

На правах рукописи



Рашупкин Иван Михайлович

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

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Шевела Екатерина Яковлевна

Официальные оппоненты:

Куликов Александр Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий сектором генетических коллекций нейропатологий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Логашенко Евгения Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии Наук (ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Защита состоится 5 июня 2025 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета № 24.1.184.01 (Д 001.001.XX) в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте
<https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна

Общая характеристика работы

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 различных активированных макрофагов человека на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза нейральных 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 витальные исследования влияния различных клеток и факторов на функции НСК традиционно проводят в культурах клеточных линий нейральных 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 медико-социальных 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 секрета макрофагов с различным функциональным фенотипом на нейровоспалительные, нейрорегенераторные процессы и, в частности, нейрогенез представляется достаточно актуальным.

Цель исследования: оценить эффекты секреторных факторов различных 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 нейральных 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 нейральных 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 макрофагов человека M2 фенотипа, поляризованных через механизм эффероцитоза.

Теоретическая и практическая значимость

Сравнительный анализа влияния секреторных факторов макрофагов, дифференцированных в присутствии GM-CSF и поляризованных различными стимулами (IFN γ , 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, 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.

Объём 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 источников.

Публикации

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

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.

Материалы и методы исследования

Генерация макрофагов. В исследование были включены условно здоровые доноры (n=50) в возрасте от 18 до 70 лет обоих полов. У всех доноров было получено письменное информированное согласие. Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием (20 мин, 3000 об/мин) образцов гепаринизированной венозной крови доноров в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США). Для выделения адгезивной фракции МНК (в концентрации $4-5 \times 10^6$ /мл) культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 (БиолоТ, Россия), дополненной 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). На 5-ый день в культуры M1 и M2a макрофагов добавляли поляризующие стимулы: 200 МЕ/мл IFN- γ (Фармаклон, Россия) и 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США), соответственно (рис. 2). Через 7 сут кондиционную среду (КС) макрофагов собирали, центрифугировали, фильтровали (0,22 μ m) и далее хранили при температуре -80°C.

Культивирование клеток SH-SY5Y. Клетки SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10% FBS (Biowest, США). До использования в экспериментах клетки предварительно пассировали 2-3 раза. В качестве повреждающих факторов использовали 1) частичную депривацию сывороточных факторов (1% FBS), 2) химический индуктор гипоксии дихлорид кобальта, CoCl_2 (100 мкмоль, Sigma-Aldrich, США; моделирование гипоксии) [Muñoz-Sánchez, Cháñez-Cárdenas, 2021]. КС макрофагов добавляли в концентрации 30% (v/v) одновременно с повреждающими факторами.

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 мкКи/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 (3 или 7 сутки) 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.

Дифференцировку клеток SH-SY5Y 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 превышала 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.

Лабораторные животные. 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 (протокол № 145 от 19.04.2024). Животные на протяжении всего эксперимента имели свободный доступ к воде, содержались на стандартной диете и при нормальном световом режиме.

Формирование депрессивноподобного состояния у мышей и схема терапии растворимыми факторами M2(LS) макрофагов. Депрессивноподобное состояние у мышей было сформировано в результате повторного опыта социальных поражений в ежедневных (в течение 20 дней) агонистических взаимодействиях (метод парного дистантного сенсорного контакта) [Kudryavtseva, Avgustinovich, 1998]. Затем депрессивноподобные мыши были разделены на 2 группы. В опытной группе мышам интраназально вводили кондиционную среду M2(LS) макрофагов по 60 мкл дважды в день в течение 7 дней. Контрольной группой служили животные, которым вводили среду RPMI-1640 по аналогичной схеме.

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).

Ангедонию оценивали по индивидуальному потреблению 1% сахарозы в условиях свободного выбора с водой в течение 10 дней после курсового введения КС М2(LS).

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. 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.

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 с использованием соответствующих тест-систем (R&D Systems, Великобритания) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

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, обезжизивали 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 СА1 и СА3 зонах гиппокампа, уровень экспрессии IBA-1 – в пирамидном слое фронтальной коры, стриатуме, зубчатой извилине, гипоталамусе, СА1 и СА3 зонах гиппокампа. Для оценки нейрональной плотности измеряли процентное отношение площади, занимаемой Ниссель-позитивными клетками (нейроны), к площади всего участка интереса, выбираемого в исследуемой зоне головного мозга случайным образом. Для оценки уровня экспрессии IBA-1 применяли показатель интегральной оптической плотности (IOD) в условных единицах свечения. IOD измеряли в границах случайно выбранного участка интереса. Микрофотографии каждого среза были получены на микроскопе (Zeiss Axioslop2, Германия) и обработаны полуавтоматическим методом в программе Image Pro Plus Software (Media Cybernetics, США).

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 $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Витральные исследования включали оценку влияния кондиционных сред (КС), полученных от M1(IFN- γ), M2a(IL-4) и M2(LS) макрофагов, на пролиферацию, жизнеспособность и дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и сочетания депривации и гипоксии.

Пролиферация нейральных стволовых клеток (НСК) является важной составляющей процесса клеточной нейрорегенерации, как в нормальных условиях, так и при патологии ЦНС.

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 (рис. 1А, 1Б). Добавление КС всех исследованных типов макрофагов на 3 суток приводило к значимому усилению пролиферации, 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, $p<0,05$) (рис. 1А). Наиболее выраженный эффект на этом сроке регистрировался в присутствии КС M2a. На 7 суток (рис. 1Б) пропролиферативный эффект растворимых факторов макрофагов усиливался, что проявлялось в более чем двукратном усилении пролиферации по сравнению с условиями депривации, и был одинаково выраженным для всех типов макрофагов.

Комбинация повреждающих стимулов (депривации и гипоксии) приводила к более выраженному снижению пролиферативной активности клеток SH-SY5Y: в 1,4 раза на раннем ($p<0,05$ в сравнении с нормальными условиями, рис. 1Б) и в 4,7 раза на позднем ($p<0,01$, рис. 1Г) сроке культивирования. Стимулирующий эффект всех типов макрофагов в данном случае также проявлялся на обоих сроках наблюдения. Однако если на раннем сроке стимулирующее действие секреторных факторов анализируемых типов макрофагов было сопоставимым (рис. 1Б), то к 7-м суткам (рис. 1Г) эффект КС M2(LS) достоверно превышал эффекты M1 и M2a макрофагов ($p<0,05$).

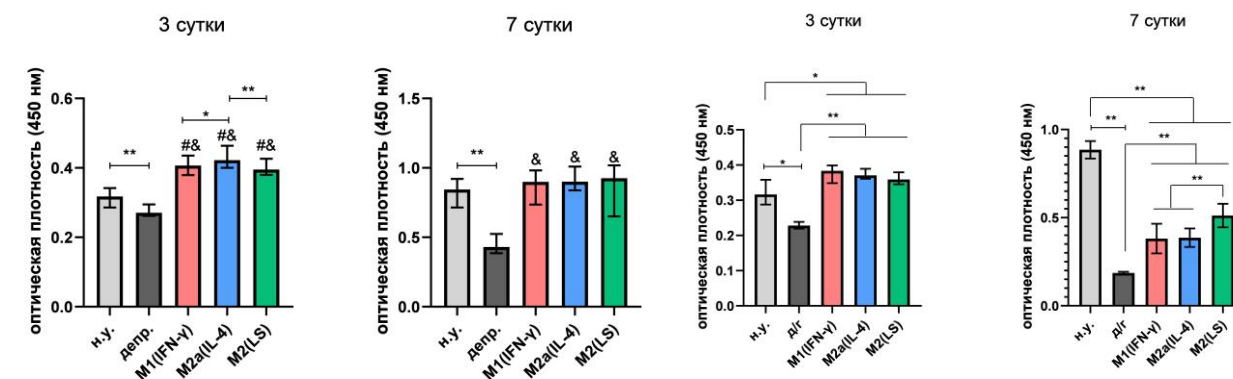


Рисунок 1 – Влияние кондиционных сред, полученных от макрофагов с различным функциональным фенотипом, на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки (А, Б) и сочетания депривации и гипоксии (В, Г). н.у. – нормальные условия; депр. – условия депривации сыворотки (1% FBS); д/г – условия депривации и гипоксии. * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$.

Поскольку усиление пролиферации клеток могло быть связано с улучшением их выживаемости, на следующем этапе работы оценили **жизнеспособность** клеток SH-SY5Y.

Депривация сыворотки не снижала жизнеспособность клеток в 3-х и 7-суточных культурах. В то же время, комбинация депривации и гипоксии приводила к выраженному повышению доли нежизнеспособных клеток: к 3-м суткам – до 25%, а к 7-м – до 57% (рис. 2).

Соответственно, в условиях депривации макрофаги ни одного из исследованных фенотипов не влияли на жизнеспособность клеток (рис. 3А, 3Б), тогда как в условиях депривации/гипоксии M2(LS) макрофаги оказывали протективный эффект, регистрируемый на 3-и и 7-е сутки ($p<0,05$; рис. 3В, 3Г).

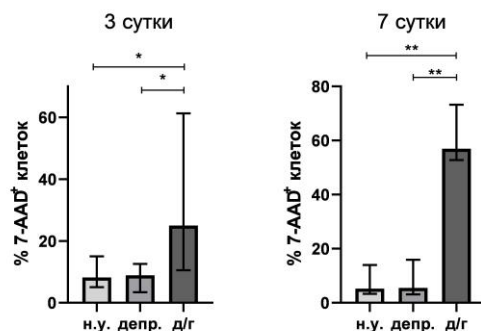


Рисунок 2 – Влияние депривации сыворотки и сочетания депривации и гипоксии на количество нежизнеспособных клеток SH-SY5Y в культуре. н.у. – нормальные условия; депр. – условия депривации сыворотки (1% FBS); д/г – условия депривации и гипоксии. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

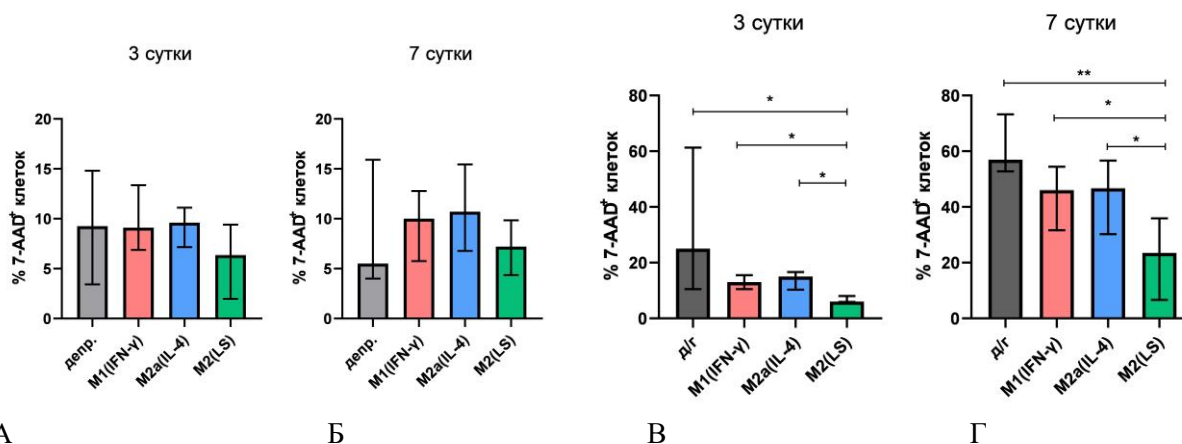


Рисунок 3 – Влияние кондиционных сред, полученных от макрофагов с различным функциональным фенотипом, на жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки (А, Б) и сочетания депривации и гипоксии (В, Г). Данные представлены в виде доли нежизнеспособных клеток (7-AAD⁺) от общего числа клеток. н.у. – нормальные условия; депр. – условия депривации сыворотки (1% FBS); д/г – условия депривации и гипоксии. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Поскольку в процессе нейрорегенерации 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, на следующем этапе работы было изучено влияние секрета различных макрофагов на **дифференцировку** НСК-подобных клеток, которую оценивали по двум ключевым морфологическим критериям: 1) доле дифференцированных клеток (то есть клеток с нейритом, длина которого превышает длину тела клетки) в культуре и 2) средней длине нейрита. В качестве позитивного контроля дифференцировки была использована ретиноевая кислота, являющаяся стандартным индуктором дифференцировки клеток SH-SY5Y. В присутствии ретиноевой кислоты доля дифференцированных клеток и средняя длина нейрита на обоих сроках культивирования были значимо выше, чем в контроле.

В стандартных условиях культивирования (10% FBS) клетки SH-SY5Y активно пролиферируют, при этом для них характерен низкий уровень спонтанной дифференцировки, не превышающий 10% (рис. 4А). В процессе дифференцировки клетки не образуют кластеры, их тела вытягиваются, нейриты

существенно удлиняются, а на поздних этапах дифференцировки формируют синаптоподобные соединения между собой (рис. 4B, 4C).

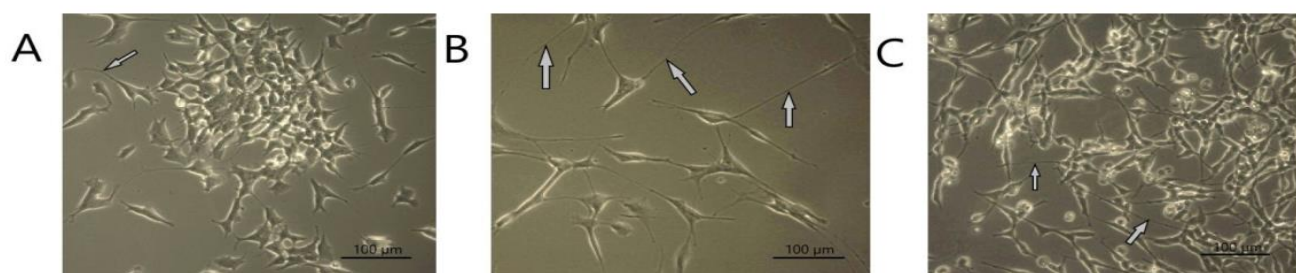


Рисунок 4 – Морфологическая характеристика intactных и дифференцированных клеток SH-SY5Y. А – intactные клетки (культивируемые в нормальных условиях), В – клетки, дифференцированные ретиноевой кислотой, С – клетки, культивируемые в условиях депривации сыворотки (1% FBS) в присутствии 30% (V/V) кондиционной среды M2(LS) макрофагов. Стрелки указывают на нейриты, длина которых превышает длину тела клетки. 7 сутки.

Депривация сыворотки приводила к некоторому угнетению дифференцировки, что проявлялось в снижении средней длины нейрита на 3 сутки (табл. 1). Исследование эффекта KC различных макрофагов на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки показало, что наиболее выраженным продифференцировочным эффектом обладали M2(LS) (табл. 1). Культивирование нейральных предшественников с растворимыми факторами этих макрофагов сопровождалось достоверным увеличением доли дифференцированных клеток и средней длины нейритов как в 3-х, так и 7-суточных культурах. Стимулирующий эффект M1 и M2a был слабо выражен и проявлялся только в 3-суточных культурах в отношении длины нейритов.

Таблица 1 – Влияние кондиционных сред макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях 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 интерквартильного диапазона (Me [IQR, 25-75% квантили]). Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Сочетание депривации с гипоксией приводило к выраженному угнетению дифференцировки, о чем свидетельствовало резкое снижение количества дифференцированных клеток на 3 сутки и их полное отсутствие на 7 сутки, а также снижение средней длины нейрита на обоих сроках культивирования. Возрастание доли дифференцированных клеток на 3 и 7 сутки в условиях сочетанного действия повреждающих факторов наблюдалось в присутствии KC всех типов макрофагов, однако продифференцировочный эффект KC M2(LS) был достоверно выше, чем M1 и M2a макрофагов ($p < 0,05$).

Все три типа КС также стимулировали рост нейритов, при этом наибольшей стимулирующей активностью в 7-дневных культурах обладали М2(LS) (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние кондиционных сред макрофагов с различным функциональным фенотипом на дифференцировку клеток SH-SY5Y в условиях, сочетающих депривацию сыворотки и химическую гипоксию

Сутки	Параметр	Депривация/ гипоксия	РА	КС-М1	КС-М2а	КС-М2(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. РА – ретиноевая кислота, КС – кондиционная среда. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me [IQR, 25-75% квантили]). Представлены результаты трех независимых экспериментов.

Суммируя полученные на данном этапе результаты, можно заключить, что наибольшую нейропротективную и нейрорегенераторную активность *in vitro* проявляли кондиционные среды М2(LS) макрофагов. В связи с вышесказанным, секреторный продукт М2(LS) макрофагов был выбран нами для дальнейших исследований *in vivo* в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей. В данной модели исследовали влияние интраназального введения кондиционных сред М2(LS) на 1) поведенческий паттерн, 2) выраженность воспалительной реакции и 3) нейрональную плотность в головном мозге депрессивноподобных мышей.

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 (оценка ангедонии). После семидневного курса интраназальной терапии КС М2(LS) депрессивноподобные мыши имели более высокие показатели исследовательской и двигательной активности в тесте "Открытое поле" в сравнении с депрессивноподобными мышами контрольной группы, получавшими интраназально питательную среду RPMI-1640. 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) (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние КС М2(LS) на поведение депрессивноподобных мышей 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 ± 0,68 **	0	0,29 ± 0,20	2,14 ± 0,27 **

Примечание: Здесь и далее: контроль – группа депрессивноподобных мышей после введения среды RPMI-1640; опыт – группа депрессивноподобных мышей после введения КС М2(LS). Данные представлены в виде $M \pm SE$. ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

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 ($p < 0,05$, *рис. 5*). Кроме того, время полной неподвижности в воде у мышей опытной группы было значимо ниже ($p < 0,05$).

Одним из основных симптомов депрессии является ангедония. Анализ потребления сахарозы (который использовался в качестве гедонического стимула) показал, что уже спустя сутки после курса терапии КС M2(LS) мыши потребляли больше раствора сахарозы в сравнении с контрольной группой, животные которой предпочитали воду в условиях свободного выбора с сахарозой. Выявленные различия сохранялись в течение 9 дней наблюдения (*рис. 6*).

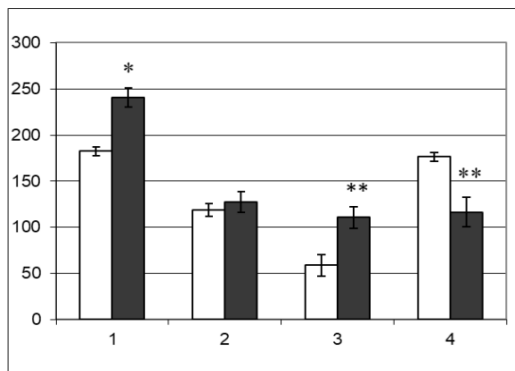


Рисунок 5 – Влияние курса интраназального введения КС M2(LS) на поведение депрессивноподобных мышей в тесте принудительного плавания по Порсолту. Данные представлены в виде $M \pm SE$. По оси ординат – период (сек). 1 – общая активность, 2 – высокая активность, 3 – умеренная активность, 4 – неподвижность. Темные столбики – опыт. Светлые столбики – контроль. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем. $N=10$.

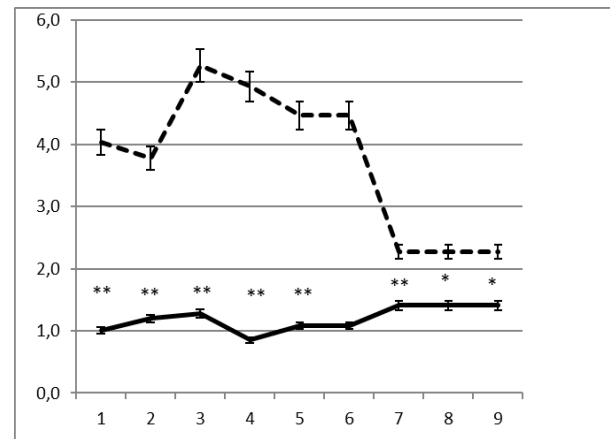


Рисунок 6 – Потребление 1% раствора сахарозы депрессивноподобными мышами. Пунктирная линия – опытная группа (после курса терапии растворимыми факторами M2(LS)), сплошная линия – контрольная группа. По оси ординат – количество потребляемой жидкости (мл/мышь). По оси абсцисс – дни тестирования. Данные представлены в виде $M \pm SE$. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Таким образом, интраназальное введение растворимых факторов M2(LS) макрофагов способствовало коррекции депрессивноподобного поведения у мышей.

Чтобы выяснить, связана ли коррекция поведенческого паттерна депрессивноподобных мышей с противовоспалительным эффектом КС M2(LS) макрофагов, исследовали содержание ключевых **провоспалительных цитокинов**, вовлечённых в патогенез депрессии, а именно IL-1 β , TNF- α , IL-6, и IFN- γ , в лизатах отдельных структур головного мозга. В группе животных, получавших терапию КС M2(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 ($p < 0,05$) (*табл. 4*).

Таблица 4 – Влияние курса интраназального введения КС М2(LS) на уровень цитокинов в структурах головного мозга депрессивноподобных мышей

Структуры мозга	Группы	Цитокины (пг/мл)			
		IL-1 β	TNF- α	IL-6	IFN- γ
Гиппокамп	Контроль	196,8 \pm 5,7	265,5 \pm 7,8	60,9 \pm 12,9	9,4 \pm 0,2
	Опыт	207,3 \pm 9,4	275,3 \pm 12,6	43,7 \pm 11,7	8,6 \pm 0,2 *
Стриатум	Контроль	124,9 \pm 1,4	156,3 \pm 3,9	32,9 \pm 2,9	4,2 \pm 0,2
	Опыт	60,8 \pm 4,3 **	113,9 \pm 7,1 **	14,3 \pm 1,0 **	2,8 \pm 0,3 *
Фронтальная кора	Контроль	164,2 \pm 4,3	240,7 \pm 3,6	23,3 \pm 1,8	4,7 \pm 0,2
	Опыт	115,6 \pm 4,6 **	168,5 \pm 6,3 **	18,4 \pm 1,1 *	5,5 \pm 0,7

Примечание: Данные представлены в виде М \pm SE. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем (U критерий Манна-Уитни). N=6.

Наряду с оценкой уровня цитокинов, нами была проанализирована экспрессия маркера активации макрофагов/микроглии **IBA-1**, отражающая интенсивность нейровоспаления. Индукция депрессивноподобного состояния ассоциировалась с повышенным уровнем экспрессии этого маркера в CA1 и CA3 зонах гиппокампа (рис. 7). В группе животных, получивших интраназальное введение растворимых факторов М2(LS) уровень IBA-1 в этих зонах был ниже: в CA3 зоне статистически достоверно, в CA1 зоне – на уровне тренда (рис. 7, 8).

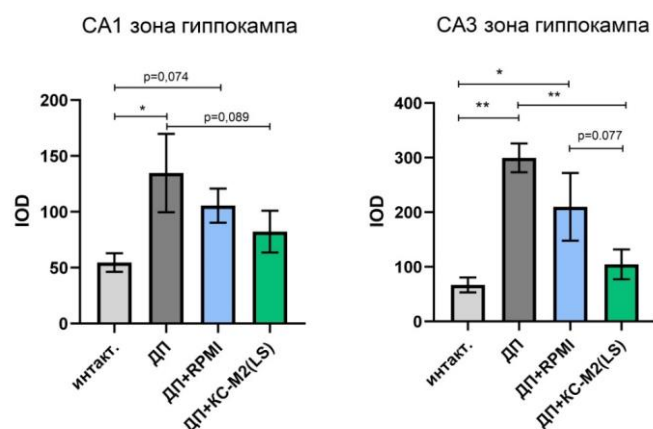


Рисунок 7 – Уровень экспрессии IBA-1 в различных зонах головного мозга мышей. IOD – интегральная оптическая плотность; интакт. – интактные животные; ДП – животные с депрессивноподобным поведением (контроль модели), ДП+RPMI – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), ДП+КС-М2(LS) – интраназальное введение КС М2(LS) (опытная группа). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me [IQR, 25-75% квантили]).

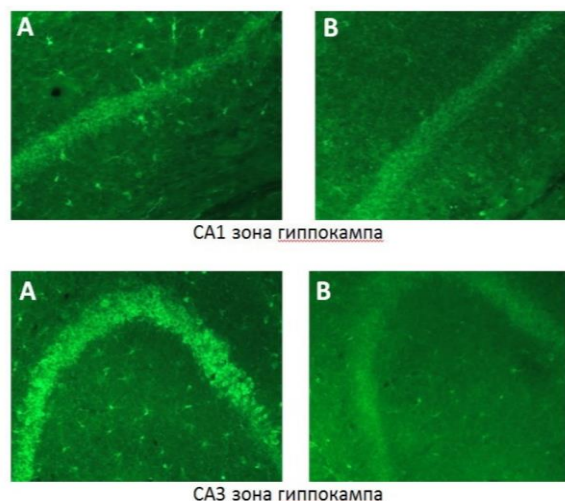


Рисунок 8 – Экспрессия IBA-1 в различных зонах головного мозга мышей. А – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), В – интраназальное введение КС М2(LS) (опытная группа). Представлены репрезентативные микрофотографии.

Таким образом, антидепрессивный эффект растворимых факторов М2(LS) макрофагов сопровождался снижением интенсивности воспаления и активации микроглии в патогенетически значимых структурах головного мозга.

Целью заключительного этапа работы стало изучение влияния М2(LS) на

нейрональную плотность во фронтальной коре и CA1 и CA3 зонах гиппокампа депрессивноподобных мышей. Нейрональная плотность отражает количество нейронов в разных зонах головного мозга и является интегральным показателем, характеризующим как интенсивность нейрогенеза, так и выраженность нейродегенеративных изменений. Из данных *рис. 9* видно, что формирование депрессивноподобного состояния сопровождалось статистически значимым снижением нейрональной плотности во фронтальной коре и гиппокампе. В группе животных с интраназальным введением растворимых факторов M2(LS) макрофагов нейрональная плотность во всех исследованных зонах была достоверно выше, чем у животных контрольной группы (контроль модели) и группы с введением RPMI-1640 (контроль лечения).

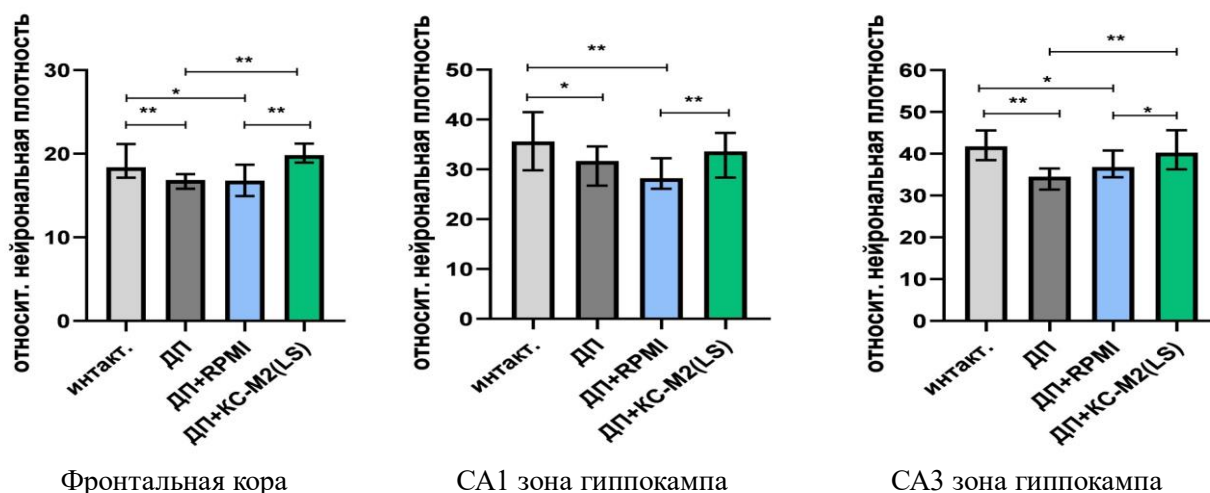


Рисунок 9 – Нейрональная плотность в пирамидном слое фронтальной коры, CA1 и CA3 зонах гиппокампа мышей. Интакт. – интактная группа животных, ДП – животные с депрессивноподобным поведением (контроль модели), ДП+RPMI – интраназальное введение среды RPMI-1640 (контроль терапии), ДП+КС-M2(LS) – интраназальное введение КС M2(LS) (опытная группа). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me [IQR, 25-75% квантили]).

Закключение

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), поляризованных 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 IFN γ (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(IFN γ) 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(IFN γ) 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 про-дифференцировочный эффект макрофагов, поляризованных эффероцитозом [M2(LS)], превышает эффекты M1(IFN γ) 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Ращупкин И.М. Влияние растворимых факторов макрофагов M2-фенотипа на пролиферацию и апоптоз клеток SH-SY5Y / И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Л.В. Сахно, А.А. Останин, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171. – № 1. – С 59-63. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-1-59-63
2. Маркова Е.В. Влияние растворимых факторов макрофагов M2-фенотипа на поведенческий паттерн и продукцию цитокинов в головном мозге депрессивноподобных мышей // Е.В. Маркова, Е.Я. Шевела, М.А.Княжева, И.В. Савкин, Е.В. Серенко, И.М. Ращупкин, Т.Г. Амстиславская, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172. – № 9. – С. 334-338. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-9-334-338
3. Ращупкин И.М. Влияние растворимых факторов макрофагов M2-фенотипа на дифференцировку клеток линии SH-SY5Y / И.М. Ращупкин, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23. – № 4. – С. 677-684. DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2276
4. Ращупкин И.М. Влияние растворимых факторов макрофагов, поляризованных эффероцитозом, на нейрональную плотность во фронтальной коре и гиппокампе мышей в модели стресс-индуцированной депрессии / И.М. Ращупкин, Т.Г. Амстиславская, Е.В. Маркова, А.А. Останин, Е.Я. Шевела // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25. – № 3. – С. 521-526. DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2731
5. Rashchupkin I.M. Effect of Differently Polarized Human Macrophages on the SH-SY5Y Cells Damaged by Ischemia and Hypoxia In Vitro. / I.M. Rashchupkin, E.Y. Shevela, A.A. Maksimova, M.A. Tikhonova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Journal of immunology research. – 2023. – e5595949. DOI: 10.1155/2023/5595949

Тезисы материалов конференций

1. Ращупкин И.М. Растворимые факторы макрофагов человека стимулируют пролиферативную активность клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих ишемию in vitro / И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Е.Я. Шевела // Гены и клетки. Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине. – 2022. – Т. 17. – № 3. – С. 196-197
2. Ращупкин И.М. Влияние растворимых факторов макрофагов человека на пролиферацию клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих ишемию и гипоксию in vitro / И.М. Ращупкин, А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных // Патогенез. – 2022. – Т. 20. – № 3. – С. 115-116. DOI: 10.25557/2310-0435.2022.03.115-116

Список сокращений

7-AAD – 7-аминоактиномицин D
ИФА – иммуноферментный анализ
КС – кондиционная среда
МНК – мононуклеарные клетки
НСК – нейральные стволовые клетки
ЦНС – центральная нервная система
BDNF – нейротрофический фактор мозга
ЕРО – эритропоэтин
FBS – фетальная бычья сыворотка
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IBA-1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1
IFN- γ – интерферон-гамма
IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1
IL – интерлейкин
IOD – интегральная оптическая плотность
IQR – интерквартильный диапазон
LS – low serum (дефицит сывороточных факторов)
PBS – фосфатно-солевой буфер
TNF- α – фактор некроза опухоли альфа
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов