

## Vježba 2 Inhibicija staničnog rasta stanica i kolonija u prisustvu citostatika adriamicina (2026.):

**Napomena:** Turnus četvrtak 8-11 i petak 8-11 su radili sa stanicama A1235, dok su ostali turnusi radili sa stanicama HeLa. Trebate samo prikazati grafove za tip stanica s kojima ste radili. Neke vrijednosti su već unaprijed izbačene koje se nisu uklapale u finalne rezultate.

### **Što sve treba biti u rezultatima vježbe 2:**

I.) Prikazati **ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji adriamicina** prema dekadskoj (tablično i grafički) **ILI** semilogaritamskoj skali (tablično i grafički). **Napomena:** odaberite **JEDAN grafički prikaz** po želji, ne treba prikazati obje varijante grafa.

II.) Odredite **vrijednost IC<sub>50</sub> za stanice** (doza adriamicina pri kojoj umire 50% stanica) i označite vrijednost na grafu.

III.) Priložiti **sliku kolonija HeLa** prije i poslije fiksacije/bojanja.

IV.) Prikazati **ovisnost preživljenja kolonija (%) o koncentraciji adriamicina** prema dekadskoj (tablično i grafički) **ILI** semilogaritamskoj skali (tablično i grafički). **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.

V.) Odredite **vrijednost IC<sub>50</sub> 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.

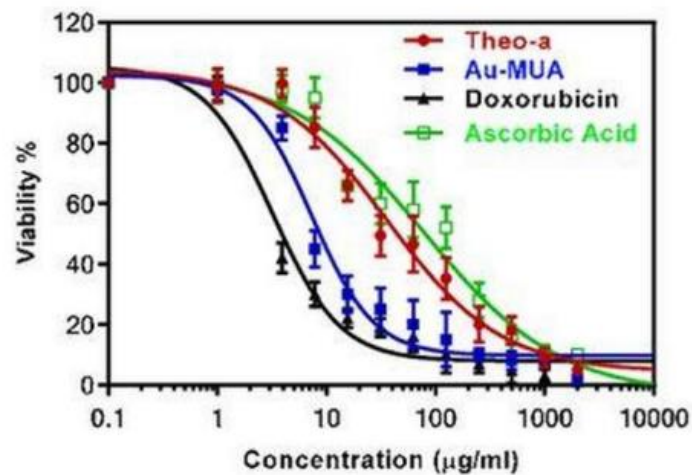
**Zadaci za vježbu 2 koji se trebaju riješiti iza diskusije i referenca:**

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 ekspimirati 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 ekvivalentni pojam koloniji adherentnih staničnih linija? Objasnite odabranu metodu. (**Napomena:** Transfecirane stanice imaju rezistenciju na antibiotik puomicin, 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 vrijednosti  $IC_{50}$  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 ( $\mu\text{M}$ ) 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, prikažite 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  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  te je redom iz stocka adriamicina dodao volumene u petrijevu zdjelicu (volumena 2 ml) 10  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  i 0,5  $\mu\text{l}$ . Pustio je da kolonije rastu tri do četiri dana nakon čega ih je fiksirao 50% 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.

**Vrsta citostatika:** doksorubicin hidroklorid (adriamicin)

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

**Podaci za inhibiciju staničnog rasta A1235 - broj stanica:**

***Kontrola (0  $\mu$ M adriamicin)***

$1,94 \times 10^6$

$4 \times 10^6$

***0,1  $\mu$ M adriamicin***

$1,16 \times 10^6$

$8,4 \times 10^5$

***0,5  $\mu$ M adriamicin***

$1,4 \times 10^5$

$3 \times 10^5$

***1  $\mu$ M adriamicin***

$2 \times 10^5$

$6 \times 10^5$

***2,5  $\mu$ M adriamicin***

$2,2 \times 10^5$

$8 \times 10^4$

***5  $\mu$ M adriamicin***

$7 \times 10^4$

$5 \times 10^4$

**Podaci za inhibiciju staničnog rasta A1235 - broj kolonija:**

***Kontrola (0  $\mu$ M adriamicin)***

1036, 1045, 1416, 1148, 1140, 1024

**0,1  $\mu\text{M}$  adriamicin**

1088, 1096, 956, 740, 880, 864, 1252, 1196

**0,5  $\mu\text{M}$  adriamicin**

716, 328, 528, 458, 256, 300, 410, 412, 204

**1  $\mu\text{M}$  adriamicin**

188, 168, 188, 200, 164, 164

**5  $\mu\text{M}$  adriamicin**

0

**Podaci za inhibiciju staničnog rasta HeLa - broj stanica:**

**Kontrola (0  $\mu\text{M}$  adriamicin)**

$5,7 \times 10^5$

$2,46 \times 10^6$

$3 \times 10^6$

**0,1  $\mu\text{M}$  adriamicin**

$2,92 \times 10^6$

$3,72 \times 10^5$

$1,7 \times 10^6$

**0,5  $\mu\text{M}$  adriamicin**

$6,4 \times 10^5$

$3,56 \times 10^5$

$2,2 \times 10^5$

**1  $\mu\text{M}$  adriamicin**

$9,56 \times 10^4$

$1,3 \times 10^5$

$2,67 \times 10^4$

**2,5  $\mu\text{M}$  adriamicin**

5,34  $\times 10^4$

8,9  $\times 10^4$

1,5  $\times 10^4$

**5  $\mu\text{M}$  adriamicin**

4,5  $\times 10^4$

2,06  $\times 10^4$

9  $\times 10^4$

**Podaci za inhibiciju staničnog rasta HeLa- broj kolonija:**

***Kontrola (0  $\mu\text{M}$  adriamicin)***

1344, 1203, 1712, 1576, 1512, 1400, 1250, 1230, 1524, 1456, 1286

***0,1  $\mu\text{M}$  adriamicin***

1092, 996, 1284, 1256, 1272, 1102, 1158

***0,5  $\mu\text{M}$  adriamicin***

648, 628, 424, 516, 436, 454, 448

***1  $\mu\text{M}$  adriamicin***

198, 204, 184, 244, 192, 194, 198

***5  $\mu\text{M}$  adriamicin***

0