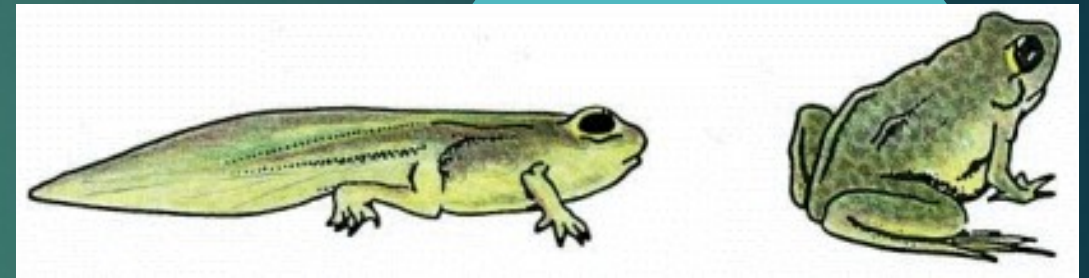
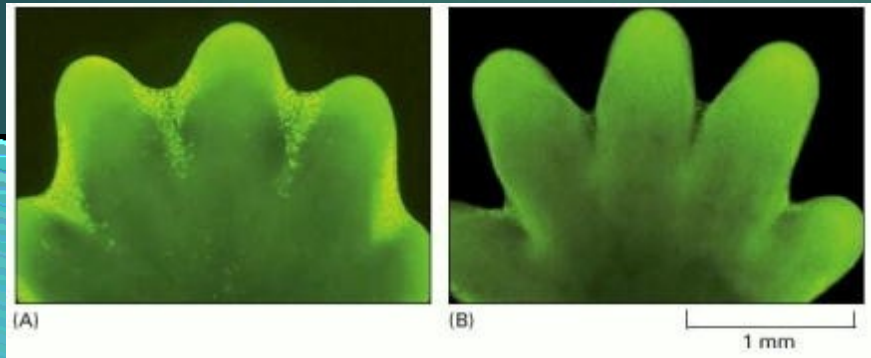


Metody detekce buněčné smrti (apoptózy) u nádorových buněk

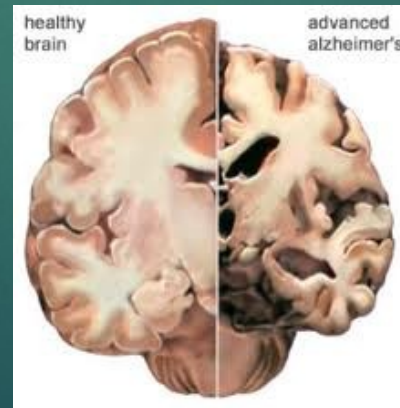
Apoptóza je fyzilogický proces

- embryogeneze / organogeneze
- odstranění poškozených a nefunkčních buněk

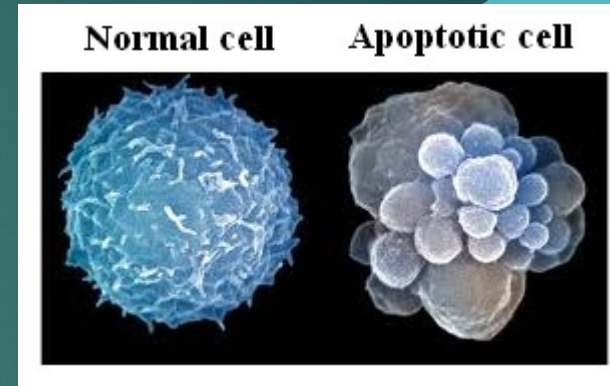
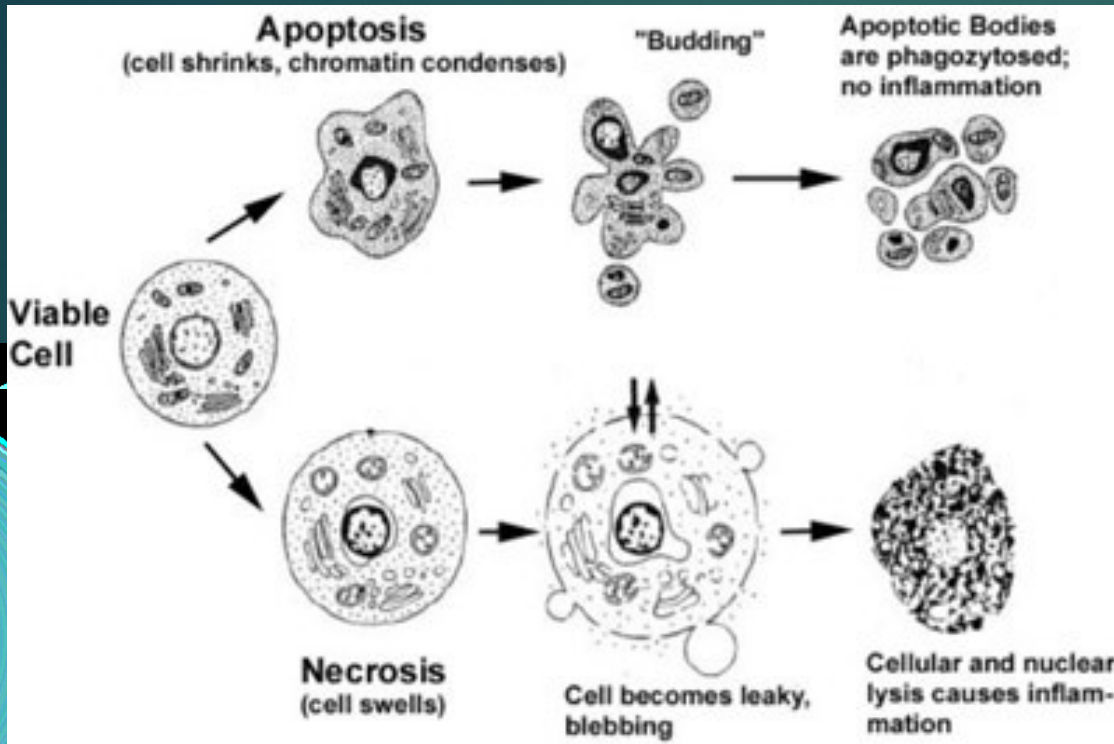


Změny v regulaci apoptózy jsou patologické

- snížená vs. zvýšená míra apoptózy v různých tkáních

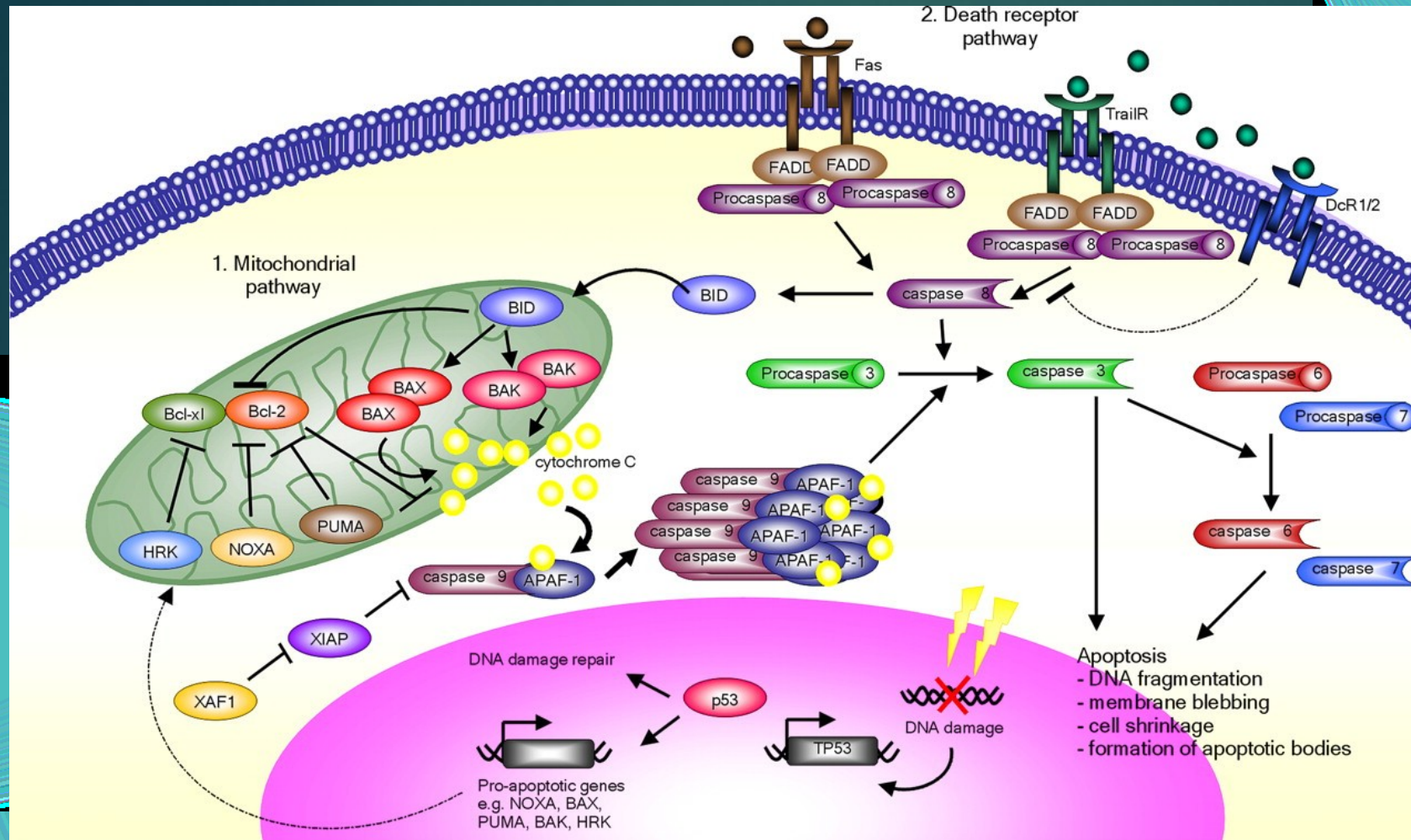


Apoptóza vs. nekróza



+ další typy b. smrti: anoikis, aponekróza, nekroptóza, mitotická katastrofa, autofagie...

Apoptóza je regulovaný proces – velký význam buněčné signalizace



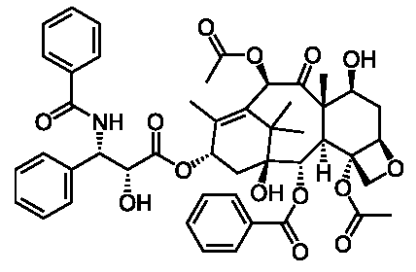
- kaspázy = proteázy
- iniciační kaspázy: 8, 9
- efektorové kaspázy: 3, 6, 7

Cisplatina (CDDP, cis-diamminedichloroplatinum)

- crosslink Pt-DNA, poškození DNA, inhibice buněčného cyklu, apoptóza

Etoposide

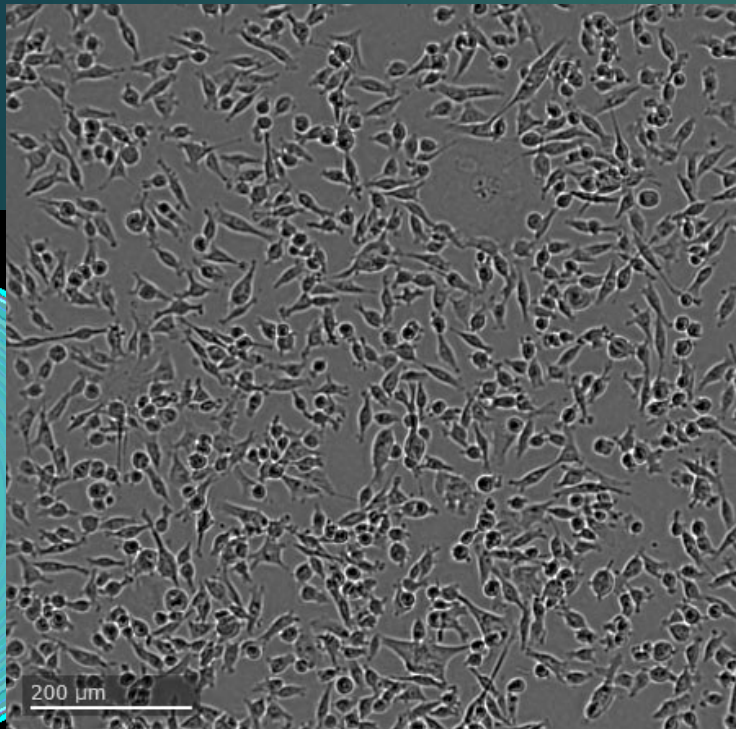
- inhibitor DNA topoizomerázy II – zlomy DNA a následná apoptóza



Paclitaxel (taxol)

- tzv. mitotický jed, brání depolymerizaci mikrotubulů, zástava buněčného cyklu a apoptóza

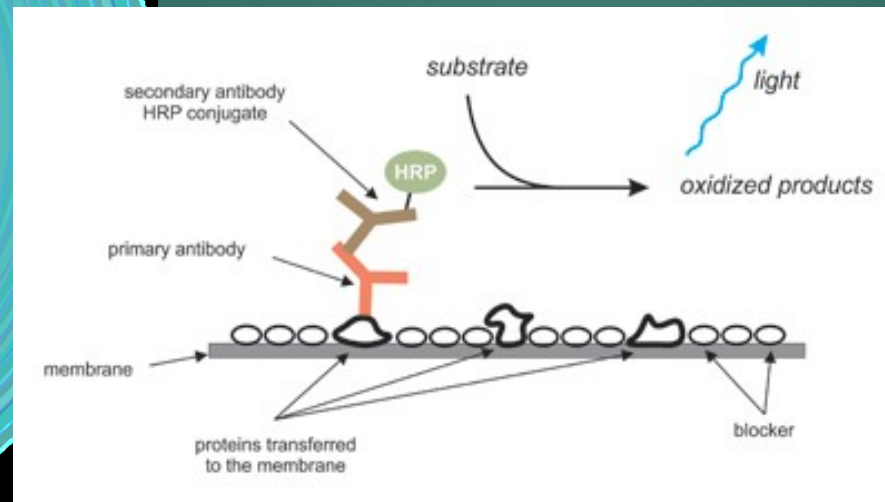
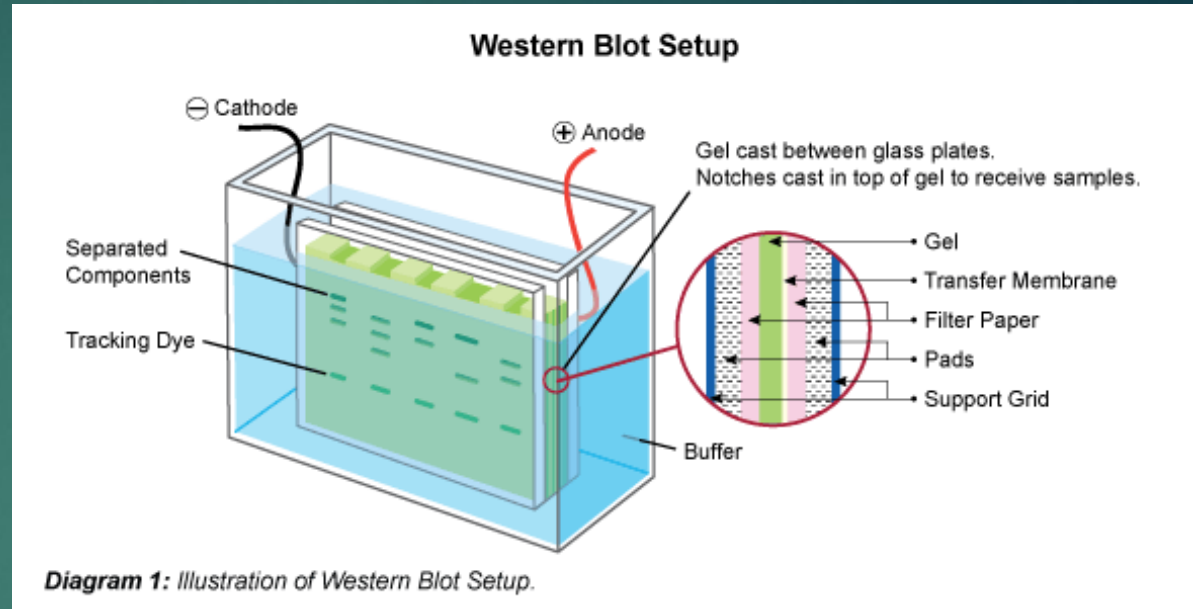
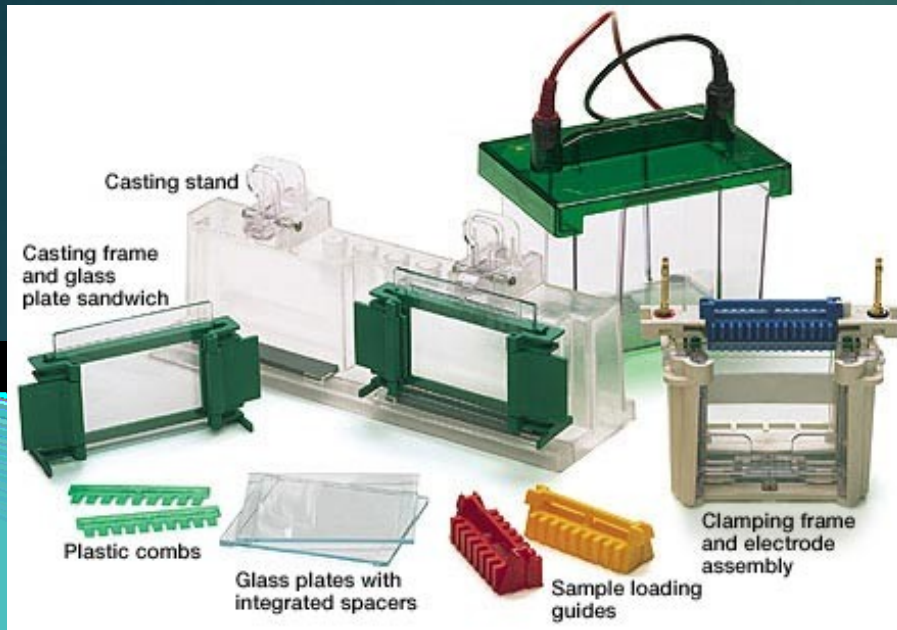
MDA-MB-231



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

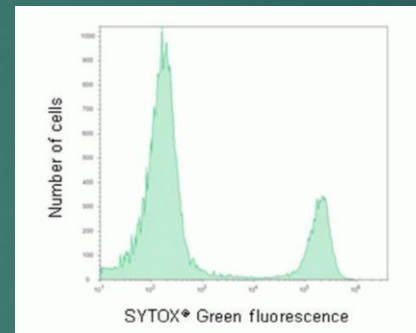
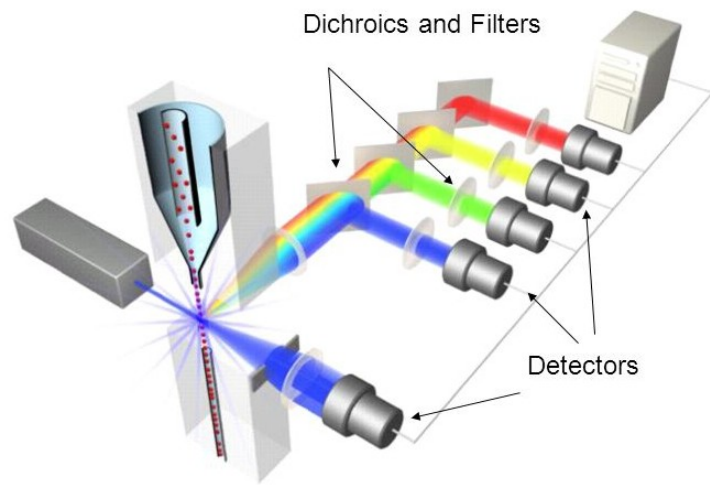
kultivace v médiu RPMI 1640 (Sigma)
+ 10% fetální bovinní sérum (FBS)
+ 2 mM L-glutamin
+ Pen/strep = penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 μg/ml)

1. SDS PAGE elektroforéza a westernový přenos - detekce štěpeného proteinu PARP



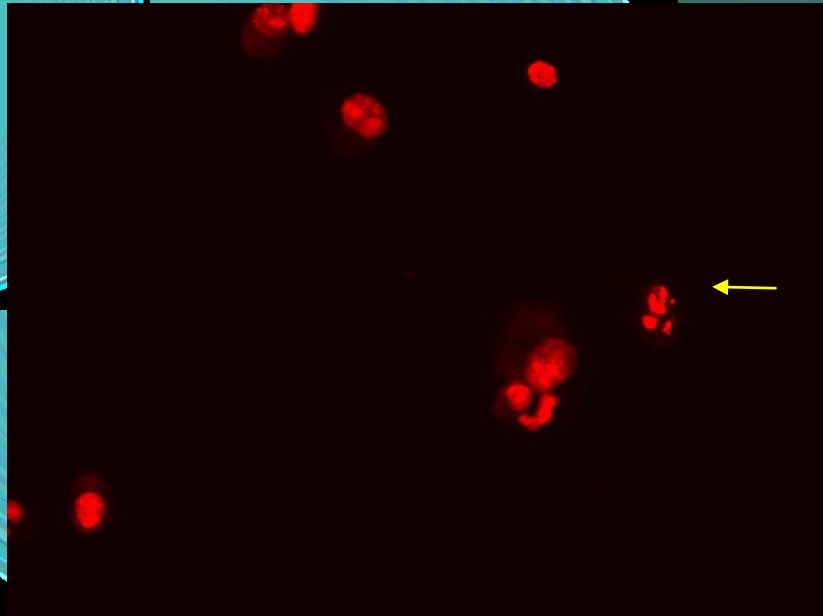
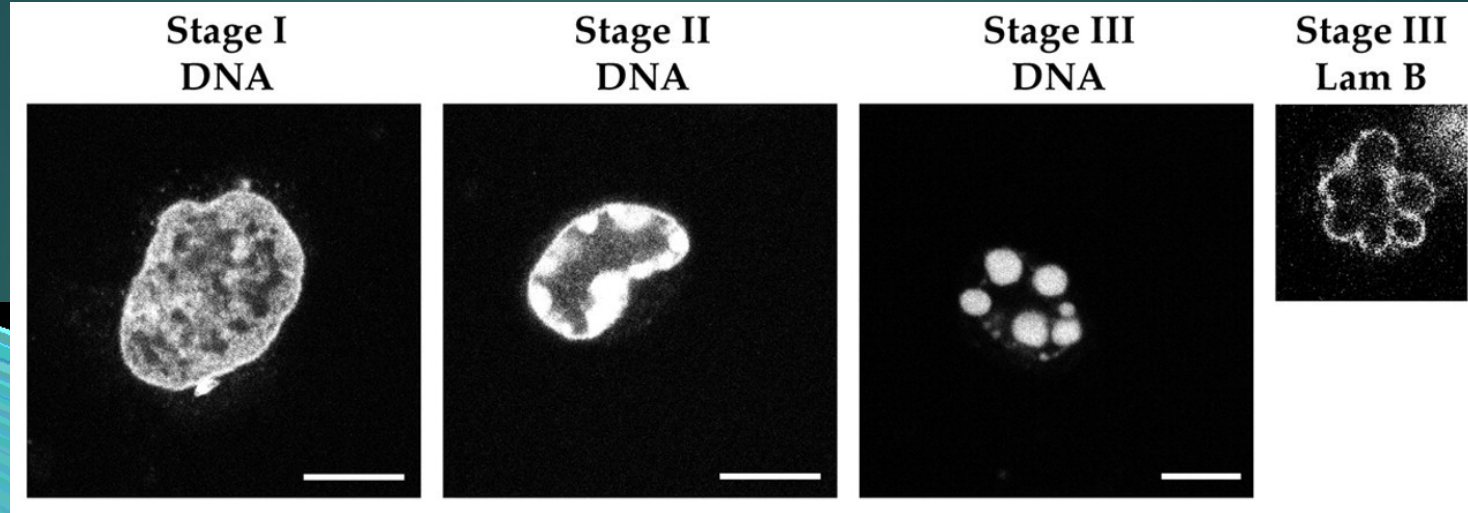
2. Detekce mrtvých buněk prostřednictvím SYTOX Green Nucleic Acid Stain a průtokového cytometru

Cytometer Optical system comprises:

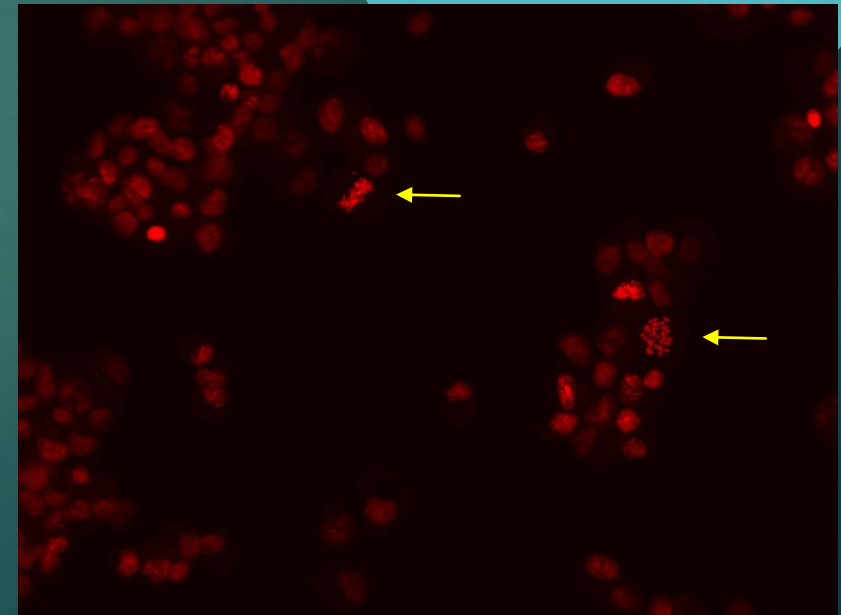


- + jednoduchá a rychlá metoda
- nerozlišíme jednotlivé typy buněčné smrti

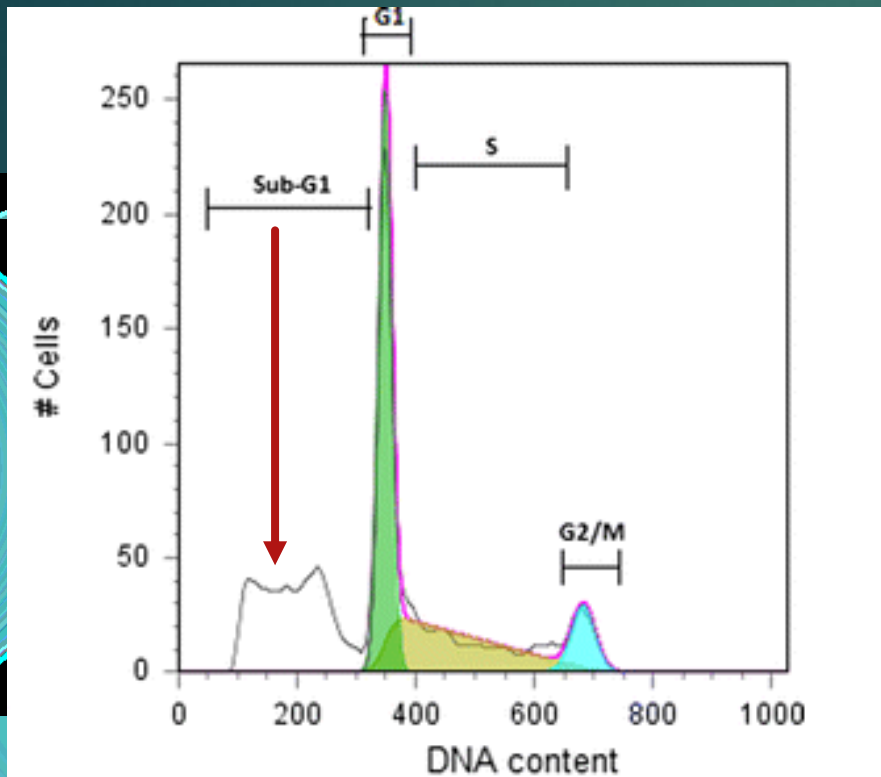
3. Barvení nukleových kyselin propidium jodidem (interkalační činidlo) –
vyhodnocení počtu apoptotických jader pomocí fluorescenčního mikroskopu



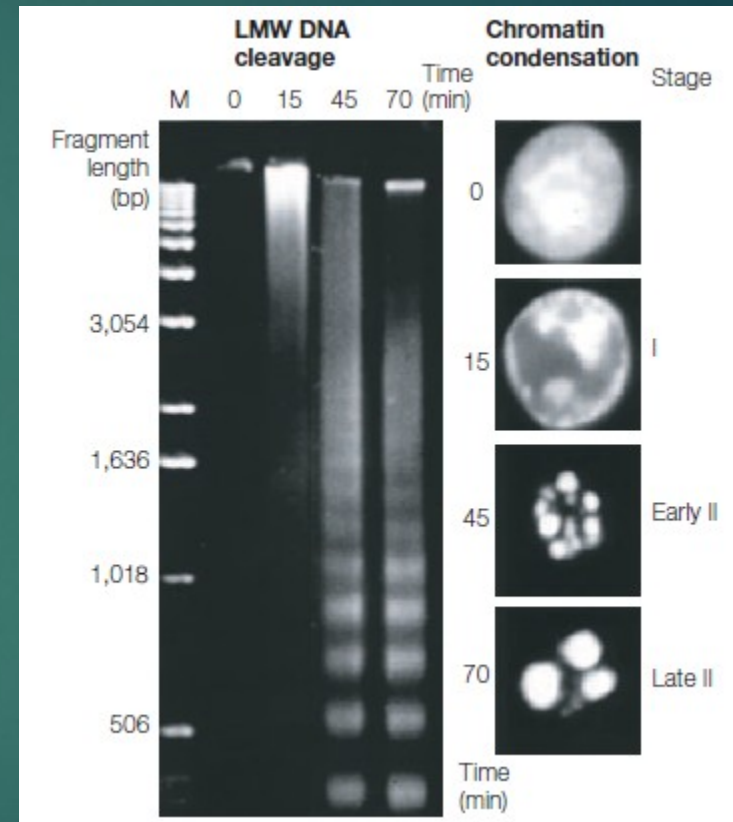
apoptóza vs. mitóza



4. Stanovení subG1 fáze buněčného cyklu na průtokovém cytometru
5. detekce štěpené DNA na agarózovém gelu



subG1 fáze zcela vlevo – nízký obsah DNA



delší kultivace buněk s cytotoxickou látkou = nárůst degradace DNA