

Molekulinio rotoriaus BODIPY-h taikymas mikroklamos nustatymui žmogaus odos mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse ir jų diferencijuotose kultūrose

Application of BODIPY-h molecular rotor for determining microviscosity in human skin mesenchymal stem cells and their differentiated counterparts

Džiugas Jurgutis^{1,2}, Greta Jarockytė^{1,2}, Aurimas Vyšniauskas³, Vitalijus Karabanovas^{1,4}, Ričardas Rotomskis^{1,5}

¹Biomedicininės fizikos laboratorija, Nacionalinis vėžio institutas, P. Baublio g. 3b, LT-08406, Vilnius

²Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius

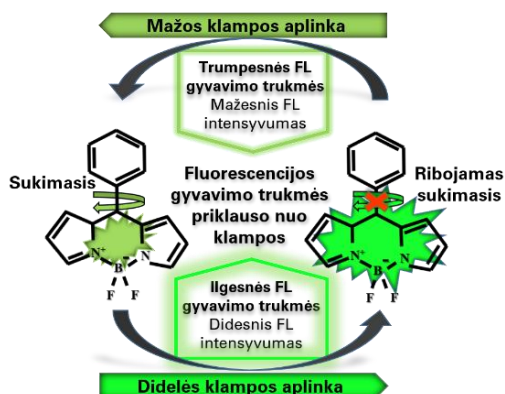
³Molekulinių darinių fizikos skyrius, Fizinių ir technologijos mokslų centras, Saulėtekio al. 3, LT-10257, Vilnius

⁴Chemijos ir bioinžinerijos fakultetas, Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Saulėtekio al. 11, LT-10223, Vilnius

⁵Biofotonikos grupė, Lazerinių tyrimų centras, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 9, LT-10222, Vilnius
dziugas.jurgutis@nvi.lt

Ląstelių diferenciacija lemia morfologinius, biocheminius ir biomechaninius viduląstelinius pakitimus. Vienas iš kertinių ląstelės biomechaninių parametrų – mikroklampa, kuri apsprendžia biomolekulių difuziją ir lemia ląstelių elgsenos pakitimus. Mikroklamos nustatymas prieš ir po diferenciacijos leistų geriau suprasti diferenciacijos mechanizmą ląstelių viduje bei tiksliau charakterizuoti kamienines ląsteles, pavyzdžiui, mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL), kurios geba diferencijuoti į riebalinio, kaulinio ir kremzlinio audinio ląsteles.

Mikroklamos nustatymą ląstelių organelėse įgalina molekuliniai rotoriai arba klampai jautrios fluorescencinės molekulės. Šiame darbe taikomas BODIPY-h (BDP-h) molekulinis rotorius, kurio jautrumas klampai patvirtintas ankstesniais tyrimais [1]. BDP-h veikimo mechanizmas (1 pav.) priklauso nuo molekulę supančios mikroaplinkos klamos: mažesnės klamos aplinkoje BDP-h fenilo funkcinė grupė suksis greičiau, vyks greitesnė relaksacija iš sužadintosios fluorescencinės būsenos nespinduliniu būdu ir bus fiksuojamos trumpesnės fluorescencijos gyvavimo trukmės. Didesnės klamos aplinkoje vyks atvirkštinis procesas. Kartu su molekuliniais rotoriais pasitelkiant fluorescencijos gyvavimo trukmės mikroskopiją (angl. trumpinys FLIM), įgalinamas viduląstelinių klamos „žemėlapių“ kūrimas [2].



1 pav. molekulių rotorijų veikimo mechanizmo schema. Paveiksle pavaizduotas darbe tiriamas BDP-h klamos jutiklis. FL – fluorescencija.

Tyrimo tikslas – nustatyti BDP-h molekulinio rotorio viduląstelinę lokalizaciją žmogaus odos MKL bei pritaikyti BDP-h diferencijuotų MKL mikroklamos nustatymui.

Tyrimo metu, pasitelkiant komercinius fluorescencinius organelių dažus (branduoliams – Hoechst 33258, mitochondrijoms – MitoTracker Red FM, lizosomoms – LysoTracker Deep Red, lipidinėms pūslelėms – Nile Red), įvertinta BDP-h lokalizacija gyvoje MKL. MKL specifinė diferenciacija indukuota naudojant StemPro diferenciacijos rinkinius (Gibco, JAV). BDP-h fluorescencijos gyvavimo trukmės gyvoje MKL ir jų diferencijuotose kultūrose nustatytos taikant FLIM su laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo metodika. Ląstelės vaizdintos su Nikon Eclipse TE2000-S C1 plus (Nikon, Japonija) skenuojančio lazerio konfokaliu mikroskopu. Išmatuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės paverstos į mikroklamos vertes naudojant BDP-h kalibracines kreives sudarytas skirtingos klamos taleno ir ricinos aliejaus tirpaluose [1].

Nustatyta, kad BDP-h difunduoja pro ląstelių plazminę membraną ir susikaupia gyvų MKL lipidinėse pūslelėse ir citozolyje. Atlikus MKL specifinę diferenciaciją į riebalinio audinio ląsteles (adipocitus) nustatyta, kad BDP-h taip pat kaupiasi adipocitų lipidinėse pūslelėse. Vadinasi, BDP-h molekulinis rotorius gali būti taikomas gyvų ląstelių lipidinių pūslelių mikroklamos įvertinimui. FLIM matavimai parodė, kad tiek nediferencijuotose MKL, tiek adipocituose, BDP-h būdingas bieksponentinis fluorescencijos gesimas, kurio trumpoji komponentė atsiranda dėl BDP-h lokalizacijos lipidinėse pūslelėse.

Reikšminiai žodžiai: kamieninės ląstelės, ląstelių diferenciacija, mikroklampa, molekuliniai rotoriai, fluorescencijos gyvavimo trukmės mikroskopija.

Literatūra

- [1] S. Toliautas, J. Dodonova, A. Žvirblis, I. Čiplies, A. Polita, A. Devižis, S. Tumkevičius, J. Šulskus, ir A. Vyšniauskas, Chem. – Eur. J. **25**, 10342 (2019).
- [2] M. K. Kuimova, Phys. Chem. Chem. Phys. **14**, 12671 (2012).