

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

*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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
Тронов Виктор Александрович

Москва - 2020

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы	6
Цели и задачи	7
Научная новизна	8
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту	11
Степень достоверности и апробация результатов	12
Публикации	13
Личный вклад автора	13
Структура и объем работы	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	14
1.1. Строение сетчатки глаза млекопитающих.	14
1.2. Дегенеративные заболевания сетчатки	15
1.3. Глиальные клетки Мюллера	16
1.4. Стволовые клетки и регенеративный потенциал ГКМ	18
1.5. Роль белка p53 в сетчатке	23
1.6. Пострепликативная коррекция нуклеотидов MMR в сетчатке	24
1.7. Окуло- и ретинотоксичность некоторых алкилирующих препаратов и интерферона, используемых в цитотоксической химиотерапии рака	26
1.7.1 Мелфалан	30
1.7.2 Нитрозомочевины	31
1.7.3 Триазены	34
1.7.4 Интерферон	37
1.8. Фармакологические модели дегенерации сетчатки	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Животные	41
2.2. Системное введение ретинотоксического агента и BrdU	41

2.3.	Получение суспензии клеток сетчатки	42
2.4.	Обработка суспензии клеток алкилирующими агентами <i>in vitro</i>	43
2.5.	Метод ДНК-комет: иммобилизация клеток в агарозе, лизис, электрофорез и визуализация клеток	43
2.6.	Сканирование слайда и интерпретация результатов	44
2.7.	Приготовление тканевых срезов	45
2.8.	Оценка апоптоза в ткани методом TUNEL	46
2.9.	Иммуногистохимия	46
2.10.	Детекция апоптотической фрагментации ДНК	47
2.11.	Регистрация электроретинограммы	47
2.12.	Статистическая обработка результатов исследования	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		49
3.1.	Оценка ретиноксичности 4-х алкилирующих агентов, используемых в химиотерапии	49
3.2.	Влияние МНМ на структуру и функциональную активность сетчатки у мышей	53
3.3.	МНМ-индуцированное повреждение и репарация ДНК в клетках сетчатки у мышей	57
3.4.	Повреждение ДНК в ГКМ	59
3.5.	Глиоз ГКМ в сетчатке в ответ на действие МНМ	63
3.6.	Экспрессия p53 в сетчатке после воздействия МНМ	67
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ		69
4.1.	Роль ферментов репарации в цитотоксическом действии МНМ на фоторецепторы сетчатки	69
4.2.	Природа индуцированного МНМ сигнала от фоторецепторов к ГКМ и механизм ответной пролиферации ГКМ.	70
4.3.	Повреждения ДНК и экспрессия p53 ограничивают пролиферацию ГКМ у мышей	73
4.4.	MMR как предположительный механизм формирования разрывов ДНК в пострепликативных ГКМ	76

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	79
Выводы по результатам работы	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	81
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [1–3]. 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) [4].

Важнейшими источниками повреждения сетчатки являются:

1. Наследственная предрасположенность к дегенерации из-за мутаций в специфических генах;
2. Естественная агрессивность окружающей среды (оксигенация, световое и радиационное воздействия, химическая токсичность);
3. 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 [5,6]. 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 [7].

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 [8]; основная же часть делящихся ГКМ дифференцируется в фибробласты и формирует глиальный шрам [9,10]. 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 [4].

### **Степень разработанности темы**

Для изучения повреждения и регенерации сетчатки разработаны и используются модели на животных (чаще всего на грызунах). В работе [11] 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 [12] 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 [13]. Несмотря на сравнительно короткое время жизни в крови, МНМ легко преодолевает гемато-ретиальный барьер, достигает сетчатки и вызывает гибель главным образом фоторецепторных клеток в ней [10].

Наряду с ретинотоксическим действием МНМ, известна высокая устойчивость ГКМ в сетчатке к МНМ [7]: 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, индуцированными генотоксикантом МНМ в клетках сетчатки и ГКМ, пока не исследована [2,3]. 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 щелочеллабильных 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).

б. Показано, что, в ответ на цитотоксическое действие МНМ, ГКМ проходят один цикл пролиферации, после которого в их ДНК обнаруживаются повреждения (разрывы и щелочеллабильные 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» [14],

в которой индуцировали острую дегенерацию сетчатки у мышей однократной внутрибрюшинной инъекцией ретинотоксического агента. В ответ на дегенерацию (гибель фоторецепторных клеток) в сетчатке активировался глиоз и пролиферация ГKM, которую оценивали по включению в ядра ГKM пролиферативного маркера BrdU (бромдезоксипуридин). После усыпления животных извлекали глаза, и из сетчатки получали клеточную суспензию и тканевые срезы. Полученную 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. Для оценки повреждений ДНК сетчатки алкилирующими агентами *in vivo*, суспензию клеток сетчатки, полученную от животных, которым внутрибрюшинно были введены препараты, исследовали методом ДНК 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. Количественно оценивали либо число флуоресцент-позитивных клеток на единичную площадь среза, либо суммарную интенсивность флуоресценции единичной площади среза, которую сравнивали с контролем. 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 щелочеллабильных 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, иммуноцито- 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 и грантом РФФИ № 16-04-00133 А «Исследование структурного и функционального восстановления сетчатки глаза мышей после ретинотоксического воздействия ионизирующим излучением и метилнитрозомочевинной».

## **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**

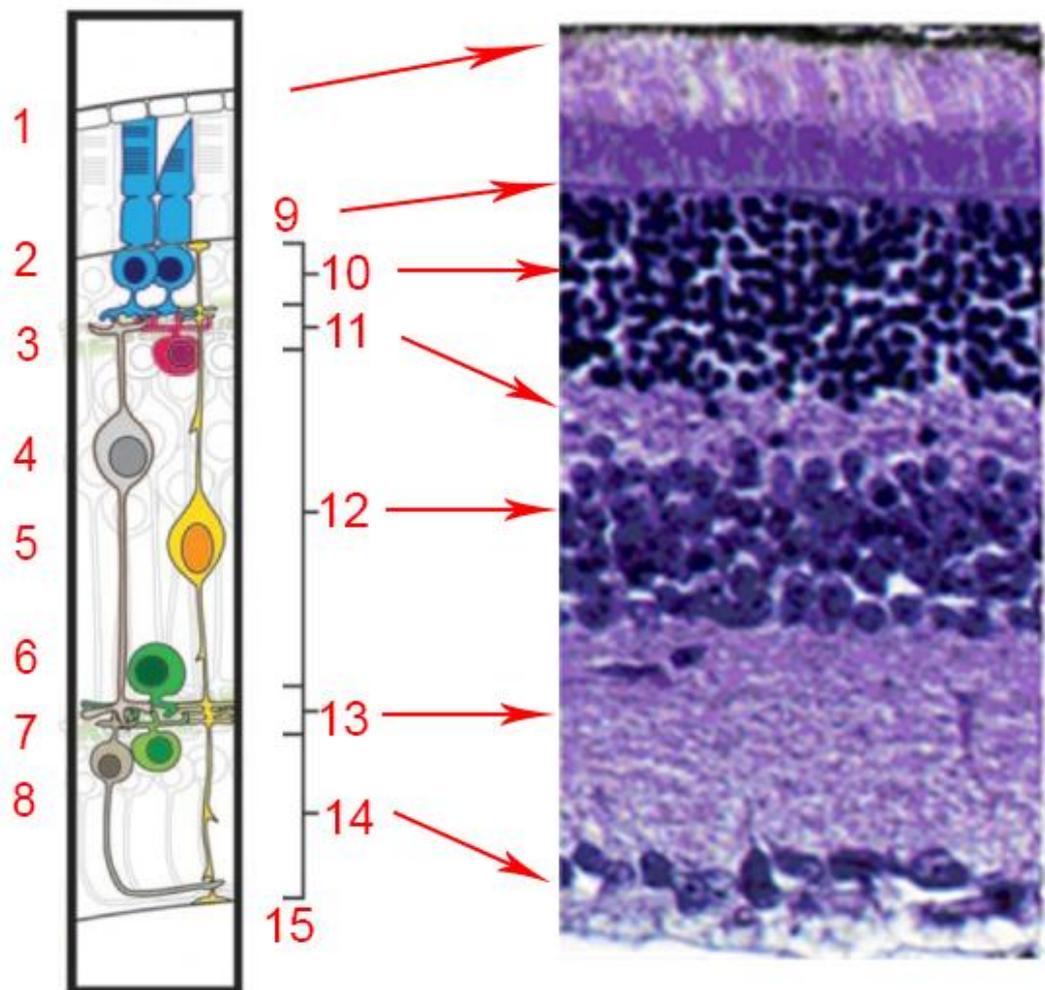
Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 25 рисунков и 4 таблицы. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения (выводов), списка сокращений и условных обозначений, и списка литературы, включающего 229 наименований.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### 1.1. Строение сетчатки глаза млекопитающих.

Сетчатка (сетчатая оболочка) глаза млекопитающих содержит в себе 10 слоев (Рисунок 1): внутреннюю пограничную мембрану, слой волокон зрительного нерва, слой ганглиозных клеток, внутренний плексиформный слой, внутренний ядерный слой, наружный плексиформный слой, наружный ядерный слой, наружную пограничную мембрану, слой фоторецепторов - палочек и колбочек и ретинальный пигментный эпителий.

а) Схема здоровой сетчатки      б) Микрофотография сетчатки



**Рисунок 1.** Схема (слева) и микрофотография (справа) здоровой сетчатки глаза млекопитающих: 1 – ретинальный пигментный эпителий; 2 – фоторецепторы; 3 – горизонтальные клетки; 4 – биполярные клетки; 5 – ГКМ; 6 – амакриновые клетки; 7 – смещенные амакриновые клетки; 8 – ганглиозные клетки сетчатки; 9 – наружная пограничная мембрана; 10 – наружный ядерный слой; 11 – наружный плексиформный слой; 12 – внутренний ядерный слой; 13 – внутренний плексиформный слой; 14 – слой ганглиозных клеток; 15 – внутренняя пограничная мембрана [15].

Всего в сетчатке насчитывается 9 типов нейрональных и глиальных клеток – пигментные клетки цилиарного эпителия, пигментные клетки эпителия сетчатки, ГКМ, фоторецепторные клетки (палочки и колбочки), биполярные клетки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки, ганглиозные клетки сетчатки и астроциты (Рисунок 1). В многочисленных опытах на земноводных, рыбах и птицах показано, что 3 из перечисленных типов клеток обладают свойствами стволовых мультипотентных клеток, способных дифференцироваться в другие функциональные клетки сетчатки и обеспечивать регенерацию поврежденной сетчатки – клетки цилиарного и ретинального пигментного эпителия и ГКМ.

ГКМ пронизывают всю толщу сетчатки, примыкая к внутренней пограничной мембране и контактируя с наружной пограничной мембраной. Помимо опорной, ГКМ обеспечивают трофическую, буферную функции, поддерживают стабильность нейрональных функций, а также предполагается их участие в процессах регенерации сетчатки [16,17]. Авторадиографическое исследование клеточного состава сетчатки глаза мышей путем введения 6-недельным мышам 3Н-тимидина показало, что в сетчатке фоторецепторные клетки (ФР) составляют 73%, биполярные — 20%, ГКМ — до 6%, а также имеется около 1% амакриновых и ганглиозных клеток [18].

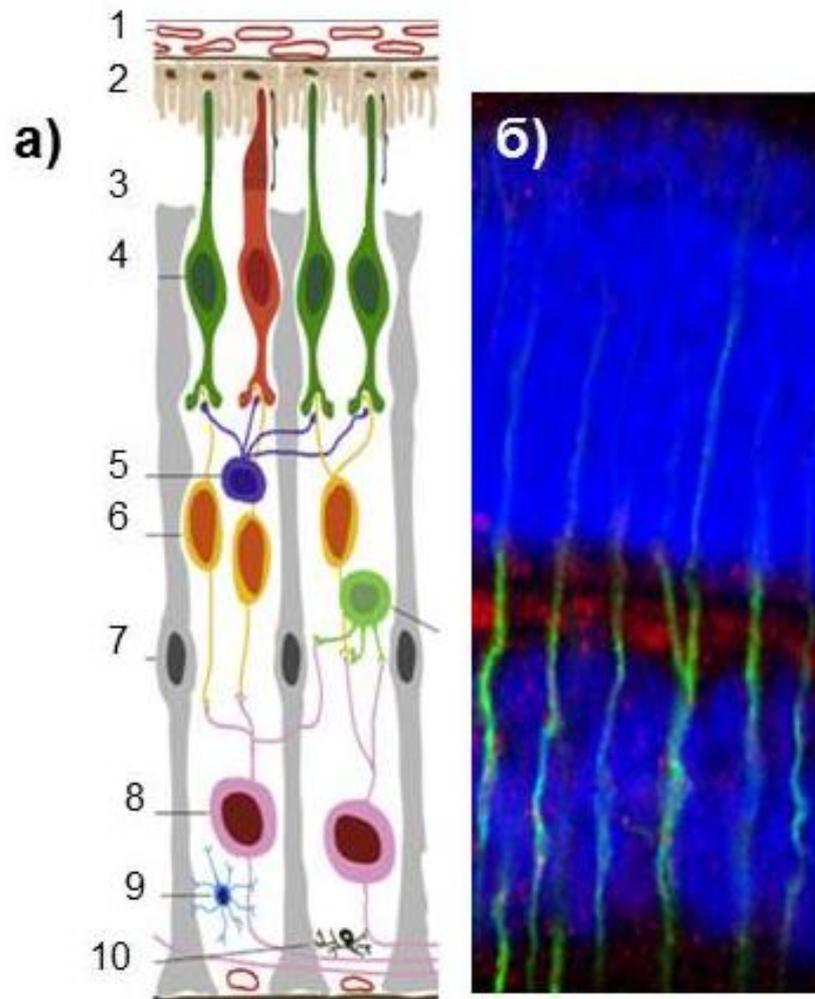
## **1.2. Дегенеративные заболевания сетчатки**

Нейроденеративные заболевания сетчатки, такие, как пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация (ВМД) сетчатки, глаукома и диабетическая

ретинопатия, различаются по этиологии, и приводят к полной или частичной потере зрения, вызывая патологические изменения фоторецепторов и внутренних нейронов сетчатки [19], с прогрессирующей гибелью клеток. Только два из них, ВМД и глаукома, являются причиной ухудшения зрения или слепоты более, чем у 12% населения старше 40 лет, по всему миру [20,21]. В настоящее время не существует эффективного метода лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, помимо ВМД, которая поддается терапии [22].

### **1.3. Глиальные клетки Мюллера**

Клетки Мюллера (глия Мюллера, глиальные клетки Мюллера, ГКМ) пронизывают всю толщу сетчатки, формируя каналы для клеточной миграции в сетчатке в процессе регенерации (Рисунок 2). При посредничестве пигментного эпителия ГКМ осуществляют связь сетчатки с хориоидом. Контактная со всеми слоями сетчатки, ГКМ поддерживают такие метаболические процессы в ткани как транспорт глюкозы, перераспределение  $K^+$ , удаление побочных продуктов, содержащих токсичные  $NH_3^+$ ,  $CO_2$ , а также осуществляют рециклинг аминокислот (глутамина). В норме ГКМ представляют собой довольно однородный класс клеток, но проявляющих высокую метаболическую пластичность при патологических воздействиях [23].



**Рисунок 2.** ГКМ на схеме (а) и экспрессия фибриллярных белков (GFAP) в ГКМ (b) [24]:  
 1-хороид с кровеносными сосудами, 2- ретинальный пигментный эпителий с микроворсинками,  
 3- фоторецептор-колбочка, 4- фоторецептор-палочка, ядро 5- горизонтальная клетка, 6-  
 биполярная клетка, 7-ГКМ с ядром, 8-глиальная клетка, 9-микроглия, 10-астроцит.

При патологических состояниях сетчатка подвергается перестройке/ремоделингу, который состоит в топографической реорганизации сетчатки в сочетании с глиозом ГКМ в ней. Выделяют 3 этапа ремоделинга сетчатки в ответ на патологический стресс:

- на первом этапе реагируют на стресс фоторецепторы, как наиболее чувствительные клетки, в которых активируется их метаболическая перестройка и инициируется программа гибели (часто апоптоз);

- на втором этапе, помимо видимой гибели фоторецепторов, в процесс включаются пигментный эпителий, микроглия и ГКМ, активируются сигнальные пути стресса, утрачивается связь сетчатки с хороидом;

- на заключительном этапе наблюдается *de novo* формирование нейритов, гибель и транслокация нейронов, нарастающая деструкция сетчатки [25].

ГКМ, которые во взрослой здоровой сетчатке млекопитающих пребывают в состоянии покоя, при травме или заболевании подвергаются реактивному глиозу, включающему изменения морфологии, синтез различных маркеров, дедифференцировку, ядерную миграцию на апикальную поверхность и пролиферацию [24,26]. Этот процесс имеет сходство с ранними стадиями регенеративного процесса, наблюдаемого в сетчатке рыб или цыплят. Однако, учитывая отсутствие спонтанного замещения нейронов в пораженной сетчатке и неспособность ГКМ самопроизвольно, без дополнительной обработки факторами роста, входить в митотический цикл после повреждения сетчатки [27], считалось, что ГКМ млекопитающих могут подвергаться только реактивному глиозу, но не нейрогенезу.

#### **1.4. Стволовые клетки и регенеративный потенциал ГКМ**

Первичные стволовые клетки были выделены из бластоцисты человека в 1998 г. и названы эмбриональными стволовыми клетками (ESC) [28]. Эти клетки плюрипотентные в том смысле, что дают начало всем типам клеток в многоклеточном организме. Следующие по уровню универсальности – мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в ограниченное число типов клеток. Сетчатка в эмбриогенезе формируется как вырост нервной трубки, называемый оптическим визигулом. Клетки, образующие его, относятся к мультипотентным стволовым клеткам.

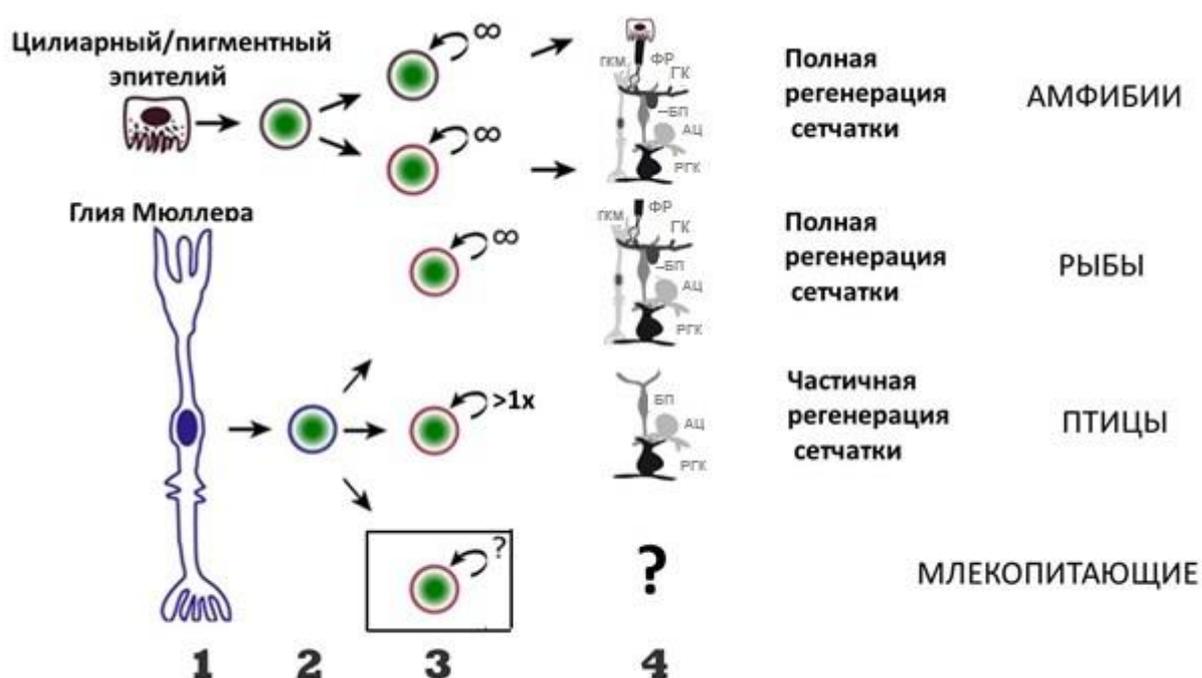
Стволовые клетки сетчатки млекопитающих, называемые в литературе как поздние нейрональные предшественники (late-stage retinal progenitor cells) [29], локализованы в цилиарной зоне ретинального пигментного эпителия и в слоях

нейральной сетчатки. Они способны дифференцироваться в пять базовых ретинальных нейронов – фоторецепторы, биполярные клетки, ганглиозные клетки, горизонтальные и амакриновые клетки и в один тип глиальных клеток - ГКМ [30]. Таким образом, у ГКМ и ретинальных нейронов общий предшественник в виде мультипотентной клетки. Глаз человека содержит всего около 1000 стволовых клеток [31]. Позднее, в работе [32], удалось выделить из глаз человека ГКМ и идентифицировать их как нейральные стволовые клетки, сохраняющие черты плюрипотентности. У земноводных, рыб и частично у птиц это выражается в их способности подвергаться репрограммированию, вступать в клеточный цикл и дифференцироваться в различные клетки зрительного органа. ГКМ у млекопитающих в ответ на повреждение сетчатки также пролиферируют и экспрессируют гены, ассоциированные с ретинальными стволовыми клетками [33]. Профиль экспрессируемых генов аналогичен таковому у клеток-предшественников [34].

Проблеме регенерации тканей глаза посвящены недавно опубликованные обзоры Э.Н. Григорян [35,36]. В них автор излагает концепцию о существовании в сетчатке клеточных фенотипов с «ювенильным» в отношении дифференцировки статусом. Предполагается связь этого фенотипа с высокой регенеративной способностью. Этим статусом обладают недодифференцированные предшественники, обнаруживаемые в сетчатке рыб [37], обезьян и человека [38]. Из дифференцированных клеток сетчатки к ним могут относиться пигментный эпителий амфибий и ГКМ. Общим фенотипическим признаком их является экспрессия факторов плюрипотентности Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc. Следует отметить, что кодирующие их гены - *Stat3*, *E-Ras*, *Klf4*, *c-myc*, *β-catenin* – высоко активны в опухолях и поддерживают фенотип эмбриональных стволовых клеток и их высокую скорость пролиферации в культуре [39]. Одним из экспериментальных подтверждений концепции «молодого фенотипа клеток в сетчатке» служит тот факт, что экзогенный коктейль из этих факторов (OSKM-коктейль) вызывает репрограммирование соматических клеток, которое протекает через продукцию промежуточных клеток, представляющих незрелые стадии, но уже с частью

активированными генами плюрипотентности [40]. Интересный факт – острая активация глии имеет нейрозащитный эффект, тогда как пролонгированная активация негативна по эффекту. Это связано с тем, что в первом случае глия продуцирует трофические факторы, способствующие выживанию клеток, регенерации и ветвлению глиальных аксонов *in vitro* и *in vivo* [41,42]. Негативный эффект активации глии у млекопитающих связан с продукцией в ней воспалительных (inflammatory) цитокинов, а пролиферация и гипертрофия глиальных клеток приводят к формированию глиального шрама, который заполняет пустоты после погибших нейронов и распавшихся синапсов [43].

Рисунок 3 иллюстрирует в обобщенном виде сложившиеся представления о регенерации поврежденной сетчатки у разных видов животных.



**Рисунок 3.** Схема регенерации сетчатки у позвоночных [44]

- 1 – клеточный ресурс/источник регенерации;
- 2 – этап дедифференцировки и вхождения в цикл
- 3 – этап пролиферации (включен в глиоз ГМК)
- 4 – дифференцировка/нейрогенез в сетчатке

На рисунке: ФР – фоторецептор; ГМК – глиальная клетка Мюллера; ГК – горизонтальная клетка; БП – биполярная клетка; АЦ – астроцит; РГК – ретинальная ганглиозная клетка

Хотя, как следует из рисунка, ГКМ млекопитающих отвечают на повреждение сетчатки делением а также экспрессируют гены, которые ассоциированы с ретинальными стволовыми клетками [17], они не функционируют *in vivo* как клетки-предшественники. Тем не менее, в пользу наличия свойств стволовых клеток у ГКМ человека говорят экспериментальные факты, демонстрирующие способность ГКМ при длительном культивировании *in vitro* экспрессировать маркеры ретинальных предшественников Chx10, Notch1, Pax6, Sox2 и  $\beta$ III-тубулин [32,45].

В смешанной культуре клеток ретинальных предшественников и ГКМ из сетчатки крыс, последние заметно стимулировали дифференцировку ретинальных предшественников в зрелые фоторецепторы, экспрессирующие характерные маркеры - орсин и периферин [46]. Этот результат расширяет ограниченные регенеративные функции ГКМ у млекопитающих. Внутриокулярная инъекция мышам нейротоксина NMDA, совмещенная с инъекцией специфического фактора роста, вызывала пролиферацию и дедифференцировку ГКМ в клетки-предшественники. Субпопуляция этих клеток далее дифференцировала в амакриновые клетки с экспрессией специфичных маркеров Calretinin, NeuN, Prox1 и GAD67-GFP [8], что говорит о способности ГКМ у мышей *in vivo* регенерировать нейроны внутренней сетчатки.

В работе [47] гистохимически исследовали срезы сетчатки, полученные из глаз вскоре после смерти пациентов, не страдавших какими-либо глазными заболеваниями. Оказалось, что в ядре и цитоплазме ГКМ в сетчатке взрослого здорового человека экспрессируются рецепторы тирозинкиназы CD117 и CD44, которые являются маркерами стволовых клеток, способных дифференцироваться в ретинальные клетки глии, фоторецепторы и в ганглиозные клетки [48].

Кроме того, было показано, что небольшое число ГКМ в сетчатке крыс способно к дедифференцировке, возвращению в клеточный цикл и производству новых биполярных клеток и фоторецепторов-палочек, в ответ на индуцированное N-метил-D-аспартатом (NMDA) повреждение сетчатки [11]. Позднее, также при использовании NMDA-индуцированной модели повреждения сетчатки мышей, в

сочетании с факторами роста, было показано, что ГКМ, в ответ на повреждение, входят в клеточный цикл и дифференцируются в амакриновые клетки, одновременно синтезируя факторы Pax6, Notch и Dll1, характерные для регенерирующей сетчатки у рыб и цыплят [8]. В другой работе [12] в ответ на индуцированное МНМ повреждение фоторецепторов в сетчатке у крыс также идентифицировали глиоз ГКМ и их дифференцировку, в направлении фоторецепторов (по экспрессии родопсина).

В исследованиях *in vitro* продемонстрировали способность культивируемых ГКМ грызунов и человека генерировать глиальные клетки и нейроны [32,49–51]. А в работе [52] показали, что ГКМ человека в культуре являются эффективным источником фоторецепторов-палочек.

В благоприятствующих условиях ГКМ могут функционировать как ретинальные предшественники и использоваться для репарации зрительной ткани. Регенеративный потенциал ГКМ делает их идеальным кандидатом для заместительной терапии дегенеративных патологий сетчатки, в которых утрата зрения – следствие гибели нейронов сетчатки (старческая макулярная дегенерация, пигментный ретинит, глаукома). Такая стратегия, которая мобилизует собственные клетки для восстановления ткани имеет ряд очевидных преимуществ перед трансплантационной терапией [53].

В работе [54] показано, что глия Мюллера, проявляющая мультипотентность, может дифференцироваться в ганглиозные клетки сетчатки под действием экзогенного фактора FGF2 и ингибитора Notch-сигнального пути. Эта индуцированная дифференцировка коррелировала со значительным улучшением функциональной активности сетчатки, оцениваемой электрофизиологически (ЭРГ).

Таким образом, в отличие от ГКМ амфибий, рыб и птиц, ГКМ млекопитающих в ответ на повреждение сетчатки отвечают не дедифференцировкой, а реактивным глиозом, который ассоциирован с пролиферацией. Тем не менее, именно пролиферативный ответ в сочетании со способностью ГКМ экспрессировать гены плюрипотентности, продуцировать нейротрофические факторы указывает на то,

что ГКМ млекопитающих могут принимать состояние, подобное стволовым клеткам-предшественникам и в благоприятных условиях активировать/стимулировать нейрогенез. То, что ГКМ грызунов и человека, как видно из обзора, генерируют нейроны и глиальные клетки *in vitro* [50,52], но *in vivo* резко ограничивают нейрогенный потенциал [24], ставит вопрос о причине этого ограничения. С другой стороны, если знание этой причины позволит хотя бы частично воспроизвести на млекопитающих регенеративную потенцию ГКМ 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 (см. обзор [55]).

### 1.5. Роль белка p53 в сетчатке

Белок p53 был идентифицирован в 1979 году как онкоген, поскольку он экспрессировался в клетках, зараженных онковирусом SV40 [56]. Однако вскоре обнаружилось, что p53 был инактивирован в клетках животных и человека, трансформированных онковирусом [57,58]. В последующем было убедительно показано, что инактивация и/или отсутствие p53 в модельных животных и у человека ассоциировано с высокой частотой возникновения у них спонтанных опухолей различной локализации [59,60]. Это указывало на возможную роль p53 как опухолевого супрессора. Кроме того, обнаружилось его участие в регуляции/подавлении клеточного цикла [61], опосредованного белком p21<sup>WAF1/Cip1</sup> [62]. Обнаружено также участие p53 в клеточном ответе на повреждение ДНК, осуществляемым путем p53-зависимой активации генов, кодирующих ферменты репарации ДНК или апоптоз [63].

Поскольку в нормальном эмбриогенезе важную роль играют регуляция клеточного цикла и апоптоз, то следует ожидать активное участие p53 в развитии и формировании сетчатки. В работе [64] по уровню матричной РНК (мРНК) оценивали экспрессию генов P53 и антиапоптотического Bcl-2 в тканях глаза

взрослых крыс. Совпадение временных паттернов экспрессии этих генов говорило о вовлеченности процессов выживания/гибели клеток в развитие тканей глаза животных. Тем не менее, на разных линиях мышей с отсутствующей экспрессией p53 (p53-null мыши) не обнаруживались дефекты в эмбриональном развитии глаз [59,65]. Однако в работе [66] у p53-null мышей линии BALB/c отмечались гиалоидные кровеносные сосуды в стекловидном теле глаза, отсутствие апоптоза и высокая частота формирования катаракты по сравнению с мышами дикого типа (wt-мышами) той же линии. Проллиферативный фиброз (шрам из фибробластов в сетчатке) наблюдали также у p53-null мышей линии C57BL/6 [67]. Другими словами, эти данные, показывающие участие p53 в формировании сетчатки у животных, позволяют предполагать, что опухолевый супрессор p53 может и ограничивать пролиферативный потенциал ретинальных клеток-предшественников у млекопитающих. Известно, что эти клетки совершают многочисленные циклы деления в процессе эмбрионального развития сетчатки. Но по мере созревания органа в конце первой постнатальной недели они выходят из митотического цикла, хотя сохраняют потенциальную способность к делению [68]. Эту способность сохраняют клетки глии Мюллера, и проявляется она после повреждения сетчатки (гибели ретинальных клеток) и внутриокулярной инъекцией эпидермального фактора роста EGF. В этой обратимой остановке деления предполагается участие p53 и активируемого им ингибитора циклинкиназы Cdkn1b/p27<sub>kip</sub> [69].

### **1.6. Пострепликативная коррекция нуклеотидов MMR в сетчатке**

Сетчатка является самой оксигенированной тканью млекопитающих [70]. В силу этого и высокой метаболической активности, в митохондриях сетчатки формируется высокая концентрация активных форм кислорода. Замкнутая в кольцо небольшая, по сравнению с хромосомальной, митохондриальная ДНК (мтДНК) почти лишена гистона и эффективно повреждается в кислородной среде митохондрий. Отметим, что мтДНК редуцируется вне зависимости от

клеточного цикла и даже в покоящихся клетках. Стало быть, для нее важную роль в удалении дефектов играет механизм пострепликативной коррекции нуклеотидов ДНК (MMR), ключевые ферменты которой кодируются генами хромосомной ДНК (Таблица 1).

**Таблица 1.** Гены пострепликативной репарации (MMR) и их локализация в хромосомах человека [71].

Факторы MMR (гетеродимеры)	Гены MMR	Хромосомная локализация
MutS $\alpha$	<i>hMSH6</i>	2p16-15
MutS $\alpha$ / MutS $\beta$	<i>hMSH2</i>	2p22-21
MutS $\beta$	<i>hMSH3</i>	5q11-13
Нет данных	<i>hMLH3</i>	14q24.3
MutL $\alpha$	<i>hPMS1</i>	2q31-33
MutL $\alpha$ / MutL $\beta$	<i>hMLH1</i>	3p21.3
MutL $\beta$	<i>hPMS2</i>	7p22

Известно, что при диабетической ретинопатии наблюдаются следующие изменения в ретинальных митохондриях: накапливаются повреждения в мтДНК в виде окси-аддукта, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина [72], и, как следствие, нарушается транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий, нарушается биогенез и снижается число копий мтДНК [73], нарушается транспорт ферментов системы репарации BER в митохондрии [74], снижается уровень экспрессии главных белков системы репарации MMR *hMLH1* и *hMSH2* (см. таблицу 1) [75].

В совокупности эти результаты позволяют считать, что дефицит MMR может быть одним из механизмов, ответственных за повреждение ДНК в диабетической сетчатке и связанные с ним патологические последствия. Более того, поскольку снятие гипергликемии не устраняет дефицит MMR, с ним также связывают такие ретинопатии как старческая макулярная дегенерация сетчатки [76] и наследственная зрительная нейропатия (синдром Лебера) [77].

Мы не исключаем вклад митохондрий, повреждений мтДНК и MMR в пролиферативную активность ГКМ.

### **1.7. Окуло- и ретинотоксичность некоторых алкилирующих препаратов и интерферона, используемых в цитотоксической химиотерапии рака**

Помимо кардиоваскулярной, печеночной и почечной токсичности, офтальмологическая токсичность является одной из четырех причин выбраковки новых лекарственных препаратов [78,79]. Настоящий раздел касается офтальмологической токсичности химиотерапии онкологических заболеваний. Системная химиотерапия во многих случаях дает позитивный результат, в особенности на фоне защиты костного мозга от цитотоксического эффекта. Это позволяет увеличить дозу препаратов и длительность терапевтического курса [80,81]. Однако по мере увеличения длительности жизни леченых больных, проявляются вторичные токсические эффекты действия препаратов на различные органы, что приводит к существенному ухудшению качества жизни больных. Офтальмологические осложнения, вызванные цитотоксической химиотерапией, часто недооцениваются из-за приоритета других побочных эффектов, угрожающих жизни пациентов. Тем не менее, ухудшение или потеря зрения является важным побочным эффектом даже на фоне ремиссии основного заболевания. Первой публикацией, рассматривающей этот вопрос как проблему, был обзор [82]. В нем приоритетное внимание было уделено нарушениям когнитивных функций, включающим зрительную. В последующих работах подчеркивается широкий спектр патологического ответа структур глаза на химиотерапию (см. ссылки в таблице 2). Раннее обнаружение, корректный диагноз и адекватные меры, включающие снижение дозы или прекращение химиотерапии, могут снизить тяжесть и длительность нежелательных эффектов на зрение.

Основное внимание уделено токсическому действию препаратов, принадлежащих к алкилирующим агентам – высокореактивным соединениям, содержащим нуклеофил (алкильную группу), способную реагировать с

электрофилом (катионом) в молекуле-мишени (белки, ДНК, РНК) – реакция нуклеофильного замещения. Представленные алкилирующие соединения разделены на 7 классов: (1) производные азотистого иприта (мехлорамин, хлорамбуцил, мелфалан); (2) алкилсульфонаты (бусульфан, манносульфан, треосульфан); (3) нитрозомочевины (метилнитрозомочевина, нимустин, кармустин, ломустин, цистемустин); (4) триазены (дакарбазин, темозоломид); (5) метилгидразины (прокарбазин); (6) оксазофосфорины (циклофосфамид, ифосфамид) и (7) комплексы платины.

В таблице 2 приведены данные о зрительных патологиях, препаратов перечисленных классов, используемых в химиотерапии. Поиск литературы по теме проводили, используя базы данных PubMed и Elibrary; ключевыми словами были названия соединений, представленных в таблице 2, в сочетании с терминами “eye”, “retina”, “toxicity”, “macula”, “electroretinogram”, встречаемых в заглавии и/или в рефератах статей [5].

**Таблица 2.** Алкилирующие соединения, используемые в химиотерапии и вызванные ими зрительные патологии (Перечень сокращений, использованных в таблице: isa- инфузия в сонную артерию; io- внутриглазное введение; iv- внутривенное введение; iaі- внутриартериальное введение; ivі- внутривентриальное введение; ро- пероральное введение; st- системная терапия/ системное введение) [5].

Классы	Препараты	Ссылка	Путь введения, эффект
HN2- произ- водные	Мехлорэтамин	[83]	(iv,ici) увеид, некроз сосудов хороида
	Мелфалан	[84,85]	(iaі,ivi) катаракта, депигментация, истоньшение радужки, ретинальный некроз, диффузн. дегенерация, экссудат, хорио-ретинальная атрофия, отек глазных век
	Хлорамбуцил	[86]	(po) кератид, диплопия, папилледема, ретинальные геморрагии
		[87]	(st) витреальные геморрагии, воспаление
	[88]	(po) диплопия, папилоэдема, ретинальные геморрагии	
	Бусульфан / Милеран	[89,90]	(iv) задняя субкапсулярная катаракта, полихромный блеск

Классы	Препараты	Ссылка	Путь введения, эффект
Алкил-сульфонаты		[91]	(iv) снижение синтеза ДНК в эпителии хрусталика
		[92]	(po) слепота , сухой кератит, катаракта
		[93]	(iv) расплывчатое зрение, конъюнктивит, субкапсулярная катаракта
Нитрозо-мочевины	Кармустин (BCNU)	[94]	(iv) двусторонняя слепота
		[95]	(iv) ненормальная пигментация макулы, макулопатия
		[96]	(ica, ia) конъюнктивальная гиперимия, несфокусир.зрение, ретинопатия,экссудат,геморрагия, воспаление роговицы, глаукома, вазодилатация сосудов глаза, помутнение стекловидного тела, ишемическая нейропатия
		[97]	(ia) потеря зрения (не наблюдали при iv)
	Ломустин (CCNU)	[98]	(po) ретинопатия,экссудат, ретинальная геморрагия, нечеткость зрения, потеря объемного зрения. (iv) задняя субкапсулярная катаракта,полихромный блеск (iv) снижение синтеза ДНК в эпителии хрусталика (po) слепота , сухой кератит, катаракта (iv) расплывчатое зрение, конъюнктивит, субкапсулярная катаракта
		[99,100 ]	(iv) частичная потеря зрения, ишемическая ретинопатия, двусторонняя отслойка стекловидного тела
			[100,101]
Триазены	Дакарбазин (DTIC)	[102]	(io) хориоретинит, ретинопатия
	Темозоломид (TMZ)	[103–105]	лучевая оптическая нейропатия
Метилгидразины	Прокарбазин	[106]	(iv) билатеральный ретинит
		[107]	(po) ретинальные геморрагии, фотофобия
		[108]	(st+радиотерапия) фотофобия

Классы	Препараты	Ссылка	Путь введения, эффект
Оксазо- фосфо- рины	Цислофосфамид	[109,110]	(iv) несфокусированное зрение, сухой кератоконъюнктивит, блефароконъюнктивит, точечный зрачок.
	Ифосфамид	[111]	(iv) несфокусированное зрение, сухой кератоконъюнктивит, блефароконъюнктивит, точечный зрачок. (iv) билатеральные скотомы, ↓ЭРГ амплитуд,
Комплексы Pt	Цисплатин	[112]	(iv) ↓ЭРГ активности, снижение цветовосприятия, нечеткость зрения
		[113]	(ica) нейроретинит –воспаление сетчатки и зрительн. нерва, потеря зрения, неравномерная пигментация сетчатки, расширение ЭРГ
		[114]	(iai) экссудативная отслойка сетчатки, воспаление
		[115]	(iv) билатеральные скотомы, ↓ЭРГ амплитуд
	Карбоплатин	[116]	(ivi) несфокусир.зрение, дисфункция колбочек, сниж. цветовосприятия
		[117]	(ica) кортикальная слепота , ↓a- и b-амплитуд ЭРГ, колбочк.дисфункция, ↓цветочувст.
		[118]	(ica) изменение пигментации макулы, ↑внутриглазного давления, отек роговицы, конъюнктивит
		[119]	(ivi) повреждение клеток и синапсов в наружн. сетчаке мышцы
	Оксалиплатин	[120]	(st) , нейротоксичность, острая боль в глазах, визуальные нарушения

Следует отметить две особенности индуцированной химиотерапией ретинопатии. Во-первых, не все возникающие зрительные расстройства связаны с лекарственной токсичностью, поскольку опухоли различной локализации и метастазы сами по себе могут симулировать некоторые симптомы [121]. Тем более это касается опухолей глаз (ретинобластомы и меланомы глаза) [122,123]. Во-

вторых, часть ретинопатий имеет неспецифический характер и не связана с непосредственным взаимодействием препаратов с клеточными структурами глаза. К сожалению, дискриминировать эти возможности на основании только клинических данных не представляется возможным.

Тот факт, что большая часть клеток сетчатки постмитотические, подчеркивает их невосполнимость, и потому их токсическая гибель ведет к частичной или полной слепоте. Наибольший интерес с точки зрения офтальмологической токсичности представляют нитрозомочевины и триазены: в силу своей липофильности они легко преодолевают гематоретинальный барьер, проникают в клетки и, благодаря высокой реакционной способности, активно взаимодействуют и повреждают критичные молекулы и клетки. Такими критичными мишенями являются фоторецепторные клетки сетчатки, пигментный эпителий и нейроны сетчатки.

Сетчатка находится в условиях постоянного окислительного и фотоокислительного стресса, вызванного длительным воздействием экзо- и эндогенных факторов: (1) видимого света; (2) высокой локальной концентрации кислорода [124]; (3) наличием высокотоксичных фотосенсибилизаторов (ретинала, бисретиноидов, липофусциновых гранул и ряда других) [125,126], (4) активным фагоцитозом обламывающихся наружных сегментов фоторецепторов [127]. И, тем не менее, сетчатка и ее клеточные компоненты имеют высокую устойчивость к окси-стрессу, много большую, чем другие клетки организма [128,129]. Одной из причин этого является обогащенность антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферолом, СОД, каталазой, глутатионом) [130–132].

### 1.7.1 Мелфалан

Внутривитреальное введение мелфалана широко используется для лечения ретинобластомы с обсеменением [133]. Положительный ответ больных при этом по показателю 2-годичной сохранности зрения составляет более 80% [134]. Но из-за токсичности самого мелфалана не редки случаи утраты больным зрения [135]. В работе [84] взрослым кроликам вводили в стекловидное тело мелфалан в

терапевтических дозах и в дробном режиме, используемом в терапии. Спустя 30 дней после последней инъекции у животных резко снижалась функциональная активность сетчатки (по данным ЭРГ), и дегенерировали оба ядерных слоя сетчатки

### 1.7.2 Нитрозомочевины

**Нитрозомочевины** - класс алкилирующих соединений, обладающих противоопухолевой способностью и активно применяемых в химиотерапии рака.

**Кармустин** (BCNU, N,N'-бис-(2-Хлорэтил)-N-нитрозомочевина, Молекулярный вес (Mw) 219. Офтальмологическая токсичность BCNU зависит от пути введения его в организм. Чаще побочные эффекты химиотерапии на зрение наблюдаются при внутриартериальной инфузии: введение BCNU в сонную артерию вызывала односторонний токсический ответ глаз [136–138]. В работе [106] сообщается о случае развития острого билатерального нейроретинита у больного множественной миеломой в ответ на внутриартериальную трансфузию BCNU и прокарбазина. Нейроретинит сопровождался снижением электрофизиологической активности сетчатки (ЭРГ) [139]. У двадцати девяти больных глиомой после курса терапии BCNU и цисплатином электроретинографически выявлялась ретинальная дисфункция. Хотя авторы делают вывод об ишемическом повреждении сетчатки, оно не сопровождалось клиническими проявлениями [95].

У трех из восьми больных глиомой, леченных внутривенным введением BCNU и внутриартериальным введением цисплатина, развивалась тяжелая латеральная макулопатия со стороны инфузии, связанная с изменением в сетчатке и пигментном слое в пределах макулы [95].

Девяти больным раком молочной железы на поздних стадиях внутривенно вводили в высокой дозе цисплатин, циклофосфамид и BCNU, в сочетании с трансплантацией аутологичного костного мозга без облучения. В результате наблюдали у пяти больных появление симптомов ретинопатии. Симптомы включали в себя хлопьевидный экссудат в сетчатке, геморрагии в сетчатке,

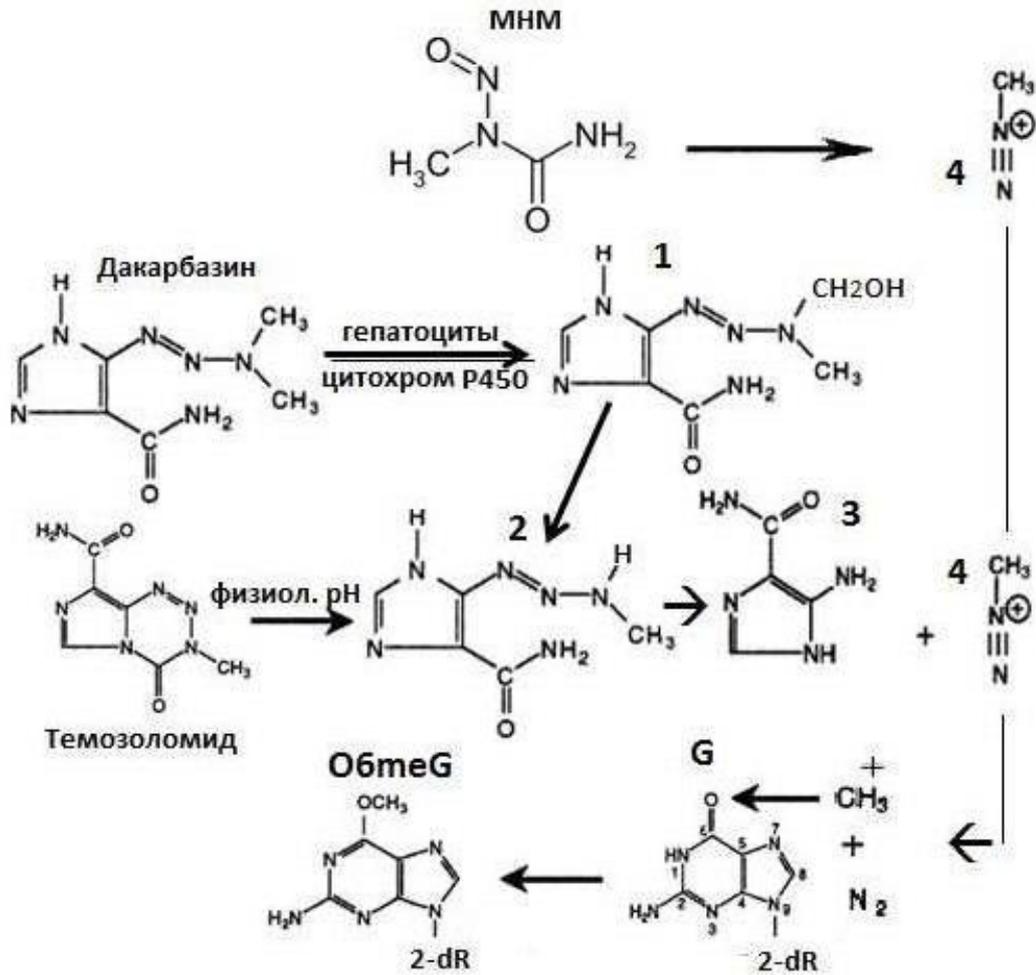
экссудат в макуле, отек нервного диска. Ретинопатия сочеталась с зрительной нейропатией, которая в отличие от ретинопатии, была необратима [140].

**Нимустин** (ACNU, амино-хлорэтил-нитрозомочевина, Mw 273,7) - бифункциональный агент, широко используется для лечения опухолей мозга [141,142]. Взаимодействуя с ДНК в клетке, вызывает два типа повреждений: алкилирует гуанин по атому Об, формируя Об-хлорэтилгуанин, который, если не репарируется, дает сшивки dG-dC в ДНК [143]. Сшивки не узнаются системой коррекционной репарации (MMR) и, как и двунитевые разрывы, летальны для делящихся клеток. Метилгуанинтрансфераза (MGMT) узнает и деалкилирует Об-хлорэтилгуанин, предотвращая образование сшивок [144,145]. Двадцати семи больным глиомой или астроцитомой внутриартериально вводили ACNU (6-недельный курс). В интервале между двумя курсами химиотерапии, больных локально облучали в дозе 60 Гр. Ответ опухолей составил 51,8%. У четырех пациентов были офтальмологические осложнения: билатеральный отек зрительного нерва (1) и частичная утрата зрения (3), из которых у двух больных – ишемическая ретинопатия и у одного наблюдалась билатеральная отслойка сосудистой оболочки глаз [99].

Больному с астроцитомой вводили комбинацию цисплатина с ACNU инфузией в левую сонную артерию. В результате у больного наблюдалась гемианопсия, ассоциированная с дегенерацией левого зрительного нерва [101]. В работе [146] на голых бестимусных мышях с привитыми ксенографтами (MGMT<sup>+</sup>) и (MGMT<sup>-</sup>) линий клеток карциномы желчного пузыря человека, показали, что, по крайней мере, часть цитотоксичности ACNU ассоциирована с его алкилирующей способностью.

**Метилнитрозомочевина** (МНМ, N-Нитрозо-N-метилмочевина, Mw 103). Положительными качествами МНМ как противоопухолевого препарата является ее растворимость и липофильность, что способствует преодолению гематоэнцефалического барьера и быстрому проникновению в клетки. Кроме того, МНМ не нуждается в метаболической активации, самопроизвольно распадаясь в

физиологической среде до активного метил-дiazониевого иона, метильная группа которого взаимодействует с электрофильным анионом в мишени (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Схема превращений алкилирующих агентов в организме до метилдiazониевого катиона.

- (1) – гидроксиметил-триазенил-имидазол-карбоксамид (НМТIC)
- (2) – метил-триазенил-имидазол-карбоксамид (МТIC)
- (3) – амино-имидазол-карбоксамид (АIC)
- (4) – метилдiazониевый катион

Противоопухолевая активность МНМ исследовалась в 60-70 годы (см. обзор [147]). Была показана высокая противоопухолевая эффективность на большом числе различных экспериментальных моделей опухолей - перевиваемых, спонтанных, индуцированных. В частности, системная инъекция МНМ мышам тормозила развитие L1210 лейкемии у мышей [148]. Особенно впечатляющими

были результаты от инъекции МНМ с метотрексатом. Системная инъекция МНМ подавляла рост асцита Эрлиха, карциномы 256 Walker и саркомы 45 [149]. В работах [150,151] получили убедительный противоопухолевый эффект от введения МНМ мышам с внутриартериально трансплантированными асцитом Эрлиха и саркомой 180. На крысах комбинация МНМ с циклофосфамидом оказалась очень эффективна при лечении лейкемии L5222 [152].

В клинических испытаниях была обнаружена высокая эффективность МНМ при лимфоме Ходжкина и неходжкинских лимфомах, мелкоклеточном раке легкого, меланоме, глиобластоме. В значительном числе случаев применение МНМ при этих опухолях приводило к длительным полным и частичным ремиссиям [149,153,154]. Однако вместе с положительными результатами обнаруживалась высокая канцерогенная способность МНМ[155], которая в конце концов стала превалирующей в сравнении с лечебными достоинствами препарата [155]. Связано это с формированием в ДНК безразрывных дефектов: ДНК-метилованных оснований, апуриновых и апириимидиновых сайтов (АП-сайтов) [14], которые приводят к появлению ошибок при репликации ДНК. Сегодня МНМ используют в качестве канцерогенного и ретинодегенеративного стандарта в экспериментальных моделях на грызунах [156].

Близкая МНМ по структуре *этилнитрозомочевина* (ЭНМ) тоже обладает ретинотоксическим действием на крысах. Отмечается, что последовательность событий в сетчатке после воздействия ЭНМ такая же, как и после МНМ (морфологическая картина дегенерации, экспрессия проапоптотических белков), но помимо этого ЭНМ также индуцирует в слоях внутренней сетчатки экспрессию гистона  $\gamma$ -H2AX – маркера двунитевых разрывов в ДНК [10].

### 1.7.3 Триазены

Ретинотоксический эффект от *дакарбазина* (DTIC, дитио-имидазол-карбоксамид, Mw 182,2), который вводили кроликам и обезьянам интраокулярно (в конъюнктивальный мешок) и внутривенно, изучали после накопленной в

течение трех недель дозы 100 мг. У обезьян наблюдался деструктивный хориоретинит и ретинопатия, которые подтверждали гистологически [102]. DTIC известен своей фоточувствительностью (максимум поглощения на 330 нм). Это позволяет ожидать от него фотосенсибилизации кожи и тканей глаза у пациентов [157]. В работе [158] проводилась оценка фотогенотоксического действия DTIC на сетчатку у крыс: животных, через 1ч после перорального введения препарата, облучали УФ-видимым светом (7 Дж/см<sup>2</sup>), 24 мин. Показано, что спустя 1 ч после однократного введения DTIC в дозе 250мг/кг, концентрация препарата в сетчатке составляла ~10 мг/кг. И хотя при этой концентрации не наблюдалось фотоповреждения ДНК в клетках сетчатки, в коже эти повреждения достоверно детектировались. При этом DTIC в коже накапливался за это же время в количестве в 8-10 раз больше, чем в сетчатке. В статье [122] описан случай больного метастатической меланомой кожи, у которого после резекции первичной опухоли и двух курсов адьювантной химиотерапии (DTIC 800 мг/м<sup>2</sup> и преднизолон) появились симптомы ретинопатии – никталопа (ночная слепота), мерцающие огни в обоих глазах и значительное снижение амплитуд электроретинограммы. Иммунохимический анализ показал наличие в сыворотке крови больного антител к внутренней сетчатке глаза (главным образом к биполярным клеткам). В последующем этот аутоимунный синдром (меланома-ассоциированная ретинопатия) был подтвержден на одиннадцати больных. Отмечается, что в некоторых случаях показатели зрения улучшались в ответ на исключение DTIC и инъекции только преднизолона, что подчеркивает ретинотоксическую роль DTIC.

Как и DTIC, *темозоломид* (TMZ, Mw 194,1) является пролекарством. Из рисунка 4 видно, что химические превращения *in vivo*, претерпеваемые этими лекарствами, одинаковы и проходят стадию образования метил-триазенил-имидазол-карбоксамид (MTIC). В отличие от DTIC, для которого эта реакция протекает с участием цитохрома P450 в гепатоцитах [159], превращение TMZ происходит спонтанно при физиологическом pH [160]. MTIC имеет очень короткое время жизни и быстро распадается на интермедиат аминокимидозол-кабоксамид и высокореактивный метилдiazониевый катион, который и осуществляет

метилирование мишени. На рисунке 4 показано метилирование гуанина в ДНК по атому O6 с образованием аддукта O6meG – главной причины мутагенеза и цитотоксичности всех монофункциональных алкилирующих агентов [161]. Цитотоксичность триазенов не зависит от клеточного цикла и проявляется как на пролиферирующих, так и на постмитотических дифференцированных клетках. Хотя в основе их цитотоксичности лежит общий механизм алкилирования молекул-мишеней (Рисунок 4), пути развития его разные. В случае делящихся клеток этот путь связан с блоком репликации; в случае постмитотических клеток этот путь связан с энергетическими затратами на репарацию большого количества повреждений ДНК и критическим снижением внутриклеточного уровня АТФ [162,163]. Применение TMZ в химиотерапии глиомы увеличивает продолжительность жизни пациентов на 2,5 месяца по сравнению с радиотерапией. Однако у 15-20% пациентов развивается клинически значимая токсичность, которая вынуждает приостановить химиотерапию [164]. В отдельных случаях это связано с офтальмологической токсичностью [165].

Подытоживая эту главу обзора, можно утверждать, что с одной стороны, рассмотренные алкилирующие агенты в ходе химиотерапии или в прямых экспериментах на животных демонстрируют офтальмологическую токсичность, которую следует принимать во внимание в процессе химиотерапии пациентов. С другой стороны, можно полагать, что ретинотоксичность рассматриваемых препаратов в большой степени связана с их ДНК-тропностью и способностью к алкилированию оснований в ДНК. То есть, механизмы противоопухолевого и ретинотоксического действия препаратов сходны: они связаны с повреждением/алкилированием ДНК, инициирующим гибель клетки. Важная роль в этом принадлежит белку p53, активирующему программу гибели клетки в ответ на возникшие повреждения ДНК [166]. Из этого следует ожидать, что подавление репарации повреждений, будучи положительным для целей терапии опухоли, имеет негативный результат для сетчатки. Оценить и сравнить степень повреждения ДНК в сетчатке *in vivo* и репарацию в ответ на введение этих

препаратов животным в ретинотоксической дозе было одной из задач данной работы.

#### 1.7.4 Интерферон

Интерферон (INF), как иммуностимулятор, используется в качестве адъювантной терапии после хирургического удаления меланомы и глиомы [167] или в сочетании с цитотоксической химиотерапией [168], поскольку опухоли снижают противораковый иммунитет [169]. Однако терапевтический эффект INF осложняется его токсичностью (в том числе ретинотоксичностью), в особенности при высоких дозах. В литературе ретинотоксичность интерферона выделяют как интерферон-индуцированную ретинопатию (ИИР) [6]. На тридцать больных меланомой частота ИИР составляла 13% [170]. Симптомами ИИР были снижение остроты зрения, геморрагии в сетчатке, отек макулы, хлопьевидный экссудат в сетчатке [171]. Индукция офтальмологических осложнений при системной INF-терапии отмечена у больных гепатитом С, карциномой почки, лейкемией, и меланомой кожи (всего двенадцать больных) [172]. Осложнения (ретинальные геморрагии, хлопьевидный экссудат в сетчатке, отек макулы, ишемическая зрительная нейропатия) диагностировали спустя две недели после начала INF- $\alpha$ 2b-терапии. Отмечается, что снижение дозы INF в 2 раза ведет к исчезновению патологических симптомов. В работе [173] проанализировали 1334 сообщения о негативных побочных эффектах адъювантной INF-терапии меланомы кожи. В 8,4% сообщений отмечаются зрительные осложнения, связанные в основном с потерей/ослаблением зрения и ишемией сетчатки. Считается, что INF в высокой дозе тормозит миграцию эпителиальных клеток в сосудах, тем самым снижая репарацию сосудов сетчатки и способствуя окклюзии [174].

Из представленных здесь литературных данных следует, что многие препараты, используемые в химиотерапии, обладают ретинотоксическим действием (метил- и этилнитрозомочевины, триазены, мелфалан). С практической стороны этот факт делает необходимым участие офтальмологов в химиотерапии

[82]. С другой стороны, на этом эффекте основаны фармакологические модели дегенерации сетчатки у животных, используемые как для изучения механизмов дегенерации, так и возможности восстановления и защиты сетчатки от вредных воздействий [84,175–178]. Наиболее популярной моделью является МНМ индуцированная дегенерация сетчатки у мышей и крыс [156]. Она используется не только для изучения механизмов дегенерации сетчатки [179–181], но и для оценки активности средств, препятствующих ей [182–184].

### **1.8. Фармакологические модели дегенерации сетчатки**

Дегенерация сетчатки, вызванная гибелью фоторецепторных клеток и синаптически связанных с ними нервных клеток, наблюдается в случае возрастной макулярной дегенерации, пигментного ретинита и других наследственных заболеваний. Согласно медицинской статистике, не менее 50% случаев слепоты обусловлены этими причинами [185]. Далее приводятся различные модели дегенерации сетчатки у животных, индуцированной с помощью химических соединений.

Системное введение метанола крысам [186,187]. Наблюдали губительный эффект на ЦНС и повреждение наружной и внутренней сетчатки, включая нейроны сетчатки.

Внутривитреальная инъекция крысам АТФ [175]. Деструктивный эффект на сетчатку развивается довольно медленно (несколько месяцев), но первые морфологические изменения могут быть зарегистрированы спустя 1-2 недели в центральной области сетчатки.

Системное (в/в, 5-12 мг/кг ) введение йодацетата свиньям [176]. Регистрировали билатеральное дозозависимое снижение/потерю зрения, деструкцию сегментов, снижение количества ядер фоторецепторов, снижение числа синапсов, гипертрофия тела ГКМ при интактной внутриклеточной структуре.

Многokратное (в течение 3-х недель) интравитреальное введение мелфалана кроликам до накопления дозы 15мкг/глаз животного [84]. Спустя 30 дней после последней инъекции наблюдалась полная атрофия сетчатки (дегенерация обоих ядерных слоев сетчатки) и сглаживание (исчезновение а-и b-волн) профиля ЭРГ.

ПЭГ-индуцированная дегенерация сетчатки у мышей [177]. Однократная субретинальная инъекция полиэтиленгликоля мышам спустя 5 дней приводила к гибели клеток в ядерных слоях сетчатки.

Кислородная модель дегенерации сетчатки у мышей (oxygen-induced retinopathy). Модель для изучения вклада сосудистой патологии в зрительную дегенерацию основана на воздействии на постнатальных мышат гипероксии в течение фазы развития у них сосудов. Для этого 7-дневные мышата в течение 5 дней выдерживаются в атмосфере 75%-го кислорода, а затем 5 дней в воздушной атмосфере [178]. Такое прекондиционирование мышей приводило к недоразвитию капиллярной сети в сетчатке и к формированию перманентно ишемической сетчатки. Ишемическая сетчатка характеризовалась дисфункцией гематоретинального барьера, гиперактивацией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), повышенной проницаемостью сосудов, зрительной дисфункцией и снижением электрофизиологической активности сетчатки (ЭРГ).

#### МНМ в лабораторной модели дегенерации сетчатки животных.

Развитие дегенерации сетчатки и гибель фоторецепторов при действии МНМ было впервые отмечено в 1967 году, при системном введении сирийским золотистым хомякам [188]. Позднее, апоптоз был определен как причина вызванной действием МНМ гибели фоторецепторов у крыс [189], мышей [13] и хомяков [190]. В дальнейшем, было показано, что однократное внутрибрюшинное введение животным разных видов МНМ в дозе равной, или превышающей 60 мг/кг, вызывает апоптоз фоторецепторов и дегенерацию сетчатки [7]. Деструкция сетчатки происходила более, чем через двое суток, и наблюдалась, главным образом, в слое фоторецепторов [191]. МНМ – монофункциональный агент, метилирующий основания ДНК [14]. Показано, что МНМ вызывает в сетчатке образование метилированных аддуктов ДНК, снижает уровень анти-

апоптотического белка Bcl-2, но увеличивает экспрессию проапоптотического Bax, активирует каспазу 3 [128,192]. Следует подчеркнуть важное для нас наблюдение: ГКМ, в ответ на действие МНМ, не только сохраняли жизнеспособность, но и вступали в клеточный цикл [7,12,193]. Именно эту модель мы взяли в качестве основной для нашей работы по индуцированной дегенерации сетчатки и изучению ответа на нее глии Мюллера.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Животные

Исследования проводили на половозрелых мышах – гибридах F1CBAxС57Bl6 (♀), в возрасте 2.5 мес. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях ( $22 \pm 2$  °С, относительная влажность воздуха  $60 \pm 10$  % и 12-часовой световой период), имели неограниченный доступ к воде и коммерческому питанию [179,180]. Все процедуры с животными осуществлялись в соответствии с Положением Комитета по этике ИБХФ РАН.

### 2.2. Системное введение ретинотоксического агента и BrdU

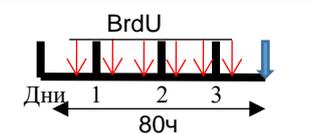
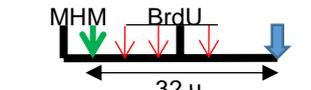
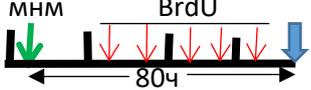
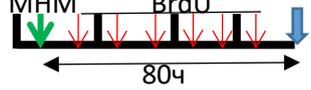
Методический подход для исследования ГКМ у мышей базировался на модели, называемой в литературе «*in vivo* pharmacological injury model for the adult retina regeneration» [8]. В ней острая дегенерация сетчатки у мышей индуцируется системной (однократной внутрибрюшинной) инъекцией ретинотоксического агента. В ответ на дегенерацию сетчатки (гибель фоторецепторных клеток) активируется глиоз и пролиферация ГКМ, которую фиксировали по включению в ядра ГКМ пролиферативного маркера бромдезоксипуридина, BrdU (Sigma).

В качестве индукторов повреждения сетчатки использовались 4 алкилирующих агента – метилнитрозомочевина (МНМ) (N3385, очищенный, Sigma), темозоломид (TMZ) (T2577, очищенный, Sigma), дакарбазин (DTIC) (D2390, очищенный, Sigma) и нимустин (ACNU) (N8659, очищенный, Sigma). Все реактивы в кристаллическом виде хранили при  $-60^{\circ}\text{C}$ , 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 [194].

Спустя сутки после инъекции МНМ 3-6 раз внутрибрюшинно вводили BrdU, в виде раствора в стерильном PBS (10 мг/мл), доза 60-70 мг/кг на инъекцию (Таблица 3, схемы инъекций).

Ретиноксический эффект оценивали спустя 5 ч и 72-80 ч после инъекции препаратов, в суспензии клеток сетчатки, по показателям средних значений поврежденности ДНК (методом комет) [2–4].

**Таблица 3.** 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 [2,3].

	Схема инъекций	Инъекции/ часы	<N ГКМ/1000кл> ±sd	Комментарии
1		6 / 80 ч	1,25±1	Контроль (спонтанная пролиф. 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

### 2.3. 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 [2–4].

## 2.4. 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°C, 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°C, используя для этого метод ДНК-комет [2–4].

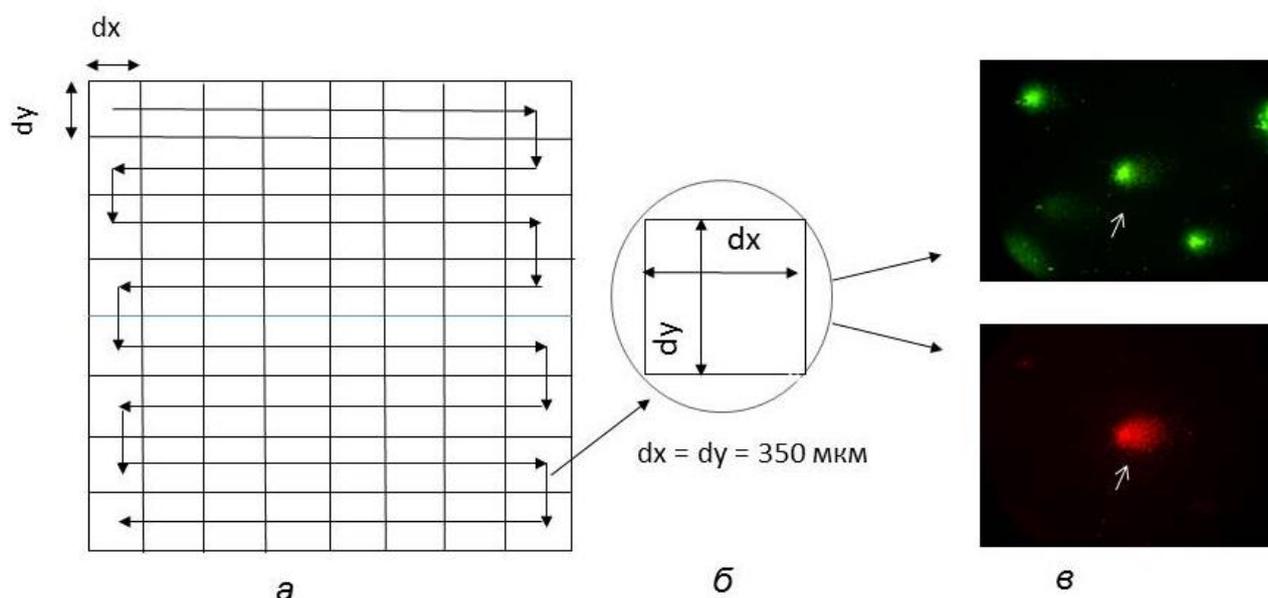
## 2.5. Метод ДНК-комет: иммобилизация клеток в агарозе, лизис, электрофорез и визуализация клеток

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 [128]. Стекла с застывшим гелем погружали в лизирующий раствор: 0.5 М Na<sub>2</sub>EDTA, 2 % Na-лауроилсаркозил, 0.3 мг/мл протеиназы К, pH 8, 37 °C. Спустя 2 ч лизирующий раствор заменяли на стандартный солевой буфер (2.5 М NaCl, 100 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 2 мМ Tris, pH 10) при 8°C на 15 ч. Щелочной лизис и электрофорез проводили в растворе, содержащем 30 мМ NaOH, 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13, (8 °C, 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. На поверхность слайдов наносили раствор первичных анти-BrdU антител (10 мкг в 60 мкл PBS; Abcam, ab131442, США), накрывали парафильмом и инкубировали в течение ночи при 8°C. После трехкратной отмывки в PBS на слайд наносили такой же объем вторичных антител (7мкг/мл), ассоциированных с Alexa 594 (Mab2-Alexa594, ab150080, Abcam, США) и инкубировали 2-3 ч при комнатной температуре. Слайды отмывали от антител в PBS, высушивали на воздухе и дегидратировали в метаноле. Фоновое окрашивание 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 [2–4].

## 2.6. Сканирование слайда и интерпретация результатов

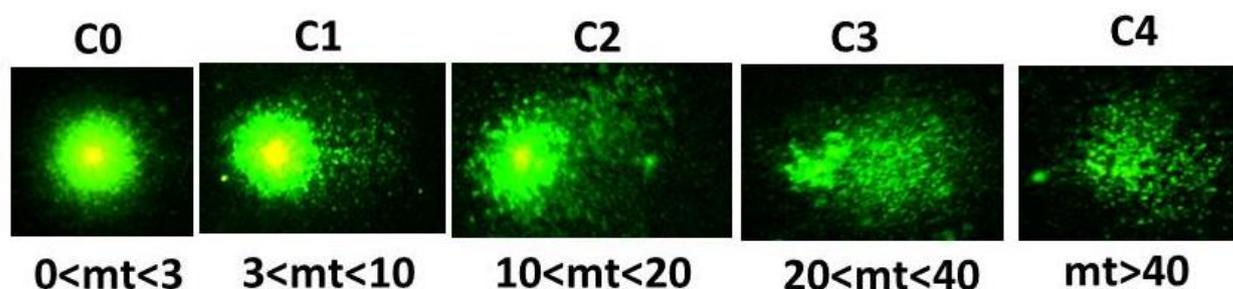
Сканирование слайда в автоматическом режиме проводили на микроскопе Axio Imager Z2m (Carl Zeiss, Германия), снабженном камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). В ручном режиме использовали микроскоп ЛОМО МИКМЕД-2 (АО “ЛОМО”, Россия) с видеокамерой ТСС-5.01СЕ (ООО “Ломо-Микросистемы”, Россия). Сканировали весь слайд (18 × 18 мм) или его репрезентативную часть с шагом 0.35 мм – размер прямоугольника, вписанного в круглое поле обзора микроскопа при увеличении 400× (Рисунок 5, а, б).



**Рисунок 5.** Процедура сканирования слайда и подсчет клеток в слайде. Сканирование слайда (а). Прямоугольное поле (б) 350x350 мкм, содержащее клетки/кометы, транслируется на экран монитора (в) и сохраняется в памяти компьютера как один из 2500 кадров, составляющих слайд размером 18x18мм. Сканирование происходит попеременно в зеленом и красном спектрах флуоресценции. Зеленые кометы окрашены SYBR Green I, красная комета – ГКМ, окрашена анти-BrdU антителом с Alexa594. Стрелки указывают одну и ту же комету в двух каналах флуоресценции [2,3].

Сканирование осуществляли попеременно в синей и в зеленой области возбуждения флуоресценции. Первое сканирование давало изображение клеток (комет), флуоресцирующих в области зеленой флуоресценции SYBR Green I (все

клетки сетчатки, содержащие ДНК). Второе сканирование давало изображение только BrdU-позитивных (красных) клеток (комет). Подсчет числа клеток и анализ комет проводили на получаемых изображениях (Рисунок 5, в). Подсчет числа клеток проводили 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) [195]. Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений mt (Рисунок 6). Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова-Смирнова, считая различия достоверными при  $P < 0.05$  [2–4].



**Рисунок 6.** 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 [2–4].

## 2.7. Приготовление тканевых срезов

Тканевые срезы сетчатки толщиной 8-12 мкм готовили из глаз, фиксированных в параформальдегиде 4% в PBS, 8°C, 24 часа, сразу после извлечения, с последующей обработкой спиртом (несколько отмывок в 70% этаноле, далее – последующие обработки в этаноле возрастающей крепости от 80% до 100%). Затем глаза подвергали обработке в смеси спирта с ксилолом (в соотношениях 1:1 и 1/4:3/4) выдерживали в ксилоле, и заливали в смесь парафина с ксилолом (при температура 57 °C), и, после пропитки в парафине, формировали парафиновый блок, из которого, при помощи ротационного микротомы, получали

срезы сетчатки глаза толщиной 8-12 мкм. Срезы анализировали с помощью микроскопа ЛОМО МИКМЕД-2 (АО “ЛОМО”, Россия), в проходящем свете и во флуоресцентном режиме после прокрашивания SYBR Green I. Для морфометрического измерения слоев сетчатки использовали окулярную линейку [2–4].

## **2.8. Оценка апоптоза в ткани методом TUNEL**

Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали набор The TACS<sup>®</sup> 2 TdT Fluorescein kit, (Trevigen, США, 4812-30-K) [196] и рекомендованную методику к нему. Визуализацию микроскопических изображений на срезах проводили на микроскопе ЛОМО МИКМЕД-2 (АО “ЛОМО”, Россия), во флуоресцентном режиме, с набором фильтров для регистрации флуоресценции FITC [2–4].

## **2.9. Иммуногистохимия**

Для иммуногистохимических исследований тканевые срезы после депарафинизации, фиксации и пермеабилзации в соответствии со стандартным протоколом к набору The TACS<sup>®</sup> 2 TdT Fluorescein kit, (Trevigen, США, 4812-30-K) [196], инкубировали с моноклональными антителами к белку p53 (Abcam, ab131442, США), каспазе 3 (Abcam, ab2302, США) и к BrdU (Abcam, ab8152, США). Все вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентными красителями (Mab2-Alexa594, ab150080; Mab2-FITC, ab7064; Mab2-FITC, ab6717; 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 [4].

## 2.10. 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. ДНК из клеточного осадка экстрагировали в ТЕ буфере (0,05М Tris, 0,02М EDTA, pH7,2) с добавлением 1 % Triton X-100, 0 °С, 10 мин. Смесь центрифугировали 1600G, 5 мин и отбирали супернатант, в который добавляли SDS (1%), протеиназу К (4 мкг/мкл) и инкубировали при 40 °С 12-14 ч. ДНК осаждали 0,8 М ацетатом натрия в этаноле при -20 °С 16 ч и центрифугировали (13000G, 15 мин). Осадок подсушивали на воздухе, растворяли в ТЕ буфере с утяжеляющим буфером и вносили 20 мкл в колодец 1,5%-ного агарозного геля в TAE буфере, содержащего бромистый этидий 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряжении 2V/см под визуальным контролем формирования лесенки нуклеосом в геле [4,197].

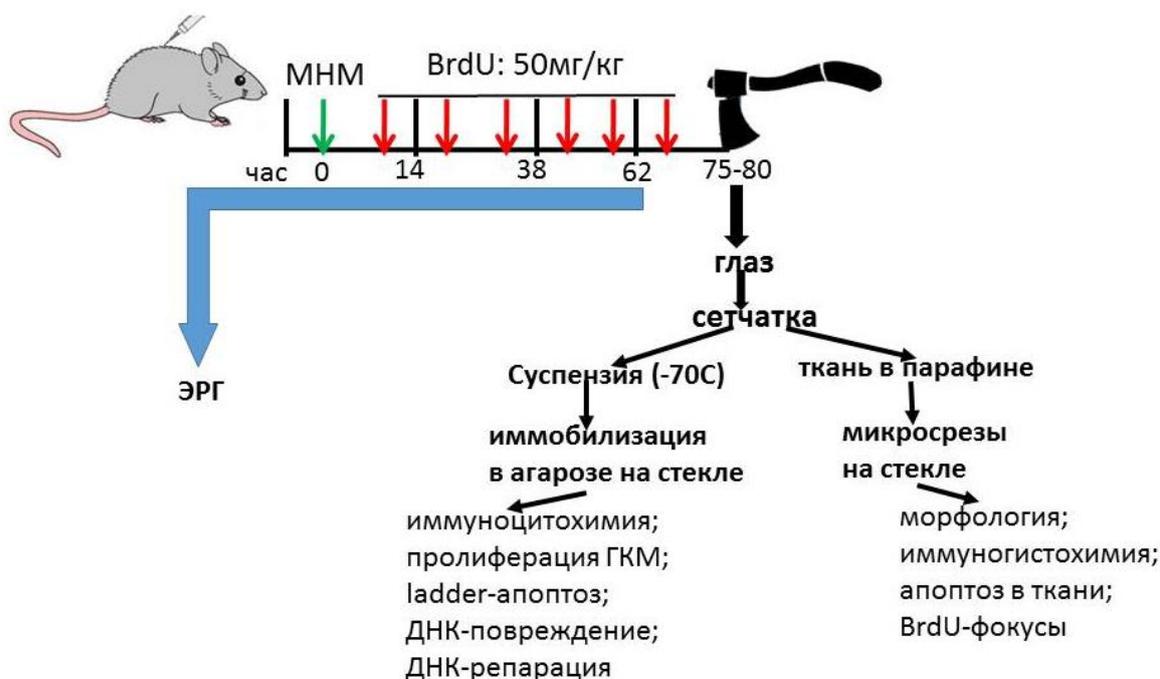
## 2.11. Регистрация электроретинограммы

Физиологическую активность сетчатки исследовали методом скотопической электроретинографии, 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 золитил-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 [179,180,198,199].

## 2.12. 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. (Originlab Corporation, США) [4]. Ниже представлена общая схема эксперимента, в которой в качестве индуктора дегенерации использовалась МНМ.



**Рисунок 7.** Принципиальная схема эксперимента, включающая перечень методов, используемых в работе. В отдельных отмечаемых случаях число инъекций BrdU, было меньше (см. таблицу 1)

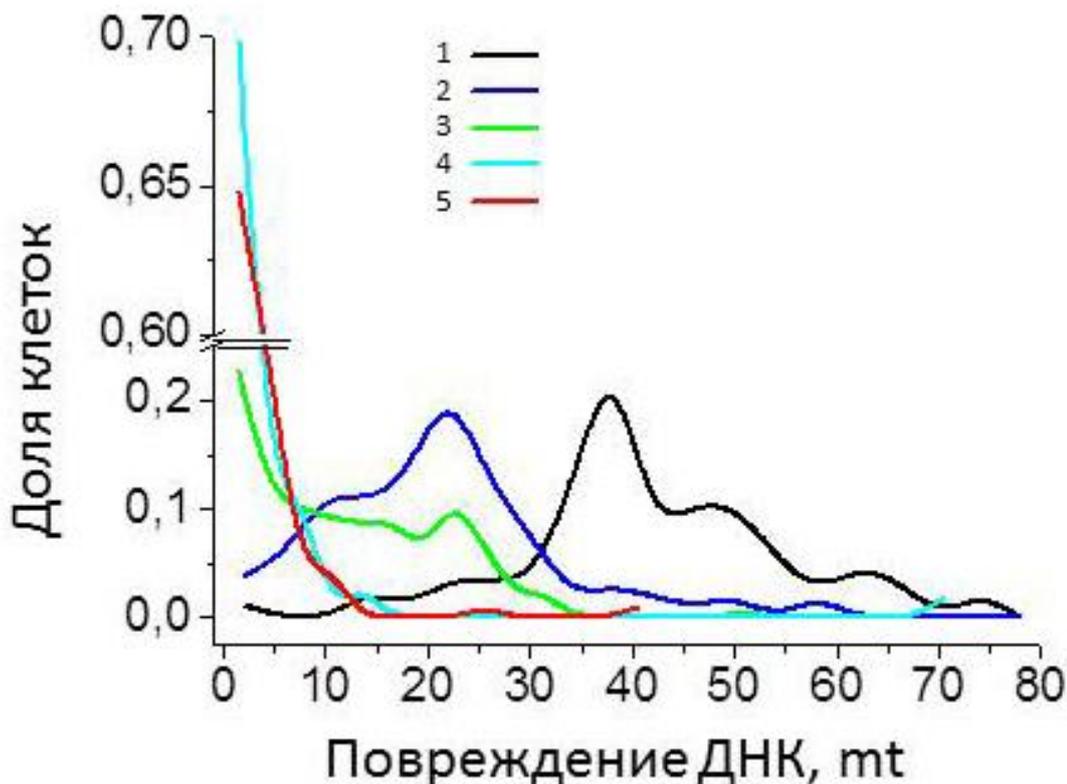
### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Оценка ретинотоксичности 4-х алкилирующих агентов, используемых в химиотерапии

Алкилирующие агенты - ДНК-тропные соединения, широко используются в химиотерапии онкологических заболеваний. Нередко это сопровождается у пациентов побочными эффектами в виде офтальмологических осложнений и ретинопатии [5]. Это обстоятельство привлекает к ним внимание, как к возможным индукторам повреждения сетчатки в моделях дегенерации и регенерации.

В этой части работы мы сравнивали ретинотоксичность 4-х алкилирующих препаратов, 2 из которых относятся к нитрозомочевинам (МНМ и АСНУ), а 2 - к триазенам (DTIC и TMZ). Опыт *in vitro* проводили, инкубируя выделенную из глаз мыши сетчатку в PBS-буфере при 37 °С с растворенными в нем агентами. Токсический эффект оценивали по выходу повреждений ДНК в клетках сетчатки после 1 ч инкубации, используя для этого метод ДНК-комет. На рисунке 8 приведены частотные распределения клеток сетчатки по степени повреждения ДНК в них под действием агентов. Средние значения поврежденности ДНК в сетчатке  $\pm$ SD приведены в подписи к рисунку.

По убыванию ретинотоксичности *in vitro* агенты располагаются в ряд – МНМ>TMZ>DTIC>АСНУ. Последний в этом ряду АСНУ не обнаруживает ретинотоксического действия *in vitro*.



**Рисунок 8.** Частотные распределения клеток сетчатки мышей по поврежденности ДНК в них после 1 ч. инкубации сетчатки с алкилирующими агентами *in vitro*. 1 – МНМ, 0,7mM,  $\langle mt \rangle = 42 \pm 13$ ; 2 – TMZ, 0,7mM,  $\langle mt \rangle = 21 \pm 11$ ; 3 – DTIC, 0,9mM,  $\langle mt \rangle = 12 \pm 9$ ; 4 – ACNU, 0,4mM,  $\langle mt \rangle = 4 \pm 9$ ; 5 – контроль,  $\langle mt \rangle = 3 \pm 5$

Аналогичное исследование ретинотоксичности проводили и в опытах *in vivo*, в которых однократно вводили мышам внутрибрюшинно препараты в примерно эквимолярных дозах. В этих экспериментах ретинотоксический эффект оценивали спустя 5 ч и 72 ч после инъекции препаратов. По нашим ранее полученным данным, 5 ч – оптимальное время достижения максимального повреждающего эффекта МНМ на ДНК сетчатки у мышей после внутрибрюшинной инъекции; 72 ч – время максимальной частоты МНМ-индуцированного апоптоза фоторецепторов в сетчатке у мышей по результатам TUNEL. Нимустин был исключен из экспериментов *in vivo* в связи с его высокой общей токсичностью на животных, плохой растворимостью и низкой ретинотоксичностью *in vitro* (Рисунок 9). Полученные результаты экспериментов *in vivo* представлены на рисунке 9 и в

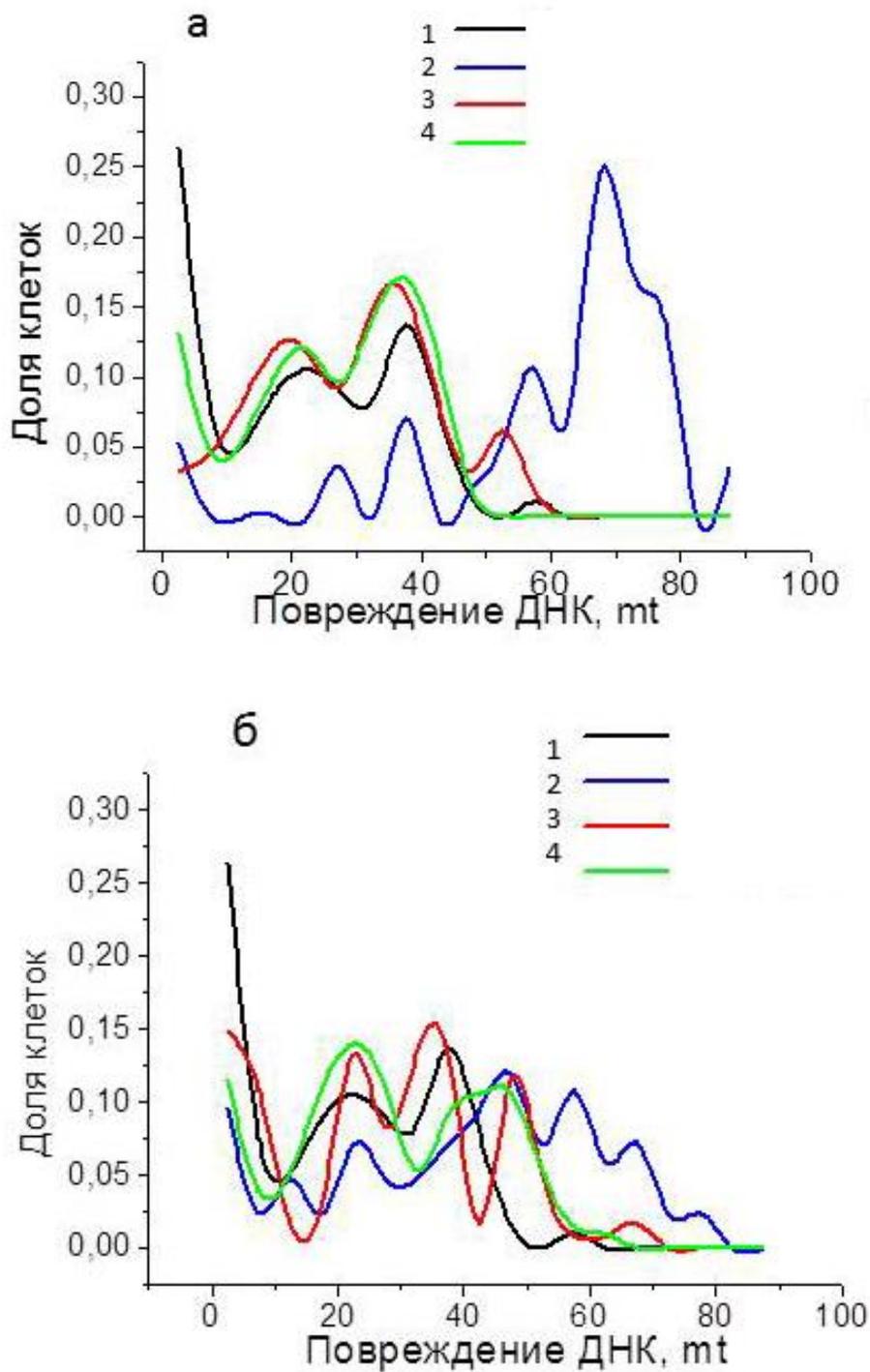
таблице 4 средних значений поврежденности ДНК в клетках сетчатки после инъекции агентов

**Таблица 4.** Средние показатели ретинотоксичности алкилирующих агентов *in vivo*,  $m \pm SD$ .

Инкубация, ч	Контроль	МНМ 0,7 мМ	TMZ 0,7mM	DTIC 0,9mM
5 ч	20,6±14,9	61,0±19,5*	20,7±11,9	25,28±13,3
72 ч	-	40,1±20,2*	27,5±17,1	39,12±16,6*

\*различия с контролем достоверны при  $P < 0,05$ .

Как и в опытах *in vitro*, в опытах *in vivo* наивысшую ретинотоксичность и стабильность результатов обнаруживает МНМ. Через 5 ч, на момент достижения максимального ДНК-повреждающего эффекта МНМ (Рисунок 9,а), эффект остальных 3-х алкилирующих агентов практически не отличим от контроля. Поэтому МНМ мы использовали для последующей ретинотоксической активации ГКМ *in vivo*.

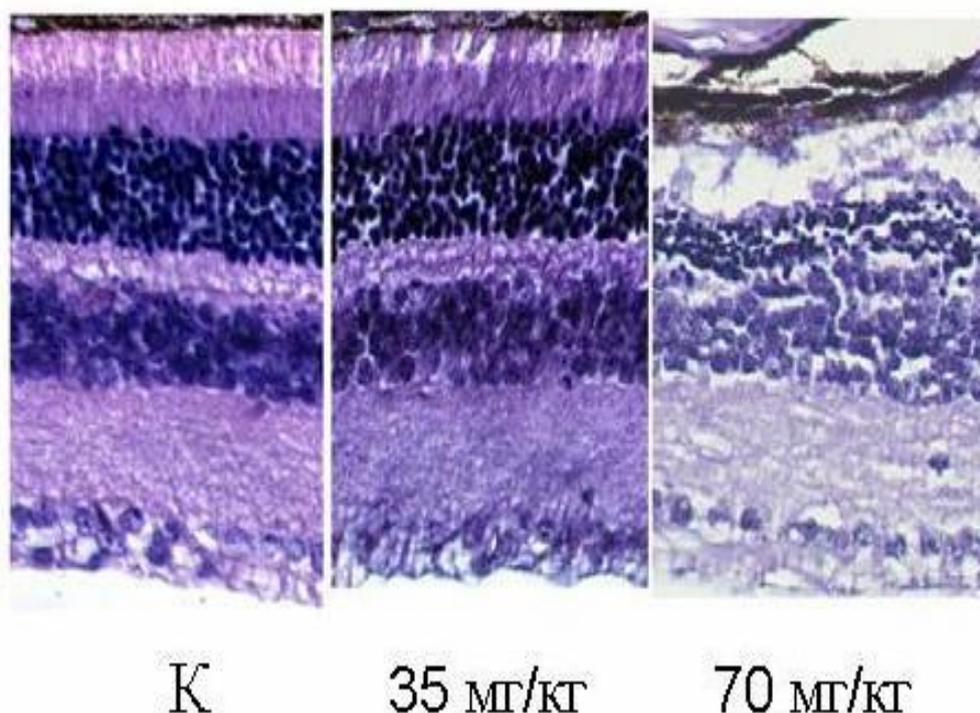


**Рисунок 9.** Частотные распределения клеток сетчатки мышей по поврежденности ДНК в них спустя 5 ч (А) и 72 ч (Б) после внутрибрюшинной инъекции алкилирующих агентов мышам. 1- контроль; 2 – МНМ, 0,7 mM; 3 – TMZ, 0,7mM; 4 - DTIC, 0,9mM.

### 3.2. Влияние МНМ на структуру и функциональную активность сетчатки у мышей

Ретинотоксическое действие МНМ известно давно и целенаправленно исследуется как модель дегенерации сетчатки во многих лабораториях мира [7,13,188–190].

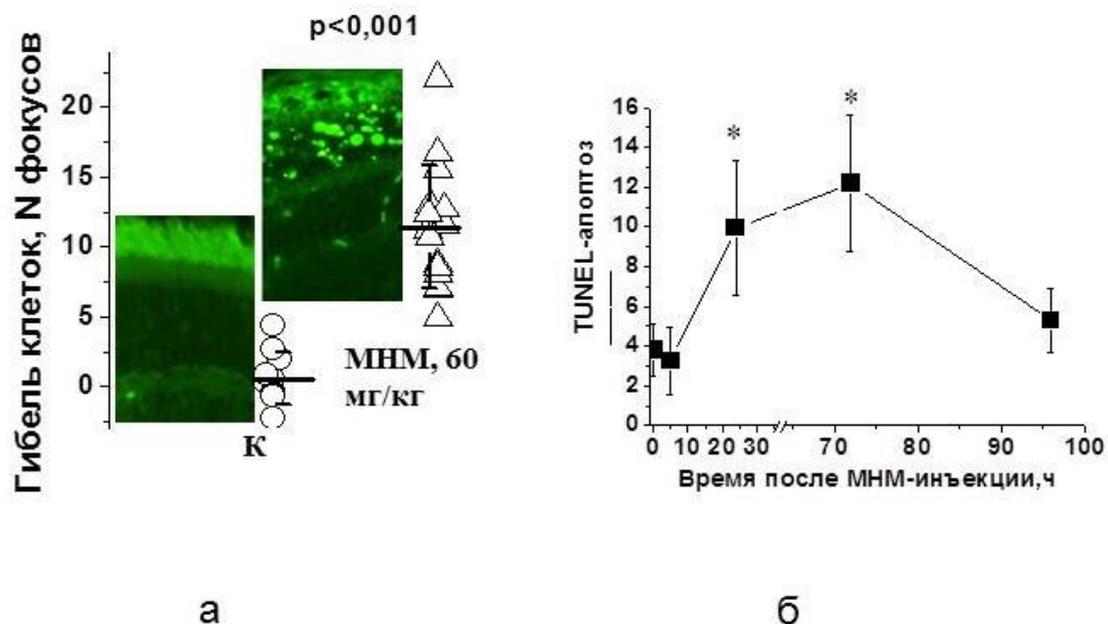
Характерно, что дегенерации подвергаются главным образом клетки фоторецепторов в наружном ядерном слое сетчатки, в то время как остальные слои сетчатки сохраняют интактную морфологию. Рисунок 10 демонстрирует этот эффект при дозе МНМ 70 мг/кг спустя 72 ч после инъекции: видна деструкция слоя сегментов фоторецепторов, разупорядочивание и снижение толщины ядерного слоя фоторецепторов, в то время как при дозе 35 мг/кг повреждения отсутствуют [179,180].



**Рисунок 10.** МНМ-индуцированная дегенерация сетчатки затрагивает только слой фоторецепторов [179,180].

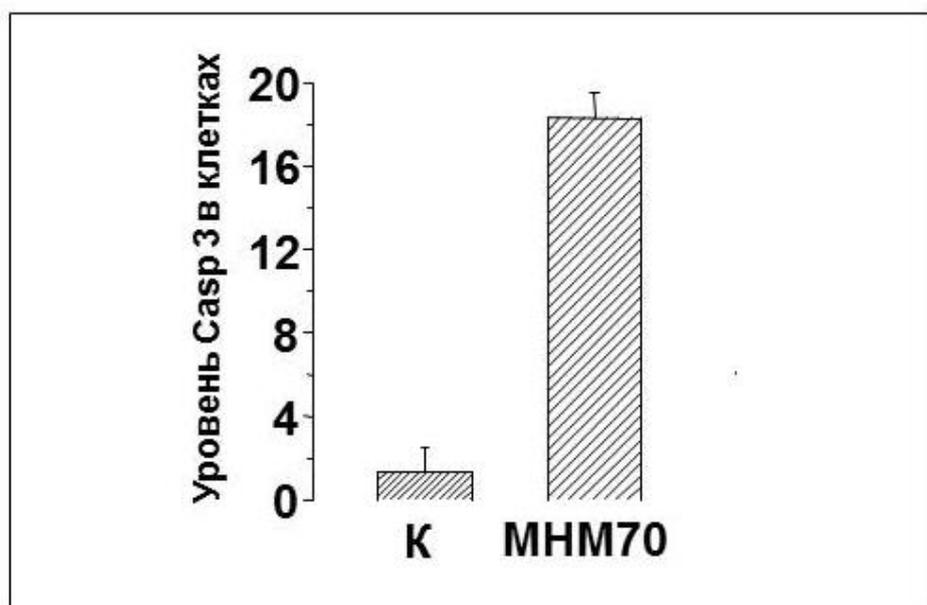
Структурная деструкция фоторецепторов связана с их апоптотической гибелью, максимум которой приходится на третьи сутки после воздействия МНМ.

Это подтверждается результатами TUNEL-детекции апоптоза в сетчатке (Рисунок 11). Последующее снижение частоты апоптоза (Рисунок 11,б) связано с фагоцитозом апоптотических фоторецепторов макрофагами и выражается также в снижении толщины наружного ядерного слоя сетчатки (Рисунок 10) [4].

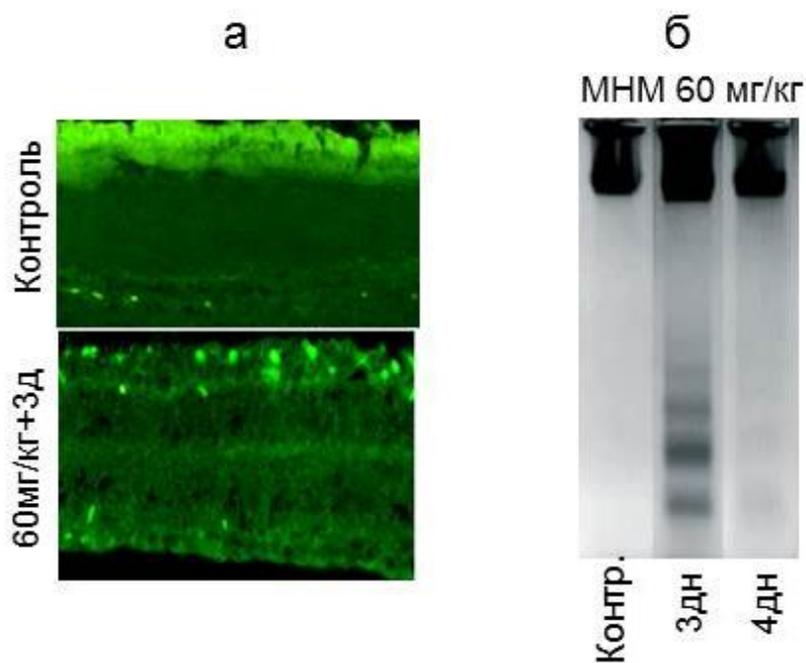


**Рисунок 11.** Влияние МНМ на гибель (TUNEL-апоптоз) фоторецепторов в сетчатке у мышей (по оси ординат – число фокусов на единицу площади среза). а - уровень апоптоза в сетчатке на третьи сутки после введения МНМ, по сравнению с контролем; б – динамика апоптоза после однократной инъекции МНМ, 60 мг/кг [4].

Другими свидетельствами апоптотической гибели фоторецепторов в результате действия МНМ являются возрастание экспрессии эффекторной каспазы 3 (Рисунок 12) [179,180,198,199] и межнуклеосомная деградация хроматина в клетках сетчатки, дающая характерную для апоптоза электрофоретическую «лесенку» фрагментов ДНК (Рисунок 13,б) [4].

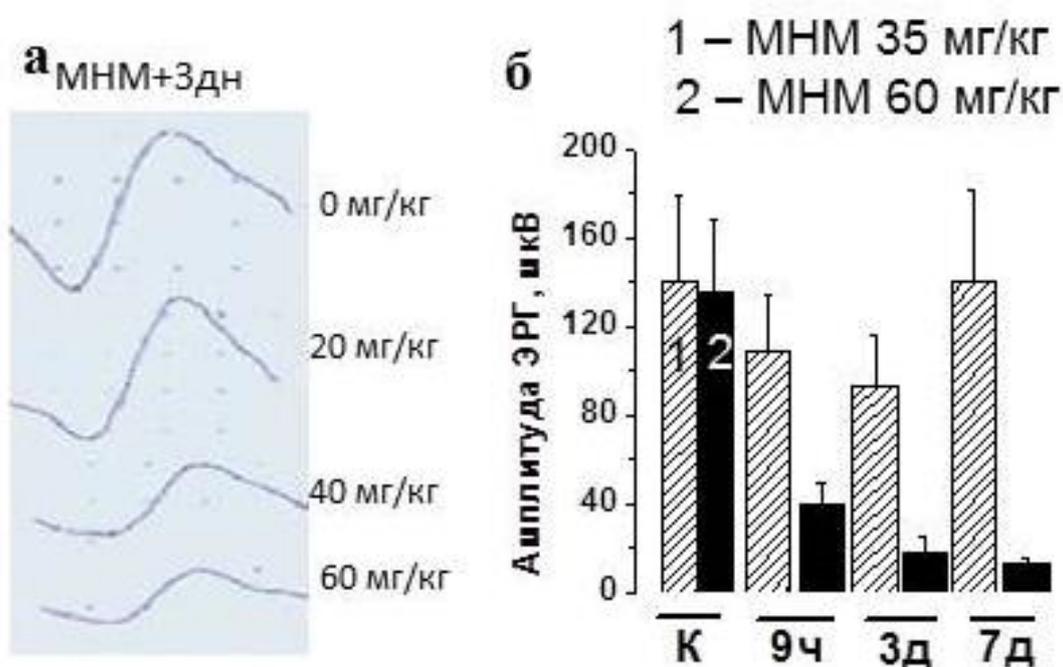


**Рисунок 12.** Экспрессия каспазы 3 в сетчатке у мышей в ответ на действие МНМ в дозе 70 мг/кг. (Интенсивность флуоресценции вторичного анти-Casp3 конъюгата на единицу площади микросреза сетчатки, среднее±sd) [179,180,198,199].



**Рисунок 13.** МНМ-индуцированный апоптоз в сетчатке у мышей.  
 а) TUNEL-детекция апоптоза в ядерном слое фоторецепторов сетчатки у мышей после инъекции МНМ в дозе 60 мг/кг;  
 б) Электрофорез апоптотических нуклеосомных фрагментов ДНК из сетчатки глаз у мышей после инъекции МНМ в дозе 60 мг/кг [4].

Параллельно со структурными повреждениями падает функциональная активность сетчатки в виде снижения амплитуды электроретинограммы (Рисунок 14, б): однако это снижение функциональной активности под действием дозы МНМ 35 мг/кг обратимо. Это говорит о способности сетчатки к восстановлению от повреждений, что было ранее обнаружено в нашей лаборатории [179,180,198,199]. Поскольку МНМ является ДНК-тропным алкилирующим агентом, то очевидной предпосылкой к восстановлению сетчатки может быть процесс репарации ДНК в ней.

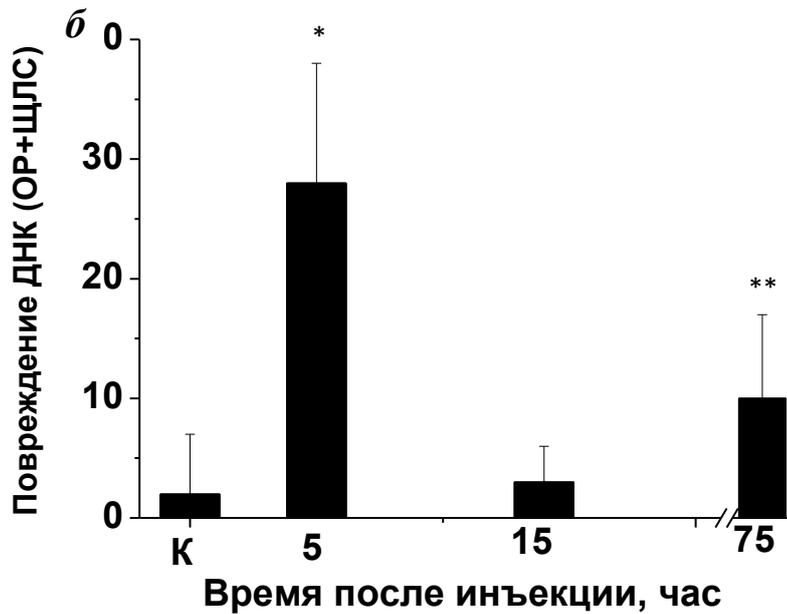
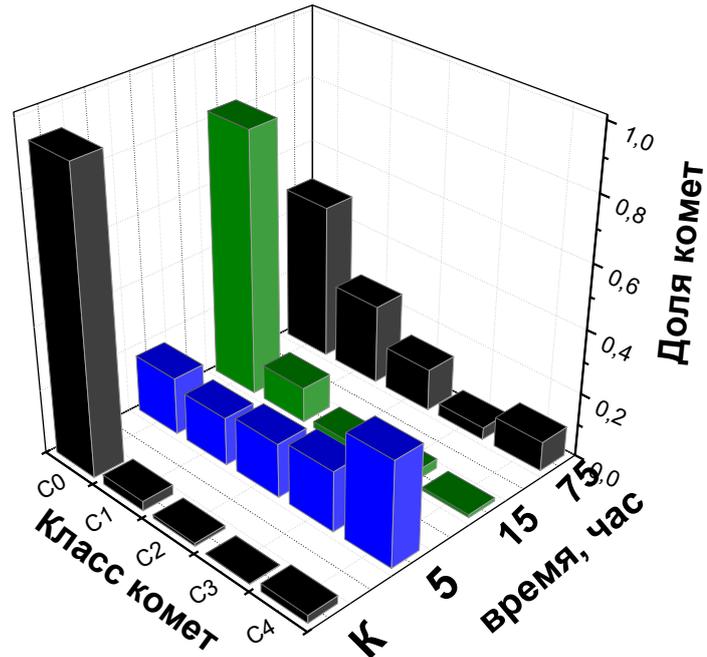


**Рисунок 14.** Функциональный ответ сетчатки у мышей на инъекцию МНМ. а - скотопическая ЭРГ; б – изменение амплитуды (a+b)-волн ЭРГ во времени после инъекции МНМ.

### 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 [200] (Таблица 3, схемы 3 и 4). Проникшая в клетку МНМ метилирует основания в ДНК, которые являются субстратом для нескольких клеточных механизмов репарации, включающих репаративный синтез ДНК - эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) и пострепликативная коррекция нуклеотидов (MMR). Поскольку MMR характерна только для делящихся клеток, механизмы BER и NER могут быть источником избыточной оценки пролиферативной активации ГКМ за счет репаративного включения BrdU в неделящиеся клетки сетчатки. Чтобы оценить возможный вклад репаративного синтеза ДНК во включение BrdU в клетки сетчатки мы реализовали схему инъекций 2 (Таблица 3): после инъекции ретинотоксического агента вводили BrdU сразу и еще 1-2 раза в течение 24час, в течение которых протекает репарация ДНК. Оценку проводили по частоте BrdU-позитивных клеток, представленной в этой таблице. Как видно из представленных результатов, уровень репаративного включения BrdU в ДНК сетчатки, обработанной МНМ, даже ниже его спонтанного включения в интактной сетчатке. Тем не менее, гистограммы распределения клеток по повреждению ДНК (Рисунок 15), говорят о том, что репаративные процессы в сетчатке, обработанной МНМ, наблюдаются [2–4].

a

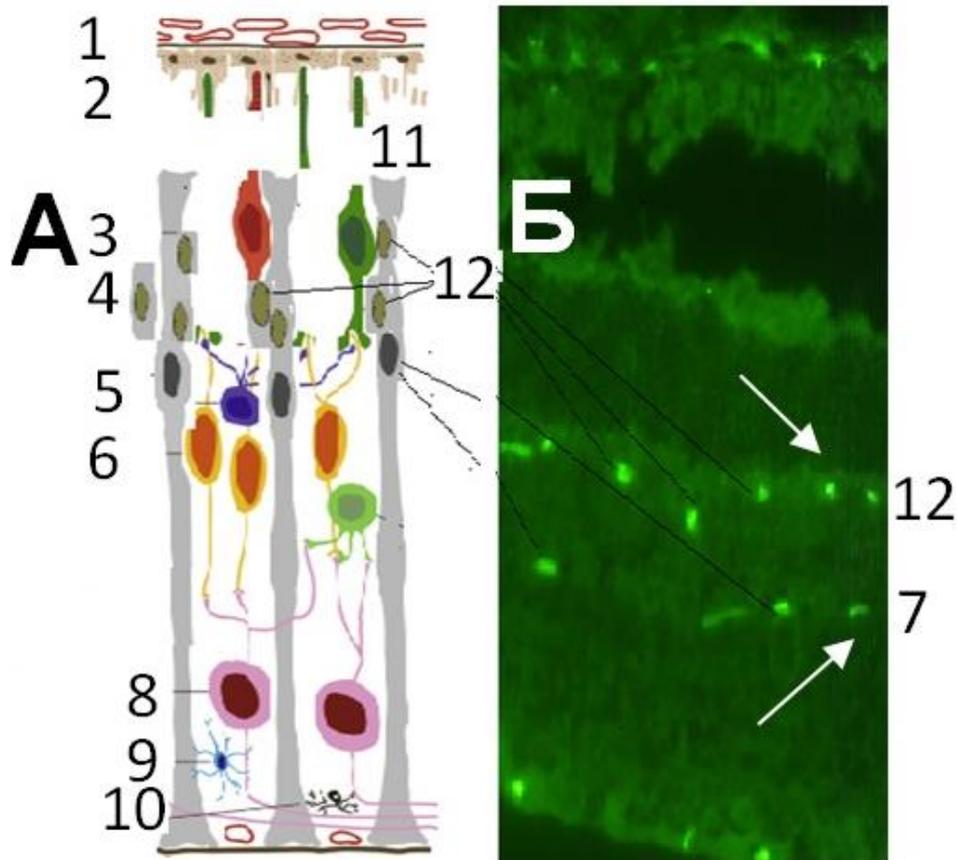


**Рисунок 15.** Гистограммы повреждения ДНК (a) и средние значения из них (б) в клетках сетчатки мышей после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг и репаративной инкубации *in vivo*; К – интактная сетчатка ( $mt=2\pm 6$ ); 5 – МНМ+5ч ( $mt=28\pm 12$ ); 15 – МНМ+15ч ( $mt=3\pm 3$ ); 75 – МНМ+75ч ( $mt=10\pm 7$ ). Различие с контролем: \*  $p<0,01$ , \*\*  $p<0,05$  [2–4].

Этот вывод следует из того факта, что повреждение ДНК от максимального уровня на 5 ч после инъекции МНМ,  $mt \pm SD = 28 \pm 12$ , достоверно снижается спустя 15 ч практически до контрольного уровня ( $mt \pm SD = 3 \pm 3$ ,  $p < 0,01$ ). Однако эта репарация не сопровождается включением BrdU в ДНК [2,3]. Причина не включения маркера может быть связана с участием в репарации метилгуанин-метилтрансферазы (MGMT) – «суицидного» фермента, деметилирующего ОбмеG. Другие метилированные основания ДНК удаляются механизмом BER с короткой однонуклеотидной вставкой, производимой ДНК-полимеразой  $\beta$  [201]. Но спустя еще 48 ч, разрывы в ДНК достоверно нарастают (Рисунок 15,б). Их появление является следствием гибели фоторецепторов и апоптотической деградации ДНК в них, что подтверждается рисунками 11 и 12.

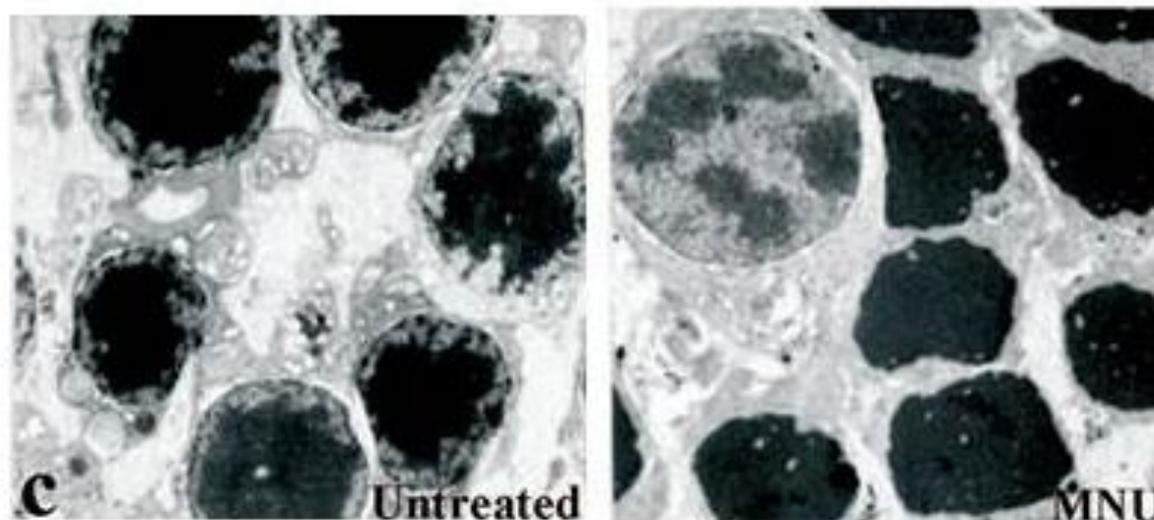
### **3.4. Повреждение ДНК в ГКМ**

Радиальное расположение ГКМ в сетчатке схематично представлено на рисунке 16, а. Здесь же схематично и на микрофотографии представлено повреждение сетчатки (Рисунок 16, б). Следует отметить, что практически любые повреждения сетчатки вызывают ответный глиоз ГКМ. Это подчеркивает центральную роль этих клеток в жизнеспособности и регенерации сетчатки. Глиоз включает в себя гипертрофию, пролиферацию ГКМ и миграцию их ядер в направлении повреждения (Рисунок 16).



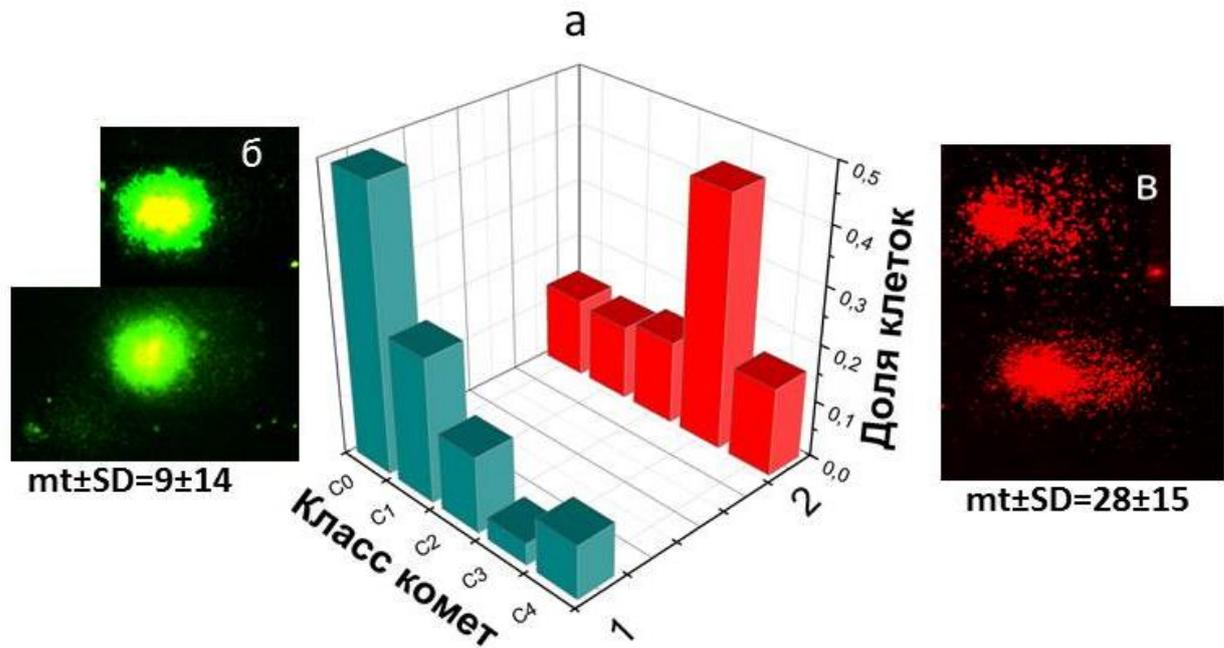
**Рисунок 16.** Ответ ГКМ на ретинотоксический стресс МНМ. А – схема; Б - микрофотография поврежденной сетчатки. 1-хороид с кровеносными сосудами; 2- ретинальный пигментный.эпителий с микроворсинками; 3- фоторецептор-колбочка; 4- фоторецептор-палочка; 5- горизонтальная клетка; 6- биполярная клетка; 7-ядра ГКМ; 8-ганглиозная клетка; 9-микроглия; 10-астроцит; 11- МНМ повреждение сетчатки; 12- дочерние ядра ГКМ.

Вместе с тем, интригующим для нас явилось наблюдение японских авторов, показавших высокую устойчивость ГКМ в сетчатке крыс к МНМ: на электронномикроскопических снимках сетчатки среди ядер фоторецепторов, содержащих апоптотический гиперконденсированный хроматин, обнаруживались редкие ядра ГКМ, содержавшие структурно интактный хроматин функционально активных клеток (Рисунок 17).



**Рисунок 17.** Фрагмент ядерного слоя фоторецепторов сетчатки крыс: слева – необработанный; справа - спустя 24ч после однократного внутрибрюшинного введения МНМ в дозе 75мг/кг [7].

Время до получения и фиксации сетчатки на рисунке 17 было 24 ч после инъекции МНМ, вполне достаточное для репарации, но недостаточное для завершения пролиферативного цикла, т.е. BrdU-промеживания ГКМ (Таблица 3). Поэтому интересным был для нас вопрос о наличии/отсутствии разрывов в ДНК клеток, завершивших цикл через 72-80 ч после МНМ-стресса. К этому времени ГКМ включают достаточно BrdU в свою ДНК, по которому их можно визуализировать. Результат представлен на Рисунке 18.

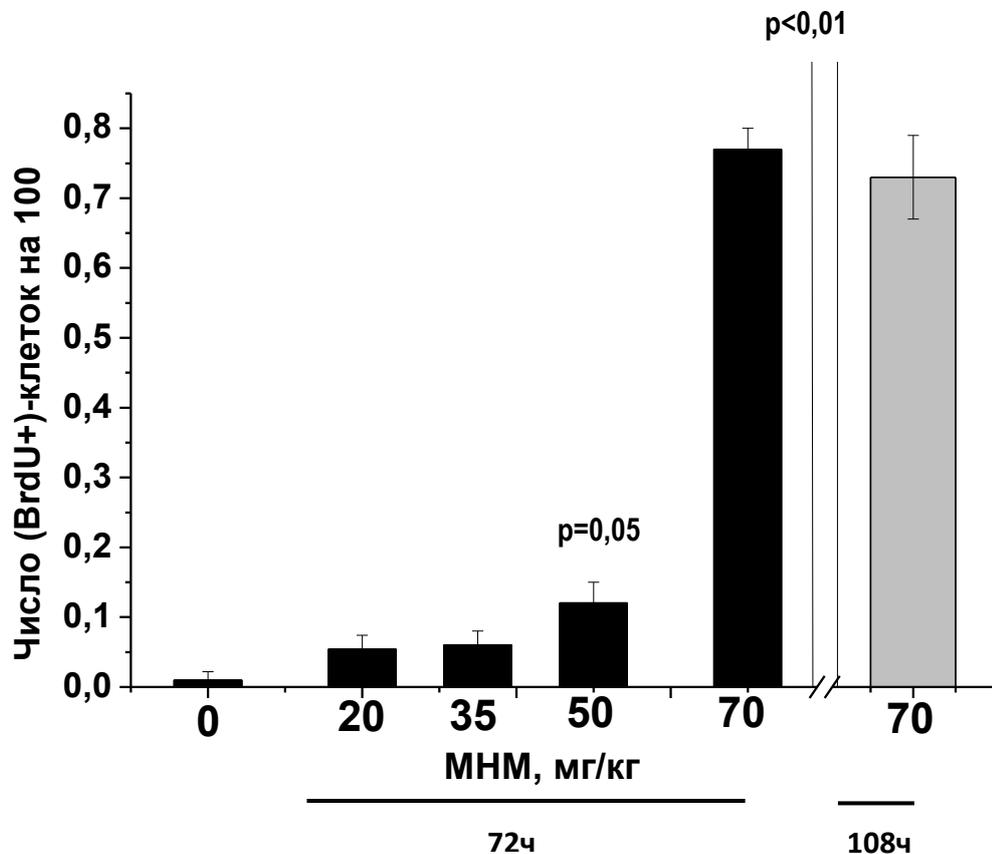


**Рисунок 18.** МНМ-индуцированные повреждения ДНК в сетчатке спустя 72 ч после инъекции МНМ. а) – гистограммы распределения клеток сетчатки (1) и ГКМ (2) по классам комет. б) и в) – средние значения поврежденности ДНК,  $mt \pm SD$  и микрофотографии комет из приведенных распределений, соответствующие этим средним значениям  $mt$  [2,3].

Как видно из рисунка 18, профили гистограмм и средние для них показатели поврежденности,  $mt$ , различаются (достоверность различия между ними  $p < 0,05$ ). Это различие проиллюстрировано микрофотографиями комет, соответствующих средним значениям  $mt$  этих распределений. Хотя ~45 % всех клеток сетчатки к этому времени содержат в разной степени поврежденную ДНК (гистограмма 1), доля аналогично поврежденных ГКМ составляет 85% (гистограмма 2). Учитывая щелочные условия определения повреждений ДНК в клетках, этими повреждениями могут оказаться одно- и двунитевые разрывы и АП-сайты [2–4]. Мы полагаем, что вне зависимости от механизма происхождения этих повреждений в ДНК, они не могут не препятствовать дальнейшей пролиферации ГКМ и регенерации сетчатки в целом.

### 3.5. Глиоз ГКМ в сетчатке в ответ на действие МНМ

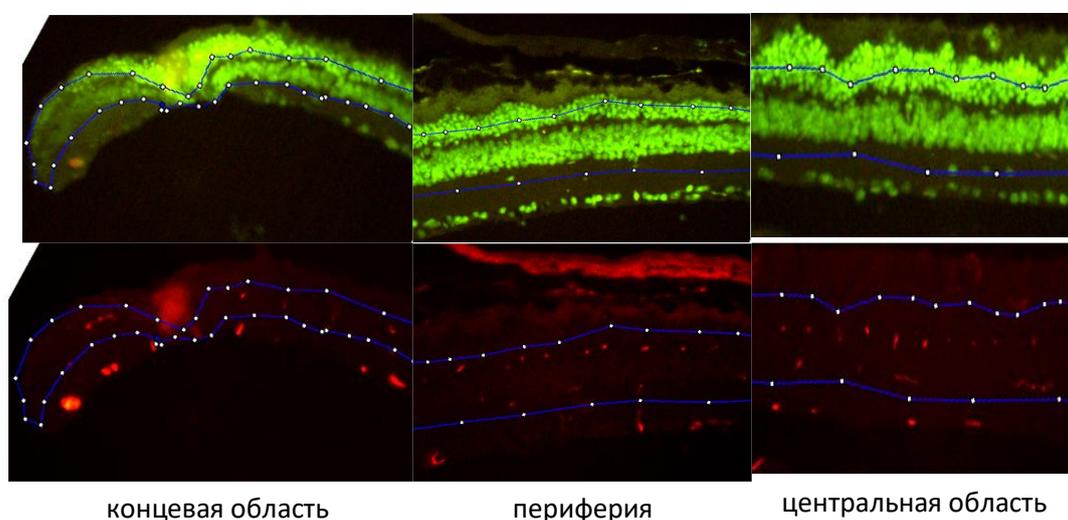
В этой серии экспериментов мы оценивали пролиферацию ГКМ в ответ на однократное системное введение МНМ в разных дозах и сопоставляли ее с повреждениями ДНК в клетках сетчатки [2–4]. Схема инъекций такая же, как в предыдущем случае (Таблица 3, схема 4), вводимые дозы МНМ – 0, 20, 35, 50 и 70 мг/кг. Результаты измерения числа BrdU-позитивных клеток в суспензии представлены гистограммой на рисунке 19. Время после инъекции 72 ч (черная гистограмма) и 108 ч (серый столбик).



**Рисунок 19.** Пролиферация ГКМ в зависимости от дозы МНМ (однократное системное введение) [4].

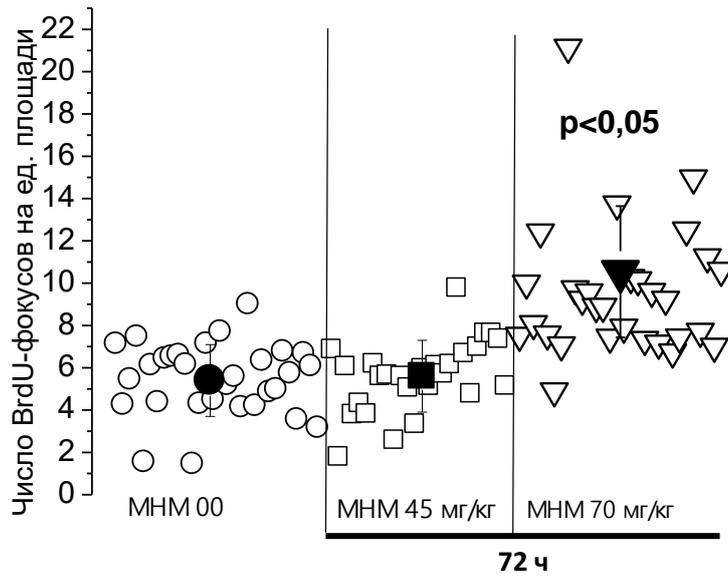
Увеличение пролиферации регистрируется после введения МНМ в дозе 50 и 70 мг/кг (различие с контролем достоверно:  $p < 0,05$  и  $< 0,01$ , соответственно). Попутно отметим, что более длительная инкубация до 108 ч после воздействия МНМ (серый столбик на этом же рисунке) не увеличивает числа ГКМ в сетчатке,

что говорит о прекращении репликации ДНК в ГКМ после 72 ч. В целом, нелинейная зависимость от дозы на рисунке 19 подтверждается и результатами подсчета числа BrdU-фокусов на микросрезах сетчатки. Поскольку ядра ГКМ в основном локализованы во внутреннем ядерном слое сетчатки [202,203], число фокусов подсчитывали в области внутренней сетчатки, включающей внутренний ядерный слой и наружный плексиформ с частичным захватом наружного ядерного слоя. Эта область очерчена на рисунке 20 синей линией. Рисунок представляет типичные микрофотографии срезов в концевой, периферийной и центральной областях сетчатки в двух каналах флуоресценции – Sybr Green и Alexa594.



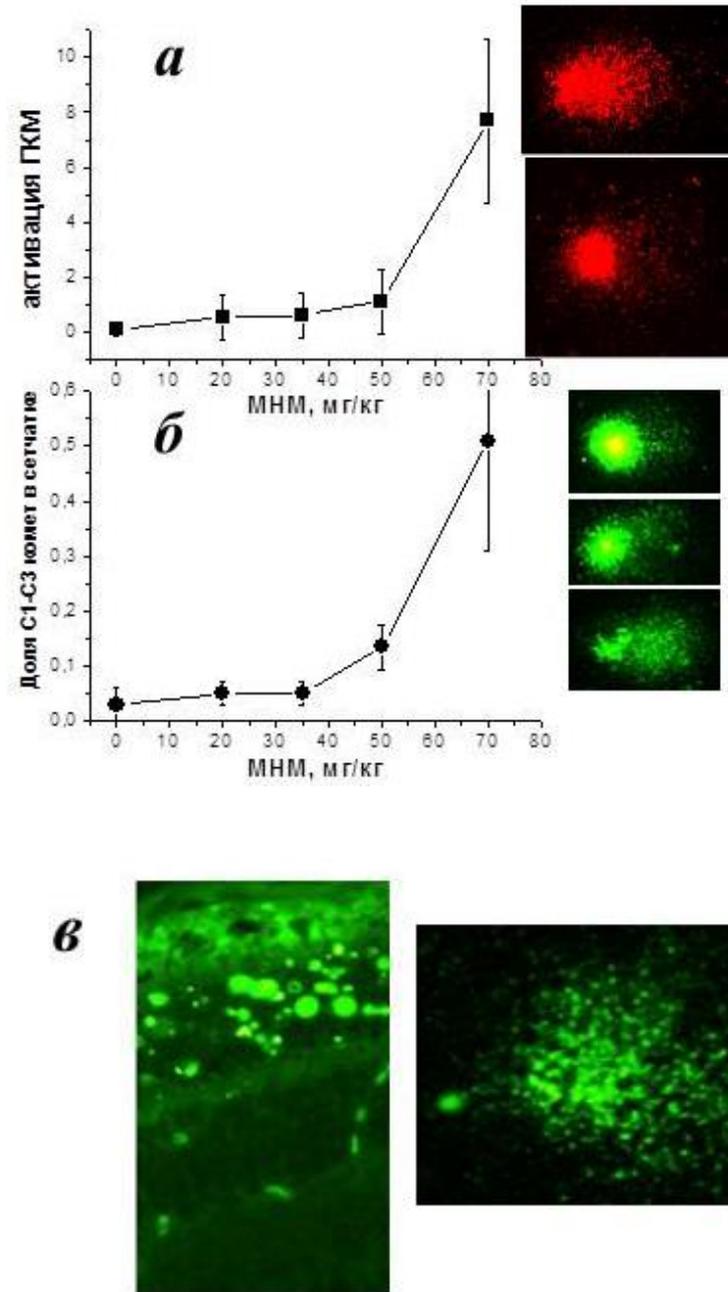
**Рисунок 20.** Локализация BrdU-положительных клеток на микросрезах разных областей сетчатки. Синяя линия ограничивает область подсчета клеток. Верхний ряд - окрашивание Sybr Green; нижний ряд – окрашивание BrdU-Alexa594 [4].

Результаты обсчета приведены на рисунке 21. В нем данные по 3-м областям сетчатки объединены, поскольку разницы в частотах BrdU-положительных клеток между ними не наблюдалось. Как и ожидалось, доза МНМ 45 мг/кг веса животного не вызывает достоверной активации ГКМ в сетчатке в отличие от дозы МНМ 70 мг/кг, вызывавшей достоверное увеличение числа (BrdU+)-клеток в срезах сетчатки. 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 19.



**Рисунок 21.** Число BrdU-положительных клеток на единицу площади микросрезов сетчатки мышей, обработанных МНМ в дозах 70 и 45 мг/кг веса животных

На различных культивируемых клетках млекопитающих и покоящихся лимфоцитах человека показано, что повреждения ДНК, характерные для комет классов С1-С3, могут быть репарированы, и клетки, формирующие эти кометы, могут сохранять жизнеспособность, в то время, как кометы класса С4 соответствуют погибшим (апоптотическим) клеткам [204,205]. На рисунке 22, а,б приведены зависимости от дозы МНМ пролиферации ГКМ и доли клеток сетчатки, формирующих кометы классов С1-С3, то есть, имеющих репарируемый объем повреждений ДНК. Здесь же приведены микрофотографии апоптотических комет С4, которые дают характерные фокусы при TUNEL детекции апоптоза в срезах сетчатки (Рисунок 22, в) [2,3].



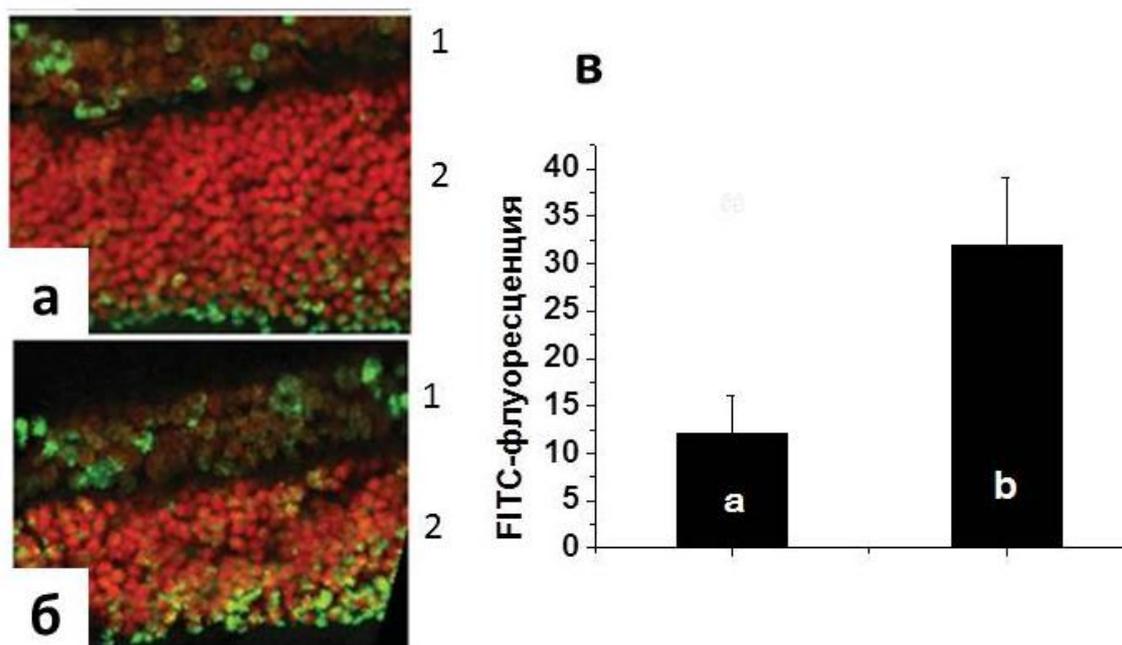
**Рисунок 22.** Ответ клеток сетчатки мышей на разные дозы МНМ спустя 72 ч после инъекции. а) – пролиферация ГKM (окраска анти-BrdU антителами, ассоциированными с Alexa594); б) – доля клеток сетчатки, содержащих репарируемые повреждения ДНК и микрофотографии соответствующих C1-, C2- и C3-комет из этих клеток, окраска SYBR-Green I; в) – картина апоптоза в ядерном слое фоторецепторов в сетчатке и ДНК-комета класса C4, формируемая апоптотическими клетками [2,3].

Таким образом, результаты гистохимического исследования и результат цитохимического анализа 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 22 а и б может отражать связь между активацией пролиферации ГКМ в ответ на МНМ и репарацией ДНК в сетчатке [2,3]. Отмечаемая многими авторами в статьях низкая пролиферативная способность ГКМ у млекопитающих здесь выражается в 2-х феноменах - в низкой (<3%) доле бромдезоксипуридин – позитивных клеток в сетчатке мышей после МНМ-стресса и в отсутствии их накопления в сетчатке в последующее время после завершения первого цикла (Рисунок 19) и [11,142].

### **3.6. Экспрессия p53 в сетчатке после воздействия МНМ**

В предыдущем разделе мы показали, что по завершении клеточного цикла, в ДНК ГКМ обнаруживается большое количество разрывов (Рисунок 18). 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 23. 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 [4].



**Рисунок 23.** 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 антиP53 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, б- спустя 24 ч после инъекции) [4].

## 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 %), N3меА(~5 %) и N7меG (~85 %) [14]. На вопрос, могут ли эти повреждения ДНК сами по себе быть ответственны за ретинотоксичность, однозначного ответа пока нет, но в последнее время обсуждается роль в этом репаративных ферментов [206]. Полученные нами результаты косвенно указывают на причастность к ретинотоксичности МНМ ферментов репарации (Рисунок 22) [2,3].

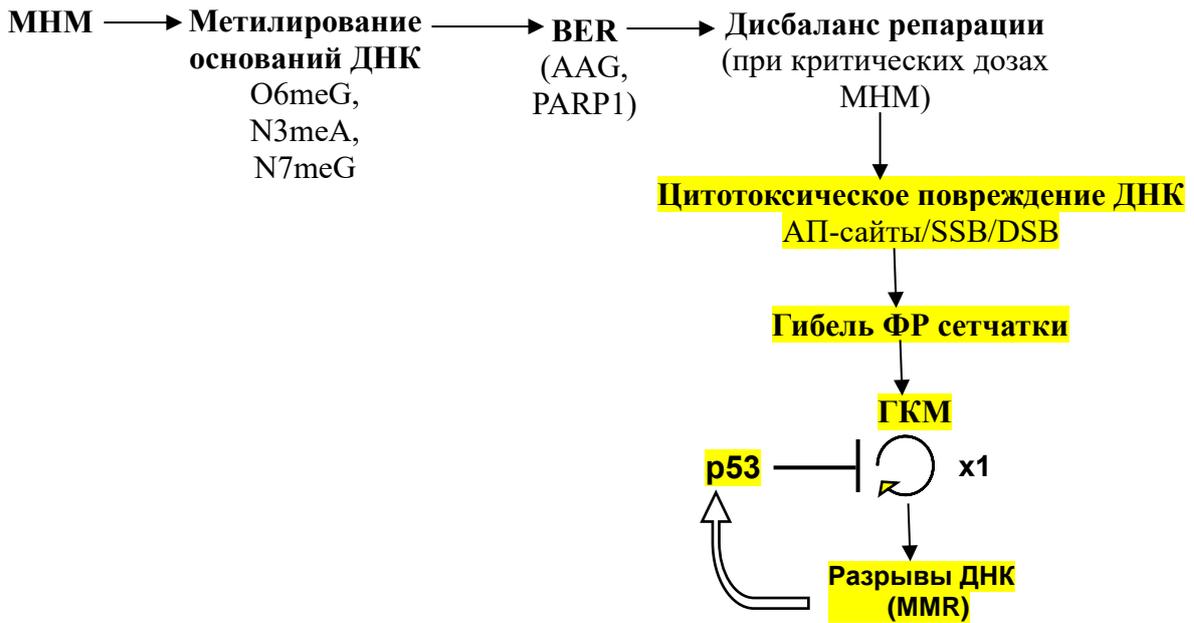
Первый из них MGMT – фермент, деметилирующий ОбмеG. Будучи нерепарированным, ОбмеG образует в процессе репликации неканоническую пару с тиминном, что приводит клетки к гибели в результате пострепликативной репарации (MMR) [161,207,208]. N3меА и N7меG являются субстратами для AAG (алкиладенин-ДНК-гликозилазы) - фермента, инициирующего эксцизионный механизм репарации BER в ответ на действие алкилирующих агентов [209]. 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  $\beta$  ( $pol \beta$ ) 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 одинонитевые 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  $pol \beta$  [210]. Как следует из наших результатов (Рисунок 22), 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 12), и, как мы показали, снижение функциональной активности сетчатки (по электроретинографии) становится необратимым (Рисунок 14) [2–4].

Другим активным участником развития цитотоксического действия МНМ в сетчатке может быть PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1) [211]. 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<sup>+</sup>. Это ослабляет связь гистонов с ДНК и вызывает диссоциацию или «миграцию» нуклеосом по ДНК, открывая доступ к повреждению для репаративного комплекса [212]. PAR-модификации подвергаются многие ферменты и структурные белки в хроматине, что делает функционирование PARP1 в клетке высокоэнергетическим, приводящим клетку к гибели [213]. 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 [2,70]. Этот механизм подтверждается защитным действием экзогенного никотинамида при МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс [184].

#### **4.2. Природа индуцированного МНМ сигнала от фоторецепторов к ГКМ и механизм ответной пролиферации ГКМ.**

Полученные результаты и анализ данных литературы позволяют проследить связь между повреждениями ДНК, индуцированными алкилирующим агентом МНМ, и активацией пролиферации ГКМ. Мы полагаем, что между этими событиями в качестве опосредующих находятся активация клеточных систем репарации ДНК и гибель фоторецепторов сетчатки [2–4] (Рисунок 24).



**Рисунок 24.** Предполагаемая последовательность событий при действии МНМ на сетчатку. (Желтым 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-апиримидиновый сайты; SSB - одноцепочечные разрывы ДНК; DSB - двухцепочечные разрывы ДНК, ФР – фоторецепторы сетчатки; ГКМ – глиальные клетки Мюллера; MMR – пострепликативная репарация ДНК)[4].

В ДНК клеток сетчатки под действием МНМ формируются метилированные основания. В ответ на них активируется механизм репарации BER. Важнейшими участниками этого механизма являются алкил-аденин-гликозилаза (AAG) и поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP1). Первый из них удаляет метилированное основание, оставляя АП-сайт, который никуруется АП-эндонуклеазой. Образовавшийся разрыв ДНК стабилизируется вторым участником BER, PARP1. Таким образом, безразрывный дефект переходит в цитотоксический разрыв цепи ДНК. Разрыв ликвидируется с помощью других участников BER, ДНК-полимеразы-бета и ДНК-лигазы. Согласованная работа всех участников BER обеспечивает скорость и полноту репарации, а дисбаланс этапов BER приводит к

накоплению АП и разрывов. Последняя ситуация становится неизбежной при ретинотоксической концентрации МНМ ( $\geq 60$  мг/кг), которая вызывает дегенерацию сетчатки в виде гибели фоторецепторов. В ответ на эту гибель активируется пролиферация ГКМ. Но как мы показали, она ограничена одним циклом (Рисунок 19). 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. На модели NMDA-индуцированной дегенерации сетчатки (в виде гибели амакриновых и биполярных нейронов) показано, что инсулин и фактор роста фибробластов FGF2 значительно усиливали пролиферацию ГКМ и их дифференцировку в нейроны в NMDA-травмированной сетчатке у цыплят [214].

Не менее вероятно и участие эндопротекторного фактора LIF (Leukemia Inhibitory Factor), продуцируемого в сетчатке небольшой субпопуляцией ГКМ в ответ на гибель фоторецепторов. LIF защищает фоторецепторы от гибели и продлевает время их жизни после светового или окислительного стресса [215]. Недавно была предложена и экспериментально частично подтверждена последовательность событий, начиная со светового стресса сетчатки мышей *in vitro*, до активации ГКМ в ней:

**$h\nu \rightarrow$  повреждение ФР  $\rightarrow$  экспрессия LIF ---  $\rightarrow$  Toll Like Receptor на ГКМ  $\rightarrow$  LIF-TLR ассоциация  $\rightarrow$  активация ГКМ [216]**, где  $h\nu$  – квант света; ФР – фоторецептор; Toll Like Receptor/TLR – рецептор на поверхности ГКМ, взаимодействующий с лигандом LIF. Согласно этой схеме, в ответ на фотоповреждение фоторецепторные клетки продуцируют фактор LIF, который секретируется вне клетки и взаимодействует с TLR рецептором на поверхности ГКМ. Взаимодействие лиганда с рецептором в клетке приводит в ассоциации рецепторов, что усиливает сигнал от внеклеточного лиганда (фактора) в ГКМ и

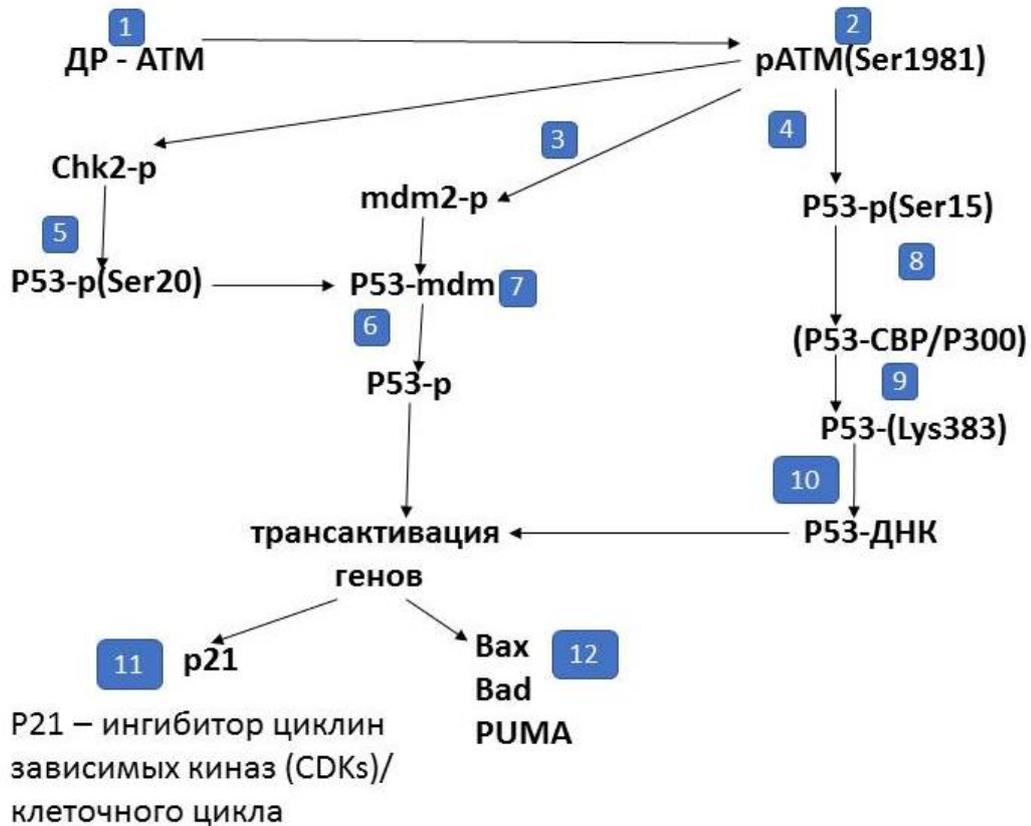
приводит к ее функциональной активации в ответ на этот фактор (в данном случае – LIF).

#### **4.3. Повреждения ДНК и экспрессия p53 ограничивают пролиферацию ГKM у мышей**

Ответом на гибель фоторецепторных клеток в сетчатке у мышей является глиоз ГKM, включающий также их пролиферацию. Количество пролиферирующих ГKM не превышает 3% от общей клеточности сетчатки у мышей (Таблица 3) . В отличие от рыб и птиц, регенеративный потенциал ГKM у млекопитающих чрезвычайно низкий [11]. Только небольшая фракция потомков ГKM, активированных в ответ на повреждение сетчатки у млекопитающих, выживают и сохраняют потенциал к регенерации и дифференцировке в фоторецепторы [8,217]. В работе [200] на модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс исследовали пролиферативный ответ ГKM. Показано, что вместе с пролиферацией ГKM в сетчатке наблюдали фосфорилирование гистона H2AX (экспрессию  $\gamma$ -H2AX), экспрессию p53 и p21 в ГKM.

Мы подтвердили эти результаты, показав возрастание экспрессии p53 в сетчатке у мышей в ответ на МНМ [4]. Перечисленные три 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  $\gamma$ -H2AX – маркер двунитевых разрывов ДНК, характерных для апоптотической компактизации хроматина. В результате в клетках приостанавливается пролиферация. С концепцией «DNA damage response» согласуется обнаруженная нами экспрессия p53 в сетчатке и факт, что в ГKM после завершения митотического цикла наблюдается большое количество повреждений ДНК (Рисунки 18, 22). Именно в ответ на них в ГKM активируется «DNA damage response», который приостанавливает дальнейшую пролиферацию ГKM сетчатки у мышей. Путь

реализации подавления клеточного цикла при наличии в ДНК двунитевых разрывов известен в деталях и представлен на рисунке 25 и комментариях к нему.



**Рисунок 25.** Путь реализации подавления клеточного цикла при наличии в ДНК двунитевых разрывов:

1: АТМ – ген, кодирующий протеинкиназу АТМ (ataxia telangiectasia mutated), мутирован в клетках больных с синдромом Луи-Барр. Является сенсором двунитевых разрывов в ДНК.

2: При взаимодействии с двунитевыми разрывами, АТМ, принимает конформацию, способствующую ее ауто-фосфорилированию по серину 1981 (Ser1981), что приводит к активации каталитических функций.

3,4,5: pАТМ активирует (фосфорилируя) нижележащие мишени – Chk2, mdm2 и p53

6: Chk-2 – checkpoint kinase-2 фосфорилирует p53 по серину 20 (Ser20)

7: mdm – mouse double minute chromosome – циркулярные хромосомо-подобные структуры, содержащие ДНК (размером до 3 Mb). Кодируют некоторые гены.

mdm2 – убиквитинлигаза, взаимодействующая с p53, вызывает его деградацию (в цитоплазме).

8: фосфорилированный p53-p диссоциирует от mdm2 и накапливается в цитоплазме

9: СВР/Р300 – Транскрипционный фактор, cAMP response element-binding protein, обладает ацетилазной активностью

10: ацетилированный p53 и фосфорилированный p53 переносятся в ядро из цитоплазмы, где они взаимодействуют со специфическими сайтами в промоторах соответствующих генов. Это приводит к трансаkтивации этих генов, завершающейся их экспрессией в виде транскриптов → мРНК → и белков, по образованию которых в клетке идентифицируется сигнальный путь

11: один из них белок p21 – блокирует клеточный цикл, ингибируя циклин-зависимые киназы

12: другие проапоптотические белки.

По такому механизму действует p53 против опухолевого роста. Но, в данном случае, он препятствует пролиферации ГКМ и возможно ГКМ-зависимого восстановления поврежденной сетчатки.

Инактивация p53 в культуре клеток (p53<sup>-/-</sup>) снимала ограничения в пролиферации ГКМ и увеличивала из них продукцию ретинальных предшественников по сравнению с клетками с фенотипом wt-p53<sup>+/+</sup>. Более того, окулярная трансплантация этих клеток-предшественников обнаруживала их дифференциацию в фоторецепторы и ганглиозные клетки [50]. Важная роль в регуляции нейрональной регенерации сетчатки *in vivo* также принадлежит p53. В работе [218] показано, что ГКМ из сетчатки мышей с фенотипами по p53 (-/-) и (-/+) обладают более высоким потенциалом пролиферации в суспензионной культуре, чем ГКМ из мышей дикого по p53 типа. Более высокая пролиферативная способность коррелировала с пониженным уровнем транскриптов ингибитора циклинкиназы *p21<sup>Cip</sup>* и фактора, ускоряющего прохождение цикла, *c-Myc*. Это говорит об участии p53 в ограничении ГКМ входить в цикл под действием факторов роста или стресса.

Альтернативное объяснением низкой способности ГКМ млекопитающих к регенерации связывается с отсутствием в них некоторых пронеуральных транскрипционных факторов, которые экспрессируются в ГКМ у рыб и птиц в ходе регенерации сетчатки [219]. Одним из них является фактор *Ascl1*. В работе [220] показано, что в молодых трансгенных мышях, экспрессирующих этот фактор, ГКМ сетчатки после повреждающего воздействия продуцируют амакриновые, биполярные клетки и фоторецепторы, напоминая ранние стадии регенерации у *zebrafish*. В недавно опубликованной работе [221] у мышей с высокой экспрессией фактора *Ascl1* с помощью интравентриальной инъекции нейротоксина NMDA вызывали гибель нейронов внутренней сетчатки. Последующее введение трихостатина-А (TSA) защищало от токсического действия NMDA глиальные клетки в сетчатке. Продуцируемые ГКМ в ответ на NMDA нейроны, экспрессировали маркеры биполярных клеток *CaBP5*. Кроме того, трихостатин-А, будучи ингибитором деацетилазы, увеличивал ацетилирование H3-гистона в

хроматине ГКМ. Это, как оказалось, ослабляло связь гистона с сайтом его связывания на промоторах нейтральных генов (*Hes5*, *Dll3*, *Nef1*), увеличивало их доступность и экспрессию, необходимую для ремоделинга клеток. Этот результат говорит о важности эпигенетической регуляции и структурной перестройки/ремоделинга хроматина в ГКМ для эффективного функционирования и обеспечения необходимой генной экспрессии в процессе репрограммирования ГКМ в сетчатке у мышей. В то же время известно, что разрывы ДНК могут приводить к компактизации хроматина в клетке, сопровождающей апоптоз.

#### **4.4. MMR как предположительный механизм формирования разрывов ДНК в пострепликативных ГКМ**

Поскольку повреждение/гибель клеток сетчатки, вызванное эндо- и экзогенными причинами, активирует пролиферацию ГКМ, то следует ожидать в них и активацию пострепликативной репарации MMR. В частности, поскольку повреждающий агент МНМ сам по себе не вызывает разрывов, и они обнаруживаются в пострепликативный период, то с большой вероятностью их можно отнести на счет пострепликативной репарации (MMR) в ГКМ. Субстратом для MMR являются некомплементарные пары оснований (мис-пары). Возникают они либо вследствие случайных ошибок ДНК-полимеразы при синтезе на интактной матрице, либо при синтезе на матрице, содержащей модифицированные основания (в том числе метил- и окси-аддукты оснований). Известны участвующие в MMR белки, по которым этот механизм идентифицируется (MLH1, MSH2, MSH3) [222] Здесь следует подчеркнуть одну важную особенность механизма MMR. MMR оперирует только с дочерней (вновь синтезированной цепочкой ДНК). В силу чего, MMR часто называют пострепликативной коррекцией. Итак, возникшие в матрице и прошедшие через цикл репликации повреждения сохраняются в клетке в пострепликативный период. Но поскольку этим аддуктам в клетке отсутствуют комплементарные основания, то эксцизионная активность

MMR на дочерней цепи ДНК становится abortивной. Это блокирует дальнейшую репликацию ДНК и пролиферацию клетки [207], 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 работе [218] на тканевых эксплантах и клеточной культуре зрелой сетчатки мышей исследовали роль p53, ингибитора митоза Cdkn1a/p21<sup>Cip</sup> и транскрипционного фактора c-Myc, продукта протоонкогена. Пролиферацию стимулировали внутриокулярной инъекцией NMDA, а регистрировали по включению в клетки пролиферативного маркера BrdU. Оказалось, что глия Мюллера в сетчатке мышей с фенотипом *trp53*<sup>-/-</sup> обнаруживала бóльшую пролиферативную активность, чем глия wt-сетчатки (дикого типа). Увеличенная пролиферация *trp53*-дефицитных мышей коррелировала с более низкой экспрессией в них ингибитора митоза Cdkn1a/p21<sup>Cip</sup> и повышенной экспрессией фактора транскрипции c-myc, который ускоряет клеточный цикл. Таким образом, авторы показали, что на wt-мышьях экспрессия p53 подавляет пролиферацию ГКМ в зрелой сетчатке в течение 1-2 недель постнатального периода. Хотя p53 не склонен непосредственно взаимодействовать с белками клеточного цикла (циклинами и циклинкиназами) [223,224], достигается это путем p53-зависимой экспрессии ингибитора циклинкиназ Cdkn1a/p21<sup>Cip</sup> и подавления экспрессии промотора пролиферации c-Myc. С другой стороны, этого подавления не наблюдается в сетчатке нокаутных по p53 мышей.

Ответ на повреждение ДНК в пролиферирующей глии Мюллера в сетчатке крыс исследовали в работе [200]. Изучали экспрессию различных маркеров клеточного цикла в дегенерирующей сетчатке крыс после введения им МНМ. В ответ на индуцированное повреждение сетчатки регистрировали пролиферацию ГКМ, фосфорилирование гистона H2AX, увеличение экспрессии p53 и p21. Совокупность этих реакций клетки на повреждающий стресс называется клеточным ответом на повреждение ДНК, «DNA damage response», который направлен на блок пролиферации клеток за счет p53-индуцированной активации ингибитора циклинкиназ p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

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

В основе регенеративной медицины лежит репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), которые могут давать самоорганизующиеся тканевые 3D-структуры, в том числе и структуры сетчатки [225,226]. ГКМ сетчатки могут быть репрограммированы в клетки с сигнатурой классических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: помимо того, что они экспрессируют маркеры стволовых клеток, они способны дифференцироваться в основные функциональные клетки сетчатки - нейроны, фоторецепторы, клетки пигментного эпителия и клетки-предшественники [226,227]. Это делает ГКМ потенциальным кандидатом для использования в заместительной терапии зрительных нейропатий [228,229].

И, тем не менее, несмотря на эффективную пролиферацию, регенеративная способность ГКМ в мышцах линии rd1 с наследственной предрасположенностью к спонтанной дегенерации сетчатки, была низкая [227]. Таким образом, остается вопрос, являются ли ГКМ адекватным источником стволовых клеток для регенерации пациентов с ретинопатией. Для ответа на этот вопрос необходимо всестороннее исследование ГКМ, включая характеристику их пролиферативной способности и возможные ограничения пролиферации.

В данной работе мы попытались определить повреждение ДНК при действии алкилирующих агентов в ГКМ сетчатки в связи с вероятной причастностью этих повреждений к ограничению пролиферации ГКМ и последующего ремоделинга в сторону репарации поврежденной сетчатки у мышей. С этой целью был разработан экспериментальный подход, позволяющий одновременно оценивать пролиферацию ГКМ и повреждение ДНК в них. Он основан на сочетании метода щелочных комет с процедурой включения в ДНК маркера пролиферации BrdU.

## Выводы по результатам работы

1. Из 4-х исследованных в работе алкилирующих агентов (метилнитрозомочевина, нимустин, дакарбазин, темозоломид), максимальной ретинотоксичностью (и минимальной общей токсичностью) на мышах обладает метилнитрозомочевина; в силу этого метилнитрозомочевина является оптимальным ретинотоксическим 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 ретинотоксичность метилнитрозомочевины коррелирует с образованием цитотоксичных разрывов и щелочеллабильных 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5'dRP	5-дезоксирибозофосфат
AAG	Алкиладенин-ДНК-гликозилаза
ACNU	Нимустин, амино-хлорэтил-нитрозомочевина
AIC	Амино-имидозол-карбоксамид
Ascl1	Транскрипционный фактор, achaete-scute family bHLH transcription factor 1
ATM	Протеинкиназа ATM (ataxia telangiectasia mutated, мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок)
BCNU	Кармустин, N,N'-бис-(2-Хлорэтил)-N-нитрозомочевина
BER	Экцизионная репарация оснований (base excision repair)
BrdU	Бромдезоксидеоксиридин (bromodeoxyuridine)
BrdU+	Бромдезоксидеоксиридин - позитивные клетки
Calretinin	Внутриклеточный кальций-связывающий белок семейства тропонин С
Casp 3	Каспаза-3 (caspase-3)
CBP/P300	Транскрипционный фактор, cAMP response element-binding protein, обладает ацетилазной активностью
CD117	Тирозинкиназа CD117
CD44	Тирозинкиназа CD44
CDK	Циклинзависимые киназы
Cdkn1a/p21 <sup>Cip</sup>	Ингибитор циклинкиназ Cdkn1a/p21 <sup>Cip</sup>
Cdkn1b/p27 <sup>Kip</sup>	Ингибитор циклинкиназ Cdkn1b/p27 <sup>Kip</sup>
Chk-2	Киназа рестрикции 2, checkpoint kinase-2
Chx10	Транскрипционный фактор Chx10
Cip	Белок-ингибитор циклинзависимых киназ, Cdk inhibiting protein
c-Myc	Транскрипционный фактор, c-Myc oncogenic transcription factor
Dll1	Транскрипционный фактор/белок, Delta-like protein 1

Dll3	Нейрональный белок Dll3
DSB	Двунитевой разрыв, double strand break
DTIC	Дакарбазин, 5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamide
EGF	Эпидермальный фактора роста
E-Ras	Белок, кодируемый геном рабдосаркомы E
ESC	Эмбриональные стволовые клетки (embryonic stem cell)
FGF2	Фактор роста фибробластов 2
FITC	Флуоресцеинизотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)
G1-checkpoint	Точка рестрикции клеточного цикла G1
GAD67-GFP	Зелёный флуоресцентный белок (glutamic acid decarboxylase-green fluorescence protein)
GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein)
H2AX	Коровый гистон H2AX
HC	Горизонтальные клетки
Hes5	Нейральный ген Hes5
hMLH	Белок hMLH системы пострепликативной репарации MMR
hMSH	Белок hMSH системы пострепликативной репарации MMR
HMTIC	Гидроксиметил-триазенил-имидазол-карбоксамид
hPMS	Белок hPMS системы пострепликативной репарации MMR
hv	Квант света
iai	Внутриартериальное введение
ica	Инфузия в сонную артерию
INF	Интерферон
io	Внутриглазное введение
iv	Внутривенное введение
ivi	Внутривентриальное введение
Klf4	Транскрипционный фактор, Kruppel-like factor 4

LIF	Эндопротекторный фактор - Лейкемия-ингибирующий фактор (Leukemia Inhibitory Factor)
mdm	Циркулярные хромосомо-подобные структуры, содержащие ДНК, Murine double minute chromosome
mdm2	Убиквитинлигаза, взаимодействующая с p53, вызывает его деградацию
MGMT	Метилгуанинметилтрансфераза
MMR	Пострепликативная коррекция нуклеотидов, репарация некоплементарных пар оснований (mis- match repair)
mt	Момент хвоста кометы (tail moment)
MTIC	Метил-триазенил-имидазол-карбоксамид
MutL	Фактор MutL системы пострепликативной репарации MMR
MutS	Фактор MutS системы пострепликативной репарации MMR
Mw	Молекулярный вес
N3meA	N3-метиладенин
N7meG	N7-метилгуанин
NAD+	Никотинамидаденин
Nef1	Нейральный ген Nef1
NER	Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair)
NeuN	Нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток
NMDA	N-метил-D-аспартат (синтетический нейротоксин, лиганд для NMDA-рецептора на мембране нейронов)
Notch1	Трансмембранный рецепторный белок, Notch homolog 1, translocation-associated
ОбmeG	Об-метилгуанин
Oct3/4	Транскрипционный фактор, octamer-binding transcription factor 4
p21/ p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	Ингибитор циклинкиназ

p53	Белок p53, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
PAR	Поли(АДФ-рибоза)
PARP1	Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1
pATM	Фосфолирированная киназа ATM
Pax6	Транскрипционный фактор, белок аниридии II типа, или окулоромбин Paired box protein Pax-6, aniridia type II protein (AN2), oculorhombin
PBS	Натрий-фосфатный буферный раствор
po	Пероральное введение
pol $\beta$	ДНК-полимераза $\beta$
Prox1	Транскрипционный фактор, Prospero homeobox protein 1
Ser	Серин
Sox2	Транскрипционный фактор, (sex determining region Y)-box 2
SSB	Однонитевой разрыв ДНК (single strand break)
st	Системная терапия/ системное введение
Stat3	Сигнальный белок и активатор транскрипции 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
SV40	Онковирус SV40 (Macaca mulatta polyomavirus 1, Simian virus 40)
TLR	Toll Like Reseptor, рецептор на поверхности ГКМ, взаимодействующий с лигандом LIF
TMZ	Темозоломид
trp53	Фактор транскрипции p53 (transcription factor p53)
TUNEL	TUNEL-тест (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling)
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
wt	Wild type, дикий тип
wt-мыши	Мыши дикого типа

$\beta$ -catenin	Бета-катенин, белок, находящийся в комплексе с молекулами клеточной адгезии в клетках животных
$\beta$ III-тубулин	Белок микротрубочек
АП-сайт	Апуриновый/апиримидиновый сайт
АЦ	Астроцит
БП	Биполярная клетка
ВМД	Возрастная макулярная дегенерация
ГК	Горизонтальная клетка
ГКМ	Глиальная клетка Мюллера
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИИР	Интерферон-индуцированная ретинопатия
МНМ	Метилнитрозомочевина (methylnitrosourea)
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
мтДНК	Митохондриальная ДНК
РГК	Ретинальная ганглиозная клетка
РПЭ	Ретинальный пигментный эпителий
ФР	Фоторецепторные клетки
ЩЛС	Щелочнолабильные сайты
ЭНМ	Этилнитрозомочевина
ЭРГ	Электроретинография, электроретинограмма

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jayakody, S.A. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement / S.A. Jayakody, A. Gonzalez-Cordero., R.R. Ali [et al.] // *Progress in retinal and eye research.* – 2015. – Vol. 46. – P. 31–66.
2. Тронов, В.А. Пролиферация клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на ретинотоксический стресс, индуцированный метилнитрозомочевинной / В.А. Тронов, Е.И. Некрасова, М.А. Островский // *Цитология.* – 2018. – Т. 60, № 6. – С. 440–447.
3. 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. – V.12, № 6. – P. 468-476.
4. 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.
5. 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.
6. Monzon, J.G. Retinopathy associated with adjuvant high-dose interferon- $\alpha$ 2b in a patient with resected melanoma: a case report and review of the literature / J.G. Monzon, N. Hammad, S.D. Stevens [et al.] // *The oncologist.* – 2012. – Vol. 17, № 3. – P. 384–387.
7. Tsubura, A. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials / A. Tsubura, K. Yoshizawa, M. Kuwata [et al.] // *Histology and histopathology.* – 2010. – Vol. 25, № 7. – P. 933–944.
8. Karl, M.O. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina / M.O. Karl, S. Hayes, B.R. Nelson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2008. – Vol. 105, № 49. – P. 19508–19513.
9. Lewis, G.P. The fate of Müller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation / G.P.

Lewis, E.A. Chapin, G. Luna [et al.] // *Molecular vision*. – 2010. – Vol. 16. – P. 1361–1372.

10. Yoshizawa, K. N -ethyl- N -nitrosourea induces retinal photoreceptor damage in adult rats / K. Yoshizawa, T. Sasaki, N. Uehara [et al.] // *Journal of toxicologic pathology*. – 2012. – Vol. 25, № 1. – P. 27–35.

11. Ooto, S. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina / S. Ooto, T. Akagi, R. Kageyama [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, № 37. – P. 13654–13659.

12. Wan, J. Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat / J. Wan, H. Zheng, Z.-L. Chen [et al.] // *Vision research*. – 2008. – Vol. 48, № 2. – P. 223–234.

13. Yuge, K. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina / K. Yuge, H. Nambu, H. Senzaki [et al.] // *In vivo* (Athens, Greece). – 1996. – Vol. 10, № 5. – P. 483–488.

14. Beranek, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents / D.T. Beranek // *Mutation research*. – 1990. – Vol. 231, № 1. – P. 11–30.

15. Oswald, J. Regenerative medicine in the retina: from stem cells to cell replacement therapy / J. Oswald, P. Baranov // *Therapeutic advances in ophthalmology*. – 2018. – Vol. 10. – P. 1–21.

16. Kolb, H. Cellular organization of the vertebrate retina / H. Kolb, R. Nelson, P. Ahnelt [et al.] // *Progress in brain research*. – 2001. – Vol. 131. – P. 3–26.

17. Bernardos, R.L. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells / R.L. Bernardos, L.K. Barthel, J.R. Meyers [et al.] // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2007. – Vol. 27, № 26. – P. 7028–7040.

18. Young, R.W. Cell differentiation in the retina of the mouse / R.W. Young // *The Anatomical Record*. – 1985. – Vol. 212, № 2. – P. 199–205.

19. Xin, D. Effects of nitric oxide on horizontal cells in the rabbit retina / D. Xin, S.A. Bloomfield // *Visual neuroscience*. – 2000. – Vol. 17, № 5. – P. 799–811.
20. Wong, W.L. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis / W.L. Wong, X. Su, X. Li [et al.] // *The Lancet. Global health*. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 106–116.
21. Tham, Y.-C. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis / Y.-C. Tham, X. Li, T.Y. Wong [et al.] // *Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 121, № 11. – P. 2081–2090.
22. Bi, Y.-Y. Stem/progenitor cells: a potential source of retina-specific cells for retinal repair / Y.-Y. Bi, D.-F. Feng, D.-C. Pan // *Neuroscience research*. – 2009. – Vol. 65, № 3. – P. 215–221.
23. Jones, B.W. *Retinal Degeneration, Remodeling and Plasticity* / B. W. Jones, R. E. Marc, R. L. Pfeiffer // *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* / Eds. H. Kolb, E. Fernandez, R. Nelson. – University of Utah Health Sciences Center, 2016.
24. Bringmann, A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects / A. Bringmann, I. Iandiev, T. Pannicke [et al.] // *Progress in retinal and eye research*. – 2009. – Vol. 28, № 6. – P. 423–451.
25. Jones, B.W. Retinal remodeling / B.W. Jones, M. Kondo, H. Terasaki [et al.] // *Japanese journal of ophthalmology*. – 2012. – Vol. 56, № 4. – P. 289–306.
26. Dyer, M.A. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury / M.A. Dyer, C.L. Cepko // *Nature Neuroscience*. – 2000. – Vol. 3, № 9. – P. 873–880.
27. Zhao, X. Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina / X. Zhao, A. V. Das, F. Soto-Leon [et al.] // *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. – 2005. – Vol. 232, № 2. – P. 349–358.

28. Thomson, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro [et al.] // *Science*. – 1998. – Vol. 282, № 5391. – P. 1145–1147.
29. Tropepe, V. Retinal stem cells in the adult mammalian eye / V. Tropepe, B.L. Coles, B.J. Chiasson, D.J. Horsford [et al.] // *Science*. – 2000. – Vol. 287, № 5460. – P. 2032–2036.
30. Cicero, S.A. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells / S.A. Cicero, D. Johnson, S. Reyntjens [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 16. – P. 6685–6690.
31. Coles, B.L.K. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells / B.L.K. Coles, B. Angénieux, T. Inoue [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, № 44. – P. 15772–15777.
32. Lawrence, J.M. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics / J.M. Lawrence, S. Singhal, B. Bhatia [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – Vol. 25, № 8. – P. 2033–2043.
33. Roesch, K. The transcriptome of retinal Müller glial cells / K. Roesch, A.P. Jadhav, J.M. Trimarchi [et al.] // *The Journal of comparative neurology*. – 2008. – Vol. 509, № 2. – P. 225–238.
34. Blackshaw, S. Genomic analysis of mouse retinal development / S. Blackshaw, S. Harpavat, J. Trimarchi [et al.] // *PLoS biology*. – 2004. – Vol. 2, № 9. – P. E247.
35. Григорян, Э.Н. Молекулярные факторы поддержания и активации «молодого» фенотипа клеток-источников регенерации тканей глаза / Э.Н. Григорян // *Биохимия*. – 2018. – Т. 83, № 11. – С.1627–1642.
36. Григорян, Э.Н. Эндогенные клеточные источники регенерации сетчатки глаза позвоночных животных и человека / Э.Н. Григорян // *Онтогенез*. – 2019. – Т. 50, № 1. – С.13–27.

37. Engerer, P. Uncoupling of neurogenesis and differentiation during retinal development / P. Engerer, S.C. Suzuki, T. Yoshimatsu [et al.] // The EMBO Journal. – 2017. – Vol. 36, № 9. – P. 1134–1146.
38. Martínez-Navarrete, G.C. Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans / G.C. Martínez-Navarrete, A. Angulo, J. Martín-Nieto [et al.] // The Journal of comparative neurology. – 2008. – Vol. 511, № 4. – P. 557–580.
39. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // Cell. – 2006. – Vol. 126, № 4. – P. 663–676.
40. Takahashi, K. A developmental framework for induced pluripotency / K. Takahashi, S. Yamanaka // Development (Cambridge, England). – 2015. – Vol. 142, № 19. – P. 3274–3285.
41. Higginson, J.R. Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells by Muller Glia and Astrocytes: T06-39A / J.R. Higginson, D. Piso, P. Veiga-Crespo [et al.] // XI European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. – Poster. Berlin, Germany, 2013.
42. Lorber, B. Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma / B. Lorber, A. Guidi, J.W. Fawcett [et al.] // Neurobiology of disease. – 2012. – Vol. 45, № 1. – P. 243–252.
43. Reichenbach, A. New functions of Müller cells / A. Reichenbach, A. Bringmann // Glia. – 2013. – Vol. 61, № 5. – P. 651–678.
44. Lamba, D. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye / D. Lamba, M. Karl, T. Reh // Cell stem cell. – 2008. – Vol. 2, № 6. – P. 538–549.
45. Solis, M.A. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells / M.A. Solis, Y.-H. Chen, T.Y. Wong [et al.] // Biochemistry research international. – 2012. – Vol. 2012. – P. 346972.
46. Simón, M.V. Müller glial cells induce stem cell properties in retinal progenitors *in vitro* and promote their further differentiation into photoreceptors / M. V. Simón, P. De. Genaro, C.E. Abrahan [et al.] // Journal of neuroscience research. – 2012. – Vol. 90, № 2. – P. 407–421.

47. Too, L.K. Adult human retinal Müller glia display distinct peripheral and macular expression of CD117 and CD44 stem cell-associated proteins / L.K. Too, G. Gracie, E. Hasic [et al.] // *Acta histochemica*. – 2017. – Vol. 119, № 2. – P. 142–149.
48. Zhou, P.-Y. c-Kit<sup>+</sup> cells isolated from human fetal retinas represent a new population of retinal progenitor cells / P.-Y. Zhou, G.-H. Peng, H. Xu [et al.] // *Journal of cell science*. – 2015. – Vol. 128, № 11. – P. 2169–2178.
49. Das, A. V Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling / A. V. Das, K.B. Mallya, X. Zhao [et al.] // *Developmental biology*. – 2006. – Vol. 299, № 1. – P. 283–302.
50. Zhao, J.J. Induction of retinal progenitors and neurons from mammalian Müller glia under defined conditions / J.J. Zhao, H. Ouyang, J. Luo [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 17. – P. 11945–11951.
51. Zeng, Q. Study on the differentiation of retinal ganglion cells from rat Müller cells *in vitro* / Q. Zeng, X. Xia // *Chinese journal of ophthalmology*. – 2010. – Vol. 46, № 7. – P. 615–620.
52. Giannelli, S.G. Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors / S.G. Giannelli, G.C. Demontis, G. Pertile [et al.] // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. – 2011. – Vol. 29, № 2. – P. 344–356.
53. Zhu, R. Ephrin-A2 and -A3 are negative regulators of the regenerative potential of Müller cells / R. Zhu, K.-S. Cho, D.F. Chen [et al.] // *Chinese medical journal*. – 2014. – Vol. 127, № 19. – P. 3438–3442.
54. Singhal, S. Human Müller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors *in vitro* and partially restore RGC function *in vivo* following transplantation / S. Singhal, B. Bhatia, H. Jayaram [et al.] // *Stem cells translational medicine*. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 188–199.
55. Devoldere, J. Müller cells as a target for retinal therapy / J. Devoldere, K. Peynshaert, S.C. Smedt [et al.] // *Drug discovery today*. – 2019. – Vol. 24, № 8. – P. 1483–1498.

56. Linzer, D.I. The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen / D.I. Linzer, W. Maltzman, A.J. Levine // *Virology*. – 1979. – Vol. 98, № 2. – P. 308–318.
57. David, Y. Ben Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus / Y. Ben David, V.R. Prideaux, V. Chow [et al.] // *Oncogene*. – 1988. – Vol. 3, № 2. – P. 179–185.
58. Wolf, D. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells / D. Wolf, V. Rotter // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 82, № 3. – P. 790–794.
59. Donehower, L.A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours / L.A. Donehower, M. Harvey, B.L. Slagle [et al.] // *Nature*. – 1992. – Vol. 356, № 6366. – P. 215–221.
60. Malkin, D. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms / D. Malkin, F.P. Li, L.C. Strong [et al.] // *Science*. – 1990. – Vol. 250, № 4985. – P. 1233–1238.
61. Agarwal, M.L. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts / M.L. Agarwal, A. Agarwal, W.R. Taylor [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – Vol. 92, № 18. – P. 8493–8497.
62. El-Deiry, W.S. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression / W.S. el-Deiry, T. Tokino, V.E. Velculescu [et al.] // *Cell*. – 1993. – Vol. 75, № 4. – P. 817–825.
63. Vousden, K.H. Live or let die: the cell's response to p53 / K.H. Vousden, X. Lu // *Nature reviews. Cancer*. – 2002. – Vol. 2, № 8. – P. 594–604.
64. Shin, D.H. In situ localization of p53, bcl-2 and bax mRNAs in rat ocular tissue / D.H. Shin, H.Y. Lee, H.W. Lee [et al.] // *Neuroreport*. – 1999. – Vol. 10, № 10. – P. 2165–2167.

65. Jacks, T. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice / T. Jacks, L. Remington, B.O. Williams [et al.] // *Current biology: CB.* – 1994. – Vol. 4, № 1. – P. 1–7.
66. Reichel, M.B. High frequency of persistent hyperplastic primary vitreous and cataracts in p53-deficient mice / M.B. Reichel, R.R. Ali, F. D’Esposito [et al.] // *Cell death and differentiation.* – 1998. – Vol. 5, № 2. – P. 156–162.
67. Ikeda, S. Severe ocular abnormalities in C57BL/6 but not in 129/Sv p53-deficient mice / S. Ikeda, N.L. Hawes, B. Chang [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 1999. – Vol. 40, № 8. – P. 1874–1878.
68. Rapaport, D.H. Timing and topography of cell genesis in the rat retina / D.H. Rapaport, L.L. Wong, E.D. Wood [et al.] // *The Journal of comparative neurology.* – 2004. – Vol. 474, № 2. – P. 304–324.
69. Levine, E.M. p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina / E.M. Levine, J. Close, M. Fero [et al.] // *Developmental biology.* – 2000. – Vol. 219, № 2. – P. 299–314.
70. Cao, W. *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor / W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2001. – Vol. 42, № 7. – P. 1646–1652.
71. Тронов, В.А. Рак толстой кишки: дефицит репарации, нестабильность генома, устойчивость к апоптозу, оценка риска развития заболевания / В.А. Тронов, А.В. Карпучин, И.И. Крамаренко // *Вопросы онкологии.* – 2005. – № 2. – С.159–166.
72. Madsen-Bouterse, S.A. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression / S.A. Madsen-Bouterse, G. Mohammad, M. Kanwar [et al.] // *Antioxidants & redox signaling.* – 2010. – Vol. 13, № 6. – P. 797–805.
73. Santos, J.M. Posttranslational modification of mitochondrial transcription factor A in impaired mitochondria biogenesis: implications in diabetic retinopathy and metabolic memory phenomenon / J.M. Santos, M. Mishra, R.A. Kowluru // *Experimental eye research.* – 2014. – Vol. 121. – P. 168–177.

74. Tewari, S. Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy / S. Tewari, Q. Zhong, J.M. Santos [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2012. – Vol. 53, № 8. – P. 4881–4888.
75. Mishra, M. Retinal mitochondrial DNA mismatch repair in the development of diabetic retinopathy, and its continued progression after termination of hyperglycemia / M. Mishra, R.A. Kowluru // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2014. – Vol. 55, № 10. – P. 6960–6967.
76. Lin, H. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration / H. Lin, H. Xu, F.-Q. Liang [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2011. – Vol. 52, № 6. – P. 3521–3529.
77. Zoccolella, S. Late-onset Leber hereditary optic neuropathy mimicking Susac's syndrome / S. Zoccolella, V. Petruzzella, F. Prascina [et al.] // *Journal of neurology*. – 2010. – Vol. 257, № 12. – P. 1999–2003.
78. Островский, М.А. Фото- и радиобиология зрения / М.А. Островский // *Технологии живых систем*. – 2005. – Т. 2, № 1–2. – С.75–86.
79. Пирузян, Л.А. О «сенсорной» безопасности лекарств: фотосенсибилизированное повреждение структур глаза / Л.А. Пирузян, М.А. Островский [и др.] // *Известия Академии Наук СССР. Серия Биологическая*. – 1991. – № 1. – С. 43–50.
80. Ha, C.S. p53-based strategy to reduce hematological toxicity of chemotherapy: A proof of principle study / C.S. Ha, J.E. Michalek, R. Elledge [et al.] // *Molecular oncology*. – 2016. – Vol. 10, № 1. – P. 148–156.
81. Xu, J. Cyclophosphamide Combined with Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Protects against Bleomycin-induced Lung Fibrosis in Mice / J Xu., L. Li, J. Xiong [et al.] // *Annals of clinical and laboratory science*. – 2015. – Vol. 45, № 3. – P. 292–300.
82. Imperia, P.S. Ocular complications of systemic cancer chemotherapy / P.S. Imperia, H.M. Lazarus, J.H. Lass // *Survey of Ophthalmology*. – 1989. – Vol. 34, № 3. – P. 209–230.

83. Anderson, B. Necrotizing uveitis incident to perfusion of intraocular malignancies with nitrogen mustard or related compounds / B. Anderson, B.J. Anderson // Transactions of the American Ophthalmological Society. – 1960. – Vol. 58. – P. 95–104.
84. Francis, J.H. Local and systemic toxicity of intravitreal melphalan for vitreous seeding in retinoblastoma: a preclinical and clinical study / J.H. Francis, P. Schaiquevich, E. Buitrago [et al.] // Ophthalmology. – 2014. – Vol. 121, № 9. – P. 1810–1817.
85. Parareda, A. Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma. Challenges of a prospective study / A. Parareda, J. Català, A.M. Carcaboso [et al.] // Acta ophthalmologica. – 2014. – Vol. 92, № 3. – P. 209–215.
86. Bregeat, M. Oedema papillaire spontanément résolu après un traitement par le chlorambucil / M. Bregeat, R. Hernians // Bull. Soc. Beige Ophthalmol. – 1972. – Vol. 1960. – P. 567–569.
87. Dinning, W.J. Immunosuppressives in uveitis. A preliminary report of experience with chlorambucil / W.J. Dinning, E.S. Perkins // The British journal of ophthalmology. – 1975. – Vol. 59, № 8. – P. 397–403.
88. Al-Tweigeri, T. Ocular toxicity and cancer chemotherapy. A review / T. Al-Tweigeri, J.M. Nabholz, J.R. Mackey // Cancer. – 1996. – Vol. 78, № 7. – P. 1359–1373.
89. Podos, S.M. Ocular toxicity of busulfan / S.M. Podos, G.P. Canellos // American journal of ophthalmology. – 1969. – Vol. 68. – P. 500–504.
90. Ravindranathan, M.P. Cataract after busulfan treatment / M.P. Ravindranathan, V.J. Paul, E.L. Kurlakose // Br. Med. J. – 1972. – Vol. 1, № 5794. – P. 218–219.
91. Grimes, P. Influence of myleran on cell proliferation in the lens epithelium / P. Grimes, L. Vonsallmann, A. Frichette // Investigative ophthalmology. – 1964. – Vol. 3, № 3. – P. 566–576.
92. Sidi, Y. Sicca syndrome in a patient with toxic reaction to busulfan / Y. Sidi, D. Douer, J. Pinkhas // JAMA. – 1977. – Vol. 238, № 238. – P. 1951.

93. Hamming, N.A. Histopathology and ultrastructure of busulfan-induced cataract / N.A. Hamming, D.J. Apple, M.F. Goldberg // *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. – 1976. – Vol. 200, № 2. – P. 139–147.
94. Wang, M.Y. Bilateral blindness and lumbosacral myelopathy associated with high-dose carmustine and cisplatin therapy / M.Y. Wang, A.C. Arnold, H. V. Vinters [et al.] // *American journal of ophthalmology*. – 2000. – Vol. 130, № 3. – P. 367–368.
95. Kupersmith, M.J. Maculopathy caused by intra-arterially administered cisplatin and intravenously administered carmustine / M.J. Kupersmith, W.H. Seiple, K. Holopigian [et al.] // *American journal of ophthalmology*. – 1992. – Vol. 113, № 4. – P. 435–438.
96. Pickrell, L. Ischemic optic neuropathy secondary to intracarotid infusion of BCNU / L. Pickrell, V. Purvin // *Journal of clinical neuro-ophthalmology*. – 1987. – Vol. 7, № 2. – P. 87–92.
97. Shapiro, W.R. A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma / W.R. Shapiro, S.B. Green, P.C. Burger [et al.] // *Journal of neurosurgery*. – 1992. – Vol. 76, № 5. – P. 772–781.
98. Lokich, J.J. 1, -(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (methyl CCNU) and adriamycin combination therapy / J.J. Lokich, A.T. Skarin, E. Frei // *Cancer*. – 1974. – Vol. 34, № 5. – P. 1593–1597.
99. Chauveinc, L. Intra arterial chemotherapy with ACNU and radiotherapy in inoperable malignant gliomas / L. Chauveinc, M.T. Sola-Martinez, M. Martin-Duverneuil [et al.] // *Journal of neuro-oncology*. – 1996. – Vol. 27, № 2. – P. 141–147.
100. Moster, M.L. Complications of cancer therapy / M.L. Moster, R. Foroozan // *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-ophthalmology* / Eds. N.R. Miller, F.B. Walsh, W.F. Hoyt. – London: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – Vol. 6. – P. 1759–1819.
101. Shimamura, Y. Optic nerve degeneration caused by supraorbital carotid artery infusion with cisplatin and ACNU. Case report / Y. Shimamura, M. Chikama, T. Tanimoto [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 1990. – Vol. 72, № 2. – P. 285–288.

102. Wilczek, Z.M. Experimental intraocular penetration of dacarbazine / Z.M. Wilczek // *American journal of ophthalmology*. – 1977. – Vol. 84, № 3. – P. 299–304.
103. Cohen, S.-Y. Randomized clinical trial France DMLA2: effect of trimetazidine on exudative and nonexudative age-related macular degeneration / S.-Y. Cohen, H. Bourgeois, C. Corbe [et al.] // *Retina (Philadelphia, Pa.)*. – 2012. – Vol. 32, № 4. – P. 834–843.
104. Reyderman, L. Disposition and pharmacokinetics of temozolomide in rat / L. Reyderman, P. Statkevich, C.M. Thonoor [et al.] // *Xenobiotica*. – 2004. – Vol. 34, № 5. – P. 487–500.
105. Schreiber, S. Bilateral posterior RION after concomitant radiochemotherapy with temozolomide in a patient with glioblastoma multiforme: a case report / S. Schreiber, V. Prox-Vagedes, E. Eloff [et al.] // *BMC Cancer*. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 520.
106. Lennan R.M. Optic neuroretinitis in association with BCNU and procarbazine therapy / Lennan R.M., Taylor H.R. // *Medical and pediatric oncology*. – 1978. – Vol. 4, № 1. – P. 43–48.
107. Matulane (procarbazine hydrochloride) product monograph [Electronic resource] / Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc. – Mode of access: [http://www.sigmatau.com/canada/Matulane\\_Product\\_Monograph.pdf](http://www.sigmatau.com/canada/Matulane_Product_Monograph.pdf).
108. Taoka, K. Treatment of primary intraocular lymphoma with rituximab, high dose methotrexate, procarbazine, and vincristine chemotherapy, reduced whole-brain radiotherapy, and local ocular therapy / K. Taoka, G. Yamamoto, T. Kaburaki [et al.] // *British journal of haematology*. – 2012. – Vol. 157, № 2. – P. 252–254.
109. Fraunfelder, F.T. Ocular toxicity of antineoplastic agents / F.T. Fraunfelder, S.M. Meyer // *Ophthalmology*. – 1983. – Vol. 90, № 1. – P. 1–3.
110. Kende, G. Blurring of vision: a previously undescribed complication of cyclophosphamide therapy / G. Kende, S.R. Sirkin, P.R. Thomas [et al.] // *Cancer*. – 1979. – Vol. 44, № 1. – P. 69–71.

111. Choonara, I.A. Blurring of vision due to ifosfamide / I.A. Choonara, M. Overend, C.C. Bailey // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 1987. – Vol. 20, № 4. – P. 349.
112. Wilding, G. Retinal toxicity after high-dose cisplatin therapy / G. Wilding, R. Caruso, T.S. Lawrence [et al.] // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 1985. – Vol. 3, № 12. – P. 1683–1689.
113. Miller, D.F. Ocular and orbital toxicity following intracarotid injection of BCNU (carmustine) and cisplatin for malignant gliomas / D.F. Miller, J.W. Bay, R.J. Lederman [et al.] // *Ophthalmology*. – 1985. – Vol. 92, № 3. – P. 402–406.
114. Margo, C.E. Ocular and orbital toxicity after intracarotid cisplatin therapy / C.E. Margo, F.R. Murtagh // *American journal of ophthalmology*. – 1993. – Vol. 116, № 4. – P. 508–509.
115. Katz, B.J. Persistent severe visual and electroretinographic abnormalities after intravenous Cisplatin therapy / B.J. Katz, J.H. Ward, K.B. Digre [et al.] // *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 132–135.
116. Rankin, E.M. Ophthalmic toxicity during carboplatin therapy / E.M. Rankin, J.E. Pitts // *Ann. Oncol.* – 1993. – Vol. 4, № 4. – P. 337–338.
117. O'Brien, M.E. Blindness associated with high-dose carboplatin / M.E. O'Brien, K. Tonge, P. Blake [et al.] // *Lancet*. – 1992. – Vol. 339, № 8792. – P. 558.
118. Watanabe, W. Severe ocular and orbital toxicity after intracarotid injection of carboplatin for recurrent glioblastomas / W. Watanabe, R. Kuwabara, T. Nakahara [et al.] // *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. – 2002. – Vol. 240, № 12. – P. 1033–1035.
119. Harbour, J.W. Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma / J.W. Harbour, T.G. Murray, D. Hamasaki [et al.] // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1996. – Vol. 37, № 9. – P. 1892–1898.

120. Wilson, R.H. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability / R.H. Wilson, T. Lehky, R.R. Thomas [et al.] // *Journal of clinical oncology*. – 2002. – Vol. 20, № 7. – P. 1767–1774.

121. Matus, G. Cancer associated retinopathy (CAR). Two clinical cases and review of the literature / G. Matus, M. Dicato, C. Focan // *Revue médicale de Liège*. – 2007. – Vol. 62, № 3. – P. 166–169.

122. Boeck, K. Melanoma-associated paraneoplastic retinopathy: case report and review of the literature / K. Boeck, S. Hofmann, M. Klopfer [et al.] // *The British journal of dermatology*. – 1997. – Vol. 137, № 3. – P. 457–460.

123. Pföhler, C. Melanoma-associated retinopathy: high frequency of subclinical findings in patients with melanoma / C. Pföhler, A. Haus, A. Palmowski [et al.] // *The British journal of dermatology*. – 2003. – Vol. 149, № 1. – P. 74–78.

124. Whitehead, A.J. Macular pigment: a review of current knowledge / A.J. Whitehead, J.A. Mares, R.P. Danis // *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. – 2006. – Vol. 124, № 7. – P. 1038–1045.

125. Davies, S. Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells / S. Davies, M.H. Elliott, E. Floor [et al.] // *Free radical biology & medicine*. – 2001. – Vol. 31, № 2. – P. 256–265.

126. Островский, М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения / М.А. Островский // *Успехи биологической химии*. – 2005. – Т. 45. – С.173–204.

127. Tate, D.J. Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells / D.J. Tate, M.V. Miceli, D.A. Newsome // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1995. – Vol. 36, № 7. – P. 1271–1279.

128. Тронов, В.А. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза / В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, М.Ю. Логинова [и др.] // *Цитология*. – 2012. – Т. 54, № 3. – С. 261–269.

129. Lu, L. Effects of different types of oxidative stress in RPE cells / L. Lu, S.F. Hackett, A. Mincey [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2006. – Vol. 206, № 1. – P. 119–125.
130. Liles, M.R. Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium / M.R. Liles, D.A. Newsome, P.D. Oliver // *Archives of ophthalmology*. – 1991. – Vol. 109, № 9. – P. 1285–1288.
131. Oliver, P.D. Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium / P.D. Oliver, D.A. Newsome // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1992. – Vol. 33, № 6. – P. 1909–1918.
132. Unger, W.G. Catalase activity in cultured human retinal pigment epithelial cells / W.G. Unger, M.E. Boulton, S. Petal [et al.] // *Biochemical Society transactions*. – 1991. – Vol. 19, № 4. – P. 443S.
133. Abramson, D.H. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma initial results / D.H. Abramson, I.J. Dunkel, S.E. Brodie [et al.] // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 115, № 8. – P. 1398–1404.
134. Ghassemi, F. Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma / F. Ghassemi, C.L. Shields // *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. – 2012. – Vol. 130, № 10. – P. 1268–1271.
135. Smith, S.J. Evaluating the risk of extraocular tumour spread following intravitreal injection therapy for retinoblastoma: a systematic review / S.J. Smith, B.D. Smith // *The British journal of ophthalmology*. – 2013. – Vol. 97, № 10. – P. 1231–1236.
136. Greenberg, H.S. Intra-arterial BCNU chemotherapy for treatment of malignant gliomas of the central nervous system / H.S. Greenberg, W.D. Ensminger, W.F. Chandler [et al.] // *Journal of neurosurgery*. – 1984. – Vol. 61, № 3. – P. 423–429.
137. Grimson, B.S. Ophthalmic and central nervous system complications following intracarotid BCNU (Carmustine) / B.S. Grimson, M.S. Mahaley, H.D. Dubey [et al.] // *Journal of clinical neuro-ophthalmology*. – 1981. – Vol. 1, № 4. – P. 261–264.

138. Shingleton, B.J. Ocular toxicity associated with high-dose carmustine / B.J. Shingleton, D.C. Bienfang, D.M. Albert [et al.] // Archives of ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960). – 1982. – Vol. 100, № 11. – P. 1766–1772.

139. Kupersmith, M.J. Visual system toxicity following intra-arterial chemotherapy / M.J. Kupersmith, L.P. Frohman, I.S. Choi [et al.] // Neurology. – 1988. – Vol. 38, № 2. – P. 284–289.

140. Khawly, J.A. Retinopathy and optic neuropathy in bone marrow transplantation for breast cancer / J.A. Khawly, P. Rubin, W. Petros [et al.] // Ophthalmology. – 1996. – Vol. 103, № 1. – P. 87–95.

141. Saito, T. Phase I and preliminary phase II study of 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) administered by intermittent dose schedule / T. Saito, M. Yokoyame, T. Himori [et al.] // Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy. – 1977. – Vol. 4. – P. 991–1004.

142. Wang, Y. Comparison of the clinical efficacy of temozolomide (TMZ) versus nimustine (ACNU)-based chemotherapy in newly diagnosed glioblastoma / Y. Wang, X. Chen, Z. Zhang [et al.] // Neurosurgical review. – 2014. – Vol. 37, № 1. – P. 73–78.

143. Agarwal, S. SERS as an advanced tool for investigating chloroethyl nitrosourea derivatives complexation with DNA / S. Agarwal, B. Ray, R. Mehrotra // International journal of biological macromolecules. – 2015. – Vol. 81. – P. 891–897.

144. Robins, P. Cross-linking of DNA induced by chloroethylnitrosourea is presented by O6-methylguanine-DNA methyltransferase / P. Robins, A.L. Harris, I. Goldsmith [et al.] // Nucleic acids research. – 1983. – Vol. 11, № 22. – P. 7743–7758.

145. Gonzaga, P.E. Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA / P.E. Gonzaga, P.M. Potter, T.Q. Niu [et al.] // Cancer research. – 1992. – Vol. 52, № 21. – P. 6052–6058.

146. Sato, K. The effect of o6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and mismatch repair gene (hMLH1) status on the sensitivity to alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea(ACNU) in

gallbladder carcinoma cells / K. Sato, Y. Kitajima, Y. Koga // *Anticancer research*. – 2005. – Vol. 25, № 6B. – P. 4021–4028.

147. Островская, Л.А. Препараты класса нитрозоалкилмочевин в отечественной противоопухолевой химиотерапии / Л.А. Островская, В.А. Филов, Б.А. Ивин [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2004. – Т. 3, № 1. – С.24–36.

148. Goldin, A. Antileukemic activity of hydroxyurea (NSC-32065) and other urea derivatives / A. Goldin, J.M. Venditti, J.A. Mead [et al.] // *Cancer chemotherapy reports*. – 1964. – Vol. 40. – P. 57–74.

149. Emanuel, N.M. Experimental and clinical studies of the antitumor activity of 1-methyl-1-nitrosourea (NSC-23909) / N.M. Emanuel, E.M. Vermel, L.A. Ostrovskaya [et al.] // *Cancer chemotherapy reports*. – 1974. – Vol. 58, № 2. – P. 135–148.

150. Bossi, A. Activity of cyclophosphamide and 1-methylnitrosourea on Ehrlich carcinoma transplanted in different sites. Correlation between drug level and tumor inhibition / A. Bossi, T. Colombo, M.G. Donelli [et al.] // *Biochemical pharmacology*. – 1975. – Vol. 24, № 1. – P. 21–26.

151. Donelli, M.G. Selective chemotherapy in relation to the site of tumor transplantation / M.G. Donelli, R. Rosso, S. Garattini // *International journal of cancer*. – 1967. – Vol. 2, № 5. – P. 421–424.

152. Ivankovic, S. Kombinationstherapie der akuten Rattenleukemie L 5222 mit Endoxan und Methyl- bzw. Endoxan und n-Butyl-Nitrosoharnstoff / S. Ivankovic, W.J. Zeller, D. Schmihl [et al.] // *Klinische Wochenschrift*. – 1974. – Vol. 52, № 21. – P. 1026–1027.

153. Корман, Н.П. Применение N-нитрозо-метил мочевины у больных раком легкого / Н.П. Корман, Е.М. Вермель, Б.В. Милонов [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 1971. – Т. 1, № 17. – P. 35–40.

154. Kolarić, K. Combination chemotherapy with 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) and cyclophosphamide in solid tumors / K. Kolarić // *Zeitschrift für*

Krebsforschung und klinische Onkologie. Cancer research and clinical oncology. – 1977. – Vol. 89, № 3. – P. 311–319.

155. Faustino-Rocha, A.I. N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent / A.I. Faustino-Rocha, R. Ferreira, P.A. Oliveira [et al.] // *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 36, № 12. – P. 9095–9117.

156. Tsubura, A. Animal models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials / A. Tsubura, Y.-C. Lai, H. Miki [et al.] // *In vivo*. – 2011. – Vol. 25, № 1. – P. 11–22.

157. Treudler R. Dacarbazine but not temozolomide induces phototoxic dermatitis in patients with malignant melanoma / R. Treudler, J. Georgieva, C.C. Geilen [et al.] // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2004. – Vol. 50, № 5. – P. 783–785.

158. Struwe, M. Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo comet assay / M. Struwe, K.-O. Greulich, U. Junker [et al.] // *Photochem Photobiol. Sci.* – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 240–249.

159. Reid, J.M. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1 / J.M. Reid, M.J. Kuffel, J.K. Miller [et al.] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 1999. – Vol. 5, № 8. – P. 2192–2197.

160. Darkes, M.J.M. Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers / M.J.M. Darkes, G.L. Plosker, B. Jarvis // *American Journal of Cancer*. – 2002. – Vol. 1, № 1. – P. 55–80.

161. Bignami, M. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents / M. Bignami, M. O’Driscoll, G. Aquilina [et al.] // *Mutation research*. – 2000. – Vol. 462, № 2–3. – P. 71–82.

162. Eguchi, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis / Y. Eguchi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto // *Cancer research*. – 1997. – Vol. 57, № 10. – P. 1835–1840.

163. Martin, D.S. Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade / D.S. Martin, G.K. Schwartz // *Oncology research*. – 1997. – Vol. 9, № 1. – P. 1–5.
164. Chamberlain, M.C. Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas / M.C. Chamberlain // *Expert review of neurotherapeutics*. – 2010. – Vol. 10, № 10. – P. 1537–1544.
165. Chen, C. Phase I trial of hypofractionated intensity-modulated radiotherapy with temozolomide chemotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme / C. Chen, D. Damek, L.E. Gaspar [et al.] // *International journal of radiation oncology, biology, physics*. – 2011. – Vol. 81, № 4. – P. 1066–1074.
166. Pabla, N. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis / N. Pabla, S. Huang, Q.-S. Mi [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 10. – P. 6572–6583.
167. Mocellin, S. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis / S. Mocellin, S. Pasquali, C.R. Rossi [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2010. – Vol. 102, № 7. – P. 493–501.
168. Абрамов, М.Е. Химиотерапия диссеминированной меланомы кожи с включением интарона ( $\gamma$ -ИФН) / М.Е. Абрамов, С.Л. Гуторов, Е.Г. Славина // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2009. – Т. 8, № 1. – С.64–74.
169. Davar, D. Adjuvant therapy for melanoma / D. Davar, A.A. Tarhini, J.M. Kirkwood // *Cancer journal*. – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 192–202.
170. Hayasaka, S. Interferon associated retinopathy / S. Hayasaka, Y. Nagaki, M. Matsumoto [et al.] // *Br J Ophthalmol*. – 1998. – Vol. 82, № 3. – P. 323–325.
171. Hejny, C. Retinopathy associated with high-dose interferon alfa-2b therapy / C. Hejny, P. Sternberg, D.H. Lawson [et al.] // *American journal of ophthalmology*. – 2001. – Vol. 131, № 6. – P. 782–787.
172. Stoffelns, B.M. Interferon causes ischemic ocular diseases--case studies and review of the literature / B.M. Stoffelns // *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. – 2006. – Vol. 223, № 5. – P. 367–371.

173. Ockenfels, M. Ocular complications of adjuvant interferon therapy for malignant melanoma: a review / M. Ockenfels, W. Lisch // *Hautarzt*. – 2003. – Vol. 54, № 2. – P. 144–147.

174. Brouty-Boyé, D. Inhibition of cell motility by interferon / D. Brouty-Boyé, B.R. Zetter // *Science (New York, N.Y.)*. – 1980. – Vol. 208, № 4443. – P. 516–518.

175. Vessey, K.A. Adenosine triphosphate-induced photoreceptor death and retinal remodeling in rats / K.A. Vessey, U. Greferath, F.P. Aplin [et al.] // *The Journal of comparative neurology*. – 2014. – Vol. 522, № 13. – P. 2928–2950.

176. Scott, P.A. Anatomical evidence of photoreceptor degeneration induced by iodoacetic acid in the porcine eye / P.A. Scott, H.J. Kaplan, J.H. Sandell // *Experimental eye research*. – 2011. – Vol. 93, № 4. – P. 513–527.

177. Lyzogubov, V.V. Polyethylene glycol induced mouse model of retinal degeneration / V.V. Lyzogubov, N.S. Bora, R.G. Tytarenko [et al.] // *Experimental eye research*. – 2014. – Vol. 127. – P. 143–152.

178. Scott, A. Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina / A. Scott, M. Fruttiger // *Eye (London, England)*. – 2010. – Vol. 24, № 3. – P. 416–421.

179. 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 [и др.] // *Цитология*. – 2015. – Т. 57, № 2. – С.119–128.

180. 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 [et al.] // *Cell and Tissue Biology*. – 2015. – V.9, № 3. – P. 198-207.

181. Hisano, S. Nitric Oxide Synthase Activation as a Trigger of N-methyl-N-nitrosourea-Induced Photoreceptor Cell Death / S. Hisano, Y. Koriyama, K. Ogai [et al.] // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 854. – P. 379–384.

182. Lin, F.-L. The natural retinoprotectant chrysophanol attenuated photoreceptor cell apoptosis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mouse model of

retinal degeneration / F.-L. Lin, C.-H. Lin, J.-D. Ho [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 41086.

183. Gao, Y. Ganoderma spore lipid inhibits N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal photoreceptor apoptosis *in vivo* / Y. Gao, X. Deng, Q. Sun [et al.] // Experimental eye research. – 2010. – Vol. 90, № 3. – P. 397–404.

184. Kiuchi, K. Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats / K. Kiuchi, M. Kondo, S. Ueno [et al.] // Current eye research. – 2003. – Vol. 26, № 6. – P. 355–362.

185. Taylor, H.R. Vision loss in Australia / H.R. Taylor, J.E. Keeffe, H.T.V. Vu [et al.] // The Medical journal of Australia. – 2005. – Vol. 182, № 11. – P. 565–568.

186. Eells, J.T. Formate-induced alterations in retinal function in methanol-intoxicated rats / J.T. Eells, M.M. Salzman, M.F. Lewandowski [et al.] // Toxicology and applied pharmacology. – 1996. – Vol. 140, № 1. – P. 58–69.

187. Murray, T.G. Methanol poisoning. A rodent model with structural and functional evidence for retinal involvement / T.G. Murray, T.C. Burton, C. Rajani [et al.] // Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960). – 1991. – Vol. 109, № 7. – P. 1012–1016.

188. Herrold, K.M. Pigmentary degeneration of the retina induced by N-methyl-N-nitrosourea. An experimental study in syrian hamsters / K.M. Herrold // Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960). – 1967. – Vol. 78, № 5. – P. 650–653.

189. Nakajima, M. Photoreceptor apoptosis induced by a single systemic administration of N-methyl-N-nitrosourea in the rat retina / M. Nakajima, K. Yuge, H. Senzaki [et al.] // The American journal of pathology. – 1996. – Vol. 148, № 2. – P. 631–641.

190. Taomoto, M. Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian golden hamsters / M. Taomoto, H. Nambu, H. Senzaki [et al.] // Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology– 1998. – Vol. 236, № 9. – P. 688–695.

191. Yoshizawa, K. Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Sprague-Dawley rats / K. Yoshizawa, H. Nambu, J. Yang [et al.]

// Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. – 1999. – Vol. 79, № 11. – P. 1359–1367.

192. Yoshizawa, K. Cataractogenesis in neonatal Sprague-Dawley rats by N-methyl-N-nitrosourea / K. Yoshizawa, Y. Oishi, H. Nambu [et al.] // Toxicologic pathology. – 2000. – Vol. 28, № 4. – P. 555–564.

193. Chen, Y.-Y. N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice / Y.-Y. Chen, S.-L. Liu, D.-P. Hu // Experimental eye research. – 2014. – Vol. 121. – P. 102–113.

194. Виноградова, Ю.В. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки глаза у мышей после воздействия ионизирующего излучения и метилнитрозомочевины / Ю.В. Виноградова, В.А. Тронов, К.Н. Ляхова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, № 4. – С.385–392.

195. Końca, K. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay / K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik [et al.] // Mutation research. – 2003. – Vol. 534, № 1–2. – P. 15–20.

196. The TACS® 2 TdT Fluorescein kit [Electronic resource] / Trevigen, Inc., 2011. – Mode of access: [https://trevigen.com/docs/protocol/protocol\\_4812-30-K.pdf](https://trevigen.com/docs/protocol/protocol_4812-30-K.pdf).

197. Тронов. В.А. Репарация ДНК и гибель покоящихся лимфоцитов крови человека, индуцированные перекисью водорода / В.А. Тронов, Е.М. Константинов // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 11. – С.1516–1524.

198. 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 [и др.] // Письма в ЭЧАЯ. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 241–255.

199. 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 [et al.] // Physics of Particles and Nuclei Letters. – 2015. – V.12, № 1. – P. 173-183.

200. Nomura-Komoike, K. DNA Damage Response in Proliferating Müller Glia in the Mammalian Retina / K. Nomura-Komoike, F. Saitoh, Y. Komoike // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2016. – Vol. 57, № 3. – P. 1169–1182.

201. Hegde, M.L. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells / M.L. Hegde, T.K. Hazra, S. Mitra // *Cell research*. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 27–47.

202. Debbio, C.B. Del Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Müller cells in adult mammalian retina / C.B. Debbio, S. Balasubramanian, S. Parameswaran [et al.] // *PloS one*. – 2010. – Vol. 5, № 8. – P. 1–15.

203. Ouyang, H. Ocular Stem Cell Research from Basic Science to Clinical Application: A Report from Zhongshan Ophthalmic Center Ocular Stem Cell Symposium / H. Ouyang, J.L. Goldberg, S. Chen [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – Vol. 17, № 3. – P. 415.

204. Chandna, S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death / S. Chandna // *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. – 2004. – Vol. 61, № 2. – P. 127–133.

205. Noda, Y. 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium salt, the 1-amino analogues of neurotoxins, MPTP and MPP+, induce apoptosis in PC12 cells: detection of apoptotic cells by Comet assay and flow cytometric analysis / Y. Noda, T. Sumino, Y. Fujisawa [et al.] // *In vivo (Athens, Greece)*. – 2004. – Vol. 18, № 5. – P. 561–569.

206. Fu, D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents / D. Fu, J.A. Calvo, L.D. Samson // *Nature reviews. Cancer*. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 104–120.

207. Тронов, В.А. Роль эксцизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза / В.А. Тронов, Е.М. Константинов, И.И. Крамаренко // *Биохимия*. – 2002. – Т. 67, № 7. – С.882–889.

208. Mirzoeva, O.K. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and

cytotoxicity / O.K. Mirzoeva, T. Kawaguchi, R.O. Pieper // *Molecular cancer therapeutics*. – 2006. – Vol. 5, № 11. – P. 2757–2766.

209. Meira, L.B. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice / L.B. Meira, C.A. Moroski-Erkul, S.L. Green [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 3. – P. 888–893.

210. Koag, M.-C. Transition-state destabilization reveals how human DNA polymerase  $\beta$  proceeds across the chemically unstable lesion N7-methylguanine / M.-C. Koag, Y. Kou, H. Ouzon-Shubeita [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2014. – Vol. 42, № 13. – P. 8755–8766.

211. Allocca, M. PARP inhibitors protect against sex- and AAG-dependent alkylation-induced neural degeneration / M. Allocca, J.J. Corrigan, K.R. Fake [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 40. – P. 68707–68720.

212. Ahel, D. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1 / D. Ahel, Z. Horejsí, N. Wiechens [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 325, № 5945. – P. 1240–1243.

213. Ying, W. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death / W. Ying, M.B. Sevigny, Y. Chen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, № 21. – P. 12227–12232.

214. Fischer, A.J. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina / A.J. Fischer, T.A. Reh // *Developmental biology*. – 2002. – Vol. 251, № 2. – P. 367–379.

215. Joly, S. Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors *in vivo* / S. Joly, C. Lange, M. Thiersch [et al.] // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, № 51. – P. 13765–13774.

216. Hooper, M.J. Damage-associated molecular pattern recognition is required for induction of retinal neuroprotective pathways in a sex-dependent manner / M.J.

Hooper, J. Wang, R. Browning [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 9115.

217. Joly, S. Pax6-positive Müller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina / S. Joly, V. Pernet, M. Samardzija [et al.] // *Glia*. – 2011. – Vol. 59, № 7. – P. 1033–1046.

218. Ueki, Y. P53 is required for the developmental restriction in Müller glial proliferation in mouse retina / Y. Ueki, M.O. Karl, S. Sudar [et al.] // *Glia*. – 2012. – Vol. 60, № 10. – P. 1579–1589.

219. Fausett, B. V The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration / B.V. Fausett, J.D. Gumerson, D. Goldman // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, № 5. – P. 1109–1117.

220. Ueki, Y. Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice / Y. Ueki, M.S. Wilken, K.E. Cox [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112, № 44. – P. 13717–13722.

221. Jorstad, N.L. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice / N.L. Jorstad, M.S. Wilken, W.N. Grimes [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 548, № 7665. – P. 103–107.

222. Тронов, В.А. Эффективность коррекционной репарации (MMR) и мутация гена *MLH2* в клетках карциномы толстого кишечника COLO320SHR / В.А. Тронов, И.И. Крамаренко, И.И. Майорова [и др.] // *Генетика*. – 2007. – Т. 43, № 4. – С.537–544.

223. Zheng, H. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation / H. Zheng, H. Ying, H. Yan [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 455, № 7216. – P. 1129–1133.

224. Sachdeva, M. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145 / M. Sachdeva, S. Zhu, F. Wu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 9. – P. 3207–3212.

225. Nakano, T. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs / T. Nakano, S. Ando, N. Takata [et al.] // *Cell stem cell*. – 2012. – Vol. 10, № 6. – P. 771–785.
226. Zhong, X. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs / X. Zhong, C. Gutierrez, T. Xue [et al.] // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 4047.
227. Volonté, Y.A. A Defective Crosstalk Between Neurons and Müller Glial Cells in the rd1 Retina Impairs the Regenerative Potential of Glial Stem Cells / Y.A. Volonté, H. Vallese-Maurizi, M.J. Dibo [et al.] // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 334.
228. Rabesandratana, O. Pluripotent Stem Cell-Based Approaches to Explore and Treat Optic Neuropathies / O. Rabesandratana, O. Goureau, G. Orioux // *Frontiers in neuroscience*. – 2018. – Vol. 12. – P. 651.
229. Jin, Z.-B. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells / Z.-B. Jin, M.-L. Gao, W.-L. Deng [et al.] // *Progress in retinal and eye research*. – 2019. – Vol. 69. – P. 38–56.