

**РАДИАЦИОННОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА
У МЫШЕЙ *IN VIVO* ПОВЫШАЕТ ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ
К ПОСЛЕДУЮЩЕМУ ГЕНОТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ
И СТИМУЛИРУЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ**

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

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

² *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна,*

³ *Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН*

и ⁴ *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва;*

* *электронный адрес: vtronov@yandex.ru*

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что невысокий уровень стресса (прекондиционирование) оказывает защитное действие на сетчатку глаза. Наши предыдущие исследования обнаружили нелинейную зависимость цитотоксического действия на сетчатку мышей от дозы ионизирующей радиации и метилнитрозомочевины (МНМ); нецитотоксическая доза МНМ увеличивала толерантность к последующему ударному воздействию агента (Тронов и др., 2012). Этот результат указывает на существование в сетчатке механизма восстановления. В настоящей работе на модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки мышей мы исследовали адаптивный ответ сетчатки *in vivo* на облучение протонами и участие в нем глиальных клеток Мюллера. Показали, что восстановление сетчатки после действия генотоксических агентов, индуцирующих ее дегенерацию, коррелирует с повышением эффективности репарации поврежденных ДНК и снижением гибели фоторецепторов в сетчатке.

Ключевые слова: сетчатка, ионизирующая радиация, метилнитрозомочевина, повреждения ДНК, репарация, радиационный гормезис.

Принятые сокращения: МНМ — метилнитрозомочевина, ЭРГ — электроретинограмма, BrdU — bromodeoxyuridine.

ДНК в сетчатке у мышей содержит большое количество спонтанно возникающих нерепарируемых дефектов, которые представляются, скорее, оксимодификациями оснований и АП-сайтами (Nakamura, Swenberg, 1999; Тронов и др., 2012). Эти дефекты являются следствием высокой оксигенации сетчатки и высокой метаболической активности фоторецепторных клеток. Такой вывод согласуется с данными других исследований, показавшими высокую ранимость фоторецепторов по сравнению с другими клетками сетчатки (Beatty et al., 2000; Shichi, 2004; Mao et al., 2009). При высокой концентрации митохондрий и интенсивном кровоснабжении фоторецепторные клетки имеют крайне небольшой энергетический резерв, и сравнительно низкий стресс может значительно увеличить вероятность их гибели. По меткому определению, фоторецепторные клетки в сетчатке «живут на лезвии ножа» (Cao et al., 2001). Этот тезис подтверждают результаты работ по влиянию степени оксигенации (гипо-, нормо- и гипероксии сетчатки) на гибель фоторецепторных клеток у крыс (Maslim et al., 1997; Wellard et al., 2005). Вместе с тем предварительное и сравнительно небольшое по силе, потенциально опасное воздействие может повысить порог повреждения, т. е. понизить вероятность гибели фоторецепторов до степени, значимой для

клинического использования. Таким защитным эффектом может обладать незначительной степени стресс химической или физической природы. Благоприятный эффект таких воздействий, вызывающих повреждения биологических структур, называется гормезисом. Гормезис определяется как адаптивный ответ, достигаемый в результате компенсаторных биологических процессов, сопровождающих начальное нарушение гомеостаза (Calabrese, Baldwin, 2002). Так, например, было показано, что крысы, предварительно подвергнутые световому воздействию (светоадаптированные крысы), оказались устойчивее к фотоповреждению — дегенерации сетчатки, чем те, которых содержали в темноте до повреждающего светового воздействия (Noell, Albrecht, 1971; Li et al., 2001; Kaldi et al., 2003).

Помимо света наблюдалось также благотворное действие таких генотоксических факторов, как ионизирующая радиация (Liu et al., 2007; Otani et al., 2012) и химические мутагены (Mattson, Cheng, 2006). Наши исследования по влиянию облучения и мутагена метилнитрозомочевины (МНМ) на сетчатку у мышей обнаружили нелинейность цитотоксического действия агента от дозы агента и наличие генотоксического порога (Тронов и др., 2012). Это может указывать на существование в клетках сетчатки механизмов восстановления от генотоксических по-

вреждений. Мы показали также, что нетоксическая доза МНМ вызывала увеличение толерантности сетчатки к повторному воздействию МНМ в сравнительно большой дозе, т. е. адаптивный ответ сетчатки на химическое воздействие (Виноградова и др., 2014).

В настоящей работе мы исследовали адаптивный ответ сетчатки на облучение протонами (радиационный гормезис), участие глиальных клеток Мюллера в этом ответе на действие МНМ, а также попытались ответить на вопрос о том, связано ли восстановление сетчатки после действия генотоксических агентов с повышением способности к репарации повреждений ДНК и снижением гибели фоторецепторов в сетчатке.

Материал и методика

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

Облучение. Мышей подвергали тотальному гамма-облучению (^{60}Co) в дозе 14 Гр на терапевтической установке Рокус-М (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна); мощность поглощенной дозы составляла 0.64 Гр/мин. Голову животных облучали 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) непосредственно перед внутрибрюшинным введением мышам в дозах 17, 35 и 70 мг/кг. Контрольным животным вводили равный объем PBS, не превышающий 1 мл.

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 (Логонова и др., 2008). 5-микрометровые срезы сетчатки на предметном стекле окрашивали гематоксилин-эозином и микроскопировали в проходящем свете.

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

Визуализация клеток Мюллера. Для того чтобы пометить в сетчатке *in vivo* мюллеровские клетки, использовали пролиферативный маркер бромдезоксисуридин BrdU (Sigma, США). Процедуру проводили дважды в день в течение 48 ч (утром и вечером), ввода животным внутрибрюшинно стерильный раствор маркера 50 мг/кг, растворенного в PBS, в объеме <0.7 мл (табл. 1). После извлечения из глаз сетчатки и приготовления микросрезов клетки, аккумуляировавшие маркер, выявляли с помощью анти-BrdU-антител, сконъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Millipore, США). Клетки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Wohl et al., 2011).

Подсчитывали либо число фокусов на единицу площади среза, либо интенсивность флуоресценции на единицу площади среза с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, США; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

TUNEL - детекция гибели клеток. Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали методику TUNEL (Trevigen, США), следуя инструкции к стандартному набору TUNEL (http://www.trevigen.com/item/3/13/118/508/TACS_2_TdF_Fluorescein_Kit/). Визуализацию микроскопических изображений на срезах проводили на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для регистрации флуоресценции FITC.

Иммуноцитохимическое определение экспрессии каспазы. 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 при 4 °С. Затем клетки пермеабелизовывали в 0.2%-ном Тритоне X-100 в PBS (20 мин, 4 °С). Слайды с клетками, предназначенными для определения уровня Fas-рецептора, процедуре пермеабелизации не подвергали. После каждой процедуры слайды трижды отмывали в PBS, последнюю отмывку от первичного антитела проводили в PBS, содержащем 2 % эмбриональной сыворотки. На слайд наносили анти-Caspase 3 антитела кролика (GenWay Biotech, США) в этом же растворе (30 мкл, 1—2 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. После инкубации покровное стекло удаляли и слайд трижды отмывали холодным PBS. После удаления излишков влаги с поверхности слайда наносили 30 мкл PBS, содержащего FITC-конъюгат антикроличьих антител (1 мкг/мл; Chemicon, Австралия), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте. Затем слайды отмывали в PBS, дегидратировали в метаноле, высушивали, окрашивали иодистым пропидием (1 мкг/мл) и микроскопировали в режиме флуоресценции с набором фильтров для FITC. Контролем служили слайды с иммобилизованными клетками, которые подвергали такой же обработке, но без первичных антител. FITC-флуоресцирующие клетки фотографировали, полученные изображения анализировали на компьютере с помощью программы ImageJ. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, США; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). 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.

Регистрация электроретинограммы (ЭРГ). Перед регистрацией ЭРГ мышей адаптировали к темноте (не менее 12 ч) и лишали корма на 24 ч. При тусклом свете мышей анестезировали внутримышечной инъекцией смеси золитила и ксилазина (1 : 1) в дозе 0.2 мл на 100 г массы животного. Для расширения зрачка в глаз закапывали 0.5%-ный 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 миниа-

тюрного широкопольного фотостимулятора, длительность вспышек составляла 5 мс, логарифм интенсивности варьировал от -3 до -0.5 . ЭРГ характеризовали амплитудой, равной сумме а- и b-волн. Результат представляли в виде среднего значения из 3 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.

Регистрация повреждений ДНК методом ДНК-комет. Использовали два варианта метода — нейтральный для оценки поврежденности двухнитевой ДНК (dsДНК-кометы) и щелочной для определения однонитевых разрывов ДНК (ssДНК-кометы). Детальное описание дано нами ранее (Тронов и др., 2012). Суспензию клеток в PBS — $(0.5-1) \cdot 10^6/\text{мл}$ — смешивали с двойным объемом 1%-ного раствора легкоплавкой агарозы IV типа (Sigma, США) и наносили на предметное стекло в виде тонкого слоя 18×18 мм. После застывания геля слайд погружали в лизирующий раствор, содержащий 2.5 М NaCl, 30 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % лаурилсаркози-

ната и 0.03 мг/мл протеиназы К, pH 8.0, при 37 °С. Нейтральный электрофорез проводили в ТАЕ-буфере pH 8.3 (ds-разрывы), или в растворе, содержащем 0.3 М NaOH, 2 мМ EDTA и 1 % DMSO (ss-разрывы), в течение 30 мин при 0.56 В/см. Слайды ополаскивали в 0.4 М Tris-HCl, pH 7.4, в PBS, высушивали на воздухе, дегидратировали метанолом и после окрашивания Sybr-Green микроскопировали во флуоресцентном режиме. Изображения комет обрабатывали по программе CASP (Konca et al., 2003). Показателем поврежденности ДНК служил момент хвоста комет *mt* (olive tail moment).

Результаты

Радиоустойчивость сетчатки *in vivo*. Радиоустойчивость сетчатки демонстрирует рис. 1, а: облучение сетчатки протонами в дозах 14 Гр и менее спустя 3 сут не вызывает изменений в структуре слоев сетчатки. Однако в облученных клетках формируются разрывы ДНК, которые полностью репарируются за 10–15 ч (рис. 1, з). Репарация ДНК является предпосылкой для

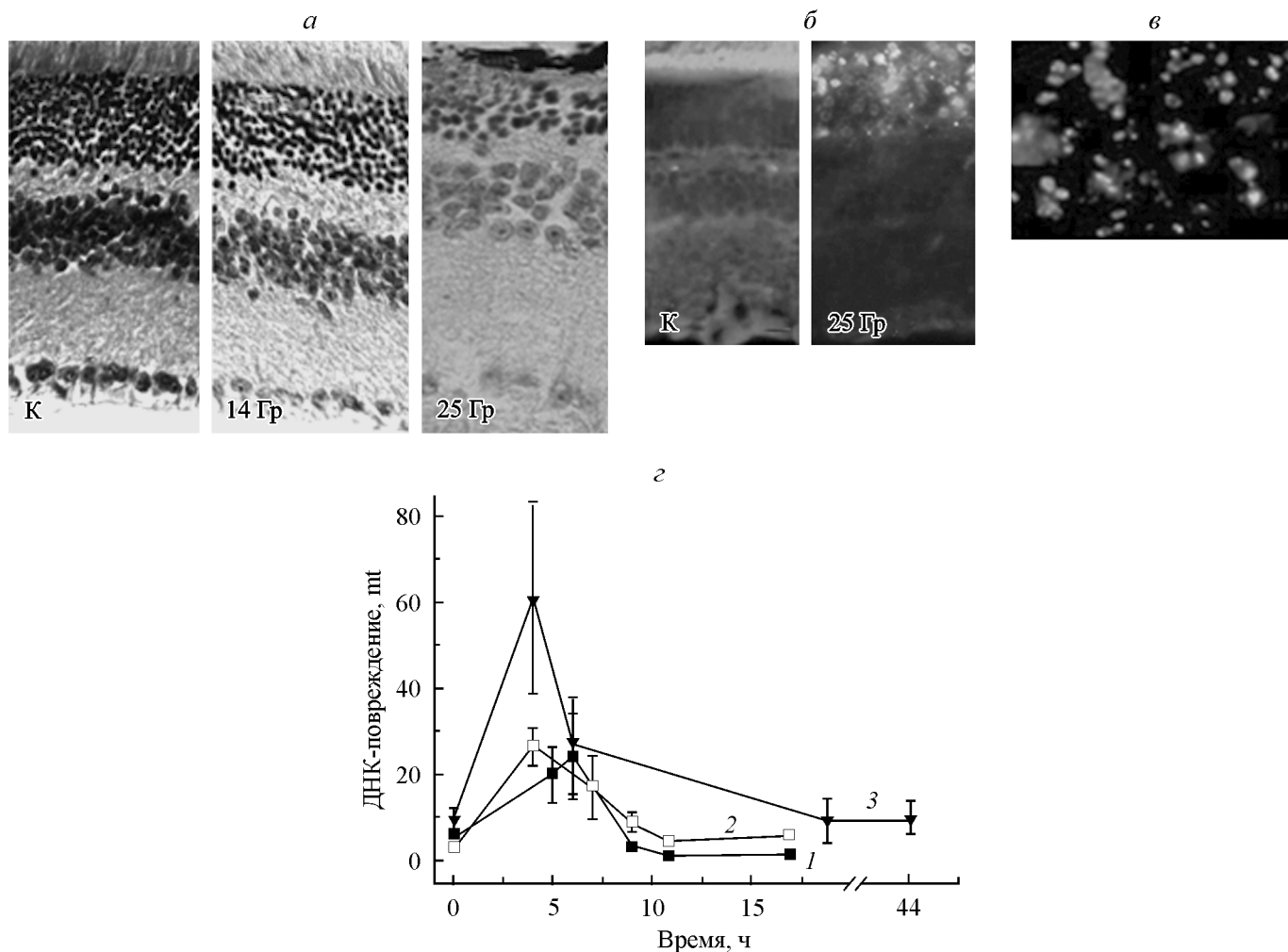


Рис. 1. Морфология сетчатки и повреждение ДНК после облучения ее ускоренными протонами в дозах 14 и 25 Гр.

а — морфологические изменения в течение 3 сут после воздействия; б, в — соответственно пикноз и фрагментация ядер фоторецепторов в облученной сетчатке; г — накопление *in vivo* однонитевых (1, 3) и двухнитевых (2) разрывов ДНК в сетчатке и их удаление спустя 10–12 ч после облучения в дозах 14 (1, 2) и 25 (3) Гр. К — контроль. Повреждения ДНК регистрировали методом ДНК-комет, показателем поврежденности служил момент хвоста комет *mt*.

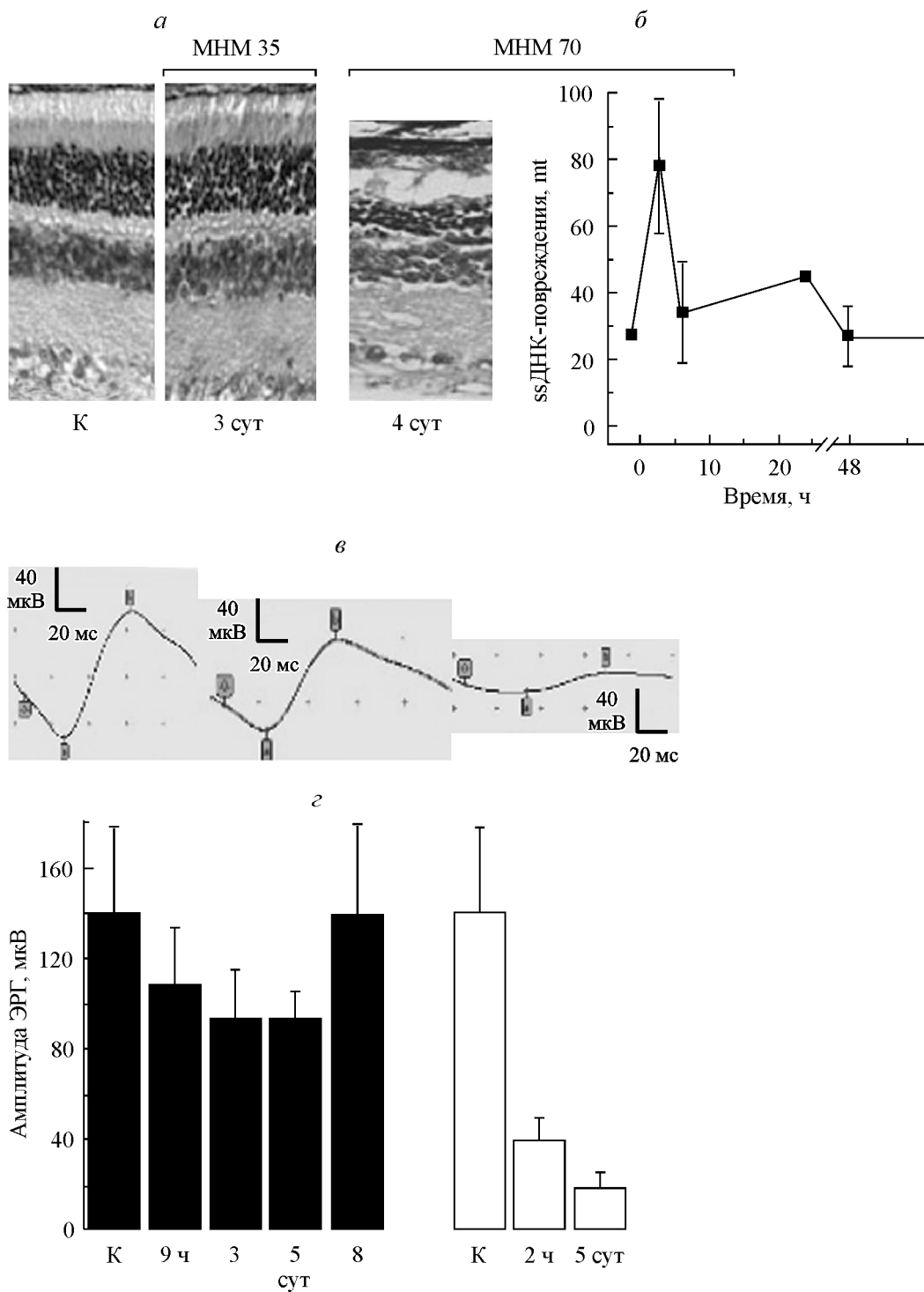


Рис. 2. Ответ сетчатки на однократное введение метилнитрозомочевины (МНМ).

а — МНМ в дозе 35 мг/мл не вызывает цитотоксического эффекта; *б* — 70 мг/кг МНМ вызывает дегенерацию ядерного слоя фоторецепторов и одновременно репарацию однонитевых разрывов ДНК (ssДНК); *в* — электроретинограмма (ЭРГ) в ответ на введение 35 и 70 мг/кг МНМ; *г* — функциональное восстановление сетчатки после введения 35 мг/кг МНМ (черные столбцы) и необратимая утрата функциональной активности сетчатки после дозы МНМ 70 мг/кг (светлые столбцы).

Таблица 1

Схема эксперимента по адаптирующему действию МНМ на сетчатку мышей

Мышь	Время, ч				48
	0	4	12	24	
	МНМ, мг/кг		BrdU, мг/кг		
1	17	70	50	50	Эвтаназия
2	0	70	50	50	»
3	0	0	50	50	»

успешного восстановления клеток и последующего сохранения их функциональной активности. Эффективная репарация ДНК наблюдается и в клетках, облученных в дозе 25 Гр. Однако эта высокая доза вызывает морфологические изменения в сетчатке (рис. 1, *a*) и гибель фоторецепторов (рис. 1, *b*). Судя по наличию фрагментированных ядер, большая часть клеток гибнет по механизму апоптоза (рис. 1, *в*). Таким образом, после воздействия в дозе 25 Гр успешная репарация ДНК оказывается недостаточной предпосылкой выживания клеток в облученной сетчатке. Нелинейный характер дозовой зависимости ответа сетчатки на облучение и активная система репарации ДНК в ней указывают на способность сетчатки к восстановлению.

Восстановление сетчатки после действия МНМ. Характер процессов в сетчатке после действия МНМ сходен с теми, которые происходят после действия протонов: нелинейная зависимость морфологических изменений сетчатки от дозы МНМ (рис. 2, *a*) и эффективная репарация возникающих разрывов ДНК (рис. 2, *b*). Агент в цитотоксической дозе 70 мг/кг спустя 3—4 сут после введения вызывает деструкцию ядерного слоя и наружных сегментов фоторецепторов и необратимую утрату функциональной активности сетчатки у мышей (рис. 2, *в, г*). Доза 35 мг/кг, как видно, не является цитотоксической. В то же время после этой дозы наблюдается продолжительное, но обратимое понижение амплитуды ЭРГ (рис. 2, *з*), говорящее о восстановлении функциональной активности сетчатки после действия МНМ.

Адаптивный ответ сетчатки и клеток Мюллера на МНМ. Схема опыта представлена в табл. 1. Поскольку МНМ вызывает апоптотическую гибель фоторецепторов, в качестве индикатора цитотоксического действия агента использовали экспрессию активированной каспазы 3 в клетках сетчатки, определяемой иммуноцитохимически по флуоресценции антител, специфичных к каспазе. Результат, представленный на рис. 3, показывает, что цитотоксический эффект от однократного введения МНМ в дозе 70 мг/кг больше, чем от последовательного введения 17 и 70 мг/кг МНМ. Спустя 12 ч после введения МНМ, когда завершалась репарация ДНК, дважды вводили пролиферативный маркер BrdU по 50 мг/кг с целью идентификации глиальных клеток Мюллера в сетчатке (табл. 1). Включившийся в ДНК маркер выявляли с помощью FITC-конъюгата анти-BrdU антител после щелочной обработки и нейтрализации срезов на предметном стекле (рис. 4, *a*) и подсчитывали число FITC-фокусов на единицу площади среза (рис. 4, *b*). Среднее число фокусов на срезе, приходящееся на единицу площади среза, представляли точкой из группы под каждой микрофотографией среза. Видно, что в ответ на

введение цитотоксической дозы МНМ возрастает число FITC-фокусов. Последовательное введение 17 и 70 мг/кг МНМ обнаруживает заметное снижение числа фокусов по сравнению с эффектом от одной дозы 70 мг/кг, хотя уровень достоверности снижения не высок, $P = 0.08$.

Адаптирующий эффект протонного излучения в дозе 1 Гр. Схема опыта представлена в табл. 2. После инъекции МНМ (70 мг/кг) через 44 ч в сетчатке накапливается большое число погибших, TUNEL-позитивных клеток (рис. 5). Погибшие клетки локализируются в наружном ядерном слое сетчатки. На этом рисунке интенсивности флуоресценции (измеренные по программе Image J), усредненные по одному срезу, представлены в виде точки в группе под каждой микрофотографией.

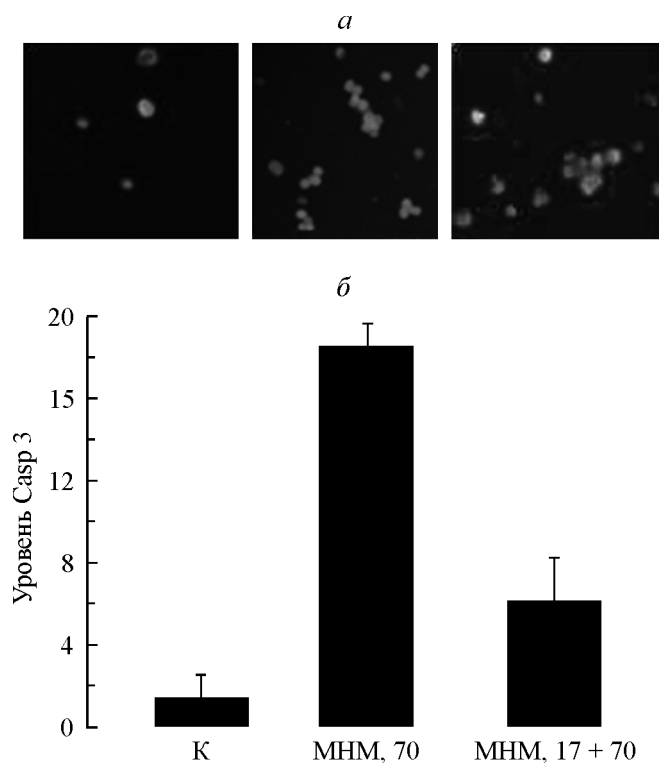


Рис. 3. Экспрессия активной каспазы 3 (Casp3) в клетках сетчатки у мышей в ответ на однократную (70 мг/кг МНМ) и двукратную (17 и 70 мг/кг МНМ) инъекции агента.

a — микрофотографии FITC-флуоресцирующих клеток сетчатки; *b* — уровень Casp3, определенный как удельная интенсивность FITC-флуоресценции клеток. К — контроль; столбцы соответствуют микрофотографиям на рис. 3, *a*.

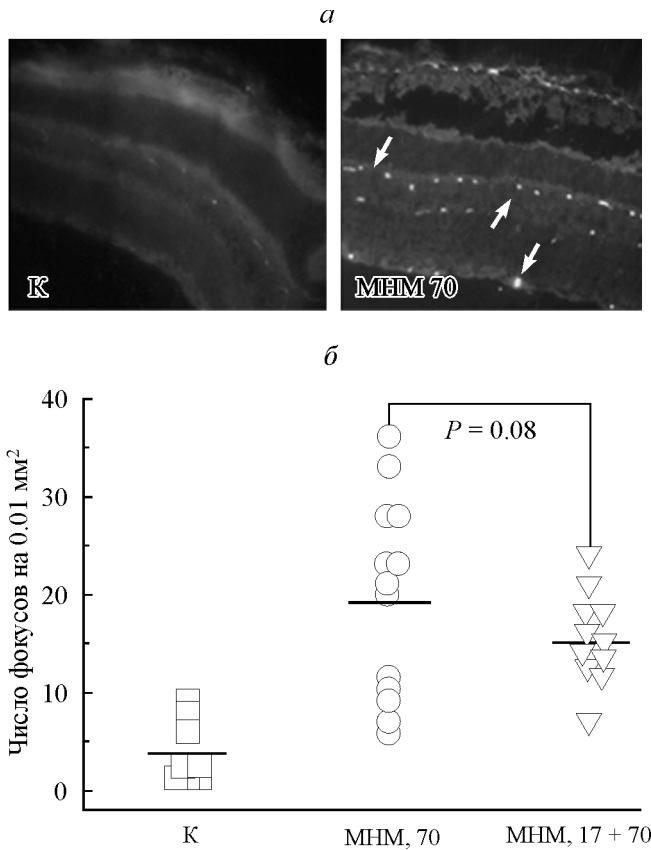


Рис. 4. Визуализация глиальных клеток Мюллера на срезах сетчатки (а) и их ответ на однократную (70 мг/кг) и двукратную (17 и 70 мг/кг) инъекции МНМ мышам (б).

К — контроль; стрелками отмечены клетки Мюллера, включившие BrdU; P — вероятность различий.

Средние значения для каждой группы точек обозначены на рис. 5 полностью черными точками.

Облучение мышей в дозе 1 Гр спустя 48 ч не приводит к сколько-нибудь значимому увеличению числа погибших клеток в сетчатке (данные не приводятся). Однако предварительное облучение мышей в этой дозе приводит к снижению цитотоксического действия МНМ на радиационно-прекондиционированную сетчатку ($P < 0.001$). Рис. 6 представляет результаты оценки двухнитевых разрывов ДНК (ДР) через 48 ч после воздействия МНМ на радиационно-прекондиционированную сетчатку у мы-

Т а б л и ц а 2

Схема эксперимента по адаптирующему эффекту облучения на сетчатку у мышей

Мышь	Время, ч		
	0	4	48
	протоны, Гр	МНМ, мг/кг	ЭРГ, затем эвтаназия
1	1	70	То же
2	0	70	» »
3	1	0	» »

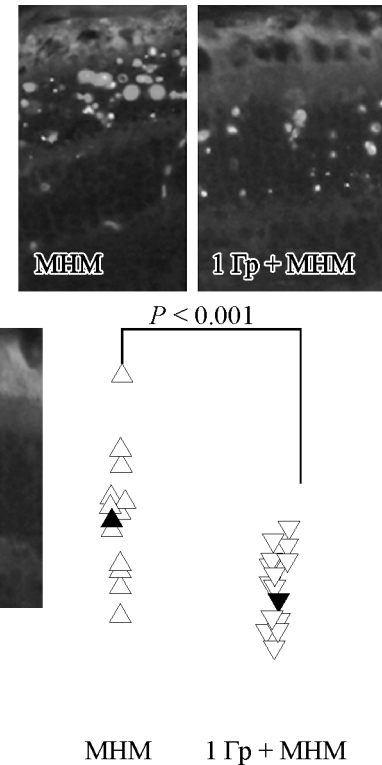


Рис. 5. TUNEL-детекция апоптоза в наружном ядерном слое сетчатки интактных мышей (К) после введения 70 мг/мл МНМ и после облучения протонами в дозе 1 Гр с последующей инъекцией 70 мг/кг МНМ (1 Гр + МНМ).

Представлены репрезентативные микрофотографии срезов сетчатки. Черный символ на гистограмме — нормированное по площади усредненное значение флуоресценции наружного ядерного слоя сетчатки в поле зрения микроскопа; P — вероятность различий.

шей. Как видно, preconditioning снижает формирование ДР. Это подтверждается микрофотографиями комет (рис. 6, а), гистограммами их распределений по степени повреждения ДНК (рис. 6, б) и по средним уровням повреждения ДНК, вычисленным из этих распределений (рис. 6, в). Таким образом, представленные данные по оценке как уровня апоптоза, так и уровня двухнитевой деградации ДНК подтверждают адаптирующий эффект на сетчатке протонного излучения в дозе 1 Гр.

Обсуждение

Высокий генотоксический порог у сетчатки, как и нелинейная зависимость цитотоксического эффекта от дозы генотоксиканта, указывают на способность сетчатки к восстановлению от повреждений (Jenkins et al., 2005; Johnson et al., 2009). С одной стороны, необходимой предпосылкой этого является механизм репарации ДНК (рис. 1), а с другой — репарация оказывается недостаточной для клеточного и функционального восстановления сетчатки (рис. 1, 2). В предыдущей работе мы показали, что предварительное введение мышам нецитотоксической дозы МНМ делает сетчатку более устойчивой к последующему цитотоксическому действию агента по показателю ЭРГ (МНМ-прекондиционирование сетчатки) (Виноградова и др., 2014). Здесь, используя ту же схему опыта (табл. 1),

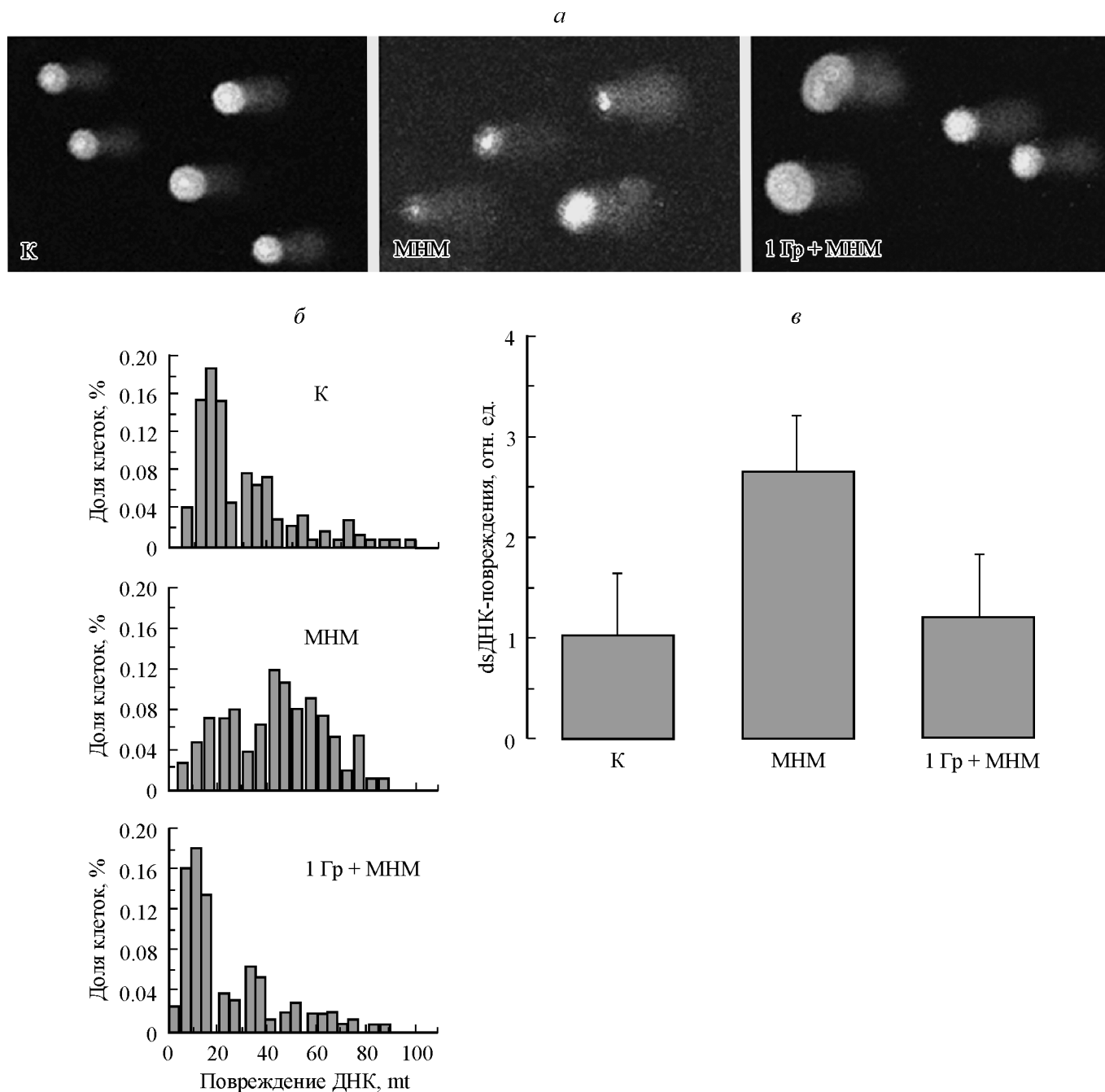


Рис. 6. Влияние протонного прекондиционирования (1 Гр) на MNM-индуцированную деградацию ДНК в сетчатке у мышей спустя 48 ч после облучения.

a — репрезентативные двухнитевые ДНК-кометы из клеток интактной сетчатки (К), подвергнутой действию MNM или последовательно облучению и 70 мг/кг MNM (1 Гр + MNM); *б* — гистограммы распределения комет по степени деградации ДНК для тех же клеток; *в* — средние относительные значения двухнитевой деградации ДНК, вычисленные из соответствующих распределений (*б*).

мы показали, что толерантность сетчатки после MNM-прекондиционирования ассоциирована с понижением уровня экспрессии каспазы 3 в сетчатке (рис. 3). Каспаза 3, проапоптотическая эффекторная каспаза, расщепляет клеточные субстраты, ускоряя апоптотическую гибель клетки. Снижение ее экспрессии означает снижение клеточной гибели.

Важным клеточным компонентом сетчатки являются глиальные клетки Мюллера. Эти клетки образуются на поздних стадиях нейрогенеза и не считаются предшест-

венниками нейронов (Ooto et al., 2004). Вместе с тем они активно пролиферируют в ответ на повреждение и могут экспрессировать нейрональные маркеры (Das et al., 2006), подтверждая тем самым свою латентную способность к нейрогенезу. Используя в качестве пролиферативного маркера BrdU, мы визуализировали клетки Мюллера в сетчатке у мышей после инъекции MNM (табл. 1) и показали, что в ответ на MNM-индуцированное повреждение возрастает их пролиферация. В MNM-прекондиционированной сетчатке это возрастание меньше, что, как мы по-

лагаем, соответствует меньшей степени ее поврежденности по сравнению с поврежденностью непрекондиционированной сетчатки (рис. 4).

Этот результат подтверждает способность зрелой сетчатки к восстановлению после воздействия МНМ. Результаты, представленные на рис. 1, 2, говорят о том, что ответ сетчатки на МНМ имеет характеристики, сходные с таковыми в ответ на излучения: нелинейность зависимости от дозы (наличие порога цитотоксического действия), активация репаративных механизмов, апоптоз фоторецепторов. Логично предполагать, что сетчатка обладает также способностью к восстановлению и после радиационного воздействия. Исследование, аналогичное предыдущему, в котором в качестве адаптирующего воздействия мы использовали облучение протонами головы животных в дозе 1 Гр (табл. 2), подтвердило это предположение. TUNEL-флуоресценция наружного ядерного слоя (апоптоз фоторецепторов) радиационно-прекондиционированной сетчатки ниже таковой у необлученной сетчатки (рис. 5). Наблюдаемое снижение частоты апоптоза, как показано на рис. 6, коррелирует со снижением количества ДР в ДНК в клетках сетчатки, которые являются маркерами апоптотической деградации ДНК (Разин, Юдинкова, 1998).

Связь между формированием ДР в ДНК и апоптозом общеизвестна и показана во многих исследованиях (Lips, Kaina, 2001). И неудивительно, что снижение апоптотической гибели фоторецепторов сетчатки коррелирует со снижением количества ДР в них. Однако возникает вопрос о том, почему в прекокондиционированной сетчатке при том же уровне генотоксического воздействия накапливается меньше ДР, чем в контроле. Хотя полученные данные не позволяют однозначно на него ответить, мы полагаем, что это может быть следствием активации репарации ДР в клетках прекокондиционированной сетчатки.

Ранее мы показали, что под действием протонного излучения в ДНК сетчатки формируются ДР и возрастает экспрессия фосфатидилинозитол-3 киназоподобной киназы ATM (Тронов и др., 2012). Аутоактивированная ATM, фосфорилирует по Ser-139 гистон H2AX в 4 ближайших к ДР нуклеосомах хроматина (Mah et al., 2010). Хотя роль γ H2AX как сенсора ДР невелика (Celeste et al., 2003), он присоединяет и удерживает комплекс MRN (Futata et al., 2003). Таким образом, протонное прекокондиционирование сетчатки, индуцируя небольшое количество разрывов в ДНК, инициирует в области разрыва цепь реакций ДР \rightarrow ATM \rightarrow γ H2AX \rightarrow MRN, завершающуюся формированием активного репаративного комплекса γ H2AX—MRN, в котором MRN представляет собой тройной комплекс Mre11—Rad50—Nsb1, осуществляющий репарацию ДР по механизму гомологичной рекомбинации (Li, Neuger, 2008). Последующее воздействие ретинотоксической дозы МНМ происходит на фоне, благоприятствующем репарации (все участники процесса уже активированы), что приводит к увеличению толерантности, адаптивному ответу (радиационному гормезису). Не исключено, что аналогичный механизм может лежать и в основе адаптивного ответа сетчатки на МНМ (Виноградова и др., 2014), поскольку здесь также могут образовываться ДР в ДНК, но в отличие от радиации механизм формирования ДР под действием МНМ опосредован эксцизионной репарацией возникающих АП-сайтов в противолежащих цепях ДНК (Lomax et al., 2004).

В качестве примера радиационного гормезиса (благоприятного действия ионизирующего излучения) на зрение

отметим исследование в 1958—1998 гг. 10 000 пациентов, перенесших атомную бомбардировку в Японии (Yamada et al., 2004). В этой работе показаны отрицательная дозовая зависимость частоты глаукомы исследованных пациентов ($P = 0.0025$) и снижение у них частоты глаукомы по сравнению со спонтанным уровнем заболевания. Есть работа, в которой мышей DBA/2J, генотипически предрасположенных к глаукоме, подвергали тотальному гамма-облучению в дозе 10 Гр с последующей внутривенной инъекцией сингенного костного мозга (лишенного Т-лимфоцитов) (Anderson et al., 2005). В то время как у необработанных мышей через 12—14 мес развивалась типичная картина глаукоматозной дегенерации сетчатки, у облученных животных дегенерации не наблюдали. Тотальное низкодозовое (0.65—2.00 Гр) гамма-облучение мышей с наследственным пигментным ретином оказывало защитное действие от развития патологии в сетчатке у животных (Otani et al., 2012). Нейропротекторный эффект гамма-облучения прослеживали на морфологическом и функциональном (ЭРГ) уровнях.

На феномене радиационного гормезиса базируются некоторые терапевтические процедуры. В последнее время для подавления неоваскуляризации используется мягкое X-излучение (Moshfeghi et al., 2011; Cantley et al., 2013) или бета-частицы (Avila et al., 2009) (дозы 15 и 24 Гр) для стереотаксического облучения глаз пациентов с возрастной макулярной дегенерацией сетчатки. Во всех случаях отмечаются подавление неоваскуляризации хориоиды и отсутствие отягчающих последствий в течение последующих 12 мес наблюдения.

Таким образом, по крайней мере два вопроса, представляющих фундаментальный и практический интерес, требуют дальнейшего исследования. Первый — это определение пороговой дозы радиационного воздействия, выше которой механизмы, обеспечивающие достаточно высокую устойчивость зрелой сетчатки к облучению, оказываются несостоятельными. Ответ на этот вопрос принципиально важен, поскольку превышение этого порога может реально привести к развитию дегенеративного заболевания сетчатки, т. е. к частичной или полной утрате зрения. Второй вопрос — это исследование механизмов, обеспечивающих так называемый адаптивный ответ сетчатки на действие малых доз облучения или химических мутагенов, и реальная оценка возможностей использования этого феномена в клинической или гигиенической практике.

Список литературы

- Виноградова Ю. В., Тронов В. А., Ляхова К. Н., Поплинская В. А., Островский М. А. 2014. Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов. Радиационная биология. Радиоэкология. 54 (4) : 385—392. (Vinogradova Yu. V., Tronov V. A., Lyahova K. N., Poplinskaya V. A., Ostrovsky M. A. 2014. Damage and functional recovery of the mouse retina after exposure to genotoxic agents. Radiat. Biol. Radioecol. 54 (4) : 385—392.)
- Логина М. Ю., Тронов В. А., Белецкая Т. А., Фельдман Е. Б., Панова И. Г., Островский М. А. 2008. Радиорезистентность сетчатки: под действием гамма-излучения в сетчатке мышей формируются разрывы ДНК, увеличивается содержание белка p53, сопровождаемые репарацией ДНК и отсутствием апоптоза клеток. Радиационная биология. Радиоэкология. 48 (6) : 698—704. (Loginova M. Yu., Tronov V. A., Belytskaia T. A., Fel'dman T. B., Panova I. G., Ostrovskii M. A. 2008. Radiat. Biol. Radioecol. 48 (6) : 698—704.)

- Razin S. V., Iudinkova E. S. 1998. Крупномасштабная фрагментация ДНК при апоптозе: разрезается ли геном по границам топологических доменов? Изв. РАН. Сер. биол. 2 : 167—171. (Razin S. V., Iudinkova E. S. 1998. Large-scale DNA fragmentation during apoptosis: is genome cleaved at boundaries of the topological domain? Izv. RAS. Ser. Biol. 2 : 167—171.)
- Тронов В. А., Виноградова Ю. В., Логинова М. Ю., Поплинская В. А., Островский М. А. 2012. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза. Цитология. 54 (3) : 261—269. (Tronov V. A., Vinogradova Yu. V., Loginova M. Yu., Poplinskaya V. A., Ostrovskii M. A. 2012. Mechanisms of radioresistance in terminally differentiated cells of mature retina. Tsitologiya. 54 (3) : 261—269.)
- Anderson M. G., Libby R. T., Gould D. B., Smith R. S., John S. W. M. 2005. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. PNAS. 102 : 4566—4571.
- Avila M. P., Farah M. E., Santos A., Kapran Z., Duprat J. P., Woodward B. W., Nau J. 2009. Twelve-month safety and visual acuity results from a feasibility study of intraocular, epiretinal radiation therapy for the treatment of subfoveal CNV secondary to AMD. Retina. 29 : 157—169.
- Beatty S., Koh H., Phil M., Henson D., Boulton M. 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. Surv. Ophthalmol. 45 : 115—134.
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. 2002. Defining hormesis. Hum. Exp. Toxicol. 21 : 91—97.
- Cantley J. L., Hanlon J., Chell E., Lee C., Smith W. C., Bolch W. E. 2013. Influence of eye size and beam entry angle on dose to non-targeted tissues of the eye during stereotactic x-ray radiosurgery of AMD. Phys. Med. Biol. 58 : 6887—6896.
- Cao W., Tombran-Tink J., Elias R., Sezate S., Mrazek D., McGinnis J. F. 2001. *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. IOVS. 42 : 1646—1652.
- Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M. J., Pilch D. R., Staudt D. W., Lee A., Bonner R. F., Bonner W. M., Nussenzweig A. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. Nat. Cell Biol. 5 : 675—679.
- Das A. V., Mallya K. B., Zhao X., Ahmad F., Bhattacharya S., Thoreson W. B., Hegde G. V., Ahmad I. 2006. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. Dev. Biol. 299 : 283—302.
- Furuta T., Takemura H., Liao Z.-Y., Aune G. J., Redon C., Sedelnikova O. A., Pilch D. R., Rogakou E. P., Celeste A., Chen H. T., Nussenzweig A., Aladjem M. I., Bonner W. M., Pommier Y. 2003. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. J. Biol. Chem. 278 : 20 303—20 312.
- Jenkins G. J. S., Doak S. H., Johnson G. E., Quick E., Waters 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. Mut. Res. 678 : 95—100.
- Kaldi I., Martin R. E., Huang H., Brush R. S., Morrison K. A., Anderson R. E. 2003. Bright cyclic rearing protects albino mouse retina against acute light-induced apoptosis. Mol. Vis. 9 : 337—344.
- Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mut. Res. 534 : 15—20.
- Li F., Cao W., Anderson R. E. 2001. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. Exp. Eye Res. 73 : 569—577.
- Li X., Heyer W. D. 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. Cell Res. 18 : 99—113.
- Lips J., Kaina B. 2001. DNA double strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. Carcinogenesis. 22 : 579—585.
- Liu G., Gong P., Bernstein L. R., Bi Y., Gong S., Cai L. 2007. Apoptotic cell death induced by low-dose radiation in male germ cells: hormesis and adaptation. Crit. Rev. Toxicol. 37 : 587—605.
- Lomax M. E., Cunniffe S., O'Neill P. 2004. Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts. Biochemistry. 43 : 11 017—11 026.
- Mah L.-J., El-Osta A., Karagiannis T. C. 2010. γ -H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. Leukemia. 24 : 679—686.
- Mao X. W., Crapo J. D., Mekonnen T., Lindsey N., Martinez P., Gridley D. S., Slater J. M. 2009. Radioprotective effect of a metalloporphyrin compound in rat eye model. Curr. Eye Res. 34 : 62—72.
- Maslim J., Valter K., Egensperger R., Hollander H., Stone J. 1997. Tissue oxygen during a critical developmental period controls the death and survival of photoreceptors. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38 : 1667—1677.
- Mattson M. P., Cheng A. 2006. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. Trends Neurosci. 29 : 632—639.
- Moshfeghi D. M., Kaiser P. K., Gertner M. 2011. Stereotactic low-voltage x-ray irradiation for age-related macular degeneration. Br. J. Ophthalmol. 95 : 185—188.
- Nakamura J., Swenberg J. A. 1999. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. Cancer Res. 59 : 2522—2526.
- Noell W. K., Albrecht R. 1971. Irreversible effects of visible light on the retina: role of vitamin A. Science. 172 : 76—79.
- Ooto S., Akagi T., Kageyama R., Akita J., Mandai M., Honda Y., Takahashi M. 2004. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 13 654—13 659.
- Otani A., Kojima H., Guo C., Oishi A., Yoshimura N. 2012. Low-dose-rate, low-dose irradiation delays neurodegeneration in a model of retinitis pigmentosa. Amer. J. Pathol. 180 : 328—336.
- Shichi H. 2004. Cataract formation and prevention. Expert Opin. Invest. Drugs. 13 : 691—701.
- Wellard J., Lee D., Valter K., Stone J. 2005. Photoreceptors in the rat retina are specifically vulnerable to both hypoxia and hyperoxia. Vis. Neurosci. 22 : 501—507.
- Wohl S. G., Schmeer S. W., Friese T., Witte O. W., Isenmann S. 2011. *In situ* dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 *in vivo*. PLoS ONE. 6 : 1—18.
- Yamada M., Wong F. L., Fujiwara S., Akahoshi M., Suzuki G. 2004. Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958—1998. Radiat. Res. 161 : 622—632.

RADIATION PRECONDITIONING OF MOUSE RETINA RESULTS IN TOLERANCE
TO MNU-INDUCED DEGENERATION AND STIMULATES RETINAL RECOVERY*V. A. Tronov*^{1, 2, *} *Yu. V. Vinogradova*² *V. A. Poplinskaya*³ *E. I. Nekrasova*⁴ *M. A. Ostrovsky*^{2, 4}¹ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow, ² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna,³ N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RASand ⁴ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow;* e-mail: vtronov@yandex.ru

Emerging body of data indicate protecting effect of low level of stress (preconditioning) on retina. Our previous studies have revealed a non-linear dose-response relationship for cytotoxic effect of both ionizing radiation and N-methyl-N-nitrosourea (MNU) on mouse retina. Moreover, non-cytotoxic dose of MNU increased tolerance of retina to following challenge dose of MNU. This result displays protection of retina through mechanism of recovery. In the present study we used the mouse model for MNU-induced retinal degeneration to evaluate the adaptive response of the retina to proton irradiation and implication of glial Muller cells in this response. In this paper, we have shown that the recovery of the retina after exposure to genotoxic agents is associated with an increased efficiency of DNA damage repair and lowered death of retinal photoreceptors.

Key words: retina, ionizing radiation, N-methyl-N-nitrosourea, DNA damage, repair, hormesis.
