

УДК 577.24

SkQ1 ЗАМЕДЛЯЕТ РАЗВИТИЕ ЗАВИСИМЫХ ОТ ВОЗРАСТА ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕТЧАТКЕ И СОСУДИСТОМ СЛОЕ ГЛАЗ КРЫС Wistar И OXYS

© 2012 г. В.Б. Сапрунова^{1,3*}, М.А. Лелекова¹,
Н.Г. Колосова^{2,3}, Л.Е. Бакеева^{1,3}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва; факс (495)939-3181,
электронная почта: fhb@belozersky.msu.ru

² Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск,
просп. Академика Лаврентьева, 10; факс: +7(383)333-1278

³ НИИ Митоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва;
факс: (495)939-5945, электронная почта: info@mitotech.ru,
saprunova@mail.genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 23.02.12

У крыс Wistar и OXYS показано развитие резко выраженных обусловленных возрастом патологических изменений ткани глаза. У всех исследованных крыс OXYS в возрасте 24 мес. фоторецепторные клетки практически полностью отсутствуют. Массовые скопления липофусциновых гранул выявляются в клетках пигментного эпителия. Наблюдается сплющивание, зарост, деградация эндотелиальных клеток хориокапилляров. На фоне этих изменений обнаружено расположение сосудов (без признаков деградации) в пигментном эпителии. У крыс Wistar в возрасте 24 мес. эти изменения выявляются не у всех животных и носят локальный характер. Митохондриальный антиоксидант SkQ1 (животные получали SkQ1 ежедневно с пищей в количестве 250 нмоль/кг в течение 5 мес., начиная с 19-мес. возраста) предотвращал развитие этих патологических изменений как у крыс Wistar так и у крыс OXYS. Проведен математический анализ и статистическая обработка полученных данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ультраструктура, окислительный стресс, сетчатка, хориокапиллярный слой, антиоксидант.

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является основной причиной снижения и потери зрения людьми старшего возраста. Это комплексное заболевание, в основе которого лежат характерные изменения хориокапилляров и сетчатки: ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и мембраны Бруха (БМ), – но механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, остаются не ясными. Причиной потери зрения становится

неоваскуляризация – прорастание аномальных сосудов из сосудистого слоя глаза (хориоидеи) вглубь сетчатки, которое приводит в конечном итоге к ее отслойке.

В настоящее время выдвигается несколько гипотез возникновения патологических изменений сетчатки глаза. Согласно одной из них, в основе этих процессов лежит патология сосудов и, как следствие, – нарушение питания центральной зоны сетчатки, ответственной за зрение. Другая гипотеза – атрофия клеток пигментного эпителия (ПЭ), приводящая к сплющиванию, зарастанию (облитерации) сосудов хориоидеи и деградации фоторецепторных клеток [1–5]. Развитие ВМД связано с гипоксией и воспалением [6, 7]. В качестве основного повреждающего фактора при этом выступает окислительный стресс – нарушение баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК) [8–12]. Сетчатка потребляет существен-

Принятые сокращения: ВМД – возрастная макулярная дегенерация, РПЭ – ретинальный пигментный эпителий, АФК – активная форма кислорода, ФРС – фоторецепторный слой, ПЭ – пигментный эпителий, БМ – мембрана Бруха, ХКС – хориокапиллярный слой, ЛГ – липофусциновые гранулы, ВСС – внутренний сетчатый слой, НСС – наружный сетчатый слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, НЯС – наружный ядерный слой, СП – слой палочек.

* Адресат для корреспонденции.

но больше кислорода, чем любая другая ткань, постоянно подвергаясь лучевому воздействию. Повышается вероятность развития окислительного стресса и насыщенность мембран фоторецепторов и клеток ПЭ легко окисляющимися липидами (до 50% полиненасыщенных жирных кислот [13]). Одна из функций РПЭ — фагоцитоз и переработка внешних сегментов фоторецепторов, связана с ферментативной генерацией АФК. С возрастом в клетках РПЭ происходит накопление окисленных липидов и клеточных компонентов, что сопровождается избыточным накоплением липофусциновых гранул (ЛГ) [14]. Основным фотоактивируемым продуцентом АФК в ЛГ является А2Е (N-ретинол-N-ретилиденэтанолламин). Его накопление рассматривается как один из ключевых факторов развития ВМД [15].

Создание биологических моделей заболеваний человека — один из подходов к выяснению их этиологии и патогенеза, а также к разработке новых способов лечения. В последние годы получены убедительные аргументы в пользу того, что моделью ВМД может стать созданная в ИЦиГ СО РАН генетическая модель преждевременного старения — линия крыс OXYS [14, 16–20]. Линия зарегистрирована в международной базе данных Rat genome (<http://rgd.mcw.edu>).

К возрасту 3–4 мес. у 100% крыс OXYS развивается ретинопатия, по клиническим проявлениям аналогичная начальным стадиям ВМД, в то время как у крыс Wistar аналогичные изменения регистрируются лишь у отдельных животных (7%) и в возрасте старше 12 мес. Антиоксиданты способны предупредить или задержать развитие фенотипических проявлений преждевременного старения крыс OXYS, при этом их эффективность связана со способностью предотвращать характерные для этих животных нарушения функций митохондрий [21, 22]. Ранее нами было показано, что избирательно проникающий в митохондрии антиоксидант SkQ1 (пластохинон-децил-трифенилфосфоний) в наномолярных концентрациях предотвращает некоторые последствия ускоренного старения тканей глаза у крыс OXYS. Добавление SkQ1 в пищу с 8-мес. возраста полностью предотвращало развитие катаракты и ретинопатии у крыс OXYS до возраста одного года [14, 16].

Результаты исследований на годовалых животных, представленные в этих работах, не выявляют всего спектра патологических изменений, развивающихся в более позднем возрасте. Несмотря на ускоренное старение, регистрирующееся у крыс линии OXYS, в возрасте 1 года эти животные не достигают терминальной стадии возраст-зависимых патологий. Поэтому

представляется чрезвычайно актуальным анализ состояния сетчатки, ПЭ, хориоидеи (хориокапиллярного слоя) крыс OXYS и Wistar при старении, а также изучение терапевтического эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на развивающиеся с возрастом патологии. Для этого были проведены исследования на крысах OXYS и Wistar в возрасте 24 мес., получавших SkQ1 с возраста 19 мес. Целью настоящей работы было исследование состояния ультраструктуры сетчатки, ПЭ, хориоидеи крыс OXYS и Wistar в возрасте 24 мес. и терапевтического эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на развитие обусловленных возрастом патологических изменений тканей глаза у крыс Wistar и OXYS.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Формирование комплекса признаков преждевременного старения у крыс OXYS явилось результатом направленной селекции по признаку ранней спонтанной катаракты [23]. В пяти первых поколениях ее развитие провоцировали обогащенной галактозой диетой [24]. На сегодня имеется 98-е поколение крыс OXYS со спонтанно развивающейся катарактой и сцеплено с ней наследуемым синдромом преждевременного старения, проявлением которого становится и ретинопатия. Работа выполнена на крысах-самцах Wistar ($n = 15$) и OXYS ($n = 15$), полученных из Центра коллективного пользования «Генофонды экспериментальных животных» ИЦиГ СО РАН. Животных содержали группами по 5 особей при естественном освещении, температуре $22 \pm 2^\circ$ и свободном доступе к воде и корму (ПК-120-1, Ltd. «Laboratorsnab», Россия). Для оценки возрастных изменений сетчатки в качестве контроля было использовано по 5 крыс Wistar и OXYS в возрасте 3 мес. Для исследования эффекта SkQ1 на развитие ретинопатии, крысы Wistar и OXYS в возрасте 19 мес. были случайным образом распределены на две группы: одна группа (5 животных) — контроль; вторая группа (5 животных) получала SkQ1 (250 нмоль/кг) ежедневно с пищей в течение 5 мес.

Все процедуры, выполненные на животных, проводились в соответствии с European Communities Council Directive No. 86/609/EES.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали 3%-ным (v/v) раствором глутарового альдегида в буфере, pH 7,4, в течение 2 ч при 4° ; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия в буфере в течение 1,5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастаю-

щей концентрацией спирта (70%-ный спирт был насыщен уранилацетатом). Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали на ультрамикротоме Leica (Leica Microsystems). Полученные препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе HU-12 («Hitachi», Япония).

Математическая обработка и статистический анализ. Наряду с непосредственным исследованием состояния ультраструктуры центральной области глаза, нами были проведены математический анализ и статистическая обработка полученных электронно-микроскопических фотографий. Для каждого животного в группе (по 5 животных в каждой группе) было получено по 2 участка сетчатки глаза (серия электронно-микроскопических фотографий, склеенных друг с другом), состоящих в среднем из 20 микрофотографий (средняя длина участка составляла 210 мкм). Для математической обработки изображения использовался графический пакет Adobe® Photoshop®.

На первом этапе вручную выделялись все сосуды хориокапиллярного слоя (ХКС), площадь сечения которых затем вычислялась в пикселях.

Проводилось измерение длины БМ. После этого программа рассчитывала отношение этих величин. Далее полученные результаты нормировались относительно длины БМ (в микрометрах квадратных на микрометр длины). Статистические показатели были рассчитаны при помощи программного пакета STATISTICA 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ультраструктура сетчатки и хориоидеи крыс Wistar и OXYS в возрасте 3 мес. В возрасте 3 мес. сетчатка крыс обеих групп – как Wistar, так и OXYS имеет сходную ультраструктуру без признаков патологии.

На рис. 1 можно видеть участок периферической области сетчатки и прилегающего слоя хориокапилляров глаза крысы в возрасте 3 мес. Видны: базальная часть фоторецепторного слоя (ФРС) – слой палочек; однослойный пигментный эпителий (ПЭ); мембрана Бруха (БМ) – сложный экстрацеллюлярный комплекс, расположенный между ПЭ и ХКС, состоящий из двух богатых коллагеном слоев – наружного и внутреннего, которые разделены центральной об-

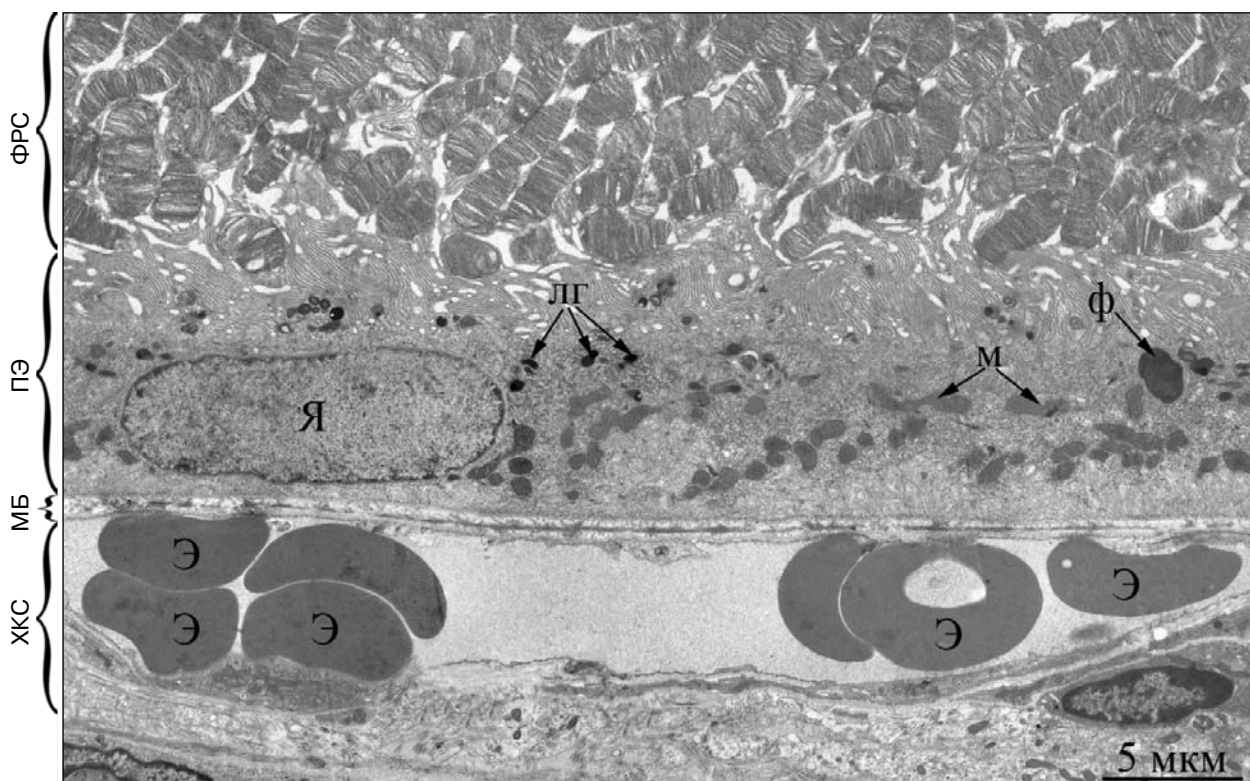


Рис. 1. Ультраструктура периферической сетчатки крысы Wistar в возрасте 3 мес. Я – ядро клетки ПЭ, Ф – фагосома, М – митохондрии; Э – эритроцит

ластью эластина и эластин-связанных белков; сосуды ХКС. Внутри сосуда видны эритроциты (Э). Характерным признаком морфологии клеток ПЭ является наличие в апикальной части цитоплазмы большого числа электронно-плотных образований. Согласно современным литературным данным [25–27], считается, что эти структуры – липофусциновые гранулы (ЛГ). Кроме этого, в апикальной зоне цитоплазмы клеток ПЭ часто встречаются фагосомы – образования, представляющие собой фагоцитированные пигментным эпителием пачки отработанных дисков фоторецепторных мембран наружных сегментов клеток палочек.

Сетчатка и хориоидея крыс Wistar в возрасте 3 мес. имеют аналогичную структуру.

Ультраструктура сетчатки и хориоидеи крыс Wistar в возрасте 24 мес. У крыс Wistar в возрасте 24 мес. нами были выявлены чрезвычайно разнообразные патологические изменения, охватывающие как фоторецепторные клетки, клетки ПЭ, так и БМ, а также ХКС. Характерная картина ультраструктуры показана на рис. 2. У всех исследованных нами животных сетчатка глаз не была однородна по своей ультраструктуре. Для ПЭ характерны изменения базальной мембраны, которая образовывала протяженные выросты сложной формы, простирающиеся вплоть до слоя палочек (стрелка на рис. 2). В апикальной части клеток ПЭ присутствовал мощно развитый слой ЛГ. В отдельных клетках ПЭ встречались огромные ЛГ, по своим размерам сопоста-

вимые с ядром [14]. БМ сохраняла свою ультраструктуру в норме. Наряду с этим, в сетчатке были обнаружены обширные области дегенеративных изменений, которые охватывали площадь от внутреннего сетчатого слоя (ВСС) – зоны расположения синапсов аксонов вторых нейронов с дендритами ганглионарных нейронов – до клеток пигментного эпителия (ПЭ) (рис. 3). Можно видеть, что происходила дегенерация всех слоев сетчатки глаза. Мощный, широкий наружный ядерный слой (НЯС), образованный телами и ядрами фоторецепторных клеток, отсутствовал – сохранялись только отдельные клетки. Клетки палочек были полностью утрачены – на их месте располагались выросты цитоплазмы клеток ПЭ (рис. 3). Клетки ПЭ имели ярко выраженные патологические изменения ультраструктуры: изменение формы клеток, увеличение слоя ЛГ, разрастание базальных складок, васкуляризация (стрелки на рис. 3). На фотографии можно видеть, что размеры клеток ПЭ значительно увеличены (см. рис. 1). По-видимому, вследствие практически полного исчезновения фоторецепторных клеток, плотная упаковка слоев сетчатки нарушается, в результате клетки ПЭ имеют возможность увеличить собственный объем. Это особенно заметно по форме ядер – они округлые, в то время как в норме (рис. 1) они уплощенные, продолговатые.

Важным признаком развивающейся патологии в ткани сетчатки глаза является обнаруженная нами васкуляризация слоя клеток ПЭ (рис. 3).

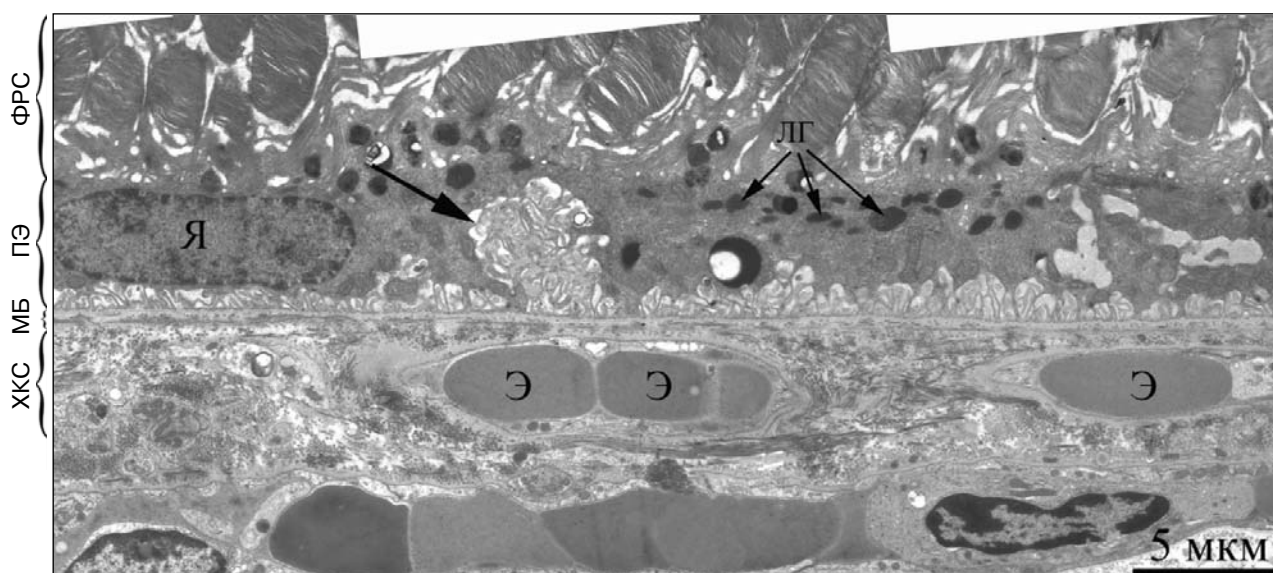


Рис. 2. Ультраструктура периферической сетчатки крысы Wistar в возрасте 24 мес. Я – ядро клетки ПЭ, Э – эритроцит. Стрелкой показана базальная мембрана, которая образует протяженные выросты сложной формы

На фотографии можно видеть полностью сформированный сосуд, прорастающий в слой клеток ПЭ со стороны внутренней сетчатки глаза (показан стрелкой 1 на рис. 3). Он имеет образованную эндотелиальной клеткой стенку, внутреннее пространство полностью заполнено, можно видеть также расположенные внутри сосуда эритроциты (Э). Кроме этого в ПЭ можно видеть многочисленные сечения капилляров (показаны стрелками).

У всех животных нами были выявлены изменения ХКС (рис. 2, 3). Число хориокапилляров было значительно снижено. Вследствие атро-

фии эндотелиальных клеток происходила облитерация сосудов, входящих в состав ХКС: просветы сосуда значительно сужены. Такая структура ХКС наблюдались нами у всех животных Wistar в возрасте 24 мес. без исключения.

Эффект SkQ1 на ультраструктуру сетчатки и хориоидеи крыс линии Wistar в возрасте 24 мес. Ни у одной из исследованных нами крыс Wistar, получавших с возраста 19 мес. в течение 5 мес. SkQ1, отклонений в общем плане структурной организации сетчатой оболочки глаза выявлено не было. На рис. 4 представлен участок сетчатки глаза крысы Wistar в возрасте 24 мес., получав-

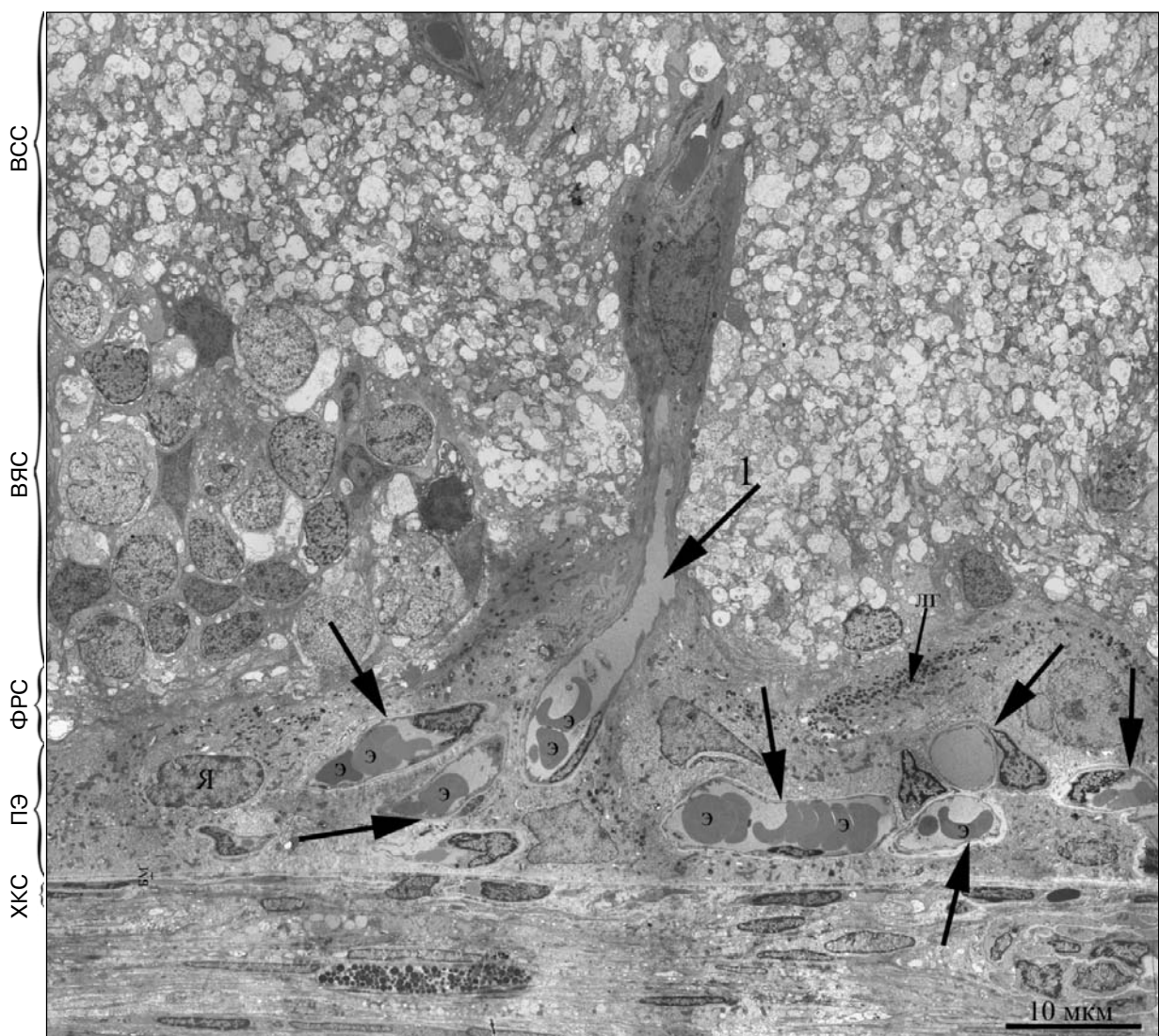


Рис. 3. Обзорная электронно-микроскопическая фотография участка сетчатки глаза крысы Wistar в возрасте 24 мес. ВСС – зона синапов аксонов вторых нейронов и дендритов ганглионарных нейронов; ВЯС – в нем лежат тела и ядра вставочных нейронов; Я – ядро клетки ПЭ; Э – эритроцит. Стрелкой 1 обозначен кровеносный сосуд, направленный в слой клеток ПЭ со стороны внутренней сетчатки. Стрелками обозначены многочисленные сечения капилляров в слое клеток ПЭ

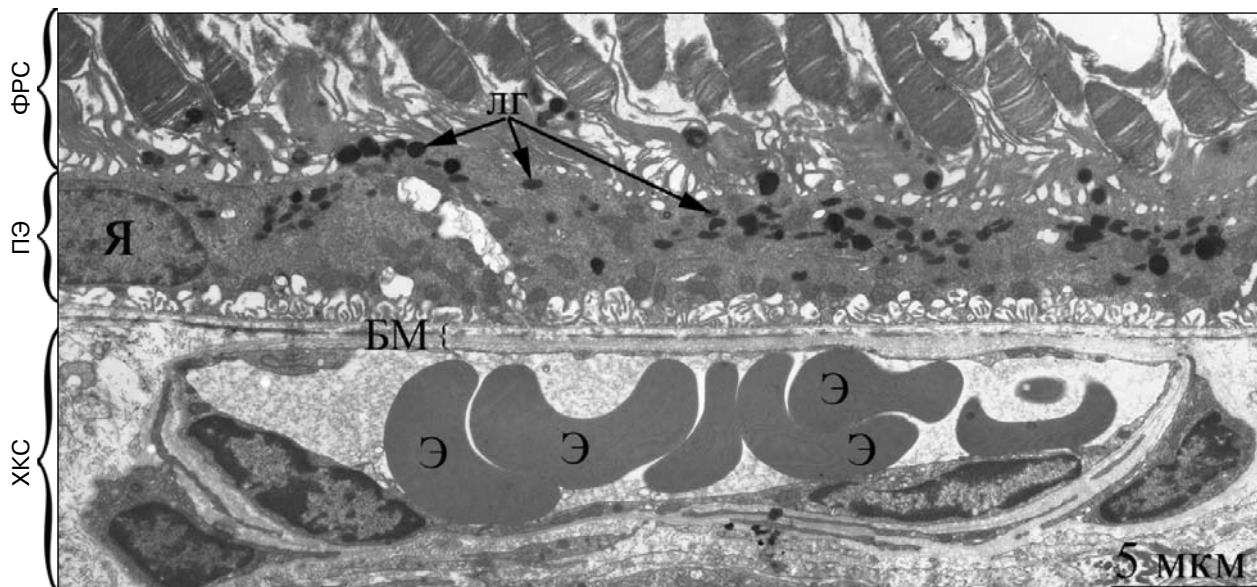


Рис. 4. Ультраструктура периферической сетчатки крысы Wistar в возрасте 24 мес., получавшей SkQ1 в количестве 250 нмоль/кг ежедневно с пищей в течение 5 мес. Я – ядро клетки ПЭ, Э – эритроцит

шей SkQ1. Видно, что сетчатая оболочка глаза содержит слои, характерные для данной ткани в норме: хорошо выражен слой палочек (ФРС), слой фоторецепторных клеток выстилают клетки ПЭ. ПЭ, БМ, ХКС не имели значительных изменений ультраструктуры.

Наиболее показательным результатом лечения животных антиоксидантом SkQ1 явилось состояние ХКС, которое у двухгодовалых крыс Wistar существенно не отличалось от состояния хориокапилляров, характерного для 3-мес. животных этой линии (рис. 5). На фотографии видны хориокапилляры правильной формы, без следов дегградации эндотелиальных клеток. Внутри сосудов происходит нормальная циркуляция крови. Таким образом, у животных, получавших лечение SkQ1, структура капилляров соответствует состоянию хориокапилляров, характерному для 3-мес. животных. Четко видны эндотелиальные клетки, по ультраструктуре соответствующие эндотелиальным клеткам интактных хориокапилляров.

Математическая обработка и статистический анализ. Для изучения полученных результатов были проведены математическая обработка и статистический анализ данных электронной микроскопии – анализа электронно-микроскопических фотографий. Для каждой из трех групп животных: 3-мес., 24-мес. контрольные и 24-мес., получавшие SkQ1, была подсчитана средняя площадь сосудов ХКС на 1 мкм длины

БМ (см. «Методы исследования»). Статистическое исследование включало анализ 10 участков сетчатки глаза для каждой группы животных. Средняя длина участка составляла 210 мкм, что приближается к размерам фотографий световой микроскопии.

Результаты представлены на рис. 5. Как видим, у крыс Wistar в возрасте 24 мес. площадь хо-

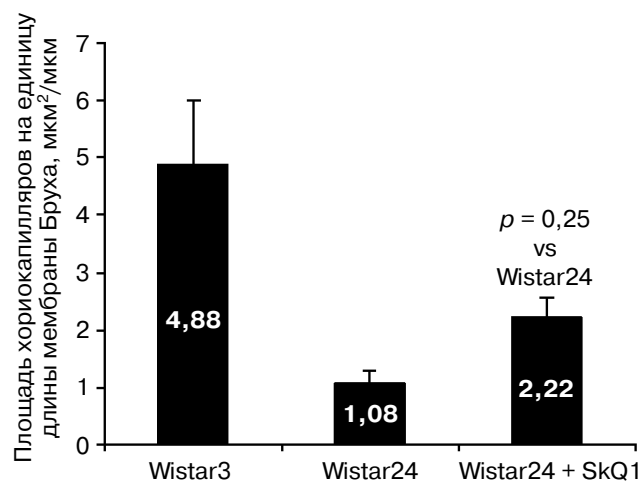


Рис. 5. Площадь хориокапилляров на единицу длины БМ, ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) у крыс Wistar в возрасте 3 мес. (Wistar 3), 24 мес. (Wistar 24) и 24 мес., получавших антиоксидант SkQ1 (Wistar 24 + SkQ1) ($p = 0,025$, STATISTICA 6)

риокапилляров на единицу длины БМ более чем в три раза меньше, чем в возрасте 3 мес. ($1,08 \pm 0,22$ мкм²/мкм против $4,88 \pm 1,1$ мкм²/мкм), что свидетельствует о значительной деградации сосудов хориоидеи. Прием SkQ1 оказал мощный защитный эффект, предупредил и/или снизил выраженность деструктивных изменений ХКС: площадь хориокапилляров на единицу длины БМ составляла у этих животных $2,22 \pm 0,35$ мкм²/мкм. Таким образом, полученные данные полностью подтверждают результаты визуальных наблюдений.

Ультраструктура сетчатки и хориоидеи крыс OXYS в возрасте 24 мес. У крыс OXYS в возрасте 24 мес. значительные патологические изменения происходят во внешних слоях сетчатки глаза, БМ и ХКС. На рис. 6 показан участок сетчатки глаза крысы линии OXYS в возрасте 24 мес. Видно, что дегенеративные изменения зрительной части сетчатой оболочки глаза охватывают площадь от внутреннего ядерного слоя (ВЯС), в котором лежат тела и ядра вставочных нейронов до клеток ПЭ. Практически полностью утрачены фоторецепторные клетки — на фотографии можно видеть лишь единичные ядра фоторецепторных клеток. На месте слоя палочек располагаются выросты цитоплазмы клеток ПЭ. Достаточно крупный кровеносный сосуд располагается в наружном сетчатом слое (стрелка 1 на рис. 6). По своему расположению он не может относиться ни к сосудам хориоидеи, ни к сосудам системы центральной артерии сетчатки — второй системы кровоснабжения, проникающей в глазное яблоко через диск зрительного нерва и ответственной за питание внутренних слоев сетчатки. Появление сосуда в наружном сетчатом слое, очевидно, связано с процессом деградации внутренней сетчатки, в результате которого становится возможной миграция сосудов из внутренних слоев сетчатки.

В клетках ПЭ этой группы животных нами обнаружены выраженные патологические изменения ультраструктуры: увеличение слоя ЛГ, разрастание базальных складок клеток ПЭ, атрофия отдельных клеток, васкуляризация (рис. 6, 7). На рис. 6 видно, что ЛГ образуют мощно развитый слой, занимающий большую часть цитоплазмы клеток ПЭ. Стрелками 1 и 2 на рис. 7 показаны сосуды, расположенные в слое клеток ПЭ.

Также нами было обнаружено, что у крыс линии OXYS в возрасте 24 мес. происходит изменение структуры БМ: нарушения в расположении слоев коллагена и эластина. Выявляются патологические изменения и в ХКС. Значительные смещения слоев коллагена БМ в область между сосудами ХКС приводят к фиброзу хорио-

окапилляров. Число хориокапилляров значительно снижено. Вследствие атрофии эндотелиальных клеток происходит облитерация сосудов, входящих в состав ХКС: практически полностью исчезает просвет сосуда. Место, где ранее располагался хориокапилляр, можно определить только по расположению ядра эндотелиальной клетки, принадлежащей ранее стенке сосуда (рис. 7).

Таким образом, у крыс линии OXYS в возрасте 24 мес. нами были выявлены значительные изменения ультраструктуры: 1 — фоторецепторных клеток (слой палочек практически полностью утрачен); 2 — клеток ПЭ: массовые скопления ЛГ в цитоплазме клеток ПЭ, разрастание базальных складок клеток ПЭ, атрофия отдельных клеток, васкуляризация; 3 — хориокапилляров: облитерация хориокапилляров, атрофия эндотелиальных клеток, уменьшение просвета функционирующих сосудов.

Эффект SkQ1 на ультраструктуру сетчатки и хориоидеи крыс OXYS в возрасте 24 мес. У животных этой группы ультраструктура сетчатой оболочки глаза резко отличается от ультраструктуры сетчатки крыс OXYS, не получавших лечение SkQ1. На рис. 8, а представлен участок сетчатки глаза крысы линии OXYS опытной группы. Видно, что сетчатая оболочка глаза содержит слои, характерные для данной ткани в норме: хорошо выражен наружный ядерный слой (НЯС), в котором лежат тела и ядра фоторецепторных клеток; слой палочек (СП) достаточно развит, хотя и отличается от нормы некоторой дезорганизацией и фрагментацией отдельных фоторецепторов. Слой фоторецепторных клеток выстилают клетки ПЭ.

Следует отметить, что сетчатка глаза животных линии OXYS, получавших лечение SkQ1, не была однородна по своей структуре. У одного и того же глаза, наряду с областями, содержащими хорошо развитые слои фоторецепторных клеток, присутствовали области с деградировавшими слоями. Однако, несмотря на встречающиеся области с деградацией фоторецепторных клеток, основной объем сетчатки крыс линии OXYS, получавших SkQ1, сохранял ультраструктуру, приближенную к ультраструктуре сетчатки глаза в норме.

Необходимо отметить, что состояние ультраструктуры ПЭ, БМ и ХКС у крыс OXYS, получавших лечение SkQ1, имело одинаковые ультраструктурные характеристики у всех исследованных животных и не зависело от нарушения слоев фоторецепторных клеток. На рис. 8, б видно, что ПЭ не имеет признаков патологии: в клетках ПЭ сильно развит эндоплазматический ретикулум, в цитоплазме хорошо различимы ри-

босомы. Объем митохондриального аппарата значительно увеличен: видны протяженные оргanelлы с мощно развитой системой крист.

Лечение животных антиоксидантом SkQ1 также восстанавливает структуру БМ. На рис. 8, а, б можно видеть, что БМ животных, получавших лечение SkQ1, несколько отличается по своей ультраструктуре от нормы, но не имеет аномальных образований (утолщений, протубе-

ранцев, образованных базальной поверхностью БМ).

Наряду с восстановлением БМ, под действием SkQ1 происходило восстановление ХКС, выстилающего клетки ПЭ (рис. 8, а). Если у контрольных 24-мес. крыс OXYS в хориоиде можно было видеть лишь единичные капилляры, нередко на протяжении всей длины среза (в среднем 210 мкм) не встречалось ни одного со-

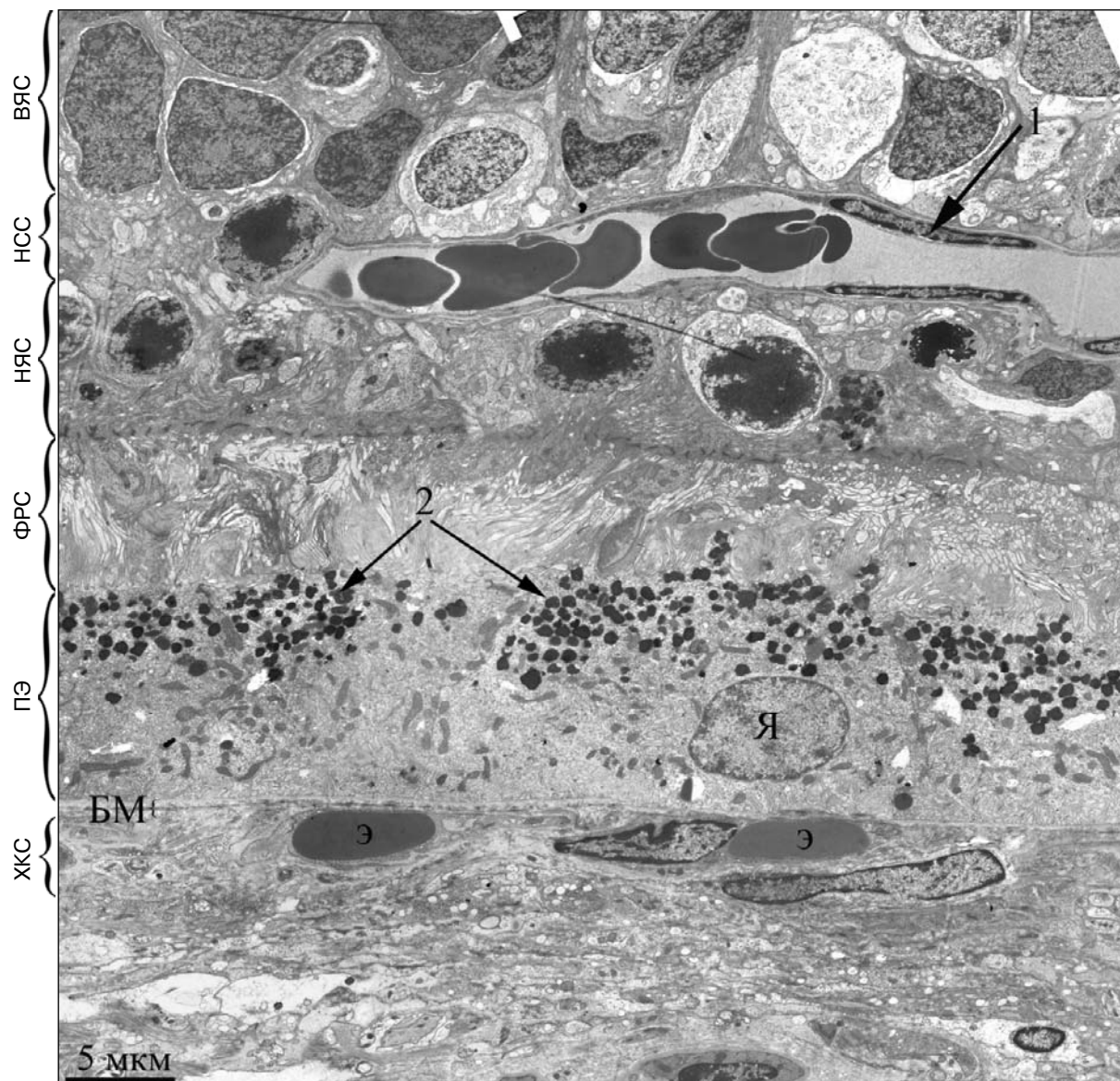


Рис. 6. Обзорная электронно-микроскопическая фотография участка сетчатки глаза крысы OXYS в возрасте 24 мес. ВЯС – в нем лежат тела и ядра вставочных нейронов; НСС – наружный сетчатый слой – зона контактов аксонов фоторецепторных нейронов с дендритами вставочных нейронов; НЯС – в нем располагаются тела и ядра фоторецепторных клеток; Э – эритроцит; Я – ядро клетки ПЭ. Стрелкой 1 обозначен кровеносный сосуд. Стрелками 2 обозначен мощно развитый слой ЛГ

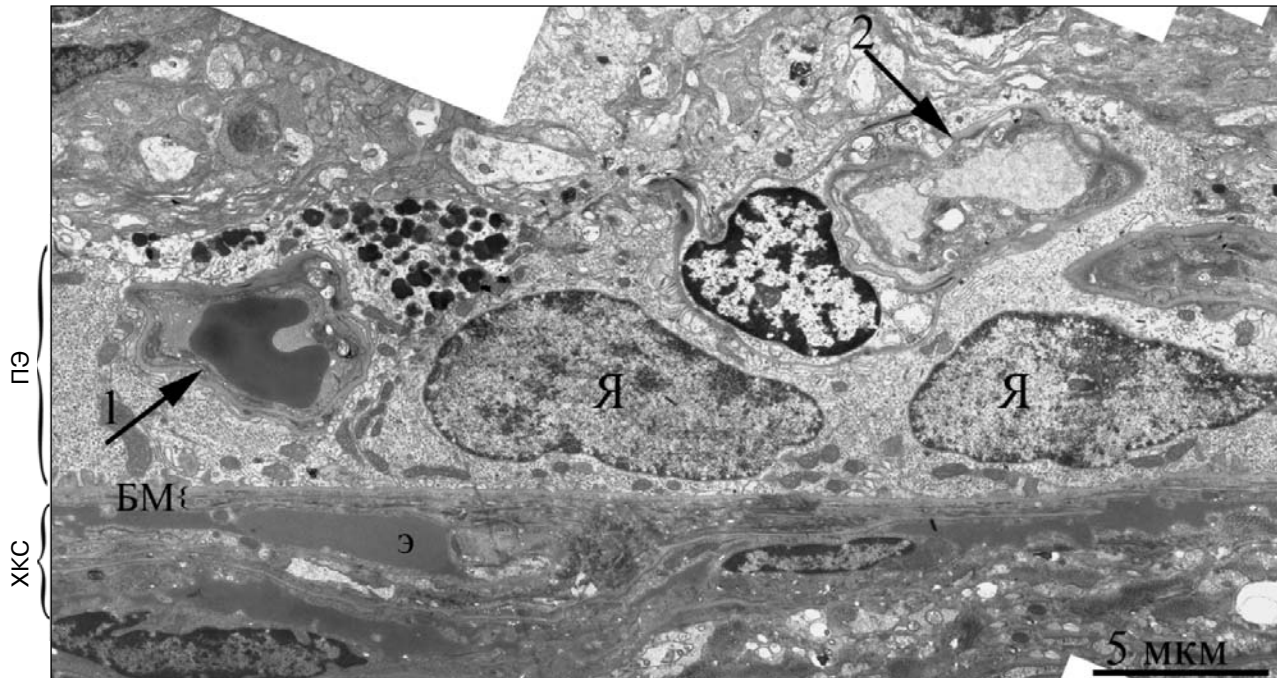


Рис. 7. Электронно-микроскопическая фотография ПЭ, БМ и ХКС крысы OXYS в возрасте 24 мес. Э – эритроцит; Я – ядро клетки ПЭ. Стрелками показаны сосуды: 1 – сосуд, расположенный в слое клеток ПЭ; 2 – сосуд направлен в слой клеток ПЭ со стороны внутренней сетчатки

суда, у животных, получавших SkQ1, просвет капилляров виден, также отчетливо видны эндотелиальные клетки, по ультраструктуре соответствующие эндотелиальным клеткам intactных хориокапилляров (рис. 8, а).

Математическая обработка и статистический анализ данных электронной микроскопии выполнены для intactных крыс OXYS в возрасте 3 и 24 мес., а также для 24-мес. крыс OXYS, получавших в течение пяти месяцев SkQ1 (см. «Методы исследования»). Статистическое исследование включало анализ 10 участков, протяженностью в среднем 210 мкм для каждой группы животных. Показано (рис. 9), что у крыс OXYS к возрасту 24 мес. площадь хориокапилляров на единицу длины БМ значительно снижается по относительно выявлено у 3-мес. животных этой линии (с $3,04 \pm 0,23$ мкм²/мкм до $0,6 \pm 0,13$ мкм²/мкм), свидетельствуя о практически полной деградации сосудов хориоидеи. Прием антиоксиданта SkQ в течение 5 мес. оказал мощный терапевтический эффект: деструктивные изменения ХКС прекращаются. Удельная площадь хориокапилляров у крыс, получавших SkQ1, превышает значение данной величины для крыс OXYS, не получавших SkQ1, почти в 3 раза ($1,73 \pm 0,21$ мкм²/мкм и $0,6 \pm 0,13$ мкм²/мкм

соответственно). Полученный результат полностью подтверждает данные визуальных наблюдений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, нами показано, что у крыс Wistar в возрасте 24 мес. регистрируются резко выраженные дегенерационные возраст-зависимые изменения тканей глазного дна, однако эти изменения носят локальный характер и не являются характерными для всех животных этой группы. В отличие от крыс Wistar, прогрессирующие патологические изменения сетчатки глаза наблюдаются у всех без исключения крыс OXYS в возрасте 24 мес. и распространяются на сетчатку глаза, включая фоторецепторные клетки, клетки ПЭ, а также БМ и ХКС.

Одним из важных, обнаруженных нами патологических признаков, является васкуляризация клеток ПЭ (рис. 3, 6, 7). При дегенерации фоторецепторных клеток НЯС и СП исчезают, в результате чего клетки ПЭ подвергаются васкуляризации. Классические представления о прорастании сосудов при дистрофии сетчатки предполагают источником капилляров в клетках ПЭ

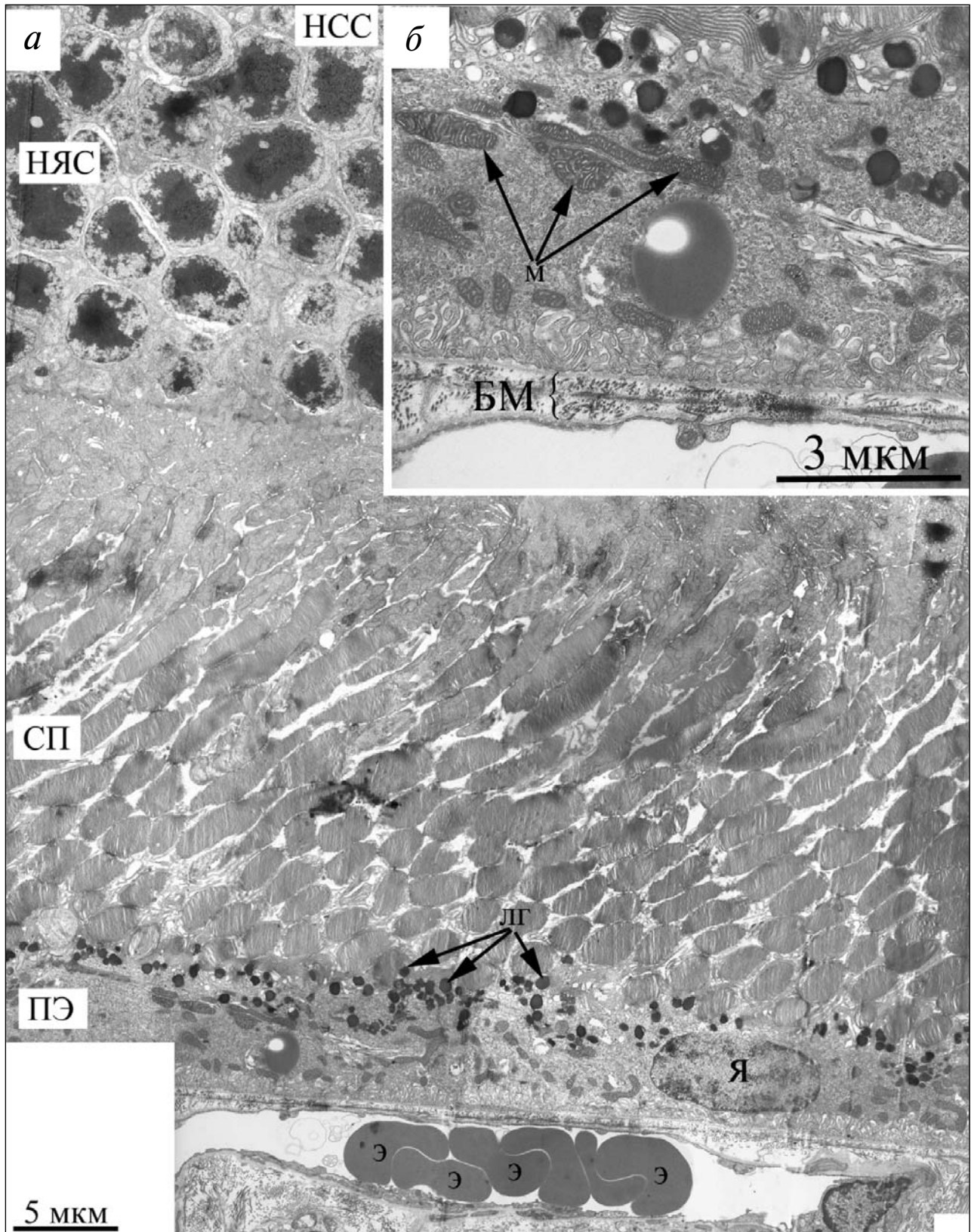


Рис. 8. Электронно-микроскопические фотографии участка сетчатки глаза крысы OXYS в возрасте 24 мес., получавшей SkQ1 в количестве 250 нмоль/кг ежедневно с пищей в течение 5 мес. *a* – Обзорная фотография. ФРС – слой фоторецепторов; Я – ядро клетки ПЭ; Э – эритроциты; *б* – особенности ультраструктуры клетки ПЭ, БМ. М – митохондрии

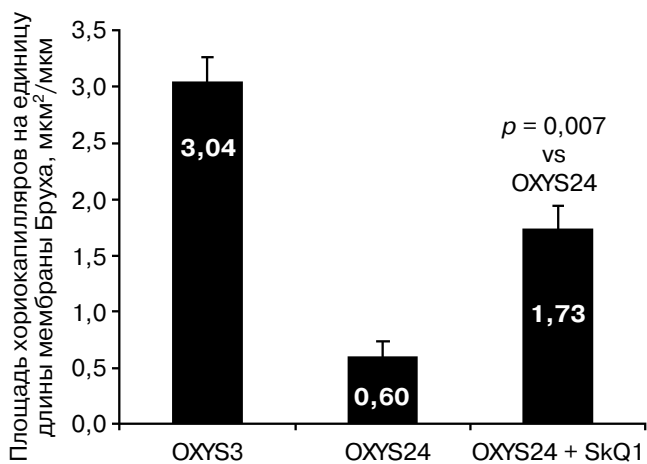


Рис. 9. Площадь хориокапилляров на единицу длины БМ, ($\mu\text{м}^2/\mu\text{м}$) у крыс OXYS в возрасте 3 мес. (OXYS 3), 24 мес. (OXYS 24) и 24 мес., получавших антиоксидант SkQ1 (OXYS 24 + SkQ1) ($p = 0,007$, STATISTICA 6)

хориоидею. Однако анализ полученных нами результатов указывает, что возможен другой источник сосудистого пророста. Поскольку наружные слои сетчатки деградируют, сосуды из внутренней сетчатки мигрируют в клетки ПЭ. Оказавшись внутри слоя клеток ПЭ, капилляр начинает разрастаться, постепенно увеличиваясь в размерах. Нами впервые на ультраструктурном уровне показан процесс пророста сосуда в слой клеток ПЭ. Действительно, на рис. 3 видно, что сосуд, обозначенный стрелкой 1, направлен в слой клеток ПЭ со стороны внутренней сетчатки. При этом никаких изменений структуры БМ, связанных с проникновением капилляра со стороны хориоидеи, не выявляется.

Обнаруженные нами изменения в ультраструктуре ПЭ крыс Wistar и OXYS в возрасте 24 мес., очевидно, отражают нарушения функционирования зрительного цикла. Так, согласно общепринятым представлениям, в норме, в клетках палочек, в процессе фотопревращения родопсина, *транс*-ретиаль в комплексе с фосфатидилэтаноламином переносится через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента и далее в клетку ПЭ [28–30]. При нарушениях зрительного цикла, не удаленный вовремя из фоторецепторной мембраны диска ретиаль накапливается в ней, а затем взаимодействует с фосфатидилэтаноламином, в результате чего в мембране образуется бис-ретиалиден-фосфатидилэтаноламин (A2E-PE), являющийся предшественником бис-ретиалиден-этаноламина (A2E) – основного флуорофора ЛГ. Вероятно,

обнаруженное нами массовое скопление ЛГ в цитоплазме клеток пигментного эпителия отражает этот процесс и способствует развитию дальнейших нарушений в функционировании зрительного цикла, поскольку в настоящее время доказано, что ЛГ крайне фототоксичны [15]. Практически полное отсутствие в пигментном эпителии фагосом также свидетельствует в пользу этого предположения.

В случае ХКС, деградиационные изменения типичны для обеих групп животных. Однако, состояние ультраструктуры ХКС крыс Wistar в возрасте 24 мес. позволяет сделать вывод о том, что это функционирующая структура, деградиационные изменения которой не столь значительны, как в случае 24-мес. крыс OXYS. Полной облитерации сосудов у крыс Wistar нам обнаружить не удалось. Математическая обработка данных подтверждает эти результаты. Действительно, если у животных линии Wistar в возрасте 24 мес. удельная площадь хориокапилляров на единицу длины БМ составляет $1,08 \pm 0,22 \mu\text{м}^2/\mu\text{м}$, то та же величина у крыс линии OXYS составляет всего $0,6 \pm 0,13 \mu\text{м}^2/\mu\text{м}$. Полученные нами результаты полностью совпадают с данными Колосовой с соавт. [31] о том, что 92% животных линии OXYS уже в 11 мес. имеют дистрофические изменения в макулярной области сетчатки, прогрессирующие с возрастом, в то время как у крыс линии Wistar аналогичные изменения авторы регистрировали лишь у отдельных животных (7%) и в возрасте старше 12 мес.

Проведенное нами электронно-микроскопическое исследование показало, что прием SkQ1 восстанавливает ультраструктуру ПЭ до состояния, характерного для этой ткани у крыс без нарушений зрения. Кроме этого, препарат SkQ1 не только останавливает развитие дегенеративных изменений ультраструктуры БМ, характерных для больных животных, но и восстанавливает ультраструктуру этого комплекса.

Прием SkQ1 существенно увеличил удельную площадь полноценно функционирующих хориокапилляров у крыс обеих линий. У получавших антиоксидант крыс Wistar она была вдвое ($2,22 \pm 0,35$ и $1,08 \pm 0,22 \mu\text{м}^2/\mu\text{м}$ соответственно), а у крыс OXYS в 2,8 раза ($1,73 \pm 0,21$ и $0,6 \pm 0,13 \mu\text{м}^2/\mu\text{м}$ соответственно) больше, чем у контрольных животных. Полученный результат впечатляет, поскольку обнаруженная нами практически полная дегградация ХКС у не леченых животных, казалось бы, не предполагает возможности какого-либо восстановления полностью утраченной системы мелких сосудов.

Таким образом, проведенное нами электронно-микроскопическое исследование на ультраструктурном уровне показало мощный терапев-

тический эффект митохондриально-направленного антиоксиданта SIQ1. Прием SkQ1 крысами Wistar и OXYS с возраста 19 мес. предупреждает нарушения и/или восстанавливает структурно-функциональные параметры хориокапилляров, пигментного эпителия и мембраны Бруха. Принципиально важно, что терапевтический эффект митохондриально-направленного анти-

оксиданта SkQ1 получен на крысах Wistar и OXYS с выраженными возрастными изменениями сетчатки. Данные математического анализа и статистической обработки данных полностью подтверждают результаты визуальных наблюдений возрастных изменений ультраструктуры хориокапилляров сетчатки глаз крыс Wistar и OXYS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hayashi, A., Majji, A.B., Fujioka, S., Kim, H.C., Fukushima, I., and de Juan, E. Jr. (1999) *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **237**, 668–677.
- Henkind, P., and Gartner, S. (1983) *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.*, **103**, 444–447.
- Heriot, W.J., and Machemer, R. (1992) *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **230**, 91–100.
- Leonard, D.S., Sugino, I.K., Zhang, X.G., Ninomiya, Y., Yagi, F., Tsukahara, I., Castellarin, A., and Zarbin, M.A. (2003) *Exp. Eye Res.*, **76**, 473–491.
- McLeod, D.S., Grebe, R., Bhutto, I., Merges, C., Baba, T., and Luty, G.A. (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 4982–4991.
- Feigl, B. (2009) *Prog Retin Eye Res.*, **28**, 63–86.
- Feigl, B. (2007) *Clin Exp Optom.*, **90**, 263–271.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000) *Surv. Ophthalmol.*, **45**, 115–134.
- Suzuki, M., Kamei, M., Itabe, H., Yoneda, K., Bando, H., Kme, N., and Tano, Y. (2007) *Mol. Vis.*, **23**, 772–778.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 7915–7922.
- Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, Jr.P., and Jones, D.P. (2000) *Prog. Retin. Eye Res.*, **19**, 205–221.
- Liang, F., and Godley, B.F. (2003) *Exp. Eye Res.*, **76**, 397–403.
- Binder, S., Stanzel, V., Krebs, I., and Glittenberg, C. (2007) *Prog. Retin. Eye Res.*, **5**, 516–554.
- Сапрунова В.Б., Пилипенко Д.И., Алексеевский А.В., Фурсова А.Ж., Колосова Н.Г., Бакеева Л.Е. (2010) *Биохимия*, **75**, 158–168.
- Островский М.А. (2005) *Успехи биол. химии*, **45**, 173–204.
- Нероев В.В., Архипова М.М., Бакеева Л.Е., Фурсова А.Ж., Григорян Е.Н., Гришанова А.Ю., Иомдина Е.Н., Иващенко Ж.Н., Катаргина Л.А., Килина О.В., Колосова Н.Г., Пилипенко Д.И., Копенкин Е.П., Ковалева Н.А., Новикова Ю.П., Филиппов П.П., Робустова О.В., Сапрунова В.Б., Сенин И.И., Скулачев М.В., Сотникова Л.Ф., Тихомирова Н.К., Стефанова Н.А., Хорошилова-Маслова И.П., Цапенко И.В., Щипанова А.И., Скулачев В.П. (2008) *Биохимия*, **73**, 1641–1654.
- Жданкина А.А., Фурсова А.Ж., Логвинов С.В., Колосова Н.Г. (2008) *Бюлл. Экспрем. Биол.*, **145**, 435–438.
- Skulachev, V.P., Anisimov, V.N., Antonenko, Y.N., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Elichev, V.P., Filenko, O.F., Kalinina, N.I., Kapelko, V.I., Kolosova, N.G., Kopnin, B.P., Korshunova, G.A., Lichinitser, M.R., Obukhova, L.A., Pasyukova, E.G., Pisarenko, O.I., Roginsky, V.A., Ruuge, E.K., Senin, I.I., Severina, I.I., Skulachev, M.V., Spivak, I.M., Tashlitsky, V.N., Tkachuk, V.A., Vysokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2009) *Biochim Biophys Acta.*, **1787**, 437–461.
- Markovets, A.M., Fursova, A.Z., and Kolosova, N.G. (2011) *PLoS One*, **6**, e21682.
- Markovets, A.M., Saprunova, V.B., Zhdankina, A.A., Fursova, A.Zh., Bakeeva, L.E., and Kolosova, N.G. (2011) *Aging. Albany N.Y.*, **3**, 44–54.
- Меньшикова Е.Б., Шабалина И.Г., Зенков Н.К., Колосова Н.Г. (2002) *Бюлл. эксп. биол. и медиц.*, **133**, 207–210.
- Kolosova, N.G., Shcheglova, T.V., Sergeeva, S.V., and Loskutova, L.V. (2006) *Neurobiol. Aging*, **27**, 1289–1297.
- Румянцева Ю.В., Фурсова А.Ж., Федосеева Л.А., Колосова Н.Г. (2008) *Биохимия*, **73**, 1467–1475.
- Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. (1975) *Генетика*, **11**, 63–71.
- Young, R.W. (1988) *Surv. Ophthalmol.*, **32**, 252–269.
- Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., and Sternberg, P. (1999) *Mol. Vis.*, **5**, 32.
- Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., and Tsubota, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11282–11287.
- Sun, H., Molday, R.S., and Nathans, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 8269–8281.
- Kennedy, M.J., Lee, K.A., Niemi, G.A., Craven, K.B., Garwin, G.G., Saari, J.C., and Hurley, J.B. (2001) *Neuron*, **31**, 3187–101.
- Sun, H., and Nathans, J.J. (2001) *Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 523–530.
- Колосова Н.Г., Лебедев П.А., Фурсова А.Ж., Морозкова Т.С., Гусаревич О.Г. (2003) *Успехи геронтологии*, **12**, 143–148.

**SkQ1 SLOWS DEVELOPMENT OF AGE-DEPENDENT
DESTRUCTIVE PROCESSES IN THE RETINA
AND VASCULAR LAYER OF EYES OF WISTAR
AND OXYS RATS**

**V. B. Saprunova^{1,3*}, M. A. Lelekova¹,
N. G. Kolosova^{2,3}, L. E. Bakeeva^{1,3}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russia;
fax: (495)939-3181, E-mail: fxb@belozersky.msu.ru*

² *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 10,
Novosibirsk 630090, Russia; fax: (383)333-1278,
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru*

³ *Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University,
Moscow 119992, Russia; fax: (495)939-5945,
E-mail: info@mitotech.ru*

Received February 23, 2012

Here we describe the development of pronounced age-related pathological changes in eye tissues in Wistar and OXYS rats. Photoreceptor cells in all studied OXYS rats 24 months of age were almost completely absent. The massive accumulations of lipofuscin granules were detected in the cells of the pigment epithelium. Also there was fibrosis of choroid and degradation of endothelium and, as a result, obliteration of choriocapillaris cavities. Against the background of these changes, the location of vessels (with no signs of degradation) in the pigment epithelium was detected. In Wistar rats 24 months of age, these changes were revealed not at all animals and were local in nature. The mitochondrial antioxidant SkQ1 (rats were fed SkQ1 daily with food at 250 nmol/kg for 5 months, starting from 19 months of age) prevented the development of these pathological changes in Wistar and OXYS rats. The data were mathematical analyzed and statistically processed.

Key words: ultrastructure, oxidative stress, the retina, choriocapillaris, antioxidant