

МЕХАНИЗМЫ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ТЕРМИНАЛЬНО ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЗРЕЛОЙ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

© В. А. Тронов,^{1, 2, *} Ю. В. Виноградова,² М. Ю. Логинова,³
В. А. Поплинская,⁴ М. А. Островский^{2, 3}

¹ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва,

² Объединенный институт ядерных исследований, Дубна,

³ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН

и ⁴ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;

* электронный адрес: vtronov@yandex.ru

Ретинопатия у животных индуцируется агентами, вызывающими повреждение ДНК. Это говорит о том, что повреждения генома могут быть причастны к инициации процесса дегенерации сетчатки. Цель работы состояла в описании действия на сетчатку мышей генотоксикантов — гамма-излучения и излучения протонов и метилнитрозомочевина (МНМ), вводимой однократно внутрибрюшинно. Оценивали морфологические изменения ткани, повреждение и репарацию ДНК в сетчатке, а также экспрессию 5 белков, участвующих в апоптозе, — p53, ATM, PARP, FasR и каспазы 3. Облучение в дозе 14 Гр равно-токсично по индукции однонитевых разрывов ДНК для гамма-излучения и излучения протонов. Но протоны в 2 раза более эффективны в индукции двухнитевых разрывов ДНК. Разрывы ДНК в сетчатке репарировались в течение ≤ 10 ч. Облучение увеличивало экспрессию p53 и ATM. Однако в течение 7 сут после облучения признаков клеточной гибели в сетчатке не обнаруживали. После облучения протонами в дозе 25 Гр отмечали нарастающие во времени деструктивные изменения в сетчатке, затрагивающие главным образом фоторецепторный слой. Изменения сопровождалось увеличением экспрессии проапоптотических белков. Однократное введение мышам МНМ в дозе 70 мг/кг увеличивало уровень белков p53, PARP, FasR, каспазы 3 и сопровождалось деструктивными изменениями в сетчатке с признаками апоптоза фоторецепторов. Как и в случае с облучением, снижение дозы МНМ в 2 раза полностью отменяло цитотоксический эффект агента. В ДНК сетчатки обнаружен высокий уровень спонтанных повреждений в виде апуриновых и апириимидиновых сайтов. Полученные результаты свидетельствуют о генотоксическом пороге инициации гибели клеток сетчатки. Предполагается участие топоизомеразы 2 в реализации повреждений ДНК в цитотоксический эффект.

Ключевые слова: сетчатка, постмитотические клетки, ионизирующее излучение, метилнитрозомочевина, повреждение ДНК, генотоксический порог, топоизомераза 2.

Основу зрелой сетчатки млекопитающих составляют терминально дифференцированные клетки, утратившие свой регенеративный потенциал. Для них апоптоз представляется губительным, угрожающим существованию органа и организма в целом. Вместе с тем в эмбриогенезе глаза апоптоз играет важную роль. По мере дифференцировки клеточных элементов сетчатки частота апоптоза снижается (Walsh, 1997). Таким образом, зрелая сетчатка приобретает высокую устойчивость к генотоксическому стрессу и связанному с ним апоптозу. Действительно, радиорезистентность зрелой сетчатки взрослых мышей на порядок выше, чем развивающейся сетчатки новорожденных животных (Borges et al., 2004; Gorgels et al., 2007). Заметные морфологические изменения наблюдались в сетчатке в ответ на облучение животных довольно высокими дозами (более 10 Гр) и спустя длительный срок (несколько месяцев) (Amoaku et al., 1989, 1992; Stitt et al., 1994; Логинова и др., 2008).

Пострадиационная ретинопатия и когнитивные расстройства часто бывают нежелательными побочными эф-

фектами радиотерапии (Kwon, Sung, 2009; Seigers, Fardell, 2010; Gan et al., 2011). Так, при радиотерапии опухолей носоглотки (Takeda et al., 1999) и глаза (Lumbroso-Le Rouic et al., 2006; Wuestemeyer et al., 2006) суммарная доза облучения превышает 50 Гр. При протонной радиотерапии меланомы глаза кумулятивная доза фракционированного облучения составляет 54—75 Гр (Takeda et al., 1999). Цитотоксическая химиотерапия также вызывает офтальмологические осложнения в виде обратимых и необратимых острых и хронических глазных заболеваний (Imperia et al., 1989; Schmid et al., 2006; Hazin et al., 2009).

Наследственная или вызванная внешним воздействием дегенерация сетчатки начинается с гибели фоторецепторов, вслед за которой разрушается система трофической поддержки ткани, приводящая к гибели нейронов сетчатки (Marc et al., 2003). Хотя доминирующей формой гибели фоторецепторов сетчатки признается апоптоз (Xu, 1996; Marigo, 2007), тем не менее связь повреждения ДНК с гибелью постмитотических клеток, формирующих сетчатку, в настоящее время не исследована. Показано, что в

Антитела, использованные в работе

Антитела	Специфичность	Клон	Изотип	Конъюгат с	Разведение
antiP53 (Abcam, Англия)	Мышь	PAb240	IgG1		1 : 200
antiBrUdR			То же		То же
antiATM (Calbiochem, США)	Человек, мышь	Ab-1 (13-24)	IgG		1 : 100
antiCaspase3 active (GenWay, США)	Кролик, человек, мышь	Поликлональные (ПК)	То же		То же
PARP (Abcam, Англия)	Человек, мышь	A5A light κ	IgG1		1 : 200
anti-rabbit (Sigma, США)		ПК	IGG		Перокси- дазой
anti-mouse (Abcam, Англия)		То же	IgG	FITC	1 : 500
anti-rabbit (Abcam, Англия)		» »	То же	То же	То же

постмитотических клетках активной сохраняется репарация ДНК, ассоциированная с транскрипцией активных генов, одна из разновидностей эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) (Nouspikel, Hanawalt, 2002; Simonatto et al., 2007).

Целью нашей работы было исследование связи повреждения и репарации ДНК с дегенеративными изменениями в сетчатке после воздействия на мышей ионизирующей радиации (гамма-излучения и протонного излучения) и генотоксического агента метилнитрозомочевины (МНМ). Гамма-излучение вызывает главным образом одонитивные разрывы ДНК, равномерно распределенные по всему геному. Протоны же более эффективны в индукции двунитевых разрывов, локализующихся в области трека частицы (Moertel et al., 2004). Двунитевые разрывы являются летальным повреждением из-за их высокой эффективности в индукции апоптоза в делящихся клетках (Lips, Kaina, 2001). Метилирующий агент МНМ приводит к безразрывным дефектам, ДНК-метилированным основаниям, апуриновым и апиримидиновым (АП) сайтам (Begnec, 1990). Показано, что МНМ вызывает апоптоз фоторецепторов после однократного внутрибрюшинного введения животным в дозе 60 > мг/кг (Tsubura et al., 2010). В нашей работе МНМ используется как позитивный контроль на апоптоз в сетчатке. Таким образом, три используемых агента охватывают основные типы повреждений ДНК и механизмы их репарации.

Материал и методика

Животные. Исследования проводили на половозрелых мышах линии СВА×С57В1 (♀) в возрасте 2.5 мес. Животные, содержащиеся в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °С, отн. влажность воздуха 60 ± 10 % и 12-часовой световой период), имели свободный доступ к воде и коммерческому питанию.

Облучение. Мышей подвергали тотальному гамма-облучению (Co⁶⁰) в дозе 14 Гр на терапевтической установке Рокус-М (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна); мощность поглощенной дозы составляла 0.64 Гр/мин. Голову животных облучали протонами в дозе 14 или 25 Гр на фазотроне (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна). Энергия частиц в пучке 150 МэВ/нуклон, ЛПЭ 10 кэВ/мкм, мощность дозы 1 Гр/мин.

Введение МНМ. Кристаллическую МНМ (Sigma, США) хранили при –20 °С, растворяли в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) непосредствен-

но перед введением внутрибрюшинно мышам в дозе 35 или 70 мг/кг. Контрольным животным вводили равный объем PBS.

Приготовление образцов. Спустя различное время после воздействия животных умерщвляли в парах хлороформа и извлекали оба глаза. Тканевые срезы толщиной 5 мкм готовили из глаз, фиксированных в растворе Боуэна сразу после извлечения. Последующую спиртовую отмывку, обработку глаз и приготовление срезов проводили по стандартной процедуре, описанной нами ранее (Логина и др., 2008). Суспензию клеток готовили из извлеченной из глаз животного сетчатки путем мягкого механического диспергирования ткани в охлажденном PBS. Приготовленную суспензию сразу использовали в работе.

Морфологическое исследование. 5-микрометровые срезы сетчатки на предметном стекле окрашивали гематоксилин-эозином и микроскопировали в проходящем свете. Морфометрические измерения проводили с помощью окулярной линейки.

Вестерн-блот-анализ белков p53 и ATM. Суспензию клеток сетчатки в PBS центрифугировали, осадок ресуспендировали в 100–150 мкл лизирующего буфера, содержащего 0.093 М Трис-НСl, рН 6.8, 23.2 % глицерина, 2.3 % додецилсульфата натрия, 23 % β-меркаптоэтанола и коктейль ингибиторов протеаз в разведении 1 : 50 (Sigma, США). Лизаты выдерживали 5 мин на кипящей водяной бане, центрифугировали и замораживали при –20 °С. Для анализа р53 аликвоты лизатов, содержащие 80 мкг белка, подвергали электрофорезу в 12.5%-ном ПААГ при 100 В в течение 4.5 ч в камере для вертикального электрофореза. Блот-перенос осуществляли на блоттере (Helicon Semi-Dry Transfer) в буфере для переноса (25 мМ Трис, 250 мМ глицина и 20 % метанола) в течение 60 мин. Мембрану блокировали раствором 1%-ного БСА в PBS-t, затем инкубировали ночь в холодильнике с первичными антителами (разведение 1 : 2000) и после 3-кратной промывки в PBS-t инкубировали с конъюгатом вторичных антител с пероксидазой хрена в разведении 1 : 400. Зону белка детектировали с помощью системы ECL (Amersham Biosciences, США) и рентгеновской пленки Retina. Для анализа ATM электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ при 60 В в течение 10 ч. Последующие операции были такими же, как и для р53. Все используемые антитела перечислены в таблице.

Иммуноцитохимическое определение экспрессии белков. Клетки иммобилизовывали в низкотемпературной агарозе (0.7 % в PBS) в виде тонкого слайда на поверхности предметного стекла. Клетки фиксировали,

инкубируя слайды 20 мин в 3%-ном формальдегиде в PBS в холодильнике. Затем пермеабилizовывали в 0.2%-ном Triton X-100 в PBS (20 мин в холодильнике). Слайды, предназначенные для определения уровня FasR, процедуры пермеабилзации не подвергали. После каждой процедуры слайды трижды отмывали в PBS, последнюю отмывку от первичных антител проводили в PBS, содержащем 2 % эмбриональной сыворотки. На слайд наносили раствор первичных антител в PBS (30 мкл, 1—2 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. После инкубации стекло удаляли и слайд трижды отмывали холодным PBS. После удаления излишков влаги с поверхности слайда наносили 30 мкл PBS, содержащего вторичные антитела, меченные FITC (1 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте. После удаления покровного стекла слайды отмывали в PBS, дегидратировали в метаноле, высушивали, окрашивали йодистым пропицидом (1 мкг/мл) и микроскопировали в режиме флуоресценции с набором фильтров для FITC. Контролем служили слайды с иммобилизованными клетками, которые подвергали такой же обработке, но без первичных антител. FITC-флуоресцирующие клетки фотографировали, полученные изображения анализировали на компьютере с помощью программы ImageJ. Регистрировали флуоресценцию не менее 150 клеток в каждом слайде и определяли долю FITC-позитивных клеток. Показателем уровня экспрессии каждого белка служило произведение среднего значения флуоресценции одной клетки на долю FITC-позитивных клеток в каждом слайде.

Оценка повреждения ДНК методом ДНК-комет. Использовали описанные нами ранее (Тронов и др., 2011) два варианта метода — нейтральный для оценки поврежденности двуниевой ДНК (dsДНК-кометы) и щелочной для определения одонитевых разрывов ДНК (ssДНК-кометы). В первом случае 100 мкл суспензии, содержащей $0.5 \cdot 10^6$ — $1 \cdot 10^6$ клеток в PBS, смешивали с 200 мкл 1%-ного раствора легкоплавкой агарозы IV типа (Sigma, США). Смесь (30 мкл) наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом (18×18 мм). После застывания геля стекло удаляли и слайд погружали в лизирующий раствор, содержащий 2.5 М NaCl, 30 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % лаурилсаркозината и 0.03 мг/мл протеиназы К, pH 8.0. Спустя 12—16 ч лизиса при 37 °С слайды погружали в раствор, содержащий 2.5 М NaCl, 0.1 М EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 1 % DMSO, pH 10, и помещали на 1 ч или более в холодильник. Далее слайды помещали в горизонтальную камеру для электрофореза, заполненную TAE-буфером (pH 8.3), и выдерживали в течение 40 мин при 4 °С. Электрофорез проводили при 0.56 В/см в течение 40 мин. После электрофореза слайды погружали в охлажденный раствор 0.3 М NaOH и 1 мМ EDTA на 15 мин, трижды ополаскивали в 0.4 М Tris-HCl, pH 7.4, и 1 раз — в PBS. Слайды дегидратировали метанолом и высушивали на воздухе. После высыхания и окрашивания Sybr-Green слайды микроскопировали во флуоресцентном режиме. Для определения одонитевых разрывов слайды после инкубации в лизирующем буфере при pH 10 помещали в электрофоретическую камеру, заполненную охлажденным раствором 0.3 М NaOH и 1 мМ EDTA, pH 13. После инкубации в течение 40 мин при 4 °С проводили электрофорез при 0.75 В/см в течение 25 мин. После электрофореза слайды ополаскивали раствором 0.4 М Tris-HCl и проводили те же операции, что и для нейтральных комет. В процессе мик-

роскопии накапливали изображения комет в памяти компьютера и обрабатывали их по программе CASP (Konica et al., 2003). Показателем поврежденности ДНК служил параметр момент хвоста комет mt (Olive tail moment). По изменению этого показателя во времени после воздействия на животных судили о репарации ДНК в клетках сетчатки.

Статистика. Результаты в виде числовых множеств регистрируемых параметров индивидуальных клеток из контрольных и из обработанных агентами животных представляли в виде средних значений и сравнивали между собой как независимые распределения с использованием непараметрической статистики Колмогорова—Смирнова (программа Statistica).

Результаты

Ответ сетчатки мышей на облучение. Гамма-облучение или облучение протонами в дозе 14 Гр не вызывает дегенерации сетчатки в течение 7 сут, что прослеживается на микроскопических срезах сетчатки (рис. 1, *a—d*) и подтверждается результатами морфометрии (рис. 1, *a'—d'*). Небольшое понижение толщины ядерного слоя фоторецепторов через 7 сут после облучения протонами не сопровождалось морфологическими изменениями ядер и сегментов фоторецепторов (рис. 1, *d*).

Облучение вызывало увеличение экспрессии сенсоров одно- и двухнитевых разрывов ДНК — белков p53 и ATM (рис. 2, *a, б*). Для обоих видов излучения наблюдалась нормализация экспрессии через 12—14 ч после воздействия. Возникающие в ответ на облучение одно- и двунитевые разрывы в ДНК эффективно удаляются в течение 10—12 ч после воздействия гамма-излучения и протонов, что коррелирует с динамикой экспрессии белков p53 и ATM (рис. 3).

Локальное облучение протонами позволило увеличить дозу облучения до 25 Гр, после которой мыши сохраняли жизнеспособность в течение 6 сут. В результате удалось наблюдать нарастающую во времени дегенерацию фоторецепторов сетчатки в виде разупорядочивания и деструкции сегментов и снижения плотности упаковки ядерного слоя и его толщины (рис. 4, *б, в*). Эти изменения достоверны ($P < 0.01$) спустя 6 сут после облучения (рис. 4, *в*) и отражают нарастающую во времени гибель фоторецепторов в сетчатке мышей после облучения протонами в дозе 25 Гр. Через 24 ч после облучения наблюдается повышенная экспрессия FasR и каспазы 3. К этому времени экспрессия p53 также сохраняется повышенной (рис. 5). Этот результат говорит в пользу апоптоза как механизма гибели фоторецепторов в ответ на облучение протонами в дозе 25 Гр.

Ответ сетчатки на введение МНМ. Однократное введение мышам МНМ (70 мг/кг) вызывает деструктивные изменения в сетчатке, затрагивающие главным образом слой фоторецепторных клеток (рис. 6, *а*). Дегенерация сегментов, снижение толщины ядерного слоя фоторецепторов (рис. 6, *б*), наличие фрагментированных ядер фоторецепторов (рис. 6, *в*), увеличенная экспрессия белков, связанных с апоптозом, — p53, PARP, FasR и каспазы 3 (рис. 6, *г*) указывают на прогрессирующую гибель фоторецепторов по механизму апоптоза. У многих животных отмечается слепота на 6-е сут.

Цитотоксический эффект МНМ имеет резкую концентрационную зависимость: инъекция мышам МНМ в

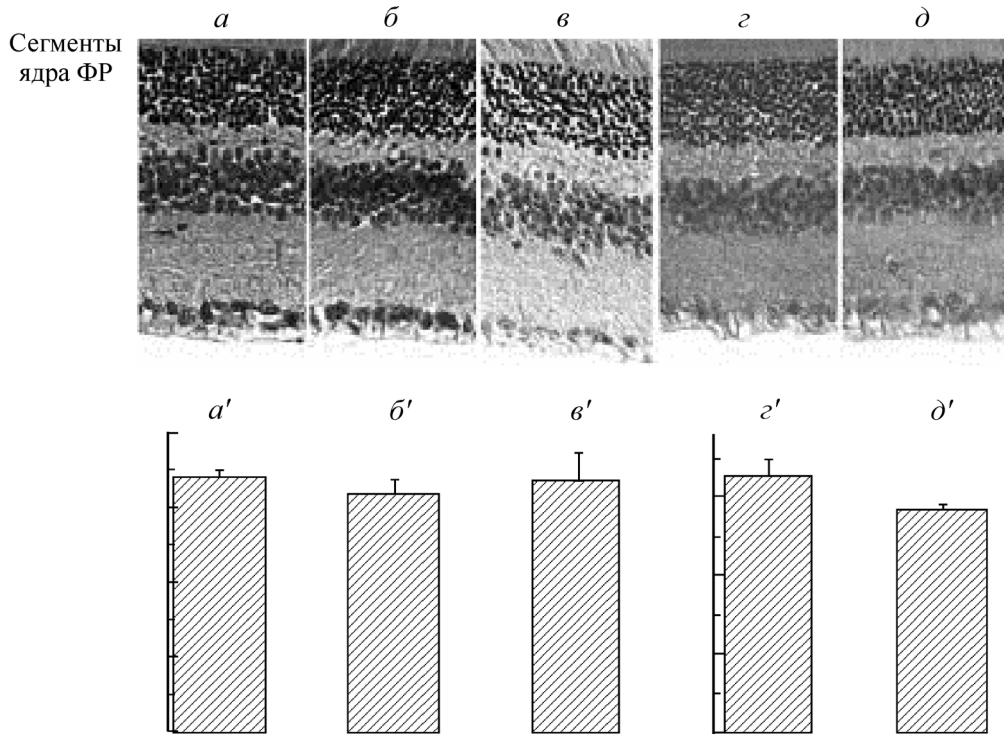


Рис. 1. Микрофотографии сетчатки мышей ($a-d$), облученных гамма-лучами и протонами (14 Гр), и соответствующая толщина ядерного слоя фоторецепторов ($a'-d'$) через 24 и 168 ч после воздействия.

a, a' — контроль; $б, б'$ — 24 ч после гамма-облучения; $в, в'$ — 168 ч после гамма-облучения; $г, г'$ — 24 ч после облучения протонами; $д, д'$ — 168 ч после облучения протонами.

дозе 35 мг/кг не вызывает изменений в фоторецепторном слое сетчатки (рис. 6, a) и не сопровождается увеличением экспрессии проапоптотических белков FasR и каспазы 3.

Таким образом, особенностью ответа сетчатки на генотоксический стресс, вызванный облучением и метилирующим агентом, является нелинейность зависимости цитотоксического ответа от дозы. Иными словами, для этих видов воздействия в сетчатке обнаруживается высокий генотоксический порог. В случае пролиферирующих клеток генотоксический порог связывают с активной систе-

мой репарации ДНК. Поэтому мы оценили уровень спонтанной поврежденности и полноту репарации ДНК в сетчатке.

Спонтанная поврежденность и репарация ДНК в сетчатке. Для оценки поврежденности ДНК в сетчатке использовали вариант В метода ДНК-комет, в котором протеиназа К в лизирующем растворе обеспечивала полную диссоциацию хроматина и высвобождение ДНК (см.: Тронов и др., 2008). Микрофотографии типичных ДНК-комет из сетчатки и лимфоцитов интактных мышей представлены на рис. 7. Как видно, по-

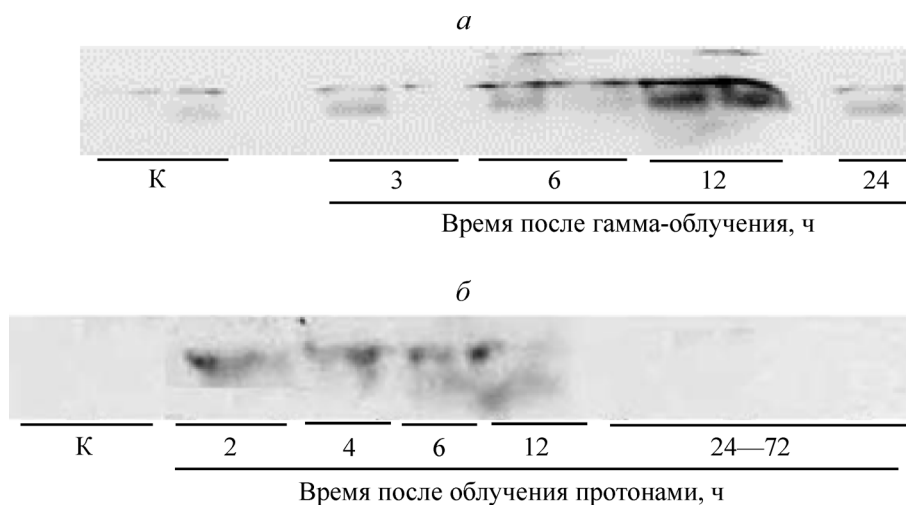


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ экспрессии белков p53 (a) и ATM ($б$) в сетчатке мышей, подвергнутых гамма-облучению (a) и облучению протонами ($б$) в дозе 14 Гр, спустя разное время после облучения.

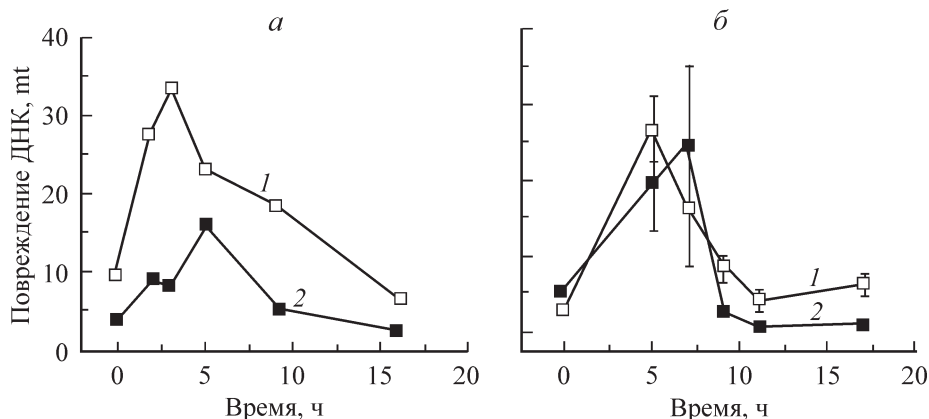


Рис. 3. Динамика репарации однонитевых (1) и двунитевых (2) разрывов ДНК в сетчатке мышей *in vivo* после их облучения гамма-лучами (а) и протонами (б) в дозе 14 Гр.

врежденность ДНК в сетчатке значительно выше, чем в лимфоцитах. Это подтверждается и более высоким значением параметра *nt* для ssДНК-комет из клеток сетчатки.

В связи с наличием спонтанных повреждений в ДНК сетчатки мышей мы исследовали репарацию после облучения протонами и после инъекции МНМ. Поскольку МНМ не вызывает разрывов ДНК, мы использовали В-вариант метода ДНК-комет. Рис. 8 представляет динамику восстановления структуры ДНК в сетчатке *in vivo* после облучения мышей протонами в дозе 25 Гр (а) и после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг (б). Как видно, все индуцированные облучением и МНМ повреждения ДНК в сетчатке удаляются, но предсуществующие спорадические повреждения не затрагиваются механизмом репарации. Для сравнения приведена кривая репарации после облучения протонами, полученная в том же опыте без добавления в лизирующий коктейль протеиназы К. В этом случае отмечаются полное восстановление ДНК, но и отсутствие спонтанной поврежденности ДНК в сетчатке.

Обсуждение

Полученные нами результаты подтверждают тезис о высокой радиостойкости зрелой сетчатки мышей. Наблюдается полная репарация ДНК после действия гамма-излучения или излучения протонов в дозе 14 Гр. Увеличенная экспрессия белков p53 и АТМ нормализуется спустя 12 ч после облучения. К этому времени завершается репарация индуцированных излучениями разрывов в ДНК (рис. 1—3).

Заметные морфологические изменения в фоторецепторном слое сетчатки отмечаются после облучения в дозе 25 Гр. Эти изменения выражаются в деградации наружных сегментов фоторецепторов, а также в снижении плотности и толщины ядерного слоя фоторецепторов (рис. 4). Деградация нарастает во времени и связана с гибелью фоторецепторов, протекающей по механизму апоптоза. На апоптоз указывает возросшая экспрессия проапоптотических белков p53, FasR и активной каспазы 3 (рис. 5). Высокая радиостойкость сетчатки и активный механизм пострадиационной репарации, удаляющий разрывы ДНК, индуцированные излучениями, указывают на существование генотоксического порога, который обуславливает нелинейный характер зависимости эффекта от дозы (Johnson et al., 2009). На пролиферирующих клетках геното-

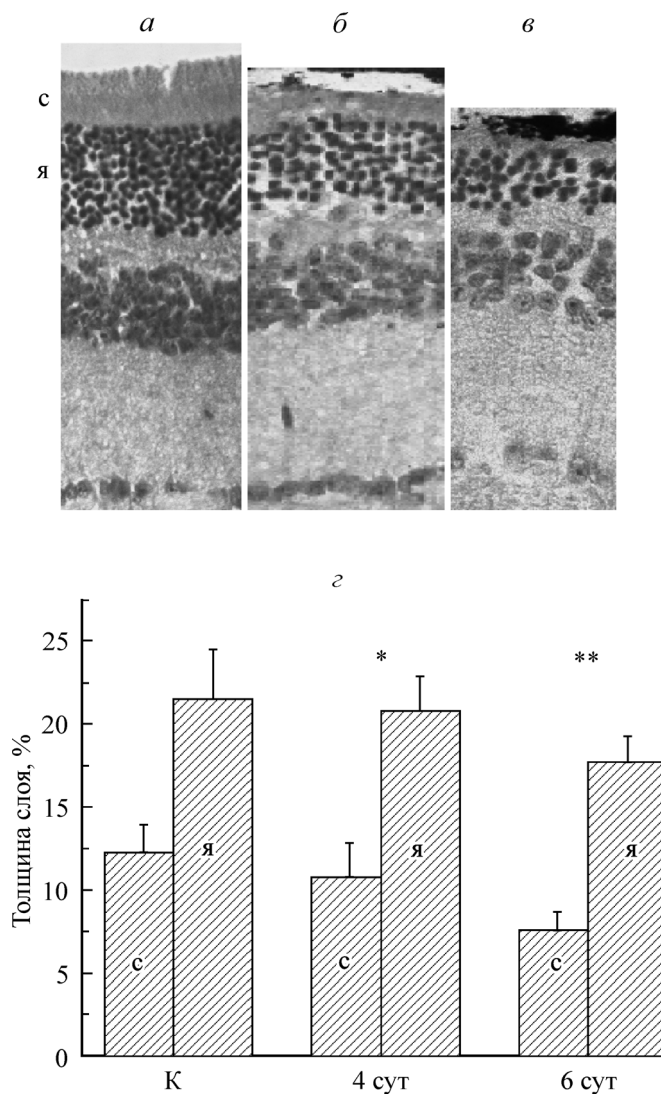


Рис. 4. Морфологические изменения в сетчатке мышей, подвернутых локальному облучению протонами в дозе 25 Гр.

а — контроль, б — 4 сут после облучения, в — 6 сут после облучения, z — толщина сегментов (С) и ядерного (Я) слоя фоторецепторов (% от суммарной толщины всех слоев сетчатки). Представлены средние значения и их стандартные отклонения. Различия с контролем (К): * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$.

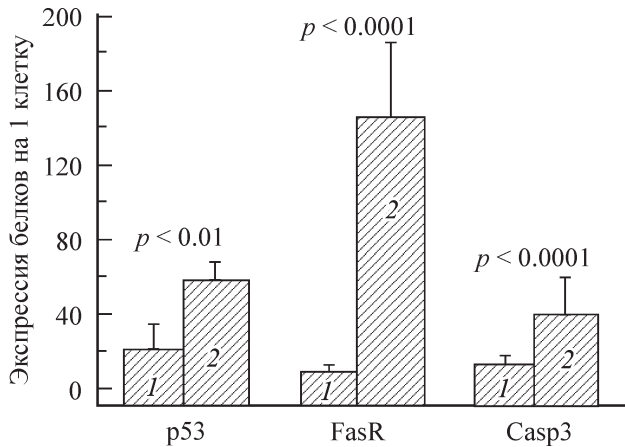


Рис. 5. Иммуноцитохимический анализ экспрессии проапоптотических белков в клетках сетчатки intactных мышей (1) и мышей через 24 ч после облучения протонами в дозе 25 Гр (2).

кисический порог наблюдался при действии алкилирующих агентов (Jenkins et al., 2005). Он выражался в нелинейной зависимости эффекта от дозы и прямо связан с активной системой репарации ДНК. МНМ, относящаяся к этому же классу соединений, оказывает цитотоксическое действие на сетчатку, которое выражается в апоптотической гибели фоторецепторов (рис. 6). Нелинейный характер дозовой зависимости цитотоксического эффекта МНМ на сетчатке (рис. 6, а) также указывает на наличие генотоксического порога. Исследование связи его с генотоксическим действием МНМ обнаружило две ранее не описанные особенности сетчатки. Во-первых, это высокая спонтанная поврежденность ДНК в сетчатке мышей (рис. 7). Как видно на рис. 7, параметр *mt* в сетчатке на порядок выше такового в лимфоцитах. По этому показателю органы мыши располагаются в следующем порядке возрастания поврежденности ДНК: лимфоциты < печень < мозг < сетчатка, который совпадает со степенью оксигенации тканей. Средний момент хвоста ssДНК-комет intactной сетчатки ($mt = 32 \pm 2$) соответствует дозе облучения протонами 15–20 Гр. Такая доза облучения неизбежно индуцирует заметное повреждение и dsДНК в сетчатке (рис. 3, б). Однако в нейтральных условиях dsДНК intactной сетчатки не обнаруживает разрывов, хотя форма комет, напоминающая одуванчики (рис. 7), указывает на декомпактизацию хроматина в клетке и на ослабление его связи с ядерным матриксом. Все это говорит о том, что спонтанные повреждения ДНК в сетчатке не являются разрывами, но трансформируются в таковые в щелочных условиях ($pH > 13$), т. е. являются оксимодифицированными основаниями ДНК.

Вторая обнаруженная нами особенность сетчатки — активная репарация, удаляющая большую часть повреждений ДНК, индуцированных облучением или МНМ, но не затрагивающая предсуществующих спонтанных повреждений ДНК (рис. 8). Наличие спонтанных повреждений в виде односторонних разрывов ДНК в различных органах мышей отмечалось в ряде работ (Valverde et al., 2000, 2001). Степень поврежденности ДНК нарастала в органах в том же порядке, что и у нас: лейкоциты < печень < мозг

(Wang et al., 2010). Апоптоз в ответ на повреждение ДНК в пролиферирующих клетках признается радикальным способом для предотвращения формирования генетически нестабиль-

ного потомства клеток. В случае дифференцированных клеток неясно, способны ли они подвергаться апоптозу в ответ на генотоксический стресс (Walsh, Perlman, 1997). Известно, что в постмитотических клетках подавлены отдельные механизмы репарации. Так, терминально дифференцированные клетки не способны осуществлять репарацию по механизму гомологичной рекомбинации (HRR), ассоциированной с репликацией. Кроме того, в этих клетках регуляторно подавлена глобальная репарация генома, одна из разновидностей механизма NER (Simonatto et al., 2007). Вместе с тем терминально дифференцированные клетки транскрипционно активны и нуждаются в поддержании целостности транскрибируемой части гено-

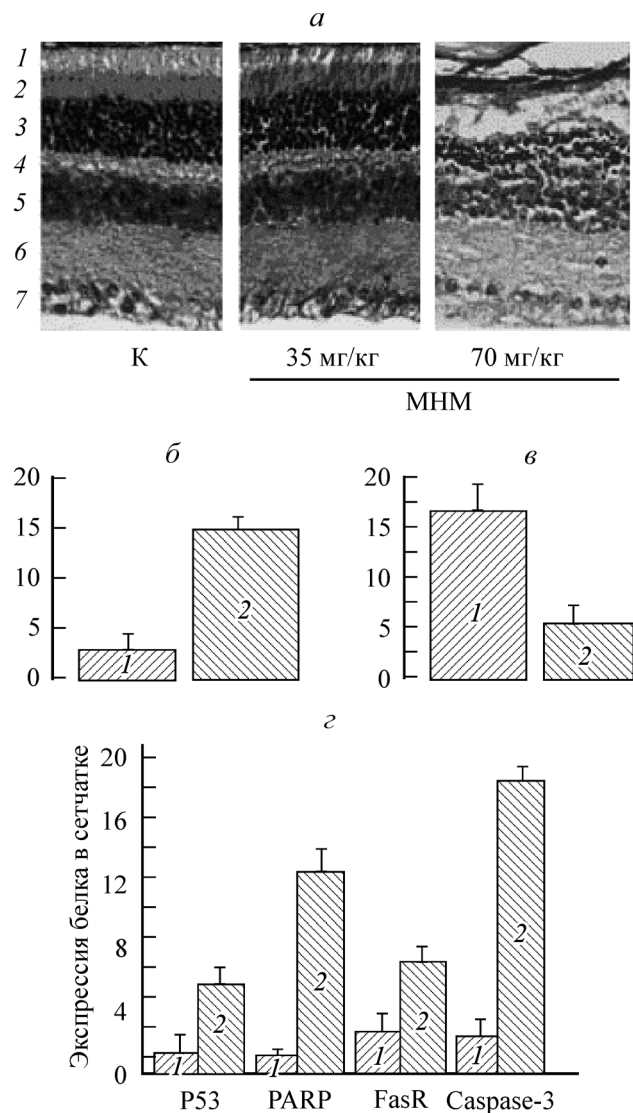


Рис. 6. Цитотоксическое действие на сетчатку однократной инъекции мышам метилнитрозомочевины (МНМ, 35 и 70 мг/кг).

а — гистологический препарат intactной сетчатки (К) и сетчатки через 6 сут после инъекции МНМ: 1 — пигментный эпителий, 2 — сегменты фоторецепторов, 3 — наружный ядерный слой, 4 — наружный плексиформ, 5 — внутренний ядерный слой, 6 — внутренний плексиформ, 7 — слой ганглиозных клеток; б — доля (%) фрагментированных ядер фоторецепторов в intactной сетчатке (1) и через 6 сут после инъекции МНМ (2); в — средняя толщина ядерного слоя фоторецепторов intactной сетчатки (1) и сетчатки через 6 сут после введения МНМ (2); г — иммуноцитохимическое определение экспрессии проапоптотических белков спустя 24 ч после инъекции МНМ (1 — контроль, 2 — МНМ).

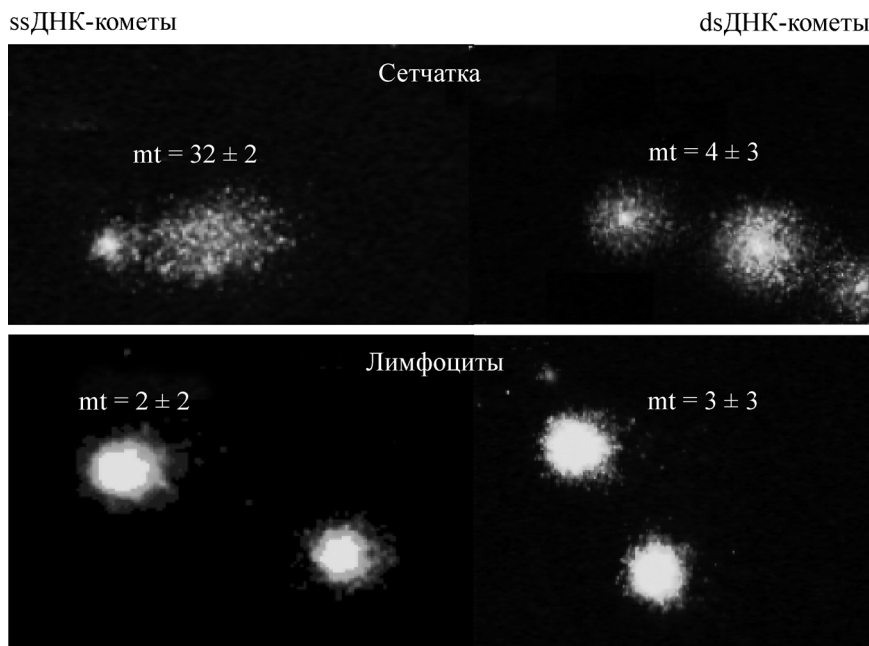


Рис. 7. ДНК-кометы, формируемые из интактных клеток сетчатки и лимфоцитов мышей в щелочных (ssДНК) и нейтральных (dsДНК) условиях.

Параметр mt характеризует степень поврежденности ДНК.

ма на протяжении жизни клетки. Эту функцию выполняет механизм репарации, ассоциированный с транскрипцией (Noussipiel, 2007). Принимая эти факты, можно считать большую часть глобального генома терминально дифференцированных клеток (в том числе и клеток сетчатки) не критичной для выполнения их специфических функций. Поэтому репарацией ДНК в этой части генома клетка может до какой-то степени пренебречь. В результате в ней могут накапливаться спонтанные повреждения без очевидных цитотоксических последствий. Спонтанная поврежденность ядерной ДНК в сетчатке отражает толерантность клеток к генотоксическому стрессу.

Таким образом, представленные результаты подтверждают наличие генотоксического порога для облучений и метилирующего агента у дифференцированных клеток сетчатки. Результаты также показывают, что одной из причин толерантности постмитотических клеток сетчатки к повреждениям ДНК является репарация, как и у деля-

щихся клеток. Вторая причина их толерантности — уменьшение физического размера радиочувствительной мишени до размеров транскрибируемого локуса генома. Мы предполагаем, что решающая роль в трансформации изначально перmissive повреждений ДНК (разрывов после облучения и появления модифицированных оснований и АП-сайтов после действия МНМ) в цитотоксические принадлежит локализованным в транскрибируемых сайтах молекулам топоизомеразы 2 (topo 2).

Известно, что регуляция генной экспрессии осуществляется путем структурной перестройки (ремоделирования) хроматина и формированием петель (Kauzaridis et al., 2005; Kadauke, Blobel, 2009). Важная роль в этом принадлежит topo 2, входящей в состав комплекса, осуществляющего ремоделирование (Varga-Weisz et al., 1997; Kuniaki et al., 2008). Топо 2 локализована в транскрибируемой области, где изменяет топологию ДНК, делая в ДНК временный двойной разрыв и лигируя его в последующем

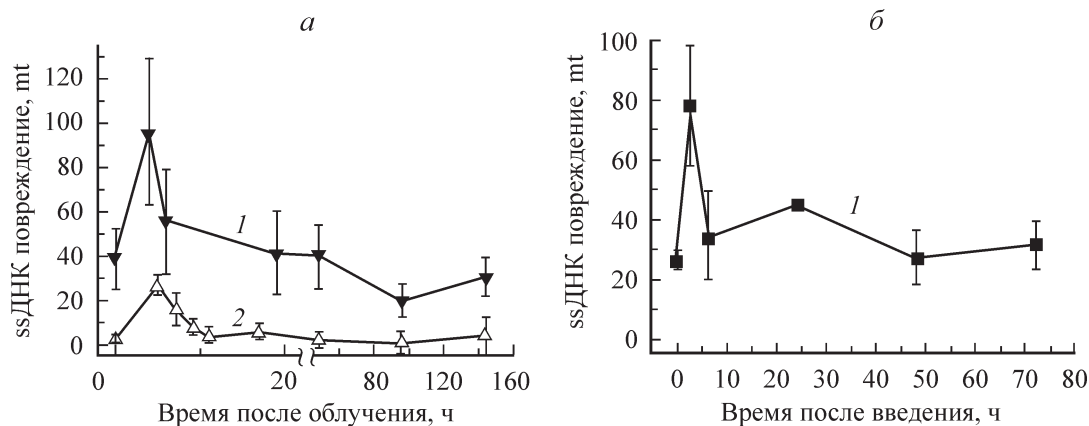


Рис. 8. Динамика репарации ssДНК в сетчатке мышей *in vivo*.

a — облучение протонами в дозе 25 Гр; *б* — репарация после инъекции мышам МНМ в дозе 70 мг/кг (1 — лизис с добавлением протеиназы К, 2 — лизис без протеиназы).

благодаря своим эндонуклеазной и лигазной функциям (Champoux, 2001). Активацию эндонуклеазной активности торо 2 могут осуществлять как индуцированные внешним воздействием (Sabourin et al., 2000), так и спонтанно возникающие повреждения ДНК (Liu, Gerson, 2004). В результате в транскрибируемых локусах формируются нерепарируемые двунитевые разрывы, приводящие к образованию высокомолекулярных фрагментов (0.5—300 млн пар оснований) dsДНК (Taverna et al., 2001), являющихся ранним маркером апоптотической деградации генома (Тронов и др., 1999). Показано, что для инициации этих процессов необходимо попадание повреждения в область, перекрываемую эндонуклеазной активностью торо 2 (Fishel et al., 2007). В противном случае повреждение может быть репарировано до возникновения цитотоксического действия. Этот механизм объясняет как наличие генотоксического порога и вклад репарации в его формирование, так и в конечном счете процесс трансформации повреждения ДНК в цитотоксический эффект в постмитотических клетках сетчатки.

Список литературы

- Логонова М. Ю., Тронов В. А., Белецкая Т. А., Фельдман Т. Б., Панова И. Г., Островский М. А. 2008. Радиорезистентность сетчатки: под действием гамма-излучения в сетчатке мышей формируются разрывы ДНК, увеличивается уровень белка p53, сопровождается репарацией и отсутствием апоптоза. Радиационная биология. Радиоэкология. 48 (6) : 698—704.
- Тронов В. А., Артамонов Д. Н., Абрамов М. Е., Горбачева Л. Б. 2011. Эффективность репарации ДНК лимфоцитов, их гибель, а также экспрессия белков MLH1, MSH2, FasR как факторы прогноза клинического ответа на химиотерапию больных диссеминированной меланомой. Цитология 53 (1) : 10—16.
- Тронов В. А., Конопляников М. А., Никольская Т. А., Константинов Е. М. 1999. Апоптоз нестимулированных лимфоцитов и разрывы ДНК, вызванные ингибитором топоизомеразы 2 этопозидом (VP16). Биохимия. 64 (5) : 412—420.
- Тронов В. А., Логонова М. Ю., Крамаренко И. И. 2008. Метилнитрозомочевина challenge-мутagen в оценке активности коррекционной репарации ДНК (MMR): связь с некоторыми видами рака. Генетика. 44 (5) : 686—692.
- Amoaku W. M., Frew L., Mahon G. J., Gardiner T. A., Archer D. B. Early ultrastructural changes after low-dose X-irradiation in the retina of the rat. Eye (Lond.). 3 : 638—646.
- Amoaku W. M., Mahon G. J., Gardiner T. A., Frew L., Archer D. B. 1992. Late ultrastructural changes in the retina of the rat following low-dose X-irradiation. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 230 : 569—574.
- Beranek D. T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutat. Res. 231 : 11—30.
- Borges H. L., Chao C., Xu Y., Linden R., Wang J. Y. J. 2004. Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53. Cell Death Diff. 11 : 494—502.
- Champoux J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu. Rev. Biochem. 70 : 369—413.
- Fishel M. L., He Y., Smith M. L., Kelley M. R. 2007. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. Clin. Cancer Res. 13 : 260—267.
- Gan H. K., Bernstein L. J., Brown J., Ringash J., Vakilha M., Wang L., Goldstein D., Kim J., Hope A., O'Sullivan B., Waldron J., Razak A. R., Chen E. X., Siu L. L. 2011. Cognitive functioning after radiotherapy or chemoradiotherapy for head-and-neck cancer. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 81 : 126—134.
- Gorgels T. G., van der Pluijm I., Brandt R. M., Garinis G. A., van Steeg H., van den Aardweg G., Jansen G. H., Ruijter J. M., Bergen A. A., van Norren D., Hoeijmakers J. H., van der Horst G. T. 2007. Retinal degeneration and ionizing radiation hypersensitivity in a mouse model for cockayne syndrome. Mol. Cell. Biol. 27 : 1433—1441.
- Hazin R., Abuzetun J. Y., Daoud Y. J., Abu-Khalaf M. M. 2009. Ocular complications of cancer therapy: a primer for the ophthalmologist treating cancer patients. Curr. Opin. Ophthalmol. 20 : 308—317.
- Imperia P. S., Lazarus H. M., Lass J. H. 1989. Ocular complications of systemic cancer chemotherapy. Surv. Ophthalmol. 34 : 209—230.
- Jenkins G. J. S., Doak S. H., Johnson G. E., Quick E., Walters E. M., Parry J. M. 2005. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? Mutagenesis. 20 : 389—398.
- Johnson G. E., Doak S. H., Griffiths S. M., Quick E. L., Skibinski D. O., Zair Z. M., Jenkins G. J. 2009. Non-linear dose-response of DNA-reactive genotoxins: recommendations for data analysis. Mutat. Res. 678 : 95—100.
- Kadauke S., Blobel G. A. 2009. Chromatin loops in gene regulation. Biochim. biophys. acta. 1789 : 17—25.
- Kauzaris T. 2005. Chromatin modifications and their functions. Cell. 128 : 693—705.
- Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A. 2003. Across-platform public domain PC image-analysis program for comet assay. Mutat. Res. 534 : 15—20.
- Kuniaki Sano K., Miyaji-Yamaguchi M., Tsutsui K. M., Tsutsui K. 2008. Topoisomerase II β activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. PLoS ONE. 3 (e4103) : 1—17.
- Kwon Ho Hong, Sung Dong Chang. 2009. A Case of radiation retinopathy of left eye after radiation therapy of right brain metastasis. Korean J. Ophthalmol. 23 : 114—117.
- Lips J., Kaina B. 2001. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. Carcinogenesis. 22 : 579—585.
- Liu L., Gerson S. L. 2004. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. Curr. Opin. Investig. Drugs. 5 : 623—627.
- Lumbroso-Le Rouic L., Delacroix S., Dendale R., Levy-Gabriel V., Feuvret L., Noel G., Plancher V., Nauraye V., Garcia P., Calugaru V., Asselain B., Desjardins L. 2006. Proton beam therapy for iris melanomas. Eye. 20 : 1300—1305.
- Marc R. E., Jones B. W., Watt V. B., Strettoi E. 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. Prog. Retin. Eye Res. 22 : 607—655.
- Marigo V. 2007. Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. Cell Cycle. 6 : 652—655.
- Moertel H., Georgi J. C., Distel I., Eyrich W., Grobenbauer G. 2004. Effects of low energy protons on clonogenic survival, DSB repair and cell cycle in human glioblastoma cells and B14 fibroblasts. Radiother. Oncol. 73 (Suppl. 2) : 115—118.
- Nouspikel T. 2007. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. Neuroscience. 145 : 213—221.
- Nouspikel T., Hanawalt P. V. 2002. DNA repair in terminally differentiated cells. DNA Repair (Amst.). 1 : 59—75.
- Sabourin M., Osheroff N. 2000. Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. Nucl. Acids Res. 28 : 1947—1954.
- Schmid K. E., Kornek G. V., Scheithauer W., Binder S. 2006. Update on ocular complications of systemic cancer chemotherapy. Surv. Ophthalmol. 51 : 19—40.
- Seigers R., Fardell J. E. 2010. Neurobiological basis of chemotherapy-induced cognitive impairment: a review of rodent research. Neurosci. Biobehav. Rev. 35 : 729—741.
- Simonatto M., Latella L., Puri P. L. 2007. DNA damage and cellular differentiation: more questions than responses J. Cell. Physiol. 213 : 642—648.
- Stitt A. W., Anderson H. R., Gardiner T. A., McIntyre I., Archer D. B. 1994. The combined effects of diabetes and ionising radiation on the rat retina: an ultrastructural study. Curr. Eye Res. 13 : 79—86.

Takeda A., Shigematsu N., Suzuki S., Fujii M., Kawata T., Kawaguchi O., Uno T., Takano H., Kubo A., Ito H. 1999. Late retinal complications of radiation therapy for nasal and paranasal malignancies: relationship between irradiated-dose area and severity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 44 : 599—605.

Taverna P., Liu L., Hwang H., Hanson A. J., Kinsella J., Gerson S. L. 2001. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. *Mutat. Res.* 485 : 269—281.

Tsubura A., Yoshizawa K., Kuwata M., Uehara N. 2010. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol. Histopathol.* 25 : 933—944.

Valarde M., Fortoul T. I., Diaz-Barriga F., Mejia J., del Castillo E. R. 2000. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mouse. *Mutagenesis.* 15 : 109—114.

Valarde M., Trejo V., Rojas E. 2001. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis.* 18 : 265—270.

Varga-Weisz P. D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P. B. 1997. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 388 : 598—602.

Walsh K. 1997. Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Prog. Cell Cycle Res.* 3 : 53—58.

Walsh K., Perlman H. 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 7 : 560—567.

Wang A., Lukas T. J., Yuan M., Neufeld A. H. 2010. Age-related increase in mitochondrial DNA damage and loss of DNA repair capacity in the neural retina. *Neurobiol. Aging.* 31 : 2002—2010.

Wuestemeyer H., Sauerwein W., Meller D., Chauvel P., Schueler A., Steuhl K. P., Bornfeld N., Anastassiou G. 2006. Proton radiotherapy as an alternative to exenteration in the management of ex- tended conjunctival melanoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 244 : 438—446.

Xu G. Z. 1996. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans. Amer. Ophthalmol. Soc.* 94 : 411—430.

Поступила 3 X 2011

MECHANISMS OF RADIORESISTANCE IN TERMINALLY DIFFERENTIATED CELLS OF MATURE RETINA

V. A. Tronov,^{1,2,*} Yu. V. Vinogradova,² M. Yu. Loginova,³ V. A. Paplinskaya,⁴ M. A. Ostrovsky²

¹ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow,

² Joint Institutes of Nuclear Problems, Dubna, ³ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS and ⁴ N. K. Koltsov Institute of Biology of Development RAS, Moscow;

e-mail: vtronov@yandex.ru

Retinopathy of animals is induced by many agents damaging DNA. This fact shows that DNA lesions may initiate retinal degeneration. The aim of our work was to study the effects of gamma and proton irradiation, and methylnitrosourea (MNU) on mice retina. We evaluated morphological changes, DNA damage and repair in retina, and expression of 5 proteins participating in apoptosis: p53, ATM, FasR, PARP and caspase 3 active. Dose of 14 Gy is equitoxic in terms of induction of DNA single strand breaks by both gamma and proton irradiation. But protons were 2 fold more effective than gamma-rays in induction of DNA double strand breaks. All breaks were repaired within ≤ 10 h. Irradiation resulted in increased expression of p53 and ATM. But no signs of cell death and retinal degeneration were observed during 7 days after irradiation. Proton irradiation in dose of 25 Gy resulted in increasing over time destructive changes localized mainly in photoreceptor layer of retina. These changes were followed by increased expression of proapoptotic proteins. A single systemic administration of MNU (70 mg/kg) increased intracellular levels of p53, PARP, FasR, caspase 3 active, which was followed by destructive changes in retina with signs of apoptosis of photoreceptors. As in the case of irradiation, the 2-fold dose reduction of MNU abrogated cytotoxic effect of MNU on retina. High level of spontaneous DNA damage such as apurine and apyrimidine sites were observed in mouse retina. The results of our study demonstrate the occurrence of genotoxic threshold in the initiation of retinal cell death *in vivo*. Topoisomerase 2 of retina is suggested to translate primary DNA damage to cytotoxic effect.

Key words: retina, postmitotic cells, ionizing radiation, methylnitrosourea, DNA damage, genotoxic threshold, topoisomerase 2.