

УДК 577.3

## ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК И БЕЛКА p53 ОГРАНИЧИВАЮТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЮЛЛЕРА В СЕТЧАТКЕ МЫШЕЙ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ

© 2020 г. В.А. Тронов\*, Е.И. Некрасова\*\*

\*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

\*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: vtronov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.11.2019 г.

После доработки 17.11.2019 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Известно, что системная инъекция крысам метилнитрозомочевина вызывала гибель фоторецепторов в сетчатке и последующую дифференцировку клеток глии Мюллера в фоторецептор-подобные клетки. Однако пролиферативная способность клеток глии Мюллера у крыс очень ограничена и сопровождается экспрессией гистона  $\gamma$ H2AX и белка p21, которые, как известно, являются компонентами клеточного ответа на повреждение ДНК («DNA damage response»). Это ограничение препятствует заместительной терапии сетчатки с помощью клеточной трансплантации. С другой стороны, механизм наблюдаемого ограничения пролиферации клеток глии Мюллера в сетчатке млекопитающих пока не известен. Мы исследовали пролиферативный ответ клеток Мюллера, поврежденность ДНК в них в пострепликативный период, а также экспрессию белка p53 в ответ на ретиноксическое воздействие метилнитрозомочевина. Показали, что метилнитрозомочевина вызывала дегенерацию сетчатки у мышей, которая выражалась в апоптотической гибели фоторецепторов. При этом остальные клеточные слои сетчатки сохраняли интактную морфологию. Тем не менее во всех клетках сетчатки через 5 ч после инъекции метилнитрозомочевина наблюдалось формирование разрывов и щелочлабильных сайтов в ДНК, которые практически полностью удалялись спустя 15 ч после инъекции метилнитрозомочевина. Однако к 72 ч в клетках глии Мюллера наблюдали достоверное увеличение разрывов ДНК. Отсутствие в последующее время включения бромдезоксисуридина в клетки сетчатки говорит об отсутствии пролиферации клеток глии Мюллера и репаративного синтеза ДНК. Вместе с тем в сетчатке наблюдалось увеличение экспрессии белка p53 – универсального маркера повреждений в ДНК. Полученные результаты подтверждают концепцию «DNA damage response» в отношении клеток глии Мюллера, которая связывает повреждения ДНК в клетках глии Мюллера с ограниченной пролиферацией этих клеток у мышей. Пострепликативная репарация рассматривается как вероятный механизм формирования разрывов ДНК в пострепликативных клетках глии Мюллера.

*Ключевые слова:* сетчатка, клетки Мюллера, фоторецепторы, апоптоз, разрывы ДНК, репарация ДНК, p53, метилнитрозомочевина.

DOI: 10.31857/S000630292003014X

К нейродегенеративным заболеваниям сетчатки относятся пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация сетчатки, глаукома и диабетическая ретинопатия. В основе этих заболеваний лежит необратимая утрата ретинальных клеток. Одна из стратегий терапии этих заболеваний базируется на стимуляции эндогенных стволовых клеток в глии, способных восполнять патологическую утрату клеток сетчатки [1]. Глия в сетчатке состоит на 90% из глиальных клеток

Мюллера (ГКМ), которые в ответ на повреждение сетчатки подвергаются глиозу, включающему в себя дедифференцировку, пролиферацию и в конечном счете дифференцировку ГКМ в ретинальные фоторецепторы и нейроны [2]. Процесс регенерации сетчатки присутствует в некоторых видах позвоночных (рыбы, амфибии, птицы).

Важнейшими источниками повреждения сетчатки являются наследственная предрасположенность к дегенерации из-за мутаций в специфических генах, естественная агрессивность окружающей среды (оксигенация, световое и радиационное воздействия, химическая токсич-

*Сокращения:* ГКМ – глиальные клетки Мюллера, BrdU – бромдезоксисуридин, МНМ – метилнитрозомочевина, PBS – натрий-фосфатный буфер.

ность), радиационная и химиотерапия при онкологических заболеваниях. В последнее время обращается внимание на окуло- и ретинотоксичность химиотерапии опухолей, поскольку большинство применяемых при этом препаратов обнаруживают ретинотоксичность *in vitro*, а используемые в химиотерапии интерферон и алкилирующие соединения проявляют ретинотоксическое действие в экспериментах на животных [3, 4]. В частности, метилнитрозомочевина широко используется в животных моделях для исследования дегенерации и восстановления сетчатки [5].

Хотя во многих работах наблюдали глиоз клеток Мюллера в сетчатке грызунов, существует устойчивое представление о том, что у млекопитающих регенеративная способность сетчатки крайне ограничена: только небольшая часть потомства делящихся ГKM у млекопитающих выживает, сохраняет способность к делению и дифференцировке [6]; основная же часть ГKM дифференцируется в фибробласты и формирует глиальный шрам [7, 8]. С одной стороны, это ограничение препятствует заместительной терапии сетчатки с помощью клеточной трансплантации. С другой стороны, механизм наблюдаемого ограничения пролиферации ГKM в сетчатке пока не известен. Таким образом, понимание молекулярных событий в ГKM после повреждения сетчатки может наметить путь к усилению регенеративной способности сетчатки у млекопитающих. В данной работе предпринята попытка определить повреждение ДНК в ГKM сетчатки у мышей в связи с возможной причастностью этих повреждений к ограничению пролиферации ГKM и регенерации сетчатки.

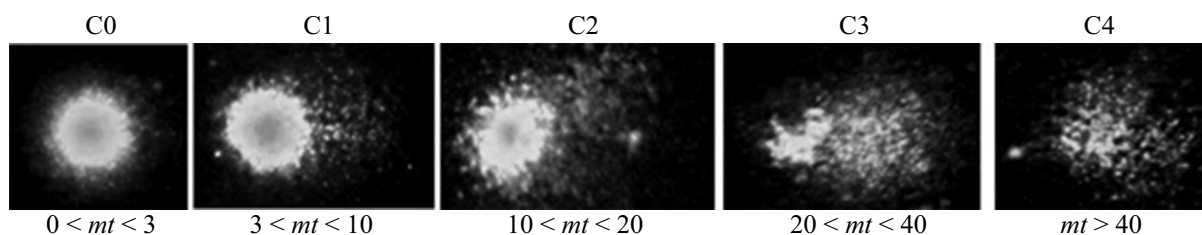
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные и инъекции метилнитрозомочевины и бромдезоксигуанидина.** Исследования проводили на половозрелых мышах-гибридах F1CBAx57Bl6 (♀), 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 неограниченный доступ к воде и коммерческому питанию. Методический подход для исследования глиальных клеток Мюллера у мышей базировался на модели, в которой острая дегенерация сетчатки у мышей индуцируется системной (однократной, внутрибрюшинной) инъекцией ретинотоксического агента [6]. В ответ на дегенерацию сетчатки активируется пролиферация ГKM, которую фиксировали по включению в ядра ГKM пролиферативного маркера бромдезоксигуанидина (BrdU, Sigma, США). В качестве ретинотоксического агента использовали метилнитрозомочевину (МНМ, Sigma), которую хранили в кристаллическом виде при  $-60^\circ\text{C}$ . МНМ растворяли в стерильном на-

трий-фосфатном буфере (PBS) непосредственно перед опытом в концентрации  $\sim 0.1\text{ M}$  и вводили мышам однократно внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 0.4 мл. Контрольным животным вводили равный объем PBS. Спустя сутки после инъекции МНМ животным три-шесть раз внутрибрюшинно вводили BrdU в виде раствора в стерильном PBS (10 мг/мл), доза 60–70 мг/кг на инъекцию. Ретинотоксический эффект оценивали спустя 72–110 ч после инъекции препаратов.

**Получение суспензии клеток сетчатки.** Спустя 5 ч после последней BrdU-инъекции животных усыпляли в парах хлороформа и извлекали глаза и сетчатку. Сетчатку диспергировали в объеме 0.2–0.4 мл PBS, дважды центрифугировали по 5 мин при 400 g. Конечный осадок суспендировали в фетальной сыворотке быка, содержащей 10% диметилсульфоксида. Аликвоты суспензии хранили при  $-70^\circ\text{C}$ .

**Метод ДНК-комет: иммобилизация клеток в агарозе, лизис, электрофорез и визуализация клеток.** Размороженную суспензию клеток центрифугировали (400 g, 5 мин). Осадок суспендировали в растворе легкоплавкой агарозы (тип IV, Sigma, США) в PBS. Из суспензии готовили слайд на предметном стекле по стандартной процедуре метода комет [9]. Лизис в щелочи, электрофорез, последующие нейтрализацию и фиксацию проводили согласно процедуре, детально описанной нами ранее [10]. Проллиферирующие ГKM проявляли с помощью первичных анти-BrdU антител (10 мкг в 60 мкл PBS/слайд; Abcam, США) и вторичных антител (1 мкг/100 мкл/слайд), ассоциированных с Alexa 594 (Abcam, США). Фоновое окрашивание, проявляющее все ДНК-содержащие клетки в слайде проводили красителем SYBR-Green I. ГKM визуализировали в режиме красной флуоресценции Alexa 594. Клетки/кометы визуализировали в режиме зеленой флуоресценции красителя SYBR-Green I. Сканирование слайда проводили на микроскопе AxioImager Z2m (Carl Zeiss, Германия), снабженном камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Сканировали весь слайд (18×18 мм) или его репрезентативную часть с шагом 350 мкм, соответствующим размеру прямоугольника, вписанного в круглое поле обзора микроскопа при увеличении 400×. Сканирование осуществляли попеременно в синей и в зеленой области возбуждения флуоресценции. Первое сканирование давало изображение клеток (комет), флуоресцирующих в области зеленой флуоресценции SYBRGreen I (все клетки сетчатки, содержащие ДНК). Второе сканирование давало изображение только BrdU-позитивных красных клеток/комет. Изображения накапливали в памяти компьютера. 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 оцени-



**Рис. 1.** Классы ДНК-комет, получаемых из клеток сетчатки мышей, и соответствующие им диапазоны поврежденности: C0 – отсутствие повреждений, C1 – низкий уровень повреждений, C2 – средний уровень повреждений, C3 – высокий уровень повреждений, C4 – апоптотическая клетка.

вали по моменту хвоста комет ( $mt$ ) [11]. Полученные данные представляли в виде распределения комет по 5 классам, каждому из которых соответствовал свой интервал значений  $mt$  (рис. 1). Сравнение экспериментальных распределений проводили, используя непараметрическую статистику Колмогорова–Смирнова, считая различия достоверными при  $P < 0.05$ .

**Приготовление тканевых срезов.** Тканевые срезы сетчатки толщиной 8–12 мкм готовили из глаз, фиксированных в параформальдегиде (4%-й раствор в PBS, 8°C, 24 ч), сразу после извлечения. Последующие процедуры спиртовой отмывки, впаивание в парафиновые блоки и приготовление срезов были стандартные и описаны нами ранее [12]. Срезы на предметном стекле окрашивали красителем SYBR Green I и анализировали микроскопически во флуоресцентном режиме. Для морфометрического измерения слоев сетчатки использовали окулярную линейку.

**Оценка апоптоза в ткани методом TUNEL.** Для регистрации гибели клеток в микроскопических срезах сетчатки на предметном стекле использовали набор The TACS<sup>®</sup> 2 TdT Fluorescein kit (Ser. Nu. 4812-30-K, Trevigen, США) [13] и рекомендованную методику к нему. Визуализацию проводили на микроскопе ЛОМО МИКМЕД-2 (АО «ЛОМО», Россия) в флуоресцентном режиме, с набором фильтров для регистрации флуоресценции красителя FITC.

**Детекция апоптотической фрагментации ДНК.** Для детекции апоптотической фрагментации ДНК использовали суспензию клеток после стандартной процедуры экстракции из них ДНК и ее электрофоретического разделения в агарозном геле [14]. Электрофорез в 1,5%-м агарозном геле проводили при напряжении 2В/см под визуальным контролем формирования лесенки нуклеосом в геле.

**Иммуногистохимия.** Иммуногистохимическое исследование тканевых срезов после их депарфинизации, фиксации и пермеабиллизации проводили в соответствии со стандартным протоколом к набору The TACS<sup>®</sup> 2 TdT Fluorescein kit (Trevigen, США) [13]. Для этого использовали мо-

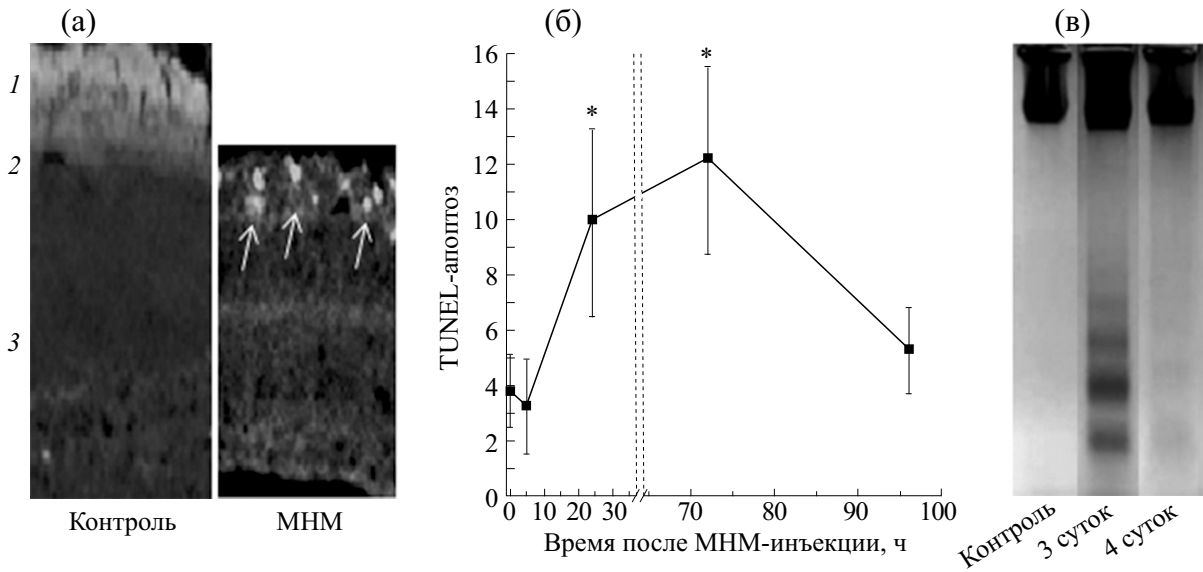
ноклональные антитела к белку p53 (Abcam, США) и к BrdU (Abcam, США). Все вторичные антитела были конъюгированы с флуоресцентными красителями Alexa594 или FITC. Слайды подвергали флуоресцентной микроскопии. Количественно оценивали либо число флуоресцирующих клеток на единичную площадь среза, либо суммарную интенсивность флуоресценции единичной площади среза, которую сравнивали с контролем.

**Статистическая обработка результатов исследования.** Все эксперименты проводили в трех независимых повторах; представлены средние значения из них  $\pm sd$ ; сравнение экспериментальных распределений параметров осуществляли с помощью непараметрической статистики Колмогорова–Смирнова, считая различия достоверными при  $P < 0.05$ . Все статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1. (OriginLab Corp., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Метилнитрозомочевина индуцирует апоптоз фоторецепторов в сетчатке у мышей.** МНМ-индуцированная дегенерация сетчатки затрагивает в основном слой фоторецепторов, в то время как остальные слои сетчатки остаются интактными. Это видно из рис. 2а. Гибель фоторецепторов сопровождается межнуклеосомной деградацией хроматина (рис. 2в), что характерно для апоптотической гибели. Как следует из рис. 2б, максимум гибели приходится на 72 ч после воздействия. Последующее снижение частоты апоптоза связано с фагоцитозом поврежденных клеток в ткани.

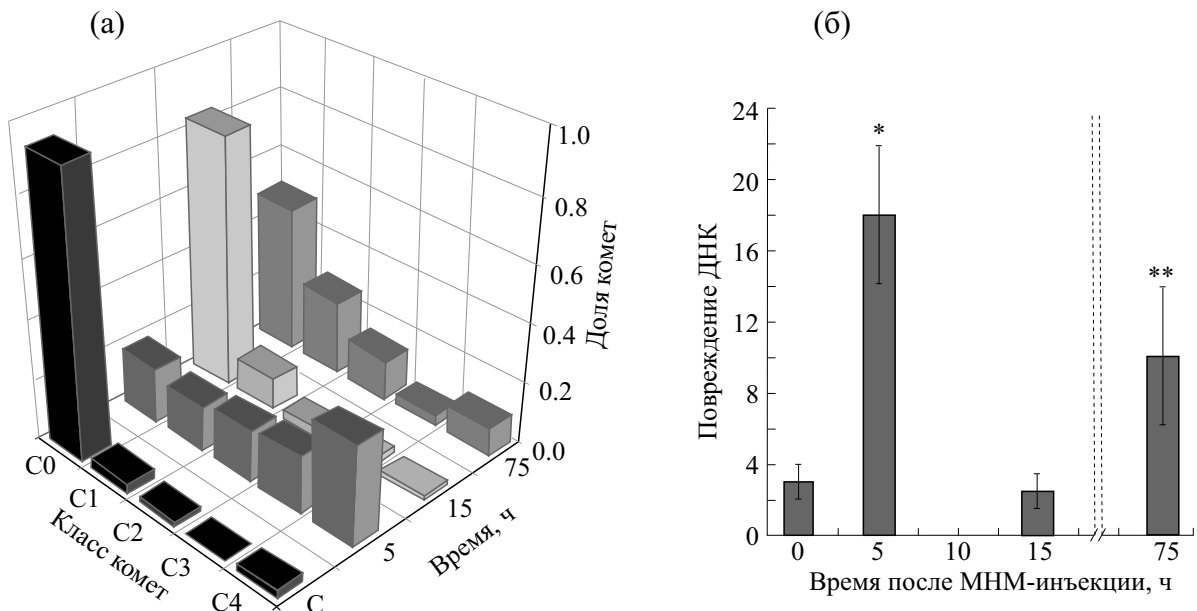
**Повреждения, индуцированные метилнитрозомочевинной, и репарация ДНК в клетках сетчатки у мышей.** Известно, что МНМ является ДНК-тропным агентом, вызывающим повреждение ДНК в виде метилирования оснований, вслед за которым в клетке активируется механизм репарации. Хотя МНМ сама по себе не вызывает разрывов, образование многих метильных аддуктов и процесс их репарации протекает с образованием временных апури-апирииминовых сайтов и



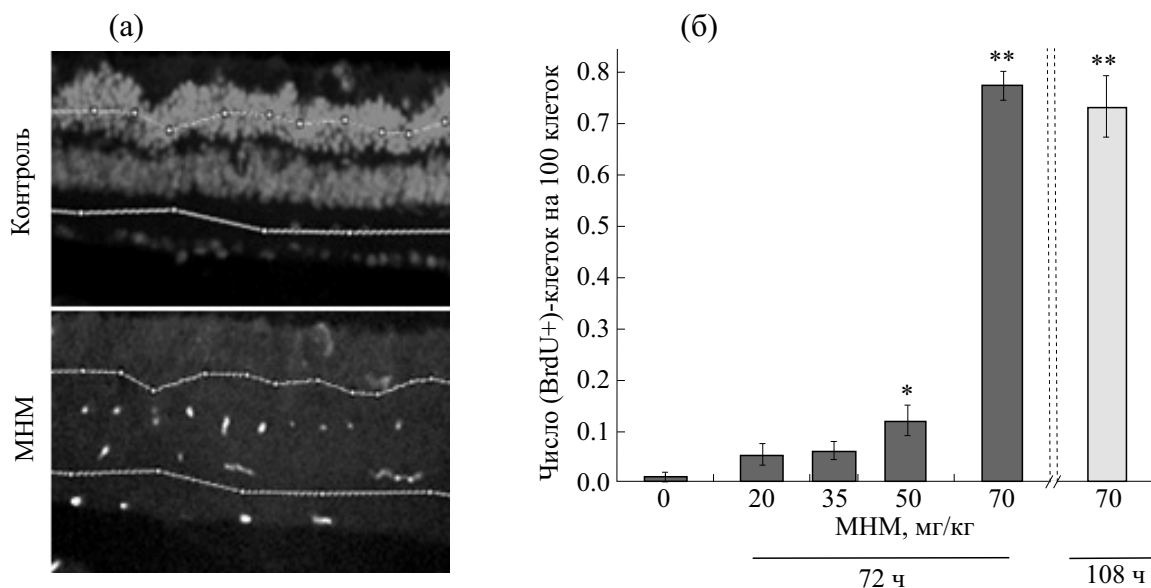
**Рис. 2.** Апоптоз в сетчатке у мышей, вызванный действием МНМ в дозе 60 мг/кг. (а) – TUNEL-детекция апоптоза фоторецепторов в срезах сетчатки спустя 72 ч после инъекции; 1 – слой сегментов фоторецепторов, 2 – ядерный слой фоторецепторов, 3 – внутренний ядерный слой сетчатки; стрелки на микрофотографии указывают на FITC-позитивные апоптотические клетки. (б) – Динамика числа апоптотических FITC-фокусов в фоторецепторном слое сетчатки у мышей после инъекции МНМ; \* –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем (0 ч). (в) – МНМ-индуцированная межнуклеосомная деградация хроматина в фоторецепторах сетчатки через трое и четверо суток спустя после инъекции.

разрывов цепей ДНК, которые детектируются методом щелочных комет. Рис. 3 отражает динамику этих процессов в виде гистограмм распределения клеток по поврежденности (рис. 3а) и в ви-

де средних значений  $mt$  из этих гистограмм (рис. 3б). Из рисунков видно, что повреждения охватывают практически всю популяцию клеток в сетчатке (гистограмма на 5 ч), но к 15 ч значи-



**Рис. 3.** Повреждение ДНК в клетках сетчатки у мышей после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг и последующей инкубации *in vivo*: (а) – гистограммы распределения клеток по повреждению ДНК в процессе инкубации; (б) – средние значения поврежденности ДНК  $\pm$  sd в разное время инкубации; разница с контролем (0 ч): \* –  $p < 0.01$ , \*\* –  $p < 0.05$ .



**Рис. 4.** Пролиферация ГКМ в ответ на однократное введение мышам МНМ в различных дозах: (а) — микрофотографии срезов интактной сетчатки и спустя 72 ч после инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг; (б) — число BrdU-позитивных клеток в срезах на 100 клеток в сетчатке спустя 72 ч (темные столбики) и 108 ч (светлый столбик) после инъекции МНМ. Достоверность различий с контролем: \* —  $p = 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$ .

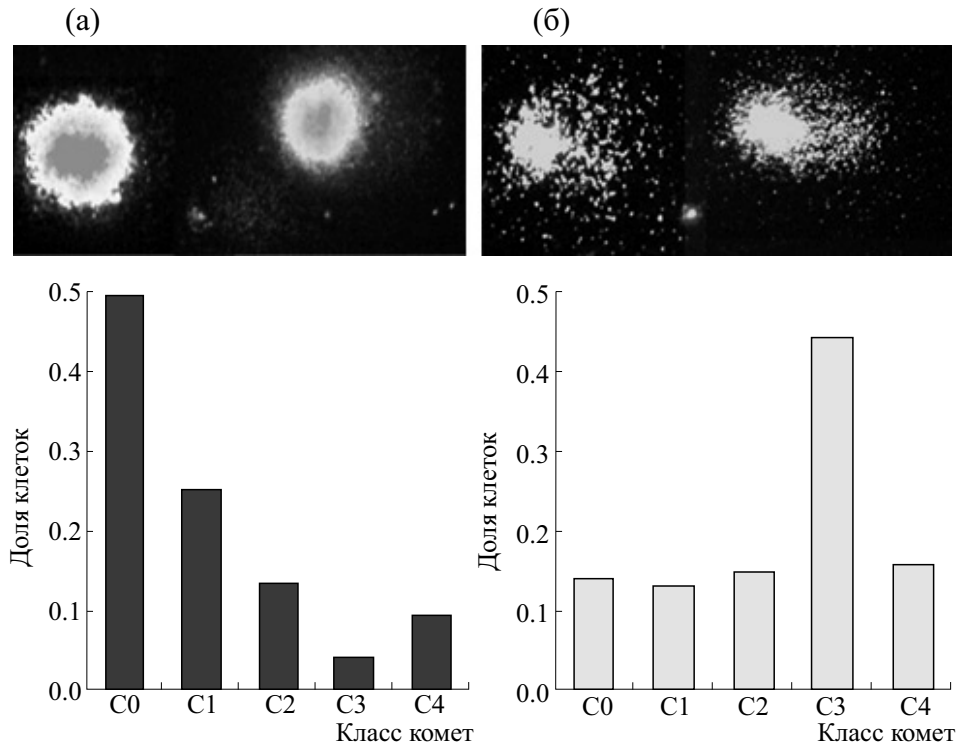
тельная часть их репарирует. Однако спустя 72 ч наблюдается вторая волна деградации ДНК, скорее всего связанная с гибелью фоторецепторов.

**Пролиферация клеток Мюллера в сетчатке в ответ на действие метилнитрозомочевины.** Радиальное расположение глии Мюллера в сетчатке обеспечивает контакт ГКМ со всеми слоями сетчатки, что позволяет им реагировать на любой вид и локализацию повреждений. В ответ на инъекцию МНМ наблюдается активация пролиферации ГКМ в сетчатке, которую мы регистрировали по включению в ДНК пролиферативного маркера BrdU. На микрофотографиях срезов сетчатки (рис. 4а) представлены BrdU-позитивные ядра клеток глии Мюллера, которые располагаются в основном в наружном и внутреннем ядерном слоях сетчатки. МНМ активирует не только пролиферацию, но и миграцию ядер клеток в направлении к фоторецепторам. Поэтому основная масса BrdU-фокусов располагается в коридоре, ограниченном двумя линиями на рис. 4а. Результат оценки их количества в зависимости от дозы МНМ показан на рис. 4б. Оценку проводили спустя 72 и 108 ч после инъекции агента. Максимальная стимуляция пролиферации наблюдается на 72 ч и далее остается постоянной до 108 ч. Количество пролиферирующих клеток в сетчатке у мышей составляет в среднем 1% и не превышает 2% от общей клеточности сетчатки.

**Повреждение ДНК в клетках Мюллера в сетчатке.** Поврежденность ДНК в BrdU-позитивных

клетках глии Мюллера оценивали спустя 72 ч после системной инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг. К этому времени завершается один цикл пролиферации ГКМ. Как видно из рис. 5, профили гистограмм и средние значения *mt* для них различаются (достоверность различия между ними  $p < 0.05$ ). Это различие проиллюстрировано микрофотографиями комет, соответствующих средним значениям *mt* этих распределений. Хотя ~45% всех клеток интактной сетчатки к этому времени содержат в разной степени поврежденную ДНК (левая гистограмма), доля аналогично поврежденных ГКМ после инъекции МНМ составляет 85% (правая гистограмма). С учетом щелочных условий определения повреждений ДНК в клетках этими повреждениями оказываются одно- и двухнитевые разрывы, а также апурин-апиримидиновые сайты.

**Экспрессия p53 в сетчатке после воздействия метилнитрозомочевины.** Известно, что универсальным маркером клеточного ответа на повреждение ДНК является белок p53. Также он принимает участие в регуляции клеточного цикла. Поэтому мы оценили его экспрессию в тканевых срезах сетчатки мышей до и после инъекции МНМ. На микросрезах сетчатки p53 проявляли с помощью моноклональных антител, конъюгированных с FITC. Измерения FITC-флуоресценции, приведенной к единичной площади микросреза, проводили с помощью программы ImageJ 1.48v. Результат представлен в виде микрофотографий типичных срезов сетчатки и рассчитан-



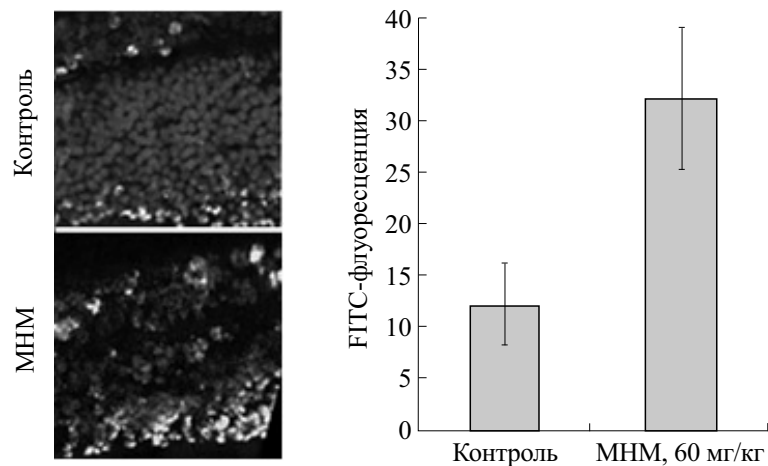
**Рис. 5.** Поврежденность ДНК в клетках сетчатки (а) и в клетках Мюллера (б), обработанных МНМ и после цикла пролиферации; микрофотографии представляют кометы клеток с поврежденностью, соответствующей средним показателям гистограмм для сетчатки ( $mt \pm sd = 9 \pm 14$ , окраска Sybr Green I) и для ГКМ ( $mt \pm sd = 23 \pm 15$ , окраска Alexa594). Различия гистограмм и средних значений  $mt$  достоверны,  $p < 0.05$ .

ной из них гистограммы на рис. 6. В интактной сетчатке обнаруживается фоновый уровень p53 в фоторецепторах и в нейронах, который резко возрастает после повреждающего воздействия МНМ в дозе 60 мг/кг, что отражает гистограмма на рис. 7.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### Ретинотоксичность метилнитрозомочевины.

Для исследования глиальных клеток Мюллера у мышей мы использовали экспериментальную модель, в которой острая дегенерация сетчатки у



**Рис. 6.** Экспрессия p53 в ядерных слоях сетчатки у мышей в ответ на воздействие МНМ, 60 мг/кг, 24 ч после инъекции. На микрофотографии видны белые одиночные и скопления p53-позитивных клеток. Достоверность различия средних  $\pm sd$ :  $p < 0.05$ .

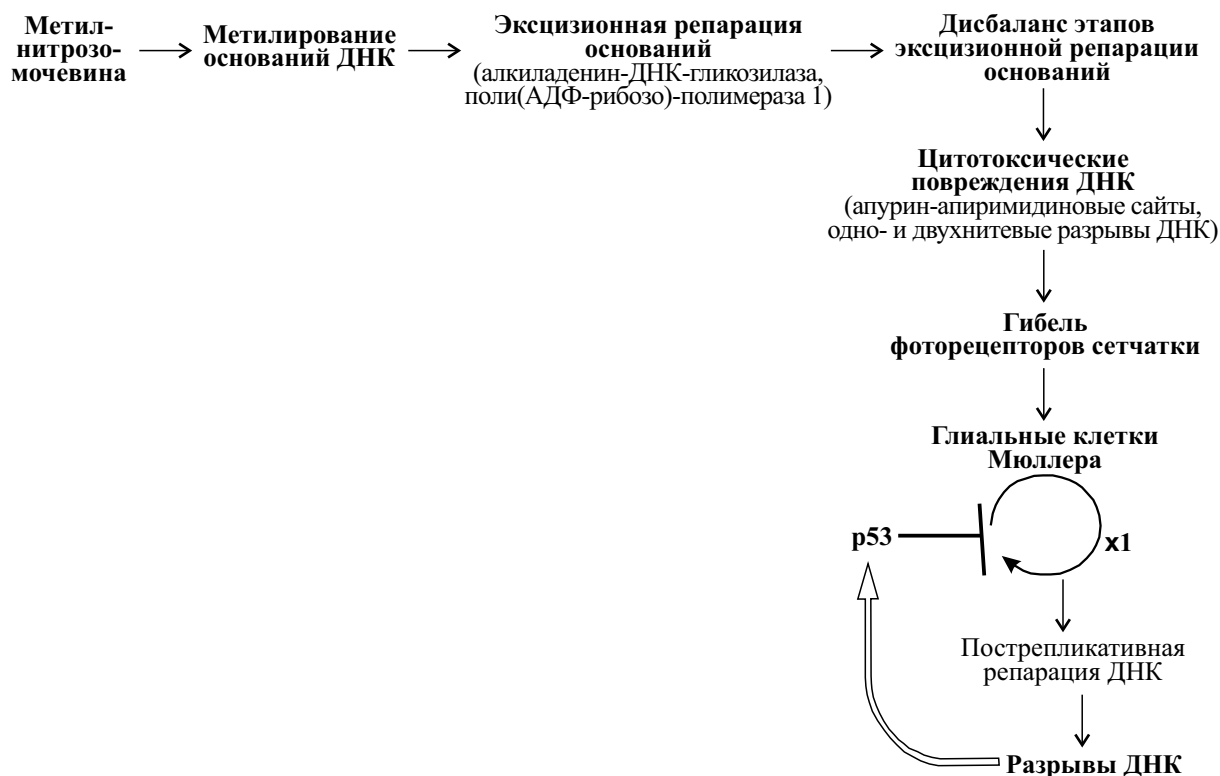


Рис. 7. Предполагаемая цепь событий при действии МНМ на сетчатку.

животных индуцируется системной инъекцией ретинотоксического агента [6]. В качестве такового была выбрана метилнитрозомочевина. МНМ индуцирует в ДНК три типа модификаций оснований – N3meA, N7meG и O6meG [15], но пока неизвестно обладают ли они ретинотоксическим действием сами по себе. В последнее время обсуждается роль репаративных механизмов в цитотоксическом эффекте МНМ [16]. Первые две модификации составляют в сумме 90% и являются субстратом для алкиладенин-ДНК-гликозилазы, фермента, инициирующего эксцизионную репарацию оснований [17]. Алкиладенин-ДНК-гликозилаза гидролизует N-гликозидную связь между алкилированным основанием и рибозофосфатным остовом ДНК, оставляя апурин-апиримидиновый сайт. Сайт является субстратом для апурин-апиримидиновой эндонуклеазы 1, которая формирует разрыв одной цепи ДНК с 3'-ОН- и 5'-dRP-концами. ДНК-полимераза  $\beta$  удаляет 5'-dRP-конец и на его место присоединяет один нуклеотид. Завершает процесс ДНК-лигаза I или III. Интермедиатами процесса, как видно, являются цитотоксические апурин-апиримидиновые сайты и одностранные разрывы, которые в случае несбалансированности этапов эксцизионной репарации оснований накапливаются в клетке и приводят ее к гибели. Дисбаланс этапов такой репарации неизбежен при нарастании дозы

МНМ. Дисбалансу способствует также то, что самая многочисленная модификация N7meG тормозит работу полимеразы  $\beta$  [18]. Как следует из наших результатов, 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. При дозе МНМ 70 мг/кг достигается максимум апоптоза фоторецепторов (рис. 2) и пролиферации ГКМ (рис. 4). Все это указывает на причастность к ретинотоксичности МНМ ферментов репарации [14].

Последняя МНМ-модификация оснований O6meG составляет 10% и репарируется деметилирующим ферментом MGMT, но, будучи нерепарированной, образует неканоническую пару с тиминном, которая в результате активности коррекционной (пострепликативной) репарации переходит в летальный двунитевой разрыв ДНК [19]. Важным посредником ретинотоксического действия МНМ может быть поли(АДФ-рибоза)-полимераза I [20]. Будучи участником репарации, эта полимеразы связывается с разрывом со стороны 5'-dRP-конца и присоединяет к ближайшему гистону разветвленный полимер поли(АДФ-рибозу), синтезируемый из АТФ и  $NAD^+$ . Это ослабляет связь гистонов с ДНК и вызывает диссоциацию или миграцию нуклеосом по ДНК, открывая доступ к повреждению для репаративного ком-

плекса [21]. Поли(АДФ-рибозной) модификации подвергаются многие ферменты и структурные белки, что делает функционирование поли(АДФ-рибозо)-полимеразы 1 в клетке в высокой степени энергос затратным, приводящим клетку к гибели [22]. Это справедливо как для пролиферирующих, так и для покоящихся клеток, в особенности для фоторецепторов сетчатки, поскольку из-за высокой оксигенации и метаболической активности эти клетки имеют крайне низкий энергетический резерв и, как видно из рис. 2, первыми подвергаются гибели при стрессе сетчатки [23,14].

**Разрывы ДНК в глиальных клетках Мюллера и p53 ограничивают пролиферацию глиальных клеток Мюллера в сетчатке.** Отсутствие увеличения числа BrdU-позитивных клеток в сетчатке после 72 ч (рис. 4) подтверждает вывод о блоке дальнейшей пролиферации ГКМ в сетчатке у мышей, вызванном имеющимися в ДНК разрывами. Но поскольку до этого времени клетки пролиферировали, то мы полагаем, что эти разрывы проявились в пострепликативный период. Их появление можно связать с механизмом пострепликативной репарации. Субстратом для нее служат некорректные пары оснований, возникшие либо как случайные ошибки ДНК-полимеразы при синтезе на интактной матрице, либо при репликации матрицы, содержащей модифицированные основания. Принимая во внимание высокий уровень оксигенации сетчатки, можно ожидать и высокий уровень окси-модифицированных оснований в материнской цепи реплицирующейся ДНК глиальных клеток, что мы наблюдали ранее [24]. Особенностью пострепликативной репарации является то, что она оперирует только с дочерней, вновь-синтезированной цепочкой ДНК (поэтому такую репарацию часто называют пострепликативной коррекцией). Итак, возникшие в матрице и прошедшие через цикл репликации повреждения сохраняются в клетке в пострепликативный период. Но поскольку этим аддуктам в клетке отсутствуют комплементарные основания, то эксцизионная активность пострепликативной репарации на дочерней цепи ДНК становится abortивной и формирует долгоживущий или двунитевой разрыв, которые блокируют репликацию.

В ответ на возникшие повреждения ДНК в клетках глии возрастает экспрессия белка p53, который сигнализирует о снижении пролиферации. Например, глиа Мюллера в сетчатке у мышей с фенотипом (trp53+/+) обнаруживала меньшую пролиферативную активность в модели NMDA-индуцированной дегенерации сетчатки, чем глиа у нокаутных мышей с фенотипом trp53-/- [25]. В работе на модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки у крыс также наблюдали экспрессию p53 в сетчатке. Кроме того, регистрируемая пролиферация ГКМ сопровождалась фосфо-

рилированием гистона H2AX и экспрессией белка p21. P53 – универсальный маркер повреждений ДНК, ответственный за G1-блок цикла клетки с поврежденной ДНК; фосфорилированный гистон H2AX ( $\gamma$ -H2AX) – маркер двунитевых разрывов ДНК, связанных с апоптотической компактизацией хроматина, а p21 – ингибитор циклинкиназ, осуществляющих переход G1→S в клеточном цикле. Как видно, эти три белка являются компонентами клеточного ответа на повреждение ДНК (DNA damage response), который блокирует пролиферацию. С концепцией «DNA damage response» [27] в ГКМ согласуется обнаруженный нами факт наличия повреждений ДНК в пострепликативных клетках Мюллера и увеличенная экспрессия p53 в сетчатке.

Таким образом, подытоживая результаты работы, на рис. 7 мы представляем предполагаемую последовательность событий в сетчатке мышей после ретинотоксического воздействия МНМ, которая завершается блоком пролиферации глиальных клеток Мюллера.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00133).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными осуществляли в соответствии с Положением Комитета по этике ИБХФ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Jayakody, R. R. Gonzalez-Cordero Ali, and R. A. Pearson, *Prog. Retin. Eye Res.* **46**, 66 (2015).
2. D. Lamba, M. Karl, and T. Reh, *Cell Stem Cell* **2**, 538 (2008).
3. J. G. Monzon, N. Hammad, S. D. Stevens, and J. Dancy, *Oncologist* **17**, 384 (2012).
4. В. А. Тронов и Е. И. Некрасова, *Вопросы онкологии* **64**, 555 (2019).
5. A. Tsubura, K. Yoshizawa, M. Kuwata, and N. Uehara, *Histol. Histopathol.* **25**, 933 (2010).
6. M. O. Karl, S. Hayes, B. R. Nelson, et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19508 (2008).
7. G. P. Lewis, E. A. Chapin, G. Luna, et al., *Mol. Vis.* **16**, 1361 (2010).
8. K. Yoshizawa, T. Sasaki, N. Uehara, et al., *J. Toxicol. Pathol.* **25**, 27 (2012).



9. Л. А. Островская, В. А. Филов, Б. А. Ивин и др., Рос. биотерапевт. журн. **3**, 24 (2004).
10. В. А. Тронов, Е. И. Некрасова и М. А. Островский, Цитология **60**, 440 (2018).
11. К. Коїса, А. Lankoff, А. Banasik, et al., Mutat. Res. **534**, 15 (2003).
12. М. Ю. Логинова, В. А. Тронов, Т. А. Белецкая и др., Радиационная биология. Радиоэкология **48**, 698 (2008).
13. TheTACS® 2 TdTFluoresceinkit URL: [https://trevigen.com/docs/protocol/protocol\\_4812-30-K.pdf](https://trevigen.com/docs/protocol/protocol_4812-30-K.pdf).
14. В. А. Тронов и Е. М. Константинов, Биохимия **65**, 1516, (2000).
15. D. T. Beranek, Mutat. Res. **231**, 11 (1990).
16. D. Fu, J. A. Calvo, and L. D. Samson, Nat. Rev. Cancer **12**, 104 (2012).
17. L. B. Meira, C. A. Moroski-Erkul, S. L. Green, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 888 (2009).
18. М.-С. Коаг, Y. Kou, H. Ouzon-Shubeita, and S. Lee, Nucl. Acids Res. **42**, 8755 (2014).
19. В. А. Тронов, Е. М. Константинов и И. И. Крамаренко, Биохимия **67**, 882 (2002).
20. M. Allocca, J. J. Corrigan, K. R. Fake, et al., Oncotarget **8**, 68707 (2017).
21. D. Ahel, Z. Horejsi, N. Wiechens, et al., Science **325**, 1240 (2009).
22. W. Ying, M. B. Seigny, Y. Chen, and R. A. Swanson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12227 (2001).
23. W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **42**, 1646 (2001).
24. В. А. Тронов, Ю. В. Виноградова, М. Ю. Логинова и др., Цитология **54**, 261 (2012).
25. Y. Ueki, M. O. Karl, S. Sudar, et al., Glia **60**, 1579 (2012).
26. J. Wan, H. Zheng, Z-L. Chen, et al., Vis. Res. **48**, 223 (2008).
27. K. Nomura-Komoike, F. Saitoh, Y. Komoike, and H. Fujieda, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **57**, 1169 (2016).

## DNA Damage and p53 Restrict Proliferation of Muller Cells in Mouse Retina in Response to the Influence of N-Methyl-N-Nitrosourea

V.A. Tronov\* and E.I. Nekrasova\*\*

\*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

A systemic administration of *N*-methyl-*N*-nitrosourea in rats resulted in the death of the retinal photoreceptors followed by differentiation of retinal Müller glia cells into the photoreceptor-like cells [27]. However, the mammalian Müller glia cells display an extremely limited proliferative capacity which correlates with expression of histone H2AX and p21 protein. These proteins are known to be the components of cellular response to DNA damage [26]. The restriction of the human Muller glia cells proliferation prevents the retinal replacement therapy by cell transplantation. On the other hand, the mechanism that limits the proliferation of Müller glia in the mammalian retina is yet to be elucidated. We examined the Müller glial proliferative response, DNA damage response in Müller glia in a postreplicative stage as well as expression of p21 protein in response to the influence of retinotoxic *N*-methyl-*N*-nitrosourea. It was shown that *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced retinal degeneration in mice via apoptotic death of photoreceptors while the other retinal layers remained intact. At the same time, the formation of DNA breaks and alkali-labile sites was observed in all retinal cells 5 h after *N*-methyl-*N*-nitrosourea injection; complete disappearance of these formations occurred 15 h after *N*-methyl-*N*-nitrosourea injection. By 72 hour, there was a significant rise in DNA breaks in Müller glia. The absence of bromodeoxyuridine incorporation during subsequent time in the retinal cells indicates that there is no Müller glia cell proliferation and reparative synthesis of DNA. At the same time, an increase in the expression of p53 protein, a universal marker to determine DNA damage response was observed. Thus, our findings support the concept of “DNA damage response” with regards to Müller glia that there is a link between DNA damage in Müller glia cell and limited proliferation of these cells in mice. Postreplicative repair is considered a probable mechanism of the formation of DNA breaks in postreplicative Müller glia cells.

*Keywords:* retina, Muller cells, photoreceptors, apoptosis, DNA strand breaks, DNA repair, p53, methylnitrosourea