

Характеристика фенотипа клеток нейробластомы NB41A3 в культуре

Научный руководитель – Большаков Алексей Петрович

Корягина А.А.¹, Буянова А.А.²

1 - Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия, *E-mail: koraljona3@gmail.com*; 2 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: destroyh09@gmail.com*

Характеристика фенотипа клеток нейробластомы NB41A3 в культуре Корягина А.А., Спивак Ю.С., Буянова А.А., Недогреева О.А.

Дефицит ацетилхолина может быть причиной ухудшения когнитивных функций, наблюдаемого при старении и некоторых нейродегенеративных патологиях. В частности, нарушение памяти на ранних стадиях болезни Альцгеймера связывают со снижением функциональной активности холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга. Механизмы этого до конца не ясны в том числе в связи с недостаточностью подходящих клеточных моделей, которые позволяли бы исследовать нейродегенеративные процессы на уровне отдельных клеток. Культивация холинергических нейронов, получаемых из эмбрионального материала, представляет определенную проблему в связи с недостаточным количественным выходом. В связи с этим представляет интерес подробная характеристика доступных клеточных линий как перспективного материала для изучения функций холинергических клеток *in vitro*. Целью работы была характеристика клеток нейробластомы мыши NB41A3 в различных условиях культивации.

Клетки были получены из Российской коллекции клеточных культур ИЦ РАН. Культивацию клеток проводили в чашках Петри в среде F10, содержащей 10% сыворотки FBS и смесь антибиотиков и антигрибковых препаратов. Один раз в два дня половину среды заменяли на свежую. Клетки пересеивали 1 раз в 7-9 дней с использованием смеси 0.25% трипсина и 0.05% ЭДТА. Оценку дифференцировки проводили после инкубации клеток с одним из следующих реагентов: 30 мкмоль цАМФ, 10 мкмоль ретиноевой кислоты, 20 нг/мл фактора роста нервов (ФРН) или смеси 30 мкмоль цАМФ и 10 мкмоль ретиноевой кислоты. Клетки фотографировали через 48, 96 или 144ч инкубации (2, 4 или 6 дней) с помощью инвертированного микроскопа Keyence (Keyence Corporation of America, USA) в условиях фазово-контрастного освещения. Эксперимент проводили в двух повторностях, каждая из которых выполнялась на 3-4 чашках. С каждой чашки снимали 5 изображений. Оценку морфологических показателей дифференцировки проводили с использованием программы FIJI (NIH, USA). Было установлено, что все дифференцирующие агенты вызывали отрастание нейритов. При этом в случае аппликации ФРН значимое удлинение нейритов наблюдалось уже через 4 дня инкубации. Иммуноцитохимически в клетках нейробластомы выявляли присутствие и холинацетилтрансферазы (ХАТ) и ацетилхолинэстеразы как в телах, так и в отростках. Уровень активности ХАТ в лизатах клеток оценивали флюоресцентным методом. Активность ХАТ составила 6.3 нмоль/ч/мг белка через 48 ч инкубации с ФРН по сравнению с 2.2 на нмоль/ч/мг белка в контрольных культурах. Наконец, с использованием метода полимеразной цепной реакции со вложенными праймерами мы смогли детектировать присутствие мРНК ХАТ в клетках исследованной линии.

На основании проведенного анализа можно заключить, что исследованная линия нейробластомы NB41A3 может быть использована в качестве модельной линии клеток при проведении экспериментов по изучению функций холинергических клеток. В клетках линии NB41A3 экспрессируется ген *Chat*, происходит продукция соответствующего белка

и белка ацетилхолинэстеразы, наблюдается специфическая активность фермента ХАТ, которую можно зарегистрировать. Клетки дифференцируются в нейроноподобные клетки с отростками, под действием типичных агентов, причем эффект ФРН, важнейшего нейротрофина, поддерживающего в мозге жизнедеятельность холинергических нейронов, максимально выражен.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-015-00226).