

karlo.miskec@biol.pmf.hr

Vježba 2 Inhibicija staničnog rasta stanica i kolonija u prisustvu citostatika adriamicina (2025.):

Napomena: Radili smo s HEK293 (<https://www.atcc.org/products/crl-1573>).

Što sve treba biti u rezultatima vježbe 2:

I.) Prikazati puni izračun kako ste izračunali **broj stanica petrijeve zdjelice** za jedan odabrani tretman adriamicinom. (*Dovoljan je računski prikaz samo jedne petrijeve zdjelice.*)

II.) Prikazati **ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji adriamicina** prema dekadskoj (tablično i grafički) **ILI** semilogaritamskoj skali (log od broja stanica u ovisnosti o koncentraciji adriamicina). *Napomena: odaberite **JEDAN grafički prikaz** po želji, ne treba prikazati obje varijante grafa. Prikažite sve točke u tablici i označite koje ste uzeli za izračun srednje vrijednosti po tretmanu.*

III.) Odredite **vrijednost IC_{50} za stanice** (doza adriamicina pri kojoj umire 50% stanica) i označite vrijednost na grafu.

IV.) Priložiti **sliku kolonija HEK293** prije i poslije fiksacije/bojanja.

V.) Prikazati **ovisnost preživljenja kolonija (%) o koncentraciji adriamicina** prema dekadskoj (tablično i grafički) **ILI** semilogaritamskoj skali (log od broja stanica u ovisnosti o koncentraciji adriamicina). *Napomena: odaberite **JEDAN grafički prikaz** po želji, ne treba prikazati obje varijante grafa. Prikažite odabrane točke u tablici, obzirom da ima jako puno podataka **ne morate prikazivati sve vrijednosti već samo one odabrane za izračun srednje vrijednosti po tretmanu.***

VI.) Odredite **vrijednost IC_{50} za kolonije** (doza adriamicina pri kojoj umire 50% kolonija) i označite vrijednost na grafu.

Što sve treba biti u diskusiji vježbe 2:

I.) Opisati dobivene **kinetike grafa**, vidi li se koljeno u grafu? Koje je značenje koljena i zašto se pojavljuje odnosno zašto ne.

II.) Da li je **skala koncentracija** dobro određena, ako nije koju skalu biste vi predložili da ponavljate eksperiment kako biste suzili vrijednosti za precizniji IC_{50} .

III.) **U koju kategoriju citostatika spada adriamicin po jačini djelovanja?** (Literaturni podatak gdje možete pronaći skalu: Krippendorff, B. F., Lienau, P., Reichel, A., & Huisinga, W. (2007). Optimizing classification of drug-drug interaction potential for CYP450 isoenzyme inhibition assays in early drug discovery. Journal of biomolecular screening, 12(1), 92-99.))

IV.) Podudaraju li se Vaši rezultati **(za stanice) IC_{50}** s literaturom? Referencirajte literaturni podatak.

V.) **Usporedite vrijednosti IC_{50} između kolonija i stanica.** Koja vrijednost je preciznija, ona određena na kolonijama ili na stanicama i zašto?

VI.) Podudaraju li se Vaši rezultati **(za kolonije) IC_{50}** s literaturom? Referencirajte literaturni podatak.

Zadaci za vježbu 2 koji se trebaju riješiti iza diskusije i referenca:

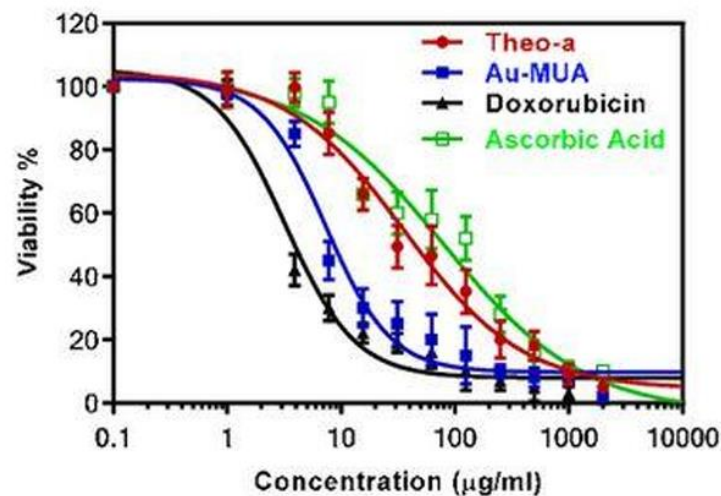
1.) Stabilnom transfekcijom želite transfecirati stanični suspenzijski soj LCL-HD0016 te integrirati u genom stanica konstrukt mRuby-KRAB-dSpCas9 pomoću transpozonskog sustava PiggyBac. Obzirom da želite imati što manji „off-target“ proteina dCas9 kada se počne eksprimirati u stanicama, transfekciju ste napravili s niskom količinom transpozonskog plazmida (100 ng) da se ugradi što manje konstrukta mRuby-KRAB-dSpCas9 zbog čega je efikasnost transfekcije samo 5%.

a) Kojom metodom biste izolirali novostvoreni soj mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL-HD0016 od onih stanica koje nisu ugradile konstrukt ako želite dobiti **čistu monoklonsku liniju** koja je evkvalentni pojam koloniji adherentnih staničnih linija? Objasnite odabranu metodu.

(Napomena: Stanice imaju rezistenciju na antibiotik puromicin, ali čak i neke stanice koje nisu primile konstrukt, mogu preživjeti selekciju).

b) Kada ste uspješno uspostavili monoklonsku liniju mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL-HD0016

tretirali ste stanice s nekoliko različitih spojeva (feofitin (Theo-a), adriamicin (doxorubicin), askorbinska kiselina (ascorbic acid) i merkaptoundekanoična kiselina (Au-MUA)) kako biste istražili njihove efekte na novu staničnu liniju. Na temelju Slike 1. odredite kolike su vrijednost IC_{50} za svaki spoj te koji je citostatik najtoksičniji za stanice.



Slika 1. Ovisnost staničnog preživljenja monoklonske linije mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL HD0016 o koncentraciji različitih spojeva (μM) kojima su tretirane.

2.) Pronađite i ispravite greške u tekstu koji opisuje eksperiment nasađivanja stanica u svrhu rasta kolonija i tretiranja kolonija adriamicinom. Ukoliko su neke greške računskog tipa, prikazite kako ste došli do točnog rješenja.

Tekst:

Andrija je odlučio nasaditi adherentne stanice 1.1.B4 kako bi uspješno dobio kolonije koje će tretirati citostatikom. U tu svrhu, presadio je stanice u vrlo visokom broju kako ne bi umrle. Odsisao je stari medij vakuum sisaljkom, isprao je petrijevu zdjelicu bikarbonatnim puferom te je stanice tripsinizirao. Kada je odsisao tripsin, neutralizirao je stanice s medijem RPMI bez seruma i nasadio ih je u novu netretiranu petrijevu zdjelicu. Drugi dan je stanice tretirao adriamicinom (stock 1 M) koncentracijama 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 2 μM i 5 μM te je redom iz stocka adriamicina dodao volumene u petrijevu zdjelicu (volumena 2 ml) 10 μl , 5

μl , 2 μl , 1 μl i 0,5 μl . Pustio je da kolonije rastu tri do četiri dana nakon čega ih je fiksirao kristal violetom i brojao kolonije koje su preživjele. Na temelju vrijednosti IC_{50} odredio je jačinu citostatika te je nakraju suzio skalu kako bi dobio preciznije rezultate.

Podaci za inhibiciju staničnog rasta HEK293 - broj stanica:

Vrsta citostatika: doksorubicin hidroklorid (adriamicin)

<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=e0349f98-42fa-4003-b6d8-a1db1401b0ef>

Kontrola (0 μM adriamicin)

4,9 $\times 10^5$

4,8 $\times 10^5$

9,3 $\times 10^5$

7 $\times 10^5$

3,2 $\times 10^5$

0,1 μM adriamicin

2,5 $\times 10^5$

1 $\times 10^5$

6,1 $\times 10^5$

1,4 $\times 10^5$

6,6 $\times 10^4$

0,5 μM adriamicin

1,7 $\times 10^5$

2,06 $\times 10^5$

2,7 $\times 10^5$

7 $\times 10^4$

2,4 $\times 10^5$

1 μM adriamicin

7 $\times 10^4$

1,8 $\times 10^5$

$1,7 \times 10^5$

$3,2 \times 10^4$

$1,86 \times 10^5$

$1,93 \times 10^5$

2,5 μ M adriamicin

$1,5 \times 10^5$

$1,4 \times 10^5$

$3,5 \times 10^5$

$2,8 \times 10^5$

5 μ M adriamicin

$7,2 \times 10^4$

7×10^4

$1,6 \times 10^5$

7×10^4

Podaci za inhibiciju staničnog rasta HEK293 - broj kolonija:

Kontrola (0 μ M adriamicin)

1226, 1692, 1252, 1102, 1458, 1612, 1400, 1050, 628, 1230, 1782, 1534, 1436, 1186, 704

0,1 μ M adriamicin

1156, 630, 1300, 1240, 1206, 792, 912, 1162, 924, 974, 582, 568, 662, 1272, 1174, 1008, 842,
584, 910, 634

0,5 μ M adriamicin

370, 536, 382, 448, 644, 412, 444, 257, 360, 454, 338, 565, 356, 568, 372, 500, 446, 456, 460, 402,
516, 360, 358, 214, 742

1 μ M adriamicin

192, 188, 204, 198, 218, 215, 172, 200, 186, 184, 194

5 μ M adriamicin

0