

Виноградова Юлия Вячеславовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ПРОЦЕССОВ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА МЫШЕЙ ПОСЛЕ
ОБЛУЧЕНИЯ УСКОРЕННЫМИ ПРОТОНАМИ И ДЕЙСТВИЯ
МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.01.01 – радиобиология

Научный руководитель:
доктор биологических наук
В.А. Тронов

Дубна – 2015

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии
Объединенного института ядерных исследований, г. Дубна

Научный руководитель:

Тронов Виктор Александрович

доктор биологических наук, старший научный сотрудник название лаборатории
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,
Объединенный институт ядерных исследований

Официальные оппоненты:

Григорян Элеонора Норайровна,

доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий
лабораторией проблем регенерации,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Муранов Константин Олегович,

доктор биологических наук,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки государственный научный центр российской федерации Институт
медико-биологических проблем РАН

Защита диссертации состоится «__» _____ 2015 года в ____ часов на
заседании диссертационного совета Д 501.001.65 Биологического факультета
Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу:
119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.73, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского
Государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Веселова Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Исследование патогенеза дегенеративных заболеваний сетчатки глаза является ключевой и до сих пор нерешенной проблемой современной экспериментальной и клинической офтальмологии. Значительный вклад в возникновение и развитие этих патологий вносят генотоксические факторы внешней среды – радиация и химические вещества. Изучение механизмов действия этих факторов на сетчатку глаза принципиально важно для оценки рисков постлучевых осложнений, возникающих при лучевой терапии глаза и мозга и, как правило, в сочетании с химиотерапией. Пострадиационная ретинопатия и когнитивные расстройства часто являются нежелательными побочными эффектами при радиотерапии, поскольку локальные дозы на органы головы человека могут быть весьма значительными. Так, при радиотерапии опухолей носоглотки и глаза суммарная доза облучения может превышать 50 Гр, а при протонной терапии меланомы глаза кумулятивная доза фракционированного облучения составляет 54-75 Гр.

Радиационный фактор также представляет вполне реальную опасность для сетчатки глаз космонавтов при осуществлении длительных космических полётов. В последнем случае речь идёт о повреждающем действии тяжёлых заряженных частиц Галактического космического излучения при длительных полетах вне магнитосферы Земли. При этом клинически значимые повреждения могут возникать не непосредственно после воздействия, а спустя месяцы и даже годы, что важно для разработки средств профилактической терапии, базирующейся на способности сетчатки к восстановлению.

Цитотоксическая химиотерапия также вызывает офтальмологические осложнения в виде обратимых и необратимых острых и хронических глазных заболеваний. Базовым компонентом стандартных протоколов химиотерапии, в том числе меланомы, являются метилнитрозомочевина (МНМ) и ее производные. Метилнитрозомочевина – монофункциональный метилирующий агент, вызывающий повреждение ядерной ДНК в клетках млекопитающих. В середине 90-х годов в литературе появились сообщения о цитотоксическом действии супермутагена МНМ на клетки сетчатки глаза лабораторных животных (Yuge et al, 1996). Особенностью действия МНМ является ее высокая избирательная цитотоксичность по отношению только к фоторецепторным клеткам сетчатки (Tsubura et al, 2011), что делает МНМ удобным инструментом для изучения дегенерации сетчатки и оценки эффективности веществ и процедур, препятствующих ее развитию.

Основу зрелой сетчатки глаза млекопитающих составляют терминально дифференцированные клетки, утративших свой регенеративный потенциал. Для них апоптоз представляется губительным, угрожающим существованию органа и организма в целом. Вместе с тем в эмбриогенезе глаза апоптоз играет важную роль. По мере дифференцировки клеточных элементов сетчатки частота апоптоза снижается (Walsh, 1997). Таким образом, зрелая сетчатка приобретает высокую устойчивость к генотоксическому стрессу и связанному с ним апоптозу. Ранее разными авторами была показана резистентность сетчатки по отношению как к ионизирующему излучению (Gorgels et al., 2007, Тронов и соавт., 2008, Amoaku W.M. et al., 1992), так и к действию алкилирующих агентов (Jenkins et al., 2005). Также было показано, что дозы, вызывающие детектируемые морфологические изменения сетчатки глаза, превышают летальные дозы для исследуемого животного при общем облучении (Gorgels et al., 2007; Williams and Lett, 1996; Keng and Lett, 1981).

Наследственная или вызванная внешним воздействием дегенерация сетчатки начинается с гибели фоторецепторных клеток, вслед за которой разрушается система трофической поддержки, приводящая к гибели нейронов сетчатки глаза (Marc et al, 2003). Хотя доминирующей формой гибели фоторецепторных клеток сетчатки глаза признается апоптоз (Ху, 1996; Marigo, 2007), тем не менее связь повреждения ДНК с гибелью постмитотических клеток, формирующих сетчатку глаза, в настоящее время не исследована. Показано, что в постмитотических клетках активной сохраняется репарация ДНК, ассоциированная с транскрипцией активных генов, она из разновидностей экспизионной репарации нуклеотидов (NER) (Noussipikel, Hanawalt, 2002; Simonatto et al, 2007).

Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы заключалась в оценке повреждающего действия протонов высоких энергий и метилнитрозомочевины на структуру ДНК в сетчатке, на функциональную активность сетчатки глаза мышей и оценка способности сетчатки к восстановлению после воздействия этих генотоксических агентов.

На пути ее выполнения решались следующие задачи:

1. Исследовались морфологические изменения сетчатки глаза мышей после действия ускоренных протонов с энергией 150 МэВ и γ -излучения ^{60}Co (дозы 14 Гр и 25 Гр) и метилнитрозомочевины (дозы 35 и 70 мг/кг). Данные дозы различаются по их цитотоксичному воздействию на сетчатку.

2. Исследовалось повреждение генома клеток зрелой сетчатки глаза и активность репарационной системы после действия ускоренных протонов, γ -излучения и метилнитрозомочевины.

3. Оценивалось изменение функциональной активности сетчатки глаза в ответ на воздействие протонами высоких энергий и метилнитрозомочевинной.

4. Оценивалось адаптирующее действие на сетчатку глаза ускоренных протонов и метилнитрозомочевины в относительно низких дозах и способность сетчатки глаза мышей к восстановлению.

5. Исследовалась роль глиальных клеток Мюллера в повреждении и восстановлении сетчатки глаза мышей после воздействия протонами и метилнитрозомочевинной.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ответ зрелой сетчатки глаза на облучение протонами и инъекцию метилнитрозомочевины свидетельствует о наличии у нее генотоксического порога и способности к структурному и функциональному восстановлению.

2. Обнаружен адаптивный ответ сетчатки глаза на фракционированное введение метилнитрозомочевины, а также на комбинированное воздействие протонами и введение МНМ.

3. Обнаружено возможное участие глиальных клеток Мюллера в восстановлении от генотоксического стресса.

Научная новизна

В работе впервые:

1. Исследована динамика формирования разрывов ДНК и их последующая репарация *in vivo* в сетчатке глаза мышей, облученных протонами высоких энергий и γ -квантами ^{60}Co . Показано, что в ответ на возникшие повреждения ДНК после облучения возрастает экспрессия генострессовых белков АТМ и р53 в сетчатке глаза, которые стимулируют репарацию ДНК и не вызывают апоптоза поврежденных клеток.

2. Показана нелинейная зависимость ответа сетчатки глаза мышей на воздействия, что говорит о наличии у сетчатки глаза генотоксического порога. Этот порог эквивалентен дозе облучения ускоренными протонами ~ 15 Гр, ниже которого происходит восстановление поврежденного генома, а также структурной целостности и функциональной активности сетчатки глаза мышей. При воздействии облучения ускоренными протонами в дозе выше пороговой, 25 Гр или после введения МНМ в дозе 70 мг/кг в сетчатке наблюдались структурная деградация и необратимое снижение/утрата функциональной активности.

3. Показано, что предварительное введение мышам метилнитрозомочевины в нетоксической дозе повышает толерантность сетчатки глаза к последующему действию агента в ретинотоксической дозе. Такое фракционированное воздействие

МНМ снижает экспрессию эффекторной апоптотической каспазы-3 и гибель фоторецепторных клеток по сравнению с однократным воздействием МНМ в ретинотоксической дозе.

4. Показано, что предварительное облучение ускоренными протонами в дозе 1 Гр вызывает адаптирующий эффект зрелой сетчатки глаза: она приобретает устойчивость к последующему ретинотоксическому действию МНМ. Эффект радиационного гормезиса сетчатки согласуется с возрастанием эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК.

5. Обнаружена активация глиальных клеток Мюллера (ГКМ) в сетчатке глаза в ответ на инъекцию мышам метилнитрозомочевины в дозе 70 мг/кг. Отмечается тенденция к снижению числа активированных ГКМ в сетчатке глаза после последовательного введения МНМ в дозе 17 и 70 мг/кг.

6. Показано наличие в сетчатке глаза спонтанных повреждений ДНК в виде щелочеллабильных сайтов, которые являются окси-модифицированными основаниями ДНК.

Научно-практическая значимость работы

Результаты проведенного исследования имеют теоретическое и практическое значение для решения фундаментальной проблемы повреждения и восстановления терминально дифференцированных клеток и, состоящих из них, тканей (в данном случае сетчатки глаза).

Результаты по восстановлению и гормезису сетчатки глаза могут быть использованы для оптимизации радио- и химиотерапии опухолей головы, мозга, шеи и глаз (подбор дозы фракционированного воздействия, длительности интервалов между фракциями).

Модель МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки глаза может использоваться для первичной оценки эффективности лекарственных средств, препятствующих дегенерации сетчатки, и для прогноза опасности ретинотоксического воздействия на человека радио- и химиотерапевтических процедур. Полученные данные также могут послужить прогностическим показателем влияния условий космоса на человека при осуществлении длительных пилотируемых космических полетов.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 10 конференциях: XVI, XVII, XVIII и XIX научные конференции молодых ученых и специалистов (2012, 2013 и 2014 гг., Дубна); 16-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ –

НАУКА XXI ВЕКА» (2012 г, Пущино); I и II Школа-конференция для молодых ученых и специалистов (2012, 2013, 2015 гг., Алушта); 36-я сессия программно-консультативного комитета ОИЯИ по физике конденсированных сред (2012 г., Дубна); Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '13» (2013 г., Пущино); 40th meeting of the PAC for Condensed Matter Physics (2014, Dubna); VII Съезд по радиационным исследованиям (2014 г., Москва); Круглый стол «Актуальные проблемы общей и космической радиобиологии и астробиологии» (2014 г., Дубна).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 94 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов и заключения, содержит 6 таблиц и 32 рисунка. Список литературы включает 95 наименования, из которых 8 — на русском и 87 — на английском языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах было использовано около 200 половозрелых мышей-гибридов СВАхС57В1, F1 (♀) возрасте 2,5 мес., с массой тела 24-28 г. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях при температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха $60\pm 10\%$ и 12-часовом световом периоде. Доступ к воде и гранулированному корму был свободным.

Мышей облучали на установках Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна):

1. Общее облучение γ -квантами ^{60}Co проводили на аппарате для дистанционной лучевой терапии «Рокус-М» в Медико-техническом комплексе ОИЯИ. Поглощенная доза составила 14 Гр, мощность дозы — 0,64 Гр/мин.

2. Тотальное и локальное облучение мышей ускоренными протонами проводили на протонном терапевтическом пучке фазотрона. Энергия частиц в пучке составляла 150 МэВ/нуклон, ЛПЭ — 0,49 кэВ/мкм. Животных облучали в дозах 1, 14 и 25 Гр с мощностью дозы — 1 Гр/мин. При локальном действии протонов была облучена только область головы мышей. При облучении использовали специально сконструированные штативы, ограничивающие подвижность животных.

Свежеприготовленный стерильный раствор метилнитрозомочевины в PBS вводили мышам внутрибрюшинно в дозах по 17, 35 и 70 мг/кг. Контрольным животным вводили соответственно равный объем PBS (до 0,7 мл).

После процедуры облучения и введения МНМ мышей умерщвляли в парах хлороформа и извлекали глаза. Из одного глаза выделяли сетчатку, из которой получали клеточную суспензию, а второй глаз фиксировали в растворе Буэна для получения гистологических препаратов: стандартная проводка через спирты восходящей крепости и ксилол, последующая обработка смесью спирт-ксилол (соотношения 1:1 и 1/4:3/4) и заливка в парафин. Поперечные срезы толщиной 5 мкм на предметном стекле окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали с помощью светового микроскопа (Carl Zeiss, Jena 410960).

Вестерн-анализ белков p53 и ATM

После центрифугирования суспензии клеток сетчатки в PBS, осадок ресуспендировали в 100-150 мкл лизирующего буфера следующего состава: 0,093 М Трис-HCl pH 6.8, глицерин (23,2%), Na-додецилсульфат (2,3%), β-меркаптоэтанол (23%), Protease Inhibitor Cocktail в разведении 1:50 (Sigma). Лизаты выдерживали в кипящей водяной бане в течение 5 мин, центрифугировали и замораживали при -20 °С. Для анализа P53 аликвоты лизатов, содержащие 80 мкг белка, подвергали электрофорезу в 12,5% ПААГ при 100 В в течение 4,5 ч в камере для вертикального электрофореза. Блот-перенос осуществляли на блоттере (Helicon Semi-Dry Transfer) в буфере (25 mM Трис, 250 mM глицин и 20% метанол) в течение 60 минут. Мембрану блокировали раствором 1% БСА в PBS-t. Мембрану инкубировали в течение ночи на холоду с первичным антителом (разведение 1:2000) и после 3-кратной промывки в PBS-t инкубировали с конъюгатом вторичного антитела с пероксидазой хрена в разведении 1:400. Зону белка детектировали с помощью системы ECL (Amersham Biosciences) и рентгеновской пленки Retina. Для анализа ATM электрофорез проводили в 10% ПААГ при 60 В в течение 10 ч. Последующие операции были такими же, как и для P53. Все используемые антитела получены от фирмы Abcam.

TUNEL-детекция гибели клеток

На микроскопических срезах сетчатки глаза на предметном стекле использовали методику TUNEL для регистрации гибели клеток в соответствии с прилагаемой инструкцией к стандартному набору TUNEL (Trevigen,

http://www.trevigen.com/item/3/13/118/508/TACS_2_TdT_Fluorescein_Kit/).

Визуализацию микроскопических изображений на срезах проводили на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для регистрации флуоресценции флуоресцеинизотиоцианата (FITC).

Иммуноцитохимическое определение экспрессии белков

Клетки иммобилизовали в низкоплавкой агарозе (0,7% в PBS) в виде тонкого слайда на поверхности предметного стекла. Клетки фиксировали, инкубируя слайды

20 мин в 3% формальдегиде в PBS на холоду. Затем слайды пермеабилizовали в 0,2% тритон X-100 в PBS (20 мин в холодильнике). Слайды, предназначенные для определения уровня FasR, этой процедуре не подвергали. После каждой процедуры слайды трижды отмывали в PBS. Последнюю отмывку от первичного антитела проводили в PBS, содержащем 2% эмбриональной сыворотки. На слайд наносили раствор первичного антитела в PBS (30 мкл, 1-2 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. Затем стекло удаляли, а слайд отмывали трижды холодным PBS. После удаления излишков влаги с поверхности слайда на него наносили 30 мкл буферного раствора PBS, содержащего конъюгат вторичных антител с FITC (1 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте. После удаления покровного стекла слайды отмывали в PBS, дегидратировали в метаноле, высушивали и окрашивали йодистым пропидием (1 мкг/мл). Микроскопирование клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа с набором фильтров для FITC. При последующем анализе определяли долю FITC-позитивных клеток на каждом слайде. Показателем уровня экспрессии каждого белка служило произведение среднего значения флуоресценции одной клетки на долю FITC-позитивных клеток.

Визуализация глиальных клеток Мюллера в срезах сетчатки глаза

Процедуру промечивания клеток Мюллера *in vivo* с помощью пролиферативного маркера BrUdR проводили в течение 48 ч дважды в день (утром и вечером). Животным вводили внутрибрюшинно стерильный раствор маркера, растворенного в PBS (по 50 мг/кг, в объеме <0,7 мл). После выделения сетчатки и приготовления микросрезов клетки, аккумуляировавшие маркер, проявлялись анти-BrUdR антителами, сконъюгированными с FITC, по флуоресценции, которого микроскопически визуализировали глиальные клетки Мюллера (Wohl S.G. et al, 2011). С помощью программы ImageJ подсчитывали число фокусов на единицу площади среза или оценивали интенсивность флуоресценции на единичную площадь среза.

Регистрация электроретинограммы

Перед регистрацией электроретинограммы мышей адаптировали к темноте (не менее 12 ч) и лишали корма на 24 ч. При слабом освещении мышей анестезировали внутримышечной инъекцией смеси золитил – ксилазин 1:1 в дозе 0,2 мл на 100 г веса животного. Для расширения зрачка в глаз закапывали 0,5% раствор мидриацила. Электрод опускали на глазное яблоко, как контактную линзу; игольчатые электроды сравнения и заземления вводили под кожу около ушных раковин. ЭРГ записывали с помощью электрофизиологической системы «Нейрософт» при использовании

программы Нейро-МВП.NET. Стимуляцию ответа сетчатки осуществляли с помощью вспышек белого цвета мини-ганцфельд-стимулятора (миниатюрный широкопольный фотостимулятор) длительностью 5 мс, логарифм интенсивности варьировал от -3 до $-0,5$. ЭРГ характеризовали амплитудой, равной сумме a - и b -волн. Результат представлялся в виде среднего значения из трех последовательно снятых ЭРГ при значениях логарифма интенсивности вспышек $-1,5$, -1 и $-0,5$ с интервалом между ними 3 мин. В таком режиме регистрации электроретинограммы при увеличении интенсивности вспышки амплитуда ЭРГ выходит на плато, что позволяет корректно проводить сравнение по этому параметру.

Метод ДНК-комет

Оценку повреждений и репарации ДНК сетчатки глаза проводили с помощью метода ДНК-комет, который включал в себя следующие процедуры: клетки сетчатки иммобилизовали в геле из низкоплавкой агарозы на поверхности предметного стекла. Гель-слайды помещали в лизирующий раствор на 12 ч при 4°C . После лизиса иммобилизованных в агарозу единичных клеток, слайды подвергались электрофорезу: при этом фрагментированная ДНК выходит из ядра клетки и образует характерный «хвост» кометы. При проведении электрофореза при нейтральном значении pH (pH 8,2; 0.5В/см, 15 мА, 40 мин.) определяются преимущественно двунитевые разрывы (Ostling et al., 1984). Для исследования фрагментации ДНК, обусловленной не только двунитевыми, но и одностранными разрывами, а также щелочеллабильными сайтами использовали щелочной вариант метода (Collins et al, 2008) – электрофорез при pH > 13 (pH 13,5; 0.7 В/см, 170 мА, 21 мин.). После электрофореза в щелочном буфере гель-слайды погружали на 10 мин. в нейтрализующий раствор (0,4 М Трис, pH 7,4); после электрофореза в нейтральных условиях слайд помещали в 0,3 М NaOH на 5 минут, а затем в Трис, pH 7,4 – для нейтрализации и ренатурации ДНК. Далее слайды высушивали на воздухе и фиксировали в метаноле в течение 30 минут. Перед проведением анализа ДНК их окрашивали пропидиум йодидом. Количество разрывов ДНК считалось прямо пропорциональным длине хвоста кометы и содержанию ДНК в нем. Для анализа ДНК-комет использовали программу CASP. В качестве параметра поврежденности ДНК использовали момент хвоста кометы (Olive Tail Moment).

При статистическом анализе полученных результатов в качестве параметра использовалось среднее значение эмпирического распределения. Значимость различий между сравниваемыми средними величинами определяли с помощью t - критерия Стьюдента. Эмпирические распределения сравнивали между собой с помощью непараметрической статистики Колмогорова-Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тотальное облучение животных в дозе 14 Гр не приводило к существенным дегенеративным изменениям сетчатки глаза мышей в течение трех суток после облучения протонами высоких энергий и γ -квантами ^{60}Co . Исследование влияния облучения в дозе 14 Гр на физиологическую активность сетчатки глаза мышей также не показало существенных изменений электроретинограммы у облученных животных по сравнению с контролем. В то же время, при облучении в дозе 14 Гр в сетчатке формируются радиационные разрывы, которые успешно репарируются. По ходу развития репарационных процессов изменяется и экспрессия генострессовых белков. Из полученных данных следует, что белки p53 и ATM при относительно низких дозах облучения стимулируют репарацию, но не апоптоз. Вследствие этого сохраняется возможность для сетчатки глаза мышей восстанавливать свою структуру и функцию.

При увеличении дозы ускоренных протонов до 25 Гр при локальном облучении животных в сетчатке глаза мышей наблюдались разупорядочивание и деструкция сегментов фоторецепторных клеток, снижение плотности упаковки ядерного слоя и уменьшение его толщины. TUNEL-оценка гибели клеток сетчатки через 3-5 дней после локального облучения головы мышей ускоренными протонами в дозе 25 Гр показала, что уменьшение общего содержания клеток в фоторецепторном слое сетчатки (рис. 1 а) сопровождается их массовой гибелью (рис. 1 б). Наличие фрагментированных ядер в фоторецепторных клетках сетчатки глаза мышей указывает на механизм апоптоза гибели клеток.

Исследование динамики изменения физиологической активности сетчатки глаза мышей после локального облучения головы мышей протонами в дозе 25 Гр показало (рис. 2), что облучение вызывает нарастающее во времени снижение амплитуды ЭРГ.

Спустя 24 ч после облучения протонами наблюдалась повышенная экспрессия проапоптотических белков FasR и каспазы 3, p53, что также свидетельствует в пользу апоптоза как механизма гибели фоторецепторных клеток вследствие облучения протонами в дозе 25 Гр.

Высокая устойчивость сетчатки глаза мышей и активная репарация повреждений ДНК отражаются в зависимости цитотоксической реакции сетчатки глаза от дозы протонного облучения, приводя к характерной S-образной кривой (рис. 3) и гипотезе генотоксического порога (Calabrese, Baldwin, 2003; Тронов и соавт., 2012).

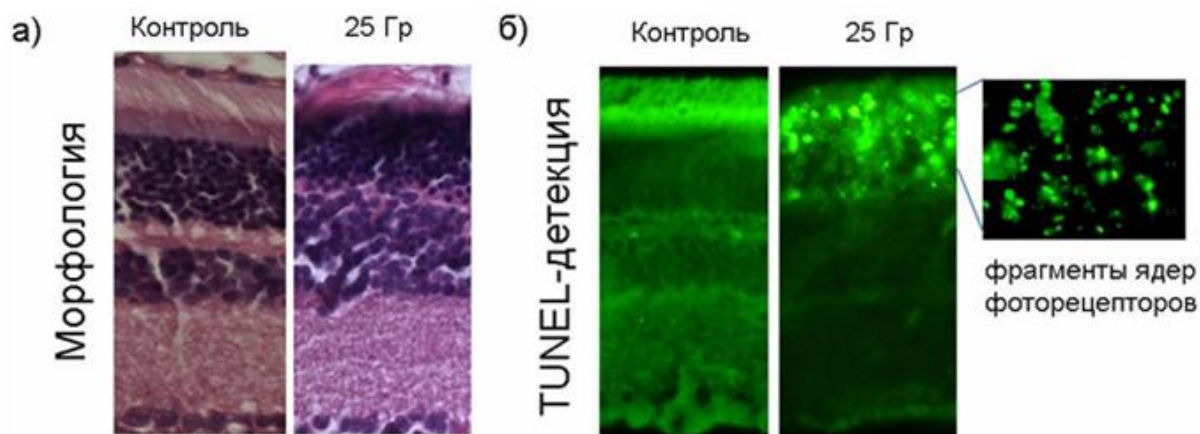


Рис. 1. Микрофотографии срезов сетчатки глаза через 3-5 дней после локального облучения головы мышей ускоренными протонами в дозе 25 Гр:

а) морфологические изменения в сетчатке глаза мышей; б) микрофотографии TUNEL-флуоресценции срезов сетчатки глаза: справа показана фрагментация ядер фоторецепторных клеток.

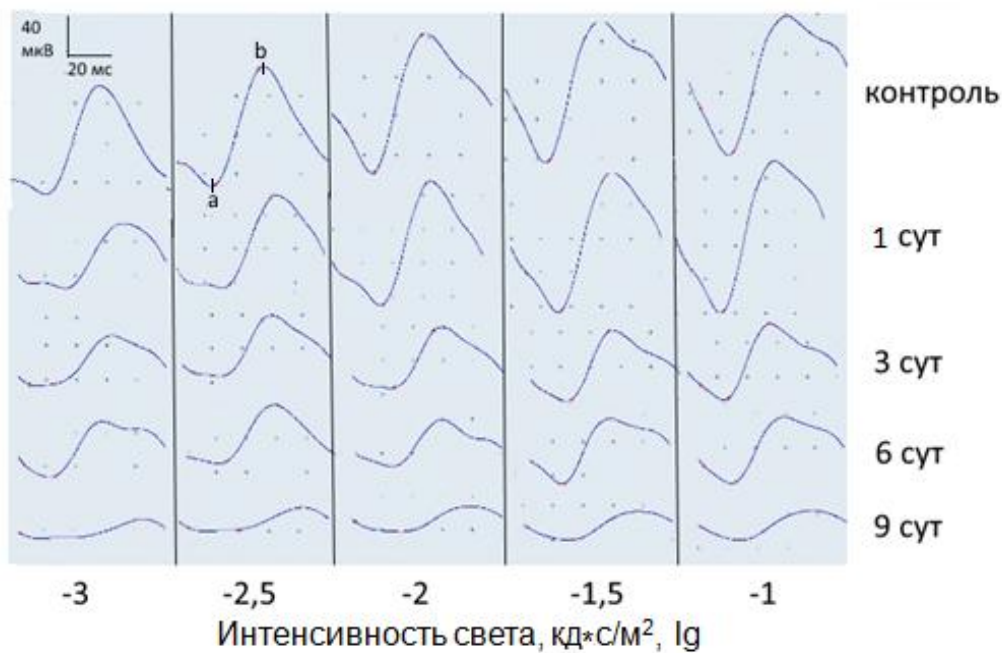


Рис. 2. Изменение профиля электроретинограммы сетчатки глаза в разные сроки после облучения головы мышей протонами в дозе 25 Гр

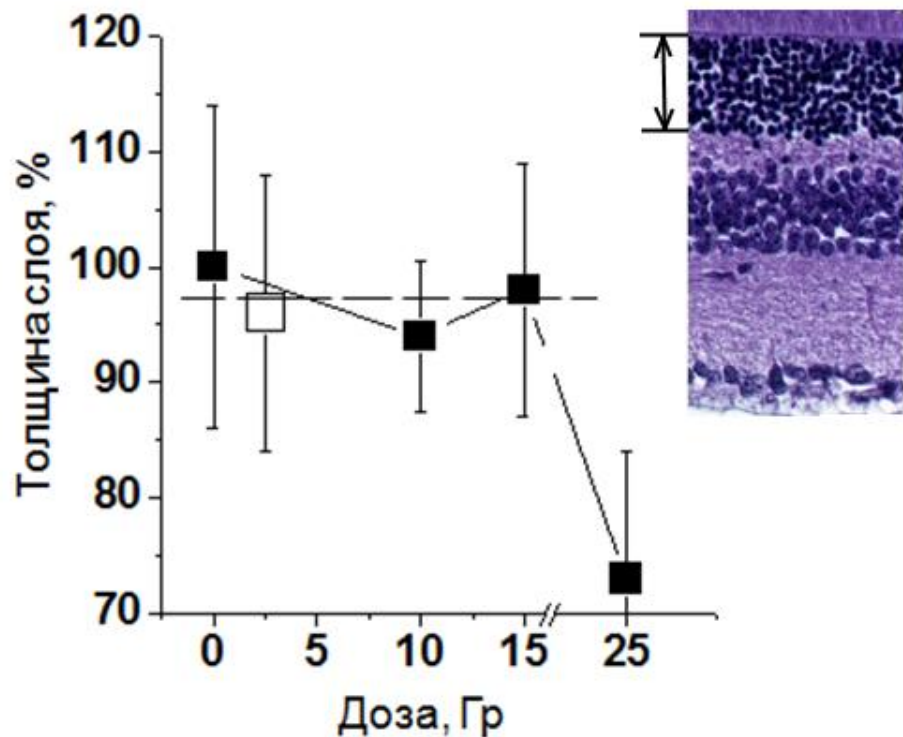


Рис. 3. Изменение толщины ядерного слоя фоторецепторных клеток (% от общей толщины) сетчатки глаза мышей в зависимости от дозы облучения головы мышей ускоренными протонами: черные квадраты – через 3 суток, белые – через 30 суток.

В рамках этого представления находятся результаты действия другого генотоксического агента – метилнитрозомочевины. Химический агент МНМ в дозе 70 мг/кг вызывает необратимую структурную дегенерацию сетчатки глаза мышей (деструкцию сегментов, фрагментацию ядер и гибель фоторецепторных клеток с параллельной гиперэкспрессией проапоптотических белков p53, PARP, FasR и caspase-3). В итоге наблюдается необратимое снижение и утрата функциональной активности сетчатки глаза (рис. 4): спустя несколько суток наблюдалось отсутствие зрительной реакции у животных. Доза агента 35 мг/кг, не выходит за пределы генотоксического порога и вызывает обратимое снижение амплитуды электроретинограммы. При этой дозе не наблюдаются и деструктивные изменения в сетчатке глаза.

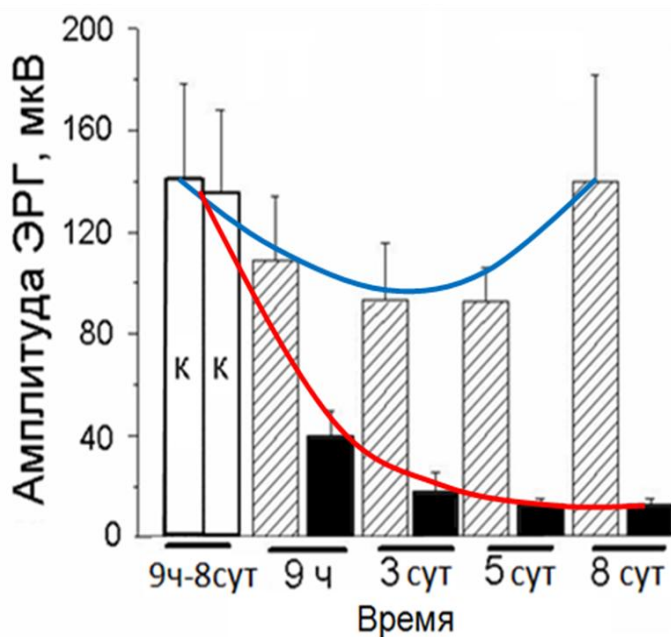


Рис. 4. Амплитуда электроретинограммы у мышей в разные сроки после однократного введения метилнитрозомочевины в дозах 35 мг/кг (серые столбики) и 70 мг/кг (черные столбики)

Таким образом, особенностью реакции сетчатки глаза мышей на генотоксический стресс, вызванный как облучением, так и метилирующим агентом метилнитрозомочевинной, является высокий генотоксический порог для этих видов воздействия. Следует отметить, что у пролиферирующих клеток генотоксический порог связывают с активной системой репарации ДНК (Jenkins et al, 2005). В связи с этим, важной характеристикой репарационной системы является уровень спонтанных повреждений ДНК в клетках и способность клеток репарировать индуцированные повреждения ДНК. Спонтанные повреждения характеризуют не только репарационную систему клеток саму по себе, но и агрессивность окружающей среды, воздействующей на клетки.

Высокий генотоксический порог предполагает наличие возможности восстановления сетчатки глаза от генотоксического стресса. Для проверки этого предположения мы исследовали способность к восстановлению от повреждения ДНК у клеток зрелой сетчатки глаза мышей. Тактика эксперимента основана на фракционированном воздействии агента. В токсикологии она используется для характеристики адаптации организма к воздействию токсического агента. Предполагается, что первое, нетоксическое воздействие в низкой дозе создает «защитный фон» в ткани, так что последующее воздействие агента в высокой концентрации становится менее токсичным. В литературе этот эффект называется «адаптивным ответом», или «гормезисом» (Luckey, 2006). Нейрогормезис был описан (Anderson et al., 2005; Otani et al., 2012) при действии гамма-излучения на глаза экспериментальных животных. В ряде исследований при использовании модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки был продемонстрирован ретинопротекторный эффект других соединений: липида, выделенного из семян

древесного гриба *Ganoderma lucidum* (Gao et al., 2010); инактивированного мутацией фактора роста фибробластов крыс (Xu et al., 2008); никотинамида (Kiuchi et al., 2003).

Для исследования адаптивного ответа сетчатки были проведены две серии экспериментов. В одной серии в качестве адаптирующего воздействия использовали низкую дозу метилнитрозомочевины (химический гормезис). Мышам последовательно вводили метилнитрозомочевину в нетоксической дозе 17 мг/кг, а через 4 ч — в токсической дозе 70 мг/кг (рис. 5).

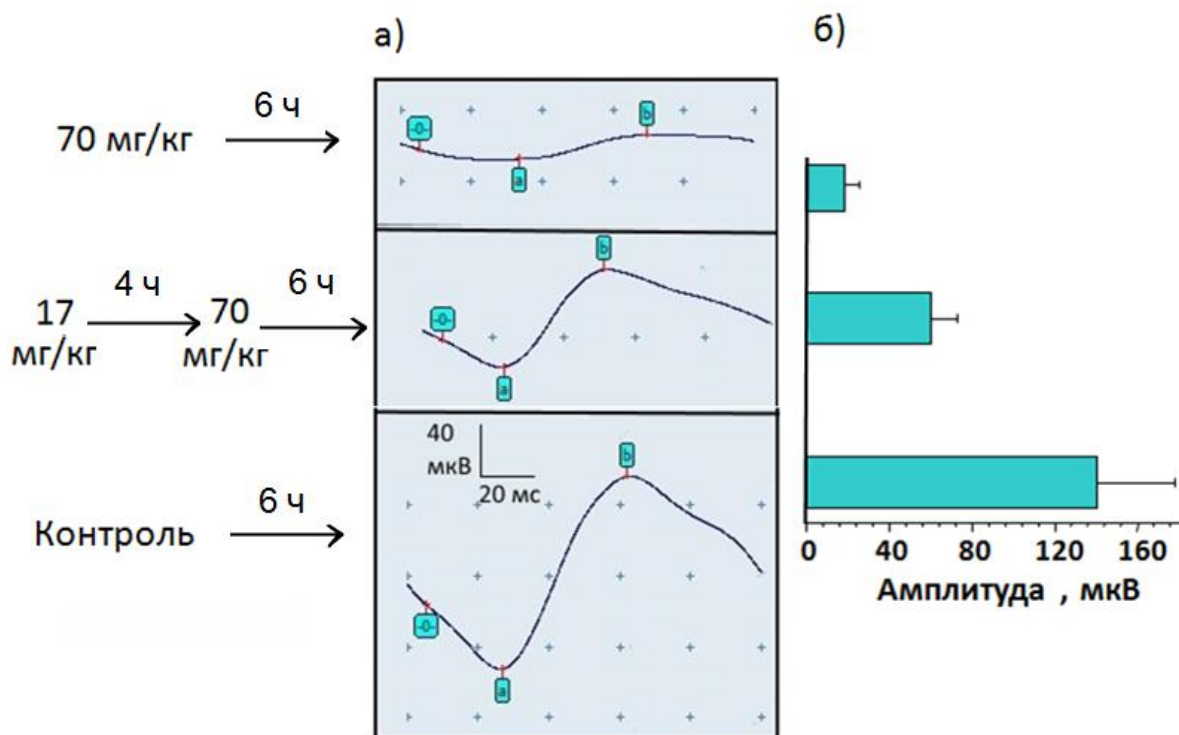


Рис. 5. Функциональная активность сетчатки глаза мышей после однократной инъекции метилнитрозомочевины в дозе 70 мг/кг и фракционированной инъекции МНМ (17+70 мг/кг) по сравнению с контролем: а) профили и б) амплитуда электроретинограммы

В другой серии экспериментов в качестве адаптирующего воздействия использовали облучение головы животных ускоренными протонами в дозе 1 Гр (радиационный гормезис). В качестве повреждающего воздействия, как и в первой серии, была применена инъекция МНМ в ретинотоксической дозе 70 мг/кг.

Адаптивная реакция сетчатки глаза на фракционированное введение метилнитрозомочевины (последовательно 17 и 70 мг/кг) представлена в виде профилей ЭРГ (рис. 5 а) и гистограммы амплитуд ЭРГ (рис. 5 б). Видно, что через 6 ч после воздействия метилнитрозомочевины в дозе 70 мг/кг профиль ЭРГ восстанавливается. Хотя амплитуда ЭРГ оказалась ниже, чем в контроле, тем не

менее, она достоверно выше амплитуды ЭРГ после единичной инъекции МНМ — 70 мг/кг.

Одновременно с помощью иммуноцитохимии прослеживалась экспрессия терминальной апоптотической каспазы-3 в клетках сетчатки глаза мышей в ответ на фракционированное введение метилнитрозомочевины (рис. 6). После однократного введения МНМ в дозе 70 мг/кг резко увеличилось содержание каспазы-3 в клетках мышей, а после фракционированного воздействия — значительно упало (рис. 6), что говорит о снижении частоты гибели клеток сетчатки в ответ на дозу 17+70 мг/кг по сравнению дозой только 70 мг/кг.

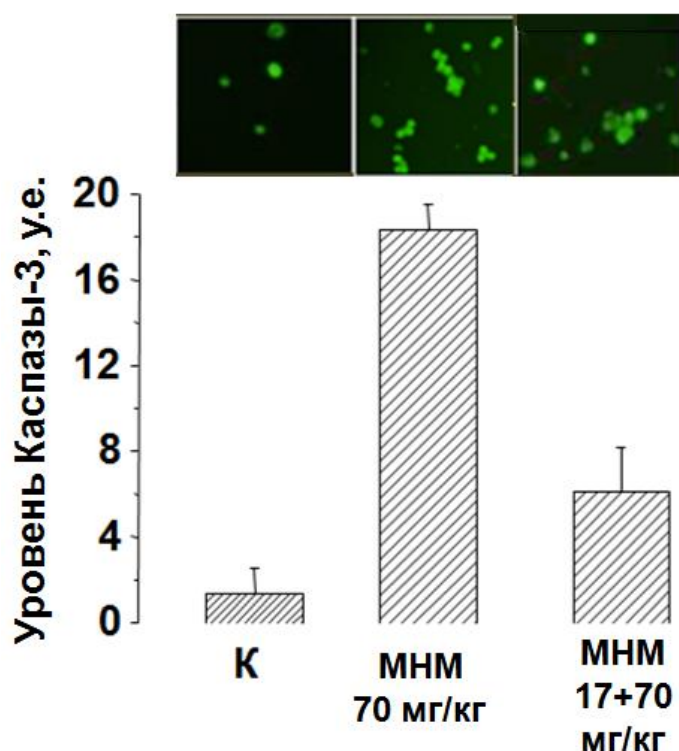


Рис. 6. Уровень увеличения экспрессии каспазы-3 в сетчатке глаза мышей в контроле, в ответ на фракционированное (17 и 70 мг/кг) и цитотоксическое (70 мг/кг) действие метилнитрозомочевины

В экспериментах по адаптивной реакции сетчатки глаза на облучении ускоренными протонами все процедуры по изъятию глаз у мышей и последующему приготовлению препаратов проводились спустя 48 ч после облучения. На микрофотографиях (рис. 7) видно, что инъекция МНМ в дозе 70 мг/кг приводит к массовой гибели фоторецепторных клеток. На это указывает локализация TUNEL-фокусов только в наружном ядерном слое сетчатки глаза (вставки фото на рис. 7). Предварительное облучение ускоренными протонами головы мышей в дозе 1 Гр

делает сетчатку глаза мышей более толерантной к цитотоксическому действию метилнитрозомочевины.

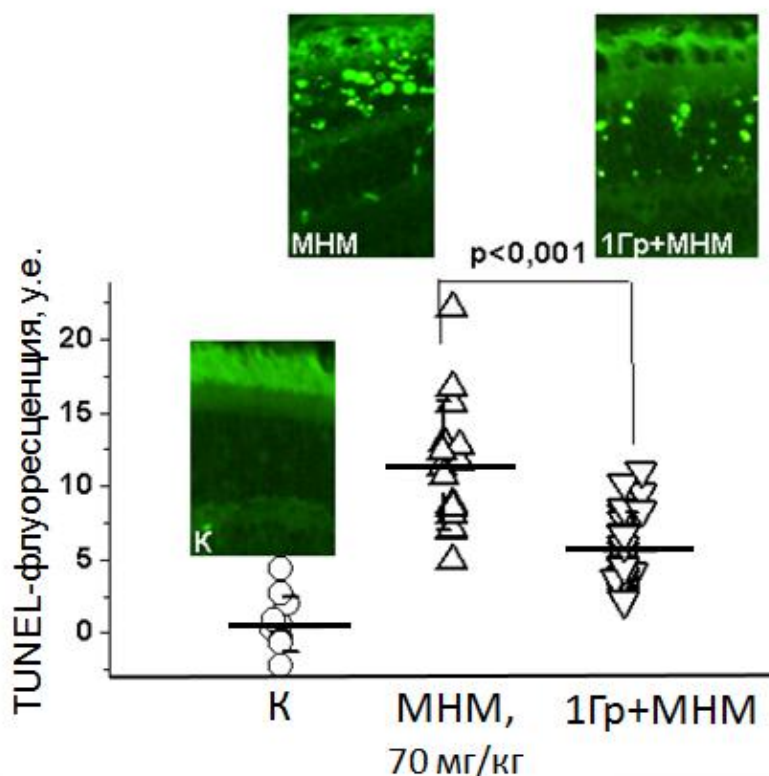
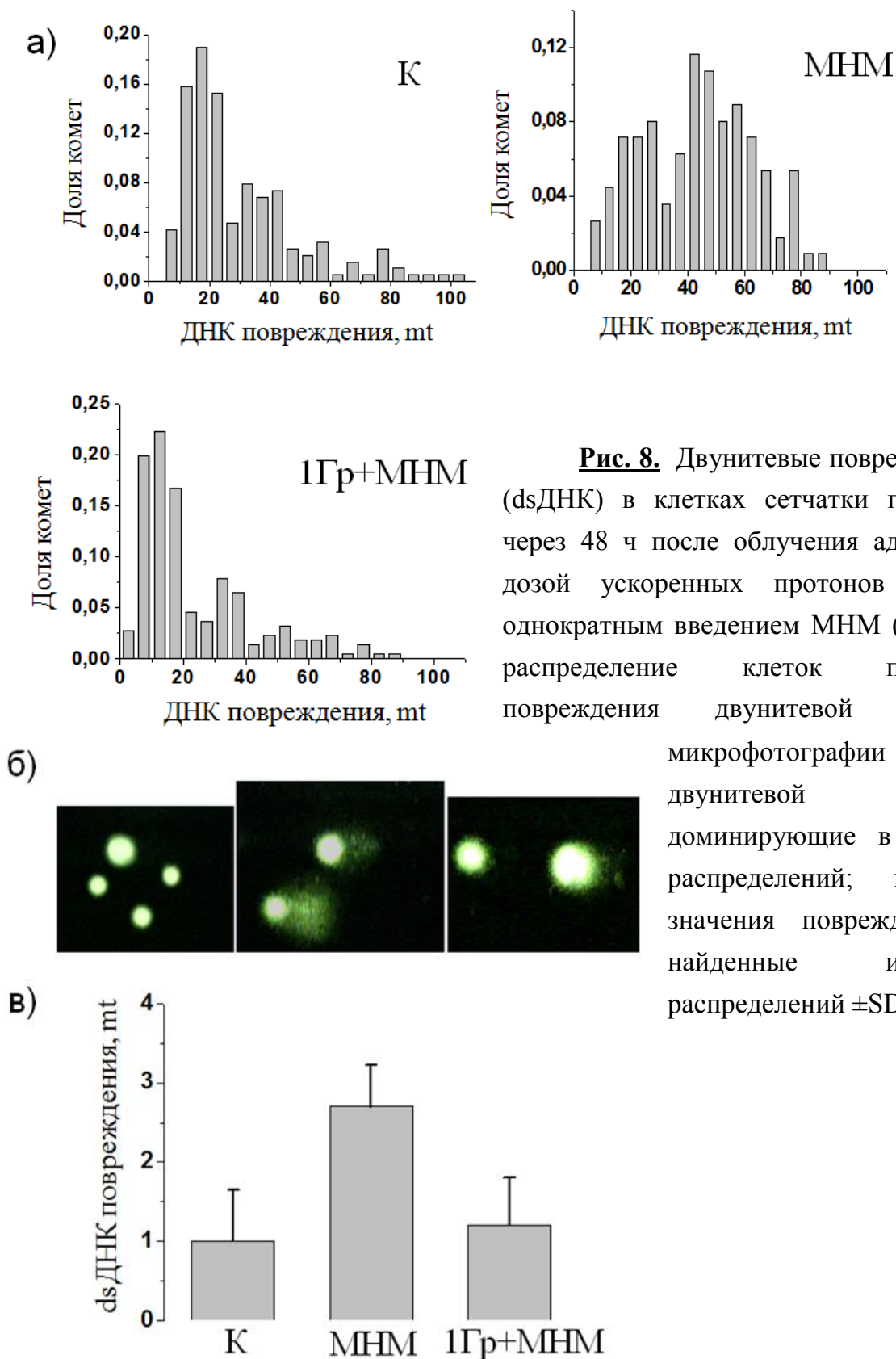


Рис. 7. Интенсивность флуоресценции ядерного слоя фоторецепторных клеток сетчатки глаза мышей в контроле и через 48 ч после однократной инъекции 70 мг/кг метилнитрозомочевины и при комбинированном действии протонов (1 Гр) и введения метилнитрозомочевины (70 мг/кг). Штрихи – средние значения для разных срезов сетчатки

Известно, что апоптоз клеток инициируется двунитевыми разрывами ДНК, имеющими ферментативную природу (Разин и Юдинкова, 1998). Поскольку, как отмечено ранее, метилнитрозомочевина не вызывает разрывов ДНК, то следует предположить, что в апоптотических клетках сетчатки глаза должно наблюдаться формирование таких ферментативных двунитевых разрывов ДНК, инициирующих апоптоз. Их возникновение в клетках может коррелировать со средней скоростью апоптоза в сетчатке глаза. На рисунке 8 видно, что полученные результаты по оценке содержания двунитевых разрывов ДНК в клетках сетчатки глаза подтверждают это предположение. Среднее содержание двунитевых разрывов ДНК в клетках сетчатки после комбинированного действия ускоренных протонов и метилнитрозомочевины оказывается сниженным по сравнению с действием только метилнитрозомочевины. Результаты TUNEL-исследования показали, что этот эффект совпадает с частотой

возникновения апоптоза в сетчатке глаза мышей (рис. 7). Таким образом, адаптирующее облучение ускоренными протонами стимулирует репарацию ДНК или подавляет активность каспаз в сетчатке глаза.



Поскольку, считается, что важная роль в восстановлении сетчатки от повреждения принадлежит глиальным клеткам Мюллера (Chollangi et al., 2009), мы попытались на феноменологическом уровне оценить участие их и в адаптивном ответе сетчатки у мышей. Для регистрации реакции этих клеток мышам вводили пролиферативный маркер бромдезоксисуридин (BrUdR) по 50 мг/кг через 12 и 24 ч после последней инъекции МНМ. Активацию клеток Мюллера в сетчатке глаза после адаптирующей инъекции мышам МНМ регистрировали через 48 часов — минимальное время для промечивания ГКМ пролиферативным маркером бромдезоксисуридином. Клетки Мюллера чутко реагируют на химическое воздействие. Эта реакция (реактивный глиозис) на генотоксический стресс выражается их гипертрофией (увеличением размера), пролиферацией и миграцией к поврежденным участкам сетчатки. Эти три компонента реакции ГКМ представлены на микрофотографиях срезов сетчатки глаза в виде FITC-фокусов в фоторецепторном слое сетчатки (рис. 9). Фокусы представляют собой ядра пролиферирующих клеток, включивших BrUdR в ДНК. Подсчет таких фокусов на единичной площади среза дает количественную меру активации глиальных клеток Мюллера на генотоксический стресс. При введении МНМ однократно в дозе 70 мг/кг наблюдается выраженная активация ГКМ (рис. 9 б), соответствующая степени повреждения клеток.

а)

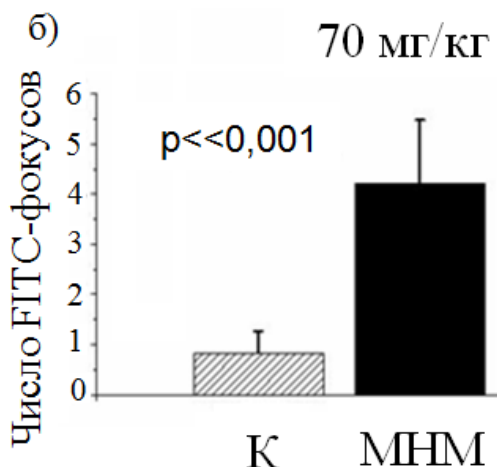
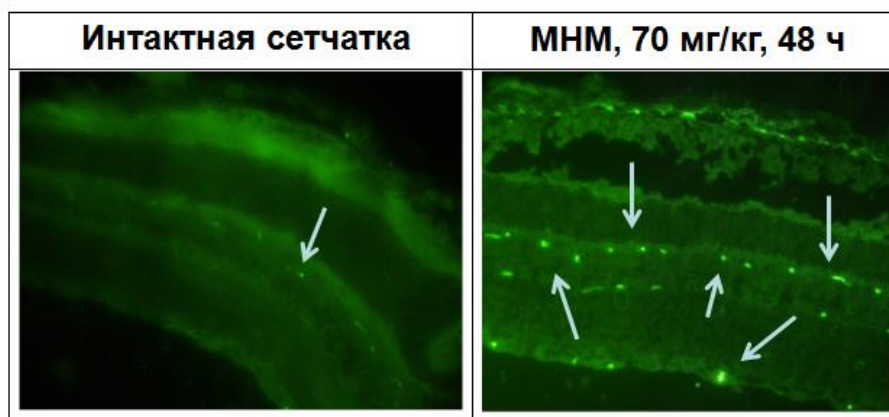


Рис. 9. Активация клеток Мюллера в сетчатке глаза мышей *in vivo* после введения метилнитрозомочевины в дозе 70 мг/кг: а) срезы сетчатки глаза – стрелками показаны глиальные клетки Мюллера, меченные анти-BrUdR антителами; б) число FITC-фокусов на единицу площади среза через 48 часов после введения метилнитрозомочевины

При последовательном введении метилнитрозомочевины (17+70 мг/кг), разделенном во времени 4-мя часами, обнаруживается снижение глиозиса (рис. 10) по сравнению с однократным введением МНМ в дозе 70 мг/кг. Это свидетельствует о снижении повреждающего действия этого агента ($P=0,08$).

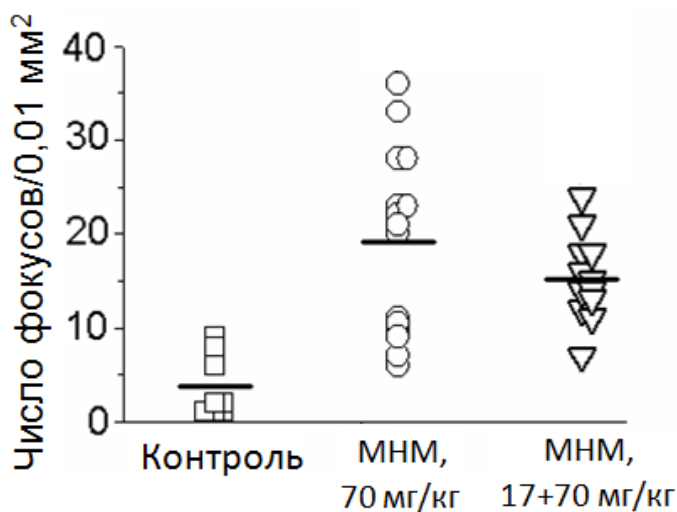


Рис. 10. Активация глиальных клеток Мюллера в сетчатке глаза мышей в контроле, при однократном и фракционированном введении мышам метилнитрозомочевины. Штрихи — средние значения количества активированных глиальных клеток Мюллера в сетчатке глаза мышей.

Следует отметить, что использованная нами процедура визуализации глиальных клеток Мюллера открывает дополнительные возможности для характеристики ответа этих клеток на повреждение сетчатки. На рисунке 11 представлены кометы одностречевой ДНК из клеток Мюллера, включивших маркер BrUdR. Эти кометы указывают на высокую степень поврежденности ДНК в этих клетках.



Рис. 11. Микрофотографии одностречевых BrUdR-ДНК комет, формируемых глиальными клетками Мюллера в интактной сетчатке глаза мышей.

Спонтанные повреждения в виде одностранных разрывов ДНК в клетках разных органов мышей отмечались и в работах других авторов (Valarde et al, 2000; Valarde et al, 2001). Степень повреждаемости ДНК в клетках мышей нарастала в таком же порядке, что и полученная в наших исследованиях: лейкоциты < клетки печени < клетки мозга < клетки сетчатки (Wang et al, 2010). Поскольку зрительный процесс связан с высоким потреблением кислорода, сетчатка оказывается самой оксигенированной тканью с высоким содержанием активных форм кислорода. Это объясняет высокий уровень спонтанного повреждения ДНК. При такой поврежденности ДНК, наблюдаемая устойчивость клеток сетчатки к апоптозу и способность к восстановлению, подчеркивает высокую степень адаптации сетчатки к генотоксическим воздействиям, механизмы которой представляют, на наш взгляд, предмет дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Исследована зависимость морфологических и функциональных изменений сетчатки глаза мышей от величины дозы воздействия генотоксическими агентами физической и химической природы: гамма-излучения, ускоренных протонов и метилнитрозомочевина.

2. Наблюдается плато устойчивости сетчатки глаза мышей к действию излучений в диапазоне доз от 0 до 14 Гр, и при введении метилнитрозомочевина в дозах от 0 до 35 мг/кг, отражающее наличие генотоксического порога у сетчатки глаза (14 Гр и 35 мг/кг) и ее способность к восстановлению после воздействия агента в дозах ниже пороговых.

3. Показано, что ускоренные протоны в дозе 25 Гр вызывают морфологические изменения в сетчатке глаза, возрастание экспрессии белков p53, FasR и каспазы-3, связанных с апоптотической гибелью фоторецепторных клеток в сетчатке, что ведет к утрате функциональной активности сетчатки.

4. Однократное введение мышам метилнитрозомочевина в дозе 70 мг/кг приводит к массовой гибели фоторецепторных клеток по механизму апоптоза, вызывает дегенерацию сетчатки глаза мышей и необратимо снижает ее функциональную активность.

5. Показана способность зрелой сетчатки глаза мышей к клеточному и функциональному восстановлению и к адаптивному ответу и возможное участие глиальных клеток Мюллера в этих процессах.

6. Обнаружен высокий уровень спонтанных повреждений ДНК сетчатки глаза, вследствие высокой степени оксигенации ткани.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Логинова М.Ю., Поплинская В.А., Островский М.А. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза // Журнал «Цитология», 2012, том 54, №3, с. 261-269.

2) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А., Ляхова К.Н., Поплинская В.А., Островский М.А. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов // Журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», 2013, том 54, №4, с. 385-392.

3) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Поплинская В.А., Некрасова Е.И., Островский М.А. Исследование адаптивного ответа сетчатки глаза у мышей на облучение протонами: связь с репарацией ДНК и гибелью фоторецепторных клеток // Журнал «Письма в ЭЧАЯ», 2015, том 12, №1(192), с. 241-255.

4) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Поплинская В.А., Некрасова Е.И., Островский М.А. Радиационное прекондиционирование сетчатки глаза у мышей *in vivo* повышает ее устойчивость к последующему генотоксическому воздействию и стимулирует восстановление // Журнал «Цитология», 2015, том 56, №2, с. 119-128.

Материалы в сборниках трудов конференций:

5) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А., Островский, М.А. Дегенерация сетчатки у мышей, индуцированная генотоксическими агентами // сборник тезисов «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: XVI Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых», Пущино, 2012, с. 303.

6) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А., Островский М.А. Индукция дегенерация сетчатки у мышей под действием генотоксических факторов: ионизирующей радиации и МНМ // труды «XVI-ой научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ», Дубна, 2012, с. 250-253.

7) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Поплинская В.А., Островский М.А. Ответ сетчатки на воздействие генотоксических агентов как модель для изучения дегенерации и регенерации сетчатки *in situ* // материалы докладов «IV Съезд биофизиков России. Симпозиум III «Физика – медицине и экологии», 2012, Нижний Новгород, с. 228.

8) **Виноградова Ю.В.**, Ляхова К.Н., Тронов В.А. Влияние генотоксических агентов на повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей // сборник тезисов «Международной конференции молодых ученых

«Экспериментальная и теоретическая биофизика '13», Пушино, 21-23 октября 2013 г., с. 103.

9) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Ляхова К.Н., Некрасова Е.И., Островский М.А. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксическими агентами // сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием «VI РОССИЙСКИЙ ОБЩЕНАЦИОНАЛЬНЫЙ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ», 2013, Москва, с. 572-575.

10) **Виноградова Ю.В.**, Ляхова К.Н. Функциональная активность сетчатки глаза мышей после воздействия генотоксических агентов // материалы конференции «XII Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 50-летию ГНЦ РФ-ИМБП РАН», Москва, 2013, с. 15-16.

11) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А., Островский М.А. Функциональные и структурные изменения сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов // труды «XVII-ой Научной конференции молодых ученых и специалистов к 100-летию В.П. Джеллепова», Дубна, 2013, с. 284-287.

12) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Поплинская В.А., Островский М.А. Радиационное прекондиционирование сетчатки глаза *in vivo* малой дозой повышает ее устойчивость к индуцированной дегенерации и стимулирует восстановление // тезисы докладов «VII съезда по радиационным исследованиям», Москва, 2014, с. 58.

13) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А. Восстановление сетчатки после воздействия генотоксических агентов // труды «XVIII научной конференции молодых ученых и специалистов к 105-летию Н.Н. Боголюбова», Дубна, 2014, с. 236-239.

Другие публикации:

14) Островский М.А., Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.** Изменение функциональной активности сетчатки мышей после воздействия генотоксических факторов // Журнал «Новости ОИЯИ», 2011, №4, с. 22-24.

15) **Виноградова Ю.В.**, Тронов В.А. Структурные и функциональные изменения сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов // Журнал «Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук», 2013, том 12, №59, с. 23-25.

16) Тронов В.А., **Виноградова Ю.В.**, Поплинская В.А., Островский М.А. Повреждение и восстановление сетчатки у мышей после воздействия ионизирующей радиации и метилнитрозомочевина // Монография «Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма» под ред. М.В. Угрюмова, Москва, Научный мир, 2014, том 2, с. 525-543.