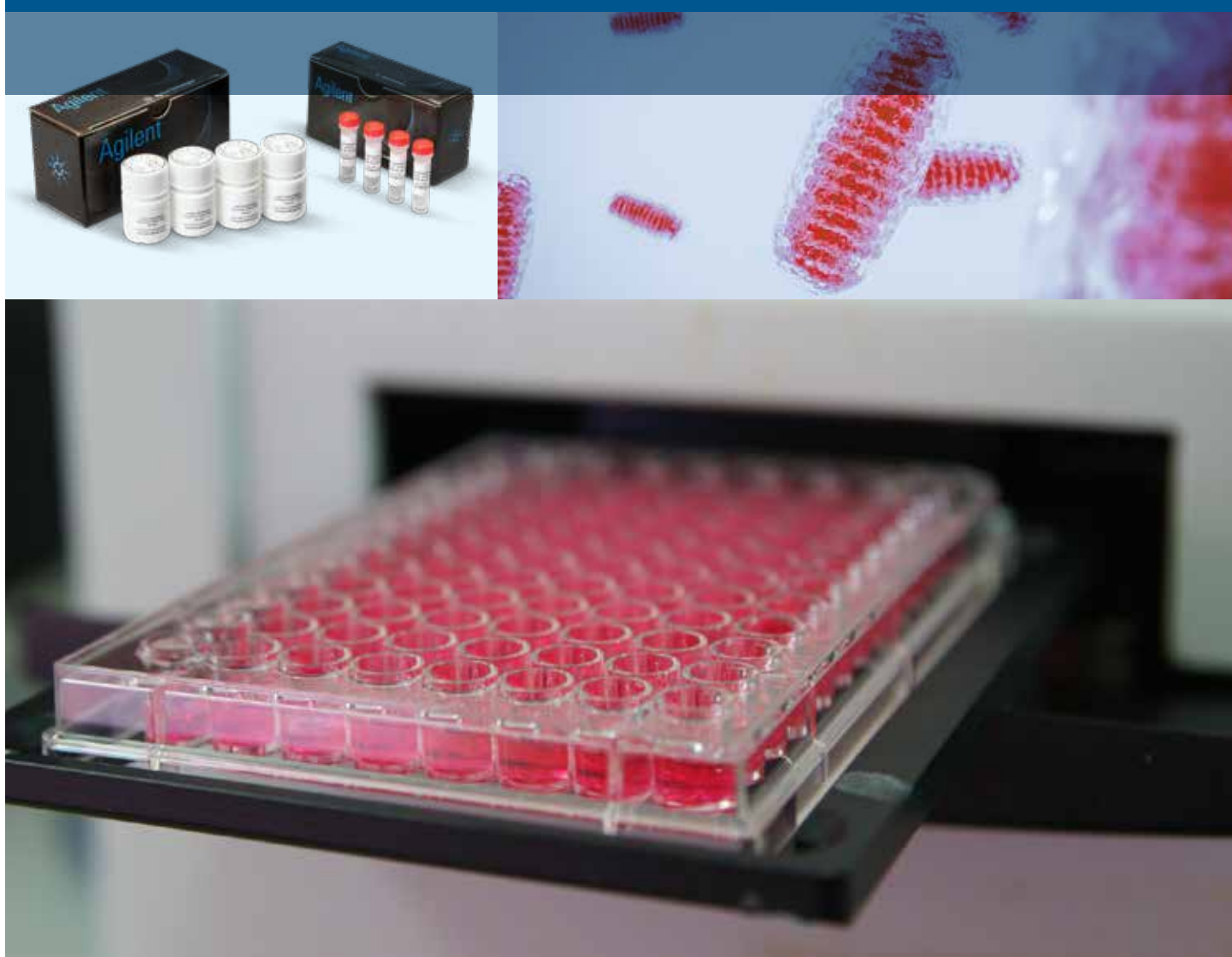


Soluzioni Agilent per la misura del metabolismo cellulare sul vostro lettore di piastre



Sblocca l'intero potenziale del tuo lettore di piastre



Scopri come le analisi del consumo di ossigeno Agilent MitoXpress Xtra, della glicolisi Agilent pH Xtra e dell'ossigeno intracellulare Agilent MitoXpress Intra possono aiutarti a:

- Misurare l'attività mitocondriale e la glicolisi in cellule vive.
- Andare oltre le analisi indirette dell'end-point basate su cellule eseguendo rilevanti valutazioni dirette "mix-and-measure" della funzionalità mitocondriale, dell'attività di glicolisi e dell'ossigenazione cellulare.
- Eseguire il multiplexing con altre analisi pertinenti.
- Spingerti oltre il monostrato per eseguire misure su cellule in sospensione, misure microbiche e su specifiche colture 3D.
- Incrementare la produttività con semplici analisi del metabolismo "mix-and-measure" in micropiastre standard.
- Misurare in modo pratico mitocondri isolati con un'alta produttività.
- Indagare la relazione tra disponibilità di ossigeno e alterazione del metabolismo cellulare.

Analisi del consumo di ossigeno MitoXpress Xtra

Misura del consumo cellulare di ossigeno



Le misure del consumo di ossigeno forniscono una lettura funzionale fondamentale del metabolismo cellulare e, nello specifico, della funzionalità mitocondriale. Eseguendo questi tipi di misure per esaminare il metabolismo di cellule vive si ottengono importanti conoscenze meccanicistiche sulla funzione cellulare e sul ruolo della perturbazione del metabolismo nella progressione della malattia.

L'analisi del consumo di ossigeno MitoXpress Xtra è uno strumento prezioso per lo studio del metabolismo. Fornisce una misura cinetica semplice del metabolismo aerobico eseguibile su micropiastre standard utilizzando lettori di piastre a fluorescenza. In seguito alla respirazione, la concentrazione di ossigeno nel campione decresce. Ciò provoca un incremento nel segnale MitoXpress Xtra che fornisce una misura del consumo di ossigeno.

In Figura 1 è mostrato uno studio del consumo di ossigeno di cardiomiociti umani derivati da iPSC (cellule staminali pluripotenti indotte) (Cor.4U, NCardia) utilizzando l'analisi MitoXpress Xtra. Nel caso delle cellule trattate con il disaccoppiante FCCP, il tasso di variazione del segnale è aumentato a causa dell'aumento della respirazione. Al contrario, il trattamento con antimicina A, un inibitore della respirazione mitocondriale, ha avuto l'effetto opposto. Il tasso di variazione del segnale si è ridotto a causa della riduzione del consumo di ossigeno. Queste misure possono essere condotte in varie formulazioni dei mezzi, rendendo più flessibile la progettazione delle analisi.

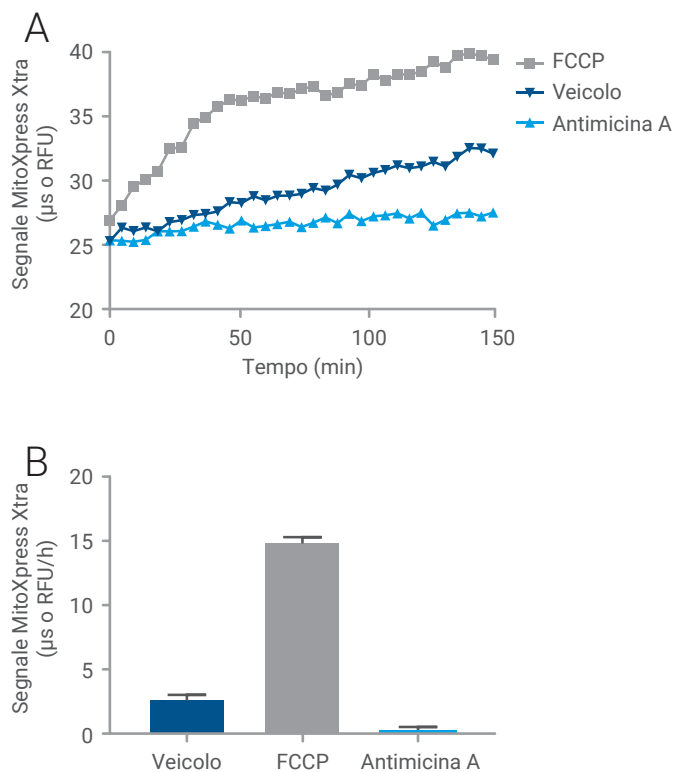


Figura 1. (A) Studio del consumo di ossigeno di Cor.4U (NCardia) eseguendo la misura con l'analisi Agilent MitoXpress Xtra. La respirazione delle cellule comporta la deplezione dell'ossigeno disciolto e il conseguente aumento del segnale MitoXpress Xtra. Il trattamento con antimicina A (un inibitore della respirazione mitocondriale) inibisce il consumo di ossigeno, riducendo pertanto il tasso di variazione del segnale del sensore. Il trattamento con FCCP (un disaccoppiante) incrementa il consumo di ossigeno, che a sua volta incrementa il tasso di variazione del segnale del sensore. (B) Questi effetti metabolici possono essere valutati analizzando il tasso di variazione del segnale MitoXpress Xtra: tassi più bassi sono indice di un'attività metabolica aerobica ridotta.

Soluzioni MitoXpress Xtra per tossicologia

Screening della tossicità indotta da farmaci

La disfunzione mitocondriale indotta da farmaci è stata associata a varie classi di farmaci ed è stato dimostrato che contribuisce in misura significativa alla tossicità a livello di fegato, cuore, reni, muscoli e sistema nervoso centrale.

Grazie alle prestazioni di analisi e al formato basato su micropiastre, l'analisi MitoXpress Xtra rappresenta una soluzione pratica per lo screening precoce delle vulnerabilità mitocondriali indotte da farmaci e la generazione di curve dose-risposta (Figura 2). Questi studi possono essere eseguiti con una serie di modelli *in vitro* pertinenti, inclusi epatociti primari e cardiomiociti ed epatociti derivati da hiPSC (cellule staminali umane pluripotenti indotte).

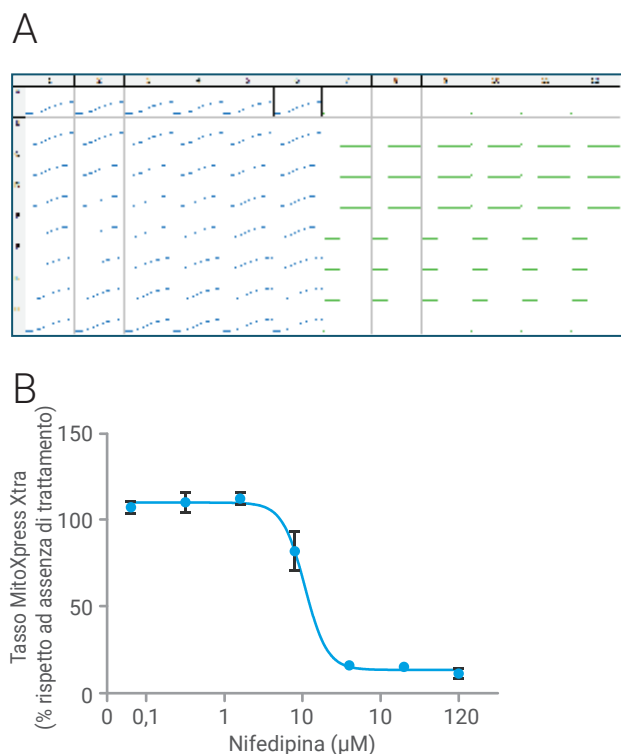


Figura 2. (A) Misura del consumo di ossigeno in cellule hiPS-HEP (Clontech) mediante l'analisi Agilent MitoXpress Xtra con un fattore Z' pari a ~0,7. (B) Curva dose-risposta per l'effetto della nifedipina (bloccante del canale del calcio) sulla respirazione mitocondriale in cardiomiociti Cor.4U. I valori sono stati ottenuti da pendenze normalizzate rispetto al controllo (veicolo).

Misura della respirazione in mitocondri isolati

Grazie a MitoXpress Xtra la misura della respirazione in mitocondri isolati è più accessibile che mai. Questa analisi permette valutazioni dirette basate su micropiastre dell'attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC), pratiche e ad alta produttività su lettori di piastre a fluorescenza convenzionali (Figura 3A). Ciò semplifica lo screening dei composti e l'analisi dose-risposta (Figura 3B). Inoltre, l'utilizzo di combinazioni specifiche di substrato e inibitore rende possibili valutazioni meccanicistiche più dettagliate per singoli complessi ETC e le proteine mitocondriali associate. Rispetto ai tradizionali approcci basati sulla polarografia, il volume di campione relativamente basso necessario per l'analisi MitoXpress Xtra permette più replicati per isolato. I bassi volumi di campione necessari incrementano significativamente la quantità di dati generabili da una singola preparazione di mitocondri, in particolare se si usano piastre a 384 pozzetti.

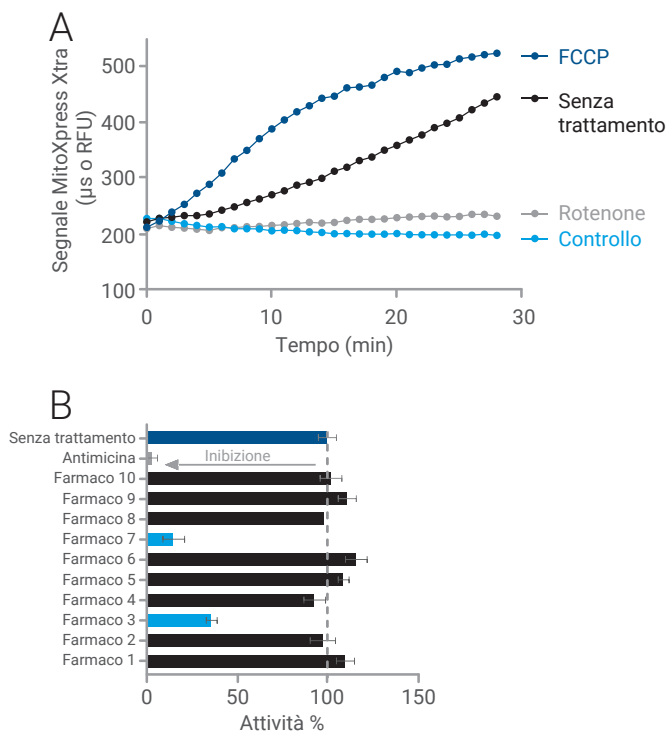


Figura 3. Analisi della respirazione di mitocondri isolati (fegato di ratto) utilizzando l'analisi Agilent MitoXpress Xtra (A) che evidenzia inibizione e disaccoppiamento in seguito al trattamento con modulatori mitocondriali classici. (B) Screening con un pannello di farmaci incogniti utilizzando mitocondri da fegato di ratto per identificare la disfunzione mitocondriale indotta da farmaci (farmaci 3 e 7).

Soluzioni MitoXpress Xtra per il multiplexing

Valutazione multiparametrica e multiplex della funzionalità mitocondriale

Ulteriori conoscenze sulla risposta cellulare possono essere ricavate abbinando le analisi MitoXpress Xtra o pH Xtra a misure di altri parametri pertinenti compatibili con lettori di piastre, quali il potenziale di membrana mitocondriale (MMP), le specie di ossigeno reattive (ROS) o il contenuto cellulare di ATP. Ciò consente ai ricercatori di caratterizzare meglio l'effetto sulla funzione cellulare dei trattamenti o delle variazioni delle condizioni. Inoltre aiuta a contestualizzare le perturbazioni metaboliche osservate senza dover condurre trattamenti paralleli o usare piattaforme tecnologiche disparate.

Un esempio consiste nell'uso di una misura multiplex della vitalità cellulare (calceina AM) e della respirazione mitocondriale (MitoXpress Xtra) per una migliore comprensione dell'effetto off-target del trattamento farmacologico sulla funzione cellulare (Figura 4).

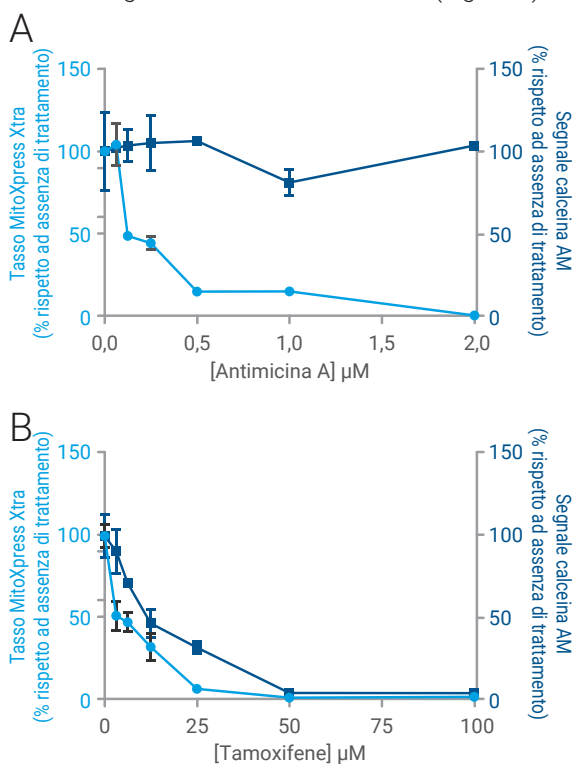


Figura 4. Misura multiplex di Agilent MitoXpress Xtra e calceina AM in cellule HepG2 trattate con (A) antimicina A e (B) tamoxifene per 24 h. Entrambi i farmaci riducono la respirazione mitocondriale (blu chiaro). Il tamoxifene ha mostrato un effetto significativo sulla vitalità, mentre il trattamento con antimicina A non evidenzia una riduzione significativa della vitalità cellulare (blu scuro). Ciò suggerisce che l'effetto dell'antimicina A sulla respirazione è il risultato di un meccanismo mitocondriale più diretto.

Anche gli indicatori della funzionalità mitocondriale, quali l'MMP e la generazione di ROS, possono essere valutati in parallelo al consumo di ossigeno. Questi parametri rivestono un particolare interesse negli studi del ruolo dei mitocondri nella fisiologia cellulare.

In Figura 5 è mostrata la misura multiplex di MitoXpress Xtra e MMP (con JC-1) in cellule HepG2 trattate con i modulatori metabolici FCCP e antimicina A. Entrambi i composti riducono il potenziale di membrana ma, allo stesso tempo, sono visibili effetti distinti sul consumo di ossigeno, a dimostrazione di come la misura di più parametri pertinenti permetta di ottenere ulteriori conoscenze.

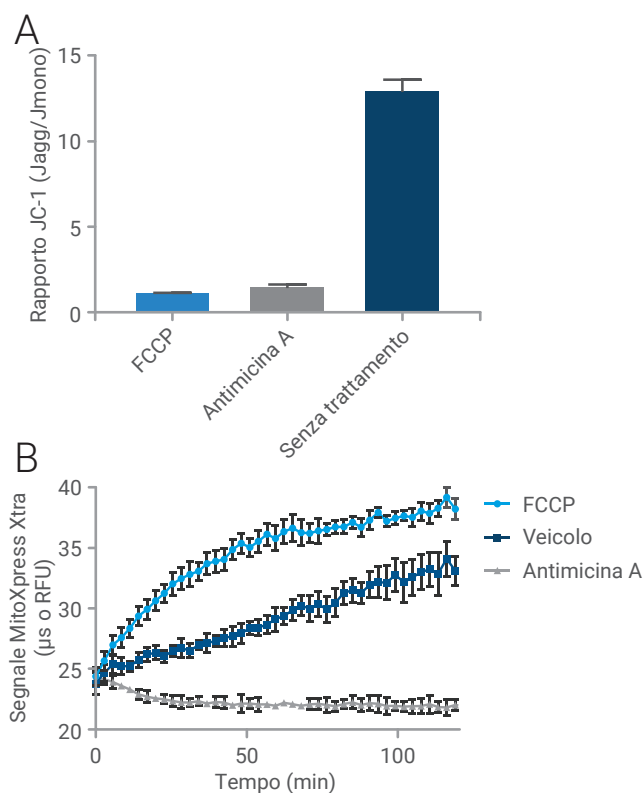


Figura 5. Misura di Agilent MitoXpress Xtra e JC-1 nello stesso pozzetto. Le cellule HepG2 sono state trattate con antimicina A o FCCP. Entrambi i composti hanno determinato una riduzione dell'MMP (A). L'FCCP ha causato un incremento caratteristico nel consumo di ossigeno, mentre l'antimicina A ha inibito la respirazione.

Soluzioni MitoXpress Xtra per la misura del metabolismo microbico

Misura della proliferazione microbica, del metabolismo e della risposta agli antibiotici

L'analisi MitoXpress Xtra mette a disposizione un metodo semplice e sensibile basato su lettore di piastre per la misura della crescita di cellule procariote o lo screening di composti antimicrobici senza necessità di eseguire svariate diluizioni del campione o lunghi studi con l'impiego di agar. Questa analisi, inoltre, è uno strumento valido per studiare il metabolismo microbico.

Il formato con lettore di piastre assicura la produttività e la risoluzione necessarie per lo screening e la pratica generazione di dati IC_{50} o MIC. In Figura 6 è mostrata l'applicazione di questo metodo per valutare la proliferazione microbica, generare dati dose-risposta e valutare gli specifici effetti metabolici del trattamento con i composti per due composti in lievito.

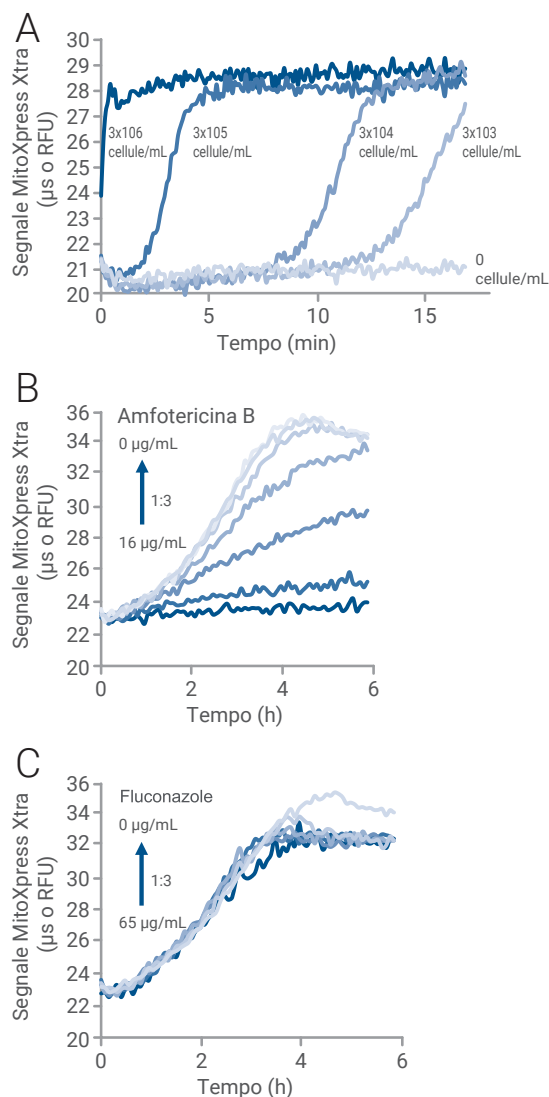


Figura 6. Profili della deplezione di ossigeno per *C. albicans* misurati a concentrazioni di semina decrescenti. (A) *C. albicans* è stato trattato con concentrazioni crescenti di amfotericina B (B) e fluconazolo. (C) L'amfotericina B ha determinato la riduzione dose-dipendente nel consumo di ossigeno mentre il fluconazolo non ha provocato la diminuzione del consumo di ossigeno. Queste osservazioni sono correlate alla modalità di azione dei farmaci.

Analisi della glicolisi pH Xtra

Misura dell'attività di glicolisi



Le misure di acidificazione extracellulare forniscono informazioni molto significative per studiare l'attività di glicolisi e sono pratiche da eseguire su lettori di piastre abilitati alla fluorescenza a risoluzione temporale (TRF) impiegando l'analisi della glicolisi pH Xtra. L'acidificazione extracellulare è in gran parte causata dalla conversione di piruvato in lattato, che provoca una diminuzione del pH del tampone di analisi. Il sensore pH Xtra rileva in maniera sensibile questa diminuzione del pH come un aumento nel segnale del sensore.

Queste misure di pH forniscono informazioni essenziali sul ruolo chiave giocato dall'alterazione dell'attività di glicolisi in un ampio spettro di processi fisiologici e patofisiologici, inclusi il cancro e l'adattamento cellulare all'ipossia.

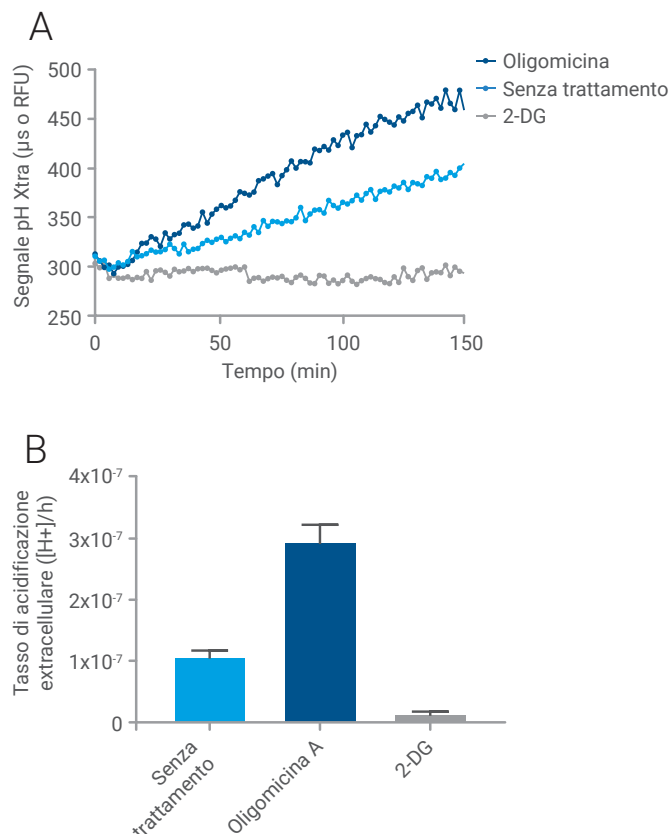


Figura 7. (A) Studio dell'attività di glicolisi A549 misurata tramite l'analisi della glicolisi Agilent pH Xtra. Il trattamento con 2-deossiglucosio (2-DG), inibitore dell'esochinasi, inibisce l'acidificazione extracellulare; tale inibizione è osservata come una riduzione nella variazione del segnale del sensore. Il trattamento con oligomicina A, un inibitore della generazione mitocondriale di ATP, comporta l'aumento della produzione glicolitica di ATP per mantenere l'omeostasi dell'energia cellulare. (B) Le variazioni nell'acidificazione extracellulare possono essere valutate in modo pratico come scala di pH o di ioni [H⁺] nel tempo.

Soluzioni MitoXpress Xtra e pH Xtra

Misura del metabolismo cellulare in colture 3D

La misura del metabolismo cellulare con lettore di piastre può essere eseguita anche su colture in sospensione e specifici sistemi di coltura 3D (per esempio RAFT, Mimetix e Alvetex). Coltivare le cellule in 3D facilita lo sviluppo di complesse interazioni intracellulari, aiutando a ridurre il divario tra sistemi biologici *in vitro* e *in vivo*. La Figura 8 mostra l'uso delle analisi MitoXpress Xtra e pH Xtra per la misura del metabolismo cellulare in matrici 3D (RAFT, Lonza) senza perturbare l'integrità della struttura 3D.

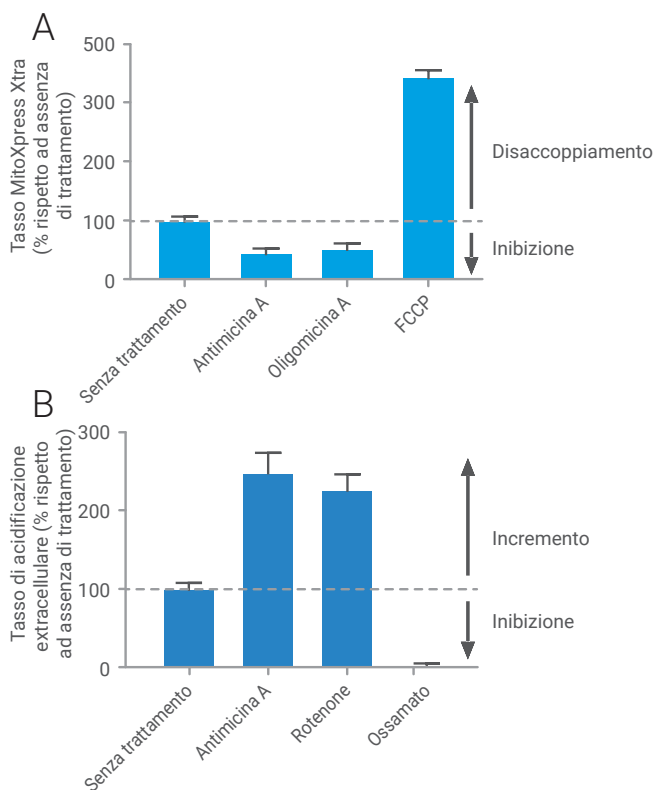


Figura 8. (A) Effetto relativo del trattamento farmacologico sul consumo di ossigeno in colture A549 3D RAFT misurato con l'analisi Agilent MitoXpress Xtra. (B) Effetto relativo del trattamento farmacologico sui tassi di acidificazione extracellulare in colture HepG2 RAFT misurato con l'analisi della glicolisi Agilent pH Xtra.

Misura combinata di glicolisi e consumo di ossigeno

L'uso combinato di MitoXpress Xtra e pH Xtra consente di valutare l'equilibrio metabolico cellulare come linea di base per i successivi studi del metabolismo. La Figura 9 illustra l'uso combinato di queste analisi per studiare l'equilibrio tra consumo di ossigeno e glicolisi in svariati tipi di cellule. La figura mostra anche come la variabilità nella disponibilità di substrato può modulare questo equilibrio metabolico.

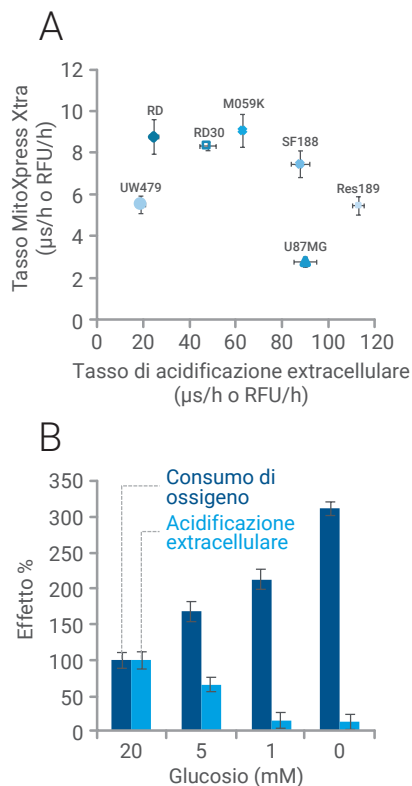


Figura 9. (A) Analisi combinata della glicolisi e della respirazione mitocondriale in linee di cellule tumorali utilizzando le analisi Agilent MitoXpress Xtra e Agilent pH Xtra. (B) Effetto della disponibilità di glucosio sul metabolismo di cellule U87MG. L'incremento della disponibilità di glucosio ha ridotto la respirazione e aumentato la glicolisi (dati gentilmente concessi dal Dr. Karl Morten, Università di Oxford, Regno Unito).

Analisi dell'ossigeno intracellulare MitoXpress Intra

Ossigenazione intracellulare e ipossia



La disponibilità di ossigeno a livello cellulare incide significativamente su fisiologia cellulare, trasduzione dei segnali e metabolismo. Di conseguenza, concentrazioni di ossigeno più basse e più rilevanti fisiologicamente sono usate negli studi *in vitro*, in particolare nei campi del metabolismo del cancro, dello sviluppo di farmaci e della ricerca cardiovascolare e neuronale. Un elemento cruciale di questi modelli *in vitro* è tuttavia la capacità di monitorare l'ossigenazione cellulare, in quanto le fluttuazioni di questo parametro dinamico possono ostacolare l'interpretazione dei dati. Comprendere l'entità e la durata della condizione di ossigenazione a cui è esposto il modello cellulare riveste pertanto un'importanza significativa.

L'analisi MitoXpress Intra risponde a questa esigenza misurando le concentrazioni intracellulari di O_2 in cellule vive. Il reagente viene captato dalla cellula e può essere monitorato impiegando lettori di piastre a fluorescenza con la capacità di eseguire misure di fluorescenza a risoluzione temporale (TRF) a doppia lettura. Il sensore risponde quindi in tempo reale a qualsiasi variazione nella concentrazione intracellulare di ossigeno provocata da variazioni delle condizioni atmosferiche o della respirazione cellulare.

Oltre a essere un informativo strumento di monitoraggio, l'analisi permette anche ai ricercatori di correlare le risposte metaboliche ai livelli di ossigeno disponibili. Questi parametri sono estremamente importanti in aree quali l'ischemia, il metabolismo del cancro e l'ipossia. La Figura 10 mostra come è possibile usare l'analisi MitoXpress Intra per evidenziare le differenze significative tra il livello di ossigeno applicato e quello sperimentato dalle cellule. Queste differenze dipendono da numero, proliferazione, tipo ed equilibrio metabolico delle cellule; ciò significa che l'entità dell'ipossia sperimentata dalle cellule non può essere dedotta dalla concentrazione ambientale di ossigeno.

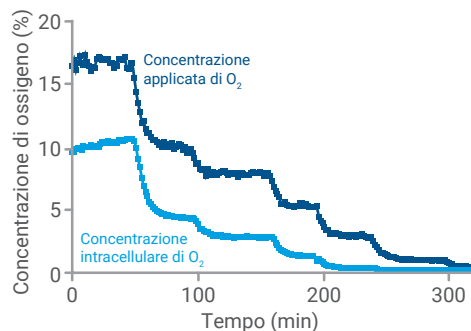


Figura 10. Monitoraggio delle concentrazioni di O_2 in campioni contenenti cellule HepG2 cresciute in coltura 3D (RAFT, Lonza) in risposta a concentrazioni decrescenti di O_2 atmosferico. Alla concentrazione atmosferica di O_2 , le cellule sperimentano livelli di ossigenazione medi pari a ~10%, mentre a una concentrazione di O_2 nell'ambiente pari a 5%, i livelli di ossigenazione tendono allo 0% di O_2 .

Tale riduzione nell'ossigenazione può avere conseguenze fisiologiche significative e, se non viene misurata, può determinare l'errata interpretazione dei dati a causa dell'assenza di visibilità sui livelli di ossigenazione sperimentati dal modello cellulare oggetto di studio. Questo aspetto è esemplificato in Figura 11, in cui si osserva una stabilizzazione HIF del 40% a un livello di ossigenazione cellulare pari a ~1,5% di O_2 . Tuttavia, senza la misura dell'ossigenazione questo livello di stabilizzazione sarebbe stato considerato correlato a un livello di O_2 pari a ~5%.

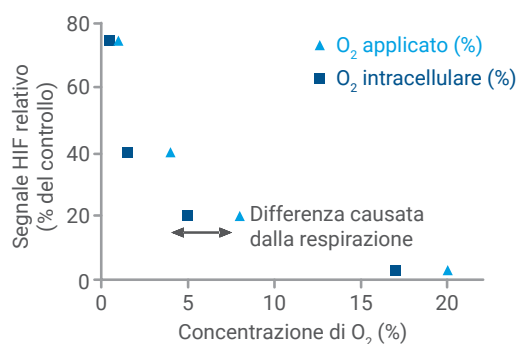


Figura 11. Stabilizzazione HIF misurata utilizzando un reporter HIF luminescente in cellule HT-1080 monitorate a concentrazioni decrescenti di ossigeno. La stabilizzazione HIF è correlata sia alla concentrazione applicata di ossigeno (blu chiaro) sia agli effettivi livelli di ossigenazione sperimentati dalle cellule, misurati tramite l'analisi Agilent MitoXpress Intra (blu scuro). Questi dati dimostrano che, a meno che non si misuri l'ossigenazione cellulare, si trarranno conclusioni erranee sulla relazione tra disponibilità di ossigeno e stabilizzazione HIF. (Dati gentilmente concessi dal Dr. Karl Morten, Università di Oxford, Regno Unito)

Soluzioni MitoXpress Intra

Studio del metabolismo del cancro in condizioni di ipossia

Il monitoraggio dell'ossigenazione cellulare in tempo reale tramite MitoXpress Intra permette ai ricercatori di determinare accuratamente l'entità dell'ipossia sperimentata da un modello cellulare. Analogamente a MitoXpress Xtra, l'analisi MitoXpress Intra può essere abbinata ad altre analisi basate su lettore di piastre, incluse le misure di vitalità, MMP e ROS. Questo aspetto è particolarmente rilevante per la ricerca sul metabolismo del cancro, in cui la relazione tra ambiente tumorale ipossico, flessibilità metabolica e fenotipo del cancro ha un'importanza significativa.

Un esempio è mostrato in Figura 12, in cui si ottengono misure multiplex dell'ossigenazione cellulare e dell'attività di glicolisi utilizzando MitoXpress Intra e l'analisi della glicolisi pH Xtra. Le misure sono eseguite sia in condizioni ipossiche sia in presenza di ossigeno atmosferico e i dati sottolineano l'effetto dell'ossigenazione sull'attività di glicolisi.

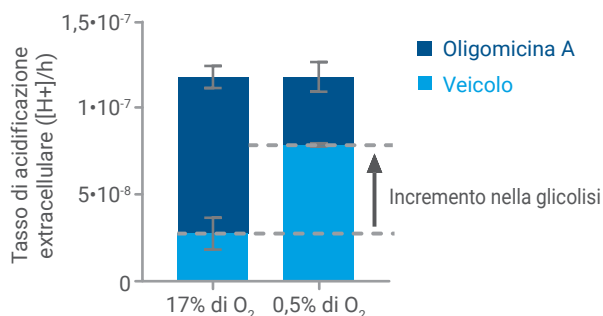
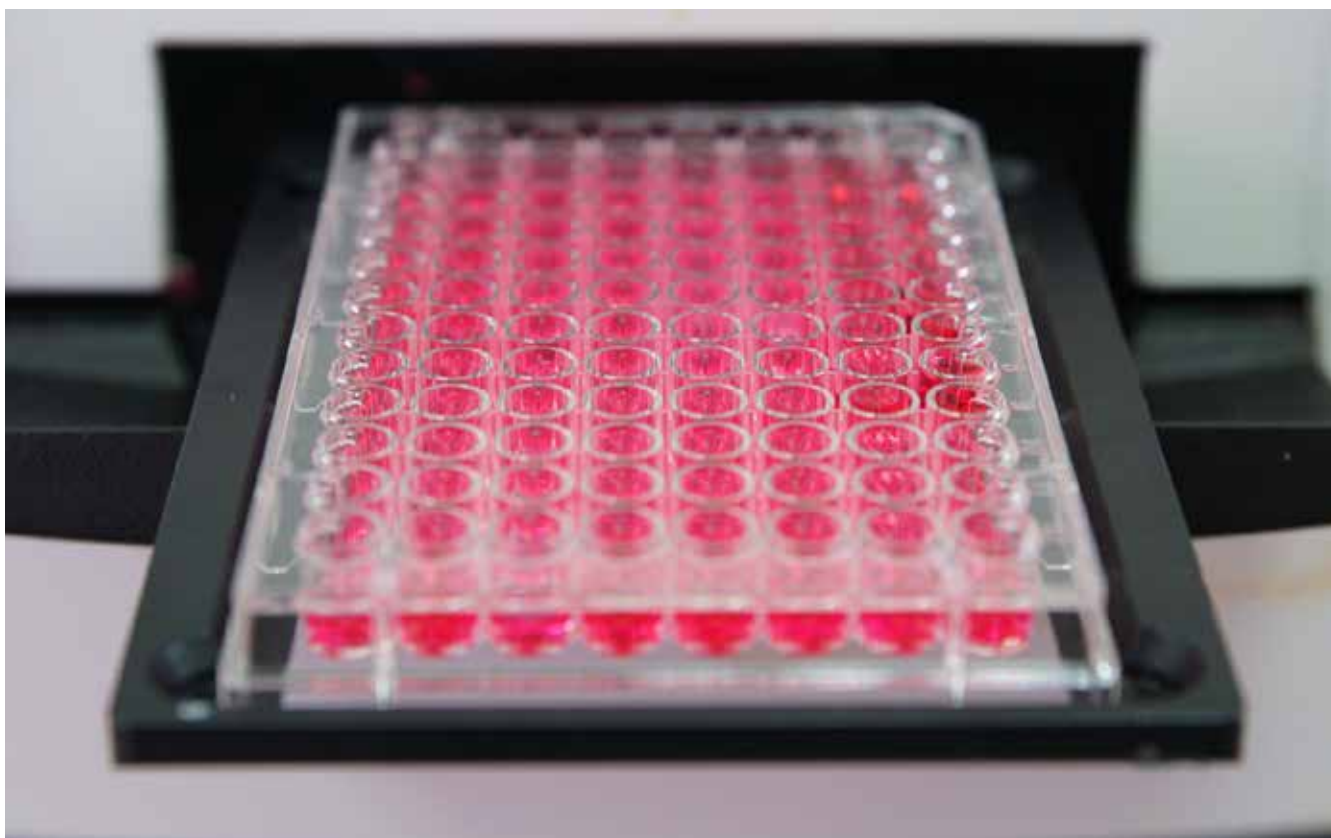


Figura 12. Acidificazione extracellulare di cellule A549 misurata con l'analisi della glicolisi Agilent pH Xtra in multiplex con l'analisi Agilent MitoXpress Intra per misurare i livelli intracellulari di ossigeno in condizioni ipossiche imposte dall'unità di controllo atmosferica del lettore di piastre. Il tasso di acidificazione extracellulare basale delle cellule trattate con il veicolo è aumentato circa tre volte in presenza di ipossia (blu chiaro), mentre la capacità glicolitica, misurata tramite trattamento con oligomicina (un inibitore della generazione mitocondriale di ATP, in blu scuro), è rimasta costante.

Il vantaggio offerto da Agilent

Il metabolismo sta alla base di tutte le risposte cellulari ed è pertanto una misura funzionale fondamentale in biologia cellulare. Grazie alla gamma di sensori metabolici compatibili con lettori di piastre a fluorescenza, Agilent ora offre una suite completa di soluzioni per gli studi *in vitro* del metabolismo cellulare. Le applicazioni qui illustrate sono esempi di come è possibile utilizzare queste analisi per studiare la funzione e il metabolismo cellulare. Per ulteriori risorse, protocolli più dettagliati e per scoprire come i sensori metabolici solubili di Agilent possono aiutarti a rispondere ai quesiti della ricerca, visita il sito www.agilent.com o contattaci direttamente all'indirizzo cellanalysis.support@agilent.com.



Gamma Agilent per l'analisi cellulare

Le nostre tecnologie all'avanguardia nel campo dell'analisi su cellule vive in tempo reale hanno aiutato i ricercatori a varcare nuovi confini in svariate aree di ricerca.

Scopri la gamma completa di soluzioni visitando il nostro sito web all'indirizzo **www.agilent.com/chem/discoverxf**

Maggiori informazioni

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

Database di pubblicazioni

www.agilent.com/publications-database/

Database di riferimento per l'analisi cellulare

www.agilent.com/cell-reference-database/

Webinar

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

Assistenza tecnica in tutto il mondo

cellanalysis.support@agilent.com

Stati Uniti e Canada

1-800-227-9770; selezionare l'opzione 3 e quindi 8

Europa

Regno Unito: 0500 096 7632

Germania: 0800 180 66 78

Altri paesi dell'UE: +45 3236 9878

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.