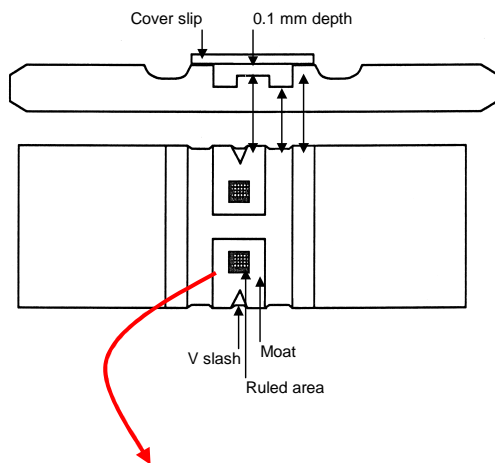
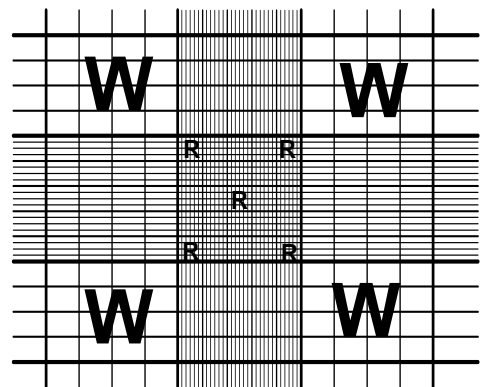
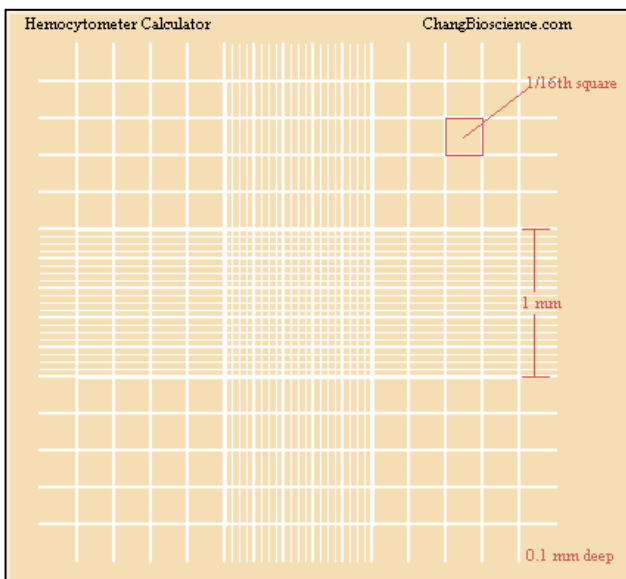


# 1. Proliferace a buněčný cyklus

Znalost rychlosti s jakou probíhá buněčné dělení je výhodná nejen pro plánování experimentů, ale i pro rutinní udržování nebo selekci buněčných linií (pasážování). Základní informaci poskytují **růstové křivky**, což není nic jiného než závislost počtu buněk dané populace na čase. Počet buněk v daném vzorku lze jednoduše určit pomocí hemocytometru – opticky ploché komůrky s definovanou plochou a výškou. Z počtu buněk v takto určeném prostoru lze odvodit celkový počet buněk v suspenzi.



Obr. 1. Komůrka hemocytometru je rozdělena mřížkou na 4 čtverce o ploše 1mm<sup>2</sup> které jsou dále rozděleny na 16 menších. Hloubka komůrky je 0,1 mm.



Obr. 2. Odlišnou velikost polí lze využít pro stanovení počtu různých typů buněk, např. erytrocytů (R) nebo leukocytů (W).

**Příklad:** Buněčná suspenze rostoucí na Petriho misce byla 10× zředěna a nanesena do komůrky hemocytometru. Celkem bylo spočítáno 100 buněk (ϕ) ve 4 čtvercích. Jaká je koncentrace buněk na misce?

100 ϕ / 4 čtverce = 25 ϕ / čtverec  
 1 čtverec odpovídá 1 mm<sup>2</sup>, objem potom 10<sup>-4</sup> ml (0,1 mm<sup>3</sup>).  
 Počet buněk ve zředěné suspenzi je tedy 25 · 10<sup>4</sup> ϕ / ml.  
 Suspenze byla 10× zředěná, výsledný počet buněk na misce: 25 · 10<sup>5</sup> ϕ / ml = **2,5 · 10<sup>6</sup> ϕ / ml**

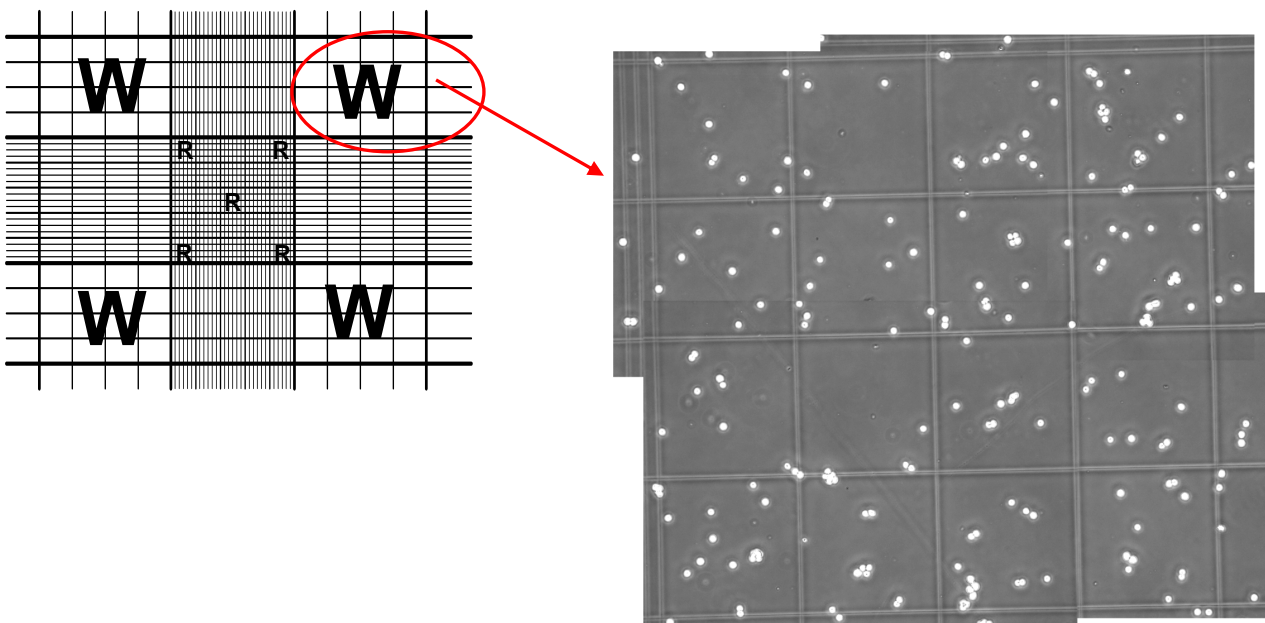
**Výpočet:** (průměrný počet buněk na 1 velký čtverec) × (plocha čtverce) × (výška komůrky) × (poměr ředění)

### Postup:

- 1) Očistit sklíčko s komůrkou i krycí sklíčko 70% EtOH; nepoškrábat povrch obou sklíček. Čistota celého hemocytometru určuje i hloubku komůrky a tím i přesnost počítání.
- 2) Odebrat vzorek z kultury na misce. V případě suspenzních buněk jemně kulturu promíchat, adherentní buňky oddělit mechanicky nebo trypsinizací. Pro optimální přesnost je nutné mít suspenzi s minimální koncentrací buněk  $10^6/\text{ml}$ .
- 3) Odebrat 100 $\mu\text{l}$  suspenze a 10  $\times$  ji zředit v 1  $\times$  PBS.
- 4) Nanést 10 $\mu\text{l}$  zředěné suspenze na okraj sklíčka a nechat kapalinu vzlínat pod krycí sklíčko. Prostor pod krycím sklíčkem nesmí být přeplněný (hloubka komůrky musí zůstat konstantní).
- 5) Optimální zvětšení na mikroskopu je cca 10  $\times$ .
- 6) Spočítat buňky ležící uvnitř velkých čtverců včetně těch, které leží na horní a vnější straně čtverce. Nepočítat ty, které leží na spodní straně a straně přivrácené ke středu.
- 7) V případě velkého počtu buněk, např. erytrocytů ( $>1000$  buněk na čtverec), lze spočítat buňky ležící uvnitř 25 malých čtverců uprostřed, ohraničených trojitou linkou. Výpočet je potom obdobný, plocha malého čtverce je 0,04  $\text{mm}^2$ .

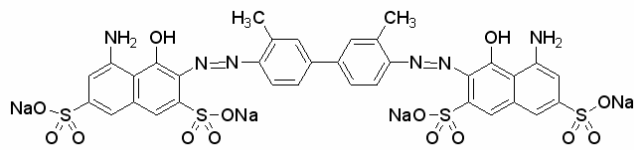
### Příklad:

Stanovte koncentraci buněk BM2 na misce pokud byl vzorek zpracován výše uvedeným postupem a hemocytometr poskytl následující obraz:

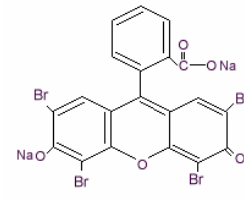


Obr. 3. Fotografie velkého čtverce hemocytometru (plocha 1  $\text{mm}^2$ )

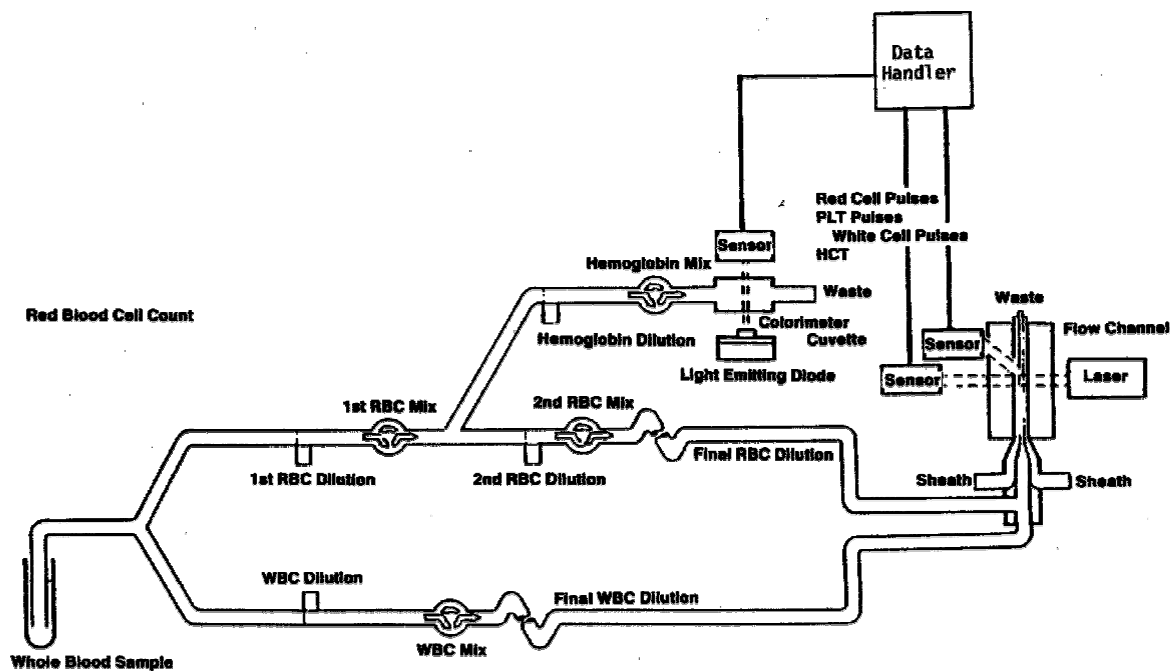
Výhodou použití hemocytometru je to, že umožňuje vizuálně hodnotit to co počítáme, tedy např. odlišit živé buňky od mrtvých nebo nebuněčného materiálu. Viabilitu buněk lze snadno stanovit, pokud k suspenzi buněk přidáme vhodné barvivo, např. *Trypan Blue* nebo *eosin*. Živé buňky s nepoškozenou membránou barvivo nepřijímají nebo jej aktivně vylučují a jeví se pod mikroskopem jako průhledné, neobarvené. Mrtvé buňky mají obvykle membránu perforovanou a barvivo se v nich hromadí. Pod mikroskopem se potom jeví jako barevné (modré).



Obr. 4. *Trypan Blue*

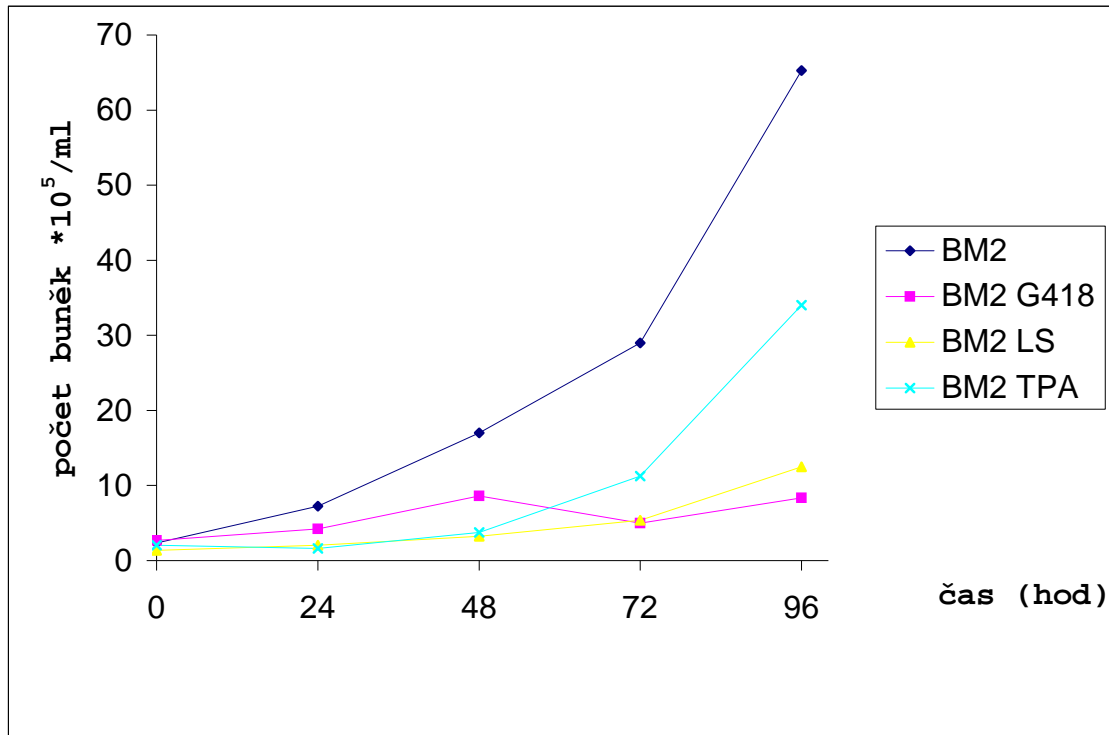


Obr. 5. *Eosin*



Obr. 6. Stanovení počtu buněk lze i automatizovat, nejčastěji se využívá např. systém *Coulter counter*.

## Růstové křivky:



Obr. 7. Příklad růstových křivek buněk BM2, které byly kultivovány v různých podmínkách:

### Legenda:

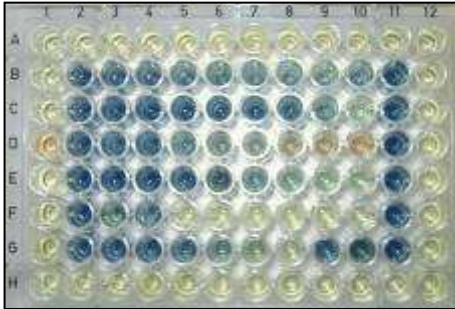
„BM2“ – buňky BM2 kultivované v optimálních podmínkách. Tato buněčná populace zdvojnásobí svoji velikost každých cca. 24 hodin.

„BM2 G418“ – buňky BM2 kultivované s antibiotikem zasahujícím do eukaryotické proteosyntézy. Antibiotikum výrazně snížilo proliferaci buněk.

„BM2 LS“ – buňky BM2 byly kultivovány v prostředí obsahující minimální množství séra (doplněk médií obsahující růstové faktory, vitamíny, výživu atd.). Proliferace nestimulovaných buněk byla značně snížena.

„BM2 TPA“ – v buňkách BM2 (monoblastech) byla indukována diferenciace do konečného stádia makrofágů. Indukce diferenciace je obvykle spojena se zastavením nebo zpomalením proliferace.

Mezi další metody pro stanovení počtu buněk patří **kolorimetrické určení** obsahu DNA nebo proteinů v buňkách. Principem je obarvení DNA (Hoechst) nebo proteinů (Folin) a určení fluorescence, resp. absorpance vzorků. Srovnáním se standardy získáme představu o počtu buněk. Klasickou metodou testování metabolické aktivity, která odráží rychlost proliferace nebo senzitivitu např. k cytostatikům je **MTT test**. Je založen na



redukci žluté, rozpustné tetrazoliové MTT soli (3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) na nerozpustný modrý formazan mitochondriálním enzymem sukcinát-dehydrogenázou. Absorbance barevného roztoku v DMSO se stanovuje při 575 nm a odráží metabolickou aktivitu populace buněk.

Rychlost proliferace odráží také rychlost syntézy DNA nebo proteosyntézy. V obou případech jde **radioizotopové stanovení** množství DNA nebo celkových proteinů, které na rozdíl od kolorimetrického stanovení (v jednom bodě) umožňuje popsat dynamiku celé kultury během různých časových intervalů.

Běžně se využívá inkorporace  $^3\text{H}$  tymidinu ( $^3\text{HTdR}$ ) nebo  $^3\text{H}$  deoxycytidinu během syntézy DNA. Nevýhodou  $^3\text{HTdR}$  je nutnost využívat pouze krátkodobé expozice, protože záření  $\beta$  emitované tritiem způsobuje zlomy DNA.

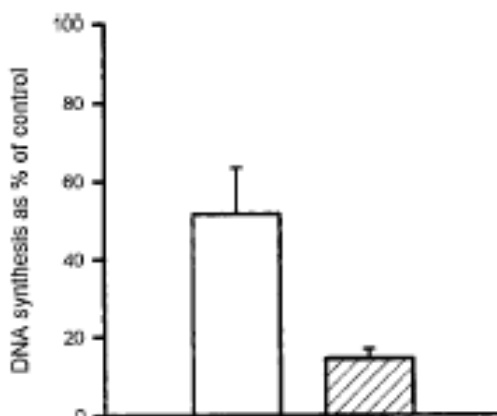
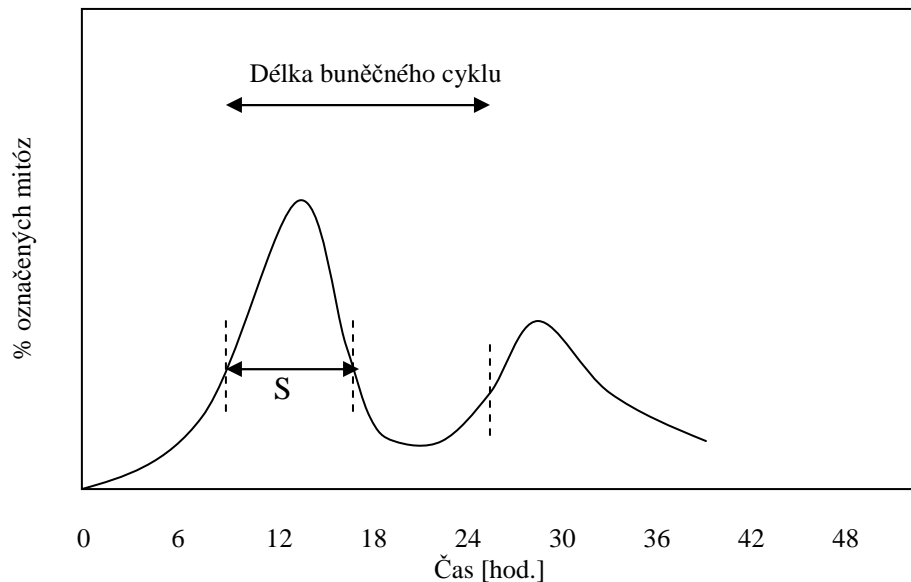


Fig. 5 DNA synthesis inhibition after treatment of SW1736 (□) and 8505C (▨) cell lines with an  $\text{IC}_{50}$  of CDDP. Cells were exposed to an  $\text{IC}_{50}$  of CDDP for 1 h and then grown for 23 h in drug-free media. Analysis for residual DNA synthesis was performed by  $^3\text{H}$ -thymidine-incorporation assay. Experiments were conducted three times, and results were expressed as percentage of untreated control  $\pm$  SD.

Obr. 8. Příklad využití inkorporace  $^3\text{H}$  Tymidinu do DNA jako metody charakterizující různou senzitivitu dvou linií nádorových buněk tyroidního karcinomu k léčbě *cis*-platinou.

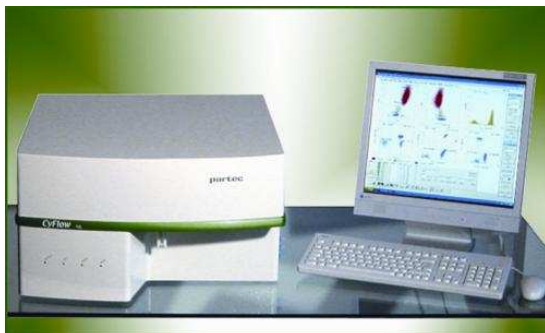
→ Voigt et al. 2000. Clin Cancer Res 6(5): 2087-93.

Pomocí inkorporace radionuklidů ( $^3\text{HTdR}$ ) lze také odhadnout délku buněčného cyklu: buňky jsou inkubovány s  $^3\text{HTdR}$  po dobu 30min., poté je  $^3\text{HTdR}$  odmyt a v následujících 48 hodinách je každých 30min. hodnoceno procento označených mitóz (tj. buněk obsahujících DNA značenou  $^3\text{HTdR}$ ), vůči všem mitózám.



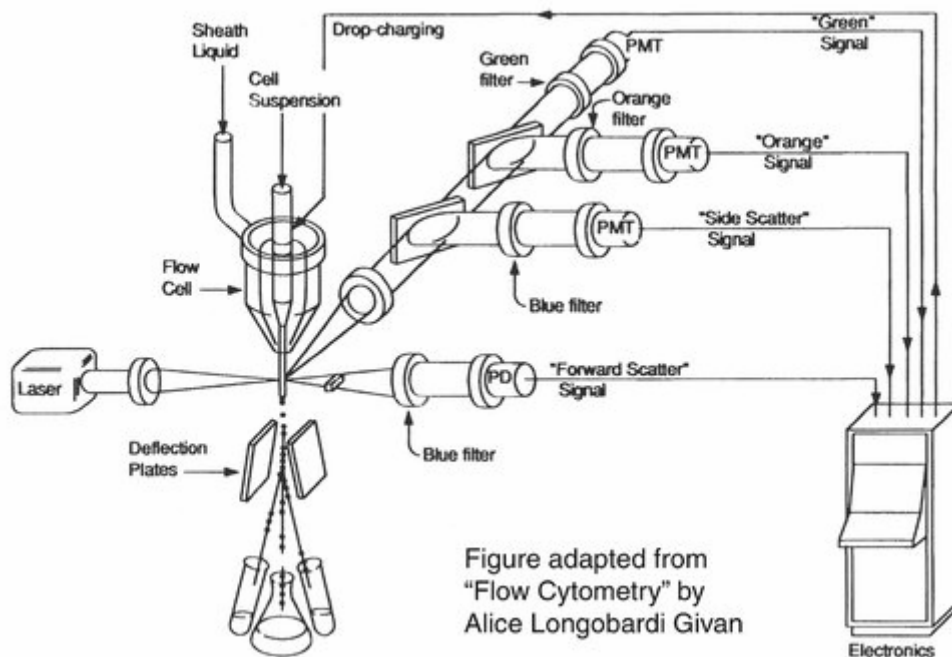
Obr. 9. Stanovení délky buněčného cyklu pomocí inkorporace  $^3\text{HTdR}$ .

Podobnou metodou jako dvě předchozí, je označení DNA fluorescenčním barvivem (např. propidium jodidem) a následná analýza buněčné populace na průtokovém cytometru (*flowcytometru*). Průtokový cytometr rozdělí buňky na základě jejich fluorescence – tedy podle obsahu DNA; z výsledného histogramu lze potom odvodit nejen informace o procentuálním zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu, ale také délky cyklu nebo případnou apoptózu. Pro kvantitativní analýzu jsou buňky nejprve fixovány v etanolu a jejich

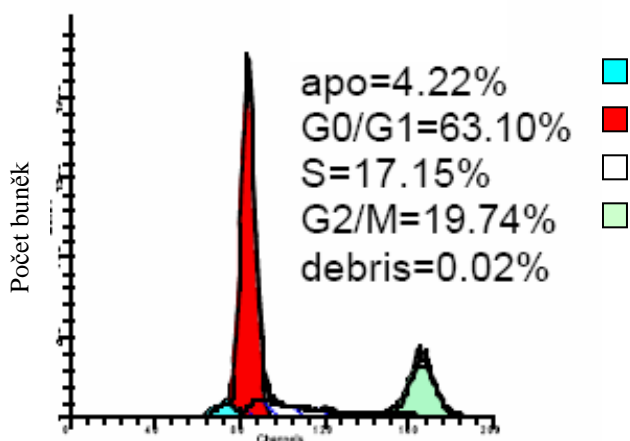


DNA je následně obarvena fluorescenčním barvivem. Využívá se řada látek, např.: Hoeschst 33342, DAPI, Mithramicin, propidium jodid, DRAQ5, TO-PRO-3, Aminoactinomycin D, atd.

Pozn.: Průtokový cytometr má široké využití nejen v analýze buněčného cyklu a proliferace, ale také v klinických aplikacích, např. v analýze počtu chromozomů, imunofenotypizaci nádorových, zejména leukemických buněk, monitorování průběhu chorob typu AIDS nebo transplantační medicíně. Dále umožňuje analýzu exprese intracelulárních i povrchových markerů (CD), měření velikosti buněk, stanovení intracelulárního pH, membránového potenciálu atd.

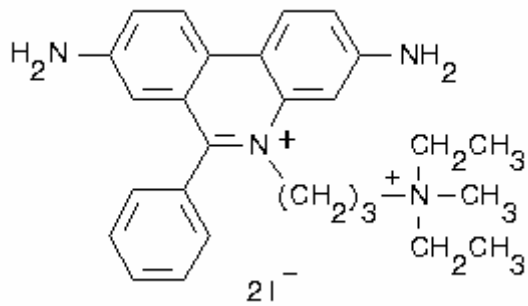


Obr. 10. Princip průtokového cytometru: Označené buňky v kapiláře procházejí laserovým paprskem, který excituje fluorochrom navázaný buď přímo nebo prostřednictvím protilátek ke specifickým buněčným strukturám. Údaje o fluorescenci zaznamenaná a vyhodnotí počítač, který případně vydá pokyn k rozřídění buněk podle zvolených parametrů. → [www.cytometry.cz](http://www.cytometry.cz)



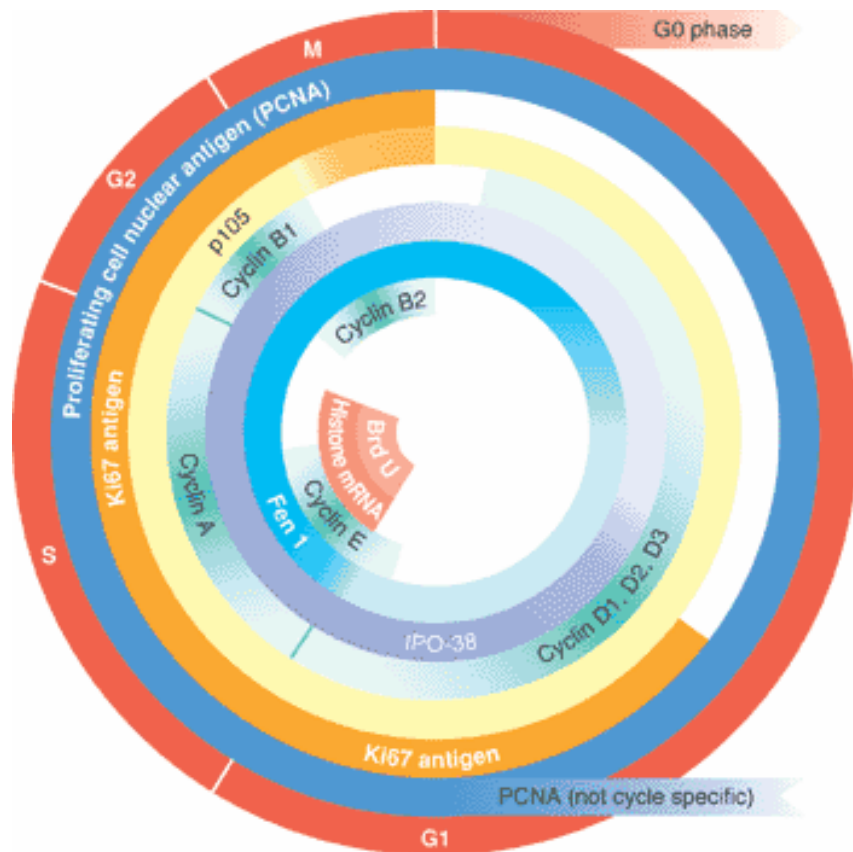
Obr. 11. Buňky z této kultury lze zařadit do jednotlivých fází cyklu obsahu DNA – buňky v G2 a M budou mít dvojnásobné množství DNA oproti buňkám v G1 nebo G0, buňky v S budou mít obsah DNA ve srovnání s G1 – M intermediální. Kromě toho, se zde objevuje tzv. subG0 pík, který naznačuje přítomnost menšího množství DNA než by odpovídalo alespoň G1. Tento stav je typický pro apoptotické buňky degradující vlastní DNA. *Debris* znamená přítomnost subcelulárního materiálu, pravděpodobně buněčných trosek.





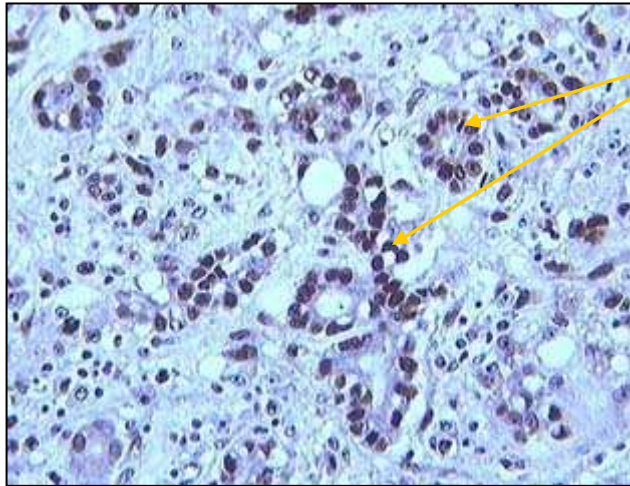
Obr. 12. Struktura propidium jodidu,  
MW 668.40 Da

Proliferaci lze charakterizovat také na základě **exprese proteinů** přítomných nebo aktivních pouze v proliferujících buňkách, resp. závislých na konkrétní fázi buněčného cyklu.





**PCNA** (proliferating cell nuclear antigen), 36kDa velký, evolučně konzervovaný protein, syntetizovaný v G1 fázi jako součást polymerázového komplexu. V pozdní S fázi se z velké části nachází právě v jádře. Jednou z možností, jak zviditelnit přítomnost PCNA v buňkách je imunohistochemické značení. Nevýhodou zůstává citlivost na způsob barvení (např. buňky fixované v aldehydech mají signál PCNA difúzní a zkreslený).

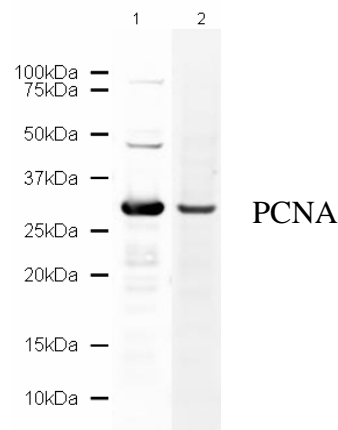


Obr. 13. PCNA přítomný v buňkách ptačího cholangiocelulárního karcinomu (karcinom jaterních žlučovodů). Podbarveno hematoxylinem a eosinem.

→ <http://www.vet.uga.edu/ivcvm/1998>

(Sullivan et al. 1998, PCNA, Ki-67, and p53 Expression in Avian Hepatic Tissues)

Obr. 14. Analýza množství PCNA western blottingem může dát představu rychlosti proliferace (zvýšená tvorba PCNA odpovídá většímu počtu buněk v G1 a S fázi).



Podobně lze využít i další proteiny závislé na průběhu buněčného cyklu, zejména **cykliny** (D, E, A, B), inhibitory **p16**, **p21** a **27** nebo analyzovat aktivitu **CDK**.

