

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
проф. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2023 р.

**СКРИНІНГ ТА ВАЛІДАЦІЯ ДАНИХ СЕКВЕНУВАННЯ РНК
ОДИНОЧНИХ КЛІТИН ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАРКЕРІВ
ПРОТИЗАПАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ У ЛИЧИНКАХ *DANIO RERIO***

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Скакун Тетяни Вадимівни

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
професор **Дзядевич Сергій Вікторович**

Робота виконана у Becker Lab
Центру регенеративної терапії ТУ Дрезден
(Center for Regenerative Therapies TU Dresden, CRTD)
під керівництвом **Alberto Docampo-Seara, PhD**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Скакун Т.В. Скринінг та валідація даних секвенування РНК одиночних клітин для ідентифікації маркерів протизапальних макрофагів у личинках *Danio rerio*. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі досліджено 8 потенційних маркерів протизапальних макрофагів личинок *Danio rerio*, досліджено їх профіль експресії в базі даних секвенування РНК одиночних клітин, та проведено валідацію цих потенційних маркерів за допомогою РНК-флуоресцентної *in situ* гібридизації 24 години після трансекції спинного мозку. Було підтверджено профілі експресії 6 потенційних маркерів в різних типах клітин, та з них отримано 2 прийнятних потенційних маркери протизапальних макрофагів.

Також було проведено дослідження наявності впливу інкубації личинок з метиленовим синім протягом 24 годин після трансекції спинного мозку, на запальне середовище ділянки ураження. Було отримано підтвердження наявності впливу метиленового синього на середовище ділянки ураження шляхом підвищення протизапальних властивостей середовища.

Отримані результати можуть бути використані для майбутнього дослідження ролі протизапальних макрофагів в процесі регенерації спинного мозку.

Ключові слова: макрофаги; поляризація макрофагів; регенерація; спинний мозок; *Danio rerio*.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CXCR4a - (*англ.* C-X-C motif chemokine receptor, type 4 alpha) рецептор хемокінового мотиву C-X-C, тип 4 альфа

CXCR4b - (*англ.* C-X-C motif chemokine receptor, type 4 beta) рецептор хемокінового мотиву C-X-C, тип 4 бета

GFP - (*англ.* green fluorescent protein) зелений флуоресцентний білок

HCRTM RNA-FISH - (*англ.* hybridization chain reaction, RNA-fluorescent *in situ* hybridisation) ланцюгова реакція гібридизації, РНК-флуоресцентна *in situ* гібридизація

mpeg1 - (*англ.* macrophage expressed gene 1) експресований макрофагами ген 1

MRC1a - (*англ.* mannose receptor, C type 1 alpha) рецептор манози, C тип 1 альфа

pdgfrb - (*англ.* platelet-derived growth factor receptor, beta) рецептор тромбоцитарного фактора росту, бета

SOCS1a - (*англ.* suppressor of cytokine signaling, type 1 alpha) супресор сигналізації цитокінів, тип 1 альфа

TGFb1a - (*англ.* transforming growth factor, beta 1a) трансформуючий фактор росту, бета 1a

TGFb3 - (*англ.* transforming growth factor, beta 3) трансформуючий фактор росту, бета 3

TIMP2b - (*англ.* tissue inhibitor of metalloproteinases, type 2 beta) тканинний інгібітор металопротеїназ, тип 2 бета

ЕРГ - епендимо-радіальна глія

ПНС - периферична нервова система

ЦНС - центральна нервова система

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. РЕГЕНЕРАЦІЯ СПИННОГО МОЗКУ	6
1.1 Регенерація спинного мозку у ссавців та ананій.....	6
1.2 <i>Danio rerio</i> як модель для вивчення регенерації спинного мозку.....	7
1.3 Роль імунної системи у регенерації спинного мозку.....	8
1.4 Поляризація макрофагів та її вплив на регенерацію.....	10
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	13
2.1 Тварини.....	13
2.2 Трансекція спинного мозку.....	13
2.3 Секвенування РНК одиночних клітин.....	13
2.4 <i>In situ</i> гібридизація.....	14
2.5 Отримання та обробка зображень.....	15
2.6 Кількісний та статистичний аналіз.....	15
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	16
3.1 Огляд літератури для відбору маркерів M2 поляризації	16
3.2 Обрані для валідації потенційні маркери M2 поляризації.....	17
3.3 Вплив метиленового синього на запальне середовище.....	32
ВИСНОВКИ.....	34
ПОДЯКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ.....	43

ВСТУП

Ссавці, включаючи людину, не мають здатності відновлювати пошкодження центральної нервової системи, головного і спинного мозку. *Danio rerio* за останні 30 років стала відмінною моделлю для вивчення успішної регенерації спинного мозку. Після травми спинного мозку макрофаги мобілізуються до місця пошкодження і зазнають значних фенотипічних, морфологічних і функціональних змін, які дозволяють їм відігравати критично важливу роль у процесі відновлення. Найчастіше вивчають M1 (прозапальний) та M2 (протизапальний, прорепаративний) поляризаційні стани макрофагів. Загальні M1 і M2 стани та секреція характерних для них цитокінів суттєво впливають на регенеративний результат. У той час як цитокіни та функції M1 макрофагів здебільшого ідентифіковані, цитокіни та функції M2 макрофагів все ще залишаються спірними як у ссавців, так і у риб, і потребують подальшого вивчення. Виявлення та опис специфічних M2-маркерів поляризаційного стану макрофагів є ключовим для розуміння регенерації спинного мозку і потенційно відкриває шлях до нових підходів у регенеративній терапії. Тому метою цієї роботи був скринінг та валідація потенційних M2-маркерів макрофагів у личинок *Danio rerio* після трансекції спинного мозку.

Відповідно до поставленої мети, основними завданнями роботи є:

1. Скринінг потенційних M2-маркерів макрофагів за літературою та базою даних секвенування РНК одиночних клітин (scRNA-секвенування).
2. Валідація потенційних M2-маркерів після травми спинного мозку за допомогою методу флуоресцентної *in situ* гібридизації, ланцюгової реакції гібридизації (HCR™ RNA-FISH).

РОЗДІЛ 1. РЕГЕНЕРАЦІЯ СПИННОГО МОЗКУ

1.1 Регенерація спинного мозку у ссавців та ананій

У ссавців травма спинного мозку спричиняє неврологічні порушення, такі як демієлінізація та аксональний колапс, загибель клітин, запалення та інші патологічні дефекти нижче рівня ураження [1]. Вторинні події, пов'язані з травмою, що характеризуються проапоптичною сигналізацією, ішемією та інфільтрацією периферичних запальних клітин, можуть посилити неврологічні порушення, які зазвичай спричинені перериванням висхідних та низхідних аксональних шляхів, викликаних пошкодженням. Більшість нейронів центральної нервової системи (ЦНС) ссавців не мають здатності до регенерації пошкоджених аксонів на вродженому рівні [2]. Втрата аксональних зв'язків та пошкодження тканин призводить до значної загибелі локальних нейронів. Щоб відновити ці різноманітні форми пошкодження, різні типи клітин повинні відреагувати на травму; нейрони, що вижили, повинні почати повторний ріст аксонів, а місцеві прогеніторні клітини повинні реактивувати нейрогенні програми для генерації нових нейронів (регенеративний нейрогенез), щоб заповнити прогалину і відновити зв'язки, що існували раніше [3].

Аксони ЦНС дорослих ссавців не відновлюються самостійно після травми спинного мозку. Фактори, що перешкоджають ефективній регенерації, можуть бути зовнішніми або внутрішніми по відношенню до аксона або нейрона [4,5]. Зовнішні механізми включають відносну велику кількість інгібуючих ріст молекул, що експресуються в середовищі пошкодження, та/або дефіцит молекул, що стимулюють ріст. Молекули, які експресуються всередині нейрона і перешкоджають або заважають регенерації, відомі як внутрішні механізми і характеризуються низьким рівнем синтезу білка і нездатністю транспортувати важливі білки в аксони [5]. Однак, на відміну від ЦНС дорослих ссавців, аксони ембріональних

нейронів, аксони периферичної нервової системи (ПНС) та аксони деяких видів ананій відрастають після розриву. Зокрема, *Danio rerio* здатні до відновлення аксонів і повторного запуску нейрогенезу з прогеніторних клітин після травми спинного мозку [5,6,7].

1.2 *Danio rerio* як модель для вивчення регенерації спинного мозку

Danio rerio дають нам можливість досліджувати окремі механізми, що лежать в основі успішної та невдалої аксональної регенерації. Для проведення функціональних досліджень були розроблені численні молекулярні методи, такі як мікрочипи, секвенування наступного покоління, трансгенез і морфоліно. Завдяки цьому можна використовувати різноманітні підходи для підтвердження ступеня участі певних молекул та/або шляхів у регенерації аксонів. Крім того, дослідження регенерації аксонів *in vivo* із застосуванням двофотонної мікроскопії, лазерної абляції та візуалізації Ca^{2+} стають можливими завдяки прозорості ембріонів, личинок і дорослих особин лінії Casper [5]. Крім того, *Danio rerio* є чудовою тваринною моделлю для вивчення ранніх етапів життя в біомедичних дослідженнях. Запліднені яйця перетворюються на личинок, які самостійно харчуються незалежно від матері, без батьківської опіки, і можуть легко підтримуватися в різноманітних експериментальних і фармакологічних умовах [8]. Таким чином, *Danio rerio*, рибка довжиною 2,5-4 см, стала популярною новою моделлю для досліджень регенерації ЦНС [3].

Danio rerio, дорослі особини та личинки, демонструють значне функціональне та аксональне відновлення навіть після повної трансекції спинного мозку. Важливо, що регенерація аксонів відбувається швидко і видима в реальному часі у личинок. Після травми спинного мозку, через 3 дні після запліднення личинки страждають від скроневого паралічу. Аналіз плавальної поведінки за допомогою плавання, викликаного дотиком, показує,

що через 2 дні після пошкодження личинки вже функціонально відновилися після травми. Цей факт корелює з безперервним відростанням аксонів на місці пошкодження (аксональним містком). Було показано, що до 80% личинок дикого типу демонструють утворення аксонального містка на 2 день після трансекції. Наявність аксонального містка корелює з функціональним відновленням, оскільки тварини без містка демонстрували гірше відновлення дистанції плавання, викликаної дотиком, а повторне подразнення призводило до повної втрати функціонального відновлення. Таким чином, відсоток личинок з відновленими пошкодженими ділянками дає точну оцінку регенерації у *Danio rerio* [9].

Danio rerio демонструють вроджену імунну систему ще на стадії личинки, яка також розвивається в адаптивну імунну систему на ювенільних стадіях, подібно до імунної системи ссавців [9,10]. Попередні дослідження також показали, що імунна система відіграє ключову роль у регенерації у цих рибок, причому не тільки в регенерації спинного мозку [3, 9], але й в інших органах або частинах тіла, які також можуть регенерувати, наприклад, серце [11] або плавці [12]. Розуміння специфічних ролей, які відіграють різні імунні складові в процесі регенерації, є одним з перших завдань при інтеграції імунної системи в стратегії регенеративної терапії [13].

1.3 Роль імунної системи у регенерації спинного мозку

Імунна система має вирішальне значення для регенерації та відновлення нейронів. Фактично, реакція імунної системи на травму ЦНС відіграє ключову роль у визначенні швидкості та характеру загоєння і відновлення нейрональних функцій. Минулі дослідження показали, що імунна відповідь безпосередньо відповідає регенерації нейронів, і що активність імунної системи фактично необхідна для регенерації аксонів у ділянці спинного мозку і сприяє цьому процесу. Різні типи клітин, такі як

клітини вродженої імунної системи: нейтрофіли, макрофаги і мікроглія, вторгаються і накопичуються в місці ураження майже відразу після травми. На личинках *Danio rerio* було показано, що через 2 години після травми кількість нейтрофілів досягає піку, а макрофаги і мікроглія проникають через кілька годин, і їхня кількість досягає піку через 2 дні після травми. Однак роль, яку різні типи імунних клітин, що вторгаються в місце пошкодження, відіграють в успіху регенерації, залежить від типу клітини [9].

У личинок *Danio rerio* імунна відповідь є двофазною з прозапальною фазою, під час якої рівні експресії прозапальних цитокінів, таких як $\text{IL-1}\beta$, досягають піку приблизно на 12 годині після трансекції, за якою слідує протизапальна фаза, коли рівні експресії протизапальних цитокінів підвищуються протягом 48 годин після пошкодження, іншими словами - на пізній стадії регенерації. Показано, що на ранніх стадіях регенерації прозапальний $\text{IL-1}\beta$, який переважно продукується нейтрофілами, активно сприяє регенерації аксонів. Однак, починаючи приблизно з 12 години після трансекції і далі, макрофаги відіграють ключову роль і починають виробляти протизапальні цитокіни. Було показано, що периферичні макрофаги інгібують і регулюють $\text{IL-1}\beta$ -опосередковане запалення на пізніх стадіях, що, в свою чергу, сприяє функціональній регенерації спинного мозку. Периферичні макрофаги виробляють $\text{Tnf-}\alpha$, який зменшує кількість нейтрофілів і, відповідно, активність $\text{IL-1}\beta$, сприяючи регенерації на пізніх стадіях [9].

Імунна система також відіграє важливу роль у запуску процесу регенеративного нейрогенезу після травми спинного мозку. Показано, що регенеративний нейрогенез у спинному мозку безпосередньо регулюється імунною відповіддю на рівні експресії генів і проліферації специфічної для *Danio rerio* епендимо-радіальної глії (ЕРГ), прогеніторних клітин, і що існує прямий зв'язок між прорегенеративними макрофагами і прогеніторними клітинами через $\text{TNF-}\alpha$, який сприяє викликаному ушкодженням нейрогенезу. Повідомлялося, що ці прорегенеративні макрофаги, активовані

пошкодженням, мають як про-, так і протизапальні властивості, і що TNF- α , який зазвичай відносять до фенотипу прозапальних макрофагів, бере участь у прорегенеративних процесах, підвищуючи регуляцію критично важливих для нейрогенезу генів в ЕРГ і знижуючи експресію прозапальних цитокінів у нейтрофілах та інших клітинах [3]. Розуміння клітинної та генетичної динаміки та основних молекулярних подій, які відбуваються в макрофагах у про- та протизапальній фазах, дозволить поглибити наші знання про імунну відповідь після травми спинного мозку.

1.4 Поляризація макрофагів та її вплив на регенерацію

Макрофаги - це гетерогенні клітини, які диференціюються з циркулюючих моноцитів і мають широкий спектр функціональної гнучкості. Вони зазнають значних фенотипічних, морфологічних і функціональних змін після пошкодження тканин, що дозволяє їм відігравати вирішальну роль в ініціалізації, підтримці та вирішенні стадій процесу відновлення [14]. Здатність макрофагів змінювати свій фенотип може мати дуже різноманітні, навіть протилежні ефекти у відповідь на зовнішні стимули. Вони здатні переходити від цитотоксичних, прозапальних клітин до протизапальних, прорепаративних фенотипів [15]. Здатність макрофагів переходити в різні функціональні стани називається «поляризацією макрофагів».

Прозапальні (також відомі як "класично активовані" або M1) та протизапальні (також відомі як "альтернативно активовані" або M2) поляризаційні стани макрофагів є тими, що вивчаються найчастіше [16,17]. Парадигма M1/M2, яка протиставляє прозапальну активність M1-макрофагів, керованих цитокінами, протизапальній активності M2-макрофагів, керованих цитокінами, вперше була використана для опису цих протилежних функціональних відмінностей. Ця модель в першу чергу базується на метаболізмі аргініну, оскільки запальні M1 макрофаги використовують

аргінін для виробництва антимікробних окислювальних метаболітів (наприклад, оксиду азоту і супероксиду), тоді як протизапальні M2 макрофаги використовують той самий аргінін для виробництва проліну і поліамінів, необхідних для розвитку тканин і клітинного поділу [18]. Парадигма M1/M2 була вдосконалена в пізніших дослідженнях, щоб включити щонайменше дев'ять різних станів активації макрофагів або розташувати макрофаги M1 і M2 на протилежних крайніх точках спектру станів активації [19,20].

Зокрема, у риб було показано, що макрофаги також мають здатність поляризуватися в M1-подібний і M2-подібний стани, подібно до поляризованих макрофагів людини [21]. Було показано, що макрофаги коропа розвивають запальний фенотип у відповідь на стимуляцію ліпополісахаридом. Подібно до людських M1-макрофагів, цей фенотип характеризується продукцією оксиду азоту та прозапальних цитокінів, які є життєво важливими для захисту організму та елімінації пухлинних клітин, але також спричиняють побічну шкоду здоровим клітинам. З іншого боку, при стимуляції П-4, П-13 або циклоаміноксидазою макрофаги коропа набувають протизапального фенотипу, що характеризується підвищеною активністю аргінази, подібно до M2 макрофагів ссавців [19]. Зазвичай, макрофаги M2 демонструють підвищену аргіназну активність і генерують білки, важливі для процесів репарації, такі як поліаміни (путресцин, спермідин і спермін), життєво важливі для росту і поділу клітин і виробництва позаклітинного матриксу [22]. У ссавців, зменшуючи деструктивну імунну активність, M2 макрофаги сприяють ангіогенезу та ремоделюванню матриксу, а також стимулюють регенеративну відповідь у дорослих аксонах, навіть за наявності інгібіторних субстратів, які переважають у місці пошкодження [16,23]. Однак також було показано, що як запальні, так і протизапальні середовища можуть позитивно впливати на регенерацію. У *Danio rerio* на пізній стадії регенерації макрофаги M2 та протизапальні цитокіни концентруються в місці пошкодження, пригнічуючи

цитокін-опосередковане запалення і сприяючи подальшій регенерації. Таким чином, після того, як запальна фаза змінюється протизапальною, M2 макрофаги обмежують надмірне запалення і таким чином створюють середовище, сприятливе для загоєння тканин і росту аксонів [9]. Однак відсутність у *Danio rerio* чітких молекулярних маркерів, які б розрізняли обидва стани поляризації макрофагів, є перешкодою для майбутніх експериментів, які досліджували б динаміку імунних клітин під час регенерації спинного мозку, і, отже, перешкоджають пошуку нових імунотерапевтичних мішеней.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Тварини

Усі лінії *Danio rerio* утримувались та вирощувались у лабораторному акваріумі за стандартних умов [24]. Для експериментальних досліджень використовували 3-денних після запліднення личинок обох статей лінії Tg (*mpeg1.1:mCherry*) [25], скорочено *mpeg1:mCherry*, та Tg (*pdgfrb:gal4ff*)x(*UAS:GFP*) [26], скорочено *pdgfrb:GFP*.

2.2 Трансекція спинного мозку

Личинок *Danio rerio* віком 3 дні після запліднення анестезували за допомогою MESAB (етиловий ефір 3-амінобензойної кислоти; MS-222, Sigma), а потім перенесли в чашку Петрі, вкриту агарозою. Після видалення надлишку розчину личинок укладали в латеральне положення і кінчиком голки шприца 30 калібру наносили дорсальний надріз на дорсальній частині тулуба на рівні 15-го міотому. Після трансекції спинного мозку, личинок повертали в середовище E3 без метиленового синього, яке містило ПТУ (пропілтіоурацил), на 24 години.

2.3 Секвенування РНК одиночних клітин

Секвенування РНК одиночних клітин (scРНК-секвенування) проводилось за методикою Cavone *et al.* [3] шляхом флуоресцентно-активованого клітинного сортування личинок *Danio rerio mpeg1.1:mCherry* та *her4.3:GFP* ліній, без трансекції спинного мозку та 24 години після трансекції, а потім їх секвенування з використанням технології 10-кратного секвенування. Для оцінки профілів експресії окремих клітин для обраних генів, що цікавили, була створена внутрішня база даних одиночних клітин (single cell database).

2.4 *In situ* гібридизація

Ланцюгову реакцію гібридизації, РНК-флуоресцентну *in situ* гібридизацію (HCR™ RNA-FISH) проводили згідно з протоколом виробника (Molecular Instruments). Личинок фіксували в 4% параформальдегіді (PFA) протягом ночі при 4 °С і зневоднювали/пермеабілізували метанолом (MeOH) протягом ночі при -20 °С. Потім личинки зебр зволожували послідовно в MeOH і фосфатному буферному розчині (PBS), а потім додатково пермеабілізували 30 мкг/мл протеїнази К (Sigma) в PBS протягом 45 хвилин при кімнатній температурі. Потім, після короткого промивання в 1× PBS 0,1% Tween 20 (PBST), личинки постфіксували в 4% PFA протягом 20 хв для зупинки ферментативної активності. Після цього проводили ще одну серію відмивань у PBST. Потім личинок попередньо гібридували з 500 мкл попередньо підігрітого буфера для гібридизації зондів (Molecular Instruments) протягом 30 хв при 37 °С. Після попередньої гібридизації личинок переносили в розчин зондів (2 пмоль кожного набору зондів у 500 мкл буфера для гібридизації зондів) та інкубували протягом ночі при 37 °С. Зонди були розроблені компанією Molecular Instruments (Лос-Анджелес, Каліфорнія, США) з використанням наборів даних NCBI для генів, що цікавили. Наступного дня личинок відмивали в попередньо підігрітому буфері для відмивання зондів 4 рази по 15 хв при 37 °С, а потім у 5-кратному розчині хлориду натрію з 0,1% Tween 20 (SSCT) при кімнатній температурі. Потім личинок попередньо ампліфікували в 500 мкл ампліфікаційного буфера протягом 30 хв при кімнатній температурі, після чого додавали окремо приготований розчин шпильок (30 пмоль шпильок h1 і h2 готували шляхом швидкого охолодження (snap-cooling) 10 мкл 3 мкМ розчину, а потім додавали охоложені h1 і h2 до 500 мкл ампліфікаційного буфера при кімнатній температурі). Потім личинок інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом ночі. Наступного дня личинок відмивали в серії

промивань в $5\times$ SSCT в темряві при кімнатній температурі, а потім зберігали в гліцерині 70% PBST при 4 °C.

2.5 Отримання та обробка зображень

Для зразків, оброблених за допомогою HCR, зображення отримували за допомогою конфокального мікроскопа LSM 980 (Zeiss). Для зразків, не оброблених HCR (лише ендогенна флуоресценція), зображення отримували за допомогою звичайного епіфлуоресцентного мікроскопа, з'єднаного з пристроєм Apotome (Zeiss). Зображення корегували за яскравістю та контрастом за допомогою програмного забезпечення Fiji/ImageJ.

2.6 Кількісний та статистичний аналіз

Підрахунок клітин макрофагів проводився з використанням Fiji, як описано в Tsarouchas *et al.* [9]. З конфокальних зображень визначався об'єм, що цікавив, з центром у ділянці ураження. Розміри: ширина = 200 мкм, висота = 75 мкм (над нотохордою), глибина = 50 мкм. Зображення аналізувались за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Кількість клітин підраховували вручну. Статистичний аналіз проводився за допомогою GraphPad v8 і тесту Манна-Уїтні для непараметричних даних розподілу.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Потенційні маркери протизапальних макрофагів у личинок *Danio rerio* були відібрані відповідно до літературних даних, а потім відфільтровані з урахуванням рівнів їх експресії в макрофагах у базі даних секвенування РНК одиночних клітин (scRNA-секвенування). Потім ці маркери були валідовані методом HCR RNA-FISH з використанням трансгенної лінії *mpeg1:mCherry*. Валідацію проводили шляхом скринінгу подвійно позитивних клітин, акумульованих у місці ураження.

3.1 Огляд літератури на наявність маркерів поляризації M2

Після вивчення літератури, було знайдено 16 генів, які могли бути перспективними маркерами M2 поляризації *Danio rerio*. З цих генів було відкинуто 8 на основі патерну експресії в базі даних одиночних клітин та деяких додаткових критеріїв виключення, а саме: (1) вони були залучені в інші механізми і експресувалися у всіх типах клітин, як *vgfaa*, *cd63*, *STAT3*, *smad2* або *smad3*; (2) експресувалися переважно в інших типах клітин і майже не експресувалися в макрофагах, як *thar1* і *thar3*; (3) експресувалися повсюдно, як *msna*; (4) або які можуть відігравати роль про- і протизапальних, як ІЛ6. У таблиці 1 наведено список генів, що були відібрані (зеленим кольором) та виключені (червоним кольором). Додаткову інформацію про ці гени можна знайти в посиланнях, наведених у таблиці 1.

Ген	Посилання
Tgfb1a	https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.10561
Tgfb3	
Timp2b	https://doi.org/10.1155/2022/3632764
mrc1a (CD206)	https://doi.org/10.1080%2F2162402X.2019.1683347
Vegfaa	https://doi.org/10.1242%2Fdmm.035998
STAT3	10.1002/jcb.27259
И6	10.1002/jcb.27259
CD63	https://doi.org/10.1155/2019/7132708
Socs1	https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2014.00357
Msna	https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102397
Thap1	https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102397
Thap3	
Cxcr4a	https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.10561
Cxcr4b	
Smad2	https://doi.org/10.1007/s10142-023-01017-z
Smad3a	https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561
Arg2	https://doi.org/10.1038/s41598-020-70248-y

Таблиця 1 - Початково обрані потенційні маркери M2 поляризації.

3.2 Потенційні маркери M2 поляризації, відібрані для валідації

В якості потенційних M2-маркерів було відібрано 8 кандидатів. У цій частині представлено профіль експресії генів з бази даних одиночних клітин, виконаний Cavone *et al.* 2021 [3], та валідацію за допомогою НСР. Для порівняння різних клітинних кластерів, отриманих після однієї клітини для імунних клітин (А) та прогеніторних клітин (В), див. рисунок 1 нижче.

Рис. 1 - УМАР, отримані з секвенування РНК одиночних клітин для імунних клітин (А) та прогеніторних клітин (В) за даними Cavone *et al.* 2021 [3].

Tgfb1a (трансформуючий фактор росту, бета 1a), ортолог tgfb1, і tgfb3 (трансформуючий фактор росту, бета 3). Tgfb1a і Tgfb3 є членами сімейства цитокінів TGF- β . TGF- β - це цитокін з багатьма функціями, які впливають на проліферацію, диференціацію, міграцію та виживання клітин. Він регулює ряд типів клітин, включаючи епітеліальні та кровотворні клітини, а отже, відіграє життєво важливу роль у розвитку, загоєнні ран та імунологічних реакціях. Зокрема, TGF- β може пригнічувати або зміщувати активацію, дозрівання та диференціацію макрофагів [27]. TGF- β індукує M2-подібний фенотип, що характеризується підвищенням рівня протизапального цитокіну IL-10 та зниженням рівня прозапальних цитокінів TNF- α та IL-12. TGF- β сприяє диференціюванню M0 макрофагів у M2-подібні макрофаги, що характеризуються зниженою прозапальною реактивністю та підвищеною протизапальною здатністю [28]. TGF β -1 є важливим регулятором регенеративних процесів після травми периферичних нервових клітин. Зокрема, шваннівські клітини секретують TGF β -1 після травми, щоб прискорити очищення від залишків пошкоджених клітин та інгібувати проліферацію фібробластів, і в той же час вони потребують сигналізації TGF- β для ефективної міграції через ділянку пошкодження. Таким чином,

сигналізація TGF- β є критично важливою для перепрограмування шваннівських клітин, очищення від залишків клітин і подальшої регенерації нервових клітин [29]. *Tgfb1a* та *tgfb3* були обрані з огляду на згадки про них у попередніх дослідженнях як такі, що мають протизапальні властивості та індукують M2-фенотип [9, 28].

Після скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин було виявлено достатній рівень експресії в макрофагах (Рис. 2А-В). *Tgfb1a* був виявлений переважно у фібробластах, деяких макрофагах і мікрогліальних клітинах, а також у невеликій популяції клітин ЕРГ (А). З іншого боку, *Tgfb3* переважно виявляється у фібробластах (В). Той факт, що типові M2 цитокіни були виявлені переважно у фібробластах, призвів до необхідності підтвердити, чи є *tgfb1a* і *tgfb3* насправді маркерами M2 макрофагів, чи вони експресуються лише у фібробластах після травми спинного мозку у *Danio rerio*.

Сигнали експресії *tgfb1a* (С-С") і *tgfb3* (D-D") чітко не колокалізуються з сигналами експресії в макрофагах, що свідчить про те, що вони не експресуються в макрофагах, принаймні на 24 години після трансекції. Беручи до уваги результати скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин для обох генів, було вирішено підтвердити можливість експресії *tgfb1a* і *tgfb3* у фібробластах, використовуючи лінію *pdgfrb:GFP*. Було виявлено, що *tgfb1a* (Е) і *tgfb3* (F) експресуються в клітинах, позитивних до *pdgfrb* (стрілки в Е і F), що підтверджує, що вони дійсно є фібробластами. Тому ми можемо припустити, що фібробласти в моделі, яка добре регенерує, могли частково взяти на себе роль M2-макрофагів. Дослідження регенерації в *Danio rerio* показали, що і *tgfb1a*, і *tgfb3* є сприятливими для регенерації аксонів [30]. Соматична мутація цих генів призводить до значного зменшення кількості риб, які демонструють регенерацію аксонів. Для підтвердження цієї нової гіпотези необхідні подальші дослідження.

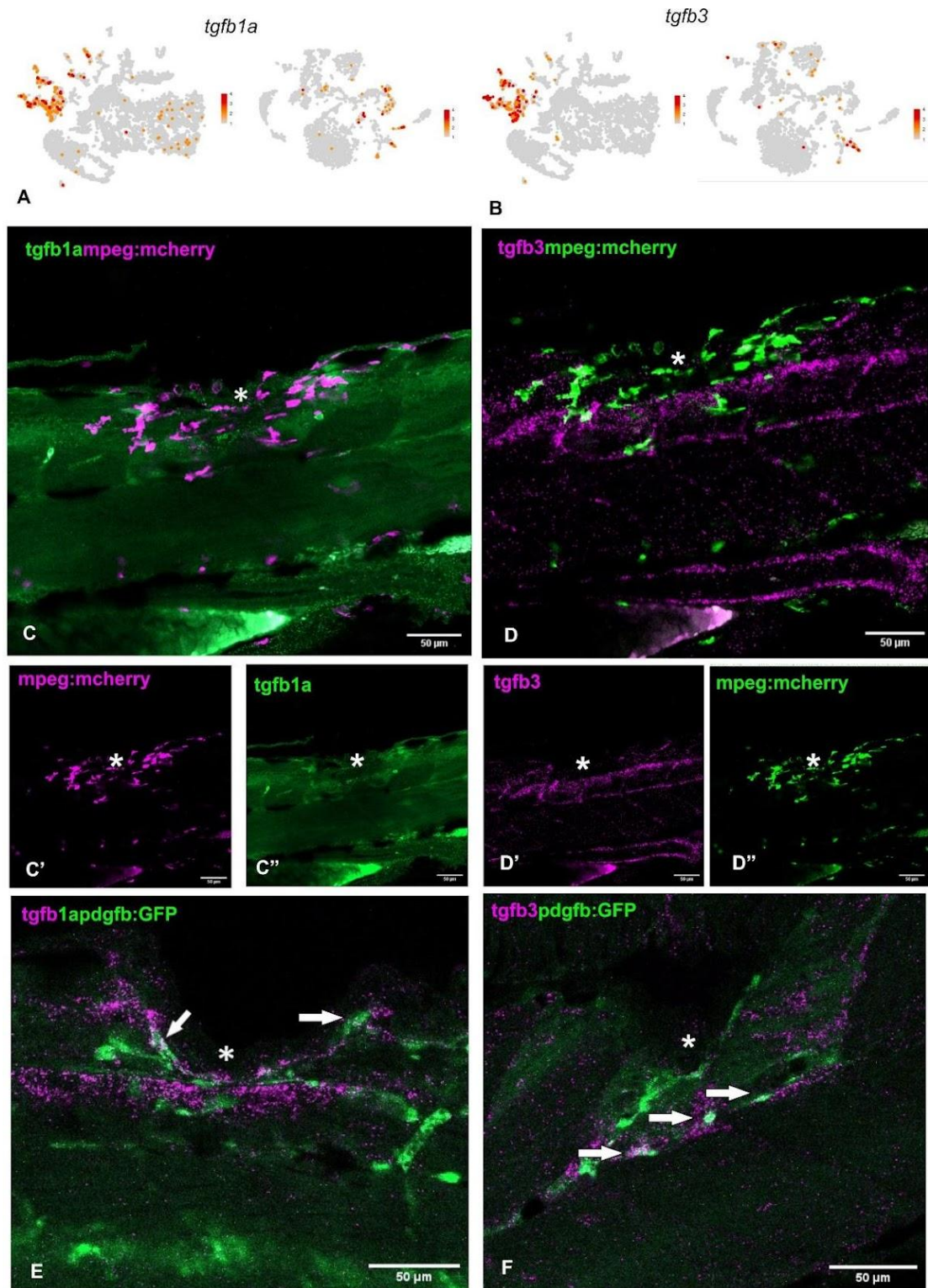


Рис. 2 - *Tgfb1a* і *tgfb3* не експресуються в макрофагах на 24 годині після трансекції

Мікрофотографії показують латеральні види личинок *Danio rerio* 24 години після трансекції; зірочкою позначено місце пошкодження. (A) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *tgfb1a*. (B) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *tgfb3*. (C-C'') При малому

збільшенні показано макрофаги (*mpeg1:mCherry*, пурпурний) та *tgfb1a* (зелений), сконцентровані в ділянці пошкодження спинного мозку; колокалізація сигналів експресії не спостерігається. (D-D") При малому збільшенні показано макрофаги (*mpeg1:mCherry*, зелений) і *tgfb3* (пурпурний), сконцентровані в ділянці пошкодження спинного мозку; колокалізація сигналів експресії не спостерігається. (E-F) При великому збільшенні показано експресію *tgfb1a* (E) та *tgfb3* (F) у трансгенній лінії *pdgfb:GFP* (зелений). Стрілки вказують на подвійно позитивні клітини.

Тімп2b (тканинний інгібітор металопротеїназ, тип 2 бета), ортолог *timp2*. Тімп2 є членом сімейства Тімп, який регулює периклітинний протеоліз білків позаклітинного матриксу і клітинної поверхні шляхом пригнічення активності матриксних металопротеїназ і відіграє вирішальну роль у контролі обороту позаклітинного матриксу. TNF/IL-1 β регулюють експресію *timp2* в клітинах серця, тоді як інгібування ТІМР2 збільшує продукцію цитокінів у мікрогліальних клітинах. ТІМР2 пригнічує активацію мікрогліальних клітин, регулюючи транскрипційні фактори Nrf2 і білок, що зв'язує сАМР-елемент відповіді. Тімп2 також може запобігати апоптозу макрофагів і пінистих клітин в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що призводить до зменшення запалення [31].

Після скринінгу за допомогою бази даних секвенування РНК одиночних клітин було виявлено високий рівень експресії *timp2b* у макрофагах. *Тімп2b* був виявлений у фібробластах, макрофагах і нейтрофілах, а також у невеликій популяції мікроглії та прогеніторних клітинах (Рис. 3А). Знову ж таки, скринінг також виявив високий рівень експресії у фібробластах, що призвело до необхідності експериментально перевірити експресію *timp2b* в макрофагах і фібробластах після травми спинного мозку, а, отже, і валідність *timp2b* як М2-маркера.

Результати НСР для *timp2b* не показують колокалізації з *mpeg1:mCherry*-позитивними клітинами (Рис. 3В-В"). Насправді, беручи до уваги скринінг бази даних секвенування одиночних клітин та орієнтацію *timp2b*-позитивних клітин у найбільш вентральній ділянці пошкодження, що характерно для фібробластів, *timp2b* може експресуватися у фібробластах на 24 годині після трансекції. Тому було вирішено підтвердити можливість експресії *timp2b* у фібробластах, використовуючи лінію *pdgfrb:GFP*. Було виявлено, що в більшій частині ділянки пошкодження клітини, позитивні до *timp2b*, є також позитивними до *pdgfrb* (Рис. 3С-Д"). Фібробласти пов'язані з регенерацією спинного мозку личинок *Danio rerio* з відкладенням колагену для створення сприятливого позаклітинного матриксу для аксональної навігації [32]. Той факт, що *timp2b* пов'язаний з ремоделюванням позаклітинного матриксу, підтверджує активну роль фібробластів у створенні цього сприятливого середовища. Однак, як зазначалося вище, повідомлялося, що *timp2b* є маркером М2 у ссавців. Ці дані, взяті разом, підсилюють гіпотезу про те, що фібробласти у *Danio rerio* можуть частково виконувати роль М2-макрофагів і сприяти регенерації спинного мозку.

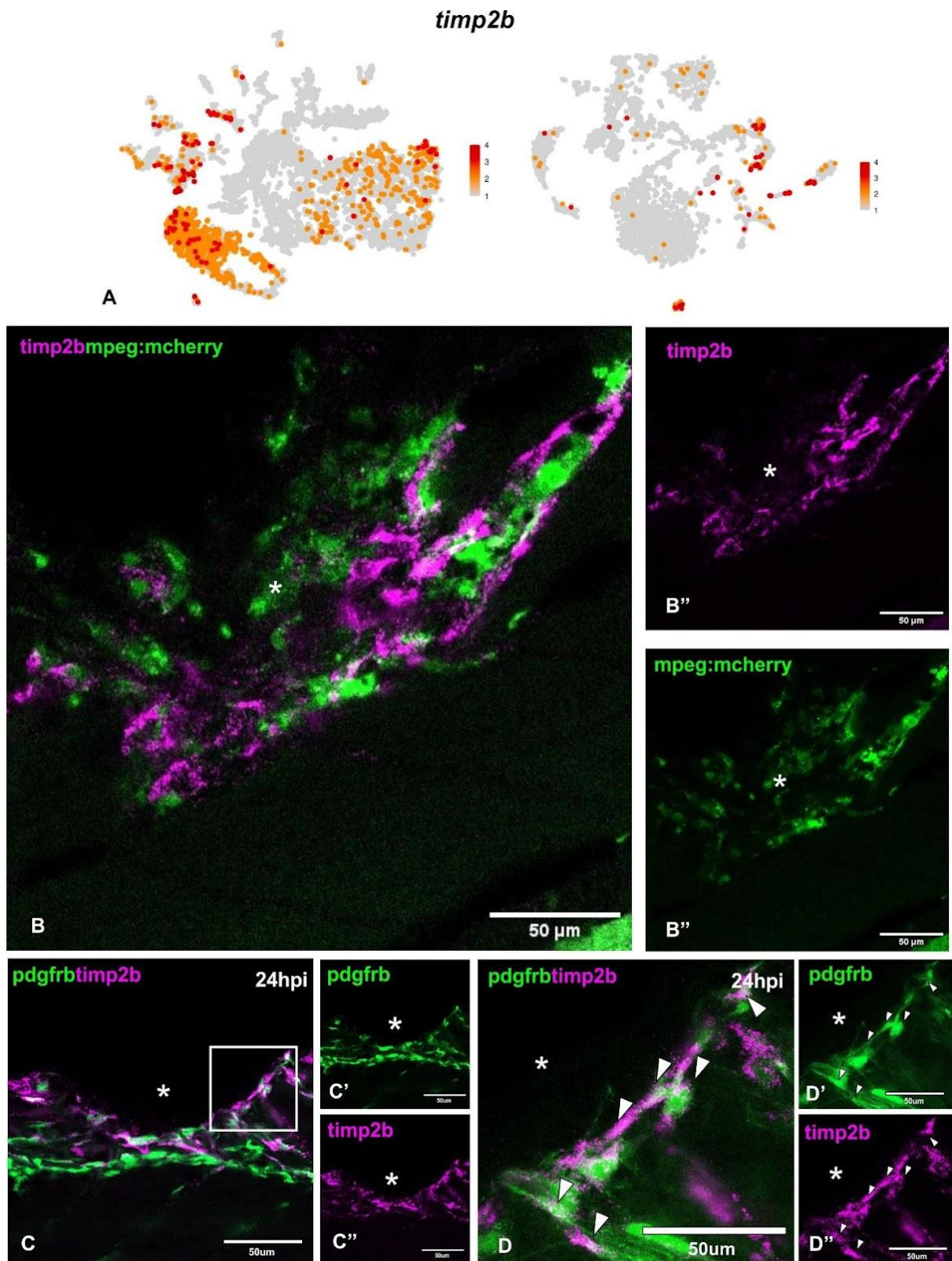


Рис. 3 - *Timp2b* не експресується в макрофагах на 24 годині після трансекції
 Мікрофотографії показують латеральні види личинок *Danio rerio* 24 години
 після трансекції; зірочкою позначено місце пошкодження. (А) Секвенування
 РНК одиночних клітин показує характер експресії *timp2b*. (В-В'') За
 збільшення показано макрофаги (*mpeg1*:mCherry, зелений) і *timp2b*

(пурпурний), сконцентровані в ділянці пошкодження спинного мозку; колокалізації сигналів експресії не спостерігається. (С-D) За різних збільшень показано експресію *timp2b* (пурпурний) у трансгенній лінії *pdgfb:GFP* (зелений). Стрілки вказують на подвійно позитивні клітини.

Mrc1a (рецептор манози, С тип 1 альфа), ортолог *mrc1*. Mrc1, також відомий як CD206, є трансмембранним глікопротеїном, який належить до сімейства лектинів С-типу і експресується переважно більшістю тканинних макрофагів, дендритних клітин та окремими лімфатичними або ендотеліальними клітинами печінки [33]. Mrc1 зазвичай називають однією з характеристик M2. Mrc1, рецептор манози, знаходиться переважно на поверхні альтернативно активованих макрофагів, де він функціонує як рецептор розпізнавання патернів і бере участь як у вродженому, так і в адаптивному імунітеті [34,35]. Зазвичай він локалізується в зоні запалення, блокує експресію прозапальних медіаторів, таких як iNOS, і сприяє нейропротекції [19,36].

Після скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин було виявлено достатній рівень експресії *mrc1a* в макрофагах; фактично, з усіх перевірених до цього часу генів він виявився найбільш специфічним для макрофагів (Рис. 4А). Беручи до уваги його характеристику як маркера M2 в макрофагах ссавців, *mrc1a* здавався життєздатним як потенційний маркер M2 у *Danio rerio*, що призвело до необхідності підтвердити його за допомогою HCR.

Результати HCR для *mrc1a* показують чітку колокалізацію з *mpeg1:mCherry* позитивними клітинами (Рис. 4В-В"), що вказує на те, що *mrc1a* активно експресується в макрофагах на 24 годині після трансекції. Як зазначено вище, з усіх перевірених генів він є найбільш специфічним для макрофагів, що робить його гарним кандидатом на роль потенційного

маркера M2 поляризації. Але для повного підтвердження цієї гіпотези необхідні подальші дослідження.

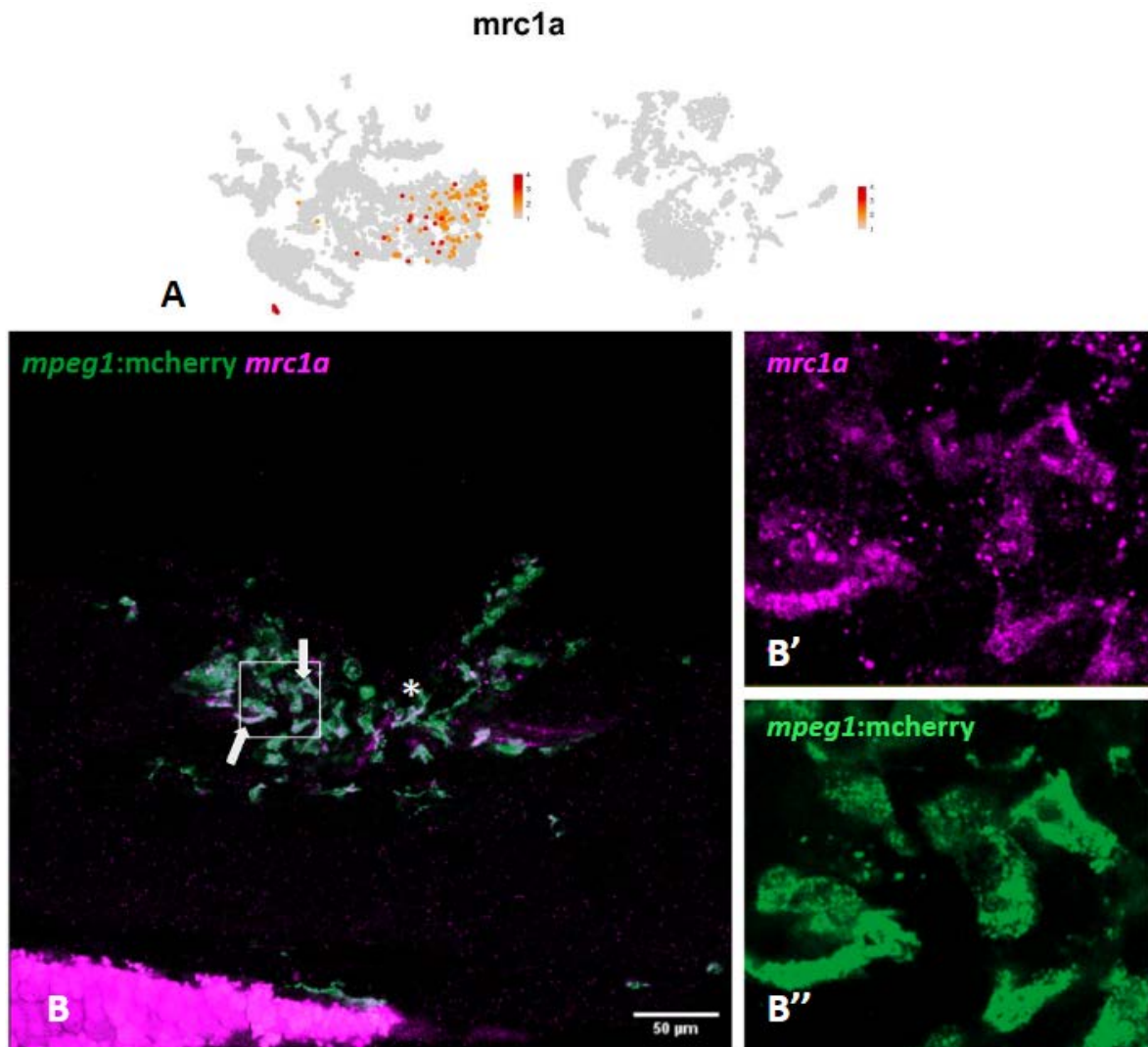


Рис. 4 - *Mrc1a* активно експресується в макрофагах на 24 години після трансекції

Мікрофотографії показують латеральні види личинок *Danio rerio* 24 години після трансекції; зірочка вказує на місце пошкодження; область в рамці показана з більшим збільшенням праворуч; стрілки вказують на подвійно клітини. (А) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *mrc1a*. (В-В'') За збільшення показано макрофаги (*mpeg1:mCherry*, зелений) і *mrc1a* (пурпурний), сконцентровані в ділянці пошкодження спинного мозку; спостерігається колокалізація сигналів експресії.

Socs1a (супресор сигналізації цитокінів, тип 1 альфа), ортолог *socs1*. Socs1 є найпотужнішим варіантом сімейства Socs і основним регулятором різноманітних імунозалежних цитокінів, зокрема IFN γ . Socs1 контролює опосередковане макрофагами запалення, регулюючи шляхи, індуковані інтерфероном типу I, і беручи участь у ліпополісахарид-індукованих шляхах Jak-STAT і NF-kB через опосередковану убіквітином протеасомну деградацію. Відомо також, що Socs1 є регулятором індукованих IFN запальних реакцій шляхом інгібування шляхів Jak/STAT [37]. Експресія SOCS1 збільшується в макрофагах після впливу LPS, що вказує на механізм негативного зворотного зв'язку сигналізації LPS. Раніше також було показано, що Socs1 блокує опосередковані ROS сигнальні шляхи під час апоптозу T-клітин у відповідь на TNF- α та окислювальний стрес.

Однак, більшість відомої інформації про протизапальні властивості Socs1 стосується тварин, які мають адаптивну імунну систему, яка ще не розвинена у личинок *Danio rerio*, які мають лише вроджену імунну систему. Достатні рівні експресії *socs1a* були виявлені в макрофагах після скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин (Рис. 5B). Однак певний рівень експресії в інших типах клітин, таких як мікроглія, нейтрофіли та фібробласти, також був виявлений, що призвело до необхідності підтвердити потенційний M2-маркер за допомогою HCR.

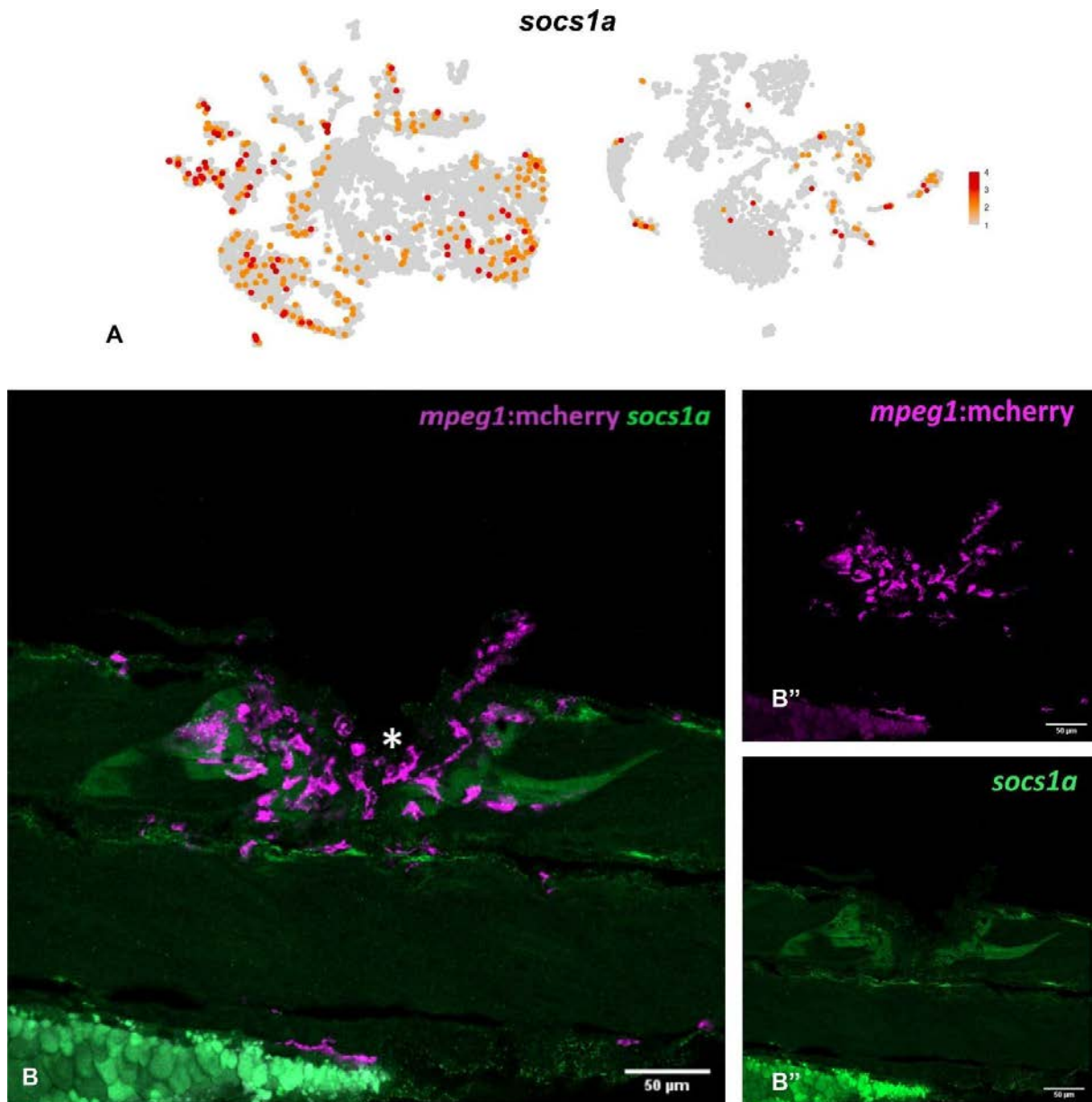


Рис. 5 - Сигнал експресії *socs1a* відсутній в макрофагах на 24 годині після трансекції

Мікрофотографії являють собою латеральні види 24 години після трансекції; зірочка вказує на місце пошкодження. (А) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *socs1a*. (В-В') За збільшення показано макрофаги (*mpeg1*:mCherry, пурпурний), зосереджені в місці пошкодження спинного мозку; сигнал експресії *socs1a* (зелений), видимий у місці пошкодження, є фоновим.

На жаль, сигнал експресії *socs1a* (зеленим) дуже низький у місці пошкодження (Рис. 5А), що може свідчити про те, що він не експресується в макрофагах на 24 годині після пошкодження, або про проблеми з протоколом HCR. *Socs1a* мав найкоротшу послідовність з усіх генів-кандидатів. Конструкція зонда HCR вимагає відносно довгих послідовностей, щоб бути точним та ефективним, тому це може бути поясненням потенційної технічної проблеми.

Sxcr4a (рецептор хемокінового мотиву C-X-C, тип 4 альфа) і *sxcr4b* (рецептор хемокінового мотиву C-X-C, тип 4 бета), ортологи *sxcr4*. У *Danio rerio* *sxcr4a* і *sxcr4b* експресуються в більшості ліній клітин, які, як відомо, експресують *sxcr4* у ссавців. Ці гени знаходяться в бічній мезодермі та задньому середньому мозку. Транскрипти *sxcr4a* були ідентифіковані в інтернейронах і ентодермі, тоді як *sxcr4b* виявлено в сенсорних нейронах, мотонейронах і мозочку [38]. І *sxcr4a*, і *sxcr4b* були згадані як потенційно придатні маркери M2 у *Danio rerio*, але для підтвердження необхідні подальші дослідження [8,19].

Після скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин було виявлено, що *Sxcr4a* та *sxcr4b* експресуються в макрофагах (Рис. 6АВ). Схоже, що *sxcr4b* також експресується рядом типів клітин, включаючи сильний сигнал експресії в нейтрофілах. Згадки про те, що ці гени є маркерами M2 *Danio rerio*, але і, здавалося б, розсіяні сигнали експресії призвели до необхідності підтвердити їх за допомогою HCR.

Після HCR не було виявлено сигналу для *sxcr4a*, що могло б вказувати на збій протоколу HCR. Крім того, експресія цього маркера в окремих клітинах надзвичайно низька порівняно з іншими дослідженими генами. Чи макрофаги в личинках *Danio rerio* на 24 годині після пошкодження справді експресують цей маркер, потребує подальшого дослідження. З іншого боку, видно чітку спільну локалізацію *sxcr4b* і *mpeg1:mCherry* (Рис. 6А), що вказує на те, що *sxcr4b* експресується в макрофагах на 24 годині після

пошкодження. Цікаво, що не всі макрофаги експресують цей маркер, що робить цей ген хорошим кандидатом для подальшого дослідження. Крім того, *cxcr4b* також чітко експресується в нейтрофілах вентрально від місця пошкодження личинок *Danio rerio*, ймовірно, в кров'яному острівці, що також узгоджується з тим, що повідомляється в нашій базі даних секвенування РНК одиночних клітин.

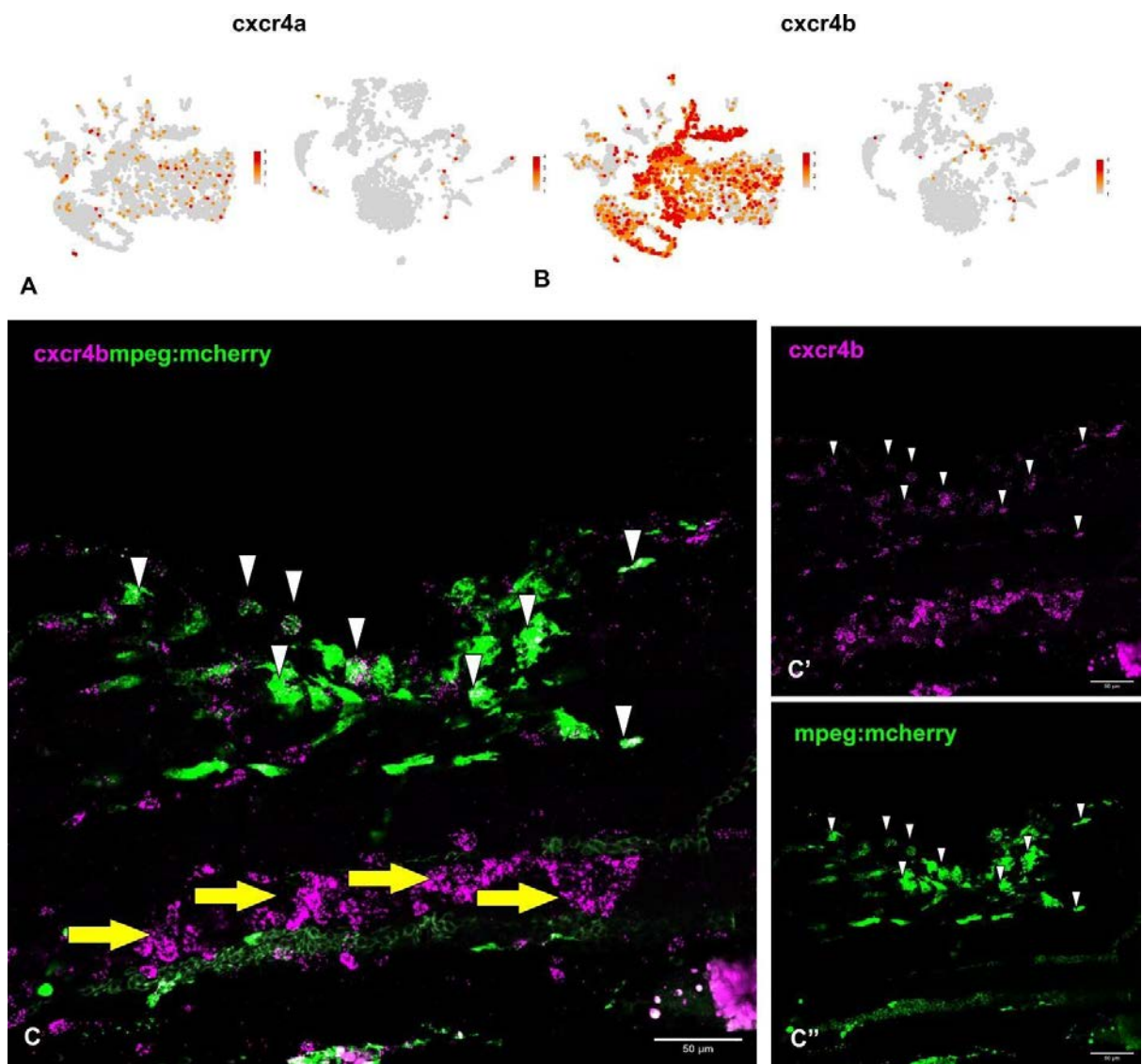


Рис. 6 - *Cxcr4b* експресується в макрофагах і нейтрофілах на 24 годині після трансекції

Мікрофотографії являють собою латеральні види 24 години після трансекції; зірочка вказує на місце пошкодження. (А) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *sxcr4a*. (В) Секвенування РНК одиночних клітин показує характер експресії *sxcr4b*. (С-С'') За збільшення показано макрофаги (*mpeg1:mCherry*, зелений) і *sxcr4b* (пурпурний), зосереджені в місці пошкодження спинного мозку; білі стрілки вказують на подвійно позитивні клітини (*mpeg1:mCherry* : *sxcr4b*); жовті стрілки вказують на накопичення нейтрофілів.

Arg2 (аргіназа 2). Аргіназа 2 є мітохондріальним ферментом, який бере участь у метаболізмі L-аргініну, гідролізуючи аргінін до орнітину та сечовини. Регулюючи мітохондріальну динаміку, збільшуючи окисне фосфорилування та контролюючи продукцію IL-1b, Arg2 сприяє протизапальному стану в макрофагах мишей [39]. IL-10-опосередкована активація білка Arg2 необхідна для зсуву мітохондріальної динаміки та біоенергетики в запальних макрофагах у бік окислювального фенотипу, а саме через підвищення активності комплексу II у ланцюзі транспортування електронів [40]. В рибах, під час обробки cAMP, макрофаги поляризуються у M2 фенотипи, що характеризуються сильною позитивною регуляцією експресії гена *arg2*, що означає, що *arg2* може бути відповідним маркером для M2 макрофагів риб [22]. Крім того, той факт, що стани поляризації макрофагів спочатку визначалися диференціальним метаболізмом аргініну (див. Розділ 1), робить цей маркер більш цікавим для оцінки.

Після скринінгу бази даних секвенування РНК одиночних клітин було виявлено достатні рівні експресії *arg2* у макрофагах (Рис. 7А). Проте певні рівні експресії в інших типах клітин також були виявлені, наприклад нейтрофіли та, що цікаво, у специфічній для регенерації популяції (RSP), яка виявилася в базі даних her4.3 (неопубліковані результати). Це переконливо свідчить про необхідність перевірити достовірність *arg2* як маркера M2-

макрофагів. HCR для *arg2* не показав явної спільної локалізації з *mpeg1:mCherry* позитивними клітинами. Цікаво, що він демонструє виражену колокалізацію з одним із генів, які визначають цю специфічну для регенерації популяцію (дані не показані). Роль цієї специфічної для регенерації популяції ще не виявлена, але факт, що він експресує один із найвідоміших маркерів M2-макрофагів, справді цікавий. Слід зазначити, що це один із небагатьох M2-маркерів, які були описані раніше у риб [19]. Чи має ця популяція клітин протизапальну роль, заслуговує на майбутнє дослідження.

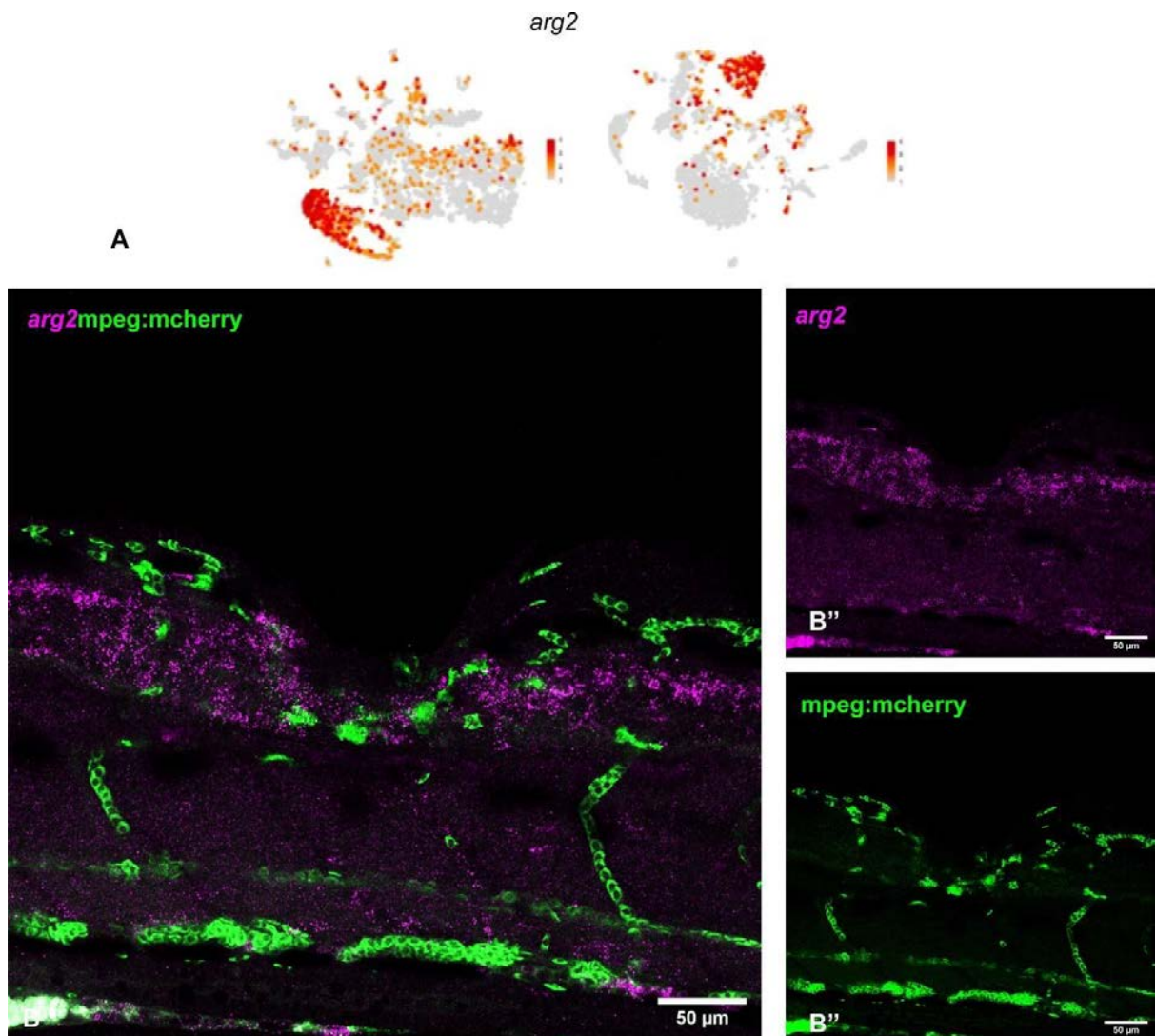


Рис. 7 - *Arg2* не експресується в макрофагах на 24 години після трансекції
Мікрофотографії являють собою латеральні види 24 години після трансекції;
зірочка вказує на місце пошкодження. (А) Секвенування РНК одиночних

клітин показує характер експресії *arg2*. (В-В'') За збільшення показано макрофаги (*mpeg1:mCherry*, зелений) і *arg2* (пурпурний), зосереджені в місці пошкодження спинного мозку; колокалізації сигналів експресії не спостерігається.

3.3 Вплив метиленового синього на запальне середовище

Метиленовий синій зазвичай використовується як барвник, однак він також має протизапальні властивості, які можуть викликати порушення в середовищі місця пошкодження та, отже, покращити регенерацію. У кількох дослідженнях його використовували як фармакологічне лікування для зменшення запалення [41]. Одним із можливих способів перевірки маркерів-кандидатів як протизапальних може бути перевірка того, як змінюється динаміка макрофагів і експресія генів у присутності протизапальних препаратів, таких як метиленовий синій. Щоб перевірити потенційний ефект цього препарату, було проаналізовано залучення макрофагів до місця пошкодження личинок, які інкубувались в метиленовому синьому. Використовували дві групи личинок лінії *mpeg1:mCherry*. Після ураження їх відповідно інкубували або в нормальному середовищі E3 (n=15), або в середовищі E3, яке містило метиленовий синій (n=15). На 24 годині після пошкодження личинки були зафіксовані, а потім була підрахована кількість макрофагів у місці пошкодження (Додаток 1).

Інкубація з метиленовим синім призвела до значного збільшення кількості макрофагів (Рис. 8), що вказувало на порушення запального середовища в осередку ураження.

Однак, було очікувано зменшення кількості макрофагів як пряму ознаку зменшення запалення. Одним із можливих пояснень є те, що це збільшення кількості макрофагів може означати збільшення залучення протизапальних макрофагів. Якщо ця гіпотеза вірна, це буде ідеальна

фармакологічна обробка для підтвердження експресії таких генів, як *mrc1a* та *sxcr4b*, які, як було показано, є хорошими потенційними M2 генами.

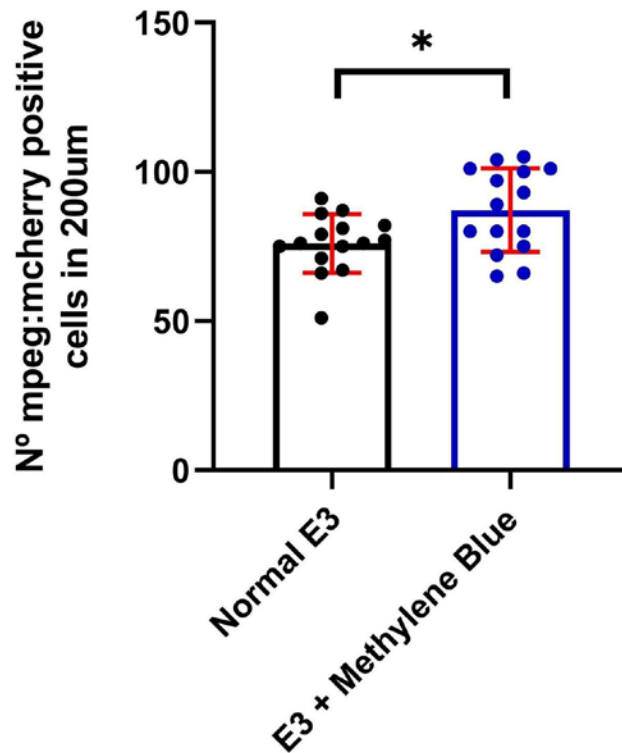


Рис. 8 - Інкубація з метиленовим синім призводить до збільшення кількості макрофагів у місці пошкодження порівняно зі звичайним розчином E3.

Дані представлені як середнє \pm SEM. p-value = 0,0172.

ВИСНОВКИ

1. Сигнали експресії типових протизапальних маркерів макрофагів TGFb1a і TGFb3, а також TIMP2b виявлені не в макрофагах, а у фібробластах.
2. Сигналів експресії SOCS1a та CXCR4a не спостерігається, що вказує або на відсутність експресії в макрофагах на 24 години після трансекції, або на несправність їхніх відповідних флуорофорів під час HCR.
3. Сигнал експресії аргінази 2 у макрофагах на 24 години після трансекції не спостерігається, що вказує на те, що вона може бути поганим маркером M2 поляризації макрофагів.
4. Сильні сигнали експресії MRC1a та CXCR4b у макрофагах були зареєстровані на 24 години після трансекції, що вказує на них як на прийнятні потенційні маркери M2 поляризації макрофагів.
5. Інкубація личинок з метиленовим синім призвела до збільшення кількості макрофагів на 24 години після трансекції, що вказує на значне втручання протизапальних властивостей метиленового синього в запальне середовище ділянки ураження.

ПОДЯКИ

Хочу висловити подяку Альберто Докампо-Сеара, PhD, за допомогу, супровід та величезну кількість часу, присвяченого допомозі мені в моїй роботі, а також усім членам лабораторії за підтримку та допомогу під час роботи в Becker Lab над моєю дипломною роботою. Особлива подяка проф. Катерині Г. Беккер за її допомогу та розуміння під час написання роботи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fan, B., Wei, Z., Yao, X., Shi, G., Cheng, X., Zhou, X., Zhou, H., Ning, G., Kong, X., & Feng, S. (2018, June). Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 27(6), 853–866.
<https://doi.org/10.1177/0963689718755778>
2. Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017, April 27). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
3. Cavone, L., McCann, T., Drake, L. K., Aguzzi, E. A., Oprișoreanu, A. M., Pedersen, E., Sandi, S., Selvarajah, J., Tsarouchas, T. M., Wehner, D., Keatinge, M., Mysiak, K. S., Henderson, B. E., Dobie, R., Henderson, N. C., Becker, T., & Becker, C. G. (2021, June). A unique macrophage subpopulation signals directly to progenitor cells to promote regenerative neurogenesis in the zebrafish spinal cord. *Developmental Cell*, 56(11), 1617–1630.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.031>
4. Mahar, M., & Cavalli, V. (2018, April 17). Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(6), 323–337.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0001-8>
5. Vajn, K., Plunkett, J. A., Tapanes-Castillo, A., & Oudega, M. (2013, July 28). Axonal regeneration after spinal cord injury in zebrafish and mammals: differences, similarities, translation. *Neuroscience Bulletin*, 29(4), 402–410.
<https://doi.org/10.1007/s12264-013-1361-8>
6. Becker, C., & Becker, T. (2015, February). Neuronal Regeneration from Ependymo-Radial Glial Cells: Cook, Little Pot, Cook! *Developmental Cell*, 32(4), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.001>

7. Stenudd, M., Sabelström, H., & Frisé, J. (2015, February 1). Role of Endogenous Neural Stem Cells in Spinal Cord Injury and Repair. *JAMA Neurology*, 72(2), 235. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.2927>
8. van den Bos, R., Cromwijk, S., Tschigg, K., Althuisen, J., Zethof, J., Whelan, R., Flik, G., & Schaaf, M. (2020, April 29). Early Life Glucocorticoid Exposure Modulates Immune Function in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00727>
9. Tsarouchas, T. M., Wehner, D., Cavone, L., Munir, T., Keatinge, M., Lambertus, M., Underhill, A., Barrett, T., Kassapis, E., Ogryzko, N., Feng, Y., van Ham, T. J., Becker, T., & Becker, C. G. (2018, November 7). Dynamic control of proinflammatory cytokines Il-1 β and Tnf- α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07036-w>
10. Renshaw, S. A., & Trede, N. S. (2012, January 1). A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Disease Models & Mechanisms*, 5(1), 38–47. <https://doi.org/10.1242/dmm.007138>
11. Poss, K. D., Wilson, L. G., & Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601), 2188–2190. <https://doi.org/10.1126/science.1077857>
12. Li, L., Yan, B., Shi, Y. Q., Zhang, W. Q., & Wen, Z. L. (2012). Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *The Journal of biological chemistry*, 287(30), 25353–25360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349126>
13. Julier, Z., Park, A. J., Briquez, P. S., & Martino, M. M. (2017, April). Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomaterialia*, 53, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.056>

14. Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016, March). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, *44*(3), 450–462.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
15. David, S., Greenhalgh, A., & Kroner, A. (2015, October). Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord. *Neuroscience*, *307*, 311–318.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.064>
16. Wang, X., Cao, K., Sun, X., Chen, Y., Duan, Z., Sun, L., Guo, L., Bai, P., Sun, D., Fan, J., He, X., Young, W., & Ren, Y. (2014, November 28). Macrophages in spinal cord injury: Phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia*, *63*(4), 635–651.
<https://doi.org/10.1002/glia.22774>
17. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008, December). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
18. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014, October 27). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, *5*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
19. Wentzel, A. S., Petit, J., van Veen, W. G., Fink, I. R., Scheer, M. H., Piazzon, M. C., Forlenza, M., Spaink, H. P., & Wiegertjes, G. F. (2020, August 10). Transcriptome sequencing supports a conservation of macrophage polarization in fish. *Scientific Reports*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70248-y>
20. Murray, P., Allen, J., Biswas, S., Fisher, E., Gilroy, D., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J., Ivashkiv, L., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F., Mege, J. L., Mosser, D., Natoli, G., Saeij, J., Schultze, J., Shirey, K., & Wynn, T. (2014, July). Macrophage Activation and

- Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
21. Rougeot, J., Torraca, V., Zakrzewska, A., Kanwal, Z., Jansen, H. J., Sommer, F., Spaink, H. P., & Meijer, A. H. (2019, April 17). RNAseq Profiling of Leukocyte Populations in Zebrafish Larvae Reveals a cxcl11 Chemokine Gene as a Marker of Macrophage Polarization During Mycobacterial Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00832>
22. Wiegertjes, G. F., Wentzel, A. S., Spaink, H. P., Elks, P. M., & Fink, I. R. (2016, January). Polarization of immune responses in fish: The ‘macrophages first’ point of view. *Molecular Immunology*, *69*, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.026>
23. Brennan, F. H., Li, Y., Wang, C., Ma, A., Guo, Q., Li, Y., Pukos, N., Campbell, W. A., Witcher, K. G., Guan, Z., Kigerl, K. A., Hall, J. C. E., Godbout, J. P., Fischer, A. J., McTigue, D. M., He, Z., Ma, Q., & Popovich, P. G. (2022, July 14). Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31797-0>
24. Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition. University of Oregon Press, Eugene.
25. Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood*. 2010;117(4):e49-56.
26. Ando, K. et al. Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish. *Development* *143*, 1328–1339 (2016).
27. Gong, D., Shi, W., Yi, S. J., Chen, H., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2012, June 15). TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative

- macrophage activation. *BMC Immunology*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-31>
28. Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., & Du, J. (2016, July 13). TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 7(32), 52294–52306.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561>
29. Arena, K. A., Zhu, Y., & Kucenas, S. (2022, May 26). Transforming growth factor-beta signaling modulates perineurial glial bridging following peripheral spinal motor nerve injury in zebrafish. *Glia*, 70(10), 1826–1849.
<https://doi.org/10.1002/glia.24220>
30. Keatinge, M., Tsarouchas, T. M., Munir, T., Porter, N. J., Larraz, J., Gianni, D., Tsai, H. H., Becker, C. G., Lyons, D. A., & Becker, T. (2021, April 29). CRISPR gRNA phenotypic screening in zebrafish reveals pro-regenerative genes in spinal cord injury. *PLOS Genetics*, 17(4), e1009515.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009515>
31. Costanzo, L., Soto, B., Meier, R., & Geraghty, P. (2022, December 31). The Biology and Function of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 in the Lungs. *Pulmonary Medicine*, 2022, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2022/3632764>
32. Wehner, D., Tsarouchas, T. M., Michael, A., Haase, C., Weidinger, G., Reimer, M. M., Becker, T., & Becker, C. G. (2017, July 25). Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00143-0>
33. Azad, A. K., Rajaram, M. V., & Schlesinger, L. S. (2014). Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease

- Diagnostics and Therapeutics. *Journal of cytology & molecular biology*, 1(1), 1000003. <https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000003>
34. Tsuchiya, K., Suzuki, Y., Yoshimura, K., Yasui, H., Karayama, M., Hozumi, H., Furuhashi, K., Enomoto, N., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Inui, N., Yokomura, K., & Suda, T. (2019, December 10). Macrophage Mannose Receptor CD206 Predicts Prognosis in Community-acquired Pneumonia. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55289-2>
35. Raggi, F., Pelassa, S., Pierobon, D., Penco, F., Gattorno, M., Novelli, F., Eva, A., Varesio, L., Giovarelli, M., & Bosco, M. C. (2017, September 7). Regulation of Human Macrophage M1–M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01097>
36. Bok, E., Chung, Y. C., Kim, K. S., Baik, H. H., Shin, W. H., & Jin, B. K. (2018, July). Modulation of M1/M2 polarization by capsaicin contributes to the survival of dopaminergic neurons in the lipopolysaccharide-lesioned substantia nigra in vivo. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(7), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0111-4>
37. Liao, N. P. D., Laktyushin, A., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N. A., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018, April 19). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04013-1>
38. Wei Chong, S., Emelyanov, A., Gong, Z., & Korzh, V. (2001, December). Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mechanisms of Development*, 109(2), 347–354. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00520-2](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00520-2)
39. De Santi, C., Nally, F. K., Afzal, R., Duffy, C. P., Fitzsimons, S., Annett, S. L., Robson, T., Dowling, J. K., Cryan, S. A., & McCoy, C. E. (2022,

- September). Enhancing arginase 2 expression using target site blockers as a strategy to modulate macrophage phenotype. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 29, 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.08.004>
40. Dowling, J. K., Afzal, R., Gearing, L. J., Cervantes-Silva, M. P., Annett, S., Davis, G. M., De Santi, C., Assmann, N., Dettmer, K., Gough, D. J., Bantug, G. R., Hamid, F. I., Nally, F. K., Duffy, C. P., Gorman, A. L., Liddicoat, A. M., Lavelle, E. C., Hess, C., Oefner, P. J., . . . McCoy, C. E. (2021, March 5). Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21617-2>
41. Gureev, A.P., Sadovnikova, I.S. & Popov, V.N. Molecular Mechanisms of the Neuroprotective Effect of Methylene Blue. *Biochemistry Moscow* 87, 940–956 (2022). <https://doi.org/10.1134/S0006297922090073>

ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

	ЕЗ	ЕЗ + метиленовий синій
Група 1		
	51	72
	66	80
	75	80
	82	101
	87	101
	67	104
	91	89
		100
Група 2		
	76	65
	71	75
	75	66
	86	105
	81	93
	79	80
	76	97
	77	

Таблиця 1 - Підрахунок макрофагів личинок *Danio rerio*, інкубованих протягом 24 годин після трансекції в ЕЗ з метиленовим синім і без метиленового синього.