

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА СЕТЧАТКИ ГЛАЗА У МЫШЕЙ НА ОБЛУЧЕНИЕ ПРОТОНАМИ: СВЯЗЬ С РЕПАРАЦИЕЙ ДНК И ГИБЕЛЬЮ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТОК

В. А. Тронов^{а,б}, Ю. В. Виноградова^{б,1}, В. А. Поплинская^б,
Е. И. Некрасова^с, М. А. Островский^{б,с}

^а Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

^б Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^с Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

^с Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

Сетчатка — зрительный орган, находящийся постоянно в условиях агрессивного воздействия окружающей среды, что предполагает существование в ней внутренних механизмов защиты и восстановления. Подтверждением этого является наличие у клеток сетчатки генотоксического порога и адаптивного ответа на генотоксическое воздействие. В данной работе на модели МНМ (метилнитрозомочевина)-индуцированной дегенерации сетчатки глаза мышей мы исследовали адаптивный ответ сетчатки *in vivo* на облучение протонами и участие в нем глиальных клеток Мюллера. Показали, что восстановление сетчатки после действия генотоксических агентов, индуцирующих ее дегенерацию, коррелирует с повышением эффективности репарации ДНК-повреждений и снижением гибели фоторецепторных клеток в сетчатке глаза.

Retina, the visual organ, that is permanently undergone aggressive environmental influence. This implies the existence in retina of intrinsic protective and recovery mechanisms. The presence of retinal genotoxic threshold, nonlinear dose response and adaptive response of retina to genotoxicants suggest this assumption. In this article, using the model of MNU-induced degeneration of retina in mice, we investigated the adaptive response of the retina *in vivo* after proton irradiation and a participation of Muller glial cells in it. It was showed that the retinal recovery after the genotoxic insults correlated with increase efficacy of DNA-damage repair and decrease in death of retinal photoreceptor cells.

PACS: 87.53.-j; 87.55.dh

ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка — орган зрительной системы, состоящий из терминально дифференцированных клеток, утративших способность к делению. Сетчатка глаза характеризуется высокой устойчивостью к воздействиям окружающей среды, включая химические агенты и ионизирующую радиацию [1, 2]. Вместе с тем, значительный контингент людей оказывается

¹E-mail: vinojv@jinr.ru

в ситуации, когда уровень токсического воздействия на сетчатку превышает уровень ее устойчивости либо тип воздействия не является адаптивным. Таких ситуаций, по крайней мере, три: радиационная терапия опухолей мозга и опухолей глаз (ретинобластомы и меланомы глаз); полеты человека в космос; цитотоксическая химиотерапия рака.

В результате радиотерапевтического курса наблюдаются цистовидный макулярный отек, телангиактазия, глаукома, сухой глаз, катаракта [3–6]. Радиационно-индуцированная патология зрения снижается при фракционированном облучении [7]. Снижение дозы во фракциях и увеличение интервалов между фракциями увеличивают вероятность зрительной ткани и сетчатки к восстановлению [8]. Поэтому знание показателей восстановления сетчатки глаза после облучения позволяет оптимизировать тактику терапевтического воздействия — достичь высокой терапевтической эффективности при минимальном поражении здоровых тканей, в том числе и сетчатки.

В космическом пространстве основным поражающим сетчатку глаза фактором являются протоны и тяжелые заряженные частицы [9]. Оказалось, что у мышей сразу после полета на space shuttle повышалась частота спонтанного апоптоза в ганглиозном слое и в пигментном эпителии сетчатки, возрастала экспрессия некоторых генов в сетчатке, продуцирующих окислительный стресс, что увеличивало риск отдаленной дегенерации сетчатки [10]. У новорожденных крысят после космического полета наблюдались признаки дегенерации сетчатки глаза [11]. Эти результаты на животных коррелируют с известным фактом снижения остроты зрения, которое отмечается у 30% астронавтов после полетов [12, 13].

Связь *цитотоксической химиотерапии* рака с вторичными патологиями зрения является предметом многочисленных публикаций (см. обзоры [14, 15]), в которых у пациентов, прошедших курс химиотерапии, наблюдались фотофобия, катаракта, глаукома, ретинопатия, ишемическая дегенерация сетчатки, васкулопатия [16, 17]. Как видно, во всех трех ситуациях наблюдается потеря зрения, в основе которой лежит гибель клеток зрительной системы — фоторецепторных клеток, нейрональных клеток, клеток пигментного эпителия. В то же время упоминаемая ранее высокая устойчивость клеток сетчатки глаза к внешним воздействиям есть результат эволюционно возникших в этих клетках механизмов репарации и восстановления, которые обеспечивают регенерацию зрительной ткани и функции. Экспериментальным показателем способности клеток/ткани к восстановлению от повреждающего воздействия является адаптивный ответ. Он выражается в защитном эффекте субтоксического воздействия, после которого клетки/ткани приобретают толерантность к последующему воздействию агента в токсической дозе [18–20]. В данной работе на модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки глаза у мышей [21, 22] мы исследовали адаптивный ответ сетчатки на облучение протонами (радиационный гормезис), участие глиальных клеток Мюллера в адаптивном ответе сетчатки на действие метилнитрозомочевины (МНМ), а также попытались ответить на вопрос: связано ли восстановление после действия генотоксических агентов с повышением способности к репарации повреждений ДНК и снижением гибели фоторецепторных клеток в сетчатке глаза.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКИ

1.1. Животные. Исследования проводили на половозрелых мышах-гибридах СВАхС57В1, F1 (♀) в возрасте 2,5 мес, с массой тела 24–28 г. Животные, содержащиеся в стандартных лабораторных условиях ((22 ± 2) °С, относительная влажность воз-

духа (60 ± 10) % и 12-ч световой период), имели свободный доступ к воде и гранулированному корму.

Все процедуры с животными были осуществлены согласно положению Комитета по биоэтике ИБХФ РАН от 17 сентября 2007 г.

1.2. Облучение. Мышей подвергали тотальному γ -облучению (^{60}Co) в дозе 14 Гр на терапевтической установке Рокус-М (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна); мощность поглощенной дозы составляла 0,64 Гр/мин. Голову животных облучали ускоренными протонами в дозах 1, 14 или 25 Гр на фазотроне (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна). Энергия частиц в пучке 150 МэВ/нуклон, ЛПЭ = 0,49 кэВ/мкм, мощность дозы 1 Гр/мин.

1.3. Введение МНМ. Кристаллическую МНМ (Sigma, США) хранили при -20°C , растворяли в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) непосредственно перед введением внутрибрюшинно мышам в дозах 17, 35 и 70 мг/кг. Контрольным животным вводили равный объем PBS, не превышающий 0,7 мл.

1.4. Приготовление образцов. Спустя различное время после воздействия животных умерщвляли в парах хлороформа и извлекали оба глаза. Тканевые срезы толщиной 5 мкм готовили из глаз, фиксированных в растворе Боуэна сразу после извлечения. Последующую спиртовую отмывку, обработку глаз и приготовление срезов проводили по стандартной процедуре, описанной нами ранее [2]. 5-мкм срезы сетчатки на предметном стекле окрашивали гематоксилин-эозином и микроскопировали в проходящем свете.

Суспензию клеток готовили из извлеченной из глаз животного сетчатки путем мягкого механического диспергирования ткани в охлажденном PBS. После двух циклов центрифугирования-ресуспензирования в охлажденном PBS приготовленную суспензию клеток сразу использовали в работе.

1.5. Визуализация клеток Мюллера. Для того чтобы пометить в сетчатке *in vivo* Мюллеровские клетки, использовали пролиферативный маркер BrUdR. Процедуру проводили дважды в день в течение 48 ч (утром и вечером), вводя животным внутрибрюшинно стерильный раствор маркера 50 мг/кг, растворенного в PBS, в объеме $< 0,7$ мл (табл. 1). После извлечения из глаз сетчатки и приготовления микросрезов клетки, аккумулировавшие маркер, проявляли антиBrUdR антителами, сконъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Клетки визуализировали по флуоресценции FITC с помощью флуоресцентного микроскопа [23]. Подсчитывали либо число фокусов на единицу площади среза, либо интенсивность флуоресценции на единичную площадь среза с помощью программы ImageJ [24].

1.6. TUNEL-детекция гибели клеток. Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали методику TUNEL (Trevigen), следуя инструкции к стандартному набору TUNEL [25]. Визуализацию микроскопических изображений на срезах проводили на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для регистрации флуоресценции FITC.

1.7. Иммуноцитохимическое определение экспрессии каспазы. 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 %-м формальдегиде в PBS в холодильнике. Затем пермеабелизовали в 0,2 %-м тритоне X-100 в PBS (20 мин в холодильнике). Слайды, предназначенные для определения уровня FasR, процедуре пермеабелизации не подвергали. После каждой процедуры слайды трижды отмывали в

PBS, последнюю отмывку от первичного антитела проводили в PBS, содержащем эмбриональную сыворотку 2%. 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. После инкубации стекло удаляли и слайд трижды отмывали холодным PBS. После удаления излишков влаги с поверхности слайда наносили 30 мкл PBS, содержащего вторичные антитела, меченные 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, окрашивали йодистым пропидием (1 мкг/мл) и микроскопировали в режиме флуоресценции с набором фильтров для FITC. Контролем служили слайды с иммобилизованными клетками, которые подвергали такой же обработке, но без первичных антител. FITC-флуоресцирующие клетки фотографировали, полученные изображения анализировали на компьютере с помощью программы ImageJ [26]. Регистрировали флуоресценцию не менее 150 клеток в каждом слайде и определяли долю FITC-позитивных клеток. Показателем уровня экспрессии каждого белка служило произведение среднего значения флуоресценции одной клетки на долю FITC-позитивных клеток в каждом слайде.

1.8. Регистрация электроретинограммы (ЭРГ). Перед регистрацией ЭРГ мышью адаптировали к темноте (не менее 12 ч) и лишали корма на 24 ч. При тусклом свете мышью анестезировали внутримышечной инъекцией смеси золотил – ксилазин 1/1 в дозе 0,2 мл на 100 г веса животного. Для расширения зрачка в глаз закапывали 0,5 %-й раствор мидриацила. Электрод помещали 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 миниатюрного широкопольного фотостимулятора, длительность вспышек составляла 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. При таком режиме регистрации в этом диапазоне зависимость амплитуды ЭРГ от интенсивности вспышки выходит на плато, что позволяет корректно проводить сравнение этого параметра.

1.9. Регистрация повреждений ДНК методом ДНК-комет. Использовали два варианта метода — нейтральный для оценки поврежденности двунитовой ДНК (dsДНК-кометы) и щелочной для определения однонитевых разрывов ДНК (ssДНК-кометы). Детально метод описан нами ранее [22]. Суспензию клеток $(0,5–1) \cdot 10^6$ /мл PBS смешивали с двойным объемом 1 %-го раствора легкоплавкой агарозы IV типа (Sigma, США), наносили на предметное стекло в виде тонкого слайда 18×18 мм. После застывания геля слайд погружали в лизирующий раствор, содержащий 2,5 М NaCl, 30 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % лаурилсаркозината и 0,03 мг/мл протеиназы К, pH 8,0, 37 °С. Нейтральный электрофорез проводили в ТАЕ-буфере pH 8,3 (ds-разрывы) или в растворе 0,3 М NaOH, 2 мМ EDTA и 1 % DMSO (ss-разрывы) в течение 30 мин при 0,56 В/см. Слайды ополаскивали в 0,4 М Tris-HCl, pH 7,4, в PBS, высушивали на воздухе, дегидратировали метанолом и после окрашивания Sybr-Green микроскопировали во флуоресцентном режиме. Изображения комет обрабатывали по программе CASP [27]. Показателем поврежденности ДНК служил момент хвоста комет mt (Olive tail moment).

1.10. Статистика. Представлены результаты усреднения трех независимых экспериментов. Каждый опыт содержал контрольную и опытную группы животных. Различия между показателями контрольных и опытных групп анализировались с помощью непараметрической статистики Колмогорова–Смирнова со сравнением экспериментальных распределений показателей (иммуногисто- и цитохимия, ДНК-кометы). Средние показатели сравнивались с использованием программы STATISTICA.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1. Радиоустойчивость сетчатки глаза *in vivo*. Радиоустойчивость сетчатки глаза продемонстрирована на рис. 1, *a*: облучение сетчатки ускоренными протонами в дозах 10 и 14 Гр спустя 3 сут не вызывает изменений в структуре слоев сетчатки. Однако в облученных клетках формируются разрывы ДНК, которые полностью репарируются за 10–15 ч (рис. 1, *б*).

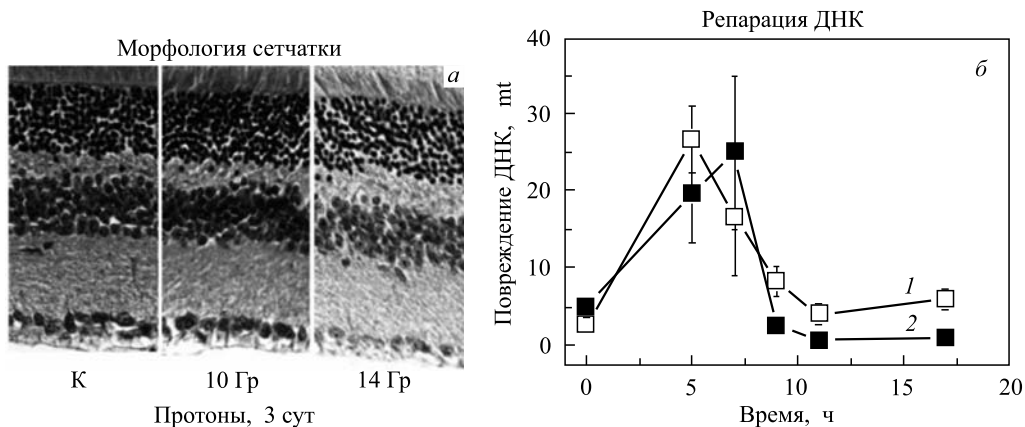


Рис. 1. Морфология сетчатки и повреждение ДНК в сетчатке после облучения ускоренными протонами в дозах 10 и 14 Гр. *a*) Микрофотографии срезов сетчатки в течение трех суток после воздействия; *б*) динамика репарации однонитевых (1) и двунитевых (2) разрывов ДНК в сетчатке *in vivo*. Разрывы накапливаются и удаляются спустя 10–12 ч после облучения в дозе 14 Гр. Увеличение $\times 200$

Репарация ДНК является предпосылкой для успешного восстановления клеток и последующего сохранения их функциональной активности. Эффективная репарация ДНК наблюдается и в клетках, облученных в дозе 25 Гр (рис. 2, *a*). Однако эта высокая доза вызывает морфологические изменения в сетчатке глаза и гибель фоторецепторных клеток (рис. 2, *б*). Судя по наличию фрагментированных ядер, большая часть клеток гибнет по механизму апоптоза.

Таким образом, репарация ДНК является необходимой, но недостаточной предпосылкой выживания клеток в облученной сетчатке глаза. Нелинейный характер дозовой зависимости ответа сетчатки на облучение и активная система репарации ДНК в ней указывают на способность сетчатки глаза к восстановлению.

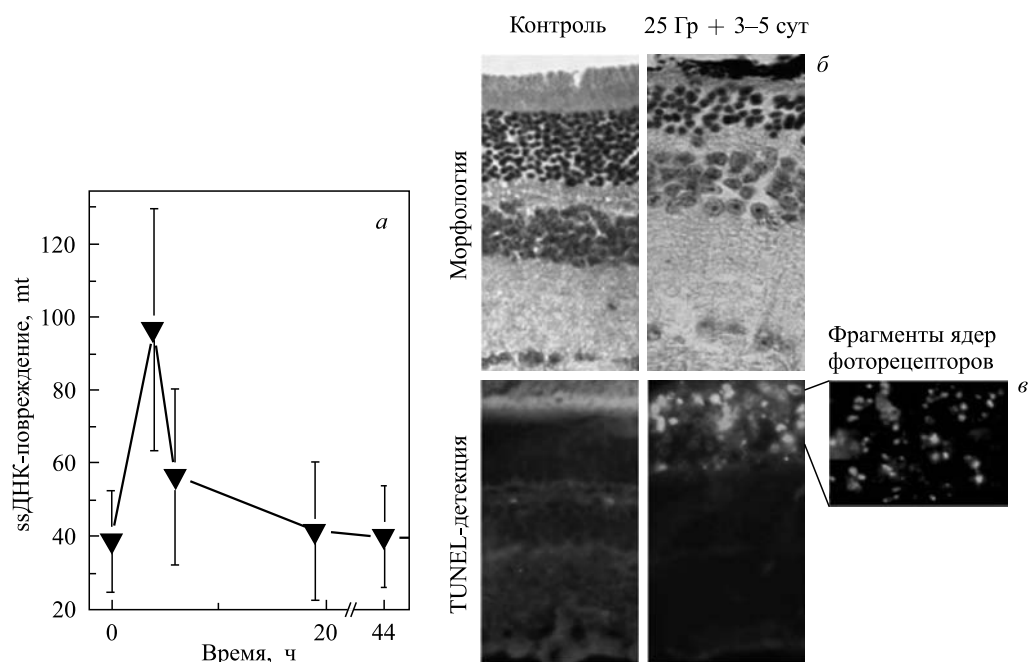


Рис. 2. Морфология сетчатки глаза, гибель фоторецепторов в сетчатке и репарация ДНК в сетчатке глаза мышей *in vivo* после облучения протонами в дозе 25 Гр. *а*) Накопление и репарация однонитевых разрывов ДНК в сетчатке после облучения; *б*) морфологические изменения в сетчатке и гибель фоторецепторов в сетчатке; *в*) пикноз и фрагментация ядер фоторецепторов в облученной сетчатке. Увеличение $\times 200$

2.2. Восстановление сетчатки глаза после действия МНМ. Метилнитрозомочевина вызывает в сетчатке глаза реакции, сходные с таковыми после действия протонов: нелинейный характер зависимости морфологических изменений сетчатки от дозы (рис. 3, *а*) и эффективную репарацию возникающих разрывов ДНК (рис. 3, *б*). Цитотоксическая доза агента 70 мг/кг спустя 3–4 сут после введения вызывает деструкцию ядерного слоя и наружных сегментов фоторецепторных клеток и необратимую утрату функциональной активности сетчатки глаза у мышей (рис. 3, *в*, *г*). Доза 35 мг/кг, как видно, не является цитотоксичной. В то же время после этой дозы наблюдается продолжительное, но обратимое понижение амплитуды ЭРГ (рис. 3, *з*), говорящее о восстановлении функциональной активности сетчатки глаза после действия МНМ.

2.3. Адаптивный ответ сетчатки и клеток Мюллера на МНМ. Схема опыта представлена в табл. 1.

Поскольку МНМ вызывает апоптотическую гибель фоторецепторных клеток, в качестве индикатора цитотоксического действия агента использовали экспрессию активированной каспазы-3 в клетках сетчатки глаза, определяемой иммуноцитохимически по флуоресценции каспаза-специфичных антител. Результат, представленный на рис. 4, показывает, что цитотоксический эффект от однократного введения МНМ в дозе 70 мг/кг больше, чем от последовательного введения МНМ 17 и 70 мг/кг.

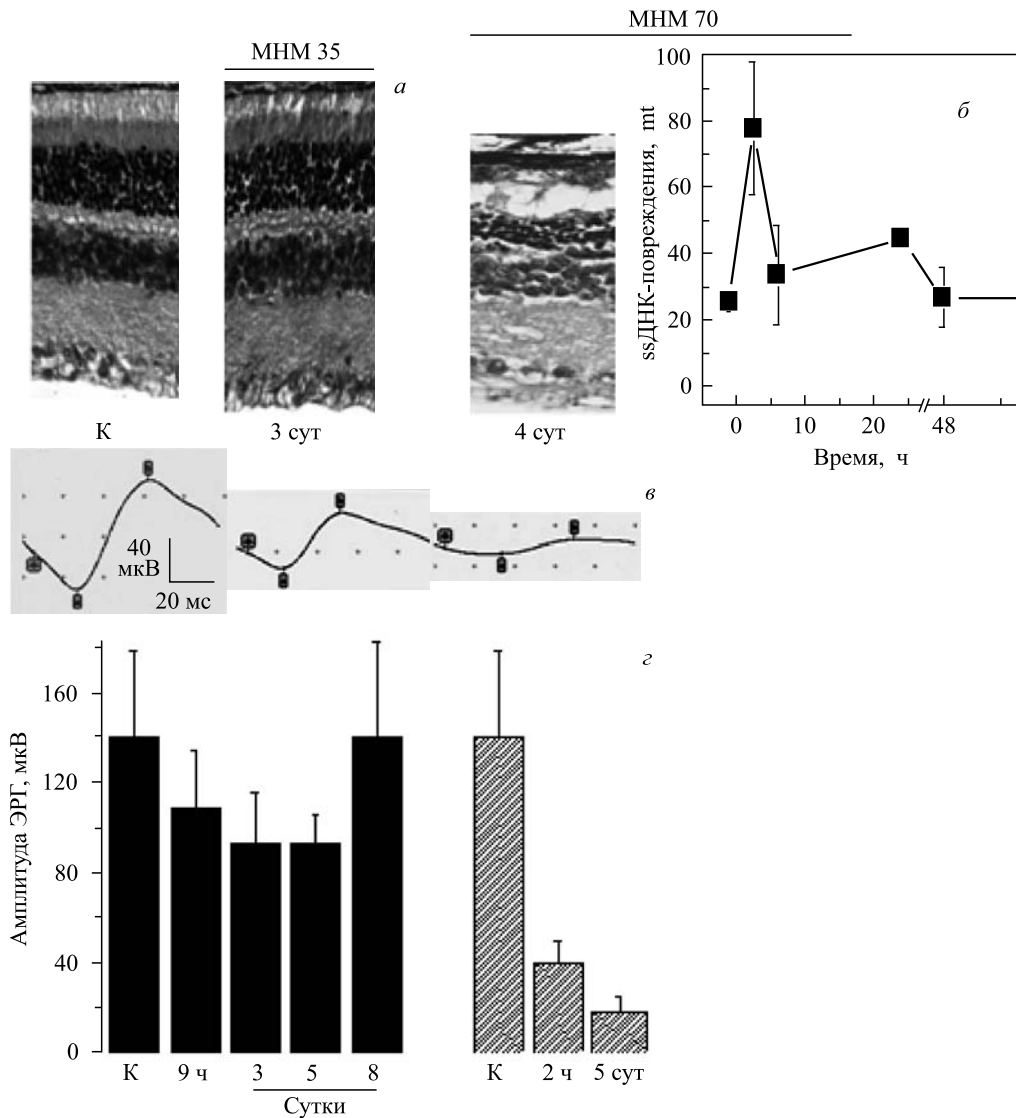


Рис. 3. Ответ сетчатки глаза на однократное введение метилнитрозомочевины. а) Микрофотографии срезов сетчатки после воздействия МНМ в дозе 35 мг/кг; б) одновременная дегенерация ядерного слоя фоторецепторов и репарация однонитевых разрывов ДНК после воздействия дозы МНМ 70 мг/кг; в) ответ электроретинограммы на введение МНМ в дозах 35 и 70 мг/кг; г) функциональное восстановление сетчатки после введения МНМ в дозе 35 мг/кг и необратимая утрата функциональной активности сетчатки после дозы 70 мг/кг. Увеличение $\times 200$

Спустя 12 ч после введения МНМ, когда завершалась репарация ДНК, дважды по 50 мг/кг вводили пролиферативный маркер BrUdR с целью идентификации глиальных клеток Мюллера в сетчатке глаза (табл. 1). Включившийся в ДНК маркер проявляли с помощью FITC-конъюгата антиBrUdR антител после щелочной обработки и нейтрали-

Таблица 1. Схема эксперимента по адаптирующему эффекту МНМ на сетчатку глаза у мышей

	Время, ч				
	0	4	12	24	48
Мышь 1					
Воздействие	МНМ		BrUdR		Эвтаназия
Доза, мг/кг	17	70	50	50	
Мышь 2					
Воздействие	МНМ		BrUdR		Эвтаназия
Доза, мг/кг	—	70	50	50	
Мышь 3					
Воздействие	МНМ		BrUdR		Эвтаназия
Доза, мг/кг	—	—	50	50	

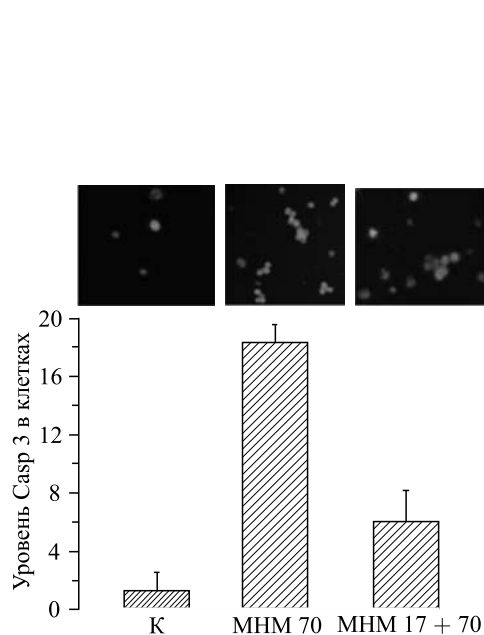


Рис. 4. Экспрессия активной каспазы-3 в клетках сетчатки глаза у мышей в ответ на однократную (МНМ 70 мг/кг) и двукратную (МНМ 17 + 70 мг/кг) инъекции агента. Уровень каспазы определен как удельная интенсивность FITC-флуоресценции клеток. Увеличение $\times 200$

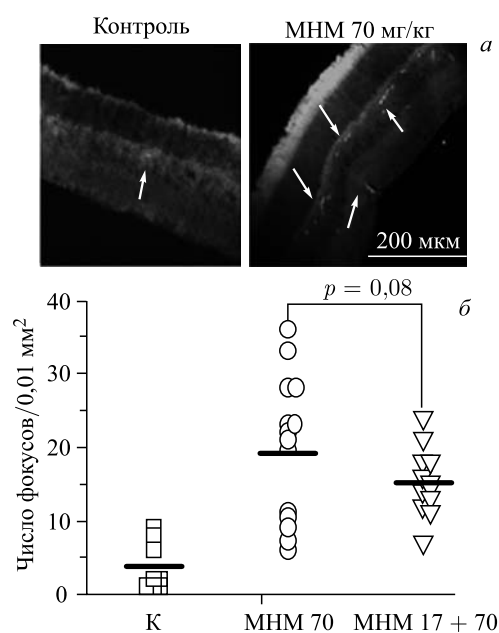


Рис. 5. Визуализация клеток Мюллера в срезах сетчатки глаза (а) и их ответ на однократную (70 мг/кг) и двукратную (17 + 70 мг/кг) инъекции МНМ мышам (б)

зации срезов на предметном стекле (рис. 5, а) и подсчитывали число FITC-фокусов на единичную площадь срезов (рис. 5, б). Среднее число фокусов на срезе, приходящееся на единицу площади среза, представляли точкой из группы под каждой микрофотографией среза. Видно, что в ответ на введение цитотоксической дозы МНМ возрастает число

FITC-фокусов. Последовательное введение 17 и 70 мг/кг МНМ обнаруживает заметное снижение числа фокусов по сравнению с эффектом от одной дозы 70 мг/кг, хотя уровень достоверности снижения невысок, $p = 0,08$.

2.4. Адаптирующий эффект протонного излучения в дозе 1 Гр. Схема опыта представлена в табл. 2.

Таблица 2. Схема эксперимента по адаптирующему эффекту облучения на сетчатку глаза у мышей

	Время, ч		
	0	4	48
Мышь 1			
Воздействие	Протоны	МНМ	ЭРГ + эвтаназия
Доза	1 Гр	70 мг/кг	
Мышь 2			
Воздействие	—	МНМ	ЭРГ + эвтаназия
Доза, мг/кг	—	70	
Мышь 3			
Воздействие	Протоны	—	ЭРГ + эвтаназия
Доза, Гр	1	—	

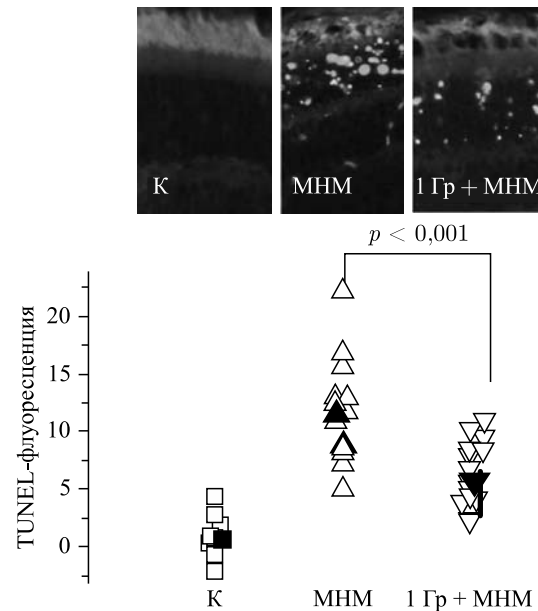


Рис. 6. TUNEL-детекция апоптоза в наружном ядерном слое сетчатки интактных мышей (К), после введения МНМ 70 мг/мл (МНМ) и после облучения протонами 1 Гр с последующей инъекцией МНМ 70 мг/кг (1 Гр + МНМ). Приведены репрезентативные микрофотографии срезов сетчатки. Точка на графике — нормированное по площади усредненное значение флуоресценции наружного ядерного слоя сетчатки в поле зрения микроскопа. Увеличение $\times 200$

После инъекции МНМ (70 мг/кг) в сетчатке глаза через 44 ч накапливается большое число погибших TUNEL-позитивных клеток (фото на рис.6). Погибшие клетки локализуются в наружном ядерном слое сетчатки. На этом рисунке измеренные по программе ImageJ интенсивности флуоресценции, усредненные по одному срезу, представлены в виде точки в группе под каждой микрофотографией. Средние значения для каждой группы точек обозначены на рисунке жирными горизонтальными штрихами.

Облучение мышей в дозе 1 Гр спустя 48 ч не приводит к сколько-нибудь значимому увеличению числа погибших клеток в сетчатке глаза (данные не приводятся). Однако предварительное облучение мышей в этой дозе приводит к достоверному снижению цитотоксического действия МНМ на радиационно-прекондиционированную сетчатку ($p < 0,001$).

Рис. 7 представляет результаты оценки двунитевых разрывов ДНК через 48 ч после воздействия МНМ на радиационно-прекондиционированную сетчатку глаза у мышей.

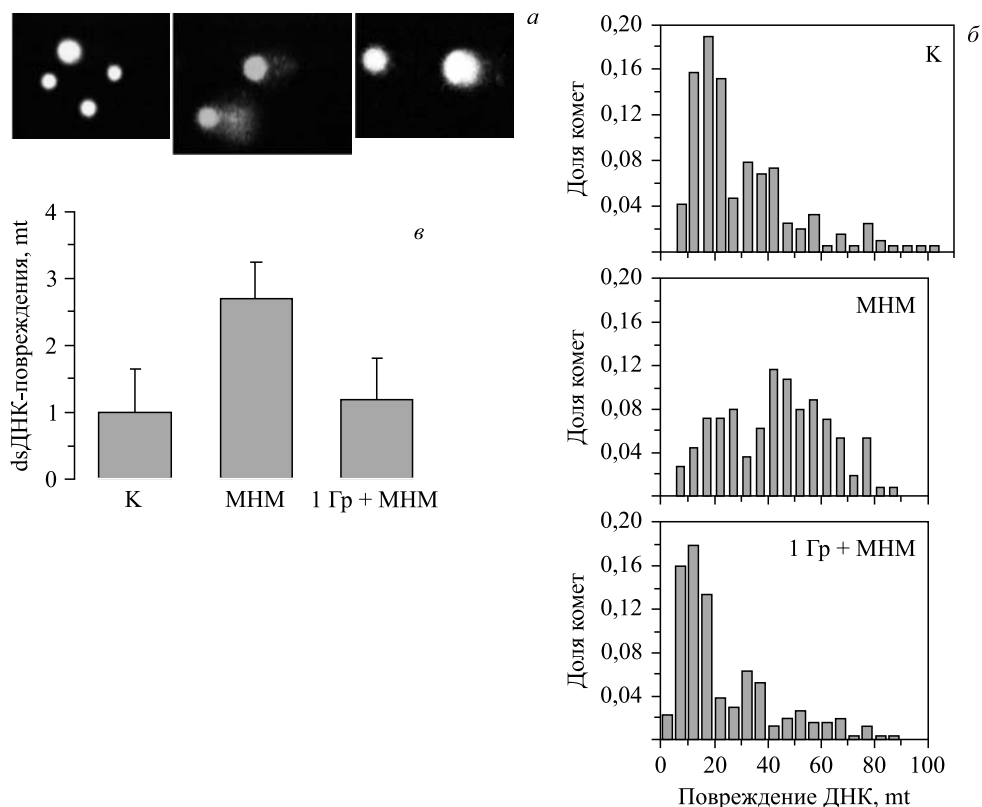


Рис. 7. Влияние протонного preconditionирования (1 Гр) на МНМ-индуцированную деградацию ДНК в сетчатке у мышей спустя 48 ч после облучения. а) Репрезентативные ds-ДНК-кометы из клеток интактной сетчатки, МНМ-обработанной и (1 Гр + МНМ)-обработанной сетчатки; б) гистограммы распределения комет по степени деградации ДНК для тех же клеток; в) средние относительные значения ds-деградации ДНК, вычисленные из соответствующих распределений (б). Увеличение $\times 400$

Как видно, прекоондиционирование снижает формирование двунитевых разрывов ДНК. Это прослеживается на микрофотографиях комет (рис. 7, *а*), на гистограммах распределений комет по степени повреждения ДНК (рис. 7, *б*) и соответствует средним уровням повреждения ДНК, вычисленным из этих распределений (рис. 7, *в*). Таким образом, представленные данные по оценке как степени апоптоза, так и количества двунитевых разрывов ДНК подтверждают адаптирующий эффект на сетчатке глаза протонного излучения в дозе 1 Гр.

3. ОБСУЖДЕНИЕ

Высокий генотоксический порог у сетчатки глаза, как и нелинейная зависимость цитотоксического эффекта от дозы генотоксиканта указывают на способность сетчатки к восстановлению от повреждений [28, 29]. С одной стороны, необходимой предпосылкой к этому является механизм репарации ДНК (рис. 1), а с другой стороны, репарация оказывается недостаточной для клеточного и функционального восстановления сетчатки глаза (рис. 2 и 3). Ранее мы показали, что предварительное введение мышам нецитотоксической дозы МНМ делает сетчатку глаза более толерантной к последующему цитотоксическому действию агента по показателю ЭРГ (МНМ-прекоондиционирование сетчатки) [30]. Здесь, используя ту же схему опыта (табл. 1), мы показали, что толерантность сетчатки после МНМ-прекоондиционирования ассоциирована с понижением уровня экспрессии каспазы-3 в сетчатке (рис. 5). Каспаза-3, проапоптотическая эффекторная каспаза, расщепляет клеточные субстраты, ускоряя апоптотическую гибель клетки. Снижение ее экспрессии означает снижение вероятности клеточной гибели.

Важным клеточным компонентом сетчатки глаза являются глиальные клетки Мюллера (ГКМ). Эти клетки образуются на поздних стадиях нейрогенеза и не считаются предшественниками нейронов [31]. Вместе с тем они активно пролиферируют в ответ на повреждение и могут экспрессировать нейрональные маркеры [32], подтверждая тем самым свою латентную способность к нейрогенезу. Используя в качестве пролиферативного маркера бромдезоксидин, BrUdR, мы визуализировали ГКМ в сетчатке глаза у мышей после инъекции МНМ (табл. 1). В результате показали, что в ответ на МНМ-индуцированное повреждение возрастает пролиферация ГКМ. В МНМ-прекоондиционированной сетчатке глаза это возрастание меньше, что, как мы полагаем, соответствует меньшей степени ее поврежденности по сравнению с поврежденностью непрекоондиционированной сетчатки (рис. 5). Этот результат также подтверждает способность зрелой сетчатки глаза к восстановлению после воздействия МНМ. Результаты, представленные на рис. 1 и 2, говорят о том, что ответ сетчатки на МНМ имеет характеристики, сходные с таковыми в ответ на излучения: нелинейность зависимости от дозы/наличие порога цитотоксического действия, активацию репаративных механизмов, апоптоз фоторецепторных клеток. Логично предполагать, что сетчатка глаза обладает также способностью к восстановлению и после радиационного воздействия. Исследование, аналогичное предыдущему, в котором в качестве адаптирующего воздействия мы использовали облучение протонами головы животных в дозе 1 Гр (табл. 2), подтвердило это предположение. TUNEL-флуоресценция наружного ядерного слоя (апоптоз фоторецепторных клеток) радиационно-прекоондиционированной сетчатки достоверно ниже таковой у необлученной сетчатки (рис. 6). Наблюдаемое снижение частоты

апоптоза, как показано на рис. 7, коррелирует со снижением количества двунитевых разрывов ДНК в клетках сетчатки, которые являются маркерами апоптотической дегенерации ДНК [33].

Связь между формированием двунитевых разрывов (ДР) в ДНК и апоптозом общеизвестна и показана во многих исследованиях [34]. И не удивительно, что снижение апоптотической гибели фоторецепторных клеток сетчатки глаза коррелирует со снижением количества ДР в них. Однако возникает вопрос, почему в прекондиционированной сетчатке при том же уровне генотоксического воздействия накапливается меньше ДР, чем в контроле. Хотя полученные данные не позволяют однозначно на него ответить, мы полагаем, что это может быть следствием активации репарации ДР в клетках прекондиционированной сетчатки. Ранее мы показали, что под действием протонного излучения в ДНК сетчатки формируются ДР и возрастает экспрессия фосфатидилинозитол-3-киназо-подобной киназы АТМ [22]. Аутоактивированная АТМ фосфорилирует по Ser-139 гистон H2AX в четырех ближайших к ДР нуклеосомах хроматина [35]. Хотя роль γ -H2AX как сенсора ДР невелика [36], он присоединяет и удерживает комплекс MRN [37]. Таким образом, протонное прекондиционирование сетчатки, индуцируя небольшое количество разрывов в ДНК, инициирует в области разрыва цепь реакций ДР \rightarrow АТМ \rightarrow γ -H2AX \rightarrow MRN, завершающуюся формированием активного репаративного комплекса γ -H2AX-MRN, в котором MRN представляет собой тройной комплекс Mre11-Rad50-Nsb1, осуществляющий репарацию ДР по механизму гомологичной рекомбинации [38]. Последующее воздействие ретиноксической дозы МНМ происходит на фоне благоприятствующей репарации (все участники процесса уже активированы), что приводит к увеличению толерантности, адаптивному ответу/радиационному гормезису. Не исключено, что аналогичный механизм может лежать и в основе адаптивного ответа сетчатки на МНМ [30], поскольку здесь также могут образовываться ДР в ДНК, но, в отличие от радиации, механизм формирования ДР под действием МНМ опосредован эксцизионной репарацией возникающих в противоположащих цепях АП-сайтов ДНК [39].

В качестве примера радиационного гормезиса (благоприятного действия ионизирующего излучения) на зрение отметим исследование в 1958–1998 гг. 10000 пациентов, перенесших атомную бомбардировку в Японии [40]. В этой работе показана отрицательная дозовая зависимость частоты глаукомы исследованных пациентов ($p = 0,0025$) и снижение у них частоты глаукомы по сравнению со спонтанным уровнем заболевания. В работе [41] мышей DBA/2J, генотипически предрасположенных к глаукоме, подвергали тотальному γ -облучению в дозе 10 Гр с последующей в/в-инъекцией сингенного костного мозга (лишенного Т-лимфоцитов). В то время как у необработанных мышей через 12–14 мес развивалась типичная картина глаукоматозной дегенерации сетчатки, у леченых животных дегенерации не наблюдалось. Тотальное низкодозовое (0,65–2 Гр) γ -облучение мышей с наследственным пигментным ретинитом оказывало защитное действие от развития патологии в сетчатке у животных [42]. Нейропротекторный эффект γ -облучения прослеживался морфологически и функционально (ЭРГ). На феномене радиационного гормезиса базируются некоторые терапевтические процедуры. В последнее время для подавления неоваскуляризации используется мягкое X-излучение [43, 44] или β -частицы [45] (дозы 15 и 24 Гр) для стереотаксического облучения глаз пациентов с возрастной макулярной дегенерацией сетчатки. Во всех случаях отмечается подавление неоваскуляризации хориоиды и отсутствие отягощающих последствий в течение последующих 12 мес наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по крайней мере, два вопроса, представляющих фундаментальный и практический интерес, требуют дальнейшего исследования.

Первый — это определение пороговой дозы радиационного воздействия, выше которой механизмы, обеспечивающие достаточно высокую устойчивость зрелой сетчатки глаза к облучению, оказываются несостоятельными. Ответ на этот вопрос принципиально важен, поскольку превышение этого порога может реально привести к развитию дегенеративного заболевания сетчатки глаза, т. е. к частичной или полной утрате зрения.

Второй вопрос — это исследование механизмов, обеспечивающих так называемый адаптивный ответ сетчатки глаза на действие малых доз облучения или химических мутагенов, и реальная оценка возможностей использования этого феномена в клинической или гигиенической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gorgels T. G. et al.* Retinal Degeneration and Ionizing Radiation Hypersensitivity in a Mouse Model for Cockayne Syndrome // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27, No. 4. P. 1433–1441.
2. *Логонова М. Ю. и др.* Радиорезистентность сетчатки: под действием гамма-излучения в сетчатке мышей формируются разрывы ДНК, увеличивается содержание белка p53, сопровождаемые репарацией ДНК и отсутствием апоптоза клеток // *Рад. биология. Радиоэкология.* 2008. Т. 48, № 6. С. 698–704.
3. *Brady L. W.* Ocular Complications of High-Dose Radiotherapy // *Oncology (Williston Park).* 1996. V. 10, No. 7. P. 981–984.
4. *Barabino S. et al.* Radiotherapy-Induced Ocular Surface Disease // *Cornea.* 2005. V. 24, No. 8. P. 909–914.
5. *Hazin R. et al.* Ocular Complications of Cancer Therapy: a Primer for the Ophthalmologist Treating Cancer Patients // *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2009. V. 20, No. 4. P. 308–317.
6. *Salvin J. H., Hendricks D.* Ophthalmology Manifestations of Pediatric Cancer Treatment // *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2012. V. 23, No. 5. P. 394–399.
7. *Monroe A. T. et al.* Preventing Radiation Retinopathy with Hyperfractionation // *Intern. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 2005. V. 61, No. 3. P. 856–864.
8. *Bhandare N. et al.* Does Altered Fractionation Influence the Risk of Radiation-Induced Optic Neuropathy? // *Ibid.* V. 62, No. 4. P. 1070–1077.
9. http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=12045&displayrelated=22
10. *Mao X. W. et al.* Spaceflight Environment Induces Mitochondrial Oxidative Damage in Ocular Tissue // *Rad. Res.* 2013. V. 180, No. 4. P. 340–350.
11. *Tombran-Tink J., Bamstable C. J.* Space Flight Environment Induces Degeneration in the Retina of Rat Neonates // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 572. P. 417–424.
12. *Mader T. H. et al.* Optic Disc Edema in an Astronaut after Repeat Long-duration Space Flight // *J. Neuroophthalmol.* 2013. V. 33, No. 3. P. 249–255.
13. *Mader T. H. et al.* Optic Disc Edema, Globe Flattening, Choroidal Folds, and Hyperopic Shifts Observed in Astronauts after Long-duration Space Flight // *Ophthalmology.* 2011. V. 118, No. 10. P. 2058–2069.
14. *Imperia P. S., Lazarus H. M., Lass J. H.* Ocular Complications of Systemic Cancer Chemotherapy // *Surv. Ophthalmol.* 1989. V. 34, No. 3. P. 209–230.

15. *al-Tweigeri T., Nabholtz J. M., Mackey J. R.* Ocular Toxicity and Cancer Chemotherapy. A Review // *Cancer*. 1996. V. 78, No. 7. P. 1359–1373.
16. *Eagle R. C. Jr. et al.* Histopathologic Observations after Intra-arterial Chemotherapy for Retinoblastoma // *Arch. Ophthalmol.* 2011. V. 129, No. 11. P. 1416–1421.
17. *Giralt J. et al.* Severe Visual Loss in a Breast Cancer Patient on Chemotherapy // *Med. Oncol.* 2012. V. 29, No. 4. P. 2567–2569.
18. *Williams T. P., Henrich S., Reiser M.* Effect of Eye Closures and Openings on Photostasis Albino Rats // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. V. 39, No. 3. P. 603–609.
19. *Jovtchev G., Menke M., Schubert I.* The Comet Assay Detects Adaptation to MNU-Induced DNA Damage in Barley // *Mutat. Res.* 2001. V. 493, No. 1–2. P. 95–100.
20. *Evensen G., Seeberg E.* Adaptation to Alkylation Resistance Involves the Induction of a DNA Glycosylase // *Nature*. 1982. V. 296, No. 5859. P. 773–775.
21. *Tsubura A. et al.* Review: Animal Models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced Mammary Cancer and Retinal Degeneration with Special Emphasis on Therapeutic Trials // *In Vivo*. 2011. V. 25, No. 1. P. 11–22.
22. Тронов В. А. и др. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза // *Цитология*. 2012. Т. 54, № 3. С. 261–269.
23. *Wohl S. G. et al.* *In Situ* Dividing and Phagocytosing Retinal Microglia Express Nestin, Vimentin, and NG2 *in Vivo* // *PLoS ONE*. 2011. V. 6, No. 8. P. 1–18.
24. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
25. http://www.trevigen.com/item/3/13/118/508/TACS_2_TdT_Fluorescein_Kit/
26. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
27. *Kocínca K. et al.* A Cross-Platform Public Domain PC Image-analysis Program for the Comet Assay // *Mutat. Res.* 2003. V. 534, No. 1–2. P. 15–20.
28. *Jenkins G. J. et al.* Do Dose Response Thresholds Exist for Genotoxic Alkylating Agents? // *Mutagenesis*. 2005. V. 20, No. 6. P. 389–398.
29. *Johnson G. E. et al.* Non-Linear Dose-Response of DNA-Reactive Genotoxins: Recommendations for Data Analysis // *Mutat. Res.* 2009. V. 678, No. 2. P. 95–100.
30. Виноградова Ю. В. и др. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов // *Рад. биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54, № 4. С. 385–392.
31. *Ooto S. et al.* Potential for Neural Regeneration after Neurotoxic Injury in the Adult Mammalian Retina // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101, No. 37. P. 13654–13659.
32. *Das A. V. et al.* Neural Stem Cell Properties of Müller Glia in the Mammalian Retina: Regulation by Notch and Wnt Signaling // *Dev. Biol.* 2006. V. 299, No. 1. P. 283–302.
33. Разин С. В., Юдинкова Е. Ю. Крупномасштабная фрагментация ДНК при апоптозе: разрезается ли геном по границам топологических доменов? // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1998. № 2. С. 167–171.
34. *Lips J., Kaina B.* DNA Double Strand Breaks Trigger Apoptosis in p53-Deficient Fibroblasts // *Carcinogenesis*. 2001. V. 22, No. 4. P. 579–585.
35. *Mah L.-J., El-Osta A., Karagiannis T. C.* γ -H2AX: A Sensitive Molecular Marker of DNA Damage and Repair // *Leukemia*. 2010. V. 24, No. 4. P. 679–686.
36. *Celeste A. et al.* Histone H2AX Phosphorylation is Dispensable for the Initial Recognition of DNA Breaks // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5, No. 7. P. 675–679.
37. *Furuta T. et al.* Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-Dependent DNA Double-Strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, No. 22. P. 20303–20312.

38. *Li X., Heyer W.D.* Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance // *Cell Res.* 2008. V. 18, No. 1. P. 99–113.
39. *Lomax M.E., Cumiffe S., O'Neill P.* Efficiency of Repair of an Abasic Site within DNA Clustered Damage Sites by Mammalian Cell Nuclear Extracts // *Biochemistry.* 2004. V. 43, No. 34. P. 11017–11026.
40. *Yamada M. et al.* Noncancer Disease Incidence in Atomic Bomb Survivors, 1958–1998 // *Rad. Res.* 2004. V. 161, No. 6. P. 622–632.
41. *Anderson M. G. et al.* High-Dose Radiation with Bone Marrow Transfer Prevents Neurodegeneration in an Inherited Glaucoma // *PNAS.* 2005. V. 102, No. 12. P. 4566–4571.
42. *Otani A. et al.* Low-Dose-Rate, Low-Dose Irradiation Delays Neurodegeneration in a Model of Retinitis Pigmentosa // *Am. J. Pathol.* 2012. V. 180, No. 1. P. 328–336.
43. *Moshfeghi D.M., Kaiser P.K., Gertner M.* Stereotactic Low-Voltage x-Ray Irradiation for Age-Related Macular Degeneration // *Br. J. Ophthalmol.* 2011. V. 95, No. 2. P. 185–188.
44. *Cantley J.L. et al.* Influence of Eye Size and Beam Entry Angle on Dose to Non-targeted Tissues of the Eye during Stereotactic x-Ray Radiosurgery of AMD // *Phys. Med. Biol.* 2013. V. 58, No. 19. P. 6887–6896.
45. *Avila M.P. et al.* Twelve-Month Safety and Visual Acuity Results from a Feasibility Study of Intraocular, Epiretinal Radiation Therapy for the Treatment of Subfoveal CNV Secondary to AMD // *Retina.* 2009. V. 29, No. 2. P. 157–169.

Получено 1 июля 2014 г.