**Czas podwojenia populacji (PDT)** jest parametrem umożliwiającym sprawdzenie kinetyki wzrostu populacji komórek i służy do oceny skutków niekontrolowanej replikacji komórek. W komórkach nowotworowych mutacje genetyczne promują niekontrolowany podział komórek. Mutageneza i proces nowotworzenia są złożonymi i wieloczynnikowymi procesami obejmującym procesy komórkowe nie wpływające wyłącznie na tempo podziału komórek lub podwojenia populacji. Podczas gdy zwiększona proliferacja komórek może być cechą charakterystyczną komórek nowotworowych, jest to tylko jeden aspekt ogólnego procesu rozwoju nowotworu.

W teście podwojenia czasu populacji komórki są wysiewane do naczyń hodowlanych i pozostawiane do wzrostu w kontrolowanych warunkach w zakresie zmiany medium oraz stałej temperatury . Komórki są liczone przed i po zakończeniu hodowli a następnie są oceniane pod kątem ich zbieżności z czasem nie przekraczającym szybkości podziału komórek zdrowych. PDT jest obliczany na podstawie wzrostu liczby komórek lub czasu potrzebnego na podwojenie populacji komórek.

Aby określić PDT, powszechnie stosuje się następującą formułę:

PDT = (t2 - t1) × log2 / log(N2 / N1)

Gdzie:

**PDT** - czas podwojenia populacji

**t2 - t1** - odstęp czasu między dwoma pomiarami liczby komórek (zwykle wyrażany w godzinach)

**log2** - logarytm dziesiętny z 2

**N2** - końcowa liczba komórek w czasie t2

**N1** - początkowa liczbą komórek w czasie t1

Przykład: jeśli populacja komórek podwaja się z 1000 komórek do 2000 komórek w okresie 24 godzin, PDT zostanie obliczony w następujący sposób:

PDT = (24 godziny - 0 godzin) × log2 / log(2 000 komórek / 1 000 komórek)

= 24 godziny × log2 / log2

= 24 godziny

Obliczony PDT reprezentuje średni czas potrzebny poszczególnym komórkom w populacji na poddanie się jednemu podziałowi.

Ważne jest, aby pamiętać, że czas podwojenia populacji może się różnić w zależności od typu komórki, warunków hodowli i manipulacji eksperymentalnych. Stąd warunki hodowli powinny być jak najbardziej stabilne.

**Test rozkładu cyklu komórkowego** opiera się na teście wykorzystującym odczynnik FxCycle™ PI/RNase Staining Solution Astest, składającym się z barwnika fluorescencyjnego stosowanego do barwienia DNA oraz enzymu trawiącego RNA. Analizę przeprowadza się przy użyciu cytometru w dniu "0", czyli przed zasianiem komórek do testu PDT i po 144 godzinach hodowli po zbiorze komórek.

Test cyklu komórkowego pozwala analitykom określić dystrybucję komórek w różnych fazach cyklu komórkowego. Główne zasady dystrybucji cyklu komórkowego mierzone za pomocą FxCycle™ PI/RNase Staining Solution są następujące:

1. Barwienie DNA: FxCycle™ PI/RNase Staining Solution zawiera jodek propidyny (PI), który jest barwnikiem wiążącym się z dwuniciowym DNA. Barwnik PI wnika przez błonę komórkową utrwalonych komórek, a następnie wiąże się z DNA na zasadzie interkalacji pomiędzy komplementarnymi zasadami obydwu nici.
2. Degradacja RNA: Roztwór barwiący zawiera również rybonukleazę (RNazę), enzym degradujący RNA. Trawienie RNazą zapewnia, że tylko DNA podlega analizie, w wszelkie zakłócenia RNA są eliminowane.
3. Pomiar zawartości DNA: Barwnik PI emituje fluorescencję, gdy wiąże się z DNA, a intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości DNA obecnego w komórce. Zabarwione komórki są następnie analizowane za pomocą cytometrii przepływowej.

Fazy cyklu komórkowego: Na podstawie zawartości DNA komórki można podzielić na różne fazy cyklu komórkowego, a mianowicie G0 / G1 (Gap 1 - jeden zestaw chromosomów na komórkę), S (synteza DNA, podwojenie materiału genetycznego – 4c, powstawanie dodatkowej, jednej kopii chromosomu czyli w rezultacie mamy dwie chromatydy siostrzane), G2 (Gap 2) i M (mitoza). Każda faza ma charakterystyczną zawartość DNA, którą można określić, porównując intensywność fluorescencji barwionych komórek ze znanymi wzorcami.

Cykl komórkowy zakończony podziałem mitotycznym (cykl życiowy komórki) to proces prowadzący do powstania dwóch komórek potomnych, będących wiernymi kopiami komórki, z której powstały. Cykl komórkowy można podzielić na dwie fazy – M (mitozę lub mejozę) oraz interfazę, będącą okresem między jednym podziałem komórki a drugim. W trakcie trwania interfazy wyróżnia się 4 fazy: G0, G1, S i G2. Komórki, które w najbliższym czasie nie będą się dzielić znajdują się w fazie G0. Wejście komórki w fazę G1 obliguje ją do przejścia przez kolejne etapy cyklu i w końcu prowadzi do jej podziału. Na schemacie poniżej (Rys. 1) przedstawiono fazy cyklu komórkowego.

Obraz zawierający tekst, diagram, zrzut ekranu, linia

Opis wygenerowany automatycznie

Rys. 1. Histogram otrzymany po wybarwieniu komórek jodkiem propidyny, na którym przedstawiono analizę cyklu komórkowego. Najwyższy pik to komórki niedzielące się, będące w fazie G0 lub G1 cyklu komórkowego (komórki diploidalne). Jest to faza następująca po zakończeniu mitotycznego podziału komórkowego. W młodej komórce obserwuje się intensywne procesy anaboliczne. Komórka intensywnie rośnie, zachodzi wzmożona synteza makrocząsteczek (m.in. białek i RNA) i budowa organelli. Pod koniec tej fazy komórka albo przechodzi do fazy S, albo może opuścić cykl komórkowy i wejść w fazę G0. Drugi mniejszy pik to komórki w fazie G2 i M (mitozy), o podwojonej ilości DNA (komórki tetraploidalne). Pomiędzy pikami znajdują się komórki w fazie S (syntezy DNA). Replikacja DNA to proces biosyntezy DNA, w wyniku którego z jednej dwuniciowej cząsteczki DNA powstają dwie cząsteczki DNA identyczne pod względem sekwencji nukleotydów. Do każdej z dwóch „starych” nici DNA zostaje dobudowana „nowa” nić. W wyniku tego procesu ilość DNA w komórce zostaje podwojona.

Na poniższym rysunku nr 2 przedstawiono prawidłową dystrybucję materiału genetycznego (c) w trakcie cyklu komórkowego związanego z podziałem:

Obraz zawierający tekst, diagram, zrzut ekranu, linia

Opis wygenerowany automatycznie

4c

2c

Rys. 2. Ilość DNA w komórce diploidalnej przed replikacją jest określana jako 2c i ulega zmianie w trakcie cyklu komórkowego. Podczas interfazy i podziałów zmienia się ilość materiału genetycznego, natomiast ploidalność komórki zależy od stopnia ploidalności komórki rodzicielskiej. Jeżeli w podział mitotyczny wchodzi komórka diploidalna zawierająca podwójny zestaw chromosomów (oznaczana jako 2n), to nowo powstałe komórki również będą diploidalne. Podczas fazy S – replikacji – dochodzi do podwojenia ilości DNA z 2c do 4c w komórce diploidalnej.

Obraz zawierający tekst, diagram, linia, Wykres

Opis wygenerowany automatycznie Obraz zawierający tekst, szkic, zrzut ekranu, czarne i białe

Opis wygenerowany automatycznie

Rys. 3. Obraz nieprawidłowej dystrybucji materiału genetycznego. Po fazie G2/M następuje kumulacja materiału genetycznego obrazująca na poliploidalność komórek – mutacja zespołu chromosomów – poliploidalność.

**-KONIEC PROTOKOŁU-**