

# CYTOKINETICKÉ PARAMETRY



**PROLIFERACE**  
**VIABILITA**  
**DIFERENCIACE**

Změna cytokinetických parametrů odráží efekt použitých modulátorů signálních drah

# PROLIFERACE



- Množení buněk mitózou
- Dostatek živin, růstových faktorů, pH a teplota prostředí
- Metody stanovení počtu buněk:
  - nespecifické barvení všech proteinů/DNA (metylenová modř, neutrální červeň, 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 (el. proudy) dovnitř
  - ✦ Barviva: eosin, trypanová modř, propidium iodid, 7 amino actinomycin D, acridin orange, Hoechst 33258

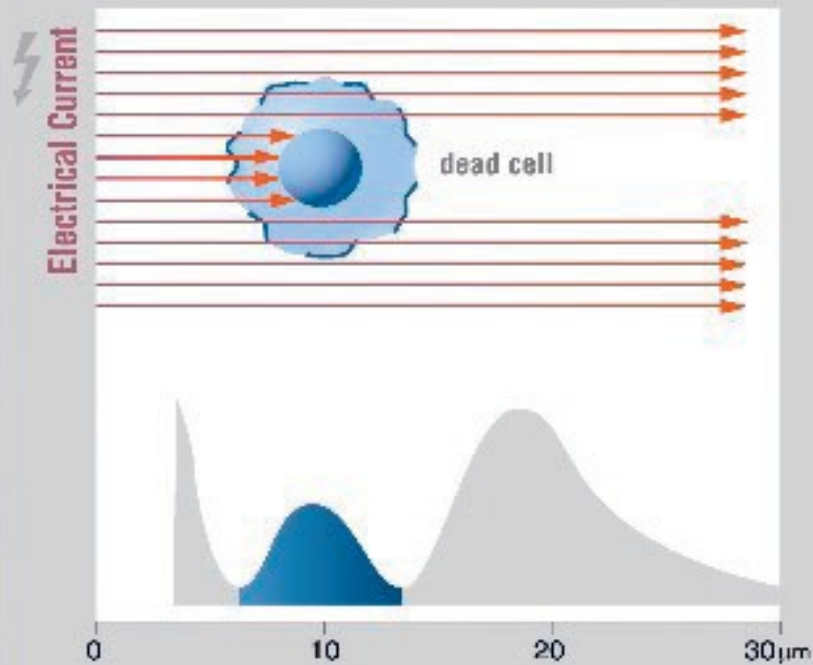
**7AAD**: SS 1 mg/ml; WS 1  $\mu$ g/ml ... inkubace 1 minutu, hodnocení FACS

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

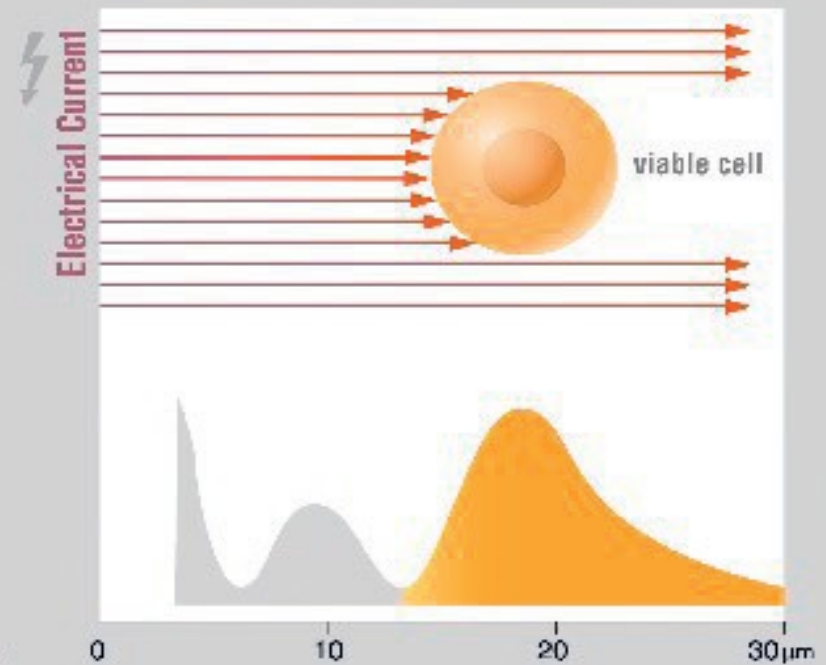
# CASY



Dead cells have a membrane that is permeable for the electrical current. They are measured by the size of the cell nucleus.



Viable cells have an intact membrane, which excludes the electrical current. They are measured by the true cell volume.

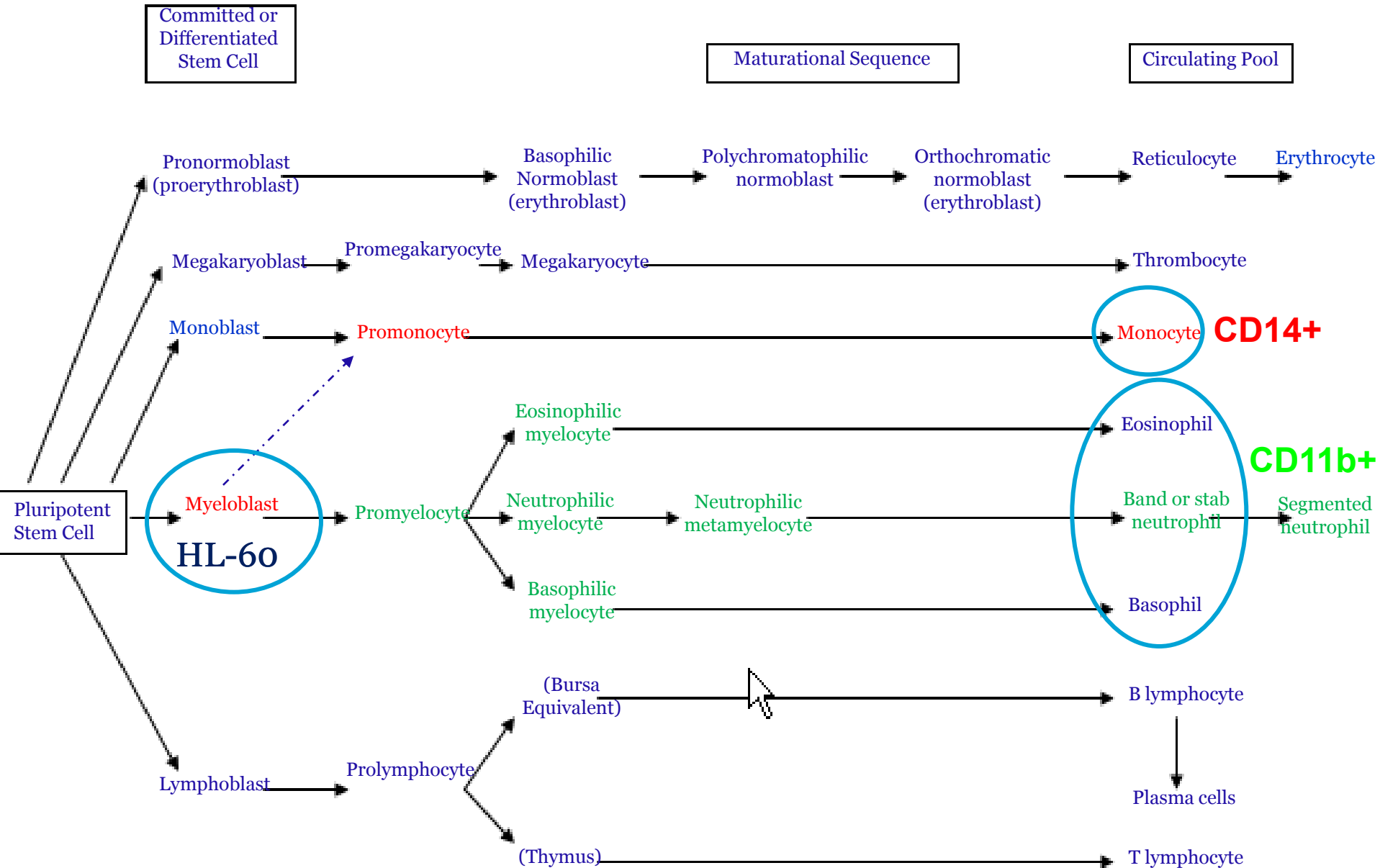


# Diferenciace



- 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 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 – PI3K – 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), G/M/GM-CSF

# Metody detekce diferencovaných HL-60 buněk



## Změna enzymového vybavení buněk

- **Nespecifické esterázy**

Hydrolyza  $\alpha$ -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 (změna absorbance)

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

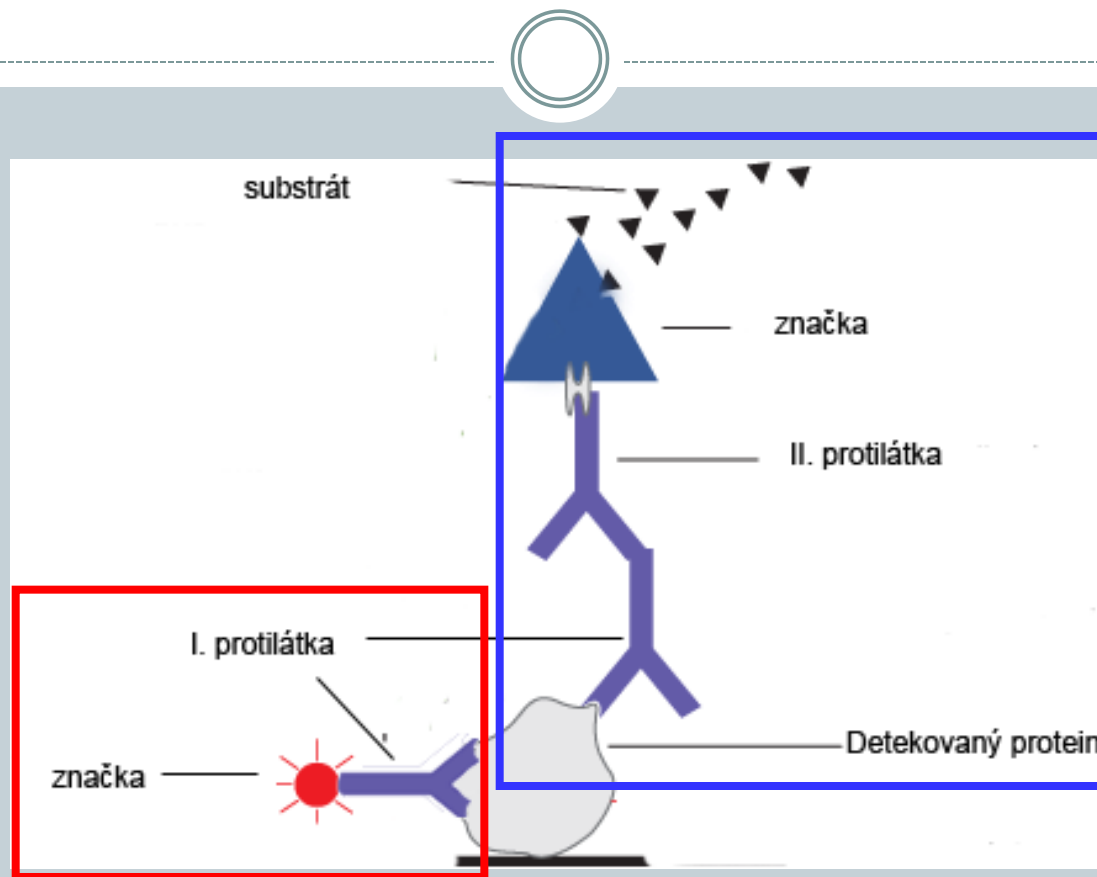
**Změna morfologie** - Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace

## 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 – jedноступňová (silný Ag)

Nepřímá – víceúrovňová (velká multiplikace signálu) - slabší Ag