

УДК 576:576.5+57.085.23

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МОДЕЛИ ИХ ИЗУЧЕНИЯ *in vitro*

В. Э. МАНТИВОДА¹⁾, Н. Г. АНТОНЕВИЧ¹⁾, А. Е. ГОНЧАРОВ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Микроглиальные клетки – это один из ключевых клеточных элементов центральной нервной системы. В последние годы появляется все больше данных о роли микроглиальных клеток в патогенезе различных психических и нейродегенеративных заболеваний. Однако исследование микроглии головного мозга человека ограничено по техническим и этическим причинам, в связи с чем актуальным направлением современной биологии и медицины является создание новой клеточной модели *in vitro* микроглии человека. Цель настоящего обзора состоит в описании функциональных и иммунологических свойств микроглии, а также основных моделей *in vitro*, используемых в настоящее время для исследования свойств клеток в норме и при патологии.

Ключевые слова: микроглия; микроглиеподобные клетки; модели *in vitro*; клеточная биология.

Образец цитирования:

Мантивода ВЭ, Антоневиц НГ, Гончаров АЕ. Иммунобиологическая характеристика микроглиальных клеток и модели их изучения *in vitro*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:4–13.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-4-13>

For citation:

Mantsivoda VE, Antonevich NG, Hancharou AY. Immunobiological characteristics of microglial cells and *in vitro* models for their obtaining. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:4–13. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-4-13>

Авторы:

Вероника Эдуардовна Мантивода – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.
Наталья Георгиевна Антоневиц – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биофизики.
Андрей Евгеньевич Гончаров – кандидат медицинских наук, доцент; директор.

Authors:

Veranika E. Mantsivoda, junior researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
veronikamantivoda@gmail.com
Natalia G. Antonevich, PhD (biology); head of the laboratory of immunology and cell biophysics.
antonevich.n@gmail.com
Andrei Y. Hancharou, PhD (medicine), docent; director.
andrei.hancharou@gmail.com

IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MICROGLIAL CELLS AND *in vitro* MODELS FOR THEIR OBTAINING

V. E. MANTSIVODA^a, N. G. ANTONEVICH^a, A. Y. HANCHAROU^a

^a*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

Corresponding author: V. E. Mantsivoda (veronikamantivoda@gmail.com)

Microglial cells are one of the main cellular elements of the central nervous system. In recent years, more and more data has appeared about the role of microglial cells in the pathogenesis of various mental and neurodegenerative diseases. However, the study of human brain microglia is limited for technical and ethical reasons, so the development of a new *in vitro* cell model of human microglia is a perspective trend in biology and medicine. The aim of this review is to describe the functional and immunological properties of microglia and to analyse *in vitro* models that currently used for study the properties of cells in normal and pathological conditions.

Keywords: microglia; microglia-like cells; *in vitro* models; cell biology.

Введение

Микроглиальные клетки представляют собой иммунокомпетентные клетки центральной нервной системы (ЦНС). Основными функциями микроглии являются поддержание гомеостаза ЦНС путем удаления апоптотических клеток и клеточного мусора, участие в регуляции синаптической организации, миелинизации, возбудимости нервных клеток, а также оказание трофической поддержки нейронам [1; 2].

В последние годы публикуется все больше данных о роли микроглии в патогенезе различных психических и нейродегенеративных заболеваний. Так, нейровоспаление, ассоциированное с повышенной секрецией микроглией провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-10, IL-6), является одним из этиологических факторов развития шизофрении. Нейровоспаление оказывает негативное влияние на процессы, имеющие ключевое значение для нормального функционирования головного мозга (миелинизация, синаптический прунинг) [3; 4]. По данным ВОЗ, психические расстройства относятся к числу наиболее серьезных проблем общественного здравоохранения в Европейском регионе, занимая первое место среди факторов инвалидности и третье место (после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний) среди причин, ведущих к возникновению социального бремени заболеваний [5]. В связи с этим изучение работы микроглиальных клеток в норме и при патологии является актуальным направлением современной биологии и медицины. Но исследование микроглии головного мозга человека имеет ряд ограничений, связанных прежде всего со сложностью получения живых клеток по этическим и техническим причинам. Существуют альтернативные модели для изучения микроглиальных клеток. В первую очередь это использование перевиваемых линий клеток животных [6–8]. Микроглию человека также можно получить путем дифференцировки из моноцитов периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) [9; 10]. Однако стоит учитывать, что стандартизированный метод получения микроглиеподобных клеток отсутствует.

В данной статье изложены история открытия и теории происхождения микроглиальных клеток, описаны их иммунофункциональные свойства, а также освещены основные вопросы, связанные с исследованием микроглии, и возможности применения микроглиальных клеток в биологии и медицине.

История открытия и теории происхождения микроглиальных клеток

В 1899 г. немецким невропатологом Ф. Нисслем впервые описаны микроглиальные клетки, связанные с воспалением и повреждением. Они были названы *Stäbchenzellen*, или стержневыми клетками (*rod-like cells*). Данный тип микроглии обнаруживался у людей с психическими и нейродегенеративными заболеваниями. Однако из-за несовершенства методов выявления различных клеточных структур функцию этих клеток в то время установить не удалось [11].

Позднее, в 1913 г., знаменитый испанский врач-гистолог С. Рамон-и-Кахаль, активно занимаясь изучением строения нейроглии с помощью метода импрегнации ткани головного мозга солями металлов, установил, что нейроны и астроциты являются «первым и вторым элементами» нервной ткани. При этом ученым была обнаружена еще одна группа клеточных элементов «не астроцитарного и не нейронального происхождения», которую никак не удавалось окрасить. С. Рамон-и-Кахаль назвал такие

клеточные структуры «третьим элементом» нервной ткани, или адендритными клетками. Преимущественно они обнаруживались в белом веществе головного мозга, периваскулярных и периневральных пространствах [12].

Идентифицировать данные клетки, впервые используя термин «микроглия», в 1919 г. удалось П. дель Рио-Ортеге – ученику С. Рамон-и-Кахала. П. дель Рио-Ортега разработал собственную модификацию окрашивания аммиачным карбонатом серебра для визуализации глиальных клеток. Благодаря данному методу были изучены и детально описаны морфология микроглии и ее функциональные особенности (фагоцитарная активность, способность к миграции), а также предложена концепция мезодермального происхождения микроглиальных клеток [13].

Следует отметить, что вопрос о происхождении микроглиальных клеток долгое время оставался предметом дискуссий и исследований. Начиная со второй половины XX в. ряд ученых придерживались концепции нейроэктодермального происхождения микроглиальных клеток, согласно которой микроглия формируется из нейроэктодермы, так как данный тип клеток имеет общие характеристики с другими клетками микроглии. Например, в 1975 г. ученые С. Фуджита и Т. Китамура утверждали, что у трех типов микроглии есть общий предшественник – глиобласт [14]. Также в 1975 г. на основании экспериментов с введением [3H]тимидина крысам и мышам установлено, что клетки микроглии в гиппокампе появляются через 2 дня после рождения из клеток-предшественников (глиобластов) [15]. Методами иммуногистохимического окрашивания было выявлено, что нейроэпителиальные клетки и микроглия имеют ряд общих маркеров, например липокортин-1 (аннексин-A1). Это послужило основанием для предположения нейроэпителиального происхождения микроглиальных клеток [16]. Тем не менее все эти данные требовали дополнительных доказательств, помимо экспрессии общих молекул, и не исключали того факта, что существуют источники микроглиальных клеток вне нейроэктодермы, которые колонизируют головной мозг до их обнаружения, к примеру желточный мешок или моноциты периферической крови. Таким образом, была предложена теория моноцитарного происхождения микроглии, согласно которой микроглиальные клетки формируются из моноцитов циркулирующей крови. Впервые эту гипотезу выдвинули немецкие ученые К. Санта и А. Юба в 1933 г. [17]. В 1985 г. удалось визуализировать популяцию клеток в развивающемся и зрелом головном мозге путем мечения специфичной для макрофагов мыши молекулой F4/80. Клетки F4/80⁺ наблюдали в сосудистых сплетениях головного мозга еще до появления микроглии. В течение первых 5 дней после рождения клетки F4/80⁺ мигрировали в паренхиме головного мозга и приобретали разветвленную морфологию, типичную для микроглиальных клеток [18], что и стало обоснованием данной теории.

В настоящее время наиболее убедительной и доказанной считается концепция мезодермального происхождения микроглии. Данное происхождение предполагал П. дель Рио-Ортега в 1932 г. при идентификации клеток. Используя метод импрегнации серебром, он обнаружил, что клетки амeboидной морфологии изначально концентрировались на поверхности головного мозга, а затем в процессе эмбрионального развития мигрировали в мозг через мозолистое тело, свод, внутреннюю капсулу, парус мозжечка и основания черепных нервов и превращались в разветвленную форму микроглии. Современные исследования с использованием нокаутных мышей, которые экспрессируют белок GFP под контролем промотора хемокинового рецептора CX3CR1, доказали, что микроглиальные клетки происходят из эритромиелоидных клеток-предшественников CD45⁻c-kit⁺ в желточном мешке в ходе раннего эмбрионального развития [19; 20]. На 9-й день эмбрионального развития клетки-предшественники, имеющие фенотип CD45⁺c-kit⁻CX3CR1⁺, мигрируют в головной мозг до формирования гематоэнцефалического барьера и остаются там после его образования. Дифференцировка клеток-предшественников в клетки микроглии зависит от миелоидных транскрипционных факторов PU.1 и IRF8. Стоит отметить, что для раннего развития микроглии не требуются такие транскрипционные факторы, как Myb, Id2, Batf3 и Klf4, необходимые для дифференцировки других популяций миелоидных клеток, например моноцитов и дендритных клеток [20; 21]. Для поддержания популяции микроглии и ее выживания во взрослом организме нужна активация сигнального пути, опосредуемого рецептором CSF1R. Лигандами CSF1R являются молекулы CSF1 и IL-34 (открыт лишь в 2008 г.), продуцируемые в ЦНС (в первую очередь нейронами). Проведенные на мышах исследования показали, что дефицит IL-34 в головном мозге приводит к значительному снижению популяции микроглиальных клеток [22].

Гетерогенность морфологии и фенотипа микроглиальных клеток

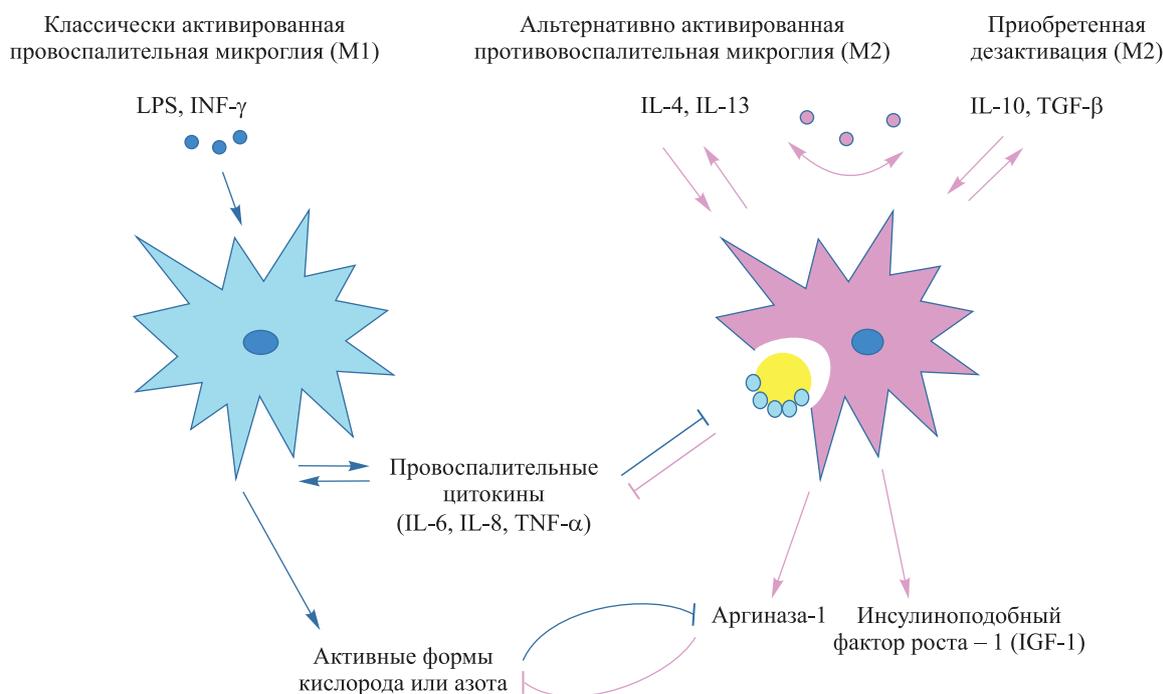
Микроглия составляет приблизительно 5–10 % от всех клеток ЦНС. Микроглиальные клетки, являясь иммунокомпетентными клетками ЦНС, обладают высокой пластичностью и претерпевают ряд морфологических и функциональных трансформаций в ответ на повреждение, травму или изменение их микроокружения. В нормальных физиологических условиях клетки микроглии обладают разветвленной морфологией, характеризующейся многочисленными отростками, которые осуществляют постоянный

мониторинг среды, при этом тело клетки остается фиксированным. В активированном состоянии клетки имеют амебоидную или стержневую (палочковидную) морфологию [2].

Подобно тканевым макрофагам, микроглию подразделяют на две функциональные категории – классически активированную провоспалительную (M1) и альтернативно активированную противовоспалительную (M2). Однако данное функциональное деление является упрощенным и дает лишь поверхностное представление о физиологических свойствах микроглиальных клеток.

Микроглия M1 характеризуется синтезом провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , и активных форм кислорода или азота. Данный фенотип наблюдается при активации INF- γ или микробными антигенами, например липополисахаридом (LPS).

Микроглия M2 активируется IL-4, IL-13 и оказывает противовоспалительное действие, синтезируя факторы для восстановления нейронов, такие как аргиназа, хитиназа типа 3 (Chi3l3). IL-4, IL-13 являются хорошо изученными противовоспалительными цитокинами, которые могут подавлять выработку провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TNF- α . Кроме того, микроглия M2 усиливает высвобождение нейротрофических факторов, в частности инсулиноподобного фактора роста – 1 (IGF-1), что способствует разрешению воспаления и выживанию нейронов. Микроглии M2 также присущ фенотип, характеризующийся состоянием приобретенной дезактивации (*acquired deactivation*). Он индуцируется прежде всего воздействием противовоспалительных цитокинов IL-10, TGF- β и поглощением апоптотических клеток (см. рисунок) [23; 24].



Состояния микроглиальных клеток в зависимости от пути активации и секретируемых молекул (с изменениями согласно данным работы [24])
Microglia states depending on the activation pathway and secreted molecules (with changes according to the data of work [24])

Недавно была принята концепция, согласно которой микроглия переходит из гомеостатического состояния в патологическое с последующим приобретением активированного DAM-фенотипа, ассоциированного с заболеванием (*disease-associated microglia*). Данный тип микроглии возникает при накоплении в окружающей среде апоптотических телец, образующихся в результате гибели нейронов, продуктов деградации липидов, внеклеточных скоплений белковых агрегатов, а также остатков миелина [25]. DAM-микроглия отличается высокой экспрессией Iba-1 и низкой экспрессией других микроглиальных маркеров, таких как P2RY12, P2RY13, CX3CR1, CD33 и TMEM119 [26]. Также для DAM-микроглии характерна повышенная фагоцитарная активность [25]. Фагоцитарная активность микроглии зависит от активации сигнального пути, опосредованного рецептором TREM2, экспрессия которого свойственна миелоидным клеткам. Недавние исследования выявили ряд мутаций в гене, кодирующем TREM2, которые повышают риск развития болезни Альцгеймера у людей в 3–4 раза. В головном мозге только микроглиальные клетки обладают высокой экспрессией TREM2, что дает основания предполагать важную роль микроглии в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [27].

Микроглиальные маркеры

Микроглиальные маркеры включают в себя как поверхностные, так и внутриклеточные молекулы (см. таблицу). К самым распространенным маркерам относят молекулу Iba-1. Было показано, что в головном мозге молекула Iba-1 специфична только для микроглиальных клеток и не экспрессируется нейронами, астроглией или олигодендроглией [28]. Также наиболее специфичными микроглиальными маркерами являются молекулы TMEM119 и P2RY12. С помощью синтезированного антитела к TMEM119 ученым удалось доказать, что в головном мозге мышей и человека экспрессия молекулы TMEM119 характерна только для микроглиальных клеток [29]. В 2003 г. были получены первые данные о присутствии рецептора P2RY12 на мембране клеток микроглии [30]. В настоящее время опубликовано большое количество работ, доказывающих, что в головном мозге P2RY12 не экспрессируется никакими клетками, кроме микроглиальных. P2RY12 является специфичным маркером для идентификации клеток микроглии на протяжении всей жизни человека [31].

Стоит отметить, что микроглиальные клетки, имея мезодермальное происхождение, разделяют экспрессию широкого спектра молекул миелоидного ряда (CD11b, CD14, F4/80, CD80, CD115 (CSF-R1), CX3CR1, CD16, CCR2, CD209) и панлейкоцитарного ряда (CD45, HLA-DR) [32–34].

Микроглиальные маркеры
 Microglial markers

Маркер	Альтернативное название	Тип по локализации в клетке	Экспрессия	Функция
<i>Специфичные микроглиальные маркеры</i>				
Iba-1	Ионизированная кальцийсвязывающая адапторная молекула – 1	Внутриклеточный	Микроглия	Является кальцийсвязывающим белком
TMEM119	Трансмембранный белок – 119	Поверхностный	Микроглия	Способствует дифференцировке миобластов в остеобласты
P2RY12	Пуринергический рецептор P2Y12	Поверхностный	Тромбоциты, микроглия	Участвует в агрегации тромбоцитов, свертывании крови, миграции микроглиальных клеток
<i>Молекулы панлейкоцитарного ряда</i>				
CD45	Тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа, общий лейкоцитарный антиген	Поверхностный	Лимфоциты, лейкоциты, моноциты, макрофаги	Осуществляет активацию Т-клеток через Т-клеточный рецептор
HLA-DR	Человеческий лейкоцитарный антиген	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты	Выступает рецептором молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС II)
<i>Молекулы миелоидного ряда</i>				
CD14	–	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы	Является мембранным гликозилфосфатидилинозитолсвязанным белком и корцептором для Toll-подобных рецепторов, способствует клеточному ответу на низкие дозы LPS
CD11b	Интегрин альфа-М	Поверхностный	НК-клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, микроглия	Представляет собой альфа-субъединицу интегрина (MAC-1), обеспечивает клеточную адгезию, а также поглощение частиц, покрытых комплементом

Окончание таблицы
Ending table

Маркер	Альтернативное название	Тип по локализации в клетке	Экспрессия	Функция
CD209	Молекула межклеточной адгезии дендритных клеток 3-захватывающего неинтегрина (DC-SIGN)	Поверхностный	Дендритные клетки, макрофаги	Является С-лектиновым рецептором, осуществляет распознавание патогенов, обеспечивает клеточную адгезию
CD80	B7-1	Поверхностный	Т-лимфоциты, моноциты	Представляет собой мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, является лигандом молекул CD28 и CD152 (CTLA-4), а также костимуляторной молекулой, участвующей в активации Т-клеток
CD115	Рецептор колониестимулирующего фактора – 1 (CSF-R1)	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, остеокласты	Осуществляет регуляцию роста, дифференцировку миелоидных клеток
CX3CR1	Хемокиновый рецептор типа 1, рецептор типа 1 хемокина CX3С, фракталиновый рецептор	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, остеокласты, микроглия	Обеспечивает миграцию и адгезию клеток
CD16	FcγRIII	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, НК-клетки, нейтрофилы	Является низкоаффинным рецептором к иммуноглобулину G
CCR2	CD192, хемокиновый рецептор типа 2	Поверхностный	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, микроглия	Выступает рецептором моноцитарного хемоаттрактантного белка – 1, обеспечивает хемотаксис моноцитов

Для различия резидентной микроглии и периваскулярных моноцитов или макрофагов используют количественную оценку уровня экспрессии (высокий (high) или низкий (low)). Таким образом, микроглиальные клетки описывают как CD11b^{high} CD45^{low}, а моноциты или макрофаги – как CD11b^{high} CD45^{high}, однако стоит учитывать, что экспрессия CD45 микроглией увеличивается с возрастом человека [35]. Также выявлено различие в экспрессии молекулы хемокинового рецептора CX3CR1 между микроглией и моноцитами. Микроглиальные клетки характеризуются высокой экспрессией CX3CR1 и низкой экспрессией молекулы CCR2 (CD192) (CX3CR1^{high} CCR2 (CD192)^{low}) по сравнению с моноцитами (CX3CR1^{low} CCR2 (CD192)^{high}) [36].

Однако микроглиальные клетки отличаются определенной степенью гетерогенности в экспрессии всех вышеперечисленных молекул (см. таблицу). Диапазон экспрессии варьируется в зависимости от степени активации микроглиальных клеток, локализации в головном мозге, возраста [34].

Модели *in vitro* микроглиальных клеток

За прошедшее время были созданы различные модели *in vitro* для изучения микроглии. Наиболее распространенными из них являются клеточные линии микроглии, полученные из головного либо спинного мозга грызунов (мышей (BV2, C8-B4, EOC, MG5, N3, N9) и крыс (HAPI, Ra2, MLS-9)), человеческого эмбриона (CHME-5, HMO6) или взрослого человека и иммортализованные путем вирусной трансдукции онкогенами *v-myc*, *v-raf*, *v-mil*, *c-myc*, *SV40 T antigen* либо путем спонтанной иммортализации в клеточной культуре [6; 37].

Использование иммортализованных клеточных линий имеет как преимущества, так и недостатки. В частности, процесс иммортализации приводит к изменению микроглиального фенотипа, а также некоторых функциональных свойств клеток, что вызывает затруднения при интерпретации результатов исследований [38]. Главным достоинством данной модели является ее доступность, так как клетки обладают неограниченной пролиферативной способностью, что обеспечивает большое количество биомассы для исследований. В то же время протоколы получения первичных культур микроглиальных клеток достаточно сложны в исполнении, а сами клетки обладают ограниченным потенциалом к делению [38; 39].

Применение первичной культуры микроглии ограничено по этическим и техническим причинам. Например, для получения первичной человеческой микроглии используют абортивный материал или донорский материал после смерти человека. При этом стоит учитывать, что условия и время транспортировки в лабораторию, последующие технические манипуляции для выделения культуры микроглии будут непосредственно влиять не только на жизнеспособность, но и на функциональные свойства клеток [39]. Как упоминалось ранее, микроглия имеет различия в уровнях экспрессии некоторых генов в зависимости от возраста. Так, гены *TMEM119*, *MafB* экспрессируются только во взрослом организме, что свидетельствует о некорректности обобщения данных, полученных при исследовании только эмбриональной микроглии [40].

Было показано, что, несмотря на большое сходство человеческой модели микроглиальных клеток и зооморфных моделей (грызуны) в экспрессии молекул Iba-1, фактора транскрипции PU.1, а также схожую реакцию на эндогенные и экзогенные стимулы, например на LPS, M-CSF, существуют некоторые важные различия. Так, микроглия грызунов, в отличие от человеческой, не экспрессировала ряд генов, продукты которых вовлечены в иммунный ответ (гены рецепторов *TLR*, *Fcy*, *SIGLEC (CD33)*, а также гены *TAL1*, *IFI16*, участвующие в регуляции пролиферации и клеточного цикла) [7]. Анализ транскриптомов при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) выявил различия в экспрессии отдельных генов, соответствующих данным заболеваниям, между грызунами и человеком [41]. Таким образом, из-за межвидовых различий необходимо более внимательно подходить к вопросу экстраполяции данных, полученных при исследовании на зооморфных моделях.

В последние годы были предложены альтернативные модели микроглиальных клеток, основанные на дифференцировке из иПСК и моноцитов периферической крови человека. В 2007 г. впервые получены иПСК из фибробластов дермы взрослого человека путем их перепрограммирования с помощью введения четырех транскрипционных факторов – Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4 [42]. В дальнейшем стали появляться протоколы получения микроглиеподобных клеток из иПСК.

В 2017 г. были представлены данные, описывающие дифференцировку иПСК в микроглиеподобные клетки в течение 5–6 недель. Изначально иПСК человека культивировали на протяжении 10 дней в среде с добавлением FGF2 (50 нг/мл), VEGF (50 нг/мл), TPO (50 нг/мл), SCF (10 нг/мл), IL-3 (10 нг/мл), IL-6 (50 нг/мл), периодически помещая в условия 5 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C для дифференцировки в миелоидные клетки-предшественники CD45⁺. Затем исходную среду меняли на бессывороточную среду DMEM/F12 (без фенолового красного), содержащую M-CSF (25 нг/мл), IL-34 (100 нг/мл), TGF-β1 (50 нг/мл), и культивировали в стандартных условиях на протяжении 25 дней (каждые 2 дня добавляли по 2 мл свежей среды, а на 12-й день заменяли 50 % от общего объема среды на свежую среду). На 25-й день дифференцировки к клеткам дополнительно добавляли гликопротеин OX-2 (CD200) (100 нг/мл) и хемокин CX3CL1 (100 нг/мл) и культивировали еще в течение 3 дней. Анализ экспрессии генов полученных микроглиеподобных клеток показал сходство с первичной культурой микроглии взрослого человека [9; 10].

В 1994 г. появились первые сведения о том, что культивирование полученных от крыс моноцитов или макрофагов на монослое астроцитов либо в астроцитарной кондиционированной среде приводит к дифференцировке клеток в микроглиальном направлении с характерной разветвленной морфологией [43]. Результаты этих исследований положили начало разработке модели индуцированных микроглиеподобных клеток (*induced microglia-like cells*), дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, для изучения функциональных свойств микроглии как в норме, так и при патологии, в частности при нейродегенеративных и психических заболеваниях.

В 2006 г. опубликован первый протокол получения микроглиеподобных клеток, которые ученые использовали для изучения ВИЧ-инфекции [44]. Он основывался на выделении моноцитов из фракции мононуклеаров периферической крови с последующим культивированием клеток в питательной среде DMEM, содержащей FBS (10 %), смесь антибиотиков, GM-CSF (1 нг/мл) и M-CSF (10 нг/мл), на протяжении 2 дней. После этого моноциты пересевали и культивировали при тех же условиях, но уже с добавлением 25 % эмбриональной астроцитарной кондиционированной среды около 8 дней до появления

разветвленных микроглиеподобных клеток. Иммунофенотипический анализ полученных клеток показал высокую экспрессию специфичного для микроглии маркера Iba-1, а также среднюю экспрессию CD4, CD14 и низкую экспрессию HLA-DR, CCR5, CXCR4 [44].

Протоколы получения микроглиеподобных клеток имеют некоторые различия. Одни из них для индукции дифференцировки предусматривают применение только коктейля цитокинов IL-34 (100 нг/мл), GM-CSF (10 нг/мл), в то время как другие предполагают использование дополнительных факторов, таких как TGF- β , IFN- γ , M-CSF, а также астроцитарную кондиционированную среду и внеклеточный матрикс. Главным преимуществом данных методик является то, что получить микроглиеподобные клетки для дальнейших исследований удается за 10–14 дней. При этом иммунофенотип клеток характеризуется экспрессией типичных микроглиальных маркеров, таких как P2RY12, CD68, Iba-1, IRF8, TMEM119, CD11b, HLA-DR [45–48]. Микроглиеподобные клетки и первичная микроглия также схожи в экспрессии генов *APOE*, *TREM2*, *CIQA-C*, *IRF8b*, *P2RX7*, *P2RY12* [47; 49].

Заключение

Согласно современным представлениям в ходе эмбрионального развития нативные микроглиальные клетки головного мозга происходят из эритромиелоидных клеток-предшественников CD45⁻c-kit⁺ желточного мешка. Для микроглиальных клеток характерна экспрессия общих миелоидных маркеров, ряда маркеров моноцитарно-макрофагальной линии, а также специфичных только для микроглии молекул. В настоящее время существуют три варианта получения микроглии для научно-исследовательских целей – первичная культура из тканей ЦНС, перевиваемые клеточные линии, а также дифференцировка из iPСК и моноцитов. Применение моделей микроглиальных клеток, основанных на дифференцировке из iPСК и моноцитов периферической крови человека, позволяет преодолеть ряд технических и этических сложностей, которые возникают при использовании первичной культуры или перевиваемых линий. Однако это достаточно новая область научных исследований. В дальнейшем требуются разработка стандартизированного метода получения микроглиеподобных клеток, подробное описание функциональных и морфологических свойств микроглии в целях расширения научной доказательной базы возможности ее использования в качестве модели *in vitro* для изучения клеток в норме и при патологии.

Библиографические ссылки/References

1. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annual Review of Physiology*. 2017;79: 619–643. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.
2. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews*. 2011;91(2):461–553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.
3. De Picker LJ, Morrens M, Chance SA, Boche D. Microglia and brain plasticity in acute psychosis and schizophrenia illness course: a meta-review. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:238. DOI: 10.3389/fpsy.2017.00238.
4. Barichello T, Simoes LR, Quevedo J, Zhang XY. Microglial activation and psychotic disorders: evidence from pre-clinical and clinical studies. In: Khandaker GM, Meyer U, Jones PB, editors. *Neuroinflammation and schizophrenia*. Cham: Springer; 2020. p. 161–205 (Current topics in behavioral neurosciences; volume 44). DOI: 10.1007/7854_2018_81.
5. World Health Organization, Regional Office for Europe. *Mental health: facing the challenges, building solutions. Report from the WHO European ministerial conference*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2005. XI, 182 p.
6. Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. An overview of *in vitro* methods to study microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12:242. DOI: 10.3389/fncel.2018.00242.
7. Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nature Neuroscience*. 2017;20(8):1162–1171. DOI: 10.1038/nn.4597.
8. Smith AM, Draganow M. The human side of microglia. *Trends in Neurosciences*. 2014;37(3):125–135. DOI: 10.1016/j.tins.2013.12.001.
9. Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, et al. iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 2017;94(2):278–293. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.03.042.
10. Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, Newey SE, Moore CS, Nicholls FJ, et al. A highly efficient human pluripotent stem cell microglia model displays a neuronal-co-culture-specific expression profile and inflammatory response. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(6):1727–1742. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.05.017.
11. Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9:247. DOI: 10.1186/1742-2094-9-247.
12. Ramón y Cajal S. The structure and connexions of neurons. In: *Nobel lectures. Physiology or medicine, 1901–1921* [Internet]. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1967 [cited 2021 August 30]. p. 220–253. Available from: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/cajal-lecture.pdf>.
13. Tremblay M-È, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2015;9:45. DOI: 10.3389/fnana.2015.00045.

14. Fujita S, Kitamura T. Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. In: Jellinger K, Seitelberger F, editors. *Malignant lymphomas of the nervous system. International symposium organized by the Österreichische Arbeitsgemeinschaft für Neuro-pathologie and the Research Group of Neuropathology of the World Federation of Neurology; 1974 August 29–31; Wien, Austria*. Berlin: Springer-Verlag; 1975. p. 291–296 (Acta neuropathologica: supplementum; volume 6). DOI: 10.1007/978-3-662-08456-4_51.
15. Skoff RP. The fine structure of pulse labeled (³H-thymidine cells) in degenerating rat optic nerve. *The Journal of Comparative Neurology*. 1975;161(4):595–611. DOI: 10.1002/cne.901610408.
16. McKanna JA. Lipocortin 1 immunoreactivity identifies microglia in adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research*. 1993;36(4):491–500. DOI: 10.1002/jnr.490360415.
17. Sántha K, Juba A. Weitere Untersuchungen über die Entwicklung der Hortegaschen Mikroglia. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1933;98:598–613. DOI: 10.1007/BF01814660.
18. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985;15(2):313–326. DOI: 10.1016/0306-4522(85)90215-5.
19. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841–845. DOI: 10.1126/science.1194637.
20. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Gomez Perdiguero E, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via PU.1- and IRF8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*. 2013;16(3):273–280. DOI: 10.1038/nn.3318.
21. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.
22. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015;7(8):a020537. DOI: 10.1101/cshperspect.a020537.
23. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2009;4(4):399–418. DOI: 10.1007/s11481-009-9164-4.
24. Tang Yu, Le Weidong. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1181–1194. DOI: 10.1007/s12035-014-9070-5.
25. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*. 2018;173(5):1073–1081. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
26. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*. 2014;17(1):131–143. DOI: 10.1038/nn.3599.
27. Yeh FL, Hansen DV, Sheng M. TREM2, microglia, and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2017;23(6):512–533. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.03.008.
28. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba-1. *Molecular Brain Research*. 1998;57(1):1–9. DOI: 10.1016/s0169-328x(98)00040-0.
29. Bennett ML, Bennett FC, Liddelov SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *PNAS*. 2016;113(12):E1726–E1746. DOI: 10.1073/pnas.1525528113.
30. Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, et al. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia*. 2003;44(3):242–250. DOI: 10.1002/glia.10293.
31. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J. P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*. 2017;65(2):375–387. DOI: 10.1002/glia.23097.
32. Akiyama H, McGeer PL. Brain microglia constitutively express β -2 integrins. *Journal of Neuroimmunology*. 1990;30(1):81–93. DOI: 10.1016/0165-5728(90)90055-r.
33. Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011;59(2):177–187. DOI: 10.1002/glia.21104.
34. Walker DG, Lue L-F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015;7:56. DOI: 10.1186/s13195-015-0139-9.
35. Martin E, El-Behi M, Fontaine B, Delarasse C. Analysis of microglia and monocyte-derived macrophages from the central nervous system by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;124:55781. DOI: 10.3791/55781.
36. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *The Journal of Immunology*. 2012;188(1):29–36. DOI: 10.4049/jimmunol.1100421.
37. Rodhe J. Cell culturing of human and murine microglia cell lines. In: Joseph B, Venero JL, editors. *Microglia: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2013. p. 11–16 (Methods in molecular biology; volume 1041). DOI: 10.1007/978-1-62703-520-0_2.
38. Melief J, Sneeboer MAM, Litjens M, Ormel PR, Palmén SJMC, Huitinga I, et al. Characterizing primary human microglia: a comparative study with myeloid subsets and culture models. *Glia*. 2016;64(11):1857–1868. DOI: 10.1002/glia.23023.
39. Mizze MR, Miedema SSM, van der Poel M, Adelia, Schuurman KG, van Strien ME, et al. Isolation of primary microglia from the human post-mortem brain: effects of ante- and post-mortem variables. *Acta Neuropathologica Communications*. 2017;5:16. DOI: 10.1186/s40478-017-0418-8.
40. Lenz KM, Nelson LH. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:698. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00698.
41. Burns TC, Li MD, Mehta S, Awad AJ, Morgan AA. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: a systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *European Journal of Pharmacology*. 2015;759:101–117. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.021.
42. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
43. Sievers J, Parwaresch R, Wottge H-U. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia*. 1994;12(4):245–258. DOI: 10.1002/glia.440120402.
44. Leone C, Le Pavec G, Mème W, Porcheray F, Samah B, Dormont D, et al. Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia*. 2006;54(3):183–192. DOI: 10.1002/glia.20372.

45. Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, et al. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu – Hakola disease. *Scientific Reports*. 2014;4:4957. DOI: 10.1038/srep04957.
46. Banerjee A, Lu Y, Do K, Mize T, Wu X, Chen X, et al. Validation of induced microglia-like cells (iMG cells) for future studies of brain diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021;15:629279. DOI: 10.3389/fncel.2021.629279.
47. Ormel PR, Böttcher C, Gigase FAJ, Missall RD, van Zuiden W, Fernández Zapata MC, et al. A characterization of the molecular phenotype and inflammatory response of schizophrenia patient-derived microglia-like cells. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020;90:196–207. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.08.012.
48. Etemad S, Zamin RM, Ruitenber MJ, Filgueira L. A novel *in vitro* human microglia model: characterization of human monocyte-derived microglia. *Journal of Neuroscience Methods*. 2012;209(1):79–89. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.05.025.
49. Sellgren CM, Gracias J, Watmuff B, Biag JD, Thanos JM, Whittredge PB, et al. Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience*. 2019;22(3):374–385. DOI: 10.1038/s41593-018-0334-7.

Получена 25.08.2022 / исправлена 26.09.2022 / принята 26.09.2022.
Received 25.08.2022 / revised 26.09.2022 / accepted 26.09.2022.