

На правах рукописи

Некрасова Елизавета Игоревна

**ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕТЧАТКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛКИЛИРУЮЩИХ
АГЕНТОВ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК МЮЛЛЕРА КАК
ПРЕДПОСЫЛКА ЕЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У МЫШЕЙ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: **Тронов Виктор Александрович,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Посыпанова Галина Ароновна,**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины
Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных
технологий Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»

Ефремов Юрий Михайлович,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
отдела современных биоматериалов Института
регенеративной медицины Федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской
академии наук (ИБР РАН)

Защита состоится " _____ " _____ 2020 г. в _____ час. на заседании
диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН) по
адресу: 119991, г. Москва, ул. Ленинский проспект, д. 38 и на сайте:

<https://biochemphysics.ru/struktura-ibxf-ran/dissertacionnyj-sovet/razmeshhennyie-dissertaczii/kopiya-dissertacziya-nekrasovoj-elizavetyi-igorevnyi.html>

Автореферат разослан " _____ " _____ 2020 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.039.01
Кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нейродегенеративные заболевания сетчатки включают в себя пигментный ретинит, возрастную макулярную дегенерацию сетчатки, глаукому и диабетическую ретинопатию. В основе этих заболеваний лежит процесс необратимой утраты ретинальных нейронов. Две стратегии лечения этих заболеваний сформировались в последнее время. Первая стратегия основывается на терапии, включающей трансплантацию стволовых клеток. Вторая стратегия связана со стимуляцией эндогенных стволовых клеток в глии, способных восполнять патологическую утрату клеток сетчатки. Глия в сетчатке, состоит на 90% из глиальных клеток Мюллера (ГКМ), которые в ответ на гибель клеток в сетчатке подвергаются глиозу, включающему в себя дедифференцировку, пролиферацию и в конечном счете дифференцировку ГКМ в ретинальные фоторецепторы и нейроны. Процесс регенерации сетчатки присутствует в некоторых видах позвоночных (рыбы, амфибии, птицы).

Важнейшими источниками повреждения сетчатки являются наследственная предрасположенность к дегенерации из-за мутаций в специфических генах; естественная агрессивность окружающей среды (оксигенация, световое и радиационное воздействия, химическая токсичность), и радиационная и химиотерапия при онкологических заболеваниях.

Офтальмологические осложнения, вызванные цитотоксической химиотерапией, часто недооцениваются из-за приоритета других побочных эффектов, угрожающих жизни пациентов. Однако в последнее время обращается внимание на окуло- и ретинотоксичность химиотерапии опухолей, поскольку большинство применяемых при этом препаратов обнаруживают ретинотоксичность *in vitro*, а используемые в химиотерапии интерферон и алкилирующие соединения проявляют ретинотоксическое действие в экспериментах на животных. Это обстоятельство привлекает к ним внимание, как к возможным индукторам повреждения сетчатки в моделях дегенерации и регенерации. В частности, метилнитрозомочевина (МНМ) широко используется в животных моделях для исследования дегенерации и восстановления сетчатки.

Хотя во многих работах наблюдали глиоз ГКМ в сетчатке грызунов, существует устойчивое представление о том, что у млекопитающих регенеративная способность сетчатки крайне ограничена: только небольшая часть потомства делящихся ГКМ у млекопитающих выживает, сохраняя способность к делению и дифференцировке; основная же часть делящихся ГКМ дифференцируется в фибробласты и формирует глиальный шрам. С одной стороны, это ограничение препятствует заместительной терапии сетчатки с помощью клеточной трансплантации. С другой стороны, механизм наблюдаемого ограничения пролиферации ГКМ в сетчатке пока не известен. Таким образом, понимание молекулярных событий в ГКМ после повреждения сетчатки может (в рамках второй

стратегии терапии) наметить путь к усилению регенеративной способности сетчатки у млекопитающих.

Степень разработанности темы

Для изучения повреждения и регенерации сетчатки разработаны и используются модели на животных (чаще всего на грызунах). В одной из работ, в качестве агента, повреждающего сетчатку, использовали N-метил-D-аспартат (NMDA), лиганд для NMDA-рецептора; активация рецептора вызывала апоптоз нейронов сетчатки у крыс. В ответ на это ГКМ в сетчатке подвергались пролиферативному глиозу и дифференцировке в ретинальные нейроны. В другой работе в ответ на индуцированное МНМ повреждение фоторецепторов в сетчатке у крыс также идентифицировали глиоз ГКМ и их дифференцировку, но в направлении фоторецепторов (по экспрессии родопсина). Таким образом, результаты этих двух работ показывают, что гибель ретинальных нейронов или фоторецепторов вызывает глиоз ГКМ в сетчатке у крыс, ассоциированный с пролиферацией и последующей дифференцировкой в направлении клеток, подвергавшихся цитотоксическому воздействию.

МНМ уже более 20 лет используется в исследованиях по дегенерации сетчатки. Несмотря на сравнительно короткое время жизни в крови, МНМ легко преодолевает гематоретинальный барьер, достигает сетчатки и вызывает гибель, главным образом, фоторецепторных клеток в ней.

Наряду с ретинотоксическим действием МНМ, известна высокая устойчивость ГКМ в сетчатке к МНМ: ГКМ в ответ на МНМ-повреждение сохраняют жизнеспособность, активируются и входят в цикл. В противоположность этому, неделящиеся фоторецепторы подвергаются апоптозу. Связь этих эффектов с повреждением и репарацией ДНК в ГКМ, индуцированным генотоксикантом МНМ в клетках сетчатки и ГКМ, пока не исследована. В данной работе предпринята попытка определить повреждение ДНК в ГКМ сетчатки в связи с возможной причастностью этих повреждений к ограничению пролиферации ГКМ и регенерации сетчатки у мышей.

Цели и задачи

Цель работы - установить связь между ретинотоксическим стрессом, индуцированным алкилирующим агентом и пролиферативным ответом на него ГКМ в сетчатке у мышей.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить ретинотоксичность 4-х алкилирующих противоопухолевых препаратов (алкилирующих агентов) в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и сопоставить полученные результаты с литературными данными по их ретинотоксичности в химиотерапии рака;

2. Разработать метод количественной оценки пролиферативной активности ГКМ в сетчатке у мышей в ответ на действие алкилирующего агента;

3. Оценить индуцированное алкилирующим агентом повреждение ДНК в клетках сетчатки, в том числе и в ГКМ, и оценить роль репарации ДНК в цитотоксическом эффекте алкилирующего агента на фоторецепторы;

4. Оценить пролиферацию ГКМ в сетчатке у мышей в ответ на ретинотоксическое действие МНМ в зависимости от концентрации повреждающего агента;

5. Проанализировать связь пролиферации ГКМ в сетчатке мышей с индуцированными повреждениями и репарацией ДНК.

Научная новизна

1. Впервые проанализирована литература по ретинотоксичности алкилирующих соединений и интерферона в связи с их применением в химиотерапии рака; проведено собственное экспериментальное сравнение ретинотоксичности 4-х алкилирующих соединений, позволившее сделать рациональный выбор в пользу МНМ в качестве повреждающего агента в модели дегенерации – регенерации сетчатки у мышей.

2. Разработан чувствительный метод количественной оценки пролиферации ГКМ в сетчатке у мышей и одновременно поврежденности ДНК. Метод основан на сочетании метода щелочных комет с включением в ДНК маркера пролиферации бромдезоксимуридина (BrdU). Метод может быть применим в решении аналогичных задач на других видах животных.

3. С помощью разработанного метода показано накопление повреждений ДНК в клетках сетчатки (разрывов и щелочлабильных сайтов) под действием МНМ. Разрывы ДНК нелинейно накапливаются с увеличением дозы МНМ и формируются в результате дисбаланса этапов репарации ДНК.

4. Повреждение ДНК вызывает апоптоз фоторецепторов и активирует пролиферацию ГКМ. Доля пролиферирующих клеток не превышает 3% от всех клеток сетчатки.

5. Зависимость количества репарируемых повреждений ДНК в клетках сетчатки от дозы МНМ совпадает с МНМ-дозовой зависимостью пролиферации ГКМ. Это говорит о связи процессов пролиферации ГКМ и репарации ДНК в сетчатке (фоторецепторах).

6. Показано, что, в ответ на цитотоксическое действие МНМ, ГКМ проходят один цикл пролиферации, после которого в их ДНК обнаруживаются повреждения (разрывы и щелочлабильные сайты), а в сетчатке увеличивается экспрессия белка P53.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые проанализирована ретинотоксичность алкилирующих агентов, используемых в химиотерапии рака, в связи с участием в ней ферментов репарации ДНК - N-алкиладенин-ДНК-гликозилазы и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы.

Экспериментальные результаты работы подтверждают концепцию об участии в цитотоксическом эффекте МНМ на фоторецепторах сетчатки механизма эксцизионной репарации ДНК.

Показано, что МНМ-индуцированная пролиферация ГКМ в сетчатке у мышей ограничивается одним циклом деления, после которого в ДНК наблюдаются повреждения и высокая экспрессия белка p53. Это может рассматриваться как p53-активированный чекпойнт, ограничивающий пролиферацию ГКМ и, возможно, препятствующий регенерации сетчатки. Эти теоретические результаты имеют и практическое значение для решения проблемы восстановления клеток сетчатки глаза. В частности, они могут быть использованы при разработке стратегии борьбы с нейродегенеративными заболеваниями сетчатки.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы исследований. Методический подход для исследования ГКМ у мышей базировался на «модели *in vivo* регенерации фармакологически поврежденной сетчатки взрослых животных», в которой индуцировали острую дегенерацию сетчатки у мышей однократной внутривнутрибрюшинной инъекцией ретинотоксического агента. После извлечения сетчатки, глиоз и пролиферация ГКМ, в суспензии и срезах, оценивали по включению в ядра ГКМ пролиферативного маркера BrdU (бромдезоксисуридин). Суспензию исследовали методом иммуноцитохимии (включение BrdU в ДНК); и методом ДНК-комет (оценка повреждений ДНК, их репарации). Для оценки повреждений ДНК сетчатки алкилирующими агентами *in vitro*, суспензию клеток сетчатки, полученную от необработанных ранее животных, обрабатывали *in vitro* препаратами и оценивали повреждение ДНК методом комет. Срезы сетчатки использовали для морфометрических измерений, оценки тканевого апоптоза методом TUNEL, а также для иммуногистохимических исследований, с применением моноклональных антител, включения BrdU и экспрессии белков-маркеров повреждения ДНК и апоптоза: p53 и каспазы 3. Все вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентными красителями FITC или Alexa594. На заключительном этапе слайды подвергали флуоресцентной микроскопии. Для ladder – детекции апоптотической фрагментации ДНК использовали суспензию клеток, из которых экстрагировали суммарную ДНК и разделяли электрофоретически в агарозном геле. Физиологическую активность сетчатки исследовали методом скотопической электроретинографии, ЭРГ. Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения Origin Pro 8.1. (Originlab Corporation, США). Подсчет числа клеток и апоптотических фокусов проводили с помощью программы ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, США). Повреждение ДНК определяли из анализа ДНК-комет с помощью программы CASP 1.2.2. (Wroclaw, Institute of Theoretical Physics, Польша).

Экспериментальная работа была выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики

им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Положения, выносимые на защиту

1. Из 4-х исследованных в работе алкилирующих агентов максимальной ретинотоксичностью (и минимальной общей токсичностью) на мышах обладает МНМ; в силу этого МНМ выбрана в качестве ретинотоксического агента в модели регенерации – дегенерации у мышей;

2. Ретинотоксичность МНМ коррелирует с образованием цитотоксичных разрывов и щелочлабильных сайтов в ДНК, которые формируются в результате активации ферментов репарации; цитотоксичность МНМ проявляется в гибели фоторецепторов без видимых повреждений других клеточных слоев сетчатки;

3. В ответ на гибель фоторецепторов активируется пролиферация ГКМ, которая выражается в увеличении числа BrdU-позитивных клеток;

4. После завершения одного цикла деления в ГКМ обнаруживается высокая степень повреждения ДНК и возрастание экспрессии белка p53 – универсального маркера повреждения ДНК и активатора точки рестрикции клеточного цикла G1 (G1-checkpoint);

5. Наличие повреждений ДНК и высокая экспрессия p53 являются предпосылками для клеточного ответа на повреждение ДНК в виде блока дальнейшей пролиферации ГКМ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность экспериментальных результатов, полученных в работе, и обоснованность выводов обеспечивалась применением общепринятых физико-химических методов исследования (включая метод ДНК-комет, иммуноцит- и иммуногистохимические методы исследования, флуоресцентную микроскопию, ladder-детекцию апоптотической фрагментации ДНК, электроретинографию), с последующей статистической обработкой результатов экспериментальных исследований с применением стандартных программ, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, которые были получены с применением различных методов исследования.

Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях: на Российском общенациональном офтальмологическом форуме (Москва, 2013); в Программе исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (Москва, 2013); на XIV Всероссийской конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017); на Ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (Москва, 2017 и 2018 год); на XVIII ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН - ВУЗЫ

"Биохимическая физика" (Москва, 2018); на VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019 г).

Работа была поддержана исследовательской Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», 2013-2015 гг. и грантом РФФИ № 16-04-00133 А «Исследование структурного и функционального восстановления сетчатки глаза мышей после ретинотоксического воздействия ионизирующим излучением и метилнитрозомочевинной» 2016-2018 гг.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций и 6 тезисов докладов.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в выборе направления и постановке задач исследования, а также в разработке метода количественной оценки пролиферации ГКМ в сетчатке у мышей и одновременно поврежденности ДНК. Автор самостоятельно выполнял анализ литературных данных, участвовал в выборе методов исследования и отборе проб, осуществлял все этапы подготовки проб, проведения экспериментов, обработки и интерпретации полученных результатов, а также подготовку материалов к публикациям. Измерения методом электроретинографии производились автором при участии научного сотрудника лаборатории радиационной биологии Объединенного института ядерных исследований Виноградовой Юлии Вячеславовны. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на ряде российских конференций.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 25 рисунков и 4 таблицы. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения (выводов), списка сокращений и условных обозначений, и списка литературы, включающего 229 наименований.

Основные сокращения, принятые в работе

5'dRP - 5-дезоксирибозофосфат; AAG - Алкиладенин-ДНК-гликозилаза; ACNU - Нимустин, амино-хлорэтил-нитрозомочевина; ATM - Протеинкиназа ATM (ataxia telangiectasia mutated); BCNU - Кармустин, N,N'-бис-(2-Хлорэтил)-N-нитрозомочевина; BER - Эксцизионная репарация оснований (base excision repair); BrdU - Бромдезоксидуридин; Casp 3 - Каспаза-3; DTIC - Дакарбазин, 5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamide; FITC - Флуоресцеинизотиоцианат (fluorescein isothiocyanate); G1-checkpoint - Точка рестрикции клеточного цикла G1; HC - Горизонтальные клетки; MGMT – Метилгуанинметилтрансфераза ; MMR - Пострепликативная коррекция нуклеотидов, репарация некоплементарных пар оснований (mis-match repair); mt - Момент хвоста кометы (tail moment); Mw - Молекулярный вес; N3meA - N3-метиладенин; N7meG - N7-метилгуанин; NAD+ - Никотинамидадениндинуклеотид; NMDA - N-метил-D-аспартат (синтетический

нейротоксин, лиганд для NMDA-рецептора на мембране нейронов); ОбмеG - Об-метилгуанин; p21 – Белок p21, ингибитор циклинкиназ; p53 - Белок p53, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл; PARP1 - Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1; PBS - Натрий-фосфатный буферный раствор; pol β - ДНК-полимераза β ; TMZ - Темозоломид; TUNEL - TUNEL-тест (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling); VEGF - Фактор роста эндотелия сосудов; АП-сайт - Апуриновый/апиримидиновый сайт; ГКМ - Глиальная клетка Мюллера; МНМ - Метилнитрозомочевина (methylnitrosourea); ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота; ЭРГ - Электроретинография, электроретинограмма.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Проанализированы современные данные о структуре сетчатки, ее повреждении и роли ГКМ в ее функционировании и регенеративном потенциале, а также данные о роли белка p53 и пострепликативной коррекции нуклеотидов MMR в ней. Обобщены литературные данные относительно окуло- и ретинотоксичности некоторых алкилирующих препаратов и интерферона, используемых в цитотоксической химиотерапии рака, и рассмотрены основные фармакологические модели дегенерации сетчатки у животных, используемые как для изучения механизмов дегенерации, так и возможности восстановления и защиты сетчатки от вредных воздействий.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Описаны основные объекты и методы исследования, а также материалы, используемые в работе.

Животные. Исследования проводили на половозрелых мышах-гибридах F1CBAxС57Bl6 (♀), в возрасте 2.5 мес. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °С, относительная влажность воздуха 60 ± 10 % и 12-часовой световой период), имели неограниченный доступ к воде и коммерческому питанию. Все процедуры с животными осуществлялись в соответствии с Положением Комитета по этике ИБХФ РАН.

Системное введение ретинотоксического агента и BrdU. Методический подход для исследования глиальных клеток Мюллера у мышей базировался на модели, в которой острая дегенерация сетчатки у мышей индуцируется системной (однократной внутрибрюшинной) инъекцией ретинотоксического агента. В ответ на дегенерацию сетчатки активируется пролиферация ГКМ, которую фиксировали по включению в ядра ГКМ пролиферативного маркера бромдезоксиуридина, BrdU (Sigma, США). В качестве индукторов повреждения сетчатки использовались 4 алкилирующих агента – метилнитрозомочевина (МНМ) (Sigma), темозоломид (TMZ) (Sigma), дакарбазин (DTIC) (Sigma) и нимустин (ACNU) (Sigma). Все реактивы в кристаллическом виде хранили при -60°C , растворяли в стерильном PBS непосредственно перед опытом в концентрации $\sim 0,1\text{M}$ и вводили мышам однократно внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 0.4 мл. Контрольным животным вводили равный объем PBS.

Спустя сутки после инъекции МНМ 3-6 раз в/б вводили BrdU, в виде раствора в стерильном PBS (10 мг/мл), доза 60-70 мг/кг на инъекцию (Таблица 1, схемы инъекций). Ретинотоксический эффект оценивали спустя 72-110 ч после инъекции препаратов.

Таблица 1. Частота активации ГКМ в сетчатке у мышей в контроле и в ответ на однократное введение МНМ в дозе 60мг/кг, сопровождаемые инъекциями маркера BrdU, в дозе BrdU 60мг/кг/инъекцию

	Схема инъекций	Инъекции/ часы	<N ГКМ/1000кл> ±sd	Комментарии
1		6 / 80 ч	1,25±1	Контроль (спонтанная пролиферативная активность ГКМ)
2		3 / 32 ч	0,13±0,1	Репаративный синтез в сетчатке
3		5 / 80 ч	10,80±1,45	Пролиферация ГКМ
4		6 / 80 ч	12,65±2,75	Пролиферация ГКМ

Получение суспензии клеток сетчатки. Животных усыпляли в парах хлороформа и изолировали глаза и сетчатку спустя более 5 ч после последней инъекции BrdU. Сетчатку диспергировали в объеме 0.2—0.4 мл PBS, дважды центрифугировали при 400 g, по 5 мин. Конечный осадок суспендировали в фетальной сыворотке быка, содержащей 10 % DMSO. Аликвоты суспензии хранили при -70 °С.

Обработка суспензии клеток алкилирующими агентами *in vitro*. Суспензию клеток сетчатки, полученную из интактных животных, и приготовленную по приведенной выше процедуре, инкубировали в PBS-буфере при 37°С, с растворенными в нем алкилирующими агентами в примерно эквимольных концентрациях. Токсический эффект оценивали по выходу повреждений ДНК в клетках сетчатки после 1 ч инкубации при 37°С, используя для этого метод ДНК-комет.

Метод ДНК-комет: иммобилизация клеток в агарозе, лизис, электрофорез и визуализация клеток. Размороженную суспензию клеток центрифугировали (400 g, 5 мин). Осадок суспендировали в растворе легкоплавкой агарозы (тип IV 4, Sigma) в PBS (0.7 %). Из суспензии готовился слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет. Стекла с застывшим гелем погружали в лизирующий раствор: 0.5 М Na₂EDTA, 2 % Na-лауроилсаркозил, 0.3 мг/мл протеиназы К, рН 8, 37 °С. Спустя 2 ч лизирующий раствор заменяли на стандартный солевой буфер (2.5 М NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 2 мМ Tris, рН 10) при 8°С на 15 ч. Щелочной лизис и электрофорез проводили в растворе, содержащем 30 мМ NaOH, 2 мМ Na₂EDTA, рН 13, (8 °С, 60 мин). По завершении электрофореза (15 V, 18-20 мин) щелочь в слайдах

нейтрализовали 0.4 М Tris, pH 7.5 и ополаскивали слайды в PBS. Пролиферирующие ГКМ проявляли с помощью первичных анти-BrdU антител (Abcam, США) и вторичных антител, ассоциированных с Alexa 594 (Mab2-Alexa594, Abcam, США). Фоновое окрашивание, проявляющее все ДНК-содержащие клетки в слайде, проводили красителем SYBR-Green I. ГКМ визуализировали в режиме красной флуоресценции Alexa 594. Популяцию всех клеток (комет) визуализировали в режиме зеленой флуоресценции с красителем SYBR-Green.

Сканирование слайда и интерпретация результатов. Сканирование слайда проводили на микроскопе, в автоматическом либо в ручном режиме. Сканировали весь слайд (18 × 18 мм) или его репрезентативную часть с шагом $dx=dy=0.35$ мм – размер прямоугольника, вписанного в круглое поле обзора микроскопа при увеличении 400× (Рисунок 1 а, б).

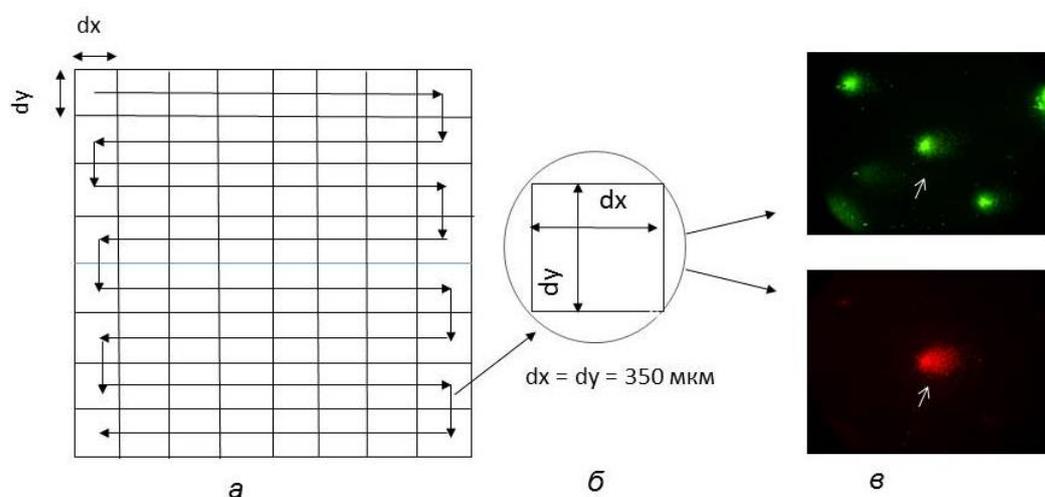


Рисунок 1. Пошаговая процедура сканирования слайда (а) и визуализация клеток в слайде.

Это прямоугольное поле, содержащее клетки/кометы (б), транслируется на экран монитора (в) и сохраняется в памяти компьютера. Сканирование происходит попеременно в зеленом и красном спектрах флуоресценции. Зеленые кометы окрашены SYBR Green I, красная комета – ГКМ, окрашенная анти-BrdU антителом с Alexa594. Стрелки на рисунке 1 в показывают одну и ту же комету в двух каналах флуоресценции. Первое сканирование давало изображение всех клеток (комет), содержащих ДНК. Второе сканирование давало изображение только BrdU-позитивных, красных клеток (комет). Подсчет числа клеток и анализ комет проводили на получаемых изображениях с помощью программы ImageJ 1.48v. Повреждение ДНК определяли из анализа ДНК-комет с помощью программы CASP 1.2.2. и оценивали по моменту хвоста комет (mt). Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений mt (Рисунок 2). Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова-Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$

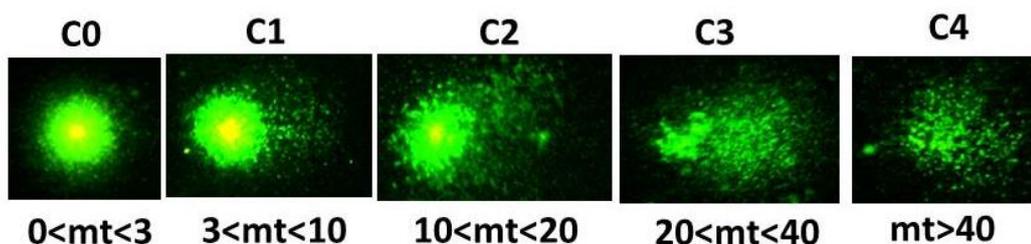


Рисунок 2. Классы ДНК-комет, получаемых из клеток сетчатки мышей, и соответствующие им диапазоны поврежденности, mt . C0 – отсутствие повреждений; C1 – низкий уровень повреждений; C2 – средний уровень повреждений; C3 – высокий уровень повреждений; C4 – апоптотическая клетка.

Приготовление тканевых срезов. Тканевые срезы сетчатки толщиной 8-12 мкм готовили из глаз, фиксированных сразу после извлечения в параформальдегиде, 4% в PBS, 8°C, 24 часа, с последующей стандартной процедурой спиртовой обработки (этанолом и ксилолом), впаивания в парафиновые блоки и приготовления срезов. Срезы микроскопировали в проходящем свете и во флуоресцентном режиме. Для морфометрического измерения слоев сетчатки использовали окулярную линейку.

Оценка апоптоза в ткани методом TUNEL. Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали набор The TACS® 2 TdT Fluorescein kit, (Trevigen, США) и рекомендованную методику к нему. Визуализацию микроскопических изображений на срезах проводили на микроскопе во флуоресцентном режиме, с набором фильтров для регистрации флуоресценции FITC.

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимических исследований тканевые срезы после депарафинизации, фиксации и пермеабилзации в соответствии со стандартным протоколом к набору The TACS® 2 TdT Fluorescein kit, (Trevigen, США), инкубировали с моноклональными антителами к белку p53 (Abcam, США), каспазе 3 (Abcam, США) и к BrdU (Abcam, США). Все вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентными красителями (Mab2-Alexa594, Mab2-FITC, Mab2-FITC, Abcam, США). На заключительном этапе слайды подвергали флуоресцентной микроскопии. Количественно оценивали либо число флуоресцирующих клеток на единичную площадь среза, либо суммарную интенсивность флуоресценции единичной площади среза которую сравнивали с контролем.

Детекция апоптотической фрагментации ДНК. Для ladder-детекции апоптотической фрагментации ДНК использовали суспензию клеток после стандартной процедуры экстракции из них ДНК и ее электрофоретического разделения в агарозном геле. Электрофорез в 1,5% агарозном геле проводили при напряжении 2V/см под визуальным контролем формирования лесенки нуклеосом в геле.

Регистрация электроретинограммы.

Физиологическую активность сетчатки исследовали методом скотопической электроретинографии, ЭРГ. Адаптированных к темноте животных анестезировали в/м

инъекцией смеси золитил-ксилазин 1/1. 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, 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 с интервалом ≥ 3 мин.

Статистическая обработка результатов исследования. Все эксперименты на животных и *in vitro* проводились в 3-х независимых повторах; представлены средние значения из них \pm SD; сравнение экспериментальных распределений значений параметров осуществлялось с помощью непараметрической статистики Колмогорова-Смирнова, считая различия достоверными при $P < 0.05$. Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения Origin Pro 8.1.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. Оценка ретинотоксичности 4-х алкилирующих агентов, используемых в химиотерапии. Сравнивали ретинотоксичность 4-х алкилирующих препаратов, используя метод ДНК-комет. Спустя 1 час инкубации извлеченной сетчатки *in vitro* с препаратами, и последующей оценке в суспензии, агенты располагаются в ряд по убыванию ретинотоксичности следующим образом: МНМ>ТМЗ>ДТИС>АСНУ, причем последний в этом ряду АСНУ не обнаружил ретинотоксического действия *in vitro* (Рисунок 3 а). При аналогичном исследовании ретинотоксичности *in vivo*, мышам однократно внутривенно вводили препараты (за исключением высокотоксичного для животных нимустина), и эффект на ДНК в сетчатке оценивали спустя 5 ч и 72 ч после инъекции препаратов (Рисунок 3 б, в). Через 5 ч, на момент достижения максимального ДНК-повреждающего эффекта МНМ *in vivo*, эффект остальных алкилирующих агентов практически не отличим от контроля.

Таким образом, в опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что наивысшую ретинотоксичность и стабильность результатов обнаруживает МНМ. Поэтому именно МНМ мы использовали для последующей ретинотоксической активации ГКМ *in vivo*.

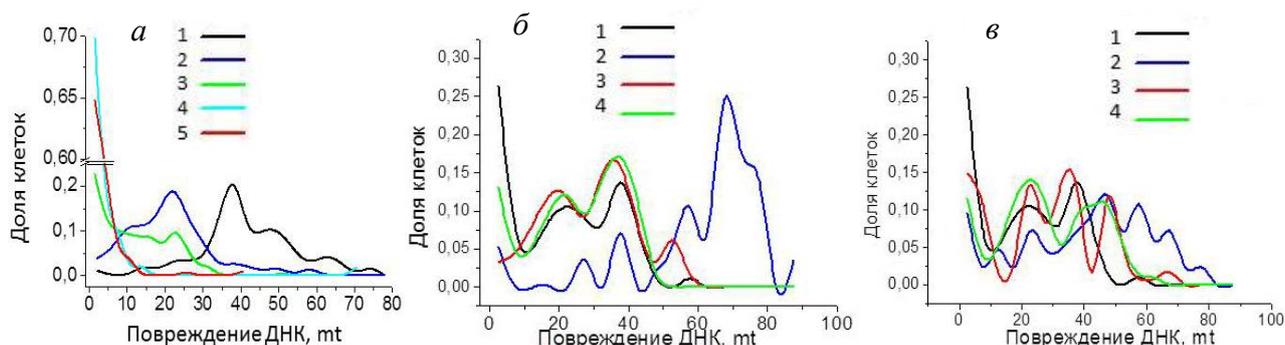


Рисунок 3. Частотные распределения клеток сетчатки мышей по поврежденности ДНК в них. (а) - после 1 ч. инкубации сетчатки с алкилирующими агентами *in vitro*; (б) - спустя 5 часов после внутрибрюшинной инъекции алкилирующих агентов мышам; (в) - спустя 72 часов после внутрибрюшинной инъекции алкилирующих агентов мышам (см. Таблицу 2 для расшифровки).

Таблица 2. Повреждение ДНК, индуцированное алкилирующими агентами в клетках сетчатки мышей *in vitro* и *in vivo*. Средние значения из распределений на рисунке 3

* - различия с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Условия	<i>in vitro</i> , 1 ч					<i>in vivo</i> , 5 ч				<i>in vivo</i> , 72 ч			
	МНМ 0,7 mM	TMZ 0,7 mM	DTIC 0,9 mM	ACNU 0,4 mM	Конт- роль	Конт- роль	МНМ 0,7 mM	TMZ 0,7 mM	DTIC 0,9 mM	Конт- роль	МНМ 0,7 mM	TMZ 0,7 mM	DTIC 0,9 mM
Кривая на рисунке 3	а, 1	а, 2	а, 3	а, 4	а, 5	б, 1	б, 2	б, 3	б, 4	в, 1	в, 2	в, 3	в, 4
$\langle mt \rangle \pm SD$	42±13	21±11	12±9	4±9	3±5	21±15	61±20*	21±12	25±13	21±15	40±20*	28±17	39±17*

* - различия с контролем достоверны при $p < 0,05$

3.2. Влияние МНМ на структуру и функциональную активность сетчатки у мышей. МНМ-индуцированной дегенерации подвергаются главным образом клетки фоторецепторов в наружном ядерном слое сетчатки, в то время как остальные слои сетчатки сохраняют интактную морфологию (Рисунок 4 а). Структурная деструкция фоторецепторов связана с их апоптотической гибелью (Рисунок 4, а,б), что также подтверждается возрастанием экспрессии эффекторной каспазы 3 (Рисунок 4 в) и межнуклеосомной деградацией хроматина (Рисунок 4 г). Максимум гибели приходится на 72 ч после воздействия, последующее снижение частоты апоптоза связано с фагоцитозом поврежденных клеток в ткани.

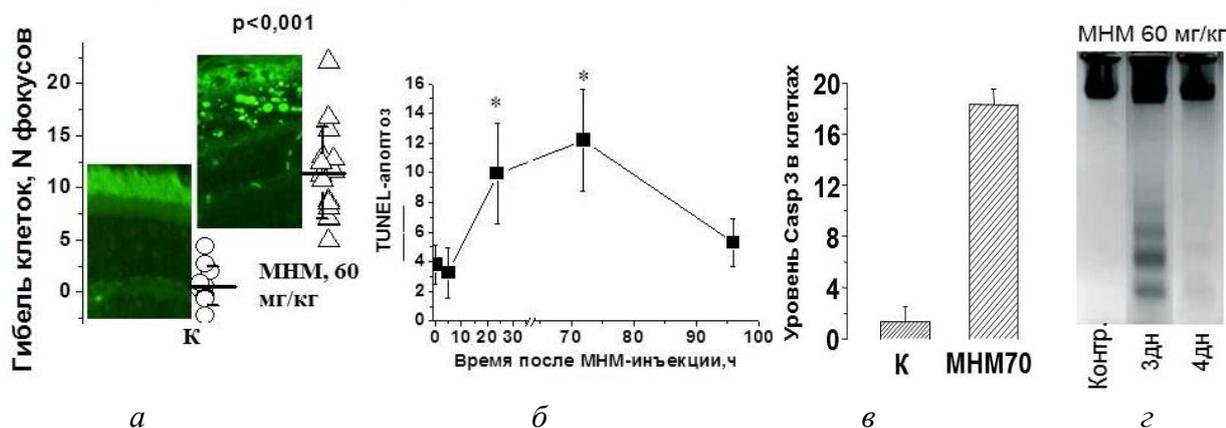


Рисунок 4. Влияние МНМ на гибель фоторецепторов в сетчатке у мышей. а - уровень TUNEL-апоптоза в сетчатке на третьи сутки после введения МНМ, по сравнению с контролем (по оси ординат – число фокусов на единицу площади среза); б – динамика TUNEL-апоптоза после однократной инъекции МНМ, 60 мг/кг; в - экспрессия каспазы 3 в сетчатке у мышей в ответ на действие МНМ в дозе 70 мг/кг (интенсивность флуоресценции вторичного анти-Casp3 конъюгата на единицу площади микросреза сетчатки, среднее±sd); г - электрофорез апоптотических нуклеосомных фрагментов ДНК из сетчатки глаз у мышей после инъекции МНМ в дозе 60 мг/кг.

Параллельно со структурными повреждениями падает функциональная активность сетчатки в виде снижения амплитуды электроретинограммы (Рисунок 5

б): однако это снижение функциональной активности под действием дозы МНМ 35 мг/кг обратимо. Это говорит о способности сетчатки к восстановлению от повреждений. Поскольку МНМ является ДНК-тропным алкилирующим агентом, то очевидной предпосылкой к восстановлению сетчатки может быть процесс репарации ДНК в ней.

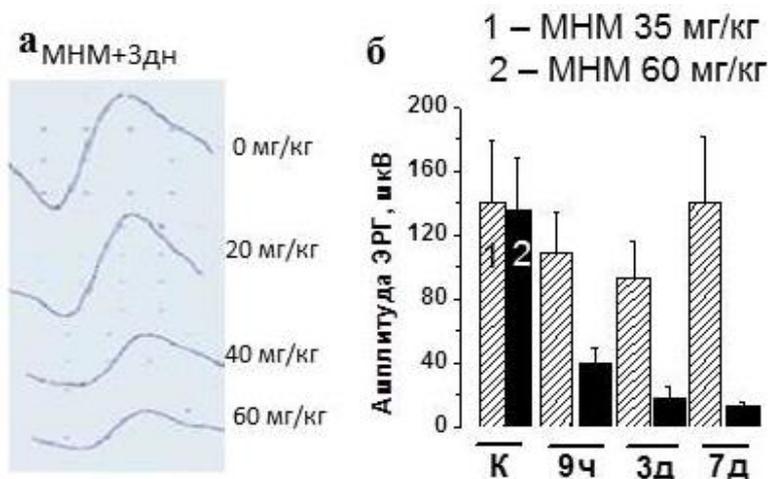


Рисунок 5. Функциональный ответ сетчатки у мышей на инъекцию МНМ. *а* - скопическая ЭРГ; *б* – изменение амплитуды (а+б)-волн ЭРГ во времени после инъекции МНМ.

3.3. МНМ-индуцированное повреждение и репарация ДНК в клетках сетчатки у мышей. Используемый метод регистрации ГКМ в сетчатке базируется на включении маркера BrdU в течение не менее 72 ч, т.е., по крайней мере, одного цикла пролиферации ГКМ после ретинотоксического действия МНМ (Таблица 1, схемы 3 и 4). Проникшая в клетку МНМ метилирует основания в ДНК, которые являются субстратом для механизмов репарации, с образованием временных АП-сайтов и разрывов цепей ДНК, которые детектируются методом щелочных комет. Динамика этих процессов отражена на рисунке 6, согласно которому повреждение ДНК максимально на 5 ч после инъекции МНМ, и достоверно снижается спустя 15 ч, практически до контрольного уровня, причем следует отметить, что эта репарация не сопровождается включением BrdU в ДНК (что отражено в Таблице 1, схеме 2, где показано, что уровень репаративного включения BrdU в ДНК сетчатки, обработанной МНМ, даже ниже его спонтанного включения в интактной сетчатке). Но на третьи сутки, разрывы в ДНК достоверно нарастают (Рисунок 6 б). Их появление является следствием гибели фоторецепторов и апоптотической деградации ДНК в них, что подтверждается рисунком 4 б).

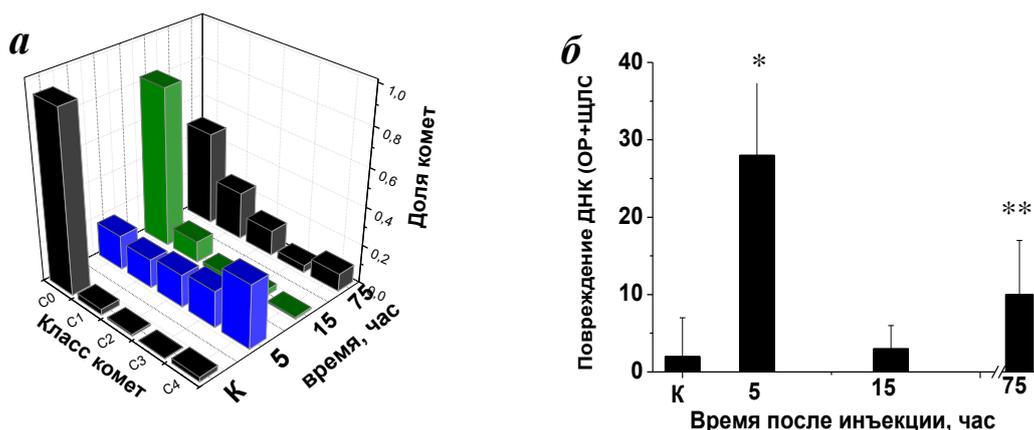


Рисунок 6. Гистограммы повреждения ДНК (*а*) и средние значения из них (*б*) в клетках сетчатки мышей после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг и репаративной инкубации *in vivo* К – интактная сетчатка ($mt=2\pm 6$); 5 – МНМ+5ч ($mt=28\pm 12$); 15 – МНМ+15ч ($mt=3\pm 3$); 75 – МНМ+75ч ($mt=10\pm 7$). Различие с контролем: * $p<0,01$, ** $p<0,05$.

3.4. Повреждение ДНК в ГКМ

Поврежденность ДНК в BrdU-позитивных ГКМ оценивали спустя 72 ч после системной инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг. К этому времени завершается один цикл пролиферации ГКМ. Как видно из рисунка 7, профили гистограмм и средние значения mt для них, различаются (достоверность различия между ними $p<0,05$). Это различие проиллюстрировано микрофотографиями комет, соответствующих средним значениям mt этих распределений. Хотя ~45 % всех клеток интактной сетчатки к этому времени содержат в разной степени поврежденную ДНК (левая гистограмма), доля аналогично поврежденных ГКМ после инъекции МНМ составляет 85% (правая гистограмма). Учитывая щелочные условия определения повреждений ДНК в клетках, этими повреждениями оказываются одно- и двунитевые разрывы и АП-сайты.

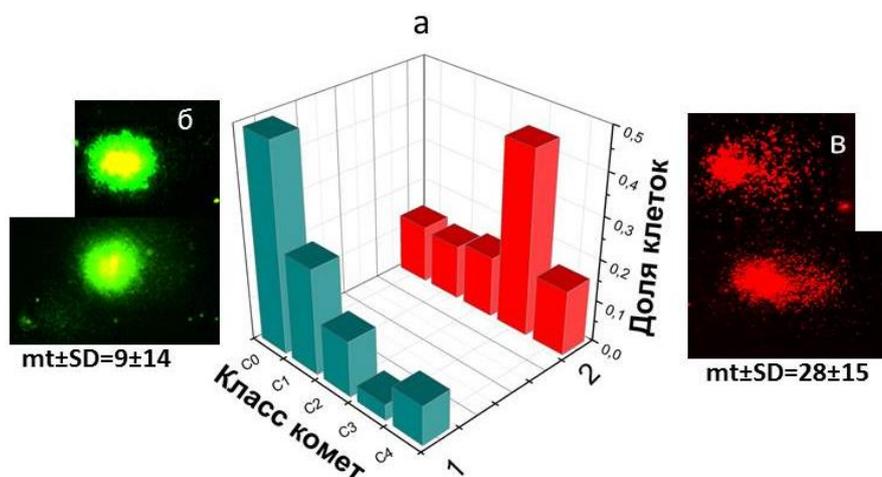


Рисунок 7. МНМ-индуцированные повреждения ДНК в сетчатке спустя 72 ч после инъекции МНМ. *а* – гистограммы распределения клеток сетчатки (1) и ГКМ (2) по классам комет. *б* и *в* – средние значения поврежденности ДНК, $mt \pm SD$ и микрофотографии комет из приведенных распределений, соответствующие этим средним значениям mt .

3.5. Глиоз ГKM в сетчатке в ответ на действие МНМ

Радиальное расположение ГKM в сетчатке обеспечивает их контакт со всеми слоями сетчатки, и практически любые повреждения сетчатки вызывают ответный глиоз ГKM. Это подчеркивает центральную роль этих клеток в жизнеспособности и регенерации сетчатки. Однократная инъекция МНМ запускала активную пролиферацию ГKM в сетчатке, которую мы регистрировали по включению пролиферативного маркера BrdU. Результат оценки их количества в суспензии, в зависимости от дозы МНМ, спустя 72 и 108 ч после инъекции агента, показан на рис. 8, а. Максимальная стимуляция пролиферации наблюдается на 72 ч и далее остается постоянной до 108 ч что говорит о прекращении репликации ДНК в ГKM после 72 ч.

На микрофотографиях срезов сетчатки (Рисунок 8 б) представлены BrdU-позитивные ядра клеток глии Мюллера, которые располагаются, в основном, в наружном плексиформе и внутреннем ядерном слоях сетчатки. МНМ активирует не только пролиферацию, но и миграцию ядер клеток в направлении к фоторецепторам. Так что основная масса BrdU-фокусов располагается в коридоре, ограниченном двумя линиями на микрофотографии на рисунке 8 б. На рисунке 8 в приведены результаты обсчета числа BrdU-позитивных клеток на единицу площади микросреза, в зависимости от концентрации МНУ. Хотя результат менее выразителен в связи с трудностью подсчета общей численности клеток сетчатки в площади микросреза, в целом он отражает ту же закономерность, что гистограмма на рисунке 8 а.

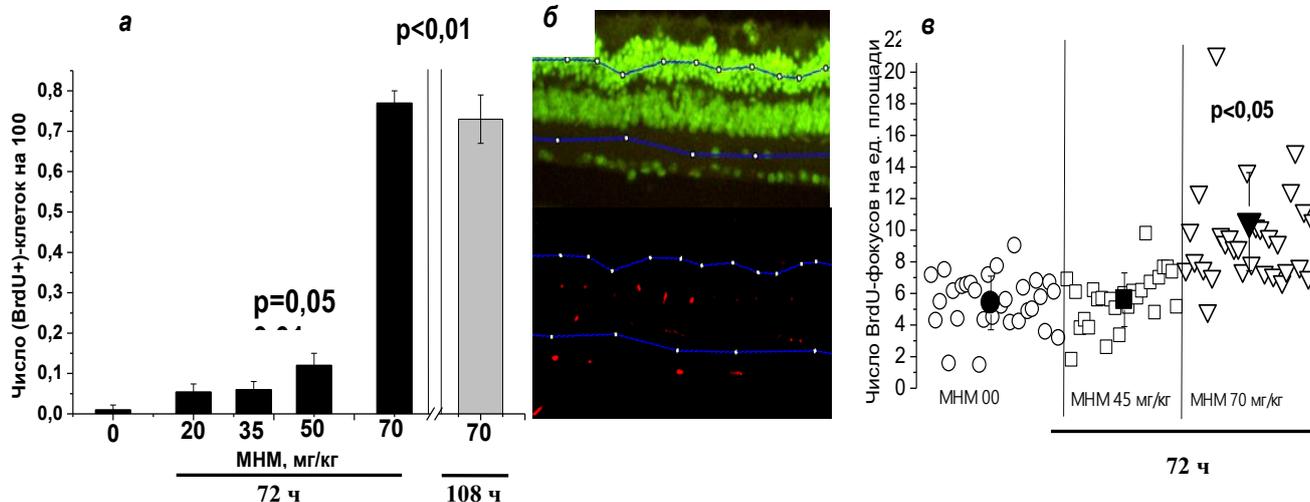


Рисунок 8. а - пролиферация ГKM в зависимости от дозы МНМ (однократное системное введение), при оценке в суспензии; б - локализация BrdU-позитивных клеток на микросрезе сетчатки (синяя линия ограничивает область подсчета клеток, верхний ряд - окрашивание Sybr Green; нижний ряд - окрашивание BrdU-Alexa594); в - число BrdU-позитивных клеток на единицу площади микросрезов сетчатки мышей, обработанных МНМ в дозах 0, 45 и 70 мг/кг веса животных.

На рисунке 9 а, б приведены зависимости от дозы МНМ пролиферации ГKM и доли клеток сетчатки, формирующих кометы классов С1-С3, то есть, имеющих репарируемый объем повреждений ДНК (в то время, как кометы класса С4 соответствуют погибшим, апоптотическим, клеткам). Результаты гистохимического

исследования (Рисунок 8 *в*) и результат цитохимического анализа (Рисунок 9 *а*) на иммобилизованной в агарозе суспензии клеток сетчатки одинаково свидетельствуют о нелинейной зависимости пролиферации ГКМ у мышей от дозы МНМ. Поскольку МНМ вызывает разрывы не сама по себе, а через активацию механизма BER, то почти полное графическое совпадение дозовых зависимостей на рисунках 9 *а* и *б* может отражать связь между активацией пролиферации ГКМ в ответ на МНМ и репарацией ДНК в сетчатке. Отмечаемая многими авторами в статьях низкая пролиферативная способность ГКМ у млекопитающих здесь выражается в 2-х феноменах - в низкой (<3%) доле BrdU – позитивных клеток в сетчатке мышей после МНМ-стресса и в отсутствии их накопления в сетчатке в последующее время после завершения первого цикла (Рисунок 8 *а*).

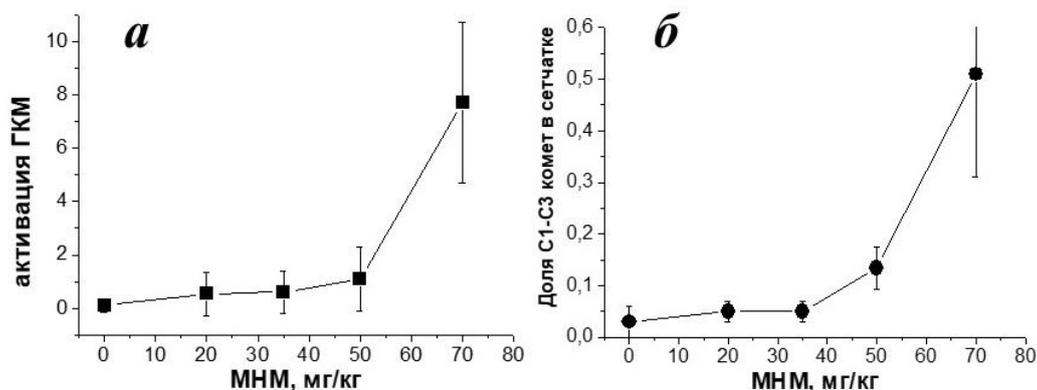


Рисунок 9. Ответ клеток сетчатки мышей на разные дозы МНМ спустя 72 ч после инъекции. *а* – пролиферация ГКМ (окраска анти-BrdU антителами); *б*) – доля клеток сетчатки, содержащих репарируемые повреждения ДНК.

3.6. Экспрессия p53 в сетчатке после воздействия МНМ. Известно, что универсальным маркером клеточного ответа на повреждение ДНК является белок p53. Поэтому мы оценили его экспрессию в тканевых срезах сетчатки мышей до и после инъекции МНМ. Результат представлен в виде микрофотографий срезов сетчатки и рассчитанной из них гистограммы на рисунке 10. В интактной сетчатке обнаруживается фоновый уровень p53 в фоторецепторах и в нейронах, который резко возрастает после повреждающего воздействия МНМ в дозе 60 мг/кг, что отражает гистограмма *в*.

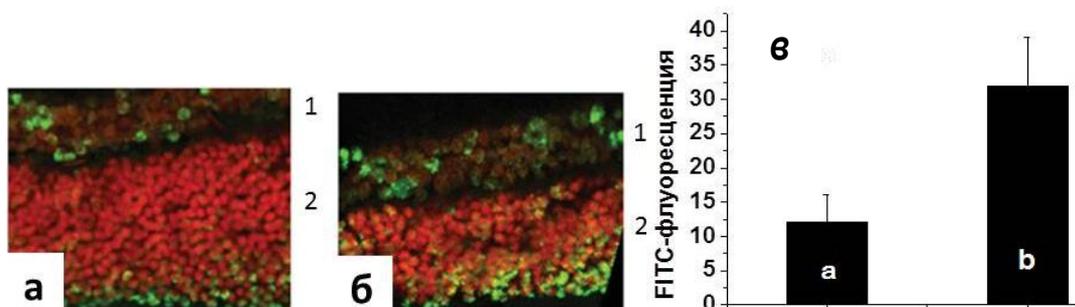


Рисунок 10. Экспрессия p53 в сетчатке у мышей в ответ на воздействие МНМ (доза 60 мг/кг). *а* – микрофотография контроля; *б* – микрофотография спустя 24 ч после инъекции; 1 – наружный ядерный слой, 2 – внутренний ядерный слой; p53 проявлялся конъюгатом

антиР53 антитела с FITC; фоновое окрашивание йодистым пропидием; (увеличение x500); в - FITC-флуоресценция единичной площади (60*60) мкм срезов, среднее \pm SD из более, чем трех срезов (на графике а – контроль, в- спустя 24 ч после инъекции)

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

4.1. Роль ферментов репарации в цитотоксическом действии МНМ на фоторецепторы сетчатки. МНМ индуцирует в ДНК три типа модификаций оснований - ОбмеG (~10 %), N3меA (~5 %) и N7меG (~85 %), причем пока неизвестно обладают ли они ретинотоксическим действием сами по себе, но в последнее время обсуждается роль в этом репаративных ферментов. Полученные нами результаты косвенно указывают на причастность к ретинотоксичности МНМ ферментов репарации (Рисунок 9).

Первый из них MGMT – фермент, деметилирующий ОбмеG. Будучи нерепарированным, ОбмеG образует в процессе репликации неканоническую пару с тиминном, что приводит клетки к гибели в результате пострепликативной репарации (MMR). N3меA и N7меG являются субстратами для AAG (алкиладенин-ДНК-гликозилазы) - фермента, инициирующего эксцизионный механизм репарации BER в ответ на действие алкилирующих агентов. AAG гидролизует N-гликозидную связь между алкилированным основанием и рибозофосфатным остовом ДНК, оставляя AP-сайт. Сайт является субстратом для AP-эндонуклеазы 1, которая гидролизует в нем фосфодиэфирную связь, формируя одиночный разрыв цепи ДНК с 3'ОН- и 5'dRP-концами. ДНК-полимераза β (pol β) удаляет 5'dRP-конец и на его место присоединяет один нуклеотид, заполняя пробел. Завершает процесс ДНК-лигаза I или III. Интермедиатами процесса, как видно, являются цитотоксичные AP-сайты и одиночные разрывы, которые в случае несбалансированности этапов BER, накапливаются в клетке и приводят ее к гибели. Дисбаланс этапов BER, как неизбежное событие при нарастании дозы, наступает при достижении критического уровня повреждений. Дисбалансу способствует также то, что самая многочисленная модификация N7меG тормозит работу pol β . Как следует из наших результатов (Рисунок 9), критический уровень повреждений в сетчатке у мышей достигается при дозе МНМ \geq 60 мг/кг. При этих дозах МНМ резко возрастает накопление разрывов ДНК в клетках сетчатки. С этой же дозы МНМ достигается максимум апоптоза в фоторецепторах сетчатки (Рисунок 4), и, как мы показали, снижение функциональной активности сетчатки (по электроретинографии) становится необратимым (Рисунок 5).

Другим активным участником развития цитотоксического действия МНМ в сетчатке может быть PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1). PARP1 играет роль сенсора разрывов в ДНК в процессе BER. Она связывается с разрывом со стороны 5'dRP-конца и присоединяет к ближайшему гистону разветвленный полимер PAR, синтезируемый из АТФ и NAD⁺. Это ослабляет связь гистонов с ДНК и вызывает диссоциацию или «миграцию» нуклеосом по ДНК, открывая доступ к повреждению для репаративного комплекса. PAR-модификации подвергаются многие ферменты и

структурные белки в хроматине, что делает функционирование PARP1 в клетке высокоэнергозатратным, приводящим клетку к гибели. Это справедливо как для пролиферирующих, так и для покоящихся клеток, в частности для фоторецепторных клеток сетчатки, поскольку из-за высокой оксигенации и метаболической активности эти клетки имеют крайне небольшой энергетический резерв, и, как видно из рисунка 4, первыми подвергаются гибели при стрессе сетчатки.

4.2. Природа индуцированного МНМ сигнала от фоторецепторов к ГКМ и механизм ответной пролиферации ГКМ. На рисунке 11 представлена предполагаемая последовательность событий в сетчатке мышей после ретинотоксического воздействия МНМ.

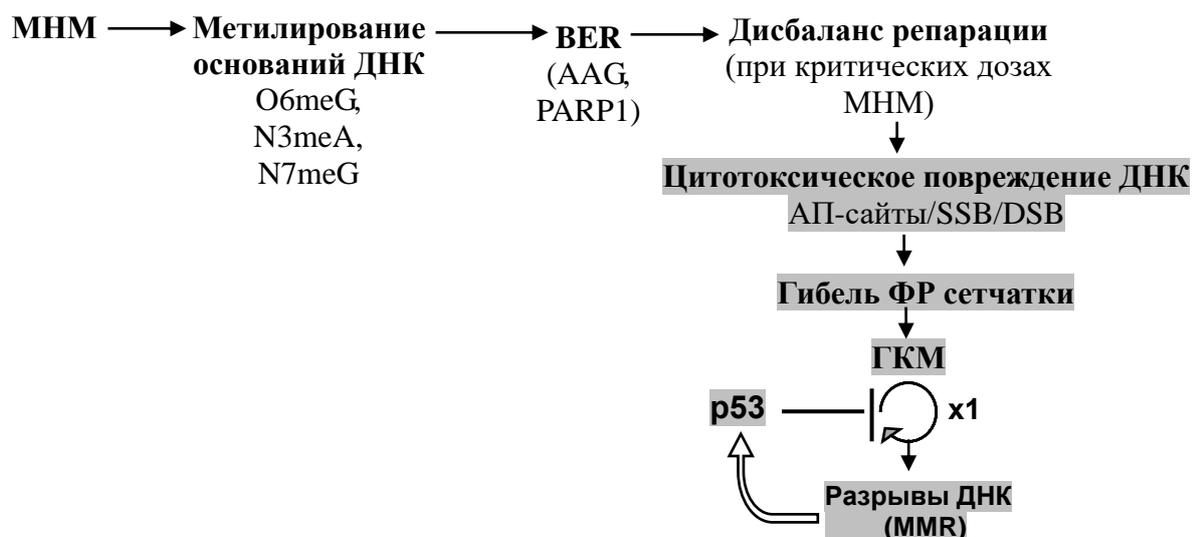


Рисунок 11. Предполагаемая последовательность событий при действии МНМ на сетчатку. (Серым цветом отмечены этапы, зарегистрированные и описанные в данной работе). Сокращения на рисунке: BER – эксцизионная репарация оснований; AAG – алкиладенин-ДНК-гликозилаза; PARP1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1; АП-сайт – апуриновый-апириимидиновый сайты; SSB - одноцепочечные разрывы ДНК; DSB - двухцепочечные разрывы ДНК, ФР – фоторецепторы сетчатки; ГКМ – глиальные клетки Мюллера; MMR – пострепликативная репарация ДНК.)

В ДНК клеток сетчатки под действием МНМ формируются метилированные основания. В ответ на них активируется механизм репарации BER. При ретинотоксической концентрации МНМ (≥ 60 мг/кг) наблюдается дисбаланс этапов BER, который сопровождается накоплением АП сайтов и разрывов (Рисунок 6, 7), за которой следует дегенерация сетчатки в виде гибели фоторецепторов (Рисунок 4). В ответ на эту гибель активируется пролиферация ГКМ, ограниченная одним циклом (Рисунок 8 а). На этот срок в ГКМ наблюдаются разрывы ДНК, которые сами по себе являются препятствием для ДНК-полимеразы, а кроме того, в ответ на них экспрессируется p53, который блокирует дальнейшую пролиферацию ГКМ. Точная природа генерируемого гибнущими фоторецепторами сигнала, вызывающего ответ ГКМ на цитотоксический стресс и путь, по которому он передается к ГКМ, на сегодня неизвестны.

4.3.-4.4. Повреждения ДНК и экспрессия p53 ограничивают пролиферацию ГКМ у мышей. MMR как предположительный механизм формирования разрывов ДНК в пострепликативных ГКМ. Ответом на гибель фоторецепторных клеток в сетчатке у мышей является глиоз ГКМ, включающий также их пролиферацию. Количество пролиферирующих ГКМ не превышает 3% от общей клеточности сетчатки у мышей (Таблица 1). В соответствии с данными литературы, в отличие от рыб и птиц, регенеративный потенциал ГКМ у млекопитающих чрезвычайно низкий. При этом имеются данные, что для мышей, экспрессия p53 подавляла стимулированную пролиферацию ГКМ сетчатки, путем p53-зависимой экспрессии ингибитора циклинкиназ *Cdkn1a/p21^{Cip}* и подавления экспрессии промотора пролиферации *c-Myc*; причем этого подавления не наблюдалось в сетчатке нокаутных по p53 мышей. На модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс, вместе с пролиферацией ГКМ, наблюдали фосфорилирование гистона H2AX (экспрессию γ -H2AX), экспрессию p53 и p21 в ГКМ. Мы подтвердили эти результаты, показав возрастание экспрессии p53 в сетчатке у мышей в ответ на МНМ.

Перечисленные 3 белка являются компонентами клеточного ответа на повреждение ДНК, «DNA damage response»: p53 – универсальный маркер повреждений ДНК, ответственный за G1-checkpoint клетки с поврежденной ДНК; p21 – ингибитор циклинкиназ, осуществляющих переход G1→S, его экспрессия контролируется белком p53; гистон γ -H2AX – маркер двунитевых разрывов ДНК, характерных для апоптотической компактизации хроматина. В результате процесса в клетках приостанавливается пролиферация. Упомянутый путь реализации подавления клеточного цикла при наличии в ДНК двунитевых разрывов, при участии белка p53, действует против опухолевого роста. Но, в данном случае, он препятствует пролиферации ГКМ и возможно ГКМ-зависимого восстановления поврежденной сетчатки.

С концепцией «DNA damage response» согласуется продемонстрированные нами в сетчатке, в ответ на МНМ, экспрессия p53 (Рисунок 10), отсутствие увеличения числа BrdU-позитивных клеток после 72 ч, которое мы связываем с прекращением репликации ДНК и блоком пролиферации ГКМ (Рисунок 8), и факт, что в ГКМ сетчатки, после завершения митотического цикла наблюдается большое количество повреждений ДНК (Рисунки 7, 9). Именно в ответ на повреждения ДНК в ГКМ активируется «DNA damage response», который приостанавливает дальнейшую пролиферацию ГКМ сетчатки у мышей.

Поскольку повреждающий агент МНМ сам по себе не вызывает разрывов, а они обнаруживаются в пострепликативный период (Рисунки 7, 9), то с большой вероятностью их можно отнести на счет пострепликативной репарации (MMR) в ГКМ. Субстратом для MMR являются некоплементарные пары оснований (мис-пары), причем этот механизм оперирует только с дочерней (вновь синтезированной цепочкой ДНК), из-за чего MMR часто называют пострепликативной коррекцией. Его

активность блокируют дальнейшую репликацию ДНК и пролиферацию клетки, вследствие чего активная MMR часто приводит к гибели клетки. Полученные в нашей работе результаты говорят об участии p53 в этом блоке ГКМ у мышей.

В нашей работе мы наблюдали пролиферативную активацию ГКМ в сетчатке у мышей, сочетающуюся с экспрессией белка P53 и показали, что его экспрессия ассоциирована с наличием в пострепликативных ГКМ разрывов ДНК. Мы предполагаем, что одной из причин образования этих разрывов является активация в ГКМ механизма пострепликативной коррекции нуклеотидов MMR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанная в литературе потенциальная способность ГКМ к репрограммированию в клетки со свойствами классических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, экспрессирующих маркеры стволовых клеток и способных дифференцироваться в основные функциональные клетки сетчатки-нейроны, фоторецепторы, клетки пигментного эпителия и клетки-предшественники, делает ГКМ возможным кандидатом для использования в заместительной терапии зрительных нейропатий. Однако оказалось, что, несмотря на эффективную пролиферацию, регенеративная способность ГКМ в мышцах линии rd1 с наследственной предрасположенностью к спонтанной дегенерации сетчатки, была низкая. Таким образом, остается вопрос, являются ли ГКМ адекватным источником стволовых клеток для регенерации пациентов с ретинопатией. Для ответа на него необходимо всестороннее исследование ГКМ, включая характеристику их пролиферативной способности и возможные ограничения пролиферации. В данной работе мы показали, что в МНМ-поврежденной сетчатке у мышей, ГКМ вступают в митотический цикл, но приостанавливают деление спустя 72 ч после воздействия. В это время в ГКМ мы наблюдали повреждения ДНК (разрывы) и экспрессию белка P53, который ответственен за блок пролиферации в клетках с поврежденной ДНК. Этот результат объясняет известный из литературы факт, что ГКМ грызунов генерируют нейроны и глиальные клетки *in vitro*, но *in vivo* резко ограничивают нейрогенный потенциал. Тем не менее, именно пролиферативный ответ в сочетании со способностью ГКМ экспрессировать гены плюрипотентности и продуцировать нейротрофические факторы указывает на то, что ГКМ млекопитающих могут принимать состояние, подобное стволовым клеткам-предшественникам и в благоприятных условиях активировать/стимулировать нейрогенез. Кроме того, если знание причин, ограничивающих пролиферацию ГКМ позволит хотя бы частично воспроизвести на млекопитающих регенеративную потенцию ГКМ рыб zebrafish, это обещает значительный успех в терапии дегенеративных заболеваний сетчатки у человека. Хотя важные вопросы в этой области остаются пока без ответа, многие исследователи выражают уверенность в том, что ГКМ являются уникальной

мишенью и средством для терапии ретинопатий и продолжают поиск в этом направлении.

ВЫВОДЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАБОТЫ

1. Из 4-х исследованных в работе алкилирующих агентов (метилнитрозомочевина, нимустин, дакарбазин, темозоломид), максимальной ретиноксичностью (и минимальной общей токсичностью) на мышах обладает метилнитрозомочевина; в силу этого метилнитрозомочевина является оптимальным ретиноксическим агентом в модели регенерации-дегенерации у мышей;

2. С помощью разработанного метода оценки пролиферации глиальных клеток Мюллера и, одновременно, поврежденности ДНК в них, показано, что ретиноксичность метилнитрозомочевины коррелирует с образованием цитотоксичных разрывов и щелочелабильных сайтов в ДНК, которые формируются в результате активации ферментов репарации; цитотоксичность метилнитрозомочевины проявляется в гибели фоторецепторов без видимых повреждений других клеточных слоев сетчатки;

3. В ответ на гибель фоторецепторов активируется пролиферация глиальных клеток Мюллера в сетчатке мышей, которая выражается в увеличении числа бромдезоксисуридин-позитивных клеток;

4. Пролиферация глиальных клеток Мюллера в сетчатке ограничена одним циклом, после которого в них обнаруживается высокая степень повреждения ДНК, и возрастает экспрессии белка p53 – универсального маркера повреждения ДНК и активатора точки рестрикции клеточного цикла G1 (G1-checkpoint);

5. Наличие повреждений ДНК и экспрессия p53 являются предпосылками для клеточного ответа на повреждение ДНК в виде блока дальнейшей пролиферации глиальных клеток Мюллера.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Тронов, В.А. Повреждение ДНК и p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины / В.А. Тронов, **Е.И. Некрасова** // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 543–551.

2. Тронов, В.А. Пролиферация клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на ретинотоксический стресс, индуцированный метилнитрозомочевиной / В.А. Тронов, **Е.И. Некрасова**, М.А. Островский // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 6. – С. 440–447.

Tronov, V.A. Proliferation of mouse retinal Muller cells in response to methylnitrosourea-induced retinotoxic stress / V.A. Tronov, **E.I. Nekrasova**, M.A. Ostrovski // Cell and Tissue Biology. – 2018. – V12, №6. – P.468-476

3. Тронов, В.А. Окуло- и ретинотоксичность противоопухолевых препаратов на основе алкилирующих агентов / В.А. Тронов, **Е.И. Некрасова** // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64, № 5. – С. 555–563.

4. Тронов, В.А. Радиационное прекондиционирование сетчатки глаза у мышей *in vivo* повышает ее устойчивость к последующему генотоксическому воздействию и стимулирует восстановление / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская., **Е.И. Некрасова**, М.А. Островский // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 2. – С.119–128.

Tronov V.A. Radiation preconditioning *in vivo* increases the resistance of mouse retina to genotoxic exposure and stimulates its regeneration / V.A. Tronov, J.V. Vinogradova, V.A. Poplinskaya, **E.I. Nekrasova**, M.A. Ostrovski // Cell and Tissue Biology. – 2015. – V9, №3. – P.198-207

5. Тронов. В.А. Исследование адаптивного ответа сетчатки глаза у мышей на облучение протонами: связь с репарацией ДНК и гибелью фоторецепторных клеток / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская, **Е.И. Некрасова**, М.А. Островский // Письма в ЭЧАЯ. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 241–255.

Tronov V.A. Mouse retinal adaptive response to proton irradiation: correlation with DNA repair and photoreceptor cell death / V.A. Tronov, J.V. Vinogradova, V.A. Poplinskaya, **E.I. Nekrasova**, M.A. Ostrovski // Physics of Particles and Nuclei Letters. – 2015. – V12, №1. – P.173-183

Публикации в трудах конференций и съездов:

1. Тронов В.А. Повреждение ДНК ограничивает пролиферативный ответ клеток Мюллера на действие алкилирующего агента в сетчатке мышей / В.А. Тронов, **Е.И. Некрасова** // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков. – 2019. – Т. 2. – С. 80–81.

2. **Некрасова Е.И.** Деление клеток Мюллера в сетчатке в ответ на токсическое действие метилнитрозомочевины / Е.И. Некрасова Е.И., Ю.В. Виноградова., В.А. Тронов В.А.// Сборник трудов XXIII ежегодной научной конференции Института

химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, секция "Динамика химических и биологических процессов". Изд. РУДН, Москва. – 2018. – С. 9–14.

3. **Некрасова Е.И.** Восстановление сетчатки мышей и явление гормезиса после воздействия ускоренных протонов и метилнитрозомочевины. / Некрасова Е.И., Виноградова Ю.В., Тронов В.А. // Сборник трудов XXII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, секция "Динамика химических и биологических процессов". Изд. РУДН, Москва. – 2017. – С. 48–53.

4. **Некрасова Е.И.** Различия в чувствительности к алкилирующим агентам клеток сетчатки мышей, в сравнении с культивируемыми клетками меланомы / Е.И. Некрасова, О.О. Рябая, В.А. Тронов // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – № S1. – С. 58.

5. Тронов В.А. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксическими агентами. / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, К.Н. Ляхова, **Е.И. Некрасова**, М.А. Островский // Российский общенациональный офтальмологический форум, 6_й: Сб. науч. тр. Под ред. В.В. Нероева. 2013.– Т. 2.– С. 572-575.

6. В.А. Тронов. Радиационное прекондиционирование сетчатки с целью повышения ее устойчивости к последующему генотоксическому воздействию и стимуляции ее восстановления. / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская, **Е.И. Некрасова**, М.А. Островский. // Фундаментальные науки – медицине. Тезисы докладов на конференциях и семинарах по научным направлениям Программы в 2013 году. М.: Фирма «Слово». 2013.– С. 34-35.