

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕЙСТВИЯ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ.

А.А. Абишева

НИЦ Курчатовский институт, Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, nrcki@nrcki.ru

Актуальной проблемой ядерной и радиационной медицины является изучение механизмов развития пострadiационных нарушений функций мозга. Важными осложнениями являются когнитивные расстройства, которые проявляются в снижении способности к гиппокамп-зависимому обучению и ухудшении памяти спустя несколько месяцев после воздействия.

Пострадиационные когнитивные нарушения могут быть следствиями нескольких факторов, в том числе снижения образования новых нейронов гиппокампа в результате повреждения нейрональных стволовых клеток в зубчатой извилине (в дальнейшем называемые НСК). Нарушение нейрогенеза после облучения может определяться не только прямым повреждающим действием радиации на клетки мозга, но, в значительной мере, следствием повреждающего действия активных метаболитов кислорода и азота, которые образуются в результате развития окислительных реакций в процессе облучения.

Собственно, данная работа посвящена исследованию влияния гамма-излучения на пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток мыши.

Объект исследования

Что такое НСК? Это клетки с неограниченным пролиферативным потенциалом, способные дифференцироваться в трех направлениях: нейроны, астроциты и олигодендроциты. *In vitro* НСК активно размножаются, формируя свободноплавающие колонии сферической формы, которые называют нейросферами. Тут представлены фотографии нейросфер при увеличении 100x и при 400x (рис.1 и 2).

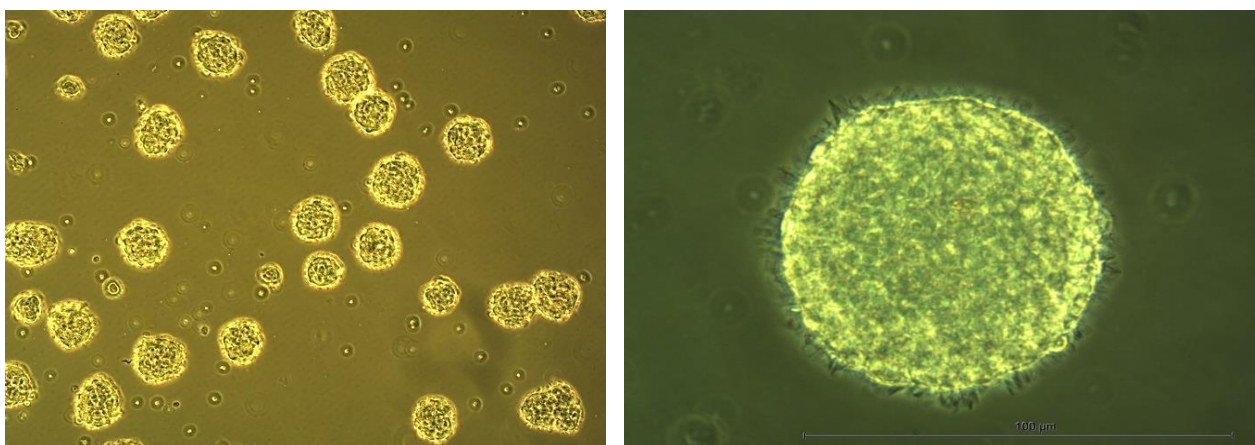


Рис. 1 и 2

Каким образом было определено, что имеющиеся у нас клетки это НСК?

Во первых, эти клетки культивировались в течении длительного времени и наблюдалась их способность к дифференцировке в нейроны и астроциты и олигодендроциты.

Также, был проведен анализ клеток на специфические маркеры. Для этого, клетки были окрашены антителами с флуоресцентными метками и затем, проанализированы методом проточной цитометрии - методом позволяющим оценивать флуоресценцию каждой отдельной

клетки в образце. Также, морфология клеток изучалась при помощи флуоресцентной микроскопии (тоже с предварительным окрашиванием образцов).

Анализ содержания специфических маркеров в НСК с помощью проточной цитометрии показал, что большинство НСК являются нестин-положительными (Таблица 1), что подтверждает их статус нейральных стволовых/прогениторных клеток. В общей популяции также присутствовало небольшое количество клеток, содержащих маркеры дифференцировки астроцитов (GFAP), нейронов (бета-тубулин III), олигодендроцитов (O4).

Специфические антигены	Нестин	В-тубулин III	GFAP	O4	NG2	CD133
Процент положительных клеток в популяции	86	4	4,8	4,1	1,25	2,6

На микропрепарате (рис.3) НСК, окрашенные антителами к нестину, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (зеленый). Ядра клеток (синие) окрашены флуоресцентным красителем DAPI.

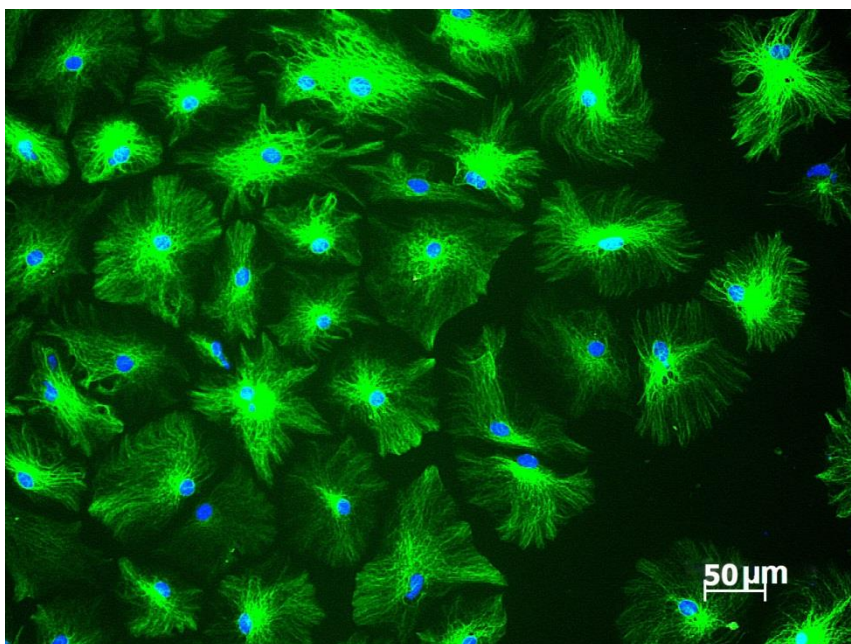


Рис. 3

Влияние гамма-облучения на выживаемость НСК

Для исследования выживаемости клеток были использованы 3 метода: определение количества выживших клеток путем прямого подсчета диссоциированных клеток в камере Горяева; с помощью МТТ-теста и SRB-теста.

Тут представлены результаты подсчета в камере Горяева диссоциированных клеток через 6 суток после облучения. (Рис.4)

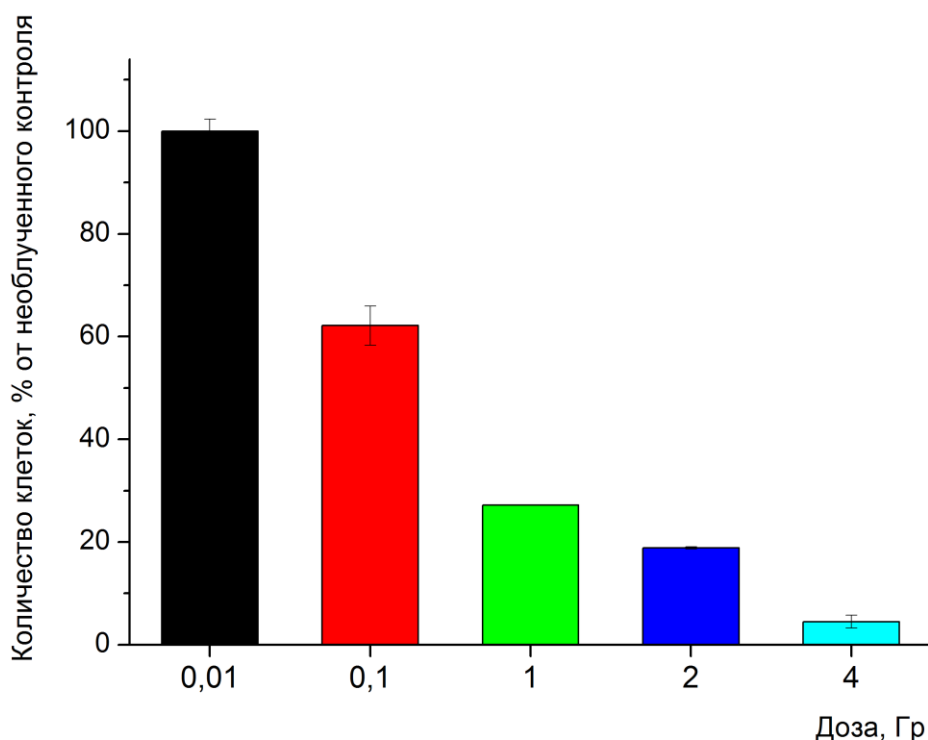


Рис.4

Метод подсчета клеток в камере Горяева предполагает прямой подсчет клеток в объеме 0,02 мкл, он точные результаты при большом количестве клеток, что является достаточно дорогостоящим с точки зрения потраченных реактивов.

Поэтому встала задача адаптировать другие методы для анализа выживаемости.

Определение количества выживших клеток с помощью МТТ-теста и SRB-теста.

Определение количества клеток, культивируемых в виде нейросфер, с помощью МТТ-теста достаточно трудоемкий процесс, так как требует переноса нейросфер в центрифужные пробирки, центрифугирования, растворения в пробирках кристаллов формазана, а затем переноса раствора в планшеты для измерения оптической плотности. SRB-тест для суспензионных культур просто невозможен, так как первым этапом является фиксация клеток в лунках планшета, и в процессе требуется большое количество отмывок окрашенных клеток. Поэтому мы исследовали, способны ли НСК адаптироваться к росту в прикрепленном состоянии на подложке и будут ли результаты двух указанных тестов совпадать с результатами прямого подсчета клеток. (Тесты могут давать ложные результаты по множеству причин: при изменении метаболизма клеток в процессе проведения тестов или если среда содержит компоненты искажающие результаты и др.) Для этого мы сначала высадили клетки в различных концентрациях в планшет, покрытый специальным матриксом матригелем и на следующий день провели МТТ-тест и SRB-тест. Результаты экспериментов представлены на Рис. 5 (а, б).

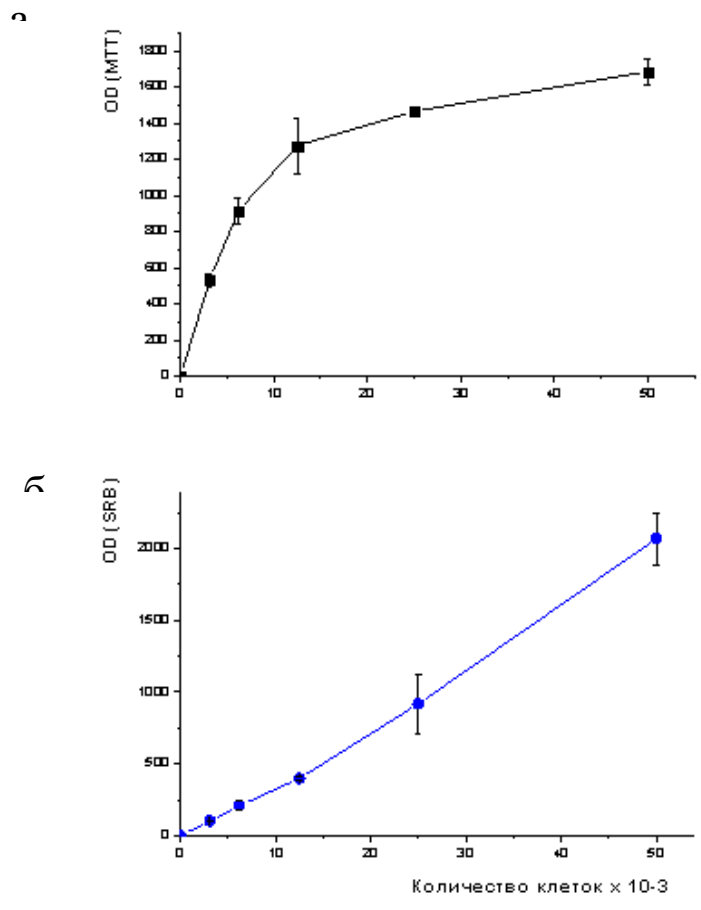


Рис. 5

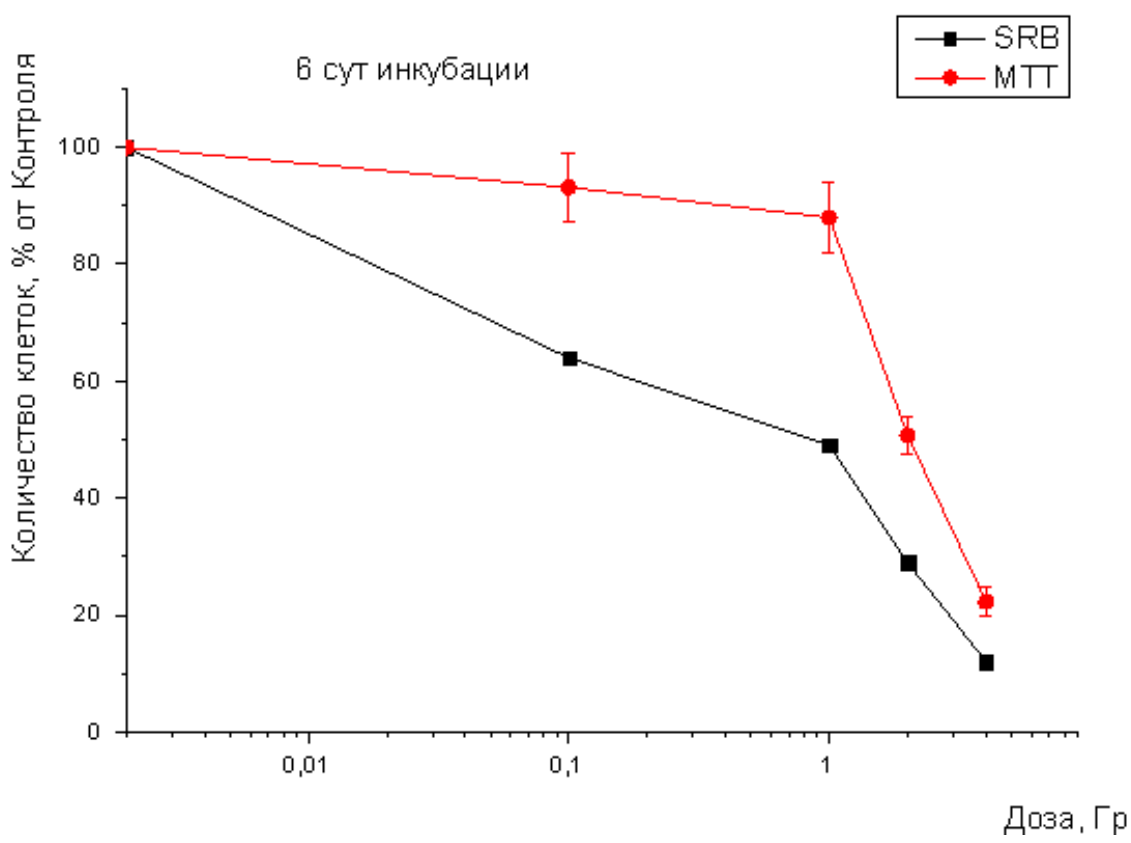


Рис.6

Полученные данные свидетельствуют о том, SRB-тест адекватно отражает изменения в количестве клеток в образцах т.к. зависимость оптической плотности от числа клеток линейная, в отличие от зависимости в МТТ-тесте.

Зависимость количества живых клеток от дозы после шести суток инкубации показана на рисунке 6. Сравнивая данные по определению количества клеток (выживаемости), полученные двумя методами – прямым подсчетом клеток и в SRB-тесте, мы видим, что они очень схожи и однозначно свидетельствуют о высокой радиочувствительности НСК. Даже в дозе 0,1 Гр через 6-7 суток инкубации наблюдается снижение количества выживших клеток на 36%, по сравнению с необлученным контролем. Облучение НСК в более высоких дозах приводило к драматическому снижению количества клеток, как за счет гибели, так и из-за ингибирования пролиферации. Причем, если обратить внимание на характер кривой на рис. 3, то можно предположить, наличие в культуре НСК как минимум двух популяций клеток с разной радиочувствительностью.

Влияние облучения на пролиферативный потенциал НСК

При анализе числа выживших клеток было важно правильно подобрать временной интервал инкубации НСК после облучения, т. к. гибель клеток происходит не сразу. Задачей стояло подобрать тот срок, за который погибнут не только наиболее чувствительные клетки, но и те в которых репарация повреждений ДНК не прошла правильно. Оптимальный интервал, подобранный эмпирически составил 6-7 суток. При последующей инкубации облученных в разных дозах клеток с регулярной их диссоциацией, подсчетом в камере Горяева и добавлением свежей питательной среды каждые 5-7 суток, было обнаружено, что НСК, облученные в дозе 0,1 Гр восстанавливали свой пролиферативный потенциал (рис. 7). Пролiferация же клеток, облученных в более высоких дозах (1-4 Гр) замедлялась.

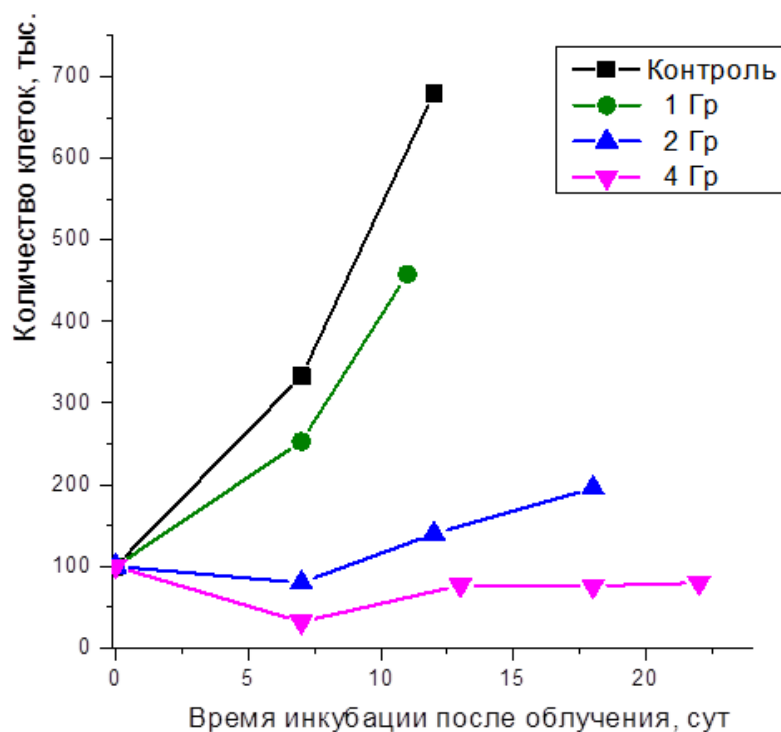


Рис. 7

Оценка колониобразующей способности

При культивировании НСК в нейросферах каждая нейросфера представляет собой потомство одной клетки. Поэтому, по количеству нейросфер можно оценивать влияние ИИ на пролиферацию клеток. Клетки были высеяны в низкой плотности, через 5-7 суток инкубации нейросферы были аккуратно перенесены в лунки планшетов покрытых матригелем. Через 2 ч инкубации в стандартных условиях все нейросферы сорбировались на подложке, затем их фиксировали, окрашивали кристаллическим фиолетовым и фотографировали с помощью системы геледокументирования (рис.8).

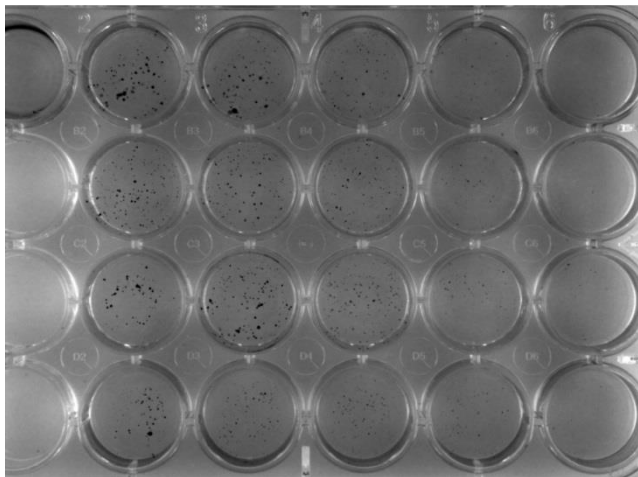


Рис.8

С увеличением дозы ясно можно видеть что снижается не только число нейросфер, но и их размер.

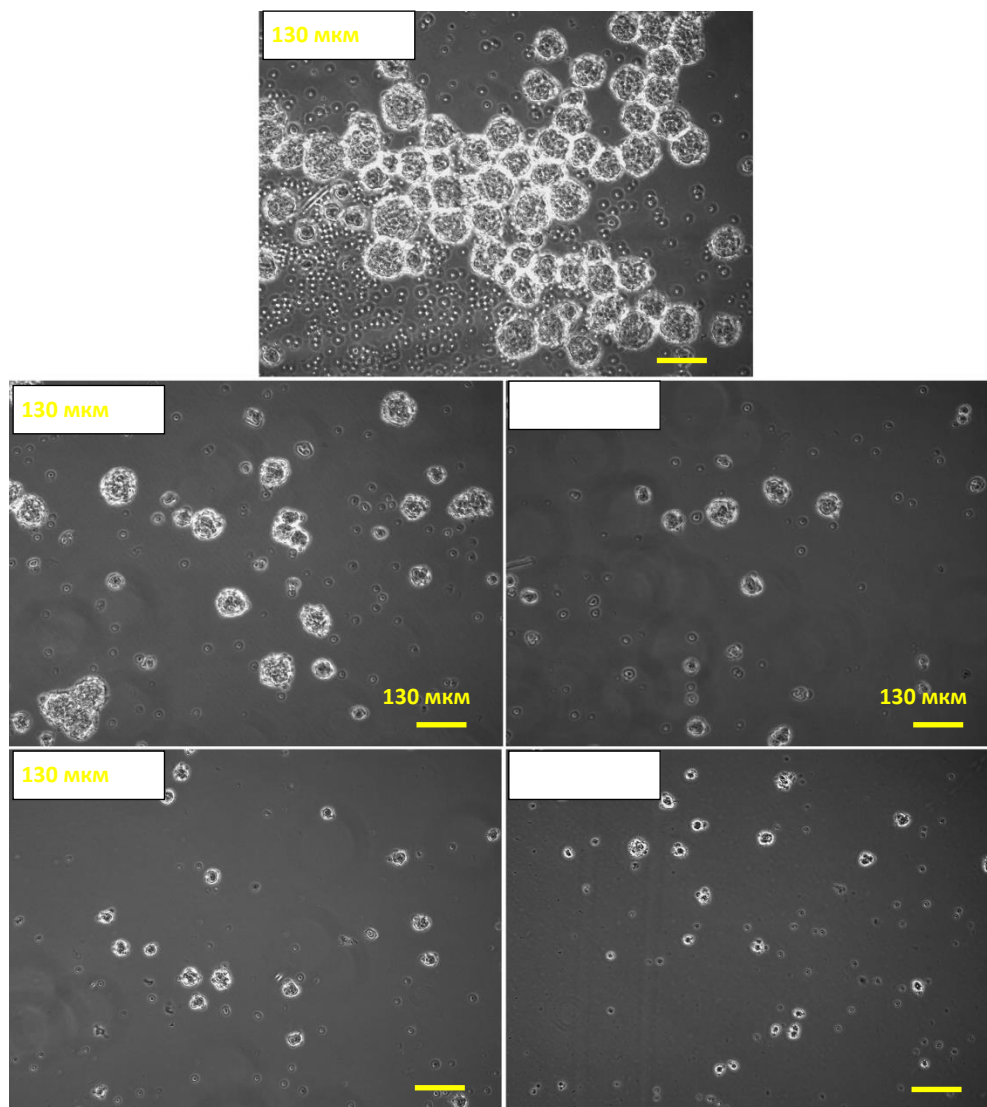


Рис.9

Под действием гамма-облучения количество нейросфер снижалось, но динамика снижения несколько отличалась, если сравнивать эти данные с подсчетом количества выживших клеток. Если для НСК, облученных в дозах 4 и 8 Гр значения близки (то есть и клеток мало, и нейросфер мало), то количество нейросфер, сформированных клетками, облученными в дозе 2 Гр (количество выживших клеток составляло 31% от необлученного контроля), составляло 75% от контроля.

Анализ числа двуниевых разрывов ДНК и их репарации

Двуниевые разрывы — ключевой вид повреждения ДНК, репарация которого определяет судьбу клетки. Именно от числа накопленных ДР в каждой конкретной клетке, как и от числа среднего значения по популяции будет зависеть прогноз выживаемости и развития клеток-предшественников.

Метод, позволяющий регистрировать двойные разрывы при облучении малыми дозами и использованный в данной работе — иммунофлуоресцентный метод, основанный на детектировании фосфорилированной формы известного белка репарации — H2AX. Один ДР запускает фосфорилирование нескольких тысяч лежащих рядом копий гистона H2AX [50] и на микрофотографиях клеток, обработанных антителами, это выглядит как флуоресцирующие скопления, называемые фокусами.

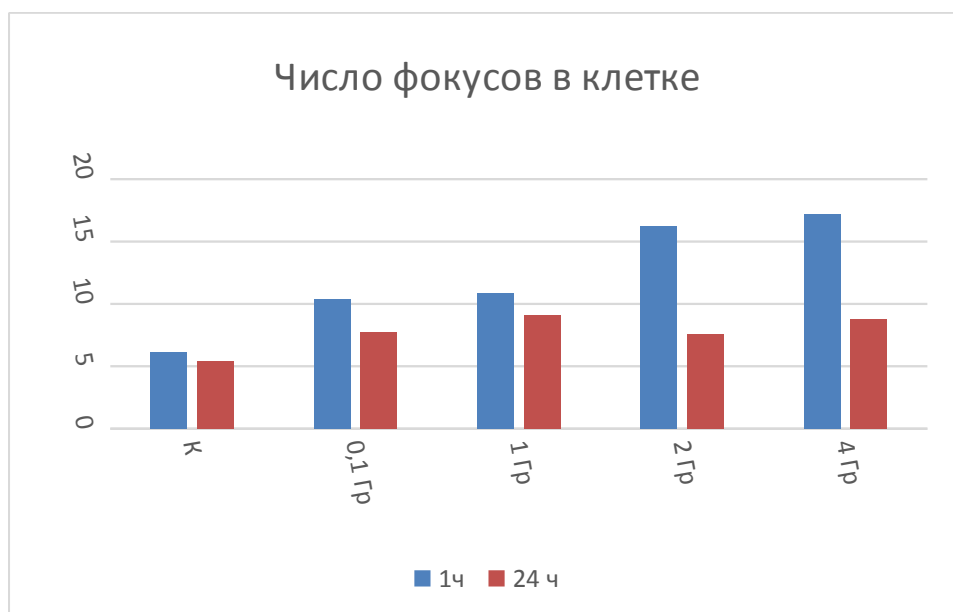


Рис.10

Было обнаружено, что количество ДР, регистрируемых через 1 ч после облучения возрастало с увеличением дозы. Через 24 ч инкубации количество ДР снижалось, но не достигало уровня контроля. Основываясь на полученных экспериментальных данных (рис.10), можно предположить, что НСК обладают высоким репаративным потенциалом, однако, учитывая данные по выживаемости клеток, описанные в предыдущем разделе, по-видимому, репарация ДР в клетках облученных в сублетальных дозах проходит с ошибками, не позволяющими клеткам впоследствии делиться.

Оценка дифференцировки клеток

Для анализа дифференцировки клеток после облучения, НСК, культивируемые в 24-луночных планшетах на покровных стеклах, покрытых матригелем, культивировали в стандартных условиях 6-7 суток с частичной сменой среды через 3 суток. Затем среду удаляли и добавляли аналогичную среду, но без факторов роста EGF и bFGF. Через 2 суток половину среды заменяли на аналогичную свежую. После 4-х суток инкубации клетки фиксировали, пермеабелизовали и проводили иммуноцитохимическое окрашивание на маркеры астроцитов (GFAP) и нейронов (бета-тубулин III).

Было обнаружено (рис.11), что способность к астроглиальной дифференцировке у НСК, выживших после облучения в дозах 0,1 и 1 Гр, повышается, по сравнению с необлученным

контролем. Для дозы 1 Гр количество астроцитов в 2 раза превышало таковое в контроле (35% и 17% соответственно). Для нейрональной дифференцировки наблюдалась обратная зависимость: количество нейронов падало. При увеличении дозы до 2 Гр количество астроцитов снижалось до 27% , а процентное содержание нейронов наоборот возрастало. Клетки, облученные в дозе 4 Гр, по большей части погибали за 6 суток, однако оставшиеся в живых клетки в малой степени, но дифференцировались в нейроны и астроциты (менее 4%).

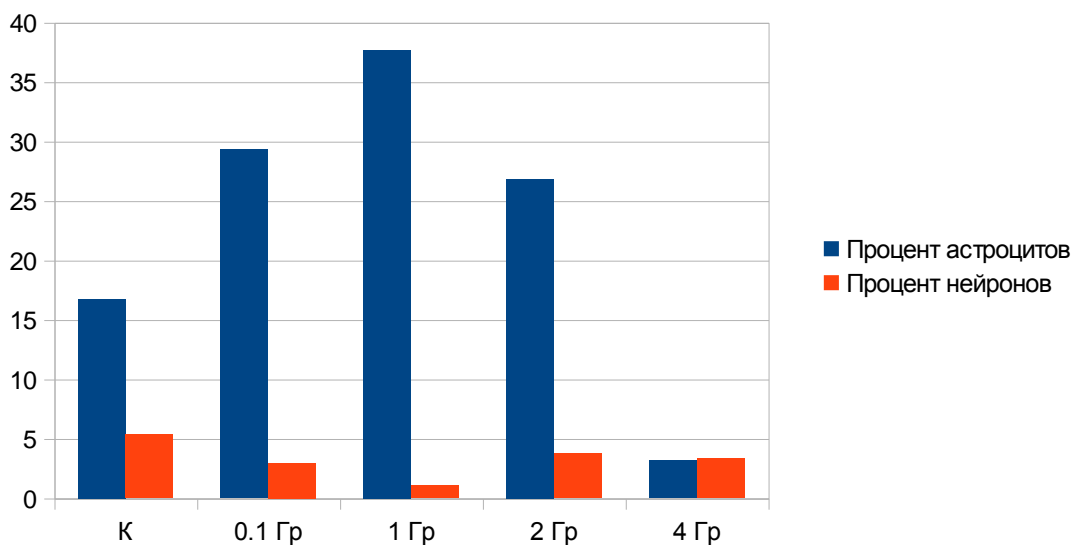


Рис.11

Выводы:

1. Охарактеризованы нейрональные стволовые клетки, выделенные из головного мозга мыши.
2. Проанализировано влияние ионизирующего излучения на жизнеспособность НСК. Экспериментально показано, что НСК мыши отличаются высокой чувствительностью к ионизирующему гамма-излучению.
3. Показано, что облучение НСК индуцировало дозозависимое увеличение количества двунитевых разрывов ДНК через 1 ч после облучения и их частичную репарацию через сутки.
4. Исследовано влияние гамма-излучения на способность НСК дифференцироваться в нейроны и астроциты. Обнаружено что дифференцировка клеток, выживших после облучения, преимущественно идет по астроглиальному типу в ущерб нейрональному.