

Metode i analize u Odeljenju Eksperimentalne Onkologije(OEO)

(Bold slovima označene su metode uvedene u poslednjih 5 godina)

Načelnik OEO: Dr sc Mirjana Branković-Magić

Direktor Službe za naučnoistraživačku i obrazovnu delatnost: Dr Siniša Radulović

Laboratorija za eksperimentalnu farmakologiju (Šef: Dr Siniša Radulović)

Cell cultures

Nove ćelijske linije: Hela, MDA-MB-231, K562, A-549, MCF7, SK-OV-3, THLE-2, Caov-3,

Citotoksičnost novih lekova

MTT, SRB eseji

"Combinational drug study"

Merenje kombinovanog citotoksičnog efekta dva ili više lekova *in vitro*

Određivanje apoptoze

Aktivacija kaspaza (protočni citometar)

Annexin V esej (protočni citometar)

Bojenje akridin oranžom i etidijum bromidom (fluorescentni mikroskop)

Merenje membranskog mitohondrijskog potencijala (protočni citometar)

Određivanje kiseoničnih reaktivnih vrsta u tumorskim ćelijama, eritrocitima, granulocitima, monocitima (protočni citometar)

Ćelijski ciklus-DNK sinteza (protočni citometar)

Određivanje cyclin B1 (protočni citometar)

Intracelularna distribucija ispitivanih supstancija, vezivanje za intraćelijske proteine, DNK i sl.-
"Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Mass Spectrometry" (u saradnji sa Hemijskim fakultetom):

Merenje aktivacije i agregacije trombocita (protočni citometar)

In vitro antimetastatic potential:

"Gelatin zymography"

Aktivnost matriks-metaloproteinaza

"Invasion assay"

Merenje anti-invazivnog potencijala ispitivanih lekova

"Adhesion assay"

Merenje pro-adhezivnih osobina ispitivanih supstancija

Inhibicija migracije ćelija ("Scratch assay")

"Tube formation assay"

Merenje anti-angiogenetskog efekta

Western blot

Merenje ekspresije proteina-ERCC1, Anexin 11, P53, MSH2, bax, caspase 3, ERK ½, p73, Cytochrom c

Afinitetna hromatografija - afinitetno prečišćavanje antitela iz seruma hematoloških pacijenata i zdravih osoba

Određivanje patoloških autoantitela (ELISA):

anti-dsDNA antitela, anti-TPO antitela, anti-Tg antitela, anti-oxLDL antitela, RF antitela, antitela na glikoproteine prisutne na trombocitima, anti-kardiolipinska antitela

Određivanje koncentracije imunoglobulinskih izotipova (ELISA):

IgG, IgM, IgA, kao i IgG subklasa (IgG1-IgG4)

In Vivo ispitivanje antitumorske efikasnosti eksperimentalnih lekova (subkutani / intraperitonealni B16 tumori na C57 Black miševima)

Antitumorska aktivnost pojedinog leka

Inhibicija rasta tumora (Tumor growth inhibition – TGI)

Usporenje rasta tumora (Tumor growth delay – TGD)

Dužina životnog veka (Increase in life span – ILS «survival study»)

Gubitak u telesnoj težini (Body weight reduction – BWR)

Antitumorska aktivnost kombinovane terapije

II – indeks interakcije

IC – indeks kombinacije

Laboratorija za receptore i biologiju malignih tumora (Šef: Dr sc Nataša Todorović-Raković)

- Biohemijske metode : ER i PR
- IRMA: Cath-D i pS2, hFSH, hLH
- **Imunohistohemijske metode : p53, Ki67, bcl-2, ERβwt**
- **TUNEL metoda: AI**
- ELISA: TGFβ1, VEGF, FGF, IL-8, uPA, PAI-1
- CISH: HER-2, TOPO2α, c-myc, cyclin D
- **RIA: Estradiol**
- Frakcionisanje jedarne, citosolne 100 000 g i membranske frakcije iz smrznutog tkiva
- **Izolovanje DNK iz zamrznutog tkiva**
- **Western-blot: PRA i PRB.**

Laboratorija za modifikatore biološkog odgovora (Šef: Dr sc Zorica Juranić)

A.. Ćelijske kulture

- Ćelijske linije: humane (Hela, K562, MDA-MB 361, MDA-MB 453, Fem-x, LS174), i mišije (B16)
- **Nove ćelijske linije** MDA-MB-231, A-549, MCF7, SK-OV-3, THLE-2, Caov-3, kultura hepatocita
- Humane mononuklearne ćelije periferne krvi

B. Citotoksićna aktivnost jonizujućeg zraćenja i dodatno imunomodulatorna dejstva biljnih ekstrakata, novosintetisanih agenasa, sastojaka namirnica i lekova koji se primenjuju u onkologiji:

- kolorimetrijski eseji: MTT, SRB, neutral red
- bojenje tripan plavim,

C. Određivanje apoptoze

- Bojenje akridin oranžom i etidijum bromidom (fluorescentni mikroskop)
- Elektroforeza DNK
- Protoćna citometrija (bojenje propidijum jodidom)

D. Određivanje reaktivnih vrsta kiseonika u tumorskim ćelijama (fluorimetrijski)

E. Određivanje zastupljenosti ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa (protoćni citometar, bojenje propidijum jodidom)

F. *In vitro* određivanje antimetastatskog potencijala

- **Esej ćelijskog prijanjanja**
- **Merenje anti-invazivnog potencijala ispitivanih lekova**

G. Merenje kombinovanog in vitro efekta dva ili više lekova

I. Testovi za imunoenzimsko određivanje antitela na pojedine antigene prisutne u namirnicama.

J. Određivanje stimulacije humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi na proliferaciju antigenima prisutnim u namirnicama.

Laboratorija za molekularnu genetiku (Šef: Dr sc Radmila Janković)

Izolacija DNK: (iz ćelijskih linija, parafinskih kalupa, pune krvi, tkiva, brisa, sa ploćica)

- Fenol-hloroformska metoda
- **Isoljavanje**
- **Izolacija na aparatu (NucleicAcid Prep Station)**
- **Qiagen kit za izolaciju iz parafina**

Izolacija RNK: (iz ćelijskih linija, parafinskih kalupa, pune krvi)

- **Trizol**
- **Izolacija na aparatu (NucleicAcid Prep Station)**
- **Qiagen kit za izolaciju iz parafina**
- **Qiagen kit za izolaciju iz pune krvi**

PCR-based metode

- PCR (Detekcija HPV16 i 18)
- **RT-PCR**
- **Alel-specifičan PCR** (5382insC, kod testiranja BRCA1 mutacija)
- **Nested PCR** (bcr-abl kod pacijenata sa CML)
- **Real-Time PCR**
 - **TaqMan metoda** – bcr-abl kvantifikacija
 - **Scorpions-Arms metoda** - Detekcija mutacija u KRAS I EGFR genima, BRAF mutacije (Cobas)
- **PCR praćen reversnom hibridizacijom** (KRAS StripAssay za detekciju KRAS mutacija)

"High Resolution Melting" (HRM) analiza

- **Detekcija CYP2D6 polimorfizama,**
- **Odredjivanje UGT1A1 polimorfizma, BRAF i BRCA mutacija**

Automatsko sekvenciranje gena

- **Detekcija mutacija u BRCA1/2 i c-kit genima**

"Single-Strand Conformation Polymorphism" (SSCP)

- **Analiza mutacija u p53 genu**

"Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP)

- **Detekcija promena u MTHFR, DPD i TS genima**

Analiza RNK, DNK, proteina, RFLP na Bioanalyzeru

Analiza ekspresije gena – Agilent mikroerej skener

Laboratorija za imunologiju (Šef: Dr Gordana Konjević)

-Određivanje NK ćelijske citotoksične aktivnosti sveže izolovanih i IFN α , IL-2, IL-12, IL-18, IL12 i IL-18, TNF α tretiranih limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova merenjem otpuštanja radioaktivnog hroma (^{51}Cr) nakon kontakta sa obeleženim ciljnim tumorskim ćelijama (K562, FemX, Daudi, Hela.)

-MTT test za citotoksičnost

-In vitro kultivacija limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova

-In vitro kultivacija limfocita periferne krvi i indukcija produkcije TNF α , IL-2, IFN α
mitogenima i/ili citokinima (IL-12, IL-18, IL12 i IL-18)

-Protočna citometrija:

a) imunofenotipizacija sveže izolovanih i IFN α , IL-2, IL-12, IL-18, IL12, IL-15 i IL-18 i TNF α tretiranih limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova

b) određivanje IFN- γ intraćelijskim bojenjem sveže izolovanih i IFN α , IL-2, IL-12, IL-18, IL12 i IL-18, TNF α tretiranih limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova

c) određivanje pStat-1, pStat-5 i bcl-2 intarćelijskim bojenjem sveže izolovanih i IFN α , IL-2, IL-12, IL-18, IL12 i IL-18, TNF α tretiranih limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova

d) određivanje faza ćelijskog ciklusa propidijum jodidom tretiranih tumorskih ćelijskih linija (FemX, HL-60, Daudi, K562, HeLa)

e) određivanje apoptoze Annexin V esej

f) formiranje konjugata limfocita periferne krvi i tumorske ćelijske linije (K562)

g) uticaj formiranja konjugata limfocita periferne krvi i tumorske ćelijske linije na dinamiku raspodele NK ćelijskih subpopulacija i njihove imunofenotipske karakteristike

-Western blot

određivanje ekspresije proteina iz sveže izolovanih i IFN α , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL12 i IL-18, TNF α tretiranih limfocita periferne krvi i limfocita limfnih čvorova: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5, TIMP1, bcl-2, MEK, ciklin B

-Gelatin zimografija-

određivanje aktivnosti matriks-metaloproteinaza iz svežeg tumorskog tkiva i limfocita periferne krvi

- rt-PCR

određivanje nivoa transkripcije gena za IRF-1, DAP10, SHIP

-ELISA

(IFN- γ , TNF- α , IL-2)