



## FIȘA METODĂ ADAPTATĂ PENTRU EVALUAREA STUDIUL IN VITRO AL ACTIVITĂȚII OXIDATIVE INTRACELULARE A PRIN CITOMETRIE IN FLUX

**Denumire:** Metodă adaptată pentru studiul *in vitro* al activității oxidative intracelulare prin citometrie în flux pentru nano- și bio-materiale sub formă de pulberi, pastile și filme subțiri.

**Scurta descriere:** Activitatea oxidativă intracelulară poate fi măsurată prin citometrie în flux utilizând marcatori specifici pentru diferite tipuri de ROS (anion superoxid, apa oxigenată) sau care evidențiază activitatea oxidativă globală intracelulară. Marcatorul CM-H2DCFDA difuzează pasiv în celule și are un timp de retenție foarte bun în celulele vii. CM-H2DCFDA este hidrolizat de esterazele intracelulare iar gruparea reactivă cu grupările tiol reacționează cu glutationul și cu alți tioli. Oxidarea marcatorului determină generarea unui aduct fluorescent care este bine reținut în celule. Caracteristici ale fluorescenței: Ex/Em: ~492 495/517 527 nm. Pentru utilizare, marcatorul se dizolvă în DMSO pentru a realiza o soluție stoc de 10 mM și se diluează în tampon Hank's pentru a ajunge la concentrația dorită în probele celulare. Fluorescența intracelulară a marcatorului de ROS poate fi monitorizată prin citometrie în flux și microscopie de fluorescență.

**Metoda de evaluare prin citometrie în flux a activității oxidative intracelulare:** celulele se cultivă și se tratează conform studiului dorit. În cazul în care se dorește investigarea *in vitro* a efectelor exercitate de nanoparticule, se vor utiliza numai celule aderente deoarece acestea permit îndepărtarea nanoparticulelor neincorporate în celule înainte de marcarea celulelor pentru citometrie în flux. La finalul incubării celulelor cu nanoparticulele, se îndepărtează supernatantul de cultură și stratul de celule aderente se spală blând cu tampon Hank's cald (37°C) de 3x pentru îndepărtarea nanoparticulelor neincorporate în celule. Celulele se reiau apoi în tampon Hank's cu 5 μM CM-H2DCFDA și se incubează timp de 30 min pentru încărcare cu marcatorul de ROS. La final, celulele aderente se tripsinizează și se spală prin centrifugare (5 min, 1200 rpm, 4°C) cu tampon Hank's. În final, suspensia de celule se reia în 300 - 500 μL tampon Hank's. Citirea probelor se face la citometrul în flux FACSCalibur (Becton Dickinson) iar procesarea datelor se realizează cu programul CellQuest. Se citesc minim 5000 evenimente (celule)/proba la viteza de achiziție joasă. Rezultatele se interpretează ca % celule pozitive și ca intensitate a fluorescenței în celulele pozitive.

**Echipamente utilizate:** facilitati culturi celulare - hotă cu flux laminar, incubator cu CO<sub>2</sub>, centrifugă cu răcire cu rotor swing-out, microscopie optice directe și inversate, citometru în flux.

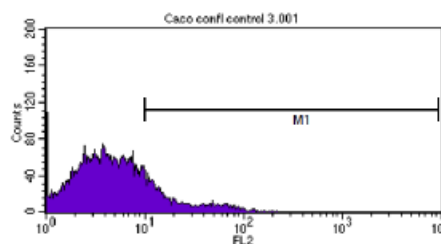
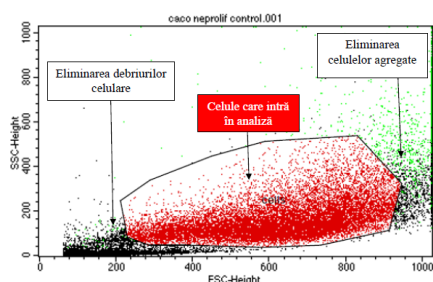


Diagrama FSC-SSC de citometrie în flux  
- selecționarea populației celulare de interes pentru analiză.

Model de diagramă privind distribuția fluorescenței  
unui indicator de ROS într-o populație de celule;  
definirea subpopulației celulare pozitive (M1) care  
dezvoltă activitate oxidativă intracelulară crescută.

**Informația dobândită:** Metoda permite evaluarea efectelor biomaterialelor asupra statusului oxidativ al celulelor normale și patologice. Modificările de activitate oxidativă intracelulară pot fi dependente de: a) caracteristicile nanoparticulelor: dimensiune, formă, material, funcționalizare (dopaj, coating), mediul în care sunt suspendate nanoparticulele; b) concentrațiile de nanoparticule; c) tipul celular testat; d) timpul de expunere a celulelor la nanoparticule.