

# CYTOKINETICKÉ PARAMETRY



**PROLIFERACE**  
**VIABILITA**  
**DIFERENCIACE**  
***(APOPTÓZA)***

# PROLIFERACE



- Množení buněk mitózou
- Dostatek živin, růstových faktorů, pH a teplota prostředí (kultivační techniky) + ovlivnění?
- Metody stanovení počtu buněk:
  - nespecifické barvení všech proteinů/DNA (metylénová modř, neutrální červeně, tetrazoliové soli MTT, WST<sub>1</sub>/ CyQuant)
  - Bürkerova komůrka
  - Počítač částic (Coulter counter)

Postup: 20  $\mu$ l b. suspenze do 10 ml hemasolu ... 500 x ředěno  
Counter nasaje 0,5 ml  
Př.:  $1 \cdot 10^3$  b. .... 0,5 ml /x2  
       $2 \cdot 10^3$  b. .... 1 ml /x500  
       $1 \cdot 10^6$  b/ml

# Viabilita



- Životnost buněk (vs. mortalita)
- Živé buňky – semipermeabilní cytoplazmatická membr.
- Mrtvé buňky – permeabilní cytoplazmatická membr.
- **DYE EXCLUSION ASSAYS**

- ✦ Živá buňka je schopna zabránit průniku barviva dovnitř

Barviva: eosin, trypanová modř, propidium iodid, 7 amino actinomycin, acridin orange, Hoechst 33258 x 33342

**EOSIN:** SS 0,15% smíchat 1:1 s buněčnou suspenzí – kápnout do Bürkerovy komůrky ... hodnotit 100 buněk – kolik z nich je mrtvých = oranžových

**PI:** SS 1 mg/ml; WS 1 µg/ml ... inkubace 1 minutu, hodnocení FACS živé buňky nenabarvené x mrtvé fluoreskují v FL2

# Diferenciace



- Rozrůznění buněk vlivem faktorů okolního prostředí
- **Změna** biochemických procesů
  - expresního profilu (mRNA, DNA, proteiny)
  - morfologie
  - povrchových antigenů
- **Detekce těchto změn** biochemie
  - molekulární biologie
  - histologie/cytologie
  - imunologie

# HL-60 = Akutní myeloidní leukémie (AML)



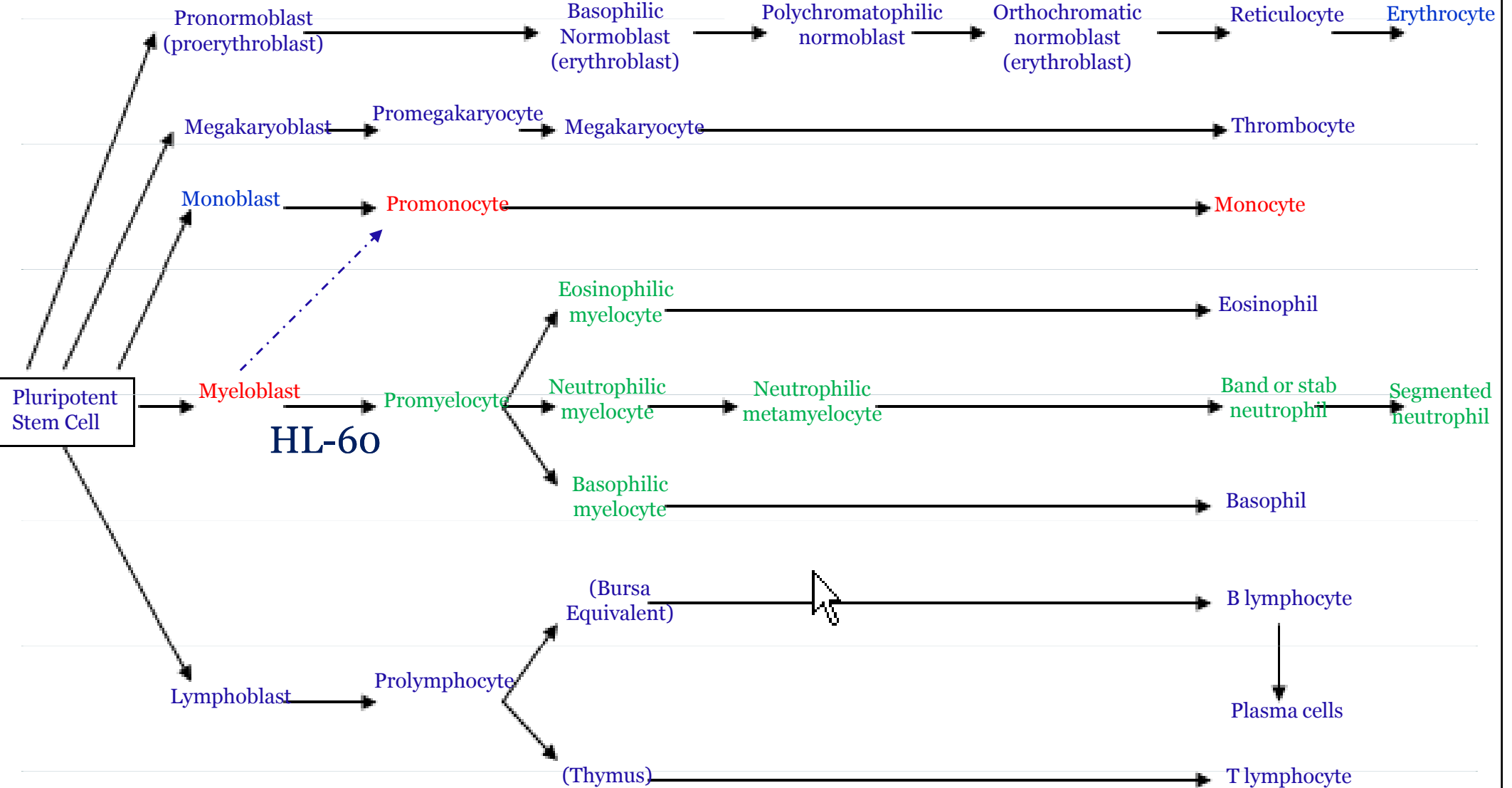
- Zhoubná forma rakoviny kostní dřeně způsobená poruchou dozrávání hematopoietických prekurzorů (>20% blastických bb. v kostní dřeni)
  - 2,5% všech nádorů
- HL-60 - Akutní myeloidní leukemie M3 – 5-8% AML
- Genetické abnormality - často chromosomové translokace - t(15;17) – PML/RAR $\alpha$
- Následek - nedostatek zralých krevních buněk
  - akumulace nezralých buněk (zvýšená proliferace a snížená apoptóza) v kr. dřeni, perif. krvi, slezině a játrech
- Léčba – podpůrná léčba DIC (disseminated intravascular coagulation), podpůrná léčba pomocí G(M)-CSF
  - alogenní transplantace
  - diferenciační terapie ATRA – 25% pacientů RA syndrom + krátká remise
    - diferenciační terapie s trioxidem arseniku v post-remisi
  - Gemtuzumab ozogamicin – anti-CD33 MAb + calicheamicin

# HEMATOPOIESIS

Committed or Differentiated Stem Cell

Maturation Sequence

Circulating Pool



# Diferenciační látky – princip účinku



- **(ATRA 1  $\mu\text{M}$ )** – PML/RAR protein méně účinný než RAR – ATRA zvyšuje jeho účinnost
- **Vitamín D<sub>3</sub>** (VD<sub>3</sub>, kalcitriol) – aktivace kinázových kaskád, translokace do jádra, aktivace VDR, ovlivnění transkripce
- **Phorbolmyristate acetate/12-O-tetradecanyl phorbol 13-acetate** (PMA/TPA) – vazba na receptor asociovaný s protein kinázou C – PI<sub>3</sub>K – cAMP - pokles cMyc – zástava proliferace
- **Dimetyl sulfoxid 1,3 %** (DMSO) – široké spektrum účinků – zvýšení fluidity membrány, aktivace kinázových kaskád, zvýšení Ca<sup>2+</sup>, vazba na DNA - ovlivnění transkripce, demetylace

Souběh drah ovlivňující kinázové kaskády, transkripční faktory (např. PU.1) a pak G/M/GM-CSF

# Metody detekce diferencovaných buněk

## Změna enzymového vybavení buněk

- *Nespecifické esterázy*

*Hydrolýza  $\alpha$ -naftyl acetátu esterázami vede k vzniku hnědého zbarvení*

- *Detekce myeloperoxidázy*

Myeloperoxidáza štěpí peroxid kyslíku za vzniku kyslíkových radikálů, které pak oxidují o-dianisidin za vzniku barevných látek chinonového charakteru

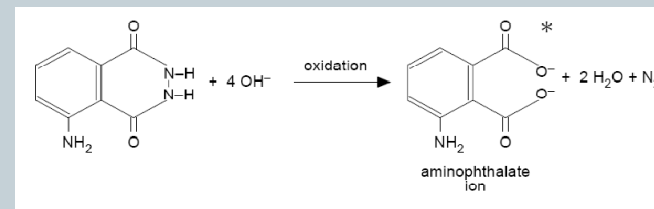
## Produkce ROS při oxidativním vzplanutí (monocyty)

- *Redukce NBT (nitroblue tetrazolium)*

NBT je redukován superoxidem produkovaným monocytou. Redukce vede k změně barvy ze žluté na modrou

- *Oxidace/redukce luminolu*

ROS produkované monocytou oxidují luminol při redukcii - chemiluminiscence



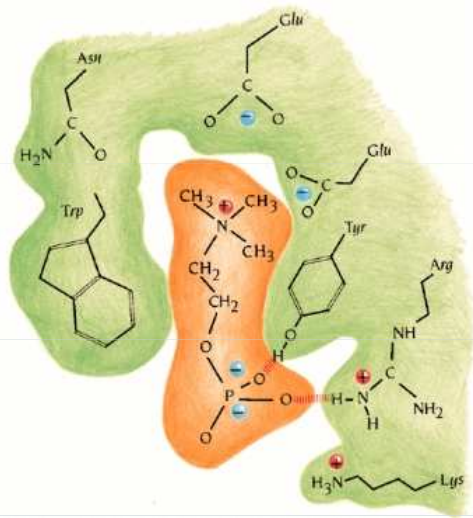
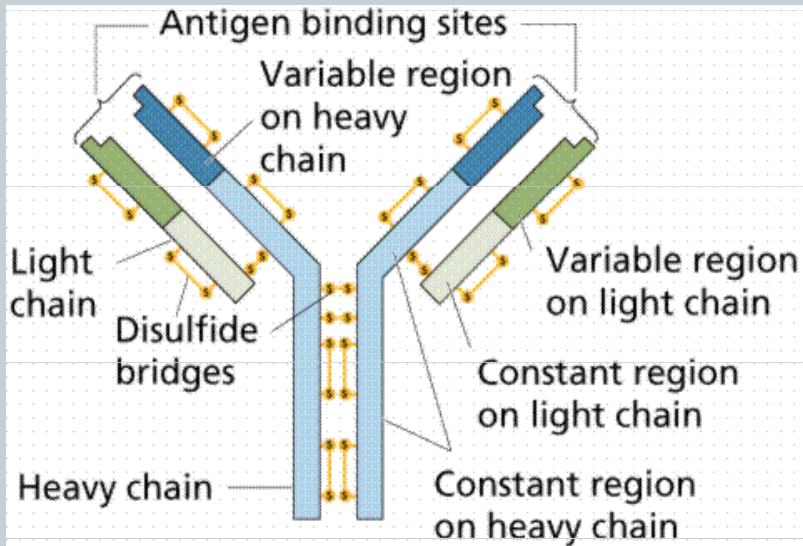
## Změna povrchových molekul

- Expresse CD11b (R proC3b složku komplementu) a CD14 (vazba LPS)

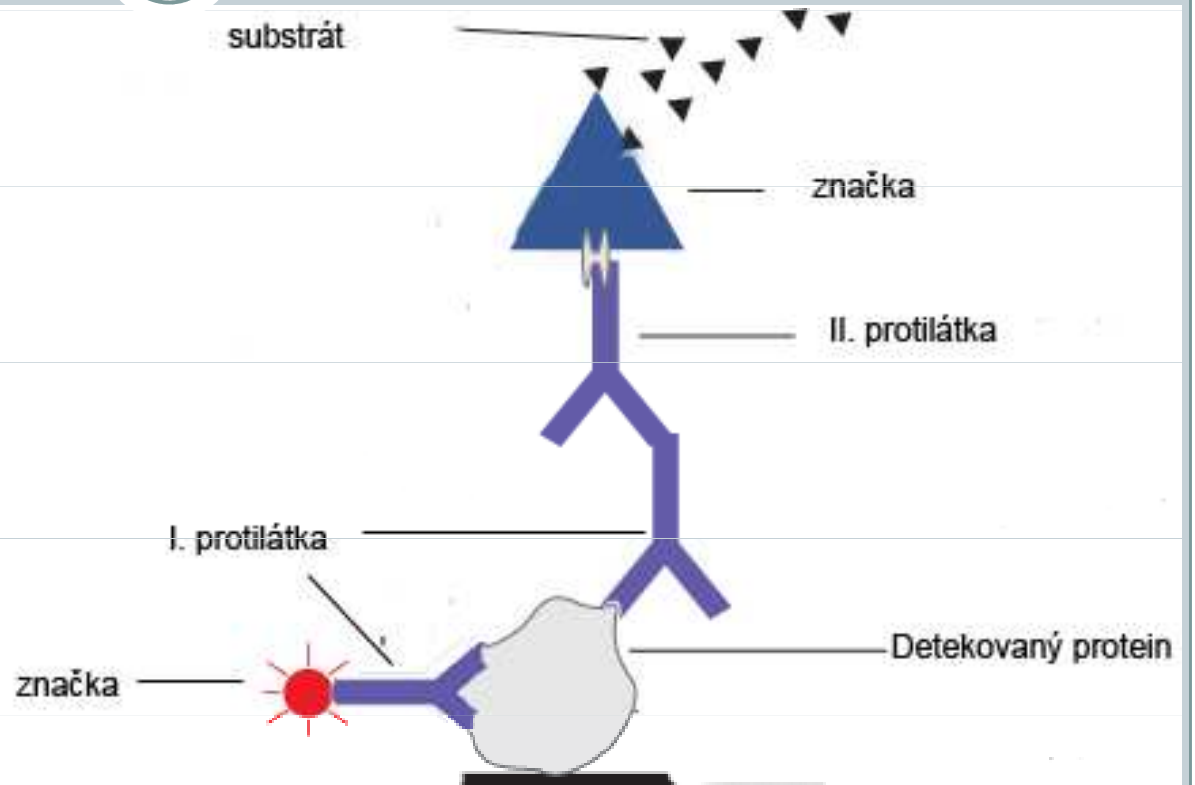
**Změna morfologie** Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace



# Imunokomplex



© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.  
A member of the Taylor & Francis Group



Přímá – jednostupňová (silný Ag)

Nepřímá – vícestupňová (velká multiplikace signálu) - slabší Ag