

ФОРМИРОВАНИЕ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В НЕЙРОНАХ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ γ -КВАНТОВ ^{60}Co И ПРОТОНОВ

Т.С. Храмко^{1,2}, М.Е. Крупнова¹, А.В. Борейко^{1,2}

¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

²Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

E-mail: Bulanova_tatyan@mail.ru

Представлено исследование закономерностей формирования и репарации двунитевых разрывов ДНК (ДР ДНК) в клетках первичной культуры гиппокампа крыс при действии γ -квантов ^{60}Co и протонов в дозе 3 Гр. Установлено, что при действии γ -квантов ^{60}Co и протонов наблюдается сходная кинетика формирования $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов (РИФ) — через 1ч после облучения количество РИФ возрастает, после чего снижается по экспоненциальной кинетике в течение 24ч. Однако отмечено, что протоны как частицы имеют особенность формировать большее количество РИФ через 1ч и более сложные по структуре кластеры $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов через 4 и 24ч — больше 90 % РИФ при действии протонов находятся в составе кластеров РИФ с 2-6 индивидуальными фокусами. Также через 24ч отмечается наличие персистентных фокусов, уровень которых достоверно отличается от контроля: при действии γ -квантов ^{60}Co и протонов количество остаточных РИФ составляет 18 и 16 % от максимального значения на 1ч, что свидетельствует о способности обоих видов излучения в дозе 3 Гр формировать сложные для восстановления кластерные ДР ДНК.

Введение

Двунитевые разрывы ДНК (ДР ДНК) являются одними из наиболее тяжёлых повреждений для генетических структур клеток, некорректная репарация которых может привести к генетической нестабильности, гибели клетки или стать причиной злокачественного перерождения [1]. Для нейронов как высокоспециализированных клеток ДР ДНК могут быть особенно опасны, поскольку в результате окончательной дифференцировки они утратили способность к безошибочной репарации ДР ДНК за счет гомологичной рекомбинации [2]. В связи с чем репарация ДР ДНК может проходить с потерей части генетической информации, особенно в случае воздействия излучений с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ), отличительной особенностью которых является образование сложных комплексов повреждений ДНК [3]. В настоящее время вопросы, касающиеся репарации такого рода повреждений в нейронах, остаются слабо изученными. С учетом этого представляются важными исследования формирования и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками в нейронах различных отделов мозга и, прежде всего гиппокампа как одной из наиболее радиочувствительных областей.

Для исследования репарации ДР ДНК в зрелых нейронах использовалась первичная культура гиппокампа крыс, которая является признанной моделью *in vitro* для исследования молекулярных процессов, происходящих в клетках головного мозга *in vivo*. Исследование репарации ДР ДНК в нейронах осуществлялось с привлечением двух маркеров ДР ДНК — γ H2AX и 53BP1. Они представляют собой белки, участвующие в репарации ДР ДНК: γ H2AX, являющийся фосфорилированной формой гистонового белка H2AX, играет роль сигнального маркера ДР ДНК для привлечения других белков, таких как 53BP1, который в дальнейшем играет роль «строительных лесов» для стабилизации концов ДР ДНК и его последующей репарации [4]. В работе анализировалась как кинетика элиминации колокализованных γ H2AX/53BP1 фокусов, так и сложность γ H2AX/53BP1 кластеров фокусов, сформированных в нейронах первичной культуры гиппокампа крыс в результате облучения γ -квантами ^{60}Co и протонами в дозе 3 Гр.

Материалы и методы

Первичная культура клеток гиппокампа крыс

В данном исследовании применялась культура нейрональных клеток с минимальным содержанием глиальных элементов, полученная с использованием антимиотического агента арабинофуранозид цитозина (AraC, cytosine β -D-arabinofuranoside, Sigma-Aldrich, C1768, CAS 147-94-4). При подготовке первичной культуры клеток гиппокампа использовались P0-P1 крысята линии Sprague Dawley и следующие среды: среда для выделения, среда для гомогенизации и среда для культивации (табл. 1). Перед началом работы чашки Петри диаметром 35 мм (Epp 0030 700.015, Eppendorf) покрывали поли-L-лизина гидробромидом (0,05 мг/мл, Ф086, Пан-Эко). Для извлечения тканей головного мозга животных проводили декапитацию. Извлеченные ткани головного мозга помещали в охлажденную (+4°C) среду для выделения гиппокампа [5]. В последующем гиппокамп разрезали на небольшие фрагменты, которые помещали в среду для гомогенизации и диссоциировали в течение 15 мин в CO₂-термостате (37 °C, 5 % CO₂). Диссоциированную ткань гиппокампа центрифугировали при 560 g в течении 2 мин (КТ), сливали супернатант и промывали от среды для гомогенизации средой для выделения с последующим центрифугированием при 560 g в течение 2 мин (КТ). Далее сливали супернатант, а полученный осадок ресуспендировали в 5 мл среды для культивации и оставляли на 4 мин для осаждения мертвых клеток. Затем отбирали 1 мл клеточной суспензии из верхнего слоя исходной пробирки в новую, далее добавляли 1 мл свежей среды для культивации в исходную пробирку и оставляли на 4 мин. Процедуру осаждения повторяли 4 раза. На 4-й раз отбирали всю клеточную суспензию из исходной пробирки в новую и центрифугировали при 560g 2 мин (КТ), затем сливали супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды для культивации, чтобы получить концентрацию клеток $0,1-0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Далее клеточную суспензию наносили на покрытые поли-L-лизина гидробромидом чашки Петри по 350 мкл и помещали в CO₂-термостат на 1,5ч для прикрепления клеток к субстрату. После 1,5ч инкубации в образцы добавляли 3 мл среды для культивации. Гото-

вые образцы с нанесенными на поверхность клетками, инкубировали в CO₂-термостате в среде для культивации в течение 16 дней (16-18 days in vitro, DIV). Морфологические изменения культуры клеток гиппокампа на протяжении 10 дней культивации представлены на рис. 1. Для снижения содержания глиальных клеток в образцы на 4 день культивации добавляли АраЦ (3 мМ) и инкубировали в течение 24ч. После добавления и выдерживания культуры клеток с АраЦ в течение 24ч к 15 DIV (days in vitro) остаётся около 6 % астроцитов из общей популяции (данные не представлены).

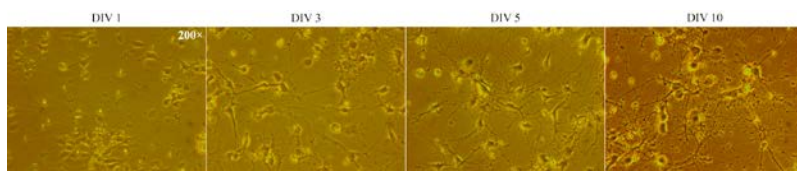


Рис. 1. Морфологические изменения первичной культуры клеток гиппокампа с 1 по 10 день культивации (1-10 DIV)

Состав сред, использованных при подготовке первичной культуры гиппокампа

Название	Состав	Артикул
Среда для выделения	ДМЕМ	Пан-Эко, С410п
	1,5 % 1М HEPES	Пан-Эко, Ф133.100 г
Среда для гомогенизации	ДМЕМ	Пан-Эко, С410п
	1,5 % 1М HEPES	Пан-Эко, Ф133.100 г
	5 мг Trypsin 1-300	MP-Biomedicals, CAS №: 9002-07-7
Среда для культивации	Neurobasal Medium	Gibco, 21103049
	2% B27 (50×)	Gibco, 17504-044
	1% гентамицин-глютамин (0,5 мМ)	Sigma-Aldrich, G9654

Облучение

На 16-18 DIV образцы в одинаковой дозе 3 Гр (0,3 кЭВ/мкм) облучали γ-квантами ⁶⁰Со на установке «Рокус-М» и протонами (150 МэВ) на ускорителе фазотрон (МТК, Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ). После облучения образцы инкубировали в CO₂-термостате (37 °С, 5 % CO₂) вплоть до момента фиксации.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Через 1, 4 и 24ч после облучения образцы фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в фосфатном буфере в течение 10 мин (КТ). Затем проводили пермеабиллизацию в 0,2 % растворе Triton X-100 («Panreac», Испания) в течение 15 мин (КТ). Далее проводилась инкубация образцов в блокирующем растворе для первичных антител в течение 30 мин (КТ). В состав блокирующего раствора входит: фосфатный буфер, 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, 16170-086, Новая Зеландия) и 2 % бычьего сывороточного альбумина (0332-100G, “Invitrogen”). После этапа блокировки неспецифического связывания, образцы инкубировали в смеси первичных антител γ H2AX (γ H2AX, 1:700, ab22551, Abcam, США) и 53BP1 (1:600, ab21083, Abcam, США), разведенных в блокирующем растворе для первичных антител в течение 10 мин при КТ и далее в течение ночи при 4°C.

На следующий день проводилась блокировка неспецифического связывания вторичных антител в растворе PBS с 5 %-содержанием инактивированной козьей сыворотки (“Lifetechnologies”, США). По истечении этого времени нанесли смесь вторичных поликлональных козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (1:200, FITC, ab97239, Abcam, США) и поликлональных козьих антител к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с сульфородамино 101 (1:400, Texas Red, ab6719, Abcam, США). Буфером для разведения вторичных антител являлся блокирующий раствор для вторичных антител. Образцы инкубировали 1ч в темноте (КТ). Фоновое окрашивание ядер проводили красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндола дилактат (DAPI, D3571, Invitrogen) в концентрации 1800 нМ, разведенным в фотозащитной среде Vectashield H-1000 (Vector laboratories, США).

Микроскопирование и анализ экспериментальных данных

Изображения окрашенных препаратов получали с использованием флуоресцентного микроскопа AxioImager. M2 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного световой системой оптического секционирования ApoTome.2 и цифровой монохромной камерой AxioCam MRm r.3.1 (Carl Zeiss, Германия) с разрешением 1388×1040 пикселей.

Анализ изображений осуществляли в 3D геометрии в программе ZEN 2012, которая позволяет различать индивидуальные γ H2AX и 53BP1 фокусы в составе кластера фокусов на всех слоях Z-стека изображений. Пример подсчета индивидуальных фокусов, входящих в кластер, представлен на рис.2. Для количественного анализа формирования ДР ДНК в клетках первичной культуры гиппокампа крыс производили подсчет не менее 30 клеток. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы OriginPro.2018.v9.5.0.193. Анализ статистической значимости проводили с использованием теста Манна-Уитни.

На изображениях Z1-Z4 показаны индивидуальные оптические срезы в плоскостях X-Y, полученные вдоль оси Z с расстоянием между Z1-Z4 2,52 μ m, иллюстрирующие количество индивидуальных γ H2AX и 53BP1 фокусов, входящих в γ H2AX/53BP1 кластер. Показан сложноорганизованный γ H2AX/53BP1 кластер, состоящий из 9 индивидуальных фокусов, правое нижнее изображение является результирующим, полученным совмещением всех оптических срезов Z1-Z4 в обоих спектрах, в пределах которых располагается кластер γ H2AX/53BP1 фокусов.

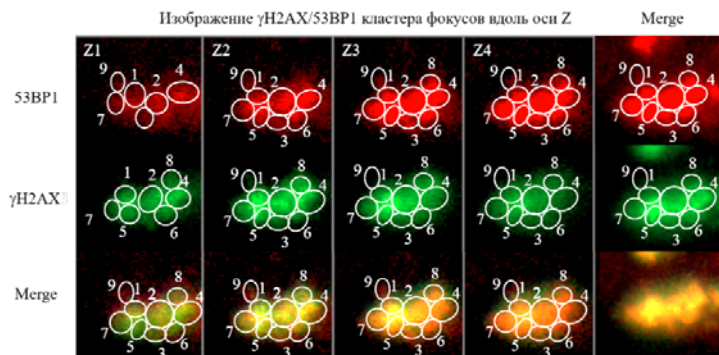


Рис. 2. Кластеризация γ H2AX/53BP1 фокусов в ядре нейрона через 1ч после облучения протонами

Результаты и обсуждение

Для исследования кинетики формирования ДР ДНК в нейрональных клетках проведено облучение первичной культуры гиппокампа двумя видами ионизирующего излучения, γ -

квантами ^{60}Co или протонами, в одинаковой дозе (3 Гр). На рис. 3Б представлены изображения ядер клеток с радиационно-индуцированными $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусами (РИФ) в различное время после облучения γ -квантами ^{60}Co и протонами. Далее псевдотрехмерные флуоресцентные изображения ядер клеток анализировались на предмет абсолютного количества $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов (рис. 3А). Проведенный сравнительный анализ формирования $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов после облучения протонами и γ -квантами показал, что при действии обоих видов излучений кинетика РИФ имеет сходные особенности: пик формирования РИФ приходится на 1ч после облучения с последующей элиминацией РИФ вплоть до 24ч после облучения. К 24 часам после облучения количество РИФ приближается к контрольному уровню и статически достоверно отличается от контрольных показателей как для γ -квантов, так и для протонов (тест Манна-Уитни, $P=0,001$).

Однако воздействие протонов имеет свои особенности такие, как увеличенное на 20% через 1ч количество РИФ по сравнению с γ -облучением. Это, вероятно, говорит о более сложном характере сформированных повреждений ДНК. Протоны, благодаря своей корпускулярной природе, способны генерировать более сложные повреждения ДНК, несмотря на близкие значения ЛПЭ. Также кинетика элиминации РИФ при действии протонов отличается: через 4ч после облучения количество РИФ снижается на 65 % для протонов и на 4 3% для γ -квантов. Вероятно, что несмотря на генерацию большего количества ДР ДНК в результате действия протонов, большая часть из них представляет достаточно простые повреждения, которые могут быть восстановлены в течение первого часа после облучения. Оставшаяся часть более сложных повреждений может быть восстановлена в последующие часы или привести к гибели клетки [6].

Следует также отметить, что воздействие обоих видов излучений в дозе 3 Гр приводит к образованию долгоживущих РИФ, о чем говорит достоверно более высокий уровень РИФ через 24ч после облучения в сравнении с контролем: 18% остаточных РИФ от максимального значения на 1ч при действии γ -облучения и 16 % — при действии протонов. Это может свидетельствовать о том, что оба вида облучения могут стать

источником труднорепазируемых ДР ДНК, которые впоследствии могут стать причиной генетической нестабильности и гибели нейронов.

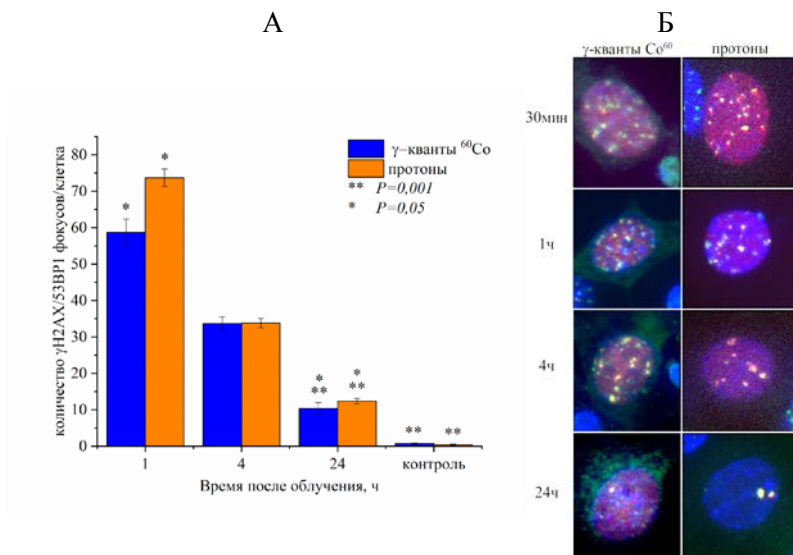


Рис. 3. Сравнительный анализ кинетики формирования γ H2AX/53BP1 фокусов в культуре нейрональных клеток при воздействии γ -квантов ^{60}Co и протонов в дозе 3 Гр. Достоверные отличия наблюдаются: между протонами и γ -квантами через 1 и 24ч после облучения (тест Манна-Уитни, $*P=0,05$); между 24ч и контрольными группами для обоих видов облучения (тест Манна-Уитни, $**P=0.001$). Рис 3Б – Флуоресцентные изображения ядер клеток с γ H2AX/53BP1 фокусами через 1, 4 и 24ч после облучения γ -квантами ^{60}Co и протонами

Список литературы

1. Role of ionizing radiation in neurodegenerative diseases/ N.K. Sharma, R. Sharma, D. Mathur, S. Sharad, G. Minhas, K. Bhatia, A. Anand, S.P. Ghosh //Frontiers in aging neuroscience. 2018. V. 10. P. 134.
2. M. L. Fishel, M. R. Vasko, M. R. Kelley. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? //Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007. V. 614. №. 1-2. P. 24-36.
3. Mladenova V. et al. DNA damage clustering after ionizing radiation and consequences in the processing of chromatin breaks/V Mladenova, E Mladenov, M Stuschke, G Iliakis//Molecules. – 2022. V. 27. №. 5. P. 1540.

4. Multifaceted regulation and functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB repair/ T. Lei, S. Du, Z. Peng, L. Chen //International Journal of Molecular Medicine. 2022. V. 50. №. 1. P. 1-19.
5. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex/G.M.J. Beaudoin, S.H. Lee, D. Singh, Y. Yuan, Y.G. Ng, L.F. Reichardt, J. Arikath //Nature protocols. 2012. V. 7. №. 9. P. 1741-1754.
6. Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A. D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break //Trends in cell biology. 2016. V. 26. №. 1. P. 52-64.