

© Макаренко О. М., *Довгий Р. С.

УДК 57. 085. 23

Макаренко О. М., *Довгий Р. С.

МОЖЛИВІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ АСТРОЦИТІВ ТА МІКРОГЛІЇ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ТЕРАПІЇ ПАТОЛОГІЙ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

***Навчально-науковий центр «Інститут біології» (м. Київ)**

Мікрогліальні клітинні лінії. Мікроглія представлена резидентними фагоцитами та клітинами імунної системи мозку. За останні декілька десятиліть виріс інтерес до мікроглії, так як багато дослідників усвідомили важливість цих клітин для підтримки гомеостазу, так само як і у патогенезі різноманітних хвороб центральної нервової системи [32].

Відтоді як мікроглія була вперше описана Pío del Río-Hortega в 1932, її походження та функції в ЦНС інтенсивно обговорювалися. Єдиним консенсусом є те, що клітини мікроглії мають гематопоетичне походження [2], хоча специфічний попередник залишається невідомим. Показано, що колонізація ЦНС мікроглією відбувається протягом ембріонального розвитку у гризунів, на пренатальній стадії (E10 до E19) [26]. Ці дані свідчать про гетерогенність мікрогліальних клітин за походженням: одна популяція мієлоїдного/мезенхімального походження (не обов'язково з моноцитів) та інша популяція, яка представляє транзиторну форму фетальних макрофагів (можливо моноцитів), які є амебоїдними мікрогліальними клітинами, як описано у постнатальному мозку гризунів [27].

Мікроглія має фенотипи подібні таким у макрофагів які характеризуються функціональною пластичністю. «Дрімаючий» стан відносно неактивний, але виконує функцію спостереження [14]. Крім «дрімаючого» стану є 2 функціонально різні фенотипи – M1 та M2. Перші є класично активованими, наприклад у відповідь на ІФН-γ або ліпополісахарид (ЛПС), та зумовлюють пошкодження мозку за рахунок секреції прозапальних цитокінів, таких як ФНП, ІЛ-1β та реактивних форм кисню та азоту (ROS, NOS). На противагу їм, M2 макрофаги є протизапальними, вони блокують виділення прозапальних цитокінів, фагоцитують дебрис, забезпечуючи відновлення тканини та виділення нейротрофічних факторів [15].

Культури мікрогліоцитів вперше були описані у 30-х роках минулого століття, однак використання культур для вивчення функцій мікроглії стало можливим лише після винайдення методу отримання та культивування великих кількостей мікрогліальних клітин. Збільшена кількість та гомогенність клітин в культурі дозволяє отримувати більшу кількість даних

в більш коротких час у порівнянні з експериментами *in vivo*. Крім того, *in vitro* культури представляють корисний інструмент для вивчення активаційних станів (фенотипів), секретованих факторів, рухливості та інших ключових ознак, що характеризують мікроглію, які не можуть бути достатньо проаналізовані *in vivo*.

На даний момент існує багато моделей мікроглії та мікроглія-подібних ліній клітин, які використовуються для вивчення феномену нейрозапалення. Сюди відносяться первинні та іморталізовані лінії клітин мікроглії, які є або трансформованими або не трансформованими ретровірусами. Ці моделі мають подібні риси, але також мають ключові відмінності, які мають бути проаналізовані при виборі підходящої моделі для дослідження [32].

Первинні культури мікрогліоцитів. Первинні культури мікрогліоцитів переважають у дослідженнях нейрозапалення завдяки своїй подібності до клітин *in vivo*. Ці клітини найчастіше отримують із кори мозку щурів або мишей перед або одразу після народження. В процесі, описаному Giulian and Baker [14], амебоїдні мікрогліальні клітини можуть отримуватися з мозку ссавців та вирощуватися в культурі. Вони показали, що завдяки використанню специфічних процесів адгезії та перемішування культивованих гліальних клітин, можна отримати очищену культуру приблизно на 95% збагачену мікрогліальними клітинами [14]. Ця техніка інтенсивно використовувалася з моменту її описання і, інколи трохи модифіковано, залишається популярним методом культивування мікроглії *in vitro*. Перевагами використання амебоїдної мікроглії, отриманої напряму із тварин, є функціональні характеристики цих клітин, такі як секретовані речовини та поверхневі маркери клітин, які дуже подібні до таких у ендогенних клітин [32].

Показано, що всі ці клітини не експресують гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP, маркер астроцитів); галактоцереброзид (GC, маркер олігодендроцитів); не мають пероксидазної активності (маркер на активність нейтрофілів); та експресують неспецифічні естерази, які є макерами мікроглії [14]. При стимуляції ЛПС та цитокінами, первинні культури мікрогліоцитів секретують оксид азоту (NO) за рахунок підвищення експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS, NOS-II) та аніонів

супероксиду (O_2) за рахунок активації комплексів NADPH оксидази (NOX) [6]. Більше того, первинна мікроглія синтезує безліч інших анти- та прозапальних факторів при індукції муляючими агентами. Реактивні форми кисню (ROS) та азоту (RNS) виділяються при активації, подібно до моноцитів, макрофагів та нейтрофілів [8].

Виявлено, що β -олігомер, відомий нейротоксин, який відіграє важливу роль у патогенезі хвороби Альцгеймера, може викликати більш значне пошкодження нейронів опосередковано, викликаючи активації мікроглії [22]. При дослідженні *in vitro* культур, субнейротоксичні концентрації А β олігомера (від 5 до 50 нМ) викликали активацію первинної мікроглії, стимулюючи їх проліферацію та продукцію ними NO [22]. Більше того, показано, що первинна мікроглія здатна фагоцитувати А β у відповідь на його накопичення [33]. Це є прикладом M2 фенотипу. Також було показано, що фагоцитоз А β первинною мікроглією може інгібуватися цитокінами, такими як ІЛ-1 β , ФНП та ІФН γ , які, найвірогідніше, стимулюють перехід клітин до прозапального M1 фенотипу [20].

Фенотип амебоїдної мікроглії може змінюватися *in vitro* до «дрімаючого» стану, в той час як у клітин подовжуються відростки, втрачається здатність до фагоцитозу, та знижується здатність до проліферації. Цей перехід підсилюється при інкубації з ретиноевою кислотою – агентом, який посилює клітинну диференціацію [14].

Можливість вимірювання цих білків та клітинних маркерів у цій моделі клітин є корисною; однак, тривале приготування, необхідне для кожного експерименту, робить цю модель більш затратною по часу та, можливо, менш привабливою у порівнянні з іншими лініями мікрогліоцитів, які вимагають менше часу для приготування, але зберігають подібні властивості. Одним із методів отримання клітин, які швидше проліферують, характеризуються більш гомогенною популяцією, та нижчою вартістю, є генетична іморталізація первинних мікрогліоцитів.

Мікроглія, іморталізована ретровірусами: BV2 та N9. Такі іморталізовані клітинні лінії можна отримувати за рахунок інфікування клітин ретровірусами. Дві загально використовувані клітинні лінії цього типу – BV2 та N9, які отримують від щурів та мишей відповідно. Обидві лінії клітин інтенсивно використовуються в дослідженнях, пов'язаних з нейродегенеративними захворюваннями [32].

Після вдалої іморталізації мишачих макрофагів кісткового мозку за рахунок використання ретровіруса з *v-raf/v-myc* онкогенами (J2) [5], дослідницька група на чолі з Blasі застосувала цю ж технологію для отримання BV2 лінії мікрогліальних клітин [4]. Для отримання цієї лінії, мікроглія була спочатку очищена за рахунок адгезії/перемішування [14], потім всю ніч інкубувалася з контрольними або J2 вірус-вмісними супернатантами в специфічному для цих клітин повному середовищі. Після 3-4 тижнів інкубації, в інфікованих культурах спостерігалися проліферуючі

клітини, в той час як в неінфікованих культурах клітини втрачали адгезивність та гинули [4].

BV2 клітини на 90% позитивні по показнику неспецифічної естеразної активності та всі пероксидазонегативні. Більше того, BV2 клітини були MAC-1 та MAC-2-позитивні, але не експресували MAC-3 антигену. Також, подібно до первинної мікроглії, вони були не експресували GFAP та GC антигени, маркери астроцитів та олігодендроцитів [3], відповідно. Оцінювалася також секреція цитокинів, і було виявлено, що при стимуляції ЛПС, рівні ІЛ-1 підвищувалися дозозалежно [4]. Також, враховуючи, що ці клітини здатні до фагоцитозу, було показано, що А β (1-42) фібрили можуть стимулювати фагоцитоз у мікрогліоцитів залежно від дози та часу інкубації [21].

Не зважаючи на подібність до первинної мікроглії, ці клітини містять онкогени, які обумовлюють їхні відмінності від первинних мікрогліоцитів, такі як підвищена проліферація та адгезія, та збільшена варіація морфології [19]. Валідність BV2 клітин як підходящої заміни для первинної мікроглії обговорювалася, тому з'явилися дослідження, які порівнюють різні лінії мікрогліоцитів. Одне із таких досліджень було проведене Horvath et al. [19]. Вони порівняли первинну мікроглію щурів з клітинами BV2 лінії відносно активаційних маркерів, рухливості та факторів, що синтезуються, таких як NO та цитокіни. Було виявлено, що і первинна мікроглія, і BV2 клітини експресують Iba-1 – активаційний маркер мікроглії. Більше того, при стимуляції ЛПС, BV2 клітини секретували менше, але достатньо NO у порівнянні з первинною мікроглією [19].

Припущення, що іморталізовані клітини BV2 лінії мають подібні до первинної мікроглії функції, але не в однаковому ступені, було надалі перевірене Henn et al. [16]. Ця група дослідників оцінювала BV2 клітини як підходящу альтернативу первинним культурам. Вони виявили, що у відповідь на стимуляцію ЛПС, 90% генів, експресія яких була індукована в BV2 клітинах, також індукувалися в первинних мікрогліоцитах; хоча, підвищення експресії в BV2 клітинах було менш значним, ніж у первинній мікроглії [16].

Лінія мікрогліальних клітин N9 походить з мозку мишей та має багато спільних фенотипових характеристик з первинною мікроглією мишей. Це проілюстровано рядом досліджень, зокрема Nickman et al. [17]. Його група досліджувала кліренс β -амілоїда та рецепторну регуляцію мікроглії. Вони виявили, що при інкубації N9 клітин з ФНП спостерігається зниження експресії скавенджер-рецептора А та CD36 та зменшення поглинання β -амілоїда, що збігається з результатами, отриманими на первинних мишачих мікрогліоцитах. Однак, ці клітини є генетично модифікованими, що призводить до підвищення здатності до проліферації та адгезії.

Мікрогліальні клітини лінії N9 були розроблені шляхом іморталізації первинних мікрогліальних клітин онкогенами *v-myc* або *v-mil* пташиного

ретровірусу МН2 [28]. Клони клітин, отримані внаслідок цих процесів, характеризувалися неспецифічною естеразною активністю та експресували поверхневі маркери мікрогліальних клітин FcR, Mac-1 та F4/80. Більше того, вони не експресували GFAP, A2B5 та Gal-C. Мікроглія також здатна фагоцитувати опсонізовані еритроцити овець та одразу експресує вати цитокіни. При стимуляції ЛПС, ці клітини продукують ІЛ-6, ФНП та ІЛ-1 [28]. Також показано, що N9 мікрогліальні клітини експресують пуринергічні рецептори, такі як P2Y та P2Z, які є АТФ-чутливими. P2Z рецептор залучений до синтезу ІЛ-1 β у відповідь на стимуляцію АТФ [11].

Людські іморталізовані мікрогліоцити: НМО6. Отримати людські мікрогліоцити важче, оскільки вони отримуються з людських ембріонів, що важко досягти через етичні питання та законодавчі заборони. Група вчених на чолі з Nagai вирішила це питання за рахунок створення лінії іморталізованих людських мікрогліальних клітин НМО6 [24]. Ця лінія клітин була розроблена за рахунок використання первинних людських ембріональних мікрогліальних клітин. Клітини були стимульовані до проліферації внаслідок інкубації з 8 мкг/мл гранулоцитарно-макрофагального колоніестимулюючого фактора в середовищі протягом 7-12 днів та потім були інфіковані ретровірусним вектором PASK 1. 2, з якого транскрибувався онкоген *v-myc*. В культурі час подвоєння у цих клітин був досить швидким, і склав 34,5 години. Клітини також адгезувалися до скла або пластику та зберігали здатність до фагоцитування латексних частинок. Більше того, НМО6 клітини були позитивними при забарвленні аглютиніном *Ricinus communis* (RCA) та CD11b (MAC-1) та експресували транскрипти пуринергічних рецепторів, що свідчить про мікрогліальний фенотип. Nagai et al. також провели RT-PCR аналіз та показали експресію генів ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-15 та ФНП.

Характеристики НМО6 клітин робить їх підходящими для дослідження прозапальних процесів при хворобі Альцгеймера. НМО6 клітини експресують ФНП та ІЛ-8. Після 48-годинної інкубації з β -пептидом (25-35) або ЛПС, у НМО6 клітинах підвищилася експресія генів та рівень білка ІЛ-8 та ФНП [24]. Більше того, виявлено, що при інкубації НМО6 клітин з β -амілоїдом або ЛПС клітини експресують високі рівні альбуміну, який вважається ключовим у патогенезі хвороби Альцгеймера [1].

Людські клітинні лінії рідко використовуються, оскільки важко отримати первинну культуру для трансфекції. Більше досліджень проводиться на тваринах, тому частіше використовуються мишачі мікрогліальні культури [32].

Клітинні лінії астроцитів.

Астроцити це одна з головних субпопуляцій клітин мозку ссавців. Вони забезпечують здійснення ряду підтримуючих функцій, таких як метаболічна підтримка нейронів. Астроцити також залучені до різноманітних патологічних процесів [34]. Порушення нормальних функцій астроцитів внаслідок інсульту може негативно впливати на виживання нейронів. Численні дослідження показують, що астроцити

належать до найбільш функціонально різноманітних груп клітин центральної нервової системи [30]. Багато інформації про астроцити отримано з *in vitro* досліджень, тому клітинні лінії є корисним засобом для дослідження різноманітних властивостей цього типу клітин. Подібно до мікрогліоцитів, розрізняють первинні та іморталізовані лінії астроцитів.

Первинні культури астроцитів. Більшість протоколів приготування астрогліальних культур з ембріонів щурів або мишей взяті з роботи Booher and Sensenbrenner або пізнішої модифікації McCarthy та de Vellis [23]. Астроцити можуть рости при широкому діапазоні умов *in vitro*, тому, фактично кожна лабораторія створила свій власний більш чи менш модифікований протокол. У більшості протоколів препаративна тканина дисоціюється механічним і/або ензиматичним способом, після чого дисоційовані клітини висіваються на плашку. За підходящих умов, таких як густина висіву, склад поживного середовища, та режим зміни середовища, астроцити швидко проліферують, конфлюентна культура утворюється через 7-14 днів після висіву. У цих культурах астроцити I-го типу утворюють моношар з різним вмістом II-го типу астроцитів. Оскільки у цих культурах астроцитів найбільше, вони (культури) описуються як астрогліальні, багаті астроцити, збагачені астроцитами або навіть чисті культури астроцитів. Хоча, в жодному із цих типів культур астроцити не складають 100% клітин [29]. Залежно від умов культивування, олігодендроцити [35], нейрони [18], різні типи попередників [9], епендимоцити [35], фібробласти [10], ендотеліоцити [7], або мікрогліоцити [14] можуть виявлятися в цих культурах, переважно у малій кількості.

Іморталізовані астроцити. Клітини Neu7 отримані за рахунок інфікування первинних кортикальних астроцитів щурів ретровірусом, що містить у своєму геномі онкогена *neu* [31]. Ця лінія була розроблена в якості моделі реактивних астроцитів для скринінгу факторів, які можуть регулювати ріст нейритів при ураженнях центральної нервової системи [31]. Хоча вважається, що первинні астроцити сприяють росту аксонів [25], клітини лінії Neu7 пригнічують ріст нейритів у різних типів нейронів. Частково цей інгібіторний ефект опосередкований підвищеною експресією протеоглікану NG2 [12]. Клітини лінії A7 отримані з клітин зорового нерва щурів, іморталізованих за рахунок трансфекції великим Т антигеном поліомавірусу SV40 [13]. На відміну від Neu7, ці клітини сприяють росту нейритів.

Таким чином, для дослідження препаратів, розроблених з метою терапії патологій головного мозку, найбільш підходящими є первинні лінії гліоцитів, оскільки вони найбільш подібні до клітин *in vivo*. Однак при виконанні досліджень з використанням первинної культури астроцитів потрібно особливу увагу приділяти чистоті культури, оскільки наявність інших типів клітин, зокрема мікроглії, може спотворити результат [29].

Література

1. Ahn S. -M. Human microglial cells synthesize albumin in brain / S. -M. Ahn, K. Byun, K. Cho [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – P. e2829.
2. Asheuer M. Human CD34+ Cells Differentiate into Microglia and express recombinant therapeutic protein / M. Asheuer, F. Pflumino, S. Benhamida [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 3557 – 3562.
3. Bignami E. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence / E. Bignami, L. F. Eng, D. Dahl, C. T. Uyeda // *Brain Res*. – 1972. – Vol. 43. – P. 429 – 435.
4. Blasi E. Immortalization of murine microglia cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus / E. Blasi, R. Barluzi, V. Bocchini [et al.] // *J. Neuroimmun.* – 1990. – Vol. 27. – P. 229 – 237.
5. Blasi E. Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a *raf/myc* recombinant murine retrovirus / E. Blasi, B. J. Mathieson, L. Varesio [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 318. – P. 667 – 670.
6. Boje K. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death / K. Boje, P. Arora // *Brain Res*. – 1992. – Vol. 587. – P. 250 – 256.
7. Castel H. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes / H. Castel, M. Diallo, D. Chatenet [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 99. – P. 582 – 595.
8. Colton C. Production of superoxide anions by CNS macrophage, the microglia / C. Colton, D. Gilbert // *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* – 1987. – Vol. 223. – P. 284 – 288.
9. Crang A. J. Attempts to produce astrocyte cultures devoid of oligodendrocyte generating potential by the use of antimetabolic treatment reveal the presence of quiescent oligodendrocyte precursors / A. J. Crang, W. F. Blakemore // *J. Neurosci. Res.* – 1997. – Vol. 49. – P. 64 – 71.
10. Falsig J. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function / J. Falsig, P. Porzgen, S. Lund [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 96. – P. 893 – 907.
11. Ferrari D. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP / D. Ferrari, M. Villalba, P. Chiozzi [et al.] // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 156. – P. 1531 – 1539.
12. Fidler P. S. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2 / P. S. Fidler, K. Schuette, R. A. Asher [et al.] // *J. Neurosci.* – 1999. – P. 8778 – 8788.
13. Geller H. M. Antigenic and functional characterization of a rat central nervous system-derived cell line immortalized by a retroviral vector / H. M. Geller, M. Dubois-Dalcq // *J. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 107. – P. 1977 – 1986.
14. Giulian D. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain / D. Giulian, T. Baker // *J. Neurosci.* – 1986. – Vol. 6. – P. 2163 – 2178.
15. Henkel J. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting / J. Henkel // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 389 – 398.
16. Henn A. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation / A. Henn, S. Lund, M. Hedtjarn [et al.] // *ALTEX*. – 2009. – Vol. 26. – P. 83 – 94.
17. Hickman S. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice / S. Hickman, E. Allison, J. Khoury // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 8354 – 8360.
18. Hildebrand B. Neurons are generated in confluent astroglial cultures of rat neonatal neocortex / B. Hildebrand, C. Olenik, D. K. Meyer // *Neuroscience*. – 1997. – Vol. 78. – P. 957 – 966.
19. Horvath R. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures / R. Horvath, N. McMenemy, M. Alkaitis, J. DeLeo // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 107. – P. 557 – 569.
20. Koenigsknecht-Talboo J. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines / J. Koenigsknecht-Talboo, G. Landreth // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 8240 – 8249.
21. Kopec K. Alzheimer's β -Amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia / K. Kopec, R. Carroll // *J. Neurochem.* – 1998. – Vol. 71. – P. 2123 – 2131.
22. Maezawa I. Amyloid- β protein oligomer at low nanomolar concentrations activates macroglia and induces microglial neurotoxicity / I. Maezawa, P. Zimin, H. Wulff, L. W. Jin // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 3693 – 3706.
23. McCarthy K. D. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue / K. D. McCarthy, J. de Vellis // *J. Cell Biol.* – 1980. – Vol. 85. – P. 890 – 902.
24. Nagai A. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines / A. Nagai, E. Nakagawa, K. Hatori [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1057 – 1068.
25. Noble M. Glia are a unique substrate for the in vitro growth of central nervous system neurons / M. Noble, J. Fok-Seang, J. Cohen // *J. Neurosci.* – 1984. – Vol. 4. – P. 1892 – 1903.
26. Rezaie P. Microglia in the human nervous system during development / P. Rezaie // *Neuroembryol.* – 2003. – Vol. 1. – P. 29 – 31.
27. Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia-new concepts / P. Rezaie // *Brain Res. Rev.* – 2007. – Vol. 53. – P. 344 – 357.
28. Righi M. Monokine production by microglial cell clones / M. Righi, L. Mori, G. De Libero [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1989. – Vol. 19. – P. 1443 – 1448.
29. Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note / J. Saura // *J. of Neuroinflammation*. – 2007. – Vol. 4. – P. 26.
30. Shao Y. Plasticity of astrocytes / Y. Shao, K. D. McCarthy // *Glia*. – 1994. – Vol. 11. – P. 147 – 155.
31. Smith-Thomas L. C. An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes / L. C. Smith-Thomas, J. Fok-Seang, J. Stevens [et al.] // *J. of Cell Science*. – 1994. – Vol. 107. – P. 1687 – 1695.
32. Stansley B. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease / B. Stansley, J. Post, K. Hensley // *Journal of Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 9 (115). – 8 p.
33. Takata K. Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors / K. Takata, Y. Kitamura, M. Saeki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 40180 – 40191.

34. van der Laan L. J. Extracellular matrix proteins expressed by human adult astrocytes in vivo and in vitro: an astrocyte surface protein containing the CS1 domain contributes to binding of lymphoblasts / L. J. van der Laan, C. J. De Groot, M. J. Elices, C. D. Dijkstra // *J. Neurosci. Res.* – 1997. – Vol. 50. – P. 539 – 548.
35. Wiesinger H. Replacement of glucose by sorbitol in growth medium causes selection of astroglial cells from heterogeneous primary cultures derived from newborn mouse brain / H. Wiesinger, B. Schuricht, B. Hamprecht // *Brain Res.* – 1991. – Vol. 550. – P. 69 – 76.

УДК 57. 085. 23

МОЖЛИВІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ АСТРОЦИТІВ ТА МІКРОГЛІЇ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ТЕРАПІЇ ПАТОЛОГІЙ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Макаренко О. М., Довгий Р. С.

Резюме. У патогенезі багатьох захворювань головного мозку важливу роль відіграють гліальні клітини. У зв'язку з цим, для дослідження препаратів *in vitro*, розроблених з метою терапії цих патологій, доцільно використовувати гліальні клітинні лінії. Наразі отримано безліч імморталізованих ліній астроцитів та мікроглії тварин та людини. Також використовують первинні лінії гліоцитів тварин. Отримання первинних ліній людини значно ускладнене різноманітними етичними аспектами та законодавчими заборонами. З метою дослідження препаратів для терапії патологій головного мозку найдоцільніше використовувати первинні клітинні лінії гліоцитів, тому що вони найкраще відтворюють глію *in vivo*.

Ключові слова: глія, мікроглія, астроцити, лінія клітин.

УДК 57. 085. 23

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ АСТРОЦИТОВ И МИКРОГЛИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Макаренко А. Н., Довгий Р. С.

Резюме. В патогенезе многих заболеваний головного мозга важную роль играют глиальные клетки. В связи с этим, для исследования препаратов *in vitro*, разработанных с целью терапии этих патологий, целесообразно использовать глиальные клеточные линии. На сегодняшний день получено множество иммортализованных линий астроцитов и микроглии животных и человека. Также используют первичные линии глиоцитов животных. Получение первичных линий человека значительно осложняется различными этическими аспектами и законодательными запретами. С целью исследования препаратов для терапии патологий головного мозга наиболее целесообразно использовать первичные клеточные линии глиоцитов, потому что они наилучше воспроизводят глию *in vivo*.

Ключевые слова: глия, микроглия, астроциты, линия клеток.

UDC 57. 085. 23

The Possibility of Microglial and Astroglial Cell Lines Use for Investigation of Preparations for the Therapy of Brain Pathologies

Makarenko A. N., Dovgiy R. S.

Abstract. *Microglial cell lines.* Over the past few decades, there has been an increased interest in microglia, as many investigators have recognized the importance of this cell in the homeostasis, as well as various pathologies, of the central nervous system. *in vitro* cultures present a beneficial tool to study the activation state, releasable factors, motility, and other crucial components that characterize microglia, which cannot be sufficiently examined *in vivo*.

Primary microglia cultures. Primary microglia cultures are very prevalent in research due to the similarities in phenotype to *in vivo* cells. These cells are most often derived from the cortex of a rat or mouse before or early after birth. The advantages of using amoeboid microglia directly from an animal are the functional characteristics that these cells are endowed with, such as secretory products and cell surface markers, which closely resemble endogenous cells. However, the extensive preparations needed for each experiment makes this model more time consuming and perhaps less attractive as compared to other microglia lines that have shorter prep-time, but maintain similar cell properties.

Retroviral immortalized microglia: BV2 and N9. Such immortalized cell lines can be generated by infecting the cells with a retrovirus. Two commonly used cell lines of this type are the BV2 and N9 microglia cell lines which are derived from rat and mouse, respectively. Even with the similarity to primary microglia, the cells do contain oncogenes that render them in some ways different from primary microglia, such as increased proliferation and adhesion, and increased variance of morphologies. The N9 microglia cells were developed by immortalizing murine primary microglia cells with the v-myc or v-mil oncogenes of the avian retrovirus MH2. These cells are genetically modified, which leads to increased proliferation and adherence.

Human immortalized microglia: HMO6. It is more difficult to obtain these cells because they have to be derived from human embryos, which can be difficult to access due to the ethical and legal issues. HMO6 cell line was established by using primary human embryonic microglia cultures. HMO6 cells were positive for staining with *Ricinus communis* agglutinin and CD11b and express transcripts for purinergic receptors, confirming a microglia phenotype. These human-derived cell lines are rarely used based on the fact that it is difficult to obtain a primary

culture to transfect. More research is conducted in non-human animals and, thus, murine microglia cultures are more commonly used.

Astroglial cell lines. Astrocytes provide a number of supportive functions, such as metabolic support of neurons. A lot of information about astrocytes received from *in vitro* studies, that's why cell lines represent a useful tool for investigation of different properties of this type of cells. Similar to microglia, there are primary and immortalized astrocyte cell lines.

Primary astrocyte cultures. Most protocols for preparing astroglial-enriched cultures from rat/mouse late embryos/neonates are derived from the seminal work of Booher and Sensenbrenner or the later modification by McCarthy and de Vellis. In none of primary cell cultures do astrocytes represent 100 % of cells. Depending on culture conditions, oligodendrocytes, neurons, various types of precursors, ependymal cells, fibroblasts, endothelial cells or microglial cells can be present in these cultures, generally in small proportions.

Immortalized astrocytes. Neu7 cells obtained by infection of rat primary cortical astrocytes with retrovirus containing neu oncogene in its genome. This cell line was made as a model of reactive astrocytes for the screening of factors, which may regulate the growth of neurites under the lesions of central nervous system. Although it is considered, that primary astrocytes promote axonal growth, Neu7 cells inhibit the growth of neurites. This inhibitory effect partially mediated by increased expression of proteoglycan NG2. A7 cell line obtained from rat optical nerve cells, immortalized by transfection of SV40 large T antigen. Unlike Neu7, these cells promote the growth of neurites.

Thus, for investigation of preparations, designed for the therapy of brain pathologies, the most appropriate are the primary glial cell lines, because they are the most similar to the cells *in vivo*. But, of course, such issues, as presence of different types of cells in astroglial cultures, or time consuming preparation of primary cultures, make them less attractive, than immortalized cell lines.

Keywords: glia, microglia, astrocytes, cell line.

Рецензент – проф. Весніна Л. Е.

Стаття надійшла 8. 07. 2014 р.