

## ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК МЮЛЛЕРА В СЕТЧАТКЕ МЫШЕЙ В ОТВЕТ НА РЕТИНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС, ИНДУЦИРОВАННЫЙ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ

© В. А. Тронов,<sup>1</sup> \* Е. И. Некрасова,<sup>2</sup> М. А. Островский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва, 119991, и

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва, 119991;

\* электронный адрес: vtronov@yandex.ru

Однократное внутрибрюшинное введение мышам метилнитрозомочевина (МНМ) вызывает в сетчатке гибель фоторецепторов, которая нелинейно зависит от дозы (Тронов и др., 2015). Плато устойчивости на кривой дозовой зависимости может быть связано с механизмом репарации ДНК в клетках сетчатки. МНМ-индуцированная гибель фоторецепторов в сетчатке у взрослых мышей может стимулировать трансдифференцировку глиальных клеток Мюллера в фоторецептор-подобные (Wan et al., 2008). В настоящей работе с помощью метода комет и BrdU (аналога тимидина) как маркера пролиферации оценивали пролиферативный ответ клеток Мюллера на инъекцию МНМ в разных дозах и сравнивали его с повреждениями ДНК и их репарацией в суспензии клеток сетчатки и в клетках Мюллера. Инъекция МНМ в дозе  $\leq 40$  мг/кг не приводила к заметной активации клеток Мюллера спустя 3 сут после инъекции. К этому времени после указанной дозы не наблюдали повреждений ДНК вследствие репарации. При дозах МНМ, превышающих 50 мг/кг, наблюдали TUNEL-детектируемую гибель фоторецепторов в сетчатке, увеличение пролиферирующего пула клеток Мюллера (более чем 10-кратное) по сравнению с контролем и возрастание разрывов (одно- и двухнитевых разрывов, АП-сайтов) ДНК, которые являются цитотоксичными для фоторецепторов. Полученные результаты интерпретируются в рамках концепции дисбаланса этапов эксцизионной репарации МНМ-алкилированных оснований в ДНК, достигаемого при определенной дозе агента (уровне повреждения). В ходе разбалансированной репарации ДНК в ней накапливаются цитотоксичные интермедиаты, вызывающие гибель фоторецепторов, в ответ на которую активируются клетки Мюллера.

Ключевые слова: сетчатка, клетки Мюллера, глиоз, повреждения ДНК, репарация, метилнитрозомочевина.

Принятые сокращения: АП-сайт — апури-апиримидиновый сайт, ГКМ — глиальные клетки Мюллера, МГМТ — метилгуанинметилтрансфераза, МНМ — метилнитрозомочевина, BER — эксцизионная репарация оснований (base excision repair), BrdU — бромдезоксигуанидин (2'-дезоксигуанидин), ААГ — алкиладенин-ДНК-гликозилаза, MMR — пострепликативная коррекция нуклеотидов (mismatch repair), mt — момент хвоста, N3meA — N3-метиладенин, N7meG — N6-метилгуанин, NER — эксцизионная репарация (nucleotide excision repair) нуклеотидов, ОбмеG — Об-метилгуанин, PAR — поли(АДФ-рибоза), PARP1 — поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1, PBS — натрий-фосфатный буферный раствор.

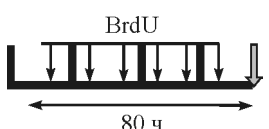
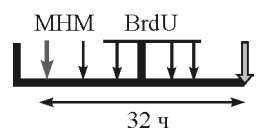
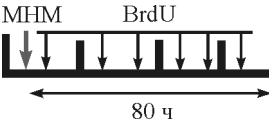
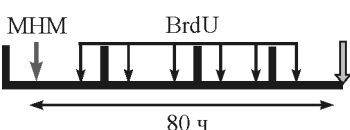
Нейродегенеративные заболевания сетчатки включают в себя пигментный ретинит, старческую макулярную дегенерацию сетчатки, глаукому и диабетическую ретинопатию. В основе этих заболеваний лежит процесс необратимой утраты ретинальных нейронов, приводящий к потере зрения.

Две стратегии лечения этих заболеваний сформировались в последнее время (Jayakody et al., 2015). Первая основывается на успехах изучения стволовых клеток и на терапии, включающей в себя их трансплантацию. Вторая стратегия связана со стимуляцией эндогенных ретинальных стволовых клеток, способных восполнять патологическую утрату клеток сетчатки. Процесс регенерации сет-

чатки присутствует в некоторых видах позвоночных (рыбы, амфибии и птицы). Идентификация клеток-предшественников в сетчатке взрослых млекопитающих питает надежду на регенерацию сетчатки как результат второй стратегии терапии.

В одной из работ (Ooto et al., 2004) использовали N-метил-D-аспартат (NMDA), лиганд NMDA-рецептора, вызывающий апоптоз нейронов сетчатки у крыс. В ответ на это повреждение клетки Мюллера в сетчатке подвергались пролиферативному глиозу и дифференцировке в ретинальные нейроны. В другой работе (Wan et al., 2008) в ответ на индуцированное метилнитрозомочевина (МНМ) повреждение фоторецепторов в сетчатке

Частота активации ГКМ в сетчатке у мышей в контроле и в ответ на однократное введение МНМ в дозе 60 мг/кг, сопровождаемое инъекциями маркера BrdU

Номер схемы	Схема инъекций	Схема инъекций/ время, ч	Число ГКМ на 1000 клеток, среднее ± стандартное отклонение	Комментарии
1		6/80	1.25 ± 1.00	Контроль (спонтанная пролиферативная активность ГКМ)
2		3/32	0.13 ± 0.10	Репаративный синтез в сетчатке
3		5/80	10.80 ± 0.45	Пролиферация ГКМ
4		6/80	12.65 ± 0.75	То же

у крыс также идентифицировали глиоз клеток Мюллера 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 клеток Мюллера в сетчатке у крыс, ассоциированный с пролиферацией и последующей дифференцировкой в направлении клеток, подвергавшихся цитотоксическому воздействию.

МНМ уже 20 лет используется в исследованиях по дегенерации сетчатки (Yuge et al., 1996). Несмотря на сравнительно короткое время жизни в крови, МНМ легко преодолевает гематоретинальный барьер, достигает сетчатки и вызывает гибель главным образом фоторецепторных клеток в ней (Yoshizawa et al., 2012). Такая селективность действия сделала МНМ популярной не только в исследованиях механизма дегенерации сетчатки, но и для оценки эффективности различных веществ, препятствующих дегенерации (Tsubura et al., 2011). Наряду с ретинотоксическим действием МНМ известна высокая устойчивость глиальных клеток Мюллера (ГКМ) в сетчатке к МНМ (Tsubura et al., 2010): 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, индуцированным генотоксикантом МНМ в клетках сетчатки и мюллеровских клетках, пока не исследована.

Целью работы было с использованием в качестве пролиферативного маркера бромдезоксигуанидина (BrdU) оценить активацию клеток Мюллера в сетчатке взрослых мышей *in vivo* в ответ на ретинотоксическое действие МНМ и сопоставить глиоз ГКМ с повреждениями ДНК и их репарацией.

## Материал и методика

**Животные.** Исследования проводили на половозрелых мышках-гибридах F<sub>1</sub>СВА×С57В16 (♀) в возрасте 2.5 мес. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °С, относительная влажность воздуха 60 ± 10 % и 12-часовой световой период), они имели свободный доступ к воде и коммерческому питанию. Все этические нормы и требования при работе с животными, изложенные в Декларации прав животных (World Medical Association Declaration of Helsinki: <http://www.who.int/bulletin/archives/79%284%29373.pdf>), были соблюдены.

**Введение МНМ и BrdU.** Кристаллическую МНМ (Sigma) хранили при -20 °С, растворяли в стерильном PBS непосредственно перед внутрибрюшинным введением мышам в объеме не более 0.3 мл. Контрольным животным вводили равный объем PBS. BrdU (Sigma) вводили внутрибрюшинно в стерильном PBS (10 мг/мл) в дозе 50—70 мг/кг (1 инъекция). Первая инъекция BrdU приходилась на 9—10 ч после инъекции МНМ (предполагаемое время репарации ДНК). Последующее введение BrdU продолжалось дважды в день. Всего делали 5—6 инъекций маркера в течение 72—80 ч после начала эксперимента (см. таблицу).

**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.

**Иммобилизация клеток в агарозе, лизис и визуализация клеток.** Разморозенную суспен-

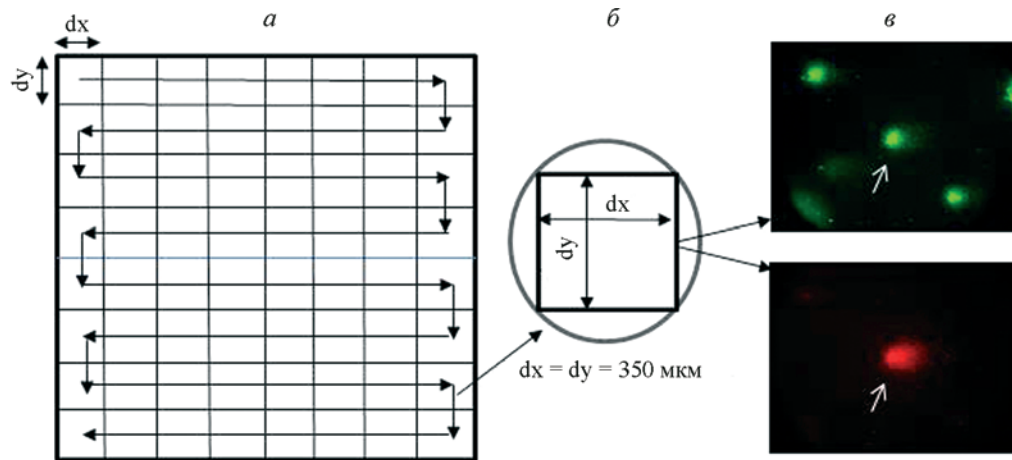


Рис. 1. Схема процедуры сканирования слайда и подсчета клеток в слайде.

*a* — сканирование слайда; *б* — прямоугольное поле  $350 \times 350$  мкм, содержащее клетки (кометы), транслируется на экран монитора (*в*) и сохраняется в памяти компьютера как один из 2500 кадров, составляющих слайд размером  $18 \times 18$  мм. Сканирование происходит попеременно в зеленом и красном спектрах флуоресценции. Зеленые кометы окрашены SYBR-Green, красная комета — ГКМ, окрашенные анти-BrdU антителами с Alexa594. Стрелки указывают одну и ту же комету в двух каналах флуоресценции.

зию центрифугировали (400 *g*, 5 мин). Осадок суспендировали в растворе легкоплавкой агарозы (тип IV 4, Sigma) в PBS (0.7 %). Из суспензии готовили слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет (Тронов и др., 2012). Стекла с застывшим гелем погружали в лизирующий раствор: 0.5 М Na<sub>2</sub>EDTA (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), 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 и 2 мМ Tris, pH 10) при 8 °C на 15 ч. Щелочной лизис и электрофорез проводили в растворе, содержащем 30 мМ NaOH и 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 США), накрывали парафильмом и инкубировали в течение ночи при 8 °C. После трехкратной отмывки в PBS на слайд наносили такой же объем вторичных антител (7 мкг/мл), ассоциированных с Alexa 594 (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. Тотальную популяцию клеток (комет) визуализировали в режиме зеленой флуоресценции красителя SYBR-Green.

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 ( $18 \times 18$  мм) или его репрезентативную часть с шагом 0.35 мм — размер прямоугольника, вписанного в круглое поле обзора микроскопа при увеличении  $400\times$  (рис. 1, *a*, *б*). Сканирование осуществляли попеременно в синей и зеленой областях 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 (рис. 1, *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*) (Койса et al., 2003). Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений *mt* (рис. 2). Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова—Смирнова, считая различия достоверными при  $P < 0.05$ .

В работе использовали стандартные и описанные нами ранее методы иммуногистохимии (Тронов и др., 2015), TUNEL-детекцию апоптоза фоторецепторов в сетчатке (по методике, рекомендованной производителем

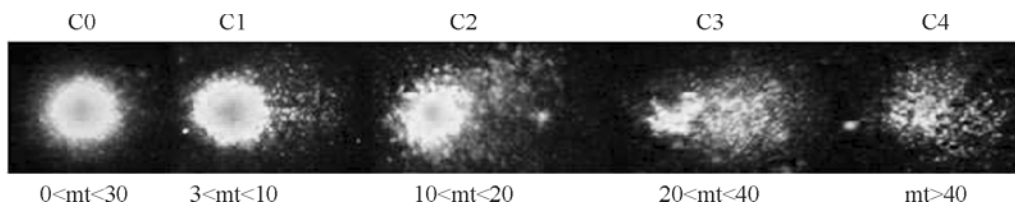


Рис. 2. Классы ДНК-комет, получаемых из клеток сетчатки мышей, и соответствующие им диапазоны степени повреждения (*mt*). Степень повреждения: C0 — отсутствует, C1 — низкая, C2 — средняя, C3 — высокая, C4 — апоптотическая клетка; *mt* — момент хвоста комет.

Trevigen для набора TACS® 2 TdT Fluorescein Kit) и метод скотопической электроретинографии (ЭРГ) (Виноградова и др., 2014).

### Результаты

МНМ-индуцированное повреждение и репарация ДНК в клетках Мюллера. Используемый метод регистрации ГKM в суспензии клеток сетчатки базируется на включении маркера BrdU в течение не менее 72 ч, что более чем длительность одного цикла пролиферации ГKM после ретинотоксического действия МНМ (см. таблицу, схемы 3 и 4). Проникшая в клетку МНМ метилирует основания в ДНК, которые являются субстратом для нескольких клеточных механизмов репарации, ассоциированных с репаративным синтезом ДНК, — эксцизионной репарации оснований (BER), эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) и пострепликативной репарации (MMR). Поскольку MMR характерна только для делящихся клеток, механизмы BER и NER могут быть источником избыточной оценки пролиферативной активации ГKM 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 (см. таблицу). Оценку проводили по частоте BrdU-позитивных клеток, представленной в таблице. Как видно, уровень репаративного включения BrdU в ДНК сетчатки, обработанной МНМ, даже ниже его спонтанного включения в интактной сетчатке. Тем не менее рис. 3 говорит о том, что репаративные процессы в сетчатке, обработанной МНМ, наблюдаются. Этот вывод следует из того факта, что повреждение ДНК от максимального уровня (через 5 ч после инъекции МНМ,  $mt = 28 \pm 12$ )

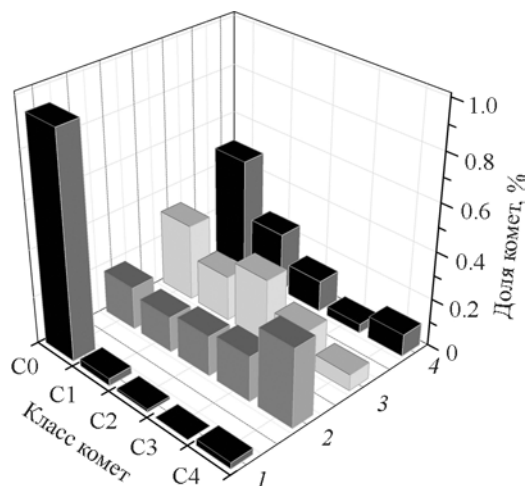


Рис. 3. Гистограммы повреждения ДНК в клетках сетчатки у мышей после инъекции метилнитрозомочевины (МНМ) в дозе 70 мг/кг и репаративной инкубации in vivo.

Гистограммы: 1 — интактная сетчатка ( $mt = 2 \pm 6$ ); 2 — МНМ, 5 ч ( $mt = 28 \pm 12$ ); 3 — МНМ, 24 ч ( $mt = 13 \pm 9$ ); 4 — МНМ, 80 ч ( $mt = 10 \pm 7$ ).

снижается спустя 20 ( $mt = 13 \pm 8, P < 0.05$ ) и 80 ( $mt = 10 \pm 7, P < 0.05$ ) ч. Эта репарация не сопровождается включением BrdU в ДНК. Причина этого может быть связана, с одной стороны, с участием метилгуанинметилтрансферазы (MGMT) — «суицидного» фермента, деметилирующего ОбмеG. Другие метилированные основания ДНК удаляются механизмом BER с короткой однонуклеотидной вставкой, производимой ДНК-полимеразой  $\beta$  (Hegde et al., 2008).

По данным из литературы, на электронно-микроскопических снимках срезов сетчатки среди фоторецепторов

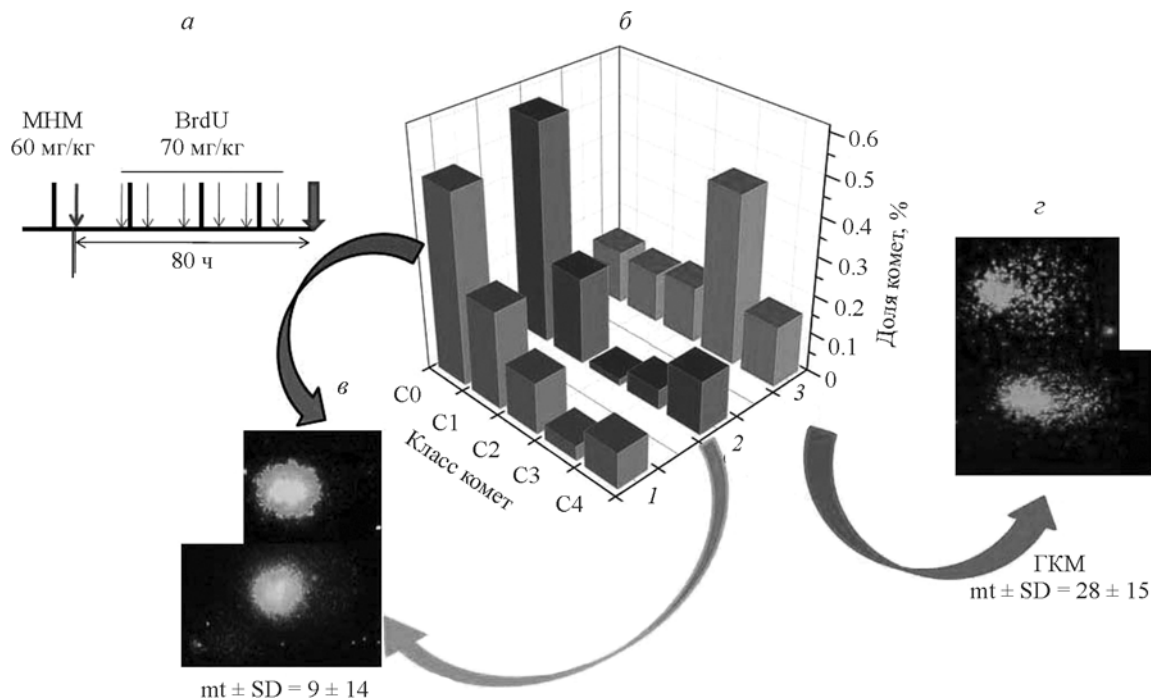


Рис. 4. МНМ-индуцированное повреждение ДНК в сетчатке и в клетках Мюллера (ГKM).

*а* — схема инъекций мышам МНМ и BrdU (указана доза одной инъекции); *б* — гистограммы поврежденности клеток всей сетчатки (1, окраска SYBR-Green), ГKM (2, окраска SYBR-Green) и ГKM (3, окраска Alexa594); *в*, *з* — микрофотографии комет с показателями поврежденности ДНК ( $mt$ , средние значения и стандартные отклонения) для распределений 1, 2 и 3 соответственно.

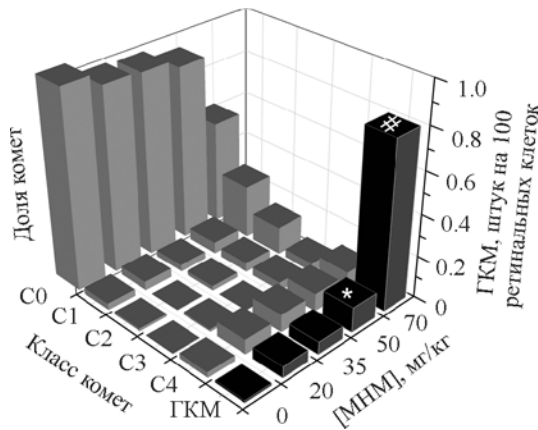


Рис. 5. Повреждение ДНК в клетках сетчатки (серые гистограммы) и активация ГКМ в ней (черные гистограммы) в ответ на однократное введение мышам МНМ в дозах 0, 20, 35, 50 и 70 мг/кг.

Достоверность различий с контролем: \* $P < 0.05$  и # $P < 0.01$ . Схема инъекций такая же, как на рис. 4, а.

с апоптотическим гиперконденсированным хроматитном обнаруживали редкие клетки с интактным гетеро- и эухроматином в ядре (Iandiev et al., 2006). Морфологически эти клетки соответствовали ГКМ, что, по мнению авторов, говорит о высокой устойчивости ГКМ сетчатки крысы к действию МНМ. Мы сравнили степень повреждения ДНК в клетках сетчатки и в ГКМ после инъекции МНМ (схема инъекций на рис. 4, а). Повреждения ДНК оценивали методом щелочных комет. При этом ГКМ окрашивали SYBR и Mab-Alexa 594, что позволяло их ви-

зуализировать одновременно в зеленой и красной флуоресценции. Этот результат представлен на рис. 4, б в виде двух гистограмм распределения ГКМ по степени повреждения в них ДНК (рис. 4, б, гистограммы 2 и 3). Здесь же показана гистограмма распределения суммарных SYBR-окрашенных клеток сетчатки (рис. 4, б, гистограмма 1). Как видно, суммарное распределение клеток сетчатки совпадает с таковым для ГКМ, окрашенных SYBR-Green, и оба они отличаются ( $P < 0.05$ ) от аналогичного распределения для ГКМ, детектируемого в красной области флуоресценции (рис. 4, б, гистограмма 3). На этом же рисунке показаны микрофотографии комет, соответствующих средним показателям  $mt$  для этих распределений ( $mt = 9 \pm 14$  и  $28 \pm 15$  соответственно).

Результат говорит о том, что метод BrdU-детекции повреждений ДНК (рис. 4, б, гистограмма 3) оказывается более чувствительным, чем общепринятая SYBR-детекция (рис. 4, б, гистограмма 2). Мы это объясняем тем, что при щелочном электрофорезе неизбежно образование одонитевых разрывов по местам АП-сайтов, присутствующих в ДНК сетчатки (Тронов и др., 2012). В этих местах начинается расхождение цепей ДНК в щелочи, и эти места и концы молекул наиболее мобильны в электрическом поле. После нейтрализации на концах ренатурированных фрагментов сохраняются одонитевые участки и несовершенные дуплексы. Другими словами, чем дальше от головы кометы, тем больше содержание одонитевых участков (фрагментов) ДНК и тем меньше интенсивность флуоресценции интеркалятора. В случае BrdU такой зависимости от вторичной структуры ДНК нет, и с одинаковой эффективностью, пропорциональной только количеству маркера, определяется мигрирующая в комете ДНК. Сходство профилей гистограмм 1 и 2 (рис. 4), а так-

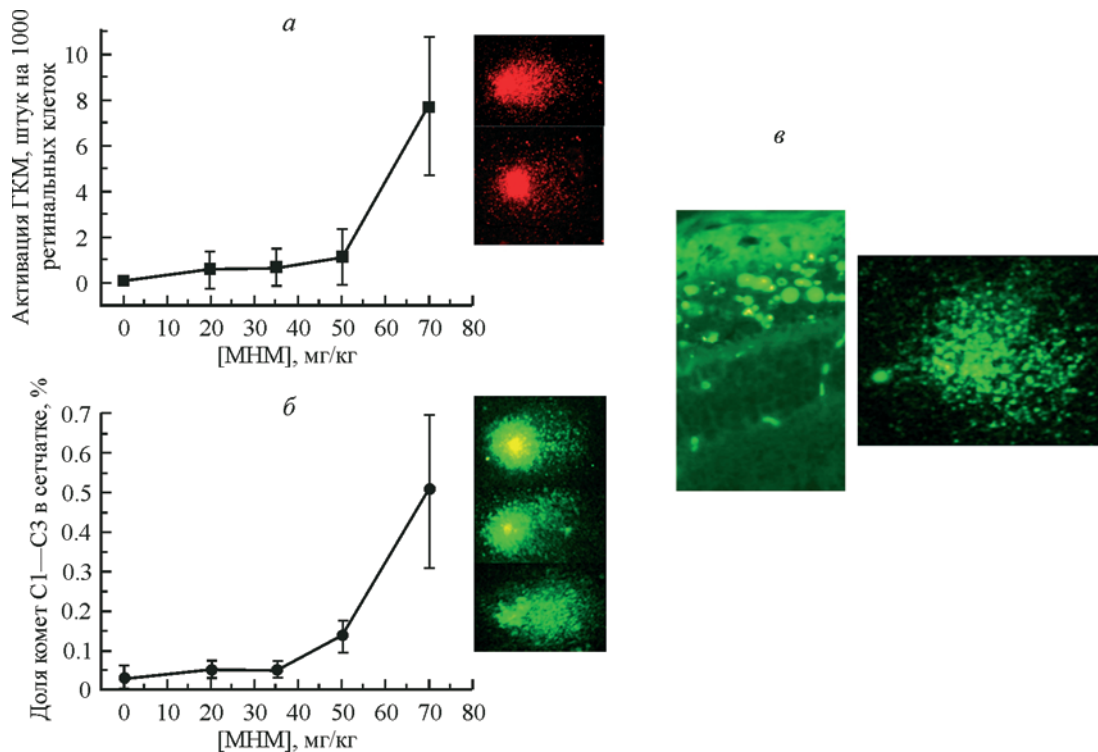


Рис. 6. Ответ клеток сетчатки мышей на разные дозы МНМ спустя 80 ч после инъекции.

а — пролиферативная активация ГКМ (окраска анти-BrdU антителами, ассоциированными с Alexa594); б — доля клеток сетчатки, содержащих реparable повреждения ДНК и микрофотографии соответствующих комет C1, C2 и C3 из этих клеток, окраска SYBR-Green I; в — картина апоптоза в ядерном слое фоторецепторов в сетчатке и ДНК-комета класса C4, формируемая апоптотическими клетками.

же близость средних значений mt (микрофотография *в*) показывают, что ДНК в ГКМ повреждена, по крайней мере в той же степени, в ответ на МНМ, как и в других клетках сетчатки — фоторецепторах и нейронах.

Глиоз глиальных клеток Мюллера (ГКМ) в ответ на действие МНМ. В этой серии экспериментов мы оценивали активацию ГКМ в ответ на разные дозы МНМ и сопоставляли ее с повреждениями ДНК в клетках сетчатки, полагая на основании результатов предыдущего раздела, что МНМ-индуцированные повреждения в клетках сетчатки и в ГКМ примерно одинаковы. Схема инъекций такая же, как в предыдущем случае (рис. 4, *а*), вводимые дозы МНМ — 0, 20, 35, 50 и 70 мг/кг. Данные по повреждению и по активации ГКМ совмещены на рис. 5. На нем *серые гистограммы* показывают повреждение ДНК в сетчатке в виде распределений по классам комет, генерируемых клетками сетчатки спустя 80 ч после введения МНМ в дозах 0—70 мг/кг. Классы комет и диапазоны поврежденности ДНК в клетках (mt) соответствуют таковым на рис. 2. Активация ГКМ при этих же дозах МНМ представлена *черной гистограммой* и выражена как доля BrdU-позитивных комет, формируемых клетками сетчатки.

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 (Chandna, 2004; Noda et al., 2004). На рис. 6, *а, б* приведены зависимости от дозы МНМ пролиферативной активации ГКМ и доли клеток сетчатки, формирующих кометы классов С1—С3, т. е. имеющих репарируемый объем повреждений ДНК. Поскольку МНМ вызывает разрывы не сама по себе, а через активацию механизма BER, почти полное графическое совпадение дозовых зависимостей на этих рисунках может отражать связь между активацией пролиферации ГКМ и репарацией ДНК в сетчатке.

## Обсуждение

Ранее мы и другие исследователи показали, что радиационно- и МНМ-индуцированная дегенерация сетчатки имеет нелинейную зависимость (плечо устойчивости) от дозы генотоксиканта, и предположили причастность к этому репарации ДНК как механизма, который защищает клетки от повреждающего воздействия (Gorgels et al., 2007; Тронов и др., 2015). Здесь мы показали наличие аналогичного плеча дозовой зависимости активации клеток Мюллера (рис. 6, *а*) и накопления клеток в сетчатке с репарируемыми повреждениями ДНК (рис. 6, *б*) в ответ на МНМ.

МНМ *in vivo* индуцирует в ДНК три типа модификаций оснований — ОбмеГ (~10%), N3меА (~5%) и N7меГ (~85%) (Beranek, 1990). Первый из них репарируется MGMT — ферментом, деметилирующим основания в ДНК и подвергающимся протеолизу после каждого акта деметилирования. Будучи нерепарированным, ОбмеГ образует в процессе репликации неканоническую пару с тиминном, что приводит клетки к гибели в результате пострепликативной репарации (MMR) (Bignami et al., 2000; Тронов и др., 2002; Mirzoeva et al., 2006). N3меА и N7меГ являются субстратами для ААГ (алкиладе-

нин-ДНК-гликозилазы) — фермента, инициирующего эксцизионный механизм репарации BER в ответ на действие алкилирующих агентов (Meira et al., 2009). На вопрос о том, могут ли быть ответственны за ретинотоксичность повреждения ДНК, генерируемые МНМ сами по себе, однозначного ответа пока нет, но в последнее время ретинотоксичность алкилирующих агентов связывается с активацией репаративных ферментов (Fu et al., 2012). ААГ, ключевой фермент механизма BER, гидролизует N-гликозидную связь между алкилированным основанием и рибозофосфатным остовом ДНК, оставляя АП-сайт. Сайт является субстратом для АП-эндонуклеазы 1, которая гидролизует в нем фосфодиэфирную связь, формируя одиночный разрыв цепи ДНК с 3'ОН- и 5'dRP-концами. ДНК-полимераза  $\beta$  ( $\text{pol } \beta$ ) 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 АП-сайты и одиночные разрывы, которые в случае разбалансировки этапов BER накапливаются в клетке и приводят 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 N7меГ тормозит работу  $\text{pol } \beta$  (Koag et al., 2014). Как следует из наших результатов (рис. 6), 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 (рис. 6, *в*), и, как мы показали в предыдущем исследовании, снижение функциональной активности сетчатки (по электроретинографии) становится необратимым (Тронов и др., 2015).

Другим вероятным кандидатом на активное участие в МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки считается PARP1 — поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (Allocca et al., 2017). PARP1 играет роль сенсора разрывов в ДНК в процессе BER. Она связывается с разрывом со стороны 5'dRP-конца и просоединяет 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 (Ahel et al., 2009). PAR-модификации подвергаются многие ферменты и структурные белки в хроматине, что делает функционирование PARP1 в клетке высокоэнергетозатратным, приводящим клетку к гибели (Ying et al., 2001). 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 (Сао et al., 2001). Этот механизм подтверждается протекторным действием экзогенного никотинамида против МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс (Kiuchi et al., 2003).

Таким образом, полученные результаты и анализ данных из литературы позволяют наметить связь между повреждениями ДНК, индуцированными алкилирующим агентом МНМ, и активацией клеток Мюллера. Мы полагаем, что между этими событиями в качестве опосредующих находятся активация клеточных репаративных систем и гибель фоторецепторов или нейронов сетчатки. Ответом на гибель этих клеток является глиоз

клеток Мюллера, включающий в себя также их пролиферацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00133 а).

### 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. 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.)
- 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., Ostrovsky M. A. 2012. Mechanisms of radioresistance in terminally differentiated cells of mature retina. Tsitologiya. 54 (3): 261—269.)
- Тронов В. А., Виноградова Ю. В., Поплинская В. А., Некрасова Е. И., Островский М. А. 2015. Радиационное preconditionирование сетчатки глаза у мышей *in vivo* повышает ее устойчивость к последующему генотоксическому воздействию и стимулирует восстановление. Цитология. 57 (2): 119—128. (Tronov V. A., Vinogradova Yu. V., Poplinskaya V. A., Nekrasova E. I., Ostrovsky M. A. 2015. Radiation preconditioning of mouse retina results in tolerance to MNU-induced degeneration and stimulates retinal recovery. Tsitologiya. 57 (2): 119—128.)
- Тронов В. А., Константинов Е. М., Крамаренко И. И. 2002. Роль эксцизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза. Биохимия. 67 (7): 882—889. (Tronov V. A., Konstantinov E. M., Kramarenko I. I. 2002. Role of excision mechanisms of DNA repair in induction of apoptosis. Biochemistry (Moscow). 67 (7): 730—736.)
- Ahel D., Horejsi Z., Wiehens N., Polo S. E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S. C., Jackson S. P., Owen-Hughes T., Boulton S. J. 2009. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. Science. 325: 1240—1243.
- Allocca M., Corrigan J. J., Fake K. R., Calvo J. A., Samson L. D. 2017. PARP inhibitors protect against sex- and AAG-dependent alkylation-induced neural degeneration. Oncotarget. 8: 68 707—68 720.
- Beranek D. T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutat. Res. 231: 11—30.
- Bignami M., O'Driscoll M., Aquilina G., Karran P. 2000. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. Mutat. Res. 462: 71—82.
- Cao W., Tombran-Tink J., Elias R., Szate S., Mrzcek D., McGinnis J. F. 2001. *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 42: 1646—1652.
- Chandna S. 2004. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. Cytometry. A. 61: 127—133.
- Fu D., Calvo J. A., Samson L. D. 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nature Rev. Cancer. 12: 104—120.
- 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., Hoeymakers 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.
- Hegde M. L., Hazra T. K., Mitra S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Res. 18: 27—47.
- Iandiev I., Uckermann O., Pannicke T., Wurm A., Tenckhoff S., Pietsch U. C., Reichenbach A., Wiedemann P., Bringmann A., Uhlmann S. 2006. Glial cell reactivity in a porcine model of retinal detachment. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 47: 2161—2171.
- Jayakody S. A., Gonzalez-Cordero A., Ali R. R., Pearson R. A. 2015. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. Progress Retinal Eye Res. 46: 31—66.
- Kiuchi K., Kondo M., Ueno S., Moriguchi K., Yoshizawa K., Miyake Y., Matsumura M., Tsubura A. 2003. Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. Current Eye Res. 26: 355—362.
- Koag M. C., Kou Y., Ouzon-Shubeita H., Lee S. 2014. Transition-state destabilization reveals how human DNA polymerase  $\beta$  proceeds across the chemically unstable lesion N7-methylguanine. Nucleic Acids Res. 42: 8755—8766.
- Końca 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. Mutat. Res. 534: 15—20.
- Meira L. B., Moroski-Erkul C. A., Green S. L., Calvo J. A., Bronson R. T., Shah D., Samson L. D. 2009. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 106: 888—893.
- Mirzoeva O. K., Kawaguchi T., Pieper R. O. 2006. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and cytotoxicity. Mol. Cancer Ther. 5: 2757—2766.
- Noda Y., Sumino T., Fujisawa Y., Miyata N., Kaiya T., Kohda K. 2004. 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. In Vivo (Athens, Greece). 18: 561—569.
- 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.
- Tsubura A., Lai Y.-C., Miki H., Sasaki T., Uehara N., Yuri T., Yoshizawa K. 2011. Animal models of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. In Vivo. 25: 11—22.
- 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.
- Wan J., Zheng H., Chen Z.-L., Xiao H.-L., Shen Z.-J., Zhou G.-M. 2008. Preferential regeneration of photoreceptor from Muller glia after retinal degeneration in adult rat. Vision Res. 48: 223—234.
- Ying W., Sevigny M. B., Chen Y., Swanson R. A. 2001. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98: 12 227—12 232.
- Yoshizawa K., Sasaki T., Uehara N., Kuro M., Kimura A., Kinoshita Y., Miki H., Yuri T., Tsubura A. 2012. N-ethyl-N-nitrosourea induces retinal photoreceptor damage in adult rats. J. Toxicol. Pathol. 25: 27—35.
- Yuge K., Nambu H., Senzaki H., Nakao I., Miki H., Uyama M., Tsubura A. 1996. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina. In Vivo (Athens, Greece). 10: 483—488.

PROLIFERATION OF MUOSE MÜLLER CELLS IN RESPONSE TO METHYLNITROSOUREA  
INDUCED RETINOTOXIC STRESS*V. A. Tronov*<sup>1,\*</sup> *E. I. Nekrasova*<sup>2</sup> *M. A. Ostrovsky*<sup>2</sup><sup>1</sup> N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow, 119991, and<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, 119991;

\* e-mail: vtronov@yandex.ru

Single intraperitoneal injection of methylnitrosourea (MNU) induces loss of mice retinal photoreceptors as a nonlinear dose response (Tronov et al., 2015). DNA repair was putative mechanism to cause a threshold of alkylation DNA in retina cells. Photoreceptor degeneration can stimulate Müller glia to transdifferentiate into photoreceptor-like cells in adult mouse retina treated with MNU (Wan et al., 2008). In this paper, we evaluated the Muller cells proliferative response to different doses of MNU injections and compared the response to DNA damage and repair in suspensions of retinal cells and in Muller cells, by using a comet assay and BrdU (thymidine analogue) as a marker of proliferation. MNU administration dose  $\leq 40$  mg/kg did not result in any significant activation of Muller cell proliferation in 3 days after the treatment. By this time point, no DNA damage after this dose was observed. For MNU doses that exceed 50 mg/kg, a TUNEL-detected death of retinal photoreceptors, more than 10-fold increase in the proliferating pool of Muller cells, and DNA breaks (single-, double strand breaks and AP sites) are observed. The results are discussed within the concept of disbalance of mechanism base excision repair that results in formation of cytotoxic intermediates in DNA, which initiate death of photoreceptors followed by activation of retinal Müller cells.

Key words: retina, Muller cells, gliosis, DNA damage, reparation, methylnitrosourea.

---