Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

 Кафедра клеточной биологии и гистологии

 УТВЕРЖДАЮ

 Декан биологического факультета

 д.б.н. профессор М.П. Кирпичников

 \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

№ госрегистрации «\_\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_г.

АААА-А16-116021660104-6

УДК: 591.4 Морфология животных.

Органология. Анатомия. Зоотомия

611.013 Эмбриология

591.3 Эмбриология животных. Онтогенез.

 Индивидуальное развитие

Инв. №

 ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ФИИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ, РАЗВИТИЯ И УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

по теме:

ГИСТОГЕНЕЗ И ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И БАРЬЕРНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ АДАПТАЦИОННЫХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ

 (окончательный)

Зам. декана по научной работе

 \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 «\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_г.

Руководитель темы

Макарова О.В.. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 «\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_г.

 Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель темы: |  |  |
| Макарова О. В. | д.м.н., профессор | (подтема 3разделы №1-4) |
| Исполнители темы: |  |  |
| Воротеляк Е.А. | д.б.н., профессор., чл.-корр. РАН | (подтема 4разделы №1-3) |
| Васильева Т.В. | старший научный сотрудник, к.б.н. | (подтемы 1-2разделы №1-3) |
| Добрынина М.Т. | доцент, к.б.н. | (подтема 3разделы № 1-3) |
| Федоров А.В. | научный сотрудник | (подтемы 1-2разделы № 1-3) |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**РЕФЕРАТ**

 **Ключевые слова:** тучные клетки, макрофаги, толстая кишка, стресс,

плюрипотентные клетки, внеклеточный матрикс, эпидермальные кератиноциты, дифференцировка,

**Подтема 1. Исследование противоаллергических свойств митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP в моделях in vitro и in vivo.**

Исследовали влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на фрагментацию митохондрий в ходе антиген-зависимой дегрануляции опухолевых тучных клеток линии RBL-2H3. Митохондрии и секреторные гранулы клеток визуализировали с помощью специфических флуоресцентных зондов. Показано, что SkQ1 и C12TPP предотвращают фрагментацию митохондрий в стимулированных клетках RBL-2H3. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что мтАФК могут участвовать в дегрануляции тучных клеток посредством индукции фрагментации митохондрий.

**Подтема 2.Исследование влияния митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на индуцированную липополисахаридом провоспалительную активацию макрофагов (линия THP-1).** Исследовали влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на активацию инфламмасом в макрофагах, дифференцированных из моноцитов линии THP-1. Стимуляцию макрофагов осуществляли в два этапа: праймирование с помощью липополисахарида и активация (АТФ или нигерицин). Активность инфламмасом определяли по уровню секреции цитокина IL-1β. Содержание цитокина в кондиционированной среде определяли методом ИФА. Показано, что предобработка дифференцированных клеток THP-1 SkQ1 перед добавлением активирующего сигнала приводит к достоверному увеличению активации инфламмасом С12ТРР и продукции IL-1β. Полученные данные свидетельствуют о том, что мтАФК ингибируют активацию инфламмасом в макрофагах.

**Подтема 3. Выявление половых гистофизиологических различий барьера толстой кишки у мышей C57BL/6 при стрессорном холодовом воздействии**. После курсового холодового воздействия патологических изменений в ободочной кишке, изменений содержания клеточных элементов в слизистой оболочке, числа эндокринныхх клеток, объемной доли бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных и высокосульфатированных муцинов после 14 дней ежедневного 10-20-ти минутного холодового воздействия не было выявлено ни у самцов, ни у самок мышей C57BL/6. У самцов мышей контрольной и опытной группы объемная доля бокаловидных клеток была меньше, чем у самцов. Таким образом, в выбранном режиме холодовое воздействие не оказывало стрессорного эффекта на гистофизиологию эпителиального барьера ни у самцов, ни у самок.

 **Подтема 4. Определение роли клеточной адгезии в эффективности эпидермальной дифференцировки из плюрипотентных стволовых клеток человека** .Плюрипотентные стволовые клетки человека способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, то есть во все соматические клетки. Проведено исследование влияния отдельных компонентов внеклеточного матрикса – коллагена IY типа, фибронектина, ламинина и витронектина - на культивирование ИПСК человека и разработан протокол дифференцировки ИПСК в эпидермальном направлении. Для каждого из использованных матриксов была проведена оценка эффективности обеспечиваемой адгезии ИПСК и способности к поддержанию роста их колоний в течение нескольких пассажей, при этом наиболее эффективным при культивировании субстратом оказался ламинин. Разработан эффективный протокол эпидермальной дифференцировки плюрипотентных клеток. Полученные результаты будут использованы при создание тканевых эквивалентов кожи.

**ВВЕДЕНИЕ**

Известно, что окислительный стресс и хроническое воспаление лежат в основе развития многих заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые, опухолевые, сахарный диабет I и II типов, метаболический синдром и др. (Murphy, Smith, 2007; Scrivo et al., 2011). В развитии и регуляции воспалительных реакций ключевую роль отводят клетками врожденного иммунитета, в первую очередь, макрофагам и тучными клеткам. Расположенные на их поверхности рецепторы PRRs распознают экзогенные (патогены, аллергены, ирританты, инородные и токсические вещества) и эндогенные сигнальные молекулы - алармины (Medzhitov, 2008; Ahmed, 2011; Ito, 2014). Однако, не все индукторы воспаления напрямую распознаются рецепторами PRRs. К ним относится ряд бактериальных токсинов, вирусов, абиотических материалов и эндогенных факторов, среди которых мочевая кислота, холестерин, РНК и др., а также изменение внутриклеточной концентрации ионов K+. Распознавание указанных молекул сопровождается активацией инфламмасоммы, представляющих собой цитозольный мультибелковый комплекс, эксрессирующийся в клетках врожденного иммунитета и регулирующий активацию цистеиновой протеазы каспазы-1. Каспаза-1, в свою очередь, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 путем протеолитического расщепления их предшественников. Данные цитокины запускают внутриклеточный MAPK-сигнальный каскад, ведущий к активации ядерного транскрипционного фактора NF-κB (Masters, 2008; Medzhitov, 2008).

Активированные макрофаги и тучные клетки секретируют различные воспалительные медиаторы, которые стимулируют процесс формирования воспалительного экссудата, обусловленного притоком белков плазмы и привлечением лейкоцитов в очаг повреждения (Galli et al., 2011). В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих об участии митохондрий в активации тучных клеток и макрофагов. Митохондрии могут участвовать в передаче внутриклеточных сигнальных путей посредством регуляции уровня АТФ, активных форм кислорода (АФК) и кальция. В качестве инструментов для изучения роли митохондриальных АФК в различных процессах используют митохондриально-направленные антиоксиданты. Одним из перспективных антиоксидантов такого рода является 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония бромид (SkQ1), накапливающийся в митохондриях благодаря остатку липофильного катиона (Antonenko et al., 2008). Кроме того, в качестве агентов, снижающих уровень митохондриальных АФК можно использовать разобщители окислительного фосфорилирования. Это связано с тем, что АФК, вырабатываемые митохондриями, крайне чувствительны к уровню трансмембранного потенциала. «Мягкое разобщение» применяется сейчас в качестве защиты клетки от окислительного стресса, так как снижение потенциала митохондрий, сопровождаются уменьшением АФК в клетке (Shabalina et al, 2014). Выделяют классические протонофорные разобщители (ДНФ, FCCP), а также проникающие катионы на основе трифенилфосфония (C12TPP) и родамина-19 (C4R1) (Ромащенко et al, 2015; Захарова, 2016). Роль митохондриальных активных форм кислорода (мтАФК) в процессах локального и системного острого воспаления изучена недостаточно.

Известно, что стресс может способствовать развитию различных заболеваний кишечника, таких как синдром раздраженной кишки, болезнь Крона, язвенный колит. Еще Selye (1936) показал, что стресс, вне зависимости от природы стрессорного фактора, вызывает ряд однотипных морфологических изменений: гипертрофию надпочечников, инволюцию тимуса и лимфатических узлов, а также изъязвления по ходу желудочно-кишечного тракта. Однако частота возникновения и тяжесть течения инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваний у мужчин и женщин различается, что обусловлено кариотипом и содержанием половых гормонов. В связи с изложенным, целью работы стало изучение морфофункциональных изменений ободочной кишки при холодовом стрессе у самцов и самок мышей С57BL/6.

 Плюрипотентные стволовые клетки могут быть использованы для получения в лабораторных условиях потенциально любых типов клеток взрослого организма, пригодных для создания трехмерных органоспецифических конструкций, позволяющих изучать межклеточные взаимодействия в развитии и гомеостазе тканей. Моделирование процессов морфо- и органогенеза в культуре с использованием эмбриональных стволовых клеток человека в значительной мере способствовало изучению основ эмбриогенеза тканей человека, исследование которых затруднено в виду этических норм, связанных с доступом к абортивному материалу и ограничениями при работе с эмбрионами человека. Разработанные протоколы направленной дифференцировки позволили выявить ключевые молекулярные регуляторные сети, регулирующие потентность как плюрипотентных, так и тканеспецифических стволовых клеток. Важным событием, значительно расширившим сферу применения плюрипотентных клеток человека, стало получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) лабораторией Яманаки в 2006 году. При помощи ИПСК стало возможным осуществлять пациент-специфический подбор лекарственных препаратов, что внесло важный вклад в развитие персонализированной медицины. Также ИПСК, полученные от доноров с генетическими заболеваниями, могут использоваться для моделирования и разработки подходов к лечению этих заболеваний in vitro. В настощее время влияние отдельных компонентов внеклеточного матрикса на культивирование ИПСК человека недостачно изучено и не разработан протокол их дифференцировки в эпидермальном направлении.

**ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

**Подтема 1. Исследование противоаллергических свойств митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP в моделях in vitro и in vivo.**

 В системе in vitro изучены механизмы активации тучных клеток и базофилов Антиген-зависимую активацию клеток осуществляли в два этапа: предварительная сенсибилизация клеток с помощью мышиных моноклональных антител изотипа IgE против динитрофенила (anti-DNP IgE) с последующей стимуляцией конъюгата динитрофенила с бычьим сывороточным альбумином DNP-BSA). Уровень дегрануляции оценивали с помощью выявления β-гексозаминидазы в кондиционированной среде и лизате клеток. Количество β-гексозаминидазы определяли по высвобождению р-нитрофенола из 4-нитрофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида по стандартной методике (Radinger et al., 2015). Показано, что предварительная инкубация опухолевых тучных клеток линии RBL-2H3 с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 в концентрациях от 0,2 до 200 нМ и разобщителем окислительного фосфорилирования С12TPP в концентрации 0,2 нМ течение 72 часов приводит к снижению уровня антиген-зависимой дегрануляции на 20-30%. Это свидетельствует об участии мтАФК в активации тучных клеток. Ранее было показано, что дегрануляция тучных клеток сопровождается фрагментацией митохондрий и их перемещением к плазматической мембране (Zhang et al., 2011). Фрагментация митохондрий, в свою очередь, сопровождается развитием окислительного стресса, а применение антиоксидантов способно подавлять фрагментацию митохондрий (Zhang et al., 2015; Huang et al., 2016; Gan et al., 2017). Исходя из этого, мы предположили, что мтАФК, контролирующие функциональное состояние митохондрий, могут играть важную роль в активации тучных клеток. Исследовали влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на фрагментацию митохондрий в ходе антиген-зависимой дегрануляции клеток линии RBL-2H3. Митохондрии и секреторные гранулы клеток визуализировали с помощью специфических флуоресцентных зондов. Показано, что SkQ1 и C12TPP предотвращают фрагментацию митохондрий в стимулированных клетках RBL-2H3. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что мтАФК могут участвовать в дегрануляции тучных клеток посредством индукции фрагментации митохондрий. На модели анафилактического анафилактического шока, индуцированного веществом 48/80, у самцов мышей линии CD1 протестированы противоаллергические свойства митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1. При профилактическом введении антиоксиданта выживаемость мышей не увеличивалась. Необходимо проведение дальнейших исследований с использованием разных доз SkQ1 и C12TPP на моделях пассивной системной анафилаксии и овальбумин-индуцированного атопического дерматита.

**Подтема 2. Исследование влияния митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на ЛПС-индуцированную провоспалительную активацию макрофагов (клеточная линия THP-1).**

 Исследовали влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на активацию инфламмасомы в макрофагах, дифференцированных из моноцитов линии THP-1. Данная клеточная линия широко используется для изучения механизмов активации инфламмасомы NLRP3 в макрофагах (Wang et al., 2013; Kim et al., 2016; Guzova et al., 2019). Стимуляцию инфламмасом осуществляли в два этапа: праймирование с помощью липополисахарида и активация (АТФ или нигерицин). Активность инфламмасом определяли по уровню секреции цитокина IL-1β. Содержание цитокина в кондиционированной среде определяли с помощью готового набора для ИФА. Результаты данной части работы показали, что предобработка дифференцированных клеток THP-1 SkQ1 в концентрациях 40, 400 и 1000 нМ в течение 5 часов перед добавлением активирующего сигнала приводит к достоверному увеличению активации инфламмасомы (в 2-3 раза). С12ТРР в тех же концентрациях также увеличивает продукцию IL-1β, однако в меньшей степени, чем SkQ1 (в 1,5-2 раза). Полученные данные свидетельствуют о том, что мтАФК ингибируют активацию инфламмасомы в макрофагах.

**Подтема 3. Выявление половых гистофизиологических различий барьера толстой кишки у мышей C57BL/6 при стрессорном холодовом воздействии**.

Известно, что стресс может способствовать развитию различных заболеваний кишечника, таких как синдром раздраженной кишки, болезнь Крона, язвенный колит. Selye (1936) показал, что стресс, вне зависимости от природы стрессорного фактора, вызывает ряд однотипных морфологических изменений: гипертрофию надпочечников, инволюцию тимуса и лимфатических узлов, а также изъязвления по ходу желудочно-кишечного тракта. Половые различия - кариотип и содержанием половых гормонов, во-многом, определяют течение стрессорных и воспалительных реакций организма. В связи с изложенным, целью работы стало изучение морфофункциональных изменений ободочной кишки при холодовом стрессе у самцов и самок мышей С57/Bl6. В течениие 14 дней мышей обоего пола опытных групп ежедневно помещали в морозильную камеру -20°С на 20 мин. За 20 минут холодового воздействия температура по данным внутрибрюшинного датчика у самки мыши снижалась в среднем до 31,7 (31,1; 31,9) °C, что соответствует умеренной гипотермии. После курсового холодового воздействия патологических изменений в ободочной кишке, изменений содержания клеточных элементов в слизистой оболочке, числа эндокринныхх клеток, объемной доли бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных и высокосульфатированных муцинов после 14 дней ежедневного 10-20-ти минутного холодового воздействия не было выявлено ни у самцов, ни у самок мышей C57BL/6.У самцов мышей контрольной и опытной группы объемная доля бокаловидных клеток у самцов была статистически значимо ниже, Таким образом, в выбранном режиме холодовое воздействие не оказывало стрессорного эффекта ни у самцов, ни у самок.

**Подтема 4. Определение роли клеточной адгезии в эффективности эпидермальной дифференцировки из плюрипотентных стволовых клеток человека.** Важным событием, значительно расширившим сферу применения плюрипотентных клеток человека, стало получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) лабораторией Яманаки в 2006 году. .При помощи ИПСК стало возможным осуществлять пациент-специфический подбор лекарственных препаратов, что внесло важный вклад в развитие персонализированной медицины. Также ИПСК, полученные от доноров с генетическими заболеваниями, могут использоваться для моделирования и разработки подходов к лечению этих заболеваний in vitro.

В настоящем исследовании был проведено исследование влияния на колонии ИПСК в течение нескольких пассажей отдельных компонентов роста - коллагена IV, фибронектина, ламинина и витронектина, причём для витронектина положительные результаты были получены только при его сорбции на стеклянных слайдах. Для ламинина была показана наилучшая адгезия ИПСК при пассировании, наиболее близкая по своему значению к контролю. Также, при культивировании клеток в течение нескольких пассажей, ламинин, по сравнению с другими матриксами, демонстрировал наиболее высокую интенсивность роста колоний и высокий уровень экспрессии маркеров плюрипотентности. Фибронектин и коллаген IV, по сравнению с ламинином, значительно хуже обеспечивали как адгезию, так и поддержание роста колоний ИПСК. Коллагены I и III оказались неспособны к обеспечению продолжительной адгезии ИПСК. При успешной сорбции, витронектин показал хорошие результаты при поддержании роста колоний ИПСК на первом пассаже, сходные с контролем. Несмотря на возникшие при работе с ним методологические проблемы, витронектин имеет большой потенциал для дальнейших исследований, так как множество литературных источников свидетельствует о его высокой эффективности в культивировании плюрипотентных клеток человека.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

 В результате исследования противоаллергических свойств митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP в моделях in vitro, показано, что оба соединения предотвращают фрагментацию митохондрий в стимулированных опухолевых тучных клетках RBL-2H3. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что мтАФК могут участвовать в дегрануляции тучных клеток посредством индукции фрагментации митохондрий

Висследовании влияния митохондриально- направленного антиоксиданта на основе пластохинона SkQ1 и разобщителя окислительного фосфорилирования С12TPP на ЛПС-индуцированную провоспалительную активацию макрофагов (клеточная линия THP-1) показано, что предобработка дифференцированных клеток THP-1 SkQ1 перед добавлением активирующего сигнала приводит к достоверному увеличению активации инфламмасомы и повышению продукции провоспалительного цитокина IL-1β. Полученные данные свидетельствуют о том, что мтАФК ингибируют активацию инфламмасомы в макрофагах.

Гистофизиологически.е реакции эпителиаального барьера толстой кишки у самок и самцов мышей C57BL/6 при стрессорном холодовом воздействии, моделирующем умеренную гипотермию, отсутствуют: не выявлено изменений содержания клеток в слизистой оболочке, числа эндокринных клеток, объемной доли бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных и высокосульфатированных муцинов. Однако, у самцов мышей контрольной и опытной групп в эпителиальной выстилке толстой кишки было больше бокаловидных клеток. Таким образом, в выбранном режиме холодовое воздействие не оказывало стрессорного эффекта ни у самцов, ни у самок.

В настоящем исследовании был проведено исследование влияния отдельных компонентов внеклеточного матрикса на культивирование ИПСК человека и разработан протокол дифференцировки ИПСК в эпидермальном направлении. Для каждого из использованных матриксов была проведена оценка эффективности обеспечиваемой адгезии ИПСК и способности к поддержанию роста их колоний в течение нескольких пассажей, при этом наиболее эффективным при культивировании субстратом оказался ламинин. Разработан эффективный протокол эпидермальной дифференцировки плюрипотентных клеток. Полученные результаты будут использованы при создание тканевых эквивалентов кожи

 Публикации: книги – 1, статьи- 4, доклады - 2