

Влияние растворимых факторов макрофагов человека на пролиферацию клеток SH-SY5Y в условиях, моделирующих ишемию и гипоксию *in vitro*

Ращупкин И.М., Максимова А.А., Шевела Е.Я., Черных Е.Р.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».
630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14

Influence of soluble factors of human macrophages on proliferation of SH-SY5Y cells under conditions simulating ischemia and hypoxia in vitro

Rashchupkin I.M., Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Yadrinctsvskaya street 14, Novosibirsk 630099, Russian Federation

Способность центральной нервной системы взрослого человека к нейрорегенерации подтверждается рядом клинических и экспериментальных данных и в настоящее время не вызывает сомнений [1]. Одним из важных компонентов нейрорегенерации является образование новых нейронов из нейральных стволовых клеток (НСК), т.е. нейрогенез. Данный процесс требует активации НСК и пролиферации нейральных предшественников. Клетки микроглии и рекрутируемые макрофаги костномозгового происхождения играют ключевую роль в регуляции функций НСК, причём значение последних возрастает при нейропатологии. Известно, что макрофагам свойственна гетерогенность и пластичность, они способны изменять свой функциональный фенотип в зависимости от сигналов микроокружения. Оппортивными состояниями активации являются макрофаги с M1 (классические активированные) и M2 (альтернативно активированные) фенотипом, среди которых M1 обладают провоспалительными свойствами и способствуют деструкции ткани, в то время как M2 участвуют в разрешении воспаления и стимуляции репаративных процессов [2]. Одним из факторов, способствующих поляризации макрофагов в сторону M2-фенотипа, является поглощение ими апоптотического материала (эффероцитоз). Учитывая, что, кроме того, эффероцитоз является важным этапом регенерации ткани, ранее нами был разработан оригинальный протокол генерации M2-подобных макрофагов, основанный на взаимодействии с апоптотическими клетками. Полученные таким способом M2 (LS, Low Serum) макрофаги характеризовались низким уровнем продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- α и др) и высоким – ростовых и нейротрофических факторов (IGF-1, VEGF и др) [3]. Это позволило сделать предположение о возможном нейропротективном/репаративном

потенциале M2(LS), в том числе их способности влиять на нейрогенез. Для проверки этого предположения планировалось исследовать влияние M2(LS) в сравнении с эффектами M1 (IFN- γ) и M2a(IL-4) на пролиферацию нейральных предшественников, в качестве которых использовались клетки линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Указанные клетки обладают свойствами НСК, т.е. экспрессируют НСК-специфические маркеры (нестин, даблкортин), активно пролиферируют, склонны к кластерообразованию и способны к дифференцировке в нейроны [4]. Учитывая, что при патологии ЦНС ткани головного мозга подвержены ишемии и гипоксии, планировалось также исследовать влияние различных функциональных фенотипов макрофагов на пролиферацию нейральных предшественников в условиях, моделирующих *in vitro* ишемию и гипоксию.

Цель работы – сравнительная оценка влияния растворимых факторов M2(LS) в сопоставлении с M1 (IFN- γ) и M2a(IL-4) на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y, культивируемых в условиях нормоксии и ишемии/гипоксии.

Материалы и методы. Макрофаги генерировали из прилипающей фракции моноклеарных клеток периферической крови доноров в присутствии 50 нг/мл GM-CSF в течение 7 суток, добавляя 200 МЕ/мл IFN- γ и 20 нг/мл IL-4 на 5 сутки соответственно для M1 и M2a; M2(LS) генерировали в условиях дефицита сывороточных факторов (2% аутоплазмы вместо 10% FBS для M1 и M2a). Кондиционную среду (КС) культур макрофагов собирали, центрифугировали и далее использовали в концентрации 30% (V/v). Клетки SH-SY5Y культивировали в 96-луночном планшете исходно по $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в течение 3 и 7 суток. Условия ишемии моделировали посредством депривации сывороточных факторов (снижение концентрации FBS

с 10 до 1%), гипоксии - добавлением 100 мкмоль хлорида кобальта (II), являющегося стабилизатором HIF (hypoxia-inducible factor). Пролиферацию клеток SH-SY5Y оценивали с помощью WST-теста.

Результаты. При нормальных условиях культивирования (нормоксия/отсутствие депривации) КС исследуемых типов макрофагов усиливала пролиферацию клеток SH-SY5Y как на 3-и, так и на 7-е сутки, с одинаковым эффектом для M2(LS), M1(IFN- γ) и M2a (IL-4). По сравнению с нормальными условиями культивирования в условиях ишемии/гипоксии пролиферация клеток SH-SY5Y на 3-и сутки снижалась в 1,4 ($p < 0,05$), а на 7-е сутки – в 4,8 раза ($p < 0,01$), то есть клетки практически переставали пролиферировать. Добавление КС макрофагов приводило к значимому повышению пролиферативной активности клеток, культивируемых в условиях ишемии/гипоксии, как на раннем (3-и сутки), так и на позднем (7-е сутки) этапе. При этом эффект КС всех исследуемых типов макрофагов на 3-и сутки оказался сопоставимым. Уровень пролиферации возрастал в 1,60–1,65 раза ($p < 0,05$), и количество НСК в этом случае было выше, чем при культивировании в нормальных условиях. На 7-е сутки растворимые факторы Мф также повышали пролиферацию клеток SH-SY5Y, культивируемых в условиях ишемии/гипоксии ($p < 0,05$). При этом КС M2(LS) обладала более выраженным эффектом, усиливая пролиферацию в 2,8 раза, в то время как КС M1 и КС M2a повышала уровень пролиферации в 2,05 и 2,08 раза, соответственно ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, растворимые факторы макрофагов как с M1, так и с M2 фенотипом, повыша-

ют пролиферативную активность НСК линии SH-SY5Y. При этом если в условиях нормоксии различно активированные макрофаги обладают сходным стимулирующим эффектом на рост НСК, то в условиях ишемии/гипоксии стимулирующее влияние M2 макрофагов, поляризованных взаимодействием с апоптотическими клетками, превышает эффект классически активированных M1 и альтернативно-активированных M2a макрофагов. Полученные данные позволяют предположить, что различия в нейрорепаративных свойствах поляризованных макрофагов в наибольшей степени проявляются в условиях патологии и позволяют рассматривать M2(LS) в качестве макрофагов с наиболее выраженным стимулирующим действием на нейрогенез.

Список литературы

1. Xu X., Warrington A.E., Bieber A.J., Rodrigues M. Enhancing CNS repair in neurological disease: challenges arising from neurodegeneration and rewiring of the network. *CNS Drugs*. 2011; 25(7): 555–573. DOI: 10.2165/11587830-000000000-00000
2. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233(9): 6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429
3. Chernykh E., Shevela E., Sakhno L., Tikhonova M., Petrovsky Y., Ostanin A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cellular Therapy and Transplantation*. 2010; 2(6): 1–8.
4. Ferlemann F.C., Menon V., Condurat A.L., Rossler J., Pruszk J. Surface marker profiling of SH-SY5Y cells enables small molecule screens identifying BMP4 as a modulator of neuroblastoma differentiation. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 13612. DOI: 10.1038/s41598-017-13497-8