

A DCFDA-MÓDSZER ÉRTELMEZÉSE NANORÉSZECSKÉK JELENLÉTÉBEN

EMÖDY-KISS BLANKA, FENT JÁNOS

MAGYAR HONVÉDSÉG, EGÉSZSÉGÜGYI KÖZPONT, JÁRVÁNYVÉDELMI ÉS TUDOMÁNYOS KUTATÓ INTÉZET

ALKALMAZOTT KUTATÁSI ALOSZTÁLY

1134, RÓBERT KÁROLY KRT. 44., BUDAPEST



Bevezetés

Kiindulási forma:

H₂DCFDA (membrán permeábilis, nem fluoreszcens)

észterázok

H₂DCF

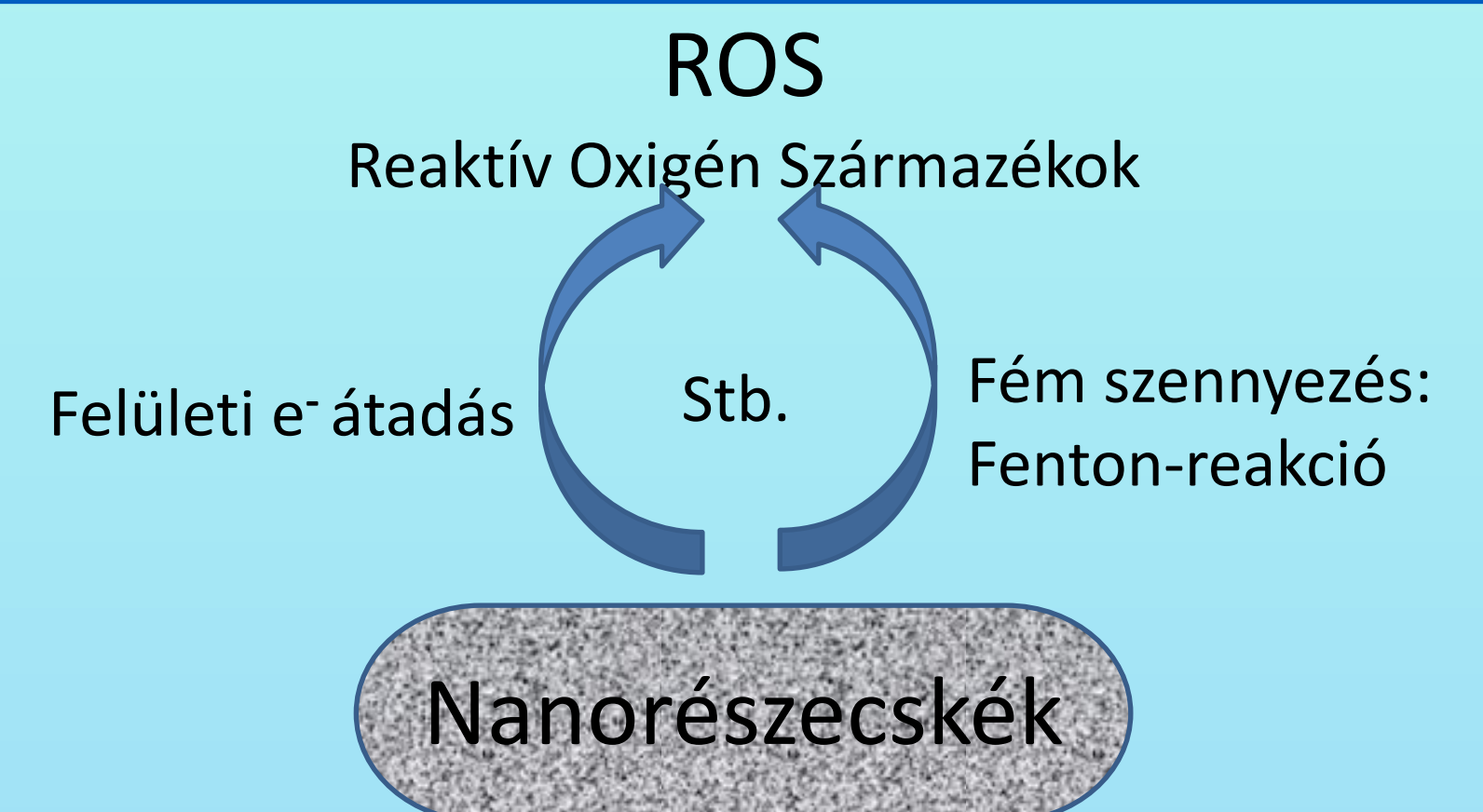
(nem membrán permeábilis, nem fluoreszcens)

ROS

DCF

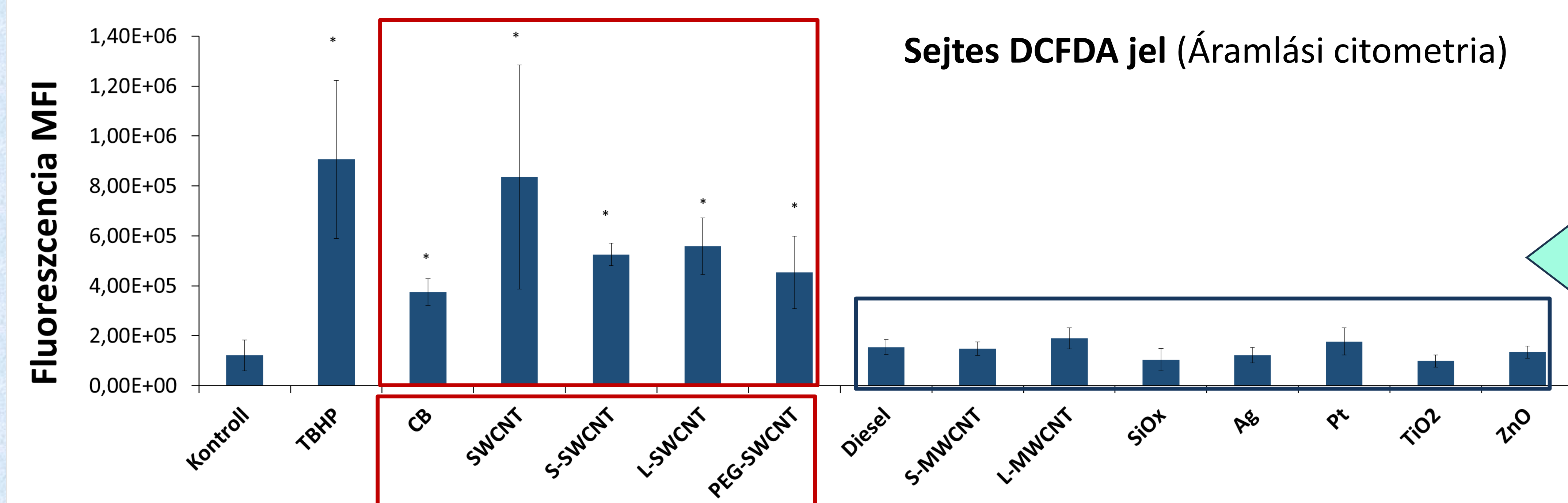
(nem membrán permeábilis, fluoreszcens)

Nem fajspecifikus: a jel az összes oxidáló ágens jelenlétét tükrözi (H₂O₂, •OH, •O₂⁻, ONOO⁻, stb.)



Eredmények és megbeszélés

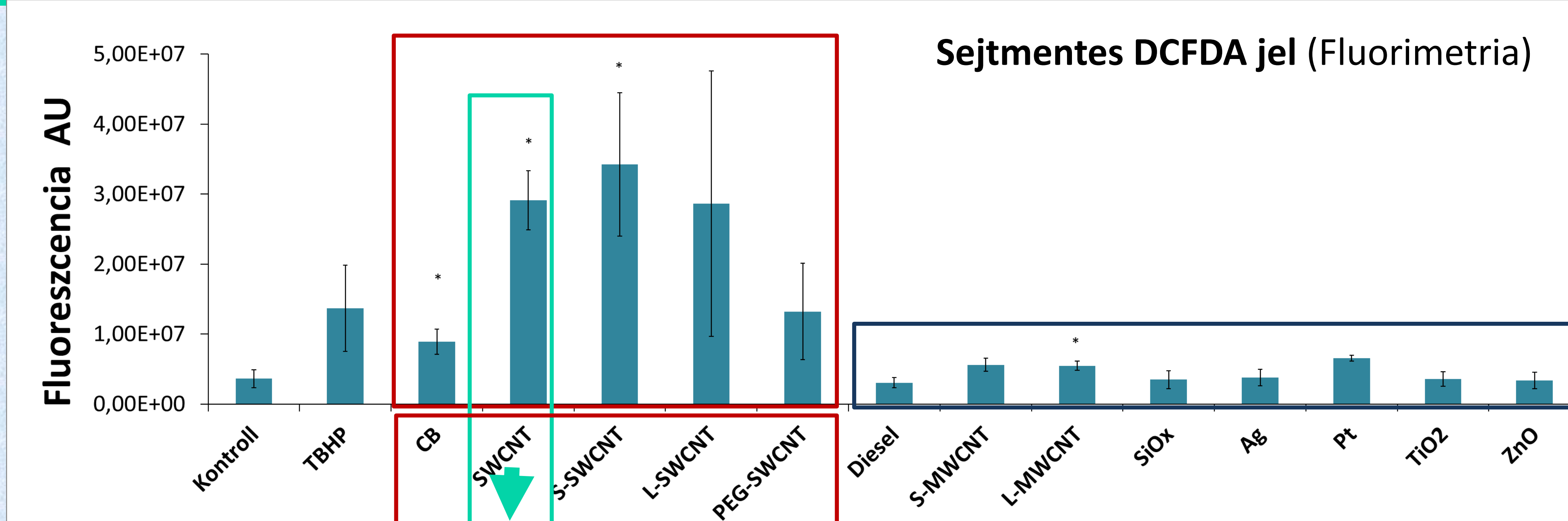
➤ Hogyan alakul a DCFDA jel érleletlen HL-60 sejtekben különböző nanoanyagok hatására?



Nanoanyagok két csoportra oszthatók:

- Magas jelet adó SWCNT, CB
- Alacsony jelet adó MWCNT és egyéb nanoanyagok

➤ Sejtmentes közegben létrejön-e a DCFDA jel?



A nanorészecskék hatására sejtes és sejtmentes közegben is hasonló DCFDA jel növekedés alakul ki.

Az SWCNT és a CB sejtmentes közegben közvetve vagy közvetlenül kiváltja a festékmolekulák oxidációját

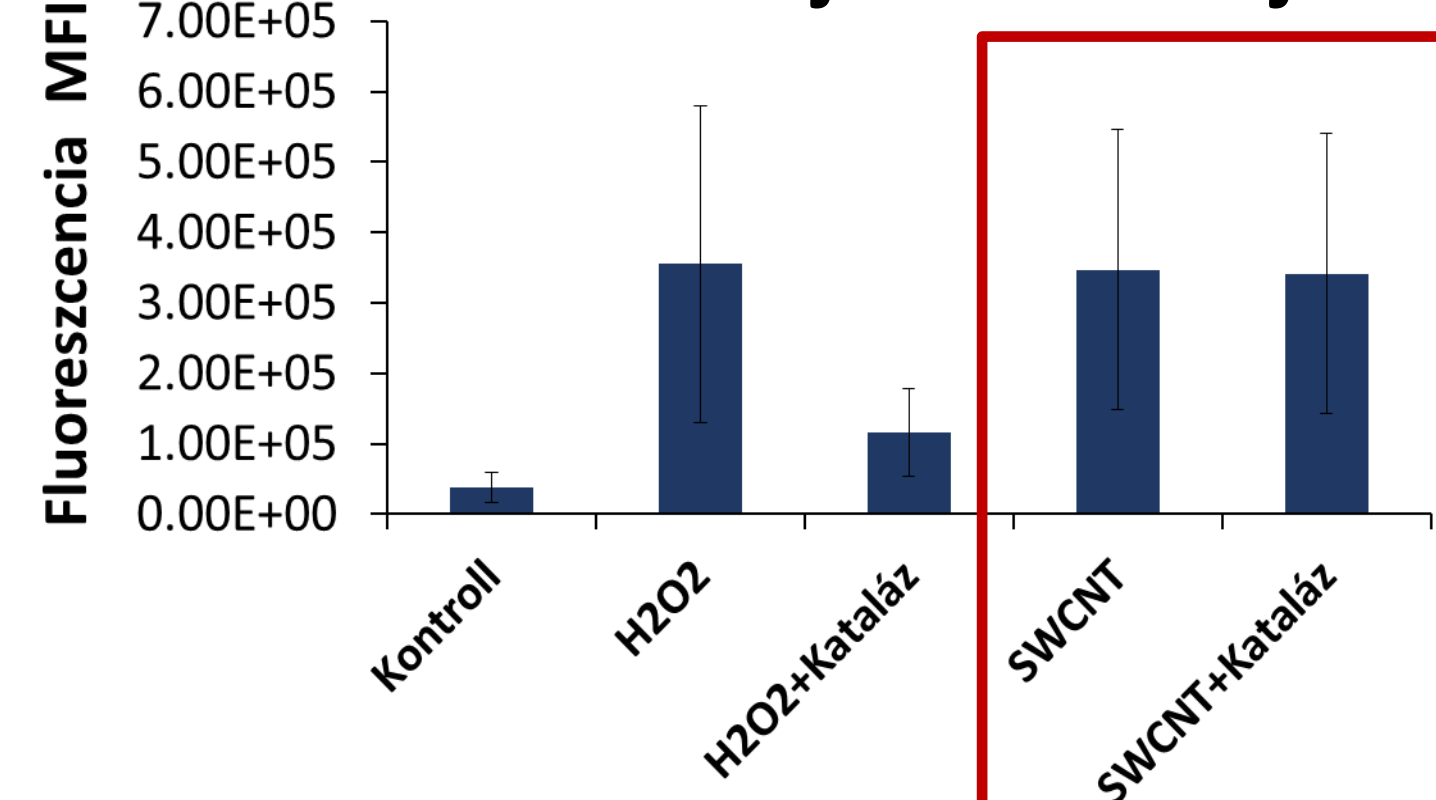
➤ NADPH-oxidáz hozzájárul-e a kialakult fluoreszcenciához?

Az érleletlen HL-60 sejteken a PMA nem indukál ROS növekedést

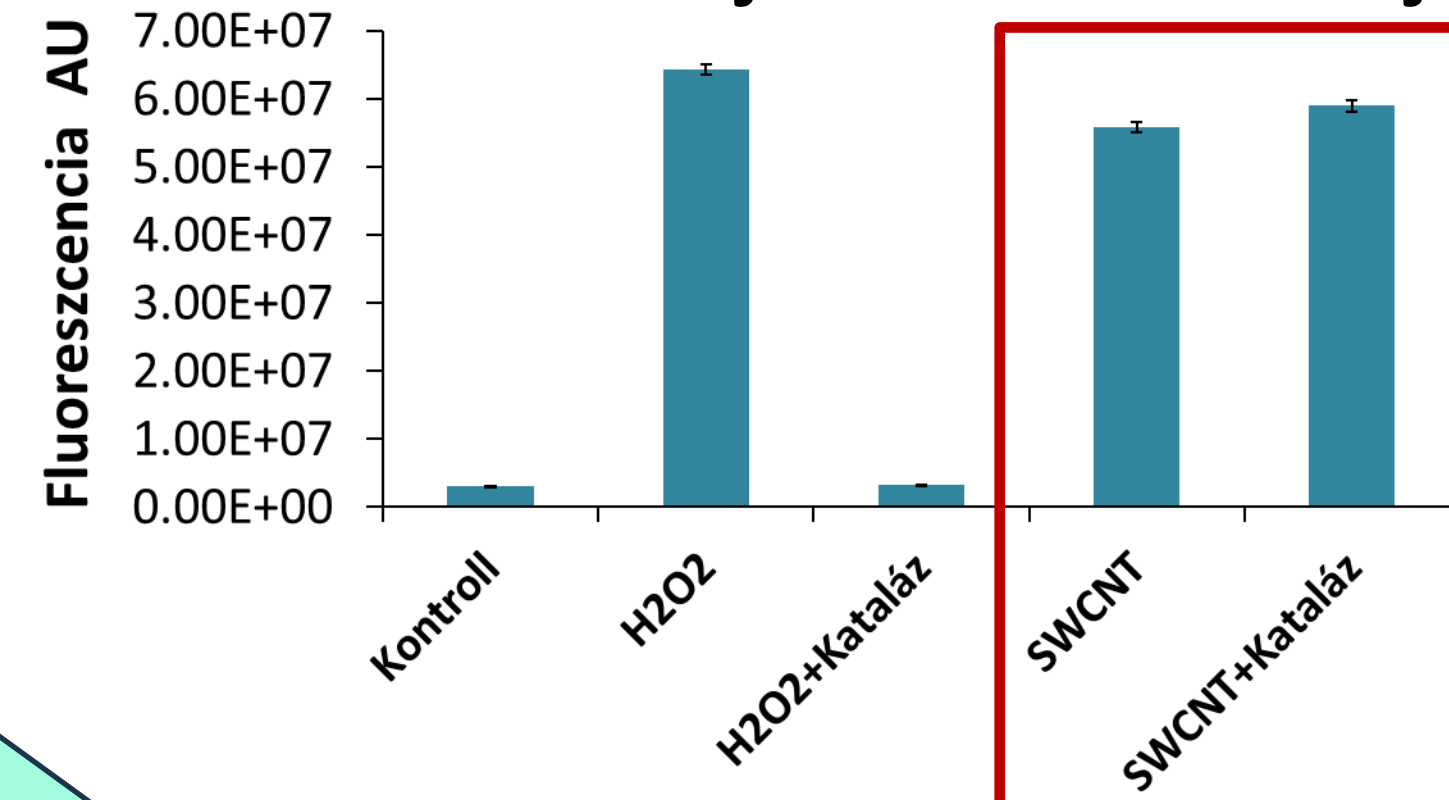
NADPH-oxidáz rendszer éretlen és nem aktiválható SWCNT által

➤ A DCF forma kialakulásáért az SWCNT generálta membrán permeábilis H₂O₂ felelős-e?

Kataláz hatás-Sejtes DCFDA jel



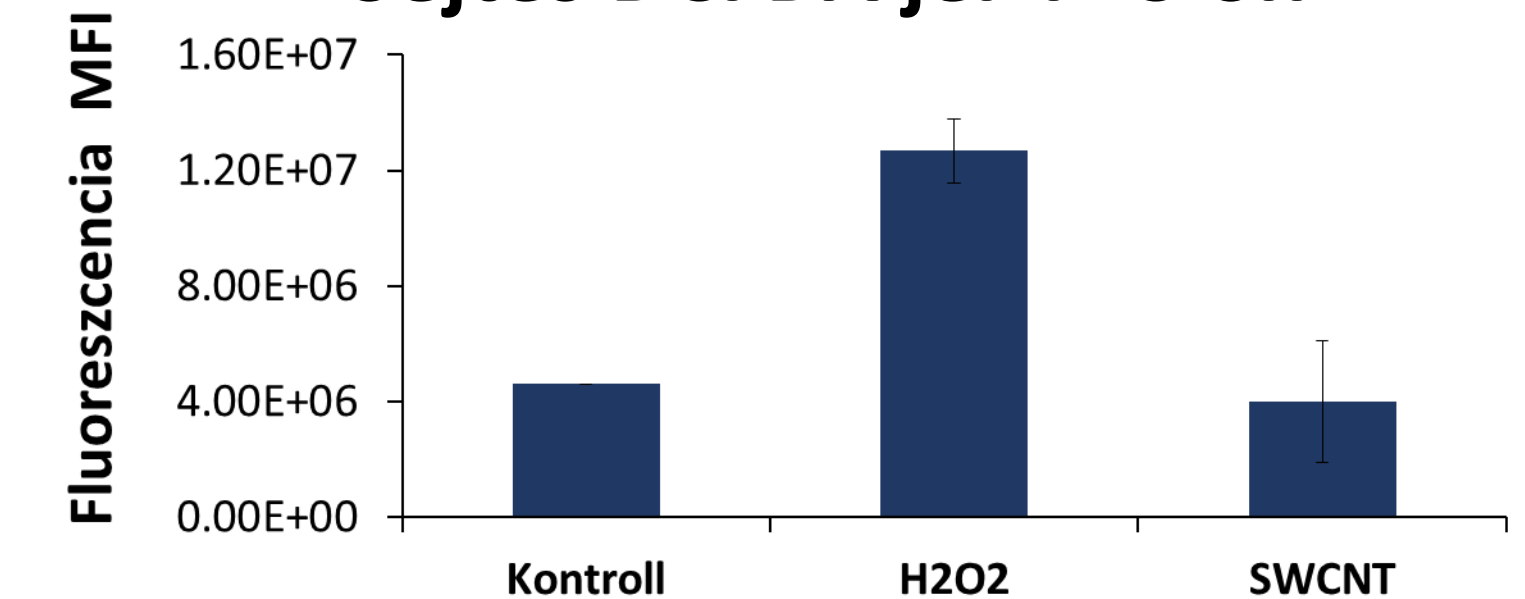
Kataláz hatás-Sejtmentes DCFDA jel



Hozzáadott kataláz nem gátolja a fluoreszcenciaintenzitás növekedést sem a sejtekben, sem a sejtmentes közegben
A jelenség nem H₂O₂ közvetített

➤ Aktív sejtfolyamat szükséges-e a sejtes fluoreszcencia kialakulásához?

Sejtes DCFDA jel 4 °C-on



4 °C-on H₂O₂-ra van, SWCNT hatására nincs jel növekedés
Szükséges sejtes folyamat a jel kialakulásához

Összegzés

A nanorészecskék HL-60 sejteken való hatásuk alapján két csoportra oszthatók. A magas jelet adó csoportból általunk reprezentatívnak vélt SWCNT-t kiválasztva és tovább vizsgálva a következők állapíthatók meg. A H₂DCF oxidációja sejten kívül és belül egyaránt lezajlik mind a H₂O₂, mind az SWCNT jelenlétében, de 4 °C-on csak a H₂O₂ vált ki sejten belüli fluoreszcens jelet. Míg a H₂O₂ passzívan jut be a sejtekbe, az SWCNT felvétele hőmérsékletfüggő, így aktív sejtes folyamathoz köthető.

Anyagok és Módszerek

NANORÉSZECSKÉK: SWCNT - purified single-walled carbon nanotubes (Sigma-Aldrich), S(short)-SWCNT (SES); L(long)-SWCNT (SES); PEG(polyethilen glycol)-SWCNT (SES); S(short)-MWCNT - multi-walled carbon nanotubes (SES); L(long)-MWCNT (SES); CB - carbon black (Printex90); és további nanorészecskék: Diesel; SiOx; Ag; Pt; TiO₂; ZnO
A nanorészecskéket szonikálással diszpergáltuk fiziológias sóoldatban, majd borjú szérum albuminnal stabilizáltuk.

Sejtvonal: érleletlen HL-60 - ECACC 98070106

H₂DCFDA-Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit – Abcam

TBHP: tert-butyl hydrogen peroxide – Abcam

MINTÁK: sejtes: HL-60 sejteket RPMI-1640 (10 % FCS) médiumban 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett nedves környezetben tenyésztettük; HL-60 sejtek előkezelése: sejtek feltöltése H₂DCFDA (20 μM) 37 °C, 5 % CO₂, 30 min; Sejtmentes közeg előinkubálása: H₂DCFDA (20 μM) 37 °C, 5 % CO₂, 30 min, 10 % FCS jelenlétében
KEZELÉS és MÉRÉS: 1 x 10⁶ sejt/ sejtmentes közeg, 0,1 mg/ml nanorészecske, 37 °C, 5 % CO₂, 4 h
1., A sejtek fluoreszcencia mérése DXFlex Beckman Coulter flow cytometer, FSC-SSC kapu MFI értékei és statisztikai analízise
2., Sejtmentes közeg fluoreszcencia mérése (270 g, 5 min) ID3 Spectramax multimode reader-rel 488/535 nm
Statisztika: Átlag ± SD, n=3, p=0,05 szignifikancia szint