

Fluoreszcens fakulás hatása morfológiai mérésekre gerincvelői mintákban

Polgár Tamás Ferenc^{1,2}, Spisák Krisztina^{1,2}, Patai Roland¹

¹SZBK Biofizikai Intézet

²SZTE SZAOK Elméleti Orvostudományok DI

polgar.tamas@brc.hu

A fluoreszcens fakulás jól ismert jelenség, de a morfológiai mérésekre gyakorolt hatásáról kevés ismeretanyag áll rendelkezésünkre. A morfometriai mérőszámok utalhatnak a vizsgált terület fiziológiás vagy patológiás állapotára; például a központi idegrendszer rezidens immunsejtjeinek, a mikroglia sejtek sejttestjének és nyúlványainak vastagsága és elágazásainak száma reprezentálja aktivációs állapotukat.

Kutatásunkban különböző fluorofórokkal jelölt, finom (makrofágok/mikroglia) és tömör (neuronok) struktúrájú sejteken mértünk morfológiai paramétereket eltérő idejű megvilágítást követően. Ezen mérőszámokat hasonlítottuk össze egy fotostabil standard (diaminobenzidin) használatával kinyert eredményekkel. Gerincvelői mintákon időszériás felvételeket készítettünk (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 és 15 perces megvilágítással) a mikroszkóp beállításainak változtatása nélkül. A felvételekből jelintenzitásokat mértünk, valamint egy saját fejlesztésű algoritmus segítségével a dinamikus és relatív mikroglia-sejtprofil lefedettséget határoztuk meg, majd fraktálgeometriai méréseket végeztünk a széria kezdőpontjából szegmentált sejtprofilokon, illetve azok párján a detektálhatósági limithez közelítő mérési időpontoknál.

Az átlagintenzitások aránya eltérő mértékű fakulásra utal a különböző fluorofórok esetében. A sejtprofilok területi lefedettsége bizonyos esetekben 2 perc megvilágítás után sem volt mérhető. Néhány fraktális paraméterben a fakulás eredményeképp 2-5 perc után több mint 35%-os eltérés volt megfigyelhető. A fenotípusosan kevésbé változó neuronok esetén sejtszámmeghatározást végeztünk, ahol megfigyeltük, hogy már 2 perc megvilágítás után több mint 20%-os sejtszámvesztés történt.

Eredményeink alapján felvethető, hogy bár az immunfluoreszcencia lokalizációra, kolokalizációra kiváló metodikai lehetőséget biztosít, azonban a finomstruktúras morfológiai mérésekhez fotostabil jelölés szükséges, hogy elkerülhető legyen a megvilágítás-idő egyenlőtlenségeiből fakadó mérési hiba.