

**Д.А. Шапошникова¹, Е.Ю. Москаleva¹, О.В. Высоцкая¹,
О.В. Комова², И.В. Кошлань², К.В. Кондратьев¹**

АНАЛИЗ ОТВЕТА КЛЕТОК МИКРОГЛИИ МЫШИ ЛИНИИ SIM-A9 НА ДЕЙСТВИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва

² Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Контактное лицо: Дарья Алексеевна Шапошникова, e-mail: dasha-shap13@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Характеристика ответа клеток микроглии мыши линии SIM-A9 на действие γ -излучения.

Материал и методы: Облучение суспензии клеток проводили на установке ГУТ-200М (источник γ -излучения кобальт-60). Радиочувствительность клеток оценивали по количеству выживших клеток и по их клоногенной активности. Влияние γ -излучения на фенотип и экспрессию рецептора колониестимулирующего фактора роста-1 и эпидермального фактора роста, необходимых для стимуляции пролиферации клеток микроглии, изучали методом проточной цитометрии после окрашивания клеток флуоресцентно меченными антителами к белкам CD11b, CD45, TMEM119, CSF-1R и EGFR. Анализ относительной экспрессии mRNA генов цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α в ответ на действие γ -излучения проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-ПЦР). Статистический анализ осуществляли по методу Стьюдента с использованием t-критерия Стьюдента по программе Origin.

Результаты: Обнаружена высокая радиочувствительность клеток линии SIM-A9. При анализе зависимости клоногенной активности клеток от дозы облучения показано, что значение D_{37} для этих клеток равно 1 Гр. Облучение вызывало блокирование клеточного цикла в фазе G_0/G_1 при снижении доли клеток в S- и G2/M-фазах. Гибель облученных клеток SIM-A9 происходила по механизму апоптоза. Особенностью клеток SIM-A9 по сравнению с микроглией головного мозга является фенотип активированной микроглии CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{high}}$ при незначительном содержании клеток CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{low}}$ и отсутствии изменения фенотипа после облучения. Показано повышение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α в ответ на γ -облучение клеток SIM-A9, что отражает их активацию и соответствует ответу клеток микроглии мозга на общее облучение мышей и локальное облучение головы.

Заключение: Обнаруженные закономерности ответа клеток микроглии мыши линии SIM-A9 на облучение свидетельствуют о возможности использования этих клеток в модельных радиобиологических исследованиях, в том числе при изучении межклеточных взаимодействий клеток головного мозга разных типов с клетками микроглии.

Ключевые слова: микроглия, линия клеток SIM-A9, радиочувствительность, клеточный цикл, апоптоз, γ -излучение, экспрессия генов, IL-1 β , IL-6, TNF α , мыши

Для цитирования: Шапошникова Д.А., Москаleva Е.Ю., Высоцкая О.В., Комова О.В., Кошлань И.В., Кондратьев К.В. Анализ ответа клеток микроглии мыши линии SIM-A9 на действие γ -излучения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 6. С. 12–18. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-6-12-18

DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-6-12-18

**D.A. Shaposhnikova¹, E.Yu. Moskaleva¹, O.V. Vysotskaya¹,
O.V. Komova², I.V. Koshlan², K.V. Kondratiev¹**

The Response of Mouse Microglia Cells SIM-A9 to γ -Radiation

¹ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

Contact person: D.A. Shaposhnikova, e-mail: dasha-shap13@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: Characterization of the response of mouse microglia cells of the SIM-A9 line to the γ -irradiation.

Material and methods: Irradiation of the cells in suspension was carried out using a GUT-200M installation (cobalt-60 γ -radiation source). The radiosensitivity of cells was assessed by the number of surviving cells and their clonogenic activity. The effect of γ -radiation on the phenotype and expression of colony-stimulating growth factor receptor-1 and of epidermal growth factor, which are required to stimulate microglial cells proliferation, was studied using flow cytometry after staining the cells with appropriate fluorescently labeled CD11b, CD45, TMEM119, CSF-1R and EGFR antibodies. Analysis of the relative expression of mRNA genes for the cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF α in response to γ -radiation was performed using RT-PCR. Statistical analysis was carried out using Student's t-test in the Origin program.

Results: High radiosensitivity of SIM-A9 cells has been demonstrated. When analyzing the dependence of the clonogenic activity of cells on the radiation dose, it was shown that the D_{37} value for these cells was equal to 1 Gy. Irradiation caused a cell cycle block in the G_0/G_1 phase with a decrease in the proportion of cells in the S- and G2/M-phases. The cell death of irradiated SIM-A9 cells occurred by apoptosis. The peculiarity of SIM-A9 cells compared to brain microglia is their phenotype of activated microglia CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{high}}$ with an insignificant content of CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{low}}$ cells and no change in it after irradiation. An increase in the level of mRNA expression of the proinflammatory cytokine genes IL-1 β , IL-6 and TNF α in response to γ -irradiation of SIM-A9 cells was shown, which reflects their activation and corresponds to the response of brain microglia cells during total mice irradiation and local cranial irradiation.

Conclusion: The obtained patterns indicate the possibility of using the SIM-A cell line in model radiobiological studies, including the study of intercellular interactions of brain cells of different types with microglia cells.

Keywords: microglia, SIM-A9 cell line, radiosensitivity, cell cycle, apoptosis, γ -radiation, gene expression, IL-1 β , IL-6, TNFa

For citation: Shaposhnikova DA, Moskaleva EYu, Vysotskaya OV, Komova OV, Koshlan IV, Kondratiev KV. The Response of Mouse Microglia Cells SIM-A9 to γ -Radiation. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(6):12–18. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-6-12-18

Введение

Лучевая терапия – основной способ эффективного лечения опухолей головного мозга и опухолей в области головы и шеи. Однако в отдаленный период после облучения почти у 50 % пациентов наблюдаются осложнения, приводящие к снижению способности к обучению и ухудшению памяти, вплоть до развития деменции [1]. В основе формирования отдаленных пострадиационных когнитивных нарушений лежит повреждение клеток ЦНС и нарушение нейрогенеза под действием факторов нейровоспаления, развивающегося в результате активации клеток микроглии и секреции ими активных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов.

Микроглия образуется в период эмбриогенеза из миелоидных клеток-предшественников костного мозга. Во взрослом головном мозге пул микроглии поддерживается в результате сбалансированных процессов пролиферации и гибели клеток путем апоптоза так, что за время жизни микроглия обновляется целиком несколько раз [2]. Пролиферацию микроглии стимулирует колониестимулирующий фактор-1 (КСФ-1, CSF-1) и IL-34 при связывании одного из этих цитокинов с рецептором КСФ-1 (PeKСF-1, CSF-1R), который в ЦНС представлен в основном в клетках микроглии [3].

В эмбриогенезе эти клетки участвуют в ремоделировании синапсов и регуляции ангиогенеза, во взрослом организме – выполняют иммунные функции, удаляя погибающие клетки мозга путем фагоцитоза и определяя развитие реакций воспаления. Кроме того, важнейшая роль микроглии определяется ее участием в устраниении ненужных синапсов, в формировании и ремоделировании нейронной сети, в регуляции нейрогенеза и миелогенеза, в ремоделировании сосудистой сети ЦНС [4]. В зубчатой извилине гиппокампа микроглия обладает особыми свойствами. Она отличается от микроглии в других зонах гиппокампа присутствием рецептора Axl и способностью поддерживать выживаемость нейробластов и активность нейрогенеза у взрослых мышей [5]. Таким образом, помимо выполнения иммунных функций, микроглия обеспечивает и регулирует ряд жизненно важных процессов в развивающемся и взрослом мозге.

Содержание микроглии в мозге мышей в зависимости от метода выделения составляет 7–14 % [6], что делает затруднительным изучение свойств этих клеток и механизмов межклеточных взаимодействий с их участием в норме и после облучения. Большая часть известных линий микроглии человека и мыши получены при трансфекции определенными онкогенами (v-mus в случае микроглии человека линии НМО6 и v-gaf/v-mus в случае микроглии мыши линии BV2) [7, 8] или в результате спонтанной иммортализации (в случае клеток линии SIM-A9) [9]. Показано, что клетки этих линий сохраняли основные свойства первичной микроглии [8, 9]. Это позволяет полагать, что использование культивируемых клеток микроглии мыши может быть полезным в модельных исследованиях *in vitro* при изучении межклеточных взаимодействий и при тестировании радиомодифицирующих препаратов, направленных на создание

средств, предупреждающих развитие нейровоспаления на этапе доклинических испытаний.

В связи с сказанным выше, целью настоящей работы явилась характеристика ответа клеток микроглии мыши линии SIM-A9 на действие γ -излучения.

Для этого проведен анализ радиочувствительности клеток, которую оценивали по количеству выживших клеток и по их клоногенной активности, изучено влияние γ -облучения на фенотип и экспрессию рецепторов, необходимых для стимуляции пролиферации клеток микроглии линии SIM-A9, а также и проведено исследование уровня экспрессии провоспалительных цитокинов этими клетками в ответ на γ -облучение.

Материал и методы

Культивирование клеток

Клетки микроглии мыши линии SIM-A9 культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки (HuClone, США), 5 % инактивированной лошадиной сыворотки (Gibco, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) в пластиковых культуральных флаконах в CO_2 -инкубаторе при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO_2 . Для пересева клетки линии SIM-A9 снимали с подложки с помощью фосфатного солевого буфера (ФСБ; ПанЭко, Россия), содержащего 1 ммоль/л ЭДТА (AppliChem, Германия), 1 ммоль/л ЭГТА (AppliChem, Германия) и 1 мг/мл глюкозы. Пересев клеток проводили 2 раза в неделю по достижении 80–90 % конфлюэнтности.

Характеристика данной клеточной линии была дана ранее в [12].

Облучение

Клетки в виде суспензии в культуральной среде подвергали действию γ -излучения от источника ^{60}Co на установке “ГУТ-200М” при комнатной температуре в дозах 1–8 Гр при мощности дозы 0,75 Гр/мин. После облучения оценивали выживаемость, клоногенную активность и другие показатели состояния клеток микроглии.

Анализ выживаемости клеток

Выживаемость клеток микроглии линии SIM-A9 оценивали на 7-е сутки после действия γ -облучения. Для этого контрольные и облученные в дозах 1, 2, 4 и 8 Гр клетки в полной культуральной среде высевали в лунки 12-луночных планшетов: контрольные и облученные в дозе 1 Гр – по 100 тыс. клеток на лунку, облученные в дозах 2 и 4 Гр – по 200 тыс., а облученные 8 Гр – по 400 тыс. клеток на лунку. На 7-е сут клетки снимали с подложки и подсчитывали их количество в камере Горяева.

Анализ клоногенной активности

Анализ клоногенной активности проводили согласно методике [10]. Для этого контрольные (100 клеток/лунку) и облученные в дозах 1, 2, 4 и 8 Гр клетки (соответственно 100, 200, 200, и 400 клеток/лунку) высевали в 6-луночные планшеты. Через 7 сут после облучения планшеты

промывали ФСБ, колонии фиксировали и окрашивали красителем кристаллический фиолетовый. Через 30 мин краситель удаляли, промывали планшеты водой, высушивали, подсчитывали колонии и рассчитывали в процентах эффективность клонирования РЕ (plating efficiency – отношение количества образовавшихся колоний к количеству высаженных контрольных или облученных клеток, соответственно РЕ_{контроль} и РЕ_{облучение} для каждой дозы). Далее рассчитывали показатель выживаемости SF (surviving fraction) по формуле SF = РЕ_{облучение}/РЕ_{контроль}.

Фенотипирование клеток

Для окрашивания поверхностных белков CD11b и CD45 клетки снимали с подложки, промывали ФСБ и окрашивали прямыми антителами кенным антигенам (описание этих и других использованных антител приведено в табл. 1) в течение 30 мин при +4 °C. Далее клетки отмывали ФСБ, фиксировали в растворе 2 % параформальдегида (ПФА) в ФСБ 10 мин при комнатной температуре, отмывали и ресуспендировали в ФСБ.

Таблица 1
Список использованных при иммуноцитохимическом окрашивании антител

List of antibodies used in immunocytochemical staining

Антиген:краситель	Видовая специфичность антител	Фирма производитель
CD11b:PE	Крыса/IgG2b,к	Biolegend, США
CD45:AlexaFluor488	Крыса/IgG2b,к	Biolegend, США
TMEM119	Кролик/IgG	Abcam, Великобритания
Иммуноглобулины кролика: AlexaFluor647	Коза/IgG	Molecular Probes, США
CD115:AlexaFluor647	Крыса/IgG2a	Biolegend, США
EGFR:FITC	Мышь/IgG1	BD Bioscience, США

Рецептор колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R, CD115) идентифицировали в фиксированных клетках при окрашивании соответствующими антителами в течение 30 мин при 4 °C. Антигены TMEM119 и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) идентифицировали на нефиксированных клетках SIM-A9. При анализе трансмембранный белка TMEM119 проводили непрямое окрашивание. Все антитела использовали в разведении, рекомендованном фирмой-изготовителем.

Анализ клеточного цикла

Контрольные и облученные в дозе 4 Гр клетки собирали, промывали ФСБ, фиксировали 70 % холодным этанолом при 4 °C в течение 2 ч при концентрации клеток в суспензии 1×10⁶ клеток/мл и хранили до исследования при -20 °C. Перед анализом фиксированные клетки осаждали при центрифугировании при 400 g, промывали ФСБ, ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (ФСБ, pH 7,4, содержащий 0,1 % тритон X-100, 0,1 моль/л ЭДТА, 0,05 мг/мл рибонуклеазы A, 50 мкг/мл йодида пропидия) в концентрации 1×10⁶ клеток/мл и инкубировали 1 ч при комнатной температуре.

Флуоресценцию клеток при фенотипировании и исследовании клеточного цикла анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria™ Fusion (BD Bioscience, США), оснащенном пятью оптоволоконными лазерами с длиной волны 355, 405, 488, 561 и 640 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ «Курчатовский институт») с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD Bioscience, США). Для каждого образца анализировали не менее 10 тыс. клеток.

Анализ уровня экспрессии генов цитокинов

Суммарную РНК выделяли фенол-хлороформенным методом, используя реактив ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Анализ относительной экспрессии мРНК исследуемых генов проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (OT-ПЦР) в режиме реального времени с использованием красителя SYBR Green I на амплификаторе CFX96 TouchTM (Bio-Rad, США). ПЦР проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) как описано ранее в [11] с использованием следующих пар праймеров: mTNFα f 5'-aaatggccctccctcatc-3', r5'-ttttagatccatgccgttg-3'; mIL-1β f 5'-accgttgtttgaagtgcacg-3', r 5'-gaaaagaaggcgctcatgtcc-3'; mIL-6 f 5'-gaggttaattcacatgttc-3', r 5'-aggcaatttcctgg ttatccagg-3'; mGAPDH f 5'-cagctcgcccgttagaca-3', r 5'-ttcccggtgtatgacaaggctc-3'. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 72 °C. Результаты анализировали с использованием программы Bio-Rad CFX Manager 2.0. Уровень экспрессии мРНК генов mTNFα, mIL-1β и mIL-6 в клетках микроголии линии SIM-A9 измеряли относительно экспрессии конститутивного гена mGAPDH и выражали как 2^{-ΔCt}, где $\Delta Ct = Ct_{\text{цитокина}} - Ct_{\text{GAPDH}}$. Ct – пороговый уровень флуоресценции, соответствующий номеру цикла ПЦР исследуемого образца, в котором флуоресценция отличается от фонового шума. Относительный уровень экспрессии генов в облученных клетках рассчитывали по отношению к среднему значению для контрольного необлученного образца, который принимали за единицу.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ осуществляли по методу Стьюдента с использованием t-критерия Стьюдента по программе Origin. Результаты, кроме данных по ПЦР, представлены в виде средних значений ± погрешность среднего. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Зависимость выживаемости клеток микроголии мыши линии SIM-A9 от дозы γ-излучения

Клетки микроголии линии SIM-A9 характеризуются высокой скоростью пролиферации – время их удвоения составляет около 24 ч, и даже при культивировании с низкой исходной плотностью они образуют колонии, которые, однако, могут сливаться после 7 сут культивирования. Поэтому радиочувствительность клеток микроголии анализировали через 7 сут после γ-облучения. Облучение клеток проводили в суспензии в культуральной среде в диапазоне доз 1–8 Гр. Выживаемость оценивали по количеству живых клеток и по их клоногенной активности. Полученные дозовые кривые представлены на рис. 1а, б.

Дозовая зависимость выживаемости клеток линии SIM-A9, оцениваемая по количеству клеток, описывается уравнением $y = -0,29x - 0,21x^2$, а оцениваемая по клоногенной активности – линейной зависимостью $y = -0,86x$. Соответственно значение D_{37} в первом случае составляет 3 Гр, а во втором – 1 Гр. При анализе выживаемости, оцениваемой по клоногенной активности после облучения клеток, основной вклад в ее изменение вносит доля клеток, сохранивших способность к пролиферации, и высокую скорость пролиферации. При анализе выживаемости, оцениваемой по количеству живых клеток через определенный интервал времени, значительный вклад в получаемое значение вносит количество

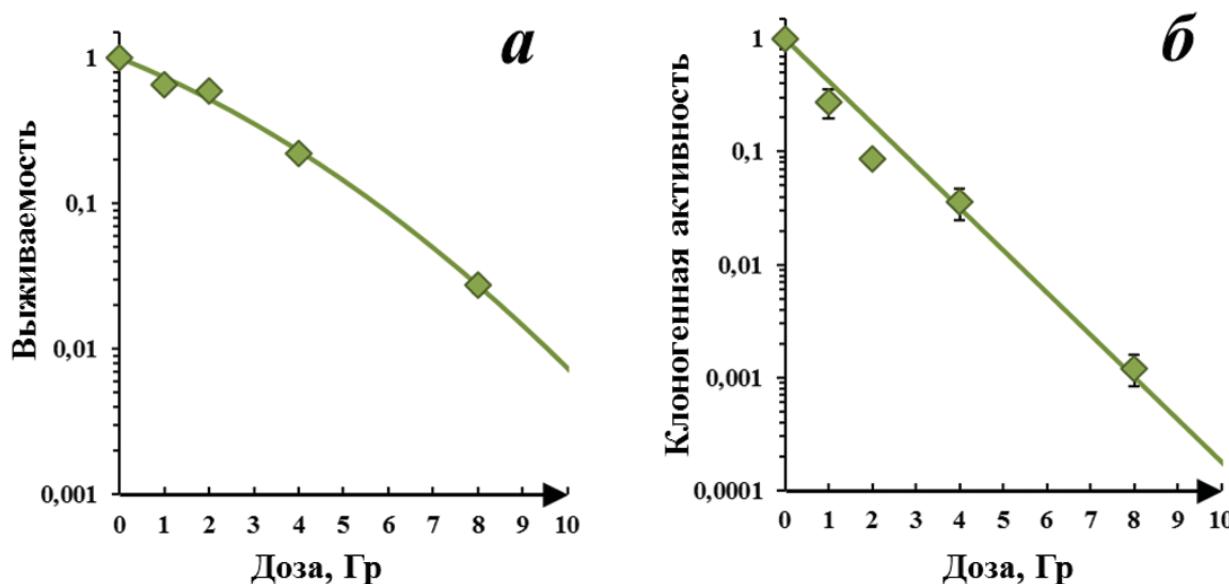


Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток микроглии мыши линии SIM-A9 от дозы γ -излучения, оцениваемой по количеству выживших клеток (а) и по клоногенной активности (б) через 7 сут после воздействия. Эффективность клонирования контрольных клеток линии SIM-A9 составила $51,5 \pm 2,6\%$

Fig. 1. The dependence of SIM-A9 mouse microglia cells survival on the dose of γ -irradiation, assessed by the number of surviving cells (a) and clonogenic activity (b) 7 days after exposure. The cloning efficiency of control SIM-A9 cells was $51.5 \pm 2.6\%$

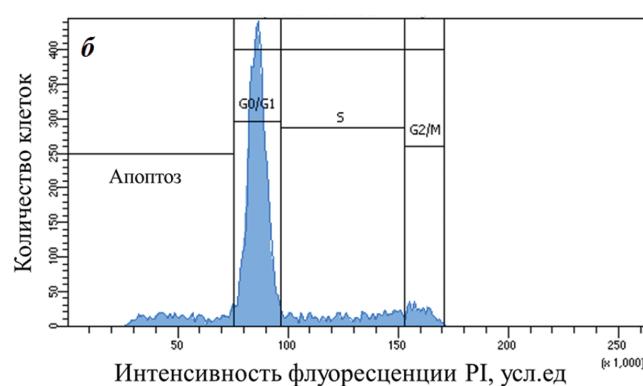
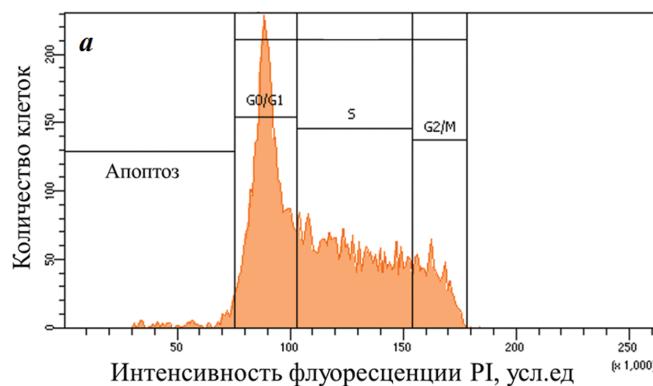


Рис. 2. Примеры гистограмм распределения клеток линии SIM-A9 по фазам клеточного цикла в контроле (а) и через 24 ч после γ -облучения в дозе 4 Гр (б). Клетки в состоянии апоптоза с гиподипloidным содержанием ДНК локализованы левее области клеток в фазе G₀/G₁

Fig. 2. The histograms of the SIM-A9 cells distribution by the cell cycle phases in control (a) and in 24 hours after 4 Gy γ -irradiation (b). Apoptotic cells with hypo diploid DNA content are localized to the left of the region of cells in the G₀/G₁ phase

тех клеток, которые остаются живыми, хотя и утратили способность к пролиферации, и количество клеток, способных к пролиферации с высокой скоростью. Показано, что клетки микроглии мыши линии SIM-A9 характеризуются высокой клоногенной активностью: эффективность клонирования контрольных клеток составила $51,5 \pm 2,6\%$.

Оценка выживаемости по количеству живых клеток при скрининговых исследованиях может рассматриваться только как предварительное ориентировочное исследование, в то время как анализ клоногенной активности позволяет оценить радиочувствительность клеток, способных к пролиферации. Полученные данные свидетельствуют о высокой радиочувствительности клеток линии SIM-A9.

Для оценки механизма гибели клеток SIM-A9 и ингибирования их пролиферации при действии γ -облучения исследовали параметры клеточного цикла через 24 ч после воздействия (рис. 2, табл. 2).

Анализ распределения клеток микроглии по фазам клеточного цикла (рис. 2, табл. 2) показал, что в кон-

Таблица 2
Распределение клеток линии SIM-A9 по фазам клеточного цикла в контроле и через 24 ч после облучения в дозе 4 Гр
SIM-A9 cells distribution by cell cycle phases in the control and 24 hours after 4 Gy irradiation

Фаза клеточного цикла	Доля клеток в соответствующей фазе цикла, %	
	Контроль	Облучение
G ₀ /G ₁	$45,3 \pm 3,5$	$72,9 \pm 0,8^*$
S	$42,8 \pm 1,1$	$14,3 \pm 0,6^*$
G ₂ /M	$11,9 \pm 2,5$	$6,5 \pm 1,3$
Апоптоз	$3,5 \pm 0,5$	$11,7 \pm 1,5^*$

Примечание: Приведены средние значения и погрешность среднего.
* – различия между группами статистически значимы, $p < 0,05$

трольной культуре клетки активно пролиферируют – в S-фазе находится 42,8 % клеток. Через 24 ч после γ -облучения клеток SIM-A9 регистрируется блокирование клеточного цикла в фазе G₀/G₁ (доля клеток значительно повышается в 1,7 раза), доля клеток в S-фазе снижается в 3 раза, а в G₂/M – в 1,8 раз. Одновремен-

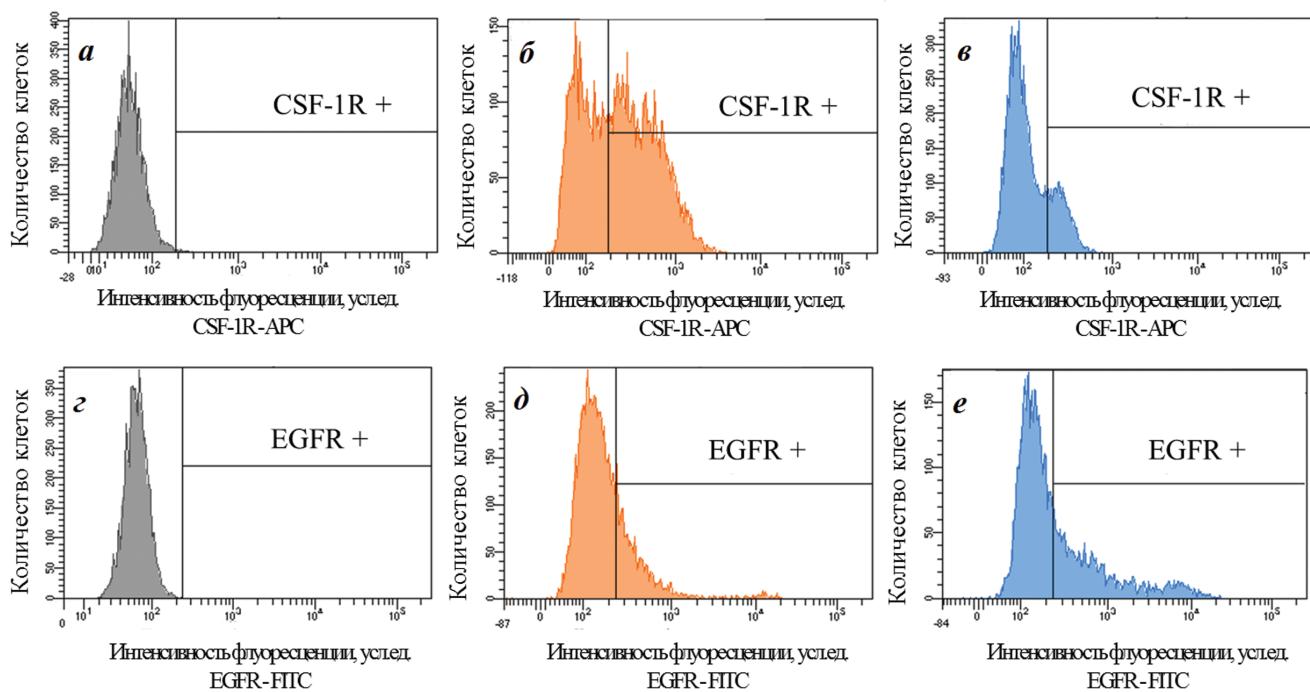


Рис. 3. Типичные гистограммы аутофлуоресценции (а, г) и уровня экспрессии рецепторов КСФ-1 (CSF-1R) (а–в) и ЭГФ (EGFR) (г–е) в контролльных (б, д) и облученных в дозе 4 Гр (в, е) клетках микроглии мыши линии SIM-A9

Fig. 3. Typical histograms of autofluorescence (a, g) and of the expression of receptors CSF-1R (a–b) and EGFR (g–e) in control mouse microglia SIM-A9 cells (b, d) and after irradiation at a dose of 4 Gy (b, e)

но регистрируется повышение доли клеток в состоянии апоптоза в 3,3 раза, которая возрастает с 3,5 % в контроле до 11,7 % после облучения. Блокирование клеточного цикла в фазе G_0/G_1 , снижение доли пролиферирующих и делящихся клеток в S - и $G2/M$ фазах соответственно определяют снижение клоногенной активности клеток линии SIM-A9.

Влияние γ -облучения клеток линии SIM-A9 на фенотип и уровень экспрессии рецепторов, определяющих стимуляцию их пролиферации

Фенотип клеток микроглии характеризуется присутствием маркеров покоящейся $CD11b^+/CD45^{low}$ или активированной $CD11b^+/CD45^{high}$ микроглии, а также молекулы TMEM119 на клетках микроглии обоих типов. Показано, что через 24 ч после облучения в дозе 4 Гр клетки микроглии линии SIM-A9 сохраняют экспрессию этих молекул (табл. 3).

Стимуляция пролиферации клеток микроглии осуществляется при связывании колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1) (КСФ-1) или IL-34 с CSF-1R. Кроме того, стимуляция микроглии возможна при связывании эпидермального фактора роста (ЭФР, EGF) с рецептором этого фактора роста (РеЭФР, EGFR), присутствие которого показано на клетках микроглии мыши линии SIM-A9 ранее [12].

Для оценки влияния облучения на уровень экспрессии CSF-1R и EGFR исследовали их присутствие на поверхности клеток линии SIM-A9 через 24 ч после облучения в дозе 4 Гр. Типичные гистограммы экспрессии CSF-1R и EGFR, полученные при проточной цитометрии, представлены на рис. 3, а относительный уровень их экспрессии – в табл. 3. Представленные результаты свидетельствуют о том, что клетки микроглии линии SIM-A9 через 24 ч после γ -облучения культуры в дозе 4 Гр сохраняют свой фенотип пре-

Таблица 3
Характеристика фенотипа контрольных и облученных в дозе 4 Гр клеток линии SIM-A9 и уровня экспрессии рецепторов факторов роста КСФ-1 и ЭГФ

Characteristics of the phenotype of control and 4 Gy irradiated SIM-A9 cells and the level of expression of growth factor receptors CSF-1 and EGF

Маркер	Контроль	Облучение
	Доля клеток, %	
$CD11b^+/CD45^{high}$	$79,5 \pm 0,9$	$87,4 \pm 3,5$
$CD11b^+/CD45^{low}$	$11,3 \pm 4,6$	$13,6 \pm 5,0$
TMEM119	$100,0 \pm 0,0$	$100,0 \pm 0,0$
Уровень экспрессии рецепторов, усл. ед.		
Рецептор КСФ-1	190 ± 31	116 ± 8
Рецептор ЭГФ	408 ± 64	$619 \pm 41^*$

Примечание: Приведены средние значения и погрешность среднего.
* – различия между группами статистически значимы, $p < 0,05$

мущественно $CD11b^+/CD45^{high}$ клеток, клетки $CD11b^+/CD45^{low}$ составляют не более 19 % и в контролльных, и в облученных культурах. Все клетки сохраняют фенотип TMEM119⁺. Ранее уже было отмечено, что клетки линии SIM-A9 имеют фенотип активированной микроглии, что связано, по-видимому, с их происхождением и активной пролиферацией, а не с провоспалительными свойствами [12].

Отмечено статистически малозначимое снижение уровня экспрессии CSF-1R и значимое увеличение экспрессии EGFR в 1,5 раза по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о том, что через 24 ч после γ -облучения клетки микроглии линии SIM-A9 сохраняют свой фенотип и рецепторы к факторам роста CSF-1 и EGF, и можно ожидать повышения чувствительности облученных клеток микроглии к EGF благодаря увеличению уровня экспрессии рецептора этого фактора.

Исследование уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в клетках микроглии линии SIM-A9 после действия γ -излучения

Хорошо известно, что облучение мозга приводит к активации клеток микроглии, которая сопровождается повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов и повышенной секрецией таких цитокинов этими клетками. Уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α клетками микроглии исследовали через 24 ч после их γ -облучения в дозах 4 и 8 Гр. Полученные результаты представлены на рис. 4.

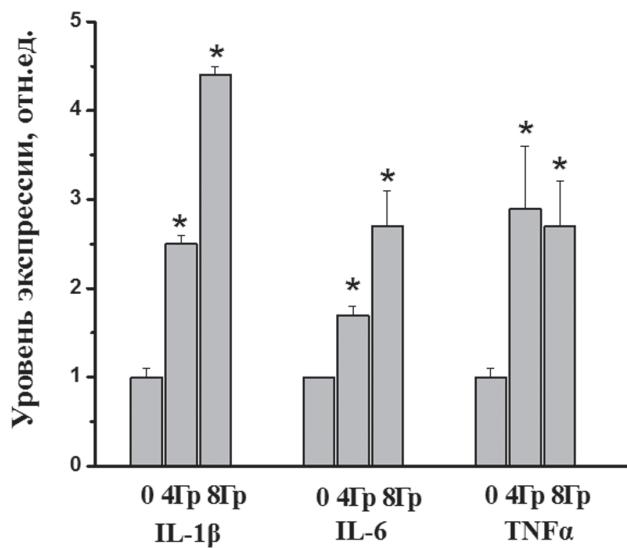


Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α в клетках микроглии линии SIM-A9 через 24 ч после γ -облучения в дозах 4 и 8 Гр.

* – различия между контрольными и облученными клетками статистически значимы, $p<0,05$

Fig. 4. The level of mRNA expression of the proinflammatory cytokine genes IL-1 β , IL-6 and TNF α in microglia cells of the SIM-A9 line 24 hours after γ -irradiation at doses of 4 and 8 Gy.

* – differences between control and irradiated cells are statistically significant, $p<0.05$

Показано, что γ -облучение клеток микроглии сопровождалось повышением экспрессии генов всех изученных провоспалительных цитокинов (рис. 4). Наиболее значительным было повышение уровня экспрессии гена цитокина IL-1 β . Повышение экспрессии генов цитокинов IL-1 β и IL-6 было пропорционально дозе облучения, в то время как уровень экспрессии гена TNF α был одинаков при обеих использованных дозах. Таким образом, облучение культуры клеток микроглии линии SIM-A9 сопровождается активацией экспрессии генов провоспалительных цитокинов, аналогично тому, как это имеет место в головном мозге при облучении головы мышей.

Заключение

Сравнивая ответ культивируемых клеток микроглии линии SIM-A9 с ответом микроглии мозга на общее γ -облучение в дозах 1, 2 и 4 Гр следует отметить, что

количество клеток покоящейся микроглии с фенотипом CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{low}}$ в мозге мышей снижалось при общем облучении пропорционально дозе через 24 и 72 ч после воздействия, а количество клеток активированной микроглии CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{high}}$ возрастало [13]. При локальном γ -облучении головы в дозах 2, 4 и 8 Гр через 72 ч после воздействия также происходило снижение количества клеток микроглии в мозге [14, 15]. Таким образом, и при общем облучении, и при локальном облучении головы в мозге регистрируется снижение количества клеток микроглии уже при умеренных дозах. Это позволяет отнести клетки микроглии мозга к радиочувствительным клеткам, что коррелирует с высокой радиочувствительностью клеток микроглии линии SIM-A9. Хотя, безусловно, культивируемые *in vitro* клетки микроглии линии SIM-A9 являются более радиочувствительными благодаря более высокой скорости пролиферации по сравнению с пролиферацией микроглии мозга.

Особенностью клеток SIM-A9 по сравнению с микроглией головного мозга является отсутствие после облучения перераспределения содержания клеток с фенотипом покоящейся CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{low}}$ и активированной CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{high}}$ микроглии в сторону увеличения последней, как это показано для микроглии после облучения мозга [15]. Можно полагать, что постоянное присутствие маркера CD45 на мембране клеток линии SIM-A9, так же как и присутствие такого маркера активированной микроглии, как белок TSPO 18 кДа [12], определяется целиком происхождением этих клеток из ранних миелоидных клеток-предшественников в период раннего эмбриогенеза и не является маркером их активированного состояния в этом случае.

Хорошо известно, что при облучении головы в мозге регистрируется активация микроглии, сопровождающаяся длительным повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов: сначала в первые сутки, а затем в отдаленный период, когда развивается хроническое нейровоспаление [11]. Аналогичное повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α показано уже через сутки после облучения клеток микроглии линии SIM-A9 (рис. 4), что отражает их активацию в ответ на облучение, несмотря на отсутствие изменений в фенотипе этих клеток (табл. 3).

Таким образом, за исключением стабильности фенотипа CD11b $^{+}$ /CD45 $^{\text{high}}$, ответ клеток микроглии линии SIM-A9 на облучение полностью соответствует ответу клеток микроглии мозга на общее облучение мышей и локальное γ -облучение мозга, что позволяет использовать эту культуру клеток в модельных радиобиологических исследованиях, в том числе при изучении межклеточных взаимодействий клеток мозга разных типов с клетками микроглии.

Благодарность

Авторы выражают глубокую благодарность профессору, д.б.н. Адольфу Адольдовичу Вайнсону за предоставленные программы для обработки результатов зависимости выживаемости и клоногенной активности клеток от дозы облучения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Greene-Schloesser D., Robbins M.E. Radiation-Induced Cognitive Impairment—from Bench to Bedside. *Neuro Oncol.* 2012;14;4:iv37-iv44 doi:10.1093/neuonc/nos196.
2. Askew K., Li K., Olmos-Alonso A., Garcia-Moreno F., Liang Y., Richardson P., Tipton T., Chapman M.A., Riecken K., Beccari S., Sierra A., Molnár Z., Cragg M.S., Garaschuk O., Perry V.H., Gomez-Nicola D. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep.* 2017;18;2:391-405. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.041.
3. Chitu V., Gokhan S., Nandi S., Mehler M.F., Stanley E.R. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci.* 2016;39;6:378-393. doi:10.1016/j.tins.2016.03.005.
4. Liu Q., Huang Y., Duan M., Yang Q., Ren B., Tang F. Microglia as Therapeutic Target for Radiation-Induced Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2022;23;15:82-86. doi:10.3390/ijms23158286.
5. Kreisel T., Wolf B., Keshet E., Licht T. Unique Role for Dentate Gyrus Microglia in Neuroblast Survival and in VEGF-Induced Activation. *Glia.* 2019;67;4:594-618. doi:10.1002/glia.23505.
6. Legroux L., Pittet C.L., Beauseigle D., Deblois G., Prat A., Arbour N. An Optimized Method to Process Mouse CNS to Simultaneously Analyze Neural Cells and Leukocytes by Flow Cytometry. *J Neurosci Methods.* 2015;247:23-31. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.021.
7. Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F. Immortalization of Murine Microglial Cells by a V-Raf/V-Myc Carrying Retrovirus. *J Neuroimmunol.* 1990;27;2-3:229-237. doi:10.1016/0165-5728(90)90073-v.
8. Stansley B., Post J., Hensley K.A Comparative Review of Cell Culture Systems for the Study of Microglial Biology in Alzheimer’s Disease. *J Neuroinflammation.* 2012;9:115. doi:10.1186/1742-2094-9-115.
9. Nagamoto-Combs K., Kulas J., Combs C.K. A Novel Cell Line from Spontaneously Immortalized Murine Microglia. *J Neurosci Methods.* 2014;233:187-198. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.021.
10. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic Assay of Cells in Vitro. *Nat Protoc.* 2006;1;5:2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339.
11. Rodina A.V., Semochkina Y.P., Vysotskaya O.V., Parfenova A.A., Moskaleva E.Y. Radiation-Induced Neuroinflammation Monitoring by the Level of Peripheral Blood Monocytes with High Expression of Translocator Protein. *Int J Radiat Biol.* 2023;99;9:1364-1377. doi:10.1080/09553002.2023.2177765.
12. Шапошникова Д.А., Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В., Комова О.В., Насонова Е.А., Кошлан И.В. Характеристика клеток микроголии линии SIM-A9 – новые данные // Цитология. 2023;T.65. №3. С. 259-272 [Shaposhnikova D.A., Moskaleva Ye.Yu., Somochkina Yu.P., Vysotskaya O.V., Komova O.V., Nasonova Ye.A., Koshlan’ I.V. Characteristics of SIM-A9 Microglial Cells – New Data. *Tsitologiya = Tsitobiologiya.* 2023;65;3:259-272 (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1990519X23050127.
13. Родина А.В., Семочкина Ю.П., Ратушняк М.Г., Шуватова В.Г., Посыпанова Г.А., Москалёва Е.Ю. Анализ ориентировочно-исследовательской активности и уровня микроголии у мышей, подвергшихся воздействию γ -излучения в сублетальных дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т.59. №6. С.575-584 [Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Ratushnyak M.G., Shuvatova V.G., Posypanova G.A., Moskalova Ye.Yu. Analysis of Exploratory Activity and Microglia Levels in Mice Exposed to Sublethal Doses of Γ -Radiation. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology.* 2019;59;6:575-584 (In Russ.)]. doi: 10.1134/S0869803119060092.
14. Родина А.В., Семочкина Ю.П., Ратушняк М.Г., Москалёва Е.Ю. Динамика изменения субпопуляций клеток микроголии после γ -облучения головы мышей // Вестник ВИТ «ЭРА». 2020. Т.1. №1. С.30-33 [Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Ratushnyak M.G., Moskaleva E.Yu. Dynamics of Changes in Microglial Cell Subpopulations after Γ -Irradiation of The Mouse Head. *Vestnik VIT «ERA» = Vestnik VIT “ERA”.* 2020;1;1:30-33 (In Russ.)].
15. Жирник А.С., Смирнова О.Д., Семочкина Ю.П., Шибаева К.Д., Родина А.В., Ратушняк М.Г., Москалёва Е.Ю. Нарушение когнитивных функций и развитие нейровоспаления в отдаленный период после однократного γ -облучения головы мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2021. Т.61. №1. С.32–43 [Zhirnik A.S., Smirnova O.D., Somochkina Yu.P., Shibayeva K.D., Rodina A.V., Ratushnyak M.G., Moskaleva Ye.Yu. Impairment Of Cognitive Functions and the Development of Neuroinflammation in the Late Period after a Single Γ -Irradiation of the Head of Mice. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology.* 2021;61;1:32–43 (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0869803121010112.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.07.2024. Принята к публикации: 25.09.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out as part of the fulfillment of the state task of the Kurchatov Institute Research Center.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.07.2024. Accepted for publication: 25.09.2024.