

**Исследование метаболического статуса мезенхимных стволовых клеток в процессе остеогенной и хондрогенной дифференцировок с использованием FLIM**

**Научный руководитель – Мелешина Александра Викторовна**

**Быстрова Алена Сергеевна**

*Студент (магистр)*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: bystrova93@gmail.com*

В настоящее время актуальной проблемой биологии стволовых клеток является изучение энергетического метаболизма в процессе направленных клеточных дифференцировок. Известно, что энергетический обмен регулирует способность к дифференцировке и самообновление стволовых клеток. Основными индикаторами внутриклеточного метаболизма являются кофакторы НАД(Ф)Н и ФАД.

Цель работы: исследование метаболических изменений в мезенхимных стволовых клетках (МСК) в процессе остеогенной и хондрогенной дифференцировок с использованием двухфотонной флуоресцентной микроскопии в сочетании с FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).

В данной работе использовали МСК жировой ткани человека. С помощью индукционных сред клетки направляли в остеогенную и хондрогенную дифференцировки. Для изучения метаболического статуса клеток в процессе дифференцировок определяли окислительно-восстановительный коэффициент (redox ratio) по отношению интенсивностей флуоресценции ФАД/НАД(Ф)Н, а также проводили анализ состояний (свободной и связанной форм) НАД(Ф)Н и ФАД по времени жизни флуоресценции и их вкладов ( $\lambda_{ex}$ : 750 нм и 900 нм;  $\lambda_{em}$ : 455-500 нм и 500-550 нм соответственно). Визуализацию МСК осуществляли на 0, 7, 14 и 21 дни остеогенной и хондрогенной дифференцировок с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss 710 с FLIM системой.

Оценка redox ratio и времени жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров показала, что на 21 день остеогенной и хондрогенной дифференцировок redox ratio было ниже, чем в недифференцированных клетках ( $0,57 \pm 0,13$  и  $0,65 \pm 0,11$  против  $0,77 \pm 0,13$ ;  $p < 0.000000$ ). Времена жизни свободной и связанной форм НАД(Ф)Н на 21 день остеогенной дифференцировки увеличились по сравнению недифференцированными МСК ( $\tau_1$  -  $448,6 \pm 25,6$  ps;  $\tau_2$  -  $2653 \pm 97,6$  ps против  $\tau_1$  -  $370,9 \pm 66,6$  ps;  $\tau_2$  -  $2500,8 \pm 131,8$  ps), а при хондрогенной дифференцировке не было найдено статистически значимого отличия по временам жизни НАД(Ф)Н на тех же сроках. Вклад во время жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н ( $a_2$ ) был выше относительно контроля на 21 день остеогенной дифференцировки ( $29,4 \pm 1,8$  против  $23,3 \pm 2,2$ ) и ниже при хондрогенной на тот же день ( $18,3 \pm 2,7$  против  $23,3 \pm 2,1$ ). Времена жизни флуоресценции свободной и связанной форм ФАД в остеогенно-дифференцирующихся клетках были выше, чем в недифференцированных МСК на 21 день дифференцировки ( $\tau_1$  -  $491,4 \pm 113$  ps;  $\tau_2$  -  $2733,5 \pm 280$  ps против  $\tau_1$  -  $435,5 \pm 64,1$  ps;  $\tau_2$  -  $2533,4 \pm 141,2$  ps). Вклад времени жизни флуоресценции связанной формы ФАД был снижен на всех временных точках дифференцировки по сравнению с недифференцированными клетками. В случае хондрогенной дифференцировки времена жизни флуоресценции ФАД не изменялись существенно, а вклад связанной формы ФАД был выше в сравнении с недифференцированными МСК ( $76,9 \pm 1,9$  против  $71,4 \pm 2,7$ ).

Основываясь на полученных данных о redox ratio и времени жизни флуоресценции кофакторов можно сделать предположение о переключении метаболизма на гликолиз в процессе остеогенной и хондрогенной дифференцировок МСК.