МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Секреторная активность мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека в стимуляции роста кровеносных сосудов

Выполнила:
Басалова Наталия

Научный руководитель:
доцент кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,
к.б.н. Калинина Н.И.

Актуальность работы:

Достигнутый за последние несколько лет мировым научным сообществом прогресс отражается в активном внедрении в клиническую практику методов клеточной терапии. Разработке этой лечебной тактики способствовало развитие современных представлений о молекулярных и клеточных механизмах регуляции роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Немаловажную роль в этих процессах играют **мезенхимальные стромальные клетки**.

Такие клетки обладают двумя важными свойствами – они способны **дифференцироваться** в широкий спектр различных типов клеток и **продуцировать** различные вещества, влияющие на ангиогенез.

Поэтому изучение секретируемых веществ поможет приблизиться к пониманию механизмов регуляции роста кровеносных сосудов и вклада МСК в эти процессы.

Цель работы:

оценить содержание ангиогенных факторов в среде культивирования и внеклеточных везикулах, продуцируемых МСК

Задачи:

1. Выделение и культивирование человеческих ЖТ-МСК;
2. Получение фракций внеклеточных везикул и белков в свободной форме ;
3. Анализ содержания белков и метаболитов;
4. Оценка влияния среды культивирования на рост кровеносных сосудов на моделях ангиогенеза in vitro.

Методы:

1. Выделение МСК из жировой ткани человека;
2. Культивирование МСК;
3. Иммунофенотипирование популяции МСК с помощью проточной цитофлуориметрии;
4. Нуклеофекция клеток культуры МСК;
5. Разделение кондиционированной среды культивирования на фракции, содержащие внеклеточные везикулы или белки
6. Исследование содержания белков и метаболитов методом ИФА
7. Оценка влияния фракций среды культивирования на рост кровеносных сосудов in vitro: модели scratch-assay, двухмерного ангиогенеза в Матригеле, трёхмерного ангиогенеза в фибриновом геле.

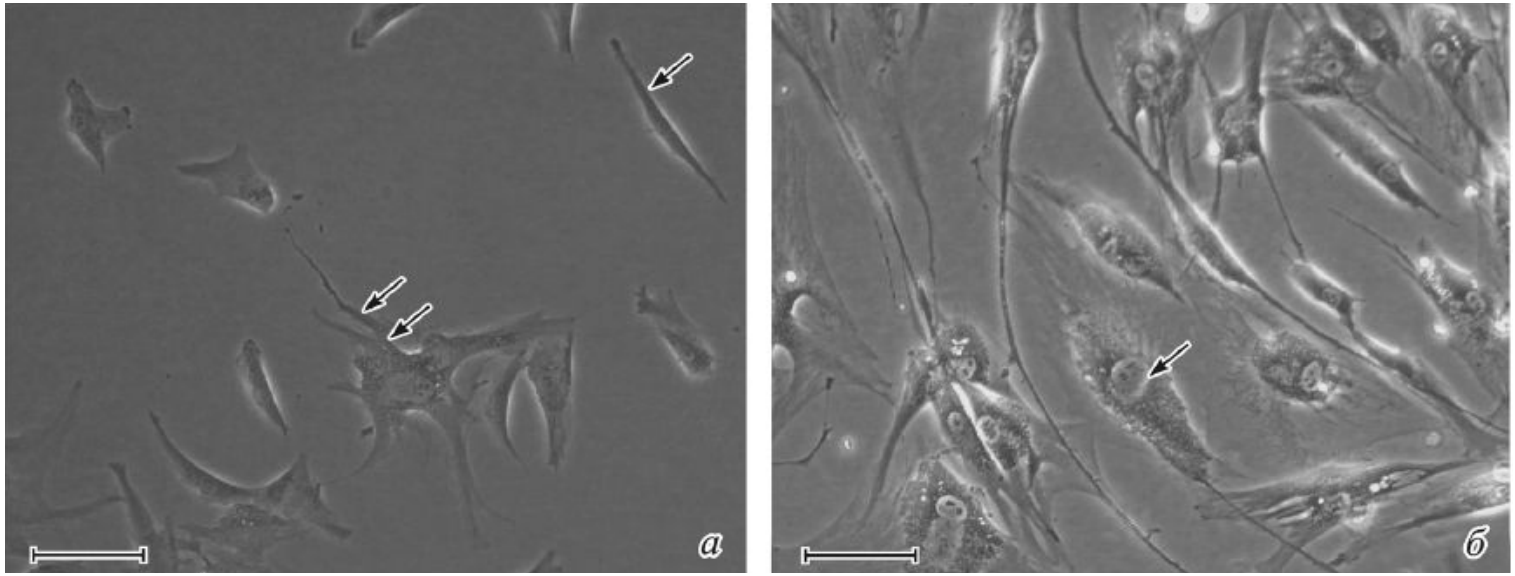
Культура:

•human ADSC (adipose tissue-derived stem cells)

•МСК-ЖТ человека (мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани)

Среда культивирования:
AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cell Media,
10% AdvanceSTEM Supplement (HyClone),
1% antibiotic–antimycotic solution (HyClone)
в инкубаторе
при 37°C и 5% CO_2

Внешний вид культуры



Мезенхимные стромальные клетки из липоаспирата
(стрелками указаны хорошо распластанные клетки)
а - 24 часа культивирования,
Б - 120 часов культивирования

Фазово-контрастная микроскопия, масштабные линейки-100 мкм

(Л.Б.Буравкова и др., Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода, 2009)

Нуклеофекция

Образцы:

1 - отрицательный контроль (Ambion, Pre-miR, Negative control #1)

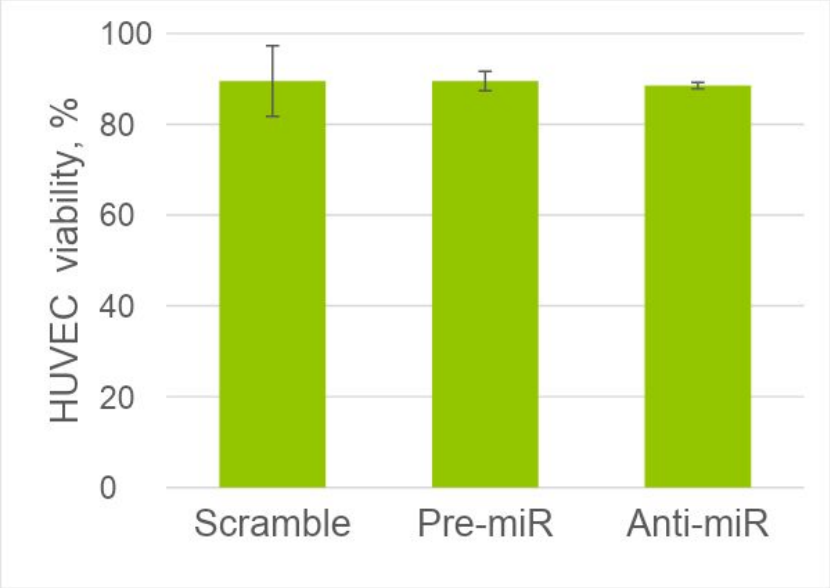
2 - miR-92a (Ambion, Pre-miR, PM 10916, Cat. # AM17100, 5 nmol)

3 - anti-miR-92a (Ambion, anti-miR AM 10916, Cat. # AM17100, 5 nmol)

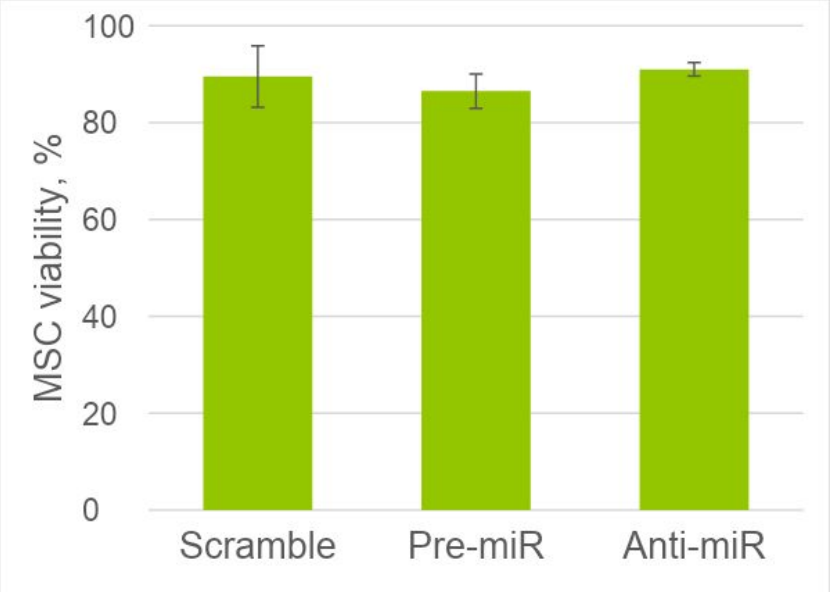
4 - pmaxGFP (в наборе, 0,5 мкг/мл) – контроль эффективности нуклеофекции

Программа а-23.

Жизнеспособность

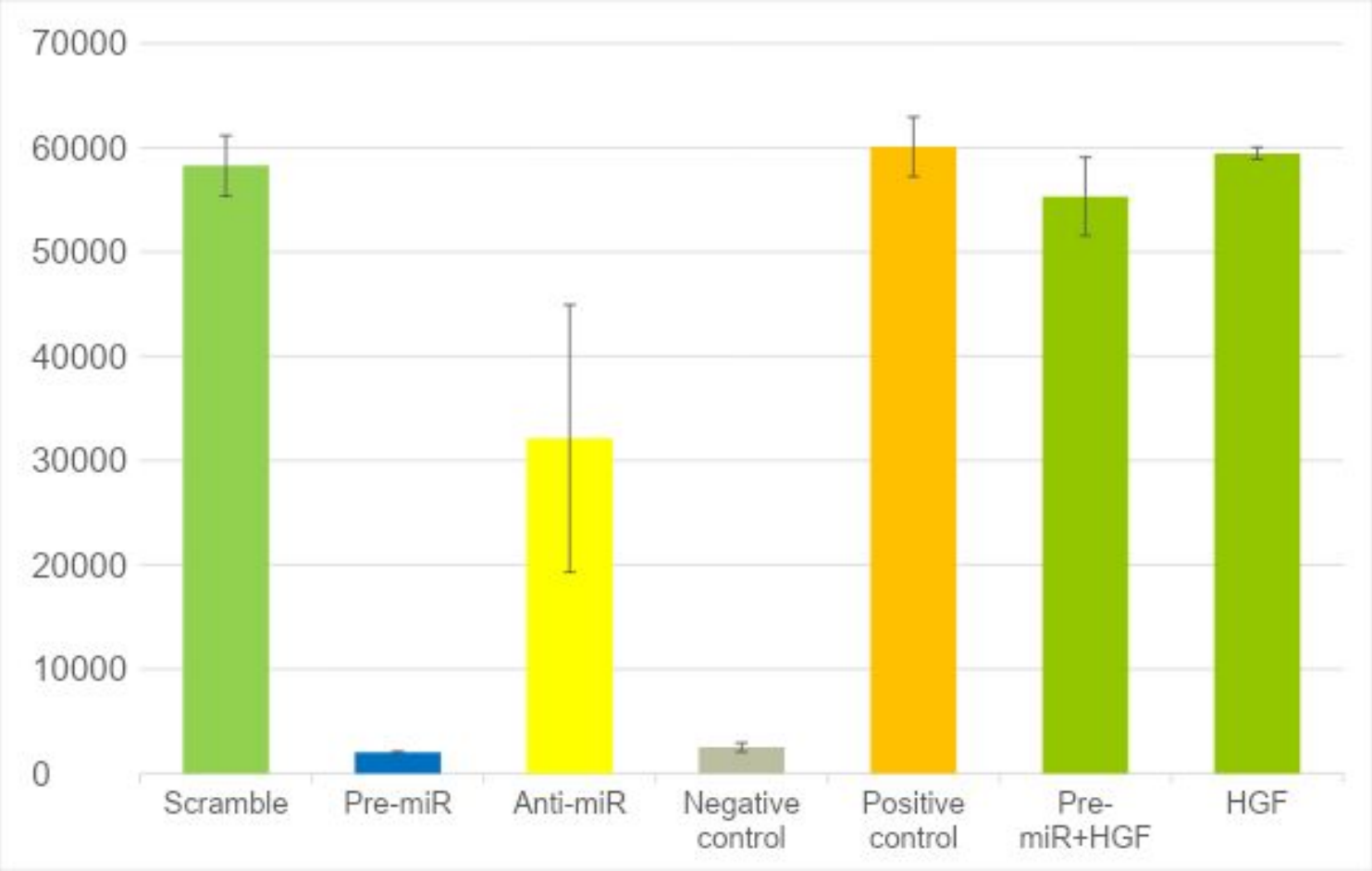


Жизнеспособность HUVEC после после 24 ч инкубации с кондиционированной средой



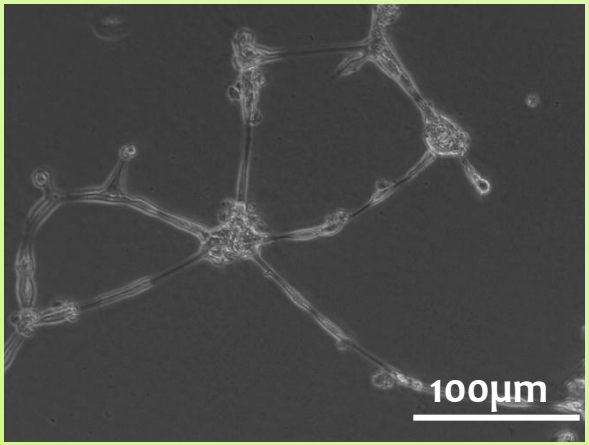
Жизнеспособность МСК после нуклеофекции

Модель двухмерного ангиогенеза в Матригеле (tube assay)



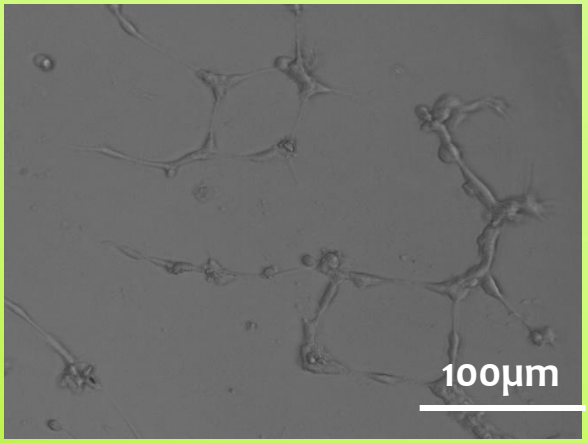
Длина капилляроподобных структур была посчитана в 5 случайных полях зрения в каждой лунке (увеличение 10x) с использованием программы MetaMorph 5.0

Модель двухмерного ангиогенеза в Матригеле (tube asssay)

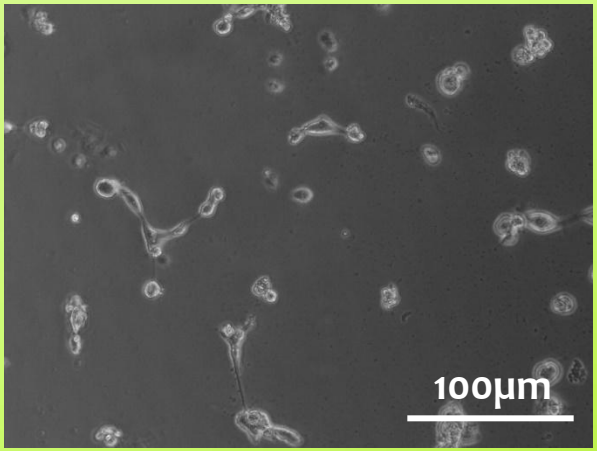


Позитивный контроль

Негативный контроль

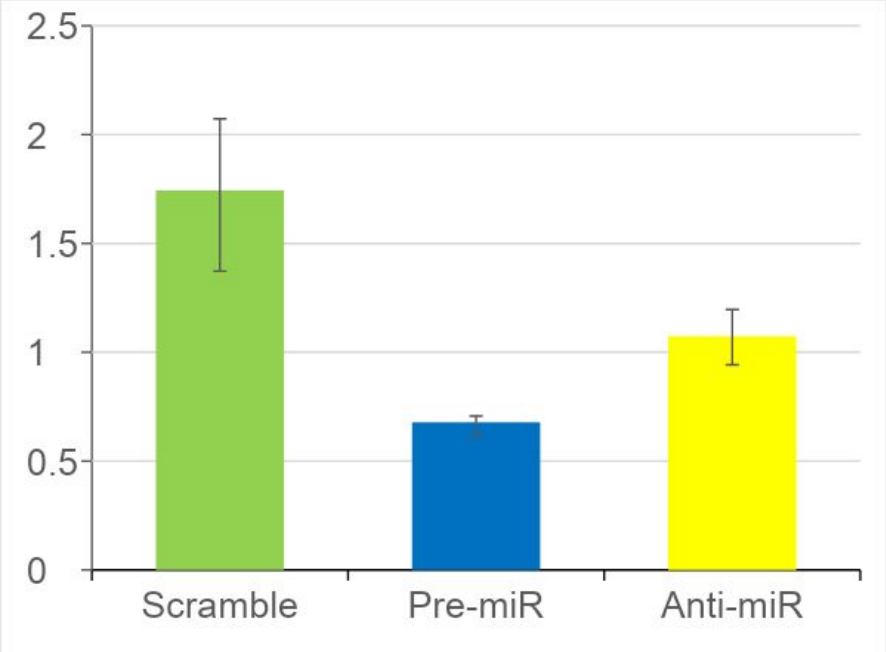


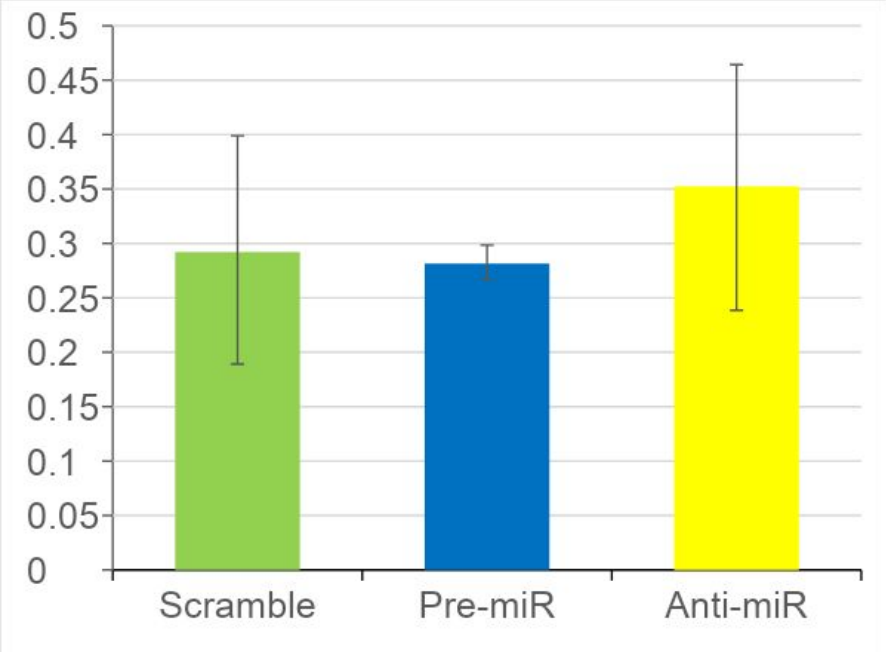
Anti-miRNA



Pre-miRNA

ELISA





Содержание HGF в кондиционированной среде от МСК, нормированное на число клеток, отн. единицы

Содержание Angpt-1 в кондиционированной среде от МСК, нормированное на число клеток, отн. единицы

Модель трёхмерного ангиогенеза в фибриновом геле (fibrin bead assay)

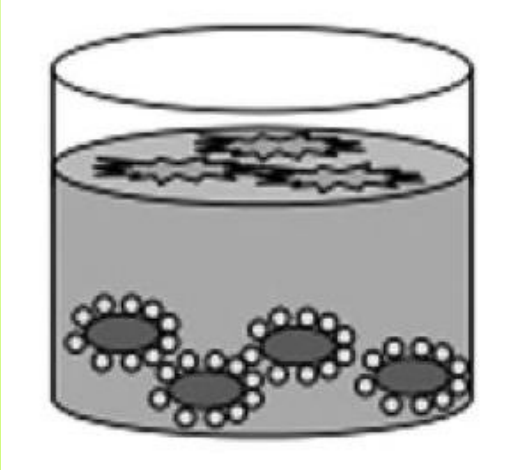
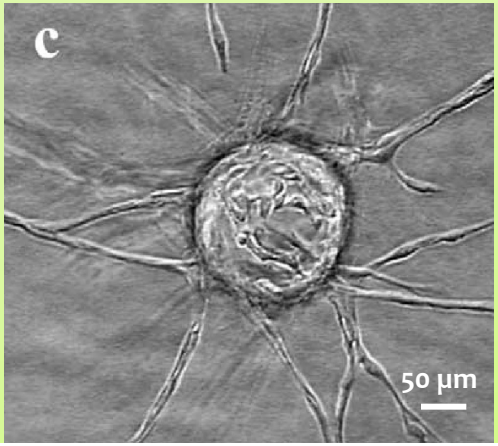
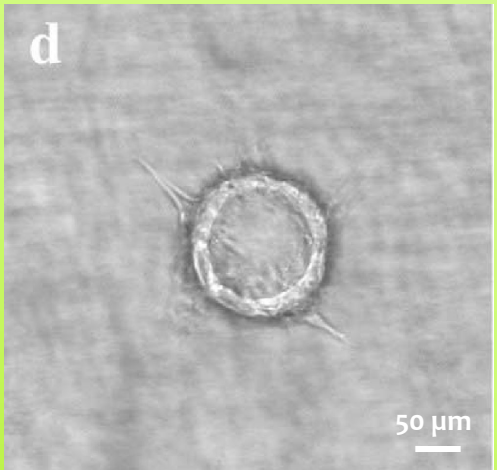


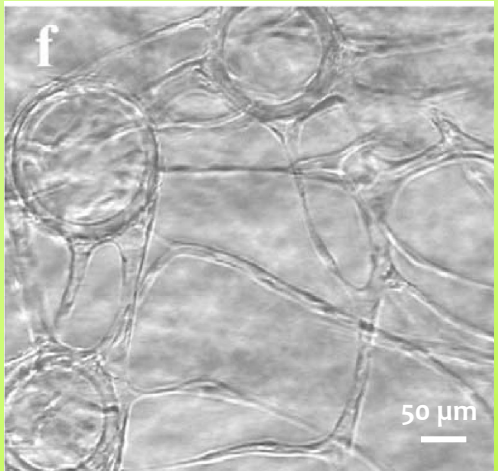
Схема эксперимента



5 день культивирования, образуется большое количество тонких сосудов



2 день культивирования, начало образования капилляроподобных структур



N. Nakatsu, 2003

7 день культивирования, формирования сложной сети и анастомозов между соседними сосудами

Спасибо за внимание!