

Ž i v o t n o s t

(= životaschopnost = vitalita
= viabilita)

$$= \frac{\text{počet živých buněk} \cdot 100}{\text{počet všech buněk}} [\%]$$

Využití:

- **při kultivaci buněk pro různé účely**
(hodnocení cytotoxického účinku,
vliv určitého faktoru na buňku ...)
- **kontrola životnosti po zamražení**

Metody pro stanovení životnosti:

- **množení živých buněk** (počítání vzniklých kolonií)
- **zvýraznění živých nebo mrtvých buněk barvením**
 - a) zachování membránové a funkční integrity buňky**
 - **klasická barviva**
(metylénová modř, Evansova modř, Janusova zeleň B, trypanová modř, eosin ...)
 - **fluorescenční barviva**
(propidium jodid – PI)

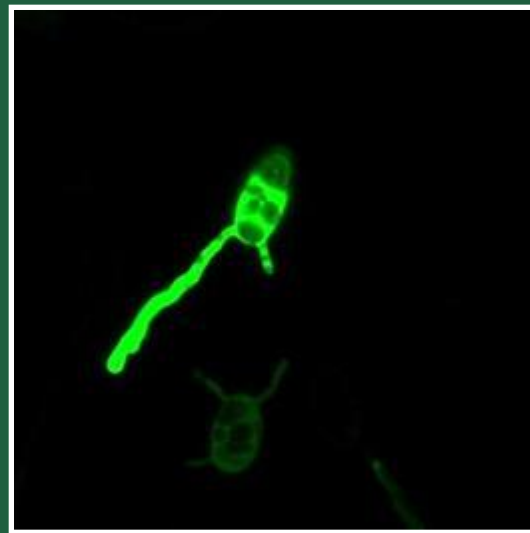
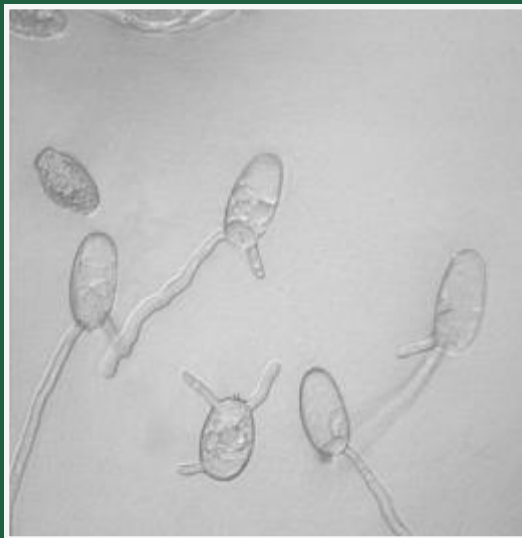
b) detekce funkčního metabolismu buňky

fluorescenční barviva:

- fluorescein diacetát

(FDA – excitace 495 nm, emise 520 nm, kostka WB)

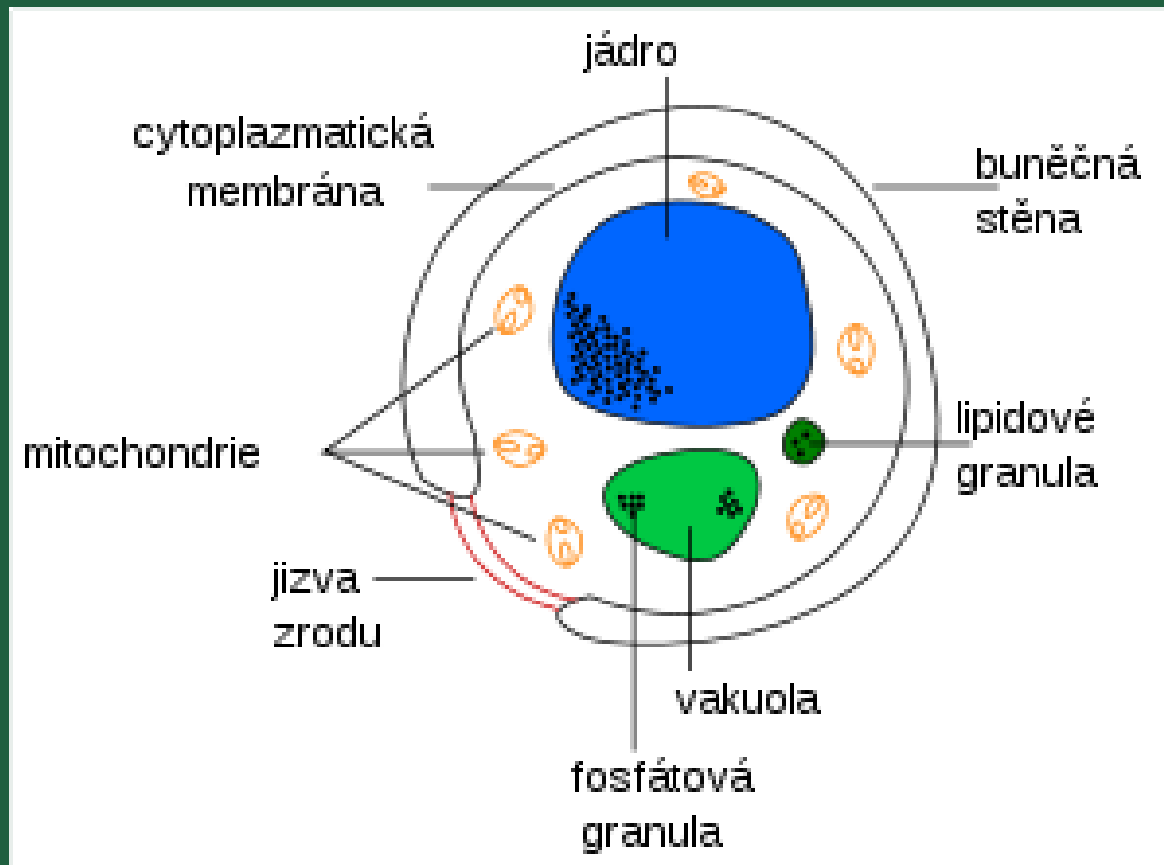
- Calcein AM (pro živočišné buňky)



Životnost klíčících pylových zrn u okurky (*Cucumis sativus*) pomocí FDA. Foto Tereza Válová.

Schéma kvasinky

(důležitý modelový eukaryotní organismus)

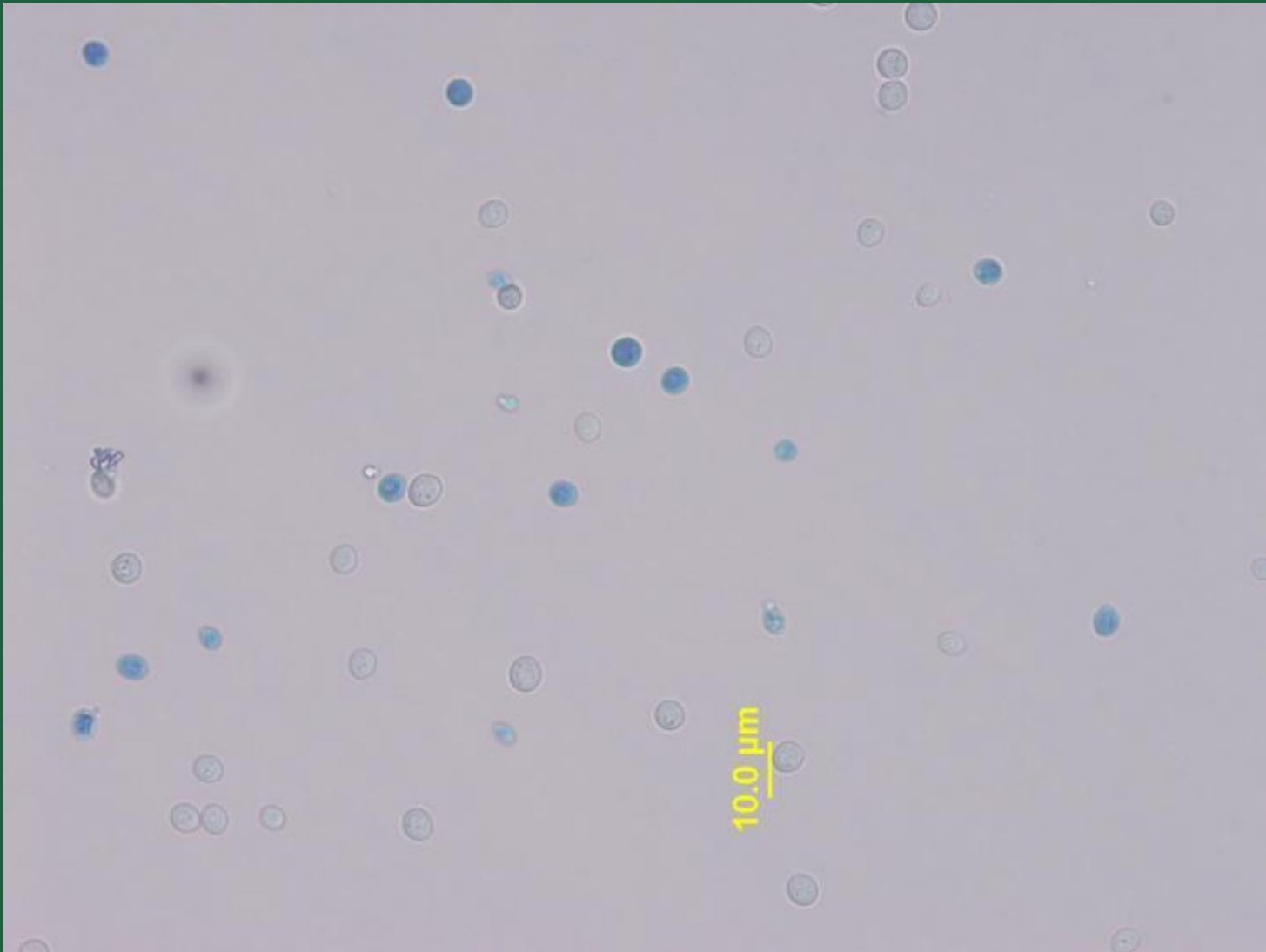


Kvasinka pivní (*Saccharomyces cerevisiae*)

Systematické zařazení kvasinek

- houby vřeckovýtrusné
- buněčná stěna: **glukan, manan, proteiny**
(i chitin a celulóza)
- kvasinky r. *Candida* – u člověka různá onemocnění (kandidóza) kůže, sliznic, plic

Barvení metylénovou modří:



**Kvasinková suspenze barvená metylenovou modří.
Z: 1 000x (imerze). Foto Pavla Válová.**

Vliv nízkých teplot na buňku

- Teploty blízké bodu mrazu → **chladový šok**
- Reverzibilní nebo irreverzibilní (nevratné) poškození buněk (stres)
- Biomembrána - za běžné teploty tekutá, při nízké teplotě rigidní struktura
- Rostlinné buňky obecně odolnější vůči nízké teplotě než živočišné

(u buněk teplokrevných živočichů už při teplotě +3 °C depolymerace mikrotubulů)

- **Kryobiologie** = vědní obor, který se zabývá studiem působení teplot pod bodem mrazu na buňky

Důležité!

- **obsah vody v buňkách** (čím méně vody, tím je mrazová rezistence větší) → spory a semena s nízkým obsahem vody poměrně odolné
 - **rychlost odvodu tepla při zmrazení**
 - **rychlost odvodu tepla při rozmrazení**
- } účinky se sčítají

Mrazící metody:

- **Kryoprezervace** = pomalé řízené zchlazování
vyžaduje výkonný, počítačem řízený chladicí agregát,
dochází k postupné dehydrataci buněk, kdy se led tvoří jen
v extracelulárním prostoru
- **Hluboké zmrazení** - buňky rychle vložíme do tekutého
dusíku (-196 °C) nebo hélia (-269 °C)
→ **vitrifikace** buněčné vody

(vzniklé ledové krystaly velké jen několik nm,
nepoškozují obsah buňky, hlavně biomembrány)

Mrazící metody:

- Hluboké zmrazení

U tekutého dusíku **P O Z O R !**

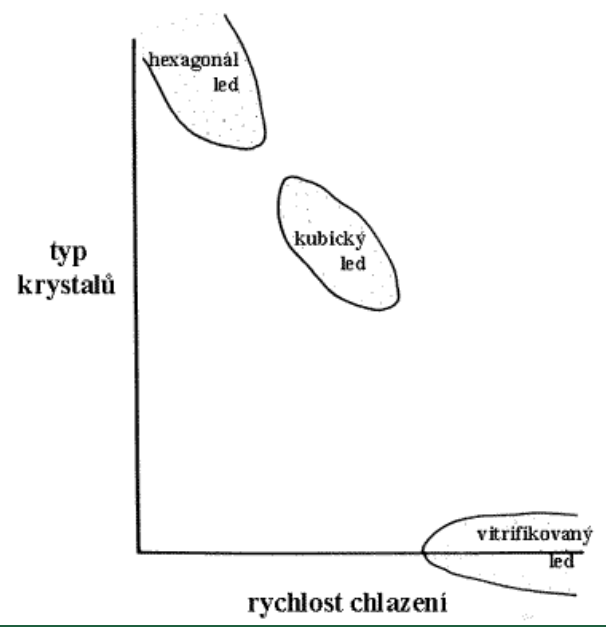
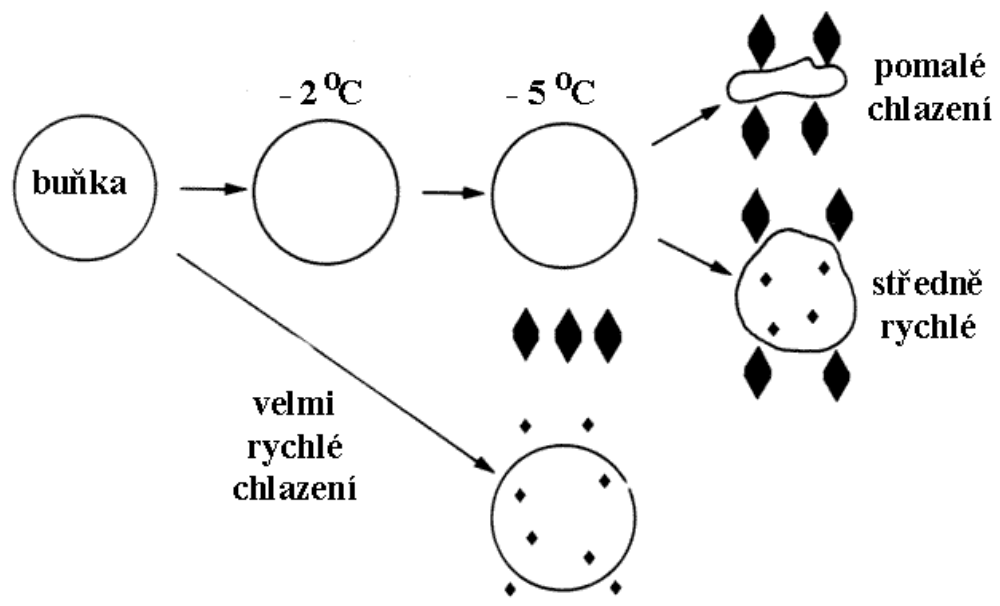
- teplota tání dusíku: **-196 °C**

- teplota bodu varu tekutého dusíku: **-195,8 °C**

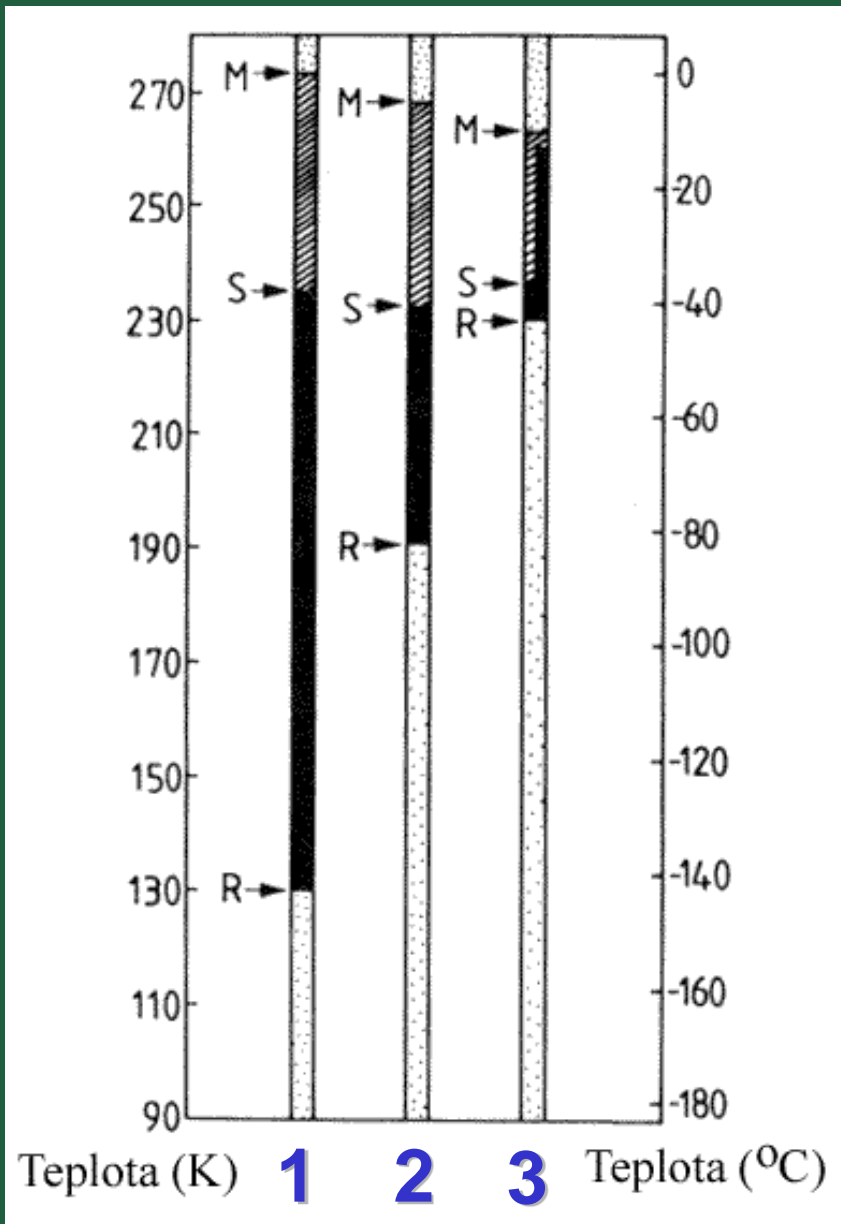
→ Vznik par, které obalí objekt → v důsledku prodlevy zmrznutí objektu mohou vzniklé ledové krystaly poškodit obsah buňky

- **Kryoprotektiva** (ochranná média)
 - k náhradě části buněčné vody ke snížení mrazového poškození buněk
 - u živočichů např. glycerol, dimetylsulfoxid (DMSO)
 - u rostlin manitol, sorbitol nebo vysoká c sacharózy
- **Lyofilizace** (= mrazová sublimace)
 - po zmrazení částečná dehydratace odsublimováním vody ve vakuu
 - uchovávání v životaschopném stavu po řadu let (sbírkové kultury; jen u prokaryota)

Kryonika – zmrazování celých těl



Schematické znázornění vlivu rychlosti mrazicího procesu na zachování buněčné ultrastruktury a typu krystalů



1 – při mrazení čisté vody

2 – při mrazení vody v živých buňkách

3 – při mrazení vody v živých buňkách ošetřených kryoprotektivem

M = bod tání

S = podchlazení

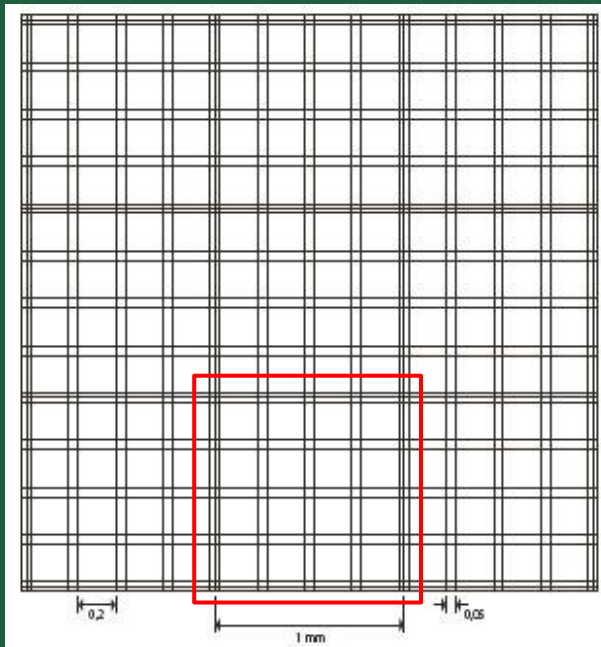
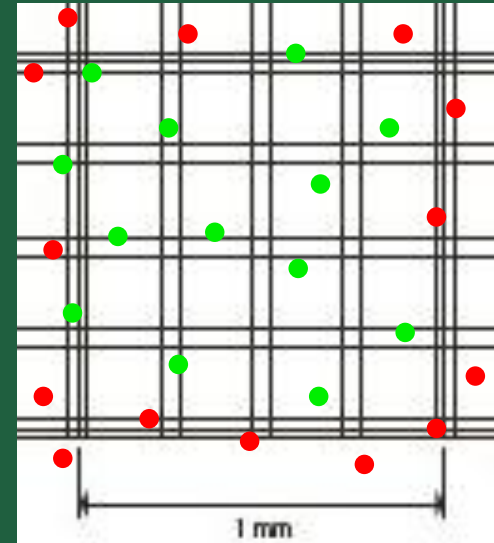
R = rekrytalizační bod

Schematické znázornění teplotních intervalů, ve kterých mohou růst krystaly

Využití zmrazovacích postupů:

- **zmrazování spermií, vajíček a celých embryí**
(tzv. genofondové banky pro umělé inseminace a oplodnění *in vitro* – u lidí tzv. *asistovaná reprodukce*)
- **tkáňové banky** (zmrazené transplantáty kostních, chrupavkovitých, epiteliálních tkání; vajíčka, embrya)
- **uchovávání genofondu** ohrožených a vzácných organismů a modelových organismů

Stanovení hustoty suspenzní kultury



$$P = (p \cdot v \cdot h \cdot z) / y$$

p = počet celkem spočítaných buněk

v = převrácená hodnota plochy jednoho políčka, ve kterém jsou buňky počítány

h = převrácená hodnota hloubky komůrky (hloubka komůrky = 0,1 mm)

z = ředění vzorku

y = počet celkem počítaných políček

P = celkový počet buněk je v 1 mm³ (násobíme jej pak 10³, aby byl výsledek v 1 cm³ = 1 ml)!