МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Мойсенович Анастасия Михайловна

СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ШЕЛКА ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: **Шайтан Константин Вольдемарович**
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Карягина-Жулина Анна Станиславовна,**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Манухов Илья Владимирович,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики, заместитель заведующего кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)»

Горбачёва Любовь Руфэльевна,
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Защита диссертации состоится «22» июня 2022 года в 16.30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: https://istina.msu.ru/dissertations/456859706/

Автореферат разослан «__» мая 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук Шаповалова И.В.

Актуальность темы исследования

Одним из бурно развивающихся направлений в области биоинженерии является создание биосовместимых конструкций, нацеленных на регенерацию тканей центральной нервной системы. Это относится и к одной из наиболее серьезных форм повреждений мозга – инсульту – третьей по значимости причине смертности от болезней во всем мире. В зависимости от зоны, затронутой ишемией, она приводит к нарушению сенсомоторных, речевых, чувствительных, координационных и когнитивных функций, включающих способность к обучению, память, исполнительный контроль, мышление и другие. Также в результате инсульта головного мозга часто наступает кратковременная или стойкая инвалидность [Dimyan, Cohen, 2011].

Возможный выбор материалов для восстановления тканей центральной нервной системы (ЦНС) сильно ограничен особенностями ее патофизиологии. Потенциальная конструкция должна представлять собой инъекционную форму, чтобы минимизировать повреждение окружающей здоровой ткани мозга и максимально повторять геометрию дефекта неправильной формы. Кроме того, биоматериал должен быть нейросовместимым, то есть его физико-химические свойства должны обеспечивать поддержание роста нейритов и вызывать минимальную нейровоспалительную реакцию. Скорость биодеградации материала должна соответствовать периоду, необходимому для адаптации клеток и их миграции в очаг инсульта.

Несмотря на увеличение случаев возникновения ишемии головного мозга, внедрение современных фармакологических методов терапии и развитие специализированной помощи способствуют снижению доли смертности среди таких пациентов. Однако, с увеличением числа выживших растет и нагрузка на систему здравоохранения, поскольку лица, перенесшие инсульт, нуждаются в долгосрочных программах реабилитации. К тому же, в настоящее время не существует методов лечения, которые полностью восстанавливают утраченные функции мозга. Таким образом, разработка новых терапевтических подходов к регенерации нервной ткани, в том числе с использованием материалов, полученных биоинженерными методами, является актуальной темой для исследований.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время имеется ряд работ, посвященных созданию, изучению и использованию биосовместимых материалов на основе фиброина шелка и структурных белков шелка паутины для тканевой инженерии. С применением различных методов биоинженерии на основе этих материалов могут создаваться различные двумерные и трёхмерные конструкции с широким диапазоном физико-химических, структурных и биологических свойств, которые могут быть оптимизированы для регенерации различных типов тканей, включая ткани периферической нервной системы, кость и покровные ткани [Weizhen Sun et al., 2021]. Существенно меньше работ относится к разработке материалов для регенерации головного мозга, которая предъявляет к таким материалам особые требования. В данной работе исследованы новые возможности применения разработанных материалов на основе рекомбинантного аналога rS1/9 структурного белка паутины *Nephila clavipes* – спидроина 1 и фиброина шелка *Bombyx mori* для тканевой инженерии и регенерации ишемического повреждения коры головного мозга. Рекомбинантный спидроин rS1/9 выделяли из дрожжевого штамма-продуцента *Saccharomices cerevisiae*; фиброин шелка получали из коконов *Bombyx mori* и очищали от серицина. На первом этапе работы были охарактеризованы физико-химические свойства, стабильность и способность к биодеградации материалов, разработанных для решения целевой задачи. После чего *in vitro* был проведен сравнительный анализ способности материалов поддерживать развитие сети нейронов коры больших полушарий мозга грызунов. В работе также было оценено влияние продуктов биодеградации спидроина на рост нейритов и пролиферацию клеток гиппокампа. После первоначальных испытаний, в ходе которых было установлено, что структура и физико-химические свойства спидроина делают его более нейросовместимым по сравнению с фиброином, была определена активность биоматериала, введенного в очаг инсульта, в отношении нейронной ниши стволовых клеток гиппокампа *in vivo*.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось изучение физико-химических свойств материала скаффолдов из структурных белков шелка, а также оценка возможности их применения для регенерации фокального повреждения коры больших полушарий мозга млекопитающих.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать структуру и физико-химические свойства полученных биоинженерными методами материалов на основе структурных белков шелка;

2. Изучить нейросовместимость полученных биоинженерных материалов при культивировании на них нейронов коры больших полушарий мозга грызунов. На основании совокупности данных о структуре, физико-химических и биологических свойствах субстрата выбрать наиболее перспективную биоинженерную конструкцию для проведения дальнейших испытаний. Исследовать активность продуктов биодеградации материала созданных биоинженерных конструкций в отношении клеток гиппокампа;

3. Изучить влияние введения инъекционной формы скаффолдов на регенерацию нервной ткани в модели фокального ишемического повреждения коры больших полушарий головного мозга мыши, включая изменения в функционировании ниши стволовых клеток гиппокампа.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования были биоинженерные конструкции на основе структурных белков шелка, а именно двумерные пленки на основе фиброина шелка *Bombyx mori* и пленки на основе рекомбинантного аналога rS1/9 структурного белка паутины *Nephila clavipes* – спидроина 1, а также инъекционная форма rS1/9, представляющая собой трехмерные скаффлоды.

Предметом исследования стало изучение физико-химических свойств полученных конструкций, оценка кинетики биодеградации, а также исследования нейросовместимости и особенностей взаимодействия материалов с иммортализованными и первичными нейрональными культурами. Также, было рассмотрено влияние трехмерных скаффолдов из rS1/9 на нейрогенную нишу зубчатой извилины гиппокампа в модели ишемического инсульта префронтальной коры головного мозга мыши.

Научная новизна и практическая значимость

1. Изучены структура и физико-химические свойства материала двумерных скаффолдов на основе структурных белков шелка и микрочастиц на основе рекомбинантного аналога структурного белка шелка паутины *Nephila clavipes*, которые

могут быть использованы для создания изделий, предназначенных для восстановления нервной ткани;

2. В результате оценки биологических свойств исследуемых двумерных скаффолдов и микрочастиц в модельных системах *in vitro* получены доказательства нейрогенной активности конструкций из структурных беков шелка и продуктов их биодеградации, которые обеспечивают рост нейритов и пролиферацию прогениторных клеток.

3. В модели фокального ишемического инсульта префронтальной коры головного мозга мыши показано, что инъекция микрочастиц в область повреждения оказывает активирующее и модулирующее воздействие на нейрогенную нишу зубчатой извилины гиппокампа.

Методология и методы исследования

В работе были исследованы физико-химические и нейрогенные свойства материалов биоинженерных двумерных скаффолдов на основе белков шелка фиброина и спидроина, а также микрочастицы на основе спидроина. Эти скаффолды были охарактеризованы и изучены как *in vitro*, так и *in vivo*.

Анализ физико-химических свойств проводили с использованием методов сканирующей электронной микроскопии, атомной силовой микроскопии, гравиметрических методов анализа, а также протокола измерения контактного угла смачивания.

В экспериментах *in vitro* работу проводили на иммортализованных и первичных культурах клеток головного мозга мыши. Для изучения влияния материалов на основе структурных белков шелка проводили подсчет количества прикрепившихся клеток, длины их нейритов и анализ инкорпорации BrdU с использованием метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Изучение свойств матриксов *in vivo* проводили в модели фокального ишемического повреждения мозга в области префронтальный коры на репортерной линии мышей, в которых стволовые и прогениторные клетки характеризуются экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP), находящегося под промотором нестина (Nestin-GFP mice), а также крысах линии Wistar. Влияние частиц на активацию нейрогенной ниши в гиппокампе изучали с применением прямой и непрямой иммунофлуоресценции, вестерн блоттинга и проточной цитометрии.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанные биоинженерные конструкции – двумерные пленки на основе фиброина и спидроина, а также микроскаффолды на основе спидроина, обладают уникальной структурой, высокой прочностью и оптимальным соотношением стабильности и биодеградации в нейтральных и протеолитических условиях.

2. В моделях *in vitro* подтверждено, что исследуемые материалы нейросовместимы и способны поддерживать адгезию нейрональных клеток, рост и формирование сети нейритов. При этом установлено, что физико-химические свойства спидроина оказывают более выраженный эффект по сравнению с фиброином. Также показана нейрогенная активность продуктов гидролиза спидроина, выражающаяся в активации роста нейритов нейронов гиппокампа и пролиферации нейрональных стволовых клеток.

3. Введение инъекционной формы скаффолдов на основе спидроина в очаг ишемического повреждения префронтальной коры полушарий мозга мыши приводит к активации пролиферации клеток-предшественников, изменению клеточного состава и повышению митохондриального потенциала клеток зубчатой извилины гиппокампа.

Степень достоверности

Достоверность результатов, представленных в работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается результатами статистической обработки полученных данных.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора в получении результатов состояло в подготовке обзора данных, опубликованных в современной научной литературе, и их детального анализа, самостоятельном планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации результатов, представлении и апробации результатов исследований на конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе, написании текста диссертации. Основные результаты работы получены самим автором.

Апробация результатов

Материалы и результаты диссертации были представлены на 4 российских и 2 международных конференциях: StemCellBio 2016, Санкт-Петербург, Россия, 2016 г., 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back", Иерусалим, Израиль, 2017 г.; III Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 2017 г.; 43rd FEBS Congress "Biochemistry Forever", 2018, Прага, Чехия, 2018 г.; V Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике МОБИ-ХимФарма-2018, Крым, Новый Свет, 2018 г., XV Всероссийский Фестиваль науки NAUKA 0+, Москва, 2020 г.

Апробация работы проведена на заседании кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Материалы и результаты диссертации были опубликованы в 10 статьях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, в том числе 6 из них в изданиях Q1. Всего за время выполнения квалификационной работы автором опубликовано 20 статей, из которых 10 в журналах Q1.

Также результаты работы отражены в 6 патентах.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 103 страницах, содержит 1 таблицу, 12 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и обозначений, благодарности, список литературы, включающий 175 источников, список иллюстративного материала и список работ, опубликованных по теме диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Изучение структуры, физико-химических свойств и стабильности материалов на основе фиброина и спидроина и микрочастиц на основе спидроина

Первоначальное тестирование материала, который планируется использовать для регенерации тканей мозга, должно начинаться с характеристики его структуры и физико-химических свойств, поскольку нервные клетки крайне чувствительны не только к хемотаксическим сигналам, но и к топографическим и механическим особенностям их субстрата. Успешная адгезия клеток к поверхности в немалой степени зависит от их заряда. Спидроин, использованный в рамках данной работы, при физиологическом уровне pH характеризуется положительным зарядом, в то время как фиброин – отрицательным. Известно, что отрицательно заряженные нейроны активнее прикрепляются к положительно заряженным поверхностям, в то же время *in vivo* на поверхности материалов с отрицательным зарядом протекают процессы сорбции молекул внеклеточного матрикса (ВКМ) из сыворотки крови, например фибронектина и ламинина, что нивелирует действие собственного заряда скаффолда. К тому же, при дизайне материала для реконструкции центральной нервной системы особое внимание уделяют формированию пористой, сложноорганизованной структуры, которая в перспективе будет обеспечивать лучшую адгезию клеток, быстрое удлинение конуса роста нейритов и интенсивный обмен нутриентов между материалом конструкции и внешней средой. Ключевым свойством скаффолда, определяющим такие важные элементы структурного и функционального восстановления нервной ткани, как протрузия аксонов и дендритов, пролиферация, судьба и миграция нейрональных стволовых и глиальных клеток, является ее механическая жесткость. Значительный вклад в регуляцию адгезии и нейритогенеза клеток вносят гидрофильность и способность материала к набуханию. Скорость биодеградации каркаса также является одним из основных параметров, определяющих возможность его использования для регенерации тканей центральной нервной системы (ЦНС). С одной стороны, биодеградируемые скаффолды предоставляют временную структурную поддержку для миграции клеток, вовлеченных в процессы регенерации, и служат структурной основой для синтеза собственного ВКМ, с другой стороны, деградация имплантата позволяет избежать вторичных повреждений после его удаления, так как он утилизируется непосредственно в организме. При этом критически важно, чтобы время

биодеградации совпадало со скоростью формирования тканей организма, в противном случае слишком быстрое или медленное разрушение материала каркаса будет препятствовать успешному исходу процесса регенерации. Исходя из вышесказанного, перед проведением биологических испытаний *in vitro*, в первой части работы были исследованы ключевые свойства материалов на основе структурных белков шелка, включая структурные особенности, механическую жесткость, набухание, гидрофильность и скорость биодеградации.

1.1. Характеристика структуры материалов на основе фиброина и спидроина и микрочастиц на основе спидроина

Тонкие пленки на основе фиброина и спидроина были получены методом кастинга на покровном стекле. Структура поверхности пленок исследована с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и представлена на рисунке 1 (А – Г). Спидроиновые пленки характеризовались большей толщиной по сравнению с фиброиновыми, что можно объяснить наличием пористой структурой среза. Поры на спидроиновых образцах образовывалась спонтанно без дополнительных пластификаторов и порообразователей. Некоторые нанопоры открывались на поверхности пленки. В пленках, полученных на основе фиброина, не было обнаружено поверхностных пор.

Спидроиновые микрочастицы были получены в результате физического дробления гидрогеля и представляли собой частицы со сложной поверхностью, включающей нано- и микроструктуры (рисунок 1 Д – Е).

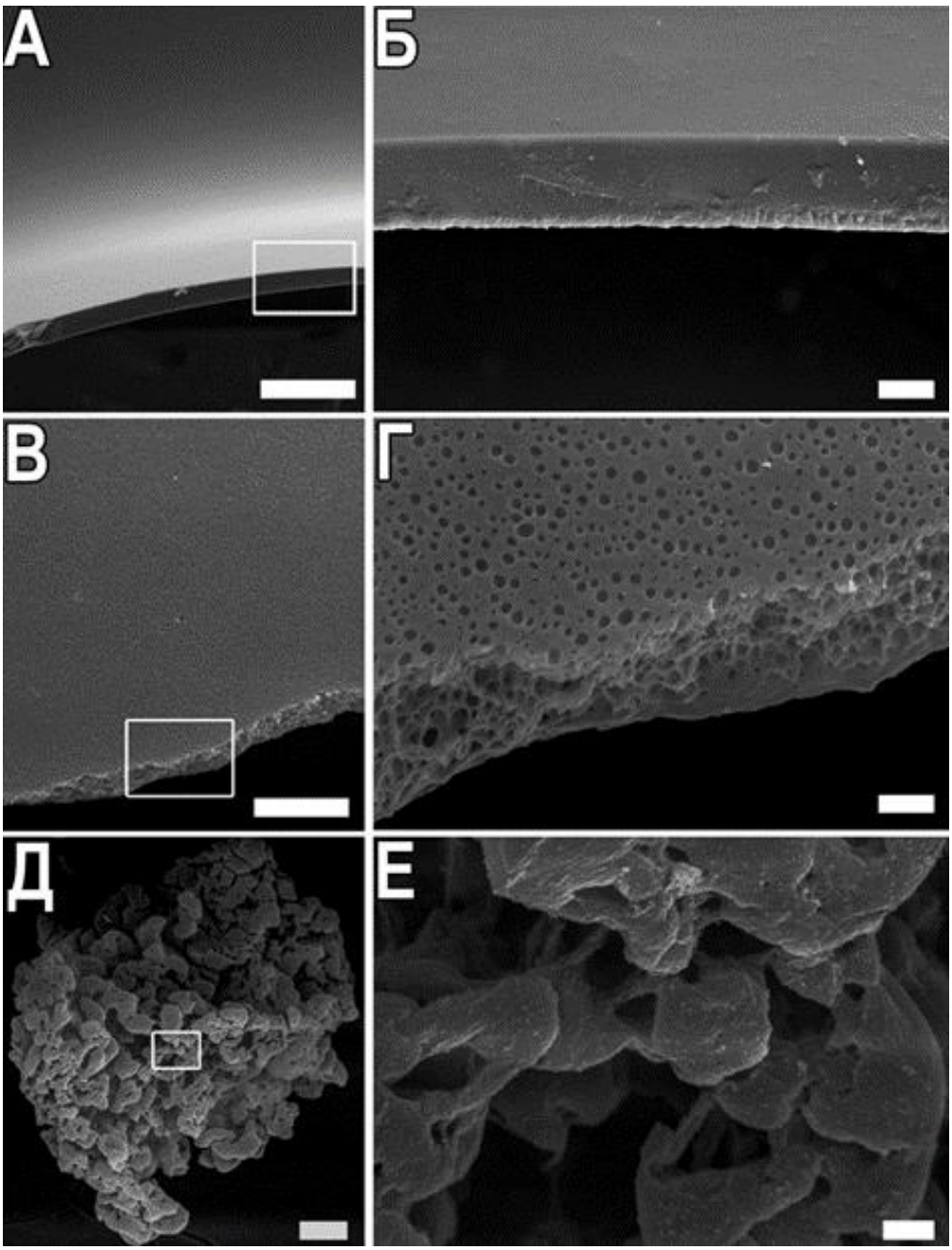

Рисунок 1. Структура пленок на основе фиброина и спидроина и микрочастиц на основе спидроина. А, Б – Изображения фиброиновых пленок, полученные методом СЭМ. В, Г – Изображения спидроиновых пленок, полученные методом СЭМ, Д, Е – Изображения спидроиновых частиц, полученные методом СЭМ. А, В, Д – Линейка 50 мкм. Белые квадраты показывают увеличенные фрагменты, представленные на фрагментах Б, Г, Е – Линейка 3 мкм

Таким образом, поверхность материала на основе рекомбинантного спидроина отличалась более сложной структурой по сравнению с фиброином, что является более предпочтительным свойством при реконструкции нервной ткани.

1.2. Характеристика механических и физико-химических свойств поверхности материалов на основе фиброина и спидроина

Жесткость полученных пленок была исследована с применением метода наноиндентирования атомно-силовой микроскопии (АСМ). Преимуществом такого метода является возможность получения информации о свойствах поверхности субстрата в масштабе 10–100 нм, который сопоставим с размером фокальных контактов клетки. Примеры наномеханических карт АСМ и значения модуля Юнга показаны на рисунке 2 и в таблице 1, соответственно.

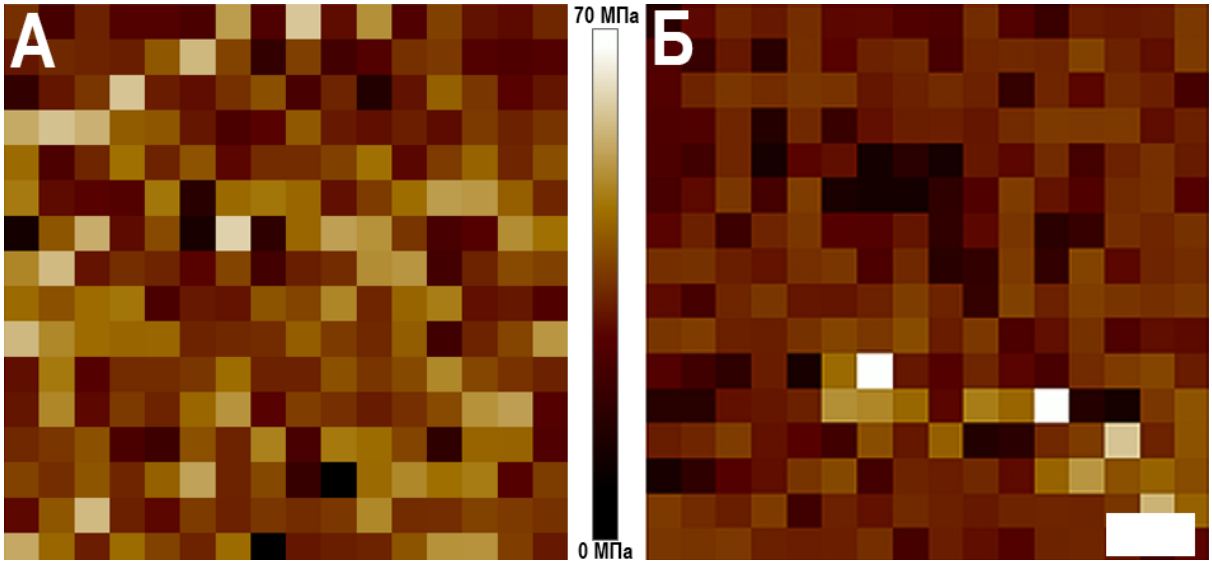

Рисунок 2. Наномеханические карты (распределения модуля Юнга) на площади 10×10 мкм, отображенные с использованием режима атомно-силовой микроскопии Force Volume. А – Репрезентативная карта пленки из фиброина. Б – Репрезентативная карта пленок из спидроина. Цветовая шкала модуля Юнга одинакова для обеих карт, для лучшего представления разницы. Линейка – 1 мкм

Коэффициент набухания материала измеряли стандартным гравиметрическим методом, результаты эксперимента приведены в таблице 1. Анализ полученных данных свидетельствует о лучшей способности спидроина поглощать воду по сравнению с фиброином.

При этом, согласно результатам измерения контактного угла смачивания материалов, спидроин характеризуется меньшей гидрофильностью в сравнении с фиброином. Такое сочетание свойств материалов можно объяснить как их различиями в структуре, так и разницей в модулях Юнга.

Таблица 1. Физико-химические свойства пленок на основе фиброина и спидроина (*M*±*SD*)

Материал пленки	Модуль Юнга (МПа)	Коэффициент набухания	Контактный угол смачивания, ^{0}
Фиброин	30±1	5±1,9	56,2±3,0
rS1/9	20±1	9±1,3	72,9±2,7

Таким образом, субстрат на основе спидроина характеризовался большим коэффициентом набухания и меньшей жесткость и гидрофильностью по сравнению с фиброином.

1.3. Характеристика стабильности материалов на основе фиброина и спидроина и микрочастиц на основе спидроина в нейтральных и протеолитических условиях

Скорость биодеградации материала является важным критерием успеха при его использовании для восстановления ЦНС. Белки шелка чувствительны к протеолитическим ферментам, таким как протеаза XIV, коллагеназа, трипсин, тромбин и α-химотрипсин. Протеаза XIV проявляет высокую активность по отношению к структурам бета-складок, в то время как трипсин может разрушать менее кристаллические области белков, но не воздействует на бета-кристаллические структуры.

Наибольшую активность в отношении материалов структурных белков шелка проявляла протеаза XIV. При ее наличии изначальная масса микроскаффолдов на основе спидроина уменьшилась вдвое уже на 7-й день эксперимента, а пленки на основе спидроина и фиброина потеряли 50% изначальной массы через две недели. Обработка трипсином приводила к двукратному уменьшению массы микроскаффолдов через 10 дней после начала обработки, а пленок – через 21 день. При этом масса спидроина уменьшалась медленнее, чем фиброина, что может быть результатом наличия более кристалличной структуры по сравнению с фиброином. Все образцы были стабильны в нейтральных условиях в течение 3 недель, при этом потеря массы микроскаффолдов была больше, чем у пленок, что, как и большую активность ферментов, можно объяснить объемной эрозией образцов.

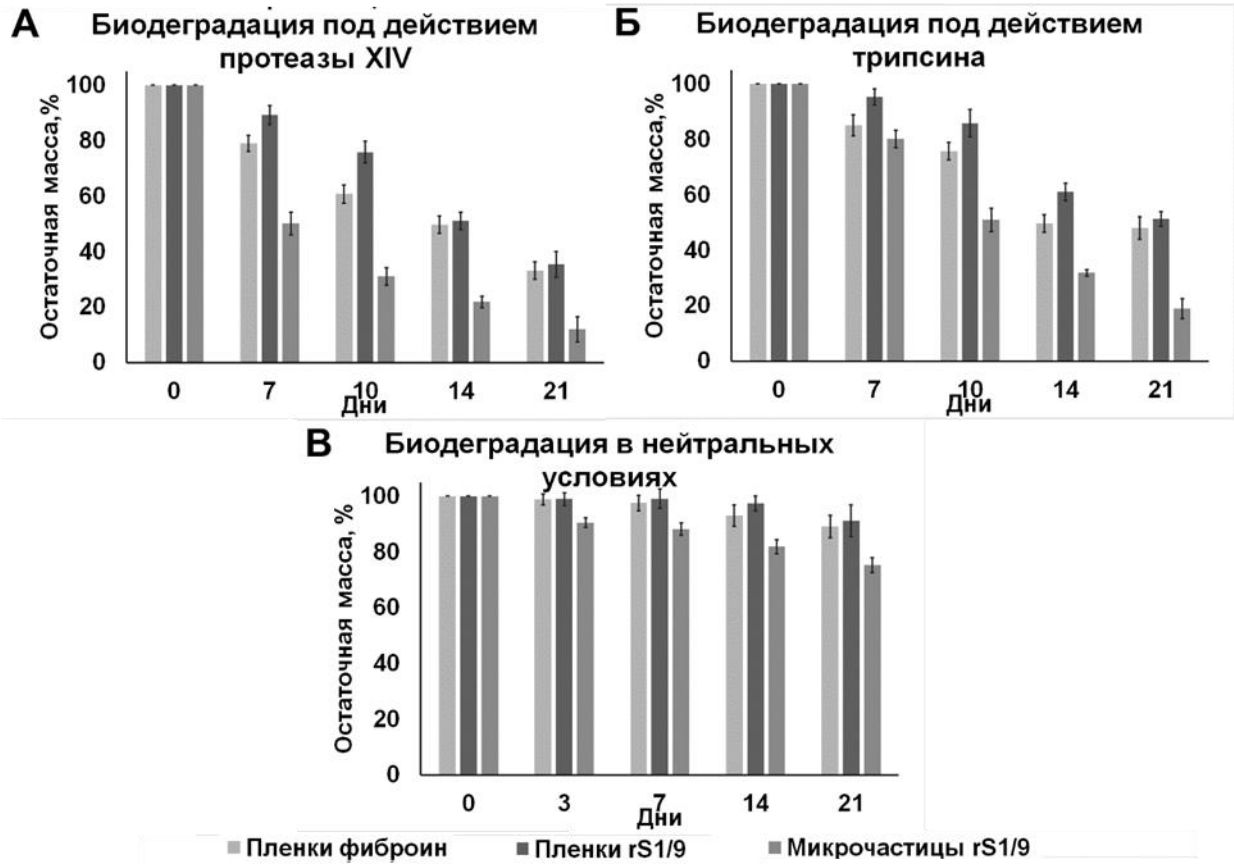

Рисунок 3. Потеря веса в результате деградации микрочастиц и пленок под действием протеазы 14 (А), трипсина (Б), и нейтральных (В) условиях pH=7,2

2. Влияние материалов на основе структурных белков шелка и продуктов их гидролиза на рост клеток головного мозга

Ключевым параметром при выборе материала для регенерации тканей центральной нервной системы является его способность поддерживать рост и развитие нейронной сети. Ранее нами была показано что фиброин-желатиновый искусственный ВКМ может не только поддерживать адгезию и жизнеспособность нейронов коры мозга, но также выполнять нейропротекторную роль в условиях кислородно-глюкозной депривации [Moisenovich и др., 2019]. Кроме того, установлено, что комбинированная матрица на основе рекомбинантных аналогов спидроина 1 (rS1/9) и спидроина 2 (rS2/12), а также поликапролактона и богатой тромбоцитами плазмы способна поддерживать рост и дифференцировку нейронов и репрограммированных клеток-предшественников нейронов человека [Baklaushev и др., 2019]. Помимо нейросовместимости самих материалов продукты их биодеградации не должны оказывать отрицательного воздействия на клетки нервной системы.

Таким образом, вторая часть работы посвящена тестированию нейросовместимости субстратов *in vitro* и выбору наиболее перспективного материала для проведения дальнейших экспериментов.

2.1. Влияние пленок из фиброина и спидроина на развитие нейрональной сети нейронов коры больших полушарий мозга мыши и на морфологию их нейритов при культивировании *in vitro*

Исследование способности пленок на основе белков шелка поддерживать адгезию нейронов, а также рост нейритов и формирование нейронной сети проводили методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания β3-тубулина, NCAM и Hoechst 33342. На седьмые сутки культивирования кортикальных нейронов было показано, что количество ядер на спидроиновой пленке достоверно больше по сравнению с фиброином (рисунок 4А). Для определения конкретных параметров роста нейритов был проведен сравнительный морфометрический анализ общей длины нейритов, их количества и толщины нейритов кортикальных нейронов, культивируемых на пленках на основе фиброина и спидроина в течение 7 дней. По сравнению с клетками, культивируемыми на субстрате на основе фиброина, общая длина нейритов была значительно выше на спидроине (рисунок 4Б). Кроме того, этот материал обеспечивал значительное увеличение общего количества нейритов (рисунок 4В) и их толщины по сравнению с фиброином (рисунок 4Г). Относительная интенсивность флуоресценции NCAM была выше при культивировании клеток на поверхности рекомбинантного белка (рисунок 4Д).

Таким образом, спидроин поддерживает формирование более обширной нейрональной сети по сравнению с фиброином. Учитывая это и ранее показанную меньшую провоспалительную активностью спидроиновых микрочастиц в сравнении с материалами на основе фиброина, мы предположили, что инъекционная спидроиновая конструкция является наиболее перспективным выбором для разработки стратегий регенерации ЦНС.

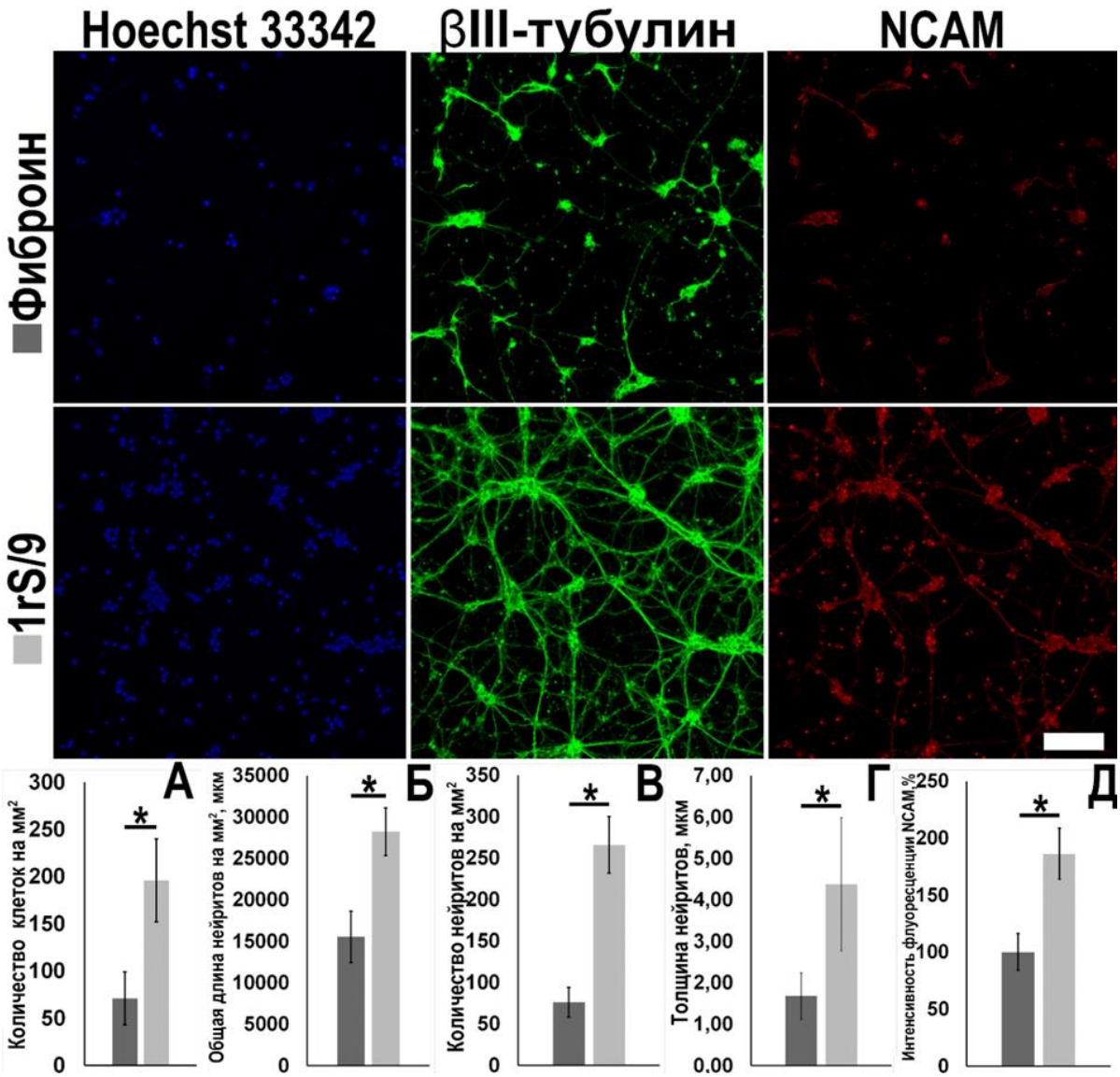

Рисунок 4. Влияние пленок из фиброина (сверху) и 1rS/9 (снизу) на количество нейронов коры больших полушарий мозга мыши и на морфологию их нейритов на 7 день культивирования. Клетки обрабатывали антителами к βIII-тубулину (зеленый) и NCAM (красный), ядра выявляли Hoechst 33342 (синий). Линейка 100 мкм. А – Количество клеток на мм^2, Б – Общая длина нейритов на мм^2, В – Количество нейритов на мм^2, Г – Толщина нейритов, Д – Относительная интенсивность NCAM. * – достоверные отличия между группами ($p<0.05$)

2.2. Влияние продуктов протеолитической деградации спидроина на клетки гиппокампа *in vitro*

Поскольку зона травмы находится на расстоянии нескольких миллиметров от гиппокампа и непосредственный контакт введенного скаффолда с клетками этой зоны

маловероятен, для экспериментов *in vitro* была выбрана модель культивирования клеток в присутствии микрочастиц rS1/9 без непосредственного контакта с клетками в системе trans-well, а также в кондиционированной среде, которая содержит продукты спонтанного гидролиза спидроина и не содержит сами микрочастицы.

Клетки обрабатывали антителами к нестину на 1, 4 и 8-й дни культивирования, после чего проводили морфометрический анализ параметров роста нейритов (рисунок 5 А – В). На первые и восьмые сутки длина отростков клеток, культивируемых в присутствии спидроина, была достоверно выше по сравнению с контрольной группой. При этом кондиционированная среда способствовала формированию более длинных нейритов на первые сутки культивирования по сравнению с контрольными клетками, однако на четвертые сутки эта разница не наблюдалась (рисунок 5Г). Культивирование нейронов гиппокампа в присутствии микрочастиц также способствовало увеличению количества нейритов на клетку на 4 и 8-е сутки культивирования по сравнению с контролем. Статистически значимых отличий в количестве нейрональных отростков между группой, получавшей кондиционированную среду, и контролем обнаружено не было (рисунок 5Д). Начиная с четвертого дня культивирования добавление микрочастиц в систему культивирования способствовало увеличению длины аксона по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. При этом увеличение длины аксона по сравнению с контролем было отмечено и для клеток, культивируемых в кондиционированной среде (рисунок 5Е). Кроме того, аксоны клеток, культивируемых в присутствии микрочастиц, имели больше точек ветвления по сравнению с контрольной группой (рисунок 5Ж).

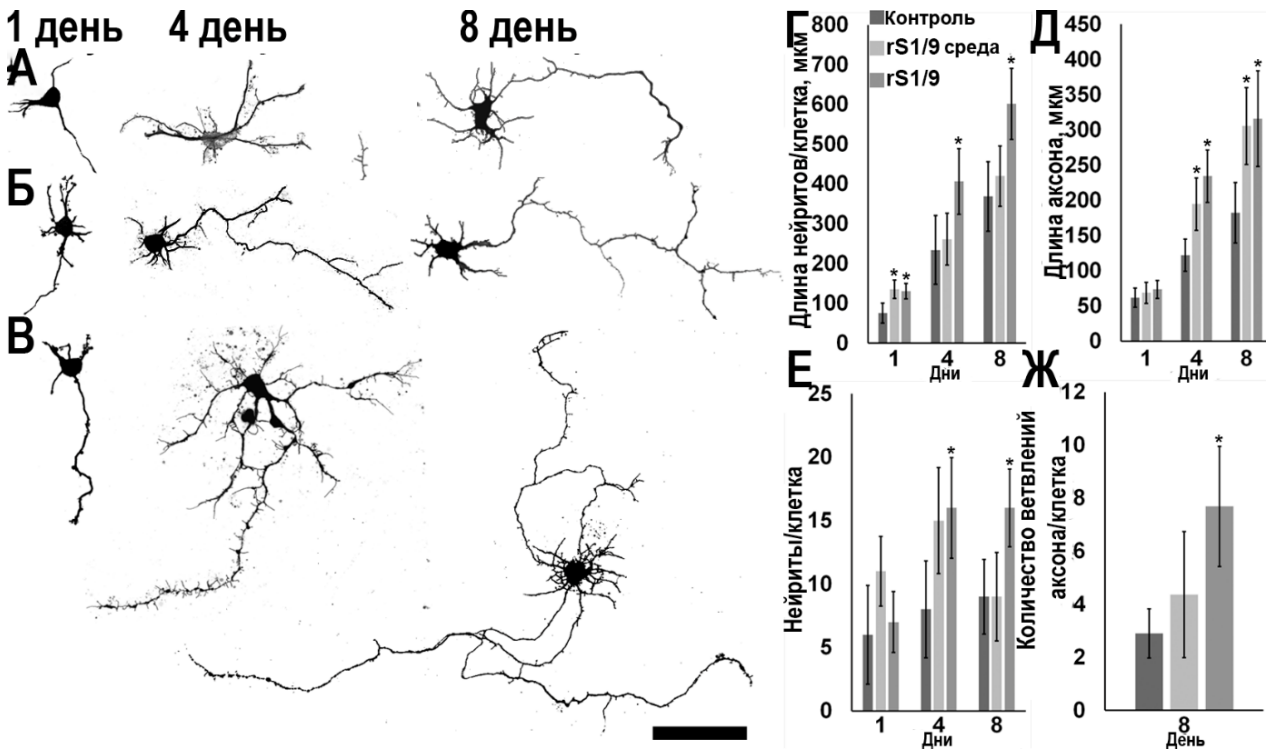

Рисунок 5. Влияние культивирования нейронов гиппокампа в присутствии микрочастиц rS1/9 и в кондиционированной среде на рост нейрональных отростков. А, Б, В – Инвертированные бинарные конфокальные изображения нестин-положительных клеток на 1, 4 и 8-й дни культивирования. А – Контроль, Б – Нейроны гиппокампа, культивируемые в кондиционированной среде, В – Нейроны гиппокампа, культивируемые в присутствии частиц. Линейка 50 мкм. Г – Длина нейритов на клетку, Д – Длина аксона, Е – Количество нейритов на клетку, Ж – Количество точек ветвления аксона. * – Достоверные отличия от контрольной группы ($p<0.05$)

Также было изучено влияние продуктов протеолитической деградации rS1/9 на пролиферацию нейральных прогениторных клеток в культуре (рисунок 6). Известно, что в мозге присутствует ряд протеаз, которые способны расщеплять rS1/9 по специфическим сайтам. Такими протеазами являются, в частности, трипсин IV и тромбин, наличие которых показано в мозге. При добавлении протеолизированного спидроина количество нестин-положительных клеток в культуре резко возрастало (рисунок 6А), это увеличение было связано с пролиферацией нейральных стволовых/прогениторных клеток, поскольку многие нестин-положительные клетки также были Brdu-положительны (рисунок 6Б).

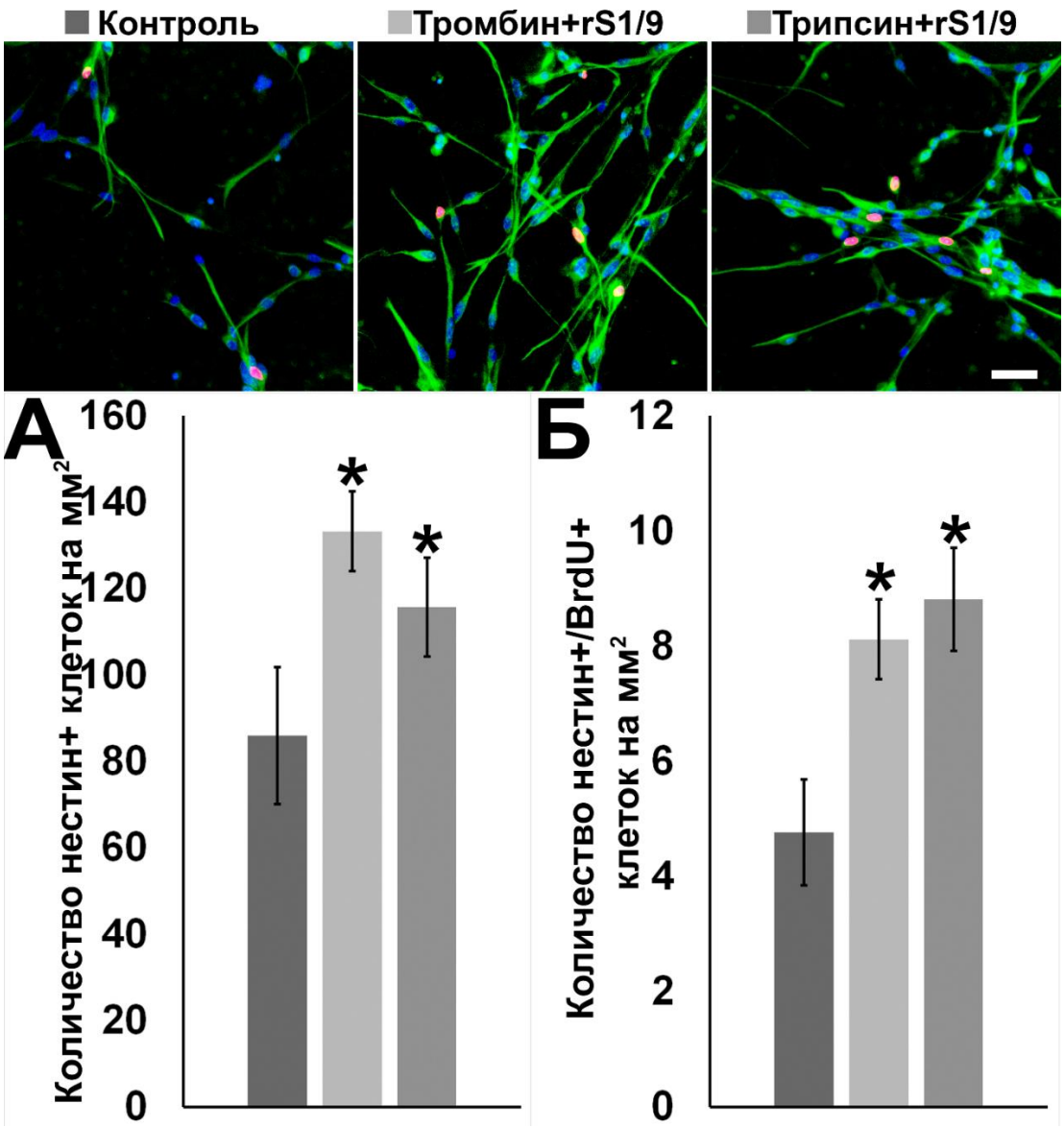

Рисунок 6. Эффект продуктов протеолитической биодеградации rS1/9 на инкорпорацию BrdU нейрональными стволовыми клетками через 3 дня культивирования. Клетки были обработаны антителами к нестину (зеленый) и Brdu (красный), ядра выявляли Hoechst 33342 (синий). Линейка 50 мкм. А – Количество нестин-положительных клеток на мм^2, Б – Процент нестин- и Brdu-положительных клеток. * – Статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой ($p<0.05$).

Таким образом, продукты биодеградации спидроина не только не оказывали токсического действия на клетки головного мозга, но и обладали собственным стимулирующим действием на удлинение нейритов нейронов и пролиферацию нейрональных стволовых клеток.

3. Влияние микрочастиц на основе спидроина на активацию нейрональных клеток-предшественников после индуцированной фототромбозом ишемии

В данной работе было исследовано влияние инъекции в область ишемического повреждения префронтальной коры мозга микрочастиц из рекомбинантного спидроина на нишу стволовых клеток в зубчатой извилине гиппокампа. Для этого использовали репортерную линию животных, в которой стволовые клетки и клетки-предшественники были помечены GFP, связанным с экспрессией нестина, являющегося характерным маркером для этого типа клеток [Bernal, Arranz, 2018]. Нестин экспрессируется в пролиферативных областях мозга эмбрионов и взрослых млекопитающих и не обнаруживается в терминально дифференцированных клетках нервной ткани.

Процессы взрослого нейрогенеза были зарегистрированы в DG гиппокампа как у грызунов [Kempermann и др., 1997; Seki, Arai, 1999], так и у человека [Bergmann и др., 2015; Knoth и др., 2010]. Это позволяет высказать предположение о возможном участии нейрогенеза в процессах пластичности мозга и, как следствие, в формировании памяти и новых нейронных связей, а также в регенерации тканей мозга после повреждений. Зубчатая извилина взрослого мозга получает различные прямые и модулирующие сигналы нейротрансмиттеров от нескольких других структур, включая префронтальную кору [Jin, Maren, 2015; Nilssen и др., 2019]. Известно, что повреждение префронтальной коры влечет за собой нарушение ее морфофункциональных связей с гиппокампом, что обуславливает многие патологические изменения когнитивных функций [Bast и др., 2017; Hoover, Vertes, 2007; Silachev и др., 2009]. Активация нейрогенеза должна способствовать функциональному восстановлению этих нарушений архитектуры мозга.

3.1. Изменение клеточного состава гиппокампа в контра- и ипсилатеральном полушарии после индуцированной фототромбозом ишемии

В группе животных, получивших инъекцию микрочастиц в область ишемического повреждения, отмечалось увеличение количества GFP+ клеток в SGZ по сравнению с контрольной группой (рисунок 7). Также, после введения животным раствора BrdU была оценена пролиферация клеток гиппокампа через 7 дней после ишемии коры.

Распределение BrdU-положительных клеток внутри DG значительно различалось. В группе, получившей спидроин BrdU+, клетки располагались преимущественно в гранулярном слое и хилусе (рисунок 7).

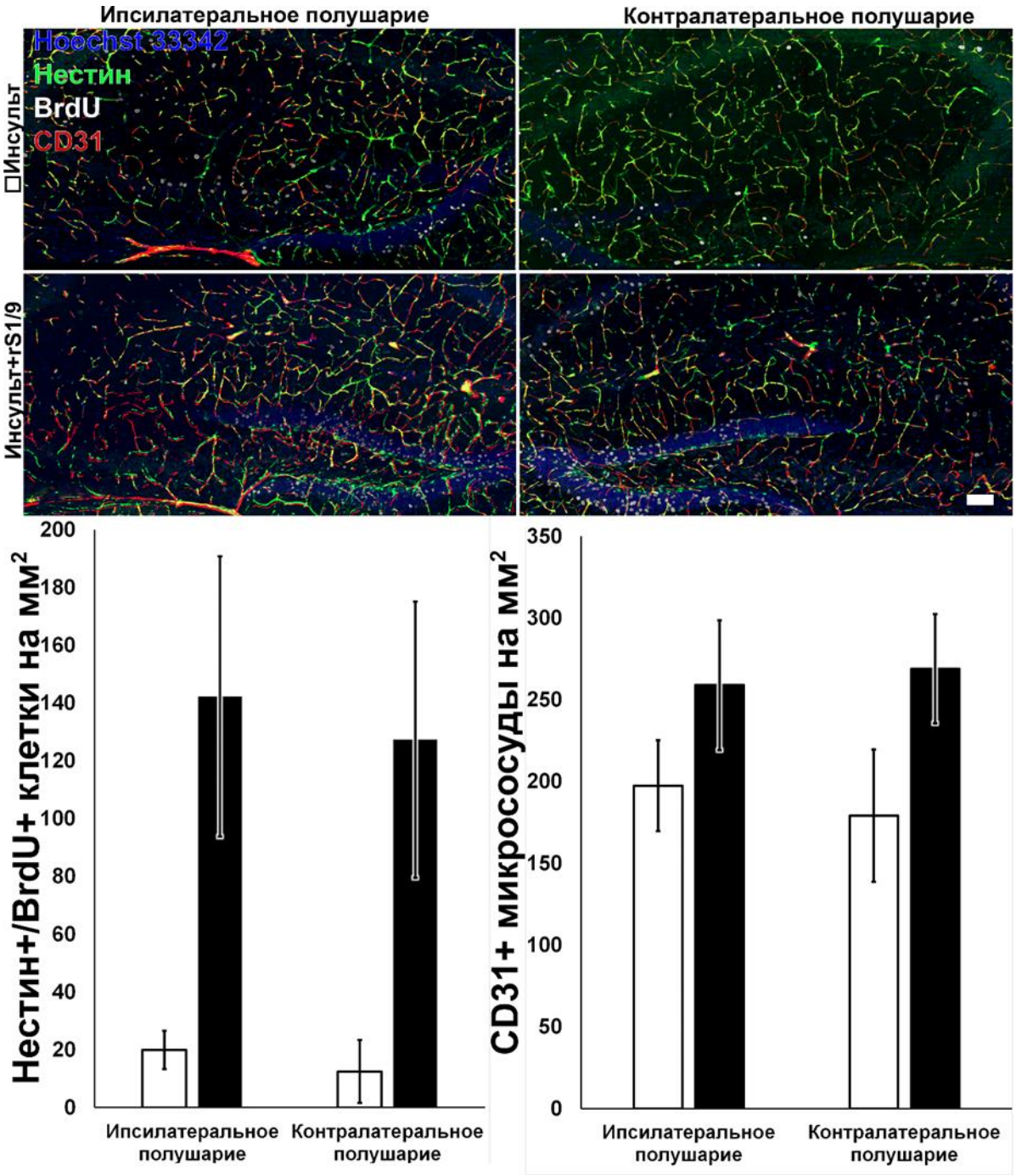

Рисунок 7. Исследование количества GFP+, BrdU+ и CD 31+ клеток в контра- и ипсилатеральном полушарии мозга через 7 дней после фокальной ишемии. Ядра на срезах выявляли Hoechst 33342 (синий) и обрабатывали антителами BrdU (белый) и CD31 (красный), клетки нестин-GFP + зеленые

Анализ нестин+ и BrdU+ клеток выявил увеличение пролиферации прогениторных клеток не только в ипси-, но и в контралатеральном полушарии мозга.

Дополнительно срезы были обработаны антителами к CD31. Было выявлено, что значительная часть нестин-положительных клеток (во всех группах животных) ко-локализуется в структурах, положительно окрашивающихся CD31. Учитывая это, можно предположить, что некоторая часть прогениторных клеток мозга происходит от перицитов микрососудов [Nakata и др., 2017].

Также была проведена количественная оценка ряда глиальных и нейрональных маркеров клеток головного мозга. Анализ нейрон-специфического тубулина показал отсутствие каких-либо изменений количества βIII-тубулина в гиппокампе мышей на 4-й день после ишемии мозга. Инъекция спидроина также не влияла на количество тубулина, что свидетельствует об отсутствии значимых изменений количества нейронов в зубчатой извилине гиппокампа на данных стадиях развития ишемии (рисунок 8А). В то же время обнаружено значимое увеличение количества GFAP (рисунок 8Б), что может быть следствием развития посттравматической активации астроглии в области гиппокампа, удаленной от очага ишемического повреждения. В группе животных, получивших микрочастицы, отмечалась тенденция к уменьшению количества сигнала GFAP, то есть снижение патологической активации астроцитов. Также, количество GFP увеличилось в группах животных, получавших физиологический раствор и микрочастицы (рисунок 8В), что подтверждает данные об увеличении количества нейральных прогениторных клеток, полученные на срезах мозга в области гиппокампа. При анализе NCAM выявлено значительное его увеличение после ишемии мозга, а также после инъекции гидрогеля микрочастиц в область ишемического повреждения (рисунок 8Г).

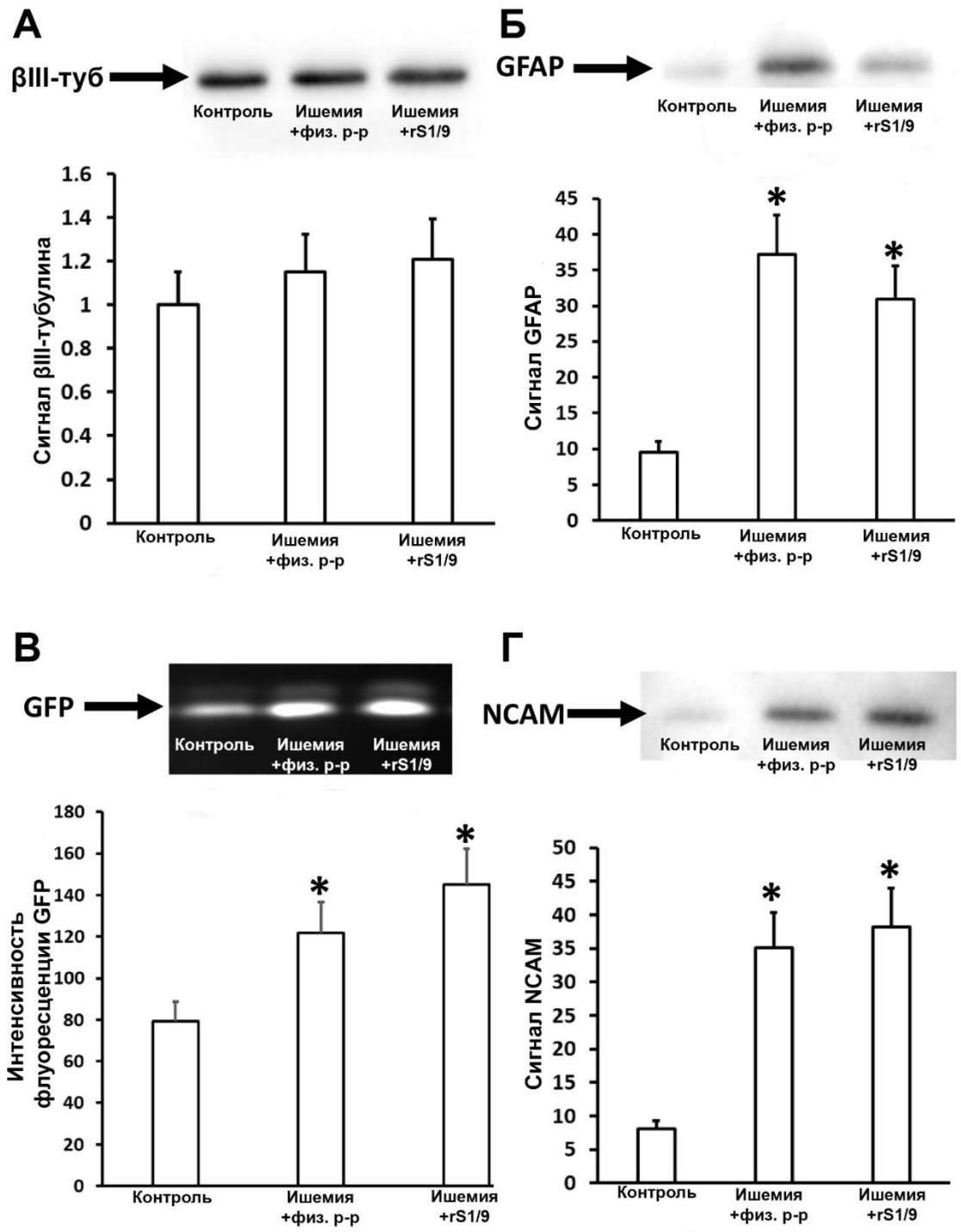

Рисунок 8. Изменение типов нейрональных клеток в гиппокампе после инъекции rS1/9 на 4-й день после индукции инсульта. А – Уровень βIII-тубулина, Б – Уровень глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), В – Уровень нестина (GFP) и Г – Молекулы адгезии нервных клеток (NCAM) в гомогенатах гиппокампа. Представлены репрезентативные вестерн-блоты с усредненной соответствующей денситометрией. Количество животных в каждой экспериментальной группе было n = 4. * – p <0,05 по сравнению с контролем

3.2. Влияние введения в ишемическую область микрочастиц спидроина на митохондрии гиппокампа мозга после ишемического инсульта

Митохондрии играют ключевую роль в развитии повреждения при ишемии мозга и их функционирование может нарушаться при действии повреждающих стимулов. В ходе работы был проанализирован митохондриальный потенциал клеток в области гиппокампа головного мозга через 7 дней после ишемии. Показано, что интенсивность флуоресценции специфического зонда активных митохондрий, перхлората этилового эфира тетраметилродамина (TMRE), значительно возрастает в клетках, выделенных из гиппокампа префронтальной коры у животных с индуцированной ишемией. При введении спидроина в область ишемического повреждения наблюдалось дальнейшее усиление флуоресценции TMRE (рисунок 9А, Б). Эти изменения могут указывать либо на увеличение трасмембранного потенциала митохондрий, либо на увеличение количества самих митохондрий через 7 дней после ишемии. Для определения конкретного эффекта было проанализировано количество фактора PGC1a, отвечающего за биогенез и пролиферацию митохондрий. Выявлено, что количество данного фактора возрастает в клетках гиппокампа после ишемии мозга (рисунок 9В), то есть происходит возможное компенсаторное увеличение биогенеза митохондрий. Инъекция спидроина усиливала этот процесс (рисунок 9В). Таким образом, увеличение интенсивности флуоресценции TMRE в нейральных клетках следует интерпретировать скорее как увеличение количества митохондрий, а не как повышение митохондриального потенциала.

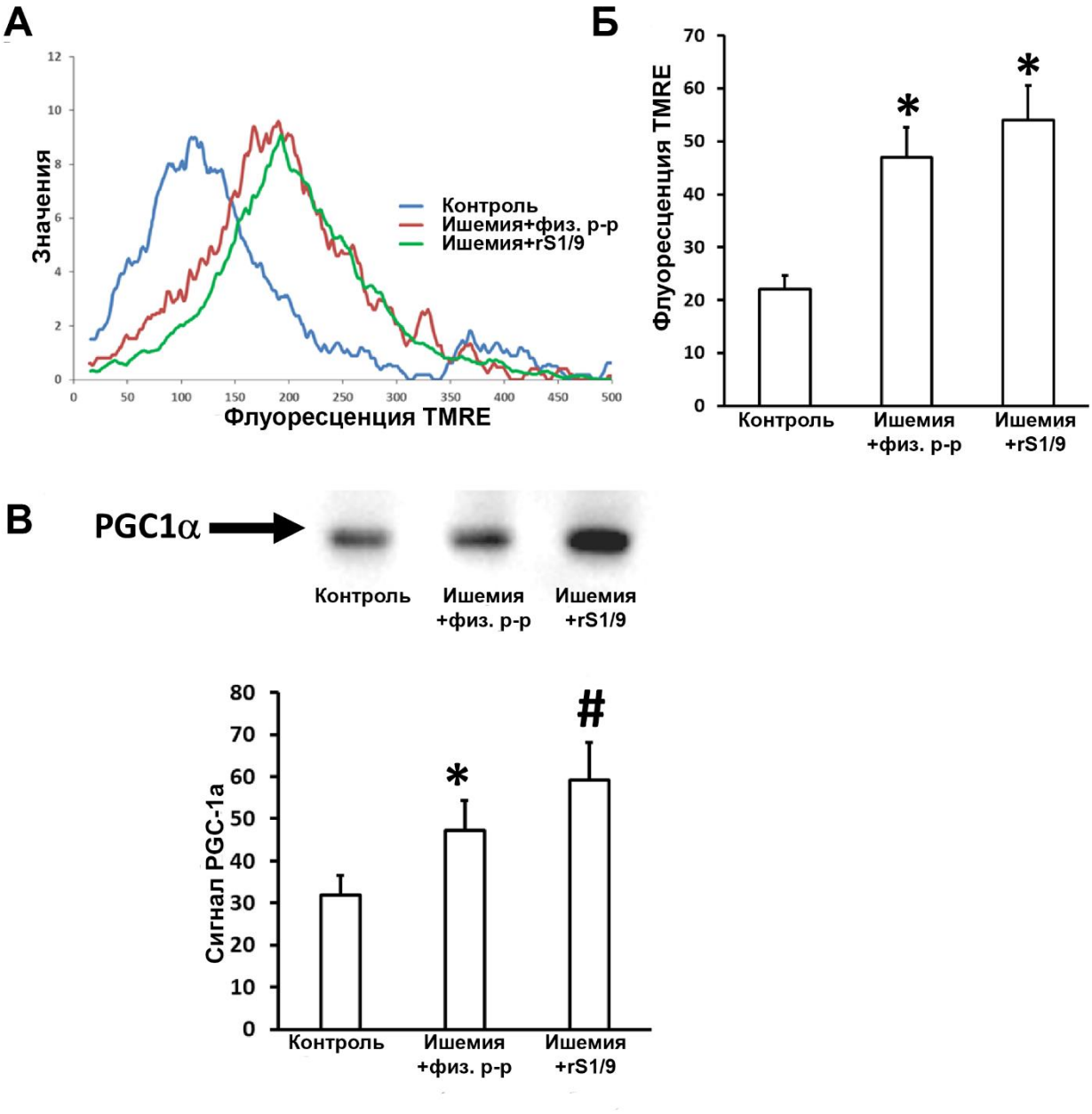

Рисунок 9. Влияние введения в ишемическую область микрочастиц спидроина на митохондрии гиппокампа мозга после ишемического инсульта. Потенциал митохондриальной мембраны оценивали по сигналу TMRE в изолированных нервных клетках сразу после обработки трипсином. А – Репрезентативные гистограммы анализа проточной цитометрии суспензии клеток, Б – Анализ количественного определения средней интенсивности флуоресценции TMRE, В – Анализ биогенеза митохондрий, показанный уровнями фактора PGC-1a в ткани гиппокампа. * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$, по сравнению с ишемией

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механические и физико-химические свойства полученных материалов на основе структурных белков шелка и микроскаффолдов на основе спидроина делают перспективным создание биоинженерных конструкций, которые в дальнейшем могут быть использованы для решения задач нейрорегенеративной медицины. В работе была продемонстрирована нейросовместимость исследуемых материалов *in vitro*, а также способность продуктов биодеградации спидроина ускорять рост и пролиферацию клеток гиппокампа. В экспериментах *in vivo* была доказана эффективность инъекции спидроина в область повреждения в отношении клеток гиппокампа мозга грызунов.

Выводы:

1. Полученные биоинженерные скаффолды обладают нейросовместимыми механическими свойствами, стабильны в водных растворах и имеют оптимальное время биодеградации в протеолитических условиях.
2. Взаимодействие полученных скаффолдов на основе фиброина и спидроина с нейронами коры приводит к формированию развитой нейрональной сети *in vitro*. За счет оптимизации физико-химических свойств материала рекомбинантный аналог спидроина 1 был более эффективен в поддержании адгезии и роста нейритов нейрональных клеток. Кроме того, нейрогенной активностью обладают и продукты гидролитической деградации микроскаффолдов на основе спидроина, что выражается в активации роста отростков нейронов гиппокампа и пролиферации нейрональных стволовых клеток.
3. Введение спидроиновых микроскаффолдов в область ишемического повреждения префронтальной коры мозга мыши приводит к активации пролиферации нестин-положительных клеток в области зубчатой извилины, изменению клеточного состава этой зоны и повышению митохондриального потенциала клеток гиппокампа. Таким образом, структура и физико-химические свойства полученных скаффолдов на основе фиброина и спидроина позволяют использовать эти материалы для решения задач по регенерации нервной ткани.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI[1]

1. Arkhipova A., Nosenko M., Malyuchenko N., Zvartsev R., **Moisenovich A.**, Zhdanova A., Vasil'eva T., Gorshkova E., Agapov I., Drutskaya M., Nedospasov S., and Moisenovich M. Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice // Biochemistry (Moscow). – 2016. – Vol. 81, N. 11. – P. 1251–1260. IF=2.42 (1.105/0.37).

2. Котлярова М. С., Архипова А. Ю., **Мойсенович А. М.**, Куликов Д. А., Куликов А. В., Коньков А. С., Бобров М. А., Агапов И. И., Мойсенович М. М., Молочков А. В., Гончаренко А. В., Шайтан К. В. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина для регенерации костной ткани // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2017. – Т. 72, N. 4. – С. 222–228. (0.375/0.175).

3. Гончаренко А. В., Котлярова М. С., **Мойсенович А. М**., Архипова А. Ю., Куликов Д. А., Коньков А. С., Куликов А. В., Машков А. Е., Агапов И. И., Мойсенович М. М., Кирпичников М. П. Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток на фиброиновых микроносителях // Доклады Академии наук. – 2017. – Т. 477, N. 1. – С. 1–4. (0.25/0.091).

4. Moisenovich M.M., Plotnikov E.Y., **Moysenovich A.M.**, Silachev D.N., Danilina T.I., Savchenko E.S., Bobrova M.M., Safonova L.A., Tatarskiy V.V., Kotliarova M.S., Agapov I.I., Zorov D.B. Effect of silk fibroin on neuroregeneration after traumatic brain injury. Neurochemical Research. – 2018. – Vol. 44. – Article ID 2261. IF = 3.59 (0.75/0.34).

5. Nosenko M. A., **Moysenovich A. M.**, Zvartsev R. V., Arkhipova A. Y., Zhdanova A. S., Agapov I. I., Vasilieva T. V., Bogush V. G., Debabov V. G., Nedospasov S. A., Moisenovich M. M., and Drutskaya M. S. Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting reepithelialization and inhibiting fibrosis // Frontiers in immunology. – 2018. – Vol. 9. – Article ID 2851. IF=6.429 (0.688/0.313).

6. Bessonov I. V., Rochev Yu A., Arkhipova A. Yu, Kopitsyna M. N., Bagrov D. V., Karpushkin E. A., Bibikova T. N., **Moysenovich A. M.**, Soldatenko A. S., Nikishin I. I., Kotliarova M. S., Bogush V. G., Shaitan K. V., Moisenovich M. M. Fabrication of hydrogel scaffolds via photocrosslinking of methacrylated silk fibroin // Biomedical materials (Bristol, England). – 2019. – Vol. 14. – Article ID 034102. IF=3.715 (1.75/0.968).

7. Moisenovich M. M., Silachev D. N., **Moysenovich A. M.**, Arkhipova A. Yu., Shaitan K. V., Bogush V. G., Debabov V. G., Latanov A. V., Pevzner I. B., Zorova L. D., Babenko V. A., Plotnikov E. Yu. and Zorov D. B. Effects of recombinant spidroin rS1/9 on brain neural progenitors after photothrombosis-induced ischemia // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Vol. 8. – Article ID 823. IF=5.87 (1.06/0.52).

8. Bessonov I., **Moysenovich A.**, Arkhipova A., Ezernitskaya M., Efremov Yu., Solodilov V., Timashev P., Shaytan K., Shtil A., Moisenovich M. The Mechanical Properties,

[1] В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах

Secondary Structure, and Osteogenic Activity of Photopolymerized Fibroin // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – Article ID 646. IF=4.329 (1.06/0.68).

9. **Moysenovich A. M.**, Tatarskiy V. V., Yastrebova M. A., Bessonov I. V., Arkhipova A. Yu, Kolosov A. S., Davydova L. I., Khamidullina A. I., Bogush V. G., Debabov V. G., Shaitan K. V., Shtil A. A., Moisenovich M. M. Akt and Src mediate the photocrosslinked fibroin-induced neural differentiation // NeuroReport. – Vol. 31, N. 10. – P. 770–775. IF=1.394 (0.31/0.24).

10. Nosenko M. A., **Moysenovich A. M.**, Arkhipova A. Y., Atretkhany K-S. N., Nedospasov S. A., Drutskaya M. S., Moisenovich M. M. Fibroblasts upregulate expression of adhesion molecules and promote lymphocyte retention in 3D fibroin/gelatin scaffolds // Bioactive Materials. – Vol. 6, N. 10. – P. 3449–3460. IF=14.593 (0.69/0.297).

Другие научные работы, опубликованные по теме диссертации

Тезисы докладов и материалы конференций

1. **Мойсенович А.М.**, Машков А.Е., Федулов А.В., Солдатенко А.С., Агапов И.И., Куликов А.В., Архипова А.Ю., Васильева Т.В., Мойсенович М.М. Витализированный аллогенными клетками костного мозга скаффолд на основе фиброиновых волокон для восстановления дефекта тощей кишки крысы // Гены и клетки – Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине. – 2017. – Т. 12. №3. – С. 167.

2. Бессонов И.И., Копицына М.Н., Котлярова М.С., **Мойсенович А.М.**, Архипов А.Ю., Богуш В.Г., Багров Д.В., Колосов А.С., Шайтан К.В., Мойсенович М.М. Новые композитные гидрогели на основе метакрилированного желатина и структурных белков шелка // Гены и Клетки – Материалы III Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. – 2017. – Т. 12. №3. – С. 167 – 168.

3. Kotliarova M., Goncharenko A., Arkhipova A., **Moysenovich A.**, Karachevtseva M., Khramova Y., Kon`kov A., Semenova M., Moisenovich M. Microcarriers based on silk fibroin for cultivation and directional osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // FEBS Journal – Материалы 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back". – 2017. – Vol. 284. – P. 382–382.

4. **Moysenovich A.M.**, Goncharenko A.V., Arkhipova A.Y., Filushkin Y.N., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Soldatenko A., Kulikov D.A., Agapov I.I., Moisenovich M.M. Silk fibroin scaffold in reconstruction of intestinal wall // FEBS Journal – Материалы 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back". – 2017. – Vol. 284. – P. 377–377.

5. Bibikova T., Bessonov I., Kopitsyna M., **Moysenovich A.**, Sivitskaya N., Bogush V., Kolosov A., Kotliarova M., Arkhipova A., Moisenovich M. Novel “photoinks” leading to photocrosslinked composites based on interpenetrating networks of methacryloyl gelatin and silk-like structural proteins // FEBS open bio – 2018. – Vol. 8, no. Suppl.S1. — P. 267.

Интеллектуальная собственность

1. Патент РФ на изобретение №2749871, 17.06.2021 г. Способ повышения состоятельности кишечного анастомоза с использованием биорезорбируемой трубки на основе метакрилированного желатина и метакрилированного фиброина. Авторы: А.Ю. Архипова, А.А. Рамонова, М.М. Мойсенович, Д.А. Куликов, А.В. Куликов, Ю.Н. Филюшкин, П.А. Глазова, Д.В. Кассина, Д.Ю. Семенов, А.В. Федулов, А.С. Солдатенко, К.В. Шайтан, **А.М. Мойсенович,** И.В. Бессонов, М.Н. Копицына, И.А. Кондратьева.

2. Патент РФ на изобретение №2714200, 13.02.2020 г. Способ получения биорезорбируемой трубки на основе метакрилированного желатина и метакрилированного фиброина и способ восстановления стенки тонкой кишки в эксперименте с помощью такой трубки. Авторы: А.Ю. Архипова, А.А. Рамонова, М.М. Мойсенович, Д.А. Куликов, А.В. Куликов, Ю.Н. Филюшкин, П.А. Глазкова, Д.В. Мосальская, Д.Ю. Семенов, А.В. Федулов, А.С. Колосов, К.В. Шайтан, **А.М. Мойсенович**, И.В. Бессонов, М.Н. Копицына, И.А. Кондратьева.

3. Патент РФ на изобретение №2711545, 17.01.2020 г. Способ получения биорезорбируемой трубки на основе метакрилированного желатина и метакрилированного фиброина и способ повышения состоятельности кишечного анастомоза с использованием такой трубки. Авторы: А.Ю. Архипова, А.А. Рамонова, М.М. Мойсенович, Д.А. Куликов, А.В. Куликов, Ю.Н. Филюшкин, П.А. Глазкова, Д.В. Мосальская, Д.Ю. Семенов, А.В. Федулов, А.С. Солдатенко, К.В. Шайтан, **А.М. Мойсенович**, И.В. Бессонов, М.Н. Копицына, И.А. Кондратьева.

4. Патент РФ на изобретение №2692578, 25.06.2019 г. Имплантат для регенерации костной ткани и способ его получения. Авторы: А.Ю. Архипова, А.А. Рамонова, М.М. Мойсенович, М.А. Карачевцева, М.С. Котлярова, **А.М. Мойсенович**, И.И. Агапов.

5. Патент РФ на изобретение №2660558, 6.07.2018 г. Способ получения минерализованных композитных микроскаффолдов для регенерации костной ткани. Авторы: М.М. Мойсенович, И.И. Агапов, А.Ю. Архипова, **А.М. Мойсенович**, А.В. Гончаренко, М.П. Кирпичников.

6. Патент РФ на изобретение №2645200, 16.02.2018 г. Способ формирования биорезорбируемых фиброиновых пленок с использованием метакрилированного желатина. Авторы: М.М. Мойсенович, И.И. Агапов, А.Ю. Архипова, И.В. Бессонов, М.Н. Копицына, **А.М. Мойсенович**, А.В. Гончаренко, М.С. Котлярова.