

Valutazione delle variazioni nel pool intracellulare di Magnesio, Zinco e Rame in cellule staminali mesenchimali umane giovani e senescenti.

Con l'invecchiamento sono stati segnalati diversi cambiamenti nel metabolismo del magnesio (Mg). In particolare il magnesio svolge un ruolo chiave nella salute delle ossa, infatti, è stato riportato che un maggiore apporto di magnesio favorisce un aumento della densità minerale ossea (BMD) dell'anca e del collo del femore. Pertanto, comprendere la relazione tra magnesio e salute delle ossa è un passo importante verso la ricerca di misure preventive per la perdita ossea correlata all'età e la prevenzione dell'osteoporosi. La corretta valutazione del Magnesio intracellulare si pone quindi come una importante necessità per controllare un corretto invecchiamento "in salute".

Tuttavia, le sonde sensibili al  $Mg^{2+}$  disponibili in commercio e la maggior parte di quelle sviluppate da diversi gruppi di ricerca rilevano selettivamente solo gli ioni metallici liberi, precludendo la possibilità di identificare il pool totale dell'elemento da analizzare. Questa caratteristica rappresenta un serio ostacolo analitico in un ambiente intracellulare in cui il  $Mg^{2+}$  libero rappresenta solo una piccola percentuale della quantità totale di ioni magnesio.

Prove convincenti dimostrano infatti la peculiarità dell'omeostasi cellulare dello ione magnesio: è stato infatti evidenziato che, come conseguenza di diversi stimoli ormonali e non ormonali, quantità sostanziali di  $Mg^{2+}$  libero fluiscono attraverso la membrana cellulare in entrambe le direzioni, determinando cambiamenti sostanziali nella la quantità di cationi presenti nel plasma. Tuttavia, questo traffico di ioni determina piccoli cambiamenti nella concentrazione intracellulare di  $Mg^{2+}$  libero, sebbene siano state riscontrate grandi variazioni nel contenuto totale di magnesio negli organelli e nei tessuti subcellulari. Questi risultati suggeriscono che le alterazioni nella disponibilità del magnesio, che influenzano diverse funzioni fisiologiche, potrebbero essere ottenute attraverso modifiche dell'entità del legame del magnesio da parte dei ligandi cellulari e della distribuzione degli ioni tra i sottocompartimenti cellulari, piuttosto che attraverso importanti modifiche della frazione ionica libera complessiva.

Il gruppo di ricerca presso cui si svolgerà l'attività scientifica ha progettato e sviluppato un colorante fluorescente basato su un azacrown conugato con derivati dell'idrossichinolina, denominato DCHQ5, che presenta la capacità analitica unica di quantificare accuratamente il contenuto totale di magnesio intracellulare, permettendo di quantificare accuratamente il magnesio intracellulare totale in un campione in cui la concentrazione di cellule era di 50.000 per ml; questo è 100 volte inferiore alla concentrazione richiesta per la spettroscopia di Assorbimento Atomico (F-AAS). È opportuno sottolineare che il limite di rilevazione del  $Mg^{2+}$  da parte del DCHQ5 ottenuto con questa procedura fluorimetrica è lo stesso di quello dell'F-AAS, 0,2  $\mu M$ , che rappresenta un valore di grande interesse analitico.

Nell'ambito dell'attività prevista per l'assegno di ricerca legato al progetto Prin "Biominerization in senescent human mesenchymal stem cells" si propone di valutare in primo luogo il contenuto di Mg totale intracellulare in cellule staminali mesenchimali (MSC) umane giovani e senescenti utilizzando la sonda fluorescente specifica DCHQ5 non commerciale. Le cellule saranno esposte e non al terreno osteogenico per tempi diversi (2-5-10-15-25 giorni) di differenziamento.

Su queste cellule verranno valutati contemporaneamente il contenuto di magnesio mediante spettrometria di fluorescenza e l'espressione dei suoi trasportatori al fine di correlarne le attività con la concentrazione intracellulare di Mg, sia nelle cellule senescenti che in quelle giovani. Queste misurazioni saranno eseguite in tre diversi momenti: a 6, 12 e 18 mesi su tre lotti di campioni con lo stesso protocollo.

Nelle cellule di controllo si valuterà la possibilità di determinare anche il magnesio mitocondriale sia su mitocondri isolati che mediante nuove sonde attualmente allo studio.

Il secondo obiettivo di questa U.O. è l'analisi elementare delle deposizioni minerali di cellule staminali mesenchimali umane giovani e senescenti. Questo progetto prevede quindi di effettuare misure morfometriche e analisi semiquantitative micro-nano-chimiche mediante microscopio elettronico dotato di sorgente di emissione di campo FEG, camera ambientale ESEM e tecniche di trasmissione STEM anche a pressione di "basso vuoto", utile per campioni biologici non fissati e non colorati, attraverso la metodologia di analisi dei raggi X emessi, utilizzando spettrometri SDD (Silicon Drift Detector) per gli elementi s P, Mg, Zn, Cu sulle deposizioni minerali di bMSC (giovani e senescenti), indotte a differenziarsi in tempi diversi a seconda dell'esperimento. Queste misurazioni verranno eseguite in due occasioni: a 6, e 18 mesi su due lotti di campioni ottenuti con protocollo sopra descritto.