

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОГЛИЯ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АУТИЗМОМ

Филиппова Ю. Ю.¹,

Русакова К. А.¹,

Бурмистрова А. Л.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет» (ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет).

**METHODOLOGICAL ASPECTS OF MONOCYTE-DERIVED
MICROGLIA-LIKE CELLS GENERATION AT CHILDREN WITH
AUTISM**

Filippova Yu. Yu. ^a,
Rusakova K. A. ^a,
Burmistrova A. L. ^a

^a Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University.

Резюме

Нарушения в согласованной работе нервной и иммунной систем в настоящее время признаются основными факторами инициации и прогрессии расстройств аутистического спектра (РАС). Ключевыми игроками в формировании нейровоспаления и нарушении синаптической пластичности выступают резидентные иммунные клетки мозга – микроглия. Исследования нейробиологических и нейроиммунологических механизмов, лежащих в основе РАС, ограничены отсутствием соответствующих экспериментальных моделей. В настоящее время одной из наиболее релевантных моделей для изучения функций микроглии человека и поиска персонализированных терапевтических подходов к лечению нейropsychических заболеваний могут стать микроглия-подобные клетки, полученные из моноцитов периферической крови (MDMi).

Цель работы – оптимизация протокола получения микроглия-подобных клеток из моноцитов периферической крови детей с аутизмом, в количестве, достаточном для проведения функциональных тестов.

Объектами исследования были мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от 18 детей (12 мальчиков и 6 девочек; в возрасте 6–12 лет, средний возраст – 8,2 года) с диагнозом «Ранний детский аутизм». Мононуклеары выделяли из периферической крови с помощью градиенте плотности «Фиколл». Методом пластинчатой адгезии при 24-часовом культивировании из мононуклеаров получали фракцию моноцитов. Моноциты культивировали 10 или 14 суток в бессывороточной среде RPMI-1640 с добавлением антибиотиков и разных коктейлей цитокинов для их дальнейшей дифференцировки в MDMi. Количество жизнеспособных клеток оценивали с помощью суправитального красителя DAPI, а их фенотип определяли по наличию специфических маркеров микроглии – P2RY12 и TMEM119, методом проточной цитометрии. Для статистических расчетов использовали программное обеспечение PAST v. 4.03.

В результате работы нами показано, что для индукции микроглия-подобных клеток из моноцитов периферической крови детей с аутизмом необходимо 10-ти дневное культивирование не менее 3×10^5 клеток/в лунке, в среде RPMI-1640 со стабильным глутамином, антибиотиками и коктейлем из трех цитокинов: GM-CSF (10 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл), IL-3 (10 нг/мл). Такие параметры культивирования позволяют получить около 6×10^4 клеток, не менее 90% из которых экспрессируют на своей поверхности маркер микроглии – P2RY12⁺ и могут быть использованы в качестве модели для изучения механизмов патогенеза аутизма, а также поиска персонализированных подходов к его лечению.

Ключевые слова: микроглия-подобные клетки, полученные из моноцитов, модели *in vitro*, IL-3, расстройства аутистического спектра, дети, проточная цитометрия.

Abstract

Current research acknowledges that dysregulation between the nervous and immune systems is a primary factor contributing to both initiation and progression of autism spectrum disorders (ASD). Microglia is a resident brain immune cells, play a pivotal role in neuroinflammation and synaptic plasticity impairment. However, understanding these mechanisms has been limited by the lack of relevant experimental models. One promising approach involves microglia-like cells derived from peripheral blood monocytes (MDMi), which can serve as an effective model for studying human microglial function and developing personalized therapeutic strategies for neuropsychiatric diseases.

The aim of this study was to optimize a protocol for generating sufficient quantities of microglia-like cells from peripheral blood monocytes of children with autism suitable for functional testing.

Peripheral blood samples were collected from 18 children diagnosed with autism (mean age: 8.2 years; range: 6–12 years; 12 boys, 6 girls). Mononuclear cells were isolated using Ficoll density gradient centrifugation. After a 24-hour incubation period, adherent fractions enriched in monocytes were obtained through plate adherence. These monocytes were then cultured for either 10 or 14 days in serum-free RPMI-1640 medium supplemented with antibiotics and various cytokine cocktails to induce differentiation into MDMi. Viability was assessed using supravital staining with DAPI, while phenotyping was conducted via flow cytometry targeting specific microglial markers such as P2RY12 and TMEM119. Statistical analyses were performed using PAST software version 4.03.

Our findings demonstrate that successful induction of microglia-like cells requires at least ten-day culture periods involving no fewer than 3×10^5 cells per well in RPMI-1640 medium containing stable glutamine, antibiotics, and a cocktail consisting of three cytokines: GM-CSF, 10 ng/mL, IL-34, 100 ng/mL, and IL-3, 10 ng/mL. Under these conditions, approximately 6×10^4 viable cells are generated, with over 90% expressing the microglial marker P2RY12. This cell population provides a valuable tool for investigating ASD pathogenesis and identifying personalized treatment approaches.

Keywords: monocyte-derived microglia-like cells, in vitro models, IL-3, autism spectrum disorders, children, flow cytometry.

1 Введение

Нарушения в работе нервной и иммунной систем и их двунаправленных взаимодействий в настоящее время признаются основными факторами инициации и прогрессии расстройств аутистического спектра (РАС) [1]. Показано, что резидентные иммунные клетки мозга – микроглия, выступают ключевыми игроками в формировании нейровоспаления и нарушении синаптической пластичности, наблюдаемыми в центральной нервной системе лиц с РАС [1]. Исследования нейробиологических и нейроиммунологических механизмов, лежащих в основе РАС, ограничены отсутствием соответствующих экспериментальных моделей [4]. В настоящее время одной из наиболее релевантных моделей для изучения функций микроглии человека и поиска персонализированных терапевтических подходов к лечению нейropsychических заболеваний могут стать микроглия-подобные клетки (МГПК), полученные из моноцитов периферической крови [8]. В последние десять лет разработаны подробные и надежные протоколы получения МГПК [5-7], которые, тем не менее, не имеют общепризнанной стандартизации [8] и могут быть трудны в реализации при некоторых патологических состояниях. Так, у детей с РАС венопункция обычно затруднена, из-за повышенной тревожности, страха и/или поведенческих особенностей [2], что не позволяет произвести забор большого объема крови и получить достаточное количество МГПК. Кроме того, для моноцитов детей с РАС характерны динамические изменения функциональной активности, что может оказывать влияние на их способность к дифференцировке в МГПК в условиях *in vitro*.

Цель работы – оптимизация протокола получения микроглиоподобных клеток из моноцитов периферической крови детей с аутизмом, в количестве, достаточном для проведения функциональных тестов.

2 Материалы и методы

Микроглия-подобные клетки (МГПК) получали из моноцитов периферической крови согласно протоколу Quek Н. с соавторами [7] с некоторыми модификациями.

Кровь из вены была собрана натощак в утренние часы у 18 детей с диагнозом по МКБ-10: F 84.0 «Ранний детский аутизм» (12 мальчиков и 6 девочек; в возрасте 6–12 лет, средний возраст – 8,2 года). Всеми родителями или официальными представителями детей было подписано информированное согласие на участие в программе. В рамках обследования детям с аутизмом был проведен подсчет показателей лейкоцитарной формулы крови.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) были выделены центрифугированием (1.5 тыс. об/мин, 40 мин) на градиенте плотности «Фиколл» (1,077 г/см³, «БиолоТ», Россия). Полученную фракцию МПК разводили в среде RPMI-1640 со стабильным глутамином («БиолоТ», Россия) с добавлением пенициллина-стрептомицина (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл соответственно; «БиолоТ», Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки («Biowest», Франция), до концентрации 1×10^6 – 2×10^6 клеток/мл; высевали в 6-

луночные планшеты с адгезивной поверхностью («Jet Biofil», Китай) и культивировали 24 часа при 37°C, 5% CO₂ для получения моноцитов.

После 24-часовой инкубации не адгезированные клетки удаляли, адгезированные клетки, соответствующие моноцитам, открепляли от поверхности лунок с помощью раствора Трипсин-Версена («БиолоТ», Россия). Количество моноцитов и их жизнеспособность определяли методом проточной цитометрии с помощью меченых флуорохромами антител – anti CD14-PerCP/Cyanine5.5 и суправитального красителя DAPI («Elabscience», Китай).

Для получения МГПК моноциты в концентрациях от 1×10^5 до 6×10^5 клеток/мл высевали в лунки 6-луночного планшета и культивировали в течение 10 или 14 дней при 37°C, 5% CO₂ со сменой среды 1 раз в 2-3 дня. Для дифференцировки МПК в МГПК к среде RPMI-1640 со стабильным глутамином («БиолоТ», Россия) добавляли раствор пенициллина-стрептомицина (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл соответственно; «БиолоТ», Россия) и коктейль цитокинов (все – производства «Cloud-Clone Corp», Китай) в следующих комбинациях: 1) GM-CSF (10 нг/мл) и IL-34 (100 нг/мл); 2) GM-CSF (10 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл) и TGFβ (10 нг/мл); 3) GM-CSF (10 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл) и IL-3 (10 нг/мл); 4) GM-CSF (10 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл), TGFβ (10 нг/мл) и IL-3 (10 нг/мл).

После 10 или 14 дней культивирования МГПК открепляли от поверхности лунок с помощью раствора Трипсин-Версена («БиолоТ», Россия). Для определения количества жизнеспособных клеток и фенотипа МГПК, клетки инкубировали с суправитальным красителем DAPI («Elabscience», Китай) и антителами, мечеными флуорохромами: anti P2RY12-PE («Biolegend», США); anti TMEM119-Alexa Fluor 647 («Biolegend», США), согласно инструкциям производителей.

Исследования по иммунофенотипированию моноцитов периферической крови и МГПК выполнено на проточном цитометре «Longcyte C3111» («Challenbio», Китай) в ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии в радиобиологии» ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства» (Челябинск, Россия).

На этапе статистической обработки принадлежность выборки нормальной генеральной совокупности проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные имели нормальное распределение и были представлены в виде средних значений и 95% доверительного интервала (ДИ). Оценку значимости различий между группами проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорными попарными сравнениями по Тьюки. Для расчетов использовали программное обеспечение PAST v. 4.03.

3 Результаты и обсуждение

В нашем исследовании, для получения МГПК, у детей с аутизмом в возрасте от 6 до 12 лет было собрано от 3 до 7 мл венозной крови в пробирки

с К₃ЭДТА. Медианные значения всех показателей лейкоцитарной формулы крови в группе обследованных нами детей с аутизмом находились в пределах возрастной нормы. У трех детей (16,7%) относительное количество целевой популяции клеток – моноцитов, выходило за верхние границы референсного диапазона, равного 2-10 % от всех лейкоцитов.

Количество МПК, полученных нами при фракционировании клеток на градиенте плотности, было сопоставимо с данными Quek H. с соавторами [7] и составляло от 1×10^6 до 4×10^6 клеток/мл. Тем не менее, как и в исследовании Llaves-López A. с соавторами [5], мы увеличили плотность высева МПК, для получения моноцитов методом пластинчатой адгезии, со стандартизированного значения в 4×10^5 клеток до 1×10^6 - 2×10^6 клеток на лунку. Такая модификация метода позволила нам получать от 1×10^5 до 6×10^5 моноцитов (99% живых клеток), среди которых более 77% экспрессировали на поверхности маркер CD14⁺ (среднее значение: 81,7%; 95% ДИ: 77,8%; 85,7%).

Критическими параметрами для получения МГПК из моноцитов периферической крови у детей с аутизмом в количестве, достаточном для проведения функциональных тестов, в том числе, определения маркеров микроглии с помощью метода проточной цитометрии, стали: начальное число моноцитов в лунке (0 день), длительность инкубации и количество клеток в лунке на финальный день культивирования. Так, к 14 дню инкубации, количество клеток в лунке варьировало в среднем от 6,6 до 12,2%, от исходной концентрации клеток, что согласуется с данными Ohgidani M. с соавторами [6]. Тем не менее, абсолютные значения были ниже 1×10^4 клеток в лунке, что не позволяло провести определение их фенотипа. На основании протоколов некоторых исследований [8] нами было принято решение сократить время культивирования клеток до 10 дней. Также нами было установлено, что при начальной концентрации моноцитов от 1×10^5 до 3×10^5 клеток/в лунке (0 день), на 10 день инкубации количество живых клеток варьировало в диапазоне 1×10^4 - 4×10^4 (9,0-13,7% от начальной численности). Если на 0 день инкубации моноцитов было больше 3×10^5 клеток/в лунке, то процент живых клеток на 10 день статистически значимо увеличивался в 2-2,5 раза, до 21,2-28,3%.

Наконец, в существующих протоколах получения МГПК из МПК, используются разные комбинации цитокинов для поддержания жизнеспособности и дифференцировки клеток [5-8]. Наиболее часто применяют два фактора: GM-CSF (10 нг/мл) и IL-34 (100 нг/мл). Нами показано, что при таком коктейле цитокинов, уже на 10 день культивирования, 74,4% клеток несут специфичный для микроглии маркер P2RY⁺, 59,5% – TMEM119⁺ и 57,3% клеток – оба маркера (табл.).

Далее нами была предпринята попытка повысить численность клеток и процент клеток, экспрессирующих специфические маркеры микроглии, на конец срока культивирования. Для этого в качестве третьего фактора к GM-CSF и IL-34 был добавлен: TGF-β (10 нг/мл), или IL-3 (10 нг/мл), а также создана комбинация на основе всех 4-х цитокинов. По данным Sargeant T.J. с соавторами, TGF-β требуется для развития зрелой микроглии *in vitro* и

помогает поддерживать покоящийся фенотип микроглии, полученной из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, но редко используется при получении МГПК из моноцитов периферической крови [8]. Добавление нами TGF- β (10 нг/мл) в среду культивирования, не зависимо от комбинации цитокинов (3/4 фактора) приводило к смерти всех клеток путем апоптоза на 5-7 сутки культивирования (в лунке вместо клеток появлялись образования, по морфологии похожие на апоптотические тельца). Данный эффект требует дополнительного изучения.

IL-3 (10 нг/мл) был добавлен нами в попытке повысить численность выживших клеток на конец срока культивирования. Согласно данным литературы, IL-3 способствует пролиферации микроглии как в условиях *in vivo*, особенно при нарушениях работы мозга, так и в условиях *in vitro* [3]. В результате, нами не обнаружено значимых различий в количестве выживших клеток на 10 день культивирования при сравнении среды с добавлением IL-3 или без него. Процент выживших клеток составил: 24,7%: 25,0% от начальной концентрации моноцитов, для коктейля из 2-х и 3-х цитокинов соответственно. Тем не менее, при введении в среду культивирования IL-3, 72,1% МГПК экспрессировали на своей поверхности маркер микроглии – TMEM119⁺, а 96,1% – P2RY⁺. Для P2RY⁺ различия были статистически значимыми по сравнению с аналогичными показателями при использовании коктейля из двух цитокинов: GM-CSF и IL-34 (табл.).

4 Заключение

Таким образом, по итогам проведенного пилотного исследования, мы установили, что для индукции микроглия-подобных клеток из моноцитов периферической крови детей с аутизмом необходимо 10-ти дневное культивирование не менее 3×10^5 клеток/в лунке, в среде RPMI-1640 со стабильным глутамином, антибиотиками и коктейлем из трех цитокинов: GM-CSF (10 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл), IL-3 (10 нг/мл). Такие параметры культивирования позволяют получить около 6×10^4 клеток, не менее 90% из которых экспрессируют на своей поверхности маркер микроглии – P2RY⁺ и могут быть использованы в качестве модели для изучения механизмов патогенеза аутизма, а также персонифицированных подходов к его лечению.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 24-25-20072.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Влияние различных комбинаций цитокинов на экспрессию p2ry12⁺ и tmem119⁺ микроглия-подобными клетками на 10 день культивирования, n [95% ди].

Table 1. Effect of various cytokine combinations on the p2ry⁺ and tmem119⁺ expression by microglia-like cells at day 10 of cultivation.

Комбинация цитокинов Cytokine combinations	P2RY12 ⁺ , %	TMEM119 ⁺ , %	P2RY12 ⁺ / TMEM119 ⁺ , %
GM-CSF/IL-34	74,4 [72,0; 76,8]	59,5 [56,6; 62,3]	57,3 [43,9; 60,4]
GM-CSF/IL-34/IL-3	96,1* [90,0; 99,2]	72,1 [47,2; 97,0]	67,0 [54,0; 79,9]

Примечание: * - значимые различия между показателями при стимуляции клеток двумя и тремя цитокинами ($p \leq 0,05$).

Note: * - significant differences between the indices when cells were stimulated with two and three cytokines ($p \leq 0.05$).

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Филиппова Юлия Юрьевна, д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия; адрес: 454001, Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129; телефон: 89124045272; e-mail: julse@rambler.ru

Filippova Yuliya Yurievna, PhD (Biology), Professor, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation; address: 454001, Russian Federation, Chelyabinsk, Bratiev Kashirinykh str., 129; telephone: 89124045272; e-mail: julse@rambler.ru

Блок 2. Информация об авторах

Русакова Ксения Андреевна, аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия;

Rusakova Kseniya Andreevna, Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;

Бурмистрова Александра Леонидовна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия;

Burmistrova Alexandra Leonidovna, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОГЛИЯ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АУТИЗМОМ

METHODOLOGICAL ASPECTS OF MONOCYTE-DERIVED MICROGLIA-LIKE CELLS GENERATION AT CHILDREN WITH AUTISM

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОГЛИЯ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАС
GENERATION OF MICROGLIA-LIKE CELLS IN ASD

Ключевые слова: микроглия-подобные клетки, полученные из моноцитов, модели in vitro, IL-3, расстройства аутистического спектра, дети, проточная цитометрия.

Keywords: monocyte-derived microglia-like cells, in vitro models, IL-3, autism spectrum disorders, children, flow cytometry.

Школа Клинической Иммунологии "Сочи-2025".

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 0.

30.04.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет адрес (URL) цитируемой статьи
1	Veiga-Fernandes, H., Pachnis, V. Neuroimmune Regulation during Intestinal Development and Homeostasis. <i>Nat. Immunol.</i> , 2017, Vol. 18, no 2, pp. 116–122.		https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31601405/ [doi:10.1038/ni.3634]
2.	Davit C.J., Hundley R.J., Bacic J.D., Hanson E.M. A pilot study to improve venipuncture compliance in children and adolescents with autism spectrum disorders. <i>J. Dev. Behav. Pediatr.</i> , 2011 Vol. 32, no 7, pp. 521-525.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21694630/ [doi: 10.1097/DBP.0b013e3182245b09]
3.	Gebicke-Haerter P.J., Appel K., Taylor G.D., Schobert A., Rich I.N., Northoff H., Berger M. Rat microglial interleukin-3. <i>J. Neuroimmunol.</i> , 1994, Vol. 50, no 2, pp. 203-214.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8120142/ [doi: 10.1016/0165-5728(94)90047-7]
4.	Heider J., Vogel S., Volkmer H., Breitmeyer R. Human iPSC-Derived Glia as a Tool for Neuropsychiatric Research and Drug Development. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2021, Vol. 22, no 19, pp. 10254.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34638595/ [doi: 10.3390/ijms221910254]
5.	Llaves-López A., Micoli E., Belmonte-	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38900366/

	Mateos C., Aguilar G., Alba C., Marsal A., Pulido-Salgado M., Rabaneda-Lombarte N., Solà C., Serratosa J., Vidal-Taboada J.M., Saura J. Human Microglia-Like Cells Differentiated from Monocytes with GM-CSF and IL-34 Show Phagocytosis of α -Synuclein Aggregates and C/EBP β -Dependent Proinflammatory Activation. <i>Mol. Neurobiol.</i> , 2025, Vol. 62, no 1, pp. 756-772.		[doi: 10.1007/s12035-024-04289-z]
6.	Ohgidani M., Kato T.A., Setoyama D., Sagata N., Hashimoto R., Shigenobu K., Yoshida T., Hayakawa K., Shimokawa N., Miura D., Utsumi H., Kanba S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. <i>Sci. Rep.</i> , 2014, Vol. 4, pp. 4957.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24825127/ [doi: 10.1038/srep04957]
7.	Quek H., Cuní-López C., Stewart R., Lim Y.C., Roberts T.L., White A.R. A robust approach to differentiate human monocyte-derived microglia from peripheral blood mononuclear cells. <i>STAR Protoc.</i> , 2022, Vol. 3, no 4, pp. 101747.	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36201317/ [doi: 10.1016/j.xpro.2022.101747]
8.	Sargeant T.J., Fourrier C. Human	-	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36202170/

	monocyte-derived microglia-like cell models: A review of the benefits, limitations and recommendations. <i>Brain Behav Immun.</i> , 2023, Vol. 107, pp. 98-109.		[doi: 10.1016/j.bbi.2022.09.015]
--	---	--	----------------------------------