

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 602.6:59; 602.6:612

Рег. № ГЗ 0108-2018-0010

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690138-8

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН
А.В. Васильев
«10» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВОЙ БИМЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМЫ
ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, ОСНОВАННОЙ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ СТЕЛОВЫХ
КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

по Программе Президиума РАН № 42
«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
старший научн. сотр.,
канд-т биол. наук

 10.12.2018
Дашинимаев Э.Б.
подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, старший научный
сотрудник, кандидат биологических наук,


10.12.2018
подпись, дата

Э.Б. Дашинимаев

Исполнители:
Научный сотрудник, кандидат
биологических наук


10.12.2018
подпись, дата

К.С. Сухинич

Аспирант ИБР РАН


10.12.2018
подпись, дата

Ю.С. Василенко

Младший научный сотрудник


10.12.2018
подпись, дата

А.В. Косых

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата
10.12.2018

Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчёт 30 с., 1 разд., 15 рис., 0 таб., приложение - 1, источников – 10, публикаций по теме – 5

НЕЙРОНЫ, НЕЙРАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, УПРАВЛЕНИЕ РОСТОМ АКСОНОВ, ТРАВМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ, КЛЕТОЧНЫЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ, РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА.

Объектом исследования являются нейроны и нейральные стволовые клетки полученные методом направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Цель настоящей работы – разработать технологию лечения травм периферических нервов при помощи клеточных трансплантаций нейронов и нейральных стволовых клеток выращенных в условиях *in vitro*.

Были отработаны методы культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и также методы их дифференцировки в нейральных направлениях. Были получены культуры зрелых нейронов человека, содержащих небольшой процент глиальных клеток. Компетентность дифференцировки была проверена иммуоцитохимическим окрашиванием на нейрональные маркеры SYN, SYP, NCAM, b3TUB, MART. Отработаны методы культивирования нейральных стволовых клеток в виде нейросфер, разработан протокол оценки направления роста аксонов нейронов из прикрепленных нейросфер. Создана экспериментальная установка электростимуляции нейронов по оригинальному дизайну. Проведены эксперименты по влиянию различных режимов электростимуляции на характер и направление роста аксонов нейронов человека. Подобран оптимальный режим электростимуляции нейронов, который позволяет не ингибировать роста аксонов и миграции нейробластов из нейросфер. Получены результаты показывающие, что импульсный ток частотой 50 Гц и амплитудой 220 мВ/мм вызывает стимуляцию роста аксонов в катодном направлении, при этом угнетая рост аксонов в анодном направлении. Таким образом получена база для дальнейшего создания клеточных трансплантатов с направленной ориентацией нервных волокон для лечения травм периферических нервов. В следующем году планируется работа на мышинных моделях травмы периферического нерва.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	8
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	15
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	25
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	26
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	29

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

DAPI — 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium, клеточная среда

iGABA-INs — iGABA interneurons, вставочные нейроны γ -аминомасляной кислоты

GFP — green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок

PBS — phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер

TxRed — TexasRed, красный флуоресцентный краситель

БАС — боковой амиотрофический склероз

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ГТФазы — семейство ферментов гидролаз, которые связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат (ГТФ)

ИПСК — индуцированные плюропотентные стволовые клетки

МСК — мезенхимальные стволовые клетки

НСК — нейральные стволовые клетки

НПК — нейральные прогениторные клетки

ЦНС — центральная нервная система

ЭСК — эмбриональные стволовые клетки

ВВЕДЕНИЕ

Управление ростом аксонов нейронов человека *in vitro* — актуальная задача современной нейробиологии и регенеративной медицины. При помощи подобной технологии возможно будет создавать клеточные транспланты, выращенные из нейронов человека, которые, в свою очередь, можно получить из аутологичных индуцированных плюрипотентных клеток человека. Такие транспланты могут быть применены для лечения травм спинного мозга и периферической нервной системы. Данные виды травм являются тяжелыми нерешенными проблемами современной неврологии, поскольку частота тяжелых позвоночно-спинномозговых травм (ПСМТ) постоянно возрастает (в настоящий момент порядка 1 случая на 10 000 человек в год, в России порядка 14 000 новых случаев), а также в виду тяжести инвалидизации и отсутствия эффективных методов терапии. Более 80% пациентов с ПСМТ не способны восстановить утраченные функции при реабилитации. Также в России ежегодно от 4 до 7 тысяч человек нуждается в операциях, связанных с травмами периферических нервов (по данным отделения нейрохирургии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского). При этом около 60% пострадавших остаются инвалидами с утратой трудоспособности.

Необходим поиск инновационных методов лечения подобных травм, поскольку возможности консервативных подходов практически исчерпаны. Одним из таких способов может стать клеточная терапия. Регенерация может стимулироваться стволовыми клетками, дифференцированными в нейральном и глиальном направлениях, при пересадке в периферическую нервную ткань и ткань центральной нервной системы. Такой эффект оказывается, как благодаря выделению нейротрофических факторов и созданию матрикса для регенерации аксонов, так и за счет замещения утраченных нейронов и глиальных клеток. В настоящий момент одним из наиболее удобных для работы в этой области типов клеток являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки кожи (ИПСК) [1]. Они могут быть аутологичными для пациента, не требуют болезненных процедур по забору материала и могут быть масштабированы в значительном количестве. Из ИПСК могут быть получены клетки нейрального ряда, также возможно модифицировать клетки для усиленного синтеза нейротрофинов.

Несмотря на их значительный потенциал, нейроны, получаемые из ИПСК, остаются по-прежнему во многом относительно малоизученным типом клеток, что делает тему разработки клеточной терапии на их основе перспективным направлением [2,3,4,5]. Важным направлением исследований являются методы электростимуляции выращиваемых *in vitro* нервных волокон, планируемых для трансплантаций. Данный

подход позволяет добиваться направленной, корректной ориентации нервных волокон, ускоряя процесс созревания выращиваемой нервной ткани [6,7]. Используя его, можно подобрать условия электростимуляции нервных волокон трансплантата, а затем провести эксперименты по пересадке выращенных клеточных трансплантов в организм мыши с моделью травмы периферического нерва и спинного мозга.

Ранее в лаборатории клеточной биологии ИБР РАН им. Н.К. Кольцова был получен ряд линий ИПСК из разных типов исходных соматических клеток человека, в т. ч. дермальных фибробластов, клеток дермальной папиллы, клеток ретинального пигментного эпителия, хрящевой ткани, МСК костного мозга и других. Были получены и охарактеризованы множество линий ИПСК от разных доноров с получением дифференцированных из них нейральных стволовых клеток и нейронов.

Непосредственной целью данного проекта в первый год выполнения было создание системы, которая позволяла бы отработать методы электростимуляции нервных волокон, выращиваемых *in vitro* из ИПСК. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Собрать систему подачи электрического тока заданных параметров к нейральным клеткам человека, получаемых из ИПСК
- 2) Убедиться в наличии физиологических эффектов при электростимуляции нейральных клеток по сравнению с интактным контролем.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы и методы

1.1. Кюветы

Кюветы в которых происходит электростимуляция нейральных клеток, должны обладать следующими свойствами:

- нетоксичность материала, из которого они изготовлены
- возможность удобной посадки клеток внутри узкого канала для создания высокой напряжённости электрического поля в местах их размещения
- удобное крепление электродов для подачи напряжения
- возможность фотографирования клеток с использованием инвертированного микроскопа

Кюветы печатаются на 3D-принтере из полилактида (PLA) (Рис.1). Этот материал является биоразлагаемым и биосовместимым и может долгое время находиться в инкубаторах и термостатах без потери формы: его температура размягчения равна $+50^{\circ}\text{C}$. В то же время, он плавится при $+173-178^{\circ}\text{C}$, и значительно теряет форму при $+121^{\circ}\text{C}$, что не позволяет автоклавировать кюветы, заставляя выбирать другие способы стерилизации перед началом эксперимента — с помощью спирта и УФ-излучения.



Рисунок 1. Кювета, 3D-рендер модель

В кювете уровень жидкости в боковых ёмкостях и центральном канале одинаков, жидкость может спокойно перетекать в обоих направлениях. Таким образом, вся система представляет собой классическую модель сообщающихся сосудов. Ёмкости для клеточной среды заполняются достаточно большим количеством жидкости (порядка 4 мл на одну кювету) для того чтобы компенсировать процессы испарения из центрального канала (Рис.2).

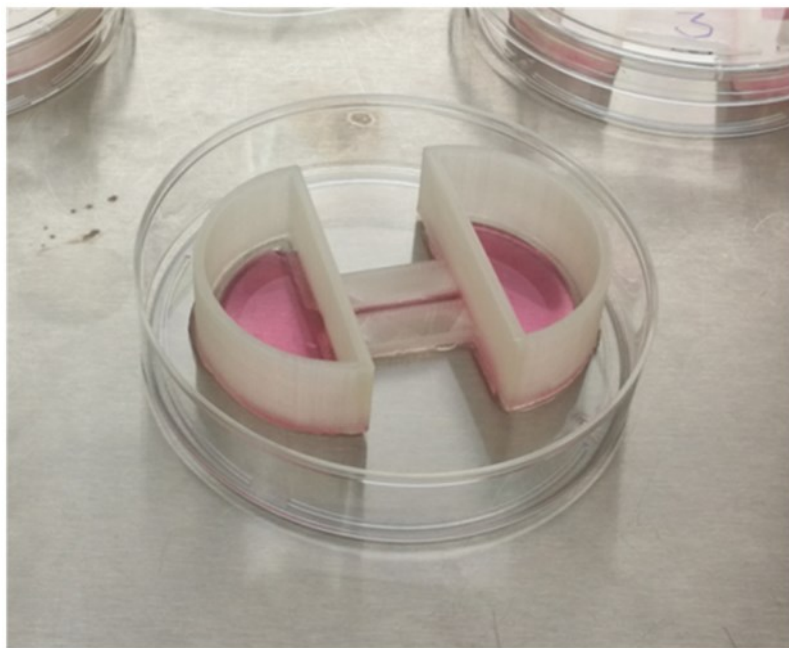


Рисунок 2. Заполнение кюветы культуральной средой

Кюветы крепятся на дно 100-миллиметровых стерильных культуральных чашек Петри (Corning-Costar) при помощи силиконовой смазки (Baysilonepaste, highviscosity, OBERMEIER, KURT GMBH). Дно центрального канала перед началом эксперимента покрывается раствором матригеля(1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience) для прикрепления нейросфер. Через 15 минут нейросферы (100 мкл) наносятся в центральный канал при помощи пипетки, после чего необходимо выждать 40-50 минут, прежде чем залить среду в боковые ёмкости

Как показал опыт, кюветы из PLA пластика достаточно прочны для многократного повторного использования. После проведения эксперимента кювета снимается с чашки Петри, очищается от силиконовой смазки, отмывается, стерилизуется при помощи спирта, после чего высушивается и облучается УФ излучением. После этих этапов она готова к повторному использованию.

1.2. Электроды

Для воздействия электрического поля на нейробласты необходимо обеспечить электрический ток в канале, где размещены клетки. Это возможно при подведении в систему двух электродов, соприкасающихся со средой. Подача напряжения на них создаёт разность потенциалов, которая образует ток ионов в растворе.

При выборе типа электродов необходимо учесть предполагаемую длительность импульсов тока. В обычном металлическом электроде при небольшом изменении напряжённости поля ток также меняется незначительно. В хлорсеребряном же электроде (который является моделью идеально неполяризуемого электрода) даже при небольшом изменении напряжённости возникает заметный ток (Рис.3). Поэтому в работе использовались хлорсеребряные электроды.

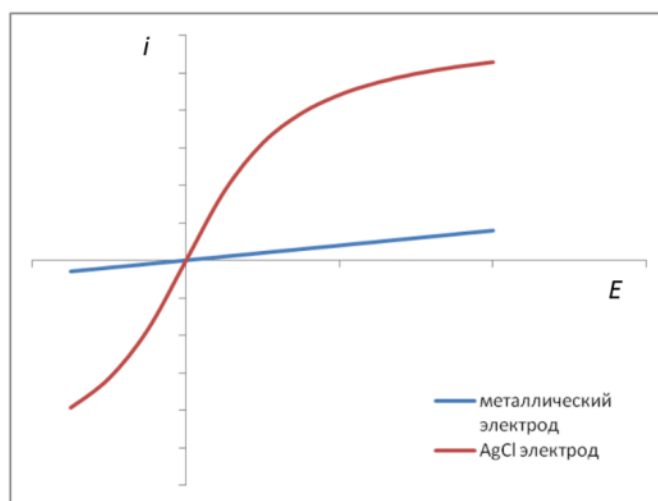
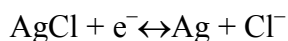


Рисунок 3. Качественный вид зависимости тока i через электрод от напряженности поля E

Серебряная проволока покрывалась слоем малорастворимой соли AgCl и погружалась в раствор 1M KCl . Таким образом, окисленной формой в такой системе является AgCl , а восстановительная форма представлена металлическим Ag и Cl^- . Электрод обратим по иону Cl^- .



Носик на 100 мкл для автоматических пипеток заливался 1% агарозным гелем до половины, после чего остаток заполнялся раствором 1M KCl , куда и погружался хлорсеребряный электрод (Рис.4).

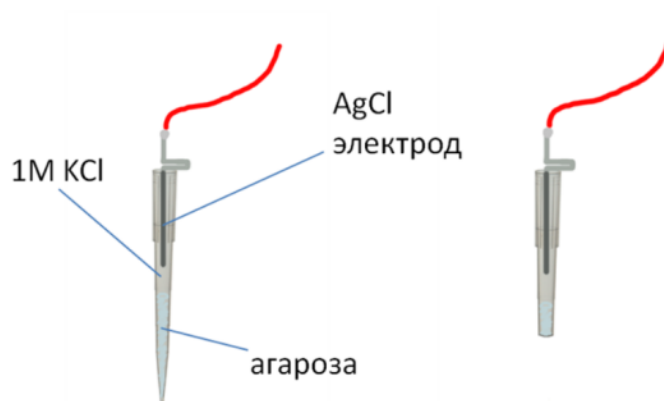


Рисунок 4. Устройство AgCl электрода с агарозным гелем.

Через отверстия в крышке чашки Петри носики с электродами опускались до уровня жидкости, контактируя с ней, и обеспечивали электрический ток в растворе (Рис.5).

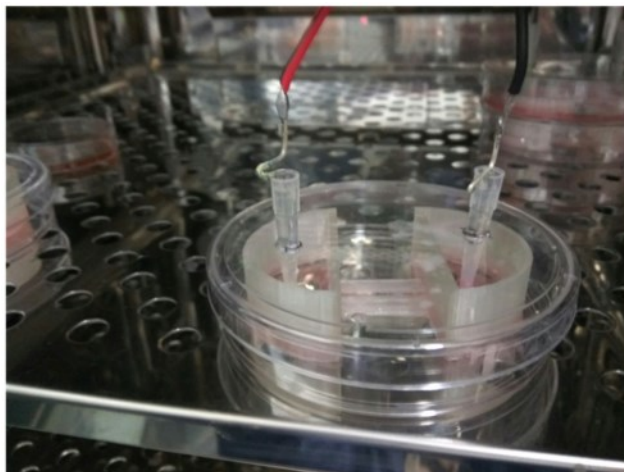


Рисунок 5. Крепление электродов на чашке Петри

1.3. Источник питания и управляющий модуль

Для подачи напряжения использовался восьмиканальный модуль-генератор измерительный LTR34-8 (компания «Л-Кард», Россия). Он позволяет генерировать импульсы длительностью от 0,01 с до 10 с, амплитудой от 0,01 В до 10 В и силой тока не менее 25 мА независимо на каждом из 8 каналов.

Управление генерацией сигналов осуществлялось через программу NeuroStim, специально разработанную и написанную для эксперимента.

1.4. Клеточная культура

Культивирование ИПСК

IPS-KYOU — линия человеческих ИПСК, полученных лабораторией Ямараки (Университет Киото, Япония) лентивирусным репрограммированием, используя факторы Oct4, Sox2, c-Мус и KLF4, из взрослых фибробластов кожи. IPS-KYOU были заказаны из банка клеток ATCC (ACS-1023™, ATCC, США).

Для пассирования ИПСК использовался 1мг/мл раствор диспазы (нейтральной протеазы) в среде DMEM/F12 (StemCellTechnologies). На каждом этапе пластиковая поверхность покрывалась раствором матригеля (1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience). Клетки культивировались в среде mTesR1 (StemCellTechnologies) при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂, 5% O₂ и при влажности 100%.

Для получения нейробластов из ИПСК необходимо провести направленную дифференцировку последних в нейральном направлении.

Нейральная дифференцировка

За день до начала нейральной дифференцировки, ИПСК были посажены в Ø6 см чашки Петри в количестве около 10⁶ клеток на чашку в среде mTeSR1. На следующий день, среда была заменена на нейральную индукционную среду (PSC NeuralInductionMedium, LifeTechnologies). Клетки культивировались в этой среде в течение 4 пассажей в Ø6 см чашках Петри, покрытых матригелем (1/40 в DMEM/F12) (BD Bioscience). Затем нейральные стволовые клетки (НСК) культивировались в нейральной пролифераивной среде (NPM, DMEM/F12 (3/1)), с добавлением B27, bFGF (10нг/мл), EGF 10нг/мл, пирувата натрия и пенициллина/стрептомицина как минимум в течение 3 пассажей (Рис.6).

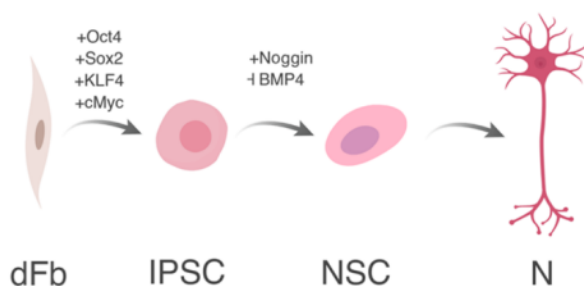


Рисунок 6. Общая принципиальная схема дифференцировки dFb в нейроны.

Вначале работы предполагалось работать с отдельными нейронами, полученными из ИПСК. Но в дальнейшем стало ясно, что в сложившейся системе становится затруднительно наблюдать за аксонами, выросшими из единичных клеток — поэтому

было принято решение начать работу с нейросферами. Нейросфера — система клеток, состоящая из свободно плавающих объединений нейральных стволовых клеток. Нейросферы позволяют исследовать нейральные клетки-предшественники *in vitro*. Для их создания нейральные стволовые клетки суспендируют в среде, не содержащей белковых субстратов, обеспечивающих прикрепление клеток к пластику, но содержащей необходимые факторы роста, такие как фактор роста эпидермиса (EGF) и базовый фактор роста фибробластов (bFGF). Это позволяет нейральным стволовым клеткам формировать характерные трехмерные кластеры шарообразной формы (Рис.7). После прикрепления нейросферы к пластику (этого можно добиться, добавив в среду матригель) размеры и конфигурация нейросфер позволяет отследить направление роста отдельных аксонов, в то время как в изотропной суспензии нейробластов это представляет значительную трудность.

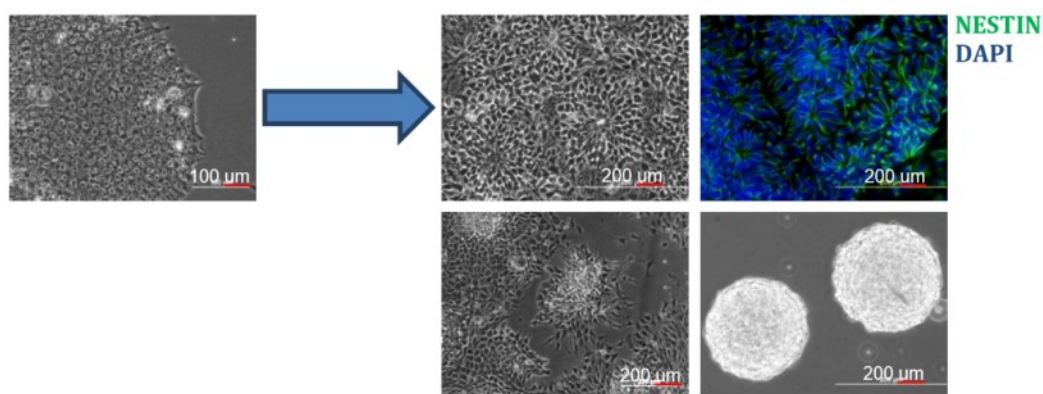


Рисунок 7. Образование нейросфер из нейробластов.

После посадки нейросфер ростовая среда для пролиферации заменяется средой для терминальной дифференцировки N2B27 (DMEM/F12 + нейробазальная среда (1/1), добавка B27, добавка N2, пируват натрия, пенициллин/стрептомицин) и культивировалась далее (24-48 часов). Этого времени обычно достаточно, чтобы увидеть рост аксонов на расстояние порядка 1 мм. Для оценки скорости роста аксонов было снято тайм-лапс видео с использованием цифровой системы визуализации EVOSFLAuto.

1.5. Иммуноцитохимия

Чтобы убедиться в том, что отростки, выходящие из нейросфер, являются нейральными, была произведена покраска нейросфер антителами на маркёры зрелых нейронов: hNCAM, SYN1 и SYP. hNCAM является специфической мембранной молекулой прикрепления нейрона к субстрату, SYN и SYP являются белками, отвечающими за процессинг нейромедиаторов.

Перед окрашиванием клетки были промыты раствором PBS и зафиксированы в течение 15 минут в 4% параформальдегиде при комнатной температуре (22°C–24°C). Затем культуры трижды были промыты в PBS (5 мин при комнатной температуре), инкубировались с первичными антителами в блокирующем растворе (PBS с 10% FBS и 0,1% Tryton-X-100) в течение 1 часа при 37°C, промывались снова и инкубировались с соответствующими вторичными антителами AlexaFluor-594 (1:800, MolecularProbes) в течение 1 часа при 37°C. После этого клетки окрашивались красителем ядер DAPI. Изображения были получены с использованием цифровой системы визуализации EVOSFLAuto.

1.6. Статистика

Для оценки погрешностей, возникающих при измерении площадей центра нейросферы, зоны миграции и зоны роста (см. ниже), был использован метод максимального правдоподобия в предположении, что величины этих площадей распределены нормально.

Пусть $\xi \sim N(\mu, \sigma^2)$, $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ — выборка. Запишем функцию правдоподобия:

$$L(X) = \prod_{i=1}^n p(x_i), \quad \text{где} \quad p(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{— плотность нормального распределения.}$$

Приравняв частные производные L по μ и σ нулю, находим стационарные точки, из которых выбираем значение для максимума L . Указанные точки μ и σ являются матожиданием и среднеквадратичным отклонением искомой величины, то есть площади зоны на фотографии.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Рост аксонов в нормальных условиях

В первой части экспериментальной работы нами был проанализирован рост аксонов из нейросфер в обычных условиях, без каких-либо стимуляций. В итоге нами было показано, что подобранные условия получения, культивирования и дифференцировки нейросфер позволяют получить удобную модель изучения роста аксонов [8, 9]. После прикрепления к подложке, покрытой матригелем, нейросферы дают обычно радиальный рост «лучей» аксонов.

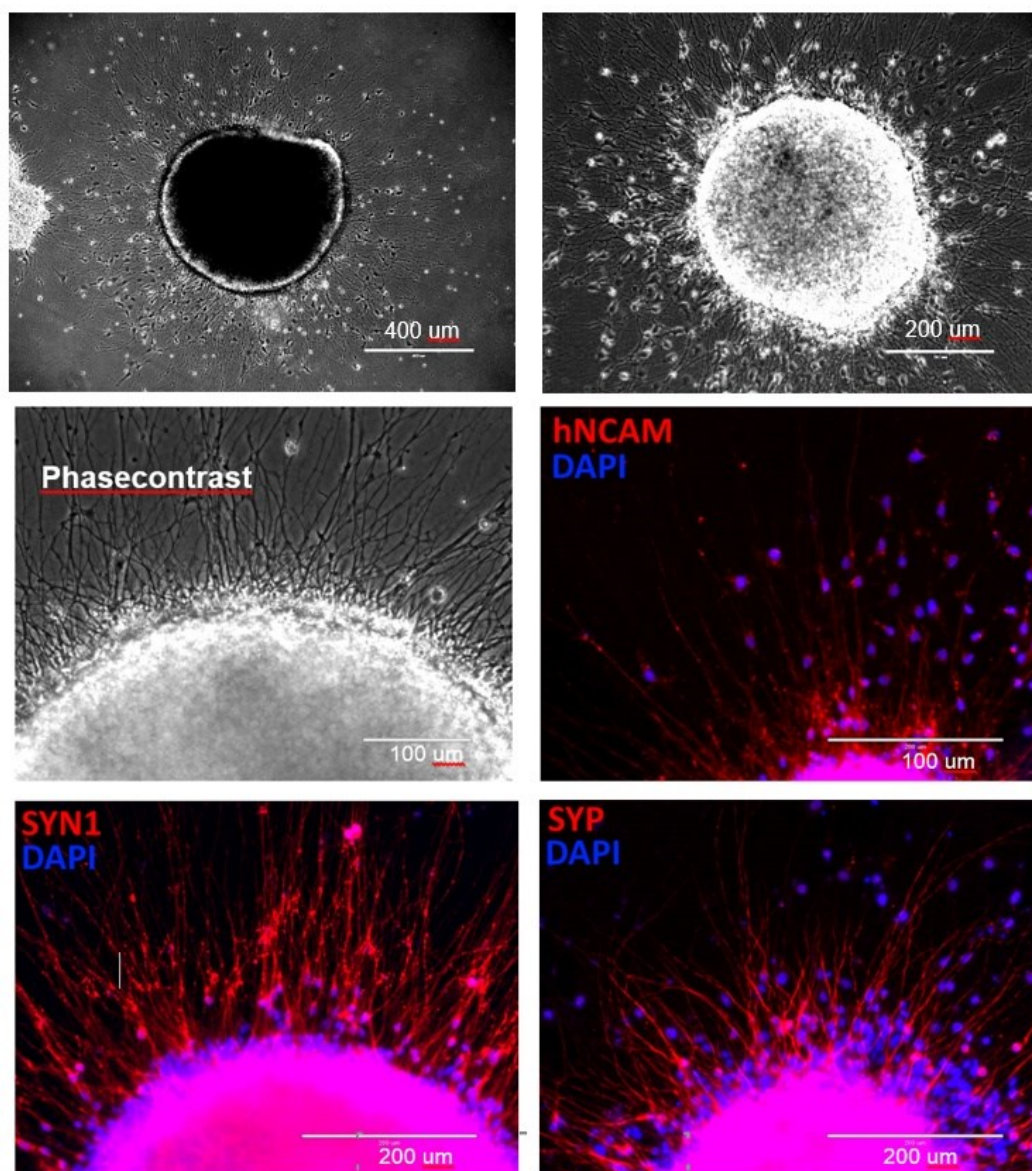


Рисунок 8. Радиальный рост аксонов из нейросфер и окраска аксонов нейронов при помощи антител против нейрональных маркеров hNCAM, SYN1, SYP

Валидация нейральной дифференцировки была показана нами при помощи покраски антителами на маркёры зрелых терминально дифференцированных нейронов: HNCAM, SYN1 и SYP (Рис.8). Для того чтобы оценить скорость роста аксонов, было снято несколько видеороликов методом цейтраферной съемки. В результате мы установили, что на начальных этапах (первые часы после прикрепления клетки) она составляет 80-140 мкм/час. В дальнейшем эта скорость уменьшается до 20-30 мкм/час.

После длительного наблюдения и многократных посадок нейросфер, было обнаружено, что развитие нейросфер после прикрепления в подавляющем большинстве случаев строится схожим образом. Часть клеток из нейросферы (скорее всего нейробласты, недифференцированные предшественники нейронов) мигрирует в радиальном направлении, образуя «зону миграции». Её ширина составляет 100-500 мкм в зависимости от размеров нейросферы. Миграция клеток из нейросфер продолжается в течение первых суток после прикрепления, после чего прекращается и нейробласты более не меняют своего местоположения. Мы считаем, что этот процесс может отражать естественную способность нейробластов к миграции при развитии слоев коры головного мозга — при этом процессе происходит их миграция из внутренней части мозга к поверхности, при этом на определённом этапе «подъёма к поверхности» они останавливаются и участвуют в образовании очередного слоя.

Одновременно с миграцией клеток происходит рост аксонов — как из мигрирующих, так и из остающихся внутри нейросферы клеток, которые образуют «зону роста», которая по своей площади превосходит «зону миграции» и площадь центра прикрепленной нейросферы (Рис.9).

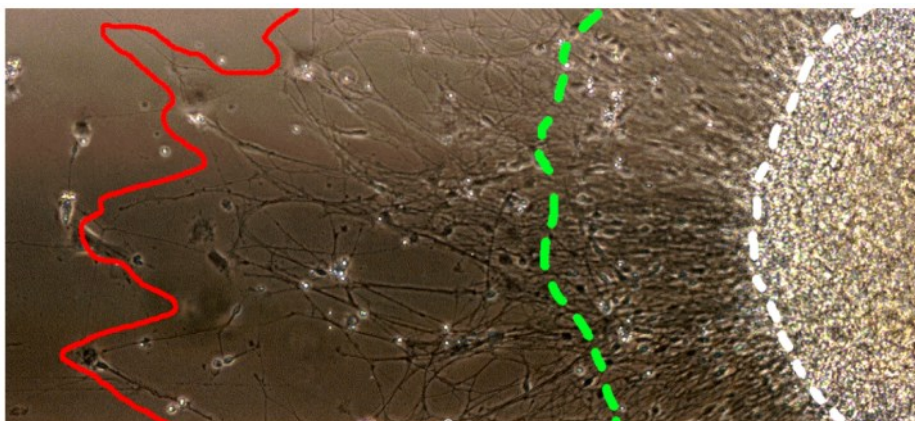


Рисунок 9. Зона роста (красный цвет), зона миграции (зелёный цвет), центр прикрепленной нейросферы (белый цвет).

2.2. Количественная оценка роста аксонов

При рассмотрении задачи об управлении ростом аксонов в качестве количественной характеристики можно принять площадь, занимаемую выросшими аксонами — «зону роста». Возьмём одну нейросферу в обычных условиях, которая посажена в кювету без подачи напряжения на электроды. Выделим на фотографии три зоны, о которых говорилось выше. Белый цвет на рисунке — сама нейросфера, зелёный — зона миграции, красный — зона роста (Рис.10).

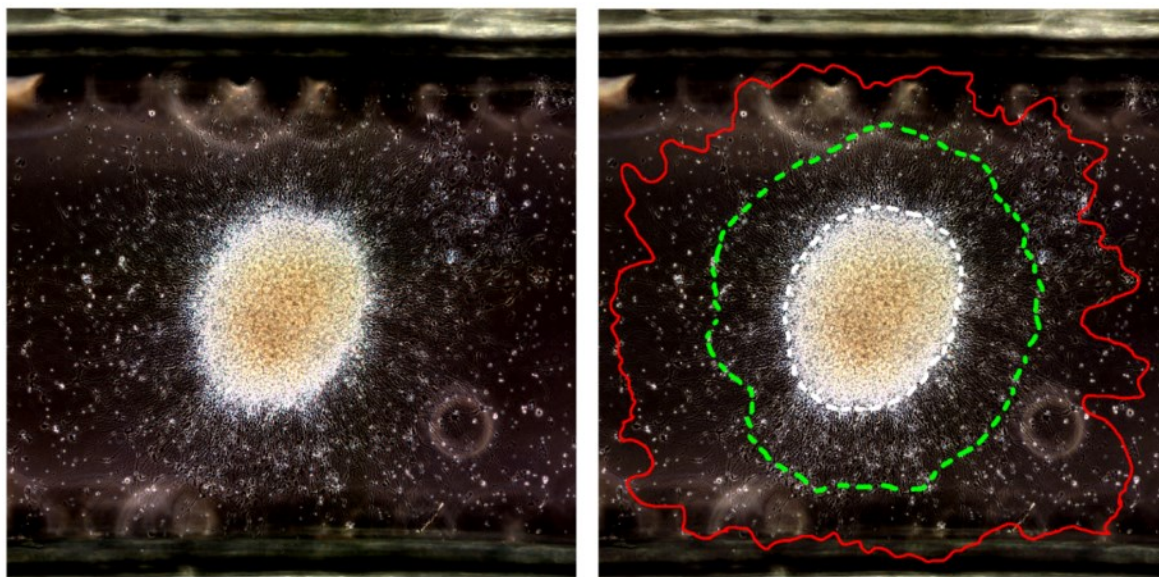


Рисунок 10. Определение центра нейросферы, зоны миграции и зоны роста в обычных условиях.

По фотографиям можно определить площадь, которую занимает каждая из зон. Измерив таким образом «зону роста», «зону миграции» и площадь центра прикрепленной нейросферы, можно найти зависимость между этими тремя площадями. На диаграмме ниже представлены эти соотношения после двух суток роста нейросферы для 7 контрольных образцов (Рис.11).

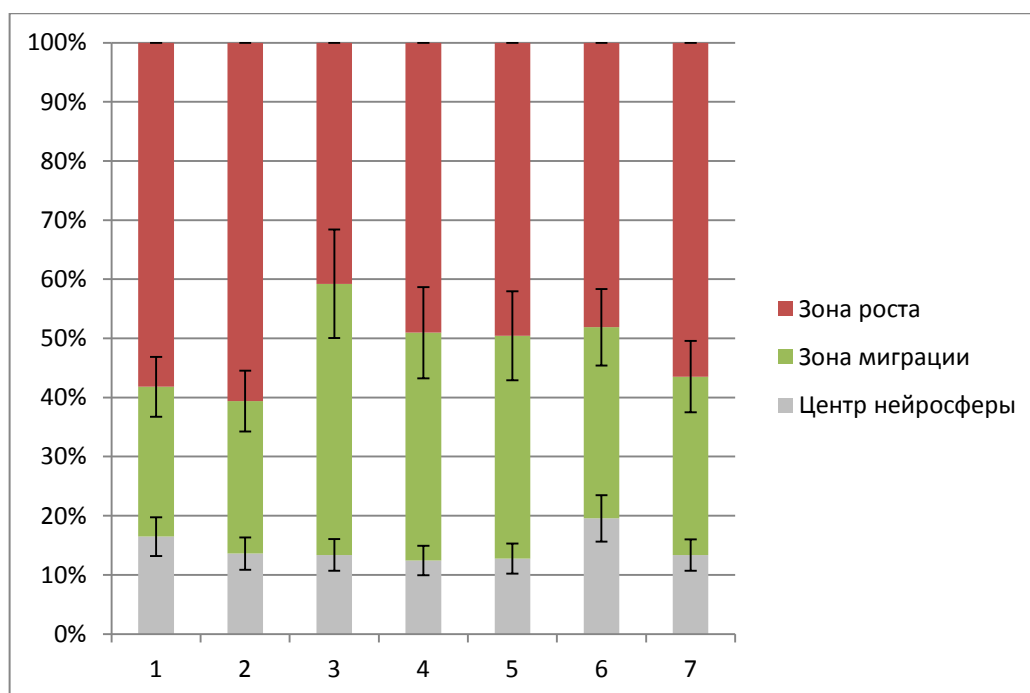


Рисунок 11. Соотношения между центром нейросферы, зоной миграции и зоной роста для нейросфер в обычных условиях.

Как видно, в среднем нейросфера занимает 12-20% общей площади, зона миграции составляет 25-45%, а зона роста — 40-60%. Погрешности вычислений были посчитаны при помощи метода максимального правдоподобия в предположении, что величины площадей распределены нормально.

2.3. Рост аксонов при наличии электрического поля

После сборки и валидации системы электростимуляции, нами была проведена серия экспериментов с подачей напряжения различной частоты и амплитуды на электроды кювет. В результате мы обнаружили, что наиболее значимый эффект электростимуляции наблюдается при подаче напряжения частотой 50 Гц и амплитудой 10 В на электроды кюветы (с учётом сопротивления всей ячейки напряжённость поля в канале составляла 150-220 мВ/мм. При таких параметрах становится заметно отклонение роста аксонов от обычного режима. Те аксоны, что направлены к катоду, вырастают длиннее тех, что направлены к аноду (Рис.12).

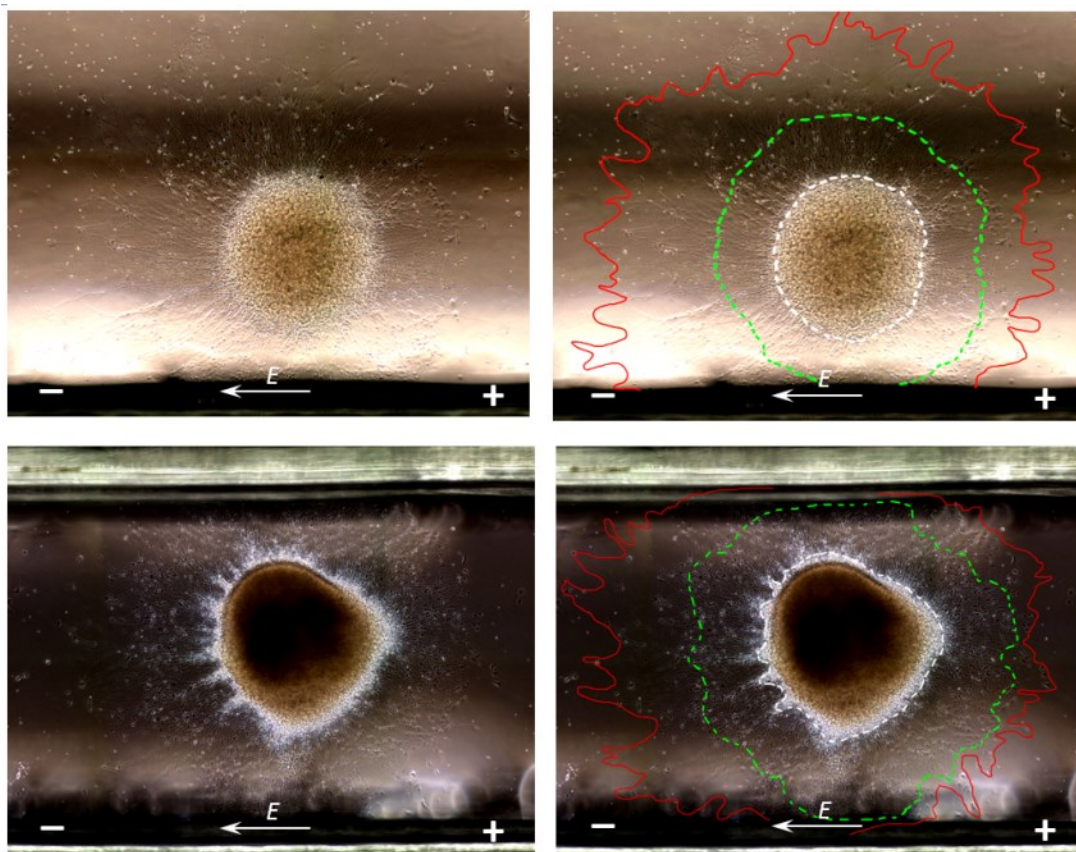


Рисунок 12. Определение центра нейросферы, зоны миграции и зоны роста при подаче напряжения.

На диаграмме ниже представлена эта особенность (также после 2 суток роста)
 (Рис.13). Показано сравнение величин $\frac{S_{\text{рост}}}{S_{\text{центр}}}$ и $\frac{S_{\text{мигр}}}{S_{\text{центр}}}$, где

$S_{\text{рост}}$ — площадь зоны роста,

$S_{\text{мигр}}$ — площадь зона миграции,

$S_{\text{центр}}$ — площадь центра нейросферы.

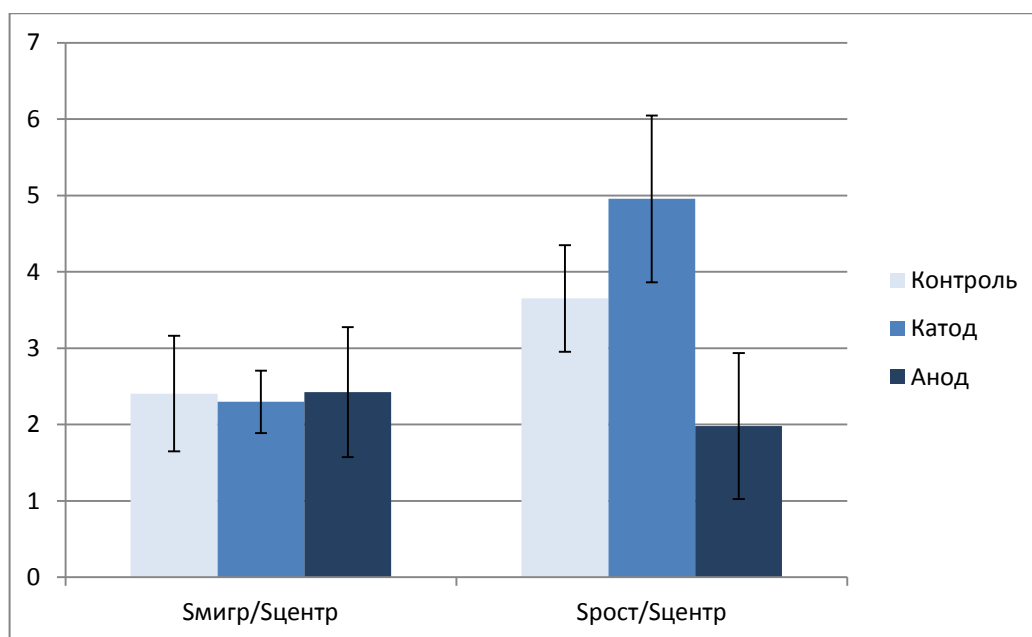


Рисунок 13. Сравнение отношения площадей зоны миграции, зоны роста и центра нейросферы.

Как видно, во всех трёх случаях отношение площади зоны миграции к площади центра нейросферы примерно одинаково. Однако соотношение зоны роста и центра нейросферы иное: в направлении катода оно больше, чем в контроле, а в направлении анода — меньше.

Разделив зоны вертикальной линией, проходящей через центр, можно сравнить величины площади слева (направление к катоду) и справа (направление к аноду) (Рис.14).

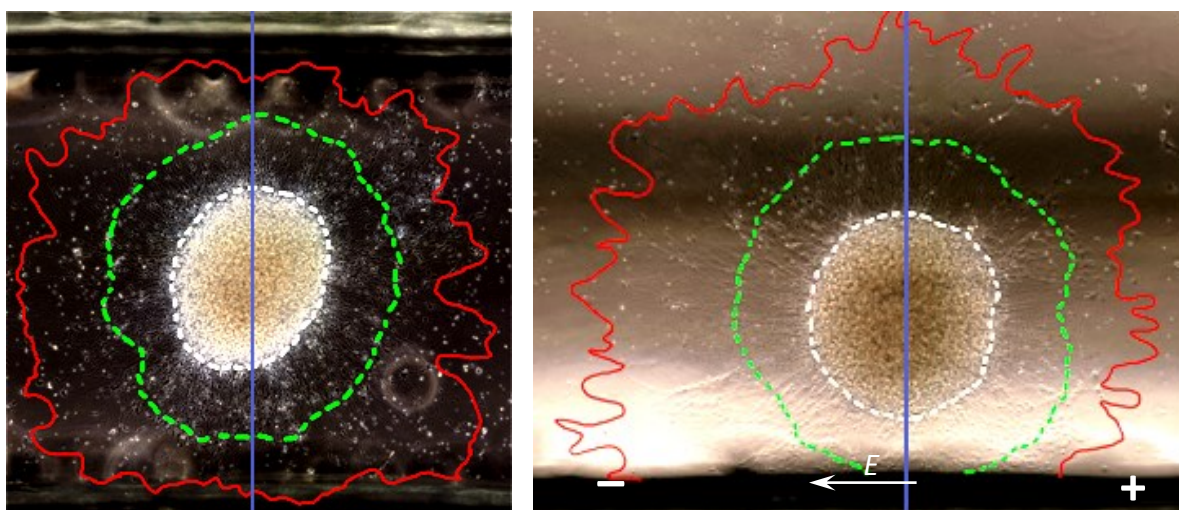


Рисунок 14. Качественное сравнение площади зоны роста в случае контроля и эксперимента

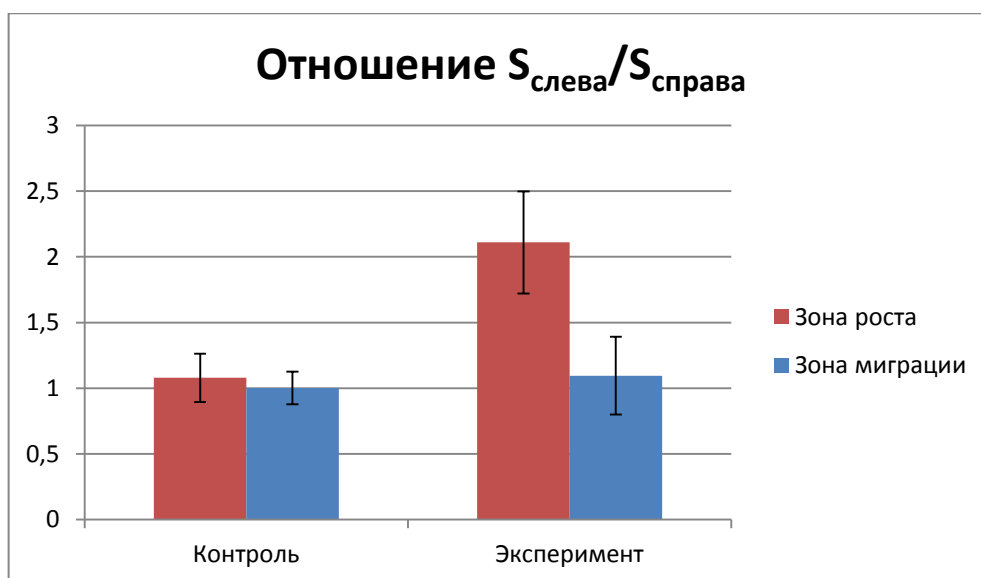


Рисунок 15. Сравнение отношения площадей зоны роста и миграции слева и справа в случае контроля и эксперимента

Как видно, в случае контроля отношение площади зоны роста слева к площади зоны роста справа, т.е. $\frac{S_{\text{слева}}}{S_{\text{справа}}}$, близко к единице. Аналогично и для зоны миграции. Однако в случае эксперимента мы видим, что отношение $\frac{S_{\text{слева}}}{S_{\text{справа}}}$ для зоны роста близко к двойке, в то время как для зоны миграции оно остаётся равным единице (Рис.15).

Это показывает, что электрическое поле не влияет на миграцию нейронов из центра нейросферы, но оказывает заметное воздействие на рост аксонов из них: скорость их роста в направлении анода уменьшается, а в направлении катода — увеличивается.

Проведённые эксперименты показывают, что напряжение с частотой 50 Гц приводит к более интенсивному росту аксонов в направлении катода. Рост в катодном направлении согласуется с описаниями в литературе.

Для объяснения этого эффекта необходимо вспомнить, что процесс роста аксона может контролироваться химически (скажем, при добавлении нетрина), или чисто электрически. Хемотаксис вкупе с влиянием электрического поля исследован довольно обширно, что позволяет сказать о влиянии определённых молекул на поведение конуса роста. Усиление же роста аксонов при возникновении только электрического поля (в отсутствие химических сигналов для рецепторов конуса роста) изучено ещё недостаточно и не поддаётся однозначному объяснению. Предлагается возможная гипотеза для одного из механизмов более интенсивного роста в нашем эксперименте.

Показано, что увеличение концентрации кальция в растущем аксоне есть ответ на

возникновение химических сигналов вблизи конуса роста и может увеличивать его чувствительность. Также известно, что при добавлении нетрина, открывающего кальциевые каналы клетки, повышение концентрации кальция вызывает выпускание филоподий и движение конуса роста в сторону нетрина. В нашем эксперименте мы не можем говорить о концентрациях сложных химических сигналов, однако, например, ионы кальция присутствуют в составе клеточной среды (DMEM и нейробазальная среда). При возникновении электрического поля ионы двигаются согласно их заряду — и ионы Ca^{+} начинают движение в сторону отрицательно заряженного катода. Таким образом, в этом направлении создаётся градиент их концентрации, который может улавливаться конусом роста, что может приводить к более интенсивному росту нейронов в этом направлении.

Интересно также, что в литературе обычно применяется постоянный ток с напряжённостью от 0,0001 до 140 мВ/мм, реже — импульсный. В нашем эксперименте использовался импульсный ток с частотой 50 Гц и амплитудой до 220 мВ/мм. В целом наблюдаемый эффект качественно оказался таким же.

Качественным отличием от предыдущих научных исследований в этой области является используемые культуры клеток [10]. В литературе обычно используются клетки сетчатки эмбриона курицы или лягушки — эти животные откладывают яйца, поэтому с зародышами легко проводить операции и извлекать необходимые такни для органных культур нейронов. Но эти клетки всё же не полностью аналогичны человеческим. В нашем исследовании мы использовали нейроны человека, полученные из ИПСК, что является очередным шагом в сторону приближения методов электростимуляции нейронов *in vitro* и созданию клеточных трансплантатов для лечения травм спинного мозга и периферических нервов.

Использованный метод подсчёта площадей центра нейросферы, зон миграции и роста может быть улучшен. В Приложении описано улучшение его с математической точки зрения. Кроме того, для более точного количественного измерения величин площадей можно использовать метод антероградной трассировки. Он предполагает либо прямую окраску красителями (например, липофильными флуоресцентными красителями), либо использование генетического подхода (внедрение генетического конструкта посредством вируса), либо чисто молекулярную трассировку (используя нейромедиаторы). Во всех трёх вариантах при помощи флуоресцентной микроскопии можно получить цветное изображение нейросферы и выходящих из неё аксонов. Затем, пользуясь программой ImageJ, можно вычислить количество пикселей на фотографии с яркостью выше порогового значения. Эти пиксели и будут обозначать аксоны и тела

нейронов. После этого можно посчитать отношение площадей в катодной и анодной области и сделать выводы об эффективности электростимуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами было исследовано воздействие импульсного электрического поля на нейроны, полученные из ИПСК человека, и были сделаны следующие выводы:

- 1) Была собрана и провалидирована система электростимуляции нейронов человека, при помощи которой можно изучать действие электрического поля на рост аксонов. Представлен способ для количественной оценки этого изменения.
- 2) Импульсный ток с частотой 50 Гц и амплитудой до 220 мВ/мм обладает способностью влиять на направление роста аксонов: наблюдается более интенсивный рост аксонов в катодном направлении. Механизм действия еще не выявлен.
- 3) Импульсный ток с частотой 50 Гц и амплитудой до 220 мВ/мм не влияет на направление миграции нейробластов из нейросферы.

Таким образом, получена база для дальнейшего создания клеточных трансплантатов с направленной ориентацией нервных волокон для лечения травм периферических нервов. В следующем году планируется работа на мышинных моделях травмы периферического нерва.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors//Cell – 2006 – Vol. 126. №4. - P.663 – 676.
- 2 Kondo, T., Funayama, M., Tsukita, K., Hotta, A., Yasuda, A., Nori, S., Inoue, H. Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice//Stem Cell Reports – 2014 – Vol. 3. №2. - P.242 – 249.
- 3 Namestnikova D.D., Tairova R.T., **Sukhinich K.K.**, Cherkashova E.A., Gubskiy I.L., Gubskiy L.V., Yarygin K.N. Cell therapy for ischemic stroke. Stem cell types and results of pre-clinical trials // Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova. 2018. V. 118 (9 Is/ 2). P. 69-75. DOI: 10.17116/jnevro201811809269. - Наместникова Д.Д., Таирова Р.Т., **Сухинич К.К.**, Черкашова Э.А., Губский И.Л., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. Клеточная терапия ишемического инсульта. типы стволовых клеток и результаты доклинических исследований // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018 Т. 118. № 9-2. С. 69-75. DOI: 10.17116/jnevro201811809269.
- 4 Yarygin K.N., Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., Gabashvili A.N., **Sukhinich K.K.**, Melnikov P.A., Vakhrushev I.V., Yarygina N.K. Effects of mesenchymal stromal cells and neural progenitor cells derived from them by direct reprogramming in experimental ischemic stroke//Human Gene Therapy. 2018. V. 29. N. 12. P. 87. WOS:000453707700278.
- 5 Yuan, T., Liao, W., Feng, N.-H., Lou, Y.-L., Niu, X., Zhang, A.-J., Deng, Z.-F. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion//Stem Cell Research & Therapy – 2013 - Vol. 4, №3. - P 73.
- 6 Yamashita, M. Electric axon guidance in embryonic retina: Galvanotropism revisited//Biochemical and Biophysical Research Communications – 2013 - Vol. 431.
- 7 Yamashita, M. Weak electric fields serve as guidance cues that direct retinal ganglion cell axons in vitro//Biochemistry and Biophysics Reports – 2015 – Vol 4. P. 83 – 88.
- 8 Artyuhov AS, Abdyev VK, Meshcheryakova NV, Dashinimaev EB. Self-organized 3D neural organoids derived from Down syndrome IPS cells are representative model of early stages of Alzheimer's disease//Biomembranes 2018 International Conference – 2018 - DOI: 10.13140/RG.2.2.14995.94249.

9 Lubinets AA, Artyuhov AS, Dashinimaev EB. Markers of gene expression imbalance for the model of Down syndrome in vitro//Biomembranes 2018 International Conference – 2018 - DOI: 10.13140/RG.2.2.18351.38566.

10 Дашинимаев Э.Б., Артюхов А.С., Мещерякова Н.В., Василенко Ю.С., Гольцова А.С., Щепетов Д.М., Воротеляк Е.А., Васильев А.В. Нокаут генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека при помощи системы *crispr/cas9* и отбор клонов при помощи различных методов скрининга //Монография «Редактирование генов и геномов: Том 3» - 2018. — Глава 32, стр. 117-146. - ISBN 978-5-7692-1578-0 - УДК 575 - ББК 28.04 Р33

ПРИЛОЖЕНИЕ

В пункте 4.2 приводится описание использованного метода для оценки величины площади, занимаемой центром нейросферы, зонами миграции и роста. Как видно, ограничительные линии проводились от руки при помощи обычного графического редактора, после чего, используя контур этих линий, вычислялись площади зон — число пикселей, попавших внутрь.

При ознакомлении с этим методом могут возникнуть сомнения в его точности. На самом деле, по фотографиям можно довольно чётко различить границы зон:

- центр нейросферы — самое плотное скопление нейронов, имеет явно очерченные границы,
- зона миграции — в ней сосредоточено большинство мигрировавших из центра нейросфера клеток,
- зона роста — в ней содержится большинство окончаний аксонов и почти не присутствуют тела нейронов.

Описанный метод измерения площади довольно трудоёмок: вначале нужно разметить границы зон на фотографиях, а затем произвести измерение площади. Алгоритмизировав этот процесс, можно добиться ускорения процедуры обработки результатов. Ниже предлагаем возможный алгоритм для подсчёта площадей зон по фотографии.

Первым этапом необходимо, как и прежде, произвести разметку зон вручную. В силу качества фотографий, полученных методом фазового контраста, не представляется возможным качественно интерпретировать результаты и перевести их в расположение зон миграции и роста на программном уровне. Дальнейшие этапы выполняются при помощи программы.

Второй этап заключается в том, что необходимо задать координаты чисел контура. Это возможно сделать, попиксельно анализируя фотографию и сравнивая цвет каждого пикселя с референсным цветом зон — белым, зелёным и красным. Возможно, от белого цвета придётся отказаться в пользу, скажем, синего, чтобы избежать возможных ошибок.

Третий этап — нахождение центра полученной области, ограниченной контуром. Здесь важно определиться с тем, что мы считаем за центр области.

Центром x области D , ограниченной контуром Γ , можно считать точку, сумма квадратов расстояний от которой до точек контура Γ минимально:

$$x: f(x) = \int_{\Gamma} \rho^2(x, t) dl \rightarrow \min_{x \in R^2},$$

где $\rho(x, t)$ — расстояние от точки x до точки $t \in \Gamma$, dl — элемент длины контура.

Четвёртый этап. После нахождения центра области D можно ввести понятие радиуса R этой области и приблизить контур Γ окружностью. Для этого нужно сгенерировать k отрезков, одним концом имеющих точку x , а другим — точку $t_k \in \Gamma$. Усреднив их длину, найдём радиус области D :

$$R = \frac{\sum_{i=1}^k \rho(x, t_i)}{k}.$$

Теперь контур Γ можно приблизить окружностью радиуса R . Нейросферы (как их центр, так и зоны миграции и роста в обычных условиях) имеют круглую форму, поэтому это приближение соответствует действительности.

Итак, после четырёх этапов мы имеем три окружности разного радиуса и, вообще говоря, с разными центрами x_1, x_2 и x_3 . В предположении о том, что миграция происходит со всех сторон нейросферы одинаково, естественно предположить, что центры этих окружностей нужно усреднить. Этого можно добиться следующей процедурой.

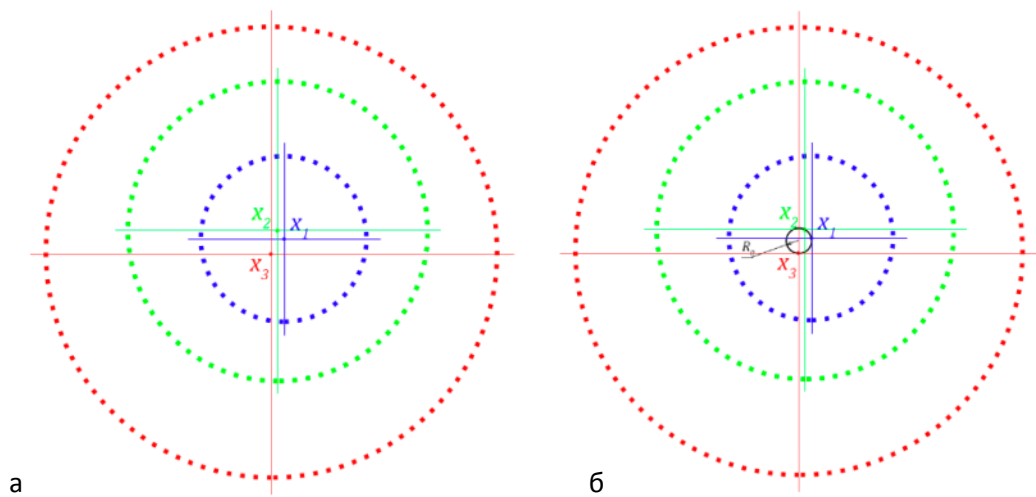


Рис. П1. Окружности, которыми были приближены центр нейросферы (синяя), зона миграции (зелёная) и зона роста (красная).

Естественно предположить, что общий центр должен находиться между тремя нынешними центрами, а именно — должен быть равноудалён от них. Проведя перпендикуляры к отрезкам, соединяющим центры окружностей, найдём центр описанной вокруг треугольника окружности — он и будет общим искомым центром (Рис. П1, а).

Помимо этого, радиус этой окружности есть та погрешность, с которой мы его определили (Рис. П1, б).

Зная радиусы окружностей, мы можем найти площади центра нейросферы, зоны миграции и зоны роста, и посчитать необходимые отношения. Погрешность определения площади будет пропорциональна R_0^2 . Среднеквадратичные отклонения в таком случае:

$$S_{\text{мигр}} = \sigma_{\text{мигр}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\left(\frac{S_{\text{мигр}}}{S_{\text{центр}}} \right)_i - \left\langle \frac{S_{\text{мигр}}}{S_{\text{центр}}} \right\rangle \right)^2}$$

$$S_{\text{рост}} = \sigma_{\text{рост}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\left(\frac{S_{\text{рост}}}{S_{\text{центр}}} \right)_i - \left\langle \frac{S_{\text{рост}}}{S_{\text{центр}}} \right\rangle \right)^2}$$

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД*

*отчетные публикации по Государственному заданию 0108-2018-0010

1 *Namestnikova D.D., Tairova R.T., **Sukhinich K.K.**, Cherkashova E.A., Gubskiy I.L., Gubskiy L.V., Yarygin K.N. Cell therapy for ischemic stroke. Stem cell types and results of pre-clinical trials // Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2018. V. 118 (9 Is/ 2). P. 69-75. DOI: 10.17116/jnevro201811809269. - Наместникова Д.Д., Таирова Р.Т., **Сухинич К.К.**, Черкашова Э.А., Губский И.Л., Губский Л.В., Ярыгин К.Н. Клеточная терапия ишемического инсульта. типы стволовых клеток и результаты доклинических исследований // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018 Т. 118. № 9-2. С. 69-75. DOI: 10.17116/jnevro201811809269.

2 *Yarygin K.N., Namestnikova D.D., Gubskiy I.L., Revkova V.A., Gabashvili A.N., **Sukhinich K.K.**, Melnikov P.A., Vakhrushev I.V., Yarygina N.K. Effects of mesenchymal stromal cells and neural progenitor cells derived from them by direct reprogramming in experimental ischemic stroke//Human Gene Therapy. 2018. V. 29. N. 12. P. 87. WOS:000453707700278.

3 Artyuhov AS, Abdyev VK, Meshcheryakova NV, **Dashinimaev EB.** Self-organized 3D neural organoids derived from Down syndrome IPS cells are representative model of early stages of Alzheimer's disease//Biomembranes 2018 International Conference – 2018 - DOI: 10.13140/RG.2.2.14995.94249.

4 Lubinets AA, Artyuhov AS, **Dashinimaev EB.** Markers of gene expression imbalance for the model of Down syndrome in vitro//Biomembranes 2018 International Conference – 2018 - DOI: 10.13140/RG.2.2.18351.38566.

5 ***Дашинимаев Э.Б.**, Артюхов А.С., Мещерякова Н.В., **Василенко Ю.С.**, Гольцова А.С., **Щепетов Д.М.**, **Воротеляк Е.А.**, **Васильев А.В.** Нокаут генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека при помощи системы crispr/cas9 и отбор клонов при помощи различных методов скрининга //Монография «Редактирование генов и геномов: Том 3» - 2018. — Глава 32, стр. 117-146. - ISBN 978-5-7692-1578-0 - УДК 575 - ББК 28.04 Р33

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.