Российский иммунологический журнал
2025, Т. 28, № 4, стр. 947-952

Краткие сообщения
Short communications

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal
2025, Vol. 28, № 4, pp. 947-952

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

Филиппова Ю.Ю., Русакова К.А., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

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 персонифицированных терапевтических подходов к лечению нейропсихических 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 градиента 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-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 по-

Адрес для переписки:
Филиппова Юлия Юрьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»
454001, Россия, г. Челябинск,
ул. Братьев Кашириных, 129.
Тел.: 8 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Address for correspondence:
Yuliya Yu. Filippova
Chelyabinsk State University
129 Bratiev Kashirinykh St
Chelyabinsk
454001 Russian Federation
Phone: +7 (912) 404-52-72.
E-mail: julse@rambler.ru

Образец цитирования:
Ю.Ю. Филиппова, К.А. Русакова, А.Л. Бурмистрова «Методологические аспекты получения микроглия-подобных клеток из моноцитов периферической крови у детей с аутизмом» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 4. С. 947-952.
doi: 10.46235/1028-7221-17257-MAO

© Филиппова Ю.Ю. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
Yu.Yu. Filippova, K.A. Rusakova, A.L. Burmistrova "Methodological aspects of ex vivo-generated monocyte-derived microglia-like cells in children with autism", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 4, pp. 947-952.
doi: 10.46235/1028-7221-17257-MAO

© Filippova Yu.Yu. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17257-MAO

лучить 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 персонифицированных подходов к его лечению.

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

METHODOLOGICAL ASPECTS OF *EX VIVO*-GENERATED MONOCYTE-DERIVED MICROGLIA-LIKE CELLS IN CHILDREN WITH AUTISM

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

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Current research findings suggest that dysregulation between the nervous and immune systems is a primary factor contributing to both initiation and progression of autism spectrum disorders (ASD). Microglia consists of resident brain immune cells playing 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 our 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 *via* plate adherence. The 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 performed by 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, a ten-day culture period with $> 3 \times 10^5$ cells *per* well in RPMI-1640 medium containing stable glutamine, antibiotics, and a cocktail of three cytokines: GM-CSF, 10 ng/mL; IL-34, 100 ng/mL; 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 studying ASD pathogenesis and identifying personalized treatment approaches.

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

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

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 персонифицированных терапевтических подходов к лечению нейропсихических заболеваний могут стать микроглия-подобные клетки, полученные из моноцитов периферической крови (monocyte-derived microglia-like cells, MDMi) [8]. В последние десять лет разработаны подробные и надежные протоколы получения MDMi [5, 6, 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 MDMi. Кроме того, для моноцитов детей с РАС характерны динамические изменения функциональной активности, что может оказывать влияние на их способность к дифференцировке в MDMi в условиях *in vitro*.

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

Материалы и методы

Микроглия-подобные клетки (MDMi) получали из моноцитов периферической крови согласно протоколу H. Quek и соавт. [7] с некоторыми модификациями.

Кровь из вены была собрана натощак в утренние часы у 18 детей с диагнозом по МКБ-10: F84.0 «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/см^3, ООО «БиолоТ», Россия). Полученную фракцию МПК разводили в среде RPMI-1640 со стабильным глутамином (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением пенициллина-стрептомицина (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл соответственно; ООО «БиолоТ», Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Biowest, Франция), до концентрации $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ клеток/мл; высевали в 6-луночные планшеты с адгезивной поверхностью (Jet Biofil, Китай) и культивировали 24 часа при 37 °C, 5% CO_2 для получения моноцитов.

После 24-часовой инкубации не адгезированные клетки удаляли, адгезированные клетки, соответствующие моноцитам, открепляли от поверхности лунок с помощью раствора Трипсин-Версена (ООО «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 MDMi 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% CO_2 со сменой среды 1 раз в 2-3 дня. Для дифференцировки МПК в MDMi к среде RPMI-1640 со стабильным глутамином (ООО «БиолоТ», Россия) добавляли раствор пенициллина-стрептомицина (100 ЕД/мл и 100 мкг/мл соответственно; ООО «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 TGF-β (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), TGF-β (10 нг/мл) и IL-3 (10 нг/мл).

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

Исследования по иммунофенотипированию моноцитов периферической крови и MDMi 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» (г. Челябинск).

На этапе статистической обработки принадлежность выборки нормальной генеральной совокупности проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные имели нормальное рас-

пределение 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.

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании, для получения MDMi, у детей с аутизмом в возрасте от 6 до 12 лет было собрано от 3 до 7 мл венозной крови в пробирки с K_3ЭДТА. 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 H. Quek и соавт. [7] и составляло от 1×10^6 до 4×10^6 клеток/мл. Тем не менее, как и в исследовании A. Llaves-Lopez и соавт. [5], мы увеличили плотность высева МПК, для получения моноцитов методом пластинчатой адгезии, со стандартизированного значения в 4×10^5 клеток до $1 \times 10^6 – 2 \times 10^6$ 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 MDMi 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-й день), длительность инкубации и количество клеток в лунке на финальный день культивирования. Так, к 14-му дню инкубации, количество клеток в лунке варьировало в среднем от 6,6% до 12,2%, от исходной концентрации клеток, что согласуется с данными M. Ohgidani и соавт. [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 1×10^5до 3×10^5 клеток/в лунке (0-й день), на 10-й день инкубации количество живых клеток варьировало в диапазоне $1 \times 10^4 – 4 \times 10^4$ (9,0-13,7% от начальной численности). Если на 0-й день инкубации моноцитов было больше 3×10^5 клеток/в лунке, то процент живых клеток на 10-й день статистически значимо увеличивался в 2-2,5 раза, до 21,2-28,3%.

Наконец, в существующих протоколах получения MDMi из МПК, используются разные комбинации цитокинов для поддержания жизнеспособности и дифференцировки клеток [5, 6, 7, 8]. Наиболее часто применяют два фактора: GM-CSF (10 нг/мл) и IL-34 (100 нг/мл). Нами показано, что при таком коктейле цитокинов,

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОМБИНАЦИЙ ЦИТОКИНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ $P2RY12^+$ И $TMEM119^+$ МИКРОГЛИЯ-ПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ НА 10-Й ДЕНЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, M (95% ДИ)

TABLE 1. EFFECT OF VARIOUS CYTOKINE COMBINATIONS ON THE $P2RY^+$ AND $TMEM119^+$ EXPRESSION BY MICROGLIA-LIKE CELLS AT DAY 10 OF CULTIVATION, M (95% CI)

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 ($p \leq 0.05$).

уже на 10-й день культивирования, 74,4% клеток несут специфичный для микроглии маркер P2RY12$^+$, 59,5% – TMEM119$^+$ и 57,3% клеток – оба маркера (табл. 1).

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 цитокинов. По данным T.J. Sargeant и соавт., 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 MDMi 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-е сутки культивирования (в лунке вместо клеток появлялись образования, по морфологии похожие на апоптические 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-й день культивирования при сравнении среды с добавлением IL-3 или без него. Процент выживших клеток при использовании коктейля из двух цитокинов (GM-CSF и IL-34) составил 24,7% от начальной концентрации моноцитов в лунке, из трех цитокинов (GM-CSF, IL-34 и IL-3) – 25,0%. Тем не менее при введении в среду культивирования IL-3, 72,1% MDMi экспрессировали на своей поверхности маркер микроглии – TMEM119$^+$, а 96,1% – P2RY12$^+$. Для P2RY12$^+$ различия были статистически значимыми по сравнению с аналогичными показателями при использовании коктейля из двух цитокинов: GM-CSF и IL-34 (табл. 1).

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-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 персонифицированных подходов к его лечению.

Список литературы / References

1. Andoh M., Ikegaya Y., Koyama R. Microglia as possible therapeutic targets for autism spectrum disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 2019, Vol. 167, pp. 223-245.*

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. *J. Dev. Behav. Pediatr., 2011, Vol. 32, no 7, pp. 521-525.*

3. Gebicke-Haerter P.J., Appel K., Taylor G.D., Schobert A., Rich I.N., Northoff H., Berger M. Rat microglial interleukin-3. *J. Neuroimmunol., 1994, Vol. 50, no. 2, pp. 203-214.*

4. Heider J., Vogel S., Volkmer H., Breitmeyer R. Human iPSC-derived glia as a tool for neuropsychiatric research and drug development. *Int. J. Mol. Sci., 2021, Vol. 22, no. 19, 10254.* doi: 10.3390/ijms221910254.

5. Llaves-López A., Micoli E., Belmonte-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/EBPβ-dependent proinflammatory activation. *Mol. Neurobiol., 2025, Vol. 62, no 1, pp. 756-772.*

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. *Sci. Rep., 2014, Vol. 4, 4957.* 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. *STAR Protoc., 2022, Vol. 3, no 4, 101747.* doi: 10.1016/j.xpro.2022.101747.

8. Sargeant T.J., Fourrier C. Human monocyte-derived microglia-like cell models: A review of the benefits, limitations and recommendations. *Brain Behav. Immun., 2023, Vol. 107, pp. 98-109.*

Авторы:

Филиппова Ю.Ю. *— д.б.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия*

Русакова К.А. *— аспирант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия*

Бурмистрова А.Л. *— д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия*

Authors:

Filippova Yu.Yu., *PhD, MD (Biology), Associate Professor, Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

Rusakova K.A., *Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

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

Поступила 30.04.2025
Принята к печати 22.06.2025

Received 30.04.2025
Accepted 22.06.2025