

РОЛЯ НА МИКРОГЛИЯТА ПРИ ИСХЕМИЧЕН МОЗЪЧЕН ИНСУЛТ

Виктория Михайлова, Станислав Морфов, Искрен Великов, Радослав Спасов,
Ирина И. Стоянова, Антон Б. Тончев

*Катедра „Анатомия и клетъчна биология“, Медицински факултет,
Медицински университет – Варна*

THE ROLE OF MICROGLIA IN ISCHEMIC STROKE

Victoria Mihailova, Stanislav Morfov, Iskren Velikov, Radoslav Spasov,
Irina I. Stoyanova, Anton B. Tonchev

*Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna*

РЕЗЮМЕ

Исхемичният мозъчен инсулт е заболяване, което принадлежи към групата на острите съдови нарушения на мозъчното кръвообращение. Това разстройство е една от основните причини за инвалидизация и смъртност в световен мащаб. Доказано е, че целостта на кръвно-мозъчната бариера е нарушена след исхемичен мозъчен инсулт и това има определящо значение за мозъчната увреда. Настъпва възпалителна реакция, която се провокира и поддържа от биоактивни вещества, отделяни както от ендотелните клетки, така и от мозъчните глиални клетки и имунните клетки на кръвта. На увредата първи реагират микроглиалните клетки, активирани чрез поредица от молекулярни механизми и трансформирани в различни функционални субтипове. Активираната микроглия може да има както задълбочаващ увредата ефект, така и благоприятно въздействие що се отнася до тъканното ремоделиране и възстановяване след исхемията. Освен според функциите си, активираните микроглиални клетки се различават и по своята морфология, генна експресия и протеинов профил. Видът им може да варира и в зависимост от разположението им спрямо ядрото на увреда. Микроглиалната пластичност, както и сложните взаимоотношения на микроглията с другите клетки в централната нервна система при физиологични условия и след исхемичен мозъчен инсулт са проучени предимно при експериментални животни: гризачи и примати. Използването на високоспециализирани образни методи доведе до натрупването на

ABSTRACT

Cerebral ischemic stroke is a disease that belongs to the group of acute vascular disorders of the cerebral circulation. It is considered a major cause of disability and mortality worldwide. It has been shown that the integrity of the blood-brain barrier is impaired after an ischemic stroke, and this is the key factor in brain damage. An inflammatory reaction occurs, which is provoked and maintained by bioactive substances released by endothelial cells, brain glial cells, and blood immune cells. Microglial cells are the first to respond to an injury; they get activated through a series of molecular mechanisms and transformed into diverse functional subtypes. Activated microglia can have both aggravating and beneficial effects regarding tissue remodeling and recovery after ischemia. In addition to their functions, activated microglial cells also differ in their morphology, gene expression, and protein profile. Their type can also vary depending on the distance from the ischemic lesion. Microglial plasticity, as well as the complex relationships of microglia with other cells in the central nervous system under physiological conditions and after ischemic stroke, have been studied mainly in experimental animals: rodents and primates. However, more information has been generated by *in vivo* studies of post-stroke patients, applying highly specialized imaging methods. Nevertheless, the obtained results are insufficient and ambiguous, but they are a good basis for developing strategies to influence the recovery process after ischemic brain injury.

Keywords: ischemic stroke, microglia, microglial plasticity, neural tissue repair after injury

все повече данни и от in vivo проучвания на пациенти, преживели остър исхемичен инцидент. На този етап получените резултати са недостатъчни и двусмислени, но са добра основа за разработване на стратегии за повлияване изхода от исхемична мозъчна увреда в дългосрочен план.

Ключови думи: *исхемичен мозъчен инсулт, микроглия, микроглиална пластичност, възстановяване на нервната тъкан след увреда*

ВЪВЕДЕНИЕ

Исхемичният мозъчен инсулт (ИМИ) е водеща причина за смъртността в световен мащаб. Клетъчната увреда при исхемия се състои в енергийно изчерпване и интрацитоплазмена акумулация на натрий и калций. В резултат на това следва поредица от събития като освобождаване на свободни кислородни радикали, активиране на ензими каспази (ефекторни протеини на клетъчната апоптоза), инхибиране на протеиновия синтез, митохондриална увреда, клетъчен оток, фрагментиране на клетъчната ДНК и т.н. Почти веднага след настъпването на мозъчна исхемия микроглията се активира, освобождават се цитокини и мигрират левкоцити в областта на лезията. Имунният отговор срещу увреждащия фактор е системен и се задълбочава, като това води до невронална увреда (1). Активираната микроглия е клетъчен субтип с голяма пластичност и нейната активация е сложен процес, зависещ от множество фактори и от заобикалящите клетки: неврони, астроцити, олигодендрцити, ендотелни клетки (2,3). Съществуват два класа активирани микроглиални клетки: класически (M1) и алтернативен (M2) активиран фенотип, които могат да се наблюдават през различните етапи от развитието на увредата (4,5). Ефектът, който те упражняват, може да бъде както благоприятен, така и негативен във всеки един от етапите на ИМИ (6). В настоящия обзор ние разглеждаме активирането на микроглията при мозъчна исхемия в експериментални животни и при човек: молекулярните механизми, които модулират този процес; двойствената роля и функции на активираната микроглия, както и динамичните ѝ взаимоотношения с другите клетъчни видове.

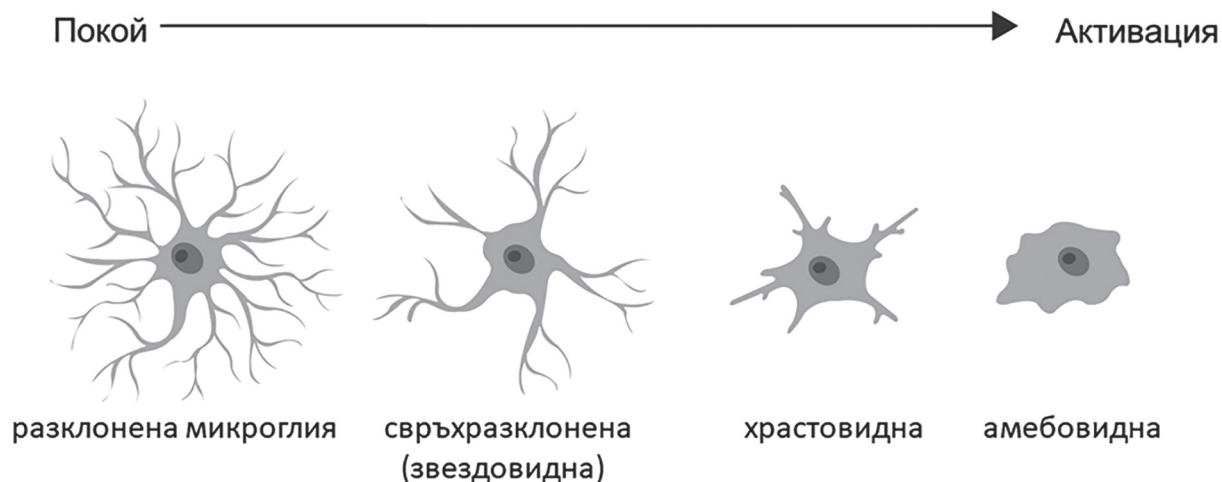
Същност на микроглията

Микроглията е част от мононуклеарната фагоцитарна система (МНС) и има защитна функ-

ция спрямо мозъчната тъкан срещу различни видове патогени. Съществуват няколко предположения за нейния произход. Някои автори считат, че микроглията произхожда от невроектодермални и/или мезодермални прогениторни клетки, които мигрират в мозъка още по време на ембрионалното развитие (7-9). Според други автори микроглията произлиза от циркулиращи в кръвта моноцити през ранния постнатален период (10,11). Трети проучвания сочат, че микроглията не води началото си от костния мозък, а от миелоидна прекурсорна клетка в жълтътното мехурче (12,13). Съвременните схващания са, че микроглията произлиза от миелоидна прекурсорна клетка, като заселването в мозъчната тъкан става през различни етапи от ембрионалното развитие. По-голямата част от микроглиалните клетки обаче мигрират в централната нервна система (ЦНС) през постнаталния период, след сформирването на кръвно-мозъчната бариера (КМБ) (14,15).

След като се установи в мозъчната тъкан, микроглията придобива специфичен фенотип: тя има малко тяло и множество разклонения (16). Поради това във физиологични условия се означава като „разклонена“ („раифицирана“) микроглия или микроглия в „състояние на покой“. Изучаването на тази клетъчна популация обаче показва, че тя всъщност никога не е в покой, а чрез своите движещи се израстъци непрекъснато сканира мозъчната тъкан с цел да установи промяна в хомеостазата. Така една от основните ѝ функции е да съхранява тъканния интегритет (17). При появата на увреждащ фактор микроглията в покой се трансформира в т.нар. активирана или амебовидна микроглия, която има по-голямо тяло и извършва амебовидни движения (Фиг. 1) (16).

Активираната микроглия може да елиминира клетъчни останки чрез фагоцитоза или да



Фиг. 1. Графично изображение на етапите в трансформирането на микроглията от „разклонена“, в състояние на покой, в амебовидна или активирана микроглия

освобождава различни биоактивни молекули, включващи имунни и неимунни фактори (18). При физиологични условия микроглията осъществява контакт с неврони, кръвоносни съдове и други глиални клетки чрез своите израстъци. В здравия мозък поддържа функцията на невроните чрез посочените два основни механизма: фагоцитоза и биохимични взаимодействия. Докато в миналото се е считало, че фагоцитозата се включва само при патологични състояния, то днес има натрупани доказателства, че микроглията фагоцитира клетъчни останки, генерирани от апоптоза в региони на възрастния мозък с активна невrogenеза (17,19,20). Обичайно процесът на фагоцитоза е съпроводен от освобождаването на антиинфламаторни цитокини, растежни и невротропни фактори и от ограничаване освобождаването на някои проинфламаторни цитокини (21). Интересно е да се отбележи, че фагозомите на микроглиалните клетки съдържат реактивни кислородни радикали (РКР), чрез които се осъществява фагоцитарната активност. При по-големи или невъзможни за поглъщане структури микроглиалните клетки освобождават токсични субстанции в извънклетъчното пространство, включително и РКР (22,23).

Установени са контакти на микроглията със синапси: чрез фагоцитоза микроглията отстранява непотребни синаптични елементи (17,19,21). Синаптичната пластичност и функцията на невроните се поддържат от микроглиални клетки благодарение на биохимични взаимодействия, които включват модулиране на невротрансмисията и секрецията на няколко ензима като матриксни металопроотеази (ММР) и тъканен плазминогенен активатор (tPA). Последните участват

в ремоделирането на извънклетъчния матрикс в областта на синапсите (17).

Активиране на микроглията при исхемична мозъчна увреда

В процеса на активиране микроглията претърпява специфични морфологични промени: хипертрофия на клетъчното тяло и ретрахиране и удебеляване на клетъчните израстъци (24). След активиране настъпват промени и в генома, клетките се поляризират и се получават няколко функционално различни подвида: М1 – класически активиран фенотип с проинфламаторна активност, и М2 – алтернативен активиран фенотип с противовъзпалително действие (7). Съществуват и субтипове М2а – реактивни микроглиални клетки, участващи в процесите на регенерация и възстановяване; М2б – субтип с имунорегулаторни способности и М2с – субтип с инхибиторно/деактивиращо действие. Това, което обединява М2 групата, е, че всички представители участват в тъканното възстановяване, докато М1 клетките имат подчертан цитотоксичен ефект (25). Тези промени в микроглиалния геном могат да бъдат доказани чрез имунохистохимично изследване (6).

Редица маркери се експресират предимно в активираната микроглия: CD45, МНСII, CD68 (26). За изучаването ѝ се използват маркерите Iba1, IB4, F4/80 и CD68. След локална мозъчна исхемия се установяват различни микроглиални фенотипове в зависимост от разположението на микроглията спрямо огнището на увреда и специфичната експресия на повърхностни клетъчни протеини. В зоната около инфаркта микроглиалните клетки са позитивни за Iba1 и негативни за CD68. В инфарктната зона микроглиални-

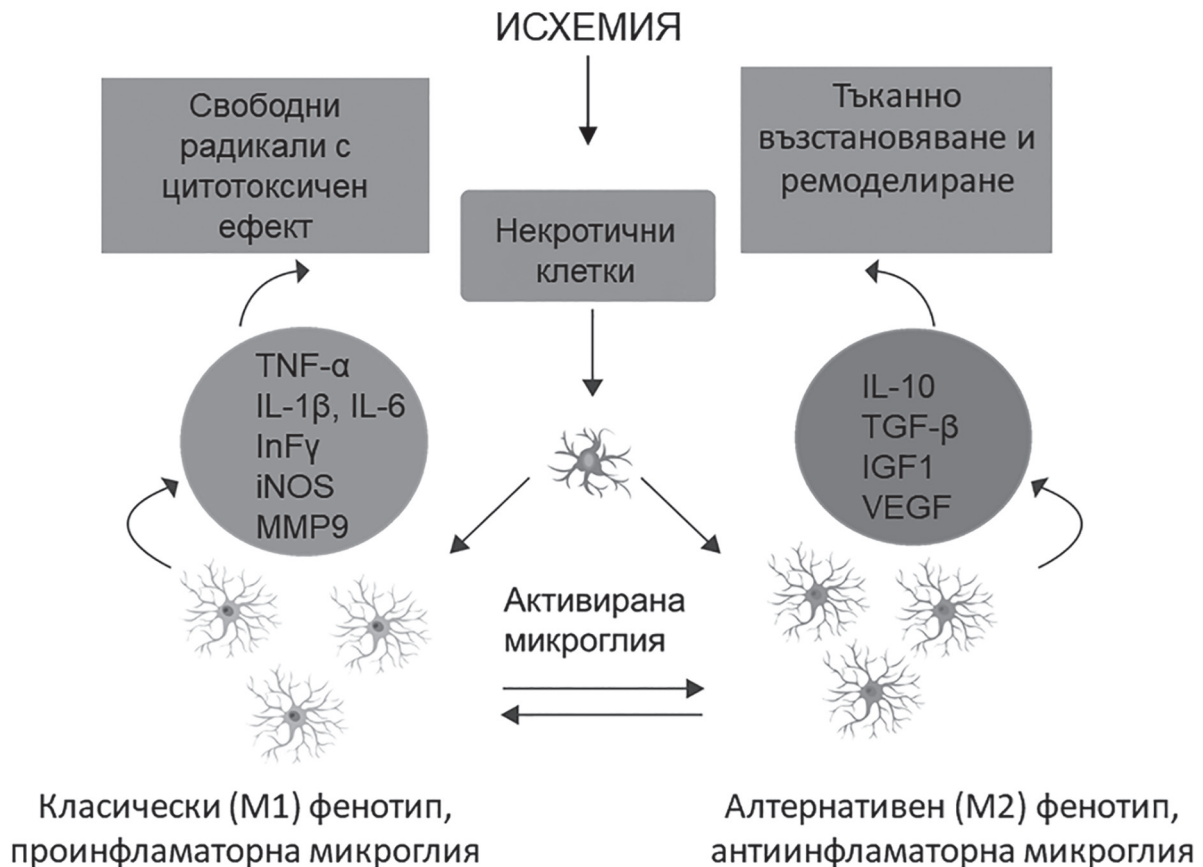
те клетки са позитивни за Iba1, CD68, като показват и повишена експресия на CD11b (27,28). Докато активираната микроглия в зоната на инфаркт има фагоцитарна активност и експресира основно МНСI (29), то микроглията в отдалечените от инсульта региони експресира МНСII и е свързана с невронална дегенерация (30,31).

Микроглията се активира минути след исхемичната мозъчна увреда (32). Активираната микроглия може да произвежда множество медиатори като inducible nitric oxide synthase (iNOS) (33), nitric oxide (NO) (34), проинфламаторни цитокини (TNF α) (35), антиинфламаторни цитокини (TNF β) (36), растежни и трофични фактори: insulin-like growth factor 1(IGF-I), basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophic factors (NT-3 и NT-4/5) и плазминоген (37). Въпросът дали тези биоактивни молекули имат протективен или аг-

равиращ увредата ефект при ИМИ все още не е напълно изяснен. От една страна активираната микроглия ускорява процеса на невронална дегенерация, отделяйки токсични субстанции, но от друга страна тя допринася за невроналната регенерация, произвеждайки растежни фактори (Фиг. 2) (38). Защитната функция се изразява също и във фагоцитиране на клетъчни остатъци от инфарктната зона (29).

Активиране на микроглията след ИМИ в експериментални животни и при човек

При експериментални животни след исхемична мозъчна увреда и последваща реперфузия микроглията претърпява морфологична трансформация, която засяга основно броя и дължината на нейните израстъци (28,39,40). При огнищен ИМИ (след оклузия на средна мозъчна артерия) в нормалната мозъчна кора на мишка е установено наличието на т.нар. „разклонена“ микроглия с тънки и дълги израстъци. Един до три дни след исхемията, предимно в периинфарктния



Фиг. 2. Схематична илюстрация на двойствената роля на активираната микроглия при мозъчна исхемия: класическият (M1) фенотип отделя проинфламаторни цитокини (TNF- α , IL-1 β , InF γ , IL-6, iNOS, MMP9), докато за алтернативния (M2) фенотип е характерно производството на антиинфламаторни и проангиогенни фактори (IL-10, TGF- β , IGF1, VEGF). Класическата микроглия има цитотоксичен ефект, докато алтернативната микроглия има имунорегулаторни и инхибиторни функции и участва в процесите на тъканно възстановяване и ремоделиране.

регион, се наблюдава т.нар. звездовидна микроглия с къси израстъци. На ден 6-и в зоните в близост до инфаркта се описва амевовидна микроглия с овално голямо тяло и без израстъци. Тези морфологични различия са свързани с различни функции на микроглиалните клетки, които могат да повлияят степента на увреда при определени обстоятелства (41). Наличието както на разклонена, така и на амевовидна микроглия около здрави и увредени неврони след ИМИ е потвърдено и от други изследвания (1,42).

Активирането на микроглията при човек е изучено благодарение на високотехнологични образни методи *in vivo*. Активирана микроглия се наблюдава в острата (43,44), подострата (45) и хроничната фаза на ИМИ (4). Активирана микроглия може да се открие в първите 24-48ч. след мозъчната исхемия, локализирана предимно в центъра на увредата и постепенно разпространяваща се към периферията (43,44). Клинично проучване, включващо шестима пациенти, от 3 до 150 дни след ИМИ показва, че активирана микроглия може да се наблюдава още на третия ден. На 28-ия ден при един от пациентите е установена активирана микроглия в зоната на инфаркта, която постепенно започва да се разпространява към периферията му, а след това и в контралатералната мозъчна половина (46). Друго проучване на четирима пациенти показва, че активирана микроглия е налична както в зоната на исхемичния инсулт, така и около нея още през първата седмица след инцидента, но броят на тези клетки постепенно намалява. След 14 седмици е установено, че повишеното количество на реактивната микроглия в периинфарктния регион персистира, докато в центъра на лезията то е по-малко (4).

При 18 пациенти с първи ИМИ субкортикално е регистриран различен клиничен изход, в зависимост от това дали активираната микроглия е локализирана предимно в инфарктната зона или около нея. Ефектът на активираната микроглия в ядрото на лезията е негативен, докато активирането на микроглията в периинфарктната зона корелира с положителен клиничен изход (47). Тези големи различия в резултатите от проучванията при човека показват, че въпросът дали реактивната микроглия има позитивен или негативен ефект върху възстановяването след ИМИ е все още дискусативен. Ето защо за неговото изясняване е необходимо натрупване на по-голямо количество клинични данни.

Молекулярни механизми за активиране на микроглията при ИМИ

Toll-like receptors (TLRs) са трансмембранны протеини, които имат определящо значение за иницирането на възпалителни реакции. В ЦНС те могат да бъдат активирани както от Damage-associated molecular patterns (DAMPs), така и от pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Това са молекули, които се отделят от некротичните клетки след мозъчна исхемия и отключват поредица от имунни реакции с участието на микроглията и астроцитите (48-51). Активираната микроглия може да произвежда проинфламаторни цитокини, да задълбочава невроналната увреда (52) и да подпомага невроналната апоптоза, но също така и да ограничава обема на инфарктното огнище (53-55). Така при ИМИ е установена повишена експресия на TLR2, TLR4, TLR9 (56,57). Следователно TLRs имат значение за активиране на микроглията при мозъчна исхемия, а действието е едновременно проинфламаторно и невропротективно (51).

Notch-сигналният път се индуцира от инфламаторни цитокини (58). Той стимулира поляризацията на M1 микроглията и инхибира активирането на M2 в експериментални условия след ИМИ, което води до задълбочаване на мозъчната увреда (59,60). При действието на инхибитори на Notch-сигнализацията се наблюдава противоположен ефект – мозъчната увреда се ограничава (61).

Други молекули, които биха могли да имат отношение към активирането на микроглията след исхемична увреда, са хистамин и субстанция P (62), secreted protein lipocalin 2 (LCN2) (63), mitogen-activated protein kinase (MAPK), AMP-activated protein kinase (AMPK) (64), programmed cell death protein 1 (PD1) (65), interferon regulatory factors (IRFs) (56,66), microRNAs (26,67), транскрипционният фактор p53 (59), peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR γ) (68). В заключение може да се каже, че промените, които настъпват в микроглиалните клетки след ИМИ са комплексни, многостъпални и ненапълно проучени.

Роля на микроглията при ИМИ: кръвно-мозъчна бариера и взаимоотношения с ендотелните клетки

Налични са доказателства, че микроглията може да участва в процеса на ангиогенеза. По време на ИМИ микроглията е със специфично разположение спрямо кръвоносните съдове – образува периваскуларни „маншонни“ и струпвания около тях (69). Чрез *in vivo* експериментални проучвания е доказано, че при нарушаване целостта на КМБ микроглията се активира и започва да

формира протрузии към прилежащите кръвоносни съдове (70). Именно тази микроглия фагоцитира ендотелни клетки (69,71). Реконструкцията на кръвоносните съдове след ИМИ от микроглията се осъществява и с помощта на отделяния от нея vascular endothelial growth factor (VEGF), който е с проангиогенен ефект. Количеството му около инфаркта е увеличено, което води до стимулиране образуването на нови кръвоносни съдове (72,73). Това е свързано с изливане на компоненти на кръвния серум в мозъчната тъкан, стимулиращи фагоцитарната активност на намиращата се тук микроглия и действащи като хемоатрактант за отдалечената микроглия, която мигрира и също фагоцитира увредени кръвоносни съдове (69). Нарушеният интегритет на ендотелните клетки води до отделяне на ендотелни фактори, които повишават пропускливостта за левкоцити в зоната на увреда (74).

Първата стъпка при образуването на нови кръвоносни съдове е ендотелната пролиферация, която се влияе от про- и антиинфламаторни цитокини: TGF- α я стимулира, а TGF- β я инхибира (75,76). По време на острата и подостра фаза на инсулта именно антиинфламаторната микроглия, секретиреща TGF- β , е разположена предимно в исхемичния участък (77). Проангиогенни фактори, отделяни от M2 глията, са VEGF и matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (75). Докато микроглията в покой създава среда, която инхибира ендотелната пролиферация, то активираната микроглия има противоположно действие (76). Демонстрирано е, че след инсулт дезинтегритетът на КМБ се поддържа и от проинфламаторни фактори като TNF α , IL-1 β и IL-6, отделяни от M1 микроглията (78).

Роля на микроглията при ИМИ: неврогенеза, синаптогенеза и взаимоотношения с невроните

Редица проучвания сочат, че ИМИ стимулира неврогенезата както при гризачи (79,80), така и при примати (81-83). Според някои изследвания в ипсилатералната субвентрикулна зона (СВЗ) активираната микроглия с клетъчни израстъци подпомага миграцията на невронални прекурсорни клетки, докато амебовидната микроглия в периинфарктната зона може да оказва неблагоприятен ефект върху неврогенезата. В СВЗ по време на хроничната фаза на инсулта се установява струпане на микроглия от проневрогенен фенотип, експресираща IGF-1, което подсказва нейната подпомагаща роля (84). Някои микроглиални проинфламаторни фактори, като TNF α , могат също да подпомагат невроналната проли-

ферация и диференциация (85). Други изследвания обаче показват, че микроглията няма отношение към процеса на неврогенеза (86).

Според съвременни експерименти микроглията участва в ремоделирането на синаптичните контакти по време на ембрионалното развитие (87,88) и подпомага синаптичното узряване (89,90). Един от основните медиатори с невротоксично действие, който се отделя при ИМИ, е NADPH оксидаза. Този инфламаторен стимул активира микроглията, която от своя страна предизвиква дългосрочно инхибиране на синапсите (91). Следователно микроглията може да повлиява функцията на невроналните вериги след ИМИ.

Невроналната увреда при ИМИ усилва фагоцитарната активност на микроглията. Последната отделя невротрансмитери и модулатори, които повлияват невроналната функция (92-94), но е доказано, че тази роля е двойствена: активираната микроглия подпомага оцеляването на невроните (84), но в същото време безконтролната активация на микроглията може да доведе до отделяне на цитотоксични фактори като супероксиди (95-97), азотен оксид (98) и TNF- α (99). Глутаматът, който се отделя от активираната микроглия, допринася за невроналната увреда, тъй като е невротоксичен (100). Микроглията притежава рецептор (CX3CR1) за хемокинът фракталкин (CX3CL1), който се секретира от невроните. CX3CR1/CX3CL1 сигналният път е отговорен за хемотаксиса на микроглията, нейната активация (101) и микроглия-медираната невротоксичност (102). Така секретираният LCN2 (Lipocalin 2) действа по автокринен начин и функционира като регулатор на микроглиалната апоптоза (103). От друга страна, неотдавнашно проучване показва, че увредени неврони секретират LCN2 като сигнал за „помощ“ и стимулират M1 микроглията (104). Съществуват и други механизми на взаимодействие между неврони и микроглиални клетки в ЦНС след мозъчна увреда, детайлното проучване на които е подходящ терен за създаване на нови терапевтични подходи за постигане на невронална регенерация.

Роля на микроглията при ИМИ: взаимоотношения с другите глиални клетки

В миналото се е считало, че астроцитите и олигодендроцитите са клетки с предимно механична функция, докато днес е известно, че те активно взаимодействат с другите клетки в ЦНС както в норма, така и при патологични състояния (105). След ИМИ както астроцитите, така и микроглията се активират. Микроглията реаги-

ра първа и модулира астроглиозата след мозъчна увреда или като я стимулира, или като я ограничава (106). От своя страна, астроцитите могат да активират отдалечената микроглия, секретират проинфламаторни цитокини. Медиатори, които допринасят за тези взаимодействия, са IL-1 β , калциевият сигнален път, АТР, цитоплазменият калций-свързващ S100 β протеин (107-109). Двата клетъчни типа си взаимодействат и при отстраняването на увредени неврони. Хроничната мозъчна хипоперфузия при експериментите с плъхове показва, че израстъците на астроцитите могат да инфилтрират телата на увредените неврони и заедно с активираната микроглия да образуват „триада“ от израстъци около тях. Тези „триади“ задълбочават исхемичната увреда и могат да бъдат причина за увеличаване степента на невродегенерация (110).

При физиологични условия микроглията има минимален контакт с олигодендроцитите. След активиране обаче тя започва да произвежда TNF, който е цитотоксичен за олигодендроцитите, като тяхното унищожаване може да бъде подпомогнато и от комплемента (111). Свърх продукция на азотен оксид и iNOS от Iba1 позитивната микроглия е също токсична за олигодендроцитите (112). Проучвания сочат, че взаимодействията между микроглията и олигодендроцитите могат да бъдат благоприятни или неблагоприятни и това зависи от степента на развитие на олигодендроцитите. Активираната микроглия е вредна за олигодендроцитните прогениторни клетки, но подобрява преживяемостта на зрелите олигодендроцити (113). При ИМИ зрелите олигодендроцити са устойчиви на исхемична увреда и се струпват по границата с инфарктната зона, за да участват в тъканното възстановяване (114).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Една от основните функции на микроглията е да поддържа хомеостазата в здравата мозъчна тъкан, „сканирайки“ непрекъснато заобикалящата я среда със своите израстъци. При ИМИ микроглията допринася както за задълбочаване на исхемичната увреда, така и за процеса на регенерация на мозъчната тъкан. Микроглията може да увеличи размера на инфарктната зона като обостри възпалителния отговор, в същото време може да стимулира възстановителни процеси и реакции. Съвременни проучвания доказваха пластичната природа на микроглията, която приема функционално различни фенотипове в увредената мозъчна тъкан. Активи-

раната микроглия влиза в сложни взаимоотношения и с други клетъчни видове: неврони, астроцити, олигодендроцити, ендотелни клетки. Тя играе важна роля в процесите на ангиогенеза, неврогенеза, синаптогенеза, невропротекция, модулиране на астроцитната активност и поддържане на олигодендроцитната популация след ИМИ. Всички изброени взаимодействия и процеси представляват сложна система, която изисква прецизна регулация от редица биоактивни молекули. Тяхното познаване в детайли е база за разработване на различни методи за ограничаване размера на лезията след мозъчна исхемия или подпомагане на тъканното възстановяване. Необходими са обаче допълнителни проучвания, преди тези познания за микроглията да намерят реално практическо приложение.

Финансиране: Разработката е финансирана по проект № 19-25, 2019 г. на Фонд „Наука“ на МУ-Варна: „Астроцитна хетерогенност и експресия на транскрипционен фактор ZBTB20 в глиални субпопулации на човешки теленецфалон“.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perego, C., S. Fumagalli, and M.G. De Simoni, Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation*, 2011. 8: p. 174.
2. Chen, G., et al., Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain: Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes. *Neurosci Bull*, 2018. 34(1): p. 98-108.
3. Fang, X., et al., MiR-30a Positively Regulates the Inflammatory Response of Microglia in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurosci Bull*, 2017. 33(6): p. 603-615.
4. Gulyas, B., et al., Evolution of microglial activation in ischaemic core and peri-infarct regions after stroke: a PET study with the TSPO molecular imaging biomarker ((11)C) vinpocetine. *J Neurol Sci*, 2012. 320(1-2): p. 110-7.
5. Perego, C., S. Fumagalli, and M.G. De Simoni, Three-dimensional confocal analysis of microglia/macrophage markers of polarization in experimental brain injury. *J Vis Exp*, 2013(79).
6. Hu, X., et al., Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*, 2015. 11(1): p. 56-64.
7. Prinz, M. and J. Priller, Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to

- neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, 2014. 15(5): p. 300-12.
8. Cuadros, M.A. and J. Navascues, The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*, 1998. 56(2): p. 173-89.
 9. Alliot, F., et al., Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(4): p. 1541-5.
 10. Chan, W.Y., S. Kohsaka, and P. Rezaie, The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, 2007. 53(2): p. 344-54.
 11. Perry, V.H., D.A. Hume, and S. Gordon, Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 1985. 15(2): p. 313-26.
 12. Ginhoux, F., et al., Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 2010. 330(6005): p. 841-5.
 13. Beattie, E.C., et al., Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, 2002. 295(5563): p. 2282-5.
 14. Rezaie, P., et al., Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex*, 2005. 15(7): p. 938-49.
 15. Fujimoto, E., A. Miki, and H. Mizoguti, Histochemical study of the differentiation of microglial cells in the developing human cerebral hemispheres. *J Anat*, 1989. 166: p. 253-64.
 16. Kettenmann, H., et al., Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 2011. 91(2): p. 461-553.
 17. Tremblay, M.E., et al., The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, 2011. 31(45): p. 16064-9.
 18. Lampron, A., A. Elali, and S. Rivest, Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron*, 2013. 78(2): p. 214-32.
 19. Ji, K., J. Miyauchi, and S.E. Tsirka, Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plast*, 2013. 2013: p. 627325.
 20. Paolicelli, R.C., K. Bisht, and M.E. Tremblay, Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci*, 2014. 8: p. 129.
 21. Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 119-45.
 22. Wink, D.A., et al., Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(6): p. 873-91.
 23. Rosas, M., et al., The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol*, 2008. 181(5): p. 3549-57.
 24. Kreutzberg, G.W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 1996. 19(8): p. 312-8.
 25. Chhor, V., et al., Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*, 2013. 32: p. 70-85.
 26. Ponomarev, E.D., T. Veremeyko, and H.L. Weiner, MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia*, 2013. 61(1): p. 91-103.
 27. Ito, D., et al., Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*, 2001. 32(5): p. 1208-15.
 28. Morrison, H.W. and J.A. Filosa, A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*, 2013. 10: p. 4.
 29. Stoll, G., S. Jander, and M. Schroeter, Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*, 1998. 56(2): p. 149-71.
 30. Block, F., M. Dihne, and M. Loos, Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol*, 2005. 75(5): p. 342-65.
 31. Morioka, T., A.N. Kalehua, and W.J. Streit, Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol*, 1993. 327(1): p. 123-32.
 32. Nakajima, K. and S. Kohsaka, Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2004. 4(1): p. 65-84.
 33. Iadecola, C. and M.E. Ross, Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 835: p. 203-17.
 34. Gibson, C.L., T.C. Coughlan, and S.P. Murphy, Glial nitric oxide and ischemia. *Glia*, 2005. 50(4): p. 417-426.
 35. Lambertsen, K.L., et al., Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci*, 2009. 29(5): p. 1319-30.
 36. Iadecola, C. and J. Anrather, The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 2011. 17(7): p. 796-808.
 37. Elkabes, S., E.M. DiCicco-Bloom, and I.B. Black, Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*, 1996. 16(8): p. 2508-21.
 38. Madinier, A., et al., Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, 2009. 4(12): p. e8101.

39. Korematsu, K., et al., Microglial response to transient focal cerebral ischemia: an immunocytochemical study on the rat cerebral cortex using anti-phosphotyrosine antibody. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994. 14(5): p. 825-30.
40. Korzhevskii, D.E., et al., (Morphological types of activated microglia in the hippocampus observed following transient total brain ischemia). *Morfologiya*, 2012. 142(5): p. 30-3.
41. Schroeter, M., et al., Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke*, 1997. 28(2): p. 382-6.
42. Zhang, Z., M. Chopp, and C. Powers, Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*, 1997. 744(2): p. 189-98.
43. Krupinski, J., et al., Immunocytochemical studies of cellular reaction in human ischemic brain stroke. MAB anti-CD68 stains macrophages, astrocytes and microglial cells in infarcted area. *Folia Neuropathol*, 1996. 34(1): p. 17-24.
44. Tomimoto, H., et al., Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta Neuropathol*, 1996. 92(3): p. 281-7.
45. Price, C.J., et al., Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke*, 2006. 37(7): p. 1749-53.
46. Gerhard, A., et al., Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a (11C)(R)-PK11195 PET study. *Neuroimage*, 2005. 24(2): p. 591-5.
47. Thiel, A., et al., The temporal dynamics of poststroke neuroinflammation: a longitudinal diffusion tensor imaging-guided PET study with 11C-PK11195 in acute subcortical stroke. *J Nucl Med*, 2010. 51(9): p. 1404-12.
48. Lehnardt, S., Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 2010. 58(3): p. 253-63.
49. Jack, C.S., et al., TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*, 2005. 175(7): p. 4320-30.
50. Olson, J.K. and S.D. Miller, Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*, 2004. 173(6): p. 3916-24.
51. Gulke, E., M. Gelderblom, and T. Magnus, Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018. 11: p. 1756286418774254.
52. Kilic, U., et al., TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 2008. 31(1): p. 33-40.
53. Ziegler, G., et al., TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 359(3): p. 574-9.
54. Cao, C.X., et al., Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 353(2): p. 509-14.
55. Hua, F., et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res*, 2009. 1262: p. 100-8.
56. Zhao, S.C., et al., Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol Sin*, 2017. 38(4): p. 445-458.
57. Ji, Y., et al., Temporal pattern of Toll-like receptor 9 upregulation in neurons and glial cells following cerebral ischemia reperfusion in mice. *Int J Neurosci*, 2016. 126(3): p. 269-77.
58. Ando, K., et al., Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene*, 2003. 22(49): p. 7796-803.
59. Jayadev, S., et al., Transcription factor p53 influences microglial activation phenotype. *Glia*, 2011. 59(10): p. 1402-13.
60. Liu, H.C., et al., N9 microglial cells polarized by LPS and IL4 show differential responses to secondary environmental stimuli. *Cell Immunol*, 2012. 278(1-2): p. 84-90.
61. Wei, Z., et al., Notch activation enhances the microglia-mediated inflammatory response associated with focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2011. 42(9): p. 2589-94.
62. Zhu, J., et al., Activation of microglia by histamine and substance P. *Cell Physiol Biochem*, 2014. 34(3): p. 768-80.
63. Jang, E., et al., Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB J*, 2013. 27(3): p. 1176-90.
64. Zhou, X., et al., CaMKKbeta-dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 21(12): p. 1741-58.
65. Yao, A., et al., Programmed death 1 deficiency induces the polarization of macrophages/microglia to the M1 phenotype after spinal cord injury in mice. *Neurotherapeutics*, 2014. 11(3): p. 636-50.
66. Escalante, C.R., et al., Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 103-6.
67. Zhao, H., et al., MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation. *Stroke*, 2013. 44(6): p. 1706-13.
68. Pisanu, A., et al., Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment

- in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2014. 71: p. 280-91.
69. Jolivel, V., et al., Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol*, 2015. 129(2): p. 279-95.
 70. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 2005. 308(5726): p. 1314-8.
 71. Lou, N., et al., Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(4): p. 1074-9.
 72. Zhang, Z.G., et al., VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 2000. 106(7): p. 829-38.
 73. Xie, L., et al., Vascular endothelial growth factor-B expression in postischemic rat brain. *Vasc Cell*, 2013. 5: p. 8.
 74. Hayashi, T., et al., Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. 23(2): p. 166-80.
 75. Kanazawa, M., et al., Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 42582.
 76. Welser, J.V., L. Li, and R. Milner, Microglial activation state exerts a biphasic influence on brain endothelial cell proliferation by regulating the balance of TNF and TGF-beta1. *J Neuroinflammation*, 2010. 7: p. 89.
 77. Li, Y., et al., Ephrin-A3 and ephrin-A4 contribute to microglia-induced angiogenesis in brain endothelial cells. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014. 297(10): p. 1908-18.
 78. Pan, W. and A.J. Kastin, Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol*, 2007. 83(6): p. 363-74.
 79. Stoyanova, I.I., et al., Ghrelin Regulates Expression of the Transcription Factor Pax6 in Hypoxic Brain Progenitor Cells and Neurons. *Cells*, 2022. 11(5): p. 24.
 80. Stoyanova, I.I., D. Lutz, and J. le Feber, Anatomical Society Summer Meeting Glasgow 2021: Cutting Edge Anatomy. *J Anat*, 2022. 240(4): p. 816-817.
 81. Tsai, Y.W., et al., Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos expression and reverses spatial memory deficits in rats. *PLoS One*, 2011. 6(8): p. e24001.
 82. Arvidsson, A., et al., Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 2002. 8(9): p. 963-70.
 83. Tonchev, A.B., Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates. *Arch Ital Biol*, 2011. 149(2): p. 225-31.
 84. Thored, P., et al., Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 2009. 57(8): p. 835-49.
 85. Choi, J.Y., et al., M2 Phenotype Microglia-derived Cytokine Stimulates Proliferation and Neuronal Differentiation of Endogenous Stem Cells in Ischemic Brain. *Exp Neurobiol*, 2017. 26(1): p. 33-41.
 86. Heldmann, U., et al., Selective depletion of Mac-1-expressing microglia in rat subventricular zone does not alter neurogenic response early after stroke. *Exp Neurol*, 2011. 229(2): p. 391-8.
 87. Lauro, C., et al., Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic molecule? *Ann N Y Acad Sci*, 2015. 1351: p. 141-8.
 88. Wu, Y., et al., Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol*, 2015. 36(10): p. 605-613.
 89. Parkhurst, C.N., et al., Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 2013. 155(7): p. 1596-609.
 90. Miyamoto, A., et al., Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12540.
 91. Zhang, J., et al., Microglial CR3 activation triggers long-term synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase. *Neuron*, 2014. 82(1): p. 195-207.
 92. Wu, L.J., Voltage-gated proton channel Hv1 in microglia. *Neuroscientist*, 2014. 20(6): p. 599-609.
 93. Tian, D.S., et al., Deficiency in the voltage-gated proton channel Hv1 increases M2 polarization of microglia and attenuates brain damage from photothrombotic ischemic stroke. *J Neurochem*, 2016. 139(1): p. 96-105.
 94. Tikamdas, R., et al., Ischemia-responsive protein 94 is a key mediator of ischemic neuronal injury-induced microglial activation. *J Neurochem*, 2017. 142(6): p. 908-919.
 95. Wu, L.J., et al., The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat Neurosci*, 2012. 15(4): p. 565-73.
 96. Wu, L.J., Microglial voltage-gated proton channel Hv1 in ischemic stroke. *Transl Stroke Res*, 2014. 5(1): p. 99-108.
 97. Liu, J., et al., Microglial Hv1 proton channel promotes cuprizone-induced demyelination through oxidative damage. *J Neurochem*, 2015. 135(2): p. 347-56.
 98. Moss, D.W. and T.E. Bates, Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and

- interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur J Neurosci*, 2001. 13(3): p. 529-38.
99. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(1): p. 57-69.
100. Takeuchi, H., et al., Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 2006. 281(30): p. 21362-21368.
101. Mizuno, T., et al., Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*, 2003. 979(1-2): p. 65-70.
102. Cardona, A.E., et al., Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*, 2006. 9(7): p. 917-24.
103. Lee, S., et al., A dual role of lipocalin 2 in the apoptosis and deramification of activated microglia. *J Immunol*, 2007. 179(5): p. 3231-41.
104. Xing, C., et al., Neuronal production of lipocalin-2 as a help-me signal for glial activation. *Stroke*, 2014. 45(7): p. 2085-92.
105. Petrovic-Djergovic, D., S.N. Goonewardena, and D.J. Pinsky, Inflammatory Disequilibrium in Stroke. *Circ Res*, 2016. 119(1): p. 142-58.
106. Rohl, C., R. Lucius, and J. Sievers, The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res*, 2007. 1129(1): p. 43-52.
107. Liu, W., Y. Tang, and J. Feng, Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*, 2011. 89(5-6): p. 141-6.
108. Saijo, K., et al., A Nurrl/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*, 2009. 137(1): p. 47-59.
109. Vallejo, R., et al., The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract*, 2010. 10(3): p. 167-84.
110. Quintas, C., et al., Microglia P2Y(6) receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J Neuroinflammation*, 2014. 11: p. 141.
111. Zajicek, J.P., et al., Interactions between oligodendrocytes and microglia. A major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing. *Brain*, 1992. 115 (Pt 6): p. 1611-31.
112. Merrill, J.E., et al., Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol*, 1993. 151(4): p. 2132-41.
113. Miller, B.A., et al., Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro. *J Neuroinflammation*, 2007. 4: p. 28.
114. Mabuchi, T., et al., Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2000. 31(7): p. 1735-43.

Адрес за кореспонденция:

Виктория Михайлова
Катедра „Анатомия и клетъчна биология“
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна, 9002
e-mail: Viktoriya.Mihaylova@tu-varna.bg