

P19-2013-54

Ю. В. Виноградова*, В. А. Тронов, К. Н. Ляхова,
М. А. Островский

**ПОВРЕЖДЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕТЧАТКИ У МЫШЕЙ
ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ**

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоз экология»

*E-mail: vinojv@jinr.ru

Повреждение и функциональное восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов

Как известно, зрелая сетчатка характеризуется высокой радиостойкостью. Ранее мы показали, что ионизирующая радиация в дозе ≥ 25 Гр и химический генотоксический агент метилнитрозомочевина (МНМ) в концентрации ≥ 60 мг/кг индуцировала острую дегенерацию сетчатки, сочетающуюся с экспрессией проапоптотических белков. Процесс имел высокий генотоксический порог, ниже которого признаки дегенерации не прослеживались.

Цель настоящей работы — оценка повреждающего действия ионизирующей радиации и МНМ на функциональную активность сетчатки и ее способности к восстановлению после воздействия этих генотоксикантов. Функциональную активность сетчатки у мышей оценивали по электроретинограмме (ЭРГ). Параллельно проводился контроль морфологических изменений сетчатки и TUNEL-детекция гибели ее клеточных элементов. Показано, что облучение в дозе до 15 Гр гамма-квантами или ускоренными протонами не вызывает структурных и функциональных изменений сетчатки у мышей, что подтверждает высокую радиорезистентность зрелой сетчатки. Облучение в более высокой дозе 25 Гр вызывает деструкцию слоя фоторецепторных клеток. При этом наблюдается увеличение числа TUNEL-позитивных фоторецепторов, среди которых отмечаются клетки с характерными для апоптоза фрагментированными ядрами. МНМ в концентрации 70 мг/кг приводит к необратимой утрате электрической активности сетчатки, морфологической дегенерации фоторецепторов и их массовой гибели. В то же время МНМ в дозе 35 мг/кг не оказывала цитотоксического действия на сетчатку. Более того, при такой дозе наблюдалось обратимое снижение амплитуды ЭРГ. Было выявлено также наличие у сетчатки адаптивного ответа, который проявлялся при условии двух последовательных инъекций мышам МНМ сначала в дозе 17 мг/кг, а затем в цитотоксической дозе 70 мг/кг.

Полученные результаты указывают на возможность эффекта нейрогормезиса, описанного для сетчатки при действии на нее ионизирующей радиации и некоторых химических веществ.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2013

Damage and Functional Recovery of the Mouse Retina after Exposure to Genotoxic Agents

As is known, the mature retina is characterized by high radiation resistance. We showed earlier that ionizing radiation at a dose of ≥ 25 Gy and the chemical genotoxic agent methylnitrosourea (MNU) in a concentration of ≥ 60 mg/kg induce acute retinal degeneration, combined with proapoptotic protein expression. The process has a high genotoxic threshold, below which no degeneration signs were traced.

The aim of this work was to study the damaging effect of ionizing radiation and MNU on the functional activity of the retina and its ability to recover after exposure to these genotoxicants. The functional activity of the mouse retina was evaluated with electroretinograms (ERG). In parallel, morphological changes in the retina were controlled, and the TUNEL detection of the death of its cell elements was performed. It has been shown that gamma rays or accelerated proton irradiation below 15 Gy cause no structural or functional changes in the mouse retina, which confirms the mature retina's high radiation resistance. Irradiation with a higher dose of 25 Gy leads to photoreceptor layer destruction. This goes along with an increase in the number of the TUNEL-positive photoreceptors, among which are cells with fragmented nuclei, which are typical of apoptosis. MNU in a concentration of 70 mg/kg caused the irreversible loss of the retina's physiological activity, and the morphological degeneration of photoreceptors and their mass death. In a concentration of 35 mg/kg, however, MNU had no cytotoxic effect on the retina. Moreover, this dose caused a reversible ERG amplitude decrease. Also, adaptive response was observed in the retina, which became apparent after two consecutive MNU injections — first, at a dose of 17 mg/kg; then, at a cytotoxic dose of 70 mg/kg. These results point to the possibility of the neurohormesis effect, which was described concerning the retina's exposure to ionizing radiation and some chemicals.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2013

ВВЕДЕНИЕ

В 1990-х гг. был описан дегенеративный процесс в сетчатке у мышей и крыс, индуцированный метилнитрозомочевинной (МНМ) [6]. В основе ретинотоксического эффекта лежала апоптотическая гибель фоторецепторов. В последующие годы во многих работах МНМ использовалась в качестве индуктора гибели фоторецепторов *in situ* [7]. МНМ — монофункциональный алкилирующий агент, модифицирующий основания в ДНК. В силу этого МНМ используется в качестве индуктора эксцизионных механизмов репарации ДНК [8], а в случае сетчатки — дорепликативной репарации (BER) [9]. Что касается действия на сетчатку ионизирующей радиации, то, как было показано, зрелая сетчатка характеризуется высокой радиоустойчивостью [9–11]. Как ионизирующая радиация, так и МНМ способны индуцировать острую дегенерацию сетчатки, сочетающуюся с экспрессией проапоптотических белков PARP, Вах, AP-1 [1, 12]. Следует подчеркнуть, что индуцированная дегенерация сетчатки имеет высокий генотоксический порог, ниже которого признаки дегенерации не прослеживаются [1].

Целью нашей работы была оценка действия ионизирующей радиации и МНМ на функциональную активность сетчатки — электроретинограмму (ЭРГ) и на ее способность к восстановлению после действия этих генотоксикантов. Параллельно с регистрацией ЭРГ контролировались морфологические изменения клеточных слоев сетчатки и проводилась TUNEL-детекция гибели ее клеточных элементов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводились на половозрелых мышах линии СВАхС57В1 (♀), в возрасте 2,5 мес. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях ($(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха $(60 \pm 10)\%$ 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 0,64 Гр/мин,

а также ускоренными протонами (на медико-техническом комплексе) — тотально в дозе 14 Гр и область головы в дозе 25 Гр (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна). Энергия частиц в пучке 150 МэВ/нуклон, ЛПЭ 10 кэВ/мкм, мощность дозы 1 Гр/мин.

Морфологические исследования. 5-мкм срезы сетчатки на предметном стекле окрашивали смесью гематоксилин–эозин и микроскопировали в проходящем свете. Морфометрические измерения проводили с помощью окулярной линейки.

TUNEL-детекция гибели клеток. Использовали стандартный набор для проведения реакции TUNEL в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле (Trevigen, http://www.trevigen.com/item/508/TACS_2_TdT_Fluorescein_Kit/). Все операции выполнялись согласно прилагаемой инструкции. Визуализацию проводили на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для FITC-флуоресценции.

Регистрация ЭРГ. Мыши перед регистрацией ЭРГ проходили темновую адаптацию (не менее 12 ч) и лишались еды на 24 ч. При тусклом свете мыши были анестезированы внутримышечной инъекцией смеси золитил–ксилазин 1/1, доза 0,2 мл на 100 г веса животного. Для расширения зрачка в глаз закапывали 0,5 %-й раствор мидриацила. Электрод опускался на глазное яблоко, как контактная линза; игольчатые электроды сравнения и заземления вводились под кожу около ушей. ЭРГ записывалась электрофизиологической системой «Нейрософт» с использованием программы Нейро-МВП.NET. Стимуляцию ответа сетчатки осуществляли с помощью мини-ганцфельд-стимулятора. Длительность вспышки 5 мс, логарифм интенсивности варьировался от -3 до $-0,5$. ЭРГ характеризовалась амплитудой, равной сумме a - и b -волн. Результат представлялся в виде среднего значения, найденного из трех последовательно снятых ЭРГ при значениях логарифма интенсивности вспышек $-1,5$, -1 и $-0,5$ с интервалом между ними 5 мин. При таком режиме регистрации в этом диапазоне зависимость амплитуды ЭРГ от интенсивности вспышки выходит на плато, что позволяет корректно проводить сравнение этого параметра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Гамма-облучение и ускоренные протоны в дозе 14 Гр не изменяют морфологию сетчатки и амплитуду ЭРГ.

Как показали микроскопические исследования срезов сетчатки, морфология клеточных слоев и сетчатки в целом в результате облучения гамма-квантами и ускоренными протонами в дозе 14 Гр не изменяется в течение всего времени жизни мышей (≤ 7 сут). Это отражено на рис. 1, *а*. Здесь же представлены результаты морфометрических измерений срезов сетчатки, которые подтверждают отсутствие изменений (рис. 1, *б*).

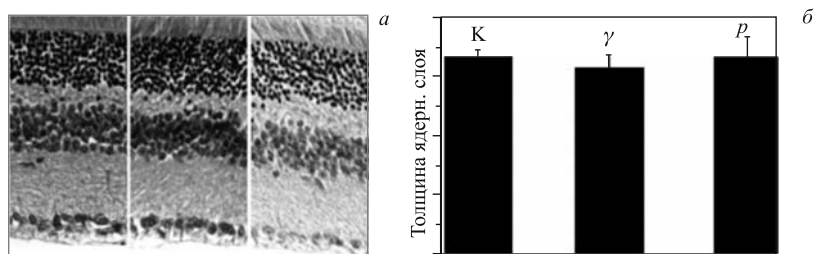


Рис. 1. Облучение гамма-квантами (γ) и ускоренными протонами (p) в дозе 14 Гр. Морфологических изменений по сравнению с контролем (К) в сетчатке мышей спустя 3–5 сут после тотального облучения животных не выявлено

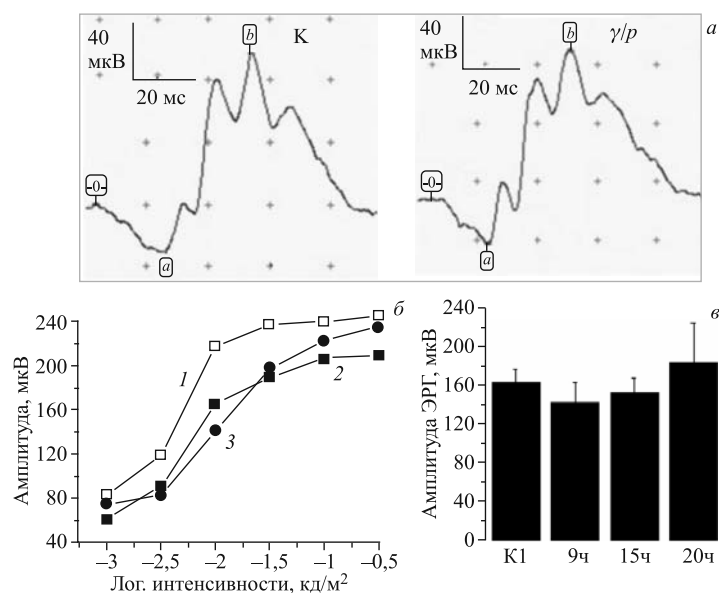


Рис. 2. а) Профиль ЭРГ мышей после тотального облучения в дозе 14 Гр; б) зависимость амплитуды от интенсивности вспышки: 1 — контроль, 2 — через 15 ч после облучения, 3 — через 20 ч после облучения; в) гистограмма амплитуд в максимуме после тотального облучения животных в дозе 14 Гр

Для интактных и облученных в дозе 14 Гр животных определяли зависимость амплитуды ЭРГ от интенсивности возбуждающей вспышки с интервалом между вспышками 5 мин (рис. 2, б). Как видно, и для контрольных, и для облученных животных зависимость выходит на плато в области интенсивностей $-1,5 \div -0,5$ лог. ед. Это делает правомочным усреднение амплитуды ЭРГ в этом диапазоне интенсивностей. Найденные таким образом средние

значения амплитуды ЭРГ отражены в гистограмме (рис. 2, в). Из гистограммы следует, что достоверные отличия между контрольными и облученными животными отсутствуют. Таким образом, можно заключить, что облучение мышей гамма-квантами и ускоренными протонами в дозе до 14 Гр не вызывает структурных изменений и функциональных нарушений сетчатки, что иллюстрируется рис. 2, а.

2. Облучение ускоренными протонами в дозе 25 Гр вызывает гибель фоторецепторов и снижает амплитуду ЭРГ.

Увеличение дозы облучения протонами до 25 Гр вызывает заметную морфологическую деструкцию сетчатки спустя 3 сут после воздействия (рис. 3, а, в). Как показывает TUNEL-тестирование, этот процесс сопровождается массовой гибелью фоторецепторов (рис. 3, б, г). Строго говоря, на основании только результатов TUNEL нельзя сделать вывод о механизме клеточной гибели (апоптоз–некроз), поскольку в основе метода лежит реакция терминальной нуклеотидтрансферазы, маркирующей разрывы ДНК. Тем не менее мы не исключаем участия в гибели фоторецепторов после облучения

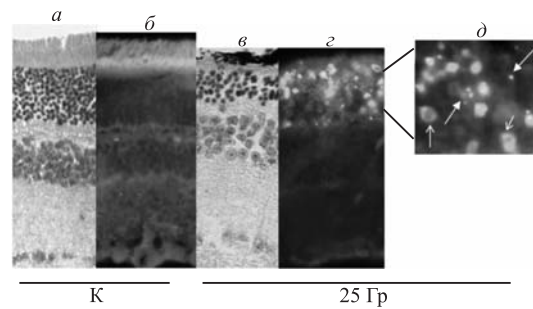


Рис. 3. Дегенерация сетчатки у мышей под действием облучения ускоренными протонами в дозе 25 Гр. а, в) морфологическая деструкция; б, г, д) TUNEL-детектируемая гибель фоторецепторов

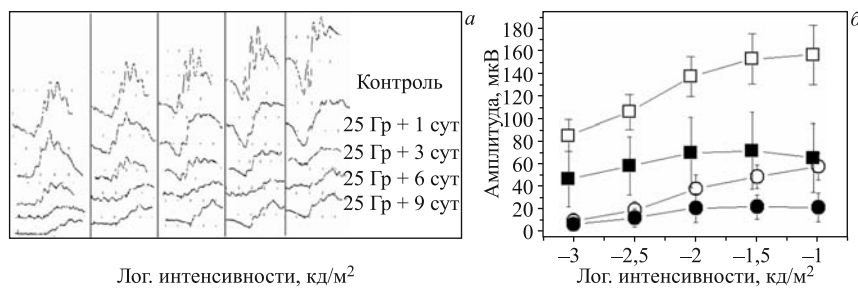


Рис. 4. а) Изменение профиля ЭРГ; б) амплитуды а- (темные кружки) и б- (темные квадраты) волн ЭРГ мышей в ответ на облучение протонами в дозе 25 Гр по сравнению с контролем (светлые кружки и квадраты)

протонами механизма апоптоза, что подтверждается наличием в ядерном слое фоторецепторов характерных фрагментированных ядер и ядер, содержащих конденсированный хроматин (рис. 3, *d*).

На рис. 4, *a* представлено изменение профиля ЭРГ у мышей, облученных протонами в дозе 25 Гр, в зависимости от интенсивности светового стимула. Как видно, облучение вызывает снижение во времени амплитуды ЭРГ во всем исследуемом диапазоне интенсивностей возбуждения. Эта же зависимость для *a*- и *b*-волн ЭРГ показана на рис. 4, *b*, из которого следует, что падение ЭРГ нарастает с увеличением интенсивности светового стимула.

3. Действие МНМ на структуру и функциональную активность сетчатки.

В нашей работе цитотоксической дозой МНМ для сетчатки была доза 70 мг/кг. При такой высокой дозе, как и после облучения протонами в дозе 25 Гр, мы наблюдали деструкцию сетчатки, а именно деструкцию слоя фоторецепторных клеток (рис. 5, *a*). В этом же ряду микрофотографий представлен увеличенный фрагмент ядерного слоя фоторецепторов, на котором стрелками отмечены характерные для апоптоза фрагментированные ядра. Это указывает на то, что гибель фоторецепторных клеток при действии МНМ (70 мг/кг) включает в себя и апоптоз. Цитотоксическая доза МНМ 70 мг/кг монотонно и необратимо снижает амплитуду ЭРГ мышей, как это следует из рис. 5, *b*.

Характерно, что по морфологическим показателям доза МНМ 35 мг/кг, как и доза облучения 14 Гр, не является цитотоксической. Это подтверждает микрофотография сетчатки после инъекции МНМ в дозе 35 мг/кг (рис. 5, *a*). Однако инъекция мышам МНМ в дозе 35 мг/кг приводит к достоверному снижению ЭРГ (рис. 5, *b*). Существенно, что это снижение оказывается обратимым (серая гистограмма на рис. 5, *b*).

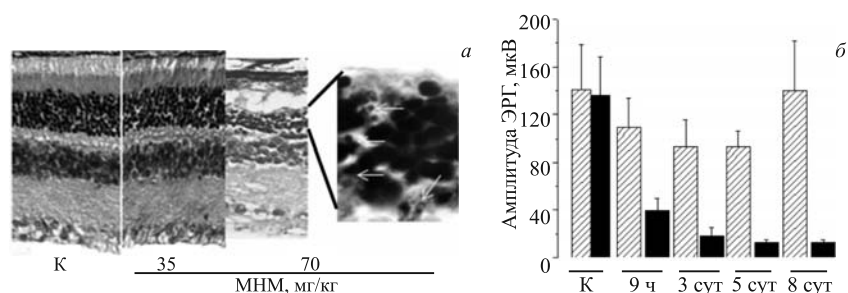


Рис. 5. *a*) Цитотоксический эффект метилнитрозомочевины на морфологию сетчатки у мышей спустя 3 сут после однократного введения агента; стрелками показаны фрагментированные апоптотические ядра фоторецепторов. *б*) Влияние МНМ на амплитуду ЭРГ у мышей спустя разное время после однократного введения агента животным в дозах 35 мг/кг (серая гистограмма) и 70 мг/кг (черная гистограмма)

4. Адаптивный ответ ЭРГ сетчатки у мышей на МНМ.

Представленные выше результаты свидетельствуют о высоком генотоксическом пороге у сетчатки. В случае нетоксичной или малотоксичной дозы облучения (14 Гр) и МНМ (35 мг/кг) обнаруживается способность сетчатки к восстановлению ее функциональной активности: повышение амплитуды ЭРГ. Такое восстановление физиологической активности после умеренного генотоксического стресса указывает на способность сетчатки к адаптивному ответу. Иными словами, речь идет о «защитном» действии малой дозы химического генотоксиканта (МНМ) в отношении последующего введения этого же генотоксиканта, но уже в большей, несомненно токсичной, дозе.

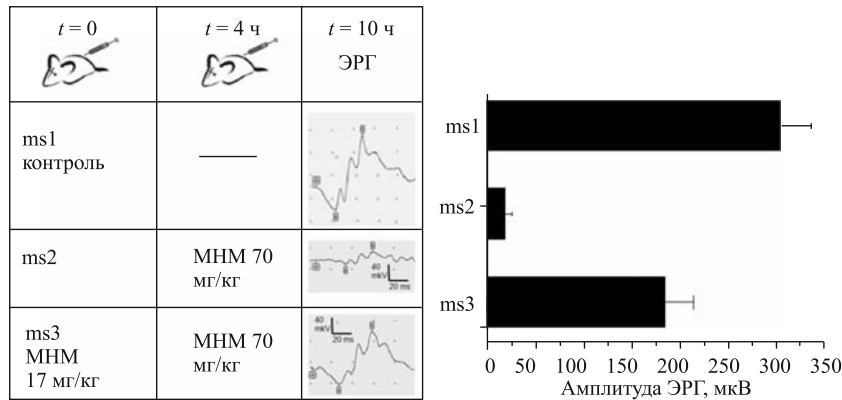


Рис. 6. Схема (а) и результат (б) эксперимента по влиянию фракционированного (17 + 70 мг/кг) введения МНМ на ЭРГ у мышей

Рис. 6 представляет схему (а) и результат (б) опыта по адаптивному ответу сетчатки на последовательное воздействие МНМ сначала в нетоксической (17 мг/кг) и спустя 4 ч в токсической дозе 70 мг/кг. Как видно, через 6 ч после воздействия МНМ в дозе 70 мг/кг профиль ЭРГ восстанавливается. Хотя амплитуда ЭРГ остается сниженной по сравнению с контрольной сетчаткой (рис. 6, б), она тем не менее достоверно выше амплитуды ЭРГ после единственной инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что МНМ, в отличие от ионизирующей радиации, селективно действует на сетчатку у мышей, вызывая гибель только фоторецепторов [1, 11, 13]. Этот деструктивный эффект устойчив и воспроизводим при однократном введении МНМ в дозе ≤ 60 мг/кг. Как следует из результатов

нашей работы, цитотоксическая доза МНМ вызывает монотонное и необратимое снижение электрической активности сетчатки, завершающееся полной утратой зрения у животных через 6–8 дней после введения агента. Вместе с тем отмечается резкая зависимость цитотоксического эффекта МНМ от дозы агента: 35 мг/кг не вызывают деструктивных изменений в сетчатке (рис. 1, а).

Другой генотоксический агент — ионизирующая радиация в дозе 25 Гр — также вызывает деструкцию сетчатки, обусловленную гибелью фоторецепторов, и сопровождается снижением амплитуды *a*- и *b*-волн ЭРГ. Это снижение электрической активности сетчатки у облученных животных сохранялось в течение времени их жизни (9 сут). Высокая радиоустойчивость сетчатки в интервале доз гамма-излучения и ускоренных протонов ≤ 20 Гр и резкая концентрационная зависимость цитотоксического эффекта МНМ свидетельствуют о наличии высокого генотоксического порога у зрелой сетчатки мышей. Само по себе наличие генотоксического порога может свидетельствовать о протекторном механизме или механизме восстановления сетчатки от повреждения. Действительно, доза МНМ, вдвое меньшая цитотоксической, вызывает меньшее и, что существенно, обратимое снижение амплитуды ЭРГ. Этот факт, а также протекторное действие предварительно введенной малой дозы МНМ в отношении последующего введения явно цитотоксической дозы указывают на способность сетчатки к адаптивному ответу на такое воздействие.

В токсикологии такой адаптивный ответ получил название «нейрогормезис» [14]. Он был описан в отношении действия радиации на глаз экспериментальных животных [2, 15]. У человека к подобному явлению можно отнести эпидемиологические данные о снижении частоты заболевания глаукомой в популяции людей, переживших атомную бомбардировку в Японии [3, 4]. Механизм нейрогормезиса в ответ на генотоксическое химическое [5] или радиационное воздействие неизвестен. Не исключено, что какую-то роль в этом могут играть образующиеся в сетчатке эндогенные протекторы, повышающие ее устойчивость к окислительному и генотоксическому стрессам [16].

Возможно также, что в адаптивном ответе сетчатки на генотоксический стресс могут принимать участие ее глиальные мюллеровские клетки, чутко реагирующие на различные деструктивные изменения [17]. В последующих экспериментах мы намерены исследовать адаптивный ответ этих клеток на действие радиации и МНМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тронов В. А. и др. Механизмы радиорезистентности терминально дифференцированных клеток зрелой сетчатки глаза // Цитология. 2012. Т. 54, № 3. С. 261–269.
2. Anderson M. G. et al. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma // PNAS. 2005. V. 102, No. 12. P. 4566–4571.
3. Miyachi Y. et al. Changes of aggressive behavior and brain serotonin turnover after very low-dose X-irradiation of mice // Neurosci. Lett. 1994. No. 175. P. 92–94.

4. Yamada M. *et al.* Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors. 1958–1998 // *Rad. Res.* 2004. V. 161, No. 6. P. 622–632.
5. Mattson M. P., Son T. G. Viewpoint: mechanisms of action and therapeutic potential of neurohormetic phytochemicals // *Dose Response.* 2007. V. 5, No. 3. P. 174–186.
6. Yuge K. *et al.* N-methyl-N-nitrosourea induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina // *In vivo.* 1996. No. 10. P. 483–488.
7. Tsubura A. *et al.* Review: Animal models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials // *In Vivo.* 2011. V. 25, No. 1. P. 11–22.
8. Tronov V. A. *et al.* Sensitivity of human lymphocytes to the genotoxic effect of N-methyl-N-nitrosourea: possible relation to gynecological cancers // *Exp. Oncol.* 2006. V. 28, No. 4. P. 314–318.
9. Логинова М. Ю. *и др.* Радиорезистентность сетчатки: под действием гамма-излучения в сетчатке мышей формируются разрывы ДНК, увеличивается содержание белка р53, сопровождаемые репарацией ДНК и отсутствием апоптоза клеток // *Радиобиология. Радиоэкология.* 2008. Т. 48, № 6. С. 698–704.
10. Mao X. W. *et al.* Radioprotective effect of a metalloporphyrin compound in rat eye model // *Current Eye Res.* 2009. No. 34. P. 62–72.
11. Gorgels T. G. *et al.* Retinal degeneration and ionizing radiation hypersensitivity in a mouse model for cockayne syndrome // *Mol. Cell. Biol.* 2007. No. 27. P. 1433–1441.
12. Uehara N. *et al.* Nicotinamide blocks N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in rats through poly(ADP-ribose) polymerase activity and Jun N-terminal kinase/activator protein-1 pathway inhibition // *Exp. Eye Res.* 2006. No. 82. P. 488–495.
13. Tsubura A. *et al.* N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals // *Acta Histochem. Cytochem.* 2003. V. 36, No. 4. P. 263–270.
14. Luckey T. D. Radiation hormesis: the good, the bad, and the ugly // *Dose Response.* 2006. V. 4, No. 3. P. 169–190.
15. Otani A. *et al.* Low-dose-rate, low-dose irradiation Delays neurodegeneration in a model of retinitis pigmentosa // *The American Journal of Pathology.* 2012. V. 180, No. 1. P. 328–336.
16. Li F., Cao W., Anderson R. E. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light // *Exp. Eye Res.* 2001. No. 73. P. 569–577.
17. Chollangi S. *et al.* Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina // *Neurobiol. Dis.* 2009. V. 34, No. 3. P. 535–544.

Получено 29 мая 2013 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 03.09.2013.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,68. Уч.-изд. л. 0,84. Тираж 205 экз. Заказ № 58057.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/