

# Detekce apoptózy

PharmDr. Zuzana Soldánová

# Získané vlastnosti maligního nádoru

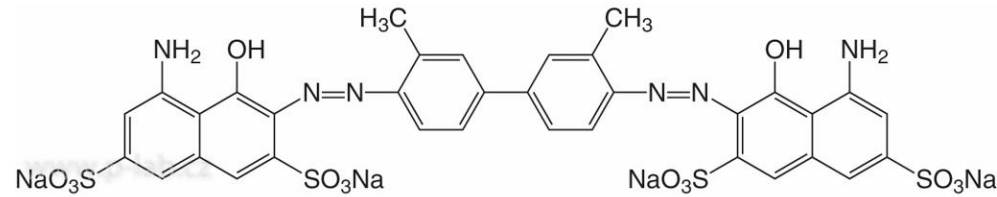
- Soběstačnost v produkci růstových signálů (aktivace H-ras)
- Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus (ztráta RB)
- **Poškození apoptózy (produkce IGF)**
- Neomezený replikační potenciál (aktivace telomerázy)
- Posílení angiogeneze (produkce VEGF)
- Tvorba metastáz (inaktivace E-kadherinu)

# Metody detekce apoptózy

- Barvení buněk trypanovou modří
- Konfokální mikroskopie
- Western blotting
- Průtoková cytometrie

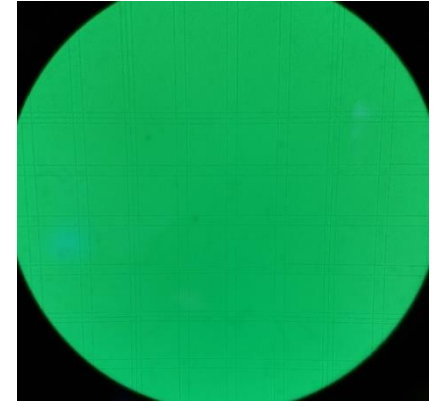
# Barvení buněk trypanovou modří

– Trypanová modř



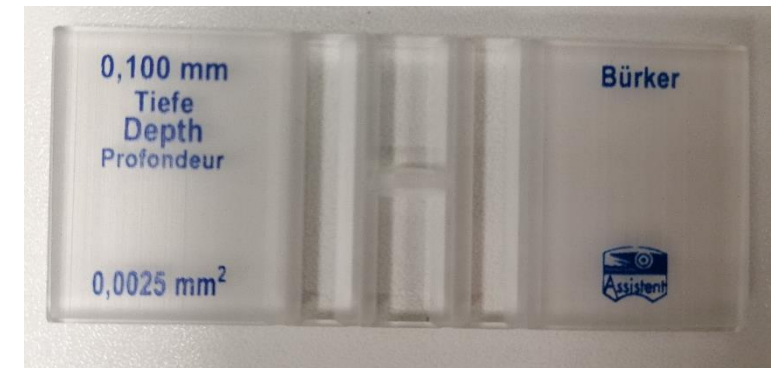
Zdroj: <https://www.p-lab.cz/modr-trypanova>

– proniká do mrtvých buněk

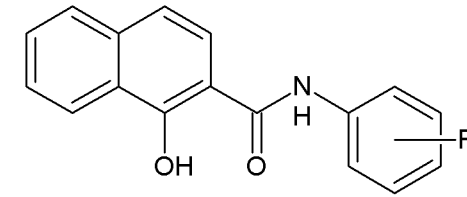


– nelze rozlišit apoptózu od nekrózy

– světelný mikroskop a Bürkerova komůrka



# Konfokální mikroskopie



– acridine orange / Ethidium

bromide staining test

– ranná fáze apoptózy

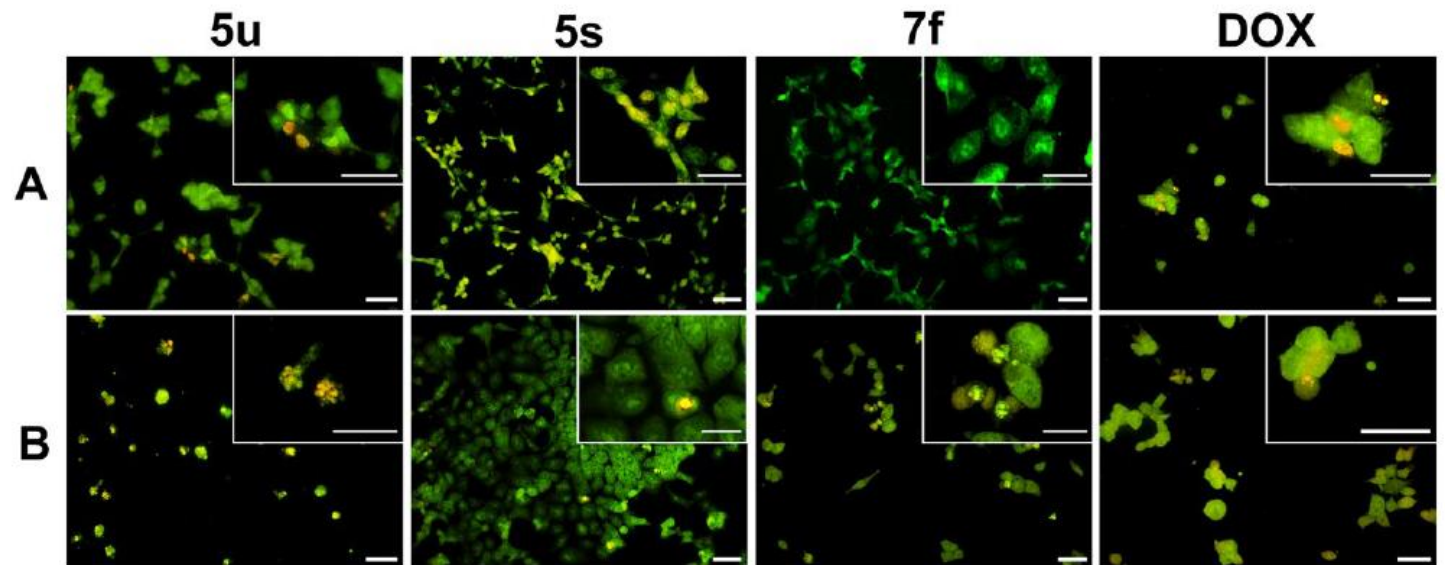
– zelené a žluté buňky

- zelené tečky v jádře naznačují kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra

– pozdní fáze apoptózy

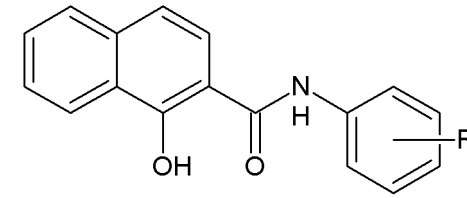
– oranžové buňky

- jádro je již kondenzované a fragmentované



*Zdroj: Spaczyńska E. et al. 2019.*

# Western blotting



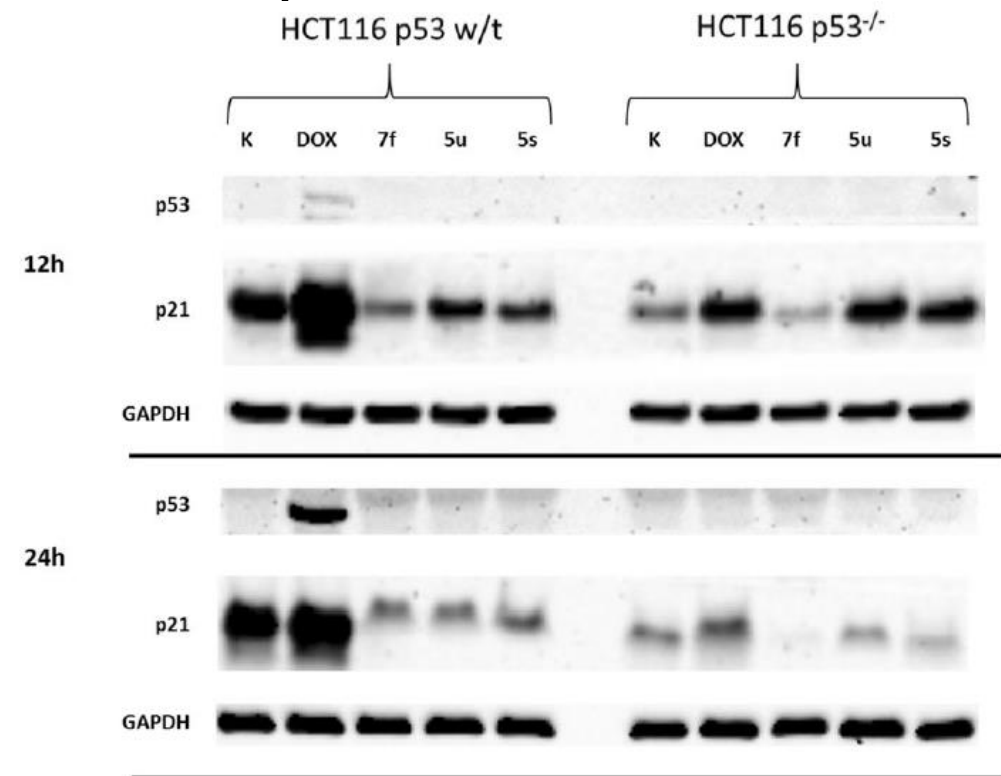
– izolace celkového proteinu z buněk a rozdělení proteinů na polyakrylamidovém gelu podle velikosti

– inkubace s protilátkou

- přítomnost proteinu
- možné určit množství při porovnání s jiným vzorkem na téže membráně

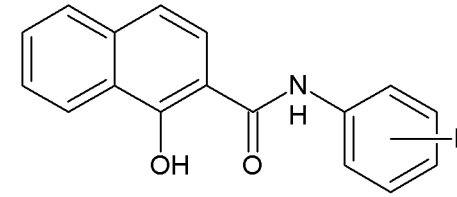
– markery apoptózy

- **BIM** (proapoptotický protein z rodiny Bcl-2)
- **kaspázy, prokaspázy** (štěpení)
- **PARP** (ve své štěpené formě)



Zdroj: Spaczyńska E. et al. 2019.

# Průtoková cytometrie

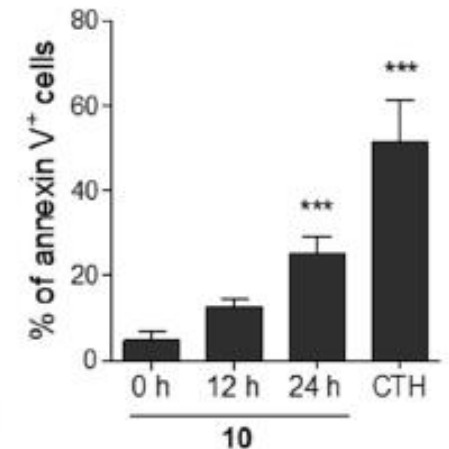
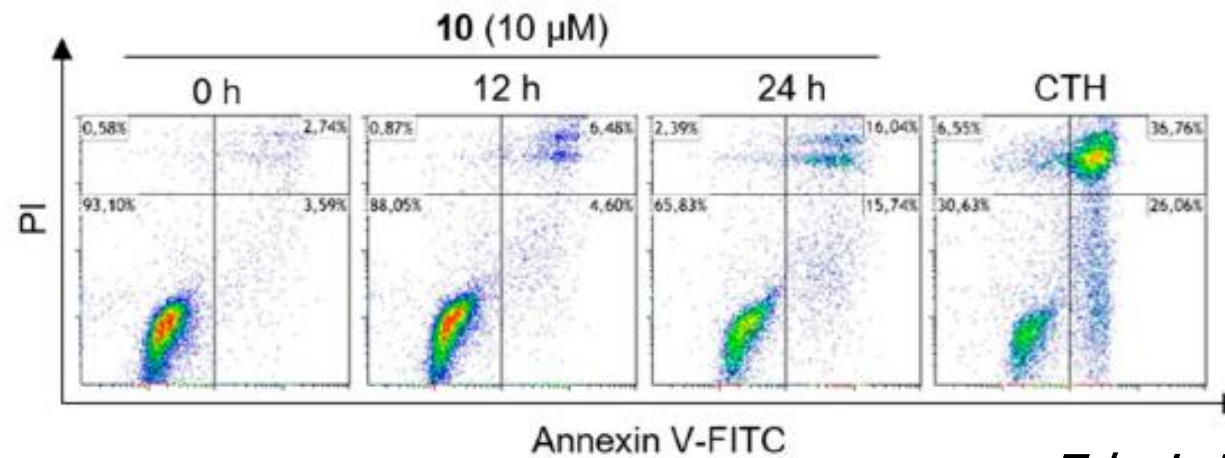


– analýza velkého množství buněk

– lze rozlišit:

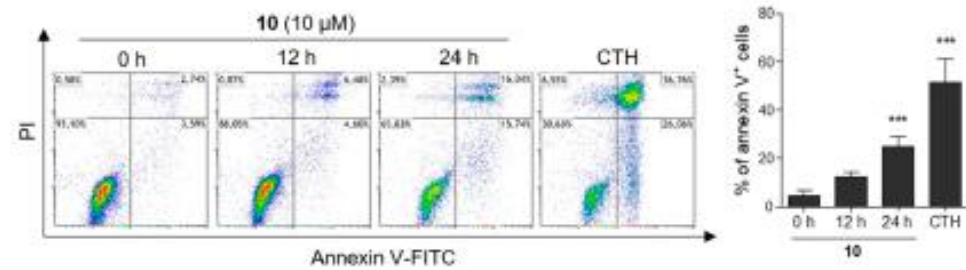
- velikost
- tvar
- fluorescenční barvičku (propidium jodid nebo DAPI)
- expresi povrchových proteinů
- expresi intracelulárních proteinů

obarveno Annexin V-FITC  
a  
propidium jodidem (PI)

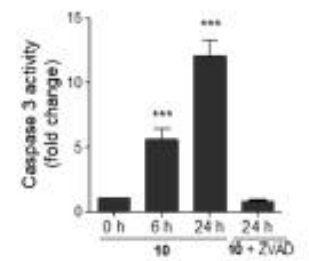


Zdroj: Kauerová et al., 2020.

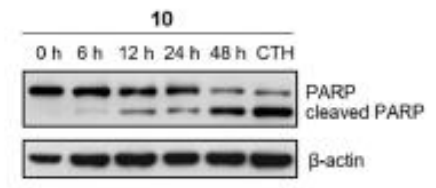
# Příklad



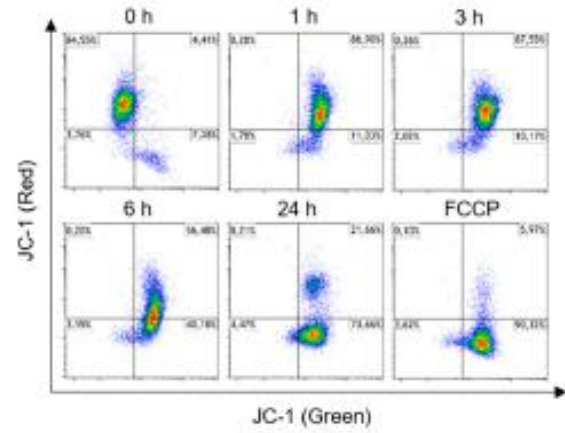
(a)



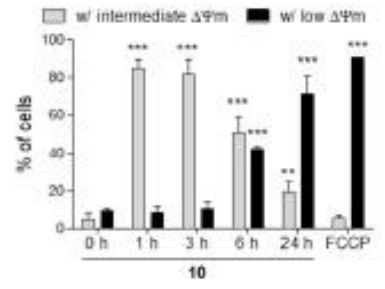
(b)



(c)



(d)





**MUNI**  
**PHARM**

**Děkuji za pozornost**

[SoldanovaZ@pharm.muni.cz](mailto:SoldanovaZ@pharm.muni.cz)

# Zdroje

- Spaczyńska E, Mrozek-Wilczkiewicz A, Malarz K, Kos J, Gonec T, Oravec M, Gawecki R, Bak A, Dohanosova J, Kapustikova I, Liptaj T, Jampilek J, Musiol R. **Design and synthesis of anticancer 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides with a p53 independent mechanism of action.** Sci Rep. 2019 Apr 23;9(1):6387. doi: 10.1038/s41598-019-42595-y. PMID: 31011161; PMCID: PMC6476888.
- Kauerová T, Goněc T, Jampílek J, Hafner S, Gaiser AK, Syrovets T, Fedr R, Souček K, Kollar P. **Ring-Substituted 1-Hydroxynaphthalene-2-Carboxanilides Inhibit Proliferation and Trigger Mitochondria-Mediated Apoptosis.** Int J Mol Sci. 2020 May 12;21(10):3416. doi: 10.3390/ijms21103416. PMID: 32408543; PMCID: PMC7279329.