

Специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат имени А.Н.
Колмогорова Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Курсовая работа

**Влияние миофибрилл на пролиферацию и дифференцировку миобластов
в условиях совместного культивирования с макрофагами**

Выполнила: Фролова Л.,

ученица 10 «Н» СУНЦ МГУ

Научный руководитель: к.б.н. Фуралев В.А.,

преподаватель кафедры биологии СУНЦ МГУ

Место выполнения:

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

Москва 2016

Содержание

1. Введение.....	3
2. Глава 1. Обзор литературы.....	4
3. Глава 2. Экспериментальная часть.....	10
4. Заключение.....	15
5. Список литературы.....	16

Введение

В настоящее время проблема изучения мышечной регенерации и болезней, связанных с мышечным восстановлением, стоит особенно остро. До сих пор не было проведено исследований, в которых рассматривалось бы влияние миофибрилл на другие клетки, участвующие в мышечном восстановлении, в частности на макрофаги. Исследования в этой области представляют большой интерес как в плане выяснения механизмов межклеточных взаимодействий в процессе мышечной регенерации, так и в прикладном аспекте.

Актуальность: Работа является весьма актуальной, так как данное исследование проливает свет на механизмы регуляции пролиферации миобластов, обеспечивающие восстановление скелетно-мышечной ткани. Результаты исследования потенциально могут быть использованы при создании принципиально новых лекарственных средств для лечения мышечных дистрофий.

Цель исследования: Изучить воздействие миофибрилл на миобласты в условиях взаимодействия данных мышечных клеток с макрофагами.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Исследовать влияние совместного культивирования с макрофагами, а также инкубации с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.
2. Исследовать влияние среды, кондиционированной макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.

Глава 1. Обзор литературы

Скелетная мышечная ткань состоит из поперечнополосатых волокон, являющихся структурными единицами мышц. Мышечные волокна окружены соединительнотканными прослойками – эндомизием, содержащими фиброциты (клетка соединительной ткани, не способная к делению, которая участвует в синтезе волокнистых структур), соединительнотканное волокно, нервные окончания и капилляры. Длина мышечных волокон колеблется от нескольких сотен мкм до 10–12 см, а диаметр составляет несколько десятков или сотен мкм. Группы мышечных волокон образуют пучки, покрытые более толстой соединительнотканной оболочкой – перимизием, а вся мышца окружена мощно развитым эпимизием, богатым сосудами, нервами и большим числом соединительнотканных волокон. В наиболее крупных мышцах наружная оболочка очень богата коллагеновыми волокнами и называется фасцией [1].

Своими концами поперечнополосатые волокна прочно соединяются с плотной соединительной тканью сухожилия, прикрепленного к кости, хрящу, надкостнице, или с плотной соединительной тканью кожи.

В цитоплазме мышечного волокна есть все обычные органеллы и многочисленные ядра, расположенные у высших позвоночных по периферии клетки. Специфическими мышечными органеллами являются миофибриллы.

Структурной единицей миофибрилл является саркомер, он имеет длину 2,5–3,0 мкм. Саркомер – это повторяющийся участок миофибрилл поперечнополосатых мышц; состоит из набора взаимодействующих друг с другом миофиламентов актина и миозина. Под электронным микроскопом в миофибрилле обнаруживаются сотни протофибрилл, состоящих из толстых (диаметр 10–12 нм) и тонких (5–8 нм) миофиламентов. Толстые нити состоят главным образом из скоплений молекул фибриллярного белка миозина; тонкие нити - из фибриллярного актина.

Между эндомизием и клеточной мембраной (сарколеммой) скелетного мышечного волокна расположены клетки миосателлиты, которые являются главными участниками постнатального мышечного роста. Миосателлит является одноядерной стволовой клеткой взрослой мышечной ткани.

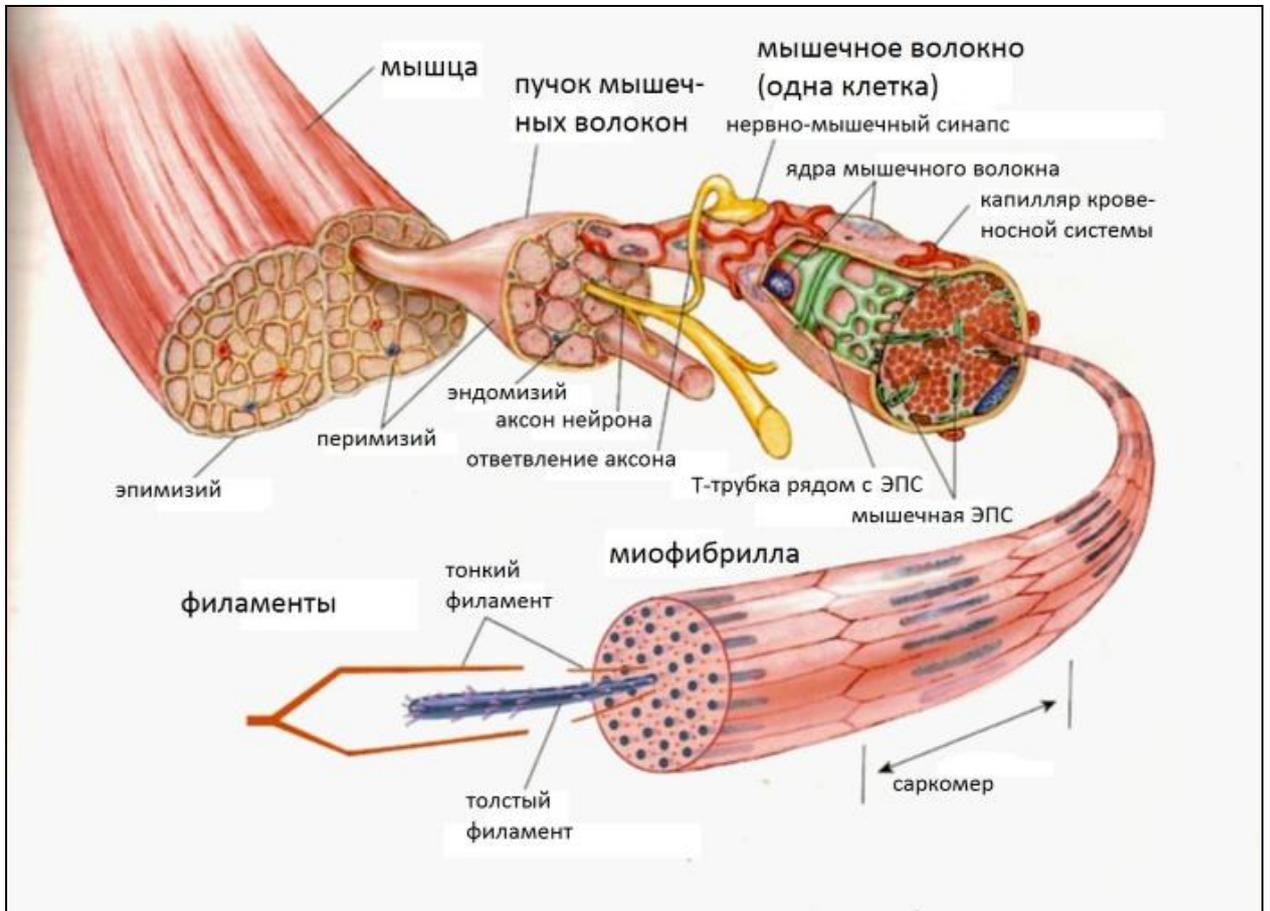


Рис. 1. Строение поперечнополосатой мышцы.

Зрелые скелетные мышцы обладают замечательным свойством регенерации после повреждения. На протяжении мышечной регенерации миобласт делится и мигрирует, окончательно претерпевая миогенную дифференцировку, после чего эти клетки сливаются, формируя многоядерную миотубу, а затем и мышечное волокно. Небольшое количество миобластов не дифференцируются, а остаются в исходном состоянии, чтобы пополнить пул сателлитных клеток (самообновление).

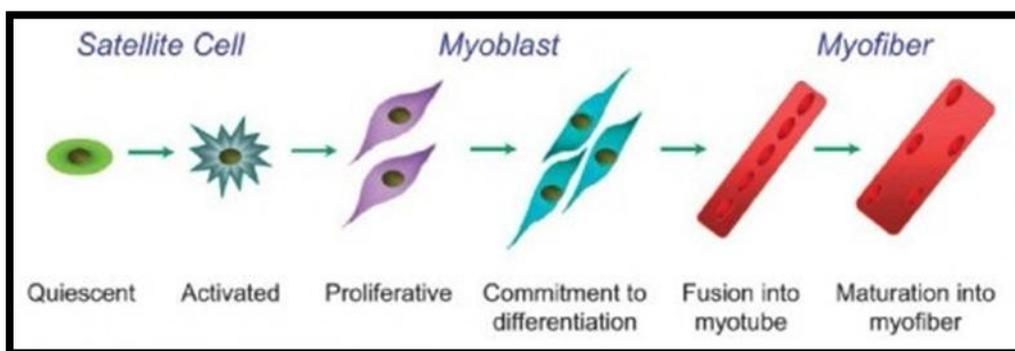


Рис. 2. Процесс регенерации мышечной ткани

Макрофаги постоянно присутствуют в скелетной мышце на всем протяжении процесса регенерации - от фагоцитоза поврежденных мышечных волокон до полного образования новых.

В нормальной скелетной мышце резидентные макрофаги едва обнаружимы. Они были найдены в небольшом количестве в межклеточном пространстве, и наиболее многочисленны в перимизии (соединительной ткани, которая окружает мышечные пучки) и эпимизии (соединительной ткани, которая окружает всю мышцу), где они расположены рядом с сосудами и капиллярами.

Макрофаги необходимы для регенерации скелетных мышц. Они происходят главным образом из моноцитов крови, которые пересекают эндотелиальный барьер кровеносного сосуда. Участие макрофагов в регенерации скелетных мышц давно известно: их количество значительно увеличивается в пораженной области через несколько часов после различных травм - таких, как инъекции токсина (лидокаин, хлорид бария и др.), частичное удаление клеток или необычно большая для мышцы физическая нагрузка.

Вскоре после поражения мышечной клетки макрофаги первыми связываются с мышечными волокнами, подвергшимися некрозу, где они фагоцитируют поврежденные мышечные клетки. Даже после завершения фагоцитоза макрофаги присутствуют в области регенерации в больших количествах; они тесно связаны с миогенными клетками-предшественниками

и молодыми регенерирующими мышечными волокнами. Когда дифференцировка и слияние миобластов завершается, количество макрофагов падает до низкого уровня.

В ходе нескольких исследований была изучена роль макрофагов помимо фагоцитоза, и в частности их воздействие на миобласты.

Первые эксперименты *in vitro* показали, что макрофаги стимулируют рост миобластов. Макрофаги выделяют митогенные факторы для этих клеток, которые стимулируют их пролиферацию. Но эти наблюдения не описывают полную картину участия макрофагов в процессе регенерации, так как макрофаги оказывают различное воздействие на миогенные клетки-предшественники в зависимости от своего состояния в ходе воспалительной реакции. Существует два типа макрофагов – M1 и M2. Макрофаги M1 стимулируют пролиферацию миогенных клеток-предшественников и тормозят их дифференцировку. Макрофаги M2, наоборот, стимулируют дифференцировку миогенных клеток-предшественников и формирование миотуб [2].

В процессе регенерации мышечной ткани играют важную роль сами поврежденные мышечные клетки. Было показано, что при повреждении мышечной клетки из нее высвобождаются миофибриллы, которые вызывают синтез инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и механо-ростового фактора (МРФ) [3].

Механо-ростовой фактор – это продукт альтернативного сплайсинга мРНК инсулиноподобного фактора роста 1. Известно, что МРФ стимулирует пролиферацию миобластов. Экспрессия МРФ резко возрастает в ответ на механическое раздражение или тканевое повреждение. Это свидетельствует о том, что белковые факторы такие, как миофибриллы, высвобождающиеся из поврежденной мышцы, могут стимулировать синтез МРФ в нормальных миобластах [4].

В нормальных мышечных клетках экспрессии МРФ и ИФР-1 не наблюдается. Инкубация миобластов с гомогенатом клеток скелетной мышцы повышает синтез обоих факторов роста как в миобластах, так и в дифференцированных миотубах, что проявляется и на уровне мРНК, и белковом уровнях. Показано, что за стимуляцию экспрессии ростовых факторов в гомогенате отвечает фракция миофибрилл.

Однако до сих пор не было проведено исследований, в которых рассматривалось бы влияние миофибрилл на другие клетки, участвующие в мышечном восстановлении, в частности на макрофаги. Исследования в этой области представляют большой интерес как в плане выяснения механизмов межклеточных взаимодействий в процессе мышечной регенерации, так и в прикладном аспекте.

Актуальность: Работа является весьма актуальной, так как данное исследование проливает свет на механизмы регуляции пролиферации миобластов, обеспечивающие восстановление скелетно-мышечной ткани. Результаты исследования потенциально могут быть использованы при создании принципиально новых лекарственных средств для лечения мышечных дистрофий.

Цель исследования: Изучить воздействие миофибрилл на миобласты в условиях взаимодействия данных мышечных клеток с макрофагами.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

3. Исследовать влияние совместного культивирования с макрофагами, а также инкубации с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.
4. Исследовать влияние среды, кондиционированной макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.

Методы.

Исследования проводились на культурах миобластов и макрофагов мыши, выращиваемых в лаборатории на среде DMEM с добавлением 10%-й эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ). Для проведения МТТ-теста в экспериментах по совместному культивированию миобласты рассеивали в среде DMEM с 10%-й ЭСТ в количестве 3×10^3 на лунку 96-луночного планшета (фирма Corning-Costar), в те же лунки рассеивали также по 10^3 макрофагов. Спустя 48 часов среду в лунках заменяли на 0,2 мл свежей среды с 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) и оставляли на 4 часа. Затем осадок восстановленного формазана растворяли в 0,15 мл диметилсульфоксида и измеряли оптическую плотность при 595 нм с помощью планшетного фотометра «Multiscan» фирмы Thermo Labsystems, λ измерения = 595 нм, λ сравнения = 690 нм. Каждая экспериментальная точка представляет собой средний результат 16 лунок планшета.

В экспериментах по исследованию влияния кондиционированной макрофагами среды на деление миобластов миобласты рассеивали так же, но без макрофагов. На следующий день среду для культивирования заменяли на среду DMEM с 0,5%-й ЭСТ и спустя 10 часов добавляли кондиционированную макрофагами среду в концентрации 20%. В качестве отрицательного контроля использовали DMEM с 0,5%-й ЭСТ. Для получения кондиционированной макрофагами среды макрофаги из брюшной полости мыши рассеивали отдельно на чашки Петри в количестве 3×10^5 на чашку. На следующий день среду для культивирования заменяли на среду DMEM с 0,5%-й ЭСТ и спустя 24 часа собирали кондиционированную среду. Постановка МТТ-теста проводилась как описано выше.

Глава 2. Экспериментальная часть

Эксперимент №1

Изучение влияния совместного культивирования с макрофагами, а также инкубации с миофибриллами и бактериальным ЛПС, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.

МТТ-тест - колориметрический тест, позволяющий измерять метаболическую активность живых клеток, что в свою очередь дает возможность оценить их количество. В основе метода лежит способность НАД(Ф)Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз восстанавливать бесцветные соли тетразолия в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание.

В лунки культурального 96-луночного планшета были помещены следующие клеточные культуры (по 16 лунок на каждую):

- Макрофаги + миобласты
- Макрофаги + миобласты + бактериальный липополисахарид
- Макрофаги + миобласты + миофибриллы
- Миобласты
- Миобласты + миофибриллы

После инкубации культур клеток с тетразолиевым красителем содержимое лунок приобрело пурпурный цвет. Осадок формазана, имеющий пурпурную окраску, растворили в диметилсульфоксиде. Для того чтобы количественно определить интенсивность окрашивания, а, следовательно, оценить интенсивность пролиферации миобластов, в каждой лунке была измерена оптическая плотность при 595 нм с помощью фотометра. Результаты измерений представлены на диаграмме 1.

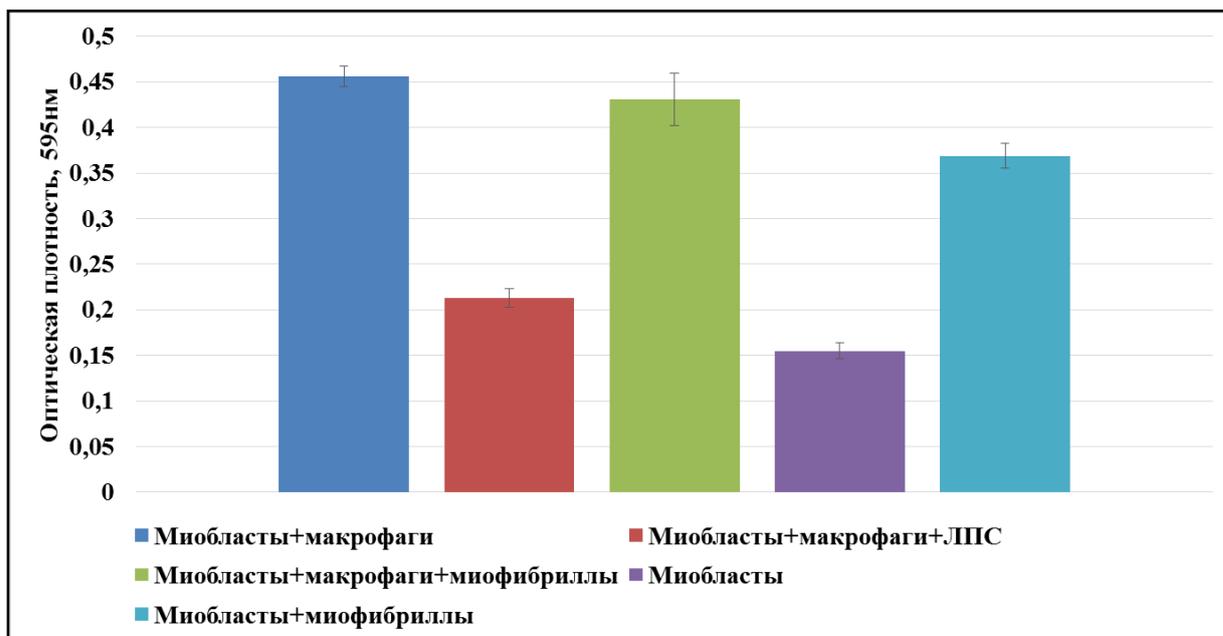


Диаграмма 1. Влияние совместного культивирования с макрофагами, а также инкубации с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов. Показаны доверительные интервалы по критерию Стьюдента, $p < 0,05$.

Было установлено, что совместное культивирование с макрофагами существенно увеличивает скорость восстановления МТТ – приблизительно в 2,9 раза. Добавление миофибрилл в совместную культуру миобластов и макрофагов не вызывало дальнейшего роста восстановления МТТ – стимуляция составляла около 2,8 раза, отличие от предыдущего варианта является статистически недостоверным. В то же время добавление бактериального ЛПС в эту совместную культуру приводило к резкому снижению стимулирующего эффекта – он не достигал и 1,4 раза. Инкубация чистой культуры миобластов с миофибриллами также вызывала рост скорости восстановления МТТ, но в меньшей степени, чем совместное культивирование, - только в 2 раза.

Полученные результаты позволяют утверждать, что макрофаги стимулируют пролиферацию миобластов. Миофибриллы также стимулируют пролиферацию данных клеток, но в меньшей степени. Совместное действие обоих стимулирующих факторов не приводит к дальнейшему росту

пролиферации. Предположительно, это связано с тем, что стимуляция под действием макрофагов достигает максимальных значений, и добавление миофибрилл на этом фоне уже не может оказать существенного воздействия. В то же время в присутствии ЛПС стимулирующий эффект макрофагов резко ослабевает. Предположительно, это связано с тем, что ЛПС стимулирует превращение макрофагов по типу M1, который служит для борьбы с различными инфекциями, а не для ускорения регенерации тканей.

Эксперимент №2

Изучение влияния среды, кондиционированной макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами и бактериальным ЛПС, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.

В этом эксперименте миобласты не взаимодействовали с макрофагами непосредственно. Макрофаги, находившиеся в отдельных чашках Петри, секретировали в культуральную среду различные соединения. Затем эта среда (кондиционированная среда) добавлялась к культурам миобластов, и исследовалось её влияние на пролиферацию мышечных клеток.

В лунки культурального 96-луночного планшета были помещены следующие клеточные культуры (по 16 лунок на каждую):

- миобласты
- миобласты + среда, кондиционированная макрофагами без обработки
- миобласты + среда, кондиционированная макрофагами, инкубировавшимися с ЛПС
- миобласты + среда, кондиционированная макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами

МТТ-тест был проведен как описано выше. Результаты представлены на диаграмме 2.

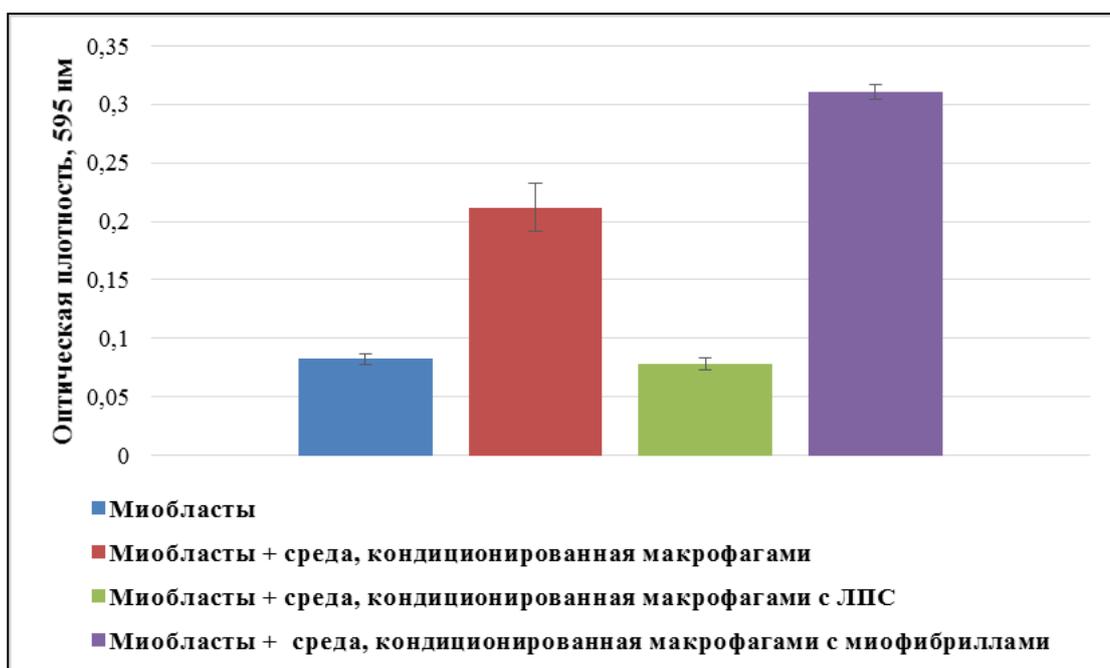


Диаграмма 2. Влияние среды, кондиционированной макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами и бактериальным ЛПС, на пролиферацию миобластов. Показаны доверительные интервалы по критерию Стьюдента, $p < 0,05$.

Было установлено, что среда, кондиционированная необработанными макрофагами, существенно увеличивает скорость восстановления МТТ – приблизительно в 2,6 раза. Инкубация макрофагов с миофибриллами приводила к значительному усилению митогенных свойств кондиционированной макрофагами среды - стимуляция составляла около 3,8 раза, отличие от предыдущего варианта является статистически достоверным. В то же время инкубация макрофагов с бактериальным ЛПС полностью снимала эффект кондиционированной макрофагами среды - скорость восстановления МТТ составляла 95% от таковой в контрольных лунках, отличие является статистически недостоверным.

Полученные результаты позволяют утверждать, что секретируемые макрофагами вещества стимулируют пролиферацию миобластов. По всей вероятности, эти вещества являются белковыми цитокинами, поскольку низкомолекулярные продукты секреции макрофагов (такие как NO или

лейкотриены) имеют короткий период полураспада и вряд ли сохранились бы в кондиционной среде. Контакт макрофагов с миофибриллами резко стимулирует секрецию ими митогенных для миобластов факторов. Возможно, миофибриллы стимулируют превращение макрофагов по типу M2, который служит для регенерации поврежденных тканей. В то же время контакт макрофагов с ЛПС полностью блокирует секрецию митогенных цитокинов. Как уже отмечалось выше, это может быть связано с тем, что ЛПС стимулирует превращение макрофагов по типу M1.

Заключение

Выводы.

На основе проделанной нами исследовательской работы мы пришли к следующим основным выводам:

1. Макрофаги и миофибриллы стимулируют пролиферацию миобластов, в то время как, совместное действие обоих стимулирующих факторов не приводит к дальнейшему росту пролиферации; в присутствии ЛПС стимулирующий эффект макрофагов резко ослабевает.

2. Секретируемые макрофагами вещества стимулируют пролиферацию миобластов, в то время, как контакт макрофагов с миофибриллами резко стимулирует секрецию ими митогенных для миобластов факторов; контакт макрофагов с ЛПС полностью блокирует секрецию митогенных цитокинов.

Цель и задачи нашей работы выполнены:

- Изучено воздействие миофибрилл на миобласты в условиях взаимодействия данных мышечных клеток с макрофагами.
- Исследовано влияние совместного культивирования с макрофагами, а также инкубации с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.
- Исследовано влияние среды, кондиционированной макрофагами, инкубировавшимися с миофибриллами и бактериальным липополисахаридом, на пролиферацию миобластов с помощью МТТ-теста.

Список литературы

1. Шубникова Е. А. и др. Мышечные ткани. – М. : Медицина, 2001.
2. Saclier M. et al. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration //FEBS Journal. – 2013. – Т. 280. – №. 17. – С. 4118-4130.
3. Kravchenko I. V., Furalyov V. A., Popov V. O. Stimulation of mechano-growth factor expression by myofibrillar proteins in murine myoblasts and myotubes //Molecular and cellular biochemistry. – 2012. – Т. 363. – №. 1-2. – С. 347-355.
4. Dai Z. et al. IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues //Growth Hormone & IGF Research. – 2010. – Т. 20. – №. 4. – С. 275-281.