

CYTOKINETICKÉ PARAMETRY



PROLIFERACE
VIABILITA
DIFERENCIACE
(APOPTÓZA)

Změna cytokinetických parametrů odráží efekt použitých modulátorů signálních drah

PROLIFERACE



- Množení buněk mitózou
- Dostatek živin, růstových faktorů, pH a teplota prostředí (kultivační techniky) + ovlivnění?
- Metody stanovení počtu buněk:
 - nespecifické barvení všech proteinů/DNA (metylenová modř, neutrální červeně, tetrazoliové soli MTT, WST1/ CyQuant)
 - Bürkerova komůrka
 - Počítač částic (CASy - Roche)

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 D, acridin orange, Hoechst 33258

7AAD: SS 1 mg/ml; WS 1 μg /ml ... inkubace 1 minutu, hodnocení FACS

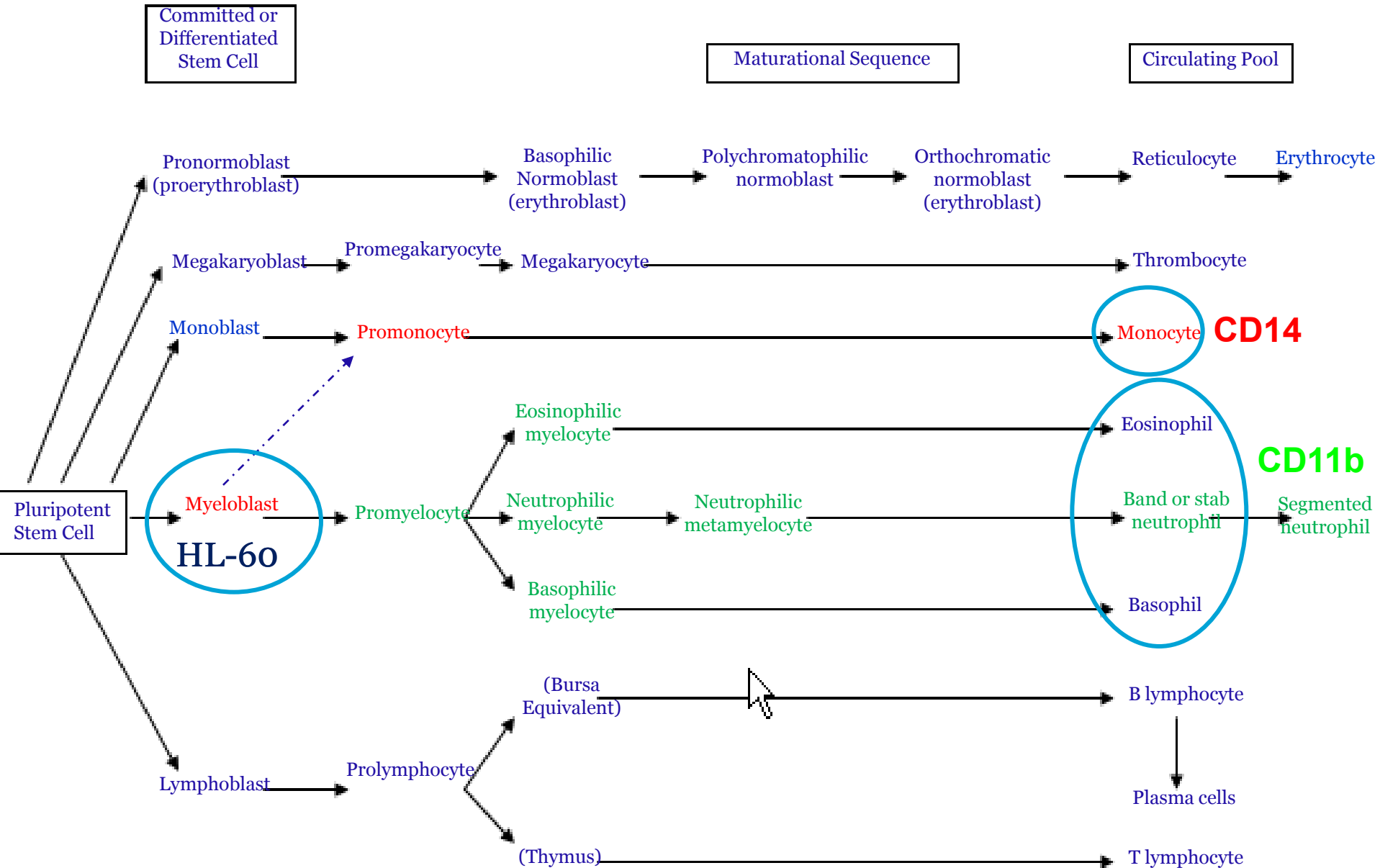
živé buňky nenabarvené x **mrtvé** fluoreskují v FL2

Diferenciace



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

HEMATOPOIESIS



Diferenciační látky – princip účinku



- **Vitamín D₃** (VD₃, 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 – PI3K – cAMP - pokles cMyc – zástava proliferace
- **Dimetyl sulfoxid 1,3 %** (DMSO) – široké spektrum účinků – zvýšení fluidity membrány, aktivace kinázových kaskád, zvýšení Ca²⁺, vazba na DNA - ovlivnění transkripce, demetylace

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

Metody detekce diferencovaných HL-60 buněk



Změna enzymového vybavení buněk

- **Nespecifické esterázy**

Hydrolyza α -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 (změna absorbance)

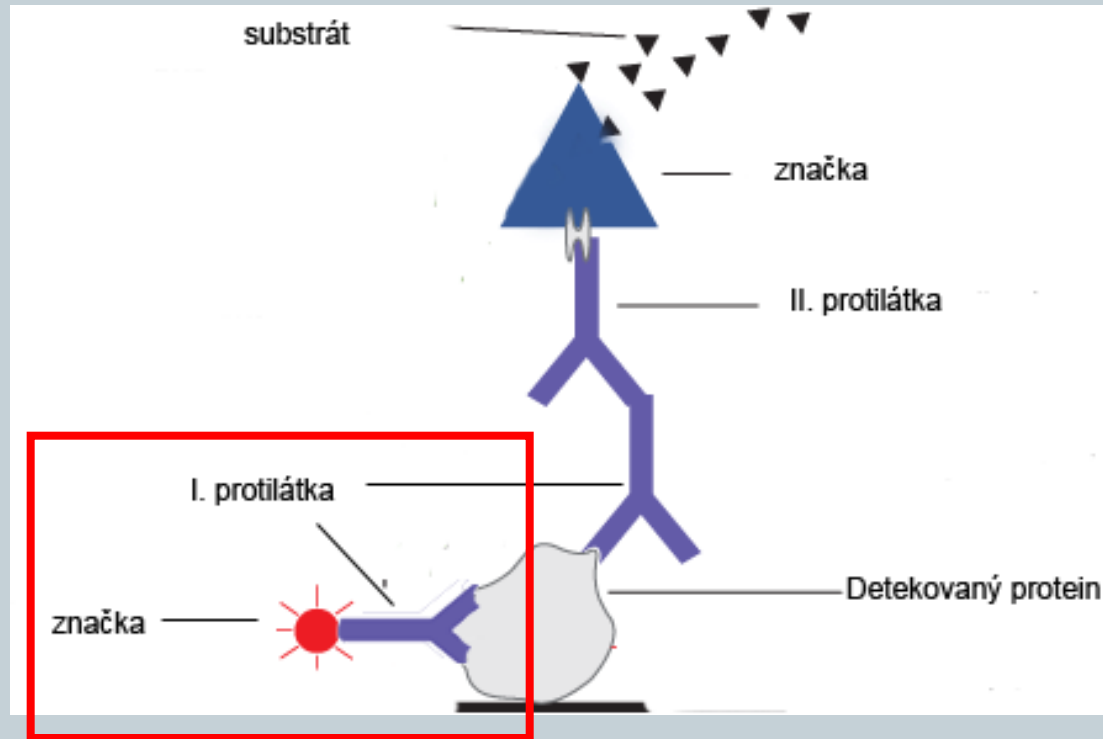
- **Redukce luminolu** superoxidem produkovaným monocytou (změna chemiluminiscence)

Změna morfologie - Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace

Změna povrchových molekul

- Exprese **CD11b-FITC** (R pro C3b složku komplementu) a **CD14-PE** (vazba LPS) - Detekce protilátkami přímo kongujovanými s fluorescenčními značkami

Imunokomplex



Přímá – jednostupňová (silný Ag)

Nepřímá – vícešupňová (velká multiplikace signálu) - slabší Ag