

## Materiale si metode

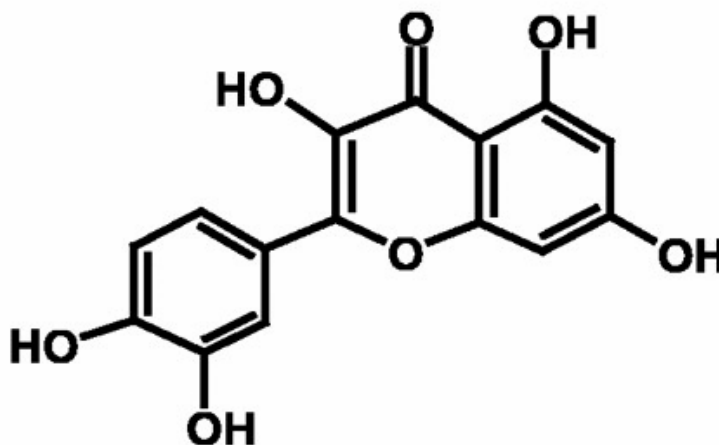
### Celule:

#### limfoblasti T leucemici umani: Jurkat

mentinute in cultura in mediu RPMI suplimentat cu 10% (v/v) ser fetal bovin, 2mM glutamina si penicilina/streptomicina la 37°C, 80% umiditate si 5% CO<sub>2</sub>

### Chimicale:

#### Quercetina (3,3',4',5,6-pentahidroxi flavon, Q0125 SIGMA)



bioflavonol relativ hidrofob avand totusi grupari OH suficiente ca numar si in pozitii potrivite pentru a permite interactiunea prin legaturi de hidrogen cu capetele polare ale lipidelor din bistrat artificial/membranar

#### medii de cultura

mediu de cultura standard RPMI suplimentat cu 10% (v/v) ser fetal bovin, 2mM glutamina si penicilina/streptomicina

### Tratamente, proceduri:

**Deprivare de ser** in vederea sincronizarii celulelor in etapa G0 a ciclului celular

**Expunere la quercetina - concentratii de 5 - 100  $\mu$ M in mediu de cultura**

**- perioade de timp: 24 - 72h**

#### Medii de cultura modificate:

G - mediu standard RPMI cu glucoza suplimentat cu 10% (v/v) ser fetal bovin (FCS), 2mM glutamina, 100unitati/mL Penicilina si 100 $\mu$ g/mL Streptomicina

G0 - G fara 10% FCS

G5Q - G care contine 5 $\mu$ M Quercetin

G10Q - G care contine 10 $\mu$ M Quercetin

G50Q - G care contine 50 $\mu$ M Quercetin

G100Q - G care contine 100 $\mu$ M Quercetin

## Investigarea modificarilor aparute in fluiditatea membranelor celulare:

### Masuratori de fluorimetrie stationara pe suspensii celulare ale modificarilor aparute in anizotropia de fluorescenta a unor fluorofori incorporati in membrana plasmatica

Fluorimetru: Perkin-Elmer 50B

Fluorofor: **TMA-DPH** (1-[(4-trimethyl-amino)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene)

#### Coeficient de anizotropie de fluorescenta:

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}}$$

unde  $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$  iar  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  si  $I_{HH}$  sunt componentele de intensitate de fluorescenta corectate pentru autofluorescenta celulelor,

VV, VH, HV, HH indica pozitia verticala/orizontala a polarizorului/analizorului

#### Parametru de ordine lipidica:

$$S = \sqrt{\frac{r_{\infty}}{r_0}}$$

unde  $r_0^{\text{TMA-DPH}} = 0.362$  este valoarea limita initiala a coeficientului de anizotropie, iar valorile limita pentru timpi lungi ale coeficientului se calculeaza cu ajutorul formulelor semiempirice deduse [11] utilizand date experimentale publicate [30]:

$$\begin{aligned} r_{\infty} &= 1.270 \cdot r - 0.076 & 0.13 < r < 0.28 \\ & & \text{pt.} \\ r_{\infty} &= 1.100 \cdot r - 0.032 & 0.28 < r < 0.34 \end{aligned}$$

### Fluiditate membranara (F) in regiunea capetelor polare ale lipidelor din bistratul membranei plasmaticice

$$F^{\text{suprafata externa/interna}} = \frac{1}{S^{\text{TMA-DPH}}}$$

unde  $S^{\text{TMA-DPH}}$  reprezinta parametrul de ordine lipidica

## Investigarea modificarilor aparute in viabilitatea/proliferarea celulara:

### Evidentierea modificarilor aparute in viabilitatea / proliferarea celulară prin microscopie optica

Microscop: Carl Zeiss Axiovert25 CFL

Colorant: tripan albastru

Numararea celulelor in camera Neubauer/Tuerk

S-au determinat numarul total, numarul de celule viabile (excluzand albastru de tripan: tripanalbastru<sup>-</sup>) si numarul de celule neviabile (colorate de albastru de tripan: tripanalbastru<sup>+</sup>).

**Procentajul de celule viabile** a fost determinat din raportul dintre numarul celulelor viabile si numarul total de celule:

$$\% \text{ viabilitate} = \frac{n_{\text{tripanalbastru}^-}}{n_{\text{tripanalbastru}^-} + n_{\text{tripanalbastru}^+}} \cdot 100$$

iar **numarul total relativ de celule vii** a fost calculat drept raport de celule vii dupa perioade de timp diferite de expuneri unor doze diferite in conditii diferite fata de numarul initial de celule vii:

$$\text{supravietuire/prolif.fractionala}(t) = \frac{n_{\text{tripanalbastru}^-}(t)}{n_{\text{tripanalbastru}^-}^{\text{initial}}}$$

Procesarea datelor: Excel

### **Examinarea morfologiei celulelor din culturi prin microscopie de contrast de faza**

Microscop: Carl Zeiss Axiovert25 CFL

Observarea celulelor in camera Neubauer/Tuerk sau in petriuri

### **Evidentierea modificarilor aparute in rata de celule vii / apoptotice / necrotice prin microscopie de fluorescenta**

Microscop: Carl Zeiss Axiovert25 CFL

Fluorofor: Hoechst 33342 (Ex. 350 nm, Em. 540 nm) si PI (iodura de propidiu)  
(Ex. 490/535 nm, Em. 617 nm)

Observarea celulelor in camera Neubauer/Tuerk - examinarea morfologiei celulelor vii (Hoechst+PI<sup>-</sup>) si moarte (Hoechst+PI<sup>+</sup>)

Procesarea datelor: Excel

### **Investigarea prin citometrie in flux a efectelor celulare ale quercetinei:**

#### **Evidentierea modificarilor aparute in progresia celulelor prin ciclul celular prin citometrie în flux**

Citometru: Becton Dickinson FACS, aflat în dotarea Institutului National de Cercetare-Dezvoltare "Victor Babes"

Soft de achizitie: CellQuest

Fluorofor: PI (Ex. 490 nm, Em. 605 nm)

Celule tratate cu RNaza

Procesarea datelor: WinMDI 2.8 si Cylchred

#### **Analiza datelor cantitative privind modificarile aparute in parametri celulari sub influenta quercetinei**

Valorile sunt prezentate sub forma de valori medii±S.D. calculate in cel putin 3 experimente independente

Evaluarea semnificatiei statistice cu ajutorul testului Student (unpaired, two-tailed), considerand valori P<0.05 ca fiind semnificative statistic

Soft de analiza: Excel