

РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ТРАНСКРИПТОМИКА ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2023.15.6.08

УДК 616.832–001:575.1

Поступила 30.08.2023 г.

© Ю.А. Чельшев, д.м.н., профессор кафедры гистологии¹;
И.Л. Ермолин, д.б.н., профессор кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, Республика Татарстан, 420008;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005

Для понимания фундаментальных механизмов функционирования спинного мозга необходимо выявить полный набор клеточных типов и образуемых ими популяций, которые могут быть идентифицированы по уникальному сочетанию признаков. Технологии секвенирования РНК отдельной клетки и отдельного клеточного ядра служат эффективными инструментами для определения роли клеток разных типов в нормальных и патологических реакциях в спинном мозге. Пространственная транскриптомика сочетает эти технологии с методами получения и сохранения пространственной информации о клетках в ткани, что позволяет более точно локализовать область повреждения, детально охарактеризовать тканевые компартменты в конкретной анатомической области и анализировать патологическую картину на клеточном и молекулярном уровне.

Созданные на основе данных РНК-секвенирования отдельной клетки и отдельного клеточного ядра атласы развития технологий РНК-секвенирования и пространственной транскриптомики открывают большие возможности для формулирования новых перспективных концепций, касающихся механизмов реорганизации нейронных связей и восстановления сенсомоторных функций при травме спинного мозга. Полученные транскриптомы явились мощным ресурсом для выяснения новых функций клеток нервной ткани. С целью установления терапевтических мишеней выявляемое молекулярное разнообразие в нейронах разных типов позволяет отслеживать и сравнивать их уязвимость и регенераторный потенциал. Для выяснения причин селективной уязвимости клеток при травме спинного мозга важно располагать детальной информацией о специфике клеточных популяций у человека в сопоставлении с известными данными, полученными на экспериментальных моделях.

В предлагаемом обзоре обобщены достижения по идентификации и изучению характеристик клеток в травмированном спинном мозге на основе транскрипционного профилирования на уровне отдельной клетки или отдельного клеточного ядра.

Ключевые слова: травма спинного мозга; РНК-секвенирование; пространственная транскриптомика.

Как цитировать: Chelyshev Yu.A., Ermolin I.L. RNA sequencing and spatial transcriptomics in traumatic spinal cord injury (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(6): 75, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.6.08>

English

RNA Sequencing and Spatial Transcriptomics in Traumatic Spinal Cord Injury (Review)

Yu.A. Chelyshev, MD, DSc, Professor, Department of Histology¹;

I.L. Ermolin, DSc, Professor, Department of Histology with Cytology and Embryology²

¹Kazan Federal University, 18 Kremlyovskaya St., Kazan, the Republic of Tatarstan, 420008, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

In order to understand the fundamental mechanisms of the spinal cord functioning, it is necessary to reveal a complete set of cell types and their populations, which can be identified by the unique combination of their features. The technologies of single-cell and single-nucleus RNA sequencing serve as effective tools for determining the role of various types of cells in normal and pathological reactions in the spinal

Для контактов: Ермолин Игорь Леонидович, e-mail: ermolinigor@mail.ru

cord. Spatial transcriptomics combines these technologies with the methods of obtaining and saving spatial information about cells in the tissue, which allows one to localize more precisely the injured area, characterize in detail the tissue compartments in the specific anatomical region, and analyze the pathological picture at the cellular and molecular level.

Atlases of development of RNA-sequencing technologies and spatial transcriptomics created on the basis of the data from single-cell and single-nucleus RNA sequencing open great opportunities for new perspective concepts concerning the mechanisms of rearranging neural connections and restoration of sensorimotor functions in traumatic spine injury. The transcriptomes obtained were a powerful resource for detecting new functions of the nervous tissue cells. To establish therapeutic targets, the detected molecular diversity in neurons of various types enables tracing and comparing their susceptibility and regenerative potential. Determination of causes of selective cell susceptibility in spinal cord injury needs comprehensive information on the specificity of human cell populations in comparison with the known data obtained on the experimental models.

In the present review, we have summarized advances in identification and study of cell characteristics in a traumatized spinal cord based on transcription profiling at a single-cell or single-nucleus level.

Key words: spinal cord injury; RNA sequencing; spatial transcriptomics.

Введение

Процессирование сенсорной информации и локомоторные реакции в спинного мозга контролируются нейронными сетями, объединяющими клетки многих типов [1–3]. Для установления клеточных коррелятов поведенческих реакций важно иметь представление о конкретных типах клеток, образующих нейронную сеть. Решение этой задачи оказалось возможным в результате разработки и применения технологий секвенирования РНК (RNA-seq) отдельной (единичной) клетки (scRNA-seq) или отдельного ядра (snRNA-seq) — эффективного инструмента для понимания роли клеток разных типов в нормальных и патологических реакциях в нервной системе. Эти технологии позволяют представить распределение клеток конкретного типа, визуализируя экспрессию генов в контексте тканевой структуры (пространственная транскриптомика).

Исследование J.D. Saïou с соавт. [4] послужило концептуальным и технологическим прорывом в нейронауках как первая, основанная на транскриптомных профилях классификация популяций клеток ЦНС, созданная по результатам исследований с использованием технологии микрочипов. Полученные транскриптомы явились мощным инструментом для понимания новых функций клеток нервной ткани. В дальнейшем эта классификация клеток ЦНС была уточнена и дополнена с помощью технологий scRNA-seq/snRNA-seq и пространственной транскриптомики.

Понимание фундаментальных механизмов функционирования спинного мозга требует выявления полного набора типов клеток и образуемых ими популяций, которые могут быть идентифицированы по уникальному сочетанию характеристик. Конкретный тип спинальных клеток характеризуется многими параметрами, такими как локализация, структура, цитогенез, электрофизиологические свойства, вовлеченность в формирование сетей, паттерны экспрессии генов и участие в поведенческих реакциях [5]. Для идентификации клеток конкретного типа необязательно допускать наличие в них полного набора характер-

ных признаков, но их сочетание лежит в основе клеточной идентичности.

При пробоподготовке материала для scRNA-seq ферментативное расщепление приводит к разрушению синаптических структур и гибели нейронов. snRNA-seq по сравнению с scRNA-seq может свести к минимуму образование псевдоклеточных структур, индуцированных ферментативным гидролизом и механическим повреждением. Кроме того, предполагается, что snRNA-seq позволяет собрать информацию об интронах и межгенных областях и охарактеризовать более редкие типы клеток. Однако, хотя snRNA-seq позволяет получить более полную информацию о типах клеток, для характеристики некоторых типов клеток, например иммунных, более приемлемой оказалась технология scRNA-seq [6, 7].

Методика РНК-секвенирования включает следующие этапы: 1) диссоциация ткани и получение отдельных клеток; 2) амплификация нуклеиновых кислот; 3) высокопроизводительное секвенирование; 4) анализ данных. Детальная характеристика и подводные камни каждого этапа рассмотрены в работах [8–13].

Пространственная транскриптомика сочетает scRNA-seq с методами получения и сохранения пространственной информации в ткани. Этот подход позволяет точно локализовать область повреждения и рассматривать его патогенез на клеточном уровне [14]. По сравнению со стандартной технологией scRNA-seq разрешение и эффективность обнаружения генов в ходе пространственной транскриптомики пока недостаточны, но алгоритмы биоинформатики позволяют обеспечить желаемое приближение.

Методы пространственной транскриптомики применяются для создания карт (атласов) экспрессии генов в любых тканевых компартментах. Подобные гармонизированные атласы транскрипции клеточных типов и их пространственного распределения уже созданы для спинного мозга мышей [15–17]. В них для изучения клеток разных типов как *in vivo*, так и *in vitro* привлечена большая панель маркеров, представлены предполагаемые эмбриональные линии для каждого типа клеток, мобилизованы вычислительные ресурсы

для классификации клеток спинного мозга на основе транскриптомики, позволяющие исследователям легко взаимодействовать и анализировать данные о конкретных клетках спинного мозга [17]. Подобные атласы могут служить универсальной номенклатурой и клеточных типов, и набора молекулярных маркеров, которые вместе наиболее детально характеризуют тканевые компартменты в конкретной анатомической области.

Технологии scRNA-seq/snRNA-seq играют важную роль для установления стандартного набора типов клеток в спинном мозге и понимания молекулярных механизмов патологических сдвигов в этом органе. Такие технологии позволяют проводить скрининг дифференциально экспрессируемых генов в разные сроки после травмы спинного мозга (ТСМ). Так, при контузионной ТСМ на уровне Th8 у крысы количество генов, активность которых значительно изменилась, составило 944, 1362 и 1421 через 1, 4 и 7 сут после нанесения травмы соответственно [18]. При помощи scRNA-seq выявлены сотни молекулярно различных типов клеток в нервной системе мыши и человека, чья функция определяется дифференциальной активностью генов и топографией клеток конкретных типов [16, 19, 20]. Использование технологии секвенирования совместно с пространственной транскриптомикой позволяет понять молекулярные основы онтогенетических истоков клеточного разнообразия в ЦНС [21–23].

В предлагаемом обзоре мы не будем углубляться в технологический аспект проблемы, а рассмотрим основные достижения технологий scRNA-seq/snRNA-seq и пространственной транскриптомики при ТСМ.

Поиск литературы проводили в базе данных PubMed по ключевым словам «травма спинного мозга», «РНК-секвенирование», «пространственная транскриптомика».

Спинальные нейроны

Спинальные нейроны характеризуются ярко выраженной гетерогенностью. Сформировано отчетливое представление о цитогенетических, структурных, цитохимических и функциональных характеристиках мотонейронов, интернейронов, проприоспинальных, холинергических, возбуждающих и тормозных нейронов [24–35]. Однако, как показали результаты недавних работ с scRNA-seq/snRNA-seq, все эти популяции по критерию дифференциальной экспрессии генов оказались еще более гетерогенными [15, 17, 36–38]. Информация о гетерогенности популяций спинальных нейронов имеет важное прикладное значение в отношении выявления менее и более уязвимых для повреждения нейронов (disease resistance) с целью поиска мишеней при травматическом повреждении и нейродегенеративных заболеваниях, например при боковом амиотрофическом склерозе [14, 39–41].

Результаты исследования спинного мозга с привлечением технологии RNA-seq позволили установить

определяющую роль топографии нейронных сетей в организации спинного мозга млекопитающих. Так, при помощи scRNA-seq определены основные различия между дорсальными и вентральными нейронами по критериям образования кластеров и дифференциальной экспрессии генов, контролирующей нейропластичность [17]. Это наблюдение принципиально важно для понимания различий в регенераторном потенциале нейронов конкретных популяций в условиях патологии. Дорсальные кластеры различаются по четко разделенным конкретным типам нейронов, которые легко группируются в семейства. Эти нейроны расположены на большом расстоянии друг от друга и могут быть надежно различимы. Напротив, вентральные кластеры нейронов в большей мере приближены друг к другу, с близким или перекрывающимся распределением в ткани и перекрывающимися паттернами экспрессии генов. Эти различия в структурной и молекулярной организации дорсального и вентрального отделов серого вещества спинного мозга могут лежать в основе специфики функционирования нейронных сетей в этих отделах. Более высокая пластичность связей в дорсальном отделе может быть следствием таких реакций, как центральная сенситизация, прогрессивное увеличение возбудимости ноцицептивных нейронов, долговременная потенциация, депрессия, которые сопровождают хроническую нейропатическую боль. В вентральном же отделе связи структурно более стабильны, о чем, в частности, свидетельствует высокая экспрессия генов, кодирующих синтез компонентов перинеурональных сетей, стабилизирующих синаптические связи и ограничивающих пластичность нейронов [17].

Данные scRNA-seq имеют фундаментальное значение в клеточной биологии, так как позволяют пересмыслить границы фенотипа и классическое определение принадлежности клеток к конкретному типу как клеток с идентичным набором разрешенных к экспрессии генов вне зависимости от того, транскрибируются они или нет.

В исследовании J.A. Blum с соавт. [37] в материале спинного мозга половозрелых мышей, обогащенном ядрами эфферентных нейронов, профилировано 43890 транскриптомов и дана детальная характеристика экспрессии генов с разрешением на уровне отдельной клетки. Эфферентные нейроны спинного мозга составляют всего 0,4% всех клеток в органе. Поэтому для профилирования транскриптомов в технологии snRNA-seq предварительно проведены активированные флуоресценцией сортировка и обогащение ядер. Холинергические нейроны были представлены 20 кластерами. При этом идентифицировано 16 кластеров симпатических нейронов, которые различались локализацией и экспрессией генов нейромодуляторной сигнализации, в том числе несколько кластеров, локализующихся в крестцовом отделе спинного мозга. Здесь автономные нейроны разных подтипов экспрессируют разные сочетания нейромодулирующих

пептидов, таких как соматостатин, нейротензин и проэнкефалин. Это исследование позволило выявить новые генетические маркеры, специфические для автономных и соматических мотонейронов, для α - и γ -мотонейронов, а также установить гетерогенность популяции γ -мотонейронов, разные подтипы которых экспрессируют различные транскрипционные программы [37].

Детально охарактеризованы различия в генных модулях в электрофизиологически и метаболически различных популяциях быстрых и медленных α -мотонейронов. Эти типы мотонейронов различаются по набору субъединиц калиевых каналов, которые контролируют потенциалы покоя и скорость возбуждения [24]. Выраженная транскрипционная гетерогенность соматических мотонейронов коррелирует с электрофизиологическими характеристиками и локализацией моторных пулов [37].

Гетерогенность популяций клеток в поясничном отделе сформированного после травмы спинного мозга мышей была детально охарактеризована при помощи snRNA-seq [15]. В этом исследовании секвенировано 17 354 ядра и обнаружено семь основных кластеров, которые представлены следующими типами клеток, идентифицированными по экспрессии маркеров: 52% — нейроны, 16% — олигодендроциты, 14% — смешанная популяция менингеальных и шванновских клеток, 9% — астроциты, 5% — сосудистые клетки, 1% — клетки-предшественницы олигодендроцитов и 1% — микроглия. Идентифицировано и молекулярно охарактеризовано 43 популяции нейронов, которые были неравномерно распределены по кластерам в различных отделах серого вещества. Так, 55% нейронов сосредоточены в 25 дорсальных кластерах, 34% — в вентральных кластерах и 11% нейронов располагались в 5 кластерах — в дорсальных рогах и в промежуточной зоне. Дорсальный отдел серого вещества содержит популяции клеток, которые различаются в большей мере экспрессией генов, в то время как вентральный отдел демонстрирует перекрывающиеся паттерны экспрессии генов [15].

Мотонейроны латерального двигательного ядра присутствуют в шейном и поясничном отделах спинного мозга и контролируют сокращения мышц конечностей, в то время как мотонейроны медиального двигательного ядра распределены по всей rostro-каудальной оси органа и связаны с аксиальной мускулатурой. У позвоночных молекулярная идентичность мотонейронов упомянутых ядер в целом известна. Тем не менее идентичность подтипов в этих клеточных популяциях, иннервирующих отдельные группы мышц, оставалась неясной. Ответ на этот вопрос получен с использованием snRNA-seq [38]. Мотонейроны медиального двигательного ядра подразделены на три подтипа, которые различаются по паттерну экспрессии генов *Satb2*, *Nr2f2* и *Bcl11b* и зависят от локализации нейронов по медиолатеральной оси и экспрессии молекул, контролирующей направленный рост аксонов.

При установлении терапевтических мишеней выявляемое молекулярное разнообразие позволяет отслеживать и сравнивать уязвимость и регенераторный потенциал нейронов разных подтипов в моделях повреждения ЦНС и нейродегенеративных заболеваний, например бокового амиотрофического склероза [40, 42]. Технологии scRNA-seq/snRNA-seq стали активно применяться для анализа молекулярных и клеточных механизмов патологических реакций и регенерации при TCM [11, 43–50].

Для выяснения причин селективной уязвимости клеток при патологии ЦНС важно располагать детальной информацией о специфике клеточных популяций у человека в сопоставлении с известными данными, полученными на экспериментальных моделях. При помощи snRNA-seq и пространственной транскриптомики в спинном мозге человека идентифицированы 29 кластеров глии и 35 кластеров нейронов [51], организованных главным образом по анатомическому принципу. Созданный на основе этих данных информационный ресурс актуален для клиники. Показано, что спинальные мотонейроны, которые дегенерируют при боковом амиотрофическом склерозе и прочих нейродегенеративных заболеваниях, по сравнению с другими спинальными нейронами экспрессируют гены, контролирующие размеры клетки и структуру цитоскелета, что предполагает наличие специализированного молекулярного репертуара, лежащего в основе их селективной уязвимости.

Для иллюстрации клинической значимости данных о РНК-секвенировании клеток спинного мозга у мышей с моделями нейродегенеративных заболеваний следует упомянуть интересные результаты J. Sun с соавт. [52]. В этой работе при помощи scRNA-seq у мышей с моделью спинальной мышечной атрофии наиболее выраженные сдвиги выявлены не в нейральных клетках, как ожидалось, а в субпопуляции фибробластов сосудов [52]. Численность клеток в этой субпопуляции существенно уменьшается, что приводит к дефектам сосудов с последующим угнетением энергетического метаболизма и синтеза белка.

Поясничный отдел вне зависимости от уровня повреждения спинного мозга представляет особый интерес для анализа посттравматических реакций и рассматривается как актуальная терапевтическая мишень [53, 54]. В первую очередь это связано с присутствием в этом отделе сетей интернейронов, образующих центральный генератор паттерна и контролирующих двигательную функцию [55, 56]. При TCM в поясничном отделе наряду с реорганизацией нисходящих двигательных путей [57] происходит перестройка нервных связей [58, 59]. Участие образующих эти сети конкретных интернейронов, их принадлежность к определенным классам предшественников, молекулярная специфичность и возможности модулирования фенотипа в ответ на повреждение остаются неясными. При решении комплекса этих вопросов при TCM технологии scRNA-

seq/snRNA-seq зарекомендовали себя как наиболее информативные.

Применение технологии snRNA-seq позволило получить при тяжелой контузионной ТСМ мыши принципиально новые данные о механизмах восстановления двигательной функции в ответ на эпидуральную электростимуляцию [48]. ТСМ в среднем грудном отделе вызывала полную дезинтеграцию волокон кортикоспинального тракта и выраженное уменьшение количества глутаматергических волокон ретикулоспинального тракта каудальнее области повреждения. В поясничном отделе из 82 093 ядер, подвергнутых транскриптомному анализу, 20 990 принадлежали нейронам, которые были распределены по 36 популяциям. Электростимуляция приводила к немедленной активации возбуждающих интернейронов, локализованных в промежуточных пластинках поясничного отдела, которые экспрессировали ген *Vsx2* (Visual System Homeobox 2) и маркер нейронов каудального отдела спинного мозга *Нох10* (Homeobox A10). С. Kathe и соавт. [48] в ходе изящных экспериментов удалось установить, что эти нейроны не участвуют в контроле шагания в интактном спинном мозге, но подключаются к восстановлению ходьбы после ТСМ. По мнению авторов, в клинике позитивный эффект эпидуральной электростимуляции на восстановление двигательной функции у 9 пациентов с ТСМ может быть связан с активацией именно этих интернейронов.

В поясничном отделе интактного спинного мозга мыши преобладает популяция нейронов (~21%). На модели тяжелой контузионной ТСМ мыши в грудном отделе при помощи snRNA-seq в поясничном отделе зарегистрировано отсутствие существенных изменений в соотношении количества популяций возбуждающих, тормозных и двигательных нейронов, которое составило соответственно 8:8:1 [49]. Однако при этом в данном отделе отмечены признаки усиления синаптической пластичности и увеличения чувствительности к действию нейротрансмиттеров, а также активация генов, кодирующих синтез их рецепторов, синаптогенез и ремоделирование синапсов.

При ТСМ в грудном отделе нейроны поясничного отдела в целом остаются сохранными в отличие от нейронов в эпицентре повреждения [60, 61]. Однако уже через неделю после ТСМ нейроны поясничного отдела демонстрируют сдвиги в экспрессии генов, кодирующих молекулы клеточного стресса, включая окислительно-восстановительные реакции и укладки (сворачивания) белка, а также молекулы опосредованной нейромедиаторами передачи сигналов и функционирования ионных каналов. При этом ряд популяций возбуждающих нейронов в дорсальных рогах и тормозных нейронов в вентральных рогах характеризуются изменением в организации синапсов и экспрессии генов, связанных с пластичностью [49]. После ТСМ в большинстве нейронов поясничного отдела угнетаются физиологические каскады и активируют-

ся гены, связанные с нейротрансмиссией и реструктурированием синапсов. В противоположность этим реакциям в нейронах двух конкретных популяций, а именно в *Shox2*-экспрессирующих V2d, а также в нейронах спинно-мозжечкового тракта после повреждения начинают экспрессироваться гены, ассоциированные с регенерацией (regeneration associated genes). Полученные при помощи РНК-секвенирования данные дают основание полагать, что принадлежащие к различным популяциям нейроны поясничных сетей могут демонстрировать специфические стратегии восстановления [49].

При ТСМ трансплантация в спинной мозг нейральных предшественников стимулирует регенерацию аксонов кортикоспинального тракта и восстановление двигательной функции [46, 62]. С целью выяснения молекулярных механизмов подобного действия проведен анализ регенераторного транскриптома (реверсия к эмбриональному состоянию) мотонейронов, локализованных в слое V двигательной коры, аксоны которых образуют кортикоспинальный тракт [46]. Только ТСМ, также как и травма в сочетании с трансплантацией нейральных предшественников, вызывают сходные ранние транскриптомные ответы в мотонейронах. Через 2 нед после ТСМ этот транскриптом угнетается, но при сочетании травмы с трансплантацией клеток он оказывается более устойчивым. Ген хантингина (*Htt*) является центральным геном-концентратором (хабом) в регенераторном транскриптоме, включающим ассоциированные с регенерацией гены и программы [63–67]. Делеция *Htt* значительно ослабляет регенерацию, что указывает на ключевую роль этого гена в пластичности нейронов после травмы [46].

Астроглия

Гетерогенность популяции астроцитов общепризнана [68–71]. Технология scRNA-seq существенно расширяет наши представления в этой области, позволяет получить новые данные о популяциях астроцитов в спинном мозге и их поведении при ТСМ [72]. Самым надежным маркером для идентификации астроцитов считается глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Технология scRNA-seq позволила идентифицировать популяции GFAP-экспрессирующих клеток у интактных, ложно оперированных и травмированных мышей с компрессией спинного мозга в каудальном грудном отделе. В острой и хронической стадиях выявлены популяции астроцитов, которые различались по экспрессии генов, в том числе контролирующих пролиферативную активность. При этом были идентифицированы астроциты, экспрессирующие только специфические для этого клеточного типа маркеры, а также астроциты, которые наряду со своими маркерами экспрессировали маркеры эпендимных клеток. Количество таких клеток со смешанной экспрессией значительно увеличивалось в острую фазу ТСМ, они были локализованы на отдалении от центрального

канала как у интактных, так и у травмированных мышей. Подобные астроцито-эпендимные клетки присутствовали как в белом, так и в сером веществе, но их количество в белом веществе преобладало [72]. В данном исследовании установлено (что оказалось неожиданным) увеличение в острой фазе количества таких клеток также и у ложно оперированных животных (только с ламинэктомией). Это наблюдение ставит вопрос об адекватности использования животных данной группы в качестве контрольных при ТСМ.

Молекулярный профиль, изменение длительности фаз клеточного цикла, сходная с радиальной глией морфология астроцито-эпендимных клеток с высокой экспрессией маркера стволовых клеток нестина [73] не только подтверждают данные о происхождении одной из популяций астроцитов из стволовой нейральной клетки, локализованной в эпендимном слое спинного мозга, но и указывают на присутствие подобных клеток в интактном спинном мозге [72]. Несмотря на способность дифференцироваться в астроциты [74] и олигодендроциты, эпендимные стволовые клетки при ТСМ кажутся в большей мере предрасположенными к образованию астроцитов, которые составляют примерно половину от общего числа астроцитов глиального рубца [75].

Олигодендроглия

Зрелые олигодендроциты также проявляют гетерогенность транскрипции, функциональные последствия которой неясны. Их неоднородность может коррелировать с влиянием микроокружения или взаимодействием с нейронами разных типов. Показано [44], что отдельные популяции олигодендроцитов в ЦНС млекопитающих отличаются пространственным расположением. Олигодендроциты типа 2 преобладают в спинном мозге, в то время как олигодендроциты типов 5 и 6 с возрастом увеличивают свой вклад в общую популяцию олигодендроцитов во всех исследованных отделах ЦНС. Олигодендроциты типов 2 и 5/6 различаются по присутствию в двигательных и сенсорных трактах. Предшественники олигодендроцитов в нейрогенезе кажутся неспецифицированными для дифференцировки в клетки этих популяций. Реактивность олигодендроцитов типа 2 и 5/6 при хронической ТСМ различается. Олигодендроциты типа 2 уменьшают свой вклад в популяцию олигодендроцитов в области повреждения и увеличивают его в областях дегенерации нервных волокон, особенно в хроническую фазу ТСМ [44]. Увеличение присутствия олигодендроцитов типов 5/6 в общей популяции в месте повреждения указывает на то, что в этой области активно действуют факторы, которые стимулируют резидентные предшественники олигодендроцитов к предпочтительной дифференцировке в олигодендроциты типов 5/6. В целом данные scRNA-seq в комплексе с иммунофлуоресцентным анализом показывают, что разные популяции олигодендроцитов различаются

по пространственным предпочтениям, по-разному реагируют на ТСМ и могут выполнять разные функции в ходе регенерации.

При острой ТСМ в грудном отделе при помощи scRNA-seq идентифицировано два кластера предшественников олигодендроцитов — А и В. Преобладают клетки с фенотипом А, которые экспрессируют канонические для предшественников олигодендроцитов гены, кодирующие синтез таких молекул, как хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4, он же NG2-протеогликан), рецептор тромбоцитарного фактора роста α (PDGFR α) и тенасцин R. Предшественники олигодендроцитов В появляются в первые сутки после повреждения и активно экспрессируют тенасцин С [47]. Предполагается, что предшественники олигодендроцитов А участвуют в процессах цитогенеза и миелинизации, а клетки популяции В активно пролиферируют [47].

Эпендимная глия

Нейральные стволовые клетки в сформированном спинном мозге присутствуют в популяции эпендимных клеток. В спинном мозге человека не зарегистрировано их размножение [76, 77], хотя *in vitro* эпендимоциты вступают в митоз [78–80]. Эпендимная глия явилась объектом экспериментальных исследований на уровне отдельной клетки [45, 81, 82]. В ряде работ получены данные о проявлении у эпендимоцитов некоторых субпопуляций потенциала нейральных стволовых клеток [82, 83]. Эпендимоциты и нейральные стволовые клетки во взрослом организме происходят из общих эмбриональных предшественников [82, 84]. Детальный анализ гетерогенности популяции и возрастной динамики транскриптома эпендимоцитов в спинном мозге был предпринят в работе [50]. В общей популяции эпендимоцитов scRNA-seq позволил идентифицировать незрелые клетки как потенциальные стволовые клетки в спинном мозге. После ТСМ эти клетки повторно вступают в клеточный цикл, что сопровождается кратковременной реверсией их созревания.

Резидентные нейральные стволовые клетки вносят ограниченный вклад в замену клеток. При ТСМ у мыши эпендимные клетки в основном дают начало астроцитам глиального рубца [75, 82] и в меньшей степени — олигодендроцитам [85–87]. Выявлен скрытый потенциал резидентных нейральных стволовых клеток для замещения значительной части погибших олигодендроцитов в поврежденном спинном мозге мыши. Технология scRNA-seq демонстрирует пребывание нейральных стволовых клеток в перmissive состоянии, что позволяет реализовать обычно латентную программу экспрессии генов для олигодендрогенеза после повреждения.

В сформированном спинном мозге маркер олигодендроцитов — транскрипционный фактор Olig2 — не оказывает стимулирующего влияния на олигодендро-

генез и миелинизацию, но ранние предшественники в популяции эпендимоцитов сохраняют возможность ответа на действие этого транскрипционного фактора, что и наблюдается в условиях ТСМ. Эктопическая экспрессия *Olig2* сопровождается обильным олигодендрогенезом, производящийся из стволовых клеток, который следует за естественной дифференцировкой олигодендроцитов, способствует ремиелинизации аксонов и стимулирует восстановление проводимости нервных волокон [45]. Эти данные позволяют высказать обнадеживающее предположение о том, что рекрутирование резидентных стволовых клеток может служить альтернативой трансплантации клеток после повреждения ЦНС.

Микроглия

Микроглия представлена резидентными иммунными клетками в ЦНС, которые участвуют в иммунной защите, поддержании гомеостаза, фагоцитозе фрагментов погибших клеток, прунинге избыточных синапсов и коллатералей аксонов, стимулировании роста и ремиелинизации отростков нейрона [88–91]. В настоящее время для изучения разнообразия микроглии широко применяются технологии scRNAseq/snRNAseq [47, 92–95]. РНК-секвенирование выявило новые маркеры микроглии: S100A8, S100A9, HEXB, TMEM119, GPR34, P2RY12, Siglec-H, TREM2, OLFML3 [96].

Отдельная и непростая задача, которая была успешно и полно решена благодаря технологии РНК-секвенирования, — различение микроглии и макрофагов. Эти линии клеток характеризуются морфологической идентичностью и сходными фенотипическими маркерами *in vivo*, особенно в условиях патологии, включая ТСМ, когда активируются оба клеточных типа [95, 97–100].

Недавними исследованиями с помощью scRNAseq установлено, что микроглия отличается от пограничных макрофагов экспрессией генов, кодирующих пуриnergический рецептор P2y₇, мембранный переносчик — член 5 семейства 2 (SLC2A5), трансмембранный белок *Tmem119* и β -субъединицу β -гексозаминидазы (*Hexb*), тогда как пограничные макрофаги экспрессируют молекулу активации лимфоцитов *Ms4a7* (член 7 подсемейства 4 доменов, охватывающих мембрану), рецептор маннозы (*Mrc1*) и др. [95]. Эти данные имеют важное значение для идентификации и изучения роли пограничных макрофагов в ЦНС, которые контролируют поступление лейкоцитов из крови и спинномозговой жидкости в паренхиму мозга, а также ограничивают обмен ЦНС и крови различными цитокинами и хемокинами [101].

При ТСМ микроглия специфически координирует взаимодействие клеток различных типов [102]. Фармакологическое истощение микроглии усугубляет повреждение спинного мозга и ухудшает восстановление функций. Наоборот, восстановление в микроглиоцитах внутриклеточных сигнальных каскадов, иденти-

фицированных по данным scRNAseq, предотвращает вторичное повреждение и способствует регенерации. Анализ работы [102] показывает, что оптимальное восстановление после ТСМ может быть достигнуто за счет координации ключевых лиганд-рецепторных взаимодействий между микроглией, астроцитами и инфилтстрирующими лейкоцитами.

Травма спинного мозга запускает нейровоспалительную реакцию, в которой преобладают моноциты/макрофаги и резидентные клетки микроглии. Технология scRNAseq разделяет гомеостатическую и негомеостатическую микроглию в спинном мозге. При ТСМ негомеостатическая микроглия включает три популяции, а именно воспалительную, пролиферирующую и мигрирующую микроглию. Воспалительная микроглия характеризуется экспрессией генов, связанных с гибелью клетки, продукцией цитокинов и экспрессией гена пуриnergического рецептора *P2ry12*, который слабо экспрессируется в двух других популяциях негомеостатической микроглии. Пролиферирующая микроглия экспрессирует гены, ассоциированные с регуляцией клеточного цикла, например *Cdk1*. Микроглиоциты самой немногочисленной популяции мигрирующих клеток экспрессируют гены, связанные с подвижностью клетки, а также характеризуются высокими уровнями экспрессии гена рецептора мусорщиков макрофагов (*Msr1*) и гена инсулиноподобного фактора роста 1 (*Igf1*) [47].

При ТСМ пространственная транскриптомика выявляет в кластерах миелоидных клеток фенотипы моноцитов, макрофагов нескольких подтипов, а именно индуцирующих хемотаксис и провоспалительных, а также пограничные (*border associated*) макрофаги и дендритные клетки [47]. Причем упомянутые подтипы макрофагов не соответствуют широко известной классификации поляризационных фенотипов M1/M2. Индуцирующие хемотаксис и провоспалительные макрофаги демонстрировали паттерны взаимодействия, сходные с таковыми у астроцитов и фибробластов. Эти полученные с помощью scRNAseq данные, касающиеся межклеточной сигнализации, вносят вклад в понимание молекулярных механизмов астроглиоза, фиброза и ангиогенеза при ТСМ.

Травма спинного мозга сопровождается многими реакциями клеток разных типов, которые специфичны во времени, по срокам и локализации. При ТСМ у мышей использование scRNAseq в сочетании с традиционным анализом структуры, поведения и электрической активности позволило получить данные о временных и молекулярных сдвигах на уровне отдельной клетки. Описаны патологические изменения в клетках 12 основных типов, из них клетки трех типов мигрировали в спинной мозг в разное время после травмы [103]. В интактном спинном мозге обнаружены новые подтипы микроглии с характерными для каждого из них динамическими преобразованиями, которые специфичны для разных стадий патологического процесса. Активация микроглии происходит

двумя волнами. Наиболее выраженные изменения микроглии отмечены на 3-и и 14-е сутки после ТСМ. В подостром периоде ТСМ, когда нейровоспаление проявляется наиболее динамично, реакция микроглии сопровождается активацией семи генов-концентраторов (*hub genes*) *Itgb1*, *Ptprc*, *Cd63*, *Lgals3*, *Vav1*, *Shc1* и *Casp4* [104]. К 38-м суткам основные типы клеток все еще существенно отклонены от состояния в интактном спинном мозге [103].

Если клетки большинства типов в травмированном спинном мозге, как правило, возвращаются в исходное состояние, то для микроглии рассматривается возможность постоянного перепрограммирования молекулярного профиля, приводящего к пролонгированному изменению иммунного статуса в травмированном спинном мозге. При ТСМ у мышей обнаружены микроглиоциты с повышенной экспрессией ассоциированных с регенерацией молекул. Подобные клетки характерны для спинного мозга новорожденных мышей, но с небольшими различиями в экспрессии генов по сравнению с их неонатальными аналогами [103].

Заключение

Выбор оптимального режима терапии при травме спинного мозга требует понимания роли ключевых генов и соответствующих им внутриклеточных регуляторных путей. Однако отбор для этой цели единичных генов не позволяет раскрыть глубокие молекулярные механизмы патогенеза травмы спинного мозга. Конструктивное решение этой задачи начато с применением технологий scRNAseq/snRNAseq.

Результаты недавних исследований с использованием scRNA-seq/snRNA-seq показывают, что все ранее известные популяции спинальных нейронов оказываются гетерогенными по критерию дифференциальной экспрессии генов. Эти сведения приобрели важное клиническое значение для идентификации наиболее уязвимых нейронов при травме спинного мозга. При помощи технологий РНК-секвенирования определены молекулярно-генетические корреляты функциональных различий и регенераторного потенциала нейронов, локализованных в дорсальных и вентральных пластинках, что может лежать в основе специфики функционирования нейронных сетей в этих отделах серого вещества. В поясничном отделе спинного мозга в ответ на отдаленную травму в грудном отделе выявлена активация интернейронов, которые в интактном спинном мозге не принимают участия в акте шагания, но активируются после травмы и последующей эпидуральной электростимуляции. Данные RNAseq позволяют предположить, что принадлежащие к различным популяциям нейроны, образующие двигательные сети в поясничном отделе, могут реализовать различные молекулярные программы регенерации.

Технологии scRNAseq/snRNAseq расширяют наши представления о гетерогенности спинальных астроцитов при травме спинного мозга. Они различаются по

экспрессии генов, контролирующей пролиферативную активность. Как в белом, так и в сером веществе идентифицированы астроциты, которые экспрессируют маркеры эпендимных клеток. Количество подобных астроцитов значительно возрастает в острую фазу травмы спинного мозга.

Молекулярный профиль, изменение длительности фаз клеточного цикла, сходная с радиальной глией морфология астроцито-эпендимных клеток с высокой экспрессией маркера стволовых клеток не только подтверждают данные о происхождении одной из популяций астроцитов из стволовой нейральной клетки, локализованной в эпендимном слое спинного мозга, но и указывают на присутствие подобных клеток в интактном спинном мозге.

Данные scRNA-seq в комплексе с иммунофлуоресцентным анализом показывают, что спинальные олигодендроциты разных популяций различаются топографически, по-разному реагируют на ТСМ и могут выполнять разные функции в ходе регенерации.

Технологии RNAseq позволили установить и детально проанализировать гетерогенность популяций и возрастной динамики транскриптома эпендимоцитов в спинном мозге. Получены данные о проявлении у эпендимоцитов некоторых субпопуляций потенциала нейральных стволовых клеток и развертывании обычно латентной программы олигодендрогенеза при травме спинного мозга. Эти технологии позволили получить новые данные о сохранении ранними предшественниками в популяции эпендимоцитов возможности отвечать на действие стимулятора олигодендрогенеза транскрипционного фактора Olig2.

Технологии scRNAseq/snRNAseq выявили новые маркеры микроглии, по которым более надежно различаются активированные микроглия и макрофаги; дали возможность получить новые данные об участии микроглии в специфических механизмах координации взаимодействия между спинальными клетками различных типов при травме спинного мозга. Технология scRNA-seq позволила разделить микроглию на гомеостатическую и негемеостатическую, а в последней — выделить субпопуляции воспалительной, пролиферирующей и мигрирующей микроглии.

При травме спинного мозга пространственная транскриптомика описывает в кластерах миелиоидных клеток фенотипы моноцитов, индуцирующих хемотаксис; провоспалительных и пограничных макрофагов; а также дендритных клеток. Полученные данные позволяют рассматривать возможность постоянного перепрограммирования молекулярного профиля микроглии, приводящего к пролонгированному изменению иммунного статуса в травмированном спинном мозге.

Развитие технологий РНК-секвенирования и пространственной транскриптомики открывает большие возможности для формулирования новых перспективных концепций, касающихся механизмов реорганизации нейронных связей и восстановления сенсомоторных функций при травме спинного мозга.

Вклад авторов: Ю.А. Чельшев, И.Л. Ермолин — анализ публикаций и написание текста обзора.

Источники финансирования. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда 23-25-00002.

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов.

Литература/References

- Côté M.P., Murray L.M., Knikou M. Spinal control of locomotion: individual neurons, their circuits and functions. *Front Physiol* 2018; 9: 784, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00784>.
- Ramírez-Jarquín U.N., Tapia R. Excitatory and inhibitory neuronal circuits in the spinal cord and their role in the control of motor neuron function and degeneration. *ACS Chem Neurosci* 2018; 9(2): 211–216, <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00503>.
- Osseward P.J. II, Amin N.D., Moore J.D., Temple B.A., Barriga B.K., Bachmann L.C., Beltran F. Jr., Gullo M., Clark R.C., Driscoll S.P., Pfaff S.L., Hayashi M. Conserved genetic signatures parcellate cardinal spinal neuron classes into local and projection subsets. *Science* 2021; 372(6540): 385–393, <https://doi.org/10.1126/science.abe0690>.
- Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A., Foo L.C., Zamanian J.L., Christopherson K.S., Xing Y., Lubischer J.L., Krieg P.A., Krupenko S.A., Thompson W.J., Barres B.A. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 2008; 28(1): 264–278, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4178-07.2008>.
- Dobrott C.I., Sathyamurthy A., Levine A.J. Decoding cell type diversity within the spinal cord. *Curr Opin Physiol* 2019; 8: 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.11.006>.
- Wu H., Kirita Y., Donnelly E.L., Humphreys B.D. Advantages of single-nucleus over single-cell RNA sequencing of adult kidney: rare cell types and novel cell states revealed in fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30(1): 23–32, <https://doi.org/10.1681/asn.2018090912>.
- Ding J., Adiconis X., Simmons S.K., Kowalczyk M.S., Hession C.C., Marjanovic N.D., Hughes T.K., Wadsworth M.H., Burks T., Nguyen L.T., Kwon J.Y.H., Barak B., Ge W., Kedaigle A.J., Carroll S., Li S., Hacohen N., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Villani A.C., Regev A., Levin J.Z. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol* 2020; 38(6): 737–746, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0465-8>.
- Hwang B., Lee J.H., Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med* 2018; 50(8): 1–14, <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>.
- Chen G., Ning B., Shi T. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis. *Front Genet* 2019; 10: 317, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00317>.
- Slovin S., Carissimo A., Panariello F., Grimaldi A., Bouché V., Gambardella G., Cacchiarelli D. Single-cell RNA sequencing analysis: a step-by-step overview. *Methods Mol Biol* 2021; 2284: 343–365, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_19.
- Cao Y., Zhu S., Yu B., Yao C. Single-cell RNA sequencing for traumatic spinal cord injury. *FASEB J* 2022; 36(12): e22656, <https://doi.org/10.1096/fj.202200943r>.
- Jovic D., Liang X., Zeng H., Lin L., Xu F., Luo Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview. *Clin Transl Med* 2022; 12(3): e694, <https://doi.org/10.1002/ctm2.694>.
- Liu Y., Liang S., Wang B., Zhao J., Zi X., Yan S., Dou T., Jia J., Wang K., Ge C. Advances in single-cell sequencing technology and its application in poultry science. *Genes (Basel)* 2022; 13(12): 2211, <https://doi.org/10.3390/genes13122211>.
- Skinnider M.A., Gautier M., Yue A., Teo Y., Kathe C., Hutson T.H., Laskaratos A., de Coucy A., Regazzi N., Aureli V., James N.D., Schneider B., Sofroniew M.V., Barraud Q., Bloch J., Anderson M.A., Squair J.W., Courtine G. The Tabulae Paralytica: multimodal single-cell and spatial atlases of spinal cord injury. *bioRxiv* 2023, <https://doi.org/10.1101/2023.06.23.544348>.
- Sathyamurthy A., Johnson K.R., Matson K.J.E., Dobrott C.I., Li L., Ryba A.R., Bergman T.B., Kelly M.C., Kelley M.W., Levine A.J. Massively parallel single nucleus transcriptional profiling defines spinal cord neurons and their activity during behavior. *Cell Rep* 2018; 22(8): 2216–2225, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.003>.
- Zeisel A., Hochgerner H., Lönnerberg P., Johnsson A., Memic F., van der Zwan J., Häring M., Braun E., Borm L.E., La Manno G., Codeluppi S., Furlan A., Lee K., Skene N., Harris K.D., Hjerling-Leffler J., Arenas E., Ernfors P., Marklund U., Linnarsson S. Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell* 2018; 174(4): 999–1014.e22, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>.
- Russ D.E., Cross R.B.P., Li L., Koch S.C., Matson K.J.E., Yadav A., Alkaslasi M.R., Lee D.I., Le Pichon C.E., Menon V., Levine A.J. A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization. *Nat Commun* 2021; 12(1): 5722, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25125-1>.
- Li Y., Chen Y., Li X., Wu J., Pan J.Y., Cai R.X., Yang R.Y., Wang X.D. RNA sequencing screening of differentially expressed genes after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2019; 14(9): 1583–1593, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.255994>.
- Zeisel A., Muñoz-Manchado A.B., Codeluppi S., Lönnerberg P., La Manno G., Juréus A., Marques S., Munguba H., He L., Betsholtz C., Rolny C., Castelo-Branco G., Hjerling-Leffler J., Linnarsson S. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 2015; 347(6226): 1138–1142, <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>.
- Masuda T., Sankowski R., Staszewski O., Böttcher C., Amann L., Sagar S., Scheiwe C., Nessler S., Kunz P., van Loo G., Coenen V.A., Reinacher P.C., Michel A., Sure U., Gold R., Grün D., Priller J., Stadelmann C., Prinz M. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 2019; 566(7744): 388–392, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0924-x>.
- Bomkamp C., Tripathy S.J., Bengtsson Gonzales C., Hjerling-Leffler J., Craig A.M., Pavlidis P. Transcriptomic correlates of electrophysiological and morphological diversity within and across excitatory and inhibitory neuron classes. *PLoS Comput Biol* 2019; 15(6): e1007113, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007113>.
- Sagner A., Briscoe J. Establishing neuronal diversity in the spinal cord: a time and a place. *Development* 2019; 146(22): dev182154, <https://doi.org/10.1242/dev.182154>.
- Ratz M., von Berlin L., Larsson L., Martin M.,

- Westholm J.O., La Manno G., Lundeberg J., Frisén J. Clonal relations in the mouse brain revealed by single-cell and spatial transcriptomics. *Nat Neurosci* 2022; 25(3): 285–294, <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01011-x>.
24. Stifani N. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 293, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>.
25. Morisaki Y., Niikura M., Watanabe M., Onishi K., Tanabe S., Moriwaki Y., Okuda T., Ohara S., Murayama S., Takao M., Uchida S., Yamanaka K., Misawa H. Selective expression of Osteopontin in ALS-resistant motor neurons is a critical determinant of late phase neurodegeneration mediated by matrix metalloproteinase-9. *Sci Rep* 2016; 6: 27354, <https://doi.org/10.1038/srep27354>.
26. Bączyk M., Manuel M., Roselli F., Zytnicki D. Diversity of mammalian motoneurons and motor units. *Adv Neurobiol* 2022; 28: 131–150, https://doi.org/10.1007/978-3-031-07167-6_6.
27. Miles G.B., Hartley R., Todd A.J., Brownstone R.M. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(7): 2448–2453, <https://doi.org/10.1073/pnas.0611134104>.
28. Bikoff J.B., Gabitto M.I., Rivard A.F., Drobac E., Machado T.A., Miri A., Brenner-Morton S., Famojure E., Diaz C., Alvarez F.J., Mentis G.Z., Jessell T.M. Spinal inhibitory interneuron diversity delineates variant motor microcircuits. *Cell* 2016; 165(1): 207–219, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.027>.
29. Bikoff J.B. Interneuron diversity and function in the spinal motor system. *Curr Opin Physiol* 2019; 8: 36–43, <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.12.013>.
30. Chen S., Yang G., Zhu Y., Liu Z., Wang W., Wei J., Li K., Wu J., Chen Z., Li Y., Mu S., OuYang L., Lei W. A comparative study of three interneuron types in the rat spinal cord. *PLoS One* 2016; 11(9): e0162969, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162969>.
31. Bertuzzi M., Ampatzis K. Spinal cholinergic interneurons differentially control motoneuron excitability and alter the locomotor network operational range. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1988, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20493-z>.
32. Sweeney L.B., Bikoff J.B., Gabitto M.I., Brenner-Morton S., Baek M., Yang J.H., Tabak E.G., Dasen J.S., Kintner C.R., Jessell T.M. Origin and segmental diversity of spinal inhibitory interneurons. *Neuron* 2018; 97(2): 341–355.e3, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.029>.
33. Deska-Gauthier D., Zhang Y. The functional diversity of spinal interneurons and locomotor control. *Curr Opin Physiol* 2019; 8: 99–108, <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.005>.
34. Laliberte A.M., Goltash S., Lalonde N.R., Bui T.V. Propriospinal neurons: essential elements of locomotor control in the intact and possibly the injured spinal cord. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 512, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00512>.
35. Nascimento F., Broadhead M.J., Tetranga E., Tsape E., Zagoraiou L., Miles G.B. Synaptic mechanisms underlying modulation of locomotor-related motoneuron output by premotor cholinergic interneurons. *Elife* 2020; 9: e54170, <https://doi.org/10.7554/elife.54170>.
36. Alkaslasi M.R., Piccus Z.E., Hareendran S., Silberberg H., Chen L., Zhang Y., Petros T.J., Le Pichon C.E. Single nucleus RNA-sequencing defines unexpected diversity of cholinergic neuron types in the adult mouse spinal cord. *Nat Commun* 2021; 12(1): 2471, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22691-2>.
37. Blum J.A., Klemm S., Shadrach J.L., Guttenplan K.A., Nakayama L., Kathiria A., Hoang P.T., Gautier O., Kaltschmidt J.A., Greenleaf W.J., Gitler A.D. Single-cell transcriptomic analysis of the adult mouse spinal cord reveals molecular diversity of autonomic and skeletal motor neurons. *Nat Neurosci* 2021; 24(4): 572–583, <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00795-0>.
38. Liao E.S., Jin S., Chen Y.C., Liu W.S., Calon M., Nedelec S., Nie Q., Chen J.A. Single-cell transcriptomic analysis reveals diversity within mammalian spinal motor neurons. *Nat Commun* 2023; 14(1): 46, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35574-x>.
39. Kaplan A., Spiller K.J., Towne C., Kanning K.C., Choe G.T., Geber A., Akay T., Aebischer P., Henderson C.E. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron* 2014; 81(2): 333–348, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.009>.
40. Nijssen J., Comley L.H., Hedlund E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2017; 133(6): 863–885, <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1708-8>.
41. Schweingruber C., Hedlund E. The cell autonomous and non-cell autonomous aspects of neuronal vulnerability and resilience in amyotrophic lateral sclerosis. *Biology (Basel)* 2022; 11(8): 1191, <https://doi.org/10.3390/biology11081191>.
42. Taylor J.P., Brown R.H. Jr., Cleveland D.W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 2016; 539(7628): 197–206, <https://doi.org/10.1038/nature20413>.
43. Shi L.L., Zhang N., Xie X.M., Chen Y.J., Wang R., Shen L., Zhou J.S., Hu J.G., Lü H.Z. Transcriptome profile of rat genes in injured spinal cord at different stages by RNA-sequencing. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 173, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3532-x>.
44. Floriddia E.M., Lourenço T., Zhang S., van Bruggen D., Hilscher M.M., Kukanja P., Gonçalves Dos Santos J.P., Altinkök M., Yokota C., Llorens-Bobadilla E., Mulinyawe S.B., Grãos M., Sun L.O., Frisén J., Nilsson M., Castelo-Branco G. Distinct oligodendrocyte populations have spatial preference and different responses to spinal cord injury. *Nat Commun* 2020; 11(1): 5860, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19453-x>.
45. Llorens-Bobadilla E., Chell J.M., Le Merre P., Wu Y., Zamboni M., Bergensträhle J., Stenudd M., Sopova E., Lundeberg J., Shupliakov O., Carlén M., Frisén J. A latent lineage potential in resident neural stem cells enables spinal cord repair. *Science* 2020; 370(6512): eabb8795, <https://doi.org/10.1126/science.abb8795>.
46. Poplawski G.H.D., Kawaguchi R., Van Niekerk E., Lu P., Mehta N., Canete P., Lie R., Dragatsis I., Meves J.M., Zheng B., Coppola G., Tuszyński M.H. Injured adult neurons regress to an embryonic transcriptional growth state. *Nature* 2020; 581(7806): 77–82, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2200-5>.
47. Milich L.M., Choi J.S., Ryan C., Cerqueira S.R., Benavides S., Yahn S.L., Tsoulfas P., Lee J.K. Single-cell analysis of the cellular heterogeneity and interactions in the injured mouse spinal cord. *J Exp Med* 2021; 218(8): e20210040, <https://doi.org/10.1084/jem.20210040>.
48. Kathe C., Skinnider M.A., Hutson T.H., Regazzi N., Gautier M., Demesmaeker R., Komi S., Ceto S., James N.D., Cho N., Baud L., Galan K., Matson K.J.E., Rowald A., Kim K.,

- Wang R., Minassian K., Prior J.O., Asboth L., Barraud Q., Lacour S.P., Levine A.J., Wagner F., Bloch J., Squair J.W., Courtine G. The neurons that restore walking after paralysis. *Nature* 2022; 611(7936): 540–547, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05385-7>.
49. Matson K.J.E., Russ D.E., Kathe C., Hua I., Maric D., Ding Y., Krynskiy J., Pursley R., Sathyamurthy A., Squair J.W., Levi B.P., Courtine G., Levine A.J. Single cell atlas of spinal cord injury in mice reveals a pro-regenerative signature in spinocerebellar neurons. *Nat Commun* 2022; 13(1): 5628, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33184-1>.
50. Rodrigo Albors A., Singer G.A., Llorens-Bobadilla E., Frisén J., May A.P., Ponting C.P., Storey K.G. An ependymal cell census identifies heterogeneous and ongoing cell maturation in the adult mouse spinal cord that changes dynamically on injury. *Dev Cell* 2023; 58(3): 239–255.e10, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.01.003>.
51. Yadav A., Matson K.J.E., Li L., Hua I., Petrescu J., Kang K., Alkaslasi M.R., Lee D.I., Hasan S., Galuta A., Dedek A., Ameri S., Parnell J., Alshardan M.M., Qumqumji F.A., Alhamad S.M., Wang A.P., Poulen G., Lonjon N., Vachierey-Lahaye F., Gaur P., Nalls M.A., Qi Y.A., Maric D., Ward M.E., Hildebrand M.E., Mery P.F., Bourinet E., Bauchet L., Tsai E.C., Phatnani H., Le Pichon C.E., Menon V., Levine A.J. A cellular taxonomy of the adult human spinal cord. *Neuron* 2023; 111(3): 328–344.e7, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.01.007>.
52. Sun J., Qiu J., Yang Q., Ju Q., Qu R., Wang X., Wu L., Xing L. Single-cell RNA sequencing reveals dysregulation of spinal cord cell types in a severe spinal muscular atrophy mouse model. *PLoS Genet* 2022; 18(9): e1010392, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010392>.
53. Chelyshev Y. More attention on segments remote from the primary spinal cord lesion site. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2022; 27(8): 235, <https://doi.org/10.31083/j.fbl2708235>.
54. Челышев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Нигметзянова М.В. Глиальные барьеры при травме спинного мозга как мишень генно-клеточной терапии. *Неврологический вестник* 2013; 45(1): 87–93.
- Chelyshev Y.A., Shaymardanova G.F., Muhamedshina Y.O., Nigmatzyanova M.V. Glial barriers at spinal cord injury as a target of gene-cell therapy. *Nevrologiceskij vestnik* 2013; 45(1): 87–93.
55. Northcutt A.J., Schulz D.J. Molecular mechanisms of homeostatic plasticity in central pattern generator networks. *Dev Neurobiol* 2020; 80(1–2): 58–69, <https://doi.org/10.1002/dneu.22727>.
56. Grillner S., Kozlov A. The CPGs for limbed locomotion-facts and fiction. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11): 5882, <https://doi.org/10.3390/ijms22115882>.
57. Fink K.L., Cafferty W.B. Reorganization of intact descending motor circuits to replace lost connections after injury. *Neurotherapeutics* 2016; 13(2): 370–381, <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0422-x>.
58. Wang Y., Wu W., Wu X., Sun Y., Zhang Y.P., Deng L.X., Walker M.J., Qu W., Chen C., Liu N.K., Han Q., Dai H., Shields L.B., Shields C.B., Sengelaub D.R., Jones K.J., Smith G.M., Xu X.M. Remodeling of lumbar motor circuitry remote to a thoracic spinal cord injury promotes locomotor recovery. *Elife* 2018; 7: e39016, <https://doi.org/10.7554/elife.39016>.
59. Anderson M.A., Squair J.W., Gautier M., Hutson T.H., Kathe C., Barraud Q., Bloch J., Courtine G. Natural and targeted circuit reorganization after spinal cord injury. *Nat Neurosci* 2022; 25(12): 1584–1596, <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01196-1>.
60. McBride R.L., Feringa E.R. Ventral horn motoneurons 10, 20 and 52 weeks after T-9 spinal cord transection. *Brain Res Bull* 1992; 28(1): 57–60, [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90230-u](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90230-u).
61. Yokota K., Kubota K., Kobayakawa K., Saito T., Hara M., Kijima K., Maeda T., Katoh H., Ohkawa Y., Nakashima Y., Okada S. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain* 2019; 12(1): 4, <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0422-3>.
62. Poplawski G.H., Tuszynski M.H. Regeneration of corticospinal axons into neural progenitor cell grafts after spinal cord injury. *Neurosci Insights* 2020; 15: 2633105520974000, <https://doi.org/10.1177/2633105520974000>.
63. Jing X., Wang T., Huang S., Glorioso J.C., Albers K.M. The transcription factor Sox11 promotes nerve regeneration through activation of the regeneration-associated gene Sprr1a. *Exp Neurol* 2012; 233(1): 221–232, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.005>.
64. Fagoie N.D., Attwell C.L., Kouwenhoven D., Verhaagen J., Mason M.R. Overexpression of ATF3 or the combination of ATF3, c-Jun, STAT3 and Smad1 promotes regeneration of the central axon branch of sensory neurons but without synergistic effects. *Hum Mol Genet* 2015; 24(23): 6788–6800, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv383>.
65. Nguyen M.Q., Le Pichon C.E., Ryba N. Stereotyped transcriptomic transformation of somatosensory neurons in response to injury. *Elife* 2019; 8: e49679, <https://doi.org/10.7554/eLife.49679>.
66. Renthall W., Tochitsky I., Yang L., Cheng Y.C., Li E., Kawaguchi R., Geschwind D.H., Woolf C.J. Transcriptional reprogramming of distinct peripheral sensory neuron subtypes after axonal injury. *Neuron* 2020; 108(1): 128–144.e9, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.026>.
67. Akram R., Anwar H., Javed M.S., Rasul A., Imran A., Malik S.A., Raza C., Khan I.U., Sajid F., Iman T., Sun T., Han H.S., Hussain G. Axonal regeneration: underlying molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biomedicine* 2022; 10(12): 3186, <https://doi.org/10.3390/biomedicine10123186>.
68. Westergard T., Rothstein J.D. Astrocyte diversity: current insights and future directions. *Neurochem Res* 2020; 45(6): 1298–1305, <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02959-7>.
69. Escartin C., Galea E., Lakatos A., O’Callaghan J.P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., Allen N.J., Araque A., Barbeito L., Barzilai A., Bergles D.E., Bonvento G., Butt A.M., Chen W.T., Cohen-Salmon M., Cunningham C., Deneen B., De Strooper B., Diaz-Castro B., Farina C., Freeman M., Gallo V., Goldman J.E., Goldman S.A., Götz M., Gutiérrez A., Haydon P.G., Heiland D.H., Hol E.M., Holt M.G., Iino M., Kastanenka K.V., Kettenmann H., Khakh B.S., Koizumi S., Lee C.J., Liddelow S.A., MacVicar B.A., Magistretti P., Messing A., Mishra A., Molofsky A.V., Murai K.K., Norris C.M., Okada S., O’Liet S.H.R., Oliveira J.F., Panatier A., Parpura V., Pekna M., Pekny M., Pellerin L., Perea G., Pérez-Nievas B.G., Pflieger F.W., Poskanzer K.E., Quintana F.J., Ransohoff R.M., Riquelme-Perez M., Robel S., Rose C.R., Rothstein J.D., Rouach N., Rowitch D.H., Semyanov A., Sirko S., Sontheimer H., Swanson R.A., Vitorica J., Wanner I.B., Wood L.B., Wu J., Zheng B., Zimmer E.R., Zorec R., Sofroniew M.V., Verkhratsky A. Reactive astrocyte

- nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 2021; 24(3): 312–325, <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>.
70. Endo F., Kasai A., Soto J.S., Yu X., Qu Z., Hashimoto H., Gradinaru V., Kawaguchi R., Khakh B.S. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. *Science* 2022; 378(6619): eadc9020, <https://doi.org/10.1126/science.adc9020>.
71. Prabhakar P., Pielot R., Landgraf P., Wissing J., Bayrhammer A., van Ham M., Gundelfinger E.D., Jänsch L., Dieterich D.C., Müller A. Monitoring regional astrocyte diversity by cell type-specific proteomic labeling in vivo. *Glia* 2023; 71(3): 682–703, <https://doi.org/10.1002/glia.24304>.
72. Wei H., Wu X., Withrow J., Cuevas-Diaz Duran R., Singh S., Chaboub L.S., Rakshit J., Mejia J., Rolfe A., Herrera J.J., Horner P.J., Wu J.Q. Glial progenitor heterogeneity and key regulators revealed by single-cell RNA sequencing provide insight to regeneration in spinal cord injury. *Cell Rep* 2023; 42(5): 112486, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112486>.
73. Bernal A., Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(12): 2177–2195, <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>.
74. Adams K.L., Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci* 2018; 21(1): 9–15, <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>.
75. Nicaise A.M., D'Angelo A., Ionescu R.B., Krzak G., Willis C.M., Pluchino S. The role of neural stem cells in regulating glial scar formation and repair. *Cell Tissue Res* 2022; 387(3): 399–414, <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03554-0>.
76. Alfaro-Cervello C., Cebrian-Silla A., Soriano-Navarro M., Garcia-Tarraga P., Matías-Guiu J., Gomez-Pinedo U., Molina Aguilar P., Alvarez-Buylla A., Luquin M.R., Garcia-Verdugo J.M. The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *J Comp Neurol* 2014; 522(8): 1800–1817, <https://doi.org/10.1002/cne.23501>.
77. Paniagua-Torija B., Norenberg M., Arevalo-Martin A., Carballosa-Gautam M.M., Campos-Martin Y., Molina-Holgado E., Garcia-Ovejero D. Cells in the adult human spinal cord ependymal region do not proliferate after injury. *J Pathol* 2018; 246(4): 415–421, <https://doi.org/10.1002/path.5151>.
78. Dromard C., Guillon H., Rigau V., Ripoll C., Sabourin J.C., Perrin F.E., Scamps F., Bozza S., Sabatier P., Lonjon N., Duffau H., Vachieri-Lahaye F., Prieto M., Tran Van Ba C., Deleyrolle L., Boullaran A., Langley K., Gaviña M., Privat A., Hugnot J.P., Bauchet L. Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J Neurosci Res* 2008; 86(9): 1916–1926, <https://doi.org/10.1002/jnr.21646>.
79. Mothe A.J., Zahir T., Santaguida C., Cook D., Tator C.H. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation. *PLoS One* 2011; 6(11): e27079, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027079>.
80. Hugnot J.P. Isolate and culture neural stem cells from the mouse adult spinal cord. *Methods Mol Biol* 2013; 1059: 53–63, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-574-3_5.
81. Frederico B., Martins I., Chapela D., Gasparrini F., Chakravarty P., Ackels T., Piot C., Almeida B., Carvalho J., Ciccarelli A., Peddie C.J., Rogers N., Briscoe J., Guillemot F., Schaefer A.T., Saúde L., Reis e Sousa C. DNGR-1-tracing marks an ependymal cell subset with damage-responsive neural stem cell potential. *Dev Cell* 2022; 57(16): 1957–1975.e9, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.07.012>.
82. Stenudd M., Sabelström H., Llorens-Bobadilla E., Zamboni M., Blom H., Brismar H., Zhang S., Basak O., Clevers H., Göritz C., Barnabé-Heider F., Frisén J. Identification of a discrete subpopulation of spinal cord ependymal cells with neural stem cell properties. *Cell Rep* 2022; 38(9): 110440, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110440>.
83. Fiorelli R., Cebrian-Silla A., Garcia-Verdugo J.M., Raineteau O. The adult spinal cord harbors a population of GFAP-positive progenitors with limited self-renewal potential. *Glia* 2013; 61(12): 2100–2113, <https://doi.org/10.1002/glia.22579>.
84. Redmond S.A., Figueres-Oñate M., Obernier K., Nascimiento M.A., Parraguez J.I., López-Mascaraque L., Fuentealba L.C., Alvarez-Buylla A. Development of ependymal and postnatal neural stem cells and their origin from a common embryonic progenitor. *Cell Rep* 2019; 27(2): 429–441.e3, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.088>.
85. Meletis K., Barnabé-Heider F., Carlén M., Evergren E., Tomilin N., Shupliakov O., Frisén J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 2008; 6(7): e182, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060182>.
86. Rolls A., Shechter R., Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(3): 235–241, <https://doi.org/10.1038/nrn2591>.
87. Barnabé-Heider F., Göritz C., Sabelström H., Takebayashi H., Pfrieder F.W., Meletis K., Frisén J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 470–482, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.014>.
88. Marinelli S., Basilico B., Marrone M.C., Ragozzino D. Microglia-neuron crosstalk: signaling mechanism and control of synaptic transmission. *Semin Cell Dev Biol* 2019; 94: 138–151, <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.05.017>.
89. Borst K., Dumas A.A., Prinz M. Microglia: immune and non-immune functions. *Immunity* 2021; 54(10): 2194–2208, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>.
90. Ball J.B., Green-Fulgham S.M., Watkins L.R. Mechanisms of microglia-mediated synapse turnover and synaptogenesis. *Prog Neurobiol* 2022; 218: 102336, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102336>.
91. McNamara N.B., Munro D.A.D., Bestard-Cuche N., Uyeda A., Bogie J.F.J., Hoffmann A., Holloway R.K., Molina-Gonzalez I., Askew K.E., Mitchell S., Mungall W., Dodds M., Dittmayer C., Moss J., Rose J., Szymkowiak S., Amann L., McColl B.W., Prinz M., Spiers-Jones T.L., Stenzel W., Horsburgh K., Hendriks J.J.A., Pridans C., Muramatsu R., Williams A., Priller J., Miron V.E. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature* 2023; 613(7942): 120–129, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05534-y>.
92. Li Q., Cheng Z., Zhou L., Darmanis S., Neff N.F., Okamoto J., Gulati G., Bennett M.L., Sun L.O., Clarke L.E., Marschallinger J., Yu G., Quake S.R., Wyss-Coray T., Barres B.A. Developmental heterogeneity of microglia and brain myeloid cells revealed by deep single-cell RNA sequencing. *Neuron* 2019; 101(2): 207–223.e10, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.006>.
93. Hakim R., Zachariadis V., Sankavaram S.R., Han J., Harris R.A., Brundin L., Enge M., Svensson M. Spinal cord

injury induces permanent reprogramming of microglia into a disease-associated state which contributes to functional recovery. *J Neurosci* 2021; 41(40): 8441–8459, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0860-21.2021>.

94. Healy L.M., Zia S., Plemel J.R. Towards a definition of microglia heterogeneity. *Commun Biol* 2022; 5(1): 1114, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04081-6>.

95. Xu L., Wang J., Ding Y., Wang L., Zhu Y.J. Current knowledge of microglia in traumatic spinal cord injury. *Front Neurol* 2022; 12: 796704, <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.796704>.

96. Hickman S., Izzy S., Sen P., Morsett L., El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2018; 21(10): 1359–1369, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>.

97. Zhou X., He X., Ren Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2014; 9(20): 1787–1795, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.143423>.

98. Kroner A., Rosas Almanza J. Role of microglia in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2019; 709: 134370, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134370>.

99. Ding Y., Zhang D., Wang S., Zhang X., Yang J. Hematogenous macrophages: a new therapeutic target for spinal cord injury. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 767888, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.767888>.

100. Kisucká A., Bimbová K., Bačová M., Gálik J.,

Lukáčová N. Activation of neuroprotective microglia and astrocytes at the lesion site and in the adjacent segments is crucial for spontaneous locomotor recovery after spinal cord injury. *Cells* 2021; 10(8): 1943, <https://doi.org/10.3390/cells10081943>.

101. Kierdorf K., Masuda T., Jordão M.J.C., Prinz M. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2019; 20(9): 547–562, <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0201-x>.

102. 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. Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nat Commun* 2022; 13(1): 4096, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31797-0>.

103. Li C., Wu Z., Zhou L., Shao J., Hu X., Xu W., Ren Y., Zhu X., Ge W., Zhang K., Liu J., Huang R., Yu J., Luo D., Yang X., Zhu W., Zhu R., Zheng C., Sun Y.E., Cheng L. Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1): 65, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00885-4>.

104. Yan L., Fu J., Dong X., Chen B., Hong H., Cui Z. Identification of hub genes in the subacute spinal cord injury in rats. *BMC Neurosci* 2022; 23(1): 51, <https://doi.org/10.1186/s12868-022-00737-5>.