

FIȘĂ METODĂ

adaptată/optimizată de fluorescență pentru evaluarea producției de specii reactive de oxigen citosolice

Denumire metodă: Metodă adaptată/optimizată de fluorescență pentru evaluarea producției de specii reactive de oxigen citosolice.

Scurtă descriere: Oferă informații despre producția de specii reactive de oxigen (de tip H_2O_2) de la nivelul citosolului celular pentru celule în cultură, atașate pe diferite substraturi solide și expuse la diferite concentrații de nanoparticule; metoda se bazează pe măsurarea semnalului de fluorescență la nivel *single-cell*, semnal care se normalizează la aria proiectată a celulei care emite semnalul fluorescent; evaluarea folosește compusul H_2 -DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) care odată ajuns în citoplasmă este diacetilat de enzime specifice și transformat în molecula DCF care emite fluorescent prin oxidare de către speciile reactive de oxigen citosolice.

Echipele principale utilizate: unitate de culturi celulare; microscop inversat de fluorescență Observer D1 (Zeiss) echipat cu software AxioVision pentru achiziția și procesarea imaginilor, sistem tip monocromator PTI (ThermoScientific) atașat microscopului pentru controlul lungimilor de undă ale luminii de excitație/emisie și achiziție de tip ratiometric a semnalului de fluorescență, echipat cu software GTXFluorescence; computer echipat cu software *open source* adaptate prelucrărilor de bioimagini – CellProfiler și Image J.

Principale caracteristici:

- Pot fi achiziționate semnale de fluorescență în regim *single-point* sau regim *kinetic*, provenite de la celule vii, crescute pe substrat solid transparent, marcate cu fluorofori specifici (H_2 -DCFDA);
- Se pot achiziționa semnale fluorescente de la nivelul unui ansamblu de celule (*full field*), unei singure celule (*single-cell*) sau unei porțiuni dintr-o celulă prin folosirea obiectivelor cu magnificație corespunzătoare și a unui sistem mecanic, specific PTI, de *cortinete* de selecție a ariei de interes;
- Procesarea imaginilor se poate automatiza.

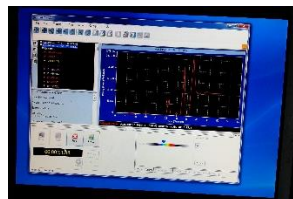
Informația dobândită: se cuantifică producția de specii reactive de oxigen (de tip H_2O_2) citosolice pe celule vii expuse la nanoparticule fără să mai fie necesară desprinderea lor de vasul de cultură, se pot analiza morfologic celulele incubate cu diferite concentrații de nanoparticule și măsurați diverși parametri celulari tip: număr, arie proiectată, diametru, caracteristici de formă (excentricitate) etc.



(a)



(b)



(c)

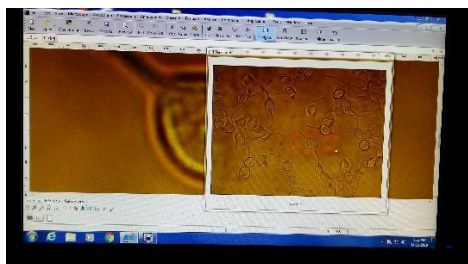
Echipele disponibile:

hota cu flux laminar LCB-0123B-A2 LabTec (a), microscop inversat Observer D1 (Zeiss) cu sistem PTI (ThermoScientific) pentru măsurători de cinetica de fluorescență (b), detaliu cu soft-ul GTXFluorescence ce permite selecția lungimii de undă de emisie specifice (530 nm) compusului DCF oxidat

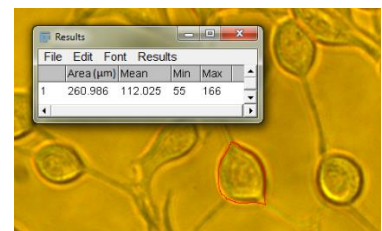
Exemple de etape de protocol:



vas Petri cu celule NIH-3T3 expuse la lumină cu lungime de undă de 480 nm specifică excitației compusului H_2 -DCFDA



selecția celulei din câmpul optic la nivelul căreia s-a realizat achiziția semnalului de fluorescent (AxioVision)



măsurarea ariei proiectate a unei celule și valoarea obținută afișată în tabelul de rezultate (ImageJ); semnalul de fluorescență este normalizat la aria celulei emitoare a acelui semnal