

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 (λ_{ex} : 750 нм и 900 нм; λ_{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 (τ_1 - $448,6 \pm 25,6$ ps; τ_2 - $2653 \pm 97,6$ ps против τ_1 - $370,9 \pm 66,6$ ps; τ_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 (τ_1 - $491,4 \pm 113$ ps; τ_2 - $2733,5 \pm 280$ ps против τ_1 - $435,5 \pm 64,1$ ps; τ_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.