

Metody detekce apoptózy indukované cytotoxickými látkami u nádorových buněk

1. Stanovení citlivosti k cytotoxickým látkám pomocí SYTOX™ Green barvení
2. Monitorování cytotoxického účinku látek v reálném čase – xCelligence assay
3. Morfologie apoptotických jader
4. Detekce hladiny p-p53 (S15) pomocí elektroforézy a westernového přenosu
5. Transfekce buněk lipofekcí a stanovení aktivity luciferázy a β -galaktozidázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk
6. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií
7. Měření hladiny kyslíkových radikálů sondami DHE a DCF průtokovou cytometrií

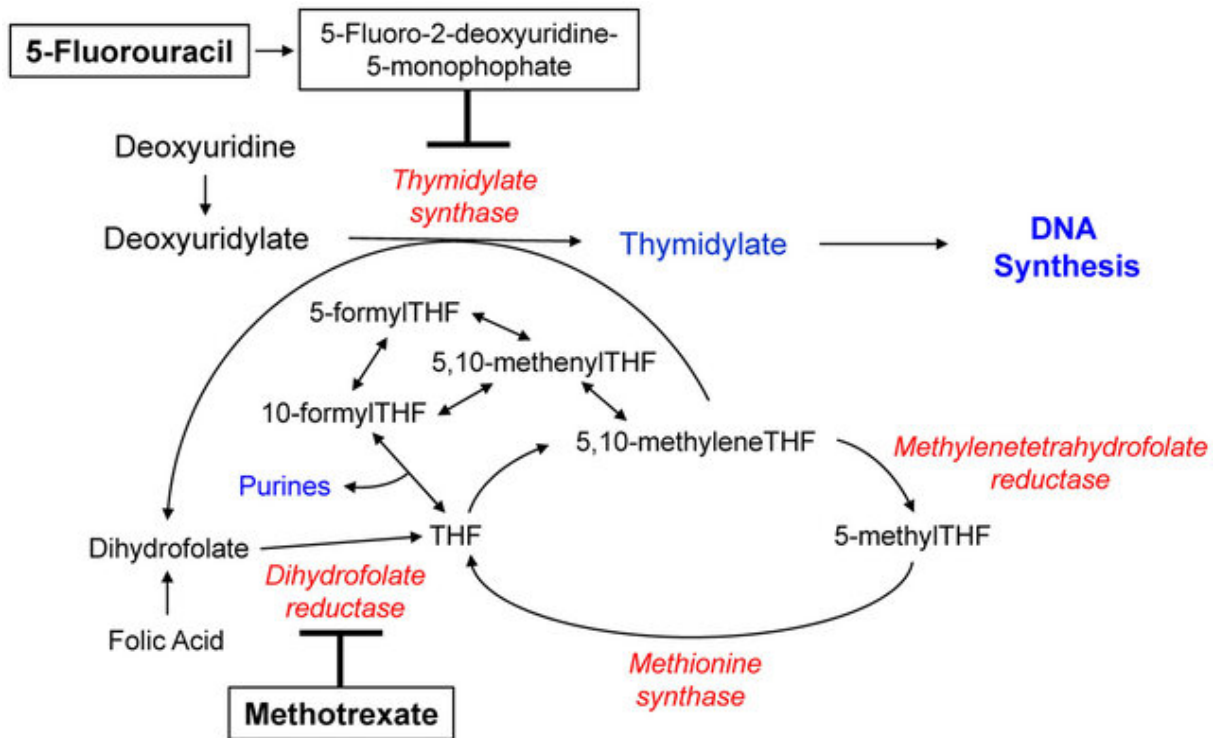
Cíle praktika:

- srovnat odpověď buněčných linií na různé typy chemoterapeutik/induktorů buněčné smrti
- na základě provedených experimentů identifikovat použítá chemoterapeutika a popsat mechanismus jejich účinku

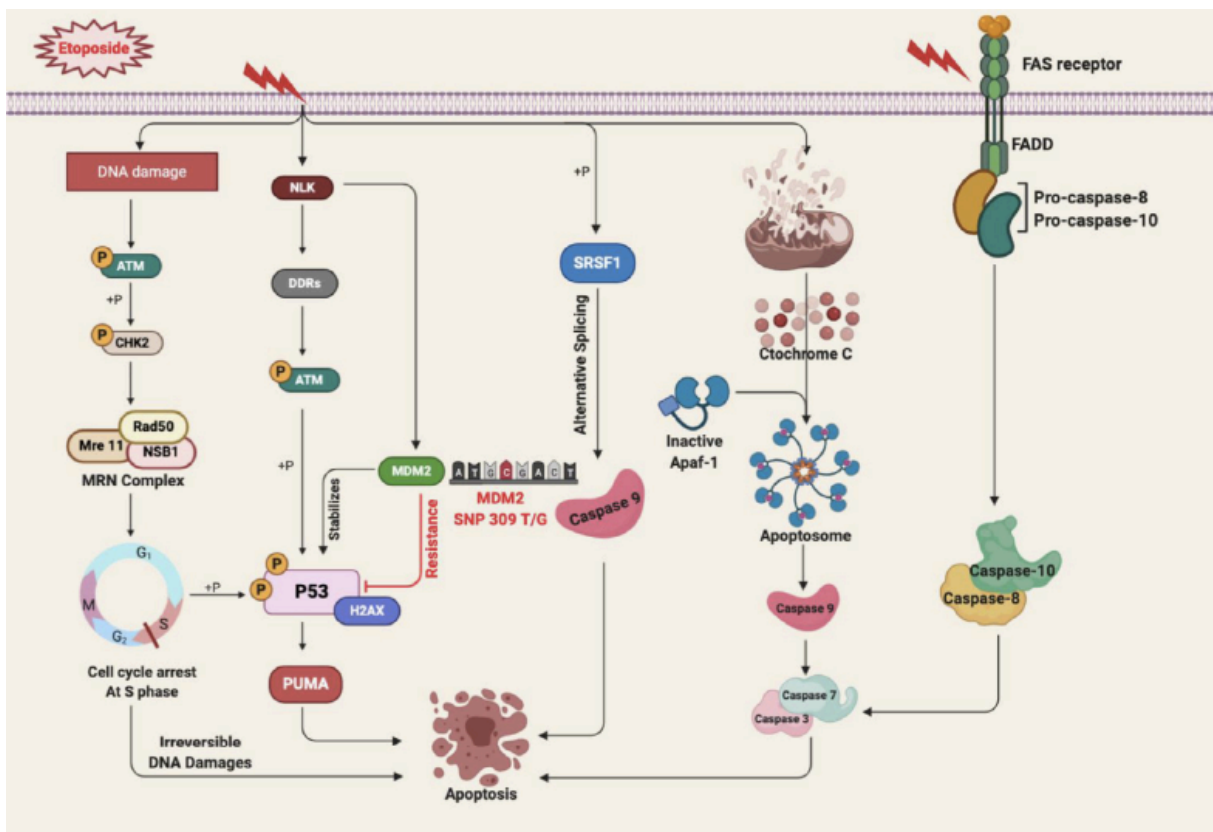
Table 1
The category of chemotherapy drugs.

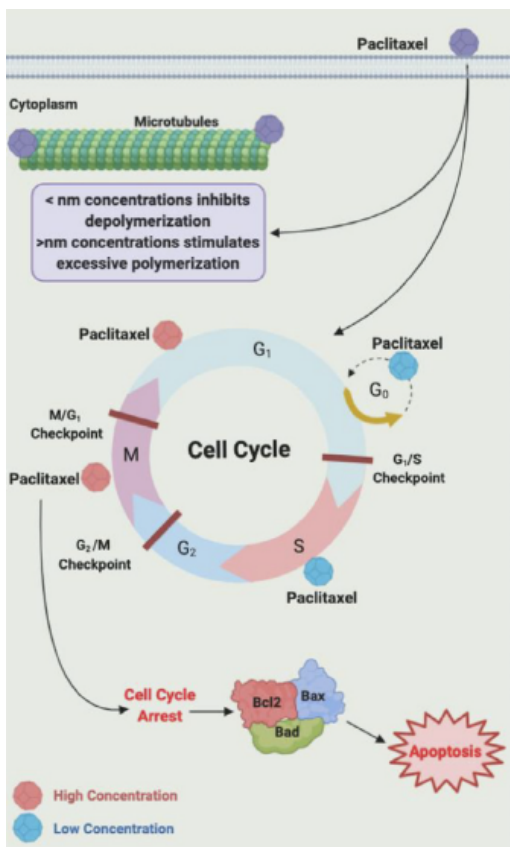
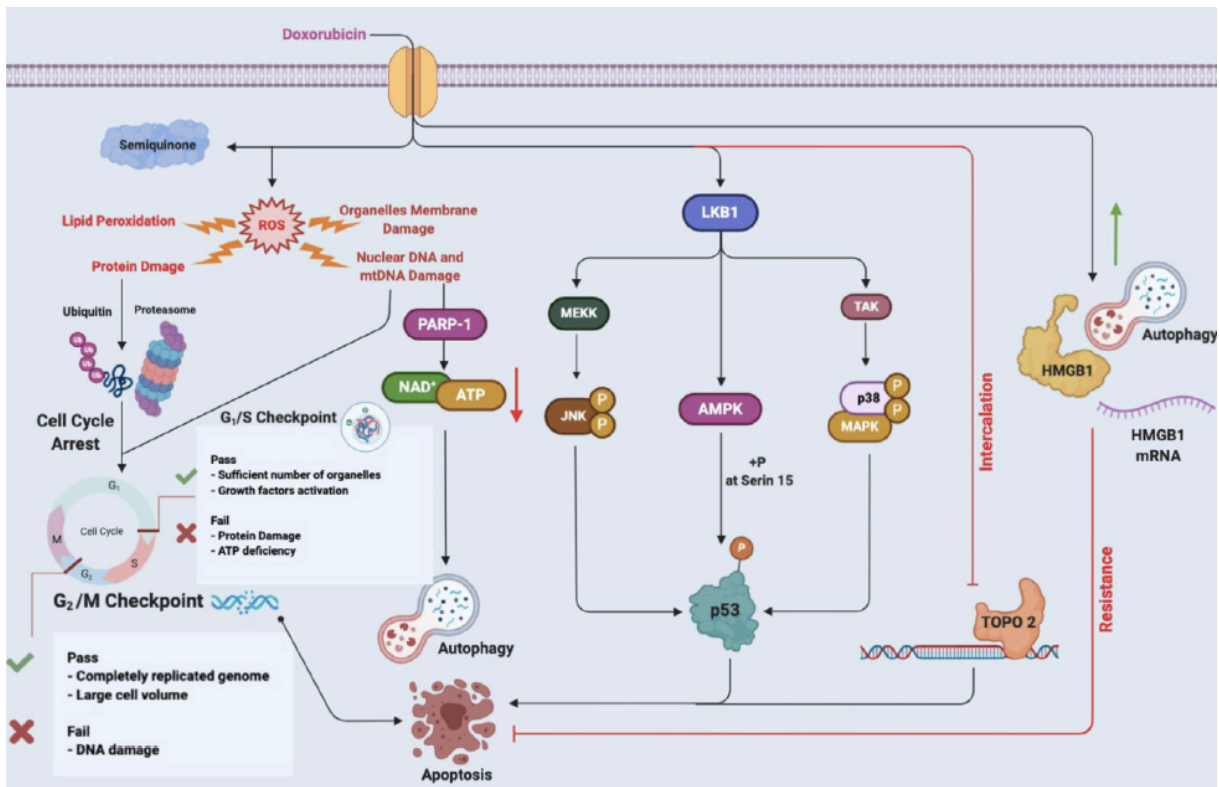
Category	Drugs	Mechanisms of action
Alkylating agents	Alteplamine Busulfan Carboplatin Carmustine Chlorambucil Cisplatin Cyclophosphamide Dacarbazine Lomustine Melphalan Oxaliplatin Temozolomide Thiotepa	Damage the DNA
Antimetabolite	5-fluorouracil (5-FU) 6-mercaptopurine (6-MP) Capecitabine (Xeloda) Cytarabine (Ara-C) Flouxuridine Fludarabine Gemcitabine (Gemzar) Hydroxyurea Methotrexate Pemetrexed (Alimta)	Substitute the RNA and DNA blocks
Anti-tumor Antibiotics	Anthracyclines Epirubicin Idarubicin Daunorubicin Doxorubicin (Adriamycin) non-Anthracyclines Actinomycin-D Bleomycin Mitomycin-C Mitoxantrone	Interfere with the activity of DNA replication enzymes
Topoisomerase inhibitors	Topoisomerase inhibitor I Topotecan Irinotecan (CPT-11) Topoisomerase inhibitor II Etoposide (VP-16) Teniposide Mitoxantrone	Interfere with the topoisomerase enzymes and incorporate the unwinding DNA in replication and transcription
Mitotic inhibitors	Docetaxel Estramustine Ixabepilone Paclitaxel Vinblastine Vincristine Vinorelbine	Hinder the cell proliferation and division
Corticosteroids	Prednisone Methylprednisone (Solumedrol) Dexamethasone (Decadron)	Palliate the chemotherapy side effects
EGFR inhibitors	Tarceva (Erlotinib) Erbix (Cetuximab) Iressa (Gefitinib)	Blocks the epidermal growth factor receptors on tumor cells

Použité induktry buněčné smrti: metotrexát, etoposid, doxorubicin, paclitaxel, cykloheximid



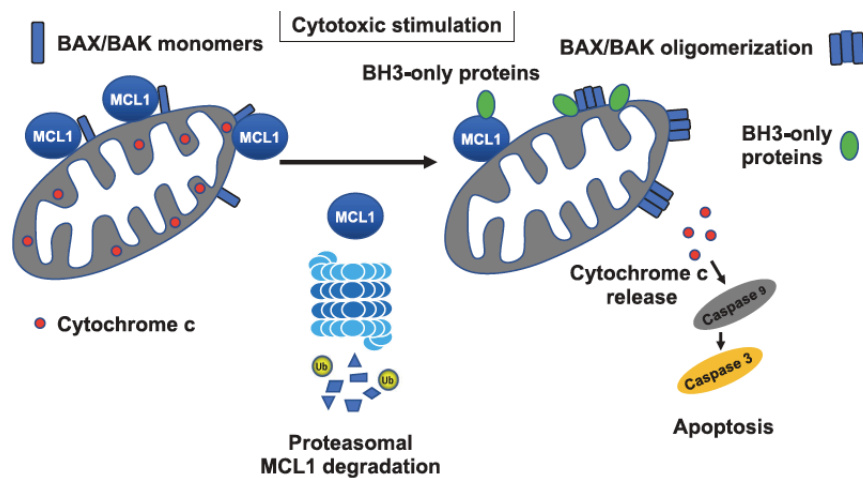
Kim S-E Nutr Res Pract. 2020;14(2):95-101.





Mollaie M et al. *Transl Oncol.* 2021,14(5):101056.

cykloheximid – inhibitor proteosyntézy (blokuje elongační fázi translace) – ne chemoterapeutikum, indukce apoptózy zprostředkovaná snížením hladiny anti-apoptického proteinu Mcl-1, který je méně stabilní a podléhá rychlé degradaci v proteasomu



Rezaeian A-H et al. Acta Mater Med. 2022;1(1):42-55.

Adams K W et al. J Biol Chem. 2007;282(9):6192-200

Goodall K J et al PLoS One. 2016;11(11):e0164003

1. Stanovení citlivosti k cytotoxickým látkám pomocí SYTOX Green barvení

Úvod: Buněčná smrt je definovaná jako nevratná ztráta buněčné integrity. Existuje řada typů buněčné smrti, klasifikujeme je na základě morfologických změn (apoptóza, nekróza, autofagie, atd), biochemických parametrů (aktivace specifických nukleáz, proteáz, ..), funkčních aspektů (náhodná vs programovaná, fyziologická vs patologická). Jedním z molekulárních rysů společných pro všechny typy buněčné smrti je permeabilizace buněčné membrány. Tu můžeme stanovit pomocí barviv, které pronikají do buněk s narušenou integritou membrány a mohou být stanoveny mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií.

SYTOX™ Green Dead Cell Stain je fluorescenční DNA barvivo, které neproniká do buněk s intaktní buněčnou membránou. Po excitaci modrým laserem 488nm emituje zelené světlo (525 nm), které můžeme detekovat průtokovou cytometrií. Tento rychlý a kvantitativní (ač) nespecifický test je vhodný pro prvotní porovnání citlivosti buněk různých linií k vybraným cytotoxickým stresorům.

Cíl: Srovnat odpověď dvou buněčných linií MDA-MB-231 a HBL-100 k působení chemoterapeutik.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 a HBL100 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 2ml misky v koncentraci $0,2 \cdot 10^6$ b/2ml.
2. Inkubace buněk 24hod/37°C
3. Ošetřit chemoterapeutikem A (0,8 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM, stock 1mM)
4. Inkubace buněk 37°C 48 h
5. Sklidit médium i adherentní buňky (EDTA v PBS, 0.5 ml) do 15 ml zkumavky
6. Centrifugace 300 g/5 min

7. Připravit roztok Sytox Green v PBS (1:10 000)
8. Odsát supernatant, rozsuspendovat pelet v připraveném roztoku Sytox Green (200 ul/ vzorek)
9. Na průtokovém cytometru stanovit % Sytox green+ (mrtvých) buněk

2. Monitorování cytotoxického účinku látek v reálném čase - xcelligence

Úvod:

Pro zjištění kinetiky změn adheze doprovázejících buněčnou smrt epiteliálních buněk je možné použít nespecifický neinvazivní test založený na kontinuálním měření impedance.

U buněk adherentních (přisedlých) je buněčná smrt doprovázena ztrátou adheze k podkladu. Tento efekt můžeme sledovat v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Principem této metody je kontinuální zaznamenávání signálu, který vytvářejí buňky kontaktem s elektrodami na dně kultivační jamky. Čím více buněk je v kontaktu s elektrodami a čím silněji tyto buňky adherují, tím vyšší signál změříme. Po přidání cytotoxické látky buňky postupně ztrácejí kontakt s podkladem, což pozorujeme jako pokles signálu (buněčného indexu).

Některá cytostatika ovšem způsobují také změnu morfologie (velikosti) buněk, což se projeví nárůstem signálu. Proto je nutné použít jinou referenční metodu (např. mikroskopii nebo specifický test na apoptózu) pro ověření pozorovaných hodnot buněčného indexu.

Cíl:

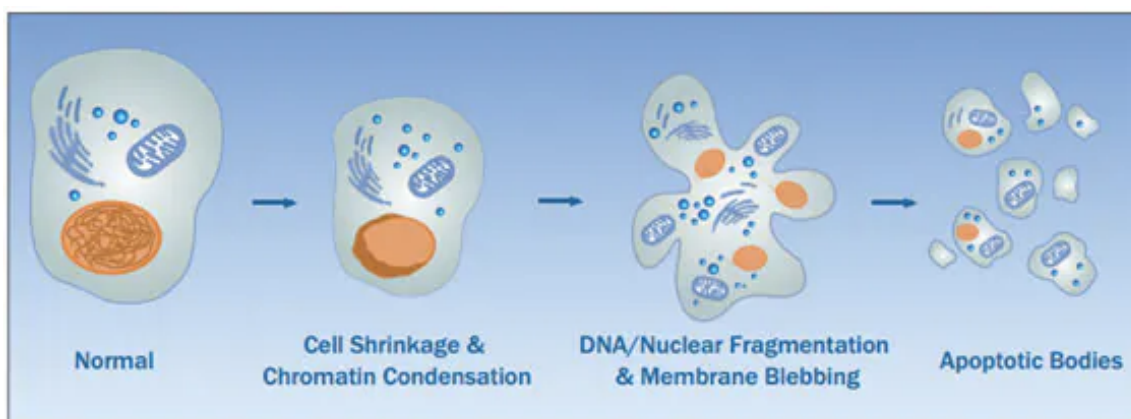
Sledovat nárůst buněčného indexu v čase u kontrolních buněk. Pozorovat změnu signálu po přidání induktorů buněčné smrti a kinetiku buněčné odpovědi během 72 hod.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit buňky do výsledné koncentrace 1.4×10^5 /ml v médiu RPMI.
2. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100 ul média RPMI, změřit background.
3. Do jamek destičky (E-plate) přidat 50 ul buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 7 000). Začátek měření.
4. Následující den přidat k vybraným jamkám induktory buněčné smrti o vhodné koncentraci chemoterapeutikem A (0,8 ug/ml a 1,6 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM a 2 uM, stock 1mM) naředěné v RPMI médiu, v objemu 50 ul. Počítat s celkovým objemem média v jamce 200 ul!!! Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.
5. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na přítomnosti (koncentraci) cytotoxické látky a srovnat použité linie.

3. Barvení nukleových kyselin propidium iodidem

Buňky se po inkubaci s daným cytotoxickým agens fixují ve směsi metanolu s kyselinou octovou, čímž se permeabilizuje jejich buněčná membrána a barvivo může proniknout dovnitř buněk. Po přidání propidium iodidu dojde k obarvení nukleových kyselin (NK). Vyhodnocuje se morfologie buněčného jádra, stupeň kondenzace chromatinu, přítomnost fragmentace jádra a apoptotických tělísek. V apoptotických buňkách dochází k pyknóze, smrštění jádra a kondenzaci chromatinu, což se projeví intenzivnějším signálem po obarvení NK, následně se jádro rozpadá. **Tímto testem identifikujeme typ buněčné smrti, konkrétně detekujeme frekvenci apoptotické buněčné smrti.**



Cíl:

Kvantifikovat četnost jader s apoptotickou morfologií po cytotoxickém působení chemoterapeutik.

Postup:

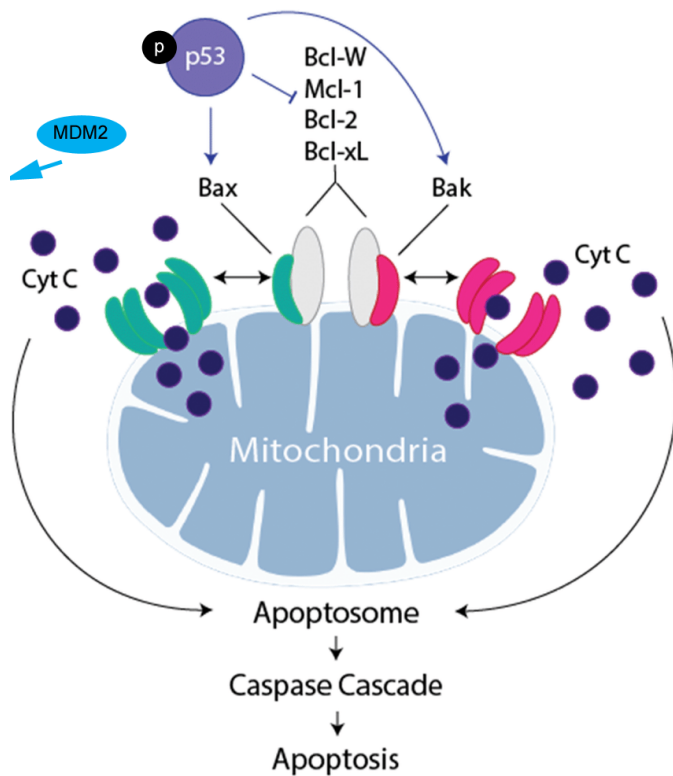
1. Indukovat buněčnou smrt buněk MDA-MB-231 inkubací s testovanými látkami (na 2 ml miskách, 3×10^5 buněk), chemoterapeutikem A (0,8 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM, stock 1mM)
2. Předem připravit směs složenou z metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1, směs uchovávat v -20°C a používat vychlazenou.
3. Buňky z pokusné misky centrifugovat (400g/5 min)
4. Odsát supernatant, pelet resuspendovat v 0,5 ml 1xPBS
5. Za současného míchání na vortexu pomalu přikapat 5 ml ledové směsi
6. Inkubovat v -20°C minimálně 30 minut (optimálně přes noc)
7. Centrifugovat při 150g/5 min (fixované buňky jsou křehké, nepoužívat při centrifugaci vyšší otáčky!)
8. Odsát supernatant, pelet resuspendovat ve 100 μl ledové směsi
9. Kápnout jednu kapku na podložní sklíčko a nechat zaschnout
10. Obarvit 10 μl propidium iodidu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$
11. Přikrýt krycím sklíčkem, vyhodnotit pod fluorescenčním mikroskopem procento jader s apoptotickou morfologií

4. Detekce hladiny proteinů PARP, p-p53 (S15), Mcl1 pomocí elektroforézy a westernového přenosu

Úvod:

Apoptóza, neboli typ I programované buněčné smrti, slouží k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk. Je součástí fyziologických i patologických dějů. Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a rozpadu buněk na apoptotická tělíska, která jsou následně fagocytována. Apoptóza je charakteristická dvěma signálními drahami – vnitřní - řízená mitochondriemi a vnější - řízená aktivací receptorů smrti.

p53 patří mezi nádorové supresory a indukuje zástavu růstu nebo apoptózu v závislosti na fyziologických podmínkách a buněčném typu. DNA poškození indukuje fosforylaci p53 na Ser15 s následným snížením schopnosti interakce p53 s jeho negativním regulátorem Mdm2. Mezi cílové geny transkripčního faktoru p53 patří pro-apoptotický protein Bcl2 rodiny Bax.



Bowman et al. *J Ovarian Res.* 2019, 12(1):38.

Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MDA-MB-231 a HBL-100 vystavených působení chemoterapeutik dochází k štěpení proteinu PARP, fosforylaci a aktivaci p-p53 (S15).

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 a HBL-100 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5ml misky v koncentraci $0,5 \cdot 10^6$ b/5ml.
2. Inkubace buněk 24hod/37°C
3. Ošetřit chemoterapeutiky chemoterapeutikem A (0,8 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM, stock 1mM)
4. Inkubace buněk 37°C
5. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20 °C. Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Ke vzorkům přidat alespoň dvojnásobek kompletního 2xCSB pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů v takto naředěných vzorcích byla stejná.

Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A' (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 minut stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.

Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout destilovanou vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacery a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

Sestavení blotovací aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a porézní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ni položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
4. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
5. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
6. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
8. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulózovou membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-p53 ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme třikrát 5min TBS-Tween a dvakrát 2 min TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Na membránu nakapeme substrát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě
8. Detekce signálu v temné komoře
9. Po vyvolání signálu membránu obarvíme v 0,2% roztoku amidoblack - nespecifické barvení proteinů, potvrzení srovnání hladiny celkových proteinů

Použité roztoky

Transferový pufr:TBS:

48 mM Tris
39 mM glycin
20%methanol

TBS-Tween:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0 přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS
57,6 ml 5M NaCl
doplnit vodou do 2 litrů

Odbarvovací roztok:

500 ml metanolu

Tris-glycin elektroforetický pufr (ph=8,3):

25 mM Tris

400 ml destilované vody
100 ml kyseliny octové

250 mM glycine
0,1% (w/v) SDS

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml) Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H ₂ O 4,9 ml	H ₂ O 5,62 ml
40% Akrylamid 2,4 ml	40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml	1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 0,1 ml	10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 75 ul	Ammonium persulfate 30 ul
TEMED 7,5 ul	TEMED 10 ul

2xCSB lyzační pufr

6,9 ml H₂O
2 ml glycerol
1,2 ml 1M Tris pH=6,8
0,4 ml 0,2% Bromfenolová modř v 1M Tris pH=6,8
2 ml 20% SDS
+ před použitím přidat 100 ul beta-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB

5. Transfekce nádorových buněk lipofekcí a stanovení aktivity luciferázy a aktivity β -galaktozidázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy

Úvod:

Protein p53 jako transkripční faktor je ve funkci nádorového supresoru aktivovaný za různých stresových podmínek. Protein p53 se váže na specifické sekvence a ovlivňuje tak expresi svých cílových genů. Některé z cílových sekvencí, například *p21/waf1*, jsou zodpovědné za stresem indukované zastavení buněčného cyklu v přechodu z fáze G1 do S. Jiné, například *bax* nebo *puma*, indukují apoptózu.

Detekce aktivity p53 je možné pomocí přechodné transfekce metodou lipofekce, s použitím konstruktů pRGC-luc, který obsahuje syntetickou p53 vazebnou sekvenci RGC (ribosomal gene cluster) zařazenou před promotor tk-luc (Kern et al., 1991). Tento konstrukt umožňuje sledovat aktivitu p53 pomocí luciferázové aktivity.

Lipofekce je metoda při níž dochází k vytvoření komplexů záporně nabitě plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

Cíl:

Potvrdit, že sledovaná chemoterapeutika aktivují v cílových buňkách protein p53 měřením jeho transaktivace reportérového systému.

Postup- lipofekce:

1. 2×10^5 buněk 143B a HBL-100 inokulovat v 2 ml kultivačního média a kultivovat 24 hod při 37 °C/5% CO₂
2. Do 100 μ l média Opti-MEM přidat 1 μ g transfekční plazmidové DNA (RGC-luc a b-gal 1:1) lehce promíchat. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě
3. Do jiné zkumavky přidat ke 100 ul Opti-MEM 3 μ L PEI (Polyethylenimine), lehce promíchat
4. Inkubovat při laboratorní teplotě 5 minut
5. Smíchat naředěnou DNA a PEI a inkubovat 25 min, RT
6. Transfekční směs nakapat na buňky a inkubovat 24 hod při 37°C/5% CO₂

- Výměnit médium, ošetřit buňky sledovanými chemoterapeutiky chemoterapeutikem A (0,4 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (7,5 uM, stock 30 mM), C (6,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (0.5 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (0.5 uM, stock 1mM) a inkubovat 24 h při 37°C/5% CO₂.
- Stanovit aktivitu β-galaktozidázy a aktivitu luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy

Roztoky:

Pufř 1 (pro aktivitu β-galaktozidázy):

100 × Mg roztok (0,1 M MgCl ₂ /4,5 M β-merkaptóetanol)	4 μl
1 × ONPG (4 mg ONPG v 1 ml směsi fosforečnanů sodných, pH=7,5)	88 μl
0,1 M směs fosforečnanů sodných	268 μl

0,1 M směs fosforečnanů sodných:

0,2 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	41 ml
0,2 M NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	9 ml
H ₂ O	50 ml

Pufř 2 (pro aktivitu luciferázy):

25 mM gly-gly	0,5 ml
15 mM K-fosfátu	75 μl
15 mM MgSO ₄	75 μl
4 mM EGTA	50 μl
2 mM ATP	100 μl
1 mM DTT	5 μl
ddH ₂ O	4,195 ml

Postup-stanovení aktivity β-galaktozidázy a aktivity luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy:

- Odsát médium, promýt buňky v 1x PBS, sklidit a centrifugovat 5 min/500g/pokojová teplota.
- Odsát supernatant, pelet suspendovat v 50 μl roztoku 0,25M Tris.Cl pH 7,5.
- Lyzovat buňky třemi cykly prudkého zamražení v – 80 °C a rozmražení. Extrakt zbytečně nevystavovat pokojové teplotě a světlu – ztráta aktivity luciferázy.
- Centrifugace 5 min/4 °C/max. výkon.
- Přenést supernatant do nové zkumavky, uchovat na ledu pro test nebo v – 80 °C pro uchování.

β-galaktozidázová aktivita

- Přidat 360 μl pufřu 1 k 10 μl lyzátu a 30 μl 0,25 M Tris pH 7,5.
- Inkubovat při 37 °C do žlutého zbarvení.
- (Zastavit reakci přidáním 667 μl Na₂CO₃.)
- Změřit absorbanci při 420 nm na Elisa readeru (Bio Tek).

Aktivita luciferázy

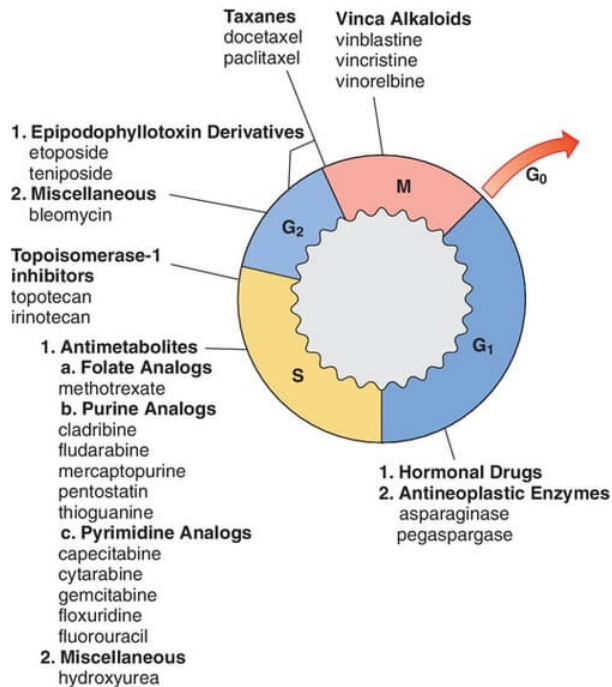
- 10 μl lyzátu přenést do 90 μl 0,25 M Tris pH 7,5 a 360 μl pufřu 2.
- Přenést zkumavky do luminometru, přidat 200 μl roztoku luciferinu (1 mM luciferin s 10 mM DTT ředěný ve vodě v poměru 1:4).
- Změřit aktivitu luciferázy.
- Relativní luciferázovou aktivitu spočítat jako aktivita luciferázy/β-gal aktivita v 1 μl lyzátu.

6. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Úvod :

Ovlivnění nádorových buněk chemoterapeutiky může být doprovázeno změnami v regulaci buněčného cyklu. Tyto změny lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem

pomocí průtokového cytometru FACSVers. Propidium jodid je interkalující barvivo, které se váže k NK a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (> 560 nm). Množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se buňky nacházejí. Při indukci apoptózy můžeme buňky detekovat v subG0 fázi buněčného cyklu.



Cíl:

Zjistit, zda-li sledovaná chemoterapeutika indukují vstup buněk do subG0 fáze buněčného cyklu a vyhodnotit změny v distribuci ostatních fází buněčného cyklu

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5ml misky v koncentraci $0,5 \cdot 10^6/5\text{ml}$ (bude nasazeno předem).
2. Následující den přidat k buňkám chemoterapeutikum A (0,8 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM, stock 1mM)
3. Inkubace 37°C
4. Médium přepipetovat do 15ml zkumavek, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min
5. Buňky promýt 1xPBS
6. Pelet rozsuspendovat v 0,25 ml PBS a přikapat 2 ml vychlazeného 70% etanolu
7. Fixace min. 30 min v 4°C nebo v -20°C
8. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
9. Promýt 4 ml 1xPBS
10. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (200 ul, obsahuje propidium jodid a RNázu)
11. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
12. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

7. Měření hladiny kyslíkových radikálů sondami DHE (dihydroethidium) průtokovou cytometrií

Úvod:

Oxidativní stres je důležitou charakteristikou nádorové buňky a také jednou z mnoha událostí, která může vyvolat vnitřní cestu aktivace apoptózy. Oxidativní stres je podmíněn přítomností kyslíkových radikálů, které vznikají při mnoha chemických reakcích probíhajících v těle. Radikál je chemické označení pro prvek nebo sloučeninu, která ve své molekule obsahuje jeden nebo více nespárovaných elektronů. Radikály bývají velmi nestabilní a vytrhávají elektrony z jiných sloučenin, tím pak poškozuji buňky organismu. Poškození se týká povrchových membrán buněk i vnitrobuněčných struktur včetně buněčných jader.

DHE je fluorescenční sonda, které monitoruje přítomnost superoxidových aniontů a peroxidu vodíku. Reakcí DHE se superoxydy vzniká hydroxyethidium, reakcí s H₂O₂ vzniká ethidium. Oba produkty detekujeme jako červený fluorescenční signál při použití excitační/emisní vlnové délky 488/606 nm.

Cíl:

Zjistit, zda-li použitá chemoterapeutika indukují tvorbu kyslíkových radikálů v buňkách MDA-MB-231. Srovnat mechanismus účinku použitých cytotoxických agens.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 24-jamkové destičky (0,5 ml média) v koncentraci $0,5 \cdot 10^5/0,5\text{ml}$.
2. Inkubace buněk 24h/37°C
3. Ošetření buněk chemoterapeutiky: A (0,8 ug/ml, stock 400 ug/ml), B (15 uM, stock 30 mM), C (12,5 ug/ml, stock 25 mg/ml), D (1 ng/ml, stock 1 ug/ml), E (1 uM, stock 1mM)
4. Inkubace buněk 24h/37°C
5. Sterilně odsát médium s buněk.
6. Namíchat si roztok média se sondou DHE o výsledné koncentraci 10uM (zásobní koncentrace DHE 50mM)
7. Promýt v 1xPBS
8. Napipetovat opatrně na buňky médium se sondou
9. Inkubace ve tmě při 37°C/20 min
10. Odsát médium, dvakrát promýt v 1xPBS
11. Přenos buněk suspendovaných v 0,2 mL 1x PBS do FC zkumavek
12. Měření na průtokovém cytometru FACSVersé