

*На правах рукописи*

ТЕЛЕГИНА ДАРЬЯ ВИКТОРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ  
КЛЕТОК В СЕТЧАТКЕ КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ  
И РАЗВИТИИ РЕТИНОПАТИИ**

Клеточная биология, цитология, гистология – 03.03.04

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в секторе молекулярных механизмов старения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Колосова Наталия Гориславовна**

д.б.н., профессор, зав. сектором молекулярных механизмов старения, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Айдагулова Светлана Владимировна**  
д.б.н. профессор ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет»

**Рябчикова Елена Ивановна**

д.б.н., профессор, зав. группой, ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН г. Новосибирск

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090.  
тел. (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78,  
e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Хлебодарова Т. М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность** Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это комплексное, многофакторное нейродегенеративное заболевание, являющееся основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 60 лет в развитых странах, патогенез которого до конца не ясен, эффективных способов лечения нет. В основе ВМД лежат характерные для старения изменения хориокапилляров, ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и мембраны Бруха, но механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, не известны. Также не ясны молекулярно-генетические предпосылки событий, ведущих к гибели фоторецепторов, и пути их гибели: апоптоз, некроз или аутофагия. С нарушением механизмов апоптоза связывают патогенез многих заболеваний, в том числе – дегенеративных, ассоциированных со старением. Важная роль в развитии ВМД отводится активации глиальных клеток сетчатки – астроцитов, клеток Мюллера и микроглии, которые активируются при повреждении сетчатки и выделяют различные биологически активные молекулы, нацеленные на восстановление тканей. Хроническая активация глии сопровождается усиленным выделением провоспалительных факторов, в том числе - оксида азота (NO), что приводит к повреждению нейронов сетчатки и индукции апоптоза. NO - одна из важнейших сигнальных молекул в организме, которая выполняет роль ключевого вазодилататора, вовлечена в процессы памяти, обучения, иммунного ответа и др. NO синтезируется синтазами оксида азота (NOS), которые имеют три изоформы - эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS), а также индуцибельной (iNOS), экспрессия которой усиливается при воспалении. Как недостаток, так и избыточная генерация NO вносят вклад в патогенез связанных со старением заболеваний, в том числе – ВМД, но механизмы реализации его эффектов до конца не ясны, сведения об изменении с возрастом экспрессии синтаз NO в сетчатке ограничены.

Изучение механизмов развития ВМД у людей, особенно ее ранних, доклинических стадий, проблематично, что диктует необходимость создания биологических моделей. Получены убедительные доказательства того, что адекватной моделью заболевания является линия преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развивается ретинопатия, по клиническим проявлениям соответствующая ВМД у людей. Гистологические исследования выявили характерные патологические изменения во всех слоях сетчатки крыс OXYS: от локальных в возрасте 3 мес. в период манифестации клинических признаков ВМД до обширных областей гибели нейронов в возрасте 24 мес. Анализ транскриптома сетчатки крыс OXYS (исследовали методом RNA-seq) показал, что ретинопатия развивается на фоне дисбаланса экспрессии генов, связанных с иммунной системой, воспалением, окислительным стрессом, гомеостазом кальция и апоптозом. В то же время различий в уровне экспрессии классических генов апоптоза в сетчатке крыс OXYS и Вистар (контроль) выявлено не было. Дальнейшее исследование генов, прямо или косвенно вовлеченных в регуляцию апоптоза, и выявление нетривиальных путей клеточной гибели на разных стадиях развития ретинопатии у крыс OXYS, включая доклиническую стадию заболевания, представляется продуктивным подходом к пониманию механизмов этого процесса.

**Цель настоящей работы** - изучить механизмы клеточной гибели в сетчатке при старении и при развитии аналогичной ВМД ретинопатии у крыс OXYS. Были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ данных RNA-seq транскриптома сетчатки 20-дневных крыс OXYS и Вистар. Определить группы генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели, используя биоинформатический анализ транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес.

2. Выполнить реконструкцию генных сетей, образуемых генами-регуляторами апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна.

3. Оценить активность процессов апоптоза, некроза и аутофагии в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста, определить динамику и характер гибели различных типов клеток сетчатки при развитии ретинопатии.

4. Изучить особенности структурно-функциональных изменений пигментного эпителия и глиальных клеток в сетчатке с возрастом и при развитии ретинопатии, оценить их связь с усилением гибели клеток.

5. Оценить уровень мРНК генов *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста (3 и 18 мес.) методом ПЦР в реальном времени. Определить содержание белковых продуктов гена *iNOS* в сетчатке крыс Вистар и OXYS.

**Научная новизна работы.** Впервые методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq) исследован профиль экспрессии генов в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, в период, когда у последних клинические проявления ретинопатии отсутствуют. Сравнение профилей экспрессии показало, что уже в этом возрасте в сетчатке крыс OXYS изменен уровень мРНК 245 генов, большинство которых связано с процессами развития, сигнальной трансдукцией и дифференцировкой клеток. На основании биоинформатического анализа транскриптома сетчатки животных в возрасте 20 дней, а также 3 и 18 мес. (получены ранее, Kozhevnikova et al. 2013) определены кластеры генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели: апоптоза, аутофагии и программируемого некроза. Различия в уровне мРНК между линиями крыс выявлены только для генов, регулирующих процесс апоптоза. При этом большинство генов, экспрессия которых у крыс OXYS и Вистар различалась, было ассоциировано с внешним путем апоптоза, запускающимся через рецепторы смерти. Установлено, что уровень мРНК генов-регуляторов клеточной гибели как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар изменяется только в возрастной период с 20 дней до 3 мес., при этом у крыс обеих линий наибольшая активность гибели клеток путем апоптоза приходится на возраст 20 дней – период завершения созревания сетчатки. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания установлена локализация основных продуктов генов-регуляторов клеточной гибели в сетчатке.

Методами конфокальной микроскопии впервые установлено, что у крыс OXYS ретинопатия развивается на фоне атрофии клеток РПЭ, при этом первые деструктивные изменения монослоя РПЭ выявляются уже в возрасте 20 дней, на доклинической стадии заболевания. Начиная с этого возраста у крыс OXYS происходит увеличение доли двуядерных клеток РПЭ, которое свидетельствует о нарушении их способности к делению и пролиферации, что может способствовать развитию и прогрессии дегенеративных изменений сетчатки. Установлено, что активная прогрессия ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне фагоцитарной дисфункции и активации астроцитов и клеток Мюллера. Впервые оценены возрастные изменения распределения активированных макрофагов и микроглии в различных слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS.

**Теоретическая и научно-практическая значимость работы.** Результаты исследования существенно дополняют фундаментальные знания об изменениях

транскриптома сетчатки с возрастом и на ранних доклинических стадиях ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, расширяют представления о патогенезе заболевания и возможных молекулярно-генетических предпосылках его развития. Новые данные об особенностях изменения экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели при нормальном старении и при развитии ретинопатии, об изменениях с возрастом глиальных клеток сетчатки, а также об изменениях клеток РПЭ на разных стадиях ретинопатии могут быть полезны при выборе потенциальных терапевтических мишеней при создании новых препаратов, направленных на профилактику и лечение ВМД у людей.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В возрасте 20 дней, на доклинической стадии ретинопатии, в сетчатке крыс OXYS изменена экспрессия генов, ассоциированных с процессами развития, сигнальной трансдукцией и дифференцировкой клеток.

2. Гибель клеток в сетчатке крыс OXYS реализуется как путем апоптоза, так и некроза и аутофагии, при этом наибольшие изменения экспрессии генов, связанных с клеточной гибелью, предшествуют проявлениям клинических признаков ретинопатии.

3. Развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне деструктивных изменений и нарушения способности к пролиферации клеток ретинального пигментного эпителия, активации макрофагов и фагоцитарной дисфункции клеток микроглии.

**Апробация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах из перечня ВАК. Результаты работы были представлены на научных конференциях: «The 9th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Новосибирск, 2014), «The 7th International Young Scientists School "Systems Biology and bioinformatics" SBB-15» (Новосибирск, 2015), «Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress» (Судак, 2016), The 10th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Новосибирск, 2016).

**Вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор принимал личное активное участие в планировании, проведении и обсуждении всех экспериментов, по результатам которых написана диссертация. Аппаратные этапы массового параллельного секвенирования были проведены на базе ЗАО Геноаналитика. Биоинформатический анализ данных RNA-seq выполнен в рамках совместной работы с к.б.н. Н.И. Ершовым и к.б.н. Е.Е. Корболиной. Морфофункциональное исследование клеток РПЭ крыс проведено на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (256 источников). Работа изложена на 176 страницах, содержит 18 рисунков, 3 таблицы и 4 приложения.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

***Животные.*** Работа выполнена на 118 крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 20 дней, 3, 7 и 18 мес. на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН.



**Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-seq)** проводилось на платформе Illumina GAIIx (ОАО «Геноаналитика») в соответствии со стандартными протоколами производителя.

**Биоинформатический анализ данных RNA-seq.** Риды картировались на референсный геном *Rattus norvegicus* (версии Rnor\_5.0.76) с помощью программы TopHat(v2.0.10). Функциональную аннотацию групп дифференциально экспрессирующихся генов проводили с помощью биоинформатических систем DAVID (Huang et al. 2009) при порогах значимости обогащения (EASE)  $p < 0,05$ .

**Создание списка генов-регуляторов апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна.** Анализировались результаты исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар методом RNA-seq: для возраста 3 и 18 месяцев, выполненного ранее (Kozhevnikova et al. 2013), для 20-дневных животных – полученные в настоящей работе (по 3 животных для каждого возраста и линии). Для построения ассоциативных сетей были выбраны дифференциально экспрессирующиеся гены, продукты которых участвуют в терминах Gene Ontology в процессах «апоптоз», «клеточная гибель», «позитивная регуляция апоптоза», «негативная регуляция апоптоза», «регуляция апоптоза», «регуляция клеточной гибели», «позитивная регуляция клеточной гибели», «негативная регуляция клеточной гибели» согласно базе данных DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

**Реконструкция и анализ ассоциативных сетей.** Ассоциативные сети реконструировались при помощи онлайн ресурса GeneMANIA (<http://www.GeneMANIA.org/>). При построении сети используется метод сопряженных градиентов. Анализ структуры сетей произведен с помощью Network Analyzer plugin в программе Cytoscape (ver. 2.8.2). Для выявления центральных вершин в полученных генных сетях использовался метод расчета различных показателей центральности вершин (средняя длина кратчайшего пути, центральность вершины по посредничеству, центральность вершины графа по близости, кластерный коэффициент, степень вершин). Как центральные рассматривались вершины, имеющие наиболее низкую среднюю длину кратчайшего пути, высокие значения кластерный коэффициент и центральность вершины графа по близости, низкую центральность вершины по посредничеству и наиболее высокую степень вершины. Кластерный анализ сетей проводили с помощью ClusterMarket plugin (ver 1.11) community cluster (GLay) для Cytoscape. Биологическая интерпретация кластеров выполнена на основе базы данных Reactome (<http://www.reactome.org/>).

**Создание списка генов-регуляторов клеточной гибели, экспрессия которых изменяется с возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар.** Изменения экспрессии с возрастом оценивались с помощью программного пакета DESeq2. Дифференциально экспрессирующиеся (ДЭ) гены с уровнем значимости  $p < 0,05$  с поправкой на множественное сравнение Бенжамини-Хохберга аннотировались в базе данных KEGG открытого биоинформатического ресурса WebGestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/analysis.php>) для отбора ДЭ генов, включенных в регуляцию апоптоза и аутофагии, и Rat genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>) для выявления генов-регуляторов программируемого некроза.

**Иммунофлуоресцентная микроскопия.** В работе использовались стандартные протоколы получения криосрезов сетчатки. Иммуногистохимический анализ проводили, используя первичные специфические антитела к Iba1, GFAP, CD68, ви-

ментину (1:250, Abcam) и RIPK1, RIPK3 (1:200, Abcam) и соответствующие вторичные антитела (1:250). Ядра визуализировали DAPI (Abcam). Для TUNEL окрашивания использовали DeadEnd™ Fluorometric TUNEL (Promega). Препараты анализировались с помощью оптического микроскопа AXIOPLAN 2 (Zeiss, Германия). Данные анализировали с помощью программ ZEN (Zeiss, Германия) и ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

**Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.** Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде, затем отделяли их переднюю камеру, хрусталик и нейроретину от задней камеры. Оставшийся слой РПЭ с подлежащей сосудистой оболочкой инкубировали в растворе FITC-phalloidin (1:500) в PBS при +4°C 18 час., помещали на полилизиновые стекла и окрашивали Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam). Анализ проводили на лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 META (Zeiss), используя программу ZEN (Zeiss, Германия).

**Вестерн блот анализ** проводили по стандартным протоколам. Использовали первичные специфичные антитела к GFAP и  $\beta$ -актину (1:1000, Abcam) и вторичные антитела Goat Anti-Rabbit (1:5000, Abcam). Интенсивность свечения оценивали с помощью программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

**Иммуноферментный анализ ELISA.** Содержание индуцибельной синтазы оксида азота iNOS в сетчатке 3 и 18 мес. животных оценивали иммуноферментным анализом (ИФА), используя набор Rat Nitric oxide synthase inducible ELISA Kit (EIAab®).

**Выделение тотальной РНК и RT-PCR.** Выделение тотальной РНК из замороженной ткани сетчатки крыс с помощью TRI® Reagent (Ambion) проводили по методу производителя. Для синтеза кДНК использовали фермент M-MLV Reverse Transcriptase. Уровень экспрессии генов определяли с помощью ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX 1000 (BioRad laboratories, США). Для оценки изменения экспрессии генов *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* использовали метод  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , обработку результатов и статистический анализ производили в программе REST 2009.

**Статистический анализ результатов** проводили с помощью программы Statistica 6.0. Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с *post-hoc* сравнениями групповых средних (Newman-Keul test). Как независимые факторы рассматривали генотип и возраст. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

**Сравнительный анализ транскриптома сетчатки 20-дневных крыс OXYS и Вистар.** Анализ изменений транскриптома, предшествующих и сопутствующих фенотипическим проявлениям старения и развитию связанных с ним заболеваний, - продуктивный подход к поиску молекулярных мишеней - генов, вовлеченных в их этиологию и патогенез. Выясняя природу развития признаков ретинопатии у крыс OXYS, мы исследовали транскриптом сетчатки на доклинической стадии заболевания в возрасте 20 дней, в период окончания постнатального созревания сетчатки у крыс методом массового параллельного секвенирования (по 3 животных для каждой линии).

Для оценки количества картированных прочтений (ридов) и анализа дифференциальной экспрессии был использован программный пакет: HTSeq/DESeq. Для DESeq количественной мерой экспрессии гена является сумма всех однозначно вы-

равненных прочтений, которые пересекаются с геном. Для оценки параметра дисперсии методом DESeq используют отрицательное биномиальное распределение. При заданной глубине секвенирования (40 млн. ридов длиной 50 нуклеотидов) установлено, что в сетчатке крыс OXYS и Вистар экспрессируется 26 405 генов, из них 14 640 генов было с числом прочтения больше 10. Максимальное количество ридов на ген составило 328 760, средние значения уровня экспрессии по всем детектируемым генам было 322 рида.

При заданной глубине секвенирования выявлены межлинейные различия в экспрессии 245 генов: 160 имели пониженный, а 85 – повышенный уровень экспрессии в сетчатке крыс OXYS. С помощью терминов Gene Ontology была проведена функциональная аннотация генов, уровень мРНК которых различался у крыс OXYS и Вистар (рис. 1).

Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов показал, что на доклинической стадии развития ретинопатии в сетчатке 20-дневных крыс OXYS изменена экспрессия генов, вовлеченных в пути, отвечающие за клеточные процессы (95 генов), процесс развития (44 гена), развитие многоклеточного организма (39 генов), развитие анатомических структур (38 генов), развитие систем (37 генов) и органов (30 генов), сигнальную трансдукцию (30 генов), процессы клеточного развития (28 генов) и дифференциацию клеток (25 генов). Различия обнаружены также для генов, регулирующих ответ на эндогенные (16 генов) и гормональные (13 генов) стимулы, регуляцию метаболизма фосфатов (13 генов), сигнальный путь связывания ферментов и белковых рецепторов (10 генов), позитивную регуляцию процесса модификации белка (9 генов), сигнальный путь, опосредованный вторичными мессенджерами (6 генов), регуляцию локализации белка (5 генов), организацию внеклеточного матрикса (5 генов), серин/треонин киназный сигнальный путь (5 генов), окислительное фосфорилирование (4 гена), ВМР сигнальный путь (3 гена), синтез комплекса электронного транспорта (4 гена), регуляцию двухцепочечных разрывов ДНК (4 гена), организация коллагеновых фибрилл (3 гена).

Наиболее существенно изменены в сетчатке 20-дневных крыс OXYS мРНК генов *Tmem221* – интегрального компонента мембраны, трансмембранного белка 221 (Fold Change >75) - и *GSTA6* - глутатион-S-трансферазы А6 (Fold Change >70), регулирующего конъюгацию сульфгидрильной (SH<sub>2</sub>) группы с электрофильными атомами С, N, S, О молекул ксенобиотиков. Также выявлено значительное снижение экспрессии генов, кодирующих субъединицы дыхательной цепи митохондрий: *mt-ND4*, *mt-ND5*, *mt-ND4L* (комплекс I, НАДН/убихинон оксидоредуктаза), *Atp5f1* (Комплекс V, АТФ-синтаза).



**Рис. 1.** Значимые термины генных онтологий, объединяющие гены, экспрессия которых в сетчатке 20-дневных крыс OXYS различна относительно крыс Вистар (BP\_FAT) ( $p < 0,05$ ).



**Сравнительный анализ транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев.** При сравнении ранее полученных данных транскриптома сетчатки на стадии манифестации клинических признаков ретинопатии (3 мес., по 3 животных для каждой линии) и прогрессии заболевания (18 мес., по 3 животных для каждой линии) (Kozhevnikova et al., 2013) с результатами, полученными в рамках данной работы, было выявлено 64 общих гена, экспрессия которых отличалась у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар как в возрасте 20 дней, так и 3 мес. Эти гены участвуют в процессах, регулирующих репарацию ДНК (*Lig4*, *MDC1*, *Rtel1* и *Hmg111*) и метаболические процессы ассоциированные с ДНК (*Prim1*, *Lig4*, *MDC1* и *Rtel1*), клеточный цикл (*Cks2*, *Kif2c*, *MDC1*, *Haus1* и *Mapk12*), метаболические процессы (n=24) и катаболические процессы, связанные с липидами (*Acadsb*, *Pla2g2c* и *Lipa*). При сравнении транскриптомов 20-дневных и 18-мес. животных выявлено 57 общих ДЭ генов (межлинейные различия), участвующих в обмене веществ (n=19) и клеточных процессах (n=23), в частности, в репарации ДНК (*Lig4*, *Rtel1* и *Hmg111*) и регуляции ответа на гормональный стимул (*Rtel1*, *Il13ra1*, *Hmg111* и *RT1-A1*).

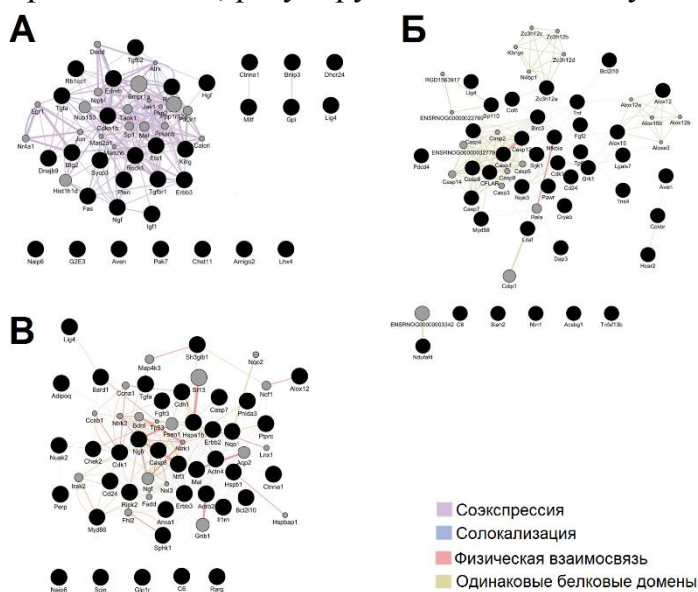
Общие категории генных онтологий для ДЭ генов крыс OXYS относительно крыс Вистар обнаружены для возраста 20-дней и 3-мес. (ответ на гормональные стимулы) и для 20 дневных и 18 мес. крыс (организация внеклеточного матрикса).

**Построение ассоциативных генных сетей клеточной гибели.** На следующем этапе была проведена реконструкция ассоциированных с клеточной гибелью генных сетей для генов, уровень мРНК которых у крыс OXYS и Вистар различен. Для этого списки ДЭ генов (p<0,01) без поправки на множественное сравнение аннотировались с помощью DAVID, отбирались гены, участвующие в регуляции клеточной гибели. Межлинейные различия в уровне экспрессии генов были обнаружены только для одного из известных путей – апоптоза. Согласно базе данных DAVID, в возрасте 20 дней обнаружены межлинейные различия в уровне экспрессии для 32 генов, включенных в путь апоптоза. Из них 26 генов имели у крыс OXYS пониженный уровень мРНК по сравнению с крысами Вистар, а 6 генов – повышенный. В возрасте 3 месяцев из 48 аннотированных генов экспрессия 6 генов у крыс OXYS была выше, чем у крыс Вистар, экспрессия остальных 42 ДЭ генов была снижена. В возрасте 18 месяцев из 41 ДЭ гена, прямо или косвенно связанных с апоптозом, экспрессия мРНК 4 генов была у крыс OXYS повышена, у остальных – снижена по сравнению с Вистар.

Межлинейные различия в уровне экспрессии гена *Lig4* обнаружены во всех исследованных возрастах; гена *Aven* – у 20-дневных и 3-месячных животных. Кроме того, 9 совпадающих генов в списках ДЭ генов найдено у 3 и 18 месячных животных (*Bcl2l10*, *Cd24*, *Casp8*, *Casp7*, *LOC298795*, *C6*, *Cdk1*, *Alox12*, *Myd88*), и 3 общих гена – у 20 дневных и 18-месячных животных (*ErbB3*, *Tgfa*, *Ctnna1*).

Для построения ассоциативной сети и анализа изменений транскриптома, связанных с функциональными категориями клеточной гибели, был использован алгоритм GeneMANIA. На рис. 2 представлены полученные нами ассоциативные генные сети апоптоза для 20-дневных, 3- и 18-мес. животных. Видно, что большинство генов прямо или косвенно связаны друг с другом. Для каждого графа ассоциативных генных сетей определяли наиболее значимые вершины и проводили кластерный анализ. Для полученных кластеров проводили функциональный анализ, используя базу дан-

ных Reactome. Реконструкция и анализ генных онтологий ассоциативных генных сетей показал, что развитие ретинопатии у крыс OXYS связано с изменениями экспрессии генов, регулирующих внешний путь апоптоза.



**Рис. 2.** Графы ассоциативных генных сетей апоптоза для 20-дневных (А), 3-месячных (Б) и 18-месячных (В) крыс OXYS. В каждой сети черным отмечены ДЭ гены, а серым – гены, предложенные программой GeneMania.

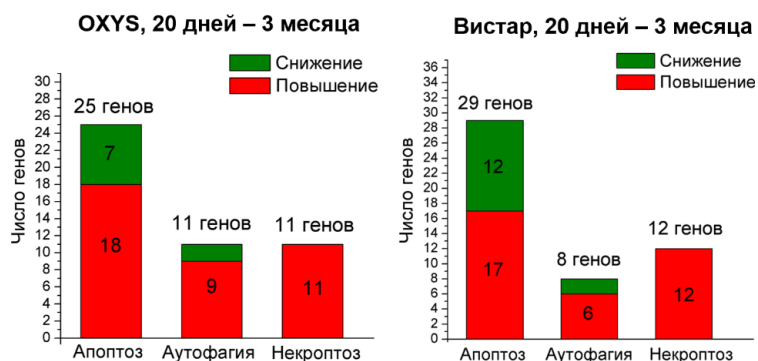
Также установлено, что в возрасте 20 дней гены-регуляторы апоптоза, уровень мРНК которых у крыс OXYS и Вистар различен, связаны с регуляцией сигнального пути интерлейкинов и сигнальной трансдукции факторов роста, в том числе - VEGF и NGF, с метаболизмом липидов и липопротеинов, иммунной системой, поиском аксонального пути и гомеостазом кальция. В возрасте 3 мес. обнаружена связь ДЭ генов с метаболизмом арахидоновой кислоты, а в 18 мес. – с иммунной системой, метаболизмом липидов и липопротеинов, кальциевыми каналами в нервной системе, метаболизмом энергии, сигнальным путем NGF и передаче сигнала через химические синапсы.

Таким образом, реконструкция ассоциативных генных сетей выявила связи ассоциированных с апоптозом генов, экспрессия которых изменена у крыс OXYS, с другими генами, прямо или косвенно влияющими на процесс клеточной гибели. Определены биологические процессы, в которых задействованы гены ассоциативных сетей, установлено, что помимо апоптоза участники ассоциативных сетей вовлечены в иммунные процессы и метаболизм липидов.

**Сравнение изменений с возрастом процессов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар.** Для определения кластеров генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели, использовали результаты исследования транскриптомов сетчатки животных в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес. Анализировали только ДЭ гены с уровнем значимости  $p < 0,05$  с поправкой на множественные сравнения. Функциональный анализ проводили с помощью базы данных KEGG и Rat genome database (RGD). Установлено, что как у крыс Вистар, так и у OXYS, уровень мРНК генов, вовлеченных в регуляцию апоптоза, некроза и аутофагии, изменяется только с возраста 20 дней до 3 мес. (рис. 3).

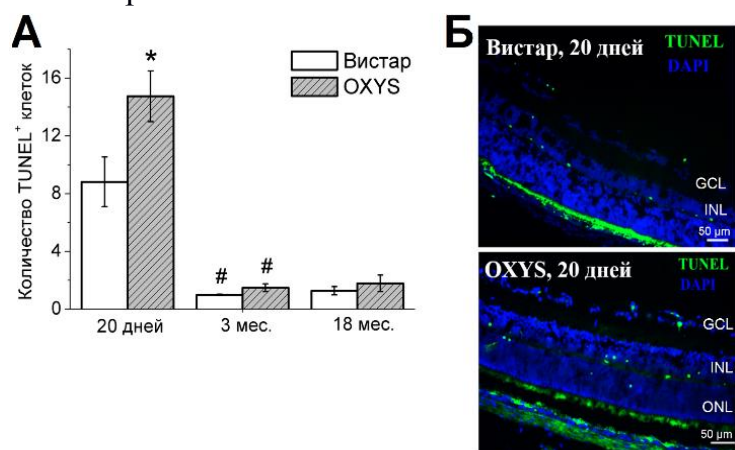
В сетчатке крыс OXYS в этот возрастной период изменялась экспрессия 25 генов-регуляторов апоптоза, у крыс Вистар - 29, из которых 14 – общие для крыс обеих линий. Однонаправлено изменена экспрессия 13 общих генов у крыс Вистар и OXYS (*Casp12*, *Cyts*, *Tnfsf10*, *Capn*, *Irak2*, *Capn2*, *Aifm1* – повышение экспрессии;

*Pik3r2*, *Ppp3ca*, *Prkaca*, *Akt3*, *Prkacb*, *Apaf1* – снижение экспрессии), разнонаправлено – гена *Ppp3r1*: у крыс Вистар экспрессия мРНК снижается, а у крыс OXYS повышается с возраста 20 дней до 3 мес. При этом изменения наблюдались как во внутреннем, так и во внешнем пути апоптоза. Среди генов, экспрессия которых изменилась в возрастной период от 3 до 18 мес, генов, регулирующих апоптоз, не выявлено.



**Рис. 3.** Количество генов - регуляторов клеточной гибели, снизивших и повысивших уровень мРНК с возраста 20 дней до 3 месяцев у крыс OXYS и Вистар (согласно базам данных KEGG и RGD)( $p_{adj} < 0,05$ )

**Исследование активности гибели клеток сетчатки методом TUNEL.** Работа выполнена на крысах OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес. В возрасте 20 дней у крыс Вистар и OXYS детектируются TUNEL<sup>+</sup> клетки (апоптотические) в ганглионарном, внутреннем ядерном, наружном сетчатом и ядерном слоях сетчатки (рис. 4Б). Это указывает на высокую активность процессов апоптоза в сетчатке крыс обеих линий этого возраста, при этом у крыс OXYS количество TUNEL<sup>+</sup> клеток достоверно выше, чем у крыс Вистар. Но уже к возрасту 3 мес. количество TUNEL<sup>+</sup> клеток снижается до единичных событий и у крыс OXYS, и у крыс Вистар. Эта тенденция сохраняется и в возрасте 18 мес. (рис. 4А). Таким образом, максимальная активность гибели клеток приходится на возраст 20 дней – период, когда завершается созревание сетчатки.



**Рис. 4.** А) Количество TUNEL<sup>+</sup> клеток на 500 мкм<sup>2</sup> в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Достоверны: \* - межлинейные отличия, # - различия по сравнению с предыдущем возрастом,  $p < 0,05$ . Б) Иммуногистохимическое окрашивание апоптотических клеток в препаратах сетчатки 20-дневных крыс OXYS и Вистар методом TUNEL (зеленый). DAPI (синий) окрашены ядра клеток. GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный

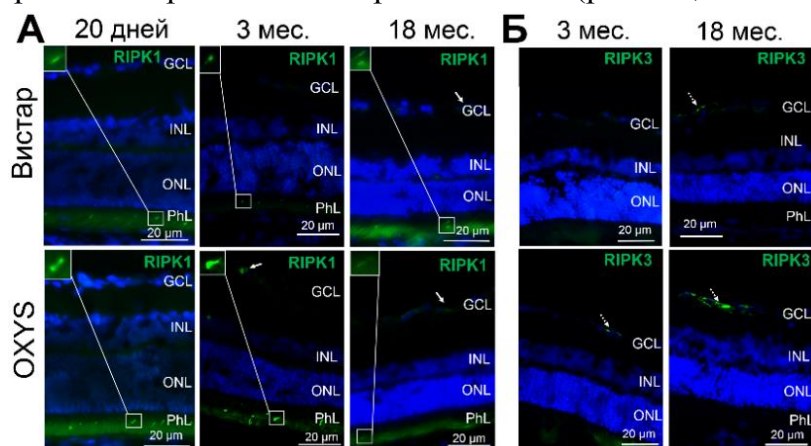
слой, ONL – внешний ядерный слой.

**Анализ вклада аутофагии в развитие ретинопатии у крыс OXYS.** Сравнительный анализ транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар методом RNA-seq выявил у животных обеих линий изменения с возрастом, преимущественно с возраста 20 дней до 3 мес., уровня мРНК генов, участвующих в аутофагии. Так, в период развития первых признаков ретинопатии у крыс OXYS изменены уровни мРНК 11-ти (*Atg1*, *Atg3*, *Atg4a*, *Atg4b*, *Atg4c*, *Atg4d*, *Atg5*, *Atg8*, *Atg12*, *Atg14*, *Atg16l2*), а у крыс Вистар – 8-ми генов (*Atg1*, *Atg3*, *Atg4a*, *Atg4b*, *Atg4d*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg12*) из 31, относящихся к этой категории (согласно базе данных KEGG) (рис. 3). Специфическими

для крыс OXYS были изменения экспрессии 4 генов (*Atg14*, *Atg16l2*, *Atg4c*, *Atg8*), а для крыс Вистар – только *Atg7*. Изменение экспрессии общих генов для крыс Вистар и OXYS были однонаправленными – повышение уровня мРНК генов *Atg3*, *Atg4a*, *Atg4b*, *Atg4d*, *Atg5*, *Atg12* и снижение экспрессии *Atg1*. При этом большинство из аннотированных ДЭ генов связано с регуляцией стадии элонгации аутофагии – происходит повышение экспрессии с возрастом основных регуляторов *Atg4*, *Atg5*, *Atg12*, *Atg8* у крыс OXYS.

**Анализ вклада некроптоза в развитие ретинопатии у крыс OXYS.** Анализ данных RNA-seq выявил в сетчатке крыс обеих линий изменения с возрастом уровня мРНК генов (12 для крыс Вистар и 11 для крыс OXYS), продукты которых участвуют в некроптозе (33 гена, согласно базе данных RGD), в том числе - основных генов-регуляторов *RIPK3* и *MLKL*. При этом и у крыс OXYS, и у Вистар уровень мРНК генов с возраста 20 дней до 3 мес. возрастал (рис. 3). Специфичными для крыс OXYS были изменения экспрессии 5 генов (*Birc2*, *Dnm1l*, *Fas*, *Pgam5*, *TRADD*), а для крыс Вистар 6 (*Casp8*, *Pygl*, *Ripk3*, *Tnf*, *TNFSF10*, *TRAF2*). Общим для животных обеих линий было повышение экспрессии 6 генов - *Birc3*, *Cav1*, *Mkl1*, *RPS27A*, *Slc25a4*, *UBC*. Важно, что уровень мРНК у обеих линий животных повышается как у генов, участвующих в самом сигнальном каскаде некроптоза, так и у ингибиторов, и генов, осуществляющих положительную регуляцию.

Далее исследовали маркеры некроптоза *RIPK1* и *RIPK3* на криосрезах сетчатки животных в возрасте 20 дней, 3, и 18 мес. Установлено, что белок *RIPK1* присутствует в фоторецепторном слое сетчатки крыс OXYS и Вистар всех исследованных возрастных групп, а в ганглионарном слое регистрируется у крыс OXYS в возрасте 3 и 18 мес., у крыс Вистар – только в 18 мес. (рис. 5А, белые стрелки). Белок *RIPK3* присутствует в ганглионарном слое сетчатки крыс OXYS с возраста 3 мес., а у крыс Вистар только в возрасте 18 мес. (рис. 5Б, белые пунктирные стрелки).

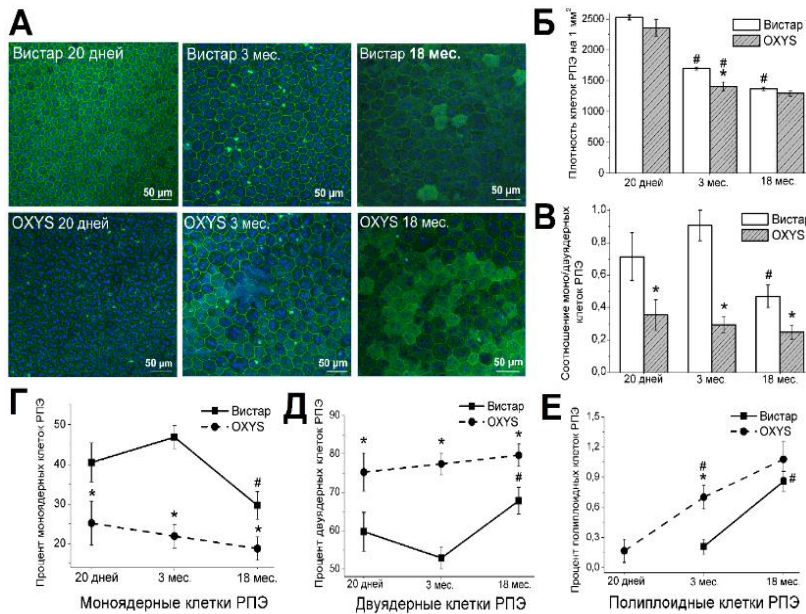


**Рис. 5.** Локализация *RIPK1* (А) и *RIPK3* (Б) – маркеров некроптоза (зеленый) - в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Ядра окрашены DAPI (синий). GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, ONL – внешний ядерный слой, PhL – фоторецепторный слой.

**Морфофункциональные изменения клеток РПЭ с возрастом и при развитии ретинопатии.** РПЭ выполняет многочисленные функции, в том числе фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов, поглощение избыточного света, участвует в зрительном цикле, секреции факторов роста и цитокинов, формирует гематоретинальный барьер. Многочисленные исследования указывают на то, что нарушение функций клеток РПЭ способствует дегенерации нейронов сетчатки и накоплению гранул липофусцина в друзах и рассматривается как одна из основных причин развития ВМД (Curcio et al., 2005; Rickman et al., 2013). Для анализа вклада морфофунк-



циональных изменений клеток РПЭ в развитие ретинопатии у крыс OXYS исследовали морфологию клеток РПЭ методами сканирующей конфокальной в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес. (рис. 6А). Анализировали только центральную зону сетчатки, находящуюся в непосредственной близости от места выхода оптического нерва.

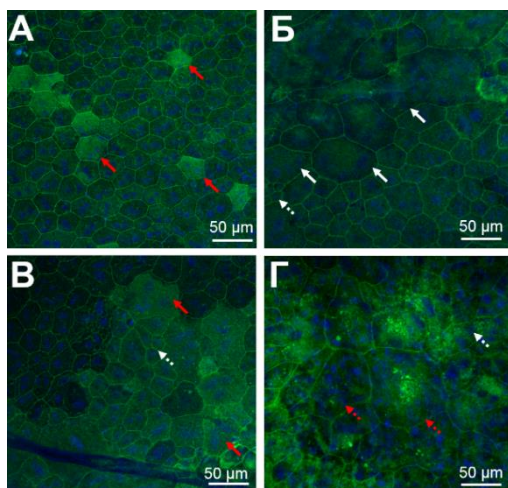


**Рис. 6. Изменения у крыс Вистар и OXYS с возрастом** А) структуры клеток РПЭ (окрашивание FITC-Phalloidine, F-actin); Б) плотности клеток на 1мм<sup>2</sup>; В) отношения количества моно- к двуядерным клеткам; процента моно- (Г), двуядерных (Д) и полиплоидных (Е) клеток РПЭ на 1 мм<sup>2</sup>. Данные представлены как M±SEM. Достоверны: \* - межлинейные отличия, # - различия по сравнению с предыдущим возрастом, p<0,05.

*Post-hoc* сравнения показали, что у крыс обеих линий с возрастом происходит постепенное снижение плотности РПЭ, но только у крыс OXYS с возраста 20 дней до 3 мес. плотность клеток достоверно снижается на 41% и становится ниже (p<0,05), чем у 3-мес. и такой же, как у 18-мес. крыс Вистар (рис. 6Б).

Атрофические изменения клеток РПЭ наблюдались у крыс OXYS начиная с возраста 3 мес.: гипертрофия и гиперплазия клеток, а также наличие аутофлуоресцирующего содержимого – гранул липофусцина - в некоторых из них. Часть клеток имела нарушения гексагональной структуры (были 4-х и многогранными), что не влияло на мозаичную структуру РПЭ. Такие клетки некоторые авторы относят к здоровым, нормально функционирующим (Ach et al., 2014).

В период активной прогрессии заболевания все описанные выше изменения усиливаются, некоторые клетки полностью теряют свою структуру и принимают округлую форму, что приводит в некоторых регионах к нарушению мозаичной структуры (рис. 7Б-Г).



**Рис. 7. Клетки РПЭ 18-месячных крыс.**

А) Крыса Вистар, красные стрелки - скопления аутофлуоресцирующих продуктов. Б) Ярко выраженная гипертрофия (белые стрелки) и гиперплазия (белые пунктирные стрелки) клеток РПЭ крысы OXYS. В) Накопление аутофлуоресцирующего содержимого и гранул липофусцина (красные стрелки) в клетках РПЭ крысы OXYS. Г) Полная потеря формы клеток РПЭ (красные пунктирные линии) у крысы OXYS.



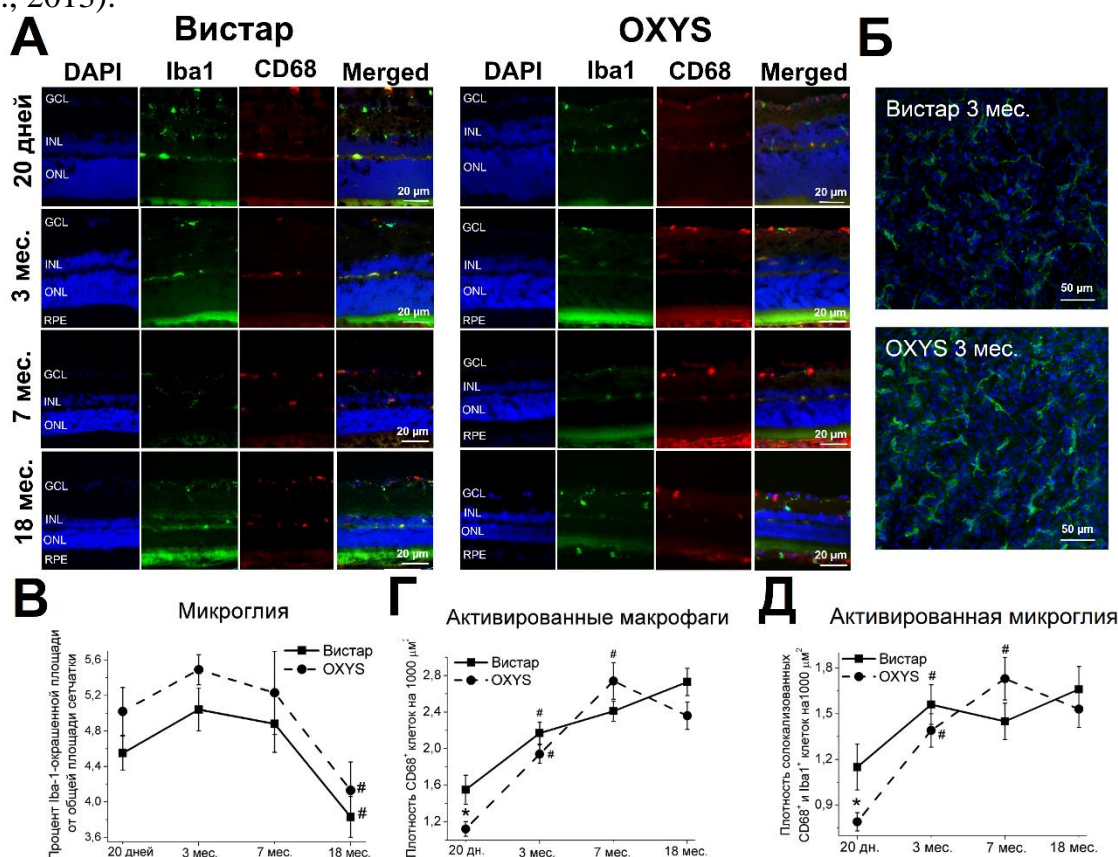
Важно, что около гипертрофированных клеток РПЭ часто обнаруживаются регионы с большим количеством мелких пяти- и шестигранных клеток (рис. 7Б, В). Пролиферация мелких клеток в центре сетчатки, скорее всего, является следствием фиброза - замещения утраченных клеток РПЭ. Наличие таких локальных рубцов характерно для поздних стадий ВМД. Кроме того, в возрасте 18 мес. из-за накопления гранул липофусцина у крыс OXYS усилена аутофлуоресценция монослоя РПЭ (рис. 7Б). У крыс Вистар деструктивные изменения клеток РПЭ (гипертрофия, гиперплазия, накопление гранул липофусцина) наблюдались в возрасте 18 мес., но они значительно менее выражены чем у крыс OXYS (рис. 7А).

**Анализ соотношения моноядерных, двуядерных и полиплоидных клеток в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес.** Для грызунов, в отличие от человека, характерно наличие как моноядерных, так и двуядерных клеток РПЭ (образующихся в результате неполного клеточного деления), наличие которых связывают с функциональной дифференцировкой (Stroeva et al., 1983), а также полиплоидных клеток, появление которых рассматривается как признак патологических изменений РПЭ (Chen et al., 2016). Анализ процентного содержания моноядерных, двуядерных и полиплоидных клеток от общего числа клеток РПЭ на 1 мм<sup>2</sup> показал, что в возрасте 20 дней доля моно- и двуядерных клеток РПЭ у крыс OXYS отличается от таковой у крыс Вистар: достоверно снижена доля моно- и повышена – двуядерных клеток ( $p < 0,01$ ) (рис. 6Г, Д), а соотношение этих типов клеток, соответственно, снижено (рис. 6В). Уже в возрасте 20 дней у крыс OXYS присутствуют полиплоидные клетки РПЭ (0,16% от общего числа) (рис. 6Е). Соотношение доли моно- и двуядерных клеток РПЭ остается у крыс OXYS более низким, чем у крыс Вистар как в возрасте 3, так и 18 мес., и не меняется по мере прогрессии ретинопатии (рис. 6В). При этом доля полиплоидных клеток к возрасту 3 мес. увеличивается по сравнению с 20 дневными животными более, чем вдвое. В этом возрасте полиплоидные клетки выявляются и в РПЭ крыс Вистар, но их существенно меньше, чем у крыс OXYS (рис. 6Е). В возрасте 18 мес. у крыс Вистар доля моноядерных клеток РПЭ становится ниже, а двуядерных и полиплоидных клеток – выше, чем в возрасте 3 месяцев ( $p < 0,05$ ), соответственно, соотношение этих типов клеток снижается, приближаясь к уровню крыс OXYS (рис. 6В – Д).

Таким образом, развитию у крыс OXYS клинических признаков ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, предшествует атрофия клеток РПЭ. В пользу этого свидетельствует и ранее проведенный ультраструктурный анализ, который выявил в сетчатке 20 дневных крыс OXYS наряду с нормально функционирующими, клетки РПЭ с вакуолями, нарушениями микроворсинок, базальной складчатостью и сниженным количеством фагосом (Markovets et al., 2011a).

**Состояние микроглии в сетчатке.** Основная функция клеток микроглии – резидентных макрофагов ЦНС – реализация иммуноопосредованных реакций. На ранних стадиях ВМД активация микроглии направлена на удаление деструктивных изменений (Ardehjan et al., 2013). Активированные клетки микроглии и макрофаги мигрируют в ядерные слои и субретинальное пространство, разделяющее фоторецепторы и РПЭ. Они способны изменять морфологию клеток РПЭ и усиливать экспрессию ими провоспалительных и проангиогенных молекул, способствуя неоваскуляризации (Ma et al., 2009; 2012). Как показал иммуногистохимический анализ

маркера микроглии Iba-1 у крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3, 7 и 18-мес. клетки микроглии равномерно распределены по всей сетчатке, начиная от центральной зоны к периферии, и локализуются в ганглионарном, внутреннем ядерном, внутреннем сетчатом, наружном сетчатом и наружном ядерном слоях. Количественный анализ не выявил межлинейных различий, но к 18 мес. площадь окрашенного поля в сетчатке крыс обеих линий снижалась ( $p < 0,05$ ) (рис. 8А-В). При этом у крыс OXYS отсутствовала характерная для ВМД миграция микроглии в фоторецепторный слой, что свидетельствует об отсутствии полноценного иммунного ответа и согласуется с полученными ранее данными о снижении активности иммунной системы у крыс OXYS (Obukhova et al., 2009), которое в сетчатке проявляется на фоне изменения уровней мРНК генов, связанных с воспалением и иммунным ответом (Kozhevnikova et al., 2013).

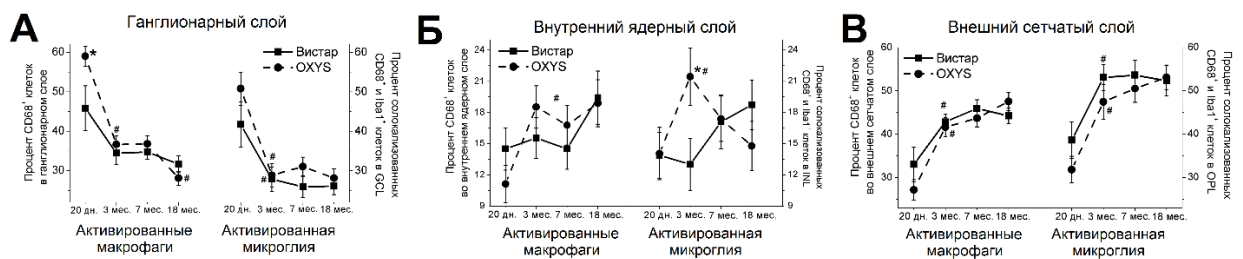


**Рис. 8.** Изменения микроглии в сетчатке крыс OXYS и Вистар с возрастом. **А)** Окрашивание специфичными к маркеру микроглии антителами Iba1 (зеленый), маркеру активированных макрофагов CD68 (красный) и их солокализация. Ядра окрашены DAPI (синий). **Б)** Морфология клеток микроглии в сетчатке 3 мес. крыс Вистар и OXYS. Окрашивание антителами к Iba1 (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий). **В)** Площадь поля, окрашенного специфичными к Iba1 антителами, нормированная на площадь сетчатки. **Г)** Численная плотность активированных макрофагов - CD68<sup>+</sup> клеток - на 1000  $\mu\text{m}^2$ . **Д)** Плотность солокализированных Iba1<sup>+</sup> и CD68<sup>+</sup> клеток (активированной микроглии) на 1000  $\mu\text{m}^2$ . Данные представлены как  $M \pm SEM$ . Достоверны: \* - межлинейные различия, # - изменения с возрастом,  $p < 0,05$ .

Для оценки иммунного статуса микроглии проводили совместное окрашивание маркера микроглии Iba1 с маркером активированных макрофагов CD68 (рис. 8А). Установлено, что у крыс ~70% CD68<sup>+</sup> клеток солокализированы с маркером Iba1, т.е. являются клетками микроглии. Как и клетки микроглии, CD68<sup>+</sup> клетки локали-

зуются в ганглионарном, внутреннем ядерном, внутреннем сетчатом, наружном сетчатом и наружном ядерном слоях. При этом миграции макрофагов в фоторецепторный слой сетчатки у крыс исследованных возрастных групп не выявлено. У крыс обеих линий с возрастом постепенно возрастает количество активированных макрофагов, при этом у крыс OXYS в возрасте 20 дней этот показатель ниже, чем у Вистар ( $p < 0.05$ ) (рис. 8Г). Аналогичную тенденцию выявил и анализ активированной микроглии: у крыс OXYS число активированных микроглиальных клеток нарастает при развитии ретинопатии, у крыс Вистар оно возрастает с возраста 20 дней до 3 мес. и в дальнейшем не меняется (рис. 8Д).

Анализ распределения активированных макрофагов и микроглии по слоям сетчатки показал, что с возрастом у крыс OXYS и Вистар происходит миграция клеток из ганглионарного слоя во внешний сетчатый слой, при этом в возрасте 20 дней у крыс OXYS число активированных макрофагов выше, чем у Вистар ( $p < 0,05$ ) (рис. 9А, В). Во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс Вистар этот показатель с возрастом не менялся, в то время как у крыс OXYS процент активированных микроглиальных клеток в период манифестации клинических признаков ретинопатии (в 3 мес.) существенно возрастал и был выше, чем у крыс Вистар ( $p < 0,05$ ) (рис. 9Б). Внутренний ядерный слой содержит тела биполярных, амакриновых, горизонтальных и клеток Мюллера. Ранее установлено, что манифестация клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне увеличения процента биполярных и амакриновых ассоциативных нейронов с признаками деструктивных изменений (Zhdankina et al., 2008). Амакриновые и биполярные нейроны наиболее чувствительны к внешним стимулам и повреждению и у крыс OXYS, можно полагать, первыми подвергаются дегенеративным процессам при развитии ретинопатии.

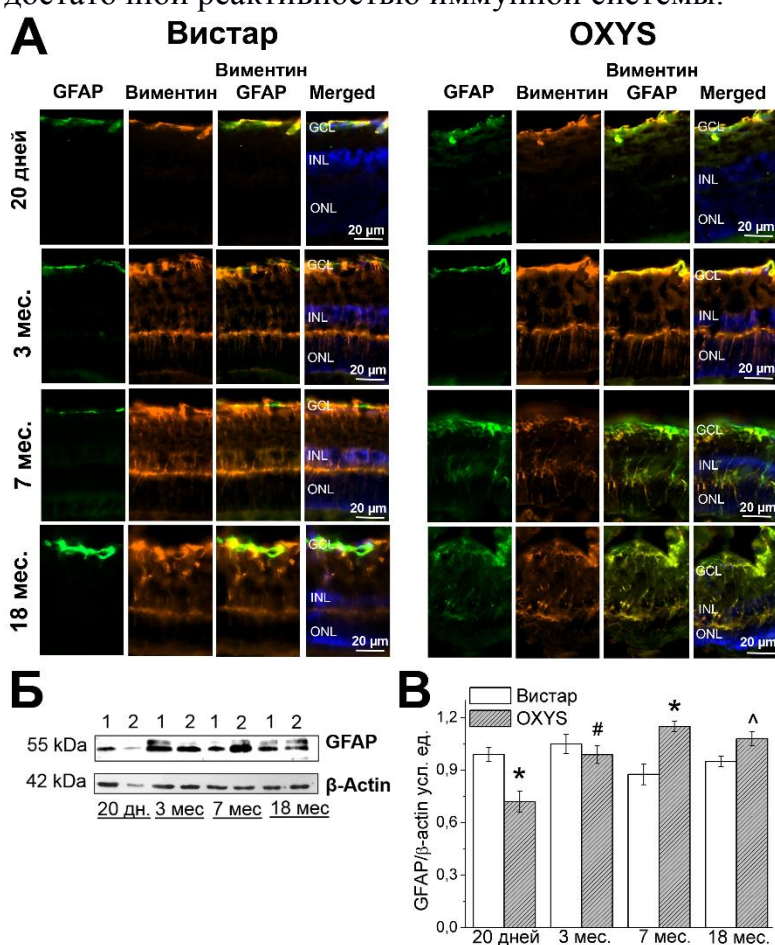


**Рис. 9.** Количество активированных макрофагов (CD68<sup>+</sup> клетки) и клеток микроглии (CD68<sup>+</sup> и Iba1<sup>+</sup>) в ганглионарном (А), внутреннем ядерном (Б) и во внешнем сетчатом (В) слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как M±SEM. Достоверны: \* - межлинейные различия,  $p < 0,05$ ; # - изменения с возрастом,  $p < 0,05$ . GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, OPL – внешний сетчатый слой.

**Состояние макроглии в сетчатке крыс Вистар и OXYS.** В сетчатке клетки макроглии – астроциты и клетки Мюллера – поддерживают гомеостаз внеклеточной среды, обеспечивая полноценное функционирование сетчатки. В ответ на повреждение сетчатки происходит активация макроглии, отличительной чертой которой является усиление экспрессии белков промежуточных филаментов, таких, как глиальный фибриллярный кислый белок GFAP и виментина – белка промежуточных нитей в клетках мезенхимального происхождения (Coorey et al., 2012). Для оценки вклада астроцитов и клеток Мюллера в развитие ретинопатии у крыс OXYS исследовали изменения с возрастом уровня белков GFAP и виментина. Согласно данным Вестерн блот анализа в возрасте 20 дней у крыс OXYS уровень белка GFAP была значительно ниже ( $p < 0,05$ ), а в 7 мес. - выше ( $p < 0,05$ ) чем у крыс Вистар (рис. 10Б, В).



Иммуногистохимическое окрашивание выявило флуоресцентное свечение виментина (маркера клеток Мюллера) в ганглионарном слое у крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, частично сококализованного с белком GFAP. Начиная с возраста 3 мес. уровень флуоресценции виментина повысился, и детектировался в виде тонких отростков пронизывающих сетчатку от ганглионарного до фотосенсорного слоев. В возрасте 7 и 18 мес. у крыс OXYS наблюдалось усиление экспрессии виментина и GFAP, регистрировалась их обширная сококализация и прорастание GFAP/виментин<sup>+</sup> апикальных отростков до внешнего ядерного слоя, что свидетельствует об ярко выраженной активации и глиозе астроцитов и клеток Мюллера начиная с возраста 7 мес. (рис. 10А). У крыс Вистар во всех исследованных возрастах GFAP детектировался только в ганглионарном слое, частично сококализованный с виментином, при этом в возрасте 18 мес. обнаружена небольшая частичная активация клеток Мюллера (рис. 10А). Отсутствие активации макроглии в период манифестации клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS, возможно, связано с недостаточной реактивностью иммунной системы.



**Рис. 10. Экспрессия белков виментина и GFAP в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста.** А) - окрашивание сетчатки антителами к GFAP (зеленый), виментину (оранжевый), и их сококализация. Ядра окрашены DAPI (синий). Б) Вестерн-блот анализ уровня GFAP: крысы Вистар - полоса 1, OXYS - полоса 2; В) количественный анализ результатов. Данные представлены как  $M \pm SEM$ . Достоверны: \* - межлинейные различия,  $p < 0,05$ ; # - изменения с возрастом,  $p < 0,05$ , ^ - тенденция по сравнению с крысами Вистар одного возраста,  $0,1 < p < 0,05$ .

**Экспрессия синтаз оксида азота в сетчатке крыс OXYS и Вистар** была исследована в возрасте 3 и 18 мес. Показано, что уровень мРНК всех трех *NOSs* (*nNOS*, *iNOS* и *eNOS*) с возрастом не менялся как у крыс Вистар, так и у OXYS. Не выявлено межлинейных различий в уровне мРНК *eNOS*, а уровень мРНК *nNOS* в возрасте 18 мес. у крыс OXYS был в 2,4 раза выше, чем у крыс Вистар ( $p < 0,05$ ). Независимо от возраста у крыс OXYS уровень мРНК *iNOS* был в 7 раз ниже, чем у крыс Вистар, но содержание белка *iNOS* (данные ИФА) в возрасте 3 мес. было повышено в 1,3 раза: 40 против 31 нг/мг ( $p < 0,05$ ). Возможно, такая парадоксальная ситуация отражает характерное для крыс OXYS снижение реактивности иммунной системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что развитию клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS предшествуют изменения экспрессии генов, ассоциированных с процессами развития, сигнальной трансдукцией и клеточной дифференцировкой. Анализ кластеров генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели, показал, что гибель клеток в сетчатке крыс OXYS реализуется как путем апоптоза, так и некроза и аутофагии. Наиболее существенны изменения экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели в период развития клинических признаков ретинопатии – с возраста 20 дней до 3 мес. Как на доклинической стадии, так и при манифестации и прогрессии заболевания в сетчатке крыс OXYS изменена экспрессия генов, вовлеченных во внешний путь апоптоза. Результаты исследования транскриптома подтверждены данными иммуногистохимического анализа: активность гибели клеток в сетчатке у крыс обеих линий максимальна в возрасте 20 дней, при этом у крыс OXYS она выше, чем у Вистар. В целом полученные результаты указывают на нарушения у крыс OXYS процесса развития сетчатки, которые могут вносить существенный вклад в патогенез заболевания. Патологические процессы в сетчатке крыс OXYS развиваются на фоне атрофических изменений клеток РПЭ – нарушения их способности делению и пролиферации, которое предшествует манифестации ретинопатии. Её манифестация протекает на фоне фагоцитарной дисфункции и снижения элиминации погибших клеток, на что указывает отсутствие характерной для ВМД миграции макрофагов и микроглии в фоторецепторный слой, что, возможно, обусловлено неполноценной реакцией иммунной системы. Такие результаты отражают ранее выявленное у крыс OXYS снижение активности иммунной системы на фоне ранней инволюции тимуса, которая рассматривается нами как одна из причин их преждевременного старения. При прогрессии ретинопатии активированные макрофаги и микроглия мигрируют из ганглионарного слоя во внутренние слои сетчатки, при этом увеличение количества этих клеток во внутреннем ядерном слое характерно для крыс OXYS с выраженными нейродегенеративными изменениями.

## ВЫВОДЫ

1. В возрасте 20 дней у крыс OXYS изменена экспрессия 245 генов, основная часть которых связана с процессами развития, сигнальной трансдукции и дифференцировкой клеток. С возраста 20 дней до 3 мес. в сетчатке крыс OXYS изменяется экспрессия 25 генов-регуляторов апоптоза, у крыс Вистар - 29 генов, из которых 14 – общие для них и крыс OXYS.

2. Активность апоптоза в сетчатке в возрасте 20 дней существенно выше, чем в 3 и 18 мес. у крыс обеих линий, при этом у крыс OXYS количество TUNEL-позитивных клеток больше, чем у Вистар. Согласно результатам реконструкции ассоциативных генных сетей, образуемых генами - регуляторами апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна, наибольшие изменения выявлены во внешнем пути апоптоза.

3. Гибель клеток в сетчатке крыс OXYS реализуется как путем апоптоза, так и некроза и аутофагии. Наибольшие изменения экспрессии генов, связанных с клеточной гибелью, предшествуют проявлениям клинических признаков ретинопатии: только в возрастной период от 20 дней до 3 мес. в сетчатке крыс повышается уровень мРНК генов, участвующих в аутофагии и программируемом некрозе. К возрасту 3 мес. у крыс OXYS, в отличие от крыс Вистар, возрастает уровень белков-маркеров



некроптоза RIPK1 в фоторецепторном и ганглионарном слоях и RIPK3 в ганглионарном слое, который к 18 мес. увеличивается.

4. Развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне деструктивных изменений клеток РПЭ и связано с увеличением доли двуядерных и полиплоидных клеток РПЭ.

5. Манифестация клинических признаков ретинопатии и развитие нейродегенеративных изменений происходят на фоне миграции клеток микроглии во внутренний ядерный и внешний сетчатый слои сетчатки крыс OXYS. Изменение экспрессии белка GFAP - маркера макроглии – свидетельствует о снижении активности макроглии у крыс OXYS в возрасте 20 дней и её активации - в возрасте 7 мес.

6. Изменения с возрастом уровня мРНК и белка индуцибельной синтазы оксида азота (*iNOS*) в сетчатке подтверждает связь развития ретинопатии у крыс OXYS с дисфункцией иммунной системы.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Телегина Д.В.**, Фурсова А.Ж., Колосова Н.Г., Кожевникова О.С. Экспрессия синтаз оксида азота в сетчатке крыс OXYS при развитии ретинопатии // Успехи геронтологии. 2014. Т. 27. № 1. С. 87–93

2. **Telegina D.V.**, Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy // Cell Cycle. 2015. Vol.14. Issue 14 (22) P. 3544 – 56.

3. **Телегина Д.В.**, Кожевникова О. С., Колосова Н. Г. Молекулярные механизмы гибели клеток в сетчатке при старении и развитии ретинопатии // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. № 6. С. 424-432.

4. **Telegina D.V.**, Kozhevnikova O.S., Baiborodin S.I., Kolosova N.G. Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats // Sci Rep. 2017. DOI: 10.1038/srep41533

5. **Telegina D.V.**, Kozhevnikova O.S., Baiborodin S.I., Kolosova N.G. Alterations of rat retinal pigment epithelium with age and AMD-like retinopathy // «BGRS/SB-2014». 2014. Novosibirsk. - P. 58.

6. **Telegina D.V.**, Korbolina E.E., Ershov N.I., Kozhevnikova O.S. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy // The 7th International Young Scientists School "Systems Biology and bioinformatics" SBB-15. 2015. Novosibirsk. – P.49

7. **Telegina D.V.**, Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. Molecular mechanisms of cell death in the retina of rats during aging and the development of retinopathy // «Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress». 2016. Sudak. - P. 393.

8. **Telegina D.V.**, Kozhevnikova O.S., Kolosova N.G. Relationship of cell death in retina of rats during aging with the development of retinopathy // «BGRS/SB-2016». 2016. Novosibirsk. - P. 315.