

НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОЙ МИКРОГЛИИ: ТРИКУЛЬТУРА ГИППОКАМПА

В. Н. Мальцева, С. Г. Гайдин

Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУ науки ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

Особый интерес среди глиальных клеток головного мозга представляют клетки микроглии, которые являются основными резидентными иммунными клетками ЦНС. Фагоцитоз, контроль активности нейронов и нейропротекция являются основными функциями микроглии направленными на поддержание гомеостаза и физиологической активности мозга. Микроглия проявляет пассивный фенотип в здоровом мозге, но становится высокоактивной при изменении физиологического состояния головного мозга, что происходит при нейровоспалении, повреждениях мозга и при различных нейродегенеративных заболеваниях. Недавние исследования показали, что реактивная микроглия обладает высокой гетерогенностью, при этом демонстрирует пластичность при ответе на различные патологии. Вышесказанное подчеркивает необходимость выявления специфичных состояний микроглии и изучения факторов, влияющих на них, и направленных на превращение микроглии в защитный фенотип, что может стать перспективной стратегией терапии нейродегенеративных заболеваний.

Классический протокол приготовления первичных нейрон-глиальных культур обеспечивает выживание и созревание нейронов, а также умеренную пролиферацию астроцитов, но, к сожалению, недостаточен для сохранения и созревания микроглии. Отсутствие микроглии делает невозможным проведение нейробиологических исследований, сопряжённых с моделированием нейровоспаления, сопровождающего множество патологий мозга. В связи с этим, на основе данных литературы относительно условий созревания и пролиферации клеток микроглии мы оптимизировали протокол приготовления первичных нейрон-глиальных культур гиппокампа таким образом, чтобы помимо нейрональных и глиальных клеток также получить функционально активную микроглию, то есть «трикультуру».

Нами были проверены комбинации ростовых факторов, включающие трансформирующий фактор роста (TGF β), интерлейкин 34 (IL-34) макрофагальный колониестимулирующий фактор (MCSF), холестерин. Было установлено, что использование комбинации TGF β +IL-34+холестерин не приводило к увеличению количества микроглии, тогда как при использовании комбинации TGF β +MCSF+холестерин количество микроглиальных клеток заметно увеличивалось. Для идентификации клеток трикультуры применяли метод иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител к молекулярным маркерам нейронов, астроцитов и микроглии. Функциональную активность нейронов и астроцитов в полученных культурах оценивали по увеличению внутриклеточной концентрации Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) в ответ на добавление различных веществ, селективно активирующих ту или иную популяцию клеток. В свою очередь активность микроглии оценивали по способности индуцировать гибель клеток в культуре при добавлении липополисахарида.

Таким образом, мы отработали новый подход к культивированию клеток головного мозга, позволяющий получать трикультуру, состоящую из функционально активных нейронов, астроцитов и микроглии. Такой подход является перспективным для изучения молекулярных механизмов развития нейропатологий, сопровождаемых нейровоспалением.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-25-00014.