuje się przede wszystkim wtedy, gdy:

- badany materiał zawiera mieszaninę struktur o różnej wielkości i masie (np. krew, homogenaty tkanek, hodowle komórkowe)
- konieczne jest oddzielenie komórek lub ich fragmentów od osocza lub podłoża
- planowana jest analiza enzymów, białek lub organelli pochodzących z określonej frakcji komórkowej

- materiał biologiczny musi zostać oczyszczony przed dalszymi testami diagnostycznymi (np. spektrofotometrycznymi, immunologicznymi, molekularnymi)

Metoda ta pozwala na kontrolowany i etapowy rozdział materiału biologicznego, co ma kluczowe znaczenie w diagnostyce laboratoryjnej, ponieważ:

- umożliwia oddzielenie jąder komórkowych, mitochondriów, lizosomów czy frakcji cytoplazmatycznej
- pozwala na analizę aktywności enzymów specyficznych dla danej frakcji komórkowej
- zwiększa dokładność i wiarygodność wyników badań, eliminując zakłócenia pochodzące z innych struktur komórkowych
- jest niezbędna w przygotowaniu próbek do badań biochemicznych, immunologicznych i molekularnych w diagnostyce specjalistycznej dotyczącej chorób mitochondrialnych, metabolicznych lub onkologicznych oraz testowania chemioterapeutyków

Zaburzenia budowy i funkcji organelli komórkowych – przykłady chorób

Postęp w zakresie frakcjonowania komórkowego, mikroskopii oraz metod biologii molekularnej przyczynił się do lepszego zrozumienia mechanizmów chorób związanych z dysfunkcją organelli, w szczególności chorób metabolicznych i neurodegeneracyjnych. Wiedza ta znajduje zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej, gdzie oznaczanie aktywności enzymów lizosomalnych, ocena funkcji mitochondriów czy analiza szlaków fałdowania białek w retikulum endoplazmatycznym stanowią podstawę rozpoznania wielu chorób dziedzicznych.

Organizm człowieka to wysoce zorganizowany, hierarchiczny układ, w którym poszczególne organelle komórkowe pełnią wyspecjalizowane funkcje

niezbędne do utrzymania homeostazy komórkowej, zapewniają prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Zaburzenia budowy lub funkcji tych struktur prowadzą do dysfunkcji podstawowych procesów biologicznych, takich jak produkcja energii, synteza i modyfikacja białek, degradacja makrocząsteczek czy przekazywanie sygnałów. Konsekwencją tych defektów są liczne jednostki chorobowe, w tym wiele chorób rzadkich, często o ciężkim i wielonarządowym przebiegu.

Tabela 4. Przykłady chorób powodowanych przez zaburzenia budowy i funkcji organeli komórkowych

| Organellum | Typ zaburzenia | Przykładowe choroby | Główne objawy |
|--|---|--|---|
| Mitochondria | Zaburzenia łańcucha oddechowego, mutacje mtDNA | Zespół Leigha, MELAS | Oslabienie mięśni, encefalopatia, drgawki, kwasica mleczanowa |
| Lizosomy | Niedobór enzymów hydrolitycznych | Choroba Taya-Sachsa, Gauchera, Pompego-choroby spichrzeniowe | Neurodegeneracja, hepatosplenomegalia, opóźnienie rozwoju |
| Peroksosomy | Zaburzenia β -oksydacji VLCFA | Zespół Zellwegera, Adrenoleukodystrofia | Uszkodzenie OUN, ślepotą, niewydolność wątroby |
| Retikulum endoplazmatyczne (RE) | Nieprawidłowe fałdowanie białek, stres ER | Mukowiscydoza (CFTR) | Zaburzenia transportu jonów, neurodegeneracja |
| Jądro komórkowe | Defekty laminy jądrowej | Progeria | Przedwczesne starzenie, miażdżyca |
| Cytoskielet | Defekty białek strukturalnych | Dystrofia Duchenne'a | Postępujący zanik mięśni |
| Rzęski (ciliopatie) | Zaburzenia sygnalizacji komórkowej i ruchu rzęsek | Zespół Bardeta-Biedla | Otyłość, wady nerek, polidaktylia |
| Błona komórkowa | Defekty receptorów i transporterów | Hipercholesterolemia rodzinna | Miażdżyca, choroby serca |

Rozdział 2.

Regulacja cyklu komórkowego

Cel ćwiczeń:

- Poznanie etapów cyklu komórkowego
- Zrozumienie mechanizmów koordynujących i kontrolujących podziały komórkowe

Podstawowe pojęcia:

Chromatyna to kompleks DNA i białek histonowych, znajdujący się w jądrze komórkowym. Ta postać materiału genetycznego dominuje podczas interfazy (czyli poza podziałami komórkowymi). Może być w postaci rozluźnionej, określanej jako euchromatyna, która jest aktywna transkrypcyjnie. Jeśli fragmenty chromatyny nie podlegają transkrypcji, wówczas jest ułożona ciasniej i określana jest jako heterochromatyna.

Chromosom to maksymalnie skondensowana forma chromatyny, widoczna w mikroskopie świetlnym podczas podziału komórki, szczególnie widoczna w metafazie. Do kondensacji chromatyny w postać chromosomów dochodzi w profazie mitozy i mejozy. W komórkach diploidalnych chromosomy występują w parach homologicznych.

Chromatydy siostrzane to dwie identyczne kopie cząsteczki DNA powstałe w wyniku replikacji, połączone w centromerze. Tworzą jeden chromosom złożony z dwóch chromatyd siostrzanych, zanim zostaną rozdzielone do komórek potomnych w mitozie lub mejozie II.

Chromosomy homologiczne to para chromosomów, jeden pochodzący od matki, drugi od ojca, które mają taką samą długość, ułożenie centromeru i geny w tych

samych loci (choć mogą różnić się allelami). W mejozie ulegają parowaniu i mogą wymieniać fragmenty podczas crossing-over.

Replikacja to proces kopiowania DNA, zachodzący przed podziałem komórki. Umożliwia przekazanie identycznej informacji genetycznej komórkom potomnym.

Transkrypcja to proces przepisywania informacji genetycznej z DNA na mRNA. Stanowi pierwszy etap ekspresji genu.

Geny supresorowe (geny supresorowe nowotworów) to geny kodujące białka, hamujące podziały komórkowe lub promujące apoptozę. Przykład: Gen TP53 koduje białko p53, które zatrzymuje cykl komórkowy, a w przypadku uszkodzeń DNA i aktywuje apoptozę.

Protoonkogeny to geny kodujące białka stymulujące podział komórek w warunkach fizjologicznych.

Onkogeny to zmutowane lub nadaktywne protoonkogeny, które prowadzą do niekontrolowanego wzrostu komórek i rozwoju nowotworów.

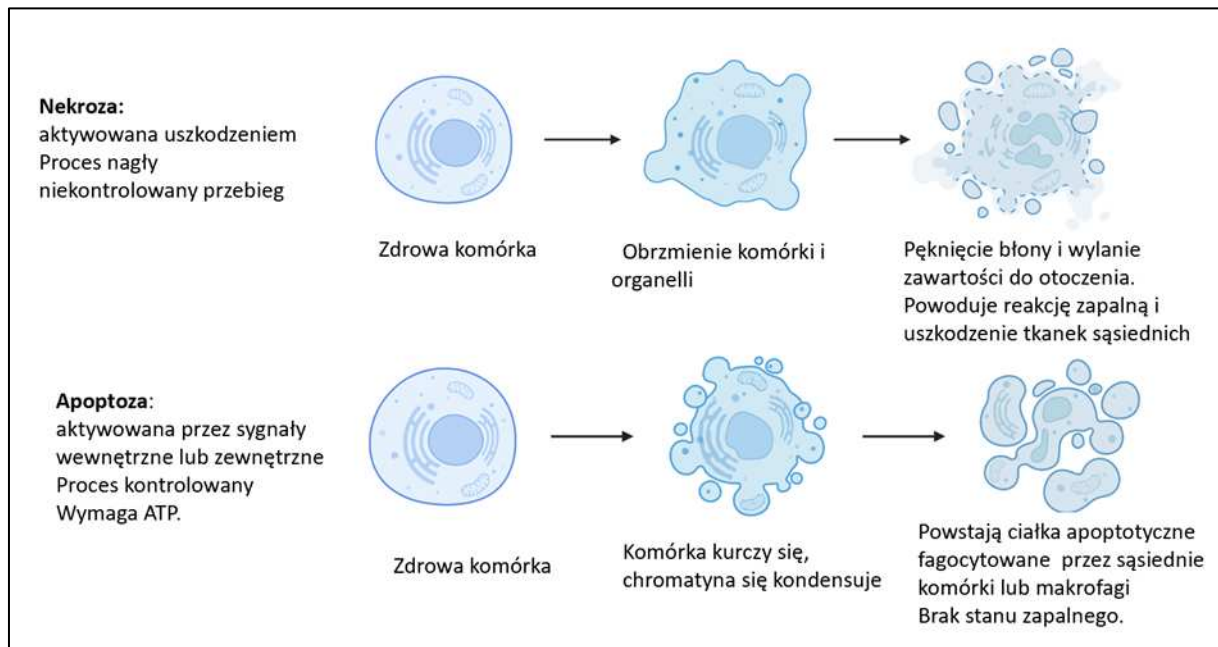
Inhibitory kinaz zależnych od cyklin to białka, które hamują aktywność kompleksów CdK–cyklina, kontrolując tempo cyklu komórkowego (np. p21, p27).

Mitogen to czynnik (np. białko lub inna cząsteczka sygnałowa), który pobudza komórki do podziału przez aktywację szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do przejścia komórki z fazy G₁ do fazy S cyklu komórkowego.

Apoptoza to genetycznie zaprogramowany proces kontrolowanej śmierci komórki, który zachodzi bez indukowania stanu zapalnego. Umożliwia organizmowi, w uporządkowany i kontrolowany sposób, usuwanie uszkodzonych, niepotrzebnych lub nieprawidłowych komórek. Apoptoza pełni także ważną funkcję w procesach spermatogenezy i organogenezy, usuwając nadmiarową liczbę komórek.

Nekroza (martwica) to proces patologiczny. Zachodzi pod wpływem zarówno czynników fizycznych (np. niska lub wysoka temperatura, promieniowanie UV, urazy mechaniczne), chemicznych (np. niedotlenienie – hipoksja) jak i biologicznych (np. toksyny bakteryjne). W jej przebiegu dochodzi do obrzęku, czyli zwiększenia

objętości komórki, przerwania ciągłości błony komórkowej i uwolnienia jej zawartości do otoczenia. Miejscowo rozwija się stan zapalny.



Ryc. 1. Porównanie procesów apoptozy i nekrozy. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

Identyfikacja obu procesów opiera się na analizie zmian w błonie komórkowej:

- Apoptoza: test z Aneksyną V (wykrywa fosfatydylserynę na powierzchni komórki)
- Nekroza: testy z barwnikami nieprzenikającymi (jodek propidyny, błękit trypanu) – barwią tylko komórki z uszkodzoną błoną

Zmian w aktywności enzymów:

- Apoptoza: aktywności kaspaz
- Nekroza: aktywności LDH (dehydrogenazy mleczanowej) uwalnianej do otoczenia

Sposobu degradacji DNA:

- Apoptoza: Regularna fragmentacja DNA
- Nekroza: Chaotyczny rozpad DNA

Zmian morfologicznych komórek:

- Apoptoza: Obkurczanie komórki i tworzenie ciałek apoptotycznych (brak zapalenia)
- Nekroza: Pęcznienie i pęknięcie komórki (wywołuje stan zapalny)

Tabela 1. Porównanie cech charakterystycznych procesów: apoptozy i nekrozy

| Cecha procesu | Apoptoza (Śmierć programowana) | Nekroza (Śmierć patologiczna/pasywna) |
|--|--|---|
| Główny mechanizm | Proces aktywny, zależny od ATP, kontrolowany genetycznie. | Proces pasywny, gwałtowny, wynikający z uszkodzenia czynnikami zewnętrznymi. |
| Specyficzne markery molekularne | Aktywacja kaspaz (szczególnie kaspazy-3, -8, -9). Ekspozycja fosfatydyloseryny na zewnętrznej warstwie błony (wiązananie Aneksyny V). | Uwalnianie enzymów wewnątrzkomórkowych np. LDH, do płynu pozakomórkowego. Uwalnianie białek jądrowych (np. HMGB1). |
| Stan mitochondriów | Spadek potencjału transbłonowego uwalnianie cytochromu c do cytoplazmy. | Pęcznienie mitochondriów, gwałtowny spadek produkcji ATP, pęknięcie grzebieni. |
| Ciągłość błon | Błona zachowana Brak stanu zapalnego. | Przerwanie ciągłości błony komórkowej. Wyciek treści komórkowej - wywołuje stan zapalny. |

Telomeraza to enzym, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu długości telomerów, wydłuża telomery, dodając sekwencje DNA (TTAGGG)_n na ich końcach, co zapobiega skracaniu telomerów i utracie informacji genetycznej.

Etapy cyklu komórkowego

Z punktu widzenia biologii organizmów, cykl komórkowy jest fundamentem życia – umożliwia rozwój zarodka, odnowę tkanek, gojenie ran, a także zastępowanie komórek zużytych lub uszkodzonych.

Cykl komórkowy to sekwencja uporządkowanych, ściśle kontrolowanych biochemicznych i biofizycznych procesów, które zachodzą od momentu powstania komórki aż do podziału na dwie komórki potomne. To nie tylko

mechanizm odmierzający czas podziału komórki, ale kluczowy mechanizm umożliwiający wzrost, rozwój, regenerację i rozmnażanie organizmów. Wszystkie organizmy wielokomórkowe, w tym człowiek, zawdzięczają prawidłowe funkcjonowanie tkanek i narządów właśnie precyzyjnej regulacji cyklu komórkowego.

Kontrola cyklu komórkowego zachodzi na poziomie molekularnym i biorą w nim udział liczne białka regulatorowe. Zdarzające się w tym procesie błędy mogą prowadzić do poważnych konsekwencji, takich jak niekontrolowane podziały komórkowe, będące podstawą rozwoju chorób nowotworowych.

Cykl komórkowy to proces wieloetapowy. Przed fizycznym podziałem komórki następuje wzrost jej rozmiarów, poprzez zwiększoną syntezę związków chemicznych i podział organeli komórkowych. Następnym etapem jest kopiowanie materiału genetycznego, po którym może dojść do równomiernej dystrybucji w obrębie komórki macierzystej i wyodrębnienia się jąder potomnych (kariokineza) oraz cytokinezy (cytokineza to fizyczny podział cytoplazmy komórki macierzystej na dwie komórki potomne; w komórkach zwierzęcych zachodzi poprzez zacieśnienie pierścienia aktynowo-miozynowego i powstanie bruzdy podziałowej).

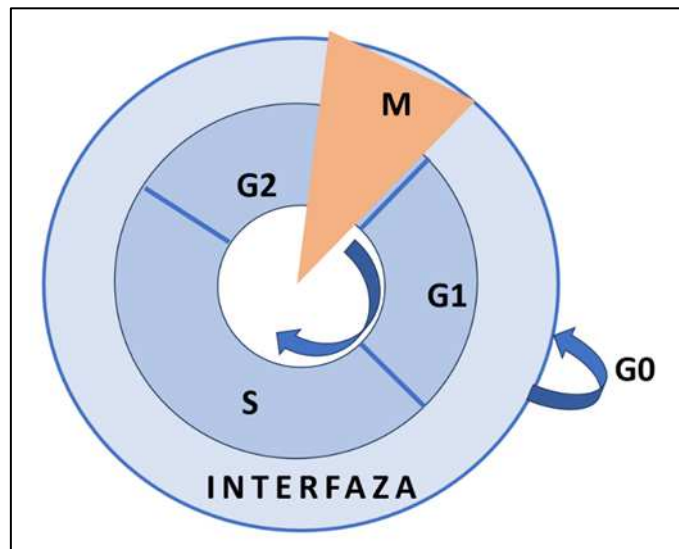
Komórki organizmów wielokomórkowych, zależnie od ich funkcji biologicznej, dzielą się poprzez mitozę lub mejozę. Mitoza, w czasie której dochodzi do równego rozdziału powielonego materiału genetycznego, umożliwia wzrost i regenerację organizmu (oraz rozmnażanie bezpłciowe organizmów jednokomórkowych). Mejoza, w wyniku której dochodzi do rekombinacji genów, segregacji i redukcji chromosomów, służy do wytwarzania komórek rozrodczych – gamet (plemników i komórek jajowych). Kluczowa różnica leży w tym, czy celem podziału jest zachowanie liczby chromosomów, czy jej redukcja o połowę.

Tabela 2. Porównanie podziału mitotycznego i mejotycznego

| Cecha | Mitoza | Mejoza |
|-------------------------------|--|--|
| Cel | Wzrost, naprawa, regeneracja, rozmnażanie bezpłciowe | rozmnażanie płciowe |
| Liczba podziałów | 1 | 2 (mejoza I i II) |
| Liczba komórek potomnych | 2 identyczne | 4 różne genetycznie |
| Zachowanie liczby chromosomów | Tak ($2n \rightarrow 2n$) | Nie ($2n \rightarrow 1n$) |
| Rekombinacja genetyczna | Nie | Tak (crossing-over, segregacja alleli) |
| Zastosowanie | Wszystkie komórki somatyczne | Tylko komórki linii zarodkowej |

Życie pojedynczej komórki to cykl zmian zachodzących od momentu jej powstania aż do podziału na komórki potomne. Okres pomiędzy podziałami określany jest jako interfaza i stanowi ok. 90% cyklu. Podczas interfazy komórka rośnie, syntetyzuje białka tworzy organelle, przygotowując się do replikacji DNA – faza G1. Pod koniec fazy G1 komórka, po uzyskaniu dojrzałości fizjologicznej i anatomicznej, podejmuje decyzję o podziale, lub przestaje rosnać i wchodzi w fazę G0. Faza G0 nie prowadzi do podziału, lecz specjalizacji w funkcji jaką będzie pełnić komórka np. neurony, komórki mięśni serca, fotoreceptory siatkówki, erytrocyty.

W fazie S następuje kopiowanie materiału genetycznego i każdy chromosom uzyskuje 2 chromatydy siostrzane. Duplikuje się także centrosom, który będzie tworzył wrzeciono podziału. Po replikacji DNA, następuje dalszy wzrost komórki, synteza białek, potrzebnych do podziału oraz kontrola poprawności replikacji – faza G2. Po okresie wzrostu i replikacji materiału genetycznego komórka rozpoczyna podział – faza M. W typowej komórce ludzkiej dzielącej się co 24 h faza S zajmuje 10–12 godzin, a M < 1 h.



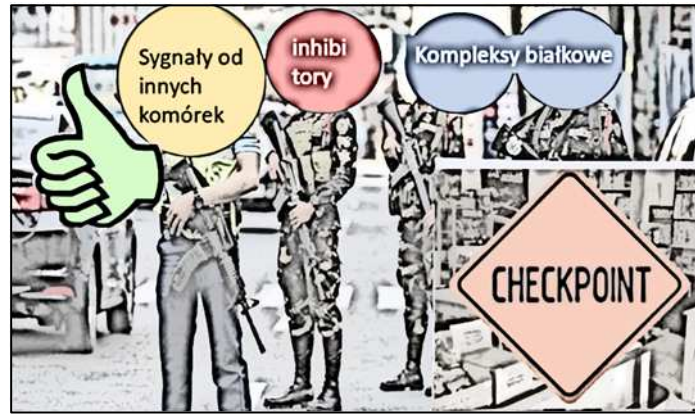
Ryc. 2. Fazy cyklu komórkowego

Regulacja cyklu komórkowego

Analiza cyklu komórkowego wykazała następujące zasady.

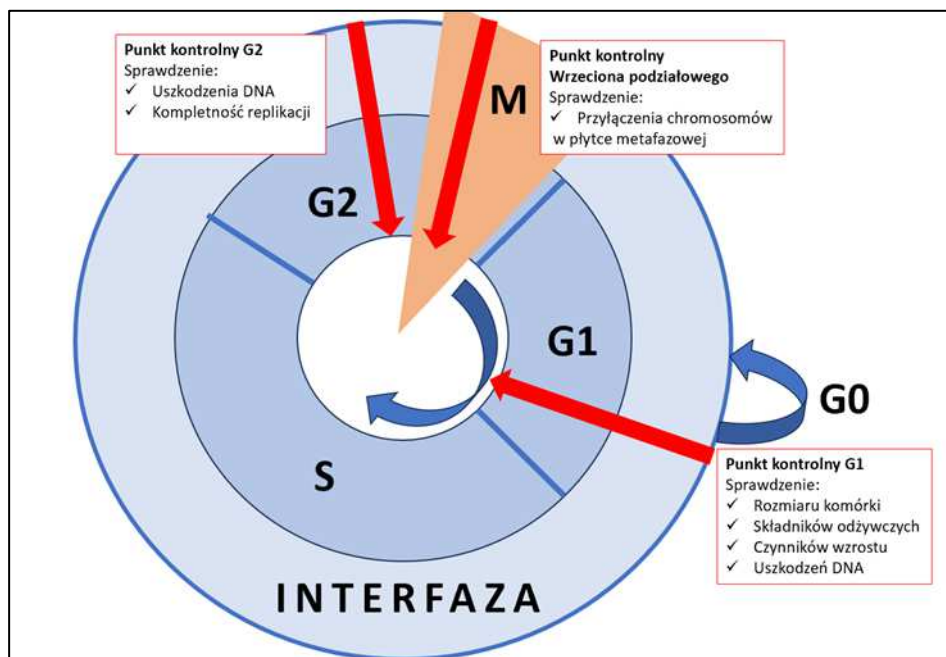
- W prawidłowo funkcjonującej komórce kolejne wydarzenia cyklu komórkowego muszą zachodzić w odpowiedniej kolejności $M \rightarrow G1$
- Poszczególne wydarzenia nie mogą się powtarzać, a kolejny etap może rozpocząć się dopiero po ukończeniu poprzedniego
- Kolejna faza cyklu może rozpocząć się, kiedy w komórce występują odpowiednie warunki: odpowiednia wielkość, procesy biochemiczne, sygnały pochodzące z komórek sąsiednich

Pomiędzy kluczowymi etapami cyklu komórkowego w komórkach włączane są mechanizmy kontroli poprawności poszczególnych procesów. Okres pomiędzy fazami cyklu, w którym następuje decyzja o wejściu do następnego etapu to punkt kontrolny cyklu, lub checkpoint.



Ryc. 3. Elementy regulujące procesy w czasie punktu kontrolnego

W czasie punktu kontrolnego, pod wpływem sygnałów z innych komórek, następuje zmiana aktywności białek enzymatycznych katalizujących przenoszenie i przyłączanie grup fosforanowych z ATP na cząsteczkę białka docelowego – kinaz. Kluczowym mechanizmem regulacji cyklu jest fosforylacja.



Ryc. 4. Punkty kontrolne cyklu komórkowego

Pierwsza kontrola cyklu komórkowego zachodzi w fazie G1 (punkt kontrolny G1). W tym czasie następuje przygotowanie materiału genetycznego do replikacji. W komórce zachodzą procesy kontroli jakości informacji

genetycznej, zasobności komórki oraz obecności sygnałów z innych komórek. Jeżeli występują uszkodzenia DNA lub komórka nie otrzymuje sygnałów do przejścia dalej, następuje zatrzymanie cyklu komórkowego i rozpoczęcie procesów naprawczych. Innym możliwym scenariuszem jest decyzja o opuszczeniu cyklu komórkowego poprzez przejście do fazy G0 lub decyzja o programowej śmierci komórki – apoptozie. Jeżeli kontrola przebiega prawidłowo, odpowiednie białka identyfikują miejsca rozpoczęcia replikacji i komórka uzyskuje pozwolenie na replikację materiału genetycznego – rozpoczyna się faza S cyklu komórkowego.

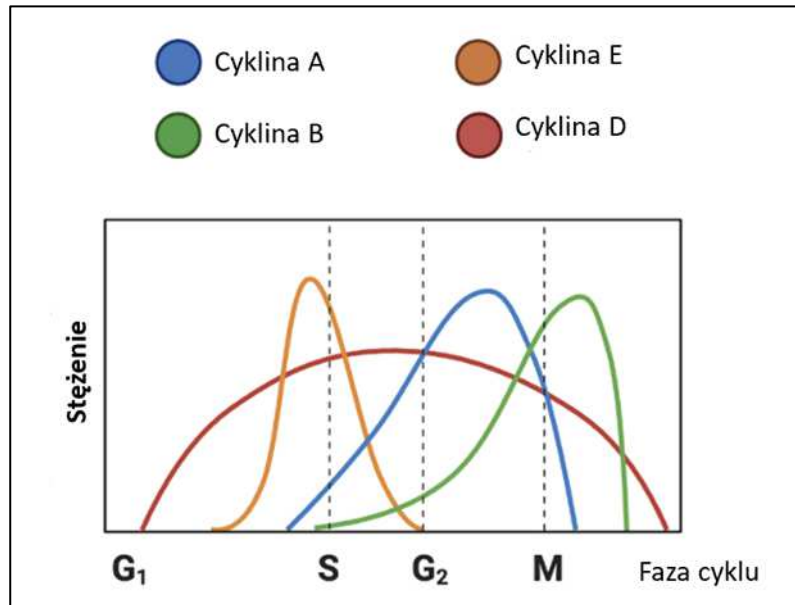
Warunkiem prawidłowego podziału komórki jest całkowite i bezbłędne skopiowanie materiału genetycznego podczas fazy S. Dlatego przed podziałem komórki, pod koniec fazy G2, następuje kontrola kompletności i poprawności replikacji – określana jako punkt kontrolny G2. Jeżeli w tym czasie zostaną wykryte nieprawidłowości komórka jest zatrzymana i następuje próba dokończenia lub naprawy uszkodzonego DNA. W przypadku niepowodzenia następuje włączenie procesu autodestrukcji komórki – apoptozy, aby uszkodzony materiał genetyczny nie został przekazany komórkom potomnym.

W trzecim punkcie kontrolnym zachodzącym w fazie M – punkt kontrolny wrzeciona podziałowego, komórka sprawdza czy chromatydy siostrzane zostały prawidłowo połączone z mikrotubulami wrzeciona podziałowego i mogą być równo rozdzielone do komórek potomnych.

Molekularne mechanizmy regulujące zmianę etapu w cyklu życiowym komórki

Mechanizmy, regulujące przejścia do poszczególnych faz cyklu komórkowego, funkcjonujące w punktach kontrolnych obejmują: regulacje aktywności enzymów: kinaz zależnych od cyklin (CDK) oraz aktywności ich inhibitorów. Za odkrycie kluczowych regulatorów cyklu komórkowego – kinazy zależnej

od cykliny (CDK) oraz białek kontrolujących ich aktywność – cyklin, w 2001 roku Leland H. Hartwell, Paul Nurse i Tim Hunt otrzymali Nagrodę Nobla.

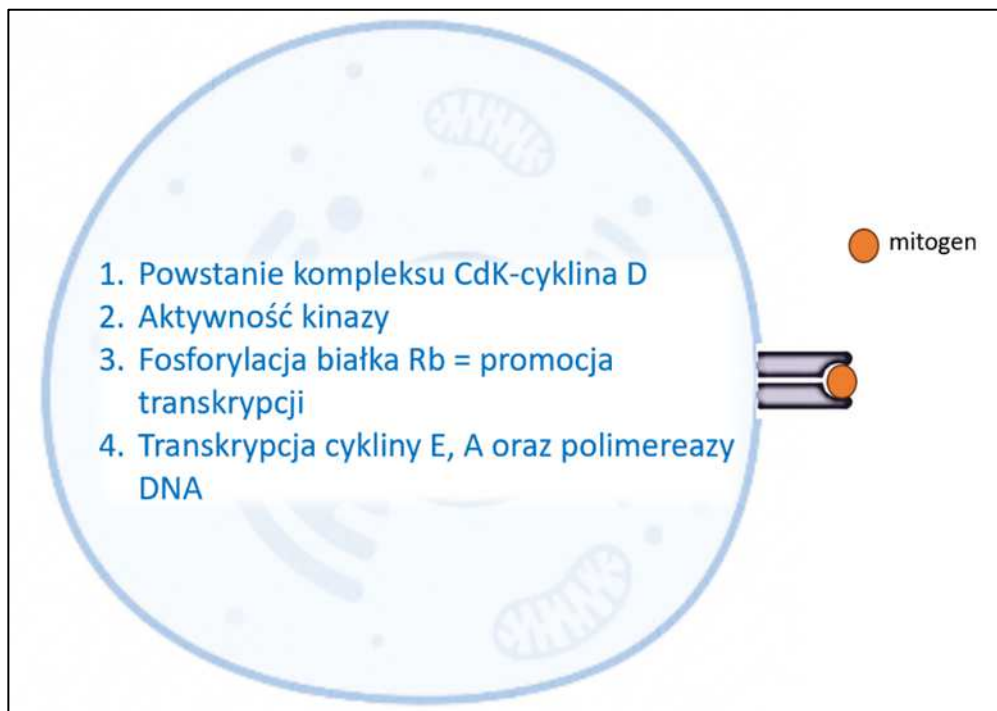


Ryc. 5. Zmiany stężenia cyklin podczas cyklu komórkowego. W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem różnych modeli organizmów wykazano, że podczas cyklu komórkowego dochodzi do cyklicznych zmian stężenia określonych białek regulatorowych, które nazwano cyklinami

Odpowiednie stężenie konkretnej cykliny umożliwia tworzenie połączeń z odpowiednimi cyklinozależnymi kinazami (CDK). Utworzenie kompleksu cyklina-kinaza warunkuje aktywność kinazy i promuje zmiany w komórce prowadzące do następnego etapu cyklu komórkowego, poprzez fosforylację odpowiednich białek.

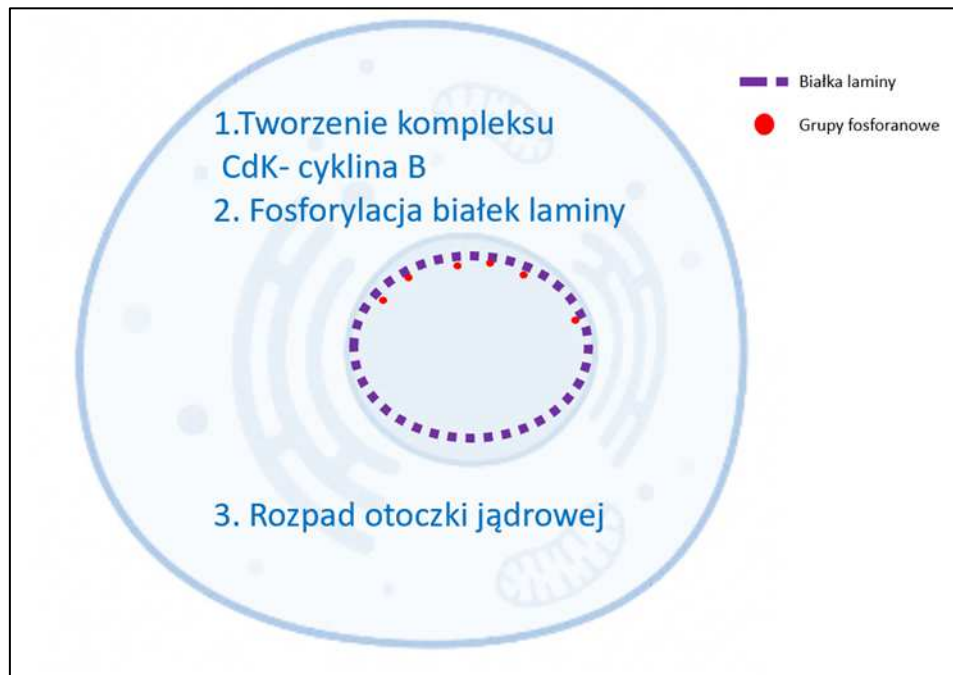
Połączenie cząsteczki sygnałowej – mitogenu (np. czynnika wzrostu), z odpowiednim receptorem na błonie komórkowej uruchamia szlaki sygnalizacyjne w komórce, umożliwiające przejście komórki z fazy G₁ do fazy S. Jest to punkt restrykcyjny cyklu, w którym kluczową rolę pełni białko supresorowe – Rb. Zlokalizowane w jądrze komórkowym białko Rb (retinoblastoma), jest ważnym inhibitorem cyklu komórkowego. Poprzez interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi, wiąże się ze specyficznymi

sekwencjami DNA i działa jak hamulec podziałów komórkowych, hamując transkrypcję genów fazy S. Fosforylacja białka Rb przez aktywny kompleks cyklinozależnej kinazy z cyklina D, powoduje zwolnienie hamowania i umożliwia rozpoczęcie transkrypcji cyklin i innych białek niezbędnych w procesie replikacji DNA.



Ryc. 6. Molekularne mechanizmu regulacji cyklu komórkowego w fazie G1

Innym przykładem współpracy cyklin i kinaz CDK jest kontrola wejścia komórki w fazę M. Przez większość cyklu komórkowego cyklina B pozostaje w niskim stężeniu. Ilość cykliny B zwiększa się pod koniec fazy G2. Kumulacja cykliny B w komórce sprzyja tworzeniu kompleksów z odpowiednią cyklinozależną kinazą. Obecność takich kompleksów rozpoczyna serię kaskadowych procesów prowadzących do fosforylacji białek laminy jądrowej i rozpadu otoczki jądrowej bezpośrednio poprzedzającej rozpoczęcie procesu mitozy.



Ryc. 7. Molekularne mechanizmy regulacji cyklu komórkowego w fazie G2

Jeśli w materiale genetycznym zostaną wykryte nieprawidłowości lub uszkodzenia zostaje uruchomiony mechanizm prowadzący do zatrzymania cyklu. Kluczową funkcję wówczas pełnią białka supresorowe, zwane strażnikami genomu (np. białko p53). Aktywne p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym inhibitorem kompleksu CDK-cyklina E. Inaktywacja kompleksu powoduje zatrzymanie komórki w punkcie kontrolnym G1 i aktywację naprawy DNA. Jeśli uszkodzenie DNA zostanie naprawione, p53 ulega degradacji, po czym cykl komórkowy zostaje wznowiony. Kiedy zaś uszkodzenia są zbyt rozległe p53 uruchamia program apoptozy, w ten sposób zapobiegając nowotworzeniu.

Gen TP53 (kodujący białko p53) to gen supresorowy, którego funkcja polega na:

- zatrzymaniu cyklu komórkowego
- umożliwieniu naprawy DNA
- indukcji apoptozy
- ochronie przed transformacją nowotworową

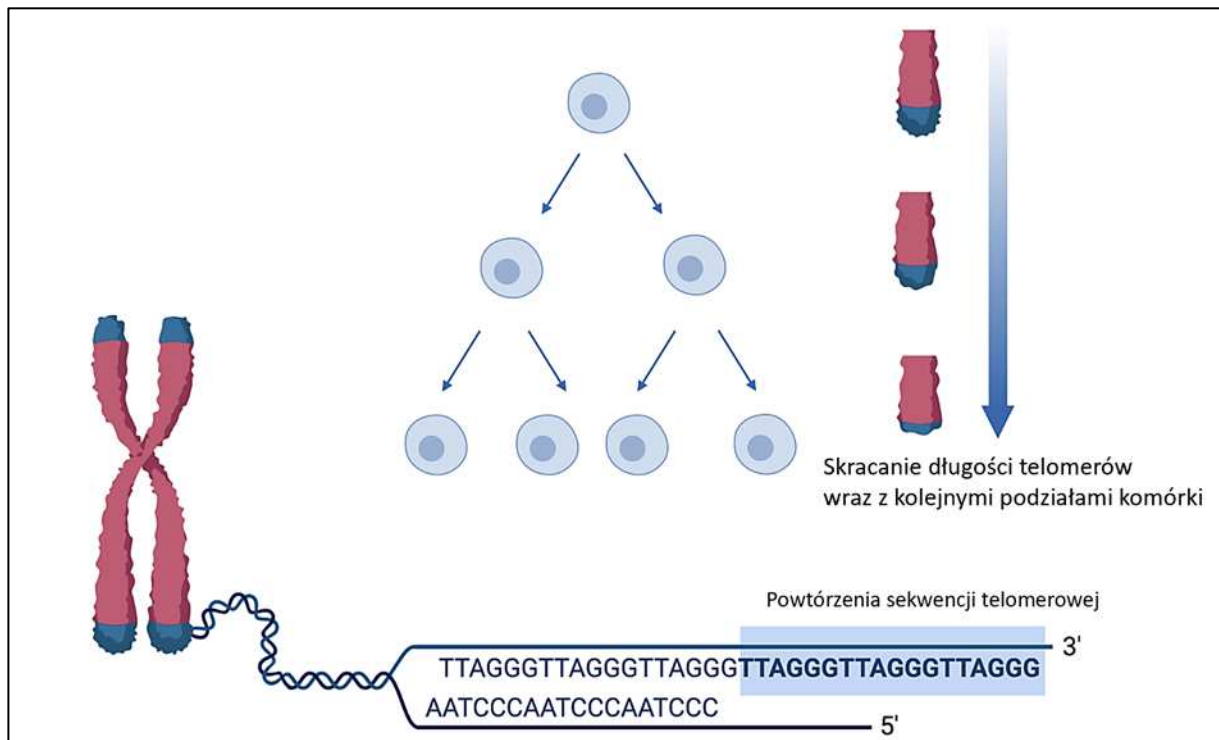
Biologiczne granice cyklu komórkowego

Proliferacja komórek organizmów wielokomórkowych podlega ścisłej kontroli, która zapewnia prawidłowy rozwój, homeostazę oraz ochronę przed nowotworzeniem. Jednak możliwości podziałowe komórek są ograniczone – zjawisko to zostało po raz pierwszy opisane przez Leonarda Hayflicka. Leonard Hayflick w latach 60-tych XX w. zaobserwował, że komórki somatyczne (np. fibroblasty skóry) hodowane in vitro mogą dzielić się tylko określoną liczbę razy – przeciętnie około 40–60 podziałów, zanim wejdą w stan trwałej senescencji komórkowej, czyli starzenia się i zatrzymania cyklu komórkowego. Proces ten, nie wynika z braku składników odżywczych ani warunków środowiskowych, ale jest wpisany w mechanizmy molekularne komórki. Głównym czynnikiem decydującym o tym limicie są telomery – sekwencje DNA (u człowieka powtarzana sekwencja nukleotydów: TTAGGG), które znajdują się na końcach chromosomów. Ich funkcją jest:

- ochrona materiału genetycznego przed uszkodzeniem podczas replikacji,
- zapobieganie fuzjom między chromosomami,
- zapewnienie stabilności genomu.

W związku z organizacją DNA przy każdym cyklu komórkowym, w procesie replikacji dochodzi do skracania się sekwencji telomerów. Gdy telomery osiągną krytycznie krótką długość, uruchamiane są ścieżki odpowiedzi na uszkodzenie DNA, prowadzące do senescencji komórkowej lub apoptozy. Istnieją pewne typy komórek, które unikają limitu Hayflicka, dzięki aktywności enzymu telomerazy, który wydłuża telomery:

1. Komórki nowotworowe – często wykazują nadaktywność telomerazy, co pozwala im dzielić się niemal nieograniczoną liczbę razy.
2. Komórki rozrodcze – zachowują długie telomery, również dzięki telomerazie.



Ryc. 8. Schemat procesu skracania telomerów wraz z kolejnymi podziałami komórki. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora

Procesy wyznaczające biologiczne granice podziałów komórek są zintegrowane z systemem regulacji cyklu komórkowego, zapewniając zatrzymanie cyklu w odpowiednich punktach kontrolnych. Takie mechanizmy stanowią ochronę przed niekontrolowaną proliferacją i transformacją nowotworową. Tzw. limit Hayflicka, wyznacza maksymalną liczbę podziałów komórkowych, jaką może przejść komórka somatyczna.

Rozdział 3.

Etapy embriogenezy i determinacja płci

Cel ćwiczeń:

- Utrwalenie wiadomości o mechanizmach oogenezy i spermatogenezy
- Zrozumienie w jaki sposób pierwsze podziały zygoty, gastrulacja i organogeneza wpływają na strukturę i funkcjonowanie narządów
- Rozwijanie umiejętności integracji wiedzy z poziomu organizmu z informacjami o mechanizmach komórkowych i molekularnych
- Poznanie głównych etapów kształtowania się płci człowieka
- Identyfikacja zaburzeń w embriogenezie oraz ich genetycznego podłoża

Podstawowe pojęcia:

Lyonizacja: proces losowego wyciszenia jednego z dwóch chromosomów X u samic (np. u ludzi – u kobiet), w czasie wczesnego rozwoju zarodkowego. Dzięki temu komórki kobiet nie mają podwójnej ilości genów z chromosomu X. Wyciszony chromosom zwany jest ciałkiem Barra

Ciałko Barra: nieczynny chromosom X w komórce kobiety, widoczny pod mikroskopem jako grudka przy błonie jądrowej. Każda kobieta ma tylko jeden aktywny chromosom X w komórce, drugi „wyciszony” to właśnie ciałko Barra.

Zmiany epigenetyczne: trwałe zmiany w aktywności genów, które nie zmieniają sekwencji DNA, ale wpływają na to, czy dany gen będzie ulegał transkrypcji (włączony) czy nie (wyłączony). Np. poprzez przyłączanie grup metylowych do DNA).

Imprinting rodzicielski (piętno genomowe): Zjawisko, w którym tylko jeden allel genu jest aktywny, a drugi – pochodzący od drugiego rodzica – jest wyciszony

epigenetycznie. Ważne w niektórych chorobach (np. zespół Angelmana, zespół Pradera-Williego).

Bruzdkowanie: pierwsze podziały komórkowego zarodka po zapłodnieniu – zygota dzieli się na coraz mniejsze komórki, bez wzrostu całej struktury.

Blastulacja: tworzenie blastocysty (blastuli) – zarodek przyjmuje postać pęcherzyka z jamą i węzłem zarodkowym, który da początek organizmowi.

Gastrulacja: proces powstawania trzech listków zarodkowych: ektodermy, mezodermy i endodermy – to z nich powstaną wszystkie tkanki i narządy.

Neurulacja: proces tworzenia cewy nerwowej z ektodermy – z której powstanie mózg i rdzeń kręgowy.

Organogeneza: okres formowania się narządów – listki zarodkowe różnicują się w konkretne struktury organizmu, np. serce, nerki, jelita.

Współczesna embriologia analizuje procesy związane z powstawaniem komórek rozrodczych, ze wzrostem i różnicowaniem organizmu a także zagadnieniami regeneracji, czyli tworzeniem na nowo tkanek i organów, które uległy zniszczeniu lub uszkodzeniu w dojrzałym organizmie, z komórek zachowujących przez całe życie charakter embrionalny. Wiedza z zakresu embriogenezy pozwala zrozumieć mechanizmy determinujące rozwój komórek płciowych (gametogeneza), mechanizmy zapłodnienia, a także pierwsze podziały mitotyczne (bruzdkowanie), gastrulację oraz procesy organogenezy. Te wczesne etapy życia są kluczowe dla powstania właściwej struktury i funkcji narządów, a ich zaburzenia stanowią podstawę wielu patologii wrodzonych, które mogą być wykrywane już na etapie prenatalnym. Diagnostyka laboratoryjna wykorzystuje tę wiedzę w kilku kluczowych obszarach:

- **Diagnostyka niepłodności** – poprzez badanie jakości plemników, oceny rezerwy jajnikowej czy testów owulacyjnych, opartych na hormonalnej regulacji gametogenezy.

- **Diagnostyka genetyczna** – dzięki znajomości genów regulujących rozwój i przebieg procesów metabolicznych, możliwe jest wykrywanie mutacji i zespołów genetycznych
- **Diagnostyka prenatalna**

Gametogeneza

Gametogeneza to proces powstawania oraz rozwoju specjalnej populacji komórek, które nazywa się gametami. Gamety powstają na drodze podziału mejotycznego. Proces gametogenezy przebiega odmiennie u mężczyzn i u kobiet.

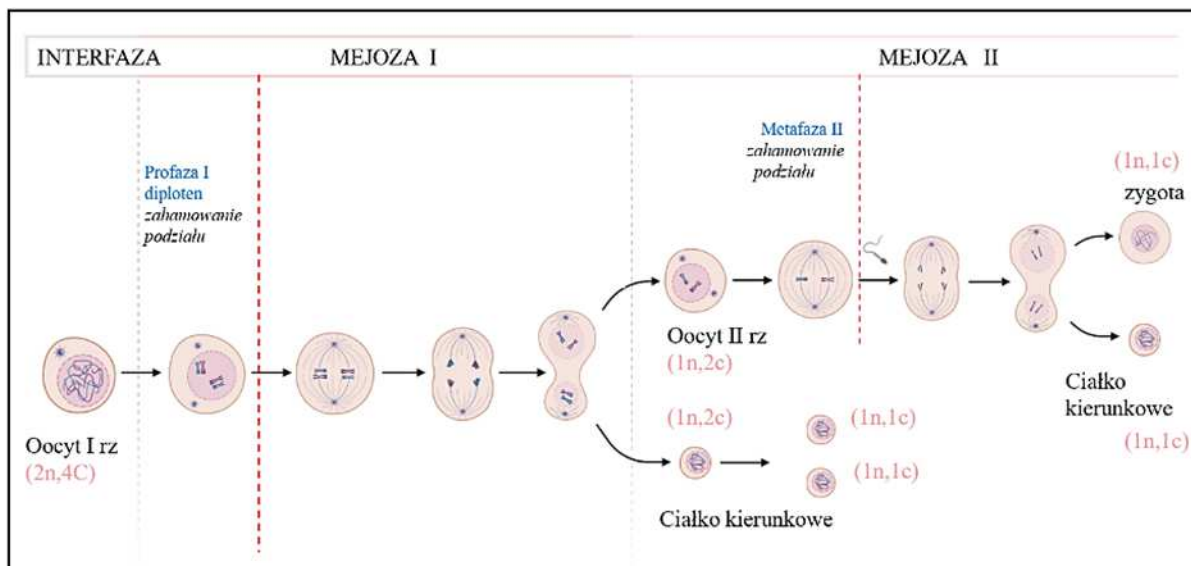
Tabela 1. Porównanie oogenezy i spermatogenezy

| Cecha | Oogeneza | Spermatogeneza |
|----------------------|--|--|
| Czas rozpoczęcia | W życiu płodowym | W okresie dojrzewania |
| Czas trwania | Rozciągnięta w czasie (do zapłodnienia) | Ciągła, szybka (64–74 dni) |
| Liczba komórek | 1 oogonium: 1 komórka jajowa + 3 pocyty | 1 spermatogonium : 4 plemniki |
| Przerwy w mejozie | Tak, długa retencja w profazie I i metafazie II | Brak – mejoza przebiega ciągle |
| Regulacja hormonalna | Złożona, cykliczna (FSH, LH, estrogeny, progesteron) | Rytmiczna, zależna od testosteronu i FSH |

U kobiet proces oogenezy rozpoczyna się w okresie płodowym. W 3–4 tygodniu życia zarodkowego migrują pierwotne komórki płciowe do listw płciowych zlokalizowanych w tylnej ścianie jamy brzusznej zarodka i tam różnicują się w oogonia ($2n$). Oogonia wielokrotnie dzielą się mitotycznie a około 12 tygodnia życia płodowego część z nich rozpoczyna pierwszy podział mejotyczny (mejozę I), osiągając stadium oocyty I-rzędu. Podział ten zatrzymuje

się w profazie I w diplotenie. W czasie tej pauzy pomiędzy podziałami dochodzi do wzrostu oocytu I rzędu i procesu witellogenety (z łac. *Vitellus* – „żółtko” oraz *génésis* – „powstawanie”) gromadzenia materiału zapasowego — żółtka. Prekursorem białek żółtka jest witelogenina, glikofosfoproteina syntetyzowana w wątrobie matki pod wpływem estrogenów. Procesowi witellogenety towarzyszy reorganizacja organelli w obrębie oocytu, zwiększenie ilości retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów, rozwój aparatu Golgiego oraz tworzenie ziaren korowych. Jest to ważny etap oogenezy, ponieważ warunkuje późniejszą zdolność oocytów do zapłodnienia i rozwój zarodka. U człowieka proces ten jest ograniczony, ponieważ powstające łożysko przejmuje główną funkcję odżywczą dla rozwijającego się zarodka.

Oocyty I-rzędu otaczane są komórkami ziarnistymi, tworząc pęcherzyki pierwotne – ich liczba ustala się do końca życia płodowego (ok. 1–2 mln), ale tylko ~400 dojrzewa do postaci oocytu II-rzędu i może zostać zapłodniona. Po osiągnięciu przez kobietę dojrzałości płciowej, w odpowiedzi na hormon LH (lutropina lub hormon luteinizujący), pojedynczy oocyt I kończy mejozę I. W ten sposób powstaje oocyt II-rzędu i pierwsze ciało kierunkowe (polocyt). Polocyty obumierają i są usuwane. Jeśli nie zostaną one właściwie usunięte, to w komórce mogą zachować się dodatkowe chromosomy. W takim przypadku po zapłodnieniu komórki jajowej z dodatkowymi chromosomami, powstaje trisomia. II podział mejotyczny zostaje zatrzymany w metafazie a kończy się dopiero w przypadku zapłodnienia – wtedy powstaje komórka jajowa i drugie ciało kierunkowe. W okresie dojrzałości płciowej w klinicznym zmianom zachodzącym w jajnikach towarzyszą zmiany zachodzące w macicy. Cykl miesięczkowy jest kontrolowany przez złożoną oś hormonalną: podwzgórze – przysadka – jajniki. Biorą w niej udział hormony, wydzielane przez różne struktury i każdy pełni określoną funkcję w regulacji procesów zachodzących w macicy i jajnikach.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający etapy oogenezy połączone z etapami podziału meiotycznego. Obraz BioRender – modyfikacja autora

Tabela 2. Funkcja hormonów cyklu miesięczkowego

| Hormon | Miejsce produkcji | Funkcja |
|----------------------------|------------------------|---|
| Gonadoliberyna GnRH | Podwzgórze | Stymulacja przysadki do produkcji FSH i LH |
| Hormon folikulotropowy FSH | Przysadka | Stymulacja dojrzewania pęcherzyków Graafa i pobudzenie komórek ziarnistych do syntezy estrogeny |
| Hormon luteinizujący LH | Przysadka | Wywołuje owulację |
| Estrogen | Dojrzewający pęcherzyk | Stymulacja wzrostu endometrium Wzrost stężenia LH |
| Progesteron | Ciałko żółte | Utrzymanie zmian w endometrium Hamowanie cyklu miesięczkowego |

U mężczyzn powstawanie komórek rozrodczych rozpoczyna się w okresie dojrzewania, a cykle spermatogenezy powtarzają się powodując, że liczba plemników jest niemal nieograniczona. Podziały mitotyczne i meiotyczne podczas kształtowania się męskich komórek rozrodczych określa się jako

spermatocytogeneza. Różnicowanie się, powstałych po II podziale mejotyczny spermatyd w plemniki określa się jako spermiogeneza. W procesie spermiogenezy powstaje akrosom, następuje kondensacja jądra komórkowego, tworzenie charakterystycznych elementów takich jak: szyjka wstawka i witka, oraz pozbycie się większości cytoplazmy. Dojrzałe plemniki przesuwane są kanaliki najądrzy, gdzie uzyskują pełną ruchliwość.

Tabela 3. Funkcja hormonów w procesie spermatogenezy

| Hormon | Miejsce produkcji | Funkcja |
|-------------|--------------------------|---|
| GnRH | Podwzgórze | Pobudza przysadkę do wydzielania FSH i LH |
| FSH | Przysadka (przedni płat) | Stymuluje komórki Sertoliego |
| LH | Przysadka | Pobudza komórki Leydiga do produkcji testosteronu |
| Testosteron | Komórki Leydiga (jądra) | Niezbędny do spermatogenezy i cech płciowych |
| Inhibina B | Komórki Sertoliego | Hamuje wydzielanie FSH |

Etapy rozwoju zarodkowego

**zapłodnienie → bruzdkowanie → blastulacja → gastrulacja → neurulacja
→ organogeneza**

Zapłodnienie, czyli fuzja męskiej i żeńskiej komórki generatywnej zachodzi w jajowodzie. Plemniki po dostaniu się do dróg rodnych kobiety, aby połączyć się z komórką jajową, muszą przejść proces kapacytacji – uzdatnienia. Zachodzące w tym czasie procesy biochemiczne mają na celu zwiększenie ruchliwości plemnika oraz płynności i przepuszczalności jego błony komórkowej. Zmiany te są niezbędne, aby mogła zajść reakcja akrosomowa.

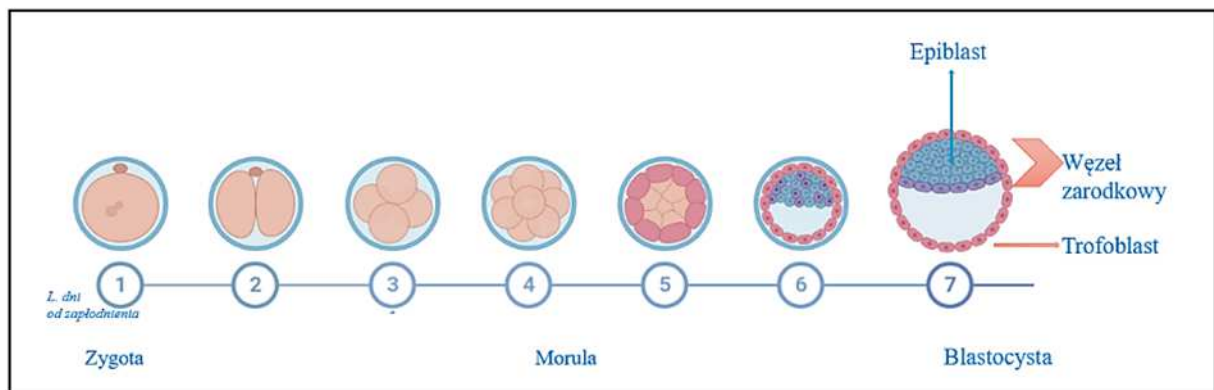
Fuzja komórek zachodzi etapami. Pierwsza faza to penetracja wieńca promienistego przez plemnik. Proces ten związany jest z chemotaksją a ważnym

atraktantem jest progesteron. Następną fazą jest penetracja osłonki przejrzystej, która zachodzi dzięki reakcji akrosomowej. Dopiero fuzja błony cytoplazmatycznej plemnika i komórki jajowej rozpoczyna połączenie obu komórek. Końcowym etapem jest reakcja korowa, polegająca na uwolnieniu z ziaren korowych enzymów powodujących zmiany w błonie komórki jajowej. W ten sposób następuje ochrona przed polispermią (wniknięciu więcej niż jednego plemnika). Wnikający plemnik stymuluje w oocyte wiele zmian. Następuje dokończenie drugiego podziału mejotycznego i przejście komórki do interfazy zarodkowego cyklu mitycznego, w którym rozpocznie się proces bruzdkowania. Skutkiem zapłodnienia jest także przywrócenie diploidalnej liczby chromosomów oraz determinacja płci u nowego osobnika. Dalszy rozwój zarodka zależy od wielu mechanizmów wpływających na ekspresję poszczególnych genów. Czynniki wpływającymi na te procesy może być, stan morfologiczny i fizjologiczny, powstających poprzez podziały mitotyczne komórek, poziom ich integracji oraz wzajemne oddziaływanie komórek na siebie. Wraz z rozwojem zarodkowym powstają coraz bardziej wyspecjalizowane komórki których potencja, czyli zdolność do różnicowania się w inne typy komórek, zmniejsza się.

Tabela 4. Zmiany potencji komórek w rozwoju zarodkowym człowieka

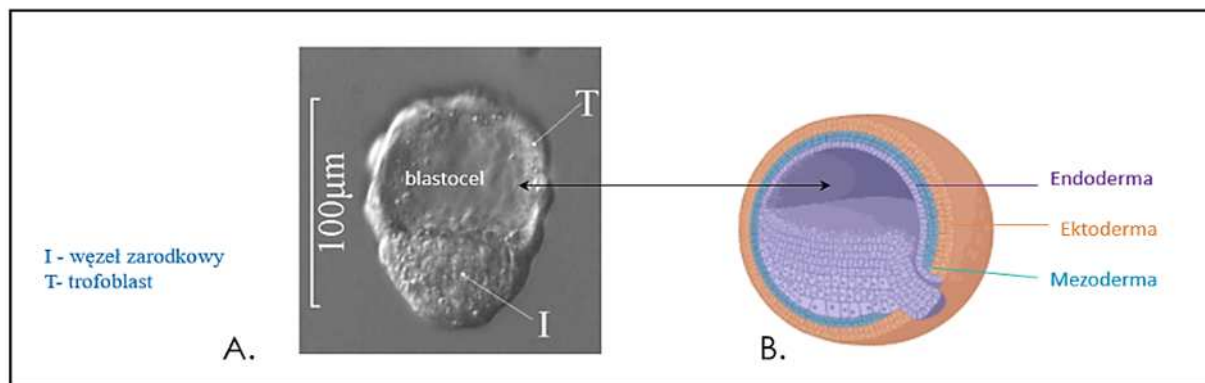
| Etap rozwoju | Typ komórek | Poziom potencji | Definicja |
|-------------------------------------|-----------------------------|--|---|
| Zygota (0 h) | Zygota | Totipotencjalna | Może dać początek całemu organizmowi, w tym zarodkowi i łożysku |
| Bruzdowanie (1–3 dni) | Blastomery (do 8 komórek) | Totipotencjalna | Nadal mogą rozwinąć się w cały organizm i tkanki pozazarodkowe |
| Morula (3–4 dzień) | Komórki zgrupowane | Pluripotencjalna | Mogą różnicować się we wszystkie tkanki zarodkowe, ale nie tworzą łożyska |
| Blastocysta (5–6 dzień) | Embrioblast, trofoblast | Pluripotencjalna / multipotencjalna | Embrioblast: pluripotencjalna (zarodek); trofoblast: multipotencjalna (łożysko) |
| Gastrulacja (3. tydzień) | Komórki listków zarodkowych | Multipotencjalna | Mogą różnicować się w kilka typów komórek w obrębie jednego listka zarodkowego |
| Organogeneza (4.–8. tydzień) | Komórki tkanek i narządów | Unii potencjalna | Mogą dać początek tylko jednemu, wyspecjalizowanemu typowi komórek |

W ciągu pierwszych godzin po zapłodnieniu zarodek przechodzi podziały komórkowe zwane bruzdkowaniem. Powstające komórki – blastomery mają sferyczny kształt a w ich cyklach nie występuje faza G. Podziały mitotyczne są całkowite a powstające komórki potomne takiej samej wielkości, dlatego proces bruzdkowania ludzkich embrionów określa się jako równomierne i całkowite. W czwartej dobie po zapłodnieniu zarodek jest wielokomórkową strukturą (32-komórki), przypominającą owoc morwy, dlatego nazwany został morulą. W następnym etapie zanikają granice pomiędzy komórkami następuje kompaktacja zarodka, który przemieszcza się z jajowodu do macicy. W obrębie moruli komórki przemieszczając się tworzą wolne przestrzenie – jamki i w ten sposób powstaje struktura zwana blastocystą (blastula) z wyodrębnionym we węzłem zarodkowym i blastocelem.



Ryc. 2. Wczesne etapy rozwoju zarodka. Obraz z BioRender – modyfikacja autora

Po implantacji zarodka w błonie śluzowej macicy rozpoczyna się gastrulacja – seria złożonych procesów, w czasie których powstają 3 listki zarodkowe. Z komórek tworzących epiblast i hipoblast zostają utworzone 3 warstwy komórek: endoderma – wewnętrzny listek zarodkowy, mezoderma – środkowy listek zarodkowy i ektoderma – zewnętrzny listek zarodkowy. Z poszczególnych listków zarodkowych w kolejnych podziałach i różnicowaniu komórek powstają odpowiednie narządy, układy i struktury organizmu.



Ryc. 3. A. blastula; B. gastrula z wyodrębnionymi listkami zarodkowymi. Obraz z BioRender modyfikacja autora

Następnymi etapami embriogenezy są neurulacja i somitogeneza. W obrębie somitów, czyli segmentów mezodermy, ułożonych symetrycznie wzdłuż cewy nerwowej, powstają:

- zróżnicowane grupy komórek tworzących szkielet, zwane: sklerotom
- zróżnicowane grupy komórek tworzących mięśnie poprzecznie prążkowane: miotom i grupy komórek z których powstanie skóra: dermatom. Ostatnim etapem rozwoju zarodkowego organogeneza, czyli powstawanie organów

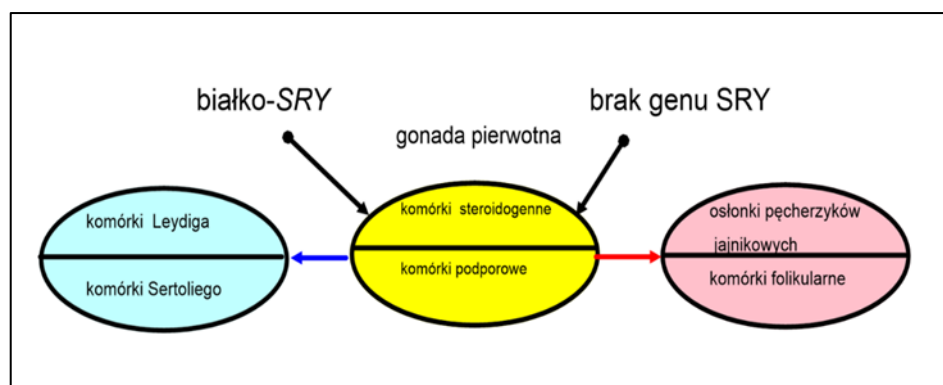
Genetyczne podstawy determinacji płci biologicznej

Z rozwojem zarodkowym związany jest proces kształtowania się płci. Jest to proces wieloetapowy, obejmujący zapłodnienie, rozwój płodowy i trwający do momentu uzyskania dojrzałości płciowej. Późniejsze etapy są konsekwencją wcześniejszych procesów, ale także mogą być kształtowane przez wiele innych czynników.

Determinacja płci chromosomowej następuje podczas zapłodnienia. Jeśli komórka jajowa jest zapłodniona przez plemnik niosący chromosom X, płeć chromosomowa rozwijającego się zarodka będzie żeńska. W przypadku nondysjunkcji – nieprawidłowego rozchodzenia się chromosomów, podczas oogenezy powstają aneuploidie, ujawniające się jako zespoły genetyczne

np.: zespół Turnera (45, X). W kształtowaniu się płci człowieka chromosom Y jest sygnałem wywoławczym rozwoju zarodka torem męskim. A jego brak powoduje samorzutny rozwój jajników. 6 tygodniowy zarodek posiada pierwotne gonady, które mogą rozwinąć się zarówno w jądra jak i w jajniki, oraz przewody Müllera (z nich mogą powstać jajowody) i Wolffa (z nich mogą powstać nasieniowody). Znajdujący się na chromosomie Y gen SRY jest rodzajem włącznika męskości, ponieważ jako czynnik transkrypcyjny uruchamia ekspresję genów niezbędnych do rozwoju bipotencjalnych gonad pierwotnych w kierunku jąder. Dalszy rozwój zależy od komórek Sertoliego, które zaczynają produkować hormon antymüllerowski (AMH – powoduje on regresję przewodów Müllera), oraz komórek Leydiga, które zaczynają produkować testosteron. Testosteron odpowiedzialny jest za maskulinizację zewnętrznych narządów płciowych oraz wspieranie rozwoju przewodów Wolffa w kierunku najądrzy, nasieniowodów i pęcherzyków nasiennych.

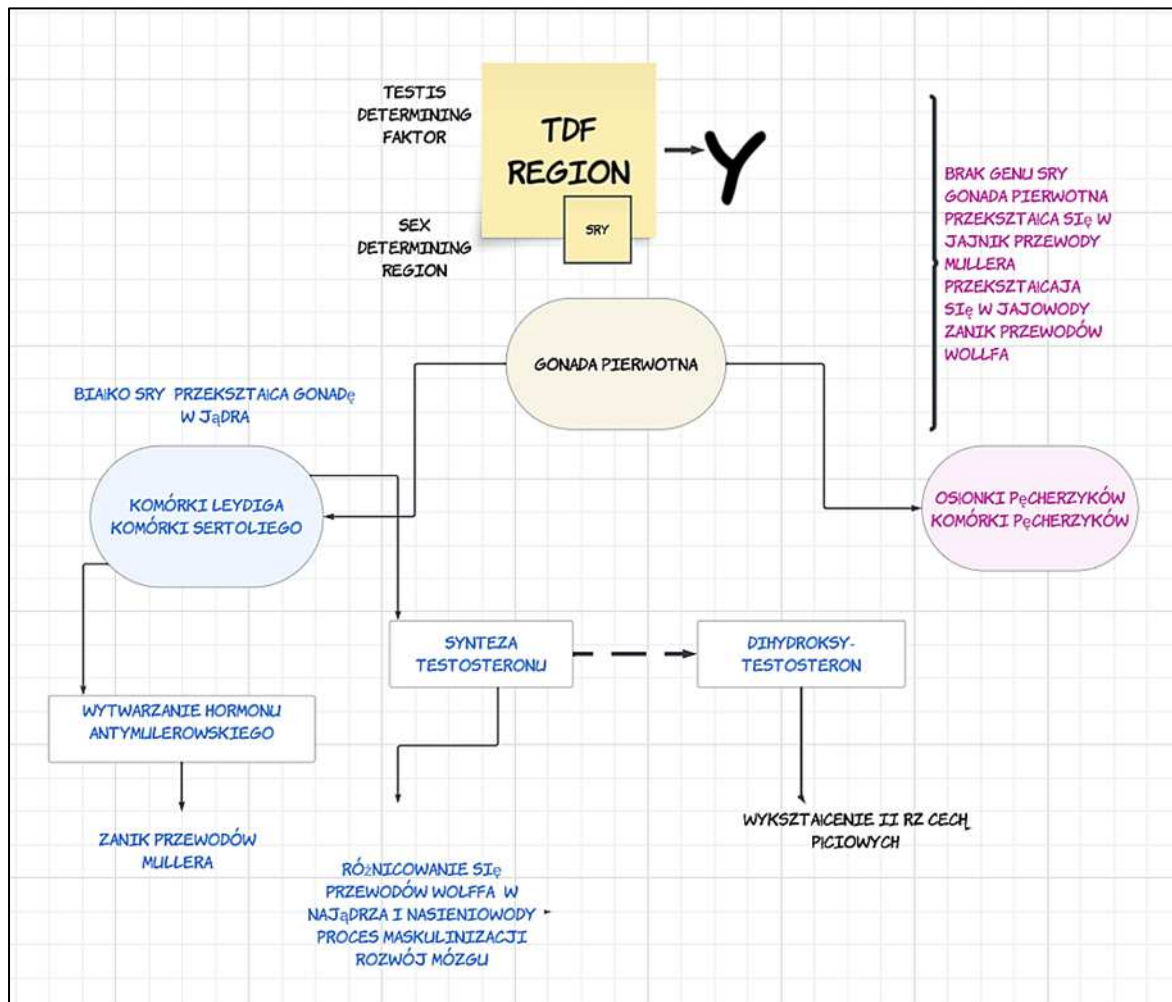
W przypadku braku genu SRY lub jego mutacji, mimo obecności kariotypu 46, XY dochodzi do rozwoju jajników i żeńskiego fenotypu.



Ryc. 4. Rola genu SRY w rozwoju jajników i jąder

Determinacja płci żeńskiej w organizmie ludzkim to proces, który zachodzi w sposób „domyślny” – czyli w przypadku braku aktywnego genu SRY. Oznacza to, że rozwój w kierunku płci żeńskiej nie wymaga specjalnego czynnika

inicjującego, lecz przebiega automatycznie, o ile nie zostaną aktywowane geny determinujące płęć męską.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający mechanizm chromosomowej i gonadalnej determinacji płci

Nieprawidłowości w kształtowaniu się płci biologicznej u człowieka znane jako zaburzenia różnicowania płci (DSD, ang. *Disorders of Sexual Development*) mogą wystąpić zarówno w życiu płodowym, jak i w okresie dojrzewania. Są to złożone procesy wynikające z zakłóceń na różnych etapach: od poziomu genetycznego i chromosomalnego, przez rozwój gonad, aż po działanie hormonów płciowych i ich receptorów. A skuteczna ich diagnoza wymaga interdyscyplinarnego podejścia: genetycznego, endokrynologicznego i psychologicznego.

Rozdział 4.

Podstawy genetyki i typy dziedziczenia

Cel ćwiczeń:

- Utrwalenie podstawowych pojęć genetyki klasycznej
- Wykazanie znaczenia praw Mendla dla współczesnych zagadnień genetyki molekularnej

Genetyka klasyczna a genetyka molekularna

Genetyka klasyczna i genetyka molekularna to fundamentalne działy biologii, które wzajemnie się uzupełniają. Genetyka klasyczna w oparciu o prawa Mendla zajmuje się dziedziczeniem cech fenotypowych, posługując się pojęciami takimi jak allele, genotyp, fenotyp, homozygotyczność czy dominacja. Genetyka molekularna bada strukturę, funkcję i ekspresję genów na poziomie DNA, RNA i białek. Umożliwia zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw dziedziczenia, mutacji i regulacji genów. Można powiedzieć, że klasyczna genetyka opisuje „co się dziedziczy” i „jak”, w podejściu molekularnym natomiast poszukuje się odpowiedzi „dlaczego tak się dzieje”. Oba podejścia odgrywają komplementarne role w praktyce klinicznej, diagnostyce, poradnictwie genetycznym, jak i w terapii chorób dziedzicznych i nowotworów.

Diagnostyka chorób dziedzicznych

Genetyka klasyczna:

- Analiza rodowodów i identyfikacja wzorców dziedziczenia (np. autosomalne recesywne, dominujące, sprzężone z płcią).

- Pomaga oszacować ryzyko choroby u potomstwa i członków rodziny (przydatna w poradnictwie genetycznym, zanim jeszcze dostępne były testy molekularne).

Genetyka molekularna:

- Pozwala na bezpośrednie wykrycie mutacji w DNA odpowiedzialnych za chorobę.
- Umożliwia preimplantacyjną i prenatalną diagnostykę genetyczną.

Onkologia – diagnostyka i leczenie nowotworów

Genetyka klasyczna:

- Rozpoznanie dziedzicznych zespołów nowotworowych, np. BRCA1 i BRCA2.
- Analiza rodowodów pacjentów z nowotworami w rodzinie – czy nowotwór ma podłoże dziedziczne?

Genetyka molekularna:

- Identyfikacja mutacji somatycznych w nowotworach – np. KRAS, BRAF.
- Pomaga dobrać celowaną terapię molekularną (np. inhibitory kinaz, immunoterapia).

Podstawowe pojęcia

Informacja genetyczna: przekazywana z podziałem komórki informacja zapisana za pomocą sekwencji nukleotydów, umożliwiającą odtworzenie struktury i funkcji komórki.

Materiał genetyczny: nośnik informacji genetycznej. W komórkach jest nim DNA.

Kod genetyczny: sposób przełożenia informacji genetycznej na sekwencję aminokwasową białka.

Gen: jednostka informacji, określony odcinek DNA, kodujący określony produkt = mendlowski czynnik dziedziczenia.

Allel: wersja genu, zajmujące to samo *locus* na chromosomach homologicznych.

Locus: dokładna lokalizacja genu na chromosomie.

Homozygota: osobnik diploidalny ($2n$) posiadający dwa identyczne allele tego samego genu (aa).

Heterozygota: osobnik $2n$ posiadający dwa różne allele tego samego genu (Aa).

Linia czysta: hodowla powstała w wyniku krzyżowania ze sobą osobników identycznych fenotypowo.

Fenotyp: zestaw cech organizmu (morfologiczne, czynnościowe i biochemiczne) uwarunkowany genotypem i czynnikami środowiskowymi, niektóre fenotypy mogą być dominujące inne recesywne.

Genotyp: zestaw alleli jaki posiada organizm w poszczególnych *locus*.

Homozygota recesywna: genotyp, kiedy oba allele genu aa dają recesywny fenotyp osobnika.

Homozygota dominująca: genotyp, kiedy oba allele genu AA dają dominujący fenotyp osobnika.

Cecha dominująca: fenotyp, który maskuje recesywny fenotyp u heterozygoty

Cecha recesywna: fenotyp, który może być maskowany przez dominujący fenotyp.

Krzyżówka testowa: krzyżowanie osobników o nieznanym genotypie a fenotypie dominującym z homozygotą recesywną, aby poznać genotyp.

Dziedziczenie mendlowskie: Dziedziczenie mendlowskie (zwane też dziedziczeniem jednogowym) to sposób przekazywania cech potomstwu, który został opisany przez Grzegorza Mendla w XIX wieku na podstawie badań nad grochem zwyczajnym. Polega ono na dziedziczeniu cech warunkowanych przez pojedynczy gen, który może występować w różnych wersjach (allele). Cechy te dziedziczą się zgodnie z zasadami znanymi jako prawa Mendla:

- **Pierwsze prawo Mendla (prawo czystości gamet):** Każdy osobnik posiada dwa allele danego genu (jeden od matki, drugi od ojca), ale przekazuje w komórce rozrodczej potomstwu tylko jeden – losowo wybrany.

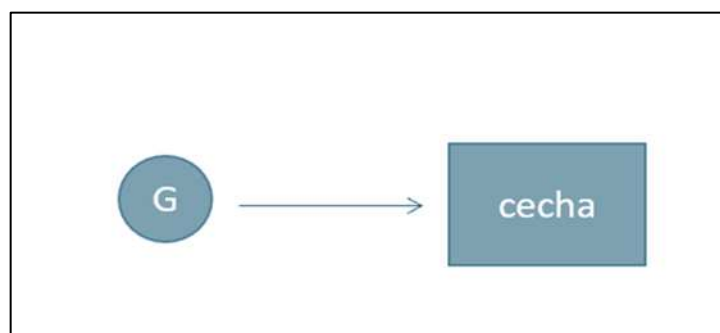
- **Drugie prawo Mendla (prawo niezależnej segregacji cech):** Allele różnych genów dziedziczą się niezależnie, o ile leżą na różnych chromosomach lub są wystarczająco odległe na tym samym chromosomie.

Prawa Mendla stanowią podstawę do zrozumienia dziedziczenia cech jednogenowych, w tym wielu chorób, a ich zastosowanie w krzyżówkach Punnetta pozwala matematycznie przewidzieć rozkład genotypów i fenotypów w potomstwie.

| | | |
|-------------------|-----------|----|
| Allele w gametach | A | a |
| | ojcowskie | |
| A | AA | Aa |
| a | Aa | aa |
| | matczyne | |

Ryc. 1. Krzyżówka Punnetta obrazująca rozkład genotypów 1:2:1

Krzyżówka Punnetta przedstawia graficznie I Prawo Mendla – prawo czystości gamet. Jeśli analizujemy dwie różne cechy, według II Prawa Mendla, ich allele segregują się niezależnie, co daje typowy rozkład 9:3:3:1 w pokoleniu F2 (przy krzyżowaniu heterozygot dwucechowych). Prawa Mendla w poradnictwie genetycznym są stosowane jako narzędzie prognostyczne w ocenie ryzyka wystąpienia choroby u potomstwa.



Ryc. 2. Schemat pokazujący mechanizm dziedziczenia mendlowskiego. G-gen, cecha – fenotyp

Jeżeli choroba dziedziczona jest w sposób mendlowski, oznacza, że jest ona uwarunkowana mutacją w jednym genie (czyli jest jednogenowa) i przekazywana zgodnie z klasycznymi prawami Mendla. Dziedziczenie to może być:

- autosomalne dominujące (AD) – wystarczy jedna kopia zmutowanego genu, by choroba się ujawniła, chory rodzic ma 50% prawdopodobieństwo przekazania zmutowanego allelu, choroba występuje w każdym pokoleniu oraz dotyka kobiety i mężczyzn z równą częstością.
- autosomalne recesywne (AR) – choroba ujawnia się tylko, gdy obie kopie genu są zmutowane (czyli jedna od matki, druga od ojca), rodzice są zwykle nosicielami, czyli mają jedną zmutowaną kopię, ale są zdrowi, potomstwo ma 25% szans bycia chorym, 50% bycia nosicielem, 25% bycia zdrowym a choroba może pojawić się niespodziewanie, jeśli oboje rodzice są nosicielami.
- sprzężone z chromosomem X (XR – recesywne lub dominujące) – zachodzi, gdy gen znajduje się na chromosomie X, dziedziczenie różni się wówczas u mężczyzn i kobiet. Jeśli XR – recesywne to mężczyźni chorują, jeśli mają zmutowany X, bo nie mają drugiego X, który mógłby to „skompensować” a kobiety są nosicielkami i zazwyczaj nie chorują. Jeśli XR – dominujące to wystarczy jedna zmutowana kopia by u kobiety i mężczyzny wystąpiły objawy (cięższy przebieg u mężczyzn, czasem letalny (śmiertelny) u płodów płci męskiej).

Tabela 1. Przykłady chorób dziedziczonych mendlowsko

| Choroba | Sposób dziedziczenia | Zmutowany gen | Skutek mutacji |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------|--|
| Mukowiscydoza | Autosomalna recesywna (AR) | CFTR | Zaburzenie transportu jonów Cl ⁻ → gęsty śluz → przewlekłe infekcje i niewydolność płuc |
| Choroba Huntingtona | Autosomalna dominująca (AD) | HTT | Powielanie trinukleotydu CAG → neurotoksyczne białko huntingtyna → neurodegeneracja |
| Fenylketonuria (PKU) | Autosomalna recesywna (AR) | PAH | Niedobór enzymu PAH → akumulacja fenylalaniny → uszkodzenie mózgu |
| Hemofilia A | Sprzężona z X (XR) | F8 | Niedobór czynnika VIII → zaburzenia krzepnięcia → skłonność do krwawień |
| Anemia sierpowata | Autosomalna recesywna (AR) | HBB | Mutacja β-globiny → hemoglobina S → sierpowaty kształt erytrocytów → niedokrwistość, ból |

W internecie znajduje się ogólnodostępna szczegółowa baza danych zawierająca informacje na temat dziedziczenia ludzkich genów, fenotypu, mutacji genetycznych oraz ich powiązań: **OMIM** (*Online Mendelian Inheritance in Man*). Jest to cenne źródło informacji dla studentów, naukowców i klinicystów zajmujących się genetyką człowieka i genetyką kliniczną. OMIM zawiera opisy genów i chorób z nimi związanych, informacje o typie dziedziczenia, dane o lokalizacji genów na chromosomach, oraz odnośniki do literatury naukowej. W katalogu OMIM opisano ponad 20 000 jednostek związanych z genami, z czego ponad 6000 to choroby monogenowe.

219700

CYSTIC FIBROSIS; CF

Alternative titles; symbols

MUCOVISCIDOSIS

Phenotype-Gene Relationships

| Location | Phenotype | Phenotype MIM number | Inheritance | Phenotype mapping key | Gene/Locus | Gene/Locus MIM number |
|----------|--|----------------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1q23.3 | {Pseudomonas aeruginosa, susceptibility to chronic infection by, in cystic fibrosis} | 219700 | AR | 3 | FCGR2A | 146790 |
| 7q31.2 | Cystic fibrosis | 219700 | AR | 3 | CFTR | 602421 |
| 19q13.2 | {Cystic fibrosis lung disease, modifier of} | 219700 | AR | 3 | TGFB1 | 190180 |

Clinical Synopsis ▾ PheneGene Graphics ▾ ?

Ryc. 3. Przykład informacji dotyczącej mukowiscydozy zawartej w OMIM. <https://www.omim.org/>

Każda jednostka chorobowa lub gen obecny w bazie mają przypisany sześciocyfrowy numer, w którym zakodowane są najważniejsze informacje. Symbol # oznacza, że fenotyp choroby może być spowodowany mutacją w więcej niż jednym genie; cyfra 1 wskazuje na autosomalnie dominujący, a 2 autosomalnie recesywny typ dziedziczenia; geny związane z chromosomem X mają kod rozpoczynający się cyfrą 3. W tabeli zebrane są informacje na temat lokalizacji genów związanych z poszczególnymi fenotypami.

Szacuje się, że choroby jednogenowe stanowią niewielki odsetek wszystkich chorób człowieka (ok. 1–2%), jednak mają duże znaczenie kliniczne. Poza tym klasycznym modelem, wiele cech (zarówno chorobowych, jak i nie chorobowych) dziedziczy się w bardziej złożony sposób. Genetyka molekularna pokazuje, że występuje wiele cech poligenowych (tzn., że wiele genów wpływa na ujawnienie się jednej cechy), sprzężonych z płcią, dziedziczonych przez mitochondrialny DNA lub uwarunkowanych przez procesy epigenetyczne. Wówczas w rozkładzie genotypów i fenotypów występują inne

proporcje niż te wynikające z praw Mendla (co nie oznacza, że prawa Mendla nie działają!).

Tabela 2. Przykłady dziedziczenia niemendlowskiego

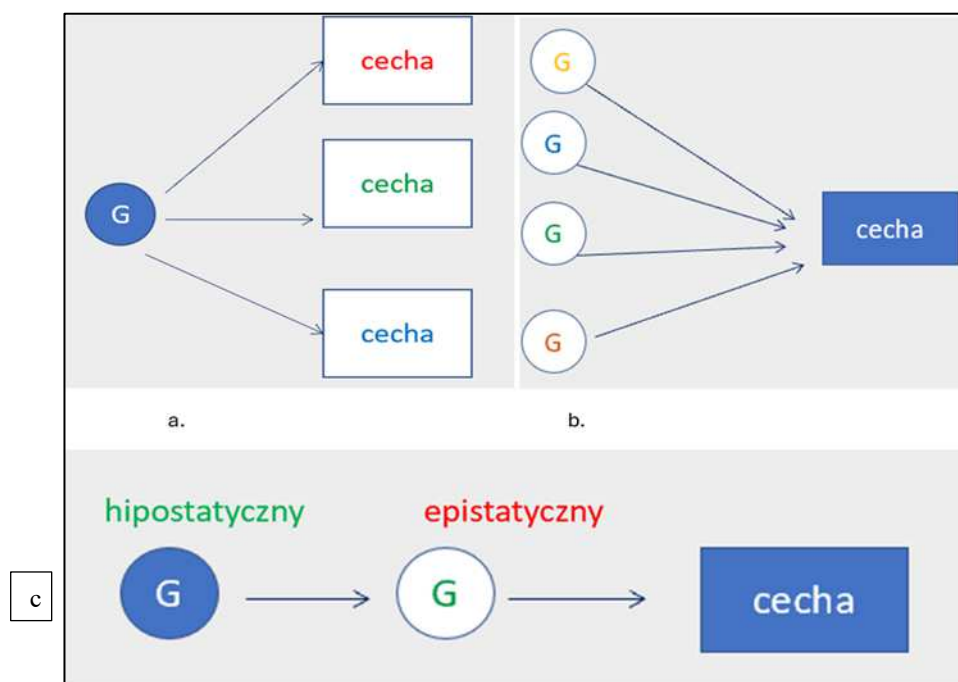
| Mechanizm | Opis | Przykład |
|-------------------------------|---|---|
| Kodominacja | Oba allele są równorzędnie wyrażane | Grupa krwi AB |
| Allele wielokrotne | Więcej niż dwa allele w populacji | Gen AB0, HLA |
| Geny sprzężone | Geny dziedziczą się wspólnie, bo są blisko na chromosomie | Kolor oczu i długość rzęs |
| Mitochondrialne dziedziczenie | Dziedziczenie tylko od matki przez mtDNA | MELAS-miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów, ang. <i>mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes</i>) |
| Piętno genomowe (imprinting) | Ekspresja genu zależy od tego, czy pochodzi od ojca czy matki | Zespół Pradera-Williego / Angelmana |
| Zjawiska epigenetyczne | Zmiany ekspresji bez zmiany sekwencji DNA | Regulacja metylacją DNA |
| Dziedziczenie poligenowe | Cechy uwarunkowane przez wiele genów | Wzrost, masa ciała, inteligencja |

Przykładem takiego niemendlowskiego dziedziczenia mogą być geny posiadające wiele alleli. Dziedziczenie alleli wielokrotnych występuje w sytuacji, w której dla danego genu w populacji obecnych jest więcej niż 2 allele. Klasycznym przykładem działania alleli wielokrotnych u człowieka jest dziedziczenie grup krwi układu AB0. Wiele alleli determinuje także układ zgodności tkankowej HLA oraz dziedziczenie łańcucha beta hemoglobiny (HbA, HbC, HbS).

Powszechną cechą wielu ludzkich genów jest także plejotropizm, kiedy jeden gen warunkuje kilka pozornie nie związanych ze sobą właściwości fenotypowych. Zjawisko to determinuje np. wiele objawów charakterystycznych mukowiscydozy lub syndromu Morfana. Większość cech człowieka (cechy fizyczne, psychiczne, poznawcze i wiele chorób) – szacuje się, że nawet ponad

90% fenotypowych różnic w populacji wynika z działania wielu genów. Dziedziczenie poligenowe polega na tym, że wiele genów, zwykle z różnych miejsc w genomie, łącznie wpływa na rozwój jednej cechy. Każdy z tych genów ma niewielki efekt, ale suma ich działania kształtuje ostateczny fenotyp. Ten sposób dziedziczenia także nie daje prostych rozkładów genotypów i fenotypów znanych z doświadczeń Mendla.

Jeżeli produkty 2 genów biorą udział w tym samym szlaku biochemicznym, stosunki liczbowe opisujące częstość fenotypów również nie będą odpowiadały tym wynikającym z praw Mendla. W takim przypadku, nazywanym epistazą, fenotypowa ekspresja jednego genu będzie wpływała na efekt fenotypowy drugiego genu. W epistazie geny współdziałają ze sobą w ten sposób, że gen epistatyczny, maskuje lub modyfikuje ekspresję genu hipostatycznego np. współdziałanie genów OCA 2 oraz HERC2 w dziedziczeniu barwy tęczówki oka.



Ryc. 4. Przykłady niemendlowskich modeli dziedziczenia cech: a. dziedziczenie plejotropowe, b. dziedziczenie wielogenowe i c. dziedziczenie epistatyczne

Rozwój współczesnej genetyki opiera się na dwóch przełomowych kamieniach milowych: prawach dziedziczenia, sformułowanych przez Grzegorza Mendla oraz chromosomowej teorii dziedziczenia, rozwiniętej na początku XX wieku przez Thomasa H. Morgana i jego współpracowników.

Na początku XX wieku, rozwój badań cytologicznych umożliwił powiązanie zasad Mendla z fizycznym nośnikiem informacji genetycznej – chromosomami. Sformułowana wówczas chromosomowa teoria dziedziczenia (W. Sutton, T. Boveri) zakładała, że geny są zlokalizowane na chromosomach, które ulegają segregacji i rekombinacji w trakcie mejozy, co dostarczało potwierdzeń dla obserwacji mendlowskich. Empiryczne potwierdzenie tej teorii zostało dostarczone przez Morgana. Jego prace na modelu Wywilżni karłowatej (*Drosophila melanogaster* L.), pospolicie zwanej muszką owocową, doprowadziły do identyfikacji genów sprzężonych z płcią, oraz zjawiska sprzężenia genowego, a także zapoczątkowały rozwój mapowania genetycznego.

Prace Morgana i jego zespołu, zwłaszcza A. Sturtevant, umożliwiły określanie względnych odległości między genami na podstawie obserwowanych fenotypowo częstości rekombinacji, prowadząc do stworzenia pierwszych map genetycznych. Osiągnięcia te nie tylko rozszerzyły klasyczne prawo Mendla, ale także stworzyły podstawy dla rozwoju współczesnych narzędzi genetyki molekularnej, takich jak: mapy genetyczne, analizy rodowodów, czy identyfikacja loci odpowiedzialnych za choroby dziedziczne. Dziedzictwo tych odkryć jest widoczne nie tylko w teorii, ale również w praktyce klinicznej i personalizowanej medycynie.

Zastosowanie w praktyce

Rozpoznanie typu dziedziczenia pozwala oszacować ryzyko odziedziczenia choroby przez potomstwo. Najczęstsze typy dziedziczenia:

- **Autosomalne recesywne (AR)** – choroba ujawnia się tylko, gdy dziecko odziedziczy dwa zmutowane allele (aa):

- Rodzice są zazwyczaj nosicielami (Aa) – zdrowi, ale przekazują wadliwy allel
- Ryzyko dla każdego dziecka: 25% chore, 50% nosiciel, 25% zdrowe (AA)
- Przerwy w rodowodach, czyli sytuacje, w których choroba „przeskakuje pokolenia” (nie występuje u rodziców, ale pojawia się u dzieci).
- **Autosomalne dominujące (AD)** – jeden zmutowany allel wystarczy, aby choroba się ujawniła;
 - Zwykle jeden z rodziców jest chory (Aa)
 - Ryzyko: 50% chore, 50% zdrowe (jeśli drugi rodzic zdrowy – aa)
- **Sprzężone z chromosomem X recesywne** – typowe dla mężczyzn (XY), kobiety mogą być nosicielkami
- Nosicielka (X^AX^a) może przekazać chorobę synowi (50% szans), córki mogą być nosicielkami
- **Sprzężone z chromosomem X dominujące** – rzadsze, może dotyczyć obu płci, ale mężczyźni często mają cięższy przebieg
- **Mitochondrialne** – dziedziczenie wyłącznie po matce (bo mitochondria są dziedziczone od niej)

Przykłady przypadków klinicznych

Zadanie 1: Mukowiscydoza (OMIM #219700)

Opis: Mukowiscydoza to choroba genetyczna powodowana mutacją w genie CFTR. Rodzice są zdrowi, ale ich 3-letni syn został zdiagnozowany z mukowiscydozą. W rodzinie nie było wcześniej znanych przypadków tej choroby. Rodzice są ze sobą niespokrewnieni.

1. Jakie są możliwe genotypy rodziców w odniesieniu do genu CFTR?
2. Jakie jest prawdopodobieństwo, że kolejne dziecko tej pary:
 - a) będzie chore
 - b) będzie nosicielem
 - c) będzie całkowicie zdrowe (bez mutacji)?

3. Dlaczego mukowiscydoza może pojawić się w rodzinie, mimo że wcześniej jej nie obserwowano?

Zadanie 2: Hemofilia A (OMIM #306700)

Opis: Hemofilia A to choroba krwi spowodowana mutacją w genie F8, dziedziczy się w sposób recesywny. Kobieta (Anna) ma zdrowego męża i dwóch synów: jeden z nich choruje na hemofilię A, drugi jest zdrowy. Ojciec kobiety był chory, a matka była zdrowa.

1. Czy Anna jest nosicielką mutacji w genie F8? Uzasadnij
2. Jakie jest prawdopodobieństwo, że kolejny syn Anny będzie chory?
3. Jakie jest prawdopodobieństwo, że córka Anny będzie:
 - a) chora
 - b) nosicielką?

Zadanie 3: Achondroplazja (OMIM #100800)

Opis: Achondroplazja to choroba powodująca karłowatość, spowodowana mutacją w genie FGFR3. w 80% przypadków jest wynikiem mutacji *de novo*. U chłopca zdiagnozowano achondroplazję. Jego rodzice i rodzeństwo są zdrowi. Ojciec ma 45 lat, matka 35. Brak przypadków choroby w rodzinie.

1. Jak można wyjaśnić pojawienie się choroby u dziecka?
2. Jakie jest prawdopodobieństwo, że dziecko odziedziczyło mutację od jednego z rodziców?
3. Jakie jest ryzyko, że kolejne dziecko tych samych rodziców również będzie miało achondroplazję?
4. Czy wiek ojca mógł mieć wpływ? Uzasadnij

Odpowiedzi:**ZADANIE 1:** Dziedziczenie: autosomalne recesywne (gen CFTR)

1. Genotypy rodziców: Oboje są najprawdopodobniej nosicielami heterozygotycznymi (Aa) – ponieważ są zdrowi, ale mają chore dziecko (aa).
2. Prawdopodobieństwa dla kolejnego dziecka: Z krzyżówki $Aa \times Aa$: aa (chory): 25%, Aa (nosiciel): 50%, AA (zdrowy, bez mutacji): 25%
3. Dlaczego choroba może pojawić się bez wcześniejszych przypadków? Nosicielstwo jest bezobjawowe – rodzice mogą być nosicielami, nawet jeśli w rodzinie nigdy nie było chorego dziecka. Recesywne mutacje mogą „ukrywać się” przez wiele pokoleń.

ZADANIE 2: Dziedziczenie: recesywne sprzężone z chromosomem X (gen F8)

1. Czy Anna jest nosicielką? Tak. Jej ojciec był chory, więc musiała odziedziczyć od niego wadliwy allel X^a . Od matki odziedziczyła prawidłowy X^A . Genotyp Anny to $X^A X^a$ – czyli jest nosicielką.
2. Prawdopodobieństwo choroby u syna: Syn dziedziczy jeden chromosom X od matki i Y od ojca. 50% szans, że otrzyma X^a (choroba), 50% że X^A (zdrowy), Odpowiedź: 50% szans na chorobę.
3. Prawdopodobieństwa dla córki: Dziedziczy X od każdego z rodziców. Ojciec jest zdrowy (X^A). Od matki: 50% szans na X^a , 50% na X^A . a) Chora: 0% (musiałaby mieć X^a od ojca, niemożliwe), b) Nosicielka: 50%

ZADANIE 3: Dziedziczenie: autosomalne dominujące (gen FGFR3), często de novo

1. Dlaczego choroba pojawiła się u dziecka, choć rodzice są zdrowi? Najbardziej prawdopodobna przyczyna to mutacja de-novo – dziecko ma mutację w FGFR3 mimo braku jej u rodziców.
2. Czy dziecko odziedziczyło mutację od rodziców? Nie – bo oboje rodzice są zdrowi, a achondroplazja ma wysoką penetrację. Mutacja musiała powstać de novo, czyli nie została odziedziczona.
3. Ryzyko, że kolejne dziecko również będzie miało achondroplazję: Jeżeli mutacja de novo wystąpiła losowo, to ryzyko jest bardzo niskie (<1%).
4. Wpływ wieku ojca: Tak. Zaawansowany wiek ojca (powyżej 40 r.ż.) zwiększa ryzyko mutacji de novo w plemnikach, szczególnie w genach takich jak FGFR3. Jest to udokumentowane zjawisko tzw. efektu wieku ojcowskiego

Rozdział 5.

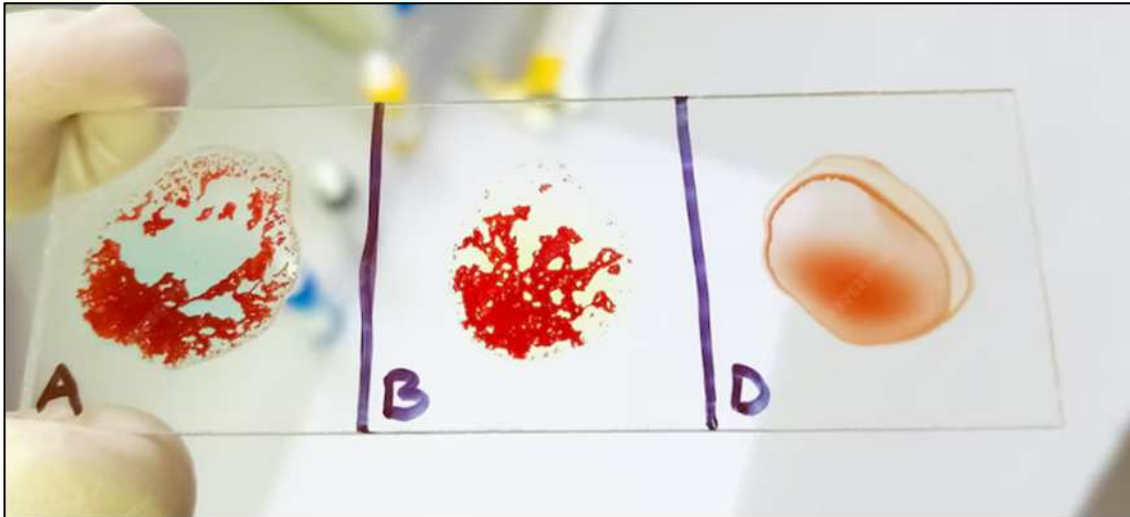
Grupy krwi, dziedziczenie układów grupowych

Cele ćwiczeń:

- Poznanie budowy i funkcjonowania głównych układów grupowych krwi rodzajów antygenów i przeciwciał
- Zrozumienie mechanizmu i konsekwencji powstawania konfliktu serologicznego w układach AB0, Rh, Kell
- Utrwalenie wiedzy o zasadach dziedziczenia grup krwi

Wiedza o grupach krwi ma istotne znaczenie kliniczne:

- w transfuzjologii – przetoczenie biorcy niewłaściwej grupowo krwi dawcy prowadzi do niebezpiecznego konfliktu immunologicznego – reakcji poprzetoczeniowej, co stanowi bezpośrednie zagrożenie życia biorcy. W warunkach laboratoryjnych obserwuje się aglutynację, czyli zlepianie krwinek
- w diagnostyce konfliktu serologicznego – niezgodności antygenów między matką a płodem może doprowadzić do konfliktu serologicznego i rozwoju choroby hemolitycznej noworodka
- w diagnostyce procesów autoimmunohemolitycznych – u niektórych chorych powstają autoprzeciwciała przeciw własnym krwinkom czerwonym, co jest skutkiem procesów autoimmunologicznych



Ryc. 1. Przykład aglutynacji szkiełkowej

https://pl.freepik.com/premium-zdjecie/ab-ujemny-rzadko-badanie-grup-krwi-metoda-aglutynacji-szkiełkowej_25028134.htm#from_element=cross_selling_photo

Układy grupowe krwi – wprowadzenie

Antygeny układów grup krwi mogą być: białkami, glikoproteinami, glikolipidami lub polipeptydami, występującymi na błonie komórkowej erytrocytów. Niektóre antygeny układowe grup krwi mogą być też obecne na powierzchni innych komórek organizmu. Zwykle są integralnymi składnikami błony komórkowej, bądź mogą być też antygenami wydzielanymi i adsorbowanymi z osocza, jak w przypadku antygenów z układów Lewis czy Chido/Rodgers. Antygeny układów Rh oraz MNS są ograniczone do erytrocytów.

Istotną cechą antygeny jest immunogenność, czyli zdolność wywołania przeciw sobie swoistej odpowiedzi immunologicznej. Zależy ona od jego budowy chemicznej oraz od gęstości determinant antygenowych, czyli fragmentów antygeny łączących się bezpośrednio z wolnymi przeciwciałami, receptorami limfocyty B lub limfocyty T, na powierzchni komórki. Glikoproteiny i glikolipidy wykazują silniejszą immunogenność w porównaniu do polipeptydów. Na pojedynczym erytrocycie liczba cząsteczek może się wahać od mniej niż 1000 (cząsteczki MHC) do ponad 1 miliona (antygen A1). Klasyfikacją układów

grupowych zajmuje się Międzynarodowe Towarzystwo Transfuzjologiczne, które dotychczas opisało 44 układy grupowe zawierające 362 antygenów kodowanych przez 48 genów (stan na 2024 rok). Największe znaczenie kliniczne mają wyłącznie te, które charakteryzują się wysoką immunogennością lub częstym występowaniem naturalnych przeciwciał.

Większość antygenów, głównie układów Rh, Kell, Kidd, Duffy, pojawia się już w pierwszych etapach życia płodowego i ich ekspresja utrzymuje się na stałym poziomie, takim jak u osób dorosłych. Natomiast antygeny z układów ABO i Lewis pojawiają się w okresie płodowym, ale do ich pełnej ekspresji dochodzi zwykle w 2. roku życia. Dlatego też grupa krwi dziecka jest ustalana ostatecznie dopiero po ukończeniu 2. roku życia.

Najważniejsze znaczenie kliniczne dla człowieka mają układy grupowe krwi:

- ABO – antygeny A i B
- Rh – antygeny C, c, D, E, e
- Kell – antygen K, k

Wybrane grupy krwi

Układ ABO

Historia odkrycia grup układu ABO sięga lat 1900–1901, kiedy to austriacki uczonec, Karl Landsteiner, badając krew swoich współpracowników w Instytucie Higieny Uniwersytetu Wiedeńskiego zauważył, że po zmieszaniu krwi różnych osób doszło do jej aglutynacji. Dzięki temu odkryciu sklasyfikowano ludzi do trzech a potem (1904 rok) do czterech grup krwi, co stało się podstawą bezpiecznego przetaczania krwi i rozwoju transfuzjologii. Za to odkrycie w 1930 roku Karl Landsteiner otrzymał Nagrodę Nobla.

Dziesięć lat później Emil von Dungern i Ludwik Hirsfeld wykazali, że grupy krwi dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla.

Rozmieszczenie antygenów układu ABO w organizmie

Antygeny układu ABO występują na powierzchni większości komórek i tkanek organizmu człowieka. Obecne są nie tylko na krwinkach czerwonych, lecz także na komórkach wielu narządów, m.in. płuc, nerek, wątroby, trzustki, a także w jądrach, nasieniu, ślinie, gruczołach ślinowych i płynie owodniowym. Jedynym wyjątkiem są komórki tkanki nerwowej, dlatego antygeny ABO nie występują w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obecność lub brak określonych antygenów na powierzchni erytrocytów warunkuje przynależność do jednej z czterech podstawowych grup krwi: A, B, AB lub O.

Budowa biochemiczna antygenów układu ABO

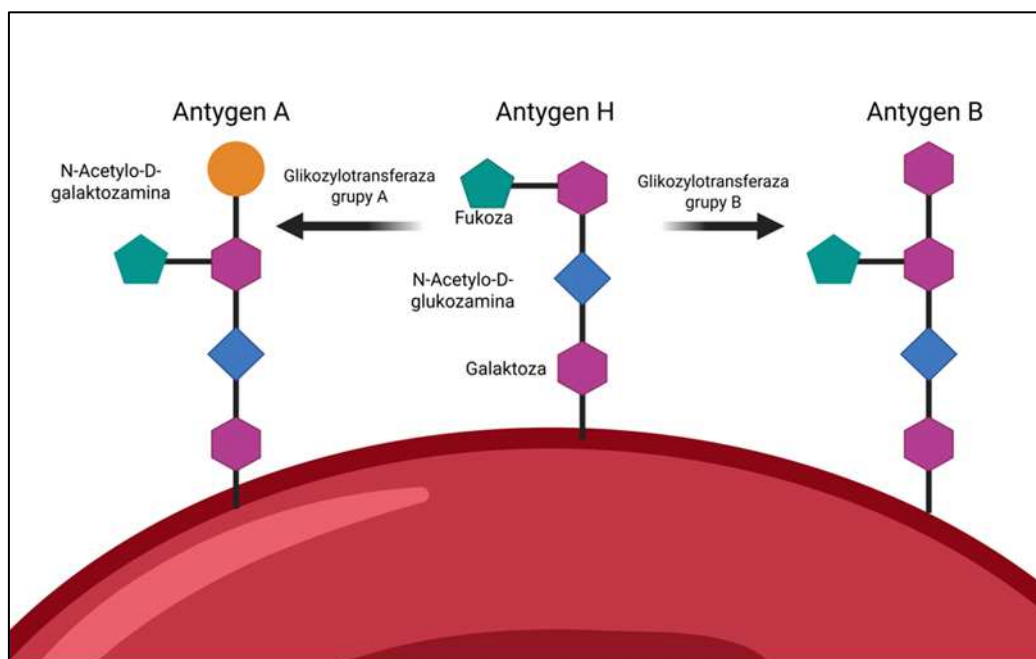
Antygeny układu ABO są polisacharydami związanymi z glikoproteinami lub glikolipidami błony komórkowej. Powstają z tzw. łańcucha prekursorowego, złożonego z D-galaktozy, L-fukozy i N-acetylo-D-glukozaminy. Rodzaj wiązania glikozydowego w tym łańcuchu decyduje o miejscu występowania antygenów:

- wiązanie β 1,4 — obecność antygenów na krwinkach czerwonych
- wiązanie β 1,3 — obecność antygenów na innych komórkach i w wydzielinach

Syntezę struktur antygenowych regulują trzy geny: Hh (FUT1), Sese (FUT2) i ABO.

- geny Hh i Sese kodują enzymy tworzące antygen H, który stanowi podstawę strukturalną wszystkich antygenów układu ABO oraz charakteryzuje grupę krwi O
- gen ABO koduje glikozylotransferazy przyłączające odpowiednie cukry do antygenu H, tworząc:
 - antygen A – po dołączeniu N-acetylo-D-galaktozaminy
 - antygen B – po dołączeniu D-galaktozy

W przypadku przyłączenia obu cukrów powstają równocześnie antygeny A i B, co odpowiada grupie krwi AB. Glikozylotransferazy są enzymami bardzo swoistymi. Każdy enzym przyłącza tylko jeden rodzaj cukru tworząc wiązanie O-glikozydowe.



Ryc. 2. Schemat biochemicznej budowy antygenów układu ABO. Obraz z BioRender modyfikacja autora

Przeciwciała układu ABO – powstawanie i właściwości

U ludzi w obrębie układu ABO występują 4 główne grupy krwi: A, B, AB, O. Determinowane są one przez obecność odpowiednich antygenów bądź ich brak na powierzchni błon erythrocytów. W surowicy osób należących do poszczególnych grup ABO obecne są charakterystyczne przeciwciała: anty-A i/lub anty-B. Ich obecność pozostaje w relacji odwrotnej do antygenów znajdujących się na erythrocytach:








- grupa A → przeciwciała anty-B,
- grupa B → przeciwciała anty-A,
- grupa AB → brak przeciwciał układu ABO,
- grupa O → obecne przeciwciała anty-A i anty-B.

Przeciwciała układu ABO są wyjątkowe, ponieważ powstają naturalnie, bez wcześniejszego kontaktu z obcymi krwinkami. Ich produkcja jest stymulowana antygenami bakteryjnymi mikrobioty jelitowej oraz antygenami pokarmowymi, które wykazują podobieństwo strukturalne do antygenów A i B. W żadnym innym

układzie grupowym nie występują tak zwane przeciwciała naturalne, charakteryzujące się stałą obecnością (regularnością). Przeciwciała te pojawiają się około 3. roku życia, utrzymują się na stałym poziomie przez większość dorosłego życia, a u osób starszych mogą stopniowo zanikać lub słabnąć.

Przeciwciała anty-A powodują aglutynację krwinek czerwonych zawierających antygen A, natomiast przeciwciała anty-B aglutynują krwinki z antygenem B. Z uwagi na tę cechę układ ABO ma kluczowe znaczenie dla bezpiecznego krwiolecznictwa.

Tabela 1. Antygeny i przeciwciała układu grupowego ABO, obecne u osób z poszczególnymi grupami krwi. <https://www.gov.pl/web/nck/grupy-krwi>

| | GRUPA A | GRUPA B | GRUPA AB | GRUPA O |
|---|--|--|--|--|
| RODZAJE KRwinek CZERWONYCH |  |  |  |  |
| ANTYGENY NA POWIERZCHNI KRwinek CZERWONYCH | antygen A | antygen B | antygen A i B | brak antygenów |
| PRZECIWCIAŁA OBECNE W OSOCZU |  anty-B |  anty-A | brak przeciwciał |  anty-B i anty-A |

Osoby z grupą krwi A na powierzchni krwinek posiadają antygen A, a w ich surowicy znajdują się naturalne, regularne przeciwciała anty-B. W przypadku grupy B na powierzchni krwinek obecny jest antygen B, w surowicy znajdują się naturalne, regularne przeciwciała anty-A. Krew grupy O nie ma żadnego antygeny na krwinkach, natomiast w surowicy krwi znajdują się naturalne, regularne przeciwciała anty-A i anty-B. Natomiast w grupie AB na erytrocytach obecne są zarówno antygeny A i B, zaś w surowicy tej grupy nie stwierdza się żadnych przeciwciał z tego układu.

Układ Rh

Odkrywcami układu grupowego Rh są Karl Landsteiner i Alexander Wiener (1940 rok). Oznaczenie tego układu pochodzi od nazwy rodzaju małpy – rezus, od których po raz pierwszy uzyskano krwinki Rh⁺ przeprowadzając doświadczenie zaszczepienia królika krwinkami rezusa (*Macacus mulatta*). Uzyskana w ten sposób surowica aglutynowała krwinki około 85% populacji Nowego Jorku, co pozwoliło wyodrębnić antygen nazwany później *Rh*. Odkrycie to zapoczątkowało intensywne badania nad jednym z najważniejszych układów grupowych krwi człowieka.

Charakterystyka antygenów układu Rh

Układ Rh jest drugim pod względem znaczenia klinicznego oraz jednym z najbardziej złożonych układów grupowych krwi. Antygeny Rh są białkami błonowymi obecnymi wyłącznie na krwinkach czerwonych. Ich ekspresja rozpoczyna się już około 6. tygodnia życia płodowego, a same antygeny cechują się bardzo dużą immunogennością, szczególnie antygen D. W przeciwieństwie do układu ABO w układzie Rh nie występują naturalnie obecne przeciwciała. Przeciwciała anti-Rh pojawiają się wyłącznie na skutek kontaktu osoby pozbawionej danego antygeny z krwią zawierającą ten antygen, np. podczas transfuzji krwi Rh⁺ biorcy RH⁻ lub w czasie ciąży, kiedy matka jest Rh⁻ a płód Rh⁺. Powstałe przeciwciała mogą wywołać zagrażające życiu biorcy reakcje poprzetoczeniowe lub prowadzić do konfliktu serologicznego matka-płód.

W układzie Rh występuje 5 głównych antygenów:

- antygen D – genotypy DD lub Dd; allel d jest genem niemym i genotyp dd nie koduje żadnego antygeny
- antygen C – genotypy CC lub Cc
- antygen c – genotyp cc
- antygen E – genotypy EE lub Ee
- antygen e – genotyp ee

Najbardziej immunogennym w układzie Rh jest antygen D. Osoba, która ma na powierzchni krwinek czerwonych antygen D jest określana jako Rh^+ , bez względu na obecność pozostałych antygenów tego układu. U ok. 15–17% osób, krwinki czerwone nie reagują z surowicą anti-D. Takie osoby określa się mianem Rh^- .

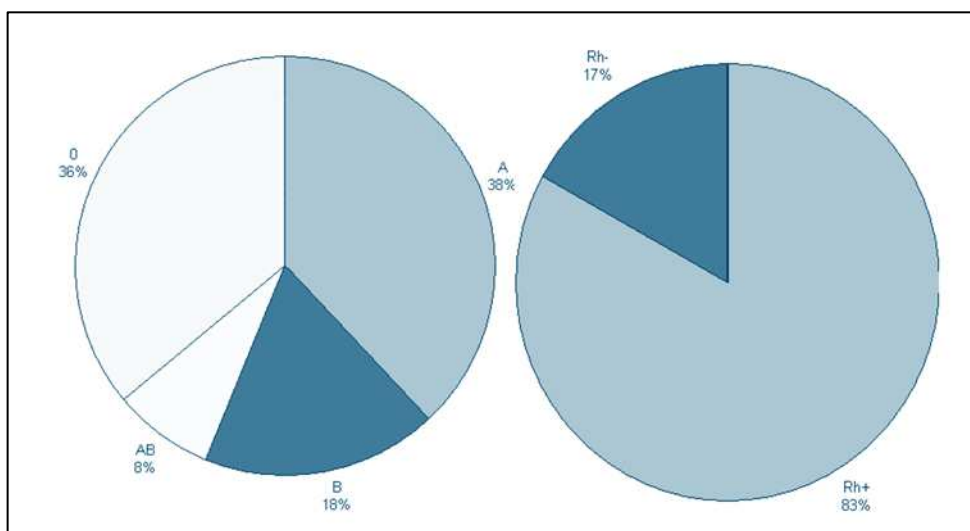
Geny odpowiedzialne za wytwarzanie antygenów układu Rh znajdują się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p34.3–1p36). Są to geny: RHD i RHCE, wykazujące 96% homologię.

- Gen RHD odpowiada za biosyntezę antygeny D.
- Gen RHCE koduje antygeny C, c, E i e.

Brak antygeny D jest najczęściej wynikiem delecji genu RHD, powstałej w wyniku nierównomiernego crossing-over.

W obrębie układu Rh istnieje także odmiana określana mianem słabego antygeny D (D^u) występująca u 1% populacji (fenotyp Rh weak). Odmiana tego antygeny D powstaje w wyniku mutacji w genie RHD. Ze względu na niski poziom białka na krwinkach czerwonych trudno jest ten antygen wykryć metodami klasycznymi. Osoba z tą odmianą określana jest jednocześnie dawcą Rh^+ i biorcą Rh^- . Antygen D obecny na erytrocytach jest nieprawidłowy. W przypadku przetoczenia tej osobie krwi Rh^+ mogłoby dojść do wytworzenia przeciwciał przeciwko pełnowartościowym antygenom D dawcy. Z tego powodu krew takiej osoby jako biorcy określa się Rh^- . Jeśli taka osoba jest dawcą, istnieje niebezpieczeństwo wytworzenia przez biorcę przeciwciał przeciwko słabym antygenom D. W takim przypadku osobę traktujemy jako dawcę Rh^+ .

Poniżej przedstawiono częstość występowania w Polsce poszczególnych grup krwi z odpowiednich układów grupowych. W populacji polskiej najczęściej występującą grupą krwi układu ABO jest grupa A, zaś najrzadziej grupa AB. Około 17% populacji Polaków to osoby z grupą Rh^- .



Ryc. 3. Częstość występowania grup krwi w Polsce (układ ABO i Rh)

Układ Kell

Układ grupowy krwi Kell został opisany w 1946 roku i nazwany na cześć pani Kelleher, której nowonarodzone dziecko zmarło z powodu choroby hemolitycznej spowodowanej obecnością przeciwciał przeciwko jego czerwonym krwinkom (RBC). Przeciwciała to reagowało również z krwinkami czerwonymi jej córki i męża i zostało nazwane anty-K. Później, w 1949 roku, odkryto jego antygen k. Odkrycie to było przełomowe i ujawniło kolejny ważny układ grupowy krwi (po ABO i Rh). Antygeny Kell są drugie pod względem znaczenia po antygenach ABO i Rh, jeśli chodzi o wywoływanie reakcji poprzetoczeniowych i konfliktu serologicznego.

Układ grupowy krwi Kell składa się z 28 antygenów kodowanych przez geny KEL zlokalizowane na chromosomie 7 (locus: 7q33). Antygeny te są glikoproteinami i występują nie tylko na powierzchni krwinek czerwonych, ale także na komórkach wielu innych tkanek, np. śledziony, mózgu, tkance mięśniowej, czy nabłonku plemnikotwórczym. Znaczenie kliniczne mają tylko antygeny K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb. Najbardziej immunogeny (silnie stymuluje układ odpornościowy do produkcji przeciwciał) jest antygen K (KEL1), obecny tylko u ok. 9% populacji europejskiej. W etnicznej grupie arabskiej jest

go ok. 25%, ale we wschodniej Azji i Afryce jest bardzo rzadki. Przeciwciała anti-K najczęściej powstają u osób z grupą Kell-ujemną, które otrzymały krew Kell-dodatnią. Osobom k (KEL2), czyli Kell-ujemnym, można przetaczać tylko krew k (KEL2), czyli Kell-ujemną. Przyjęta w transfuzjologii zasada mówi, że krwi k (KEL1) pozytywnej nie przetacza się.

Dziedziczenie układów grupowych

Dziedziczenie w układzie AB0

Grupa krwi układu ABO i układu Rh jest uwarunkowana genetycznie i nie zmienia się w trakcie życia osobniczego. Zmiana grupy krwi może nastąpić, ale nie musi, po przeszczepieniu szpiku kostnego (od rodzeństwa lub dawcy niespokrewnionego). W tym przypadku nowy szpik wytwarza krwinki czerwone z obecnymi na ich powierzchni antygenami dawcy. Geny układu ABO znajdują się na chromosomie 9 na jego długim ramieniu (locus 9q34). Występują w postaci trzech alleli I^A I^B i^0 . Grupy krwi A i B dziedziczy się w sposób dominujący. Zgodnie z przedstawioną poniżej tabelą każdy rodzic przekazuje potomkowi gen (allel) kodujący enzym o ściśle określonej swoistości, co prowadzi do określonej grupy krwi u potomka.

Tabela 2. Dziedziczenie grup krwi układu AB

| Grupa krwi matki | Grupa krwi ojca | | | |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|-------------|
| | O | A | B | AB |
| O | O | O lub A | O lub B | A lub B |
| A | O lub A | O lub A | O, A, B lub AB | A, B lub AB |
| B | O lub B | O, A, B lub AB | O lub B | A, B lub AB |
| AB | A lub B | A, B lub AB | A, B lub AB | A, B lub AB |

W przypadku, gdy potomek posiada grupę krwi A (lub B) wiadomo, że co najmniej jeden z rodziców miał tą grupę krwi i przekazał odpowiedni gen odpowiedzialny za jej powstanie. W sytuacji, gdy mamy do czynienia

z potomkiem z grupą krwi AB każde z rodziców musiało mieć cechę A lub B (czyli grupę A, B albo AB). W tym przypadku doszło do zjawiska kodominacji tj., kiedy jeden i drugi allel mają taki sam udział w tworzeniu fenotypu. W przypadku grupy O widać wyraźnie, że cecha jest dziedziczona w sposób recesywny. Tylko dziedziczenie od obojga rodziców po jednej kopii genu kodującego nieaktywne białko spowoduje, że cecha ta ujawni się u danego osobnika. Charakterystyczny brak możliwości przyłączenia cukru u osobników z grupą krwi O jest wynikiem mutacji w eksonie 6 genu ABO.

Wybrane mutacje w genie ABO

Cis AB jest rzadką odmianą grupy krwi AB. W wyniku mutacji powstaje tylko jeden enzym glikozylotransferazy (transferaza o swoistości cis AB), który posiada podwójną aktywność charakteryzującą się tym, że może tworzyć oba typy antygenów jednocześnie zarówno A jak i B. Osoba, która posiada taki gen będzie miała grupę krwi AB, ale wbrew regułom dziedziczenia Mendla może ją odziedziczyć tylko po jednym z rodziców. Częstość występowania transferazy cis AB w Europie wynosi 1:10 000. W Azji Wschodniej, szczególnie w Korei grupa krwi cis AB jest najczęstszą podgrupą grupy krwi AB. Ryzyko nieprawidłowego typowania grupy krwi w tym przypadku może wiązać się z ryzykiem niebezpiecznych reakcji przy transfuzji.

Podgrupa A2 wyodrębniona z grupy A. Powstaje w wyniku delecji jednego nukleotydu w końcowym fragmencie genu kodującego enzym o swoistości A. Zmiana ta prowadzi do wydłużenia enzymu o 21 reszt aminokwasowych i powstanie dodatkowego "ogona" w strukturze enzymu. Na skutek tych zmian aktywność jego zmniejsza się o 50%. Konsekwencją tego jest powstanie krwinek czerwonych z mniejszą ilością cząsteczek N-acetylogalaktozaminy na ich powierzchni, czyli liczba antygenów A jest obniżona. Podgrupa A2 stanowi około 20% ludzi z grupą krwi A.

Fenomen bombajski, fenotyp Bombay (O_h lub ABH_{null}) charakteryzuje się występowaniem grupy krwi O pomimo obecności genów układu ABO

odpowiedzialnych za powstawanie grup A i B. W osoczu osób z fenotypem Bombay występują przeciwciała anty-A i anty-B oraz przeciwciała anty-H. Mutacja w genie FUT1 (brak fukozylotransferazy 1) powoduje brak możliwości przyłączenia fukozy do łańcucha polisacharydowego. W następstwie tych zmian transferaza ABO nie może przyłączyć ani N-acetylogalaktozaminy ani galaktozy co skutkuje zarówno brakiem antygeny A jak i B na powierzchni krwinek czerwonych. Po raz pierwszy fenotyp ten opisał w 1952 roku dr Y.M. Bhende pracujący w Bombaju w Indiach. Fenotyp Bombay bardzo rzadko występuje w Europie. Częste przypadki tego fenotypu występują w populacji mieszkańców Indii i wyspy Reunion na Oceanie Indyjskim, zwłaszcza w tamilskiej grupie etnicznej (1:7600). Obecność w surowicy krwi regularnych przeciwciał anty-A, anty-B oraz anty-H u osób z fenotypem Bombay powoduje, że nie mogą być one biorcami krwi innej niż o fenotypie Bombay. Stwarza to ogromne problem, w sytuacji konieczności przetoczenia u tych pacjentów zgodnej grupowo krwi, z powodu rzadkości jej występowania

Dziedziczenie w układzie Rh

Dziedziczenie w układzie Rh opiera się na dominacji allelu dodatniego (D) nad recesywnym ujemnym (d), co oznacza, że osoby Rh⁺ mają genotyp DD lub Dd, a osoby Rh⁻ mają dd. Każdy rodzic przekazuje dziecku jeden allel, a kombinacja genotypów rodziców decyduje o możliwych grupach Rh u dziecka: jeśli oboje rodzice mają Rh⁻, dziecko zawsze będzie Rh⁻. W przypadku rodziców Rh⁺ lub Rh⁺/Rh⁻, dziecko może mieć grupę Rh⁺ lub Rh⁻.

Tabela 3. Dziedziczenie grup krwi układu Rh

| Rodzic | DD (Rh+) | Dd (Rh+) | dd (Rh-) |
|----------|-----------------|---------------------------------|-----------------------|
| DD (Rh+) | DD (Rh+) | DD lub Dd (Rh+) | Dd (Rh+) |
| Dd (Rh+) | DD lub Dd (Rh+) | DD lub Dd (Rh+) lub dd (Rh-) | Dd (Rh+) lub dd (Rh-) |
| dd (Rh-) | Dd (Rh+) | Dd (Rh+) lub dd (Rh-) | Dd (Rh-) |

Konflikt serologiczny

Konflikt serologiczny jest wynikiem reakcji immunologicznej pomiędzy przeciwciałami matki skierowanymi przeciwko obcym antygenom krwinkowym płodu. Przeciwciała przechodzą przez łożysko do krążenia płodowego i tam wywołują chorobę hemolityczną płodu. Jej głównym objawem jest niedokrwistość, która z kolei powoduje niedotlenienie wewnątrzmaciczne, a w dalszym etapie – uszkodzenie tkanek, narządów, obrzęk uogólniony, a w skrajnie niekorzystnych sytuacjach nawet zgon dziecka. Konflikty serologiczne mogą dotyczyć wielu układów, ale istotne klinicznie są Rh, ABO i Kell.

Konflikt serologiczny w układzie ABO

Różnice w grupach krwi układu ABO stwierdza się u około 25% ciąż, natomiast do konfliktu serologicznego dochodzi w około 10% przypadków. Konflikt w obrębie tego układu ma zdecydowanie łagodniejszy przebieg niż spowodowany niezgodnością w układzie Rh. Wynika to głównie z niewielkiej liczby antygenów układu ABO na powierzchni erytrocytów płodu. Ponadto antygeny ABO występują na powierzchni komórek różnych tkanek oraz w formie rozpuszczalnej w płynach biologicznych, co neutralizuje przeciwciała anti-A

i anti-B oraz zmniejsza szansę związania się z antygenami na powierzchni erytrocytów. Klinicznie konflikt serologiczny w układzie ABO charakteryzuje się przedłużoną do kilku tygodni żółtaczką noworodków.

Konflikt serologiczny w układzie Rh

Konflikt serologiczny w zakresie Rh występuje, gdy matka ma krew Rh⁻, a dziecko dziedziczy po ojcu grupę Rh⁺, co prowadzi do wytworzenia przez organizm matki przeciwciał niszczących krwinki płodu, powodując chorobę hemolityczną noworodków (anemię, żółtaczkę) lub nawet obumarcie płodu. Jednak dzięki profilaktyce (podawaniu immunoglobuliny anti-D) można skutecznie zapobiegać tym powikłaniom.

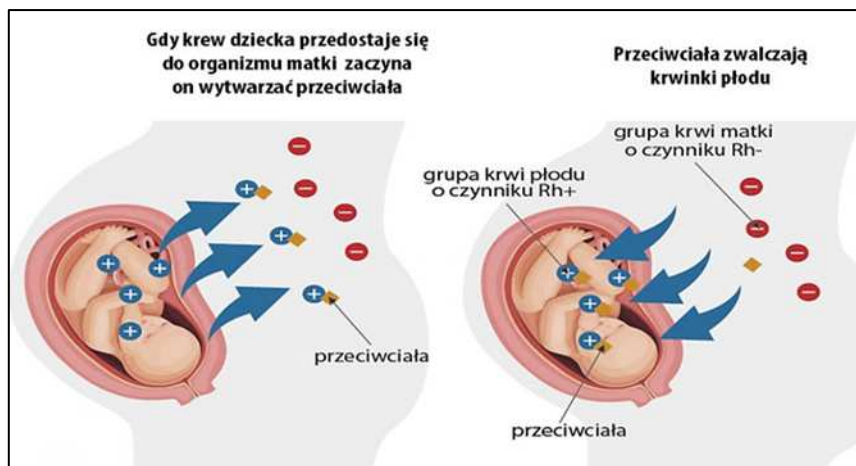
Wytwarzanie przeciwciał anti-RhD jest wywołane immunizacją, która może mieć miejsce w wyniku przeniknięcia krwinek płodu do krwiobiegu matki. Zjawisko takie zachodzi zwykle w 28.–30. tygodniu prawidłowo przebiegającej ciąży, zaś intensywność odpowiedzi układu odpornościowego matki zależy od ilości antygenów (erytrocytów płodu), które dostały się do jej krwiobiegu. Dlatego ryzyko immunizacji znacząco wzrasta w przypadku przedłużonego lub powikłanego porodu, poronienia, ciąży pozamacicznej, ręcznego wydobycia łożyska lub cięcia cesarskiego. Wytwarzanie przeciwciał stymuluje również każda kolejna ciąża. Do immunizacji może również dojść w wyniku przetoczenia krwi Rh⁺ osobie z grupą krwi Rh⁻, czy stosowania wspólnych igieł i strzykawek.

Odpowiedź na antygen RhD rozwija się powoli, dlatego do konfliktu serologicznego bardzo rzadko dochodzi w pierwszej ciąży. Po przeniknięciu krwinek czerwonych płodu do organizmu matki są one niszczone przez komórki odpowiedzi nieswoistej, a ich antygeny są prezentowane i rozpoznawane przez limfocyty B. W ciągu 5–15 tygodni wytwarzane są przeciwciała klasy IgM, które jednak nie przechodzą przez łożysko. Dopiero po okresie około 6–40 tygodni ma miejsce przełączenie klasy przeciwciał na IgG, które mają zdolność przenikania przez barierę łożyskową. W krwiobiegu płodu wiążą one erytrocyty,

które są niszczone głównie w mechanizmie hemolizy pozanaczyniowej. Dodatkowo uwalniana w dużych ilościach ze niszczonych erytrocytów hemoglobina jest metabolizowana do bilirubiny, która przenikając barierę krew-OUN może się kumulować w komórkach nerwowych pnia mózgu oraz jąder podstawy, prowadząc do ich trwałego uszkodzenia.

Diagnostyka konfliktu serologicznego opiera się na:

- oznaczeniu grupy krwi oraz czynnika Rh u matki i ojca dziecka do 10 tygodnia ciąży
- oznaczeniu przeciwciał anti-RhD we krwi ciężarnej kobiety. Dodatni wynik badania w I trymestrze przemawia za obecnością przeciwciał, które powstały w poprzedniej ciąży. Pojawienie się przeciwciał w kolejnych badaniach lub wzrost ich ilości świadczy o tym, że płód ma grupę Rh+
- przeprowadzeniu dokładniejszych badań prenatalnych w przypadku narastania ilości przeciwciał anti-RhD lub przebytej choroby hemolitycznej w poprzednich ciążach
- oznaczeniu grupy krwi płodu i czynnika Rh w krwi z żyły pępowinowej oraz ocena stopnia uszkodzenia krwinek płodu



Ryc. 7. Geneza hemolitycznej choroby płodu i noworodka (HDFN) spowodowanej konfliktem serologicznym w układzie Rh

Źródło: https://zdrowegeny.pl/poradnik/konflikt-serologiczny-zagrozeniem-zycia-plodu-noworodka?srsltid=AfmBOoqdQ38PfBqNoydE5R3zJjy0LFrs1ZS_VXMDzWITNzgxegVSRVPL

Konflikt serologiczny w układzie Kell

Konflikt serologiczny w układzie Kell może wystąpić, kiedy matka ma fenotyp k (KEL2), a ojciec K (KEL1). Dziecko ma wtedy 50% szans na odziedziczenie fenotypu K (KEL1). Cały proces przebiega analogicznie jak w przypadku grupy Rh. Przebieg pierwszej ciąży na ogół jest prawidłowy. Natomiast wytworzone podczas pierwszej ciąży przez matkę przeciwciała rozpoznające antygen K (KEL1) w następnej mogą już zniszczyć krwinki płodu. Częstość alloimmunizacji antygenami należącymi do układu Kell wynosi około 1:1000 ciąż. W takim przypadku jedyną terapią są transfuzje wymienne (wymiana całej krwi dziecka), które często stosuje się jeszcze przed urodzeniem dziecka. Dość często zdarzają się przypadki śmierci noworodków w wyniku konfliktu serologicznego w obrębie układu grupowego Kell.

Zasady krwiolecznictwa

W krwiolecznictwie stosuje się krew pełną konserwowaną, koncentrat krwinek czerwonych, koncentrat płytek krwi, koncentrat granulocytarny oraz preparaty osocza, zawierające między innymi czynniki krzepnięcia. Podanie gotowych składników krwi jest jednak rozwiązaniem doraźnym, stosowanym na ratunek życia. Decyzja dotycząca toczenia krwi jest podejmowana na podstawie oceny stanu klinicznego pacjenta oraz wyniku badania morfologii krwi obwodowej. Przetaczanie krwi i jej składników jest często wykonywanym zabiegiem jednak muszą być zachowane odpowiednie wskazania do transfuzji ściśle określone w przepisach. Przetaczanie krwi może być prowadzone wyłącznie w warunkach szpitalnych ze względu na bezpieczeństwo pacjenta.

Rozdział 6.

Mutacje i genetyka populacyjna w medycynie

Cel ćwiczeń:

- Zrozumienie rodzajów zmienności organizmów oraz ich uwarunkowań genetycznych i środowiskowych
- Poznanie mechanizmów powstawania mutacji genowych, chromosomowych i genomowych
- Omówienie czynników mutagennych o charakterze chemicznym i fizycznym
- Rozróżnienie systemów naprawy DNA oraz ich znaczenia dla stabilności genomu
- Zrozumienie metod cytogenetycznych i molekularnych stosowanych w diagnostyce chorób genetycznych
- Analiza podstawowych pojęć z genetyki populacyjnej, w tym puli genów oraz równowagi Hardy'ego-Weinberga
- Praktyczne zastosowanie prawa Hardy'ego-Weinberga do obliczeń częstości alleli i genotypów
- Poznanie znaczenia mutacji i zmienności genetycznej w kontekście medycznym i ewolucyjnym

Zmienność organizmów to występowanie różnic między osobnikami tego samego gatunku, dotyczących cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. Zmienność może mieć charakter modyfikacji, kiedy obserwowany fenotyp wiąże się z cechami niedziedzicznymi zależnymi od środowiska. Nie dochodzi wówczas do zmian w DNA a zmienność jest przejawem plastyczności fenotypowej organizmu. Zmienność dziedziczna wynika ze zmian w materiale genetycznym i przekazywana jest potomstwu.

Zmienność dziedziczna powstaje poprzez dwa główne mechanizmy:

1. Zmienność rekombinacyjną, wynikającą z:

- crossing-over
- niezależnej segregacji chromosomów
- losowego łączenia gamet
- losowego doboru partnerów

2. Zmienność mutacyjną, powstającą wskutek:

- mutacji spontanicznych
- działania mutagenów

Mutacje mogą być korzystne, dla organizmu, ponieważ zwiększając jego zdolność do przeżycia w określonym środowisku stanowią podstawowy materiał dla doboru naturalnego. Neutralne mutacje nie zmieniają fenotypu i często dotyczą odcinków niekodujących lub mutacji synonimicznych. Niekorzystne działanie mutacji powoduje obniżenie żywotności lub prowadzi do rozwoju chorób (mutacje subletalne i letalne).

Klasyfikacja mutacji:

Genowe (punktowe) – zmiany pojedynczych nukleotydów lub małych fragmentów DNA. Zmiany sekwencji DNA w obrębie pojedynczego genu mogą powstawać na skutek:

1. Substytucji

- Tranzycje – puryna ↔ puryna lub pirymidyna ↔ pirymidyna, powstają m.in. wskutek tautomeryzacji zasad
- Transwersje – puryna ↔ pirymidyna; mogą wynikać z błędów naprawy uszkodzeń (np. dimerów pirymidynowych)

2. Insercji i delecji

Powstają wskutek dodania lub utraty nukleotydu. Mogą być indukowane przez czynniki interkalujące, które zaburzają replikację DNA. Skutkiem są zmiany długości nici lub przesunięcie ramki odczytu.

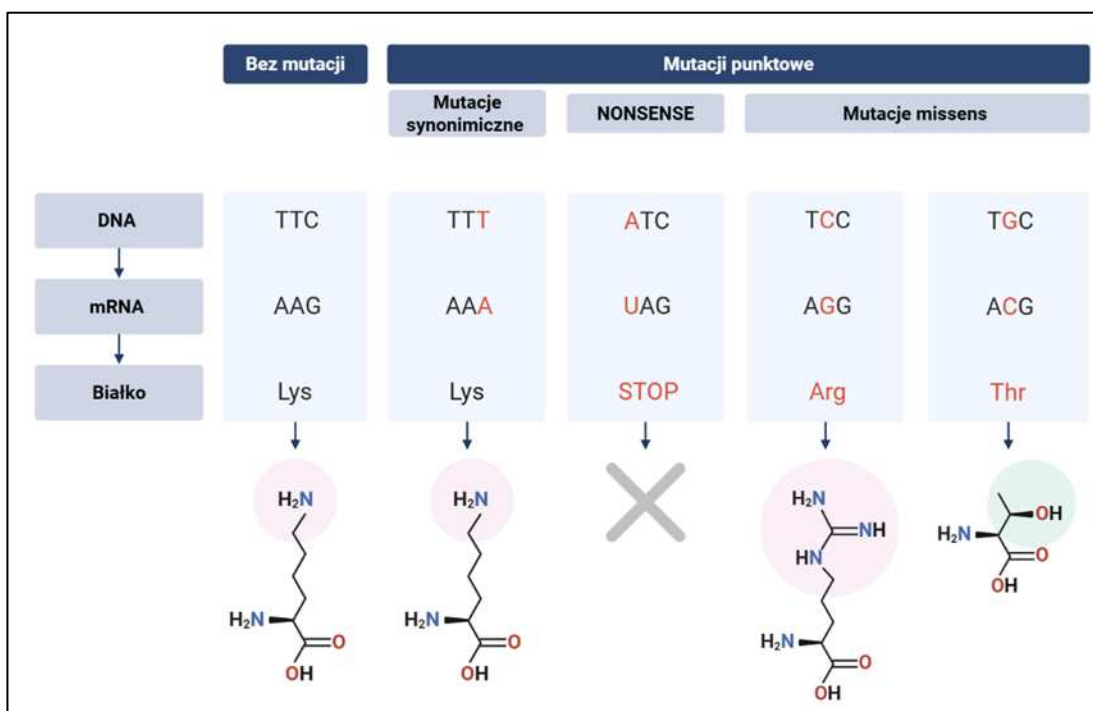
Efektami mutacji punktowych mogą być:

Mutacje synonimiczne (ciche) – zmiana kodonu nie zmienia aminokwasu.

Mutacje missense (zmiany sensu) – zamiana aminokwasu na inny; może zmieniać właściwości i funkcję białka.

Mutacje nonsense – powstanie kodonu STOP, prowadzące do przedwczesnego zakończenia translacji.

Ominięcie kodonu STOP – kodon terminacyjny zostaje zastąpiony kodonem kodującym aminokwas, co prowadzi do wydłużenia białka.



Ryc. 1. Schemat pokazujący efekty mutacji punktowych BioRender obraz zmodyfikowany

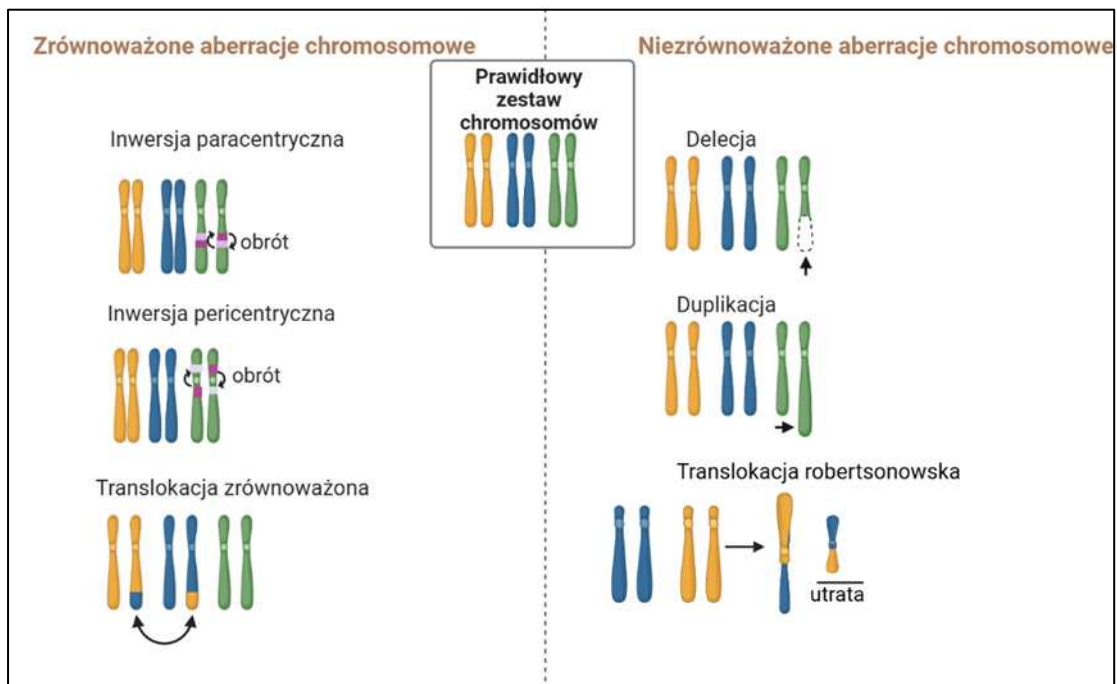
Chromosomowe – zmiany struktury chromosomów to zmiany w budowie chromosomów, które dotyczą utraty, przemieszczenia lub reorganizacji ich fragmentów. Mutacje strukturalne mogą być: zrównoważone tzn. nie powodować

utraty materiału genetycznego. Są wówczas zwykle bezobjawowe (np. inwersje, niektóre translokacje). Niezrównoważone aberracje chromosomowe powstają, gdy ogólna ilość materiału genetycznego jest nieprawidłowa (nadmiar lub ubytek genów). Prowadzą one do poważnych skutków klinicznych, np. wad rozwojowych, upośledzenia umysłowego, poronień.

Inwersja – to odwrócenie fragmentu chromosomu o 180° , powstające w wyniku dwóch złamań i ponownego połączenia odwróconego odcinka. Może prowadzić do tzw. efektu pozycji, czyli zmiany aktywności genów w nowym miejscu.

Wyróżnia się:

- inwersję paracentryczną – obejmuje jedno ramię, nie zawiera centromeru,
- inwersję pericentryczną – obejmuje oba ramiona, zawiera centromer.



Ryc. 2. Mutacje chromosomowe zrównoważone i niezrównoważone BioRender obraz zmodyfikowany

Translokacja – to przeniesienie fragmentu chromosomu na inny chromosom lub w inne miejsce tego samego.

- Translokacja wzajemna wymiana fragmentów między dwoma chromosomami; liczba chromosomów pozostaje prawidłowa, ale ich struktura się zmienia. Może powodować powstawanie gamet niezrównoważonych, prowadzących do delecji i duplikacji u zarodków
- Translokacja robertsonowska (fuzja centryczna) połączenie dwóch chromosomów akrocentrycznych w jeden duży chromosom z utratą krótkich ramion. Prowadzi do zaburzeń segregacji chromosomów w mejozie, zwiększając ryzyko trisomii lub monosomii

Duplikacja – polega na podwojeniu fragmentu chromosomu, który może znajdować się obok pierwotnego odcinka lub w innej lokalizacji na tym samym chromosomie.

Delecja – to utrata fragmentu chromosomu. Wyróżnia się:

- delecję terminalną ubytek końcowej części ramienia chromosomu
- delecję interstycjalną utrata fragmentu położonego w obrębie ramienia

Izochromosom – to niezrównoważona aberracja strukturalna, w której oba ramiona chromosomu są identyczne stanowią swoje lustrzane odbicie. Taka struktura powstaje na skutek jednoczesnej duplikacji jednego ramienia i utraty drugiego. W efekcie organizm ma dodatkową kopię niektórych genów (częściowa trisomia) oraz brak innych (częściowa monosomia), co prowadzi do zaburzenia równowagi genetycznej.

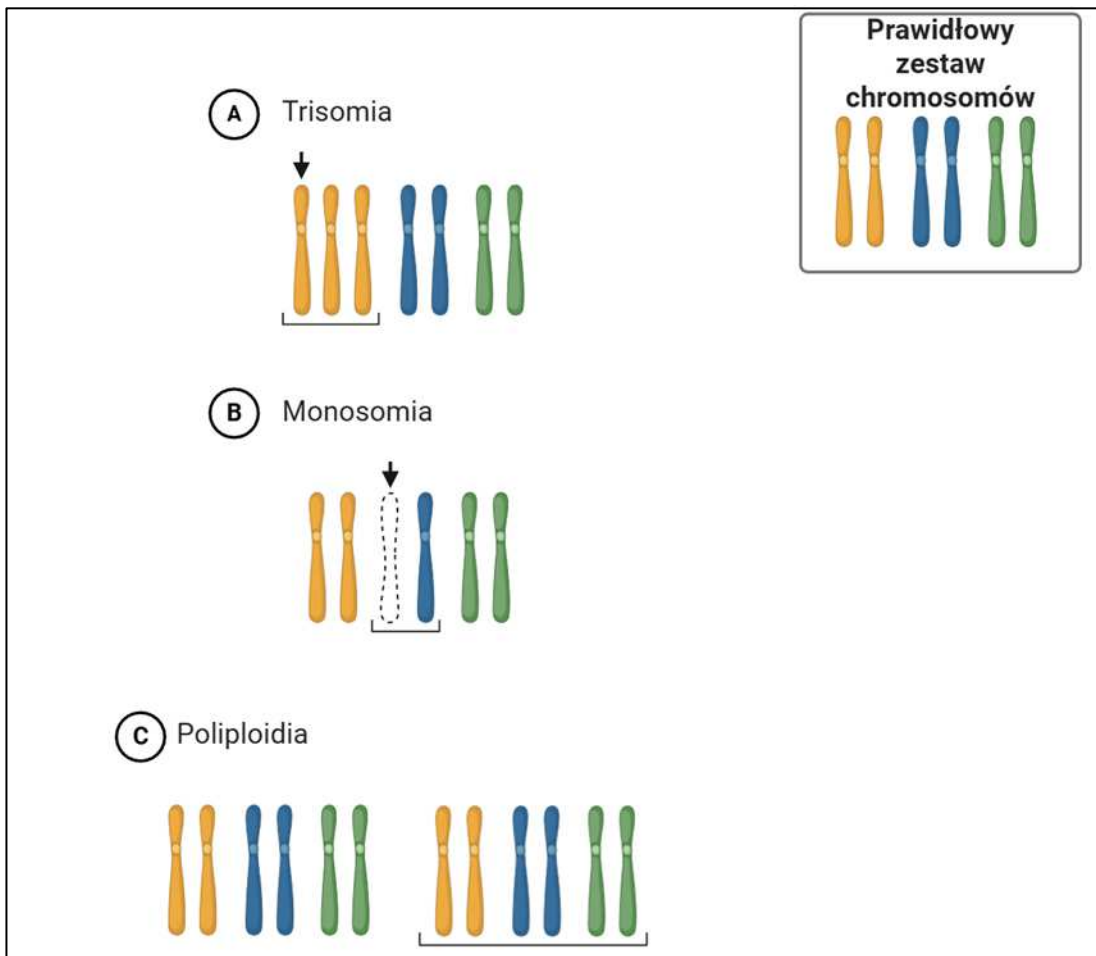
Chromosom pierścieniowy – powstaje w wyniku specyficznej delecji na końcach chromosomu, po czym końce jego ramion łączą się, tworząc strukturę w kształcie pierścienia. Proces ten zwykle wiąże się z utratą fragmentów materiału genetycznego z końcowych części ramion chromosomu. Taki chromosom oznacza się symbolem "r" wraz z numerem chromosomu w nawiasie, na przykład r(X) dla chromosomu X. Chromosomy pierścieniowe

są powiązane z różnymi schorzeniami genetycznymi u ludzi (chromosom pierścieniowy X może wywoływać zespół Turnera).

Genomowe – zmiany liczby genomów (poliploidie) oraz chromosomów (aneuploidie), dzielą się na dwie główne grupy: zmiany dotyczące liczby całych genomów (np. monoploidia — $1n$ oraz różne formy poliploidii — $3n$, $4n$ itd.) oraz zmiany obejmujące poszczególne chromosomy z danej pary homologicznej, czyli aneuploidie, takie jak monosomia ($2n-1$) czy trisomia ($2n+1$).

Poliploidia – to zmiana liczby całych genomów. Oznacza to, że zamiast typowego diploidalnego zestawu ($2n$), komórka zawiera więcej niż dwa pełne zestawy chromosomów. Do poliploidii dochodzi np. gdy komórka nie przejdzie cytokinezy po replikacji DNA, lub na skutek zapłodnienia jednej komórki jajowej przez dwa plemniki (polispermia). Może się też zdarzyć, że oocyt nie wydali ciała kierunkowego podczas mejozy i zachowa podwójny materiał genetyczny, co prowadzi do triploidii ($3n$) lub tetraploidii ($4n$) po zapłodnieniu. Poliploidia często skutkuje nieprawidłowym rozwojem zarodka, choć w niektórych tkankach (np. trofoblast, wątroba) występowanie komórek poliploidalnych jest fizjologiczne.

Aneuploidia – to zmiana liczby pojedynczych chromosomów. W wyniku takiej mutacji komórka zawiera jeden chromosom więcej lub mniej niż normalnie. Typowe przykłady to: monosomia ($2n-1$) brak jednego chromosomu z danej pary, oraz trisomia ($2n+1$) obecność dodatkowego chromosomu. Aneuploidia najczęściej powstaje w wyniku nondysjunkcji, czyli nierozdzielenia się chromosomów homologicznych podczas anafazy I mejozy lub chromatyd siostrzanych w anafazie II. Skutkiem jest powstanie gamet z nieprawidłową liczbą chromosomów. Po zapłodnieniu przez prawidłową gametę powstaje zarodek z aneuploidią. Aneuploidie mogą również powstawać po zapłodnieniu, w wyniku błędów mitozy w zarodku. Prowadzi to do mozaicyzmu, czyli obecności w jednym organizmie komórek o różnych zestawach chromosomów.



Ryc. 3. Mutacje genomowe BioRender obraz zmodyfikowany

Mutageny

Mutacje w DNA mogą pojawiać się spontanicznie, jako efekt błędów podczas replikacji, bądź być indukowane przez różnorodne czynniki chemiczne lub fizyczne, określane wspólnie jako mutageny.

Tabela. 1. Przykłady i mechanizm działania wybranych czynników mutagennych

| Grupa mutagenów | Podgrupa | Przykłady | Mechanizm działania | Typ powstających mutacji |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---|----------------------------------|
| chemiczne | Analogi zasad azotowych | 5-bromouracyl (5-BU) | Wbudowanie analogu zamiast tyminy; tautomeryzacja zmienia parowanie | Substytucje punktowe (tranzycje) |
| chemiczne | Deaminujące związki | Kwas azotowy (III) | Deaminacja C → U, A → hipoksantyna | Substytucje GC→AT |
| chemiczne | Hydroksylamina | Hydroksylamina | Modyfikacja cytozyny | C→T |
| chemiczne | Związki alkilujące | Etylonitrozomocznik, SMM | Alkilacja zasad; błędne parowanie | Tranzycje, transwersje |
| chemiczne | Interkalatory | Bromek etydyny | Wklinowanie między zasady DNA | Insercje, delecje, frameshift |
| fizyczne | Promieniowanie UV | UV-B, UV-C | Tworzenie dimerów pirymidynowych | Delecje, błędne parowanie |
| fizyczne | Promieniowanie jonizujące | X, gamma | Pęknięcia jednoniciowe i dwuniciowe DNA | Aberracje chromosomowe |
| fizyczne | Promieniowanie alfa/beta | Radon | Powstawanie wolnych rodników | Złamania chromosomowe |
| Fizyko-chemiczne | Wysoka temperatura | Ekstremalne ciepło | Depurynacja, miejsca AP | Substytucje, delecje |
| biologiczne | Wirusy | HPV, HBV | Integracja DNA wirusa | Insercje, aberracje strukturalne |
| biologiczne | Toksyny | Aflatoksyna B1 | Addukty z guaniną | G→T |

Naprawa uszkodzeń DNA

Aby zachować niezmienność sekwencji DNA kodujących geny, organizmy wykształciły różnorodne systemy naprawcze, które przeciwdziałają mutacjom powstającym wskutek działania wielu czynników uszkodzających. W organizmach nie istnieje jeden uniwersalny mechanizm naprawczy, który usuwałby wszystkie typy uszkodzeń. Zamiast tego funkcjonuje kilka specjalistycznych systemów, często o nakładającym się spektrum działania. Do najważniejszych systemów naprawczych należą:

- naprawa z wycięciem nukleotydu (NER – nucleotide excision repair). System NER usuwa uszkodzenia powodujące deformacje podwójnej

helisy, które blokują replikację i transkrypcję. Należą do nich dimery pirymidynowe, fotoprodukty 6–4, wiązania krzyżowe i duże addukty chemiczne. Mechanizm NER polega na rozpoznaniu uszkodzenia, wycięciu fragmentu nici (około 30 nukleotydów) z uszkodzonym obszarem oraz odtworzeniu fragmentu na podstawie nieuszkodzonej nici komplementarnej. W procesie bierze udział około 30 białek

- naprawa z wycięciem zasady (BER – base excision repair). Naprawa z wycięciem zasady (BER) BER odpowiada za usuwanie uszkodzeń pojedynczych zasad, zwłaszcza tych powstałych w wyniku utleniania lub innych modyfikacji chemicznych generowanych przez procesy metaboliczne i aktywne formy tlenu. System ten także naprawia jednoniciowe pęknięcia DNA. Uszkodzenia rozpoznają specyficzne glikozydazy DNA, które usuwają zmodyfikowaną zasadę i tworzą miejsce bez zasady (AP site). Następnie endonukleaza APE przecina łańcuch obok tego miejsca. Jeśli uszkodzenie powstało w wyniku np. promieniowania X, włącza się ono do szlaku BER. Polimeraza poli (ADP-rybozy) (PARP-1) aktywuje się w miejscach uszkodzeń i syntetyzuje rozgałęzione łańcuchy poli (ADP-rybozy), co prowadzi do lokalnego rozluźnienia chromatyny i ułatwia dostęp białek naprawczych
- naprawa bezpośrednia uszkodzeń ten typ naprawy jest rzadszy i polega na bezpośrednim przywróceniu prawidłowej struktury zmienionych nukleotydów bez konieczności usuwania fragmentów DNA. Przykładem takiego mechanizmu jest fotoreaktywacja, która usuwa dimery pirymidynowe powstałe pod wpływem promieniowania UV. Enzymy zwane fotoliazami, aktywowane światłem widzialnym, rozbijają wiązania powstałe podczas dimeryzacji, przywracając oryginalną strukturę zasad. Fotolazy występują u bakterii, organizmów eukariotycznych oraz roślin
- naprawa błędów parowania (MMR) MMR koryguje błędy powstałe podczas replikacji, takie jak błędne sparowanie zasad czy deaminacje.

System białek rozpoznaje nieprawidłowości, a następnie egzonukleaza wycina uszkodzony fragment, który jest uzupełniany przez polimerazę DNA

- naprawa pęknięć dwuniciowych Pęknięcia dwuniciowe naprawiane są poprzez dwie główne drogi rekombinacyjne: homologiczne (wykorzystuje nieuszkodzoną chromatydę siostrzaną lub chromosom homologiczny jako matrycę do naprawy uszkodzonego DNA), oraz niehomologiczne łączenie końców (bezpośrednio łączy dwa uszkodzone końce DNA)

Diagnostyka chorób genetycznych

Rodzaj testu genetycznego dobiera się w zależności od podejrzewanej zmiany genetycznej. Ich celem jest wykrycie zaburzeń w budowie chromosomów lub w sekwencji DNA. Testy cytogenetyczne umożliwiają analizę liczby i budowy chromosomów, głównie w stadium metafazy. Dzięki jej metodom można analizować cały kariotyp człowieka w poszukiwaniu zaburzeń odpowiedzialnych m.in. za niepłodność, poronienia czy wady wrodzone. W przypadku podejrzenia chorób monogenowych, gdzie zmiany dotyczą pojedynczych genów lub niewielkich fragmentów DNA, stosuje się testy molekularne. Służą one do wykrywania punktowych zmian w sekwencji nukleotydów, a ich wybór zależy od rodzaju mutacji oraz badanego genu.

Genetyka populacji

Genetyka populacji to dziedzina biologii zajmująca się analizą częstości alleli i genotypów w populacjach organizmów. Podstawową jednostką analizy w tej dziedzinie bywa tzw. „dem” lokalna, reprodukcyjnie aktywna grupa organizmów, która może, lecz nie musi pokrywać się z geograficznie określoną populacją. Przykładem demów są skupiska ludzkie zawierające związki małżeńskie zgodnie z kryteriami etnicznymi, religijnymi lub społecznymi. W świecie zwierząt

funkcję takich lokalnych jednostek mogą pełnić np. owady ograniczające swoje rozmnażanie do osobników zamieszkujących to samo drzewo.

Populacja jako całość dysponuje wspólnym zasobem materiału genetycznego, określanym mianem puli genów. Każdy osobnik posiada indywidualny zestaw alleli, lecz wywodzących się z tej samej wspólnej puli. Zmiany w składzie tej puli, czyli zmiany częstości występowania poszczególnych alleli, stanowią istotę procesów ewolucyjnych.

Równowaga Hardy’ego-Weinberga

Model matematyczny zaproponowany niezależnie przez G.H. Hardy’ego i W. Weinberga pozwala określić, częstość występowania w populacji określonych genotypów. Jeśli w badanej populacji rozród przebiega losowo, nie zachodzą mutacje, dobór naturalny nie faworyzuje żadnych genotypów, nie ma migracji, a każda kombinacja genów ma taką samą szansę na przekazanie informacji genetycznej potomstwu częstość genotypów jest zależna wyłącznie od częstości alleli i można je przewidzieć za pomocą równania:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

gdzie:

- p^2 to częstość homozygot dominujących (AA),
- $2pq$ – heterozygot (Aa),
- q^2 – homozygot recesywnych (aa).

W rzeczywistych populacjach wiele czynników może powodować odchylenia od oczekiwanych proporcji genotypów. Czynniki zakłócające równowagę Hardy’ego-Weinberga to:

- **Dobór naturalny** zmniejsza sukces reprodukcyjny lub przeżywalność nosicieli określonych genotypów
- **Migracje** wprowadzają nowe allele z innych populacji, zmieniając strukturę genetyczną

- **Nieprzypadkowy dobór partnerów** faworyzowanie podobnych lub różnych genotypów skutkuje przewagą homozygotyczności lub heterozygotyczności
- **Struktura populacji** obecność subpopulacji (np. lokalnych grup endogamicznych) prowadzi do wzrostu homozygotyczności
- **Mutacje** choć wprowadzają nowe allele, ich wpływ jest ograniczony przez niską częstość i selektywną eliminację mutacji szkodliwych
- **Dryf genetyczny** przypadkowe zmiany częstości alleli, szczególnie istotne w małych populacjach, mogą z czasem kumulować się i prowadzić do zauważalnych przesunięć

Pomimo, że populacje ludzkie nie spełniają wszystkich założeń, to równanie Hardy'ego-Weinberga jako prosty, dający dobre przybliżenia model, jest wykorzystywane do szacowania częstości nosicieli alleli odpowiedzialnych za ujawnienie się chorób genetycznych w populacji.

Przykładem może być oszacowanie jaki % populacji stanowią nosiciele alleli dla fenyloketonurii. Fenyloketonuria to choroba dziedziczona autosomalnie recesywnie. Częstość występowania homozygot recesywnych-ludzi chorych na Fenyloketonurię – wynosi około 1 na 10 000 urodzeń.

częstość homozygot recesywnych (aa) = $q^2 = 1/10\ 000 = 0,0001$

$$q = \sqrt{0,0001} = 0,01$$

W jednym locus u organizmów $2n$ istnieją tylko dwa allele:

- A – allele dominujący (jego częstość to p)
- a – allele recesywny (jego częstość to q)

zatem $p + q = 1$

$$p = 1 - 0,01 = 0,99$$

Nosiciele to heterozygoty (Aa) = $2pq$

$$2pq = 2 \cdot 0,99 \cdot 0,01 = 0,0198$$

$$0,0198 \approx 2\%$$

Zgodnie z równaniem nosiciele (heterozygoty) stanowią około 2% populacji (dokładnie 1,98%). Zatem liczba nosicieli jest znacznie większa niż liczba chorych homozygot recesywnych.

Spis rycin

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Rozdział 1.

| | |
|--|----|
| Ryc. 1. Budowa mikroskopu | 15 |
| Ryc. 2. Formy skupisk bakterii (https://pl.wikipedia.org/wiki/Kszta%C5%82t_bakterii-) .. | 17 |
| Ryc. 3. Schemat budowy komórki bakteryjnej https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5ffdfb47420acf00a02c5e53-structural-overview-of-a-bacterial-cell – modyfikacja autora | 18 |
| Ryc. 4. Różnice pomiędzy bakteriami: a. G (-) i b. G (+) https://app.biorender.com/illustrations/686c20542cc776c057cec695 – modyfikacja autora | 20 |
| Ryc. 5. Schemat barwienia Grama; utworzono w BioRender.com..... | 21 |
| Ryc. 6. Schemat budowy jednostki LPS. Obraz zmodyfikowany z BioRender.com..... | 23 |
| Ryc. 7. Porównanie wielkości wirusów, bakterii, drożdży i komórek człowieka https://microbeonline.com/size-of-bacteria/ | 27 |
| Ryc. 8. Pałeczka duru (Salmonella Typhi) – różne powiększenia: a. 120×; b. 480×; c. 1200×. Strzałki wskazują obecne w polu widzenia artefakty | 28 |
| Ryc. 9. Instrukcja wykonania rysunku obrazu oglądanego pod mikroskopem..... | 29 |
| Ryc. 10. Etapy przygotowania preparatu w kropli spłaszczonej | 30 |

Rozdział 2.

| | |
|---|----|
| Ryc. 1. Klasyfikacja utrwalaczy | 32 |
| Ryc. 2. Struktury chemiczne hematoksyliny i eozyny | 34 |
| Ryc. 3. Fot. Komórki nabłonka sześciennego tarczycy – widać wybarwione na kolor fioletowy jądro komórkowe – a, oraz różowo zabarwioną cytoplazmę – b. Powiększenie × 480 | 35 |
| Ryc. 4. Różnice w wyglądzie preparatu oraz komórek tkanki mięśniowej szkieletowej wynikające z różnego sposobu przygotowania preparatu | 36 |
| Ryc. 5. Dokumentacja rysunkowa preparatu tkanki mięśnia gładkiego z uwzględnieniem cech charakterystycznych: kształtu komórek i jądra komórkowego..... | 37 |
| Ryc. 6. Nabłonek walcowaty jelita. Obraz pod mikroskopem 480× | 38 |
| Ryc. 7. Rodzaje nabłonek; utworzone w BioRender.com..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Ryc. 8. Obraz spod mikroskopu 3 typy tkanki nabłonkowej z zaznaczonymi charakterystycznymi cechami dla funkcji poszczególnych tkanek. Powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe. a. Nabłonek, wielowarstwowy, płaski rogówki – komórki wydłużone, leżą w wielu warstwach ściśle do siebie przylegają, duże, spłaszczone jądro komórkowe, b. nabłonek, jednowarstwowy, sześcienny tarczycy – komórki ściśle przylegają, owalne jądro komórkowe zajmuje prawie całą komórkę, która na przekroju przypomina kształtem kwadrat, c. nabłonek wielowarstwowy skóry – wiele warstw ciasno ułożonych komórek..... | 41 |
| Ryc. 9. Linia komórkowa HaCaT (Cytion) jako przykład często wykorzystywanej linii komórkowej w badaniach naukowych; a. obraz w mikroskopie stereoskopowym kontrastowo-fazowym, b. obraz w mikroskopie fluorescencyjnym w celu wizualizacji struktur komórkowych; Niebieski kolor – jądra komórkowe przy użyciu DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), który wiąże się z DNA; Zielony kolor – cytoszkielet (Phalloidyna sprzężona z fluorochromem np. FITC) – wiąże się z filamentami aktynowymi. https://www.cytion.com/pl/Komorki-HaCaT/300493 | 43 |
| Ryc. 10. Schemat budowy włókna mięśniowego. Tkanka mięśniowa charakteryzuje się wyraźnym poprzecznym prążkowaniem widocznym w mikroskopie świetlnym, wynikającym z regularnego układu miofilamentów cienkich i grubych i różnego przechodzenia światła przez te struktury. Te charakterystyczne odcinki zwane prążkami występują w obrębie sarkomeru. Wyróżnia się prążki: I, A, H, M, Z, które poza aktyna i miozyna są zbudowane ze specyficznych białek, m.in. α-aktynina, desmina, białka M i C, nebulina. Obraz z BioRender zmodyfikowany | 45 |
| Ryc. 11. Schemat mechanizmu skurczu mięśnia. Obraz z BioRender zmodyfikowany..... | 46 |
| Ryc. 12. Rodzaje miofilamentów..... | 47 |
| Ryc. 13. Kardiomiocyty obraz spod mikroskopu powiększenie ×480 i schemat budowy komórek mięśnia serca. Obraz schematu z BioRender zmodyfikowany..... | 48 |
| Ryc. 14. Obraz pod mikroskopem tkanki mięśniowej szkieletowej powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim, jądro komórkowe, a. i mięśniowej gładkiej b. z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi; Mięśnie szkieletowe: widoczne poprzeczne prążkowanie, wielojądrzaste komórki ułożone równolegle. Mięśnie gładkie: jednorodne, wrzecionowate komórki z centralnym jądrem, brak prążkowania | 50 |
| Ryc. 15. Obraz pod mikroskopem tkanki tłuszczowej powiększenie 480×; białym kolorem oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe, żółtym kropki lipidów a. tkanka tłuszczowa brunatna b. tkanka tłuszczowa żółta z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi | 55 |
| Ryc. 16. Obraz pod mikroskopem tkanki chrzęstnej, powiększenie ×480; białym kolorem – oznaczono błonę komórkową, niebieskim – jądro komórkowe, pomarańczowym – jamkę chrzęstną; a. chondrocyty tkanki chrzęstnej szklistej; b. chondrocyty tkanki chrzęstnej sprężystej z zaznaczonymi cechami charakterystycznymi | 58 |
| Ryc. 17. Rodzaje i funkcje komórek tkanki kostnej..... | 60 |
| Ryc. 18. Budowa osteonu. Obraz pod mikroskopem tkanki kostnej zbitej z widocznymi osteonami. Schemat budowy osteonu BioRender – obraz zmodyfikowany..... | 61 |
| Ryc. 19. Klasyfikacja elementów morfotycznych krwi | 66 |

- Ryc. 20. Schematyczny obraz (cytogram) rozkładu elementów morfotycznych krwi w zależności wielkości komórek FSC (ang. forward scatter channel – rozproszenie przednie) i obecności ziarnistości SSC (ang. side scatter channel – rozproszenie boczne) uzyskany w cytometrze przepływowym. Źródło: Stachurska A., Fabijańska-Mitek J. „Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunohematologicznej ocenie krwinek czerwonych”. *Postępy Nauk Medycznych* 7/2012, 583–588.....66
- Ryc. 21. Przykładowe linie komórkowe często wykorzystywane w badaniach naukowych; obraz w mikroskopie kontrastowo-fazowym; a. NHDF – Normal Human Dermal Fibroblast (PromCell) promocell.com/us_en/normal-human-dermal-fibroblasts-nhdf.html; b. THP-1 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-THP-1/300356; c. 3T3-L1 (Cytion) cytion.com/pl/komorki-3T3-L1/400107.....69
- Ryc. 22. Budowa neuronu: Ciało komórki nerwowej (perikarion) – zawiera jądro komórkowe oraz organelle niezbędne do funkcjonowania komórki. Ciało komórki nerwowej jest zazwyczaj owalne lub nieregularne. Dendryty – rozgałęzione wypustki cytoplazmatyczne, które odbierają bodźce z innych komórek nerwowych lub receptorów sensorycznych. Akson – pojedyncza, długa wypustka osiowa komórki nerwowej, która przewodzi impulsy nerwowe od ciała komórki do innych neuronów lub efektorów (np. mięśni, gruczołów). Akson może być otoczony osłonką mielinową, co przyspiesza przewodzenie impulsów. Komórki Schwanna (lemocyty) – odpowiedzialne za wytwarzanie mieliny w obwodowym układzie nerwowym. Każda komórka Schwanna tworzy osłonkę mielinową wokół jednego aksonu. BioRender – obraz zmodyfikowany.....70
- Ryc. 23. Komórki glejowe OUN: Astrocyty – komórki o gwiazdzistym kształcie (liczne wypustki), które pełnią rolę w utrzymaniu homeostazy jonowej, regulacji przepływu krwi w mózgu, odżywianiu oraz ochronie neuronów przed toksynami; Oligodendrocyty – komórki, które w ośrodkowym układzie nerwowym wytwarzają mielinę, tworząc osłonki mielinowe wokół aksonów, co zwiększa szybkość przewodzenia impulsów nerwowych. Mikroglej (mezoglej) – komórki pełniące funkcję obronną, działając jako makrofagi w ośrodkowym układzie nerwowym, usuwając zniszczone komórki oraz patogeny BioRender – obraz zmodyfikowany71
- Ryc. 24. Przykładowe linie komórkowe wykorzystywane w badaniach naukowych z zakresu neurobiologii; obraz w mikroskopie kontrastowo-fazowym; a. PC12 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-PC-12/500311; b. C6 (Cytion) cytion.com/pl/Komorki-C6/50014272
- Ryc. 25. Rola procesu osmozy w organizmie.....73
- Ryc. 26. Istota procesu osmozy przez błonę półprzepuszczalną. a, b, c procesy zachodzące w erytrocytach znajdujących się w różnych roztworach. Proces osmoregulacji na przykładzie krwinek czerwonych. Utworzone w <https://BioRender.com>. Zaburzenia równowagi osmotycznej prowadzą do istotnych zaburzeń morfologicznych i czynnościowych krwinek. W środowisku hipotonicznym erytrocyty ulegają obrzękowi i hemolizie, natomiast w warunkach hipertonicznych dochodzi do ich odwodnienia, kurczenia się i utraty zdolności transportowych. Strzałki pokazują kierunek przepływu wody. BioRender – obraz zmodyfikowany74

Rozdział 3.

- Ryc. 1. Paskowy test moczu. Fot. Ajay Kumar Chaurasiya.....81
- Ryc. 2. Analiza mikroskopowa moczu, mikroskop świetlny, powiększenie 400×.....82

Rozdział 4.

| | |
|--|-----|
| Ryc. 1. Molekularny mechanizm powstawania objawów w anemii sierpowatej..... | 90 |
| Ryc. 2. Molekularny mechanizm powstawania objawów w fenyloketonurii | 92 |
| Ryc. 3. Uproszczony schemat metabolizmu fenyloalaniny z zaznaczonymi blokami enzymatycznymi powodującymi fenyloketonurię i albinizm | 95 |
| Ryc. 4. Schemat dziedziczenia hemofilii A – choroby sprzężonej z płcią. Rysunek zmodyfikowany za https://simple.wikipedia.org/wiki/Haemophilia | 96 |
| Ryc. 5. Schemat przedstawiający wzajemne relacje czynników w kaskadzie oraz powiązanie niedoboru czynników krzepnięcia ze skazą krwotoczną | 96 |
| Ryc. 6. Schemat przedstawiający procesy nieprawidłowego rozchodzenia się gamet podczas podziałów mejotycznych – nondysjunkcji oraz ich następstwa w tworzeniu gamet. BioRender – obraz zmodyfikowany..... | 103 |

Rozdział 5.

| | |
|--|-----|
| Ryc. 1. Cykl życiowy rzęsistka pochwowego (<i>Trichomonas vaginalis</i>) https://pl.wikipedia.org/wiki/Rz%C4%99sistek_pochwowy#/media/Plik:Trichomoniasis_01.png zmodyfikowana | 108 |
| Ryc. 2. Cykl życiowy świdorca gambijskiego (<i>Trypanosoma gambiense</i>) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_African_life_cycle_CDC.jpg modyfikowane..... | 110 |
| Ryc. 3. Świdrowce (<i>Trypanosomatidae</i>) strzałkami oznaczono postacie trypomastigota obecne w rozmazie krwi, obraz spod mikroskopu, powiększenie 480× | 110 |
| Ryc.4. Cykl życiowy zarodźców <i>Plasmodium</i> ssp. https://pl.wikipedia.org/wiki/Malaria#/media/Plik:Plasmodium-cykl-rozwojowy.jpg | 112 |
| Ryc. 5. Zarodziec pasmowy (<i>Plasmodium malariae</i>), strzałką oznaczono merozoit rozrywające krwinkę, obraz spod mikroskopu, powiększenie 480×..... | 112 |
| Ryc. 6. Cykl życiowy toksoplazmy (<i>Toxoplasma gondii</i>), (https://en.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii#/media/File:Toxoplasma_gondii_Life_cycle_PHIL_3421_lores.png modyfikowana)..... | 114 |
| Ryc. 7. Motyllica wątrobowa (<i>Fasciola hepatica</i>) przekrój poprzeczny, obraz spod mikroskopu powiększenie 120×..... | 116 |
| Ryc. 8. Cykl życiowy przywry krwi (<i>Schistosoma haematobium</i>) https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html modyfikowana | 118 |
| Ryc. 9. Przywra krwi (<i>Schistosoma haematobium</i>) przekrój poprzeczny. a. samiec, b. samica..... | 118 |
| Ryc. 10. Cykl życiowy włosogłówki ludzkiej https://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Trichuriasis_lifecycle.jpg modyfikowana | 120 |
| Ryc. 11. Cykl rozwojowy owsika ludzkiego (<i>Enterobius vermicularis</i>) https://www.cdc.gov/dpdx/enterobiasis/index.html | 121 |
| Ryc. 13. Cykl życiowy włośnia krętego (<i>Trichinella spiralis</i>) https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html | 123 |
| Ryc. 13.a. Włosień kręty (<i>Trichinella spiralis</i>) larwy w mięśniach. Obraz spod mikroskopu powiększenie 480×..... | 123 |

| | |
|--|-----|
| Ryc. 14. Cykl życiowy glisty ludzkiej (<i>Ascaris lumbricoides</i>) https://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Glista_ludzka.GIF | 125 |
| Ryc. 15. Glista ludzka (<i>Ascaris lumbricoides hominis</i>) przekrój poprzeczny. Widoczne przekroje przez jajnik i macicę oraz jelito. Obraz spod mikroskopu, powiększenie 120× | 125 |
| Ryc. 17. Jaja tasiemca. <i>Taenia</i> ssp., przekrój poprzeczny, powiększenie 120× | 127 |
| Ryc. 18. Cykl życiowy tasiemca uzbrojonego (<i>T. solium</i>) i nieuzbrojonego (<i>T. saginata</i>) https://pl.wikipedia.org/wiki/Tasiemiec_nieuzbrojony#/media/Plik:Taenia_solium_Life_cycle.tif modyfikowany..... | 129 |
| Ryc. 19. Przekrój przez cystę larwalną <i>Echinococcus</i> (torbiel bąblowcową, inaczej cystę hydatydową). Obraz z pod mikroskopa powiększenie 48×. Torbiel larwalna (cysta bąblowcowa) – cała centralna struktura, warstwa laminowana – zewnętrzna, gruba, różowa warstwa ściany torbieli, warstwa rozrodcza – cienka warstwa tuż pod warstwą laminowaną, Torebki lęgowo – wewnętrzne pofałdowane struktury w świetle torbieli..... | 130 |

CZEŚĆ TEORETYCZNA

Rozdział 1.

| | |
|---|-----|
| Ryc. 1. Porównanie mechanizmu powstawania obrazu i zastosowania różnych typów mikroskopów. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora..... | 171 |
| Ryc. 2. Ogólny schemat przygotowania preparatów mikroskopowych. W. Olejarz, opracowanie własne z wykorzystaniem ChatGPT (OpenAI)..... | 173 |
| Ryc. 3. Przykładowe obrazy mikroskopii fluorescencyjnej przedstawiające barwienie jąder komórkowych (DAPI), lipidów (Nile Red) oraz immunofluorescencję struktur subkomórkowych. Ilustracje mają charakter schematyczny i nie przedstawiają rzeczywistych danych eksperymentalnych. Opracowanie własne W. Olejarz z wykorzystaniem narzędzia ChatGPT (OpenAI)..... | 174 |
| Ryc. 4. Przykładowy diagram punktowy cytometrii przepływowej przedstawiający barwienie komórek Aneksyną V (FITC) i jodkiem propidyny (PI). Opracowanie własne W. Olejarz z wykorzystaniem narzędzia ChatGPT (OpenAI)..... | 175 |
| Ryc. 5. Wykorzystanie barwników do wykrywania lipidów. W. Olejarz, opracowanie własne z wykorzystaniem ChatGPT (OpenAI)..... | 176 |
| Ryc. 6. Komora Bürkera..... | 177 |
| Ryc. 7. Schemat wykonania testu MTT. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora..... | 178 |
| Ryc. 8. Interpretacja testu MTT a. zdjęcie płytki; Żywe, metabolicznie aktywne komórki redukują żółty MTT do fioletowego formazanu-im więcej żywych komórek, tym ciemniejszy fioletowy kolor w dołku. Jasny kolor lub jego brak oznacza małą liczbę żywych komórek lub ich obumarcie. b. schemat pokazujący sposób interpretacji testu: Fioletowy kolor – żywe komórki, Jasnożółty/ bezbarwny kolor – martwe komórki, Jasnopomarańczowy kolor – metabolicznie nieaktywne komórki | 180 |
| Ryc. 9. Schemat reakcji wykorzystywanych do testu żywotności komórek LDH..... | 181 |

| | |
|---|-----|
| Ryc. 10. Schemat przedstawiający etapy barwienia błękitem trypanu. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora | 182 |
| Ryc. 11. Etapy frakcjonowania komórek za pomocą wirowania różnicującego. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora | 183 |

Rozdział 2.

| | |
|---|-----|
| Ryc. 1. Porównanie procesów apoptozy i nekrozy. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora | 188 |
| Ryc. 2. Fazy cyklu komórkowego..... | 192 |
| Ryc. 3. Elementy regulujące procesy w czasie punktu kontrolnego | 193 |
| Ryc. 4. Punkty kontrolne cyklu komórkowego..... | 193 |
| Ryc. 5. Zmiany stężenia cyklin podczas cyklu komórkowego. W badaniach prowadzonych z wykorzystaniem różnych modeli organizmów wykazano, że podczas cyklu komórkowego dochodzi do cyklicznych zmian stężenia określonych białek regulatorowych, które nazwano cyklinami | 195 |
| Ryc. 6. Molekularne mechanizmy regulacji cyklu komórkowego w fazie G1 | 196 |
| Ryc. 7. Molekularne mechanizmy regulacji cyklu komórkowego w fazie G2..... | 197 |
| Ryc. 8. Schemat procesu skracania telomerów wraz z kolejnymi podziałami komórki. Obraz z BioRender z modyfikacjami własnymi autora | 199 |

Rozdział 3.

| | |
|---|-----|
| Ryc. 1. Schemat przedstawiający etapy oogenezy połączone z etapami podziału mejotycznego. Obraz BioRender – modyfikacja autora | 204 |
| Ryc. 2. Wczesne etapy rozwoju zarodka. Obraz z BioRender – modyfikacja autora..... | 207 |
| Ryc. 3. A. blastula; B. gastrula z wyodrębnionymi listkami zarodkowymi. Obraz z BioRender modyfikacja autora..... | 208 |
| Ryc. 4. Rola genu SRY w rozwoju jajników i jąder..... | 209 |
| Ryc. 5. Schemat przedstawiający mechanizm chromosomowej i gonadalnej determinacji płci..... | 210 |

Rozdział 4.

| | |
|--|-----|
| Ryc. 1. Krzyżówka Punnetta obrazująca rozkład genotypów 1:2:1 | 214 |
| Ryc. 2. Schemat pokazujący mechanizm dziedziczenia mendlowskiego. G-gen, cecha – fenotyp..... | 214 |
| Ryc. 3. Przykład informacji dotyczącej mukowiscydozy zawartej w OMIM. https://www.omim.org/ | 217 |
| Ryc. 4. Przykłady niemendlowskich modeli dziedziczenia cech: a. dziedziczenie plejotropowe, b. dziedziczenie wielogenowe i c. dziedziczenie epistatyczne..... | 219 |

Rozdział 5.

| | |
|---|-----|
| Ryc. 1. Przykład aglutynacji szkiełkowej..... | 225 |
| Ryc. 2. Schemat biochemicznej budowa antygenów układu ABO. Obraz z BioRender modyfikacja autora..... | 228 |
| Ryc. 3. Częstość występowania grup krwi w Polsce (układ ABO i Rh)..... | 232 |

| | |
|--|-----|
| Ryc. 7. Geneza hemolitycznej choroby płodu i noworodka (HDFN) spowodowanej konfliktem serologicznym w układzie Rh..... | 238 |
|--|-----|

Rozdział 6.

| | |
|---|-----|
| Ryc. 1. Schemat pokazujący efekty mutacji punktowych BioRender obraz zmodyfikowany | 242 |
| Ryc. 2. Mutacje chromosomowe zrównoważone i niezrównoważone BioRender obraz zmodyfikowany | 243 |
| Ryc. 3. Mutacje genomowe BioRender obraz zmodyfikowany..... | 246 |

Spis tabel

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Rozdział 1.

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Formy skupisk bakterii z przykładami gatunków..... | 18 |
| Tabela 2. Elementy tworzące zewnętrzną ochronę komórek bakterii Gram (-) i ich funkcje..... | 24 |
| Tabela 3. Mechanizm działania poszczególnych czynników wirulencji..... | 26 |

Rozdział 2.

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Główne rodzaje nabłonków występujących w organizmie ludzkim..... | 42 |
| Tabela 2. Podstawowe różnice między osoczem a surowicą..... | 63 |
| Tabela 3. Znaczenie warunków izosmotycznych w procedurach laboratoryjnych..... | 75 |

Rozdział: 3.

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Przykładowe rodzaje materiałów biologicznych i wybrane parametry wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej..... | 83 |
| Tabela 2. Kalendarium kamieni milowych w chemii klinicznej (1694–XXI w.) K. Klimasz, P.J. Tomasik, „Kamienie milowe w chemii klinicznej”..... | 85 |

Rozdział 4.

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Choroby genetyczne powstające w wyniku mutacji wpływających na liczbę chromosomów..... | 102 |
| Tabela 2. Porównanie metod diagnostycznych wybranych chorób genetycznych..... | 104 |

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Rozdział 1.

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Porównanie charakterystycznych właściwości różnych typów mikroskopów.... | 172 |
| Tabela 2. Porównanie cech preparatów utrwalonych i przyżyciowych..... | 173 |
| Tabela 3. Zestawienie wybranych fluorochromów..... | 175 |
| Tabela 4. Przykłady chorób powodowanych przez zaburzenia budowy i funkcji organelli komórkowych..... | 185 |

Rozdział 2.

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Porównanie cech charakterystycznych procesów: apoptozy i nekrozy..... | 189 |
| Tabela 2. Porównanie podziału mitotycznego i mejotycznego..... | 191 |

Rozdział 3.

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Porównanie oogenezy i spermatogenezy..... | 202 |
| Tabela 2. Funkcja hormonów cyklu miesięczkowego..... | 204 |
| Tabela 3. Funkcja hormonów w procesie spermatogenezy..... | 205 |
| Tabela 4. Zmiany potencji komórek w rozwoju zarodkowym człowieka..... | 206 |

Rozdział 4.

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Przykłady chorób dziedziczonych mendlowsko..... | 216 |
| Tabela 2. Przykłady dziedziczenia niemendlowskiego | 218 |

Rozdział 5.

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Antygeny i przeciwciała układu grupowego ABO, obecne u osób z poszczególnymi grupami krwi. https://www.gov.pl/web/nck/grupy-krwi | 229 |
| Tabela 2. Dziedziczenie grup krwi układu AB | 233 |
| Tabela 3. Dziedziczenie grup krwi układu Rh..... | 236 |

Rozdział 6.

| | |
|--|-----|
| Tabela. 1. Przykłady i mechanizm działania wybranych czynników mutagennych | 247 |
|--|-----|