

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И
КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



РАЩУПКИН ИВАН МИХАЙЛОВИЧ

**НЕЙРОРЕГУЛЯТОРНЫЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ
СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ M2 МАКРОФАГОВ *IN VITRO* И *IN VIVO***

3.2.7. – "Иммунология"

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д-р мед. наук

Шевела Екатерина Яковлевна

Новосибирск 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Макрофаги.....	12
1.1.1. Происхождение макрофагов. Резидентные макрофаги и макрофаги моноцитарного происхождения.	12
1.1.2. Дифференцировка и поляризация макрофагов	13
1.1.3. Подходы к классификации макрофагов. Идентификация фенотипов.....	15
1.1.4. Общие свойства макрофагов	16
1.1.5. Фенотипическая гетерогенность макрофагов	17
1.2. Макрофаги в ЦНС в физиологических и патологических условиях	23
1.2.1. Макрофаги в ЦНС в физиологических условиях: микроглия и пограничные макрофаги	23
1.2.2. Микроглия и макрофаги в ЦНС в условиях патологии	25
1.3. Нейрорегенерация	28
1.3.1. Изменение представлений о регенерации нервной ткани. Виды нейрорегенерации	28
1.3.2. Внутриклеточная нейрорегенерация	30
1.3.3. Клеточная нейрорегенерация	34
1.4. Подходы к исследованию нейрорегенерации	37
1.4.1. <i>In vitro</i>	37
1.4.2. <i>In vivo</i> . Моделирование депрессии	42
1.5. Гипотезы формирования депрессивного расстройства	44
1.6. Иммунопатогенез нейропатологии	48
1.6.1. M1 и M2 макрофаги в нейропатологии	48
1.6.2. Переключение M1/M2 как подход к терапии заболеваний ЦНС. Клеточная терапия.	51

1.7. M2-макрофаги как клеточная платформа для индукции нейрорегенерации	54
1.7.1. Применение M2-макрофагов для терапии заболеваний ЦНС ..	54
1.7.2. Использование факторов, продуцируемых макрофагами, при патологии ЦНС	55
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
2.1. Генерация макрофагов	57
2.2. Культивирование клеток SH-SY5Y	58
2.3. Схема экспериментов <i>in vitro</i>	59
2.4. Оценка пролиферативной активности, клеточного выхода, жизнеспособности и дифференцировки клеток SH-SY5Y	60
2.5. Формирование депрессивноподобного состояния у мышей и схема терапии растворимыми факторами M2(LS) макрофагов	61
2.6. Оценка поведенческого паттерна мышей	62
2.7. Определение уровня цитокинов в головном мозге мышей	63
2.8. Оценка относительной нейрональной плотности и уровня экспрессии IBA-1 в головном мозге мышей	64
2.9. Статистическая обработка результатов	65
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	66
3.1. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y	66
3.2. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y..	74
3.3. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y	78
3.4. Влияние растворимых факторов M2(LS) макрофагов человека на поведенческий паттерн депрессивноподобных мышей	85

3.5. Влияние растворимых факторов M2(LS) макрофагов человека на выраженность воспаления и нейрональную плотность в головном мозге депрессивноподобных мышей	89
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, обладающих выраженной пластичностью, т.е. способностью менять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения [Huang X., et al., 2018]. Пластичность макрофагов позволяет этим клеткам осуществлять достаточно тонкую регуляцию различных процессов в организме, в частности, макрофаги играют ключевую роль в запуске и опосредовании нейрорегенераторных процессов. Однако вопросы регуляции нейрорегенераторных процессов, как в целом, так и в контексте роли макрофагов изучены недостаточно. Показано, что M1 макрофаги/микроглия имеют провоспалительные свойства и могут опосредовать не только защитную функцию, но и нейротоксические эффекты, в то время как M2 клетки обладают противовоспалительной активностью и продуцируют широкий спектр цитокинов, способных в экспериментальных моделях усиливать нейрогенез, стимулировать рост аксонов и образование новых синапсов [Hu et al., 2015]. Тем не менее, нейрорегуляторные эффекты различно активированных макрофагов человека на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза нейтральных стволовых клеток (НСК) остаются практически неизученными. Подавляющее большинство работ ограничено исследованием макрофагов с M1(LPS/IFN- γ) и M2a (IL-4) фенотипом, в то время как разнообразие этих клеток значительно шире. В частности, большой интерес представляют макрофаги, поляризованные в M2 фенотип взаимодействием с апоптотическими клетками. Ранее нами был разработан оригинальный протокол генерации M2 макрофагов в условиях дефицита сывороточных факторов [M2(LS, LowSerum)], характеризующихся высоким уровнем продукции противовоспалительных цитокинов и ростовых/трофических факторов [Chernykh et al., 2010]. Учитывая, что эффероцитоз имеет важнейшее значение при патологии в разрешении воспаления и поддержании тканевого гомеостаза, мы предположили, что данный тип макрофагов будет характеризоваться высокой

нейрорегуляторной и противовоспалительной активностью.

Возможности изучения роли макрофагов и их секреторных продуктов в регуляции функций НСК у человека существенно ограничены в связи с индивидуальной гетерогенностью генерируемых макрофагов, а также с высокой сложностью получения стабильных первичных культур НСК. Поэтому витральные исследования влияния различных клеток и факторов на функции НСК традиционно проводят в культурах клеточных линий нейтральных предшественников. Для сравнительного исследования нейрорегуляторной активности секреторных факторов макрофагов нами была выбрана линия SH-SY5Y, клетки которой экспрессируют специфические для НСК маркеры (нестин, даблкортин), наряду с пролиферацией способны дифференцироваться в адренергические, холинергические и дофаминергические нейроны и широко используются для оценки нейротоксичности и нейропротективных свойств различных субстанций [Ferlemann et al., 2017; Kovalevich et al., 2021; Xie et al., 2010]. Для исследования реализации нейрорегуляторного и противовоспалительного эффекта секреторных факторов макрофагов *in vivo* планировалось использовать модель стресс-индуцированной депрессии у мышей. Патогенез депрессии, которая в настоящее время является одной из наиболее значимых медикосоциальных проблем, связан с нарушением нейротрансмиттерного метаболизма, образованием нейротоксинов, снижением продукции нейротрофических факторов и нейродегенерацией, что во многом обусловлено нейровоспалением и подавлением нейрогенеза. [Miller, Raison, 2016]. Поскольку M2 макрофаги проявляют противовоспалительную активность и характеризуются относительно высоким уровнем секреции нейротрофических факторов, смещение баланса M1/M2 в сторону M2 фенотипа представляет одну из новых стратегий в терапии нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний [Lu et al., 2023, Chernykh et al., 2010]. В то же время, эффекты различных фенотипов M2 макрофагов и их секреторных продуктов в моделях различных нейропатологий охарактеризованы явно недостаточно. Учитывая

вышесказанное, изучение влияния секретома макрофагов с различным функциональным фенотипом на нейровоспалительные, нейрорегенераторные процессы и, в частности, нейрогенез представляется достаточно актуальным.

Цель исследования: оценить эффекты секреторных факторов различно активированных макрофагов человека на функции нейральных предшественников в условиях повреждающих воздействий *in vitro* и изучить влияние наиболее эффективного секреторного продукта в модели стресс-индуцированной депрессии *in vivo*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Оценить влияние растворимых факторов GM-CSF-дифференцированных макрофагов человека, поляризованных IFN- γ , IL-4 и взаимодействием с апоптотическими клетками [M2(LS)], на пролиферативную активность нейральных предшественников линии SH-SY5Y в условиях, индуцирующих повреждение клеток (депривация сыворотки, гипоксия) *in vitro*.
2. Оценить влияние растворимых факторов M1(IFN- γ), M2a(IL-4) и M2(LS) макрофагов на выживаемость клеток линии SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и гипоксии *in vitro*.
3. Оценить влияние растворимых факторов M1(IFN- γ), M2a(IL-4) и M2(LS) макрофагов на дифференцировку клеток линии SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и гипоксии *in vitro*.
4. Изучить влияние интраназального введения растворимых факторов M2(LS) макрофагов на поведенческие паттерны мышей в модели стресс-индуцированной депрессии.
5. Оценить влияние интраназального введения растворимых факторов M2(LS) макрофагов на выраженность воспаления и активность нейрогенеза во фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе мышей в модели стресс-

индуцированной депрессии.

Научная новизна

Впервые установлено, что растворимые факторы GM-CSF-дифференцированных макрофагов человека, поляризованных IFN γ [M1(IFN- γ)], IL-4 [M2a(IL-4)] и через механизм эффероцитоза [M2(LS)], стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейтральных клеток SH-SY5Y в условиях действия повреждающих факторов (депривация ростовых/сывороточных факторов и комбинация депривации и CoCl₂-индуцированной гипоксии). При этом в условиях комбинированного воздействия депривации и гипоксии наиболее выраженный эффект на пролиферацию/дифференцировку клеток SH-SY5Y характерен для M2(LS) макрофагов, поляризованных через механизм эффероцитоза. Также показано, что в условиях комбинированного повреждения способность усиливать выживаемость нейтральных клеток SH-SY5Y свойственна исключительно для растворимых факторов M2(LS) макрофагов. Впервые продемонстрировано, что курсовое интраназальное введение секреторных факторов M2(LS) макрофагов мышам в модели стресс-индуцированной депрессии приводит к значимой коррекции поведенческого паттерна, что проявляется снижением уровня тревожности и ангедонии, а также усилением ориентировочно-исследовательской и двигательной активности животных. Корректирующий эффект растворимых факторов M2(LS) макрофагов ассоциируется со снижением уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ), экспрессии маркера активации микроглии/макрофагов (IBA-1), а также повышением нейрональной плотности в патогенетически значимых структурах головного мозга мышей (фронтальной коре и гиппокампе). Полученные данные в целом свидетельствуют о нейрорегуляторной и иммуномодулирующей активности макрофаги человека M2 фенотипа, поляризованные через механизм эффероцитоза.

Теоретическая и практическая значимость

Сравнительный анализ влияния секреторных факторов макрофагов, дифференцированных в присутствии GM-CSF и поляризованных различными стимулами ($\text{IFN}\gamma$, IL-4, апоптотическими клетками), на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников линии SH-SY5Y в условиях действия повреждающих факторов (депривация и гипоксия) расширяет представления о нейрорегуляторном потенциале различных функциональных фенотипов макрофагов человека и позволяет сделать заключение, что активация макрофагов через механизм эффероцитоза индуцирует наиболее выраженные нейропротективные и нейрорегенераторные свойства. Установлено, что различия в нейрорегуляторной активности секреторных факторов макрофагов с M1, M2a и M2(LS) фенотипом наиболее ярко проявляются при более выраженном и длительном повреждении нейральных предшественников. Исследования эффектов интраназального введения растворимых факторов M2(LS) в модели стресс-индуцированной депрессии свидетельствуют о том, что антидепрессивный эффект сопряжен с ослаблением нейровоспаления и увеличением нейрональной плотности в фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе мышей. При этом возможность коррекции поведенческого паттерна после курсового интраназального введения растворимых факторов M2(LS) обосновывает возможность использования секрета M2-поляризованных макрофагов в качестве новой молекулярной платформы лечения поведенческих расстройств, а также воспалительных и дегенеративных заболеваний нервной системы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Растворимые факторы активированных макрофагов человека в модели повреждений клеток линии SH-SY5Y стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников, причем в условиях продолжительного действия комбинации депривации сыворотки и гипоксии наибольшей стимулирующей активностью обладают макрофаги M2 фенотипа,

поляризованные через механизм эффероцитоза [M2(LS)].

2. Интраназальное введение секреторных факторов M2(LS) в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей оказывает антидепрессивный, противовоспалительный и нейрорегенераторный эффекты.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 142 страницах машинописного текста, включающего 5 таблиц и 18 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 272 литературных источника.

Степень достоверности результатов и личное участие автора

Результаты получены с использованием высокоинформативных современных методов исследования *in vivo* и *in vitro*. Выборка экспериментальных животных и объём материала являются достаточными для адекватного статистического анализа, что позволяет с высокой степенью достоверности обосновать полученные результаты. Все работы, проведенные в рамках исследования, выполнены лично автором или при его непосредственном участии на базе лабораторий клеточной иммунотерапии и нейроиммунологии НИИФКИ.

Апробация материалов

Материалы исследования были доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2020, 2021 и 2022 годах, доложены в виде онлайн-доклада на всероссийском конгрессе с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (г. Томск, 2022 г). Также материалы работы были представлены в виде очного доклада на Объединенном иммунологическом форуме 2024 (Пушкинские горы, 2024 г).

Апробация диссертации состоялась 10 октября 2024 г на семинаре ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Макрофаги

1.1.1. Происхождение макрофагов. Резидентные макрофаги и макрофаги моноцитарного происхождения.

Макрофаги стратегически распределены по всему организму как врожденные иммунные клетки, находящиеся в тканях. Эти клетки выполняют жизненно важную гомеостатическую роль как мощные фагоциты, которые удаляют вторгающиеся патогены и эндогенные вещества, такие как апоптотические клетки, умирающие эритроциты, бета-амилоид и поверхностно-активные вещества, для поддержания нормальной функции органов. Макрофаги являются крайне гетерогенными клетками, которые могут быстро менять свою функциональную активность в ответ на локальные сигналы микроокружения. Они имеют чрезвычайно пластичную природу *in vivo* и задействованы во многих заболеваниях человека, выполняя как защитные, так и патогенные функции. Исследования в области разработки клеточной терапии на основе макрофагов в основном сосредоточены на способности макрофагов регулировать регенерацию тканей и очищать организм от опухолевых клеток или патогенов [Na et al., 2023].

Макрофаги представлены в большинстве органов двумя типами клеток: резидентными местными макрофагами и макрофагами моноцитарного происхождения. Первые имеют происхождение из желточного мешка, заселяют ткани во время эмбриогенеза и в дальнейшем онтогенезе способны к самовоспроизведению *in situ* [Hashimoto et al., 2013]. В частности, к этому виду макрофагов относятся так называемые тканеспецифичные специализированные макрофаги, присутствующие во многих органах, например, клетки Купфера в печени, микроглиальные клетки в ЦНС, альвеолярные макрофаги в легких и т.д. [Lazarov et al., 2023]. Макрофаги моноцитарного происхождения, в свою очередь, дифференцируются из мигрировавших из кровеносного русла в ткани моноцитов. Моноциты происходят из общих миелоидных предшественников, локализующихся в

костном мозге, которые в процессе дифференцировки проходят стадии миелобластов, монобластов и промоноцитов. Миграция моноцитов в ткани и дифференцировка их в макрофаги значительно интенсифицируется при воспалении [Герасимова, Попкова, 2018]. Макрофаги моноцитарного происхождения при этом восполняют недостаток количества и функциональной активности резидентных макрофагов, активируя их и способствуя их пролиферации [Лохонина и др., 2018].

1.1.2. Дифференцировка и поляризация макрофагов

Для дифференцировки моноцитов в макрофаги необходимо присутствие дифференцировочных стимулов: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) или макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF). *In vitro* макрофаги, дифференцированные посредством GM-CSF и M-CSF в отсутствие других стимулов, различаются по своему секреторному профилю: первые отличаются значительно более высокой экспрессией мРНК TNF- α , в то время как вторые более активно экспрессируют мРНК IL-10 [Fleetwood et al., 2007]. Кроме того, GM-CSF-дифференцированные макрофаги имеют в десятки раз более высокую аллостимуляторную активность в смешанной культуре лимфоцитов в сравнении с M-CSF [Fleetwood et al., 2007]. Также GM- и M-CSF-дифференцированные макрофаги значительно различаются по экспрессии некоторых генов и метаболическому статусу. Так, в GM-CSF-дифференцированных макрофагах преобладает путь утилизации аргинина до мочевины и орнитина, в то время как M-CSF-дифференцированные макрофаги продуцируют из аргинина цитруллин и оксид азота (NO). Наряду с этим, GM-CSF-дифференцированные макрофаги демонстрируют более высокую активность окислительного фосфорилирования, в то время как для M-CSF-макрофагов характерен гликолиз, в результате чего GM-CSF-макрофаги имеют больший запас энергии в виде АТФ [Zhang et al., 2023].

GM-CSF-дифференцированные макрофаги, таким образом, проявляют сравнительно высокие провоспалительные, а M-CSF – напротив, противовоспалительные свойства, что позволяет рассматривать эти макрофаги как про-M1 и про-M2 соответственно. Однако моновоздействие колониестимулирующего фактора не является достаточным для формирования определенного функционального фенотипа макрофагов, которое достигается взаимодействием макрофагов с различными факторами микроокружения, обозначаемыми как поляризующие стимулы. При этом, как GM-CSF-, так и M-CSF-дифференцированные макрофаги способны дифференцироваться в любой из множества различных функциональных фенотипов. Дифференцировочный фактор также во многом определяет свойства макрофага. Так, показано, что поляризованные липополисахаридом (ЛПС) GM-CSF-дифференцированные макрофаги продуцируют больше TNF- α и IL-6 и меньше IL-10 и CCL-2 в сравнении с M-CSF-дифференцированными клетками, при этом обе популяции экспрессируют M1-ассоциированные маркеры [Fleetwood et al., 2007].

Поскольку *in vivo* на моноцит/макрофаг всегда влияет множество различных стимулов, фенотип макрофага в конкретный момент времени определяется сочетанием, соотношением и степенью выраженности воздействия этих стимулов. При этом важно отметить, что характер активации макрофагов не является строго детерминированным, он нестабилен и пластичен: макрофаги способны изменять свой фенотип в ответ на сигналы, поступающие из микроокружения (воздействие новых поляризующих стимулов и/или изменение их соотношения), в том числе показана возможность трансформации M1-фенотипа в M2 и наоборот [Quero et al., 2020; He et al., 2020]. Таким образом, применительно к макрофагам в ткани или очаге воспаления *in vivo* некорректно говорить о каком-либо одном их конкретном фенотипе: популяция макрофагов, по-видимому, разнородна и пластична, микроокружение *in situ* лишь способствует сдвигу соотношения различных фенотипов макрофагов в ту или иную сторону.

1.1.3. Подходы к классификации макрофагов. Идентификация фенотипов

Для изучения свойств макрофагов *in vitro* принято выделять конкретные фенотипы макрофагов. Так, основными типами макрофагов, выделяемыми большинством исследователей, на сегодняшний день являются M1, M2a, M2b, M2c и M2d макрофаги. При этом признаётся существование промежуточных и переходных форм и иных фенотипов макрофагов. Определенный фенотип может индуцироваться различными поляризующими стимулами, например, формирование M1 фенотипа происходит под влиянием таких веществ, как ЛПС и цитокинов Т-хелперов 1 типа (IFN- γ , TNF). При этом генерированные макрофаги имеют M1 фенотип, но несколько различаются по своим свойствам, в частности, ЛПС-стимулированные макрофаги отличаются более высокой экспрессией генов, отвечающих за синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α), а также хемокинов (CXCL10, CXCL11, CCL17) [Nakamura et al., 2022]. В связи с такой гетерогенностью свойств даже в пределах одного фенотипа, в рамках современной классификации макрофагов предложено отказаться от указаний конкретного фенотипа, а вместо этого указывать используемый поляризующий стимул [Murray et al., 2014]. Однако общепринятой классификации макрофагов по сей день не существует: одни авторы до сих пор придерживаются устаревшей концепции M1/M2 дихотомии, другие обозначают фенотипы как M2a, M2b и т.д., третьи – указывают в скобках поляризующий стимул, например M(IL-4).

Важно в то же время отметить, что у человека идентификация конкретных функциональных фенотипов макрофагов представляет значительные трудности. Если для мышинных макрофагов определены поверхностные маркеры, позволяющие различить между собой подтипы, то для макрофагов человека такие маркеры не определены и, вероятнее всего, их не существует [Murray et al., 2014]. Тем не менее, уровень экспрессии некоторых маркеров на макрофагах с различным функциональным фенотипом неодинаков и исследование ряда маркеров позволяет определить доминирующую популяцию макрофагов в культуре. Наиболее

изученными при этом являются поверхностные молекулы, характерные для классически активированных (M1) и альтернативно активированных (M2a) макрофагов, в то время как другие фенотипы изучены в значительно меньшей степени. Наряду с этим, для идентификации функционального фенотипа может применяться исследование транскриптома, а также секреции цитокинов и хемокинов. Сочетание различных методов позволяет достаточно полно охарактеризовать фенотип изучаемых макрофагов.

1.1.4. Общие свойства макрофагов

Изначально, после открытия Мечниковым в конце XIX века, макрофаги рассматривались исключительно как клетки, осуществляющие фагоцитоз и защищающие организм от чужеродных элементов. В дальнейшем, однако, представления о роли этих клеток заметно расширялись и дополнялись. В настоящее время показано, что макрофаги выполняют множество важнейших функций. Так, они играют заметную роль в эмбриональном периоде, участвуя в дифференцировке клеток, элиминации апоптотических клеток, ангиогенезе. [Mezu-Ndubuisi, A. Maneshwari, 2021]. В постэмбриональном периоде макрофаги обеспечивают антигенный гомеостаз организма, элиминируя чужеродные антигены, участвуют в запуске, регуляции и опосредовании иммунных реакций [Wynn et al., 2013]. Особого внимания заслуживает участие макрофагов в регенерации тканей. Поскольку макрофаги обладают выраженной пластичностью, они, посредством тонкой настройки фенотипов под влиянием микроокружения, способны контролировать различные этапы восстановления при повреждении тканей. Так, в зависимости от фенотипа, макрофаги инициируют или подавляют воспалительную реакцию, оказывают про- или антифиброгенное действие. Кроме того, макрофаги элиминируют детрит, стимулируют ангиогенез, регулируют функции стволовых и паренхиматозных клеток. Таким образом, макрофаги являются ключевыми регуляторами всех этапов процесса восстановления ткани при её повреждении.

Далее рассмотрим различные фенотипы макрофагов (M1, M2a, M2b, M2c и M2d), включая поляризующие стимулы, маркёры, используемые для идентификации фенотипов, функциональную, в том числе секреторную активность макрофагов и роль в процессах регенерации.

1.1.5. Фенотипическая гетерогенность макрофагов

M1

На начальных этапах повреждения ткани или инфекции в очаге преобладают M1 макрофаги. Основная функция таких макрофагов – уничтожение патогенных микроорганизмов и индукция воспалительной реакции. Они секретируют провоспалительные медиаторы и активные формы кислорода и азота, генерируемые NADPH-оксидазой и iNOS. В то же время M1 макрофаги подавляют процессы регенерации и заживления ран и могут быть охарактеризованы как тканедеструктивные. Наиболее широко используемыми факторами, индуцирующими формирование M1 фенотипа *in vitro*, являются ЛПС, IFN- γ или их комбинация [Ruytinx et al., 2018]. При этом ключевую роль в M1 поляризации макрофагов человека играет транскрипционный фактор pSTAT1 и гетеродимер pSTAT1/2, а также IRF5 и в меньшей степени — IRF1 [Никонова и др., 2017; Chistiakov et al., 2018; Tugal et al., 2013]. M1 макрофаги высоко экспрессируют молекулы, задействованные в процессах активации Т-лимфоцитов: CD80/CD86, CD40, МНСII, CD64 [21]. В секреторном профиле M1 макрофагов преобладают провоспалительные цитокины: IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-23 [Mosser, Edwards, 2008]; наряду с этим, M1 демонстрируют низкий уровень продукции противовоспалительного цитокина IL-10 и циклооксигеназы COX-2.

M2a

M2a фенотип макрофагов часто рассматривают как оппозитный к M1. Действительно, M2a макрофаги, подобно другим M2 клеткам, обладают противовоспалительной активностью, участвуют в васкулогенезе, восстановлении и

ремоделировании тканей. M2a проявляют более выраженную в сравнении с M1 способность к фагоцитозу патогенов и клеточного дебриса. Кроме того, M2a задействованы в патогенезе аллергических реакций и гельминтозов, поскольку они индуцируют Th2-опосредованный иммунный ответ [Abdelaziz et al., 2020]. Для поляризации макрофагов в M2a фенотип *in vitro* наиболее часто используется IL-4, а также его комбинация с IL-13 [Vogel et al., 2014; Huang et al., 2018]. Центральную роль в формировании M2a фенотипа у человека играют pSTAT1, IRF4, гистон-деметилаза, содержащая домен Jumonji-3 (Jdjd3) и SOCS белок 1 (SOCS1) [Никонова и др., 2017; Chistiakov et al., 2018]. Для M2a макрофагов характерна повышенная экспрессия рецепторов, связанных с фагоцитозом: маннозного рецептора (CD206), scavenger-рецепторов (CD163, CD36), C-лектинового рецептора DC-SIGN (CD209) [Liu et al., 2022; Lugo-Villarino et al., 2018]. Для M2a мыши определены специфические маркеры – поверхностные Ym1/2 и FIZZ1 [Raes et al., 2002], а также высокая экспрессия аргиназы-1 [Murray et al., 2014]. В секреторном профиле M2a преобладают цитокины с противовоспалительной активностью: IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13 [Shapouri-Moghaddam et al., 2018]. Показана высокая профиброгенная активность M2a макрофагов, опосредуемая через CCL2, который является хемоаттрактантом для фиброцитов [Sun et al., 2011].

M2b

Описанные выше M1 (также обозначаются как "классически активированные" макрофаги) и M2a (так называемые "альтернативно активированные" макрофаги) являются наиболее полно охарактеризованными фенотипами макрофагов, в то время как другие фенотипы изучены в значительно меньшей степени, а имеющиеся данные зачастую противоречивы. Известно, что макрофаги с фенотипом M2b (в отношении которых иногда употребляется термин "регуляторные макрофаги") проявляют иммунорегуляторную активность, в частности, способность активировать Th2-лимфоциты, а также высокую фагоцитарную активность [Никонова и др., 2017; Wang

et al., 2019]. Показано участие M2b в супрессии иммунного ответа при опухолях и алкоголизме, которая ассоциируется с развитием инфекций [Tsuchimoto et al., 2015]. Кроме того, M2b обладают репаративной активностью, например, участвуют в регенерации спинного мозга в модели спинномозговой травмы и миокарда в модели ишемии/реперфузии [Gensel, Zhang, 2015; Yue et al., 2017]. Этот фенотип макрофаги приобретают при взаимодействии с иммунными комплексами в сочетании с агонистами TLR или IL-1 β [Wang et al., 2019]. Среди транскрипционных факторов, которые принимают участие в поляризации M2b, ключевую роль играет AP1 [Palma et al., 2018]. M2b человека высоко экспрессируют CD86, сфингозин-киназу 1 (SPHK1), МНСII, однако эти маркеры не являются для них строго специфичными [Wang et al., 2019]. Для M2b макрофагов мыши специфичным является маркер TNFSF14 (LIGHT) [Yue et al., 2020]. Важной характеристикой M2b является одновременно высокая продукция IL-10 и низкая – IL-12, что может служить для их идентификации [Wang et al., 2019]. В то же время, способность секретировать IL-10 на высоком уровне ряд авторов считают характерной и для других M2 макрофагов – M2c и M2d. Помимо противовоспалительного IL-10, M2b активно продуцируют цитокины с преимущественно провоспалительной активностью – IL-1 β , IL-6, TNF α , а также хемокины CCL1 и CCL2 [Wang et al., 2019].

M2c

M2c (также обозначаемые как "деактивированные" макрофаги) обладают выраженной противовоспалительной активностью, участвуют в разрешении воспаления, ремоделировании ткани, ангиогенезе [Gensel, Zhang, 2015; Bijarchian et al., 2021]. В некоторых исследованиях показана ассоциация M2c поляризации макрофагов с прогрессией опухолевого процесса [38]. Сигналами для генерации M2c макрофагов являются глюкокортикостероиды (наиболее часто используется дексаметазон), IL-10, TGF- β [Kim et al., 2019]. Некоторые исследователи разделяют макрофаги, генерированные в присутствии дексаметазона и дексаметазона

совместно с TGF- β на два разных подтипа [Murray et al., 2014]. M2c макрофаги высоко экспрессируют MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), CD163, MER тирозин киназу (MerTK), CD206. Транскрипционным фактором в сигнальном каскаде для мышинных M2c является pSTAT3, в то время как для Mф человека механизмы транскрипции остаются во многом неизученными [Abdelaziz et al., 2020, Tsuchimoto et al., 2015]. Предполагается участие белка SOCS3, экспрессия гена которого возрастает при M2c поляризации [Lurier et al., 2017]. M2c макрофаги характеризуются активной продукцией противовоспалительных цитокинов, в частности, IL-10 и TGF- β [Yang et al., 2020, Tang et al., 2017]. Имеются также данные о высокой продукции макрофагами этого фенотипа как матриксных металлопротеиназ (MMP7, MMP-8), так и их тканевого ингибитора (TIMP-1), что свидетельствует об их участии в процессах накопления и деградации внеклеточного матрикса и, как следствие, ремоделировании ткани [Lurier et al., 2017].

M2d и другие фенотипы M2 макрофагов

M2d клетки являются наименее изученными из всех выделяемых по стандартной классификации фенотипов макрофагов. Показана иммуносупрессорная активность M2d, а также ассоциация макрофагов этого фенотипа с опухолевой прогрессией [Zhang, Sioud, 2023]. M2d обозначают как "опухоль-ассоциированные макрофаги", однако, в микроокружении опухолей, по всей видимости, встречаются макрофаги с различным фенотипом [Zhang, Sioud, 2023]. M2d обладают низкой костимуляторной активностью и подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов [Dulus et al., 2007, Fu et al., 2017]. Поляризующими факторами для M2d макрофагов являются IL-6, аденозин, LIF (leukemia inhibitory factor) [Huang et al., 2018, Zhang, Sioud, 2023]. Маркеры M2d фенотипа малоизучены, показана высокая экспрессия CD14, CD163 и низкая CD86 и CD206 [Zhang, Sioud, 2023; Ferrante, Leibovich, 2023]. M2d активно секретируют TGF- β и IL-10, кроме того данный фенотип отличает высокий уровень продукции VEGF и CCL18 [Zhang, Sioud, 2023; Krzyszczyk et al., 2018].

Помимо вышеперечисленных, описаны некоторые уникальные для конкретных патологических состояний фенотипы, не входящие в общепринятую классификацию. Так, активное изучение роли макрофагов в атеросклеротическом процессе позволило описать макрофаги, находящиеся в атеросклеротических бляшках и вовлеченные в патогенез атеросклероза, обозначенные как Mox (oxidized phospholipid-derived macrophages, индуцируемые окисленным фосфолипидом), а также ассоциированные с онкологической патологией M4-макрофаги, индуцируемые CCL4 [Li et al., 2022].

M2(LS)

Среди многочисленных сигналов, влияющих на формирование функционального фенотипа макрофагов, особого внимания заслуживает эффероцитоз [Johnson, DiPietro, 2013; Chernykh et al., 2010]. Эффероцитоз, то есть процесс поглощения апоптотических клеток профессиональными и непрофессиональными фагоцитирующими клетками, имеет важнейшее значение для поддержания тканевого гомеостаза. Этот процесс непрерывно протекает и в физиологических условиях, поскольку обновление клеточного состава происходит постоянно, и в условиях патологии, причём в последнем случае значительно интенсифицируется. Ключевыми клетками, осуществляющими эффероцитоз, являются макрофаги [Doran et al., 2020]. Накопленные за последние пару десятилетий данные позволяют с уверенностью утверждать, что эффероцитоз индуцирует M2-поляризацию макрофагов [Fadok et al., 1998; Kiseleva et al., 2023]. Макрофаги, осуществляющие поглощение апоптотических клеток, приобретают противовоспалительный фенотип, обладают повышенной фагоцитарной активностью и способствуют разрешению воспаления [Lin et al., 2022; Rey-Giraud et al., 2012]. Тем не менее, фенотип и свойства макрофагов, активированных/поляризованных взаимодействием с апоптотическими клетками, охарактеризованы в значительно меньшей степени в сравнении с другими фенотипами. В конце 2000-х годов в лаборатории клеточной иммунотерапии

НИИФКИ был разработан оригинальный протокол генерации макрофагов, в котором M2 фенотип индуцируется взаимодействием моноцитов с апоптотическими клетками в условиях депривации сывороточных факторов. Дефицит сыворотки (LowSerum, LS) выступает в качестве повреждающего проапоптогенного фактора. В результате взаимодействия моноцитов с апоптотическими клетками формируется M2-фенотип моноцитов/макрофагов – M2(LS). Макрофаги, генерированные посредством данного протокола: 1) экспрессируют M2-ассоциированные и проапоптогенные молекулы (TRAIL, FasL, B7-H1), а также маркеры, ассоциированные с иммуносупрессией (Arginase 1, Mer TK); 2) характеризуются низкой способностью стимулировать пролиферацию Т-лимфоцитов и практически не активируют продукцию Th1/Th17 цитокинов в смешанной культуре лейкоцитов; 3) продуцируют широкий спектр биомолекул (проанализировано содержание 62 аналитов), включая цитокины из разных функциональных групп, хемокины, протеазы, а также значительное количество ростовых факторов, в том числе с проангиогенной и нейротрофической активностью (рисунок 1). При этом в сравнении с M1 макрофагами генерируемые M2 макрофаги продуцируют гораздо меньшие количества провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IFN γ , IL-18, IL-8, MCP-1) и более высокие уровни ряда факторов с супрессорной (TGF- β), нейротрофической (IGF-1, EPO) и проангиогенной (IGF-1, EPO) активностью [Chernykh et al., 2010; Sakhno et al., 2016].

Совокупность данных свойств позволила предположить, что M2(LS) макрофаги могут обладать нейропротективными и нейрорегенераторными свойствами. Действительно, пилотные клинические испытания [NCT02957123, *clinicaltrials.gov*], проведенные в группе 52 пациентов с цереброваскулярной патологией, показали, что 30-дневный курс интраназальных ингаляций растворимыми факторами M2-макрофагов хорошо переносился и не вызывал каких-либо тяжелых нежелательных явлений, побочных реакций или неврологического ухудшения. Более того, уже через 1 мес после начала терапии у больных отмечалось снижение выраженности общей неврологической симптоматики, уровня тревоги и

депрессии, а также улучшение общей двигательной активности и когнитивных функций. Позитивная клиническая динамика сохранялась в течение 6 месяцев наблюдения [Останин и др., 2018].

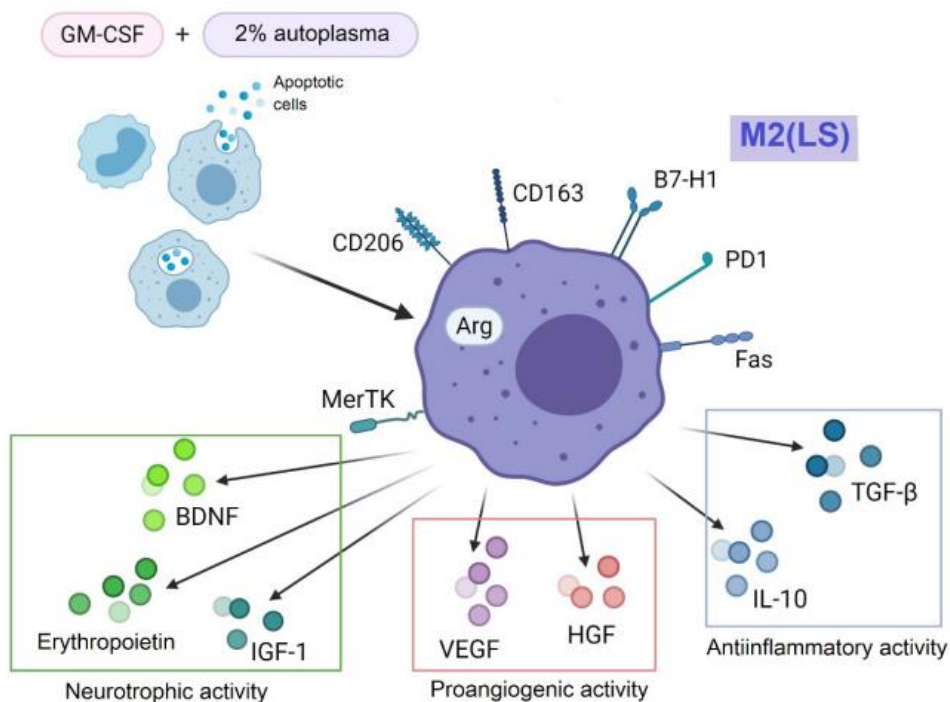


Рисунок 1 – Характеристика M2(LS) макрофагов.

В то же время, влияние M2(LS) макрофагов на нейрорегенерацию и нейрогенез в моделях *in vitro* и *in vivo* ранее охарактеризовано не было. Исследование этого влияния явилось одной из целей настоящей работы.

1.2. Макрофаги в ЦНС в физиологических и патологических условиях

1.2.1. Макрофаги в ЦНС в физиологических условиях: микроглия и пограничные макрофаги

Макрофаги в центральной нервной системе (ЦНС) представлены микроглиальными клетками, пограничными макрофагами и макрофагами моноцитарного происхождения, рекрутируемыми из периферического кровотока [Prinz et al., 2021]. Микроглия – клетки небольшого размера (7-10 мкм), которые

являются резидентными макрофагами ЦНС. Микроглиальные клетки происходят из примитивных макрофагов желточного мешка, которые в мигрируют в развивающийся головной мозг в раннем эмбриогенезе, ещё до появления гематоэнцефалического барьера, и далее активно пролиферируют [Cuadros et al., 2022; Ginhoux, Prinz, 2015]. Кроме микроглии, располагающейся непосредственно в нервной паренхиме, в зрелой ЦНС идентифицированы также так называемые пограничные макрофаги (border-associated macrophages, BAMs), располагающиеся на границах нервной паренхимы: лептоменингеальные, дуральные, периваскулярные макрофаги и макрофаги сосудистого сплетения [Cuadros et al., 2022]. Микроглия и BAMs имеют общее происхождение из желточного мешка, однако различаются по экспрессии некоторых маркеров: например, BAMs не экспрессируют специфический для микроглии маркер *Tmem119* [Cuadros et al., 2022]. Показано, что BAMs и микроглия различаются также по морфологии. Клетки микроглии в гомеостатических условиях имеет разветвленную форму, а в присутствии воспалительных сигналов могут изменять морфологию на амебоидную [Goldmann et al., 2016; Dermitzakis et al., 2023]. Морфология BAMs зависит от их локализации: например, клетки сосудистого сплетения имеют звездчатую форму, а менингеальные макрофаги – плоскую веретенообразную [McMenamin et al., 2003]. Поскольку микроглия и BAMs являются иммунокомпетентными клетками с общими предшественниками, их функции во многом схожи: удаление дебриса, фагоцитоз чужеродных веществ, презентация антигенов [Dermitzakis et al., 2023]. Вместе с тем, вследствие различной локализации биологическая роль различных клеток несколько варьирует. Так, микроглия, находящаяся в мозговой паренхиме, в нормальных условиях обеспечивает в регуляцию синаптической пластичности, реорганизацию нейронных связей, миелиногенез, участвует в регуляции нейротрансмиссии [Tremblay et al., 2011; Lenz, Nelson, 2018]. В свою очередь, BAMs, которые находятся на границе мозговой паренхимы, специализированы на фагоцитозе и презентации антигенов [Mato et al., 1996]. Кроме того, показано, что периваскулярные BAMs

способны изменять доступность паренхимы головного мозга для циркулирующих в крови клеток и молекул путём регуляции проницаемости гемато-энцефалического барьера [He et al., 2016].

1.2.2. Микроглия и макрофаги в ЦНС в условиях патологии

Активация микроглии

Считается, что в физиологических условиях у клеток микроглии преобладает противовоспалительный M2-фенотип. Действительно, многие признаки интактной микроглии напоминают признаки M2-клеток: высокая способность к удалению дебриса, секреция нейротрофических цитокинов (IGF-1, BDNF), низкий уровень экспрессии МНС-II [Cherry et al., 2014; de Haas et al., 2008]. Такую микроглию иногда обозначают как "покоющуюся", однако используемый термин является не совсем точным: микроглия в steady-state состоянии выполняет множество функций, отчасти описанных в предыдущем разделе. В то же время, при патологии ЦНС (травма, инсульт, инфекционные, нейродегенеративные и нейровоспалительные заболевания) происходит активация микроглии и интенсификация ее деятельности. Спектр возможных индукторов активации микроглии крайне широк: провоспалительные цитокины, гипоксия, различные нейромедиаторы, активные формы кислорода, инфекционные агенты и т.д [Mee-Inta et al., 2019]. При этом показано, что при кратковременном и умеренном воздействии активирующего стимула микроглия преимущественно сохраняет свой M2-фенотип, характерный для steady-state состояния, в то время как длительная и/или интенсивная индуцирует нейротоксический M1-фенотип [Черных и др., 2017]. Такая чрезмерная M1-активация микроглии не является оптимальной для восстановления ЦНС, напротив, она зачастую несёт деструктивный характер: активированная микроглия секретирует активные формы кислорода, оксид азота (NO), провоспалительные цитокины, что способствует дальнейшему повреждению нервной ткани [London et al., 2013]. Подобная гиперактивация микроглии и её отрицательная роль в восстановлении

ЦНС показана в моделях бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, синдроме Ретта [Beers et al., 2006; Wegiel et al., 2001; Maezawa, Jin, 2010].

Несомненно, M1/M2-дихотомия в отношении микроглии является, по аналогии с макрофагами, слишком упрощённой: баланс состояний активации варьирует на различных этапах патологического процесса, разнообразие фенотипов микроглии не исчерпывается M1 и M2-состояниями, M1-микроглия не является исключительно деструктивной и т.д. Наиболее ярко неоднозначную роль микроглии при патологии ЦНС демонстрируют результаты исследований с удалением/деплецией микроглии. Так, показано, что деплеция микроглии оказывает нейропротективный эффект в моделях геморрагического инсульта, спинномозговой травмы, болезни Альцгеймера [Li et al., 2017; Wang et al., 2020; Mancuso et al., 2019]. В то же время есть данные о том, что удаление микроглии усиливает нейровоспаление и усугубляет неврологический дефицит в моделях ишемического инсульта и болезни Паркинсона [Jin et al., 2017; Yang et al., 2018].

Несмотря на то, что большинство исследователей в настоящее время концентрируются именно на негативной роли активированной микроглии при патологии ЦНС, продолжается активное изучение и протективных свойств этих клеток, активно разрабатываются стратегии модулирования фенотипа микроглии в сторону M2 с целью терапии различных заболеваний ЦНС (см. ниже) [Huang et al., 2023; Sangineto et al., 2023].

Миграция моноцитов/макрофагов в ЦНС

В физиологических условиях микроглия и ВАМs в достаточной мере выполняют свои функции по обеспечению нормального функционирования нервной ткани, потому в норме рекрутирование моноцитов/макрофагов из периферической крови в мозговую паренхиму минимально. При патологии микроглия и ВАМs оказываются неспособными в полной мере обеспечить нормальное протекание воспалительной реакции, адекватный иммунный ответ и последующее

восстановление нервной ткани. Особенно критичной оказывается недостаточная прорегенеративная активность резидентных макрофагов. В связи с этим происходит активное рекрутирование моноцитов костномозгового происхождения из периферического кровотока с последующей дифференцировкой в макрофаги. Миграция моноцитов происходит как через гематоэнцефалический барьер, в норме считающийся непроходимым для моноцитов, так и через гематоликворный и гематолептоменингеальный барьеры [Greenwood et al., 2011, Shechter et al., 2013]. Показано активное участие BAMs в рекрутировании моноцитов периферической крови и других иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения [Frosch et al., 2023]. Имеются сообщения о том, что для M1 и M2 моноцитов/макрофагов пути миграции в очаг повреждения различаются: в модели спинномозговой травмы показано, что M1 мигрируют в основном через гематолептоменингеальный барьер и ключевым регулятором этого процесса является хемокин CCL2, в то время как M2 – через гематоликворный и их миграция опосредуется VCAM-1/VLA-4 и CD73 [Shechter et al., 2013]. Вместе с тем, ввиду своей пластичности, макрофаги, по-видимому, способны к смене фенотипа в очаге повреждения в зависимости от микроокружения.

Рекрутированные макрофаги при нейропатологии

До недавнего времени большинство исследований в области нейроиммунологии рассматривали микроглию и рекрутированные макрофаги как единую популяцию клеток, поскольку они схожи по морфологии, и зачастую выявить, является ли конкретная клетка рекрутированным макрофагом или клеткой микроглии, затруднительно. Однако такой подход является чрезмерно упрощенным: показано, что микроглия и рекрутированные макрофаги различаются по своим свойствам, отчасти функциям и некоторым экспрессируемым маркерам [Han et al., 2020]. Поэтому в настоящее время многие исследователи акцентируют внимание именно на роли периферических макрофагов в восстановлении ЦНС при различных патологических процессах. Как и в отношении микроглии, для макрофагов показана

провоспалительная и тканедеструктивная M1 активность и протективная, противовоспалительная и репаративная – M2 [Minogue, 2017]. Вместе с тем, по-видимому, в зоне поражения ЦНС всегда присутствуют макрофаги с различными фенотипами, ввиду их значительной пластичности и гетерогенности, а преобладание конкретного фенотипа в популяции рекрутированных макрофагов во многом определяется типом патологии и стадией патологического/регенеративного процесса [Martinez, Gordon, 2014]. Кроме того, при транскрипционном single-cell профилировании показано, что в модели черепно-мозговой травмы некоторые макрофаги могут коэкспрессировать M1 и M2 маркеры [Kim et al., 2016]. Аналогичные наблюдения методом иммуногистохимии были сделаны и в отношении микроглии [Morganti et al., 2016].

Данные о влиянии различных фенотипов макрофагов на процессы нейровоспаления и нейрорегенерации недостаточно полны и структурированы. Так, как уже было сказано, во многих исследованиях не проводится различие между рекрутированными макрофагами и клетками микроглии: они рассматриваются как общая популяция клеток. Кроме того, в подавляющем большинстве исследований речь идёт лишь об M1 и M2 макрофагах, причём в качестве M2 наиболее часто рассматриваются IL-4-активированные M2a макрофаги. Относительно роли других фенотипов M2 макрофагов при патологии ЦНС данные крайне отрывочны [Devanney et al., 2020]. Вышесказанное определяет актуальность дальнейших более глубоких исследований в этой области.

1.3. Нейрорегенерация

1.3.1. Изменение представлений о регенерации нервной ткани. Виды нейрорегенерации

Возможность регенерации нервной ткани была показана ещё в конце XVIII века [Cruikshank, 1797]. С тех пор в течение двух веков исследователи концентрировались в основном на регенерации периферических нервов. Во второй

половине XX века акцент в исследованиях распространился на регенерацию спинного мозга в моделях разрыва и травмы [Kliot, Lustgarten, 1990]. В последние десятилетия стало очевидно, что регенеративный потенциал ЦНС ранее был значительно недооценен. Действительно, долгое время считалось, что головной и спинной мозг обладают весьма низкой способностью к регенерации. В настоящее время накапливается всё больше доказательств в пользу пластичности ЦНС и её возможности регенерировать при повреждении, хотя и признаётся, что эта возможность несколько лимитирована и менее выражена в сравнении с другими тканями организма [Черных и др., 2017, Bobkova et al., 2020]. Условно нейрорегенерацию можно разделить на два вида: внутриклеточную и клеточную. Внутриклеточная нейрорегенерация включает в себя регенерацию и ремиелинизацию нейритов, синаптогенез, восстановление повреждённых ультраструктур клетки. Некоторые исследователи разделяют этот вид нейрорегенерации на два подтипа: регенерацию отростков и остальные процессы [Steward et al., 2013]. Клеточная регенерация подразумевает образование новых нейронов из нейральных стволовых клеток, т.е. нейрогенез. Различное разделение нейрорегенеративных процессов на отдельные виды, однако, не является принципиальным вопросом, поскольку в реальной ситуации повреждения нервной ткани эти процессы – регенерация тела клетки, ультраструктур и нейритов, а также нейрогенез происходят параллельно. Упомянутые виды выделяются в основном для удобства структурирования знаний. Важно уточнить, что разные виды нейрорегенерации не разнесены во времени и потому не могут быть названы этапами или стадиями. В то же время, наблюдается определенная пространственная "выделенность" некоторых процессов. Так, например, в головном мозге существуют "зоны нейрогенеза", где происходит пролиферация нейральных стволовых клеток и последующая их дифференцировка. Ниже будут отдельно рассмотрены составляющие процесса внутриклеточной и клеточной нейрорегенерации.

1.3.2. Внутриклеточная нейрорегенерация

Регенерация нейритов

Наиболее изученным компонентом внутриклеточной нейрорегенерации является регенерация отростков нервных клеток: аксонов и дендритов. Аксон представляет собой отросток нейрона, по которому нервный импульс проводится от тела клетки; как правило, аксон у нейрона один и является наиболее длинным из отростков. Дендрит – это отросток, по которому сигнал поступает к телу клетки, их у нейрона, как правило, несколько и они более короткие, чем аксон [Barnes, Polleux, 2009]. В англоязычной литературе и аксоны, и дендриты принято обозначать термином "нейрит" (neurite), т.е. отросток нервной клетки [Hasegawa, Kuwako, 2022]. Такой подход к терминологии представляется достаточно актуальным, в особенности, если речь идёт об исследованиях *in vitro*, когда различить аксон и дендриты нейроноподобной клетки зачастую не представляется возможным. В дальнейшем для удобства изложения мы будем пользоваться подобной терминологией. В русскоязычной литературе, в свою очередь, термин "нейрит" в отношении отростков нервной клетки малораспространён и неоднозначен: иногда он употребляется в том же значении, что и описано выше, а иногда синонимичен термину "аксон".

Регенерация нейритов включает в себя два основных процесса: удлинение отростка и ремиелинизацию – образование миелиновой оболочки вокруг отростка. Эти процессы при различных патологических состояниях могут протекать параллельно, или же может преобладать какой-то один из них. Например, при механическом повреждении аксона эти процессы происходят параллельно. У дендритов миелиновая оболочка отсутствует, поэтому данный этап в их регенерации исключается. В случае же, например, рассеянного склероза, при котором ключевым звеном патогенеза является демиелинизация аксонов, на первый план выступает ремиелинизация [Cunniffe, Coles, 2021].

В периферической нервной системе (ПНС) регенерация нейритов протекает значительно легче и активнее, чем в ЦНС. Это объясняется несколькими факторами.

Во-первых, в ПНС за синтез миелина и "поддержку" нейритов отвечают леммоциты (шванновские клетки), а в ЦНС – олигодендроциты; первые более активно продуцируют миелин и способны более быстро регенерировать. Во-вторых, глиальный рубец, формирующийся в ЦНС в очаге повреждения и состоящий из активированных астроцитов и микроглии, может и механически блокировать рост нейритов, и формировать "воспалительное" микроокружение, препятствующее полноценной регенерации. В ПНС такой глиальный рубец на месте повреждения не формируется. В-третьих, миелин как олигодендроцитов, так и шванновских клеток, содержит молекулы, ингибирующие нейрорегенерацию, однако в ПНС миелиновый дебрис более быстро удаляется из локуса повреждения, чем в ЦНС, что способствует более оперативной регенерации. В-четвёртых, аксоны ЦНС, вероятно, и сами обладают несколько сниженной способностью к регенерации по сравнению с отростками в ПНС (тем не менее, такая способность к регенерации была показана во множестве исследований, и более давние представления о неспособности аксонов в ЦНС регенерировать не являются истинными) [Scheib, Hoke, 2013].

Интенсивность и полнота регенерации нейритов зависит от множества параметров. Так, как было сказано выше, важное значение имеет микроокружение в патологическом очаге. Существует большое количество исследований, посвященных влиянию различных цитокинов и ростовых факторов на регенерацию нейритов. Показано, что рост нейритов стимулируют нейротрофические факторы (BDNF, NGF, NT-3, NT-4), циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ), некоторые цитокины (IL-4, LIF) [Vidal et al., 2013]. При этом стимулирующие факторы могут действовать как напрямую, так и опосредованно, модулируя содержание в очаге других позитивных регуляторов роста нейритов. Например, показано, что IL-4 повышает уровень мРНК нейротрофина-3 в Т-лимфоцитах [Besser, Wank, 1999]. Относительно влияния провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода на регенерацию нейритов данные исследований неоднозначны. Традиционно провоспалительное микроокружение считается нейродеструктивным и препятствующим полноценной

регенерации, в том числе за счёт формирования хронического воспалительного процесса. Однако для некоторых провоспалительных цитокинов показано положительное влияние на рост нейритов. Так, IL-1 β стимулирует рост нейритов как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, причём *in vitro* наблюдается дозозависимый эффект [Temporin et al., 2008; Kim et al., 2015; Boato et al., 2011]. Для TNF α разными группами исследователей показаны разнонаправленные эффекты. Так, показано снижение длины аксонов спинномозговых ганглиев крыс в присутствии TNF α [Kim et al., 2015], а также ингибирующее влияние TNF α на рост нейритов клеток линии PC12 (линия клеток феохромоцитомы крысы). В то же время, выявлена необходимость присутствия TNF- α для запуска регенерации аксонов в модели спинномозговой травмы у рыб данио [Zeng, 2023; Tsarouchas et al., 2018]. Также имеются сообщения о стимулирующем влиянии активных форм кислорода на рост нейритов [Sabbir Alam et al., 2023].

Синаптогенез

Синапсом называют место контакта двух нейронов или нейрона с эффекторной клеткой, предназначенное для передачи нервного импульса. Синаптогенез – процесс образования новых синапсов – наиболее активно протекает на ранних этапах развития нервной системы, однако продолжается в течение всего онтогенеза. Формирование синапсов тесно связано с другими сложными и тонко регулируемыми процессами, которые должны предшествовать синаптогенезу: дифференцировка нейронов из НСК, миграция, морфогенез дендритов, рост и наведение аксона [Batool et al., 2019]. Если все эти этапы проходят успешно, между клетками может сформироваться синапс, причём его формирование также проходит в несколько этапов и требует чёткого регулирования. Так, синаптогенез включает в себя сборку внутриклеточных синаптических белков, синтез молекул клеточной адгезии, которые экспрессируются на синаптической мембране, перестройку цитоскелета, поддерживающего структуру синапса, нейронную активность, которая стимулирует

образование синапса [Sudhof, 2021; Qi et al., 2022]. Все эти аспекты тонко скоординированы друг с другом, причем регуляция синаптогенеза осуществляется как со стороны самих нейронов, участвующих в нём, так и со стороны клеток в микроокружении. Так, показано, что увеличение содержания IL-6 в пренатальном периоде активирует синаптогенез и повышает число связей в мозге в постнатальном периоде у мышей; данный механизм реализуется через транскрипционный фактор STAT5 [Mirabella et al., 2021]. Ключевыми клетками, регулирующими синаптогенез, признаются астроциты, которые оказывают своё действие посредством секреции различных глиальных факторов. Первым идентифицированным глиальным фактором, способствующим синаптогенезу, был астроцитарный холестерол. Кроме него, важную роль играют тромбоспондины, глипиканы, TGF- β , BDNF [Shan et al., 2021].

Данные относительно клеток микроглии более скудны, чем для астроглии, однако признаётся, что и микроглия играет роль в регуляции образования синапсов. Так, например, показано, что микроглия регулирует образование аксо-аксональных синапсов в клетках-канделябрах [Gallo et al., 2022]. Кроме того, микроглия также способна продуцировать различные нейротропные факторы, влияющие на синаптогенез, в частности, BDNF. Показано негативное влияние деплеции микроглии на синаптогенез [Ball et al., 2022]. Более исследована роль микроглии в процессах синаптического прунинга и синаптической пластичности – процессах, которые также косвенно связаны с нейрорегенерацией. Синаптическая пластичность представляет собой изменение эффективности синапса, вызванное изменением его активности, и считается одним из основных механизмов формирования памяти [Fernandez de Sevilla et al., 2021]. Показано, что миграция микроглии может зависеть от активности конкретного нейрона и выделения им аттрактантов для микроглии, в частности, фракталикина, глутамата, АТФ, АДФ [Ball et al., 2022]; таким образом происходит нейрон-микроглиальное взаимодействие, необходимое для ремоделирования синаптической сети. Синаптический прунинг – сокращение числа синапсов, посредством удаления избыточных связей. Считается, что он также необходим для

формирования памяти и обучения. Синаптический прунинг осуществляется клетками микроглии, причём для полноценного выполнения этой функции не требуется активация микроглии [Mordelt, de Witte, 2023]. Показано участие C3-компонента комплемента, TGF- β , IL-33 в регуляции прунинга [Faust et al., 2021].

1.3.3. Клеточная нейрорегенерация

Понятие клеточной нейрорегенерации подразумевает нейрогенез, то есть образование зрелых нейронов из НСК. До недавнего времени в научном сообществе доминировала концепция о статичности нервной системы во взрослом возрасте. Однако в конце XX века, благодаря развитию новых методов визуализации, стали накапливаться данные о наличии взрослого нейрогенеза. Так, в 1989 г. Ф.Ноттебоом показал увеличение количества нейронов у канареек в тех зонах мозга, которые ответственны за вокализацию и обучение, при разучивании птицами новых песен [Nottebohm, 1989]. В 90-е годы было показано наличие взрослого нейрогенеза у млекопитающих. В 1998 г. П.Эрикссон с соавторами впервые выявили нейрогенез у человека, показав наличие бромдезоксисуридина (BrdU) в клетках зубчатой извилины головного мозга взрослых людей. Бромдезоксисуридин встраивается в ДНК во время S-фазы, что позволяет определить клетки, позитивные по BrdU, как пролиферирующие (новообразованные). Так как эти клетки одновременно экспрессировали нейрон-специфические маркеры (NeuN, кальбиндин, нейрон-специфическую енолазу), не осталось сомнений в том, что головной мозг взрослого человека способен к нейрогенезу [Eriksson et al., 1998]. В последующие десятилетия и до настоящего времени взрослый нейрогенез активно исследуется, работы в этой области находятся на передовом крае мировой науки.

Образование новых нейронов возможно не во всех участках взрослого мозга. Выявлены так называемые нейрогенные зоны, или ниши, в которых происходит нейрогенез. Наибольшее количество свидетельств нейрогенеза получено для субвентрикулярной и субгранулярной зон зубчатой извилины гиппокампа, также

имеются данные о нейрогенезе в гипоталамусе [Fares et al., 2019]. Считается, что в нейрогенной нише создаётся особое микроокружение, позволяющее НСК пролиферировать. Ниши хорошо васкуляризованы, что позволяет обеспечивать доставку питательных веществ к НСК. Клетки глии обеспечивают трофическую поддержку и продуцируют ростовые факторы, необходимые для нейрогенеза (BDNF, VEGF, NGF и др.). Кроме того, ростовые факторы и регуляторные молекулы секретируют и сами НСК, влияющие на себя аутокринно. НСК способны дифференцироваться как в нейроны с различным нейромедиаторным фенотипом (глутаматергические, дофаминергические и др.), так и в клетки глии, причём направление дифференцировки определяется поступающим стимулом и рецептором, через который этот стимул воздействует на НСК. Так, воздействие через ГАМК_A-рецептор стимулирует дифференцировку НСК в глиальном направлении, а через ГАМК_B - в нейрональном [Nakamichi et al., 2009].

Процесс нейрогенеза можно разделить на несколько этапов: пролиферация НСК, их миграция, дифференцировка и встраивание в существующую нейрональную сеть [Arzate, Covarrubias, 2020]. Наиболее активно процесс нейрогенеза протекает в эмбриогенезе. Большинство НСК после формирования мозга в эмбриональном периоде дифференцируется в зрелые нейроны или подвергается апоптозу. Тем не менее, некоторое количество НСК, способных к самовоспроизведению, остаётся в упомянутых выше нейрогенных нишах, что позволяет осуществляться взрослому нейрогенезу. Показано, что общее количество НСК в гиппокампе уменьшается в течение жизни, а доля покоящихся НСК увеличивается [Ibrayeva et al., 2021]. Некоторые из пролиферирующих НСК выходят из цикла пролиферации, дифференцируясь в нейробласты, которые мигрируют из нейрогенной ниши [Arzate, L. Covarrubias, 2020]. Важно отметить, что многие нейральные предшественники на пути дифференцировки подвергаются отрицательному отбору, что сопровождается гибелью части образовавшихся нейронов. Это физиологический процесс, наблюдающийся как при эмбриональном, так и при взрослом нейрогенезе. В то же

время, интенсивность негативного отбора может быть чрезмерной при патологических состояниях: так, показано усиление аутофагии НСК при хроническом стрессе у мышей, что, в свою очередь вызывает снижение интенсивности нейрогенеза [Jung et al., 2020]. *In vitro* выявлено снижение количества гиппокампальных НСК в ответ на кортикостерон, которое опосредуется посредством SGK3 (serum/glucocorticoid regulated kinase 3) [Jung et al., 2020].

Пути миграции для нейробластов из различных нейрогенных ниш неодинаковы. Так, показано, что нейробласты субвентрикулярной зоны мигрируют по ростральному миграционному тракту в обонятельную луковицу. Большинство из этих клеток дифференцируется в ГАМК-ергические гранулярные интернейроны, другие – в перигломерулярные интернейроны. Количество нейробластов, мигрирующих по этому пути, уменьшается с возрастом [Capilla-Gonzalez et al., 2015]. Для нейробластов, образующихся в субгранулярной зоне, показан путь миграции в слой гранулярных клеток зубчатой извилины [Arzate, L. Covarrubias, 2020]. Пути миграции, впрочем, изучались в основном на животных, в частности, грызунах. Что касается головного мозга взрослого человека, данные о путях миграции НСК крайне неполны, а наличие рострального миграционного тракта является предметом дискуссий [Capilla-Gonzalez et al., 2015].

Если в физиологических условиях нейробласты мигрируют из нейрогенных ниш по миграционным путям, то в условиях патологии происходит эктопическая миграция нейральных предшественников в очаг повреждения. Показана миграция клеток из субвентрикулярной зоны при инсульте, травме, химическом повреждении, рассеянном склерозе, нейровоспалительных заболеваниях [Otero et al., 2012; Arvidsson et al., 2002; Picard-Riera et al., 2002]. Перечень факторов, стимулирующих миграцию нейральных предшественников в очаг повреждения весьма широк. Показана важная роль провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN- γ), причём действие, в частности, TNF α , опосредуется через повышение экспрессии MCP-1 (CCL2) [Capilla-Gonzalez et al., 2015]. Также миграцию стимулируют ростовые

факторы (EGF, bFGF, PDGF, VEGF) [Wang et al., 2007; Gonzalez-Perez et al., 2009]. Кроме того, в процесс регуляции миграции нейральных предшественников вовлечены матриксные металлопротеиназы и SDF-1 [Barkho et al., 2008; Robin et al., 2006]. Такое разнообразие факторов, регулирующих миграцию НСК, позволяет предположить, что приток новых клеток в очаг повреждения происходит как на ранних, так и на поздних этапах регенерации.

После миграции происходит окончательная дифференцировка нейральных предшественников в зрелые нейроны. Этапами этого процесса являются также рост нейритов и встраивание клеток в существующую нейрональную сеть. Эти составляющие перекликаются с процессами внутриклеточной нейрорегенерации, которые обсуждались выше, регенерацией отростков и синаптогенезом, и, вероятно, подвержены схожей регуляции. Накоплено большое количество данных о стимуляции дифференцировки и роста нейритов BDNF, GDNF, NGF, IGF-1, нейротрофинов (NT-3, NT-4) [Zhang et al., 2014, Nicoletti et al., 2022]. Также важным компонентом полноценной интеграции новообразованных клеток в нейрональную сеть является наведение аксонов, которое позволяет отросткам приближаться друг к другу и эффекторным клеткам и формировать синапсы [Accogli et al., 2020]. Наведение аксонов регулируется направляющими сигналами – молекулами, депонированными во внеклеточном матриксе или экспрессированными на клетках по пути движения аксонов [Stoeckli, 2017].

1.4. Подходы к исследованию нейрорегенерации

1.4.1. *In vitro*

Возможности по изучению нейрорегенерации и нейрогенеза *in vitro* являются весьма ограниченными, ввиду невозможности достаточно полного моделирования этих сложных процессов *in vitro*. Тем не менее, существует большое количество работ, посвящённых данным вопросам. Наибольшее количество исследований в области нейрорегенерации *in vitro* посвящено аксональной регенерации. Для

изучения нейрорегенерации *in vitro* могут использоваться первичные культуры нейральных клеток, выделенных, например, из гиппокампа, ретинальных или спинномозговых ганглиев. Некоторые исследователи применяют смешанную глиально-нейрональную культуру с целью моделирования внешних эффектов на нейрональную регенерацию со стороны клеток глии [Yu et al., 2012], а также 3D-культивирование для лучшего воспроизведения естественной среды роста аксонов [East et al., 2010]. Кроме того, активно используются органотипические культуры, например, экспланты спинномозговых ганглиев, срезы тканей головного и спинного мозга [Al-Ali et al., 2017]. Такие органотипические культуры представляют собой, по сути, промежуточное звено между исследованиями диссоциированных клеток *in vitro* и моделями *in vivo*. В связи с ограниченным доступом к первичным нейронам человека перспективным представляется использование нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека [Marchetto et al., 2010]. Данный подход активно изучается, однако, будучи дорогостоящим и длительным по времени, в настоящее время не получил широкого распространения.

Применение подходов, описанных выше, связано с определенными затруднениями и ограничениями. Так, материал для первичных культур и органотипических срезов в большинстве случаев выделяется от экспериментальных животных (мышей, крыс). Кроме того, некоторые из описанных подходов весьма ресурсозатратны и плохо подходят для конкретных ситуаций, например, когда для исследования требуется достаточно большое количество клеток [Al-Ali et al., 2017]. В связи с этим, одним из наиболее популярных подходов к изучению нейрорегенерации и нейрогенеза *in vitro* во всём мире является использование клеточных линий. Преимуществами клеточных линий являются относительная простота их применения, возможность быстрого получения большого количества клеток из разных источников, в том числе от человека, хорошая воспроизводимость результатов, большой массив литературных данных. Использование клеточных

линий не связано с этическими проблемами, которые возникают при применении тканей человека и животных. В то же время такой подход, впрочем, как и любой другой, имеет свои ограничения. К недостаткам использования клеточных линий можно отнести неполное соответствие функциональных особенностей клеток линий, которые часто являются иммортализованными, получены из опухолевых источников и т.д., нормальным клеткам организма и, соответственно, невозможность полной трансляции результатов экспериментов *in vitro* на процессы, происходящие *in vivo* [Kaur, Dufour, 2012]. Тем не менее, первым этапом исследований различных препаратов и субстанций является именно изучение их влияния на клеточные линии.

Примерами клеточных линий, используемых для изучения процессов нейрорегенерации, являются клетки ReNcell, PC12, SH-SY5Y [Shui et al., 2011]. ReNcell – иммортализованная линия нейральных предшественников человеческого происхождения, клетки которой способны дифференцироваться в нейроны и клетки глии. ReNcell используется, в частности, для исследования пролиферации и дифференцировки нейральных предшественников [Song et al., 2019]. PC12 – клетки феохромоцитомы крысы, способные легко дифференцироваться в нейроноподобные клетки, используются для изучения нейрональной дифференцировки и нейросекреции [Westerink, Ewing, 2007].

Клеточная линия SH-SY5Y

Витральная часть настоящего исследования посвящена влиянию кондиционных сред макрофагов на свойства клеток SH-SY5Y. SH-SY5Y – линия клеток нейробластомы человека, впервые полученная и описанная в 1978 году [Biedler et al., 1978]. Недифференцированные клетки данной линии представляют собой нейральные предшественники, которые активно пролиферируют, склонны к кластеризации и образованию нейросфер и экспрессируют маркеры, характерные для нейральных стволовых клеток человека, например, нестин и даблкортин [Ferlemann et al., 2017]. Несомненным достоинством SH-SY5Y является способность клеток к

дифференцировке в различные типы нейронов – дофаминергические, адренергические или холинергические нейроны. Спектр веществ, индуцирующих дифференцировку клеток SH-SY5Y, достаточно широк и включает, например, ретиноевую кислоту, форболовые эфиры, дибутирил-цАМФ, стауроспорин [Kovalevich et al., 2021]. При этом направление дифференцировки клеток зависит от применяемого протокола. Так, в присутствии ретиноевой кислоты клетки дифференцируются в направлении холинергического фенотипа, в то время как использование комбинации ретиноевой кислоты и форболовых эфиров способствует дифференцировке в клетки с дофаминергическим фенотипом [Kovalevich et al., 2021]. Наиболее часто применяемым и наиболее хорошо охарактеризованным методом индукции дифференцировки клеток SH-SY5Y является их культивирование в присутствии ретиноевой кислоты. Дифференцированные клетки SH-SY5Y имеют морфологию, характерную для зрелых нейронов: их тела вытягиваются, принимают треугольную или полигональную форму, нейриты (отростки) существенно удлиняются, а на поздних стадиях дифференцировки формируют синаптоподобные соединения между собой. Дифференцированные клетки SH-SY5Y экспрессируют ряд маркеров, характерных для зрелых нейронов: β III-тубулин, MAP-2, синаптофизин, NeuN, нейрон-специфическая енолаза (NSE) [Lopes et al., 2010; Cheung et al., 2009].

Среди многочисленных достоинств линии SH-SY5Y следует отметить, что в отличие от первичных нейронов и нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, клетки SH-SY5Y сохраняют способность к крупномасштабной экспансии, что делает их подходящей и экономически эффективной моделью [Kovalevich et al., 2021; Forster et al., 2016]. Соответственно, клетки SH-SY5Y широко используются в скрининговых исследованиях для оценки нейротрофических свойств и нейротоксичности фармацевтических препаратов [Datki et al., 2003; Henkel et al., 2008; Xie et al., 2010]. Клетки SH-SY5Y легче генетически модифицировать, чем животные модели или первичные нейроны, поэтому клетки

SH-SY5Y представляют собой превосходную систему для исследования влияния генов-кандидатов на нейрональные процессы (Bell, Zempel, 2021). Клетки SH-SY5Y имеют человеческое происхождение и экспрессируют многие специфические для человека белки и изоформы белков, которые изначально не присутствуют в первичных культурах грызунов [Kovalevich et al., 2021]. Наконец, поскольку клетки SH-SY5Y считаются клеточной линией, к ним не относятся обширные этические проблемы, связанные с первичными культурами нейронов грызунов и человека [Kovalevich et al., 2021; Martin et al., 2022].

Столь впечатляющий спектр несомненных достоинств линии SH-SY5Y предопределил широкое использование клеток (как недифференцированных, так и дифференцированных) в исследованиях в области нейронауки. Недифференцированные клетки SH-SY5Y широко применяются, в частности, для изучения влияния различных веществ на свойства нейральных предшественников, при этом в одних исследованиях делается акцент на нейротоксическом воздействии исследуемых веществ [Lopez-Suarez et al., 2022; Martinez et al., 2020], в то время как в других изучаются положительные эффекты (улучшение клеточной выживаемости, стимуляция пролиферации) [Pan et al., 2021]. Кроме того, влияние различных веществ на свойства клеток SH-SY5Y зачастую исследуется в различных моделях, предусматривающих повреждение клеток – кислородно-глюкозная депривация [Zhi et al., 2020], гипоксия [Wang et al., 2021], ишемия/реперфузия [Sun et al., 2022]. Следует обратить внимание, что ясно понимая, что витральные модели, несомненно, не отражают всей сложности процессов, происходящих в организме, многие исследователи употребляют «вивальные» термины по отношению к таким моделям, например, «ишемия» и «гипоксия/реперфузия» [Zhi et al., 2020; Sun et al., 2022; Dong et al., 2019]. Во многих случаях исследования *in vitro* на клеточной линии SH-SY5Y являются первым этапом работы и выявленные эффекты становятся отправной точкой для более сложных исследований на моделях *in vivo* [Ahmad et al., 2022].

Дифференцированные клетки SH-SY5Y используются в качестве модели зрелых нейронов человека. Применяемый протокол дифференцировки определяется задачами конкретного исследования. Так, одним из основных направлений использования дифференцированных клеток SH-SY5Y является изучение болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера. Соответственно, в исследованиях такого рода используются клетки, дифференцированные в дофаминергические и холинергические нейроны [Ioghen OC et al., 2023; de Medeiros et al., 2019]. На моделях недифференцированных и дифференцированных клеток SH-SY5Y изучают нейротоксичность и нейропротективные свойства различных веществ [Kolesova et al., 2023]. Кроме того, дифференцированные SH-SY5Y используются для исследования функций синапсов, электрической активности клеток, метаболизма нейрональных клеток [D'Aloia et al., 2024]. Как на недифференцированных, так и на дифференцированных клетках активно изучаются сигнальные пути, через которые различные вещества влияют на функции клеток SH-SY5Y [Chen et al., 2023]. Таким образом, способность к дифференцировке в различные типы нейронов и «человеческое» происхождение в сочетании с простотой использования привели к широкому использованию клеток SH-SY5Y в качестве клеточной модели в области нейронауки.

1.4.1. In vivo. Моделирование депрессии

Изучение процессов нейрорегенерации *in vivo* невозможно без создания моделей нейропатологии у экспериментальных животных. Так, моделирование спинномозговой травмы позволяет изучить восстановление периферических нервов и регенерацию спинного мозга [Lopes B. et al., 2024]. Существуют общепринятые модели таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона и Альцгеймера [Parmar et al., 2021; Fassler et al., 2021].

Ещё одним возможным подходом к исследованию процессов нейрорегенерации являются различные модели депрессии. В настоящее время

общеприняты взгляды о ключевой роли нейровоспаления и нейродегенеративных изменений в патогенезе депрессии. Многие исследования связывают депрессию со снижением уровня биомаркеров взрослого нейрогенеза в гиппокампе, включая уменьшение количества гиппокампальных нейронов и уменьшение объема гиппокампа [Chen et al., 2020]. Таким образом, интенсификация нейрорегенеративных процессов, в частности, нейрогенеза, может быть ассоциирована со снижением тяжести проявлений депрессии. Моделирование депрессии на грызунах связано с некоторыми трудностями, основной из которых является невозможность создания такой модели, которая будет полностью сопоставима с большим депрессивным расстройством (БДР) у человека. Тем не менее, экспериментальные поведенческие модели депрессии незаменимы как для исследования механизмов заболевания, так и для разработки новых методов лечения и поиска эффективных антидепрессантов. Разнообразие моделей депрессии на мышах достаточно велико. Так, фармакологически депрессию моделируют, например, введением провоспалительных цитокинов (IL-1 β или TNF- α) или кортикостерона [Budni et al., 2021; Zhang et al., 2023]. Существует большое количество моделей депрессии, в которых используются мыши, нокаутные по различным генам: компонентам серотонинергической и норадренергической систем, гену рецептора нейропептида Y и др. [Zhuang et al., 1999] Как фармакологические, так и генетические модели депрессии достаточно несовершенны, поскольку в патогенез этого заболевания вовлечено одновременно большое количество веществ и сигнальных путей, и введение одного вещества и/или блокада одного пути в недостаточной степени отражают полноту процесса. Большое количество моделей основано на применении различных стрессовых факторов, поскольку именно стресс является основным этиологическим фактором риска возникновения депрессии. Часто применяют модель хронического непредсказуемого легкого стресса, которая подразумевает ежедневные изменения привычных условий (изменение светового режима, наклон клетки, лишение еды и т.д.) [Wallner, 2017]. Другой

распространенной "стрессовой" моделью депрессии является модель хронического социального конфликта, одним из вариантов которой является модель сенсорного контакта, используемая в настоящей работе. Модель сенсорного контакта основана на повторном опыте социальных поражений. В результате ежедневных непродолжительных агонистических взаимодействий между животными и повторного опыта либо «побед», либо «поражений», одно животное в конечном итоге приобретает доминирующий статус, а другое – статус побежденного. Через 20 дней животные с опытом поражений демонстрируют стойкое депрессивно-подобное поведение (ангедония, измененные поведенческие паттерны). Наличие депрессивно-подобного состояния сопровождается также снижением уровня серотонина и дофамина в структурах головного мозга, снижением интенсивности нейрогенеза и изменением активности нейронов префронтальной коры и гипоталамуса [Kudryavtseva, 2022; McAllister et al., 2019]. В модели показаны также изменения в экспрессии генов, характерные для депрессивно-подобного фенотипа [Moravcova et al., 2021]. Депрессивно-подобное состояние, моделируемое описанным образом, купируется на фоне терапии антидепрессантами и кетамином [Vialou et al., 2010]. Важно отметить, что многие исследователи считают употребление термина "депрессия" некорректным по отношению к моделям на животных и предпочитают словосочетание "депрессивноподобное состояние" (depression-like). Мы в настоящей работе поступаем аналогичным образом.

1.5. Гипотезы формирования депрессивного расстройства

В настоящее время общепризнанной является взаимная интеграция иммунной, нервной и эндокринной систем организма. Взаимодействие этих систем имеет ключевое значение в поддержании гомеостаза, а нарушение иммунонейроэндокринных взаимодействий является ключевым фактором в развитии депрессии. Существует несколько ключевых гипотез формирования депрессивного расстройства. Моноаминовая гипотеза депрессии является одной из первых попыток

объяснить механизм формирования депрессивного расстройства. Она постулирует, что основной причиной депрессии является дефицит моноаминовых нейротрансмиттеров (серотонин, дофамин, норадреналин). Действительно, существует большой массив накопленных данных, которые свидетельствуют о том, что снижение уровня упомянутых нейротрансмиттеров ассоциировано с проявлениями депрессии [Rappu, Goyal, 2023]. Однако, несмотря на однозначность упомянутой взаимосвязи, остаётся, в частности, недостаточно ясным, является ли снижение уровня моноаминов причиной развития депрессии, или, напротив, следствием уже развившегося расстройства. Кроме того, моноаминовая гипотеза плохо согласуется с фактом отсроченного эффекта антидепрессантов. По-видимому, нарушение баланса нейротрансмиттеров является лишь частью гораздо более сложного механизма формирования и персистирования депрессивного расстройства.

Кинурениновая гипотеза связывает развитие депрессии с изменениями метаболизма кинуренина, который, наряду с серотонином, является продуктом метаболизма триптофана [Brown et al., 2021]. Показано снижение уровней как кинуренина, так и триптофана в периферической крови пациентов с депрессией [Arnove et al., 2018]. Однако данные о содержании кинуренина и его метаболитов в ЦНС при депрессии достаточно противоречивы. Так, Erhardt et al. показали повышение уровня метаболита кинуренина хинолиновой кислоты, определяемой как нейротоксическое соединение, в спинномозговой жидкости у больных с тяжелой депрессией [Erhardt et al., 2013]. В то же время, Clark et al., напротив, показали снижение выработки хинолиновой кислоты в префронтальной коре у больных депрессией [Clark et al., 2016]. Несомненно, требуется дальнейшее более глубокое исследование места нарушений метаболизма кинуренина и триптофана в патогенезе депрессивного расстройства.

В контексте патогенеза депрессии активно изучается роль нейродегенеративных процессов в ЦНС. Частота депрессивных расстройств у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Паркинсона, болезнь

Альцгеймера, болезнь Генгтингтона) значительно выше, чем в среднем в популяции [Galts et al., 2019]. Многочисленными исследованиями подтверждено снижение объёма различных структур головного мозга, в частности, префронтальной коры и гиппокампа при депрессии, закономерно сопровождающееся уменьшением количества нейронов [Trifu et al., 2020]. Важно отметить, что такие изменения могут быть следствием как нейрональной гибели, так и снижения интенсивности взрослого нейрогенеза в гиппокампе. Показано, что подавление нейрогенеза может играть важную роль в патогенезе депрессии и прямо коррелирует с тяжестью патологических проявлений [Fang, 2023; Carli et al., 2021]. Причиной нейродегенеративных изменений в ЦНС и подавления нейрогенеза является в том числе хроническое нейровоспаление. Воспаление является ключевым патогенетическим фактором широкого спектра неврологических и психических заболеваний. Нейровоспаление может быть индуцировано как проникновением провоспалительных цитокинов с периферии, в частности, через гематоэнцефалический барьер, так и продукцией этих медиаторов иммунокомпетентными клетками, находящимися непосредственно в ЦНС. Сами иммунокомпетентные клетки, в свою очередь также могут быть резидентными (микроглия и пограничные макрофаги) и рекрутированными с периферии (см. гл. 2). Цитокиновая гипотеза проясняет место нейровоспаления в патогенезе депрессивного расстройства. Наиболее значимыми провоспалительными цитокинами, вовлеченными в патогенез депрессии, являются IL-1 β , IL-6, TNF- α и IFN- γ . Повышенный уровень данных цитокинов при депрессии продемонстрирован в различных структурах головного мозга [Kappelmann et al., 2021; Kofod et al., 2022]. Накоплены данные об изменении уровней провоспалительных цитокинов в периферической крови при депрессивном расстройстве. Так, у пациентов с депрессией регистрируются повышенные уровни периферических IL-1 β и TNF- α , причём концентрации данных цитокинов положительно коррелируют с тяжестью депрессии. Также показано усиление активации микроглиальных клеток на фоне

депрессивноподобного состояния у мышей, в частности, повышение уровня маркера активации макрофагов/микроглии IBA-1 [Wang et al., 2022]. Персистирующее нейровоспаление, по-видимому, задействовано сразу в нескольких аспектах патогенеза депрессии. Так, помимо индукции нейродегенеративных изменений, нейровоспаление может модифицировать активность нейротрансмиттерных систем, в частности, снижать метаболизм серотонина. В то же время, провоспалительные цитокины способны активировать другой путь катаболизма триптофана, а именно эксайтотоксическое звено катаболизма кинуренина, посредством увеличения экспрессии вовлечённых в данный метаболический путь ферментов (индоламин 2,3-диоксигеназы, кинуренин 3-монооксигеназы, кинурениназы) [Troubat et al., 2021]. Данный факт проясняет взаимосвязь между цитокиновой и кинурениновой моделями депрессии.

Ещё одним важнейшим компонентом патогенеза депрессивного расстройства является изменение содержания нейротрофических факторов. К важнейшим нейротрофическим факторам относят нейротрофический фактор мозга (BDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), нейротрофины (NT-3, NT-4), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), фактор роста нервов (NGF) и некоторые другие [Nasrolahi et al., 2022; Bartus, Johnson, 2016]. Данные факторы регулируют процессы пролиферации, миграции, дифференцировки нейронов, глиальных клеток и их предшественников, способствуют поддержанию их жизнеспособности, участвуют в синаптогенезе и синаптической пластичности, т.е. вовлечены в процессы, являющиеся ключевыми для поддержания нормального функционирования ЦНС. Также многие нейротрофические факторы (BDNF, VEGF, NGF, NT-3) вовлечены в регуляцию эмоционального состояния и психических патологий [Xu et al., 2020]. Нейротрофическая гипотеза депрессии акцентирует внимание на связи депрессивного состояния с уменьшением продукции ряда нейротрофических факторов в ЦНС. Наиболее изучена связь депрессивных расстройств с уровнем

BDNF. Показано, что воздействие хронического стресса и глюкокортикоидов ассоциируется со снижением уровня BDNF в префронтальной коре и гиппокампе [Duman et al., 2021]. Именно недостаточность BDNF может играть ключевую роль в снижении интенсивности нейрогенеза при депрессии [Colucci-D'Amato et al., 2020; Zhang et al., 2023]. Причиной снижения уровня нейротрофических факторов является в том числе персистирующее нейровоспаление [Giacobbo et al., 2019]. Следствием дефицита этих факторов является, в свою очередь, нарастание нейродегенеративных изменений и подавление нейрогенеза.

Важно отметить, что рассмотренные гипотезы и модели депрессии не являются взаимоисключающими. Каждая из них акцентирует внимание на какой-либо из составляющих сложного патогенеза депрессии: снижении уровня моноаминовых нейротрансмиттеров или нейротрофических факторов, нейровоспалении, нейродегенерации и т.д. Несмотря на то, что многие компоненты патогенеза депрессии известны и неплохо изучены, полного и целостного представления о нём в настоящее время не сформировано. В связи с этим, исследования, посвященные отдельным звеньям патогенеза депрессии и связи между ними, являются весьма актуальными.

1.6. Иммунопатогенез нейропатологии

1.6.1. M1 и M2 макрофаги в нейропатологии

Доминировавшие ранее представления о полной иммунной привилегированности ЦНС и отсутствии в паренхиме мозга иммунных клеток, за исключением резидентных, в последние десятилетия подверглись значительному пересмотру. Накопилось множество убедительных данных о том, что иммунные клетки из периферического кровотока проникают в ткань мозга, причём этот процесс значительно интенсифицируется при патологии. Показано, что иммунокомпетентные клетки, рекрутированные в паренхиму мозга при различных патологических состояниях, выполняют различные функции: элиминируют клеточный детрит,

осуществляют антигенную презентацию, а также регулируют процессы нейровоспаления и нейрорегенерации на различных стадиях [Черных и др., 2017; David, Kroner, 2011].

Среди иммунокомпетентных клеток ключевая роль в регуляции нейровоспаления и нейрорегенерации отводится макрофагам. Их способность оперативно менять фенотип в ответ на сигналы микроокружения является важной для контроля воспалительной реакции, регенерации, а также переключения этих процессов и их стадий [Chazaud, 2014]. Важно отметить, что в патологическом очаге присутствуют одновременно как M1, так и M2 клетки, а преобладание M1 или M2 фенотипа в популяции рекрутированных макрофагов во многом определяется типом патологии и конкретным этапом патологического/регенеративного процесса [Martinez, Gordon, 2014]. Показано, что для нормального протекания восстановления ткани необходимо присутствие как M1, так и M2 макрофагов в определенные периоды регенерации. Так, M1 макрофаги в воспалительную фазу обеспечивают презентацию антигена, продуцируют активные формы кислорода, стерилизуют патологический очаг. В свою очередь, M2 клетки обеспечивают нормальную регенерацию, васкуляризацию, ремоделирование ткани [Wynn, Valnella, 2016].

При патологии ЦНС зачастую наблюдается недостаточность противовоспалительной и репаративной активности макрофагов: провоспалительный/тканедеструктивный M1 фенотип часто превалирует в очаге повреждения над разрешающим/противовоспалительным M2. Это происходит, во-первых, потому что микроглия при хронической и/или интенсивной активации приобретает стойкий M1 фенотип [Черных и др., 2017]. Спектр сигналов, активирующих микроглию, достаточно широк и включает, например, инфекционные агенты, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением, растворимые факторы, выделяемые ишемизированными нейронами [Hu et al., 2012]. Во-вторых, несмотря на то, что в популяции рекрутированных макрофагов могут преобладать клетки M2 фенотипа, под влиянием воспалительного микроокружения M2 фенотипа

переключается на M1 [Koh, DiPietro, 2011]. В большинстве тканей при течении патологического процесса, например, раневого, воспалительная стадия с преобладанием клеток M1 фенотипа постепенно сменяется репаративной, ассоциированной с M2 фенотипом [Hassanshani et al., 2022]. В ЦНС же, напротив, зачастую на раннем этапе повреждения преобладания M1 клеток не наблюдается, но позднее именно они начинают доминировать. Так, в модели черепно-мозговой травмы у мышей показано, что количество макрофагов с M2 фенотипом было максимальным на раннем этапе восстановления (5 сутки) и быстро снижалось в течение второй недели после повреждения, в то время как количество M1 макрофагов постепенно нарастало в течение первой недели, оставаясь повышенным по истечении двух недель после повреждения. [Wang et al., 2013]. При ишемическом инсульте наблюдается схожий паттерн: преобладание M2 макрофагов на ранних стадиях (первая неделя) и дальнейшее постепенное переключение на M1 фенотип [Var et al., 2021]. При хронических нейродегенеративных заболеваниях продемонстрирована патогенетическая роль нейровоспаления. Так, при болезни Альцгеймера накопление бета-амилоида индуцирует активацию микроглии, которая впоследствии приобретает хронический характер [Thakur et al., 2023]. При болезни Паркинсона показано нейропротективное влияние микроглии на ранних этапах заболевания: микроглия повышает выживаемость нейронов, в том числе поврежденных допаминергических клеток [Bartels et al., 2020]. Однако на более поздних стадиях заболевания на фоне устойчивой и чрезмерной активации микроглии наблюдается избыточная продукция провоспалительных цитокинов, микроглия оказывает нейродеструктивное действие [Araújo et al., 2022]. Активно обсуждается роль нейровоспаления при депрессивных состояниях. Так, описано преобладание макрофагов/микроглии с M1 фенотипом [Dey, Giblin, 2018], а также повышенный уровень провоспалительных цитокинов в головном мозге при депрессии и их вовлеченность в патогенез заболевания [Fan et al., 2019]. Действительно, хроническое воспаление при депрессии подавляет нейрогенез и

нейропластичность, нарушает метаболизм нейротрансмиттеров, снижает продукцию нейротрофических факторов [Ambree et al., 2018; Felger, 2019]. Таким образом, при различных видах патологии ЦНС зачастую формируется очаг хронического воспаления с преобладанием M1 макрофагов/микроглии, который препятствует переключению доминирующего фенотипа на M2 и, как следствие, нормальной регенерации ткани.

1.6.2. Переключение M1/M2 как подход к терапии заболеваний ЦНС. Клеточная терапия

Смещение баланса M1/M2 макрофагов в сторону M1, как было сказано выше, является важным звеном патогенеза различных заболеваний ЦНС, от инсульта до нейродегенеративных заболеваний и депрессии. В связи с этим, в качестве терапевтической мишени представляется закономерным регулирование этого баланса и сдвиг его в сторону M2 фенотипа. Перспективность подобного подхода убедительно продемонстрирована в экспериментальных моделях различной патологии ЦНС как *in vitro*, так и *in vivo*.

Во-первых, накапливаются данные о том, что переключение M1/M2 является важным компонентом в механизме действия уже известных и широко применяемых при различных патологиях фармакологических препаратов. Так, например, с M2-поляризующим действием ассоциируется терапевтический эффект препаратов, применяющихся при рассеянном склерозе: глатирамер ацетата, финголимода, глюкокортикоидов [Rawji, Yong, 2013; Kuntzel, Bagnard, 2022]. В моделях депрессии продемонстрировано ингибирование M1- и активирование M2-поляризации микроглии, а также снижение уровня провоспалительных цитокинов в головном мозге и спинномозговой жидкости под влиянием различных антидепрессантов [Kalkman, Feuerbach, 2016]. Выявлен M2-поляризующий эффект флуоксетина и циталопрама *in vitro* при исследовании клеточных линий и первичных культур микроглии [Su et al., 2015]. Улучшение когнитивных функций и уменьшение очага

повреждения при инсульте на фоне применения агониста PPAR γ рецепторов росиглитазона связывают с перепрограммированием микроглии/макрофагов в M2 фенотип [Han et al., 2015]. Изучаются новые фармакологические подходы к терапии заболеваний ЦНС с акцентом на M1/M2 переключение, в том числе с исследованием возможных его механизмов. Показано, что эхинакозид ингибирует M1 поляризацию микроглии *in vitro* и активирует сигнальные пути JAK1/Stat3 и CREB/BDNF *in vivo*, что сопровождается коррекцией поведенческих паттернов у депрессивноподобных мышей и снижением уровня провоспалительных цитокинов и может свидетельствовать о вовлеченности упомянутых сигнальных путей в процесс M2 поляризации микроглии [Lu et al., 2023].

Во-вторых, активно исследуются основанные на клеточной терапии подходы к терапии заболеваний ЦНС, в том числе базирующиеся на M1/M2 переключении. В модели черепно-мозговой травмы у мышей показано увеличение M2/M1 соотношения и снижение уровня активации микроглии (оцениваемой по уровню экспрессии IBA1) при внутримозговой трансплантации НСК человека линии K048, предварительно культивированных в присутствии FGF и B27 [Gao et al., 2016]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что активация нейрогенеза при поражении ЦНС важна не только для замещения повреждённых нейронов новыми клетками, но и для регуляции баланса M1/M2 и опосредования нейропротекторного эффекта. Активно обсуждается и исследуется трансплантация мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при различных патологиях ЦНС. Так, положительный эффект МСК показан в моделях депрессии и рассеянного склероза у мышей [Huang et al., 2023]. Проводятся клинические исследования по применению МСК в лечении пациентов с депрессивными состояниями [*clinicaltrials.gov* ID NCT03522545; NCT03265808]. У больных с прогрессирующим рассеянным склерозом продемонстрирована безопасность и клиническая эффективность трансплантации аутологичных МСК, при этом введение МСК сопровождалось достоверным снижением активности заболевания и частоты рецидивов [Petrou et al., 2020]. Активно исследуются эффекты

МСК и при других патологиях: черепно-мозговой травме, травме спинного мозга, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, боковом амиотрофическом склерозе, инсульте [Andrzejewska et al., 2021, Kohli et al., 2021, Heris et al., 2022]. Эффекты трансплантации МСК связывают с секрецией ими паракринных факторов, стимулирующих регенерацию, и иммуномодулирующим действием, заключающемся, в частности, в ингибировании про- и стимуляции противовоспалительных реакций, и в том числе – сдвиге баланса М1/М2 микроглии и макрофагов в сторону М2 [Andrzejewska et al., 2021]. Ещё один возможный механизм действия МСК заключается в том, что в условиях неблагоприятного микроокружения трансплантированные клетки подвергаются апоптозу с последующим поглощением макрофагами (эффероцитоз), что, в свою очередь приводит к индукции у макрофагов стойкого противовоспалительного М2 фенотипа и стимулирует продукцию ими значительного количества прорегенераторных, противовоспалительных и ростовых факторов (IGF-1, VEGF, PDGF и др) [Lu et al., 2013].

Одним из активно развивающихся направлений в клеточной терапии является трансплантация МНК пуповинной крови. Этот подход наиболее востребован и изучен в отношении терапии гематологических заболеваний [Sanchez-Petitto et al., 2023], однако, есть данные и о его положительном эффекте при заболеваниях ЦНС. Так, показан противовоспалительный эффект трансплантации МНК пуповинной крови в модели инсульта на крысах [Vendrame et al., 2005]. Активно проводятся клинические испытания как аутологичной, так и аллогенной трансплантации МНК пуповинной крови у пациентов с инсультом: показана безопасность трансплантации и клиническое улучшение у больных в результате проведенной терапии [Laskowitz et al., 2018]. Обнадёживающие результаты продемонстрированы также при использовании МНК пуповинной крови в терапии нейродегенеративных заболеваний, в частности, продемонстрирована эффективность трансплантации МНК пуповинной крови в моделях бокового амиотрофического склероза и болезни Альцгеймера [Herranz et al., 2010, Darlington et al., 2013, Garbuzova-Davis et al., 2012].

Терапевтический эффект трансплантации МНК пуповинной крови связывается не только со стволовыми клетками, доля которых среди всех МНК не превышает 1-2%, но и с наличием большого количества моноцитов. Так, деплеция моноцитов приводит к снижению нейропротективного эффекта трансплантированных МНК в модели инсульта [Womble et al., 2014]. Моноциты пуповинной крови являются незрелыми клетками с низкой иммуногенностью, высокой противовоспалительной и проангиогенной активностью, а также склонностью к поляризации в М2 макрофаги [Sandberg et al., 2010]. Нейропротективный эффект МНК пуповинной крови продемонстрирован и *in vitro* в культуре первичных нейронов крысы, подвергающихся кислородно-глюкозной депривации, опосредуемый через Akt/MAPK сигнальный путь [Shahaduzzaman et al., 2015].

1.7. М2 макрофаги как клеточная платформа для индукции нейрорегенерации

1.7.2. Применение М2 макрофагов для терапии заболеваний ЦНС

Обеспечение М2 фенотипа микроглии как терапевтическая мишень в терапии заболеваний ЦНС может достигаться не только репрограммированием фенотипа макрофагов (с провоспалительного М1 на противовоспалительный М2), о чём было сказано выше, но также и непосредственным применением М2 макрофагов. Причем следует отметить, что макрофаги как кандидаты для клеточной терапии имеют ряд преимуществ перед прогениторными/стволовыми клетками, поскольку макрофаги не онкогенны, не тератогенны, терапия на основе макрофагов может легко повторяться и не связана с этическими или моральными проблемами. Данный подход успешно апробирован в нескольких моделях различных заболеваний у животных. В частности, показано, что внутривенное введение М2 макрофагов мышам с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом снижает выраженность патологической симптоматики, уменьшает интенсивность воспалительной инфильтрации и демиелинизирующих изменений в ЦНС. По крайней мере, частично, позитивное влияние М2 макрофагов связано с блокировкой пути NF- κ B [Chu et al., 2021].

Введение аутологичных M2-подобных клеток крысам с травмой спинного мозга способствует стимуляции восстановления тканей и ускорению неврологического восстановления [Rapalino et al., 1998]. Относительно применения M2-макрофагов у людей, данные значительно более скудные. В пилотном клиническом испытании продемонстрирована положительная неврологическая динамика у пациентов с церебральным инсультом при интратекальном введении аутологичных M2 макрофагов [Chernykh et al., 2016]. В то же время, начиная с 2015 года, наблюдается значительный рост числа патентов, посвященных использованию макрофагов в онкологии и регенеративной медицине. Это свидетельствует о возрастающем интересе исследователей к терапии, базирующейся на использовании макрофагов, и признании большого потенциала макрофагов в качестве источников клеточной терапии, «тремя китами» которого являются регенеративная активность, фагоцитарная способность и противовоспалительная активность этих клеток [Na et al., 2023].

1.7.2. Использование факторов, продуцируемых макрофагами, при патологии ЦНС

Наряду с многообещающими перспективами, использование активированных *ex vivo* M2 клеток в качестве терапевтического средства имеет ряд ограничений. Одним из наиболее существенных является возможность M2/M1 переключения в условиях воспалительного микроокружения [Hu et al., 2015]. Кроме того, формирование M2 фенотипа микроглии должно быть своевременным, когда все полезные роли M1 микроглии (способствует синаптической перестройке и очищению от клеточного дебриса) уже исчерпаны. Наряду с этим, долгосрочное поддержание фенотипов M2 может негативно влиять на иммунную защиту [Komohara et al., 2008]. Наконец, остается открытым вопрос об оптимальном пути введения клеток, поскольку используемые пути (подкожное, внутривенное, интратекальное введение) являются инвазивными. Некоторые из этих ограничений могут быть преодолены использованием секреторных продуктов M2 макрофагов.

Действительно, многие факторы, продуцируемые M2 макрофагами, способствуют индукции противовоспалительной активности макрофагов/микроглии, в том числе переключению M1/M2 (IL-10), модифицируют провоспалительное микроокружение в очаге воспаления, обладают нейротрофической и нейрорегенеративной активностью (IGF-1, FGF-b, EGF, BDNF, NGF и др.), индуцируют ангиогенез (VEGF) (см. соответствующие разделы обсуждения) [Черных и др., 2017].

Что касается наиболее оптимального пути введения факторов в головной мозг, одним из многообещающих является интраназальная доставка лекарственных средств. Эффективность назального пути введения различных средств в лечении нейродегенеративных и психических расстройств продемонстрирована во многих исследованиях. Показано, что проникновение препаратов в ЦНС при интраназальном введении осуществляется через обонятельный и тройничный пути, при этом минуются гематоэнцефалический и гематоликворный барьеры, что обуславливает достаточно высокую биодоступность препаратов [Erdo et al., 2018]. В пилотных клинических исследованиях показана эффективность интраназального введения растворимых факторов M2 макрофагов при постковидной гипосмии [Shevela et al., 2024] и цереброваскулярной патологии [NCT02957123, clinicaltrials.gov].

Тем не менее, данные о влиянии продуцируемых макрофагами растворимых факторов на процессы нейрорегенерации как *in vitro*, так и *in vivo* в моделях различных патологий в настоящий момент остаются крайне неполными, что обуславливает актуальность дальнейших исследований в этой области.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Генерация макрофагов

В исследование были включены условно здоровые доноры в возрасте от 18 до 70 лет обоих полов. У всех доноров было получено письменное информированное согласие. Критериями исключения доноров было наличие аутоиммунных, онкологических заболеваний, хронических вирусных инфекций, психических заболеваний. Периферическая венозная кровь в объеме 20 мл забиралась в вакутейнеры, содержащие антикоагулянт; забор крови осуществлялся в условиях пункта переливания крови ГБУЗ НСО "ГКБ № 1", г. Новосибирск.

Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием (20 мин, 3000 об/мин) образцов гепаринизированной венозной крови доноров в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho=1,078$, Sigma-Aldrich, США).

Для выделения адгезивной фракции МНК (в концентрации $4-5 \times 10^6$ /мл) культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария). В качестве среды для культивирования использовали RPMI-1640 (БиолоТ, Россия), дополненную 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF (Sigma-Aldrich, США) и 10% FBS (Biowest, США) для генерации M1 и M2a макрофагов или 2% аутологичной плазмы крови для генерации M2(LS) макрофагов. Неадгезивную фракцию клеток удаляли через 1 час для генерации M1 и M2a и через 18 часов - для генерации M2(LS). Увеличение до 18 часов времени культивирования моноцитов в присутствии клеток неадгезивной фракции необходимо и достаточно для развития апоптоза во фракции неприлипших клеток и взаимодействия моноцитов с апоптотическими клетками, которое индуцирует последующую M2 поляризацию. После удаления клеток неадгезивной фракции и возвращения надосадочной жидкости в лунки, клетки адгезивной фракции продолжали культивировать в течение 7 дней. На 5-ый день в культуры M1 и M2a добавляли

поляризующие стимулы: 200 МЕ/мл IFN- γ (Фармаклон, Россия) и 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США) соответственно (рисунк 2). По окончании культивирования кондиционную среду (КС) макрофагов собирали, центрифугировали (10 мин, 3000 об/мин), подвергали фильтрации (диаметр пор фильтра 0,22 мкм) и далее хранили при температуре -80°C до использования в экспериментах.

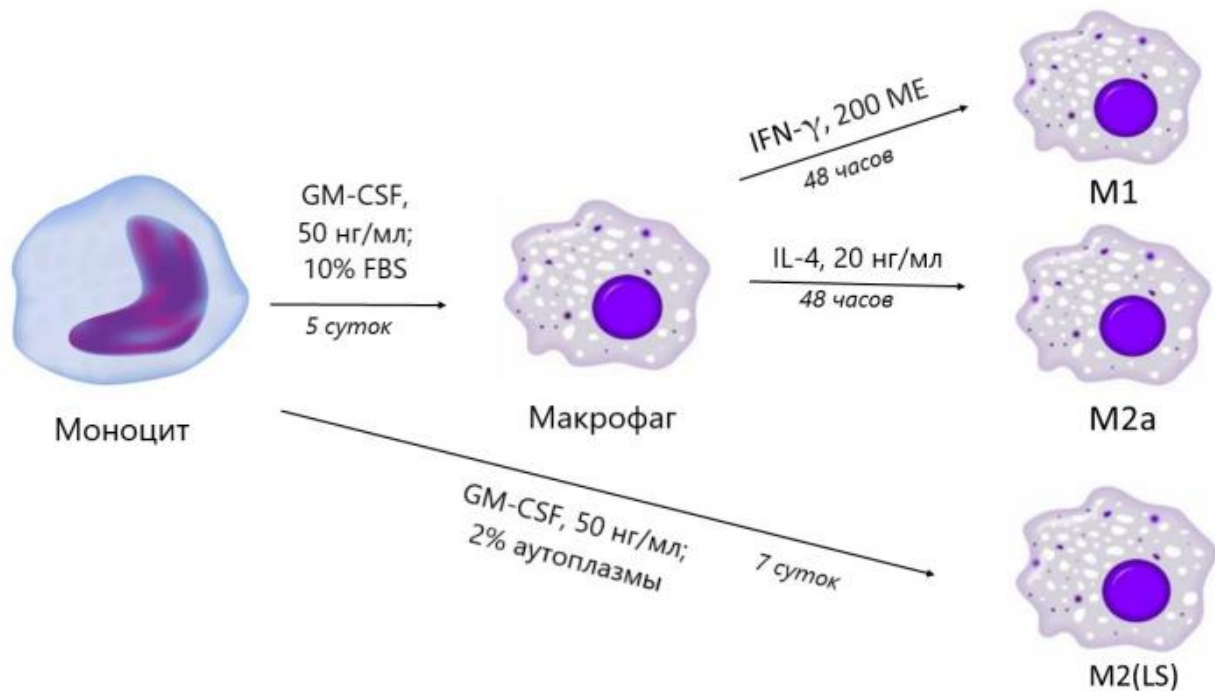


Рисунок 2 – Схема генерации макрофагов

2.2. Культивирование клеток SH-SY5Y

Криоконсервированные аликвоты с клетками SH-SY5Y (получены от пассажей 2-3) хранили при температуре -140°C. Клетки размораживали и культивировали во флаконах T-25 в среде DMEM/F12 (БиолоТ, Россия) с добавлением 10% FBS (Biowest, США). До использования в экспериментах клетки предварительно пассировали 2-3 раза. Клетки пассировали при достижении 70-80% монослоя, с использованием 0,25% раствора трипсина (Sigma-Aldrich, США) и 0,02% раствора ЭДТА (ICN, США) в течение 5 минут.

В качестве повреждающих факторов при культивировании клеток SH-SY5Y использовали 1) частичную депривацию сывороточных факторов (1% FBS); 2) индуктор гипоксии дихлорид кобальта, CoCl_2 (100 мкмоль, Sigma-Aldrich, США) [Munoz-Sanchez, Chanez-Cardenas, 2021].

2.3. Схема экспериментов *in vitro*

Для исследования нейрорегенераторной активности растворимых факторов макрофагов *in vitro*, клетки SH-SY5Y культивировали в условиях депривации сывороточных факторов и гипоксии в присутствии кондиционной среды (КС) макрофагов (рисунк 3). КС использовали в концентрации 10-50% (v/V, % от общего объёма культуральной среды). На 3 и 7 сутки культивирования оценивали свойства клеток SH-SY5Y: пролиферативную активность, клеточный выход, жизнеспособность и уровень дифференцировки. В качестве контролей использовали клетки, культивируемые в стандартных условиях (10% FBS) и клетки, культивируемые в условиях депривации сыворотки или сочетания депривации сыворотки и гипоксии без добавления кондиционной среды.

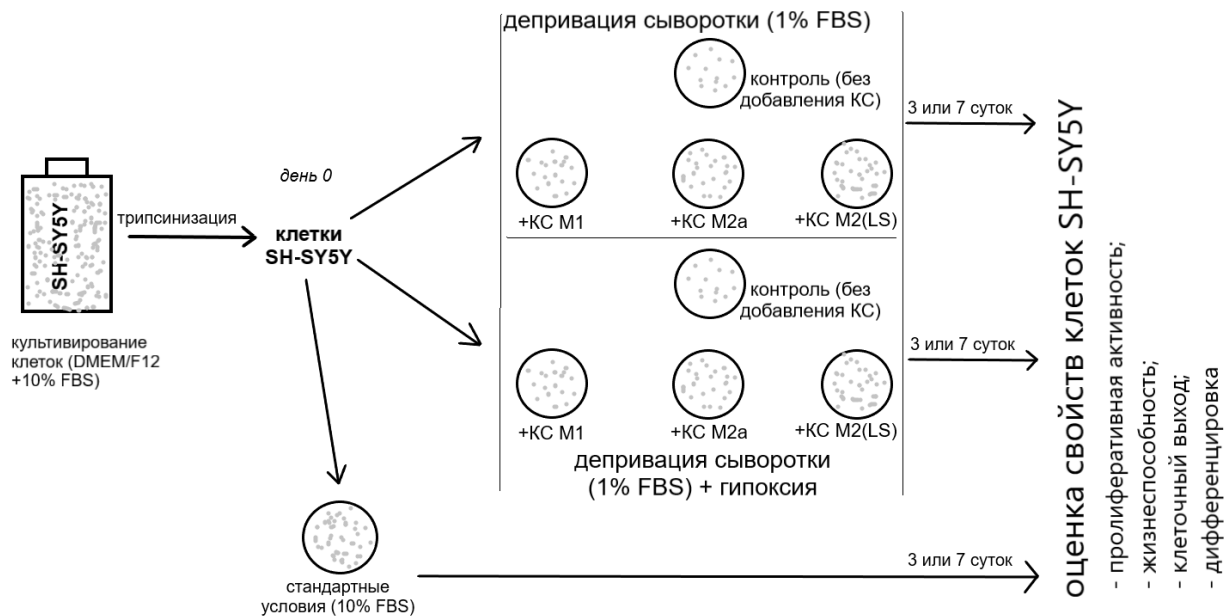


Рисунок 3 – Схема экспериментов *in vitro*

2.4. Оценка пролиферативной активности, клеточного выхода, жизнеспособности и дифференцировки клеток SH-SY5Y

Пролиферативную активность клеток SH-SY5Y оценивали радиометрическим методом с использованием 3[H]-тимидина и с помощью WST-теста. Клетки SH-SY5Y культивировали в 96-луночной планшете исходно по 1×10^4 клеток на лунку для радиометрического метода и по $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку для WST-теста. 3[H]-тимидин (1 мкКю/лунку) вносили за 18 часов до окончания культивирования с последующей оценкой пролиферации на β -счетчике по количеству импульсов в минуту. WST-тест (Merck, Германия) применялся в соответствии с инструкцией производителя. WST-1 добавляли в культуры за 3,5 часа до окончания культивирования, уровень пролиферации оценивали колориметрически при длине волны 450 нм.

Для оценки клеточного выхода и жизнеспособности клетки культивировали в 6-луночных планшетах, исходно по $2,5 \times 10^5$ клеток на лунку. По окончании культивирования клетки получали путём трипсинизации, количество клеток подсчитывали с помощью автоматического счётчика клеток LUNA-II (Logos Biosystems). Жизнеспособность оценивали методом проточной цитометрии по включению 7-аминоактиномицина D (7-AAD) (Calbiochem, США). 7-AAD⁺ клетки при этом определяли как нежизнеспособные.

Уровень дифференцировки клеток оценивали морфометрически. Фотографии культур получали на микроскопе Zeiss PrimoVert (Германия) с использованием камеры AxioCam ERc 5s (Германия). В трёх независимых экспериментах на разных сроках культивирования (3 и 7 сутки) анализировали не менее 100 клеток в случайно выбранных полях зрения. Используя программу ImageJ и плагин NeuronGrowth [Fanti et al., 2011], подсчитывали среднюю длину нейритов клеток, а также количество клеток с нейритом, длина которого превышает длину тела клетки. Для клеток, имеющих более одного нейрита, производили измерение самого длинного. В

качестве индуктора дифференцировки (позитивный контроль) использовали ретиноевую кислоту в концентрации 10 мкмоль.

2.5. Формирование депрессивноподобного состояния у мышей и схема терапии растворимыми факторами M2(LS) макрофагов

Мыши-самцы (CBA×C57Bl/6)F1 возрастом 3,5-4 мес, массой 25-30 г были получены из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН. До начала эксперимента животные содержались в условиях вивария не менее двух недель. Все процедуры были одобрены комитетом по биомедицинской этике НИИФКИ. Животные на протяжении всего эксперимента имели свободный доступ к воде, содержались на стандартной диете и при нормальном световом режиме.

Депрессивноподобное состояние у мышей было сформировано в результате повторного опыта социальных поражений с использованием метода сенсорного контакта [Kudryavtseva, Avgustinovich, 1998]. Предварительно был проведен тест "открытое поле", по результатам которого были выявлены мыши с пассивным типом поведения, отличающиеся повышенной чувствительностью к стрессовым воздействиям. Мышей с пассивным и активным типом поведения помещали попарно в одну клетку, разделенную пополам перфорированной перегородкой, не позволяющей животным физически контактировать друг с другом при сохранении сенсорного контакта (видеть, слышать, обонять друг друга). Ежедневно в одно и то же время крышка клетки заменялась стеклом, позволяющим наблюдать за животными, и после 5-минутной адаптации животных к новым условиям разделяющая клетку перегородка удалялась на 10 минут (в случае, если интенсивные атаки одного из животных продолжались более 3 минут, перегородку возвращали немедленно). Удаление перегородки приводило к агонистическому взаимодействию самцов, в результате которого выявлялись "агрессоры" (животные, которые нападали на партнера) и жертвы – побежденные животные, которые проявляли пассивное

поведение и/или убегали от агрессора. После тестирования жертв помечали и пересаживали в другую клетку, к незнакомому животному с агрессивным типом поведения. Описанные действия повторялись ежедневно на протяжении 20 суток, в результате чего у животных с многократным опытом повторных поражений формировалось депрессивноподобное состояние [Kudryavtseva, Avgustinovich, 1998; Kudryavtseva et al., 2010]. Затем депрессивноподобные мыши были разделены на 2 группы (рисунк 4). В опытной группе мышам интраназально вводили кондиционную среду M2(LS) макрофагов по 60 мкл дважды в день (поочередное закапывание, по 3 раза в левый и правый носовые ходы по 10 мкл) в течение 7 дней. Контрольной группой служили животные, которым вводили среду RPMI-1640 по аналогичной схеме. После проведения курса терапии животных выводили из эксперимента.

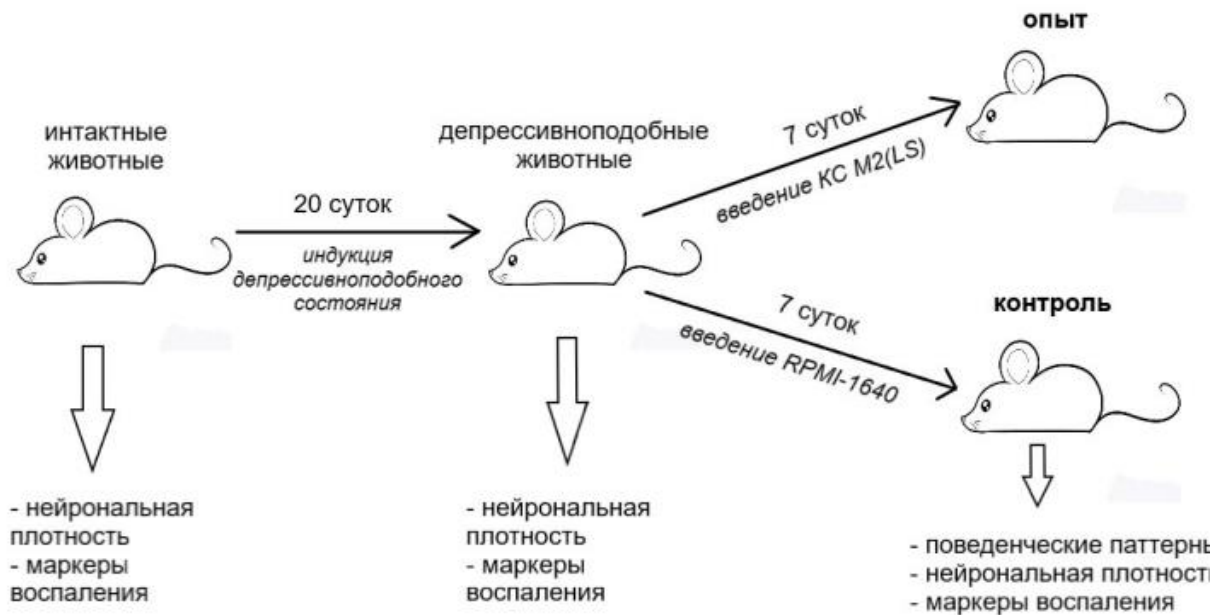


Рисунок 4 – Схема экспериментов *in vivo*

2.6 Оценка поведенческого паттерна мышей

Поведение депрессивноподобных мышей оценивали в тестах «открытое поле» (исследовательская активность, моторная активность, эмоциональная реактивность),

принудительное плавание по Порсолту (депрессивноподобное поведение) с помощью аппаратно-программного комплекса EthoVision XT (Noldus Information Technology, Нидерланды), а также потребление 1% сахарозы (ангедония). Опытной группой являлись депрессивноподобные животные, получившие семидневный курс интраназальной терапии кондиционными средами M2(LS) макрофагов, контрольной – животные, получавшие питательную среду RPMI-1640.

Для теста "открытое поле" использовалась стандартная установка, камера размером 1x1 метр, с высокими (40 см) бортами и расчерченным на равные (10x10 см) сектора полом для регистрации двигательной активности исследуемых животных. Перед исследованием мышь помещали в угол камеры, затем в течение 5 минут регистрировали поведение животного. Для оценки исследовательской активности измеряли количество свободных (без опоры на стенку камеры) и пристеночных (с опорой) вертикальных стоек; для моторной активности - число пересечённых за время исследования линий, разделяющих квадраты на полу камеры. Для оценки эмоциональной реактивности измеряли количество фекальных болюсов животного.

В тесте принудительного плавания по Порсолту каждое животное помещали в сосуд, заполненный водой температурой 25°C до 30 см на 6 минут. Оценку активности начинали через 1 минуту после помещения животного в сосуд и проводили в течение 5 минут. Оценивали продолжительность высокой активности животного (интенсивные гребки всеми лапами), умеренной активности (слабые движения задними лапами), общую активность (суммарная продолжительность высокой и умеренной активности), а также время неподвижности.

Ангедонию оценивали по соотношению потребления 1% раствора сахарозы (которому в норме мыши отдают предпочтение) и воды в условиях свободного выбора в течение 10 дней после курсового введения КС M2(LS).

2.7. Определение уровня цитокинов в головном мозге мышей

Ткани исследуемых структур головного мозга мышей (гиппокамп, стриатум, фронтальная кора) гомогенизировали в среде RPMI-1640 с добавлением 0,1% Triton X-100 (Gerbu Biotechnik, Германия), центрифугировали (10000 об/мин, 3 мин) и собирали надосадочную жидкость. Содержание цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-6) в надосадочной жидкости оценивали методом ИФА соответствующими тест-системами (R&D Systems, Великобритания) в соответствии с инструкциями фирмы производителя.

2.8. Оценка относительной нейрональной плотности и уровня экспрессии IBA-1 в головном мозге мышей

Мышей, усыпленных в камере с CO₂, транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем 4% раствором параформальдегида в PBS. Головной мозг быстро извлекали, обезживали 40% раствором сахарозы в PBS с 4 % параформальдегидом, замораживали в среде О.С.Т и хранили при температуре -70° С. Криосрезы головного мозга толщиной 30 мкм были получены при помощи криотома (HistoSafe MicroCut - SADV, Китай). Криосрезы были окрашены по методу Ниссля (позволяет визуализировать нейроны) и IBA-1 (является маркером активации микроглии) для исследования нейрональной плотности и уровня экспрессии IBA-1 соответственно. Нейрональную плотность оценивали в пирамидном слое фронтальной коры, а также в CA1 и CA3 зонах гиппокампа; уровень экспрессии IBA-1 – в пирамидном слое фронтальной коры, стриатуме, зубчатой извилине, гипоталамусе, CA1 и CA3 зонах гиппокампа. Микрофотографии каждого среза были получены на микроскопе (Zeiss Axioslop2, Германия) и обработаны полуавтоматическим методом в программе Image Pro Plus Software (Media Cybernetics, США).

Относительную нейрональную плотность оценивали в пирамидном слое фронтальной коры, а также в CA1 и CA3 зонах гиппокампа. В указанных зонах нейроны располагаются настолько плотно, что визуализировать и подсчитать

отдельные клетки зачастую не представляется возможным. В связи с этим использовали показатель относительной нейрональной плотности, которая представляет собой процентное отношение площади, занимаемой Нисслевыми клетками (нейроны), к площади всего участка интереса, выбираемого в исследуемой зоне головного мозга случайным образом. Площадь участка интереса была постоянной для каждого среза и составляла 136036 мкм² для фронтальной коры и 145907 мкм² для CA1 и CA3 зон гиппокампа.

Для оценки уровня экспрессии IBA-1 применяли показатель интегральной оптической плотности (IOD) в условных единицах свечения. Измеряли показатель IOD в границах случайно выбранного участка интереса, площадь которого составляла 145907 мкм² для CA1 и CA3 зон гиппокампа и 136036 мкм² для остальных исследуемых структур.

2.9. Статистическая обработка результатов

Для проведения статистической обработки полученных данных использовали программное обеспечение Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (Me [IQR, 25-75% квантили]). При проведении сравнений независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни, для связанных выборок использовали W-критерий Вилкоксона. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y

Пролиферация нейральных стволовых клеток (НСК) является важной составляющей процесса клеточной нейрорегенерации, как в нормальных условиях, так и при патологии ЦНС. При повреждении ЦНС пролиферация НСК интенсифицируется, поскольку требуется заместить больший объём повреждённых клеток, нейральные предшественники впоследствии мигрируют, дифференцируются и встраиваются в нейрональную сеть, замещая погибшие клетки. Важную роль в регуляции пролиферации НСК играют ростовые и трофические факторы, такие как VEGF, MIF, EPO и другие. Ключевыми продуцентами этих факторов являются клетки иммунной системы, в том числе рекрутируемые макрофаги моноцитарного происхождения, значение которых в условиях патологии существенно возрастает. Макрофаги являются пластичной популяцией клеток и способны изменять свой функциональный фенотип в зависимости от сигналов микроокружения. При этом макрофаги с различным функциональным фенотипом характеризуются разным секреторным профилем. В настоящей работе было исследовано влияние растворимых факторов, продуцируемых макрофагами с различным фенотипом, на пролиферацию НСК-подобных клеток SH-SY5Y. В качестве поляризующих стимулов для макрофагов были использованы IFN- γ (классически активированные M1 макрофаги), IL-4 (альтернативно активированные M2a макрофаги) и взаимодействие с апоптотическими клетками (поляризованные эффероцитозом M2(LS) макрофаги).

Кинетика пролиферации клеток SH-SY5Y

При стандартных условиях культивирования (среда DMEM/F12 с добавлением 10% FBS) клетки SH-SY5Y активно пролиферировали. Анализ кинетики

пролиферативного ответа с помощью WST-теста показал постепенное усиление активности пролиферации с максимальными значениями на 7 сутки (рисунок 5А).

Для очагов поражения в ЦНС характерна ишемия, следствием которой является недостаточное поступление в ткань питательных веществ. Для моделирования ишемии *in vitro* была использована частичная депривация ростовых/сывороточных факторов: снижение концентрации FBS в культуральной среде с 10% до 1%.

В условиях депривации пролиферативная активность клеток SH-SY5Y снижалась в 1,2 раза через 3 суток ($p < 0,01$) и в 2 раза через 7 суток ($p < 0,01$) в сравнении со стандартными условиями культивирования (рисунок 5Б).

Поскольку WST-тест может отражать не только пролиферативную, но и метаболическую активность клеток, для исследования пролиферации был использован также радиоизотопный метод, в котором пролиферативная активность клеток оценивается по включению $[3H]$ -тимидина. Данный метод подтвердил снижение пролиферативной активности в условиях депривации сывороточных факторов ($p < 0,01$) (рисунок 5В).

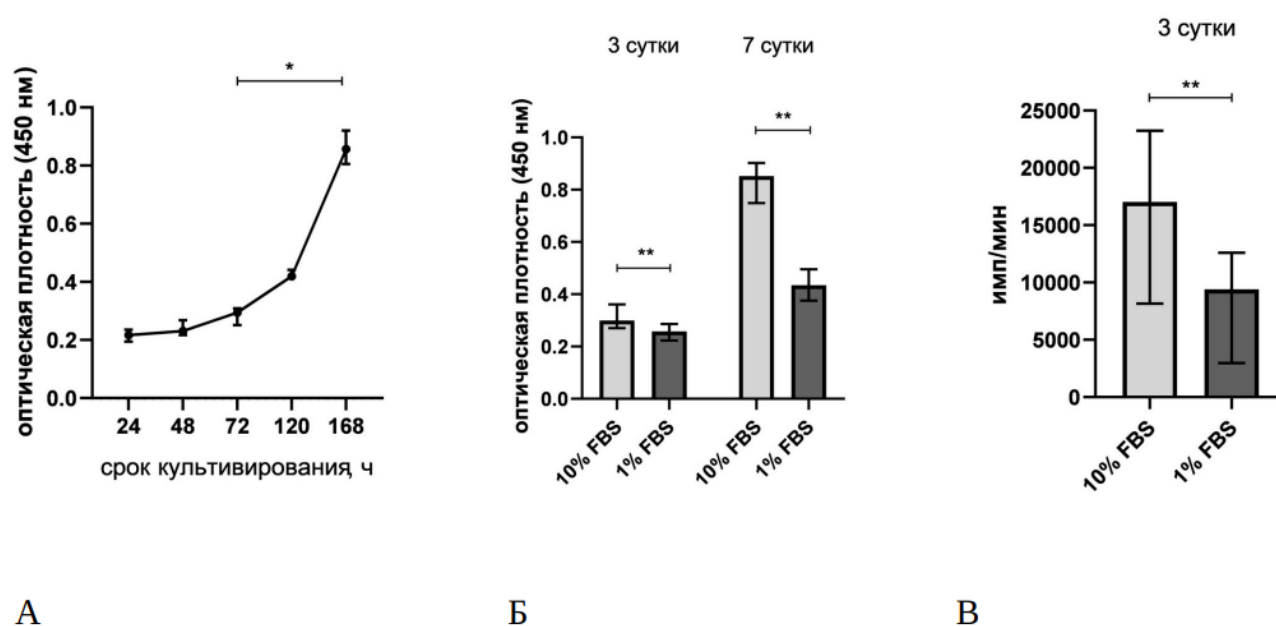


Рисунок 5 – Пролиферативная активность клеток SH-SY5Y при различных условиях

культивирования. А – Кинетика пролиферативного ответа клеток SH-SY5Y при стандартных условиях культивирования. Б, В – Пролиферативная активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сывороточных факторов. Б – WST-тест. В – радиоизотопный метод. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Влияние кондиционной среды, полученной от M2(LS) макрофагов, на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки

Поскольку макрофаги с M2(LS) фенотипом продуцируют широкий спектр ростовых и нейротрофических факторов, было выдвинуто предположение, что кондиционные среды (КС), полученные от таких макрофагов, могут стимулировать пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки. Для проверки этого предположения исследовали влияние различных концентраций КС M2(LS) на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации ростовых/сывороточных факторов на 3 сутки культивирования. Как и предполагалось, растворимые факторы макрофагов усиливали сниженную пролиферацию клеток SH-SY5Y. Стимулирующий эффект проявлялся уже в присутствии 10% КС M2(LS): в этом случае пролиферативный ответ в 3,9 раза превышал уровень "депривационного" контроля ($p < 0,05$) (рисунки б). Увеличение концентрации КС до 30% приводило к значимо более выраженной стимуляции пролиферативной активности SH-SY5Y в сравнении с 10% КС (в 1,75 раза выше) ($p < 0,05$). Однако дальнейшее повышение концентрации КС до 50% не приводило к усилению стимулирующего эффекта. Полученные результаты продемонстрировали про-пролиферативные эффекты растворимых факторов M2(LS) макрофагов, а также позволили обосновать концентрацию КС – 30% (V/V), которая была использована в дальнейших экспериментах.

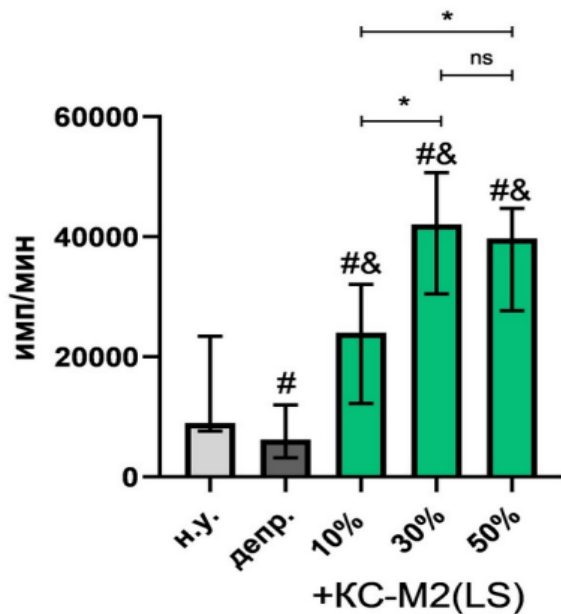


Рисунок 6 – Дозозависимость эффекта кондиционной среды M2(LS) на пролиферацию клеток линии SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки. # – $p < 0,05$ в сравнении с н.у.; & – $p < 0,05$ в сравнении с условиями депривации; * – $p < 0,05$; ns – различие статистически не достоверно; н.у. – нормальные условия, депр. – депривация сывороточных факторов (1% FBS).

Влияние макрофагов с различным функциональным фенотипом на пролиферацию клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки

Выявление способности секторных факторов M2(LS) усиливать сниженную в условиях депривации пролиферацию клеток SH-SY5Y закономерно привело к появлению вопроса, является ли данная способность уникальной для макрофагов, генерированных в условиях эффероцитоза, или её проявляют и макрофаги с другими фенотипами. Для ответа на этот вопрос сравнили эффекты растворимых факторов, полученных от классически активированных M1($\text{IFN-}\gamma$), альтернативно активированных M2a (IL-4) и поляризованных посредством эффероцитоза M2(LS) макрофагов (рисунок 7). На раннем сроке культивирования (3 сутки) все исследованные типы макрофагов усиливали пролиферацию клеток SH-SY5Y, причем не только в сравнении с "депривационным" контролем (в 1,46–1,56 раза, $p < 0,05$), но и

в сравнении с нормальными условиями (в 1,25–1,33 раза, $p<0,05$). Наиболее выраженный эффект на этом сроке регистрировался в присутствии КС М2а. На более позднем сроке культивирования (7 сутки) пропролиферативный эффект растворимых факторов макрофагов сохранялся, о чем свидетельствовало усиление пролиферативной активности клеток SH-SY5Y в 2,09–2,15 раза в сравнении с условиями депривации ($p<0,05$), и был одинаково выраженным для всех типов макрофагов.

Таким образом, способность усиливать пролиферацию нейтральных предшественников, сниженную в условиях депривации, проявляют макрофаги как М1, так и М2 фенотипа.

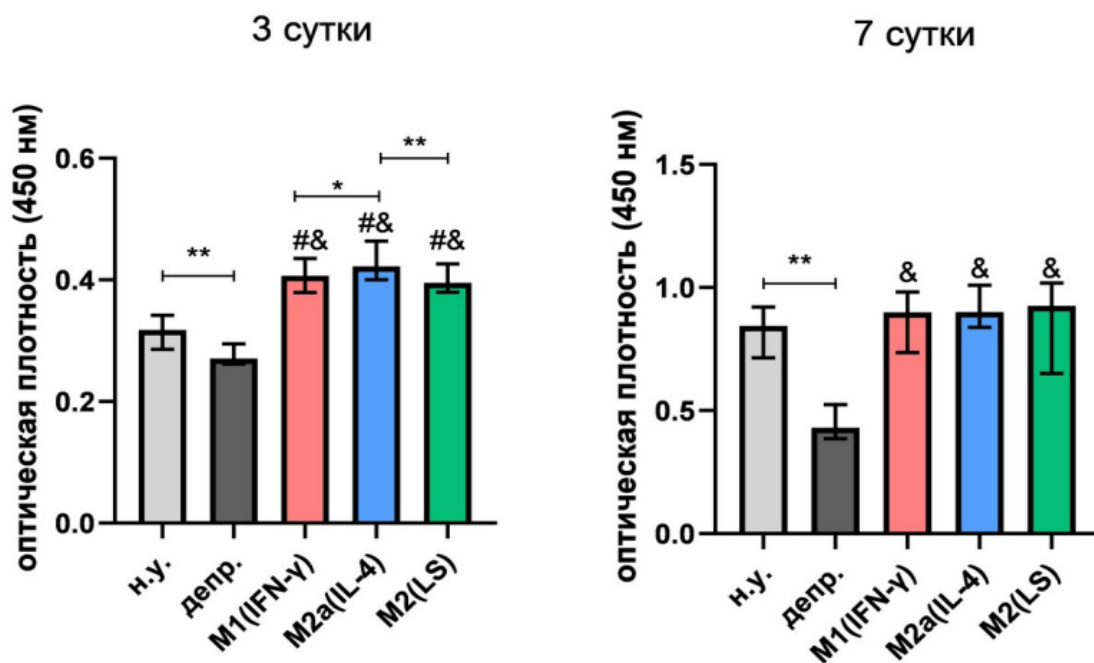


Рисунок 7 – Влияние кондиционных сред, полученных от макрофагов с различным функциональным фенотипом, на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки. # – $p<0,05$ в сравнении с нормальными условиями культивирования; & – $p<0,05$ в сравнении с условиями депривации; * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$. н.у. – нормальные условия, депр. – депривация сывороточных факторов (1% FBS).

Пролиферация клеток SH-SY5Y в условиях комбинации депривации сыворотки и химической гипоксии

Для очага повреждения при различных патологиях ЦНС зачастую характерна не только ишемия, но и гипоксия. Нейрорегенерация, соответственно, протекает в условиях сочетанного воздействия этих факторов. В связи с этим, следующий этап исследования был посвящен характеристике свойств нейральных предшественников в условиях комбинации депривации и гипоксии. При этом гипоксию моделировали добавлением индуктора химической гипоксии CoCl_2 , стабилизатора HIF (hypoxia-inducible factor).

В отсутствие депривации сыворотки (10% FBS) добавление дихлорида кобальта на 3 суток приводило к дозозависимому снижению пролиферации клеток SH-SY5Y, значимому лишь для концентрации 200 мкМ CoCl_2 (рисунок 8). Увеличение времени воздействия CoCl_2 до 7 суток ассоциировалось с существенным подавлением пролиферативной активности клеток SH-SY5Y в широком диапазоне концентраций индуктора гипоксии – от 50 до 200 мкМ ($p < 0,05$).

Оценка динамики пролиферации клеток SH-SY5Y при комбинированном воздействии депривации сыворотки и гипоксии в течение 3-х суток продемонстрировала дозозависимое снижение пролиферации клеток SH-SY5Y в присутствии 100 и 200 мкМ CoCl_2 (рисунок 8).

Через 7 суток пролиферативная активность клеток, находящихся в условиях депривации/гипоксии (д/г), была существенно снижена – в 3,2-4,7 раза в сравнении со стандартными условиями. Снижение уровня пролиферации регистрировалось в присутствии всех исследованных концентраций CoCl_2 и носило четкий дозозависимый характер. Основываясь на данных литературы и собственных результатах, для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 100 мкМоль CoCl_2 . Таким образом, комбинированное воздействие депривации и гипоксии приводило к более значительному снижению пролиферативной активности

клеток SH-SY5Y в сравнении с условиями депривации без гипоксии.

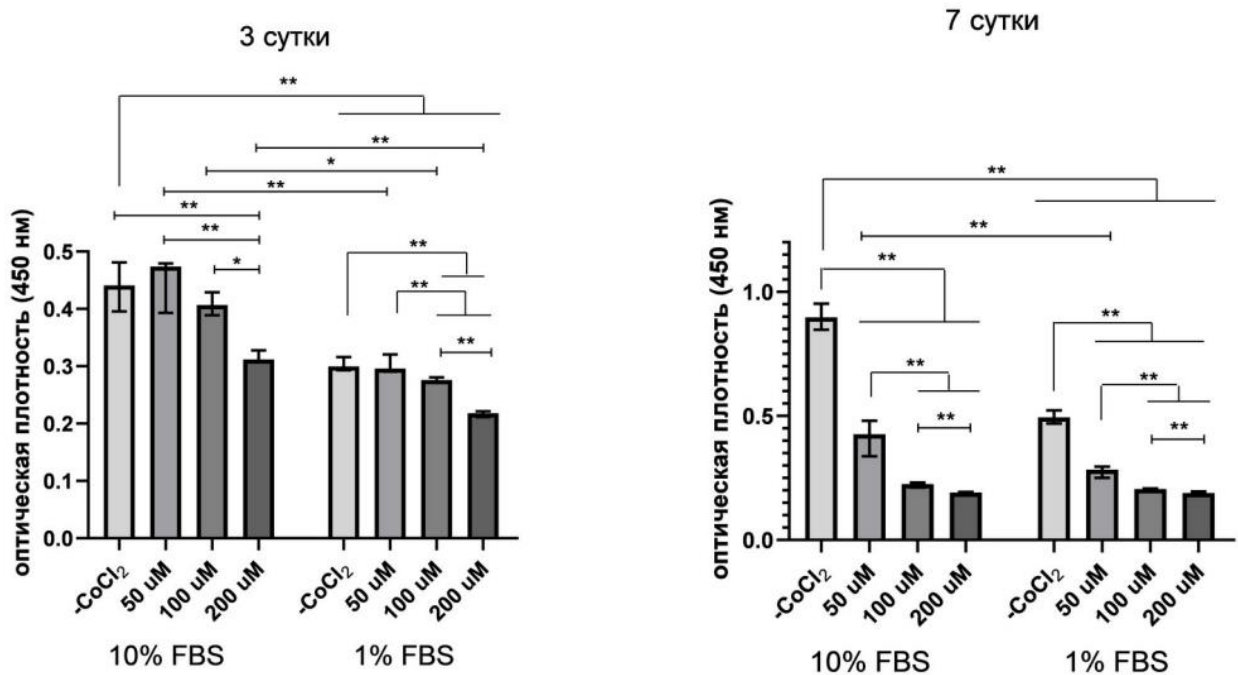


Рисунок 8 – Влияние комбинации депривации сыворотки и гипоксии на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и гипоксии

Учитывая выявленную способность макрофагов усиливать пролиферацию НСК-подобных клеток в условиях депривации, представлялось закономерным оценить эффекты макрофагов в условиях депривации в сочетании с гипоксией, характеризующихся значительным снижением пролиферативной активности клеток SH-SY5Y. Добавление КС макрофагов, полученных от M1(IFN- γ), M2a (IL-4) и M2(LS), приводило к значимому повышению пролиферативной активности клеток SH-SY5Y, культивируемых в условиях д/г, как на раннем (3 сутки), так и на позднем (7 сутки) этапе (рисунок 9). Обращает на себя внимание тот факт, что на 3 сутки

эффекты КС исследуемых типов макрофагов были сопоставимы. Действительно, уровень пролиферации клеток SH-SY5Y возрастал в 1,57-1,68 раза ($p < 0,05$) и был выше, чем при культивировании в нормальных условиях. Стимулирующий эффект КС макрофагов сохранялся и при более длительном воздействии повреждающих факторов – на 7 сутки в условиях д/г ($p < 0,05$). В то же время на этом сроке наиболее выраженный стимулирующий эффект был характерен для M2(LS), которые усиливали пролиферацию в 2,8 раза, что значимо превышало стимулирующие эффекты M1 и M2a ($p < 0,05$).

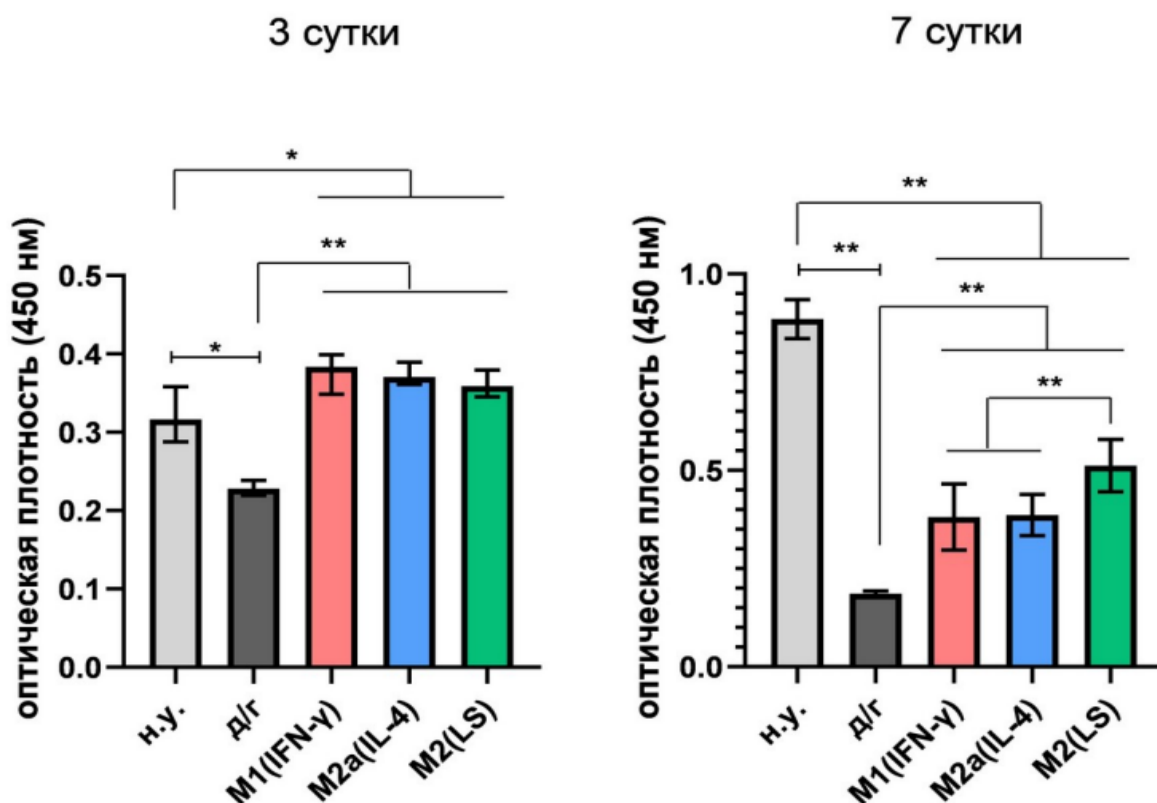


Рисунок 9 – Влияние кондиционных сред, полученных от макрофагов с различным функциональным фенотипом, на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации/гипоксии. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$. н.у. – нормальные условия, д/г – условия депривации и гипоксии.

Таким образом, растворимые факторы макрофагов различных функциональных фенотипов способны усиливать пролиферацию НСК-подобных клеток SH-SY5Y как

в условиях депривации сывороточных факторов, так и при комбинированном воздействии депривации и гипоксии. При этом при усилении повреждающего воздействия (сочетание депривации/гипоксии и более длительный срок культивирования) наиболее выраженный стимулирующий эффект регистрируется у M2(LS) макрофагов.

3.2. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y

Одним из механизмов увеличения пролиферативной активности клеток SH-SY5Y кондиционными средами макрофагов, показанной на предыдущем этапе работы, может быть усиление выживаемости за счёт снижения гибели клеток SH-SY5Y. Некоторые из растворимых факторов, секретируемых макрофагами, способны оказывать протективное действие на НСК, снижая уровень их апоптоза. В частности, показан нейропротективный эффект IGF-1, VEGF, эритропоэтина [Немани et al., 2021; Bondy, Cheng, 2004]. Известно, что секреторный профиль макрофагов напрямую зависит от их фенотипа, который, в свою очередь, формируется под влиянием сигналов микроокружения. При этом уровень продукции конкретного растворимого фактора может варьировать у макрофагов с различными функциональными фенотипами. В литературе имеются данные об эффектах отдельных факторов, секретируемых макрофагами, на свойства клеток SH-SY5Y. Однако оценка влияния кондиционных сред, содержащих комплекс различных факторов, концентрация которых может разниться в зависимости от фенотипа макрофагов, на свойства клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих патологические воздействия, ранее не проводилась.

Было изучено влияние секреторных факторов макрофагов, поляризованных IFN- γ (M1), IL-4 (M2a) и эффероцитозом (M2(LS)) на жизнеспособность НСК-подобных клеток, находящихся в условиях депривации сыворотки и депривации/гипоксии, и анализ зависимости эффекта от длительности и

интенсивности воздействия повреждающих факторов. Кроме того, поскольку количество клеток (клеточный выход) может косвенно отражать как интенсивность пролиферации, так и жизнеспособность клеток, также была проведена оценка выхода клеток SH-SY5Y.

Жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и сочетания депривации и гипоксии

Депривация сыворотки не приводила к снижению жизнеспособности клеток SH-SY5Y в сравнении со стандартными условиями: содержание нежизнеспособных (7-AAD⁺) клеток не превышало 10% как на 3, так и на 7 сутки (*рисунок 10А*). Клеточный выход в условиях депривации был снижен в 1,24 раза ($p > 0,05$) в сравнении со стандартными условиями на 3 сутки и в 2,45 раза ($p < 0,05$) на 7 сутки (*рисунок 10Б*). Более выраженное повреждающее воздействие (сочетание депривации и гипоксии) уже на 3 сутки приводило к значимому увеличению доли нежизнеспособных нейральных предшественников: так, содержание 7-AAD⁺ клеток достигало 25% и было в 3,05 и 2,8 раза выше в сравнении со стандартными условиями и условиями депривации ($p < 0,05$). Кроме того, трёхсуточное воздействие депривации/гипоксии снижало клеточный выход SH-SY5Y в 3,26 раза в сравнении со стандартными условиями и в 2,63 раза в сравнении с условиями депривации ($p < 0,05$) (*рисунок 10Б*). Увеличение длительности депривации/гипоксии до 7 суток приводило к усилению вышеописанных изменений. Так, доля нежизнеспособных клеток в условиях депривации/гипоксии достигала 57%, что было в 2,28 раза выше, чем в аналогичных условиях на 3 сутки ($p < 0,05$) и более, чем в 10 раз выше в сравнении со стандартными условиями и условиями депривации на 7 сутки ($p < 0,01$). Клеточный выход, в свою очередь, в условиях длительной депривации/гипоксии был снижен в 16,8 раза в сравнении со стандартными условиями и в 6,9 раза в сравнении с условиями депривации ($p < 0,01$).

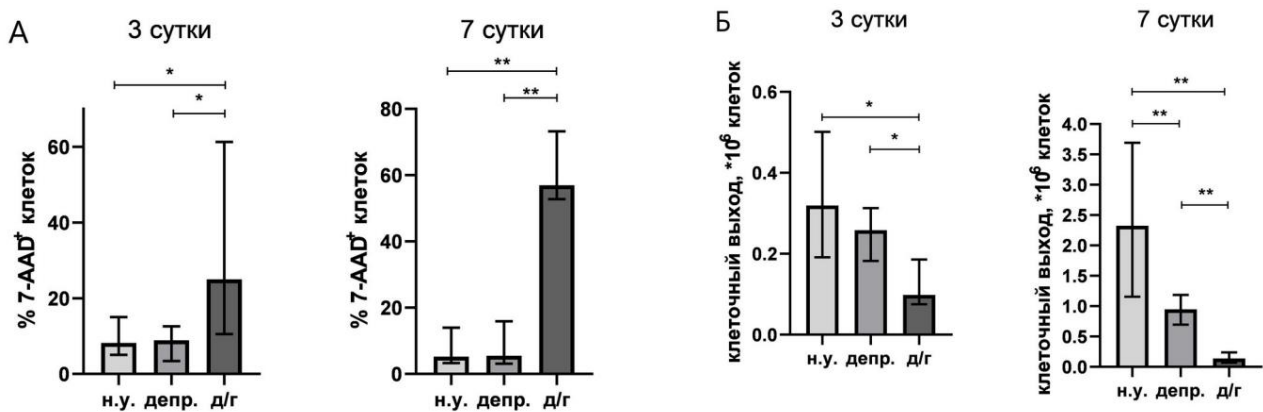


Рисунок 10 – Влияние депривации сыворотки и сочетания депривации и гипоксии на количество нежизнеспособных клеток SH-SY5Y в культуре (А) и клеточный выход SH-SY5Y (Б). н.у. – нормальные условия; депр. – условия депривации сыворотки (1% FBS); д/г – условия депривации и гипоксии. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Таким образом, как краткосрочная, так и длительная депривация сыворотки не оказывала значимого влияния на жизнеспособность клеток SH-SY5Y. В то же время, длительное воздействие депривации снижало клеточный выход SH-SY5Y. Сочетание депривации и гипоксии уже на 3 сутки приводило к выраженному снижению как жизнеспособности, так и клеточного выхода SH-SY5Y. Более длительное воздействие двух повреждающих факторов приводило к усилению описанных изменений.

Влияние кондиционных сред различно активированных макрофагов на жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки

Добавление КС М1 и М2 макрофагов не влияло на жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки ни на 3, ни на 7 сутки (рисунок 11А). В то же время, КС всех исследованных типов макрофагов значимо повышали клеточный выход SH-SY5Y как на 3 (в 1,45-1,72 раза, $p < 0,05$), так и, ещё более выражено, на 7 сутки (в 2,22-4,12 раза, $p < 0,05$) (рисунок 11Б).

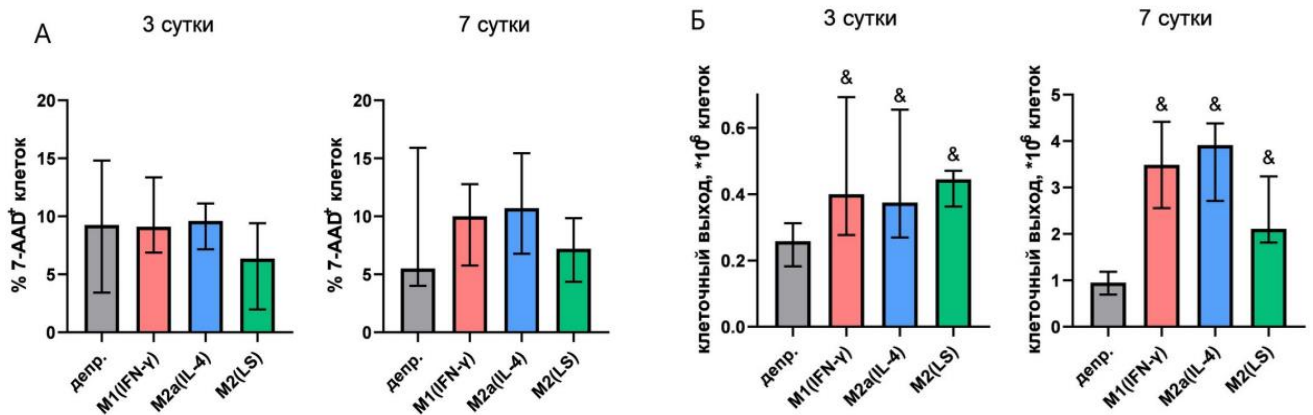


Рисунок 11 – Влияние кондиционных сред различно активированных макрофагов на количество нежизнеспособных клеток SH-SY5Y (А) и клеточный выход SH-SY5Y (Б) в условиях частичной депривации сыворотки. Депр. – условия депривации сыворотки (1% FBS). & – $p < 0,05$ в сравнении с условиями депривации сыворотки.

Влияние кондиционных сред различно активированных макрофагов на жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y в условиях сочетания депривации сыворотки и химической гипоксии

Сочетание депривации и гипоксии, в отличие от депривации в качестве моновоздействия, значительно снижало жизнеспособность и выход клеток SH-SY5Y уже на 3 сутки. КС M2(LS) на этом сроке снижали количество нежизнеспособных (7-AAD⁺) клеток более, чем в 4 раза ($p < 0,05$) (рисунк 12А). КС M1 и M2a макрофагов также снижали количество 7-AAD⁺ клеток (в 1,67 и 1,92 раза соответственно), однако, снижение не достигало уровня статистической достоверности. Протективный эффект КС M2(LS), в свою очередь, значимо превышал эффекты M1 и M2a макрофагов ($p < 0,05$). В то же время, КС M1 и M2a макрофагов на 3 сутки значимо повышали выход клеток SH-SY5Y (в 2,3 и 2,55 раза соответственно, $p < 0,05$), в то время как эффект M2(LS) проявлялся на уровне тренда ($p = 0,09$) (рисунк 12Б).

В условиях более длительной 7-суточной депривации/гипоксии протективный эффект КС M2(LS) сохранялся: количество нежизнеспособных клеток в присутствии КС M2(LS) было ниже как в сравнении с контролем (в 2,43 раза, $p < 0,01$), так и в сравнении с M1 и M2a макрофагами ($p < 0,05$). КС M1 и M2a макрофагов, в свою очередь, не оказывали протективного эффекта. Кроме того, при длительной депривации/гипоксии, лишь добавление КС M2(LS) приводило к достоверному увеличению клеточного выхода в сравнении с контролем.

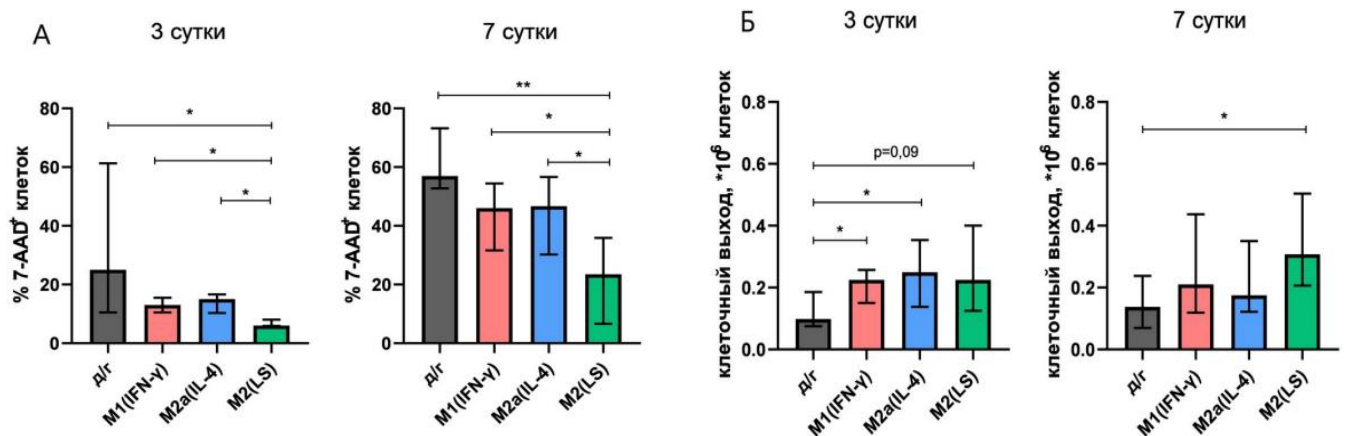


Рисунок 12 – Влияние кондиционных сред различно активированных макрофагов на количество нежизнеспособных клеток SH-SY5Y (А) и клеточный выход SH-SY5Y (Б) в условиях сочетания депривации сыворотки и гипоксии. д/г – депривация/гипоксия. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

3.3. Влияние растворимых факторов макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y

Пролиферация НСК и последующая миграция нейральных предшественников из нейрогенных ниш в очаг повреждения нервной ткани завершаются дифференцировкой нейральных предшественников в зрелые нейроны и встраиванием их в нейрональную сеть. Дифференцировка нейральных предшественников подвержена тонкой регуляции, в том числе и со стороны иммунокомпетентных клеток, в частности, резидентной микроглии и рекрутируемых

макрофагов, роль которых особенно велика в условиях патологии. При этом макрофаги способны влиять на клетки нервной ткани как напрямую, посредством межклеточного взаимодействия, так и посредством секреции целого спектра нейротропных факторов, например, BDNF и IGF-1, которые оказывают стимулирующее влияние на дифференцировку нейральных предшественников. Макрофаги являются пластичной популяцией клеток и способны, в зависимости от сигналов микроокружения, изменять свой функциональный фенотип и, как следствие, секреторный профиль. В данном разделе было изучено влияние макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку нейральных предшественников линии SH-SY5Y.

В стандартных условиях культивирования (10% FBS) клетки SH-SY5Y активно пролиферируют, при этом для них характерен низкий уровень спонтанной дифференцировки. В недифференцированных культурах SH-SY5Y можно выделить два типа клеток: S-тип, полигональные эпителиально-подобные клетки без отростков, плотно прикрепленные к субстрату, и N-тип, нейробластоподобные клетки, имеющие пирамидальную или округлую форму. Клетки N-типа склонны к образованию округлых скоплений-кластеров, по краям которых располагаются клетки с короткими нейритами (*рисунок 13А*). Именно клетки SH-SY5Y N-типа способны подвергаться дифференцировке в нейроноподобные клетки. Индукторами дифференцировки клеток SH-SY5Y выступают различные вещества – дибутирил-цАМФ, форболовые эфиры, ретиноевая кислота. Наиболее часто используемым индуктором является ретиноевая кислота, которая была использована и в данной работе. При дифференцировке клетки не образуют кластеры, их тела вытягиваются, нейриты существенно удлиняются, а на поздних этапах дифференцировки формируют синаптоподобные соединения между собой (*рисунок 13В*). Ключевыми морфологическими критериями дифференцировки клеток SH-SY5Y являются относительное количество клеток с нейритом, длина которого превышает длину тела клетки, а также средняя длина нейрита у клеток в культуре. Данные параметры были

оценены на раннем (3 сутки) и позднем (7 сутки) сроках культивирования.

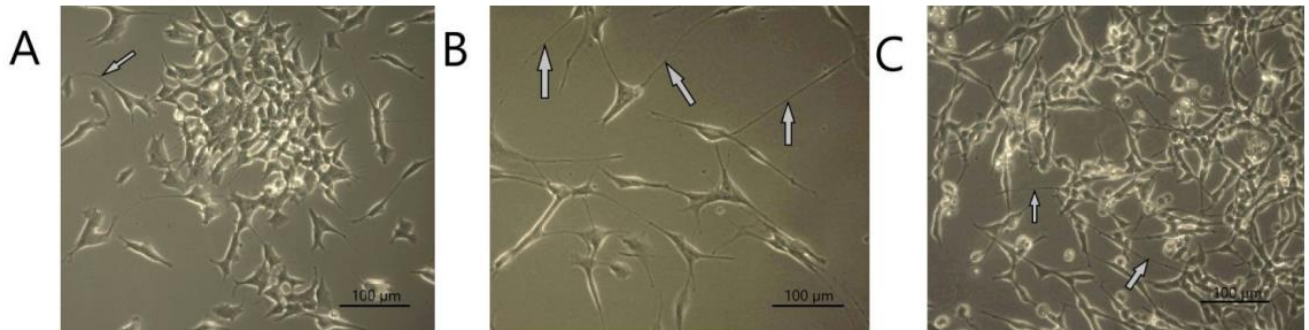


Рисунок 13 – Морфологическая характеристика интактных и дифференцированных клеток SH-SY5Y. А – интактные клетки (культивируемые в нормальных условиях), В – клетки, дифференцированные ретиноевой кислотой, С – клетки, культивируемые в условиях депривации сыворотки (1% FBS) в присутствии 30% (V/V) кондиционной среды M2(LS) макрофагов. Стрелки указывают на нейриты, длина которых превышает длину тела клетки. 7 сутки.

Влияние депривации сыворотки и сочетания депривации и гипоксии на дифференцировку клеток линии SH-SY5Y

Многие протоколы дифференцировки клеток SH-SY5Y, помимо добавления собственно индуктора дифференцировки (например, ретиноевой кислоты), предполагают также снижение концентрации FBS в культуральной среде [Dwane et al., 2013]. Прежде чем исследовать влияние растворимых факторов на дифференцировку SH-SY5Y, необходимо было понять, способны ли депривация сыворотки и сочетание депривации и гипоксии стимулировать дифференцировку SH-SY5Y в отсутствие какого-либо индуктора дифференцировки.

Клетки SH-SY5Y, находящиеся в стандартных условиях, как на раннем, так и на позднем (3 и 7 сутки соответственно) сроках культивирования характеризовались ожидаемо низким уровнем спонтанной дифференцировки: количество дифференцированных клеток в культуре не превышало 10% (таблица 1). В условиях

депривации сыворотки клетки демонстрировали снижение средней длины нейрита в сравнении с нормальными условиями на раннем сроке культивирования. Сочетание депривации и гипоксии приводило к снижению не только средней длины нейрита, но и количества дифференцированных клеток. Таким образом, ни депривация сыворотки, ни гипоксия не являлись стимуляторами дифференцировки клеток SH-SY5Y.

Таблица 1 – Влияние депривации сыворотки и гипоксии на морфологические маркеры дифференцировки клеток SH-SY5Y

Сутки	Параметр	Нормальные условия	Депривация	Депривация/ гипоксия
3	Содержание дифференцированных клеток, %	4,6 [2,8-8,8]	3,2 [0,0-6,9]	1,8 [0,0-4,3]
	Средняя длина нейрита, мкм	33,1 [25,4-44,5]	25,1 [#] [19,3-34,3]	24,2 [#] [20,0-36,6]
7	Содержание дифференцированных клеток, %	6,4 [4,1-9,6]	4,3 [0,7-6,5]	0,0 ^{#&} [0,0-0,0]
	Средняя длина нейрита, мкм	29,3 [23,6-39,6]	27,5 [21,3-38,0]	24,8 [#] [20,7-28,5]

Примечание: # – $p < 0,05$ в сравнении с нормальными условиями; & – $p < 0,05$ в сравнении с условиями депривации сыворотки (1% FBS). Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Влияние растворимых факторов макрофагов на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки

Убедившись, что депривация сыворотки не индуцирует процессы дифференцировки нейтральных предшественников, нами было исследовано влияние КС макрофагов на дифференцировку SH-SY5Y в условиях депривации.

Как и следовало ожидать, в присутствии ретиноевой кислоты (РА, позитивный контроль) количество дифференцированных клеток значительно возрастало уже на раннем сроке культивирования с дальнейшим нарастанием к 7 суткам (*таблица 2*). Средняя длина нейритов клеток в РА-индуцированных культурах также была значительно выше депривационного контроля на обоих сроках ($p < 0,05$).

Культивирование клеток в присутствии КС макрофагов приводило к значимому увеличению количества дифференцированных клеток в сравнении с депривационным контролем уже на 3 сутки, причём это изменение регистрировалось в присутствии КС всех исследованных типов макрофагов ($p < 0,05$) (*таблица 2*). При этом относительное содержание дифференцированных клеток в M2(LS) культурах более, чем в 2 раза превышало количество таких клеток в M1 и M2a культурах. Наряду с этим, длина нейритов клеток в культурах с добавлением M2(LS) значимо превышала таковую в M1 и M2a культурах ($p < 0,05$).

По сравнению с 3 сутками, на 7 сутки ни относительное количество дифференцированных клеток, ни средняя длина нейрита в культурах с добавлением КС макрофагов значимо не изменялись, что можно объяснить активной пролиферацией клеток в таких условиях. Примечательно, что только в культурах с добавлением КС M2(LS) средняя длина нейрита по-прежнему превышала значение этого параметра в депривационном контроле ($p < 0,05$). Кроме того, количество дифференцированных клеток в присутствии КС M2(LS) было значимо выше не только в сравнении с культивированием в условиях депривации, но и в присутствии КС M1 и КС M2a.

Таким образом, растворимые факторы макрофагов человека оказывали стимулирующее влияние на дифференцировку клеток SH-SY5Y. При этом на раннем сроке культивирования эффект оказывали все исследованные фенотипы макрофагов,

в то время как на позднем сроке стимулирующий эффект регистрировался лишь в присутствии кондиционной среды M2(LS).

Таблица 2 – Влияние кондиционных сред макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях частичной депривации сыворотки

Сутки	Параметр	Депривация	РА	+ KC-M1	+KC-M2a	+KC-M2(LS)
3	Содержание дифференцированных клеток, %	3,2 [0,0-6,9]	35,2 [#] [32,3-37,8]	6,9 ^{&} [5,4-8,3]	6,0 ^{&} [5,2-7,9]	14,9 ^{#&\$} [10,0-19,8]
	Средняя длина нейрита, мкм	25,1 [19,3-34,3]	46,5 [#] [36,2-60,7]	34,2 ^{#&} [27,0-46,6]	35,3 ^{#&} [26,9-46,9]	42,5 ^{#&\$} [32,4-56,9]
7	Содержание дифференцированных клеток, %	4,3 [0,7-6,5]	38,2 [#] [35,7-40,6]	5,0 ^{&} [3,5-5,6]	5,7 ^{&} [4,6-6,4]	12,9 ^{#&\$} [9,6-15,4]
	Средняя длина нейрита, мкм	27,5 [21,3-38,0]	59,6 [#] [37,6-75,6]	31,0 ^{&} [24,2-46,4]	34,5 ^{&} [26,1-44,0]	37,0 ^{#&} [29,5-48,7]

Примечание: # – $p < 0,05$ в сравнении с условиями депривации сыворотки (1% FBS); & – $p < 0,05$ в сравнении с ретиноевой кислотой (положительный контроль дифференцировки); \$ – $p < 0,05$ в сравнении с KC-M1 и KC-M2a. KC – кондиционная среда, РА – ретиноевая кислота. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Влияние растворимых факторов макрофагов на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях депривации и гипоксии

На следующем этапе работы предполагалось ответить на вопрос, сохраняется

ли стимулирующий эффект КС макрофагов на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях воздействия двух повреждающих факторов – депривации и гипоксии.

В сравнении с контролем, на 3 сутки относительное количество дифференцированных клеток повышалось в присутствии КС всех исследованных фенотипов макрофагов. При этом в культурах с добавлением КС M2(LS) доля дифференцированных клеток была в 2,1-2,6 раза больше, чем в культурах с КС M1 и M2a ($p<0,05$) (таблица 3). Наряду с этим, в культурах с добавлением КС макрофагов наблюдалось также увеличение средней длины нейрита, при этом все три исследованных фенотипа макрофагов оказывали сопоставимый эффект ($p<0,05$ в сравнении с условиями депривации/гипоксии). Интересно, что на раннем сроке культивирования средняя длина нейрита в культурах с добавлением КС макрофагов значимо не отличалась от позитивного контроля, что свидетельствует о достаточно выраженном стимулирующем эффекте КС макрофагов на дифференцировку.

На 7 сутки относительное количество дифференцированных клеток в культурах с добавлением КС макрофагов по-прежнему превышало таковое в условиях депривации/гипоксии, оставаясь при этом наиболее высоким в культурах с M2(LS) ($p<0,05$). Наибольшие значения средней длины нейритов также регистрировались в культурах с добавлением M2(LS), достоверно превышая значения в M1 и M2a культурах и достигая уровня позитивного контроля (РА) (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние кондиционных сред макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях, сочетающих депривацию сыворотки и гипоксию

Сутки	Параметр	Д/г	РА	+ КС-M1	+КС-M2a	+КС-M2(LS)
3	Содержание дифференцированных клеток, %	1,8 [0,0-4,3]	31,6 [#] [28,7-33,4]	6,8 ^{#&} [6,2-10,0]	8,3 ^{#&} [4,6-11,9]	17,7 ^{#&\$¶} [15,3-20,0]

	Средняя длина нейрита, мкм	24,2 [20,0-36,6]	48,7 # [37,8-63,0]	40,5 # [32,0-50,7]	40,7 # [29,9-52,5]	38,3 # [31,9-57,1]
7	Содержание дифференцированных клеток, %	0,0 [0,0-0,0]	35,8 # [32,4-35,8]	8,0 #& [7,0-8,8]	5,8 #& [5,6-9,5]	14,1 #&\$¶ [13,3-15,1]
	Средняя длина нейрита, мкм	24,8 [20,7-28,5]	59,3 # [44,9-71,3]	41,5 #& [32,4-56,4]	45,5 # [36,1-59,9]	55,5 # \$ [42,5-64,8]

Примечание: # – $p < 0,05$ в сравнении с условиями депривации/гипоксии (1% FBS, 100 мкМ CoCl_2); & – $p < 0,05$ в сравнении с ретиноевой кислотой (положительный контроль дифференцировки); \$ – $p < 0,05$ в сравнении с КС М1; ¶ – $p < 0,05$ в сравнении с КС М2а. Д/г – условия депривации/гипоксии, РА – ретиноевая кислота, КС – кондиционная среда. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Таким образом, кондиционные среды макрофагов оказывают стимулирующий эффект на дифференцировку клеток SH-SY5Y как в условиях депривации сыворотки, так и при сочетании депривации и гипоксии. В то же время, наиболее выраженное увеличение количества дифференцированных клеток и средней длины нейритов выявлялось в присутствии КС М2(LS).

Поскольку в исследованиях *in vitro* М2(LS) продемонстрировали наиболее выраженную – в сравнении с классическими М1 и М2а макрофагами – нейрорегенераторную и нейропротективную активность, влияние секреторного продукта М2(LS) было исследовано *in vivo* в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей.

3.4. Влияние растворимых факторов М2(LS) макрофагов человека на поведенческий паттерн депрессивноподобных мышей

Депрессия – патологическое состояние со сложным патогенезом, который остаётся до конца не изученным. В настоящее время общепринятой является

нейровоспалительная модель депрессии. Хронический стресс способен индуцировать воспалительный процесс в головном мозге, сопровождающийся усиленной продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ). Следствием этого является нарушение нейротрансмиттерного метаболизма, снижение уровня нейротрофических факторов, подавление взрослого нейрогенеза и нейропластичности. Нейровоспаление при этом является частично обратимым. Ключевая роль как в индукции и опосредовании, так и в разрешении воспалительных реакций отводится рекрутируемым макрофагам и резидентной микроглии, при этом роль первых возрастает в условиях патологии. Макрофаги/микроглия обладают выраженной пластичностью и способны изменять свой функциональный фенотип в зависимости от сигналов микроокружения. M1 макрофаги/микроглия традиционно рассматриваются как нейродеструктивные и провоспалительные, а M2 – как способствующие разрешению воспаления и репарации ткани. Одним из ключевых этапов нейрорепарации является эффероцитоз, который, в то же время, индуцирует поляризацию макрофагов в M2-фенотип. Задачей следующего этапа работы было изучение эффектов секреторных факторов M2(LS) *in vivo* в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей. При этом предполагалось исследовать влияние интраназального введения кондиционных сред M2(LS) на поведенческий паттерн, выраженность воспалительной реакции и интенсивность нейрогенеза в головном мозге животных.

Поведенческий паттерн депрессивноподобных мышей оценивали в тестах «открытое поле» (двигательная и исследовательская активности, эмоциональная реактивность), принудительное плавание по Порсолту (оценка депрессивноподобного поведения) и потребление 1% раствора сахарозы (ангедония).

После семидневного курса интраназальной терапии кондиционными средами M2(LS) депрессивноподобные мыши имели более высокие показатели исследовательской и двигательной активности в тесте "Открытое поле" в сравнении с депрессивноподобными мышами, получавшими интраназально питательную среду

RPMI-1640 (далее – контрольная группа). В частности, у мышей опытной группы увеличивалось число стоек с опорой на стенку и повышалась горизонтальная двигательная активность ($p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой) (таблица 4). Также для мышей, подвергавшихся терапии M2(LS), была характерна более низкая эмоциональная реактивность, о чем свидетельствовало меньшее количество фекальных болюсов за время тестирования ($1,9 \pm 0,3$ vs $4,5 \pm 0,2$ в контроле; $p = 0,01$).

Таблица 4 – Влияние КС M2(LS) на поведение депрессивноподобных мышей (CBA x C57Bl/6)F1 в тесте «открытое поле»

Группы животных	Горизонтальная двигательная активность		Вертикальная двигательная активность	
	Периферическая	Центральная	Свободная	С опорой на стенку
Контроль (n=32)	1.52 ± 0.38	0	0	0.48 ± 0.21
Опыт (n=32)	$7.76 \pm 0.68^{**}$	0	0.29 ± 0.20	$2.14 \pm 0.27^{**}$

Примечание: Здесь и далее: контроль – группа депрессивноподобных мышей после введения среды RPMI-1640; опыт – группа депрессивноподобных мышей после введения КС M2(LS). Данные представлены в виде $M \pm SE$. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Проявления депрессивноподобного поведения также оценивали в тесте принудительного плавания по Порсолту. Время общей активности в воде у мышей опытной группы было значимо выше в сравнении с животными контрольной группы ($p < 0,05$), в первую очередь за счёт более высокой умеренной активности, которая более, чем в 2 раза превышала таковую у мышей контрольной группы ($p < 0,05$) (рисунок 14). Кроме того, время полной неподвижности в воде у мышей опытной группы было значимо ниже ($p < 0,05$).

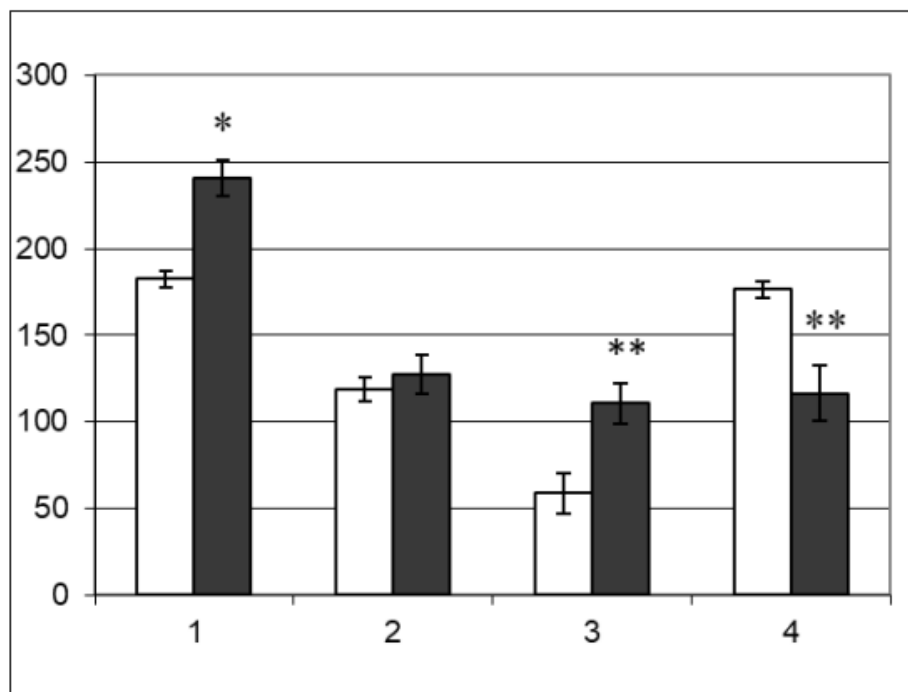


Рисунок 14 – Влияние курса интраназального введения КС М2(LS) на поведение депрессивноподобных мышей в тесте принудительного плавания по Порсолту. Данные представлены в виде $M \pm SE$. По оси ординат – период (сек). 1 – общая активность, 2 – высокая активность, 3 – умеренная активность, 4 – неподвижность. Темные столбики – опыт. Светлые столбики – контроль. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем. $N=10$.

Одним из основных симптомов депрессии является ангедония. Было показано, что уже спустя сутки после курса терапии КС М2(LS) мыши потребляли больше раствора сахарозы (который использовался в качестве гедонического стимула) в сравнении с контрольной группой, в то время как контрольные депрессивноподобные мыши в условиях свободного выбора с сахарозой предпочитали воду. В течение последующих 9 дней тестирования мыши опытной группы также потребляли значительно больше раствора сахарозы, чем животные контрольной группы (рисунок 15). Потребление раствора сахарозы в опытной группе суммарно было значимо выше, чем в контрольной: $72,8 \pm 25,7\%$ и $36,7 \pm 6,8\%$

соответственно от общего количества потребленной жидкости ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о снижении ангедонии у депрессивноподобных мышей после курса интраназальной терапии растворимыми факторами M2(LS) макрофагов.

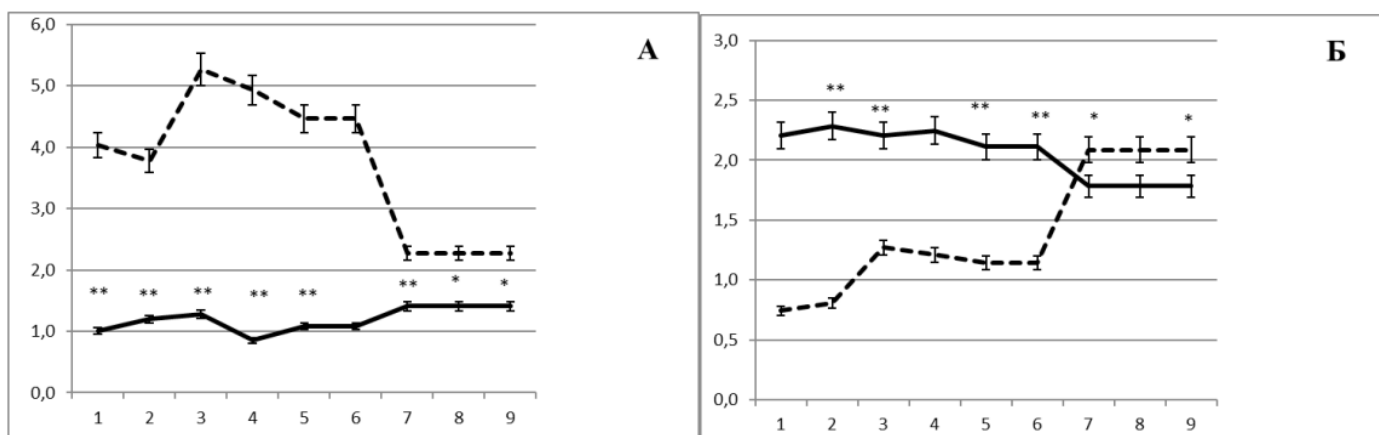


Рисунок 15 – Потребление 1% раствора сахарозы (А) и воды (Б) депрессивноподобными мышами. По оси ординат – количество потребляемой жидкости (мл/мышь). По оси абсцисс – дни тестирования. Пунктирная линия – опытная группа (после курса терапии растворимыми факторами M2(LS)), сплошная линия - контрольная группа.

3.5. Влияние растворимых факторов M2(LS) макрофагов человека на выраженность воспаления и нейрональную плотность в головном мозге депрессивноподобных мышей

Ключевыми цитокинами, вовлеченными в патогенез депрессии, считаются IL-1 β , TNF- α , IL-6, и IFN- γ . Чтобы выяснить, связана ли коррекция поведенческого паттерна депрессивноподобных мышей с противовоспалительным эффектом КС M2(LS) макрофагов, исследовали содержание вышеупомянутых цитокинов в лизатах отдельных структур головного мозга (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние курса интраназального введения КС M2(LS) макрофагов на уровень цитокинов в структурах головного мозга депрессивноподобных мышей

Структуры мозга	Группы	Цитокины (пг/мл; М ± SE)			
		IL-1 β	TNF- α	IL-6	IFN- γ
Гиппокамп	Контроль	197 ± 5,7	266 ± 7,8	60,9 ± 12,9	9,4 ± 0,2
	Опыт	207 ± 9,4	275 ± 12,6	43,7 ± 11,7	8,6 ± 0,2 *
Стриатум	Контроль	125 ± 1,4	156 ± 3,9	32,9 ± 2,9	4,2 ± 0,2
	Опыт	61 ± 4,3 **	114 ± 7,1 **	14,3 ± 1,0 **	2,8 ± 0,3 *
Фронтальная кора	Контроль	164 ± 4,3	241 ± 3,6	23,3 ± 1,8	4,7 ± 0,2
	Опыт	116 ± 4,6 **	169 ± 6,3 **	18,4 ± 1,1 *	5,5 ± 0,7

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U критерий Манна-Уитни). N=6.

В группе животных, получавших терапию КС М2(LS), регистрировался сниженный в сравнении с контрольной группой уровень IFN- γ в гиппокампе, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-6 в стриатуме и IL-6, TNF- α и IL-1 β – во фронтальной коре ($p < 0,05$).

Наряду с оценкой уровня цитокинов, нами была проанализирована экспрессия маркера активации макрофагов/микроглии *IBA-1*, отражающая интенсивность нейровоспаления. IBA-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, также известный как AIF-1 – allograft inflammatory factor 1) является маркером активированных микроглиальных клеток. С целью исследования связи антидепрессивного эффекта М2(LS) макрофагов с их противовоспалительной активностью, изучали экспрессию IBA-1 в различных зонах головного мозга депрессивноподобных мышей. Уровень экспрессии IBA-1 оценивали методом иммуногистохимии.

Индукция депрессивноподобного состояния вызывала повышение уровня IBA-1 в гиппокампе и гипоталамусе, в то время как в других зонах головного мозга повышения не наблюдалось, что может свидетельствовать о большей вовлеченности указанных структур головного мозга в патогенез депрессии. Уровень IBA-1 во

фронтальной коре и гипоталамусе депрессивноподобных мышей, получавших интраназально КС M2(LS) макрофагов, был значимо ниже в сравнении с мышами, получавшими среду RPMI-1640 ($p < 0,05$) (рисунок 16). В СА3 зоне гиппокампа наблюдалась схожая картина, однако, различия между группами не достигали статистической достоверности, находясь на уровне выраженного тренда ($p = 0,077$). В то же время, КС макрофагов снижали уровень IBA-1 в СА1 и СА3 зонах гиппокампа (на уровне тренда и статистически достоверно соответственно, $p = 0,089$ и $p = 0,009$) в сравнении с депрессивноподобными мышами, не получавшими интраназально ни КС, ни RPMI-1640 и выведенными из эксперимента сразу после индукции депрессивноподобного состояния.

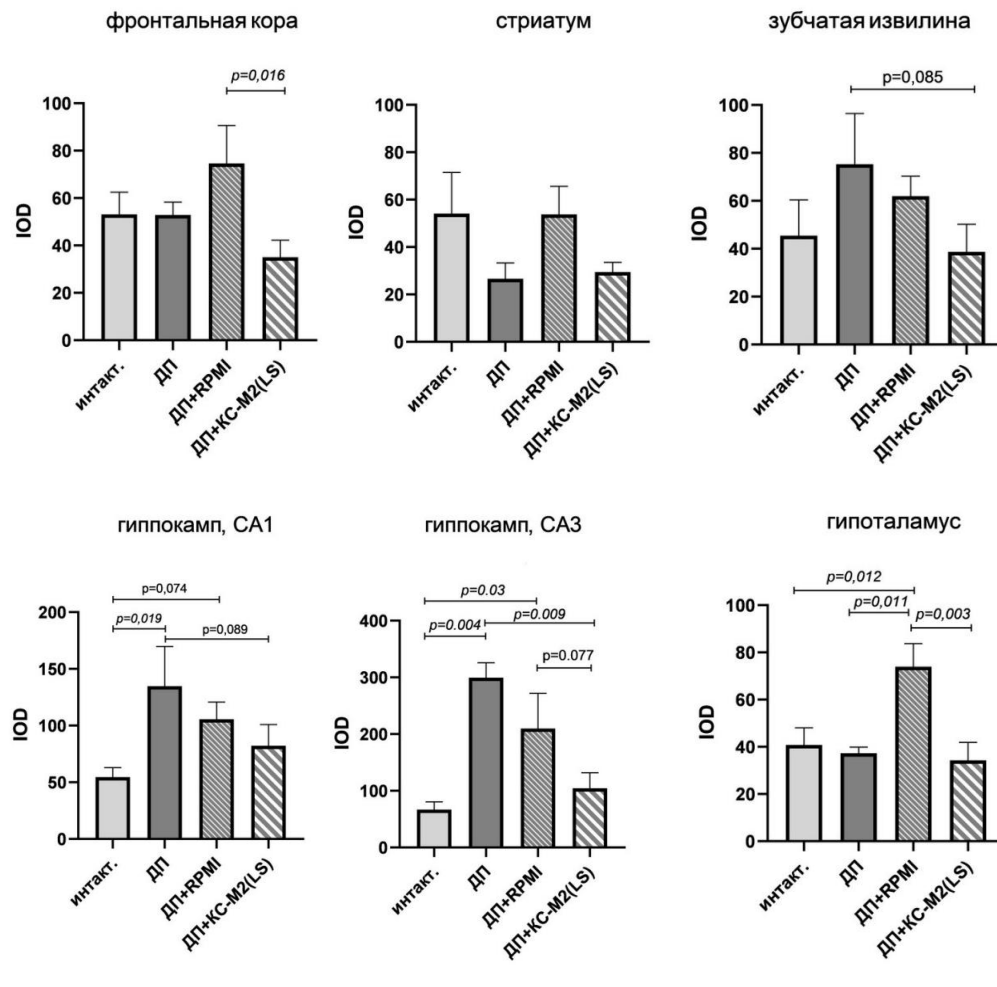


Рисунок 16 – Уровень экспрессии IBA-1 в различных зонах головного мозга мышей. IOD – интегральная оптическая плотность; интакт. – интактные животные; ДП – животные с депрессивноподобным поведением (контроль модели), ДП+RPMI – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), ДП+КС-M2(LS) – интраназальное введение КС M2(LS) (опытная группа).

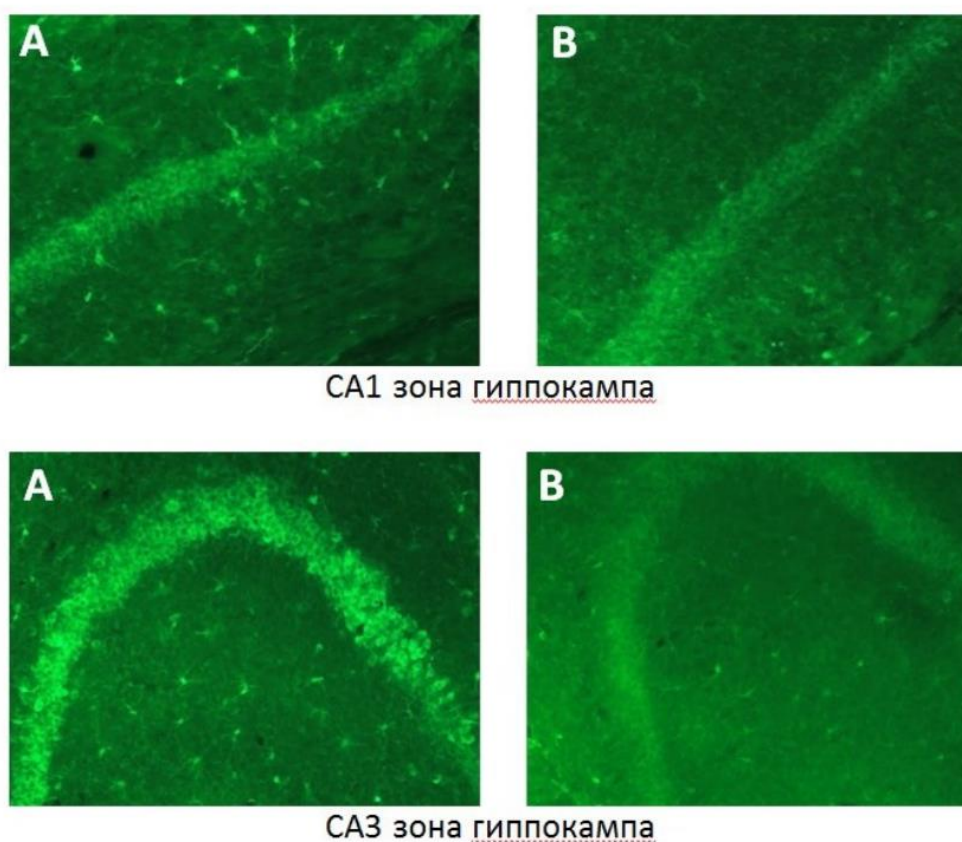


Рисунок 17 – Экспрессия IBA-1 в различных зонах головного мозга мышей. А – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), В – интраназальное введение КС M2(LS) (опытная группа). Представлены репрезентативные микрофотографии.

Таким образом, курсовое интраназальное введение КС макрофагов ассоциируется со снижением уровня воспалительной реакции в патогенетически

значимых зонах головного мозга депрессивноподобных мышей, а также о сопряженности антидепрессивного эффекта, зарегистрированного у мышей после курса интраназального введения КС макрофагов, и противовоспалительной активности.

Влияние растворимых факторов M2(LS) макрофагов на нейрональную плотность во фронтальной коре и гиппокампе головного мозга депрессивноподобных мышей

Учитывая ранее полученные данные о нейрорегенераторном, противовоспалительном и антидепрессивном эффекту M2(LS) макрофагов, целью заключительного этапа стало изучение влияния M2(LS) на нейрональную плотность в различных отделах головного мозга мышей. Нейрональная плотность отражает количество нейронов в разных зонах головного мозга и является интегральным показателем, характеризующим как интенсивность нейрогенеза (который приводит к появлению новых нейронов и, соответственно, повышению их плотности), так и выраженность нейровоспалительных и нейродегенеративных процессов (нейродегенерация ассоциирована со снижением нейрональной плотности). Оба упомянутых процесса (нейрогенез и нейродегенерация) могут представлять собой мишени для терапевтических воздействий при патологии ЦНС, в частности, депрессии. Исследование нейрональной плотности в головном мозге депрессивноподобных позволит глубже охарактеризовать нейрорегенеративную активность M2(LS) макрофагов.

Поскольку нейроны в некоторых областях головного мозга упакованы настолько плотно, что визуализировать отдельные клетки не представляется возможным, для оценки количества нейронов применяется показатель относительной нейрональной плотности: соотношения площади, занимаемой клетками, позитивно окрашенными по методу Ниссля (нейроны), к общей площади случайно выбранного участка зоны интереса. Нейрональная плотность оценивалась в пирамидном слое фронтальной коры, CA1 и CA3 зонах гиппокампа.

Анализ относительной нейрональной плотности в пирамидном слое фронтальной коры показал, что развитие депрессивноподобного состояния сопровождалось значимым снижением количества пирамидных нейронов по сравнению с мышами интактной группы – 16,8% (IQR 15,8-17,5%) против 18,4% (IQR 17,1-21,2%) ($p < 0,01$) (*рисунок 18*). Интраназальное введение питательной среды RPMI-1640 не оказывало влияния на нейрональную плотность, которая оставалась значимо сниженной в этой области, не отличаясь от «депрессивного» контроля (16,8%; 14,9-18,6%; $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными). В то же время у мышей опытной группы интраназальное введение КС M2(LS) приводило к увеличению плотности нейронов, достигавшей уровня интактных животных – 19,8 (18,9-21,2%). В этой группе плотность нейронов была значимо выше по сравнению как с депрессивноподобными животными, не получавшими терапии (контроль модели), так и мышами, получавшими RPMI-1640 (контроль лечения) ($p < 0,01$ в сравнении с обеими группами).

В обеих исследованных зонах гиппокампа, CA1 и CA3, наблюдались сходные изменения (*рисунок 18*). Развитие стресс-индуцированного депрессивноподобного состояния ассоциировалось со статистически достоверным уменьшением количества нейронов с 35,6 (29,8-41,5%) до 31,7 (26,7-34,6%) в CA1 зоне и с 41,8 (38,5-45,6%) до 34,5 (31,4-36,5%) – в CA3 зоне гиппокампа ($p < 0,05$). Интраназальное введение RPMI депрессивноподобным мышам не способствовало повышению нейрональной плотности. В то же время, интраназальное введение кондиционных сред M2(LS) макрофагов приводило к увеличению нейрональной плотности как в CA1 (33,6; 28,4-37,3%) ($p < 0,01$ в сравнении с получавшими RPMI животными), так и CA3 (40,3; 36,3-45,7%) ($p < 0,05$ в сравнении с получавшими RPMI животными) зонах гиппокампа. При этом количество нейронов в обеих исследованных зонах гиппокампа мышей, получавших кондиционные среды M2(LS), было сопоставимо с таковым у интактных животных ($p > 0,05$).

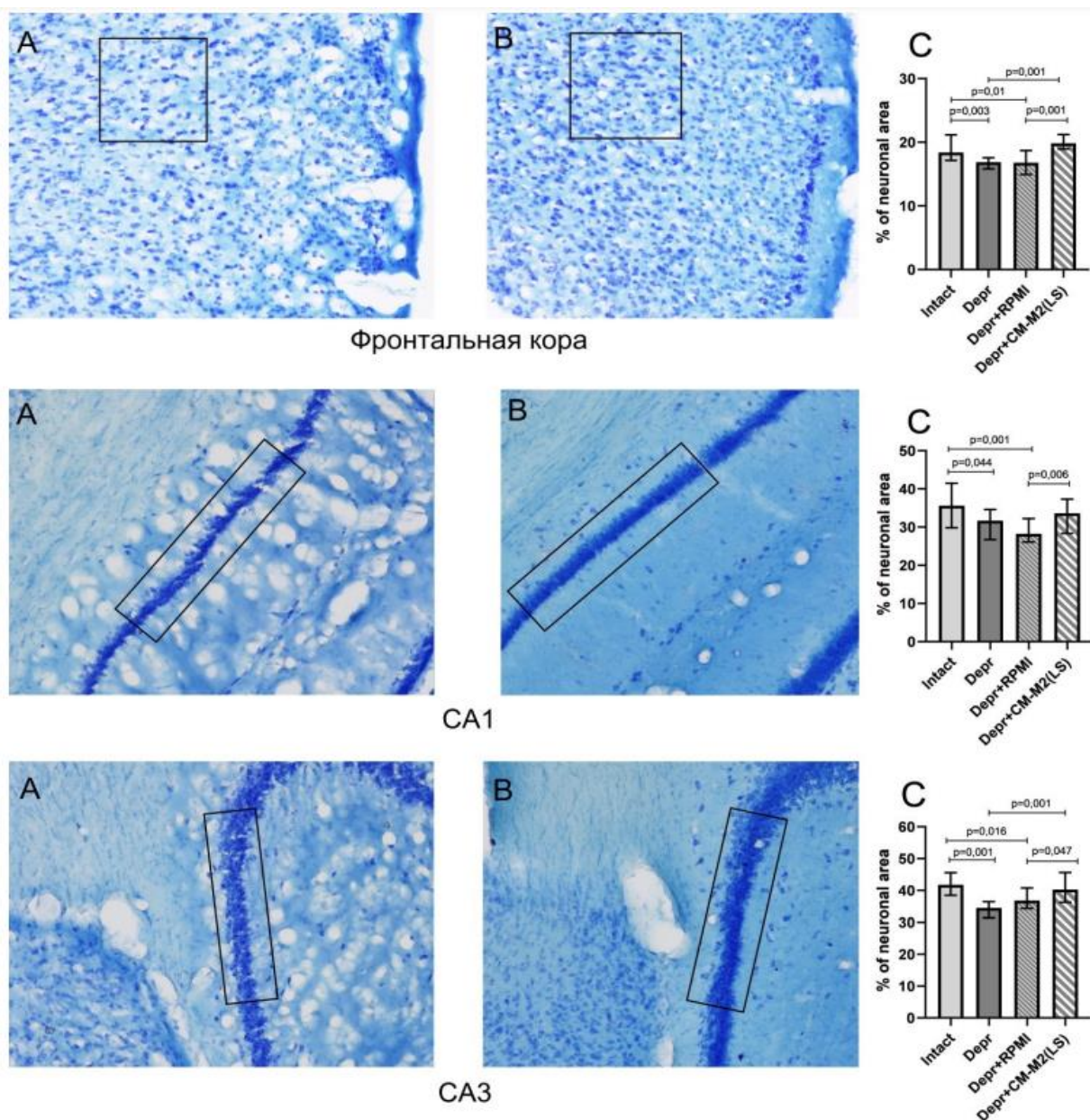


Рисунок 18 – Нейрональная плотность в пирамидном слое фронтальной коры, CA1 и CA3 зонах гиппокампа мышей. А – интраназальное введение RPMI-1640. В – интраназальное введение кондиционной среды M2(LS) (представлены репрезентативные примеры). С – относительная плотность нейронов (%) в головном мозге мышей ($n = 4-5$). Intact – интактная группа животных, Depr – животные с депрессивноподобным поведением (контроль модели), Depr+RPMI – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), Depr+CM-M2(LS) – интраназальное

введение КС M2(LS) (опытная группа). Данные представлены в виде относительной нейрональной плотности - процентного соотношения площади, занятой Ниссель-позитивными клетками в случайно выбранном участке зоны интереса, к площади всего участка (Me; IQR). p – достоверность различий (непараметрический критерий Манна–Уитни).

Таким образом, курсовое интраназальное введение кондиционных сред M2(LS) макрофагов повышает нейрональную плотность как во фронтальной коре, так и в гиппокампе мышей со стресс-индуцированным депрессивноподобным состоянием. Это может свидетельствовать как о стимуляции нейрогенеза растворимыми факторами M2(LS), так и о снижении выраженности нейродегенеративных проявлений.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рекрутированные макрофаги являются одними из ключевых регуляторов процесса нейрорегенерации. Пластичность макрофагов позволяет им осуществлять регуляцию регенерации повреждённой ткани на различных этапах после повреждения. При патологии нейрорегенерация и, в частности, нейрогенез зачастую происходит в условиях ишемии и гипоксии, которые могут сопровождать нейровоспалительный процесс. Поэтому изучение влияния макрофагов на свойства НСК-подобных клеток в условиях, моделирующих ишемию и сочетание ишемии и гипоксии, является значимым для более глубокого понимания иммунных механизмов, контролирующих процессы нейрорегенерации в условиях патологии и разработки новых терапевтических стратегий лечения различных поражений центральной нервной системы.

В витальной части данной работы были охарактеризованы эффекты растворимых факторов M1, M2a и M2(LS) макрофагов на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку НСК-подобных клеток SH-SY5Y в условиях депривации ростовых/сывороточных факторов, т.е. моделирующих ишемию, а также в условиях сочетанного влияния депривации и CoCl_2 -индуцированной гипоксии.

Согласно полученным данным, нейрорегенеративные свойства проявляют как M1, так и M2-макрофаги, стимулируя пролиферацию и дифференцировку НСК-подобных клеток. Влияние КС исследованных типов макрофагов на пролиферацию клеток SH-SY5Y оказывалось сопоставимым во всех случаях, кроме длительного комбинированного воздействия депривации и гипоксии, т.е. наиболее тяжелых повреждающих условий. Стимулировать дифференцировку также оказались способны КС всех типов макрофагов, однако в данном случае различия в выраженности стимуляции проявлялись уже в условиях депривации как моновоздействия.

Известно, что как M1, так и M2-макрофаги секретируют и про-, и противовоспалительные цитокины, а также трофические и ростовые факторы [Chernykh et al., 2010]. Каждый функциональный фенотип макрофагов при этом обладает уникальным секреторным профилем. Сопоставимость стимулирующего влияния разных фенотипов макрофагов на пролиферацию может объясняться сравнительно низкими концентрациями факторов, необходимых для активации SH-SY5Y клеток и превышением их "порогового уровня" в КС, полученных от всех трех типов исследуемых макрофагов.

Несмотря на то, что влияние макрофагов на клетки SH-SY5Y ранее не изучалось, имеются данные о воздействии различных ростовых факторов как на клетки SH-SY5Y, так и на другие нейральные клетки. Так, в частности, показан стимулирующий эффект IGF-1 как на пролиферацию, так и на дифференцировку клеток SH-SY5Y [Mattson et al., 1986; Lavenius et al., 1994]. Кроме того, IGF-1 стимулирует пролиферацию и дифференцировку в нейральном направлении стволовых клеток пульпы зуба [Huang et al., 2019; Lu et al., 2019], пролиферацию НСК, выделенных из стриатума крыс [Supeno et al., 2013]. VEGF и эритропоэтин также усиливают пролиферацию нейральных предшественников *in vitro* [Jin et al., 2002; Pavlica et al., 2012]. В отношении BDNF хорошо известно стимулирующее влияние на дифференцировку нейральных предшественников, этот фактор входит во многие протоколы дифференцировки клеток SH-SY5Y [Agholme et al., 2010; Hromadkova et al., 2020]. Таким образом, многие трофические и ростовые факторы стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников. В то же время, в работах, посвященных отдельным факторам и дифференцировочных протоколов используются существенно большие концентрации, чем регистрируемые в кондиционных средах макрофагов. Так, стандартная дозировка BDNF для дифференцировки клеток SH-SY5Y в зрелые нейроны – 50 нг/мл [Forster et al., 2016; De Medeiros et al., 2019], в то время как в кондиционной среде разных фенотипов макрофагов содержание BDNF колеблется в интервале от 70 до 750 пг/мл, т.е. на 2-3

порядка ниже [Chernykh et al., 2010]. Дозировка IGF-1 в различных исследованиях дифференцировки и пролиферации нейтральных предшественников варьирует достаточно широком диапазоне и составляет от 5 до 100 нг/мл, причём для дифференцировки обычно применяются меньшие дозы [Huang et al., 2019; Supeno et al., 2013; Okada, Zhu, 2017]. Содержание IGF-1 в КС М1 и М2а макрофагов – 150-350 пг/мл, в то время как в КС М2(LS) концентрация этого фактора в десятки раз выше и достигает 8 нг/мл, что сопоставимо с дозами, используемыми в некоторых исследованиях для дифференцировки нейтральных клеток [Huang et al., 2019]. Этот факт позволяет предположить, что именно IGF-1 может вносить существенный вклад в наблюдаемый эффект КС М2(LS), превосходящий по своей выраженности КС М1 и КС М2а. Тем не менее, содержание большинства ростовых и трофических факторов в КС действительно в разы ниже, чем концентрации, используемые при исследовании влияния их на свойства различных нейтральных клеток. Кроме того, в витальной части нашего исследования использовалась концентрация КС 30%, т.е. содержание каждого вещества было ещё на треть меньше, чем в нативной КС. По всей видимости, именно комбинация ростовых и трофических факторов, а не какой-либо конкретный, обуславливает эффект КС. Данное предположение находит подтверждение в сходных исследованиях. Так, Wang Z. с соавт. исследовали влияние конкретных факторов, содержащихся в обогащённой тромбоцитами плазме на течение остеоартрита. Было показано, что некоторые цитокины оказывают положительный эффект (например, TGF- β , IGF-1, EGF), в то время как другие или ухудшают проявления остеоартрита (TNF- α , VEGF), или их влияние остаётся неопределённым (FGF). Применение самой обогащённой тромбоцитами плазмы, содержащей комплекс факторов, оказывает положительное терапевтическое действие при остеоартрите [Wang et al., 2017]. Вероятно, эффект факторов, в комплексе содержащихся в биологически активных средах, хотя бы отчасти объясняется их синергетическим действием. Наблюдаемые в нашем исследовании эффекты макрофагов обусловлены, по всей видимости, не единственным фактором,

содержащимся в кондиционных средах разных типов макрофагов в различных концентрациях, а целым комплексом биологически активных веществ и их соотношением. Представляется актуальным изучение вклада конкретных факторов, содержащихся в кондиционных средах макрофагов, в их нейропротективный и нейрорегенераторный эффект.

Поскольку в витальной части работы наибольший эффект регистрировался у M2(LS) макрофагов, именно этот функциональный фенотип был избран для исследования *in vivo* в модели депрессии. Выбор депрессии обусловлен эпидемиологической актуальностью и наличием нейровоспалительного компонента в патогенезе. Показана отчётливая взаимосвязь между наличием хронического воспаления, снижением интенсивности нейрогенеза и усилением нейродегенеративных процессов, в том числе нейронального апоптоза [Deuama, Duman, 2020]. В исследовании влияния интраназальной терапии растворимыми факторами макрофагов мы также показали взаимосвязь между упомянутыми процессами: коррекцию поведенческого паттерна, снижение уровня маркеров воспаления (провоспалительные цитокины и экспрессия IBA-1) в отдельных структурах головного мозга, повышение нейрональной плотности во фронтальной коре и гиппокампе.

Показано, что некоторые факторы, содержащиеся в КС M2(LS), могут опосредовать эффект антидепрессантов. Так, Greene et al. в модели хронического стресса у крыс продемонстрировали повышение уровня VEGF в периферической крови и содержания его в гиппокампе после терапии антидепрессантами [Greene et al., 2009]. Кроме того, показано блокирование корректирующих эффектов флуоксетина на поведенческие паттерны крыс, подвергнутых хроническому стрессу, после введения ингибиторов VEGF-рецепторов [Warner-Schmidt, Duman, 2007]. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что именно VEGF является одним из ключевых факторов, опосредующих эффекты КС макрофагов. Данные о роли IGF-1, содержание которого в КС M2(LS) в десятки раз превышает таковое в КС

M1 и M2a, в патогенезе депрессии более противоречивы. Так, уровень IGF-1 в цереброспинальной жидкости пациентов с депрессией повышается на фоне антидепрессантной терапии, что может косвенно свидетельствовать об опосредовании эффекта антидепрессантов через IGF-1 [Schilling et al., 2011]. В то же время, показано более высокое содержание IGF-1 в сыворотке крови у пациентов с депрессией в сравнении со здоровыми донорами. Уровень IGF-1 при этом был выше у больных, не отвечающих на фармакологическую терапию, в сравнении с группой ответчиков. [Korczak et al., 2015]. Кроме того, показана положительная корреляция между снижением уровня IGF-1 в сыворотке и улучшением клинических симптомов на фоне терапии [Trojan, Levada, 2020]. Таким образом, роль IGF-1 в патогенезе депрессии остаётся весьма неопределенной, однако вероятно, что этот фактор играет в нём заметную роль.

В целом, учитывая вышеизложенные факты, можно предположить, что нейропротективный и нейрорегенеративный эффект КС макрофагов опосредуется посредством множества ростовых и трофических факторов, вклад каждого из которых в различных случаях может варьировать, в частности, зависеть от этапа регенерации и конкретной патологии. Изучение вклада и механизма действия конкретных растворимых факторов, несомненно, представляется актуальным направлением для дальнейших исследований. В то же время, целесообразно рассматривать КС не просто как набор различных факторов, а как сложный комплекс биологических веществ, находящихся в синергетических взаимоотношениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Макрофаги являются гетерогенной и пластичной популяцией клеток, свойства которых во многом зависят от сигналов микроокружения, в частности, дифференцировочных и поляризующих стимулов. Проведенные исследования были посвящены 1) изучению нейропротективной и нейрорегенераторной активности секреторных продуктов макрофагов человека, поляризованных IFN- γ , IL-4 и апоптотическими клетками, на свойства нейральных стволовых клеток в условиях, моделирующих ишемию и гипоксию *in vitro* и 2) исследованию эффектов КС M2(LS) в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей.

Растворимые факторы M1(IFN- γ), M2a(IL-4) и M2(LS) макрофагов стимулировали пролиферацию и дифференцировку клеток SH-SY5Y как в условиях, моделирующих ишемию (частичная депривация сывороточных факторов), так и при комбинированном воздействии депривации и CoCl₂-индуцированной гипоксии. В то же время при комбинации повреждающих факторов и длительном их воздействии наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладали растворимые факторы M2(LS), поляризованные посредством эффероцитоза. Наряду с этим, в условиях депривации/гипоксии только макрофаги с M2(LS) фенотипом проявляли нейропротективные свойства, повышая выживаемость клеток SH-SY5Y.

Для анализа реализации регуляторных эффектов секреторных факторов макрофагов *in vivo* нами была выбрана модель стресс-индуцированной депрессии, патогенез которой связан с нейровоспалением и нарушением процессов нейрорегенерации. Поскольку наиболее выраженная нейропротективная и нейрорегенераторная активность *in vitro* была продемонстрирована для M2(LS) макрофагов, в исследованиях *in vivo* мы проанализировали влияние курсового интраназального введения секреторных факторов M2(LS). Введение кондиционной среды M2(LS) способствовало коррекции поведенческого паттерна депрессивноподобных мышей: снижению уровня тревожности и ангедонии,

усилению двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения. Корректирующий эффект ассоциировался с повышением нейрональной плотности во фронтальной коре и гиппокампе, что свидетельствует об усилении процесса нейрогенеза.

Примечательно, что антидепрессивный эффект M2(LS) макрофагов сопровождался снижением уровня ряда провоспалительных цитокинов и экспрессии маркера активации макрофагов/микроглии IBA-1 в патогенетически значимых структурах головного мозга мышей.

Поскольку в настоящей работе изучались эффекты растворимых факторов макрофагов, можно заключить, что секреторная активность макрофагов является важным механизмом в опосредовании их регуляторной активности, в частности, стимулирующего влияния на процессы нейрорегенерации и подавляющего действия на нейровоспаление.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что M2(LS) макрофаги человека, поляризованные через механизм эффероцитоза, продуцируют растворимые факторы, которые характеризуются наиболее выраженной (в сравнении с факторами M1 и M2a макрофагов) нейрорегуляторной активностью *in vitro* и оказывают антидепрессивный, противовоспалительный и прорегенеративный эффекты при интраназальном введении мышам в модели стресс-индуцированной депрессии *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Растворимые факторы макрофагов человека, активированных $\text{IFN}\gamma$ (M1), IL-4 (M2a) и контактом с апоптотическими клетками [M2(LS)] усиливают *пролиферацию* клеток SH-SY5Y в условиях действия повреждающих факторов, причем при выраженном повреждении стимулирующее действие M2(LS) превышает эффекты M1($\text{IFN}\gamma$) и M2a(IL-4), что свидетельствует о важной роли эффероцитоза в индукции нейрорегенераторной активности макрофагов и зависимости эффекта от степени повреждения нейральных предшественников.
2. Растворимые факторы M2(LS), в отличие от M1($\text{IFN}\gamma$) и M2a(IL-4) макрофагов, повышают *выживаемость* нейральных клеток SH-SY5Y в условиях депривации/гипоксии, что свидетельствует о нейропротективной активности макрофагов, поляризованных взаимодействием с апоптотическими клетками.
3. Секреторные факторы макрофагов стимулируют *дифференцировку* клеток SH-SY5Y в условиях депривации и депривации/гипоксии *in vitro*, причем при более длительном воздействии комбинации повреждающих факторов продифференцировочный эффект макрофагов, поляризованных эффероцитозом [M2(LS)], превышает эффекты M1($\text{IFN}\gamma$) и M2a(IL-4), что указывает на значимость эффероцитоза в регуляции нейрорегенеративной активности макрофагов.
4. Курсовое интраназальное введение растворимых факторов M2(LS) макрофагов мышам в модели стресс-индуцированной депрессии приводит к снижению уровня тревожности и ангедонии, а также усилению ориентировочно-исследовательской и двигательной активности животных, что свидетельствует об эффективности секреторного продукта M2(LS) в коррекции депрессивноподобного паттерна поведения.
5. Животные в модели стресс-индуцированной депрессии после введения факторов M2(LS) характеризуются меньшим уровнем провоспалительных цитокинов (IL-1 β ,

IL-6, TNF- α , IFN- γ) и экспрессии активационного маркера макрофагов/микроглии (IBA-1), а также более высокой нейрональной плотностью в патогенетически значимых структурах головного мозга, что свидетельствует о сопряженности антидепрессивного эффекта M2(LS) с ослаблением нейровоспаления и активацией нейрорегенерации.

6. Наиболее высокая нейростимуляторная активность макрофагов человека, поляризованных эффероцитозом, *in vitro* и их антидепрессивный, противовоспалительный и нейрорегенераторный эффекты *in vivo* позволяют рассматривать секреторный продукт M2(LS) в качестве перспективной молекулярной платформы для разработки новых методов иммунотерапии воспалительных и дегенеративных заболеваний нервной системы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

7-AAD – 7-аминоактиномицин D

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

КС – кондиционная среда

ЛПС – липополисахарид

МНК – моноклеарные клетки

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

НСК – нейральные стволовые клетки

ПНС – периферическая нервная система

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

BAMs – пограничные макрофаги (border-associated macrophages)

BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor)

bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

BrdU – бромдезоксидуридин

CCL, CXCL – хемокиновые лиганды

CD – кластер дифференцировки

CREB – cyclic adenosine monophosphate response element binding protein

DC-SIGN – dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

EGF – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

EPO – эритропоэтин

FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)

FGF – фактор роста фибробластов

FIZZ1 – found in inflammatory zone 1 (resistive-like molecule alpha)

GDNF – глиальный нейротрофический фактор (glial cell-derived neurotrophic factor)

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor)

HLA-DR – человеческий лейкоцитарный антиген, изотип DR

IBA1 – ionized calcium-binding adaptor molecule 1

IFN- γ – интерферон-гамма

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1

IL – интерлейкин

IOD – интегральная оптическая плотность

IQR – интерквартильный диапазон

JAK1 – янус-киназа-1

LIF – leukemia inhibitory factor

LS – low serum (дефицит сывороточных факторов)

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)

MARCO – macrophage receptor with collagenous structure

MCP-1 – monocyte chemotactic protein 1

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор

MerTK – myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MMP – матриксная металлопротеиназа

NF- κ B – ядерный фактор "каппа-би" (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NGF – фактор роста нервов (nerve growth factor)

NT – нейротрофин

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor)

PPAR γ – рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

SDF-1 – стромальный клеточный фактор роста 1 (stromal cell-derived factor-1)

SGK3 – serum/glucocorticoid regulated kinase 3

SPHK1 – сфингозин-киназа-1

STAT – signal transducer and activator of transcription

TGF – трансформирующий фактор роста

Th – Т-хелпер

TIMP – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ

TLR – толл-подобный рецептор

TNF- α – фактор некроза опухоли альфа

TNFSF14 – tumor necrosis factor superfamily member 14

VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VLA-4 – very late antigen 4

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасимова Е. В. Функциональные нарушения макрофагов при ревматоидном артрите и атеросклерозе / Е. В. Герасимова, Т. В. Попкова // Научно-практическая ревматология. – 2018. – Т. 56. – № 4. – С. 486–493
2. Лохонина А.В. Морфофункциональная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения / А. В. Лохонина, А. В. Ельчанинов, И. В. Арутюнян, А. С. Покусаев, А. В. Макаров, И. З. Еремина, В. В. Суровцев, Г. Б. Большакова, Д. В. Гольдштейн, Т. Х. Фатхудинов // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 56–62
3. Никонова А. А. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких / А. А. Никонова, М. Р. Хаитов, Р. М. Хаитов // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 6. – С. 657–672
4. Останин А. А. Интраназальные ингаляции биоактивных факторов, продуцируемых М2-макрофагами, в лечении больных с органическими поражениями головного мозга / А. А. Останин, М. Н. Давыдова, Н. М. Старостина, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела, Е. Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20. – № 4. – С. 577–588
5. Черных Е. Р. Роль макрофагов в восстановлении повреждений центральной нервной системы: новые возможности в лечении неврологических расстройств / Е. Р. Черных, Е. Я. Шевела, А. А. Останин // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 7–18
6. Abdelaziz M. H. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma / M. H. Abdelaziz, S. F. Abdelwahab, J. Wan, W. Cai, W. Huixuan et al. // J Transl Med. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 58
7. Accogli A. Neurogenesis, neuronal migration, and axon guidance / A. Accogli, N. A.

Addour-Boudrahem, M. Srour // *Handb Clin Neurol.* – 2020. – Vol. 173. – P. 25–42

8. Agholme L. An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons / L. Agholme, T. Lindstrom, K. Kagedal, J. Marcusson, M. Hallbeck // *J Alzheimers Dis.* – 2010 – Vol. 20. – № 4. – P. 1069–1082

9. Ahmad S. Nanoliposomes Reduce Stroke Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice / S. Ahmad, S. Truran, N. Karamanova, A. Kindelin, M. Lozoya et al. // *Stroke.* – 2022. – Vol. 53. – № 2. – P. 37–41

10. Ambree O. Alterations of the innate immune system in susceptibility and resilience after social defeat stress / O. Ambree, C. Ruland, S. Scheu, V. Arolt, J. Alferink // *Front Behav Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – P. 141

11. Andrzejewska A. Mesenchymal stem cells for neurological disorders / A. Andrzejewska, S. Dabrowska, B. Lukomska, M. Janowski // *Adv Sci (Weinh).* – 2021. – Vol. 8. – № 7. – P. e2002944

12. Araujo B. Neuroinflammation and Parkinson's disease – from neurodegeneration to therapeutic opportunities / B. Araujo, R. Caridade-Silva, C. Soares-Guedes, J. Martins-Macedo, E. D. Gomes, S. Monteiro, F. G. Teixeira // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 18. – P. 2908

13. Arnone D. Role of Kynurenine pathway and its metabolites in mood disorders: A systematic review and meta-analysis of clinical studies / D. Arnone, S. Saraykar, H. Salem, A. L. Teixeira, R. Dantzer, S. Selvaraj // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2018. – Vol. 92. – P. 477–485

14. Arvidsson A. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke / A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, O. Lindvall // *Nat Med.* – 2002. – Vol. 8. – № 9. – P. 963–970

15. Arzate D. M. Adult Neurogenesis in the Context of Brain Repair and Functional

Relevance / D. M. Arzate, L. Covarrubias // *Stem Cells Dev.* – 2020. – Vol. 29. – № 9. – P. 544–554

16. Ball J. B. Mechanisms of microglia-mediated synapse turnover and synaptogenesis / J. B. Ball, S. M. Green-Fulgham, L. R. Watkins // *Prog Neurobiol* – 2022. – Vol. 218. – P. e102336

17. Barkho B.Z. Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines / B. Z. Barkho, A. E. Munoz, X. Li, L. Li, L. A. Cunningham, X. Zhao // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26. – № 12. – P. 3139–3149

18. Barnes A. P. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons / A. P. Barnes, F. Polleux // *Annu Rev Neurosci.* – 2009. – Vol. 32. – P. 347–381

19. Bartels T. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases / T. Bartels, S. De Schepper, S. Hong // *Science.* – 2020. – Vol. 370. – № 6512. – P. 66–69

20. Bartus R. T. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? / R. T. Bartus, E. M. Johnson Jr // *Neurobiol Dis.* – 2017. – Vol. 97 (Pt B). – P. 156–168

21. Batool S. Synapse formation: from cellular and molecular mechanisms to neurodevelopmental and neurodegenerative disorders / S. Batool, H. Raza, J. Zaidi, S. Riaz, S. Hasan, N. I. Syed // *J Neurophysiol.* – 2019. – Vol. 121. – № 4. – P. 1381–1397

22. Beers D. R. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis / D. R. Beers, J. S. Henkel, Q. Xiao, W. Zhao, J. Wang, A. A. Yen, L. Siklos, S. R. McKercher, S. H. Appel // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – № 43. – P. 16021–16026

23. Bell M. SH-SY5Y-derived neurons: a human neuronal model system for investigating TAU sorting and neuronal subtype-specific TAU vulnerability / M. Bell,

H. Zempel // Rev Neurosci. – 2021. – Vol. 33. – № 1. – P. 1–15

24. Besser M. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors / M. Besser, R. Wank // J Immunol. – 1999. – Vol. 162. – № 11. – P. 6303–6306

25. Beyer M. High-resolution transcriptome of human macrophages / M. Beyer, M. R. Mallmann, J. Xue, A. Staratschek-Jox, D. Vorholt // PLoS One. – Vol. 7. – № 9. – P. e45466

26. Biedler J. L. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones / J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, L. S. Freedman // Cancer Res. – 1978. – Vol. 38. – № 11. – P. 3751–3757

27. Bijarchian F. M2c Macrophages enhance phalange regeneration of amputated mice digits in an organ co-culture system / F. Bijarchian, L. Taghiyar, Z. Azhdari, M. Baghaban Eslaminejad // Iran J Basic Med Sci. – 2021. – Vol. 24. – № 11. – P. 1602–1612

28. Boato F. Interleukin-1 beta and neurotrophin-3 synergistically promote neurite growth *in vitro* / F. Boato, D. Hechler, K. Rosenberger, D. Ludecke, E. M. Peters, R. Nitsch, S. Hendrix // J Neuroinflammation. – 2011. – Vol. 8. – P. 183

29. Bobkova N. V. Neuroregeneration: Regulation in Neurodegenerative Diseases and Aging / N. V. Bobkova, R. A. Poltavtseva, S. V. Leonov, G. T. Sukhikh // Biochemistry (Mosc). – 2020. – Vol. 85. – P. 108–130

30. Bondy C. A. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain / C. A. Bondy, C. M. Cheng // Eur J Pharmacol. – 2004 – Vol. 490. – № 1–3. – P. 25–31

31. Brown S. J. The kynurenine pathway in major depression: What we know and where to next / S. J. Brown, X-F. Huang, K. A. Newell // Neurosci Biobehav Rev. – 2021. – Vol. 127. – P. 917–927

32. Budni J. Behavioral and neurochemical effects of folic acid in a mouse model of depression induced by TNF- α / J. Budni, M. Moretti, A. E. Freitas, V. B. Neis, C. M. Ribeiro et al. // *Behav Brain Res.* – 2021. – Vol. 414. – P. e113512
33. Capilla-Gonzalez V. Regulation of subventricular zone-derived cells migration in the adult brain / V. Capilla-Gonzalez, E. Lavell, A. Quinones-Hinojosa, H. Guerrero-Cazares // *Adv Exp Med Biol.* – 2015. – Vol. 853. – P. 1–21
34. Carli M. Is Adult Hippocampal Neurogenesis Really Relevant for the Treatment of Psychiatric Disorders? / M. Carli, S. Aringhieri, S. Kolachalam, B. Longoni, G. Grenno et al. // *Curr Neuropsychopharmacol.* – 2021. – Vol. 19. – № 10. – P. 1640–1660
35. Chan A. Circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF) and frequency of BDNF positive T cells in peripheral blood in human ischemic stroke: Effect on outcome / A. Chan, J. Yan, P. Csurhes, J. Greer, P. McCombe // *J. Neuroimmunol.* 2015. – Vol. 286 – P. 42–47
36. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration / B. Chazaud // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219. – № 3. – P. 172–178
37. Chen F. Hippocampal volume and cell number in depression, schizophrenia, and suicide subjects / F. Chen, A. B. Bertelsen, I. E. Holm, J. R. Nyengaard, R. Rosenberg, K-A. Dorph-Petersen // *Brain Res.* – 2020. – Vol. 1727. – P. e146546
38. Chen P. Dexmedetomidine Regulates Autophagy via the AMPK/mTOR Pathway to Improve SH-SY5Y-APP Cell Damage Induced by High Glucose / P. Chen, X. Chen, H. Zhang, J. Chen, M. Lin et al. // *Neuromolecular Med.* – 2023. – Vol. 25. – № 3. – P. 415–425
39. Chernykh E. R. Safety and therapeutic potential of M2-macrophages in stroke treatment / E. R. Chernykh, E. Y. Shevela, N. M. Starostina, S. A. Morozov, M. N. Davydova, E. V. Menyaeva, A. A. Ostanin // *Cell Transplant.* – 2016. – Vol. 25. – № 8. – P. 1461–1471

40. Chernykh E. R. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? / E. R. Chernykh, E. Y. Shevela, L. V. Sakhno, M. A. Tikhonova, Y. L. Petrovsky, A. A. Ostanin // Cellular therapy and transplantation. – 2010. – Vol. 2. – № 6. – P. 1–8
41. Cherry J. D. Are "resting" microglia more "m2"? / J. D. Cherry, J. A. Olschowka, M. K. O'Banion // Front Immunol. – 2014. – Vol. 5. – P. 594
42. Cheung Y-T. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research / Y-T. Cheung, W. K-W. Lau, M-S. Yu, C. S-W. Lai, S-C Yeung et al. // Neurotoxicology. – 2009. – Vol. 30. – № 1. – P. 127–135
43. Chistiakov D.A. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2 / D. A. Chistiakov, V. A. Myasoedova, V. V. Revin, A. N. Orekhov, Y. V. Bobryshev // Immunobiology. – 2018. – Vol. 223. – № 1. – P. 101-111
44. Chu F. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice via blockading NF-κB pathway / F. Chu, M. Shi, Y. Lang, Z. Chao, T. Jin, L. Cui, J. Zhu // Clin Exp Immunol. – 2021. – Vol. 204. – № 2. – P. 199–211
45. Clark S. M. Reduced kynurenine pathway metabolism and cytokine expression in the prefrontal cortex of depressed individuals / S. M. Clark, A. Pocivavsek, J. D. Nicholson, F. M. Notarangelo, P. Langenberg et al. // J Psychiatry Neurosci. – 2016. – Vol. 41. – № 6. – P. 386–394
46. Colucci-D'Amato L. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer / L. Colucci-D'Amato, L. Speranza, F. Volpicelli // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – № 20. – P. 7777
47. Cruikshank W. Experiments on the Nerves, Particularly on Their Reproduction; and

on the Spinal Marrow of Living Animals: From the Same Work / W. Cruikshank // Med Facts Obs. – 1797. – Vol. 7. – P. 136–154

48. Cuadros M. A. Microglia and Microglia-Like Cells: Similar but Different / M. A. Cuadros, M. R. Sepulveda, D. Martin-Oliva, J. L. Marin-Teva, V. E. Neubrand // Front Cell Neurosci. – 2022. – Vol. 16. – P. e816439

49. Cunniffe N. Promoting remyelination in multiple sclerosis / N. Cunniffe, A. Coles // J Neurol. – 2021. – Vol. 268. – № 1. – P. 30–44

50. D'Aloia A. A new advanced cellular model of functional cholinergic-like neurons developed by reprogramming the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line / A. D'Aloia, V. Pastori, S. Blasa, G. Campioni, F. Peri, E. Sacco et al. // Cell Death Discov. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 24

51. Darlington D. Multiple low-dose infusions of human umbilical cord blood cells improve cognitive impairments and reduce amyloid- β -associated neuropathology in Alzheimer mice / D. Darlington, J. Deng, B. Giunta, H. Hou, C. D. Sanberg et al. // Stem Cells Dev. – 2013. – Vol. 22. – № 3. – P. 412–421

52. Datki Z. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells / Z. Datki, A. Juhász, M. Gálfi, K. Soós, R. Papp et al. // Brain Res Bull. – 2003. – Vol. 62. – № 3. – P. 223–229

53. David S. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury / S. Davis, A. Kroner // Nat Rev Neurosci. – 2011. – Vol. 12. – № 7. – P. 388–399

54. De Haas A. H. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS / A. H. de Haas, H. W. G. M. Boddeke, K. Biber // Glia. – 2008. – Vol. 56. – № 8. – P. 888–894

55. De Medeiros L. M. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an *In vitro* Model for Alzheimer's Disease

- Studies / L. M. de Medeiros, M. A de Bastiani, E. P. Rico, P. Schonhofen, B. Pfaffenseller // *Mol Neurobiol.* – 2019 – Vol. 56. – № 11. – P. 7355–7367
56. De Medeiros L. M. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies / L. M de Medeiros, M. A. De Bastiani, E. P. Rico, P. Schonhofen, B. Pfaffenseller et al. // *Mol Neurobiol.* – 2019. – Vol. 58. – № 11. – P. 7355–7367
57. Dermitzakis I. Origin and Emergence of Microglia in the CNS-An Interesting (Hi)story of an Eccentric Cell / I. Dermitzakis, M. E. Manthou, S. Meditskou, M-E. Tremblay, S. Petratos, L. Zoupi, M. Boziki, E. Kesidou, C. Simeonidou, P. Theotokis // *Curr Issues Mol Biol.* – 2023. – Vol. 45. – № 3. – P. 2609–2628
58. Devanney N. A. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma / N. A. Devanney, A. N. Stewart, J. C. Gensel // *Exp Neurol.* – 2020. – Vol. 329. – P. e113310
59. Dey A. Insights into macrophage heterogeneity and cytokine-induced neuroinflammation in major depressive disorder / A. Day, P. A. H. Giblin // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2018. – Vol. 11. – № 3. – P. 64
60. Deyama S. Neurotrophic mechanisms underlying the rapid and sustained antidepressant actions of ketamine / S. Deyama, R. S. Duman // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2020 – Vol. 188. – P. e172837
61. Dong R-F. Neuroprotective effect of FMS-like tyrosine kinase-3 silence on cerebral ischemia/reperfusion injury in a SH-SY5Y cell line / R-F. Dong, L-W. Tai, B. Zhang, F-K. Shi, H-M. Liu et al. // *Gene.* – 2019. – Vol. 697. – P. 152–158
62. Doran A. C. Efferocytosis in health and disease / A. C Doran, A. Yurdagul Jr, I. Tabas // *Nat Rev Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – № 4. – P. 254–267
63. Duluc D. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells / D. Duluc, Y. Delneste, F.

- Tan, M-P. Moles, L. Grimaud et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – № 13. – P. 4319–4330
64. Duman R. S. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants / R. S Duman, S. Deyama, M.V. Fogaça // *Eur J Neurosci*. – 2021. – Vol. 53. – № 1. – P. 126–139
65. Dwane S. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration / S. Dwane, E. Durack, P. A. Kiely // *BMC Res Notes*. – 2013 – Vol. 6. – P. 366
66. East E. Alignment of astrocytes increases neuronal growth in three-dimensional collagen gels and is maintained following plastic compression to form a spinal cord repair conduit / E. East, D. B. de Oliveira, J. P. Golding, J. B. Phillips // *Tissue Eng Part A*. – 2010. – Vol. 16. – № 10. – P. 3173–3184
67. Erdo F. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting / F. Erdo, L. A. Bors, D. Farkas, A. Bajza, S. Gizurarson // *Brain Res Bull*. – 2018 – Vol. 143. – P. 155–170
68. Erhardt S. Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality / S. Erhardt, C. K. Lim, K. R. Linderholm, S. Janelidze, D. Lindqvist et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2013. – Vol. 38. – № 5. – P. 743–752
69. Eriksson P. S. Neurogenesis in the adult human hippocampus / P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, F. H. Gage // *Nat Med*. – 1998. – Vol. 4. – № 11. – P. 1313–1317
70. Fadok V. A. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF / V. A. Fadok, D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, P. M. Henson // *J Clin Invest*. – 1998. – Vol. 101. – № 4. – P. 890–898

71. Fan C. Neuroprotective Effects of Curcumin on IL-1 β -Induced Neuronal Apoptosis and Depression-Like Behaviors Caused by Chronic Stress in Rats / C. Fan, Q. Song, P. Wang, Y. Li, M. Yang, S. Y. Yu // *Front Cell Neurosci.* – 2019. – Vol. 12. – P. 516
72. Fang S. Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics / S. Fang, Z. Wu, Y. Guo, W. Zhu, C. Wan et al. // *Front Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. e1193053
73. Fanti Z. NeuronGrowth, a software for automatic quantification of neurite and filopodial dynamics from time-lapse sequences of digital images / Z. Fanti, M. E. Martinez-Perez, F. F. De-Miguel // *Dev Neurobiol.* – 2011 – Vol. 71. – № 10. – P. 870–881
74. Fares J. Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles / J. Fares, Z. Bou Diab, S. Nabha, Y. Fares // *Int J Neurosci* – 2019. – Vol. 129. – № 6. – P. 598–611
75. Fassler M. Engagement of TREM2 by a novel monoclonal antibody induces activation of microglia and improves cognitive function in Alzheimer's disease models / M. Fassler, M. S. Rappaport, C. B. Cuño, J. George // *J Neuroinflammation.* – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 19
76. Faust T. E. Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS / T. E. Faust, G. Gunner, D. P. Schafer // *Nat Rev Neurosci.* – 2021. – Vol. 22. – № 11. – P. 657–673
77. Felger J. C. Role of inflammation in depression and treatment implications / J. C. Felger // *Handb Exp Pharmacol.* – 2019. – Vol. 250. – P. 255–286
78. Ferlemann F. C. Surface marker profiling of SH-SY5Y cells enables small molecule screens identifying BMP4 as a modulator of neuroblastoma differentiation / F. C. Ferlemann, V. Menon, A. L. Condurat, J. Rößler, J. Pruszek // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 13612

79. Fernandez de Sevilla D. Metabotropic Regulation of Synaptic Plasticity / D. Fernandez de Sevilla, A. Nunez, A. Araque, W. Buno // *Neuroscience*. – 2021. – Vol. 456. – P. 1–3
80. Ferrante C. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing / C. J. Ferrante, S. J. Leibovich // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 10–16
81. Fleetwood A. J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation / A. J. Fleetwood, T. Lawrence, J. A. Hamilton, A. D. Cook // *J Immunol*. – 2007. – Vol. 178. – № 8. – P. 5245–5252
82. Forster J. I. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability / J. I. Forster, S. Koglsberger, C. Trefois, O. Boyd, A. S. Baumuratov, L. Buck, R. Balling, P. M. A. Antony // *J Biomol Screen*. – 2016 – Vol. 21. – № 5. – P. 496–509
83. Forster J. I. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability / J. I. Forster, S. Köglsberger, C. Trefois, O. Boyd, A. S. Baumuratov et al. // *J Biomol Screen*. – 2016. – Vol. 21. – № 5. – P. 496–509
84. Frosch M. CNS-associated macrophages shape the inflammatory response in a mouse model of Parkinson's disease / M. Frosch, L. Amann, M. Prinz // *Nat Commun*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 3753
85. Fu X-L. Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression / X-L. Fu, W. Duan, C-Y. Su, F-Y. Mao, Y-P Lv et al. // *Cancer Immunol Immunother*. – 2017. – Vol. 66. – № 12. – P. 1597–1608

86. Gallo N. B. Microglia regulate chandelier cell axo-axonic synaptogenesis / N. B. Gallo, A. Berisha, L. Van Aelst // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2022. – Vol. 119. – № 11. – P. e2114476119
87. Galts C. P. C. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options / C. P. C. Galts, L. E. B. Bettio, D. C. Jewett, C. C. Yang, P. S. Brocardo et al. // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2019. – Vol. 102. – P. 56–84
88. Gao J. Human Neural Stem Cell Transplantation-Mediated Alteration of Microglial/Macrophage Phenotypes after Traumatic Brain Injury / J. Gao, R. J. Grill, T. J. Dunn, S. Bedi, J. A. Labastida et al. // *Cell Transplant.* – 2016. – Vol. 25. – № 10. – P. 1863–1877
89. Garbuzova-Davis S. Multiple intravenous administrations of human umbilical cord blood cells benefit in a mouse model of ALS / S. Garbuzova-Davis, M. C. O. Rodrigues, S. Mirtyl, S. Turner, S. Mitha // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. e31254
90. Gensel J. C. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury / J. C. Gensel, B. Zhang // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1619. – P. 1–11
91. Giacobbo B. L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation B. L. Giacobbo, J. Doorduyn, H. C. Klein, R. A. J. O. Dierckx, E. Bromberg, E. F. J. de Vries // *Mol Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56. – № 5. – P. 3295–3312
92. Ginhoux F. Origin of microglia: current concepts and past controversies / F. Ginhoux, M. Prinz // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2015. – Vol. 7. – № 8. – P. e020537
93. Goldmann T. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces / T. Goldmann, P. Wieghofer, M. J. C. Jordao, F. Prutek, N Hagemeyer et al. // *Nat Immunol.* – 2016. – Vol. 17. – № 7. – P. 797–805
94. Gonzalez-Perez O. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular

- zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes / O. Gonzalez-Perez, R. Romero-Rodriguez, M. Soriano-Navarro, J. M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27. – № 8. – P. 2032–2043
95. Greene J. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization / J. Greene, M. Banasr, B. Lee, J. Warner-Schmidt, R. S. Duman // *Neuropsychopharmacology*. – 2009 – Vol. 34. – № 11. – P. 2459–2468
96. Greenwood J. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain / S. J. Heasman, J. I. Alvarez, A. Prat, R. Lyck, B. Engelhardt // *Neuropathol Appl Neurobiol*. – 2011. – Vol. 37. – № 1. – P. 24–39
97. Han D. The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke / D. Han, H. Liu, Y. Gao // *Neurol Sci*. – 2020. – Vol. 41. – № 12. – P. 3589–3607
98. Han L. Rosiglitazone Promotes White Matter Integrity and Long-Term Functional Recovery After Focal Cerebral Ischemia / L. Han, W. Cai, L. Mao, J. Liu, P. Li, R. K. Leak, Y. Xu, X. Hu, J. Chen // *Stroke*. – 2015. – Vol. 46. – № 9. – P. 2628–2636
99. Hasegawa K. Molecular mechanisms regulating the spatial configuration of neurites / K. Hasegawa, K-I. Kuwako // *Semin Cell Dev Biol*. – 2022. – Vol. 129. – P. 103–114
100. Hashimoto D. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes / D. Hashimoto, A. Chou, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38. – № 4. – P. 792–804
101. Hassan A-A. In vitro models of axon regeneration / A-A. Hassan, S. R. Beckerman, J. L. Bixby, V. P. Lemmon // *Exp. Neurol*. – 2017. – Vol. 287 (Pt 3). – P. 423–434

102. Hassanshani A. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing / A. Hassanshahi, M. Moradzad, S. Ghalamkari, M. Fadaei, A. J. Cowin, M. Hassanshahi // Cells. – 2022. – Vol. 11. – № 19. – P. 2953
103. He H. Perivascular Macrophages Limit Permeability / H. He, J. J. Mack, E. Guc, C. M. Warren, M. L. Squadrito // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2016. – Vol. 36. – № 11. – P. 2203–2212
104. He Y. IL-4 switches microglia/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neurological damage by modulating the JAK1/STAT6 pathway following ICH / Y. He, Y. Gao, Q. Zhang, G. Zhou, F. Cao, S. Yao // J Immunol. – 2020. – Vol. 437. – P. 161–171
105. Hemani S. Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies / S. Hemani, O. Lane, S. Agarwal, S. P. Yu, A. Woodbury // Neurochem Res. – 2021 – Vol. 46. – № 4. – P. 732–739
106. Henkel A. Antidepressant drugs modulate growth factors in cultured cells / A. Henkel, W. Sperling, A. Rotter, U. Reulbach, C. Reichardt et al. // BMC Pharmacol. – 2008. – Vol. 8. – № 6.
107. Heris R.M. The potential use of mesenchymal stem cells and their exosomes in Parkinson's disease treatment / R. M. Heris, M. Shirvaliloo, S. Abbaspour-Aghdam, A. Hazrati, A. Shariati, H. R. Youshanlouei, F. J. Niaragh, H. Valizadeh, M. Ahmadi // Stem Cell Res Ther. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 371
108. Herranz A. S. Applications of human umbilical cord blood cells in central nervous system regeneration / A. S. Herranz, R. Gonzalo-Gobernado, D. Reimers, M. J. Asensio, M. Rodriguez-Serrano, E. Bazan // Curr Stem Cell Res Ther. – 2010. – Vol. 5. – № 1. – P. 17–22
109. Hromadkova L. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive

neurons / L. Hromadkova, D. Bezdekova, J. Pala, S. Schedin-Weiss, L. O. Tjernberg, C. Hoschl, S. V. Ovsepian // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2020 – Vol. 1867. – № 9. – P. e118737

110. Hu X. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia / X. Hu, P. Li, Y. Guo, H. Wang, R. K. Leak, S. Chen, Y. Gao, J. Chen // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43. – № 11. – P. 3063–3070

111. Hu X. Microglial and macrophage polarization - new prospects for brain repair / X. Hu, R. Leak, J. Shi, J. Suenaga, Y. Gao, P. Zheng, J. Chen // *Nat Rev Neurol.* – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. 56–64

112. Huang D. Role of mTOR complex in IGF-1 induced neural differentiation of DPSCs / D. Huang, S. Shen, M. Cai, L. Jin, J. Lu et al. // *J Mol Histol.* – 2019 – Vol. 50. – № 3. – P. 273–283

113. Huang J. Mesenchymal stromal cells alleviate depressive and anxiety-like behaviors via a lung vagal-to-brain axis in male mice / J. Huang, W. Huang, J. Yi, Y. Deng, R. Li et al. // *Nat Commun.* – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 7406

114. Huang Q. Glycometabolic Reprogramming of Microglia in Neurodegenerative Diseases: Insights from Neuroinflammation / Q. Huang, Y. Wang, S. Chen, F. Liang // *Aging Dis.* – 2023. – DOI: 10.14336/AD.2023.0807

115. Huang X. Polarizing Macrophages *In vitro* / X. Huang, Y. Li, M. Fu, H-B. Xin // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1784. – P. 119–126

116. Ibrayeva A. Early stem cell aging in the mature brain / A. Ibrayeva, M. Bay, E. Pu, D. J. Jorg, L. Peng // *Cell Stem Cell.* – 2021. – Vol. 28. – № 5. – P. 955–966

117. Ioghen O.C. SH-SY5Y Cell Line In Vitro Models for Parkinson Disease Research-Old Practice for New Trends / O. C. Ioghen, L. C. Ceafalan, B. O. Popescu // *J Integr Neurosci.* – 2023. – Vol. 22. – № 1. – P. 20

118. Jin K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo* / K. Jin, Y. Zhu, Y. Sun, X. O. Mao, L. Xie, D. A. Greenberg // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002 – Vol. 99. – № 18. – P. 13946–13950
119. Jin W-N. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury / W-N. Jin, S. X-Y. Shi, Z. Li, M. Li, K. Wood, R. J. Gonzales, Q. Liu // J Cereb Blood Flow Metab. – 2017. – Vol. 37. – № 6. – P. 2224–2236
120. Johnson A. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis / A. Johnson, L. A. DiPietro // FASEB J. – 2013. – Vol. 27. – № 10. – P. 3893–3901
121. Jung S. Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits / S. Jung, S. Choe, H. Woo, H. Jeong, H-K An et al. // Autophagy. – 2020. – Vol. 16. – № 3. – P. 512–530
122. Kalkman H. O. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization / H. O. Kalkman, D. Feuerbach // Pharmacol Ther. – 2016. – Vol. 163. – P. 82–93
123. Kappelmann N. Polygenic risk for immuno-metabolic markers and specific depressive symptoms: A multi-sample network analysis study / N. Kappelmann, D. Czamara, N. Rost, S. Moser, V. Schmall et al. // Brain Behav Immun. – 2021. – Vol. 95. – P. 256–268
124. Kaur G. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts / G. Kaur, J. M. Dufour // Spermatogenesis. – 2012. – Vol. 2. – № 1. – P. 1–5
125. Kim C. C. Brain trauma elicits non-canonical macrophage activation states / C. C. Kim, M. C. Nakamura, C. L. Hsieh // J Neuroinflammation. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 117
126. Kim D. Ubiquitin E3 Ligase Pellino-1 Inhibits IL-10-mediated M2c Polarization of Macrophages, Thereby Suppressing Tumor Growth / D. Kim, J. Koh, J. S. Ko, H. Y. Kim, H. Lee, D. H. Chung // Immune Netw. – 2019. – Vol. 19. – № 5. – P. e32

127. Kim H. Effects of proinflammatory cytokines on axonal outgrowth from adult rat lumbar dorsal root ganglia using a novel three-dimensional culture system / H. Kim, T. W. Caspar, S. B. Shah, A. H. Hsieh // *Spine J.* – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 1823–1831
128. Kiseleva V. Biochemical and molecular inducers and modulators of M2 macrophage polarization in clinical perspective / V. Kiseleva, P. Vishnyakova, A. Elchaninov, T. Fatkhudinov, G. Sukhikh // *Int Immunopharmacol* – 2023. – Vol. 122. – P. e110583
129. Kliot M. Strategies to promote regeneration and recovery in the injured spinal cord / M. Kliot, J. H. Lustgarten // *Neurosurg Clin N Am.* – 1990. – Vol. 1. – № 3. – P. 751–759
130. Kofod F. Depression and inflammation: Correlation between changes in inflammatory markers with antidepressant response and long-term prognosis / J. Kofod, B. Elfving, E. H. Nielsen, O. Mors, O. Köhler-Forsberg // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2022. – Vol. 54. – P. 116–125
131. Koh T.J. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage / T. J. Koh, L. A. DiPietro // *Expert Rev Mol Med.* – 2011. – Vol. 13. P. e23
132. Kohli P. Future Perspectives in Spinal Cord Repair: Brain as Saviour? TSCI with Concurrent TBI: Pathophysiological Interaction and Impact on MSC Treatment / P. Kohli, E. Otto, D. Jahn, M-J. Reisener, J. Appelt et al. // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 11. – P. 2955
133. Komohara Y. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas / Y. Komohara, K. Ohnishi, J. Kuratsu, M. Takeya // *J Pathol.* – 2008. – Vol. 216. – № 1. – P. 15–24
134. Kopczak A. IGF-1 in major depression disorder and antidepressant treatment response / A. Kopczak, G. K. Stalla, M. Uhr, S. Lucae, J. Hennings, M. Ising, F. Holsboer, S. Kloiber // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2015 – Vol. 25. – № 6. – P. 864–

872

135. Kovalevich J. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology / J. Kovalevich, M. Santerre, D. Langford // *Methods Mol Biol.* – 2021. – Vol. 2311. – P. 9–23
136. Krzyszczyk P. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes / P. Krzyszczyk, R. Schloss, A. Palmer, F. Berthiaume // *Front Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 419
137. Kudryavtseva N. N. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC) / N. N. Kudryavtseva, D. F. Avgustinovich // *Agress Behav.* – 1998 – Vol. 24. – № 4. – P. 271–286
138. Kudryavtseva N. N. Development of Mixed Anxiety/Depression-Like State as a Consequence of Chronic Anxiety: Review of Experimental Data / N. N. Kudryavtseva // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2022. – Vol. 54. – P. 125–152
139. Kudryavtseva N. N. Snca and Bdnf gene expression in the VTA and raphe nuclei of midbrain in chronically victorious and defeated male mice / N. N. Kudryavtseva, N. P. Bondar, U. A. Boyarskikh, M. L. Filipenko // *PLoS One* – 2010 – Vol. 5. – № 11. – P. e14089
140. Kuntzel T. Manipulating macrophage/microglia polarization to treat glioblastoma or multiple sclerosis / T. Kuntzel, D. Bagnard // *Pharmaceutics* – 2022. – Vol. 14. – № 2. – P. 334
141. Laskowitz D. T. Allogenic umbilical cord blood infusion for adults with ischemic stroke: clinical outcomes from a phase I safety study / D. T. Laskowitz, E. R. Bennett, R. J. Durham, J. J. Volpi, J. R. Wiese / *Stem cell transl med.* – 2018. – Vol. 7. – № 7. – P. 521–529
142. Lavenius E. Basic FGF and IGF-1 promote differentiation of human SY-SY5Y neuroblastoma cells in culture / E. Lavenius, V. Parrow, E. Nanberg, S. Pahlman //

Growth Factors. – 1994 – Vol. 10. – № 1. – P. 29–39

143. Lazarov T. Physiology and diseases of tissue-resident macrophages / T. Lazarov, S. Juarez-Carreno, N. Cox, F. Geissmann // *Nature*. – 2023. – Vol. 618. – № 7966. – P. 698–707

144. Lenz K. M. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function / K. M. Lenz, L. H. Nelson // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 698

145. Li H. Macrophage Subsets and Death Are Responsible for Atherosclerotic Plaque Formation / H. Li, Z. Cao, L. Wang, C. Liu, H. Lin, Y. Tang, P. Yao // *Front Immunol*. – 2022. – Vol. 13. – P. e843712

146. Li M. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage / M. Li, Z. Li, H. Ren, W-N. Jin, K. Wood, Q. Liu, K. N. Sheth, F-D. Shi // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2017. – Vol. 37. – № 7. – P. 2383–2395

147. Lin J. MerTK-mediated efferocytosis promotes immune tolerance and tumor progression in osteosarcoma through enhancing M2 polarization and PD-L1 expression / J. Lin, A. Xu, J. Jin, M. Zhang, J. Lou et al. // *Oncoimmunology*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. e2024941

148. Liu L. An optimized flow cytometry panel for classifying macrophage polarization / L. Liu, J. V. Stokes, W. Tan, S. B. Pruett // *J Immunol Methods*. – 2022. – Vol. 511. – P. e113378

149. Lobo-Silva D. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation / D. Lobo-Silva, G. M. Carriche, A. Gil Castro, S. Roque, M. Saraiva // *J Neuroinflammation*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 1–10

150. London A. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair / A. London, Cohen M.,

Schwartz M // Front Cell Neurosci. – 2013. – Vol. 7. – P. 34

151. Lopes B. Animal models in peripheral nerve transection studies: a systematic review on study design and outcomes assessment / B. Lopes, A. Coelho, R. Alvites, A. C. Sousa, P. Sousa et al. // Regen Med. – 2024. – Vol. 19. – № 4. – P. 189–203

152. Lopes F. M. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies / F. M. Lopes, R. Schröder, M. L. Conte da Frota Jr, A. Zanotto-Filho, C. B. Müller et al. // Brain Res. – 2010. – Vol. 1337. – P. 85–94

153. Lopez-Suarez L. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants / L. Lopez-Suarez, S. Al Awabdh, X. Coumoul, C. Chauvet // Neurotoxicology. – 2022. – Vol. 92. – P. 131–155

154. Lu R. Echinacoside exerts antidepressant-like effects through enhancing BDNF-CREB pathway and inhibiting neuroinflammation via regulating microglia M1/M2 polarization and JAK1/STAT3 pathway / R. Lu, L. Zhang, H. Wang, M. Li, W. Feng, X. Zheng // Front Pharmacol. – 2023. – Vol. 4. – № 13. – P. e993483

155. Lu W. Effects of vascular endothelial growth factor and insulin growth factor-1 on proliferation, migration, osteogenesis and vascularization of human carious dental pulp stem cells / W. Lu, W. Xu, J. Li, Y. Chen, Y. Pan, B. Wu // Mol Med Rep. – 2019 – Vol. 20. – № 4. – P. 3924–3932

156. Lu W. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytosed dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival / W. Lu 1, C. Fu, L. Song, Y. Yao, X. Zhang, Z. Chen, Y. Li, G. Ma, C. Shen // Int J Cardiol. – 2013. – Vol. 165. – № 2. – P. 333–340

157. Lugo-Villarino G. The C-Type Lectin Receptor DC-SIGN Has an Anti-Inflammatory Role in Human M(IL-4) Macrophages in Response to Mycobacterium

tuberculosis / G. Lugo-Villarino, A. Troegeler, L. Balboa, C. Lastrucci, C. Duval et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1123

158. Lurier E. B. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing / E. B. Lurier, D. Dalton, W. Dampier, P. Raman, S. Nassiri, N. M. Ferraro, R. Rajagopalan, M. Sarmady, K. L. Spiller // *Immunobiology.* – 2017. – Vol. 222. – № 7. – P. 847–856

159. Maezawa I. Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate / L. Maezawa, L-W. Jin // *J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – № 15. – P. 5346–5356

160. Mancuso R. CSF1R inhibitor JNJ-40346527 attenuates microglial proliferation and neurodegeneration in P301S mice / R. Mancuso, G. Fryatt, M. Cleal, J. Obst, E. Pipi et al. // *Brain.* – 2019. – Vol. 142. – № 10. – P. 3243–3264

161. Marchetto M. C. N. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases / M. C. N. Marchetto, B. Winner, F. H. Gage // *Hum Mol Genet.* – 2010. – Vol. 19. – P. 71–76

162. Martin E. A novel method for generating glutamatergic SH-SY5Y neuron-like cells utilizing B-27 supplement / E. Martin, J. Gandawijaya, A. Oguro-Ando // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 943627

163. Martinez F. O. Macrophage activation and polarization / F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati // *Front Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 453–461

164. Martinez F. O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment / F. O. Martinez, S. Gordon // *F1000Prime Rep.* – 2014. – Vol. 6. – P. 13

165. Martinez M-A. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways / M-A. Martinez, J-L. Rodriguez, B. Lopez-Torres, M. Martinez, M-R. Martinez-Larranaga et al. // *Environ Int.* – 2020. – Vol. 135. – P. e105414

166. Mato M. Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex / M. Mato, S. Ookawara, A. Sakamoto, E. Aikawa, T. Ogawa et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Vol. 93. – № 8. – P. 3269–3274
167. Mattson M. E. Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin-like growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation / M. E. Mattsson, G. Enberg, A. I. Ruusala, K. Hall, S. Pahlman // *J Cell Biol*. – 1986 – Vol. 102. – № 5. – P. 1949–1954
168. McAllister B. B. Effects of social defeat stress and fluoxetine treatment on neurogenesis and behavior in mice that lack zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc / B. B. McAllister, A. Pochakom, S. Fu, R. H. Dyck // *Hippocampus*. – 2020. – Vol. 30. – № 6. – P. 623–637
169. McMenamin P. G. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy / P. G. McMenamin, R. J. Wealthall, M. Deverall, S. J. Cooper, B. Griffin // *Cell Tissue Res*. – 2003. – Vol. 313. – № 3. – P. 259–269
170. Mee-Inta O. Physical Exercise Inhibits Inflammation and Microglial Activation / O. Mee-Inta, Z-W. Zhao, Y-M. Kuo // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 7. – P. 691
171. Mezu-Ndubuisi O. J. Role of macrophages in fetal development and perinatal disorders / A. Maneshwari, O. J. Mezu-Ndubuisi // *Pediatr Res*. – 2021. – Vol. 90. – № 3. – P. 513–523
172. Miller A.H. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target / A. H. Miller, C. L. Raison // *Nat Rev Immunol*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 22–34
173. Minogue A. M. Role of infiltrating monocytes/macrophages in acute and chronic neuroinflammation: Effects on cognition, learning and affective behaviour / A. M.

- Minogue // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2017. – Vol. 79. – P. 15–18
174. Mirabella F. Prenatal interleukin 6 elevation increases glutamatergic synapse density and disrupts hippocampal connectivity in offspring / F. Mirabella, G. Desiato, S. Mancinelli, G. Fossati, M. Rasile et al. // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54. – № 11. – P. 2611–2631
175. Moravcová S. Social defeat stress affects resident's clock gene and bdnf expression in the brain / S. Moravcová, K. Červená, H. Míková, D. Pačesová, G. Pallag et al. // *Stress*. – 2021. – Vol. 24. – № 2. – P. 206–212
176. Mordelt A. Microglia-mediated synaptic pruning as a key deficit in neurodevelopmental disorders: Hype or hope? / A. Mordelt, L. D. de Witte // *Curr Opin Neurobiol*. – 2023. – Vol. 79. – P. e102674
177. Morganti J. M. Call Off the Dog(ma): M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury / J. M. Morganti, L-K. Riparip. S. Rosi // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. e0148001
178. Mosser D. M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D. M. Mosser, J. P. Edwards // *Nat Rev Immunol*. – Vol. 8. – № 12. – P. 958–969
179. Muñoz-Sánchez J. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model / J. Muñoz-Sánchez, M. E. Chánez-Cárdenas // *J Appl Toxicol*. – 2021. – Vol. 39. – № 4. – P. 556–570
180. Murray P. G. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A Fisher, D. W. Gilroy et al. // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – № 1. – P. 14–20
181. Na Y. R. A new era of macrophage-based cell therapy / Y. R. Na, S. W. Kim, S. H. Seok // *Exp Mol Med*. – 2023 – Vol. 55. – № 9. – P. 1945–1954
182. Na Y. R. A new era of macrophage-based cell therapy / Y. R. Na, S. W. Kim, S. H. Seok // *Exp Mol Med*. – 2023. – Vol. 55. – № 9. – P. 1945–1954

183. Nakamichi N. Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling / N. Nakamichi, T. Takarada, Y. Yoneda // *J Pharmacol Sci.* – 2009. – Vol. 110. – № 2. – P. 133–149
184. Nakamura R. Macrophages alter inflammatory and fibrotic gene expression in human vocal fold fibroblasts / R. Nakamura, R. Bing, G. J. Gartling, R. C. Branski // *Exp Cell Res.* – 2022. – Vol. 419. – № 1. – P. e113301
185. Nasrolahi A. Therapeutic potential of neurotrophic factors in Alzheimer's Disease / A. Nasrolahi, F. Javaherforooshzadeh, M. Jafarzadeh-Gharehziaaddin, J. Mahmoudi, K. Dizaji Asl, Z. Shabani // *Mol Biol Rep.* – 2022. – Vol. 49. – № 3. – P. 2345–2357
186. Nicoletti V.G. The role of metals in the neuroregenerative action of BDNF, GDNF, NGF and other neurotrophic factors / V. G. Nicoletti, K. Pajer, D. Calcagno, G. Pajenda, A. Nogradi // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12. – № 8. – P. 1015
187. Nottebohm F. From bird song to neurogenesis / F. Nottebohm // *Sci Am.* – 1989. – Vol. 260. – № 2. – P. 74–79
188. Okada K. S-nitrosilation of the IGF-1 receptor disrupts the cell proliferative action of IGF-1 / K. Okada, B-T. Zhu // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017 – Vol. 491. – № 4. – P. 870–875
189. Otero L. Endogenous neurogenesis after intracerebral hemorrhage / L. Otero, M. Zurita, C. Bonilla, M. A. Rico, C. Aguayo, A. Rodriguez, J. Vaquero // *Histol Histopathol.* – 2012. – Vol. 27. – № 3. – P. 303–315
190. Palma A. Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States / A. Palma, A. S. Jarrah, P. Tieri, G. Cesareni, F. Castiglione // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P.1659
191. Pan Q. Estradiol exerts a neuroprotective effect on SH-SY5Y cells through the miR-106b-5p/TXNIP axis / Q. Pan, K. Guo, M. Xue, Q. Tu // *J Biochem Mol Toxicol.* – 2021. – Vol. 35. – № 9. – P. e22861

192. Pannu A. Serotonin and Depression: Scrutiny of New Targets for Future Anti-Depressant Drug Development / A. Pannu, R. K. Goyal // *Curr Drug Targets*. – 2023. – Vol. 24. – № 10. – P. 816–837
193. Parmar M. In vivo conversion of dopamine neurons in mouse models of Parkinson's disease - a future approach for regenerative therapy? / M. Parmar, A. Björklund, T. Björklund // *Curr Opin Genet Dev*. – 2021. – Vol. 70. – P. 76–82
194. Pavlica S. Erythropoietin enhances cell proliferation and survival of human fetal progenitors in normoxia / S. Pavlica, J. Milosevic, M. Keller, M. Schulze, F. Peinemann et al. // *Brain Res*. – 2012 – Vol. 1452. – P. 18–28
195. Petrou P. Beneficial effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis / P. Petrou, I. Kassis, N. Levin, F. Paul, Y. Backner et al. // *Brain*. – 2020. – Vol. 143. – № 12. – P. 1863–1877
196. Picard-Riera N. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice / N. Picard-Riera, L. Decker, C. Delarasse, K. Goude, B. Nait-Oumesmar, R. Liblau, D. Pham-Dinh, A. Baron-Van Evercooren // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – Vol. 99. – № 20. – P. 13211–13216
197. Prinz M. Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation / M. Prinz, T. Masuda, M. A. Wheeler, F. J. Quintana // *Annu Rev Immunol*. – 2021. – Vol. 39. – P. 251–277
198. Qi C. Molecular mechanisms of synaptogenesis / C. Qi, L-D. Luo, I. Feng, S. Ma // *Front Synaptic Neurosci*. – 2022. – Vol. 14. – P. e939793
199. Quero L. miR-221-3p drives the shift of M2-Macrophages to a pro-inflammatory function by suppressing JAK3/STAT3 activation / L. Quero, A. N. Tiaden, E. Hanser, J. Roux, A. Laski, J. Hall, D. Kyburz // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 10. – P. e3087
200. Raes G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus

classically activated macrophages / G. Raes, P. De Baetselier, W. Noel, A. Beschin, F. Brombacher, G. Hassanzadeh Gh // *J Leukoc Biol.* – 2002. – Vol. 71. – № 4. – P. 597–602

201. Rapalino O. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats / O. Rapalino, O. Lazarov-Spiegler, E. Agranov, G. J. Velan, E. Yoles et al. // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4. – № 7. – P. 814–821

202. Rawji K. S. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis / K. S. Rawji, W. Y. Yong // *Clin Dev Immunol.* – 2013. – Vol. 2013. – P. e948976

203. Rey-Giraud F. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions / F. Rey-Giraud, M. Hafner, C. H. Ries // *PLoS One* – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e42656

204. Robin A.M. Stromal cell-derived factor 1 alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia / A. M. Robin, Z. G. Zhang, L. Wang, R. L. Zhang, M. Katakowski, L. Zhang, Y. Wang, C. Zhang, M. Chopp // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2006. – Vol. 26. – № 1. – P. 125–134

205. Ruytinx P. Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions / P. Ruytinx, P. Proost, J. Van Damme, S. Struyf // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. e1930

206. Sabbir Alam S. M. Neuronal NADPH oxidase is required for neurite regeneration of Aplysia bag cell neurons / S. M. Sabbir Alam, Y. Watanabe, B. L. Steeno, S. Dutta, H. A. Szilagyi, A. Wei, D. M. Suter // *J Neurochem.* – 2023. – Vol. 167. – № 4. – P. 505–519

207. Sakhno L. V. The Phenotypic and Functional Features of Human M2 Macrophages Generated Under Low Serum Conditions / L. V. Sakhno, E. Y. Shevela, M. A. Tikhonova, A. A. Ostanin, E. R. Chernykh // *Scand J Immunol.* – 2016 – Vol. 83.

– № 2. – P. 151–159

208. Sanchez-Petitto G. Umbilical cord blood transplantation: connecting its origin to its future / G. Sanchez-Petitto, K. Rezvani, M. Daher, H. Rafei, P. Kebriaei, E. J. Shpall, A. Olson // *Stem Cells Transl Med.* – 2023. – Vol. 12. – № 2. – P. 55–71

209. Sandberg P. R. Monocyte transplantation for neural and cardiovascular ischemia repair / P. R. Sanberg, D-H. Park, N. Kuzmin-Nichols, E. Cruz, N. A. Hossne Jr, E. Buffolo, A. E. Willing // *J Cell Mol Med.* – 2010. – Vol. 14. – № 3. – P. 553–563

210. Sangineto M. Metabolic reprogramming in inflammatory microglia indicates a potential way of targeting inflammation in Alzheimer's disease / M. Sangineto, M. Ciarnelli, T. Cassano, A. Radesco, A. Moola // *Redox Biol.* – 2023. – Vol. 66. – P. e102846

211. Scheib J. Advances in peripheral nerve regeneration / J. Scheib, A. Hoke // *Nat Rev Neurol.* – 2013. – Vol. 9. – № 12. – P. 668–676

212. Schilling C. Treatment with antidepressants increases insulin-like growth factor-I in cerebrospinal fluid / C. Schilling, W. F. Blum, I. Heuser, G. Paslakis, S. A. Wudy, M. Deuschle // *J Clin Pharmacol.* – 2011 – Vol. 31. – № 3. – P. 390–392

213. Shahaduzzaman M. D. Human umbilical cord blood cells induce neuroprotective change in gene expression profile in neurons after ischemia through activation of Akt pathway / M. D. Shahaduzzaman, V. Mehta, J. E. Golden, D. D. Rowe, S. Green et al. // *Cell Transplant.* – 2015. – Vol. 24. – № 4. – P. 721–735

214. Shan L. Astrocyte-Neuron Signaling in Synaptogenesis / L. Shan, T. Zhang, K. Fan, W. Cai, H. Liu // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. e680301

215. Shapouri-Moghaddam A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease / A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S-A. Esmaeili et al. // *J Cell Physiol.* – 2018. – Vol. 233. – № 9. – P. 6425–6440

216. Shechter R. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates / R. Shechter, A. London, M. Schwartz // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 206–218
217. Shechter R. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus / R. Shechter, O. Miller, G. Yovel, N. Rosenzweig, A. London et al. // *Immunity.* – 2013. – Vol. 38. – № 3. – P. 555–569
218. Shevela E. Y. Intranasal immunotherapy with M2 macrophage soluble factors in post-COVID hyposmia: A pilot study / E. Y. Shevela, M. N. Davydova, I. V. Meledina, S. S. Bogachev, A. A. Ostanin, V. A. Kozlov, E. R. Chernykh // *Int Immunopharmacol.* – 2024 – Vol. 126. – P. e111260
219. Shui G. Development of In Vitro Neural Models for Drug Discovery and Toxicity Screening / G. Shui // *Comprehensive Biotechnology.* – 2011. – P. 638–645
220. Song Y. A dynamic view of the proteomic landscape during differentiation of ReNcell VM cells, an immortalized human neural progenitor line / Y. Song, K. Subramanian, M. J. Berberich, S. Rodriguez, I. J. Latorre et al. // *Sci Data.* – 2019. – Vol. 19. – № 6. – P. e190016
221. Steward M. M. Neural regeneration / M. M. Steward, A. Sridhar, J.S. Meyer // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2013. – Vol. 367. – P. 163–191
222. Stoeckli E. Where does axon guidance lead us? / E. Stoeckli // *F1000Res.* – 2017. – Vol. 6. – P. 78
223. Stroylova Y. Y. Modulation of TRPV1 and TRPA1 Channels Function by Sea Anemones' Peptides Enhances the Viability of SH-SY5Y Cell Model of Parkinson's Disease / Y. S. Kolesova, Y. Y. Stroylova, E. E. Maleeva, A. M. Moysenovich, D. V. Pozdyshev et al. // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 25. – № 1. – P. 368
224. Su F. Fluoxetine and S-citalopram inhibit M1 activation and promote M2 activation of microglia *in vitro* / F. Su, H. Yi, L. Xu, Z. Zhang // *Neuroscience.* – 2015.

– Vol. 294. – P. 60–68

225. Sudhof T. C. The cell biology of synapse formation / T. C. Sudhof // J Cell Biol. – 2021. – Vol. 220. – № 7. – P. e202103052

226. Sun L. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis / L.Sun, M.C. Louie, K. M. Vannella, C. A. Wilke, A. M. LeVine, B. B. Moore, T. P. Shanley // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2011. – Vol. 300. – № 3. – P. 341–353

227. Sun Z. MicroRNA-126 protects SH-SY5Y cells from ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis by inhibiting RAB3IP / Z. Sun, X. Zhao, M. Zhang, N. Li, Y. Zhao // Mol Med Rep. – 2022. – Vol. 25. – № 2. – P. 62

228. Supeno N. E. IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells / N. E. Supeno, S. Pati, R. A. Hadi, A. R. I. Ghani, Z. Mustafa, J. M. Abdullah, F. M. Idris, X. Han, H. Jaafar // Int J Med Sci. – 2013 – Vol. 10. – № 5. – P. 522–531

229. Tang L. M2A and M2C Macrophage Subsets Ameliorate Inflammation and Fibroproliferation in Acute Lung Injury Through Interleukin 10 Pathway / L. Tang, H. Zhang, C. Wang, H. Li, Q. Zhang, J. Bai // Shock. – 2017. – Vol. 48. – № 1. – P. 119–129

230. Temporin K. IL-1beta promotes neurite outgrowth by deactivating RhoA via p38 MAPK pathway / K. Temporin, H. Tanaka, Y. Kuroda, K. Okada, K. Yachi, H. Moritomo, T. Murase, H. Yoshikawa // Biochem Biophys Res Commun. – 2008. – Vol. 365. – № 2. – P. 375–380

231. Thakur S. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics / S. Thakur, R. Dhapola, P. Sarma, B. Medhi, D. HariKrishna Reddy // Inflammation. – 2023. – Vol. 46. – № 1. – P. 1–17

232. Tremblay M-E. The role of microglia in the healthy brain / M-E. Tremblay, B.

- Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis, A. Nimmerjahn // *J Neurosci.* – 2011. – Vol. 31. – № 45. – P. 16064–16069
233. Trifu S. C. Brain changes in depression / S. C. Trifu, A. C. Trifu, E. Aluaş, M. A. Tătaru, R. V. Costea // *Rom J Morphol Embryol.* – 2020. – Vol. 61. – № 2. – P. 361–370
234. Troubat R. Neuroinflammation and depression: A review / R. Troubat, P. Barone, S. Leman, T. Desmidt, A. Cressant et al. // *Eur J Neurosci.* – 2021. – Vol. 52. – № 1. – P. 151–171
235. Troyan A. S. The Diagnostic Value of the Combination of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor and Insulin-Like Growth Factor-1 for Major Depressive Disorder Diagnosis and Treatment Efficacy / A. S. Troyan, O. A. Levada // *Front Psychiatry.* – 2020 – Vol. 11. – P. 800
236. Tsarouchas T. M. Dynamic control of proinflammatory cytokines Il-1 β and Tnf- α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration / T. M. Tsarouchas, D. Wehner, L. Cavone, T. Munir, M. Keatinge et al. // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 4670
237. Tsuchimoto Y. M2b Monocytes Provoke Bacterial Pneumonia and Gut Bacteria-Associated Sepsis in Alcoholics / Y. Tsuchimoto, A. Asai, Y. Tsuda, I. Ito, T. Nishiguchi et al. // *J Immunol.* – 2015. – Vol. 195. – № 11. – P. 5169–5177
238. Tugal D. Transcriptional control of macrophage polarization / D. Tugal, X. Liao, M. K. Jain // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – Vol. 33. – № 6. – P. 1135–1144
239. Var S. R. Microglia and macrophages in neuroprotection, neurogenesis and emerging therapies for stroke / S. R. Var, A. V. Shetty, A. W. Grande, W. C. Low, M. C. Cheeran // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 3555
240. Vendrame M. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model

of stroke / M. Vendrame, C. Gemma, D. de Mesquita, L. Collier, P. C. Bickford, C. D. Sanberg, P. R. Sanberg, K. R. Pennypacker, A. E. Willing // *Stem Cell Dev.* – 2005. – Vol. 14. – № 5. – P. 595–604

241. Vialou V. DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses / V. Vialou, A. J. Robison, Q. C. Laplant, H. E. Covington, D. M. Dietz et al. // *Nat Neurosci.* – 2010. – Vol. 13. – № 6. – P. 745–752

242. Vidal P. M. The role of "anti-inflammatory" cytokines in axon regeneration / P. M. Vidal, E. Lemmens, D. Dooley, S. Hendrix // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2013. – Vol. 24. – № 1. – P. 1–12

243. Vogel D. Y. S. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared / D. Y. S. Vogel, J. E. Glim, A. W. D. Stavenhagen, M. Breur, P. Heijnen, S. Amor, C. D. Dijkstra, R. H. J. Beelen // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219. – № 9. – P. 695–703

244. Wang C-F. Depletion of Microglia Attenuates Dendritic Spine Loss and Neuronal Apoptosis in the Acute Stage of Moderate Traumatic Brain Injury in Mice / C-F. Wang, C-C. Zhao, W-L. Liu, X-J. Huang, Y-F. Deng, J-Y. Jiang, W-P. Li // *J Neurotrauma.* – 2020. – Vol. 37. – № 1. – P. 43–54

245. Wang D-W. LncRNA SNHG1 protects SH-SY5Y cells from hypoxic injury through miR-140-5p/Bcl-XL axis / D-W. Wang, X-Q. Lou, Z-L. Liu, N. Zhang, L. Pang // *Int J Neurosci.* – 2021. – Vol. 131. – № 4. – P. 336–345

246. Wang G. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury / G. Wang, J. Zhang, X. Hu, L. Zhang, L. Mao et al. // *J cereb blood flow metab.* – 2013. – Vol. 33. – № 12. – P. 1864–1874

247. Wang L-X. M2b macrophage polarization and its roles in diseases / L-X. Wang, S-X Zhang, H-J. Wu, X-L Rong, J. Guo // *J Leukoc Biol.* – 2019. – Vol. 106. – № 2. – P. 345–358

248. Wang T. Esketamine alleviates postoperative depression-like behavior through anti-inflammatory actions in mouse prefrontal cortex / T. Wang, H. Weng, H. Zhou, Z. Yang, Z. Tian et al. // *J Affect Disord.* – 2022. – Vol. 307. – P. 97–107
249. Wang Y. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration / Y. Wang, K. Jin, X. Ou Mao, L. Xie, S. Banwait, H. H. Marti, D. A. Greenberg // *J Neurosci Res.* – 2007. – Vol. 85. – № 4. – P. 740–747
250. Wang Z. Effects and action mechanisms of individual cytokines contained in PRP on osteoarthritis / Z. Wang, P. Zhu, B. Liao, H. You, Y. Cai // *J Orthop Surg Res.* – 2017 – Vol. 491. – № 4. – P. 870–875
251. Warner-Schmidt J. L. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants / J. L. Warner-Schmidt, R. S. Duman // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007 – Vol. 104. – № 11. – P. 4647–4652
252. Wegiel J. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice / J. Wegiel, K. C. Wang, H. Imaki, R. Rubenstein, A. Wronska, M. Osuchowski, W. J. Lipinski, L. C. Walker, H. LeVine // *Neurobiol Aging.* – 2001. – Vol. 22. – № 1. – P. 49–61
253. Westerink R. H. S. The PC12 cell as model for neurosecretion / R. H. S. Westerink, A. G. Ewing // *Acta Physiol (Oxf).* – 2008. – Vol. 192. – № 2. – P. 273–285
254. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage / P. Willner // *Neurobiol Stress.* – 2016. – Vol. 6. – P. 78–93
255. Womble T. A. Monocytes are essential for the neuroprotective effect of human cord blood cells following middle cerebral artery occlusion in rat / T. A. Womble, S. Green, M. Shahaduzzaman, J. Grieco, P. R. Sanberg, K. R. Pennypacker, A. E. Willing // *Mol Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 59. – P. 76–84
256. Wynn T. A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease / T. A. Wynn, A. Chawla, J. W. Pollard // *Nature.* – 2013. – Vol. 496. – № 7446. – P. 445–455

257. Wynn T. A. Macrophages in tissue repair, regeneration and fibrosis / T. A. Wynn, K. M. Valnella // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44. – № 3. – P. 450–462
258. Xie H. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease / H. Xie, L. Hu, G. Li // *Chin Med J (Engl)*. – 2010. – Vol. 123. – № 8. – P. 1086–1092
259. Xu X. Arctigenin protects against depression by inhibiting microglial activation and neuroinflammation via HMGB1/TLR4/NF- κ B and TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathways / X. Xu, H-N. Piao, F. Aosai, X-Y Zeng, J-H. Cheng et al. // *Br J Pharmacol*. – 2020. – Vol. 177. – № 22. – P. 5224–5245
260. Xu X. Enhancing CNS repair in neurological disease: challenges arising from neurodegeneration and rewiring of the network / X. Xu, A. E. Warrington, A. J. Bieber, M. Rodrigues // *CNS Drugs*. – 2011. – Vol. 25. – №7. – P. 555–573.
261. Yang P. Adoptive transfer of polarized M2c macrophages ameliorates acute rejection in rat liver transplantation / P. Yang, X. Zhang, Z. Lin, Q. Wang, D. Guo et al. // *Am J Transl Res*. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 2614–2626
262. Yang X. Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP / X. Yang, H. Ren, K. Wood, M. Li, S. Qiu, F-D. Shi, C. Ma, Q. Liu // *FASEB J*. – 2018. – Vol. 32. – № 6. – P. 3336–3345
263. Yu P. An in vitro model of reactive astrogliosis and its effect on neuronal growth / P. Yu, H. Wang, Y. Katagiri, H. M. Geller // *Methods Mol Biol*. – 2012. – Vol. 814. – P. 327–340
264. Yue Y. M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20 / Y. Yue, X. Yang, K. Feng, L. Wang, J. Hou et al. // *Int J Cardiol*. – 2017. – Vol. 245. – P. 228–235
265. Yue Y. M2b Macrophages Regulate Cardiac Fibroblast Activation and Alleviate Cardiac Fibrosis After Reperfusion Injury / Y. Yue, S. Huang, L. Wang, Z. Wu, M.

- Liang, H. Li, L. Lv, W. Li, Z. Wu // *Circ J.* – 2020. – Vol. 84. – № 4. – P. 626–635
266. Zeng C-W. Macrophage-Neuroglia Interactions in Promoting Neuronal Regeneration in Zebrafish / C-W. Zeng // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 7. – P. 6483
267. Zhang K. Hyperactive neuronal autophagy depletes BDNF and impairs adult hippocampal neurogenesis in a corticosterone-induced mouse model of depression / K. Zhang, F. Wang, M. Zhai, M. He, Y. Hu et al. // *Theranostics.* – 2023. – Vol. 13. – № 3. – P. 1059–1075
268. Zhang Q. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals the metabolic programming of GM-CSF- and M-CSF-differentiated mouse macrophages / Q. Zhang, Q. Song, S. Liu, Y. Xu, D. Gao et al. // *Front Immunol.* – 2023. – Vol. 25. – P. e1230772
269. Zhang Q. Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting / Q. Zhang, M. Sioud // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 8. – P. 7493
270. Zhang X. IGF-1 promotes Brn-4 expression and neuronal differentiation of neural stem cells via the PI3K/Akt pathway / X. Zhang, L. Zhang, X. Cheng, Y. Guo, X. Sun et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 12. – P. e113801
271. Zhi S-M. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling / S-M. Zhi, G-X. Fang, X-M. Xie, L-H. Liu, J. Yan et al. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 24. – № 3. – P. 1524–1536
272. Zhuang X. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors / X. Zhuang, C. Gross, L. Santarelli, V. Compan, A. C. Trillat, R. Hen // *Neuropsychopharmacology.* – 1999. – Vol. 21(2 Suppl). – P. 52–60