

РАСШИФРОВКА МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА КОСТНОГО МОЗГА И ПОДХОДОВ К ЕГО РЕВЕРСИИ

Руководитель исследования: Старший научный сотрудник НИЛ онкогематологии, к.б.н. Бутылин П.А.

Ответственный исполнитель: Научный сотрудник НИЛ онкогематологии, к.б.н. Гин И.И.

Перечень научных подразделений, участвовавших в исполнении исследования:

1. НИЛ Онкогематологии Института гематологии

Цель исследования:

Исследование механизмов развития миелофиброза, а также возможных путей реверсии фиброза костного мозга.

На данном этапе: изучить особенности профибротических изменений мезенхимных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) в культуре.

Материалы и методы исследования:

1. Культивирование МСК костного мозга (МСК были получены из аспирата костного мозга здорового донора (мужчина, 40 лет))
2. Индукция профибротических изменений МСК с помощью TGF- β 1
3. Изучение профибротических свойств МСК после отмены TGF- β 1
4. Пробоподготовка и определение концентрации белка в пробах
5. Электрофорез белков
6. Вестерн-блоттинг
7. Денситометрия иммуноблотов.

Основные результаты:

По результатам работы можно сделать следующие заключения:

1. Добавление TGF- β 1 к обычной культуральной среде с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) приводит к увеличению количества маркера миофибробластов - гладкомышечного α -актина (α -SMA) - в культуре МСК. Чем дольше МСК инкубируют с фактором, тем больше различия в синтезе α -SMA между контролем и опытом.
2. TGF- β 1 уменьшает количество коллагена 1 типа в клеточном слое, и увеличивает его количество в среде культивирования. При этом меняется соотношение проколлагенов: под действием TGF- β 1 увеличивается содержание более процессированных форм.
3. Профибротические изменения МСК происходят не только под действием TGF- β 1, но и при нормальном культивировании с 10% FBS: профибротические признаки усиливаются в первые 4 суток культивирования в монослое и медленно ослабевают на сроках 1-2 недели культивирования в монослое. Динамика профибротических свойств МСК может быть связана с изменением плотности клеточного монослоя.

4. Отмена TGF- β 1 при культивировании с 10% FBS приводит к уменьшению количества α -SMA в культуре МСК и на коротких, и на длительных сроках культивирования, но в обоих случаях уровень α -SMA остается выше, чем в контроле. Коллаген 1 типа в клеточных лизатах практически не отвечает на отмену фактора, в то время как его количество в культуральной среде уменьшается примерно на 30%.
5. Отмена TGF- β 1 в условиях пониженного содержания сыворотки приводит к усилению профибротических признаков МСК.

Исследования механизмов миелофиброза будут продолжены на следующих этапах выполнения НИР.

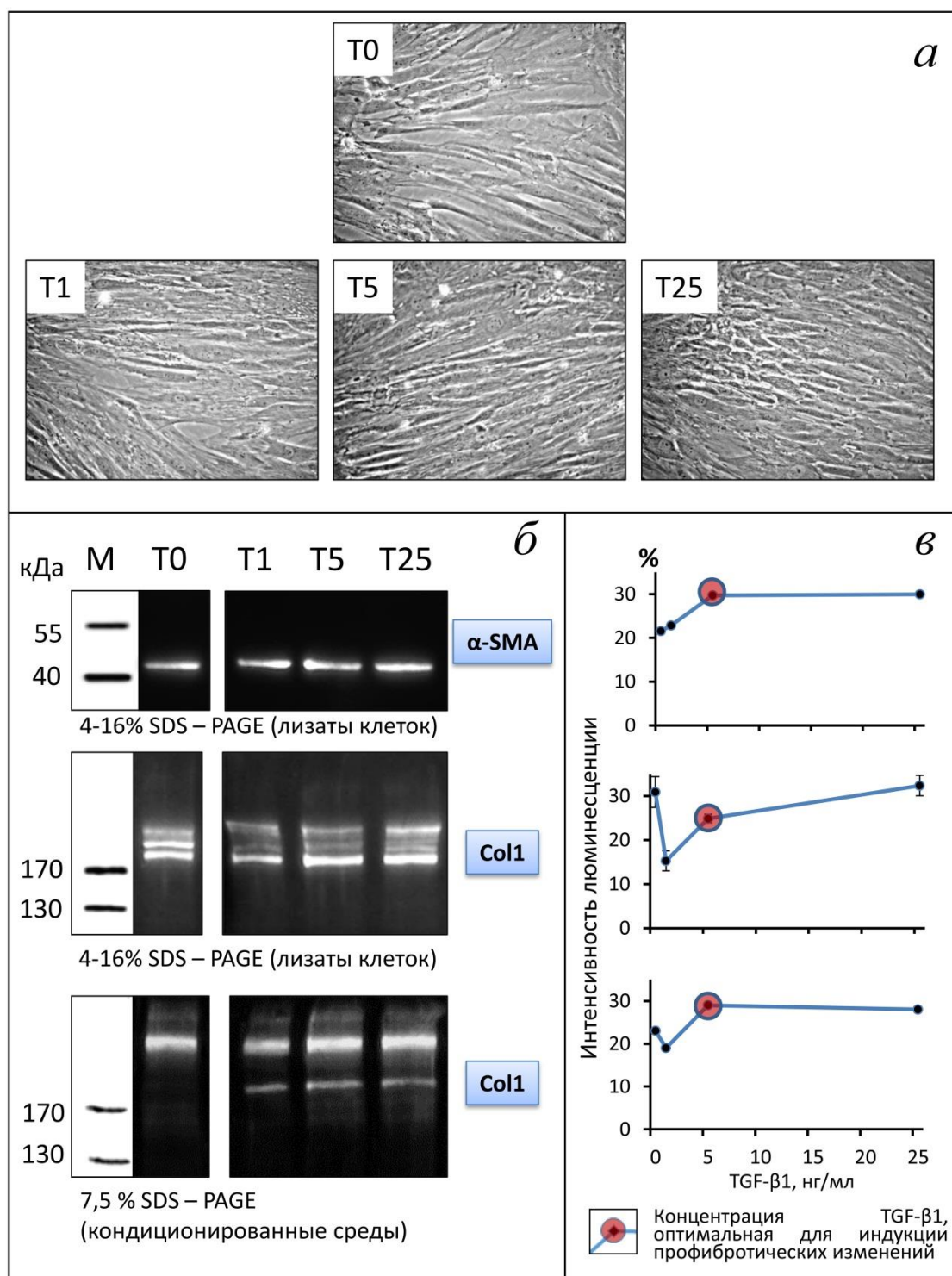


Рис. 1. Индукция профибротических изменений МСК КМ с помощью TGF- β 1.

а – прижизненные микрофотографии клеток после инкубации в течение 36 ч в среде α -MEM, содержащей 10 % FBS и разные концентрации TGF- β 1: 0 нг/мл (T0), 1 нг/мл (T1), 5 нг/мл (T5) и 25 нг/мл (T25). Об. 20х.

б – вестерн-блоттинг α -SMA и коллагена I типа (Col1) в лизатах клеток и в кондиционированных средах.

в – денситометрия иммуноблотов (*б*).

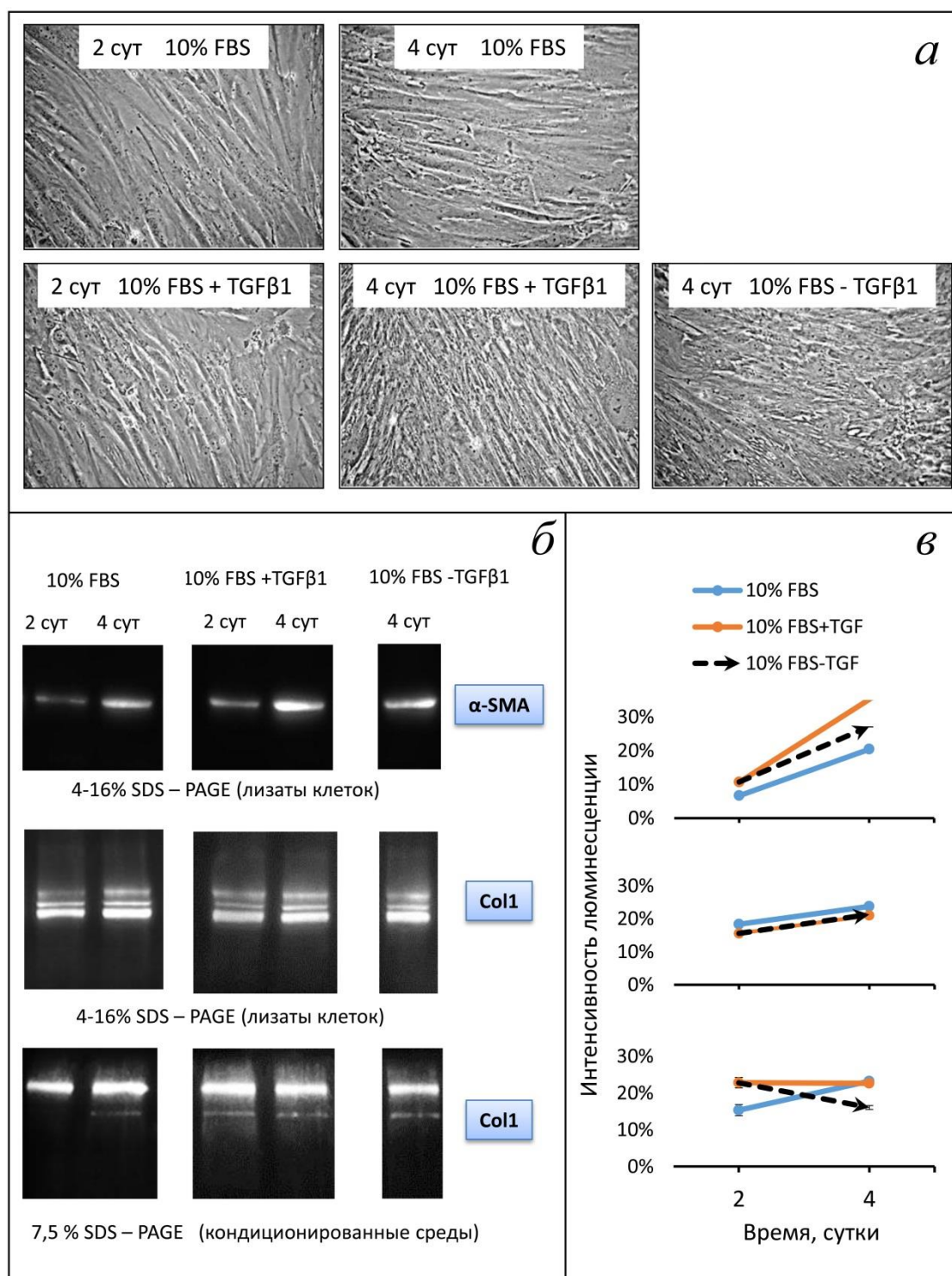


Рис 2. Обратимость профибротических изменений МСК КМ после отмены TGFβ-1 в среде, содержащей 10% FBS, при культивировании в течение короткого срока (2-4 сут).

а – прижизненные микрофотографии клеток после инкубации в среде α-MEM, содержащей только сыворотку (10 % FBS) или сыворотку + 5 нг/мл TGFβ-1 (10 % FBS + TGFβ-1), а также после отмытки от TGFβ-1 на 2-е сут культивирования (10 % FBS - TGFβ-1). Об. 20х.

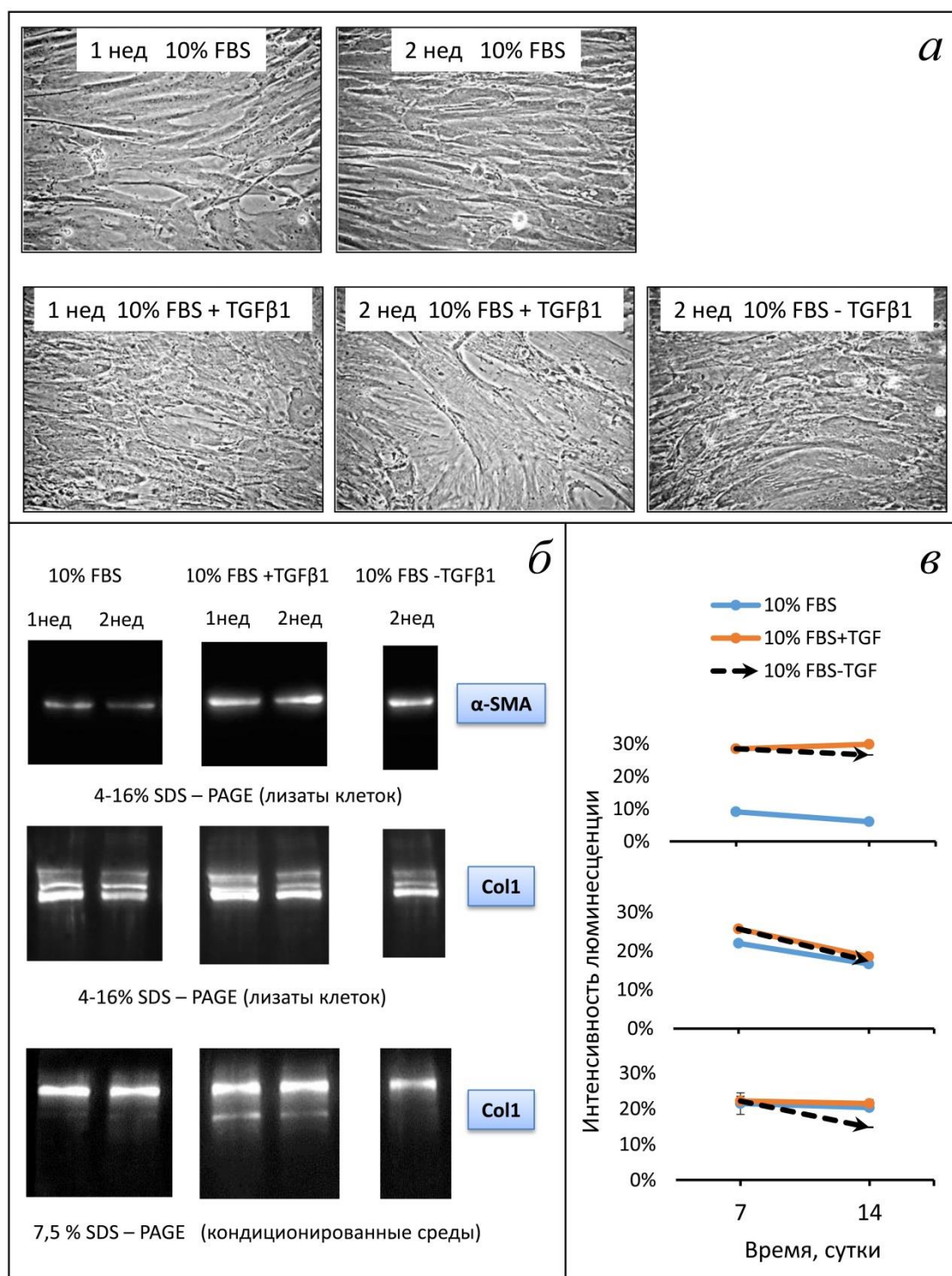


Рис 3. Обратимость профибротических изменений МСК КМ после отмены TGFβ-1 в среде, содержащей 10% FBS, при культивировании в течение длительного срока (7-14 сут).

а – прижизненные микрофотографии клеток после инкубации в среде α-MEM, содержащей только сыворотку (10 % FBS) или сыворотку + 5 нг/мл TGFβ-1 (10 % FBS + TGFβ-1), а также после отмытки от TGFβ-1 на 7-е сут культивирования (10 % FBS - TGFβ-1). Об. 20х.

б – вестерн-блоттинг α-SMA и коллагена I типа (Col1) в лизатах клеток и в кондиционированных средах.

в – денситометрия иммуноблотов (б).

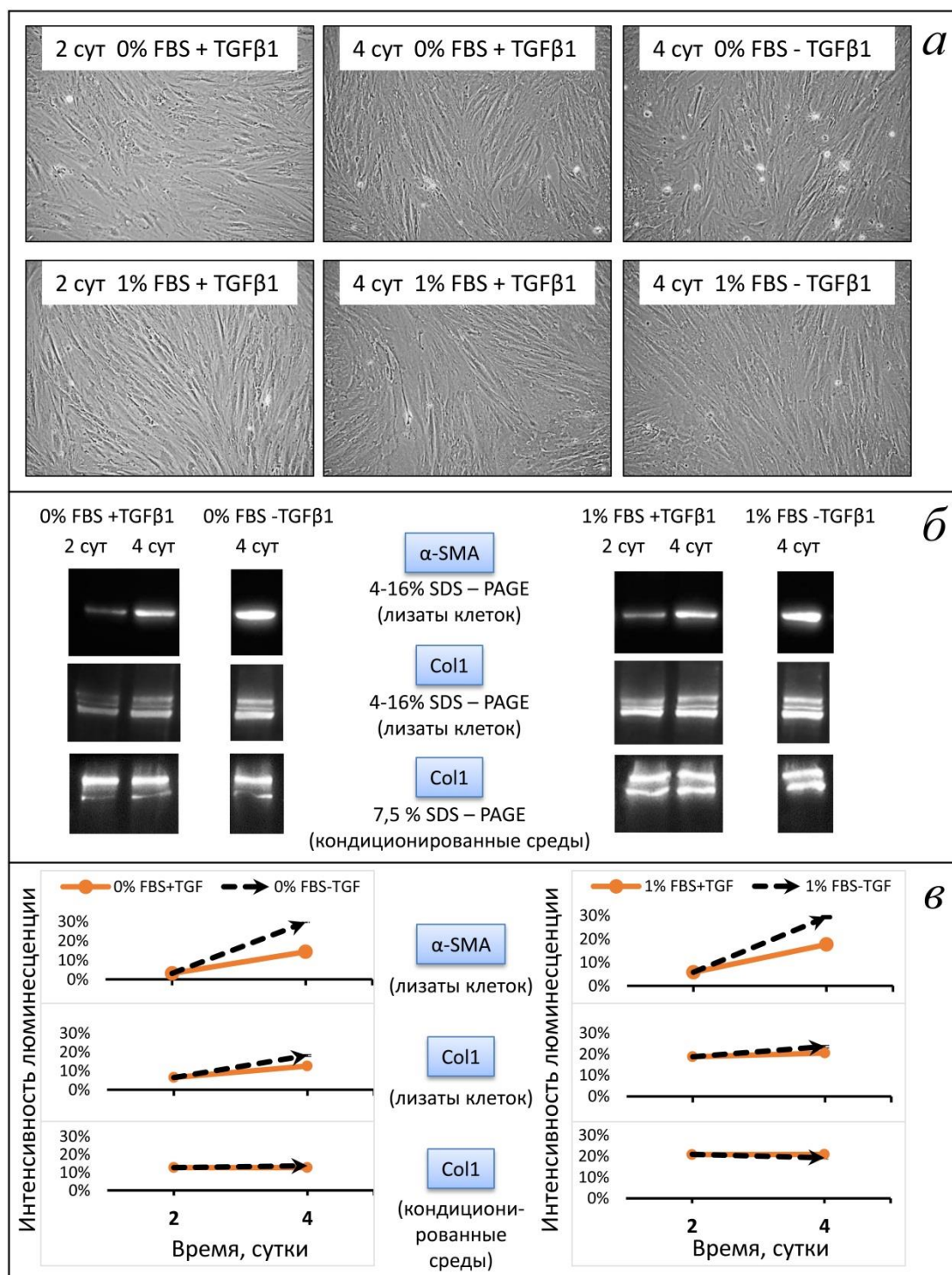


Рис 4. Обратимость профибротических изменений МСК КМ после отмены TGFβ-1 в среде с пониженным содержанием сыворотки (0% или 1% FBS) при культивировании в течение 2-4 сут.

а – прижизненные микрофотографии клеток после инкубации в среде α-МЕМ с добавлением 5 нг/мл TGFβ-1 в бессывороточных условиях (0% FBS + TGFβ-1) или в присутствии 1% FBS (1% FBS + TGFβ-1), а также после отмытки от TGFβ-1 на 2-е сут культивирования (0 % FBS - TGFβ-1 и 1% FBS - TGFβ-1).

б – вестерн-блоттинг α-SMA и коллагена I типа (Col1) в лизатах клеток и в кондиционированных средах.

в – денситометрия иммуноблотов (*б*).

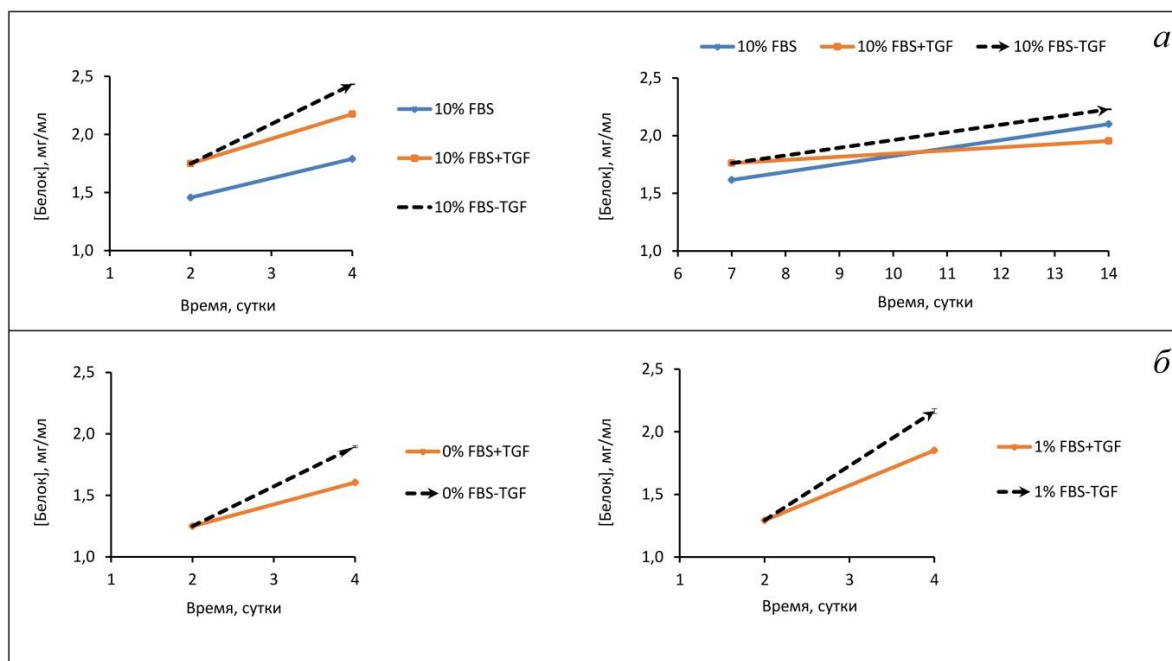


Рис 5. Концентрация тотального белка в лизатах МСК КМ после отмены $TGF\beta-1$ при культивирования в течение короткого (2-4 сут) и длительного (1-2 нед) сроков в среде, содержащей 10% FBS (а), или в течение короткого срока (2-4 сут) в среде, содержащей 0% или 1% FBS (б).