

Автономная некоммерческая общеобразовательная организация «Московская областная школа-интернат естественно-математической направленности» имени П.Л. Капицы  
(АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы)

Научно-практическая конференция

«Старт в инновации»

## **Миграция первичных фибробластов крысы**

Автор:

Ковальский Александр, 9 Б класс

## Содержание

Введение.....	3
Проблема.....	3
Актуальность.....	3
Цель.....	3
Задачи.....	3
Литературный обзор.....	4
Методы исследования.....	4
Образцы и выделение клеток.....	5
Подготовка оборудования.....	7
Ход эксперимента.....	8
Рабочие формулы.....	10
Результаты.....	10
Выводы.....	11
Список литературы.....	11

## **Введение**

В организме высших животных у всех без исключения имеется важная составляющая – соединительная ткань, которая формирует защиту для многих органов. Например, перикард сердца представляет собой тонкий плотный мешок, который защищает сам орган от внешней среды.

По структуре соединительная ткань содержит межклеточное вещество, которое состоит из коллагеновых и эластиновых волокон. За производство и обновление этих волокон отвечают клетки – фибробласты, которые меняют структуру волокон в зависимости от меняющихся условий.

Для поддержания уровня жизни соединительной ткани, фибробласты передвигаются по волокнам, «изучая» ткань. Перемещение фибробласта можно разбить на части: сначала генерируется толкающая сила, и часть клетки «выпячивается», вследствие образуется плоская листообразная структура – ламеллоподия, которая потом прикрепляется к поверхности коллагенового волокна. Затем перемещается основное тело клетки, а уже после подтягивается и ее задняя часть. Этот процесс называется миграцией.

## **Проблема**

Это исследование может помочь многим медикам. Миграция фибробластов происходит как в организме человека, так и внутри организмов других живых существ. Однако данных о самой миграции немного. В связи с тем, что присутствует малое количество литературных данных о скорости миграции фибробластов, целью работы стало определить это скорость.

## **Актуальность**

На данный момент изучен процесс миграции фибробластов: подробное описание нетрудно найти в открытых источниках. Однако нет данных о скорости миграции фибробластов, поэтому целью моей работы стало найти скорость миграции первичного крысиного фибробласта.

## **Цель:**

Установить скорость миграции первичных крысиных фибробластов.

## **Задачи:**

Изучить литературные данные

Провести выделение неонатальных крысиных кардиомиоцитов

Освоить работу на инвертированном микроскопе Olympus [x71]

Научиться определять различия между кардиомиоцитами и фибробластами

Фиксировать положение клеток через 5-10 минутные промежутки времени путем снятия видео и фотографий

Обработать полученные данные

Сделать выводы

## Литературный обзор

Фибробласты — соединительные клетки ткани организма.

Миграция фибробластов – процесс, при котором фибробласт перемещается по коллагеновому волокну, образовывается ламеллоподия.

Ламеллоподия – выступы актина, которые находятся в подвижных краях клеток

Фибробласты и кардиомиоциты:

Все типы фибробластов снижают жизнеспособность кардиомиоцитов и увеличивают объем кардиомиоцитов. Кардиомиоцит – мышечная клетка сердца. Фибробласты играют разные роли в процессе физиологии и болезни в регулировании функции миокарда.

## Методы исследования

Световая микроскопия



Тот же принцип работы, что и у Olympus [x71]

## Образцы и выделение клеток

В лаборатории была выделена культура сердечной ткани непосредственно из органа живого организма (новорожденных крысят). Дело в том, что клетки использование сердец крысят в неонатальном периоде (1-3 дня), позволяют смоделировать экспериментальную 2D модель сердечной ткани, нежели при использовании сердец взрослых животных. Крысята лабораторные, белые, породы Wistar, сердечная ткань которых использовалась в моем исследовании. После препарации 11 особей, маленькие сердца были измельчены (и всё время находились в среде HBSS) медицинскими ножницами, перемешаны, очищены от посторонних волокон при помощи пинцета.

Протокол по выделению клеток Worthington:

В ламинаре располагали емкость со льдом. Реагент № 1, CMF HBSS: 50-60 мл из флакона № 1, холодный. Реагент № 2, трипсин: восстановите один из флаконов № 2 2 мл реагента № 1, охлажденного льдом. Одна стерильная центрифужная пробирка на 50 мл во льду. Чашка Петри 10 см, стерильная, на льду. Перенесите 30-40 мл Реагента №1 в центрифужную пробирку. Сделайте анестезию каждому щенку крысы, простерилизуйте брюшную полость антисептическим раствором и хирургическим путем удалите бьющееся сердце; немедленно поместите сердце в центрифужную пробирку, чтобы охладить и промыть. Повторите то же самое для оставшихся крысят. Покрутите трубку, чтобы промыть сердца, затем слейте большую часть жидкости. Промыть сердца 10 мл Реагента №1, слить жидкость, как и раньше, затем перенести сердца в чашку Петри. Измельчите ткань маленькими ножницами или бритвенным лезвием до кусочков размером менее 1 мм<sup>3</sup>, поддерживая температуру ткани при 0 ° C. Добавьте Реагент №1 в чашку Петри до конечного объема примерно 9 мл. Перенесите 1 мл содержимого флакона с трипсином (флакон № 2) в чашку Петри и полностью перемешайте встряхиванием. Конечная концентрация трипсина составляет 50 мкг / мл. Закройте чашку Петри крышкой и немедленно поместите в холодильник на ночь (16-20 часов) при 2-8 ° C. Примечание. Если животным 4 дня и старше, увеличьте концентрацию трипсина максимум до 100 мкг / мл. День 2: Реагент №1, CMF HBSS: 30 мл. ледяной. Реагент №3, ингибитор трипсина: восстановите один из флаконов №3 с помощью 1 мл реагента №1. Комнатная температура. Реагент № 4 Коллагеназа: восстановите один из флаконов № 4 5 мл приготовленного Лейбовица L-15. Комнатная температура. Достаточно питательной среды, содержащей кальций и магний, для переваривания, центрифугирования и посева в посуду. (примерно 100 мл на 10 сердец). Комнатная температура. Серологическая пипетка с широким горлом 10 мл, стерильная (диаметр отверстия около 3 мм). Стандартная

пластиковая серологическая пипетка 10 мл. Достаньте чашку Петри из холодильника и поставьте в стерильный вытяжной шкаф на льду. Перенесите ткань и буфер в 50 мл центрифужную пробирку на льду с помощью пипетки с широким горлом. Перенести содержимое флакона № 3 в пробирку и перемешать. Окислите ткань от 30 секунд до 1 минуты, если кислород доступен, пропуская кислород через поверхность жидкости. Нагрейте ткань и буфер до 30-37 ° С на водяной бане, сохраняя стерильность (т. Е. Колпачок, если необходимо). Не добавляйте кальцийсодержащую среду, пока фрагменты ткани не нагреются. Медленно перенесите содержимое флакона № 4 в пробирку и перемешайте. Плотнo закройте трубку. Поместите пробирку в / на медленно вращающийся (переворачивание) или встряхивающий инструмент (2–4 об / мин) при 37 ° С и инкубируйте в течение 30–45 минут. Все последующие шаги при комнатной температуре. Удалите пробирку из инкубатора и верните в стерильный кожух. С помощью стандартной пластиковой серологической пипетки на 10 мл растереть примерно 10 раз для высвобождения клеток. (Растирание обсуждается в следующей вставке.) Пипетируйте как можно осторожнее, чтобы обеспечить успешное диспергирование тканей. Промойте сетчатый фильтр для клеток 1 мл культуральной среды L-15. Дайте остатку ткани осесть 3-4 минуты, затем (той же пипеткой) отфильтруйте супернатант через фильтр для клеток в свежую центрифужную пробирку на 50 мл. Добавьте 5 мл дополнительной культуральной среды L-15 к остатку ткани, повторите этап растирания. Дайте остаткам ткани осесть, как и раньше, затем отфильтруйте клетки через тот же фильтр для клеток. Осторожно промойте сетку 2 мл культуральной среды, насыщайте клетки кислородом в течение 1 минуты, затем дайте отфильтрованным клеткам оставаться нетронутыми в течение примерно 20 минут при комнатной температуре. Это позволяет полностью переваривать частично разрушенный коллаген. (На этом этапе клетки можно держать до 1 часа.) Аккуратно закрутите клетки; если комков не образовалось и внешний вид однороден, осаждают клетки при 50-100 мкг в течение 5 минут (достаточно для осаждения миоцитов и некоторых, но не всех эритроцитов). Суспендировать клетки в дополнительных порциях культуральной среды L-15 и повторить осаждение, как желанный. Если седиментация не требуется, клетки можно высеять непосредственно из исходного фильтрата. Сыворотка обычно требуется для посева клеток в культуральную посуду. Суспендировать конечный осадок клеток в подходящей культуральной среде. Пипеткой аккуратно разогнать. Никаких комочков или жилок соединительной ткани не должно быть видно. Подсчитайте количество клеток с помощью гемоцитометра или другого метода, отрегулируйте концентрацию клеток и добавьте сыворотку по желанию, затем поместите в посуду для культивирования тканей. (Некоторые бренды посуды для культивирования без покрытия

не способствуют высокой эффективности посева. Для достижения наилучших результатов используйте Falcon или эквивалент.) Обычный выход клеток составляет 2–3 x 10<sup>6</sup> кардиомиоцитов на сердце. Должны быть получены хорошие (довольно тяжелые) уровни посева клеток при 125 000 кардиомиоцитов на см<sup>2</sup> лунок или колб для культивирования.

За сутки до посадки клеток были подготовлены образцы: стекла диаметров 13мм, покрытые фибронектином. Клетки были высажены в концентрации 200тыс/см<sup>2</sup>. Образцы были убраны в инкубатор на 2 часа. Температура в инкубаторе – 37С°, 5% СО<sub>2</sub>

### **Подготовка оборудования**

Была включена камера и микроскоп, увеличение микроскопа – 60х, сфокусировался.

Далее были сделаны фотографии образцов примерно через каждые 5 минут.

## Ход эксперимента

Спустя 2 часа после посадки клеток, образец был установлен на предметный столик микроскопа.

Был выбран фибробласт для дальнейшего наблюдения.

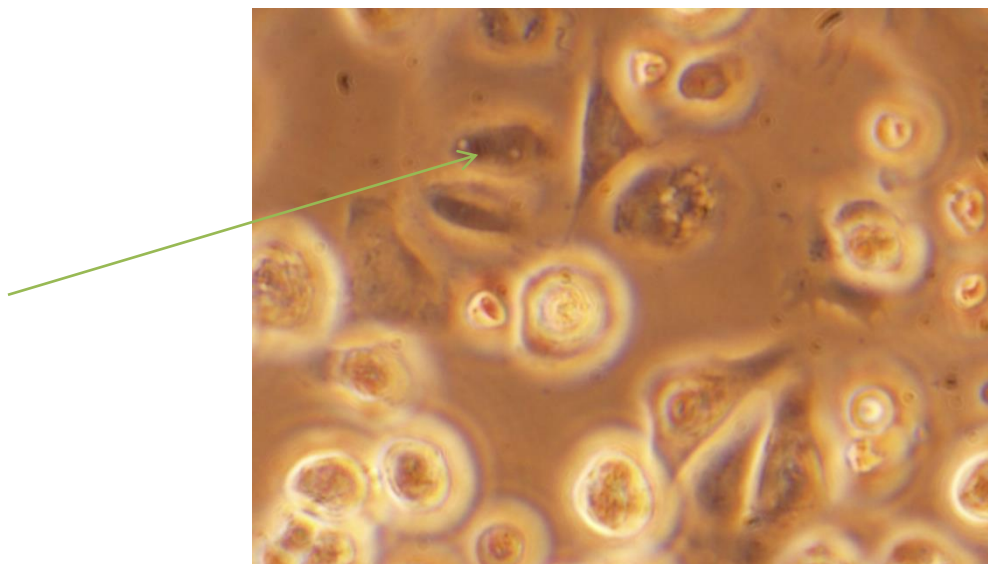


Рис.1. Первичный фибробласт крысы.

Далее наблюдаем за клеткой. В течение первых 20 минут клетка почти не двигалась, однако в переходе с 20 на 26 минуту начался первый этап миграции:

20-ая и 26-ая минуты соответственно

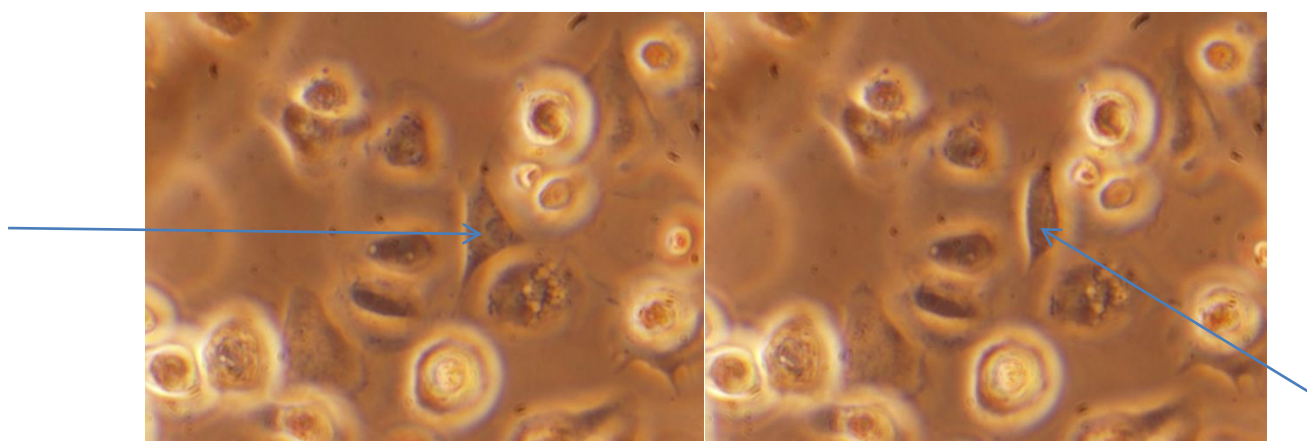


Рис 2 и 3. 20-ая и 26-ая минуты соответственно

Можем наблюдать, что клетка изменяет форму.



Далее клетко постепенно передвигается:

Период с 38 минуты до 72 соответственно

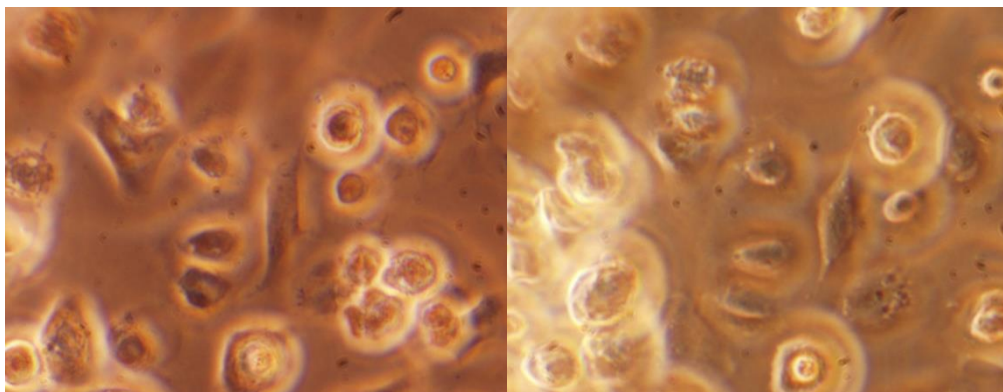


Рис 4 и 5. Период с 38 минуты до 72 соответственно.

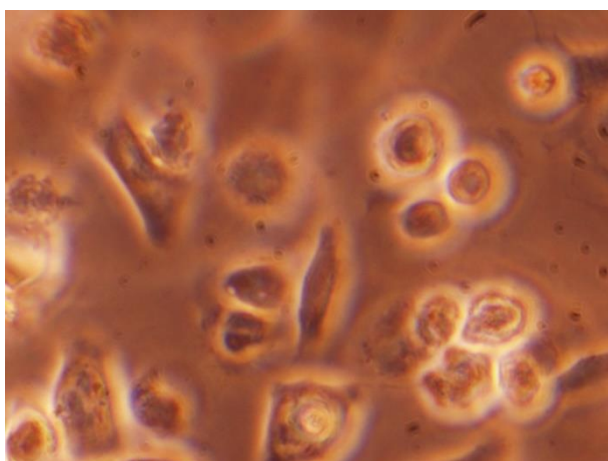


Рис 6. 148 минута.

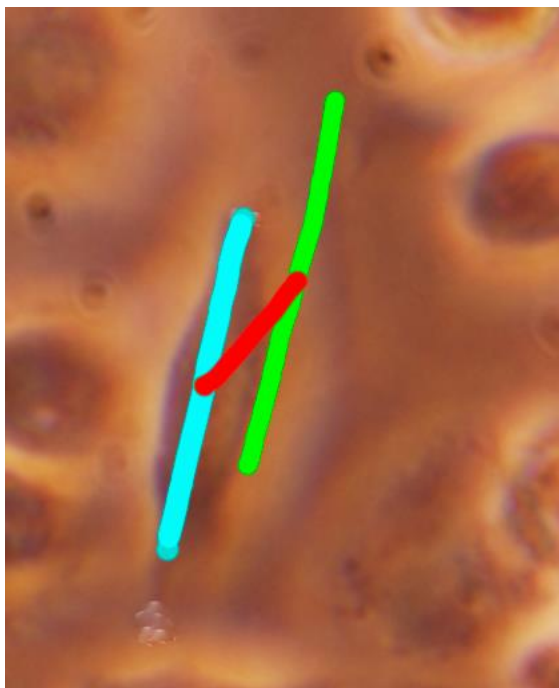
### Рабочие формулы:

Формула для нахождения скорости, которую клетка обретает в ходе миграции:

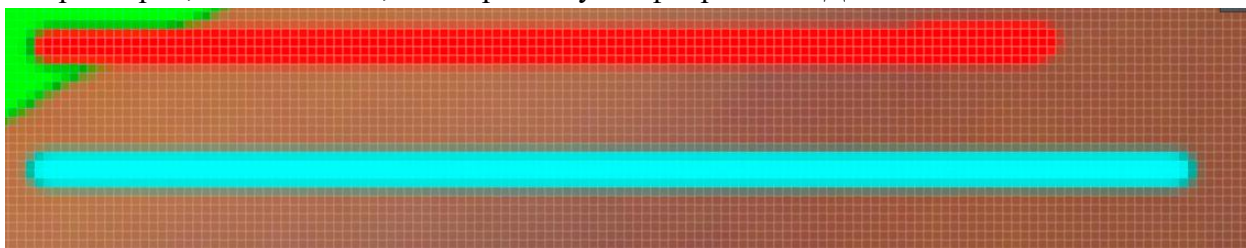
$$V = S_{\text{миграции}} / t_{\text{миграции}}$$

### Результаты

Для самого точного расчета я рассмотрел передвижение фибробласта с 77 минуты после начала наблюдения до 148 минуты. В программе Adobe Photoshop я наложил два снимка друг на друга, чтобы найти расстояние:



где голубая линия соединяет начало и конец конечного положения фибробласта на 148 минуте, а зеленая – начало и конец на 77 минуте. Красная линия – соединение их центров, которое нужно найти. Зная эталон в 13 микрометров, можно найти, как передвинулся фибробласт. Далее:



Красная линия – искомая длина, голубая – 13 микрометров. Посчитав по пикселям:

Красная – 118 пикселей, синяя – 133. Зная время, за которое была совершена миграция:

$$S_{\text{пройденное}} = 11.5 \text{ микрометров}$$

$$V = S / t = 0.16 \text{ микрометр} / \text{мин.} \text{ – скорость фибробласта при миграции}$$

## **Выводы**

Я научился отличать фибробласт от кардиомиоцита: фибробласт является клеткой соединительной ткани, а кардиомиоцит – мышечной. Также узнал, что такое миграция фибробластов. На рассмотренном образце я установил факт миграции фибробласта. Скорость фибробласта при миграции=0.16 микромметр\мин.

В исследовании на человеческих тканях, фибробласты мигрировали на место повреждения. В исследованиях нет данных о скоростях. Установлен факт миграции. [1]  
[2]

## **Список литературы**

<https://rupress.org/jem/article/165/1/251/23669/Stimulation-of-the-chemotactic-migration-of-human>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15349599>

<http://www.med24info.com/books/hirurgiya/zazhivlenie-ran-1238.html>

<https://meduniver.com/Medical/gistologia/57.html>

[https://www.researchgate.net/publication/270652194\\_Functional\\_Cross-Talk\\_between\\_Cardiac\\_Fibroblasts\\_and\\_Adult\\_Cardiomyocytes\\_by\\_soluble\\_mediators](https://www.researchgate.net/publication/270652194_Functional_Cross-Talk_between_Cardiac_Fibroblasts_and_Adult_Cardiomyocytes_by_soluble_mediators)