

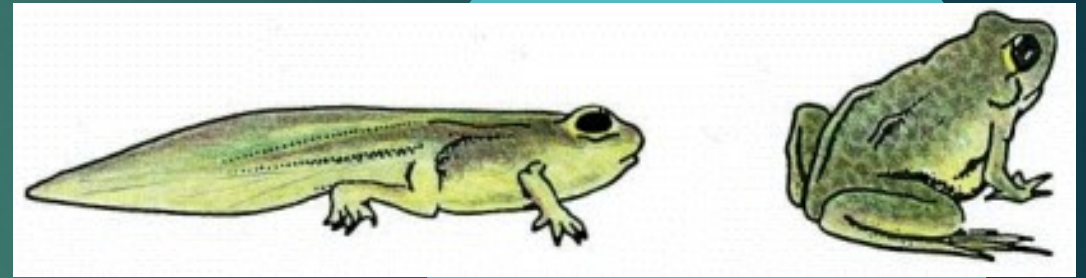
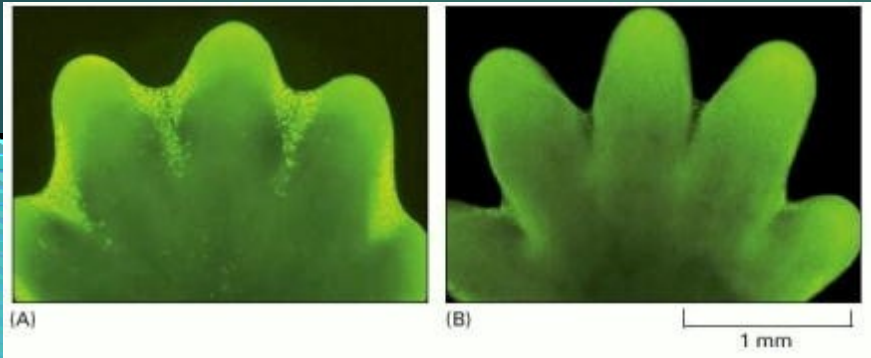


Metódy detekcie apoptózy cytotoxickými látkami u nádorových buniek



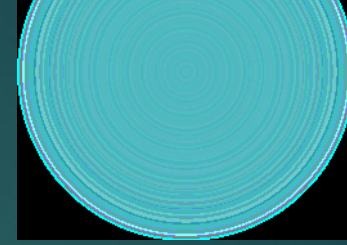
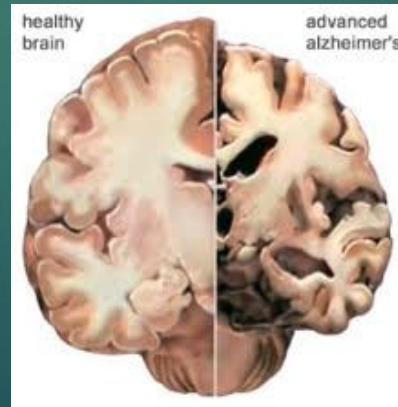
Apoptóza je fyziologický proces

- embryogenéza
- organogenéza
- odstránenie škodlivých buniek

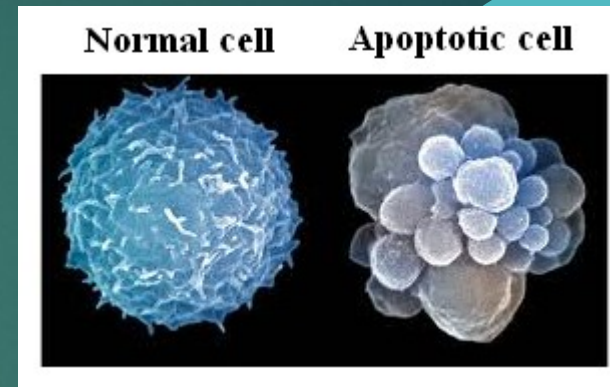
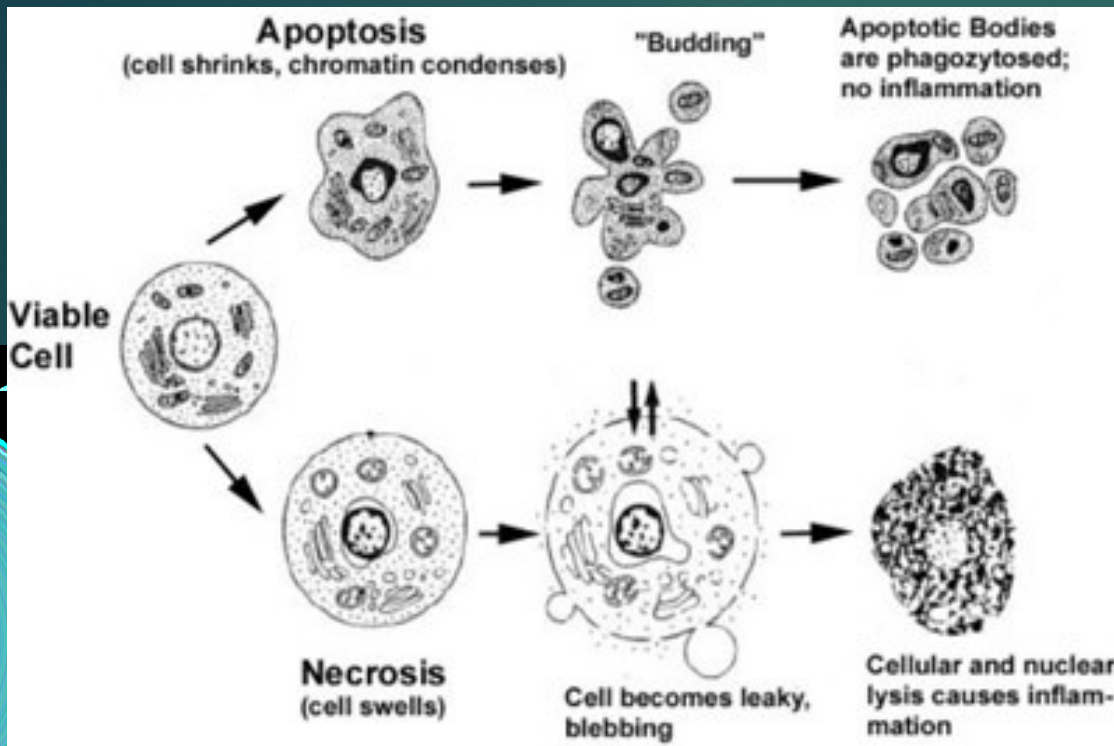


Zmeny v regulácii apoptózy sú patologické

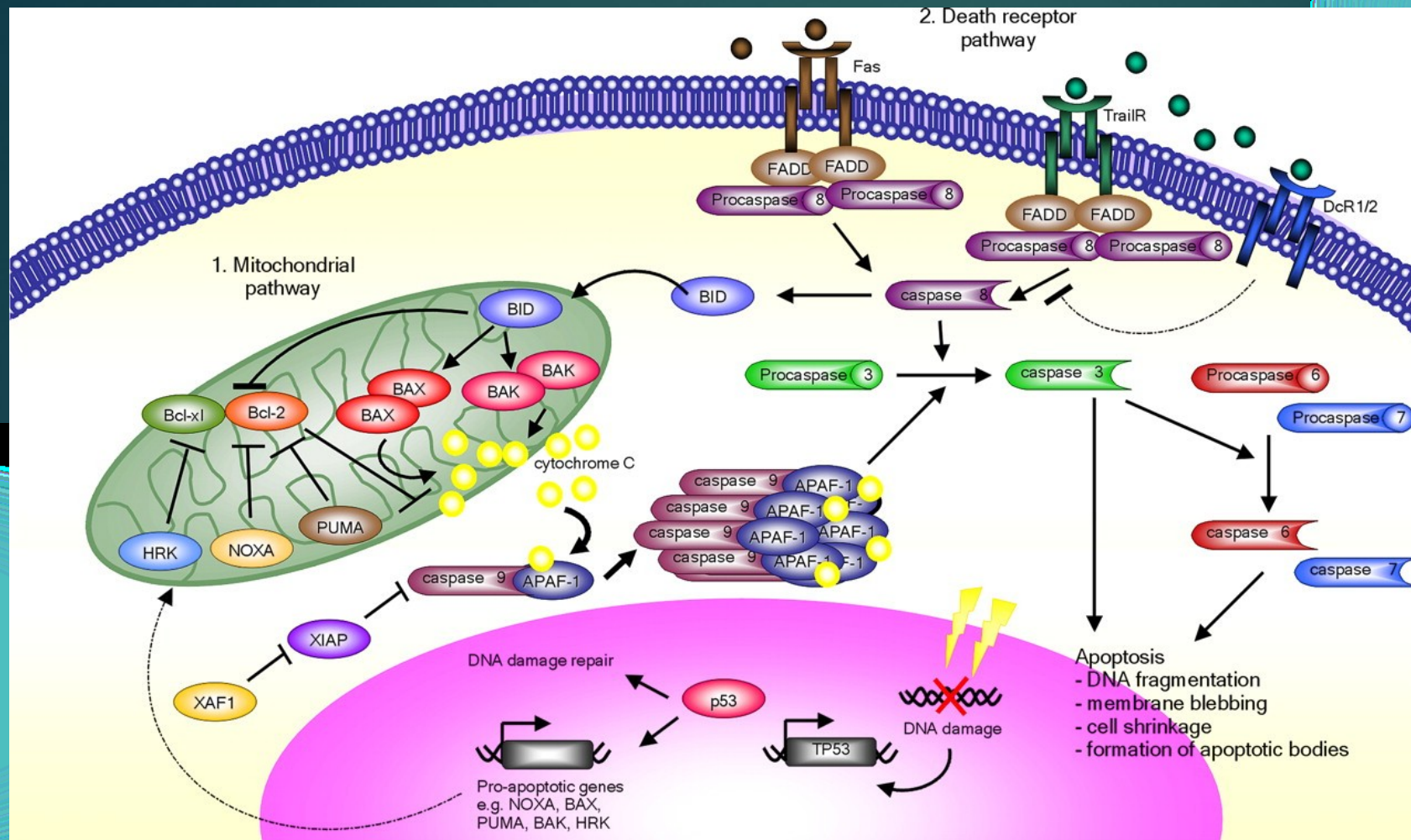
- znížená vs. zvýšená miera apoptózy



Apoptóza a nekróza



+ ďalšie typy b. smrti: anoikis, aponekróza, nekroptóza, mitotická katastrofa, autofagia...



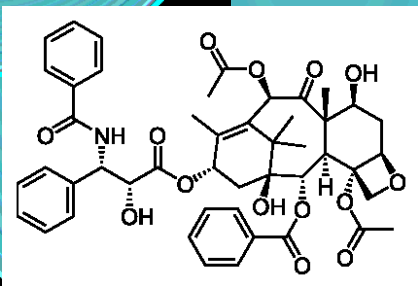
- Iniciačné kaspázy: 8, 9
- Efektorové kaspázy: 3, 6, 7

Cisplatina (CDDP, cis-diamminedichloroplatinum)

- crosslink Pt-DNA, následkom je inhibícia bunkového rastu a apoptóza

Etoposide

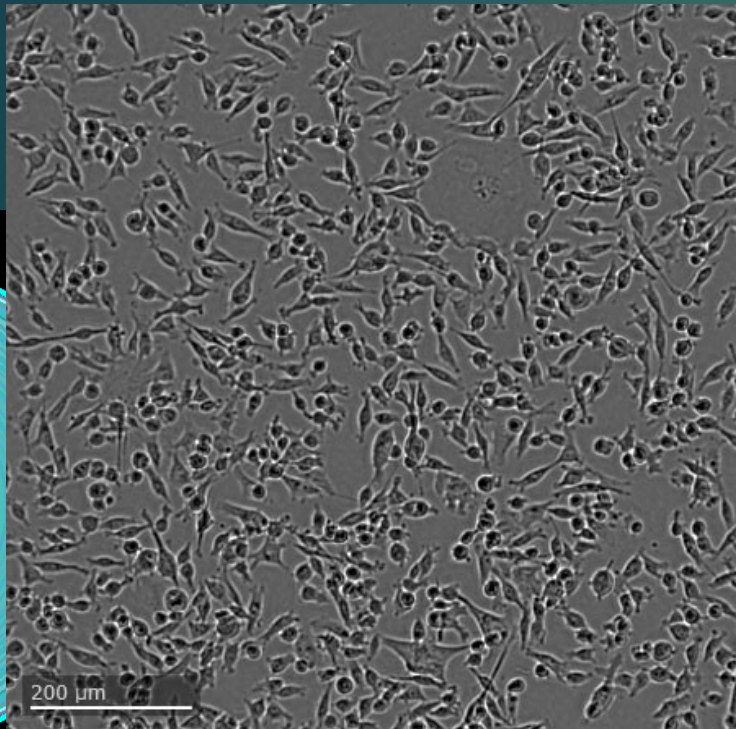
- inhibítor DNA topoizomerázy II – vytvorenie zlomov vlákien DNA a následná apoptóza



Paclitaxel (taxol)

- tzv. mitotický jed, bráni depolymerizácii mikrotubulov, následkom je zástava bunkového cyklu a apoptóza

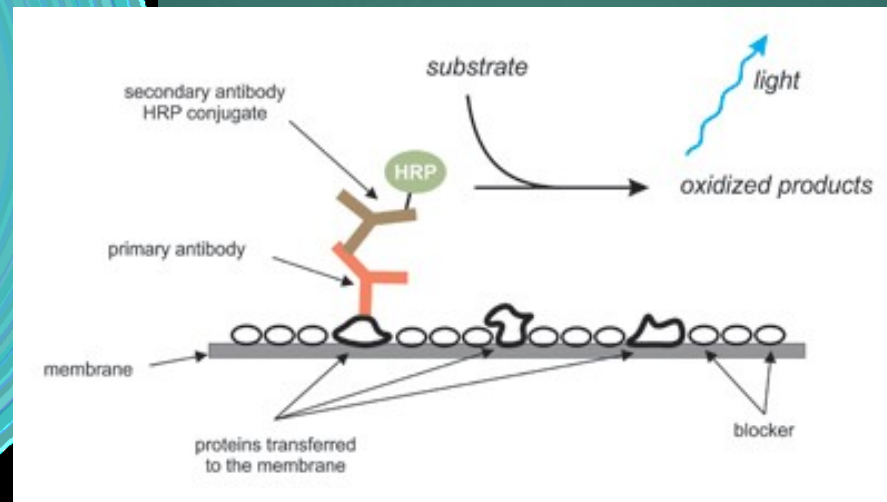
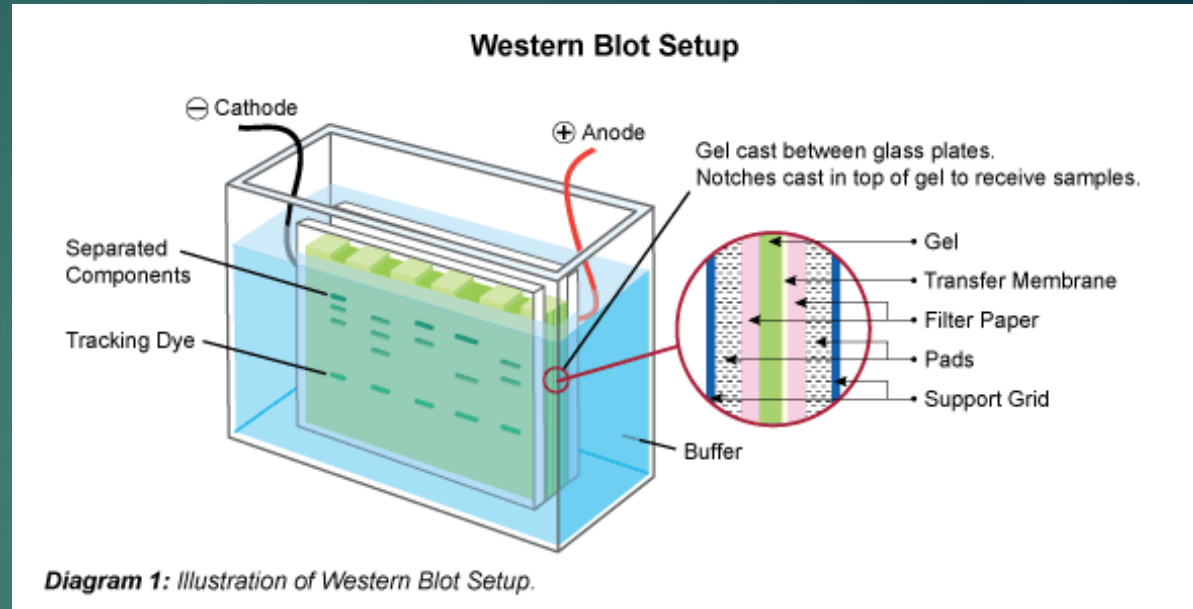
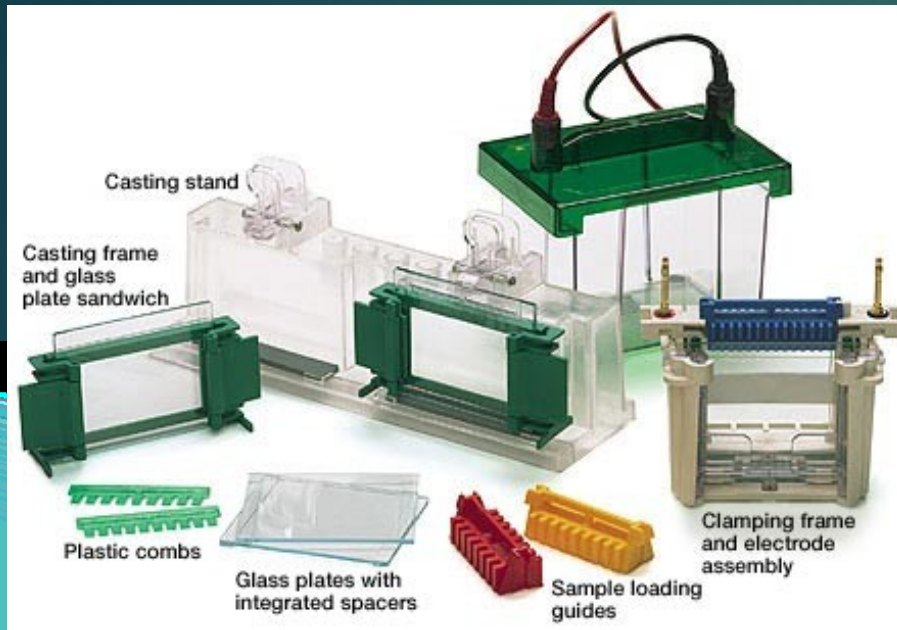
MDA-MB-231



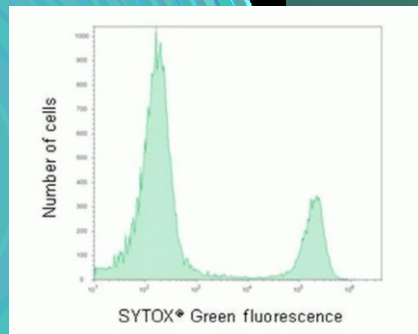
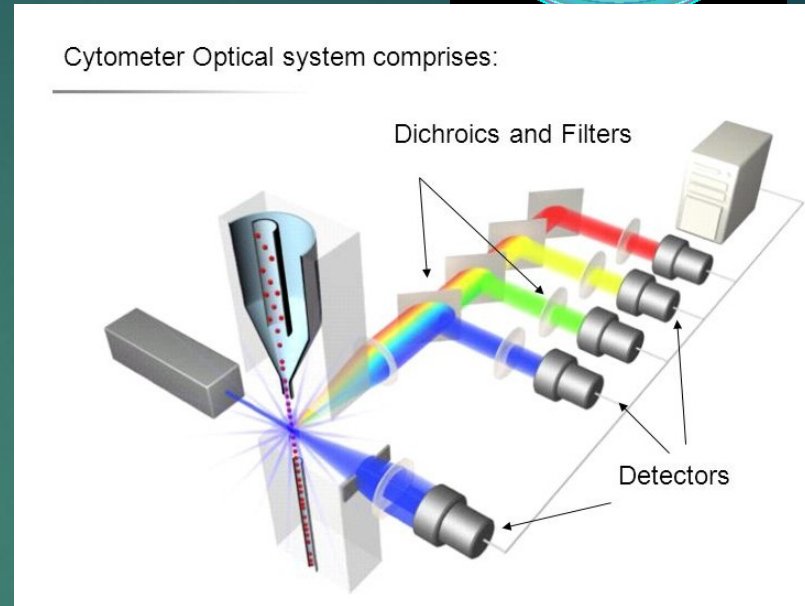
<http://www.solentim.com/products/cell-gallery/cell-gallery-mdamb231/>

kultivácia v RPMI 1640 (Sigma)
+ 10% fetálne bovinne sérum (FBS)
+ 2 mM L-glutamín
+ Pen/strep = penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 μg/ml)

1. SDS PAGE elektroforéza a westernový prenos → detekcia prítomnosti štiepenej kaspázy 8

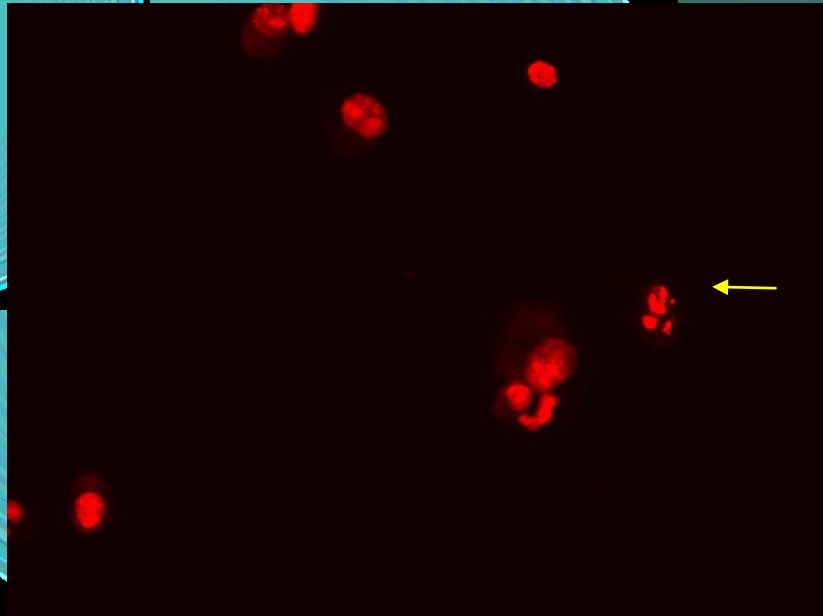
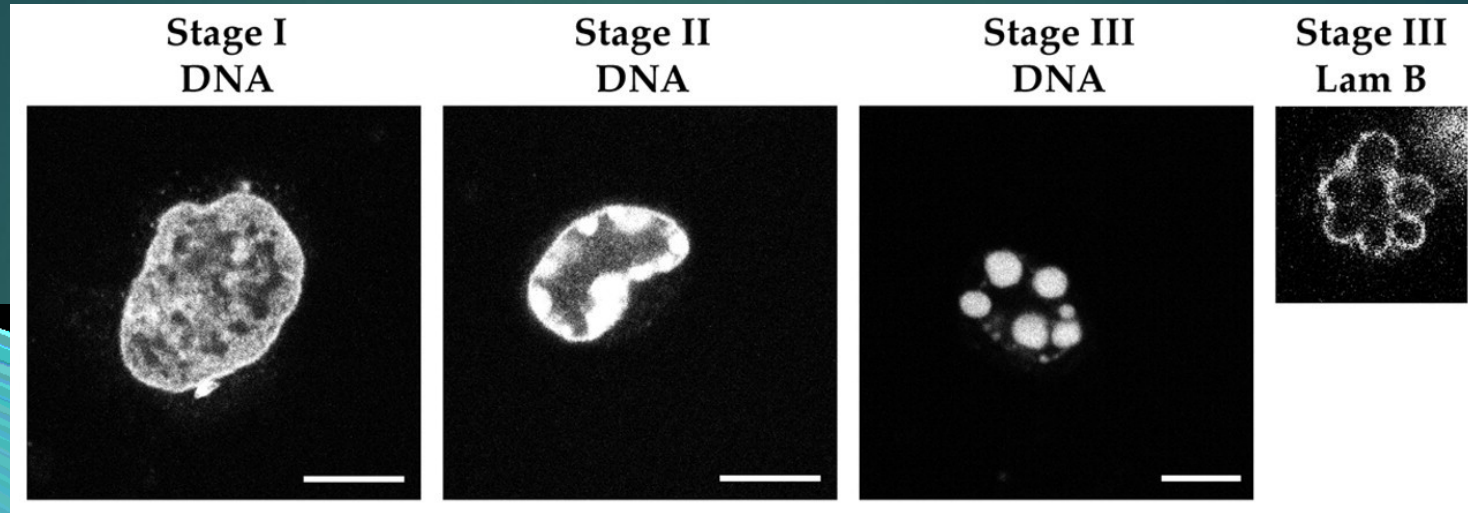


2. Detekcia mŕtvych buniek pomocou farbenia sytox green a cytometru

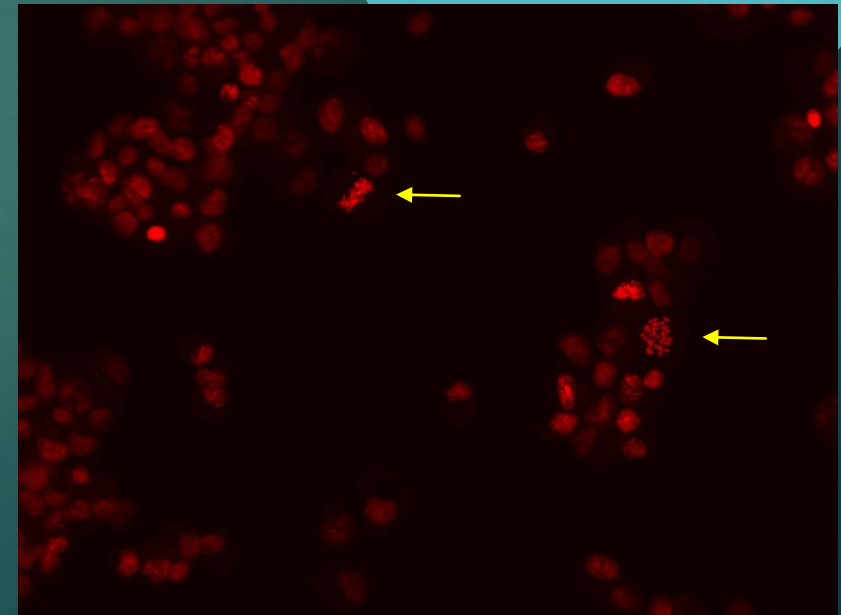


- + jednoduchá a rýchla metóda
- Jednoduché farbenie nerozlíši rôzne formy bunkovej smrti

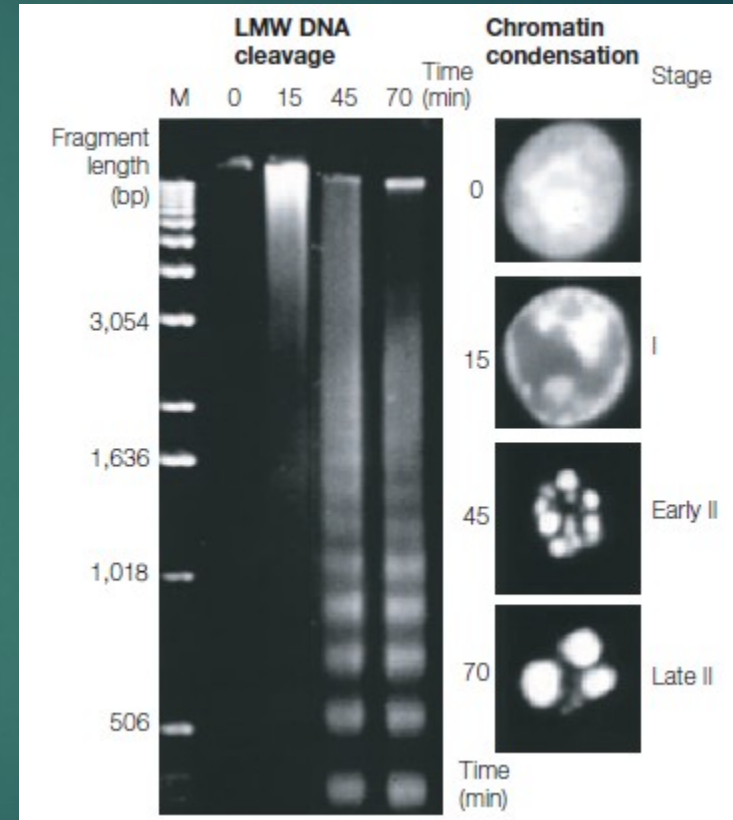
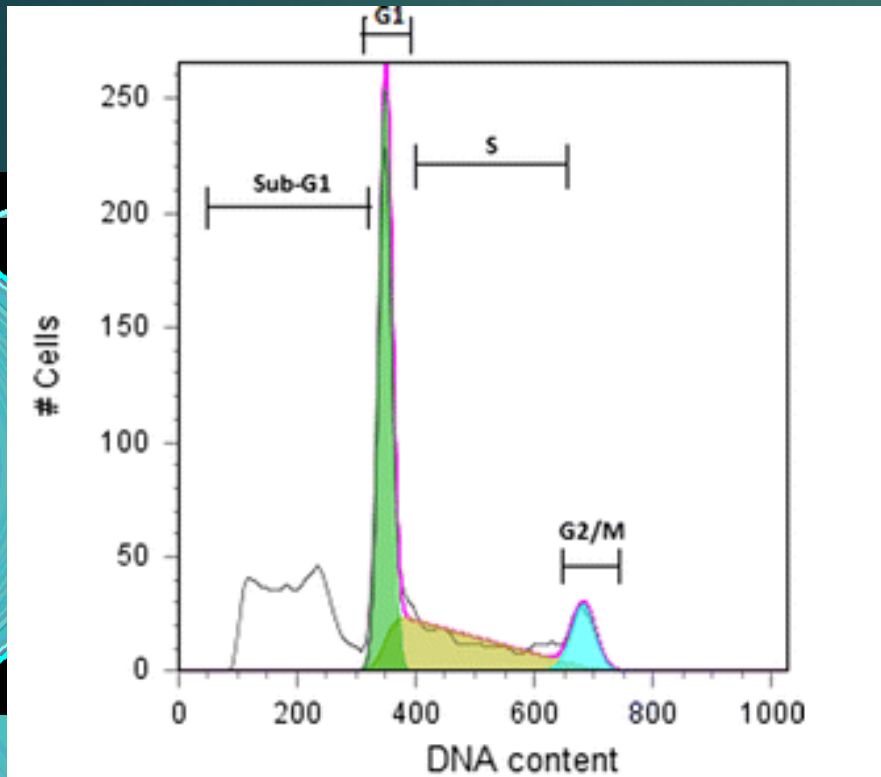
3. Farbenie nukleových kyselín propidium iodidom - vyhodnotenie prítomnosti apoptotických jadier pod fluorescenčným mikroskopom.



* apoptóza vs. mitóza



4+5. Stanovenie subG1 fázy bunkového cyklu prietokovou cytometriou, detekcia fragmentovanej DNA na agarózovom gelu



* V praxi – obdobné testy fragmentácie/integrity DNA u spermii (TUNEL)