

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

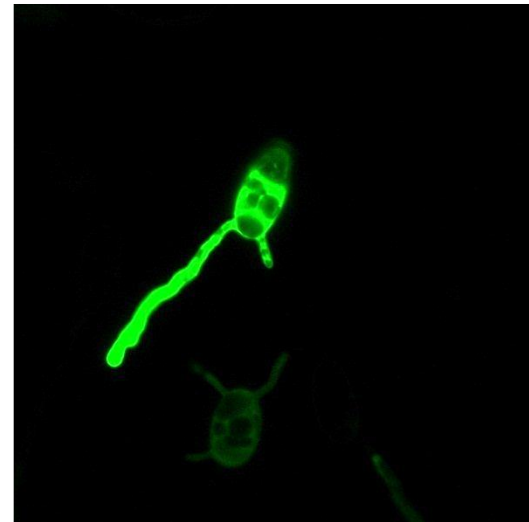
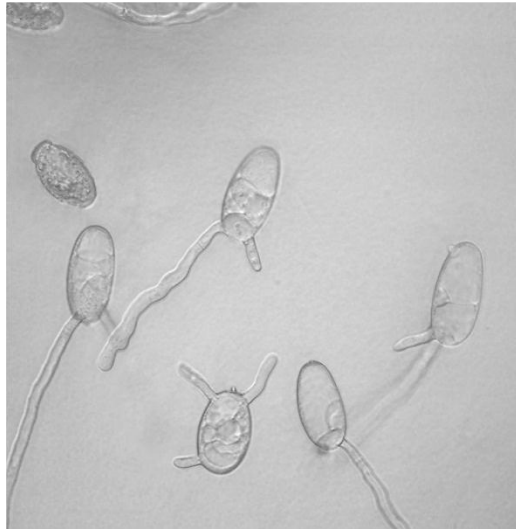
propidium jodid – PI

b) detekce funkčního metabolismu buňky

- fluorescein diacetát

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

- Calcein AM (pro živočišné buňky)



Životnost klíčících pylových zrn u okurky (*Cucumis sativus*)
pomocí FDA

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 jsou vůči nízké teplotě obecně odolnější 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 parametry:

- **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 !**

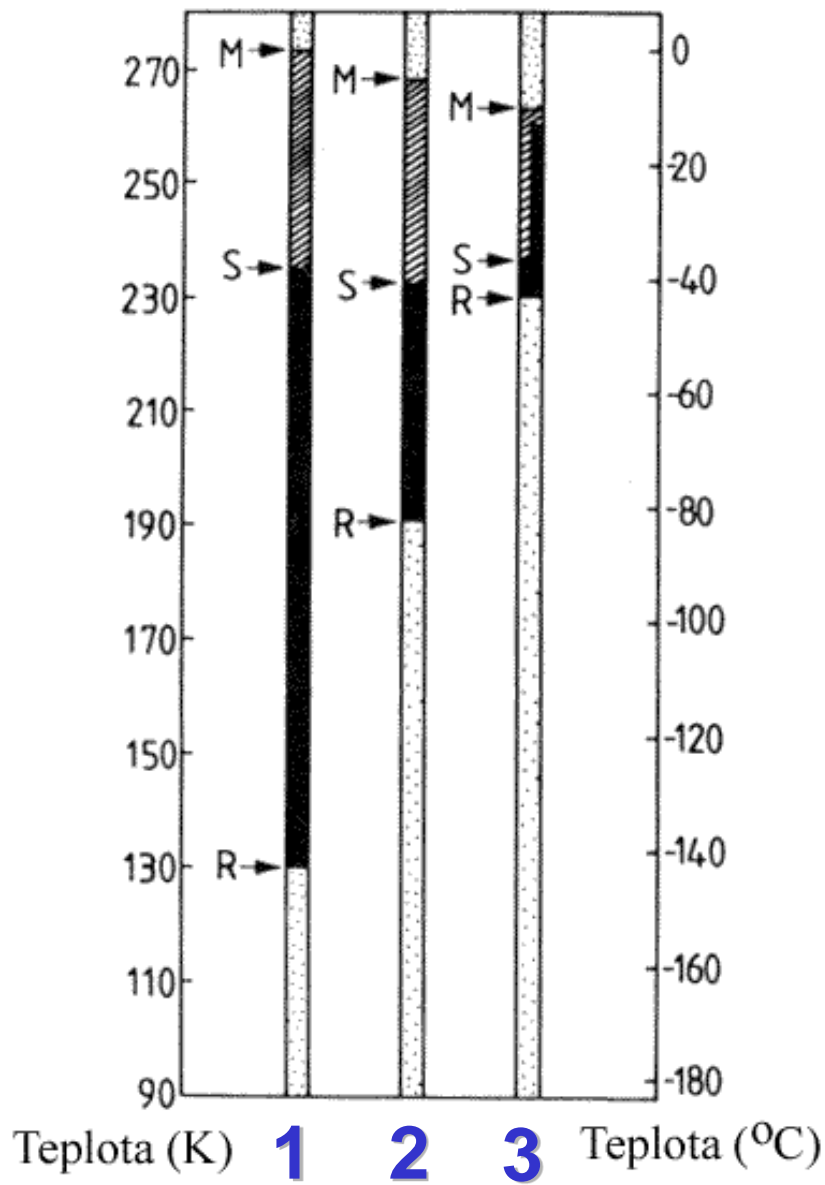
- teplota tání dusíku: **-196 °C**

- 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 prokaryonta)

Kryonika – zmrazování celých těl



1 – při mrazení čisté vody

2 – při mrazení vody v živých buňkách

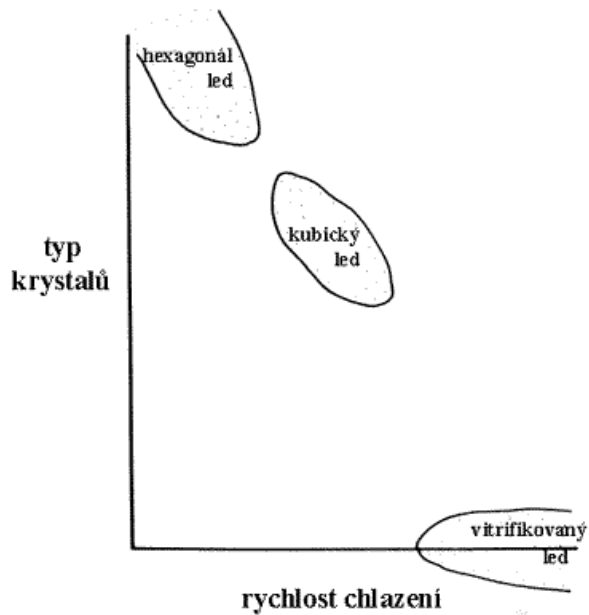
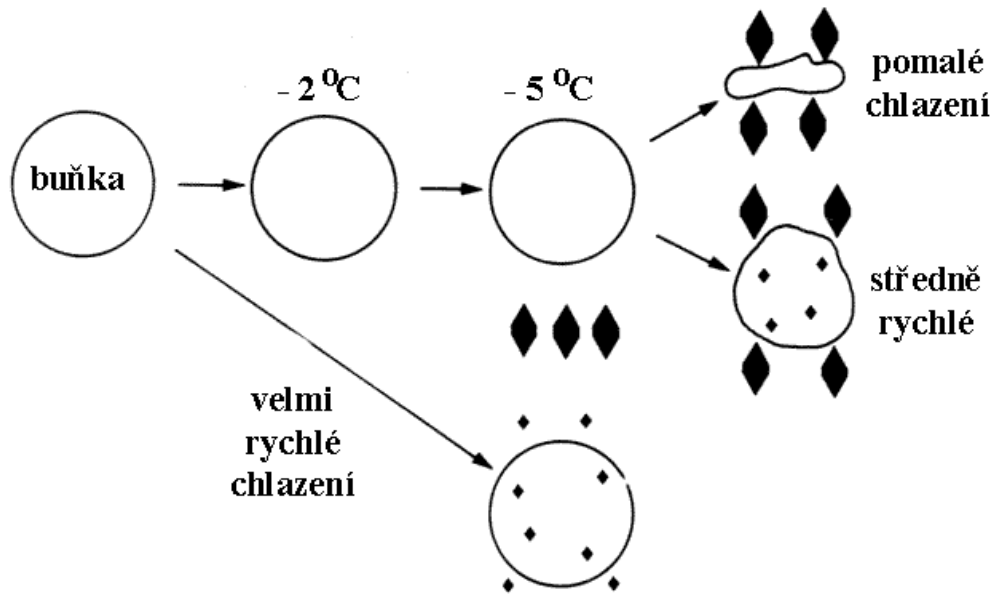
3 – při mrazení vody v živých buňkách ošetřených kryoprotektivem

M = bod tání

S = podchlazení

R = rekrytalizační bod

Schematické znázornění teplotních intervalů, ve kterých mohou růst krystaly

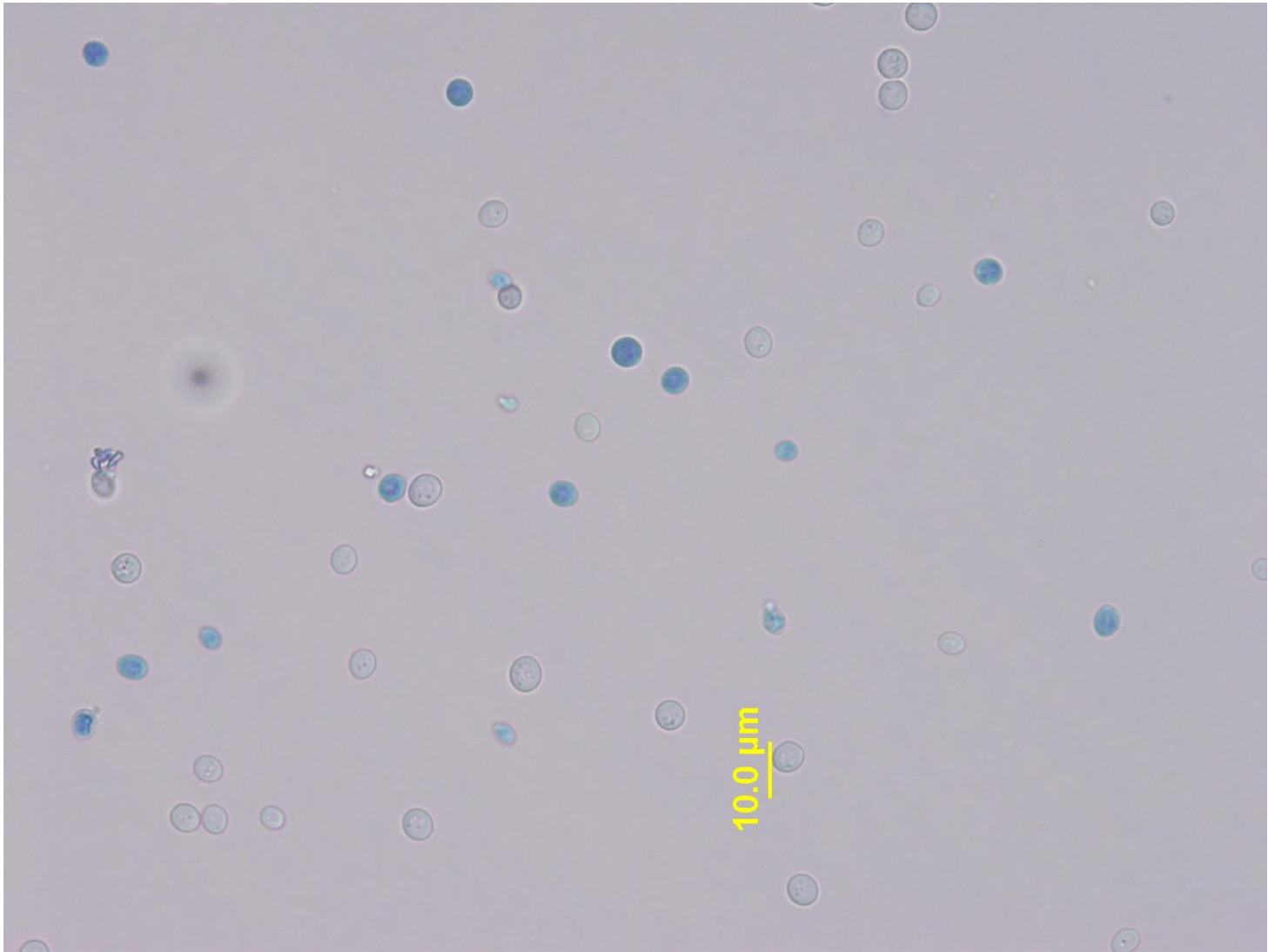


**Schematické znázornění
vlivu rychlosti mrazicího
procesu na zachování
buněčné ultrastruktury**

Využití zmrazovacích postupů:

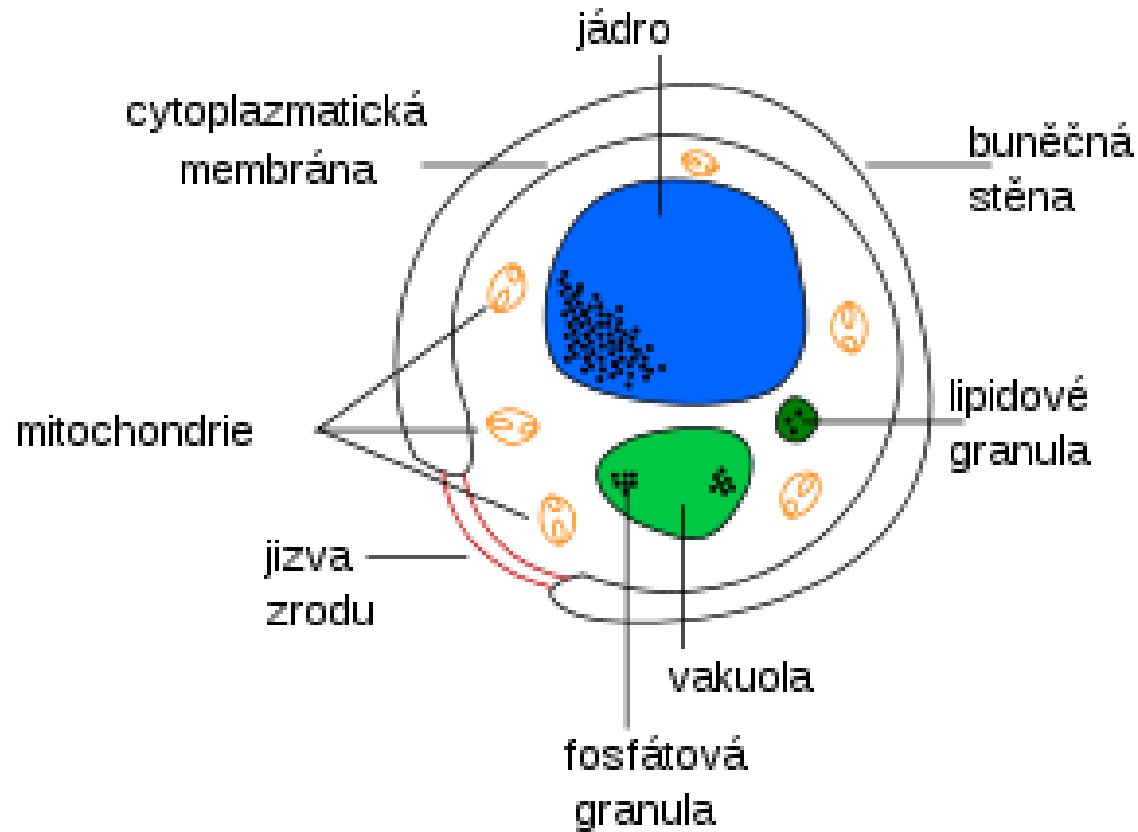
- **zmrazování spermií, vajíček a celých embryí**
(tzv. genofondové banky pro umělé inseminace a oplodnění *in vitro* – u lidí tzv. *asistovaná reprodukce*)
- **tkáňové banky** (zmrazené transplantáty kostních, chrupavkovitých, epiteliálních tkání; embrya)
- **uchování genofondu** ohrožených a vzácných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

Barvení metylénovou modří:



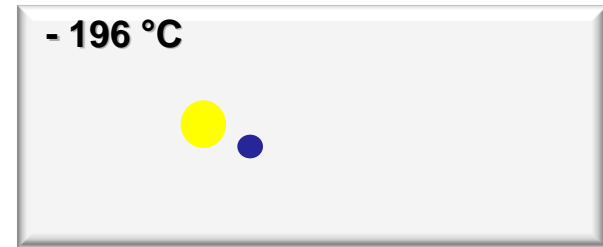
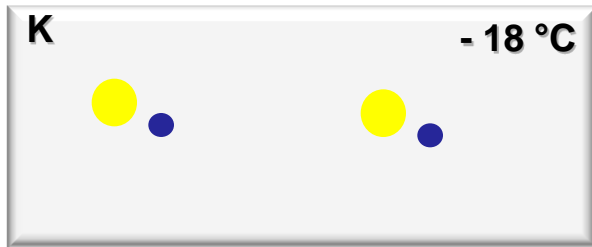
Kvasinková suspenze; Z: 1000x (imerze)

Schéma kvasinky:



Příprava vzorku:

- 1) 20 uL suspenze
- 2) 2 uL methylenové modři
- 3) Smíchat pomocí preparační jehly
- 4) Přikrýt krycím sklíčkem



- **"VÝSLEDKY"** – tabulky, výpočty (vzorec)

- **"HODNOCENÍ A DISKUSE"**

srovnat své výsledky s výsledky svých spolužáků

- zhodnotit vliv různého způsobu zmrazování
(mraznička -18 °C, tekutý dusík -196 °C)
na viabilitu kvasinkových buněk

(Vzít v úvahu i použití (nepoužití) kryoprotektiv, obsah vody v zamražovaných buňkách)

- **“ZÁVĚR”**

- uvést získané výsledky a rozhodnout, zda má zmrazování vliv na životnost buněčné suspenze, případně který způsob zmrazování byl z hlediska viability pro kvasinkovou suspenzi vhodnější