



Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН

**ФУРСОВА АНЖЕЛЛА ЖАНОВНА**

**Хориоретинальная дистрофия: особенности  
развития при преждевременном старении и  
коррекция митохондриальным  
антиоксидантом SkQ1**

*14.00.16 – патологическая физиология*

Научный консультант – д.б.н. Н.Г.Колосова

В мире **161000000** человек слепых и слабовидящих, среди них слепых – **47000000**.

---

Причины:     - **47%** – катаракта,  
                  - **9%** – макулодистрофия.

*Возрастная макулодистрофия:*

Европа и США – 1-е место,  
Азия – 2-е место.

В России макулодистрофия становится причиной слепоты в 22% случаев (*Е.С.Либман, 2006*).

**14 - 46% россиян в возрасте старше 65 лет страдают этим заболеванием.**

# Проявления преждевременного старения крыс OXYS:

---

**Продолжительность жизни снижена.**

**Ранняя инволюция тимуса, снижение реактивности  
клеточного звена иммунной системы.**

**Ранний остеопороз.**

**Изменения в когнитивной и эмоциональной сферах,  
свойственные стареющим людям и животным.**

**Повышено артериальное давление.**

**Ранняя спонтанная катаракта**

# Цель работы:

---

- исследование особенностей развития хориоретинальной дистрофии у преждевременно стареющих крыс OXYS и оценка терапевтического потенциала митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1.

# Задачи:

---

1. Охарактеризовать клинические особенности развития патологических изменений сетчатки и хрусталиков у крыс OXYS.
2. Провести морфологическое исследование тканей хориоретинального комплекса и изучить особенности развития ХРД у крыс OXYS.
3. Оценить уровень экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF в тканях внутренней оболочки глаз крыс OXYS на разных стадиях развития ХРД.
4. Установить связь развития катаракты и ХРД у крыс OXYS с окислительным стрессом и оценить возможность воздействия на их течение методами стандартной терапии с использованием препаратов со свойствами антиоксидантов.
5. Изучить влияние митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1 на развитие хориоретинальной дистрофии и катаракты у крыс OXYS и связь его эффектов с влиянием на экспрессию гена VEGF хориоретинальном комплексе и альфа-кристаллинов в хрусталиках.



# Методы исследования

**Животные:** 1710 крыс ОХУС и Вистар, возраст от 20 дней до 24 мес.

## Офтальмологические методы:

- осмотры с помощью прямого офтальмоскопа "Betta" с насадкой щелевой лампы.
- Биомикроскопическое исследование щелевой лампой SL-45 "Shin Nippon".
- Исследование глазного дна с помощью Фундус-камеры «Opton».
- Электроретинография.

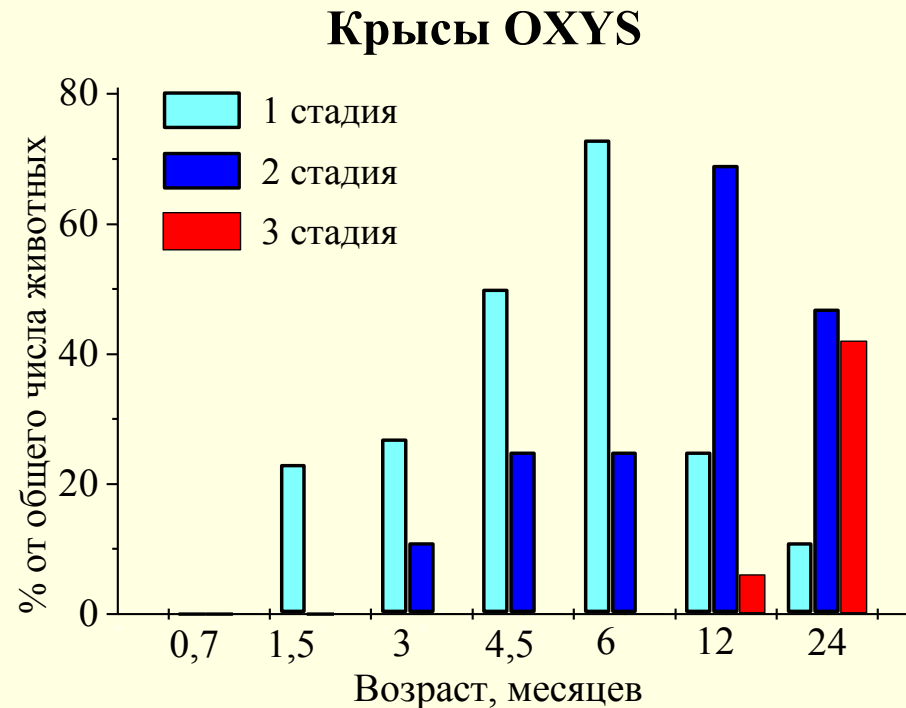
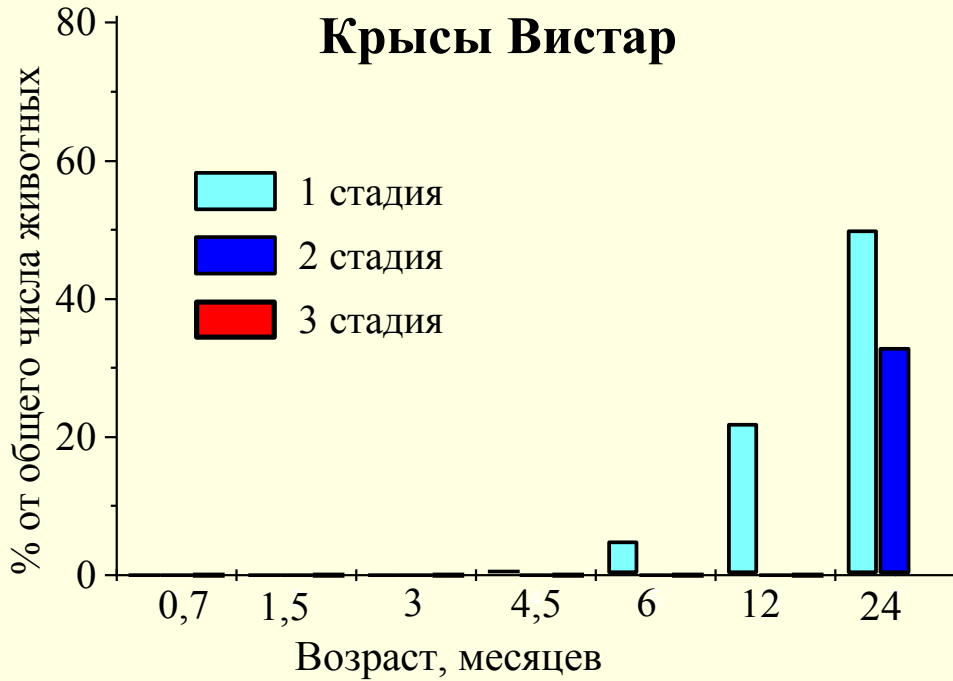
## Морфологические методы:

Световая и электронная микроскопия

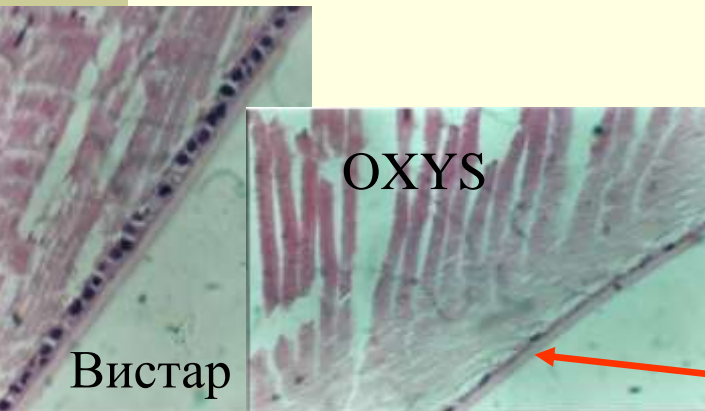
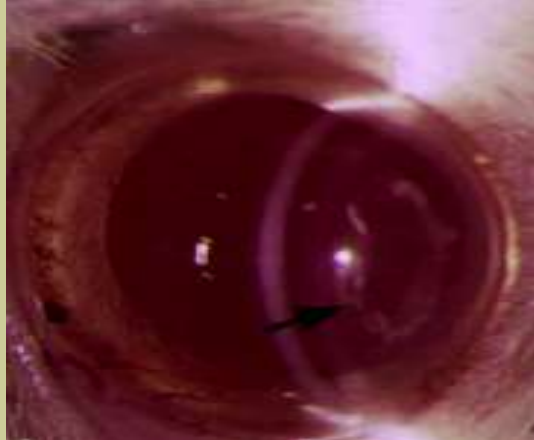
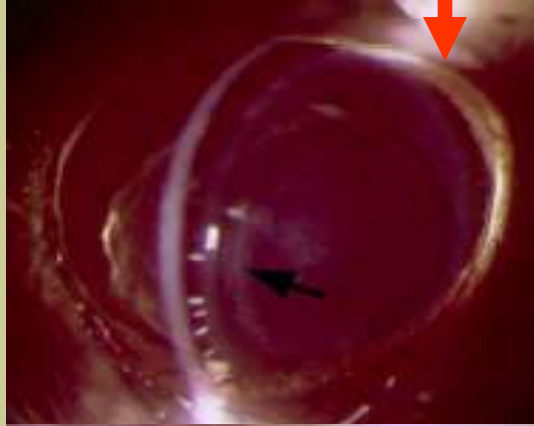
## Молекулярно-биохимические методы:

ПЦР в реальном времени, стандартные биохимические методы

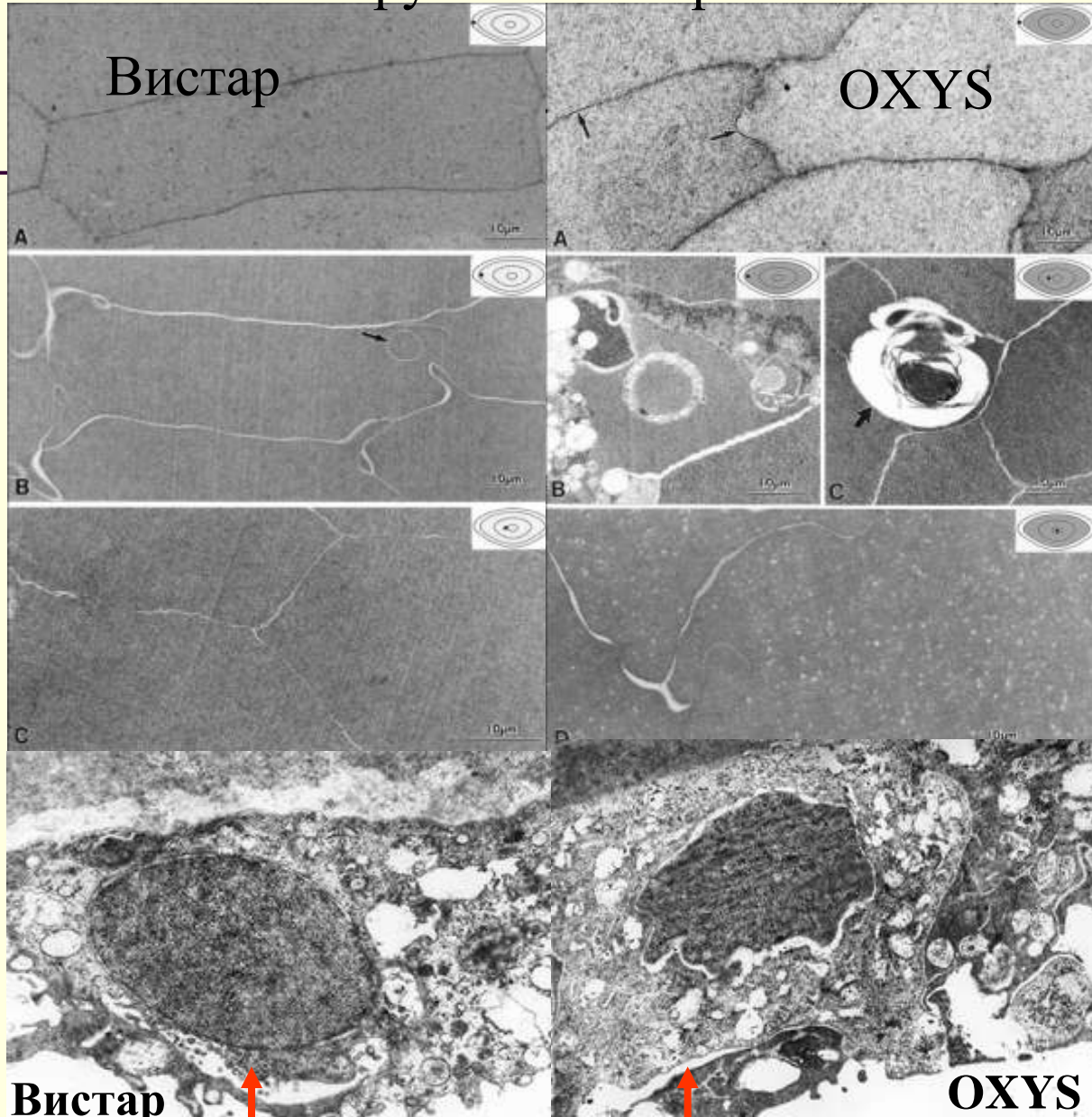
# Распределение крыс Вистар и OXYS разного возраста по стадиям развития катаракты



# Ядерная катаракта, крыса OXYS



# Электронно-микроскопическая картина изменений хрусталиков крыс OXYS



Вистар

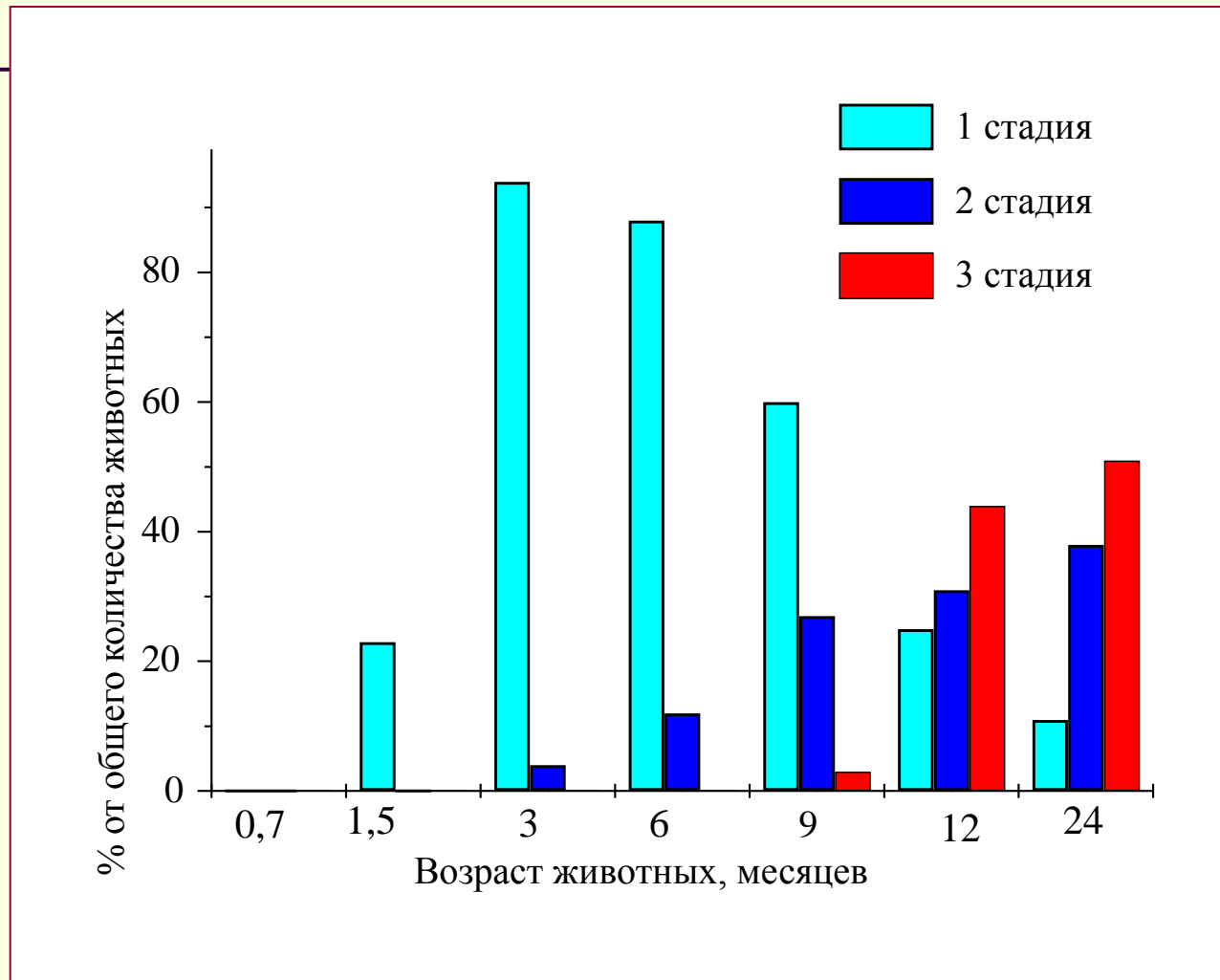
OXYS

OXYS

Эпителициты экваториальной зоны

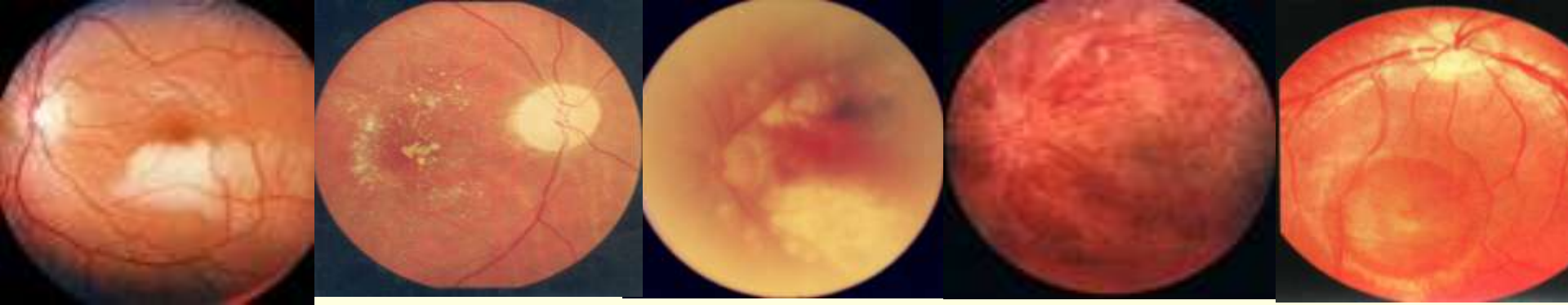


В 98% случаев катаракта у крыс ОХУС развивается на фоне дистрофических изменений сетчатки.

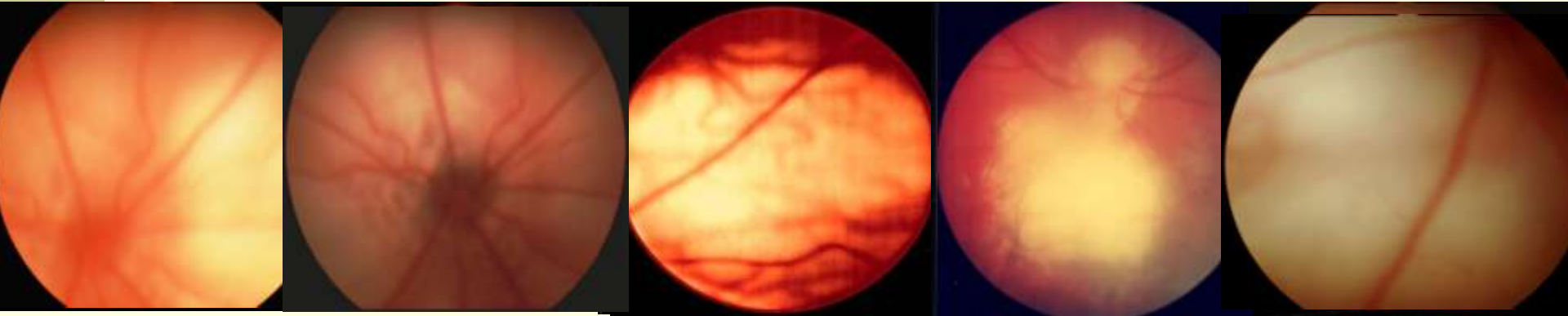


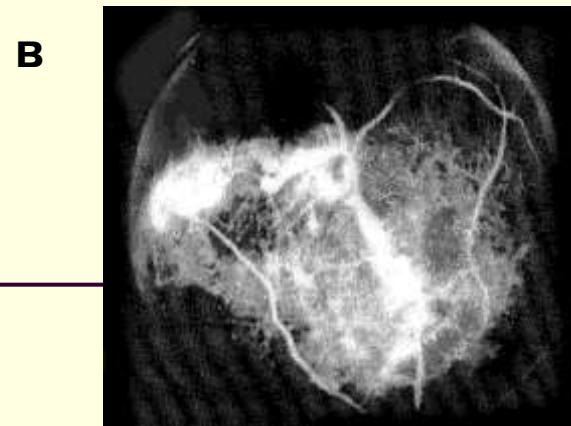
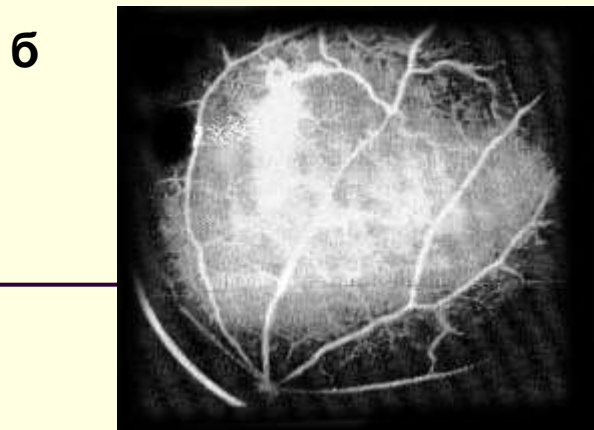
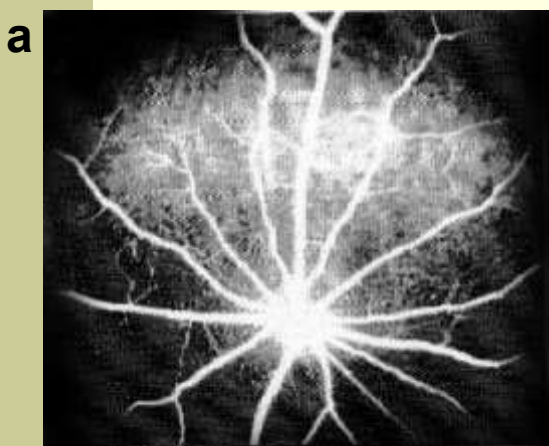
Зависимость распределения по ХРД стадиям от возраста

# Основные клинические проявления дистрофии сетчатки аналогичны у людей



...и крыс ОХУС:



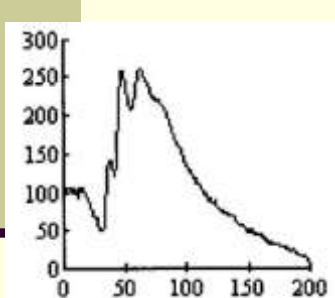


## Флуоресцентная ангиография глазного дна крыс ОХУС.

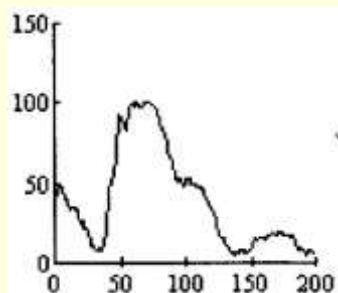
а - зоны атрофии пигментного эпителия;

б - субретинальная трансудация, отслойка РПЕ,

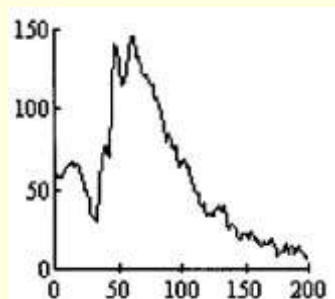
в - отслойка нейроэпителия с участками субретинальной новообразованной мембраны



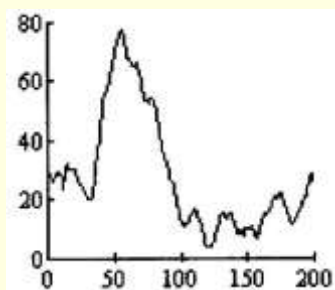
**а**



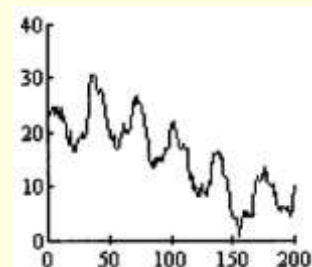
**б**



**в**



**г**



**д**

**ЭРГ крыс ОХУС разного возраста:**

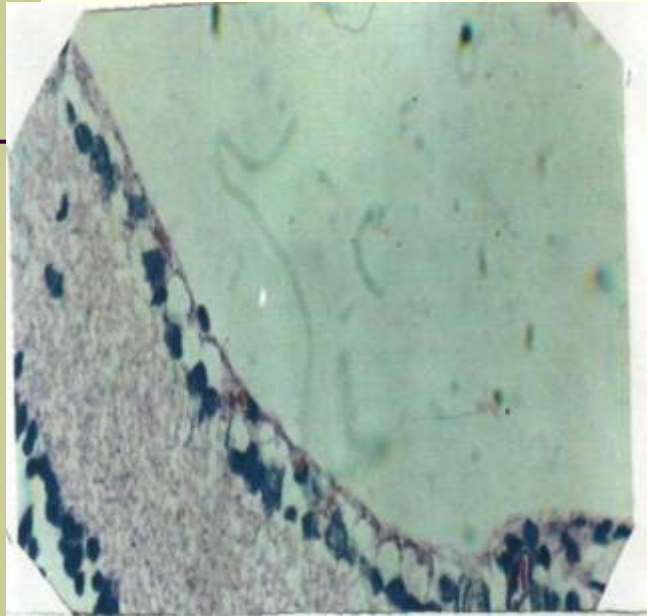
**а - супернормальная ЭРГ, возраст 3 мес.; б - негативная ЭРГ,**

**возраст 6 мес.; в- нормальная ЭРГ, возраст 3 нед. ;**

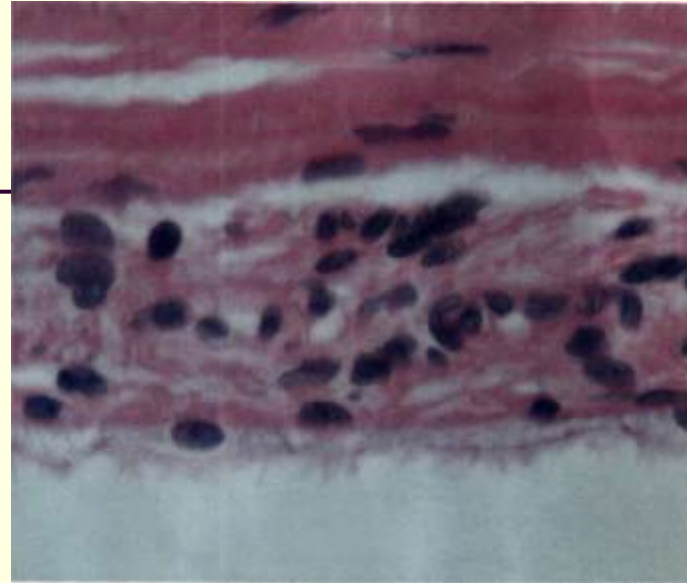
**г - субнормальная ЭРГ, возраст 7 мес.; д - нерегистрируемая ЭРГ, возраст 12 мес.**

# Хориоретинальный комплекс крыс ОХУС разного возраста

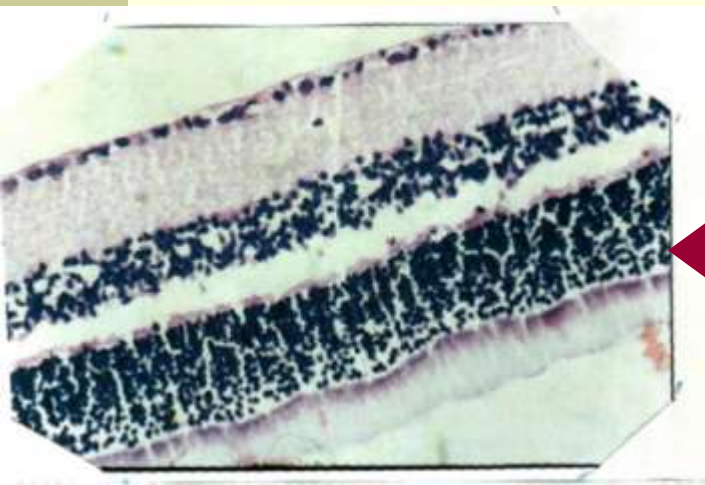
( 400, гематоксилин-эозин).



3 мес., отек в слое ганглиозных клеток сетчатки. Ядра отодвинуты от внутренней пограничной мембраны.



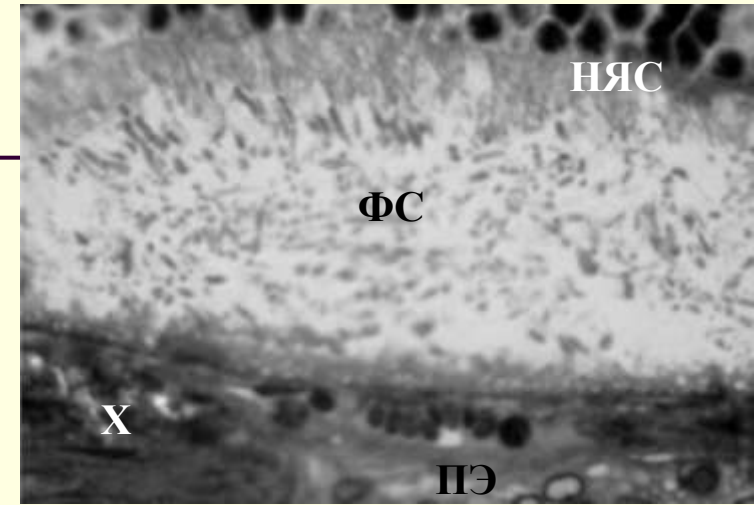
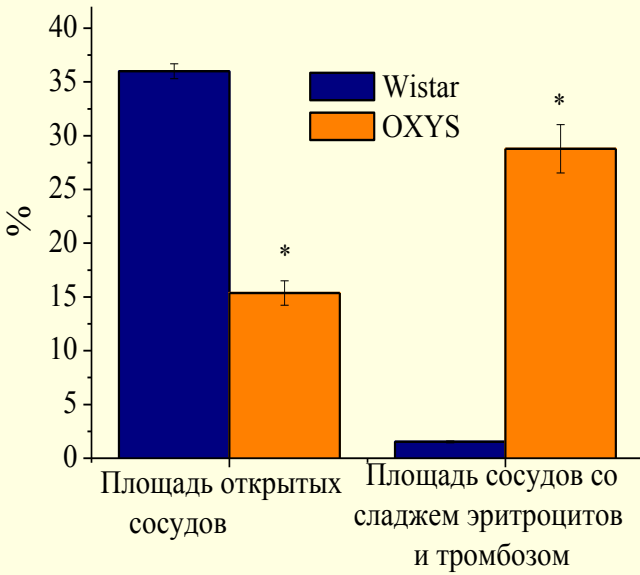
24 мес., тотальный фиброз хориоидеи, просветы сосудов не определяются.



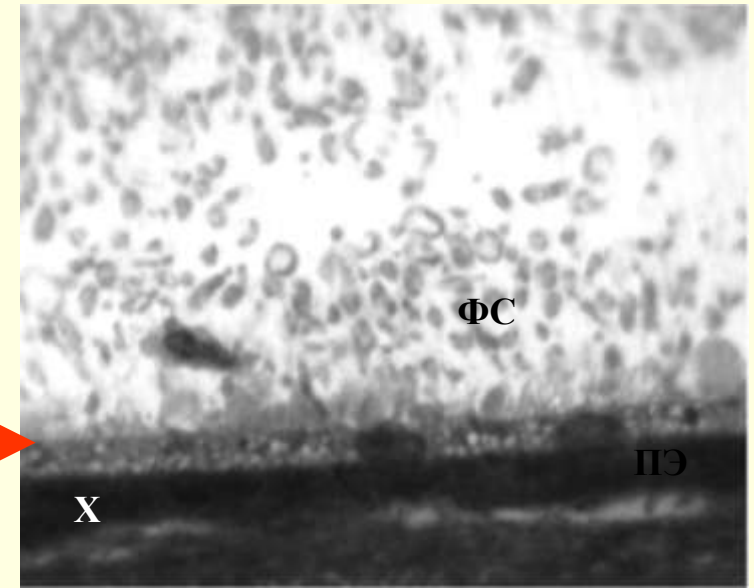
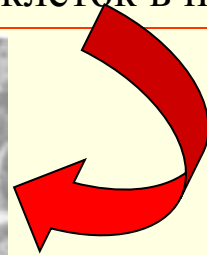
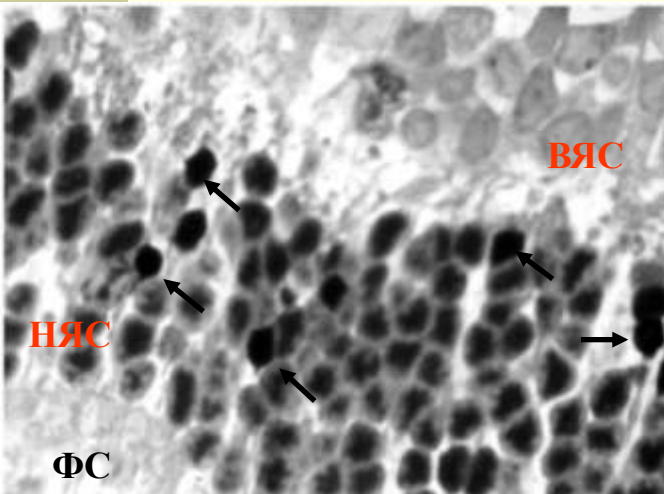
Крыса Wistar, 24 мес.: нормальное строение сетчатки глаза. (×400, окраска гематоксилин-эозин).

# Возраст животных – 5 месяцев

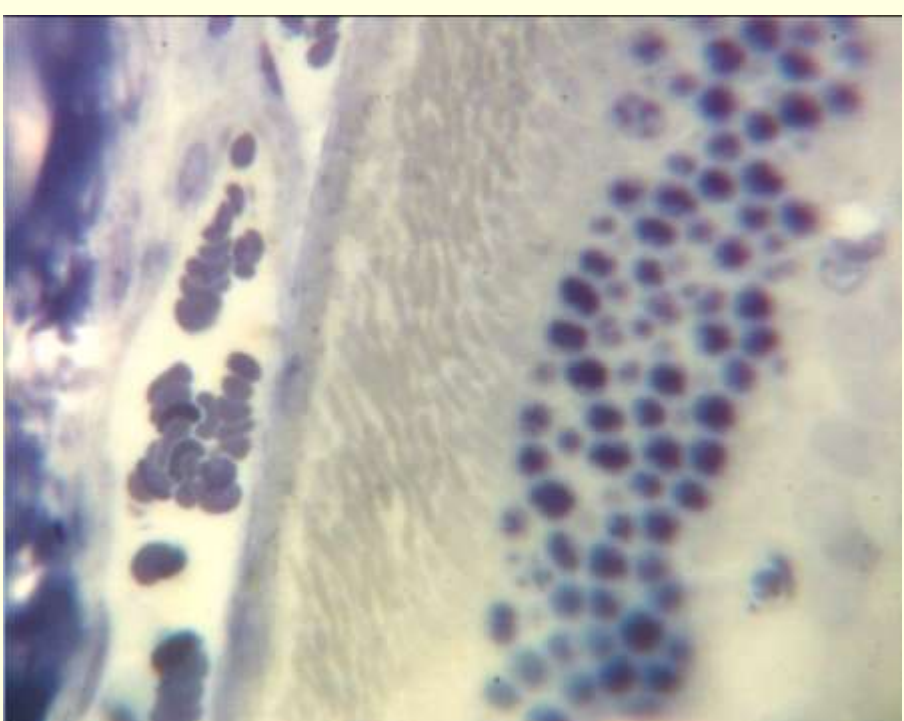
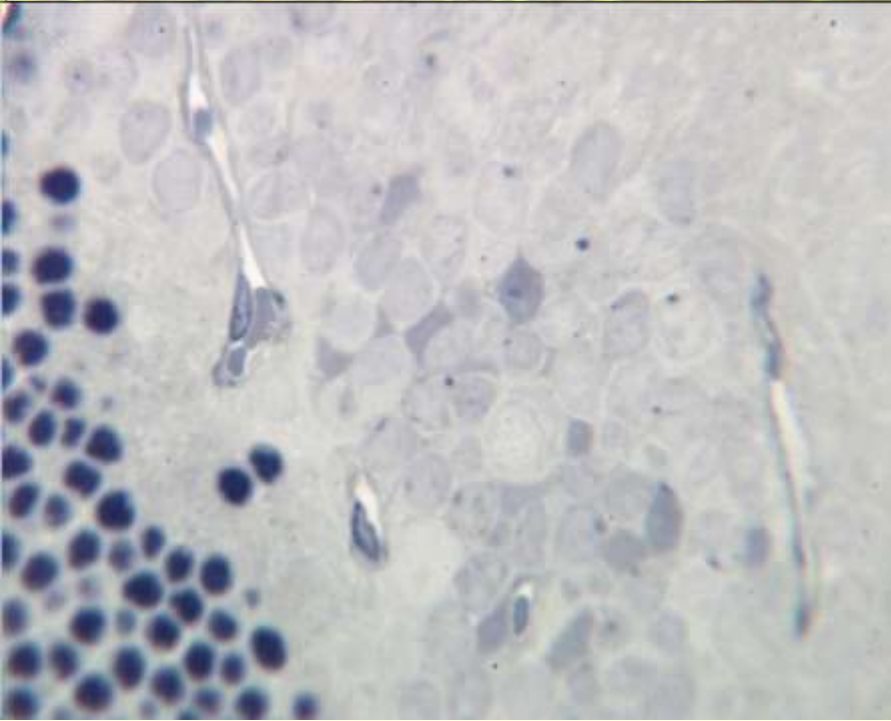
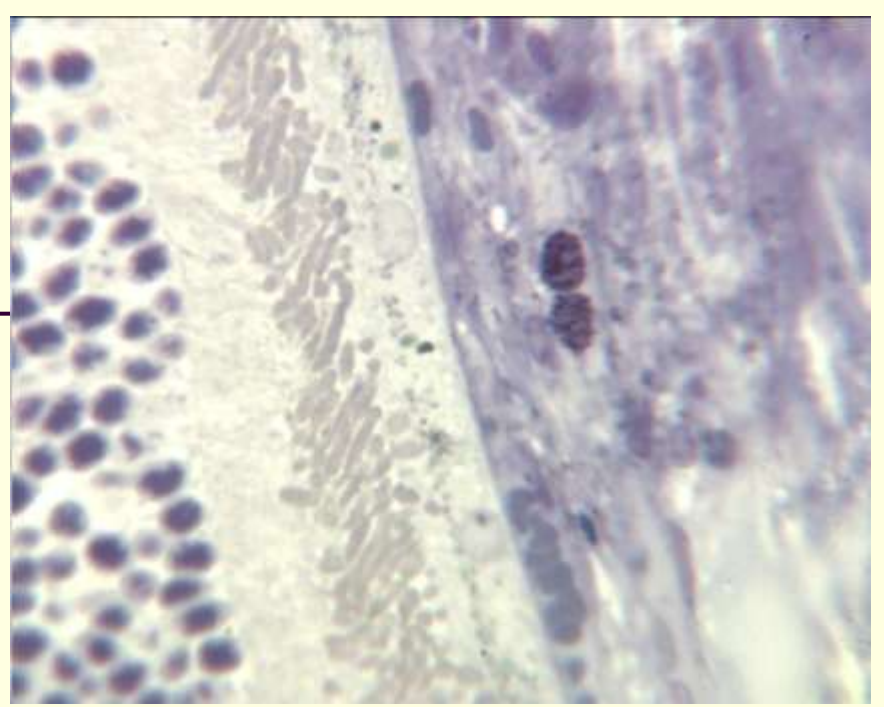
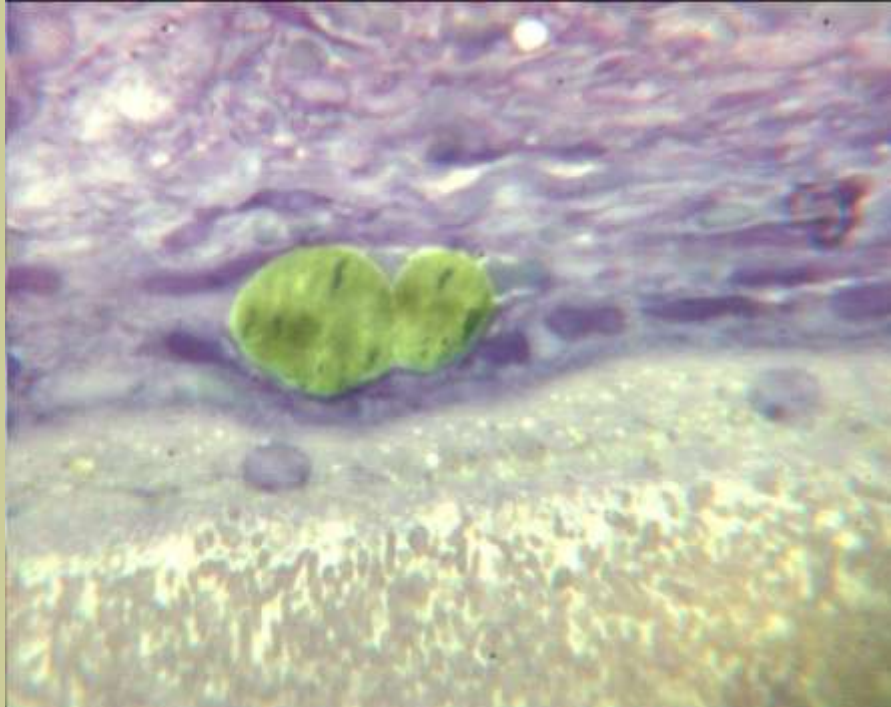
# Стаз форменных элементов в сосудах хориоидеи крыс OXYS.



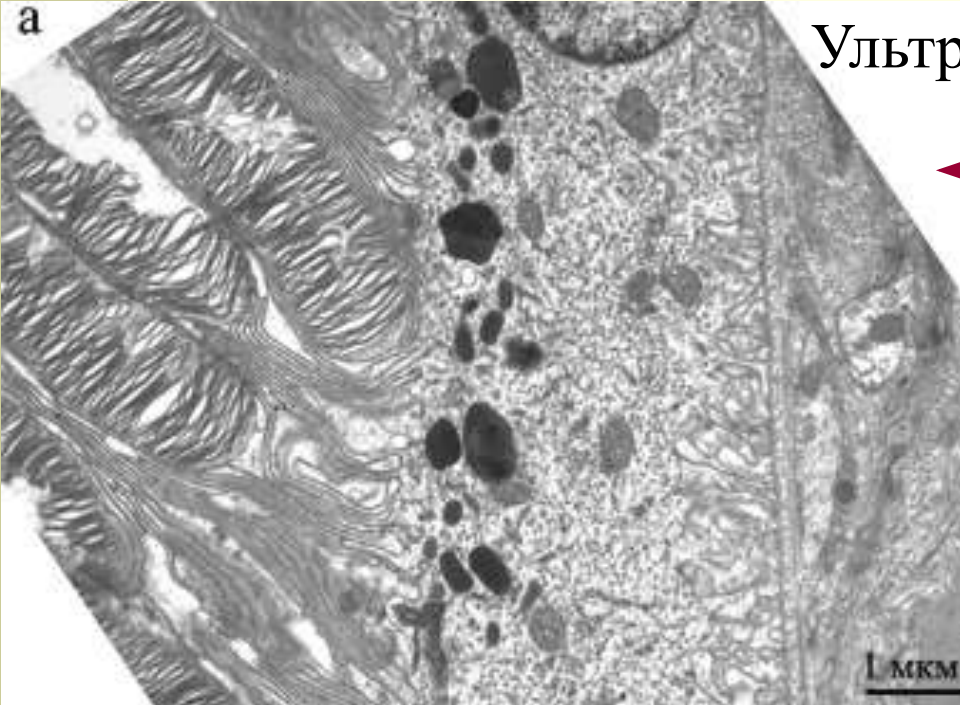
## Пикноз ядер нейросенсорных клеток в наружном ядерном слое сетчатки крыс OXYS



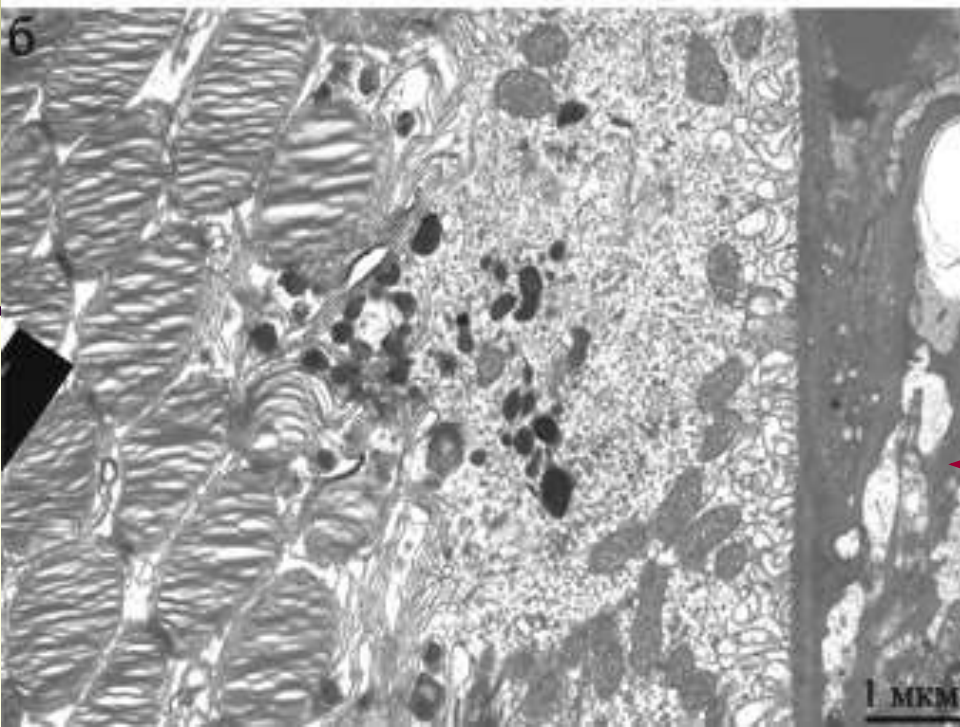
Расслоение и фрагментация наружных сегментов фоторецепторов сетчатки крыс OXYS



# Ультраструктура пигментного эпителия



Крыса Wistar в возрасте 11 мес.



Крыса OXYS в возрасте 11 мес.

Линия крыс	Удельная площадь пигментного эпителия сетчатки (%)
Вистар	5,43 0,1
OXYS	3,56 0,21*

## 1-е положение, выносимое на защиту:

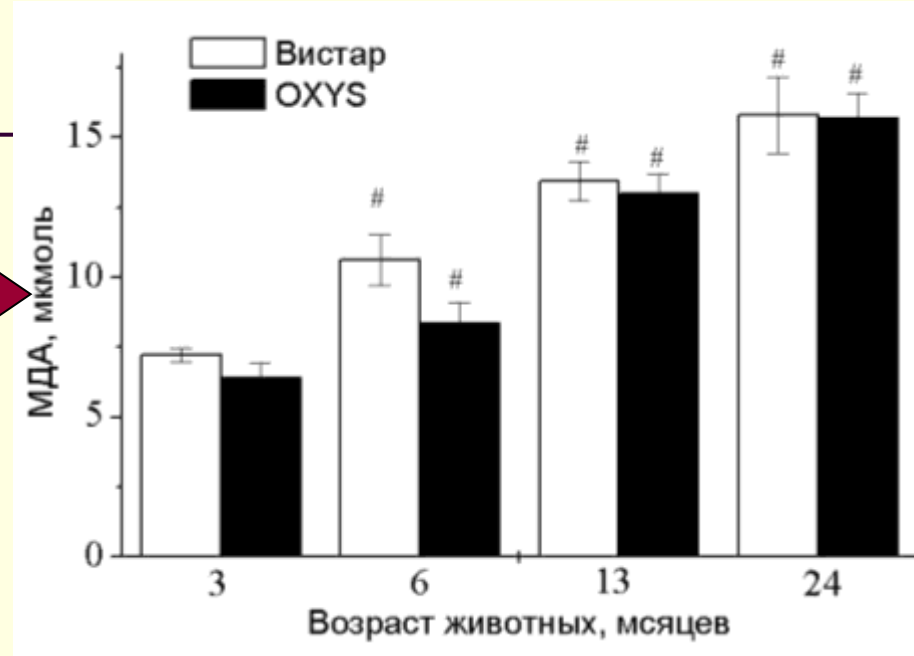
---

Развитие у крыс OXYS хориоретинальной дистрофии по клиническим и морфологическим проявлениям соответствует возрастной макулодистрофии людей, развивается параллельно с формированием катаракты и является одним из проявлений преждевременного старения.



У крыс ОХУС (70-80 поколения) манифестация хориоретинальной дистрофии и катаракты по времени опережает появление признаков окислительного стресса.

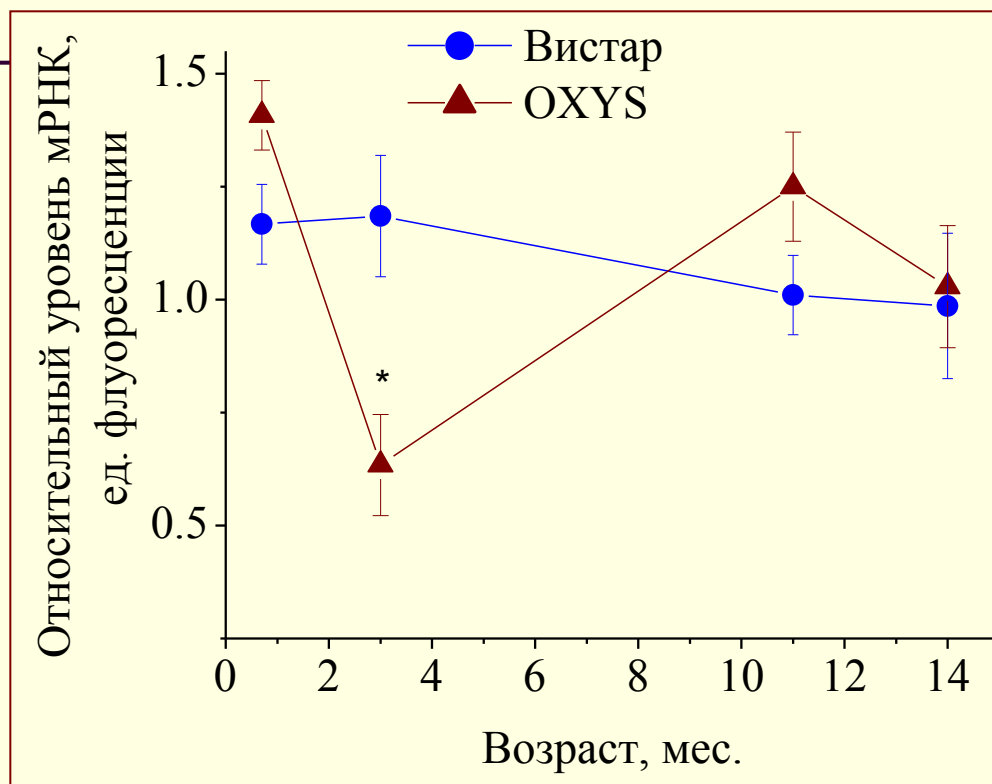
**Содержание продуктов ПОЛ  
в сыворотке крови**



**Содержание продуктов ПОЛ в сетчатке и хрусталиках глаз крыс Wistar и ОХУС в возрасте 3 месяцев (M±m).**

Линия	Хрусталик		Сетчатка	
	Диеновые конъюгаты, E <sub>232 нм</sub> на мг липидов	Основания Шиффа, отн ед на мг липидов	Диеновые конъюгаты, E <sub>232 нм</sub> на мг липидов	Основания Шиффа, отн ед на мг липидов
Wistar	3,63 ± 0,37	17,56 ± 1,00	1,88 0,11	12,48 0,99
ОХУС	2,63 ± 0,61	16,64 ± 1,40	2,05 0,08	15,02 0,83

## Экспрессия гена VEGF в хориоретинальном комплексе крыс OXYS при развитии ХРД



Выраженность патологических изменений сетчатки зависит от уровня экспрессии гена **VEGF**:

в возрасте 3 мес. связь **отрицательная** ( $r = -0,61$ ,  $p=0,028$ );

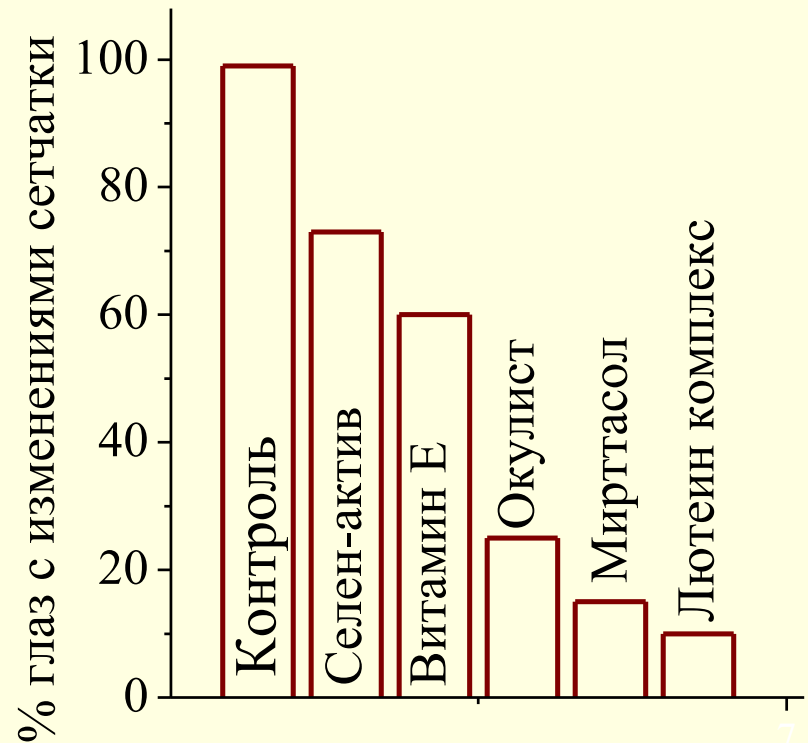
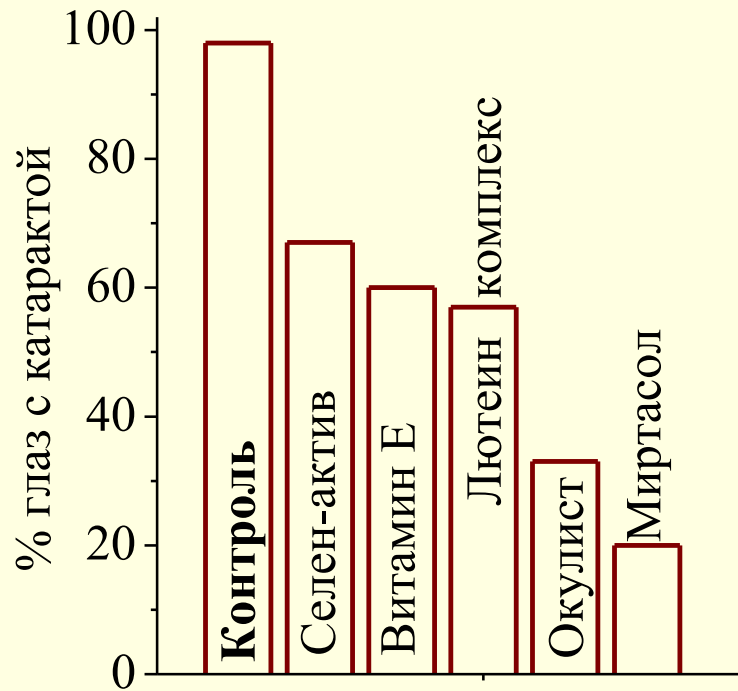
при развитых стадиях заболевания связь **положительная** ( $r=0,69$ ,  $p<0,03$ ).

## 2-е положение, выносимое на защиту:

---

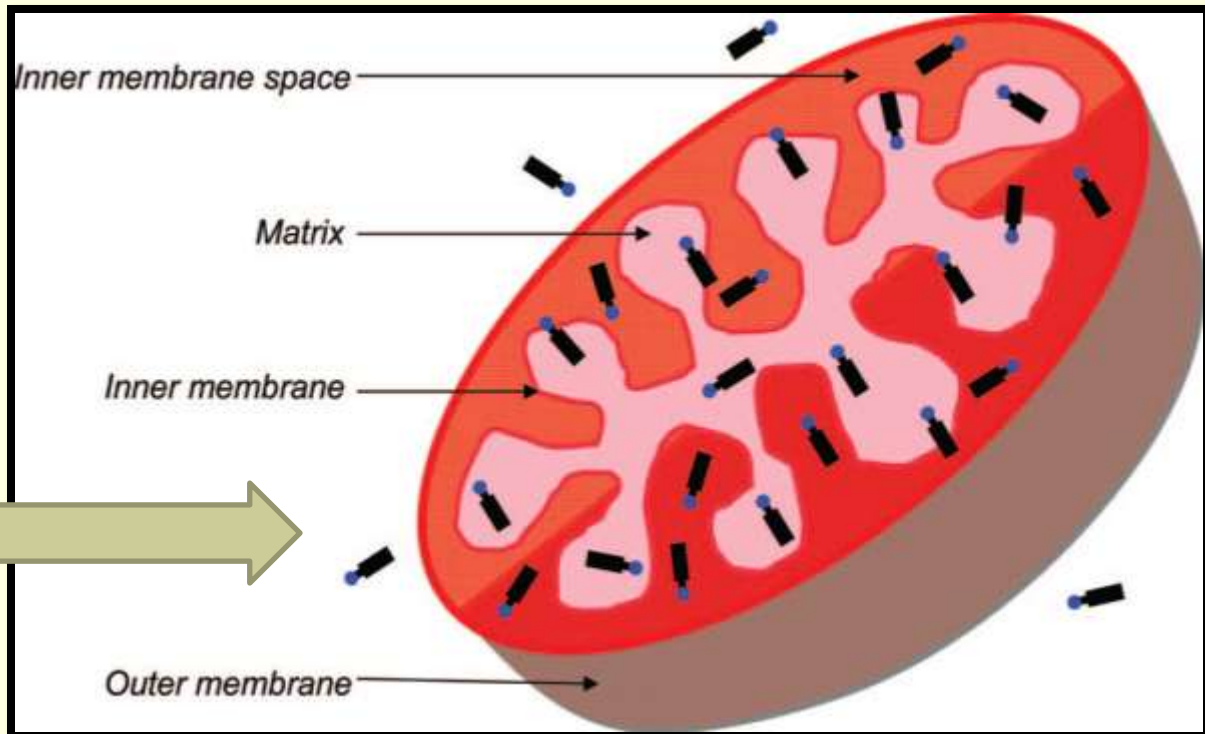
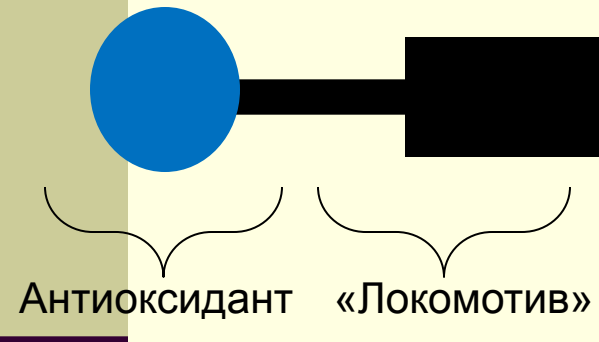
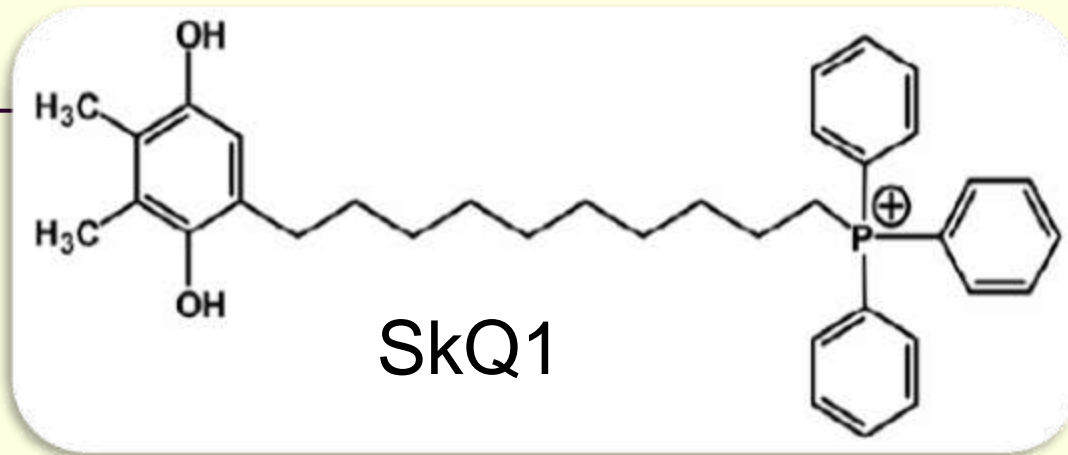
В основе патогенеза ХРД у крыс ОХУС лежат склеротические повреждения сосудов хориоидеи, нарушение кровотока в них, деструкция пигментного эпителия, изменение уровня экспрессии гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF в хориоретинальном комплексе: снижение экспрессии на ранних стадиях заболевания и повышение по мере его прогрессирования.

На развитие катаракты и ХРД у крыс OXYS влияют стандартные препараты с антиоксидантной активностью.

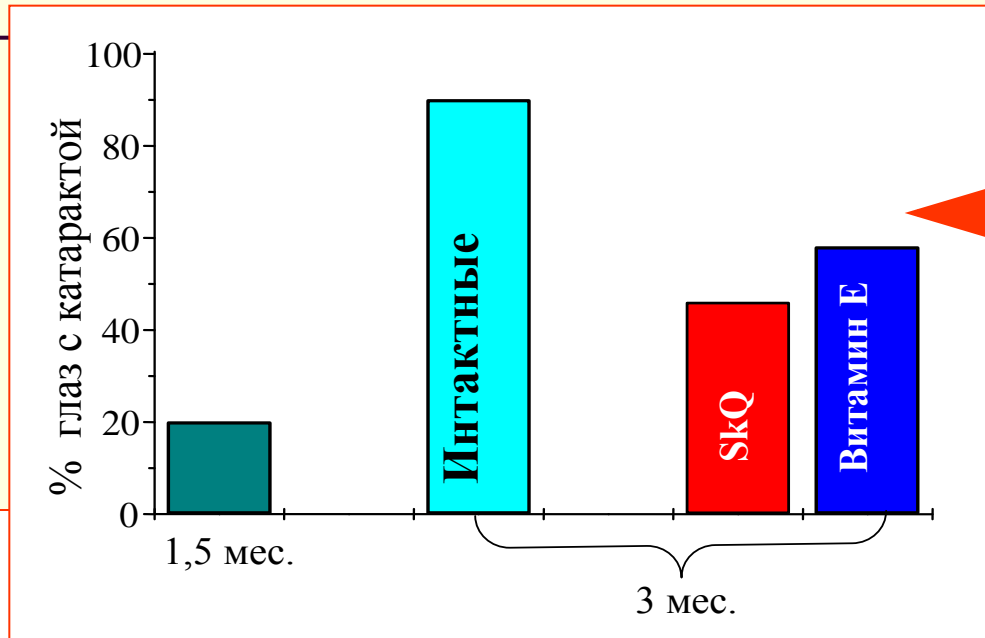


**Результаты свидетельствуют в пользу адекватности модели, а также о связи патогенеза катаракты и ХРД у крыс OXYS с окислительным стрессом.**

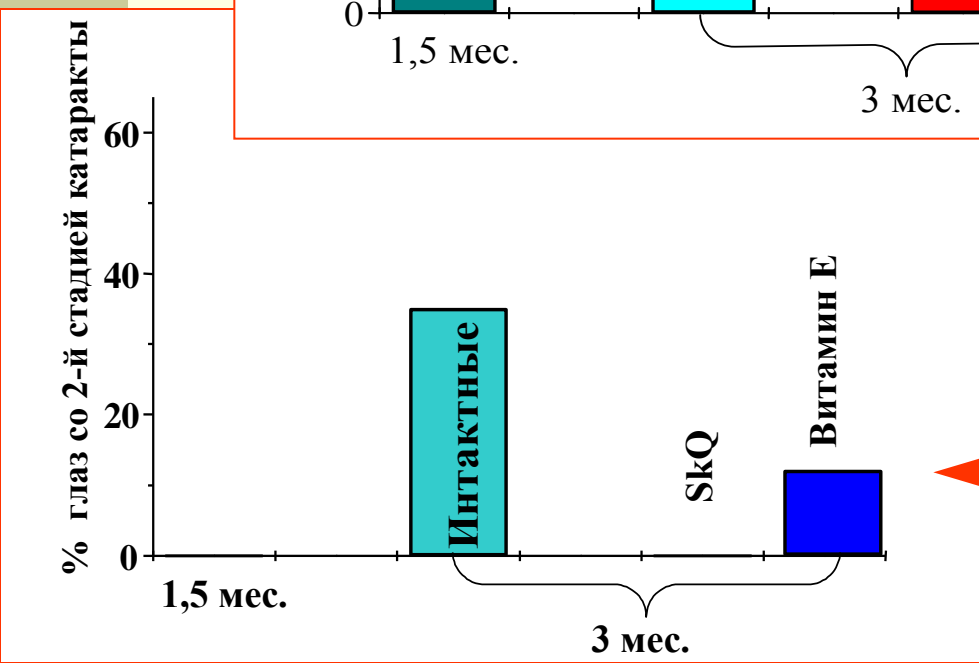
# SkQ1 – «ионы Скулачёва» - митохондриальный антиоксидант



# Влияние 45-дневного курса SkQ1 (50 нмоль/кг) и витамина E (20 мг/кг) на развитие катаракты у крыс OXYS



Влияние препаратов на заболеваемость



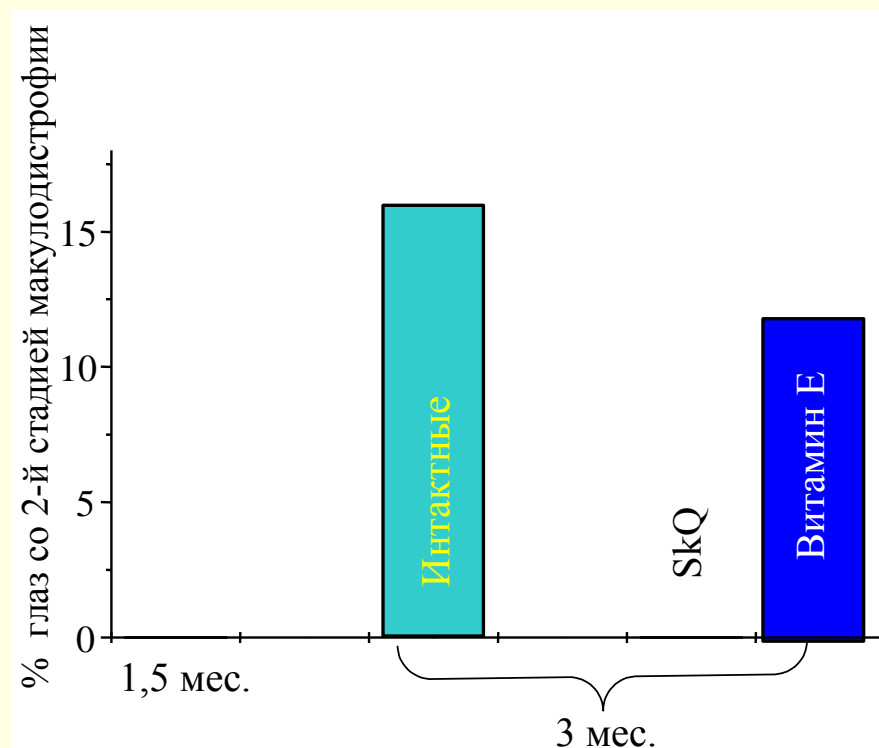
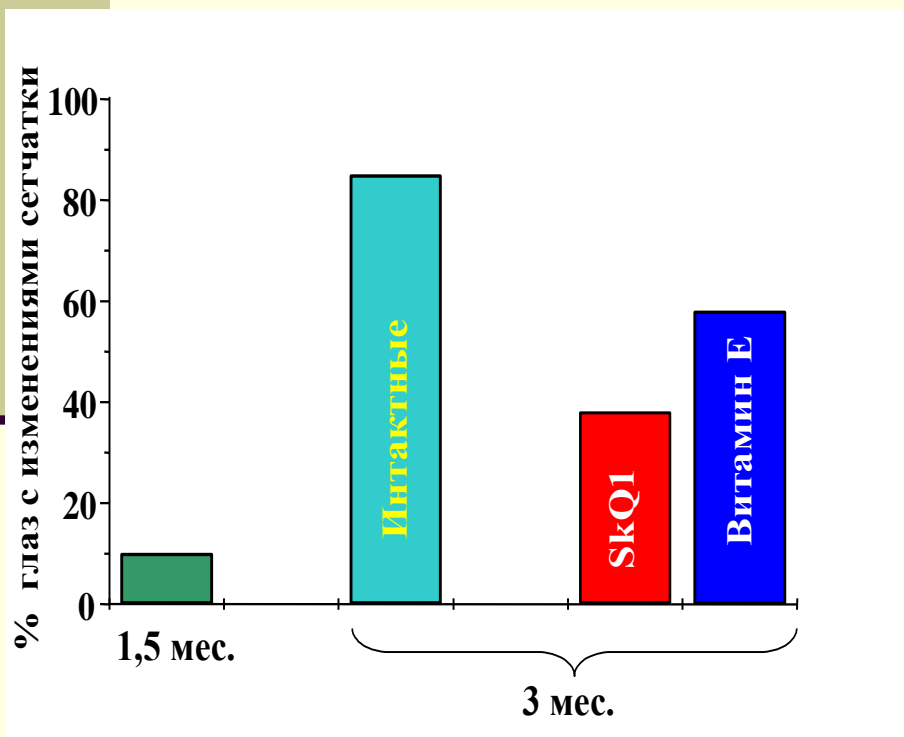
Влияние препаратов на тяжесть течения катаракты



# Влияние 45-дневного курса SkQ1 (50 нмоль/кг) и витамина E (20 мг/кг) на развитие ХРД у крыс OXYS (n=15)

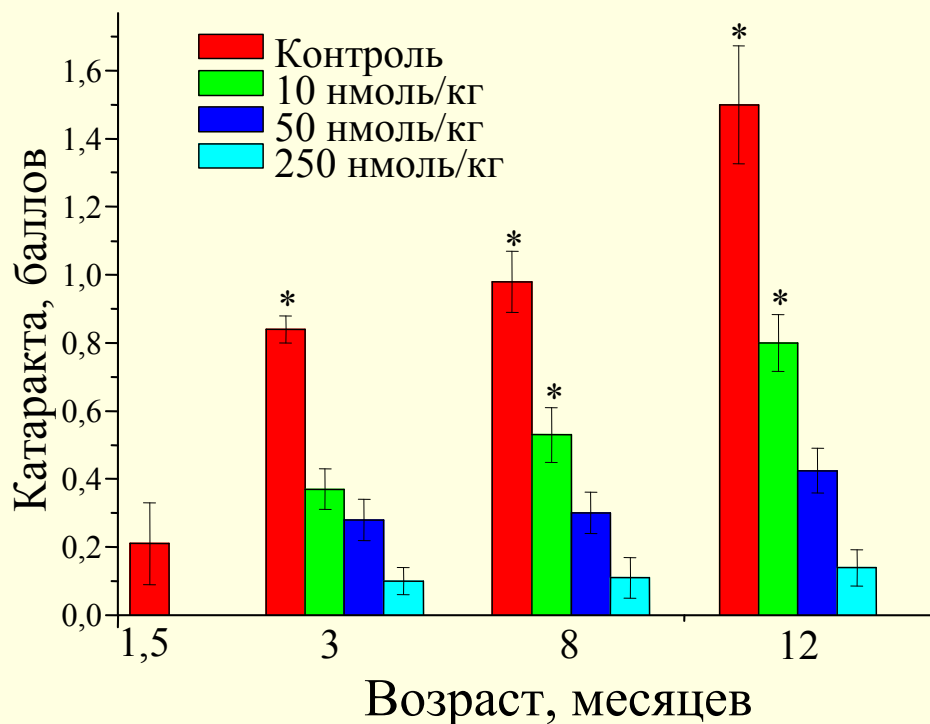
Заболееваемость животных

Выраженность патологических изменений

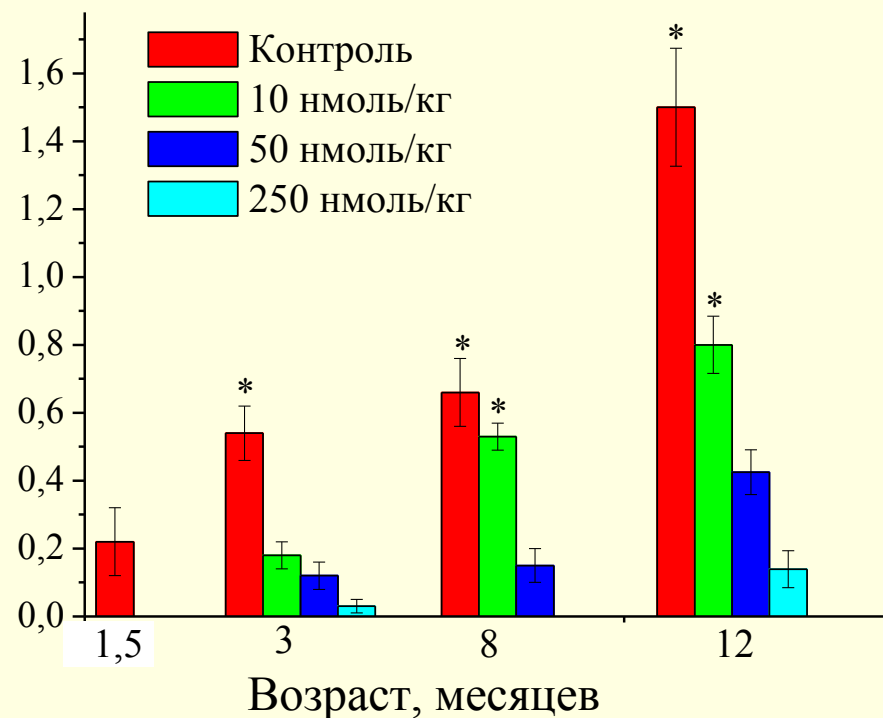


# Подбор оптимальной профилактической дозы SkQ1 (количество животных в группе - 30)

## Состояние хрусталиков

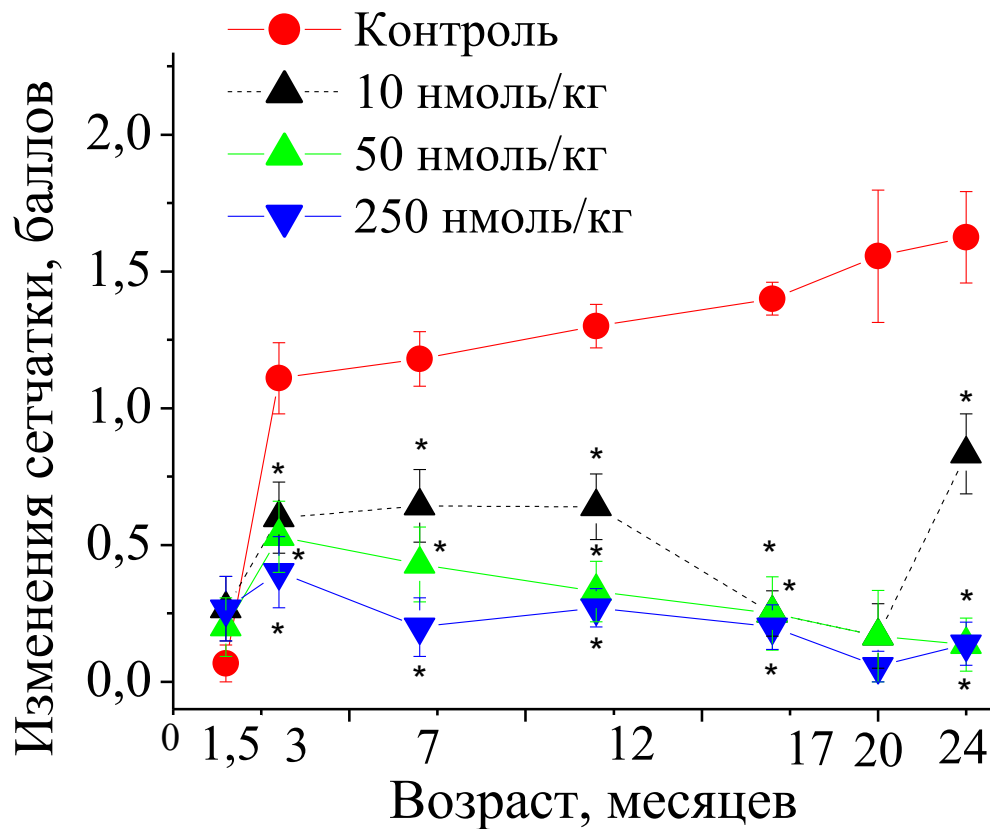


## Состояние сетчатки

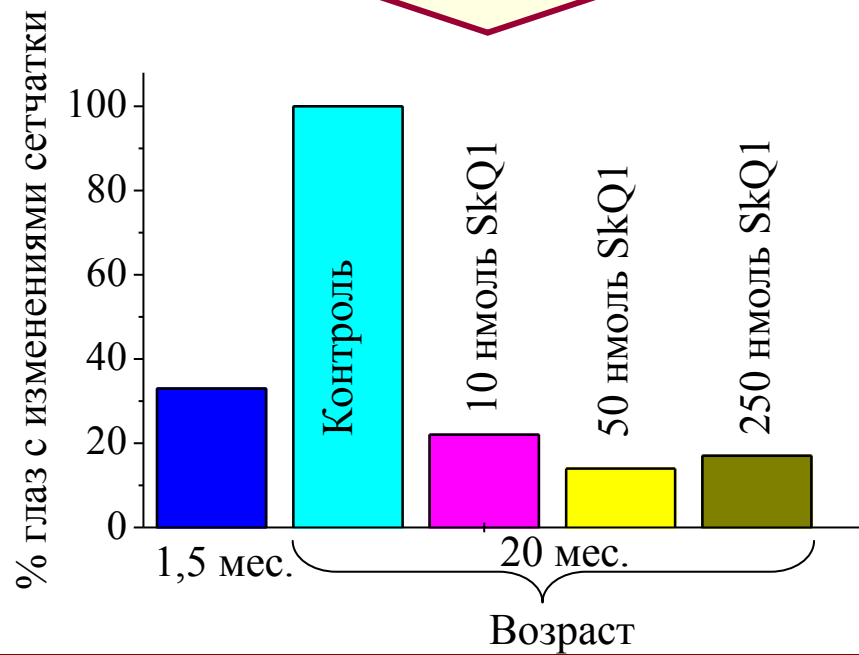




# Подтверждение - эксперимент № 2: дистрофия сетчатки на фоне приёма SkQ1 у крыс OXYS не развивается.



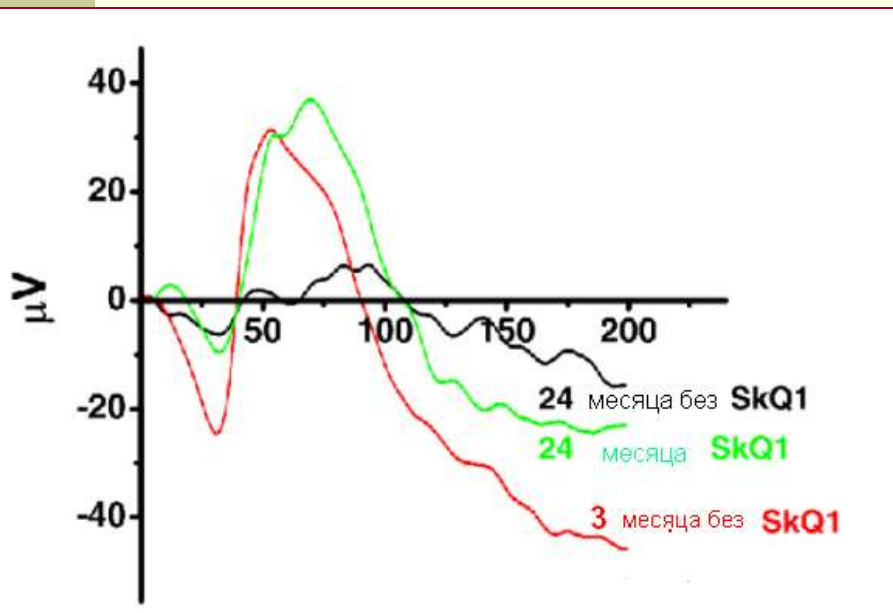
Процент глаз с изменениями сетчатки в возрасте 20 мес.



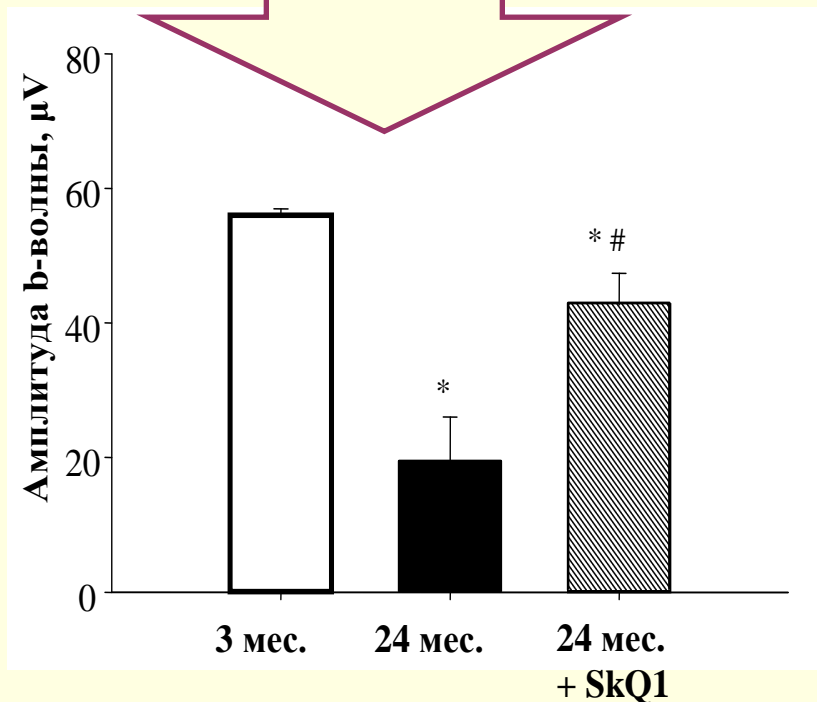
Влияние SkQ1 на выраженность патологических изменений сетчатки. Приём препарата с 1,5 мес.

# Электроретинография: SkQ1 (250 нмоль/кг с кормом) препятствует развитию нарушений функций сетчатки у крыс OXYS.

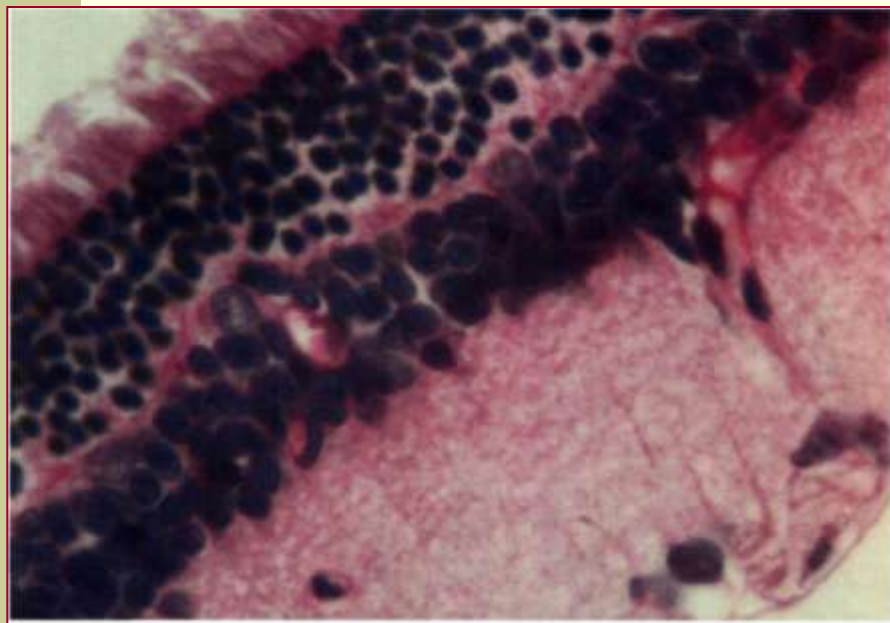
Амплитуда b волны ЭРГ контрольных крыс OXYS в возрасте 3 и 24 мес. и 24-мес., получавших с 1,5 мес. 250 нмоль/кг SkQ1. \*- достоверные отличия по сравнению с 3-мес. крысами, # - значимый эффект SkQ1



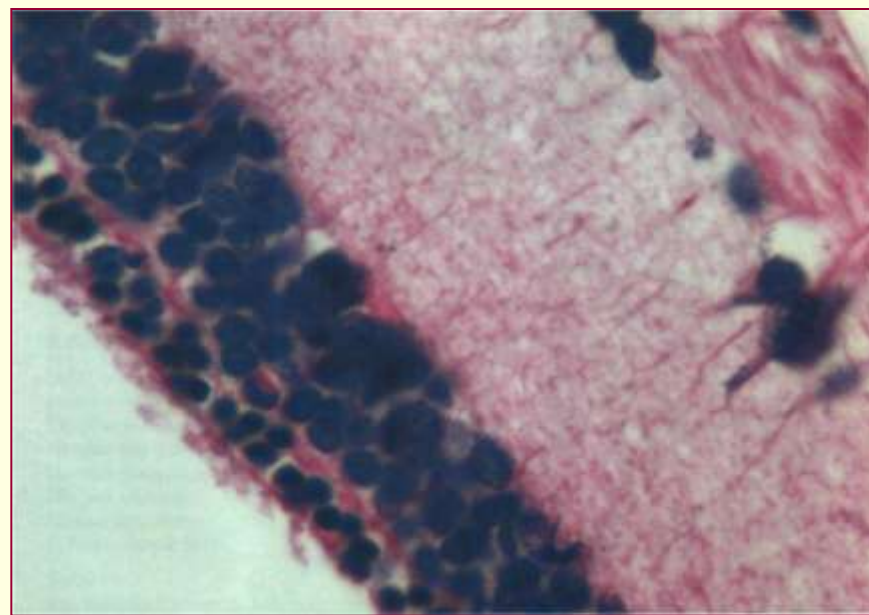
ЭРГ контрольных крыс OXYS в возрасте 3 и 24 мес. и 24-месячных крыс OXYS, получавших с возраста 1,5 мес. 250 нмоль/кг SkQ1.



# SkQ1 (250 нмоль/кг с кормом) предупреждает у крыс OXYS развитие деструктивных изменений сетчатки

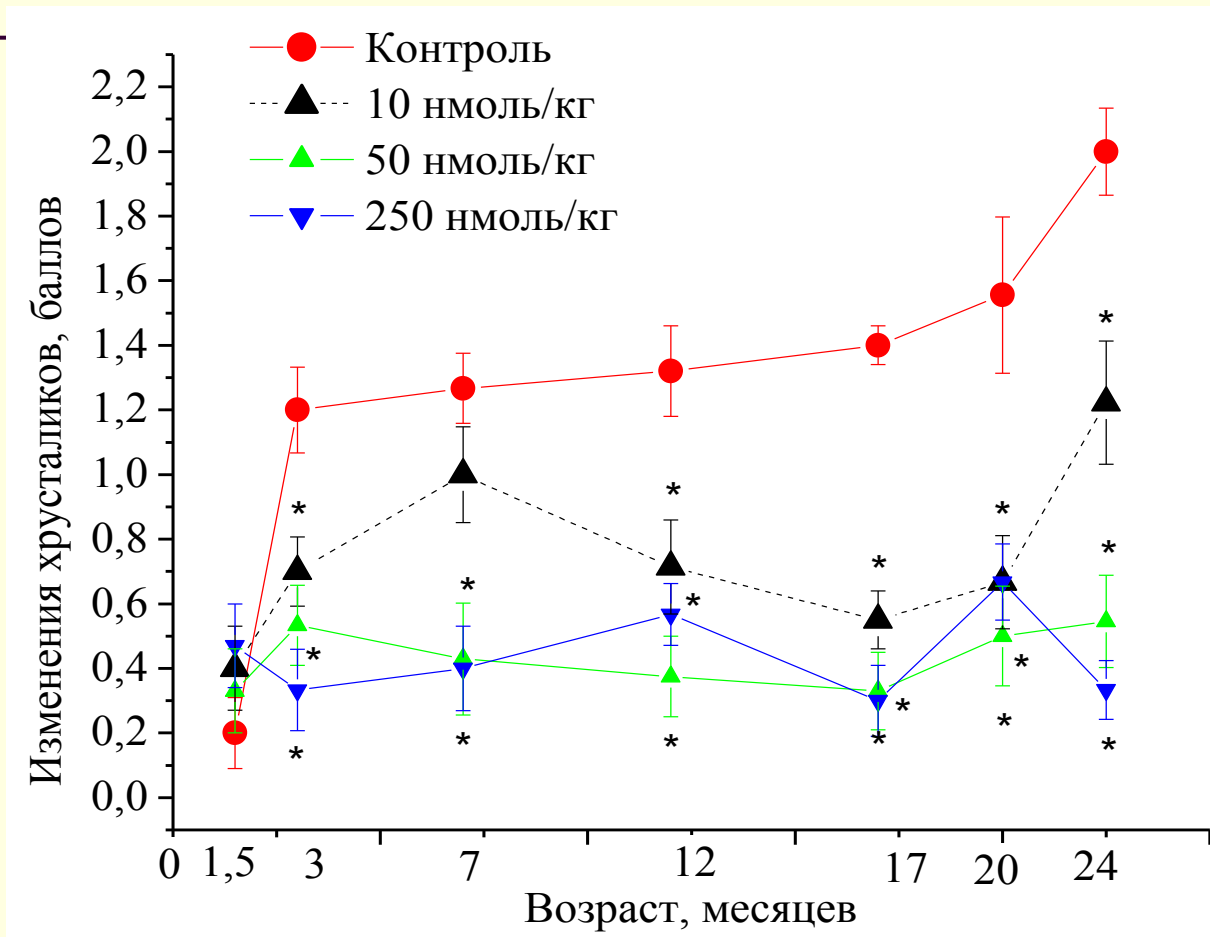


Крыса OXYS, 24 мес., приём SkQ1 с возраста 1, 5 мес.:  
хорошо выражен наружный ядерный слой, определяющий расположение тел фоторецепторных клеток.



Крыса OXYS, 24 мес., контроль:  
наружный ядерный слой редуцирован до 2-х, 3-х рядов. В некоторых ядрах признаки апоптоза. Слой палочек и колбочек разрушен.

**Зависимые парные сравнения:** катаракта на фоне приёма SkQ1 в дозах 50 и 250 нмоль на кг у крыс OXYS не развивалась.



Состояние хрусталиков контрольных и получавших SkQ1 крыс OXYS. Начало приёма препарата – 1,5 мес.,

**SkQ1 позитивно влиял на общее состояние крыс OXYS, предупреждал развитие признаков преждевременного старения.**

**Контроли**



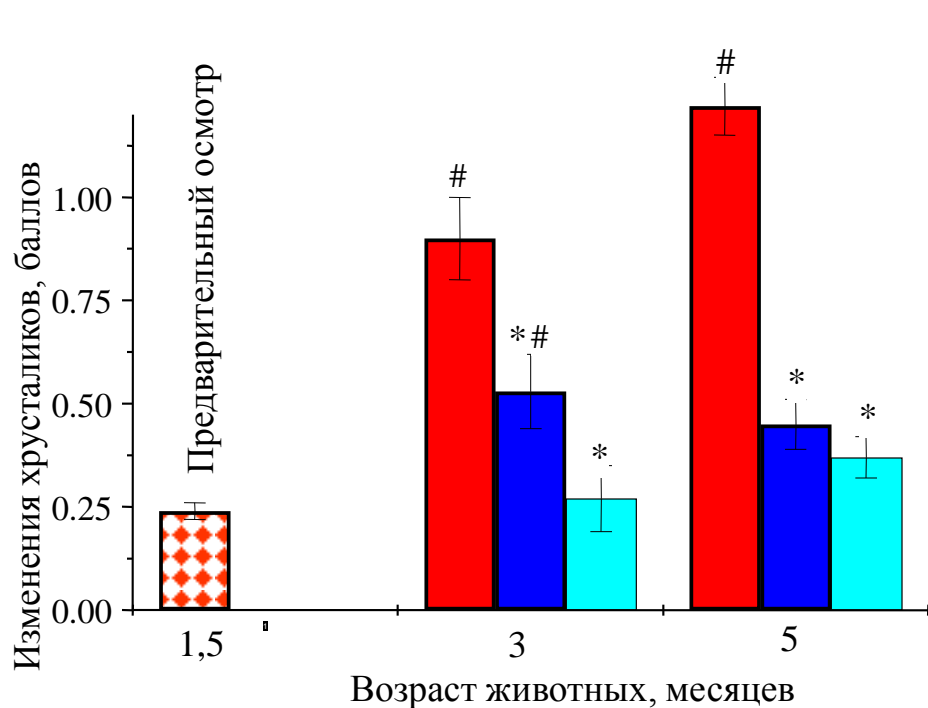
**SkQ1**



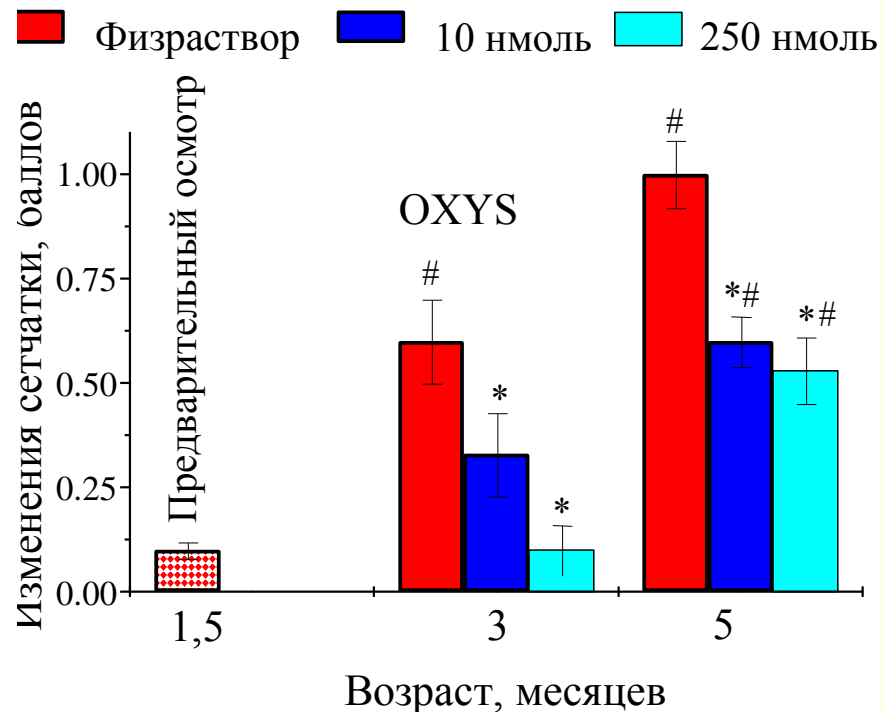
Крысы OXYS в возрасте 23 мес.  
Опытные принимали SkQ1 с 1,5 мес.  
по 250 нмоль/кг с кормом.

# Выявлен профилактический эффект **капель SkQ1** – их способность задерживать развитие катаракты и дистрофии сетчатки у крыс OXYS

## Состояние хрусталиков



## Состояние сетчатки

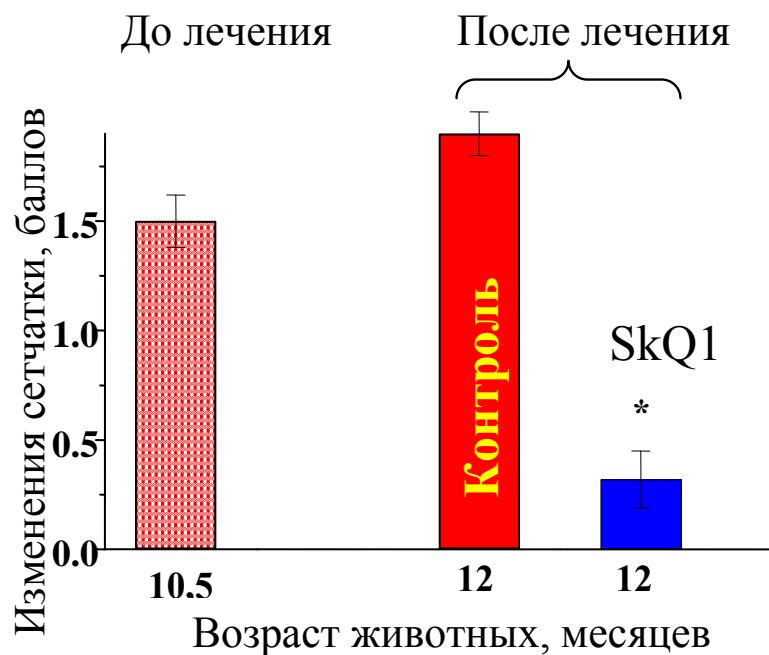


\* - достоверный эффект препарата,

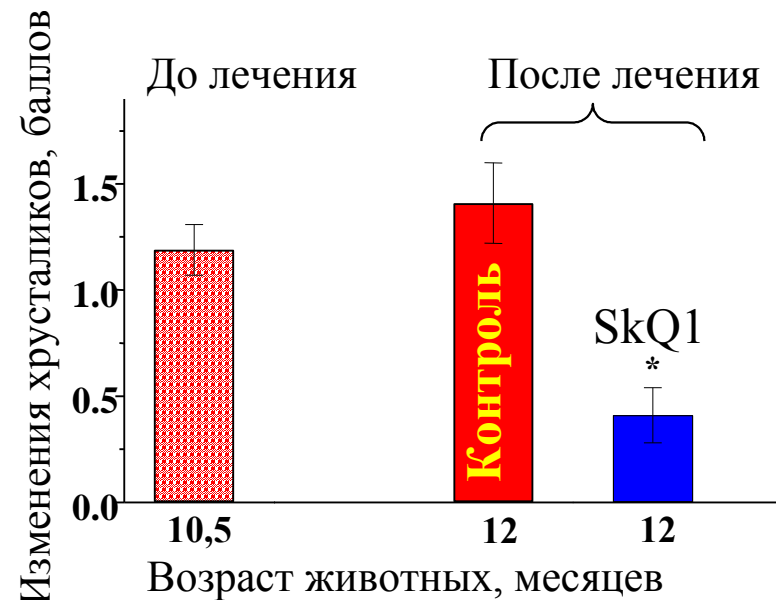
# - достоверные различия по сравнению с предыдущим обследованием.

На этой группе животных впервые получен лечебный эффект SkQ1 - его способность снижать выраженность патологических изменений сетчатки и хрусталиков

### Состояние сетчатки



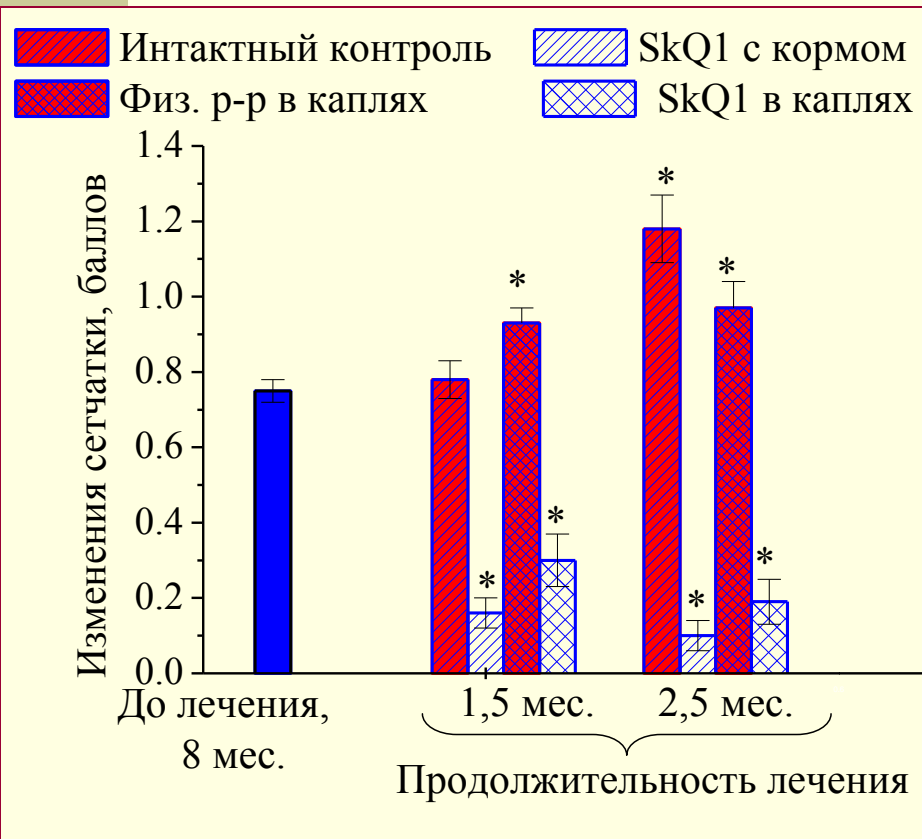
### Состояние хрусталиков



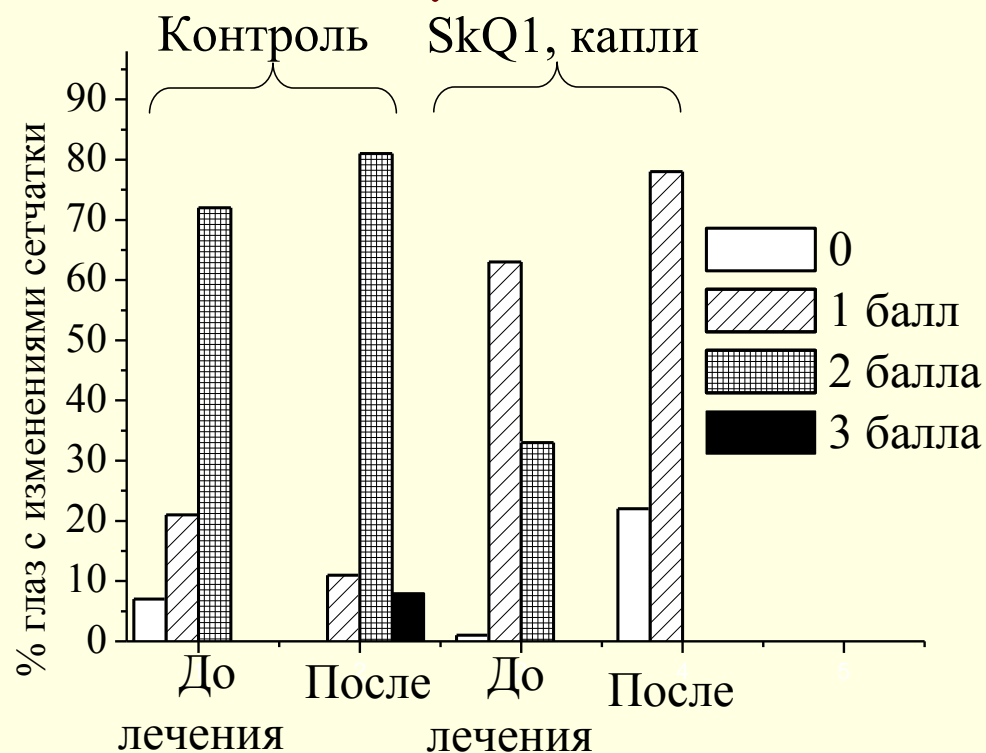
Состояние хрусталиков и сетчатки крыс OXYS до и после приема SkQ1 (50 нмоль/кг с кормом в течение 45 дней).

# Лечебный эффект приёма SkQ1 с кормом (250 нмоль/кг) и в каплях (250 нМ) сопоставим

## Состояние сетчатки



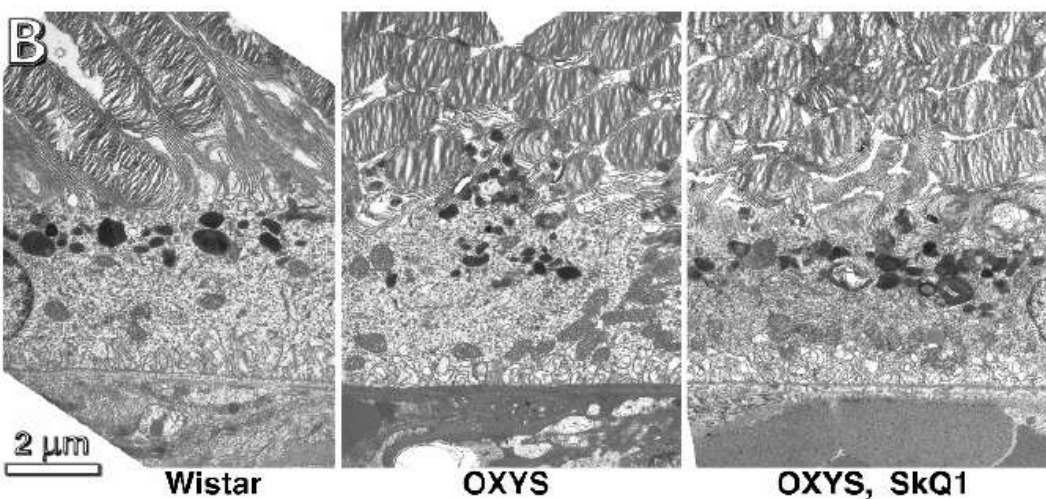
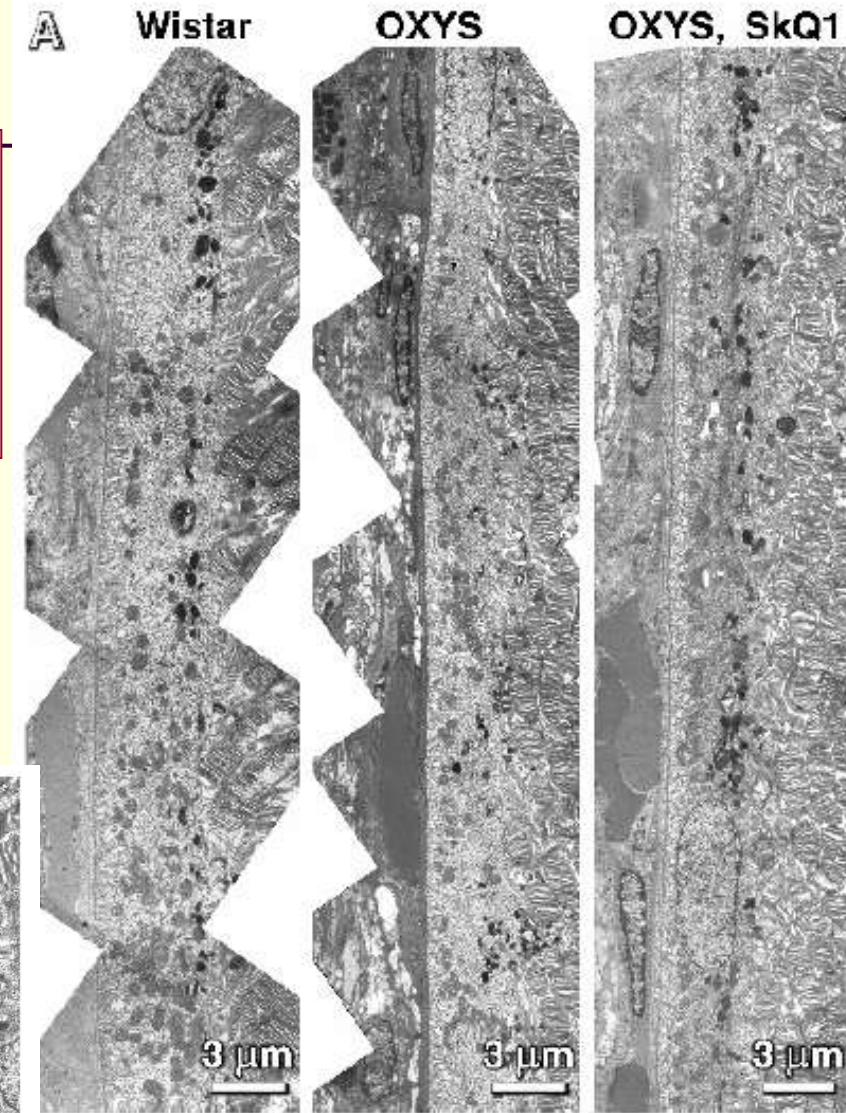
Распределение глаз по выраженности патологических изменений сетчатки до и после лечения крыс OXYS





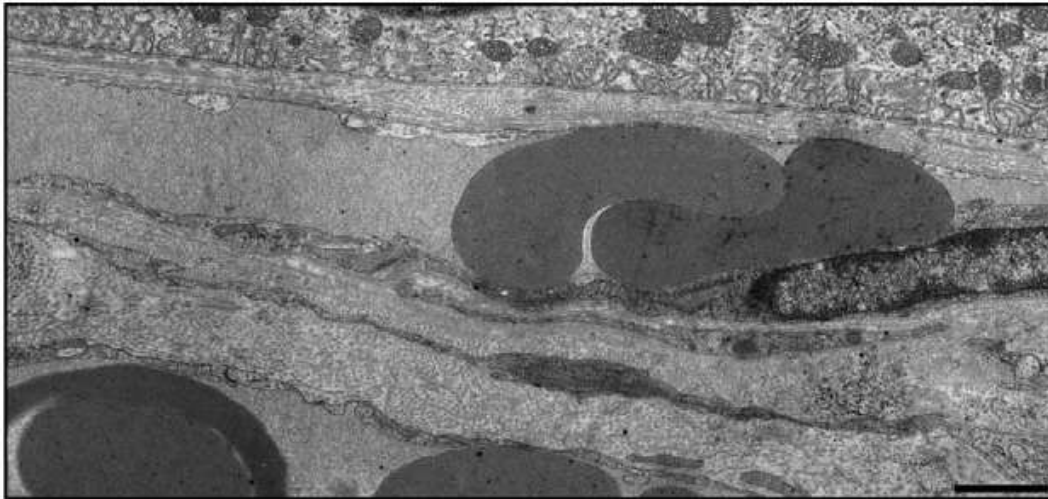
Ретинальный пигментный эпителий контрольных крыс Wistar, OXYS и крыс OXYS, получавших капли SkQ1 (250 nM 2,5 мес.).

Эффект SkQ1 связан с изменением состояния митохондрий: увеличением их количества и размеров.



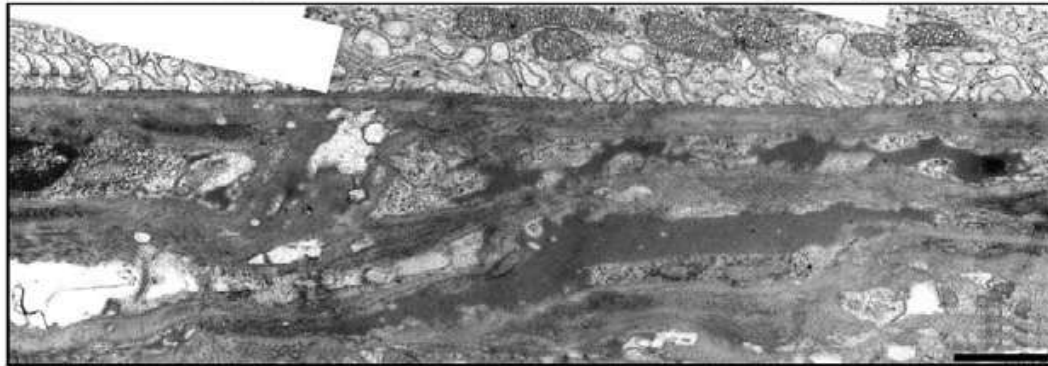
SkQ1 в 4 раз увеличил количество полноценных капилляров в хориоиде, количество клеток пигментного эпителия, восстановил их функциональную активность.

Вистар,  
без SkQ1



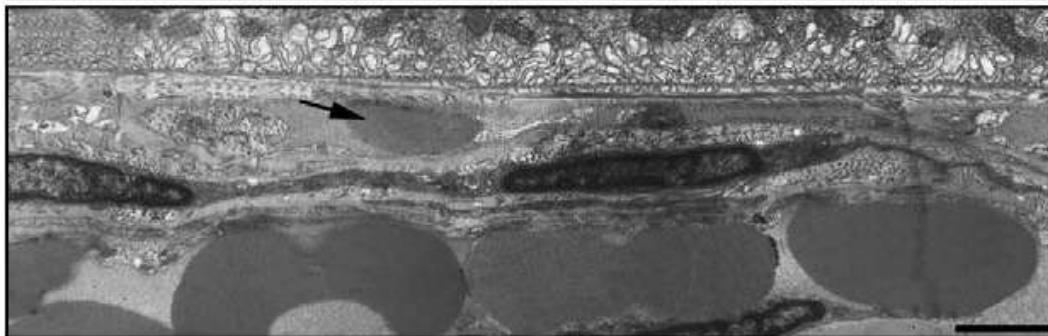
мембрана Бруха  
капилляр

OXYS,  
без SkQ1



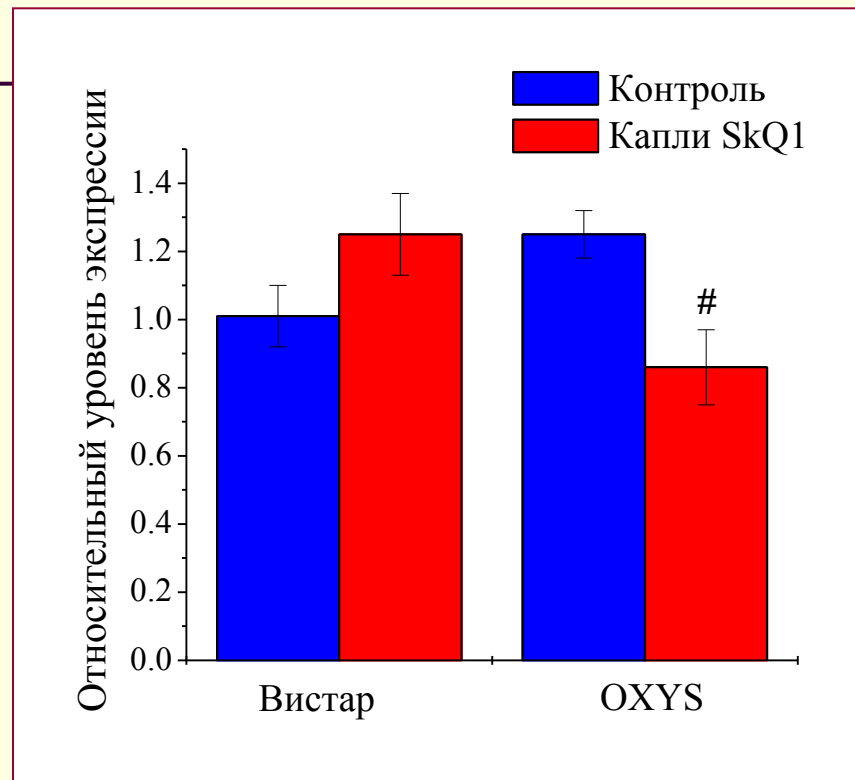
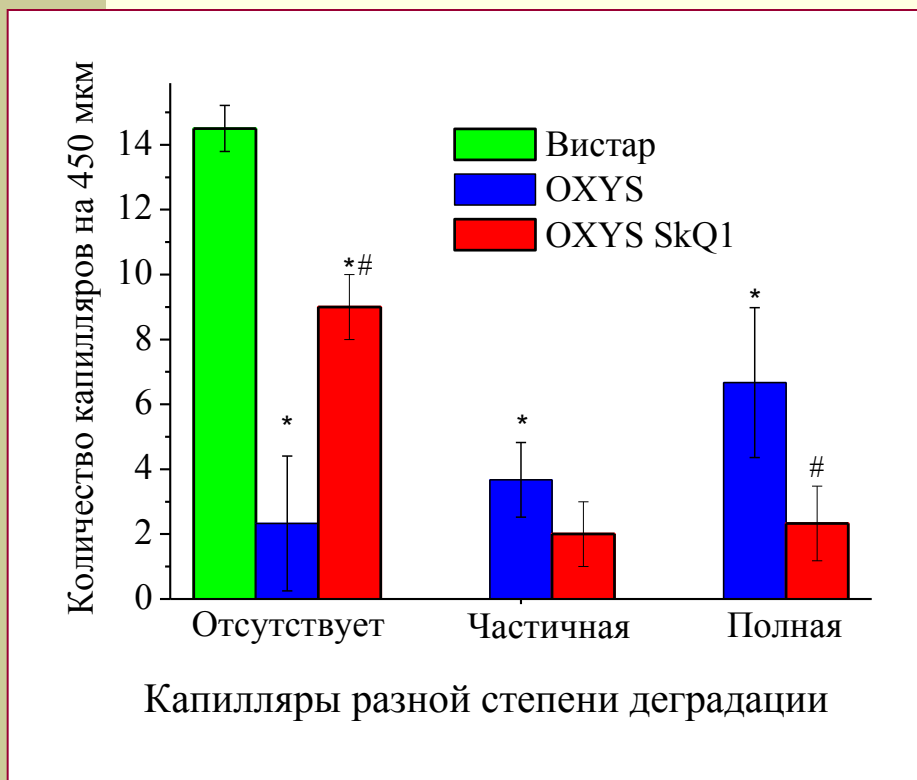
мембрана Бруха  
капилляр

OXYS,  
SkQ1



капилляр  
мембрана Бруха

# Влияние капель SkQ1 (250 нМ) на состояние капилляров в хориоиде и экспрессию гена VEGF в хориоретинальном комплексе крыс OXYS.

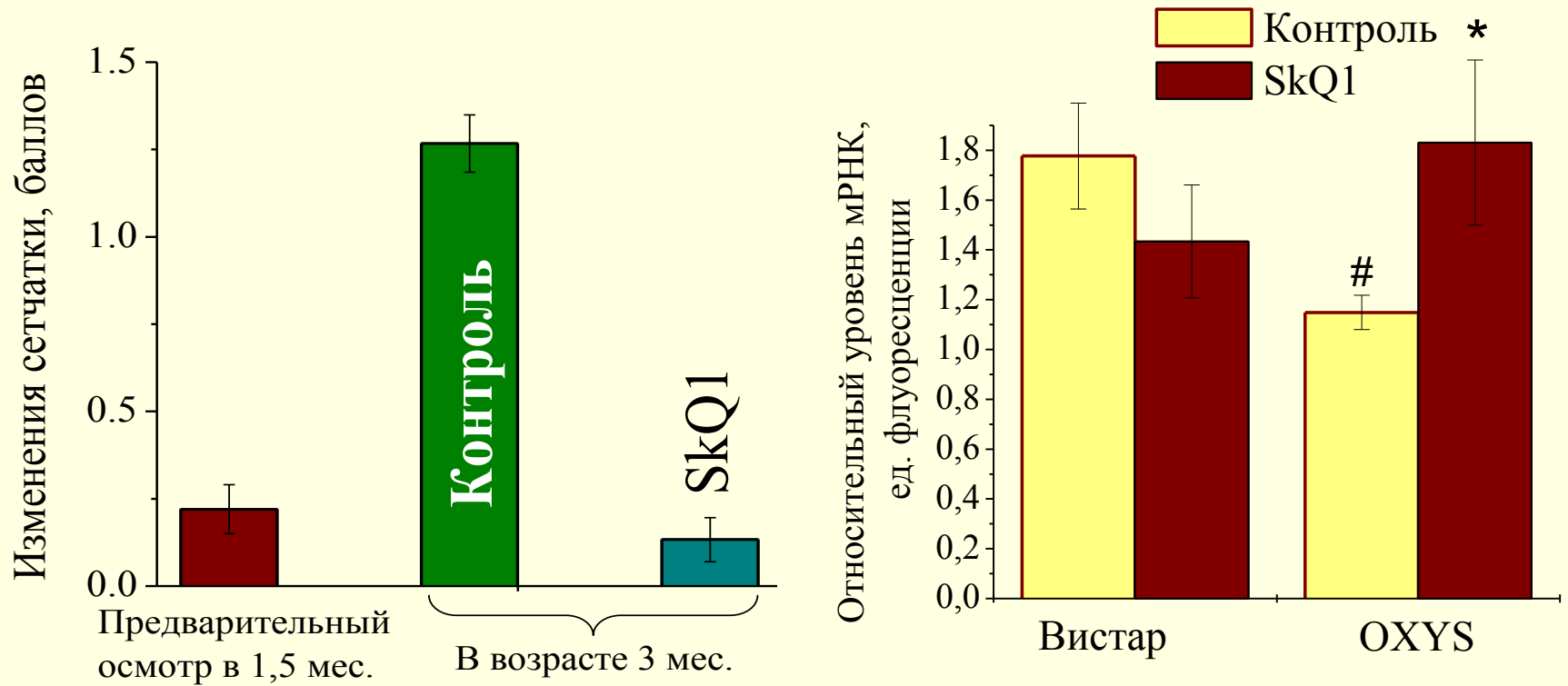


Количество капилляров (M SD) с разной степенью деградации на участке длиной 450 мкм (данные В.Б.Сапруновой).

Уровень экспрессии гена VEGF

\* - достоверные межлинейные различия, # - достоверный эффект препарата

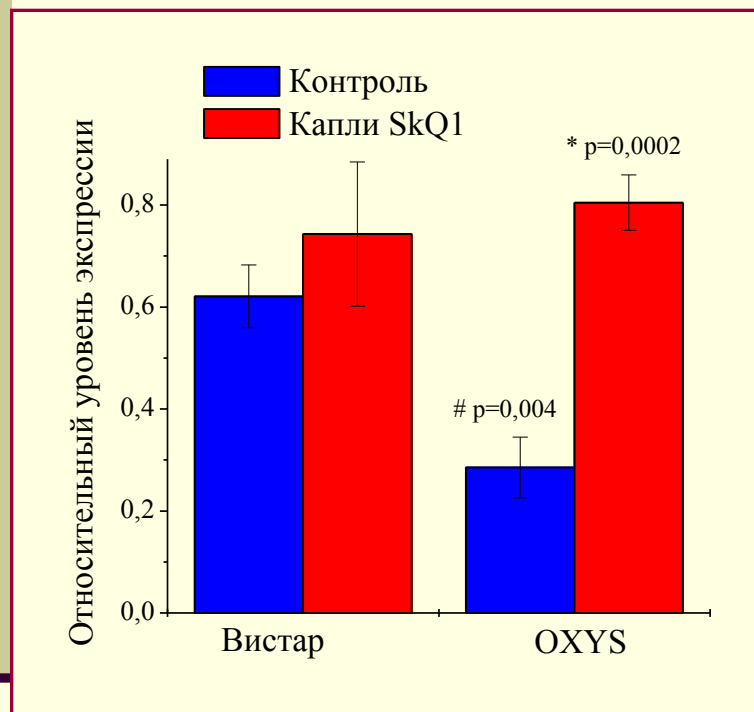
# Профилактический приём SkQ1 с кормом (250 нмоль/кг) в критический период развития ВМД с 1,5 до 3 мес.



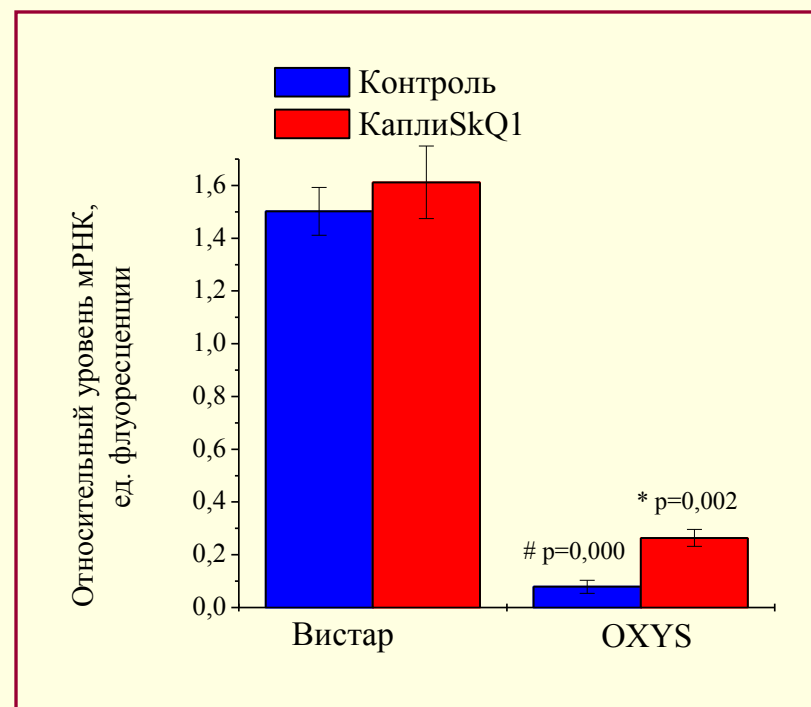
# - достоверные отличия с Вистар ( $p < 0,016$ ),  
\* - достоверное отличие с контролем ( $p < 0,044$ ).

В хрусталиках крыс OXYS экспрессия генов основных белков  $\alpha$ -кристаллинов снижена. Капли SkQ1 повысили их экспрессию.

### Экспрессия гена $\alpha$ A-кристаллина



### Экспрессия гена $\alpha$ B-кристаллина



Выраженность патологических изменений хрусталиков зависит от уровня экспрессии генов  $\alpha$ A- ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,012$ ) и ( $\alpha$ B кристаллинов ( $r = -0,60$ ,  $p < 0,003$ )).

### 3-е положение, выносимое на защиту:

---

Митохондриальный антиоксидант SkQ1 обладает высоким профилактическим и лечебным потенциалом в отношении катаракты и возрастной макулодистрофии, его эффекты связаны с нормализацией кровотока, восстановлением пигментного эпителия и экспрессии генов: VEGF в хориоретинальном комплексе и  $\alpha$ -кристаллинов в хрусталиках.

## 4-е положение, выносимое на защиту:

---

Использование линии преждевременно стареющих крыс OXYS позволяет получать объективную оценку эффективности новых способов лечения и профилактики катаракты и возрастной макулодистрофии.



# Выводы:

1. У крыс OXYS параллельно развиваются катаракта и хориоретинальная дистрофия, которые по клиническим проявлениям биомикроскопической и офтальмоскопической картины соответствуют изменениям хрусталика и сетчатки у пациентов с сенильной катарактой и возрастной макулярной дистрофией.
2. Установлены критические периоды развития катаракты и возрастной макулярной дистрофии у крыс OXYS: первые признаки этих заболеваний зарегистрированы в 5-6 недель, активно прогрессирует с возраста 12 месяцев и достигают выраженных стадий, предполагающих потерю или существенное ухудшение остроты зрения к 14–18 месяцам.
3. У крыс OXYS развитие хориоретинальной дистрофии связано с нарушениями кровообращения и транскапиллярного обмена в хориокапиллярах и вызванной этим хронической ишемией, ведущей к структурно-функциональным изменениям пигментного эпителия, дистрофическим изменениям мембраны Бруха и, как следствие, гибели клеток фоторецепторного слоя.
4. Развитие дистрофии сетчатки у крыс OXYS связано с изменениями экспрессии гена VEGF в клетках пигментного эпителия:
  - а) первичные признаки заболевания формируются на фоне его двукратного снижения по сравнению с контролем, когда между тяжестью заболевания и уровнем экспрессией гена VEGF формируется отрицательная связь;
  - б) в период формирования выраженных патологических изменений средние значения уровня экспрессии гена VEGF не отличается от контрольных, но между ним и выраженностью патологических изменений связь становится положительной.



## Выводы:

5. Развитие катаракты и хориоретинальной дистрофии у крыс OXYS с различной эффективностью предупреждают стандартные препараты с антиоксидантной активностью, что свидетельствует в пользу адекватности модели, а также о связи патогенеза катаракты и ХРД у крыс OXYS с окислительным стрессом.
6. Митохондриально направленный антиоксидант SkQ1 при его приеме с кормом и в виде капель предупреждает развитие катаракты и дистрофии сетчатки и снижает тяжесть течения этих заболеваний у крыс OXYS. Лечебный эффект SkQ1 наиболее существенно выражен при начальных, не имеющих грубых органических изменений стадиях заболевания.
7. Терапевтический эффект митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1 при ХРД у крыс OXYS связан с нормализацией уровня экспрессии гена VEGF, восстановлением микроциркуляции на фоне снижения признаков склероза и облитерации сосудов, которые обеспечивают трофику и в результате – сохранность фоторецепторов сетчатки.
8. Терапевтический эффект митохондриально направленного антиоксиданта SkQ1 при лечении катаракты связан с увеличением уровня экспрессии генов  $\alpha$ -кристаллинов.
9. Линия преждевременно стареющих крыс OXYS – адекватная модель для исследования этиологии и патогенеза катаракты и ВМД, для оценки эффективности новых способов лечения и профилактики этих заболеваний.



**Благодарю за внимание !**