

УДК 604

ПОЛУЧЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ НЕЙРОНОВ ЧЕЛОВЕКА НА МИКРОГЕЛЕВЫХ ЧАСТИЦАХ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА rS1/9

© 2023 г. Е. В. Новосадова^{1, *}, Д. М. Шимченко¹, Л. В. Новосадова¹, Г. А. Носов², Л. И. Давыдова¹, Е. Д. Барсуков¹, А. А. Рамонова³, В. Г. Дебабов¹, В. З. Тарантул¹, В. Г. Богуш^{1, 4}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²ФГБУ “Федеральный центр мозга и нейротехнологий” Федерального медико-биологического агентства, Москва, 117513 Россия

³Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

*e-mail: novek-img@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 17.06.2023 г.

Известно, что после трансплантации в организм клеточного материала без матрикса-носителя большинство клеток погибает в короткие сроки из-за отсутствия условий для их дифференцировки и пролиферации. Поэтому для длительного и полноценного функционирования вводимых клеток необходимо наличие в этих системах биodeградируемого и биосовместимого трехмерного матрикса. Нами ранее на культурах клеток и животных организмах при использовании матриксов из рекомбинантных спидроинов показана их нетоксичность, высокая биосовместимость, способность к поддержанию роста клеток, к медленной биорезорбции в организме животных. В настоящей работе в качестве матрицы для нейрональной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека были использованы микрогелевые частицы на основе рекомбинантного спидроина rS1/9. Дифференцированные на микрогеле нейроны представляют собой гетерогенную популяцию, обогащенную дофаминергическими нейронами с развитыми синапсами. Полученные нейроны проявляют спонтанную активность и экспрессируют потенциал-чувствительные каналы, что свидетельствует в пользу их функциональной зрелости.

Ключевые слова: нейроны, рекомбинантные спидроины, матрикс, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка

DOI: 10.56304/S0234275823020102

Трехмерные аналоги внеклеточных матриксов (ВКМ) на основе композиционных и полимерных материалов находят широкое применение в исследованиях клеток, регенеративной медицине и создании лекарств [1]. Разработка новых технологий получения матриксов с комплексом заданных свойств является ключевой задачей для полу-

чения нейрональных клеток нужной морфологии и функциональной принадлежности. Механические характеристики 2D- или 3D-платформ влияют на развитие и функциональность культивируемых клеток [2], изменения в них считаются клеточными рецепторами, что приводит к запуску каскадов реакций, в конечном итоге определяющих экспрессию генов и распределение сигнальных биомолекул [1, 3].

Фиброин шелка и шелк пауков считаются одними из многообещающих материалов, используемых для инженерии нервной ткани. Они обладают уникальным сочетанием физико-химических свойств и биологической активности, обеспечивающих их биосовместимость и высокую регенеративную активность [4, 5]. Рекомбинантные спидро-

Список сокращений: ВКМ – внеклеточный матрикс; ДА – дофаминергические нейроны; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МКГ – микрогель; ПФА – параформальдегид; РС – рекомбинантные спидроины; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЦНС – центральная нервная система, SR – заменитель сыворотки, FGF8 – фактор роста фибробластов 8, B-27 – бессывороточная добавка для нейрональных клеток, Shh – фактор для нейрональной дифференцировки, tubb-общий нейрональный маркер, DAPI – ядерный краситель.

ины (PC) rS1/9 и rS2/12 – аналоги белков каркасной нити паутины пауков-кругопрядов, разработанные в ГосНИИгенетике, обладают необходимыми физико-химическими и биологическими свойствами для создания 2D- и 3D-матрикс для культивирования нейральных клеток: высокой упругостью, амфифильностью, способностью к самосборке и электропрядению, биосовместимостью и могут быть модифицированы генно-инженерным путем различными биологически активными пептидами [6].

На основе PC нами были разработаны надмолекулярные формы, такие как нетканый материал, прозрачные пленки, высокопористые 3D матриксы, гидрогели и микрогели, которые характеризовались наличием спонтанно образованных нано- и микропор, положительным зарядом во всем диапазоне физиологических значений pH и способностью к регулируемой биорезорбции в организме, коррелирующей со скоростью роста новой функционирующей ткани [7]. В результате токсикологических исследований было установлено, что изделия из PC в виде гидрогеля и микрогеля являются безвредными средствами и не обладают раздражающим и сенсibiliзирующим действиями [8].

Кроме того, 18 повторов последовательности GRGGL, которые узнаются нейральными клетками и способствуют их активации [9], содержатся в PC rS1/9, вследствие чего он оказался наиболее подходящим для взаимодействия с нейрональными тканями. При имплантации в головной и спинной мозг макак-резусов нетканого анизотропного матрикса на основе PC rS1/9 и rS2/12, содержащего прямо репрограммированные клетки-предшественники (drNPC) человека, они выживали в течение 3-х месяцев после пересадки и дифференцировались в нейроны [10].

Нетканый матрикс на основе PC rS1/9 эффективно направлял рост аксонов и миграцию Шванновских клеток, а также способствовал росту аорты и миграции гладкомышечных и эндотелиальных клеток [11]. Это указывает на способность PC, в частности rS1/9, индуцировать неиннервацию и неангиогенез, что является важнейшим фактором быстрой регенерации тканей после повреждения.

Технология человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) предлагает уникальный ресурс для получения широкого спектра клеточных культур, где особое место занимают нейрональные популяции клеток. Однако точное моделирование любой ткани невозможно без воссоздания трёхмерной микроархитектуры. Есть примеры выращивания нейронов центральной нервной системы (ЦНС) на анизотропных каркасах [12], пористых микропористых

[13], трёхмерных биопечатных субстратах [14], на покрытиях на основе PC [15].

В то же время известно, что мозг является одним из самых мягких органов и ведет себя как поперечноупругий материал, благодаря высокому содержанию воды (73–85% от общей массы) [16]. Поэтому весьма перспективным представляется использование для культивирования нейрональных клеток и регенерации нервной ткани гидрогелей, обладающих схожими с тканями мозга свойствами (показателями упругости, модуля, содержания воды) [17]. Из гидрогеля путем физического дробления можно приготовить суспензию микрогелевых (МКГ) частиц, которые, обладая всеми свойствами гидрогеля, могут быть фракционированы по размеру (от 50 до 300–400 мкм) и по сравнению с исходным гидрогелем имеют значительно большее отношение поверхности к объему, что позволяет адгезироваться на них намного большему количеству клеток.

Возможность использования МКГ на основе PC rS1/9 для регенерации тканей ЦНС была продемонстрирована при введении суспензии таких частиц в зону индуцированного инсульта у мышей, что приводило к выраженному увеличению скорости пролиферации и выживаемости стволовых клеток-предшественников в зоне зубчатой извилины, расположенной на расстоянии от зоны травмы [18].

В литературе имеются публикации, посвященные использованию гидрогелей на основе синтетических и природных полимеров и фиброина шелка для культивирования нейрональных клеток и регенерации нервной ткани, в основном для периферийных нервов [19], однако отсутствуют публикации, посвященные использованию МКГ на основе PC для культивирования и дифференцировки нейрональных клеток ЦНС.

Целью настоящей работы было проведение исследований возможности получения зрелых функционально активных нейронов, дифференцированных из ИПСК человека, на трёхмерном матриксе в виде МКГ, полученных на основе PC rS1/9.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение МКГ

Получение биомассы дрожжей-продуцентов, а также выделение и очистку PC rS1/9 проводили по ранее опубликованному протоколу [20]. Очищенные белки замораживали и лиофилизовали. Образцы гидрогеля получали из 3%-ного раствора высокоочищенного PC rS1/9 в 10%-ном хлориде лития (VWR International LLC, США) в 90%-ной муравьиной кислоте (PanReac, США) как описано ранее [21], с последующим диализом против деионизованной воды с пятью сменами в течение 24 ч. Затем для инициации гелеобразова-

ния к раствору белка добавляли $MgCl_2$ (Sigma, США) до конечной концентрации 2 мМ и инкубировали при 30°C в течение приблизительно 24 ч до формирования гидрогеля. МКГ получали путем физического измельчения гидрогеля с помощью сита с размером ячеек 200 мкм. Полученные микроносители представляли собой гетерогенную смесь частиц МКГ диаметром от 50 до 300 мкм с преобладанием частиц размером 50–150 мкм.

Анализ морфологии поверхности МКГ

Подготовку МКГ к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проводили по стандартному протоколу. В частности, микрочастицы фиксировали в течение ночи с использованием 2.5%-ного глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере pH 7.2 при +4°C. Затем образцы трижды промывали этим буфером в течение 5 мин с последующим обезвоживанием в серии растворов этанола возрастающей концентрации и ацетона (“Химмед”, Россия). После сушки в критической точке на установке Hitachi HCP-2 (Hitachi, Ltd., Япония) МКГ металлизировали слоем платины толщиной 20 нм с помощью Ion Coater IB3 (Eiko Engineering Co., Япония). Полученные образцы анализировали на микроскопе Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания) с разрешением 10 нм и рабочим напряжением –20 кВ. Изображения получены с помощью программы MicroCapture (ООО “СМА”, Россия).

Клеточные культуры

В работе были использованы незрелые нейроны человека, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных клеток здорового донора, полученные нами ранее [15, 22].

Подготовка культуральной посуды с МКГ

В работе использовали как иммобилизованные, так и свободноплавающие МКГ. В первом случае МКГ в концентрации 150–200 частиц на 100 мкл дистиллированной воды наносили на конфокальную чашку Петри с 13 мм стеклянной вставкой (SPL Life Sciences, Корея). Для одной чашки использовали 100 мкл суспензии МКГ. Чашки инкубировали 30–40 мин в ламинарном шкафу и удаляли не связавшиеся частицы, оставляя немного влажным дно чашки. Чашку прикрывали крышкой и подсушивали в ламинаре в течение 10–15 мин, затем трехкратно промывали 2 мл дистиллированной воды. За 48 ч до использования в чашку вносили 2 мл среды DMEM (“ПанЭко”, Россия) и оставляли на ночь в CO_2 -инкубаторе. На следующий день максимально отбирали всю среду и вносили 2 мл среды для дифференцировки I типа следующего состава: Neurobasal

Medium (Gibco, США) с добавлением 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина (“ПанЭко”), 2% (от общего объема) заменителя сыворотки SR (Gibco), 1% B-27 (Gibco), 2 мМ глутамин (ICN Biomedicals, США), 1% (от общего объема) смесь аминокислот (“ПанЭко”), 100 нг/мл Shh (Miltenyi Biotec, Германия), 100 нг/мл FGF8 (PeproTech, США), 10 мкМ пурморфамин (Sigma-Aldrich, США) и оставляли на ночь в CO_2 -инкубаторе. За 2 ч до посева клеток среду отбирали и вносили в отверстие со стеклянной вставкой 100 мкл свежей среды для дифференцировки I типа с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора (Stemolecule Y27632; Stemgent, США).

Для получения свободноплавающих частиц МКГ в лунку 96-луночного планшета вносили суспензию в концентрации 150–200 частиц на 100 мкл дифференцировочной среды I типа с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора.

Посев незрелых нейронов человека на МКГ

Незрелые нейроны культивировали на чашках Петри, предварительно покрытых матригелем (Corning Lif Sciences, США) в дифференцировочной среде I типа. Клетки на 9 сутки культивирования снимали с подложки с помощью 0.05% трипсина (Gibco). Действие фермента инактивировали добавлением 1 мл среды DMEM (“ПанЭко”) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США). Клетки центрифугировали 5 мин при 200 g (СИА, ЭЛМИ, Латвия), сливали надосадочную жидкость и вносили 1 мл дифференцировочной среды I типа с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора (Stemolecule Y27632; Stemgent). Из лунки 96-луночного планшета с иммобилизованными МКГ отбирали 50 мкл среды и вносили 50 мкл суспензии клеток из расчета 300 тыс. клеток/лунку. Для посева на иммобилизованный на чашках МКГ использовали 100–150 тыс. клеток на чашку. На следующий день среду меняли на дифференцировочную II типа следующего состава: DMEM/F12 (Gibco), 2% заменитель сыворотки (Gibco), 1% B-27 добавка (Gibco), 2 мМ глутамин (ICN Biomedicals), 1% (от общего объема) смесь аминокислот (“ПанЭко”), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин (“ПанЭко”), 20 нг/мл BDNF (PeproTech, США), 20 нг/мл GDNF (PeproTech), 200 мкМ аскорбиновая кислота (“ПанЭко”) и 4 мкМ форсколина (Stemgent, США) и культивировали в течение 14 сут. Смену среды осуществляли первые 7 дней через день, далее ежедневно. После окончания дифференцировки клетки фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида (ПФА) (Sigma-Aldrich), и окрашивали специфическими антителами согласно методике, описанной ранее [15].

Список антител, использованных в работе:

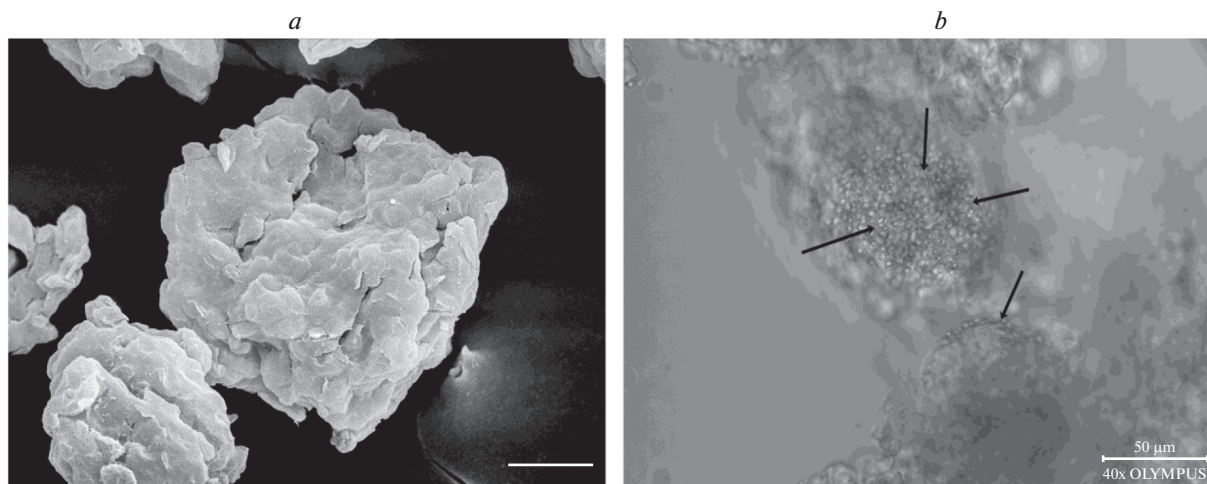


Рис. 1. (a) Структура МКГ rS1/9. Масштабная шкала 30 мкм; (b) репрезентативная фотография незрелых нейронов на МКГ через 24 ч после посева. Стрелками обозначены клетки. Масштабная шкала 50 мкм.

Fig. 1. (a) Structure of the ICG rS1/9. Scale bar 30 μm ; (b) representative photograph of immature neurons on MCG 24 h after seeding. Arrows indicate cells. Scale bar 50 μm .

Первичные антитела: мышинные Anti-tubb, (AB 7751, Abcam, Великобритания), 1 : 2000; кроличьи Anti-Syn, (S193, Sigma), 1 : 1000; кроличьи Anti-SLC1A3, (MBS178459, MyBioSource, США), 1 : 100; кроличьи Anti-TN, (AB112, Abcam), 1 : 1000; кроличьи Anti-CHAT, (A13244, Abclonal, США), 1 : 70. Вторичные антитела: козьи анти-мышинные AlexaFluor 488, (A11001) 1/2000 и козьи анти-кроличьи AlexaFluor 546, (A11010), 1/2000 (Invitrogen, США).

Функциональная характеристика нейронов с помощью кальциевого имиджинга

Для измерения функциональной активности нейронов использовали конфокальные чашки Петри с 13 мм стеклянной вставкой (SPL Life Sciences) с иммобилизованным МКГ. В данных экспериментах применяли мембрано-проницаемый Ca^{2+} -индикатор (рабочая концентрация 10 мкМ) Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific, США). Окрасивание клеток осуществляли в ростовой среде. После окрасивания клетки промывали двумя сменами среды и инкубировали дополнительно 15 мин в CO_2 -инкубаторе при 37°C. После этого осуществляли видеосъемку в течение 10 мин.

Для регистрации кальциевых токов, вызванных деполяризацией мембраны, в среду для микроскопии был добавлен раствор KCl до финальной концентрации 50 mM. Прижизненная съемка окрашенных культур проводилась с помощью инвертированного микроскопа ADF I350B (Нидерланды) оснащенного 20X объективом.

Получение криосрезов на замораживающем микротоме-криостате

Нейроны, дифференцированные на свободноплавающих частицах МКГ, по окончании дифференцировки фиксировали 4% ПФА в течение 30 мин. Зафиксированный образец помещали в пластиковую форму и заливали матричной средой для криотомии Tissue-Tek® OCT Compound (Sakura Finetek, США). Далее, заливочную форму с образцом охлаждали над жидким азотом в течение 10 мин. Полученный замороженный блок хранили при -80°C . Криосрезы осуществляли на замораживающем микротоме-криостате (Microm-Cryo-StarHM 560, Thermo Fisher Scientific.). Проводили серию срезов, которые сразу переносили на предметное стекло, предварительно обработанное полилизинном L (ICN Biomedicals, США), затем высушивали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 2 ч и хранили при -80°C . Иммуноцитохимическое окрашивание проводили согласно методике, описанной ранее [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структуру поверхности МКГ анализировали с помощью СЭМ. МКГ представляет собой микро-частицы со средним размером от 100 до 300 мкм и ярко выраженной рельефной поверхностью. Поверхностные элементы МКГ включают микро-структуры размером от 10 до 30 мкм (рис. 1a).

Незрелые нейроны, полученные из ИПСК человека, были посеяны на иммобилизованные на поверхности чашки частицы МКГ для дальнейшей дифференцировки (рис. 2). Как видно на рис. 2a, клетки плотным монослоем покрывают всю внешнюю поверхность МКГ. Нейроны куль-

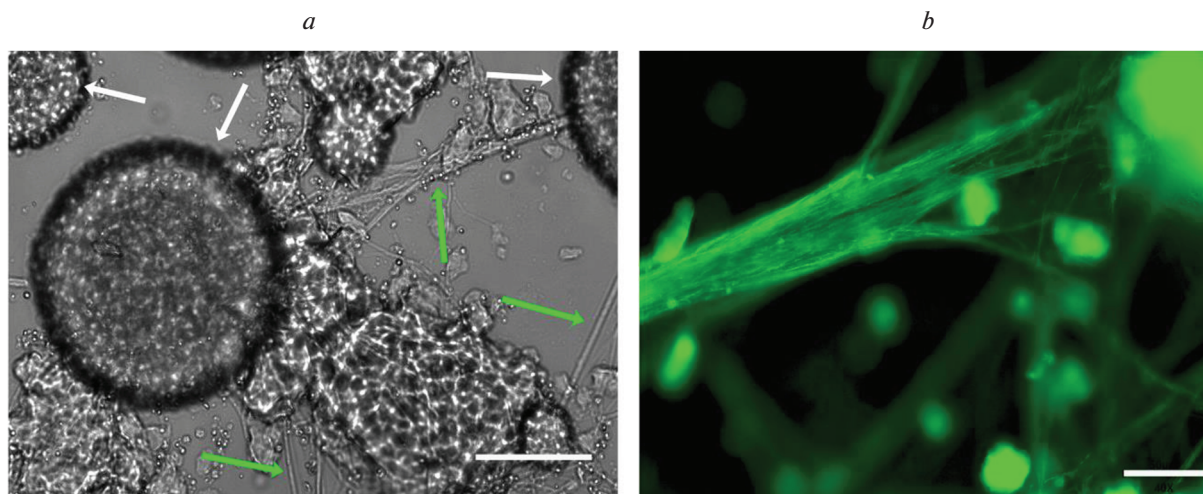


Рис. 2. Нейроны, дифференцированные в течение 14 сут на МКГ. (а) белыми стрелками обозначены частички МКГ с нейронами; зелеными — пучки аксонов; масштабная шкала 200 мкм; (б) иммуноцитохимическое окрашивание пучка аксонов антителами против tubb; масштабная шкала 50 мкм.

Fig. 2. Neurons differentiated within 14 days on MCG. (a) White arrows indicate MCG particles with neurons; green — bundles of axons; scale bar 200 μm ; (b) immunocytochemical staining of the axon bundle with antibodies against tubb, scale bar 50 μm .

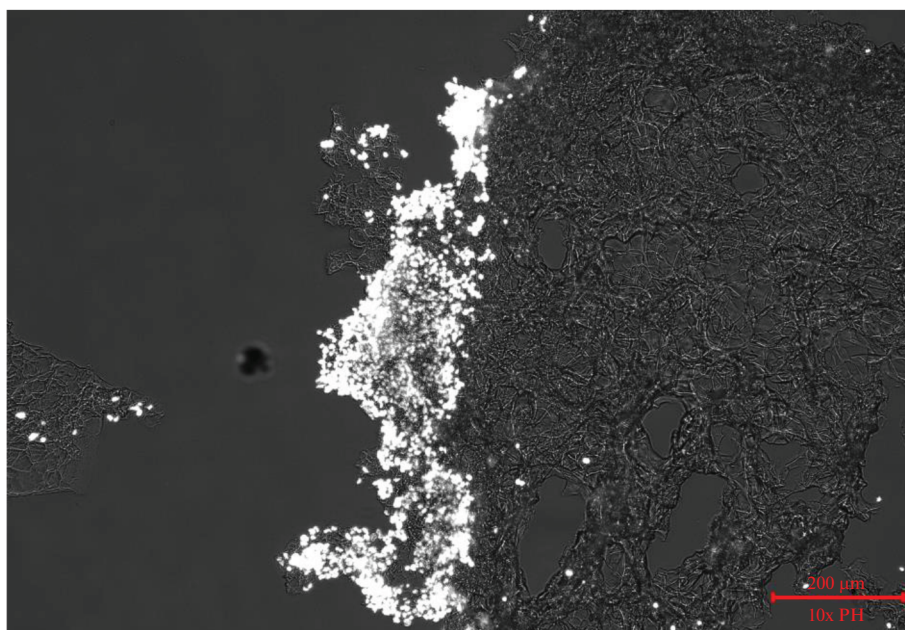


Рис. 3. Криосрез МКГ с дифференцированными нейронами. Окрашивание ядерным красителем DAPI. Масштабная шкала 200 мкм.

Fig. 3. Cryosection of MCG with differentiated neurons. Stained with nuclear dye DAPI. Scale bar 200 μm .

тивировали на матриксе в течение 14 сут и к моменту окончания дифференцировки между частичками МКГ с нейронами формировались синаптические связи: нейроны плотно заселяли МКГ и формировали аксоны, направленные к соседним частичкам МКГ. Таким образом, на всей поверх-

ности чашки были отмечены многочисленные связи между отдельно расположенными частичками МКГ.

Для того чтобы оценить миграцию клеток непосредственно внутрь МКГ, использовали криосрезы дифференцированных на нем нейронов.

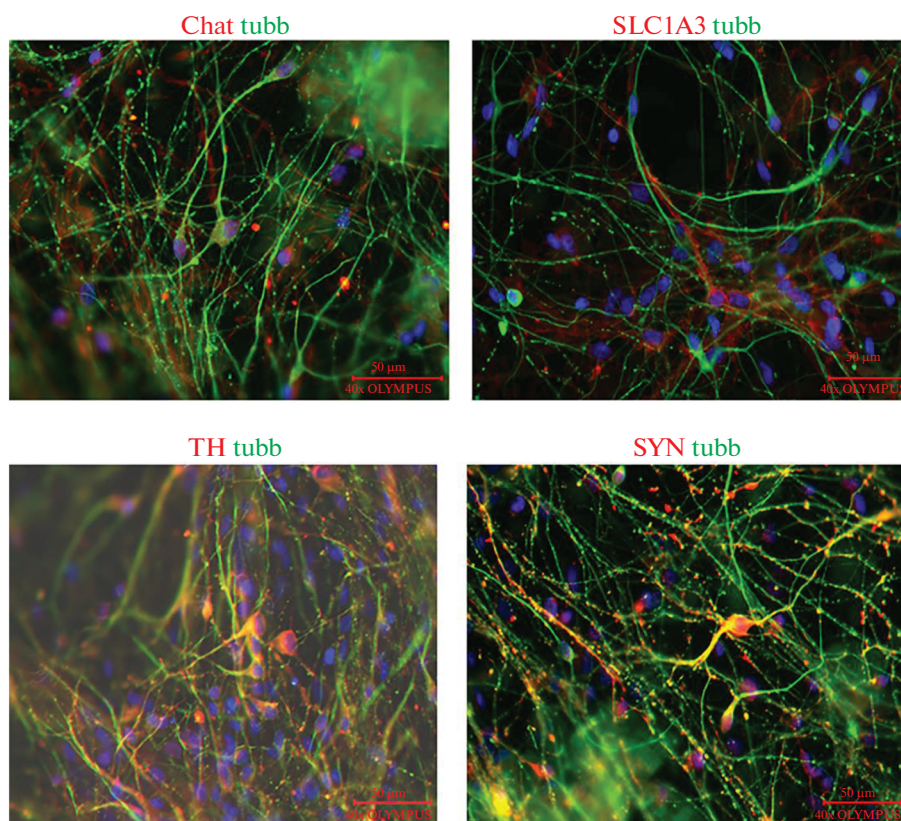


Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами против CHAT (маркер холинергических нейронов), SLC1A3 (маркер глутаматергических нейронов), TH (маркер ДА нейронов), SYN (синапсин), tubb (общий нейрональный маркер) и ядерным красителем DAPI. Масштабная шкала 50 мкм.

Fig. 4. Immunocytochemical staining with antibodies against CHAT (marker for cholinergic neurons), SLC1A3 (marker for glutamatergic neurons), TH (marker for DA neurons), SYN (synapsin), tubb (common neuronal marker), and nuclear stain DAPI. Scale bar 50 μ m.

Из анализа серии криосрезов следует, что нейроны преимущественно не мигрируют вглубь МКГ, а располагаются либо на его поверхности, либо на незначительной глубине (рис. 3).

При нейрональной дифференцировке клеток из ИПСК была получена гетерогенная популяция нейронов. Для того чтобы обогатить эту популяцию определенным типом нейронов, применяют разные протоколы [23]. В своей работе мы использовали протокол дифференцировки для получения дофаминергических (ДА) нейронов (см. раздел Условия эксперимента). После завершения нейрональной дифференцировки клетки были окрашены антителами к нейронам разной эргичности. Было показано, что в культуре преимущественно присутствуют ДА нейроны, а также, в небольшом количестве, холинергические и гамкергические нейроны, при этом не было обнаружено глутаматергических нейронов (рис. 4).

В процессе дифференцировки на МКГ в нейронах происходит изменение экспрессии ключевых нейронспецифичных генов: начинают синтезиро-

ваться белки, ответственные за аксоно- и синаптогенез, а также систем транспорта нейротрансмиттеров. Синапсины относятся к семейству нейронспецифических фосфопротеинов (SYN1-3), присутствующих в большинстве синапсов, где они участвуют в регуляции синаптогенеза и высвобождения нейротрансмиттеров. Синапсины 1 и 2, основные изоформы SYN во взрослом мозге, демонстрируют частично перекрывающиеся функции, а дефекты обеих изоформ связаны с эпилепсией и аутистическим поведением у мышей [24]. Все нейроны, дифференцирующиеся на МКГ, окрашивались антителами к синаптическому белку (SYN) и демонстрировали выраженный синаптогенез (рис. 4).

Созревание нейронов сопровождается усложнением их морфологии в связи с ростом и арборизацией нейритов, активным синаптогенезом, а также образованием функционально активных ионных каналов [25]. Ионные каналы обеспечивают формирование мембранного потенциала покоя, возбудимость, а также активную или пас-

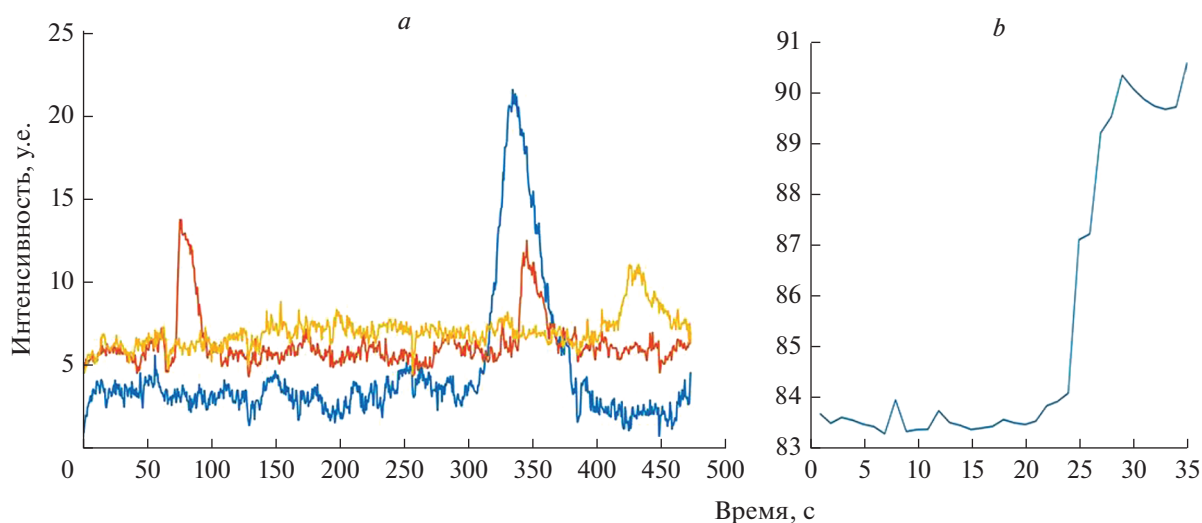


Рис. 5. Изменение концентрации кальция в нейронах, выращенных на МКГ. (а) Спонтанные изменения $[Ca^{2+}]_i$; (b) увеличение внутриклеточной концентрации кальция в нейронах, вызванное KCl-индуцированной деполяризацией.
Fig. 5. Changes in calcium concentration in neurons grown on the MCG matrix. (a) Spontaneous changes in $[Ca^{2+}]_i$, (b) increase in intracellular calcium concentration in neurons caused by KCl-induced depolarization.

сивную деполяризацию нервных клеток. Активность ионных каналов приводит к генерации и распространению потенциала действия в нейронах, необходимых для передачи возбуждающих и тормозных импульсов. Экзоцитоз синаптических везикул с выделением медиатора и его взаимодействие с рецепторами постсинаптической мембраны, осуществление передачи информации с одной нервной клетки на другую также зависят от функционирования ионных каналов. Физические изменения, происходящие в клеточной мембране нейрона, приводят к активации потенциал-зависимых каналов. Примерами таких каналов являются чувствительные к потенциалу на мембране K^- , Na^- , Ca -каналы, которые отвечают за формирование потенциала действия, открываясь при достижении определенного потенциала на мембране [26, 27].

Приобретение постмитотическими нейронами функциональной зрелости зависит от комплекса взаимодействий внутриклеточных сигнальных путей [28]. Было показано, что созреванию нейронов способствует стимуляция их электрической активности [29], активация рецепторов нейротрансмиттеров [30], совместное культивирование этих клеток с астроцитами и нейронами грызунов [31, 32], а также взаимодействие нейронов с ВКМ [33]. В качестве теста на функциональную активность формирующихся нейронов мы использовали кальциевый имиджинг, позволяющий регистрировать их спонтанную физиологическую активность. Данный метод основан на оптическом измерении концентрации кальция с помощью флуоресцентных индикаторов, которые

связываются с ионами кальция. Ca^{2+} визуализация применялась во многих исследованиях для изучения созревания нейронов человека [34, 35]. Этот метод был успешно использован для мониторинга общего состояния возбудимости нейронов, пейсмекерной активности дофаминовых нейронов [36], а также функционирования рецепторов нейротрансмиттеров [37].

Необходимым условием изучения функциональных характеристик нейронов является их иммобилизация на неподвижной подложке, в нашем случае на частичках МКГ. С этой целью МКГ были иммобилизованы на дне конфокальной чашки. Незрелые нейроны засеивали на иммобилизованных МКГ и культивировали в течение 14 сут. В данных экспериментах применяли мембрано-проницаемый Ca^{2+} -индикатор Fluo-4 AM. При попадании в клетку ацетоксиметиловый эфир красителя подвергается гидролизу внутриклеточными эстеразами с образованием полярной карбоксильной группы, препятствующей выходу красителя из клетки. При съемке с частотой 2 Hz регистрировались кальциевые вспышки в отдельных нейронах (рис. 5).

На рис. 5 представлены изменения флуоресценции Ca^{2+} -индикатора Fluo-4 AM в индивидуальных клетках в зависимости от времени. Спонтанная активность проявлялась в виде отдельных Ca^{2+} -спайков, очередей спайков или пейсмекерной активности.

Для активации потенциал-зависимых каналов была использована деполяризация, индуцируемая аппликацией KCl. В нейронах эти каналы

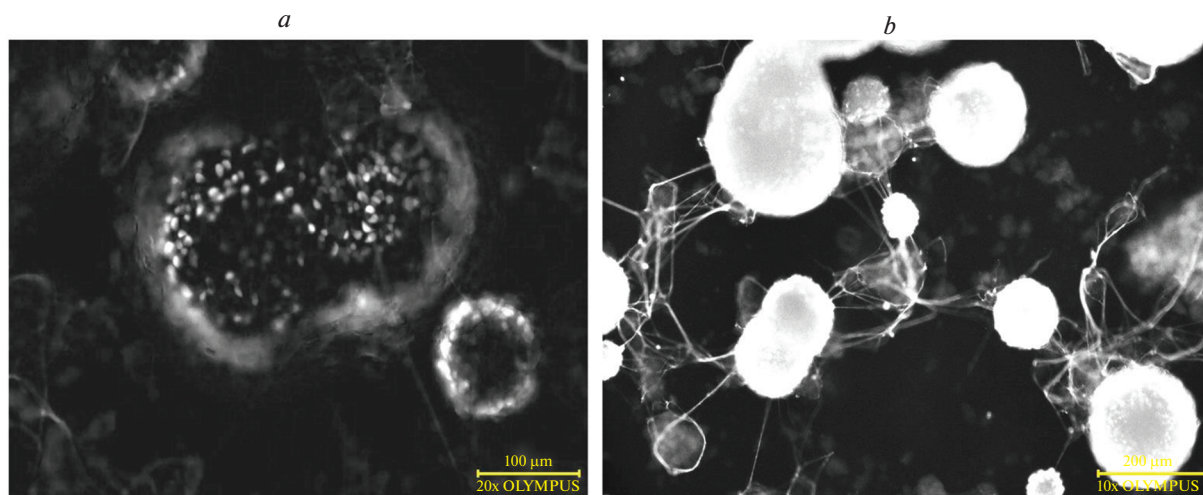


Рис. 6. Репрезентативные фотографии нейронов, дифференцированных на иммобилизованном МКГ. (а) после инкубации с Fluo-4 AM; масштабная шкала 100 мкм; (b) после добавления раствора KCl (50 mM) в нейронах и аксонах происходит вспышка флуоресценции. Масштабная шкала 200 мкм.

Fig. 6. Representative photographs of neurons differentiated on immobilized MCG. (a) after incubation with Fluo-4 AM; scale bar 100 μm; (b) after the addition of a KCl solution (50 mM), a fluorescence flash occurs in neurons and axons. Scale bar 200 μm.

располагаются преимущественно в постсинаптических терминалях и влияют на передачу возбуждающего сигнала, участвуя в активации кальций-зависимых сигнальных каскадов. Эти каскады, в свою очередь, передают сигнал в ядро, влияя тем самым, на транскрипцию генов, вовлеченных в регуляцию развития нейронов, процессов обучения и памяти [38]. Всплеск флуоресценции, вызванный входом кальция в цитозоль, продемонстрирован на рис. 5b.

Согласно фотографии на рис 6a, часть нейронов интенсивно окрашена Fluo-4 AM, после добавления KCl интенсивность флуоресценции в телах нейронов резко увеличилась и также наблюдалась в аксонах (рис. 6b).

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали возможность получения зрелых функционально активных нейронов, дифференцированных из ИПСК человека, на трехмерном матриксе в виде МКГ на основе РС rS1/9. Дифференцированные на МКГ нейроны являются гетерогенной популяцией, обогащенной DA нейронами с развитыми синапсами, проявляют спонтанную активность и экспрессируют потенциалчувствительные каналы, что свидетельствует в пользу функциональной зрелости полученных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ:

Данная работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2023-324).

ЗАЯВЛЕНИЕ ЭКСПЕРТНОГО СОВЕТА УЧРЕЖДЕНИЯ

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации “Этические принципы исследований в области медицины с участием человека”. Данная работа была одобрена Комитетом по этике Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Протокол №3 от 19 февраля 2018 года).

ЗАЯВЛЕНИЕ ОБ ИНФОРМИРОВАННОМ СОГЛАСИИ

Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ

Не применимо.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование проводилось с использованием оборудования Центра “Клеточные и генетические технологии” Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ:

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Финансирующая сторона не участвовала в разработке исследования, сборе, анализе или интерпретации данных, в написании рукописи или в решении публиковать результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nicolas J., Magli S., Rabbachin L., Sampaolesi S., Nicotra F., Russo L.* 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. *Biomacromolecules*, 2020, 21(6), 1968–1994. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00045>
2. *Barnes J.M., Przybyla L., Weaver V.M.* Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J. Cell Sci.*, 2017, 130(1), 71–82. <https://doi.org/10.1242/jcs.191742>
3. *Caliari S.R., Burdick J.A.* A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods*, 2016, 13(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
4. *Magaz N., Faroni A., Gough A., Reid J.E., A.J., Li X., Blaker J.J.* Bioactive Silk-Based Nerve Guidance Conduits for Augmenting Peripheral Nerve Repair. *Adv. Healthc. Mater.*, 2018, 766(7), 767. e1800308. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800308>
5. *Johari N., Moroni L., Samadikuchaksaraei A.* Tuning the conformation and mechanical properties of silk fibroin hydrogels. *Eur. Polym. J.*, 2020, 134, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109842>
6. *Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., Klinov D.V., Sidoruk K.V., Esipova N.G., Neretina T.V., Orchanskyi I.A., Makeev V.Yu., Tumanyan V.G., Shayjtan K.V., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P.* A novel model system for design of biomaterials, based on recombinant analogs of spider silk protein. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2009, 4(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.013>
7. *Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P., Agapov I.I.* Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. *Biomaterials*, 2012, 33(15), 3887–3898. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22364702>
8. *Лапшин Р.Д., Логинов П.А., Белоусова И.И., Жемарина Н.В., Проданец Н.Н., Соловьева Т.И., Щелчкова Н.В., Снопина Л.Б., Мухина И.В., Давыдова Л.И., Богуш В.Г.* Оценка безопасности применения рекомбинантных аналогов спидроинов как биодеградируемых матриксов для регенеративной медицины. *Соврем. Технол. Мед.*, 2017, 9(1), 37–42. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.04>
9. *An B., Tang-Schomer M., Huang W., He J., Jones J., Lewis R.V., Kaplan D.L.* Physical and biological regulation of neuron regenerative growth and network formation on recombinant dragline silks. *Biomaterials*, 2015, 48, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.044>
10. *Baklaushev V.P., Bogush V.G., Kalsin V.A., Sovetnikov N.N., Samoilova E.M., Revkova V.A., Sidoruk K.V., Konoplyannikov M.A., Timashev P.S., Kotova S.L., Yushkov K.B., Averyanov A.V., Troitskiy A.V., Ahlfors J.E.* Tissue Engineered Neural Constructs Composed of Neural Precursor Cells, Recombinant Spidroin and PRP for Neural Tissue Regeneration. *Sci. Rep.*, 2019, 28, 9(1), 3161. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39341-9>
11. *Mikhailova M.M., Sidoruk K.V., Davydova L.I., Yastremsky E.V., Chvalun S.N., Debabov V.G., Bogush V.G., Panteleyev A.A.* Nonwoven spidroin materials as scaffolds for ex vivo cultivation of aortic fragments and dorsal root ganglia. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2022, 33(13), 1685–1703. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2073426>
12. *Kim Y.S., Jung H.M., Yoon B.E.* Exploring glia to better understand Alzheimer's disease. *Anim. Cells Syst. (Seoul)*, 2018, 22(4), 213–218. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1508498>
13. *Lee S.Y., George J.H., Nagel D.A., Ye H., Kueberuwa G., Seymour L.W.* Optogenetic control of iPSC cell-derived neurons in 2D and 3D culture systems using channelrhodopsin-2 expression driven by the synapsin-1 and calcium-calmodulin kinase II promoters. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2019, 3(3), 369–384. <https://doi.org/10.1002/term.2786>
14. *Antill-O'Brien N., Bourke J., O'Connell C.D.* Layer-by-layer: the case for 3D bioprinting neurons to create patient-specific epilepsy models. *Materials (Basel)*, 2019, 12(19). <https://doi.org/10.3390/ma12193218>
15. *Novosadova E.V., Dolotov O.V., Novosadova L.V., Davydova L.I., Sidoruk K.V., Arsenyeva E.L., Shimchenko D.M., Debabov V.G., Bogush V.G., Tarantul V.Z.* Composite Coatings Based on Recombinant Spidroins and Peptides with Motifs of the Extracellular Matrix Proteins Enhance Neuronal Differentiation of Neural Precursor Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(5), 4871. <https://doi.org/10.3390/ijms24054871>
16. *Destrade M., Gilchrist M.D., Murphy J.G., Rashid B., Saccomandi G.* Extreme softness of brain matter in simple shear. *Int. J. Non Linear Mech.*, 2015, 75, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijnonlinmec.2015.02.014>
17. *Leal-Egana A., Scheibel T.* Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2010, 55, 155–167. <https://doi.org/10.1042/BA20090229>
18. *Moisenovich M., Silachev D., Moysenovich A., Arkhipova A., Shaitan K., Bogush V., Debabov V., Latanov A., Pevzner I., Zorova L., Babenkov V., Plotnikov E., Zorov D.* Effects of recombinant spidroin rS1/9 on brain neural progenitors after photothrombosis-induced ischemia. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00823>
19. *Boni R., Ali A., Shavandi A., Clarkson A.N.* Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *J. Biomed. Sci.*, 2018, 25, 90. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0491-8>
20. *Revkova V., Sidoruk K., Kalsin V., Melnikov P., Konoplyannikov M., Kotova S., Frolova A., Rodionov S., Smorchkov M., Kovalev A., Troitskiy A., Timashev P., Chekhonin V., Bogush V., Baklaushev V.* Spidroin silk fibers with bioactive motifs of extracellular proteins for neu-

- ral tissue engineering. *ACS Omega*, 2021, 6, 15264–15273. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01576>
21. *Nosenko M., Moysenovich A., Zvartsev R., Arkhipova A., Zhdanova A., Agapov I., Vasilieva T., Bogush V., Debabov V., Nedospasov S., Moisenovich M., Drutskaya M.* Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis. *Front. Immunol.*, 2018, 9, 2851. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02851>. eCollection 2018
 22. *Новосадова Е.В., Некрасов Е.Д., Честков И.В., Сурдина А.В., Васина Е.М., Богомазова А.Н., Мануилова Е.С., Арсенева Е.Л., Симонова В.В., Коновалова Е.В., Федотова Е.Ю., Абрамчычева Н.Ю., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А., Тарантул В.З., Киселев С.Л., Иллариошкин С.Н.* Платформа для изучения молекулярных и клеточных механизмов болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. *Соврем. Технол. Мед.*, 2016, 8(4), 157–166. <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.20>
 23. *Chang C.Y., Ting H.C., Liu C.A., Su H.L., Chiou T.W., Harn H.J., Lin S.Z., Ho T.J.* Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Specific Neural Lineages. *Cell Transplant.*, 2021, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep09232>
 24. *Corradi A., Zanardi A., Giacomini C., Onofri F., Valtorta F., Zoli M., Benfenati F.* Synapsin-I- and synapsin-II-null mice display an increased age-dependent cognitive impairment. *J. Cell Sci.*, 2008, 121(18), 3042–3051. <https://doi.org/10.1242/jcs.035063>
 25. *Boulanger-Weill J., Candat V., Jouary A., Romano S.A., Pérez-Schuster V., Sumbre G.* Functional Interactions between Newborn and Mature Neurons Leading to Integration into Established Neuronal Circuits. *Curr. Biol.*, 2017, 27(12), 1707–1720. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.029>
 26. *Weiger T.M., Hermann A., Levitan I.B.* Modulation of calcium-activated potassium channels. *J. Comp. Physiol.*, 2002, 188, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00359-002-0281-2>
 27. *Lepski G., Maciaczyk J., Jannes C.E., Maciaczyk D., Bischofberger J., Nikkhah G.* Delayed functional maturation of human neuronal progenitor cells in vitro. *Mol. Cell Neurosci.*, 2011, 47(1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.02.011>
 28. *Papp F., Hajdu P., Tajti G., Toth A., Nagy E., Fazekas Z., Kovacs S., Vámosi G., Varga Z., Panyi G.* Periodic Membrane Potential and Ca²⁺ Oscillations in T Cells Forming an Immune Synapse. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(5), 1568. <https://doi.org/10.3390/ijms21051568>
 29. *Latchoumane C.V., Jackson L., Sendi M.S.E., Tehrani K.F., Mortensen L.J., Stice S.L., Ghovanloo M., Karumbaiah L.* Chronic Electrical Stimulation Promotes the Excitability and Plasticity of ESC-derived Neurons following Glutamate-induced Inhibition In vitro. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 10957. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29069-3>
 30. *Rushton D.J., Mattis V.B., Svendsen C.N., Allen N.D., Kemp P.J.* Stimulation of GABA-induced Ca²⁺ influx enhances maturation of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *PLoS One*, 2013, 8(11), e81031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081031>
 31. *Lischka F.W., Efthymiou A., Zhou Q., Nieves M.D., McCormack N.M., Wilkerson M.D., Sukumar G., Dalgard C.L., Doughty M.L.* Neonatal mouse cortical but not isogenic human astrocyte feeder layers enhance the functional maturation of induced pluripotent stem cell-derived neurons in culture. *Glia*, 2018, 66(4), 725–748. <https://doi.org/10.1002/glia.23278>
 32. *Verpelli C., Carlessi L., Bechi G., Fusar Poli E., Orellana D., Heise C., Franceschetti S., Mantegazza R., Mantegazza M., Delia D., Sala C.* Comparative neuronal differentiation of self-renewing neural progenitor cell lines obtained from human induced pluripotent stem cells. *Front. Cell Neurosci.*, 2013, 7, 175. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00175>
 33. *Jain D., Mattiassi S., Goh E.L., Yim E.K.F.* Extracellular matrix and biomimetic engineering microenvironment for neuronal differentiation. *Neural Regen. Res.*, 2020, 15(4), 573–585. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266907>
 34. *Shi Y., Kirwan P., Livesey F.J.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.*, 2012, 7(10), 1836–1846. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.116>
 35. *Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurler M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P., Knoblich J.A.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013, 501(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
 36. *Hartfield E.M., Yamasaki-Mann M., Ribeiro Fernandes H.J., Vowles J., James W.S., Cowley S.A., Wade-Martins R.* Physiological characterisation of human iPSC-derived dopaminergic neurons. *PLoS One*, 2014, 9(2), e87388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087388>
 37. *Антонов С.А., Новосадова Е.В., Кобылянский А.Г., Иллариошкин С.Н., Тарантул В.З., Гривенников И.А.* Экспрессия и функциональные свойства NMDA- и ГАВАА-рецепторов при дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в вентральные мезенцефалические нейроны. *Биохимия*, 2019, 84(3), 436–447. <https://doi.org/10.1134/S0320972519030138>
 38. *Ларюшкин Д.П., Майоров С.А., Гайдин С.Г., Зинченко В.П., Косенков А.М.* Сравнение эффективности подавления KCl-индуцированных кальциевых ответов гиппокампальных нейронов различными блокаторами потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов L-типа. *Биологические мембраны*, 2021, 38(4), 284–291. <https://doi.org/10.31857/S0233475521040071>

Production of Mature Functionally Active Human Neurons on Microgel Particles Based on Recombinant Spidroin rS1/9

E. V. Novosadova^{a, #}, D. M. Shimchenko^a, L. V. Novosadova^a, G. A. Nosov^b, L. I. Davydova^a,
E. D. Barsukov^a, A. A. Ramonova^c, V. G. Debabov^a, V. Z. Tarantul^a, and V. G. Bogush^{a, d}

^a*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia*

^b*Federal Center for Brain and Neurotechnologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 117513 Russia*

^c*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^d*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnologies, Moscow, 127550 Russia*

[#]*e-mail: novek-img@mail.ru*

Abstract—It is known that after transplantation into the body of cellular material without a carrier matrix, most cells die in a short time due to the lack of conditions for their differentiation and proliferation. Therefore, for the long-term and full-fledged functioning of injected cells, the presence of a biodegradable and biocompatible three-dimensional matrix in these systems is necessary. Previously, when using matrices from recombinant spidroins in cell cultures and animal organisms, we showed their non-toxicity, high biocompatibility, ability to maintain cell growth, and slow bioresorption in animals. In this work, microgel particles based on recombinant spidroin rS1/9 were used as a matrix for neuronal differentiation of induced human pluripotent stem cells. Microgel-differentiated neurons are a heterogeneous population enriched with dopaminergic neurons with developed synapses exhibiting spontaneous activity and expressing voltage-sensitive channels, which indicates in favor of their functional maturity.

Keywords: neurons, recombinant spidroins, matrix, induced pluripotent stem cells, differentiation