

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Колосова Наталия Гориславовна

Новосибирск – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Патогенез возрастной макулярной дегенерации	11
1.2. Классификация типов клеточной гибели: апоптоз, некроз и аутофагия	16
1.2.1. Молекулярный механизм апоптоза	17
1.2.2 Молекулярный механизм аутофагии.....	24
1.2.3 Молекулярный механизм программируемого некроза.....	30
1.3. Роль апоптоза, аутофагии и некроптоза в патогенезе ВМД	32
1.4. Роль глиальных клеток в патогенезе ВМД	41
1.4.1. Астроциты	42
1.4.2. Клетки Мюллера.....	43
1.4.3. Глиоз	45
1.4.4. Микроглия	49
1.4.5. Роль микроглии при дегенерации сетчатки.....	52
1.5. Крысы OXYS как модель ВМД.....	57
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	62
Животные.....	62
Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-seq).....	62
Создание списка генов-регуляторов клеточной гибели, экспрессия изменяется с возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар	64
Реконструкция и анализ ассоциативных генных сетей генов-регуляторов апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна	64
Забор и хранение образцов.....	66
Вестерн блот анализ.....	66
Иммуноферментный анализ	67
Выделение РНК для real-time PCR	68
Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)	69
Очистка образцов РНК методом ДНКазной обработки.....	69
Реакция обратной транскрипции для получения кДНК	70
Приготовление смеси «стандартной» кДНК	71
Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR) для определения уровня мРНК исследуемых генов	71
Иммунофлуоресцентный анализ.....	73
Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.....	74
Анализ и обработка изображений	74

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ	76
3. 1. Анализ данных секвенирования транскриптома (RNA-seq) для 20-дневных крыс Вистар и OXYS	76
3. 2. Реконструкция генных сетей, ассоциированных с апоптозом в сетчатке крыс OXYS на разных стадиях ретинопатии	79
3. 2. 1. Кластерный анализ графов ассоциативных генных сетей	84
3. 3. Сравнение изменений с возрастом процессов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар	87
3. 4. Исследование активности гибели клеток сетчатки методом TUNEL	88
3. 5. Анализ вклада аутофагии в развитие ретинопатии у крыс OXYS	89
3. 6. Анализ вклада некроптоза в развитие ретинопатии у крыс OXYS	90
3. 7. Морфофункциональные изменения клеток РПЭ с возрастом и при развитии ретинопатии	92
3. 7. 1. Анализ соотношения мооядерных, двуядерных и полиплоидных клеток в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес.	95
3. 8. Исследование изменения микроглии в сетчатке при старении и развитии ретинопатии	96
3. 8. 1. Анализ изменений активированных макрофагов в сетчатке крыс Вистар и OXYS	98
3. 8. 2. Анализ распределения активированных клеток микроглии в сетчатке крыс Вистар и OXYS	101
3. 9. Исследование изменения макроглии в сетчатке крыс Вистар и OXYS	103
3. 10. Изменение уровня мРНК <i>nNOS</i> , <i>iNOS</i> и <i>eNOS</i> в сетчатке крыс OXYS при манифестации и прогрессии ретинопатии	105
3. 11. Содержание белка iNOS в сетчатке в возрасте 3 и 18 месяцев крыс OXYS и Вистар	107
ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	108
4.1. Сравнительный анализ транскриптома сетчатки 20-дневных крыс OXYS и Вистар	108
4.2. Изменения экспрессии генов, ассоциированных с клеточной гибелью с возрастом и при развитии ретинопатии	109
4.3. Изменения механизмов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар с возрастом	115
4.4. Роль дисфункции клеток РПЭ и глии в развитии ретинопатии у крыс OXYS	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
ВЫВОДЫ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132
ПРИЛОЖЕНИЯ	166

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ДЭ – дифференциально экспрессирующиеся (гены)

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПААГ – полиакриламидный гель

ЦНС – центральная нервная система

GO – генные онтологии

RNA-seq – метод массового параллельного секвенирования

TUNEL - терминальное TdT-опосредованное мечение концов ДНК

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

DAVID - Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

RGD –Rat Genome Database

DISC - мультибелковый смерть-индуцирующий сигнальный комплекс

DED - эффекторный домен смерти

DD – домен смерти

GCL – ганглионарный слой

IPL – внутренний сетчатый слой

INL – внутренний ядерный слой

OPL- внешний сетчатый слой

ONL – внешний ядерный слой

PhL – фотосенсорный слой

RPE – ретинальный пигментный эпителий

ВВЕДЕНИЕ

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 транскриптома сетчатки – данных RNA-seq – 20-дневных крыс OXYS и Вистар. Определить группы генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели, используя биоинформатический анализ результатов исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней и в возрасте 3 и 18 мес. (получены ранее, Kozhevnikova et al. 2013).

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 (в возрасте 3 и 18 месяцев) 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

клеточной дифференцировкой. 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: «BGRS-2014» (Новосибирск, 2014), «SBB-15» (Новосибирск, 2015), «Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress» (Судак, 2016), «BGRS-2016» (Новосибирск, 2016).

Основные публикации

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. - № 3.

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

ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенез возрастной макулярной дегенерации

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) - комплексное, многофакторное заболевание глаз, которое приводит к необратимому отмиранию фоторецепторов, подлежащих клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), изменению мембраны Бруха и хориокапилляров в области макулы и утрате центрального зрения. ВМД становится основной причиной потери зрения людьми старше 60 лет (Bhutto et al., 2012) и представляет серьезную экономическую и социальную проблему. Патогенез и этиология ВМД до конца не ясны, эффективных способов лечения и профилактики нет.

Сетчатка – наиболее активная в потреблении кислорода ткань в организме человека с уровнем потребления на 50% больше, чем в мозге (Rattner et al., 2006). Такой интенсивный обмен повышает вероятность развития окислительного стресса, что при недостаточной эффективности работы систем антиоксидантной защиты может приводить к дегенеративным процессам. Тогда в сетчатке, особенно в макуле и парамакулярной области, под действием кислорода и света образуются нерасщепляемые полимерные структуры – друзы - депонированное аморфное вещество, находящееся между клетками РПЭ и внешней коллагеновой зоной мембраны Бруха, основным компонентом которых является липофусцин (рис. 1А, Б). Липофусцин – комплекс соединений нестабильного состава, состоящих в основном из белков (50%) и липидов (44%). Содержимое гранул, по-видимому, представляет собой остатки неполной деградации компонентов внешних сегментов фоторецепторов, которые фагоцитируются клетками пигментного эпителия (Li et al., 2013). Образование друз, иммунорективных образований, провоцирует воспаление,

атрофию прилегающих слоев сетчатки, неоваскуляризацию - рост патологических новообразованных сосудов. В дальнейшем происходят процессы рубцевания, сопровождающиеся потерей большого количества фоторецепторов сетчатки. (Ardeljan et al., 2013) (рис. 1В, Г).

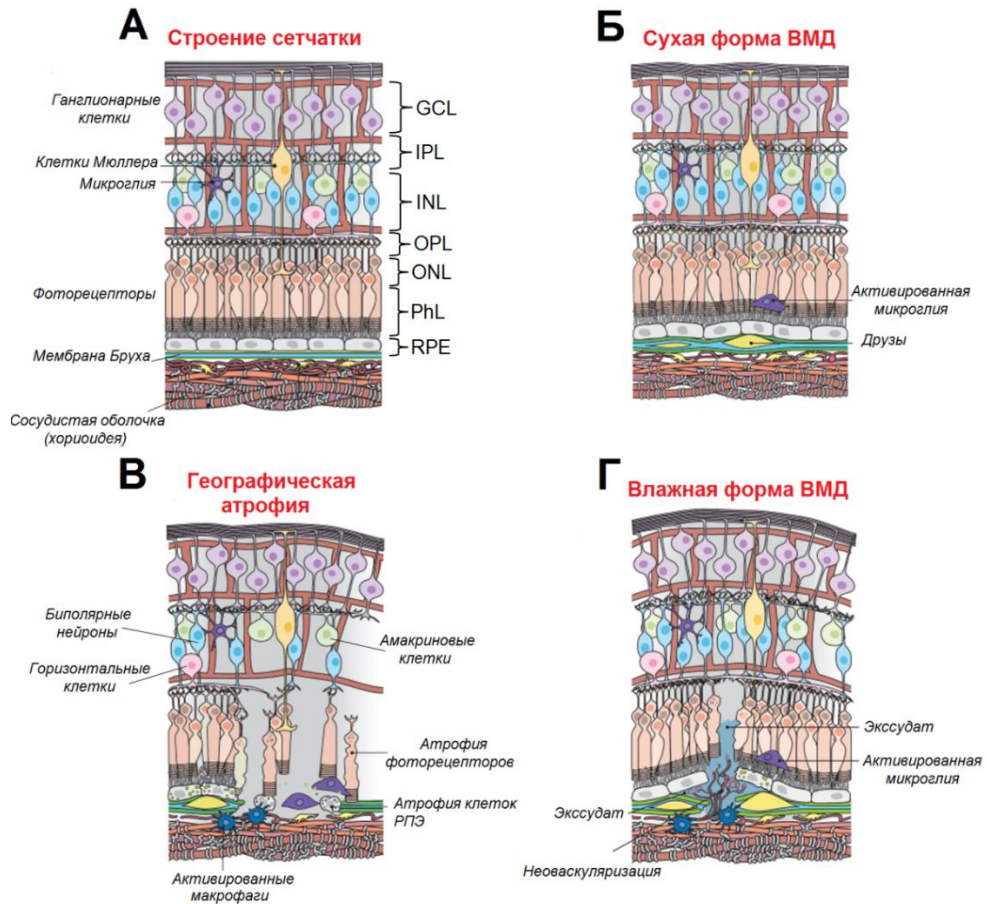


Рис. 1. Схематическое изображение событий, происходящих при развитии

ВМД. А) Строение сетчатки без патологии: ганглионарный слой (GCL) содержит тела ганглионарных клеток, генерирующие нервные импульсы; внутренний сетчатый слой (IPL) состоит из переплетения аксонов биполярных нейронов и дендритов амакриновых и ганглионарных клеток; внутренний ядерный слой (INL) включает в себя тела биполярных нейронов, амакриновых и горизонтальных клеток, а также клеток Мюллера; внешний сетчатый слой (OPL) образован синапсами между аксонами фоторецепторов, дендритами биполярных нейронов и аксонами и

дендритом горизонтальных клеток; внешний ядерный слой (ONL) содержит тела фоторецепторов, а фотосенсорный слой (PhL) – их внешние и внутренние сегменты (палочки и колбочки); ретинальный пигментный эпителий (RPE) располагается на границе с сосудистой оболочкой и своими отростками проникает в фотосенсорный слой. **Б)** Схема сетчатки с сухой (неэкссудативной) формой ВМД. Показано формирование друз между клетками РПЭ и внешней коллагеновой зоной мембраны Бруха. Воспаление характеризуется миграцией активированной микроглии в фотосенсорном слое. **В)** Обширные атрофические изменения (географическая атрофия) сетчатки при ВМД. На поздних стадиях сухой формы ВМД происходит обширная атрофия РПЭ в области макулы, что приводит к потере других типов клеток, таких, как биполярные нейроны, горизонтальные и амакриновые клетки, фоторецепторы. **Г)** Схема сетчатки с влажной (экссудативной) формой ВМД. Неоваскуляризация приводит к выделению экссудата и кровоизлиянию в сетчатку, и как следствие, потере фоторецепторов и клеток РПЭ (по обзору van Lookeren Campagne et al., 2014).

На основе клинических данных принято выделять «сухую» и «влажную» формы заболевания. Сухая (неэкссудативная) форма встречается в 90% случаях ВМД. В макулярной области диагностируются друзы, происходит перераспределение пигмента, появляются дефекты пигментного эпителия и хориокапиллярного слоя (рис. 1Б, В). Влажная (экссудативная) форма развивается у 10% больных с ВМД и характеризуется врастанием новообразованных сосудов через дефекты мембраны Бруха под пигментный эпителий сетчатки или под нейроэпителий. Патологическая проницаемость новообразованных сосудов приводит к отеку сетчатки, выделению экссудата и кровоизлияниям в стекловидное

тело и сетчатку, что в итоге становится причиной потери зрения (Nowak, 2006) (рис. 1Г).

В основе ВМД лежат характерные для так называемого физиологического старения структурно-функциональные изменения сетчатки: потеря меланиновых гранул клетками РПЭ, нарушение их базальной складчатости и атрофия микроворсинок, увеличение количества и повышение плотности липофусциновых гранул, формирование друз, уплотнение мембраны Бруха, склероз стенок хориокапилляров и сужение их просвета (Ardeljan et al., 2013). Аналогичные изменения наблюдаются и на ранних стадиях ВМД, они лежат в основе патогенеза заболевания, но не всегда приводят к его развитию (Cuenca et al., 2014).

Важную роль в развитии ВМД играют изменения в иммунной системе. Пораженную ВМД сетчатку отличает повышенная иммунореактивность, которая обусловлена формированием в ней друз (Penfold et al., 1997). В последних, а также между клетками пигментного эпителия и мембраной Бруха, выявляются компоненты системы комплемента (Hageman et al., 2001). Установлено, что влияние системы комплемента на развитие ВМД может реализовываться путем активации местного иммунного ответа в хориоидальной оболочке (Troutbeck et al., 2012).

В физиологических условиях эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, устойчивы к проангиогенным стимулам. Незначительная пролиферация, поддерживающая оптимальное функциональное состояние эндотелия, регулируется балансом между проангиогенными и антиангиогенными факторами. В сетчатке ключевую роль в регуляции ангиогенеза играют фактор роста эндотелия сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor) и его антагонист нейротрофный фактор пигментного эпителия PEDF (pigment epithelium-derived

factor). Гипоксия и ишемия являются стимулами, увеличивающими экспрессию проангиогенных факторов, что в конечном итоге приводит к неоваскуляризации. Увеличение уровня HIF-1 и NO в условиях гипоксии могут активировать пролиферацию и миграцию эпителиальных клеток, провоцируя, таким образом, неоваскуляризацию (Olson et al, 2011). Важную роль в инициации хориоидальной неоваскуляризации и её прогрессии играют локальное воспаление и системный иммунный ответ как процессы, обеспечивающие создание соответствующей проангиогенной клеточной и молекулярной среды.

Новообразованные сосуды, как правило, неполноценные и с повышенной проницаемостью, врастают со стороны хориоидеи через дефекты мембраны Бруха и приводят к образованию субретинальной неоваскулярной мембраны. Нарушение кровотока в макулярной области приводит к развитию дегенеративных изменений: апоптозу клеток РПЭ, депонированию продуктов метаболизма в виде друз, нарушению целостности мембраны Бруха, экссудативной или геморрагической отслойке пигментного эпителия (Nowak, 2006; Bhutto et al., 2012).

Предполагается, что в основе ВМД лежат характерные для старения изменения хориокапилляров, ретинального пигментного эпителия и мембраны Бруха, но механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, до конца не ясны (Ardeljan et al., 2013). В настоящее время основную роль в развитии заболевания отводят структурно-функциональным изменениям монослоя клеток РПЭ, который лежит между фоторецепторами и мембраной Бруха и служит селективным барьером между нейроретиной и хориоидальной кровеносной системой (Feigl, 2009).

Поддержание функций клеток РПЭ является критичным для обеспечения полноценного зрения. Эти клетки выполняют такие важные для сетчатки функции, как транспорт веществ между сосудами хориоидеи и фоторецепторами, фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов, участвуют в зрительном цикле (изомеризации транс формы ретиналя в 11-цис форму), обеспечивают ионный гомеостаз, защиту от окислительных повреждений и секрецию различных ростовых факторов и цитокинов (Strauss, 2005). В отличие от макрофагов и микроглии, клетки РПЭ являются непрофессиональными фагоцитами, но, тем не менее, играют решающую роль в обеспечении зрительной функции. С возрастом происходит снижение фагоцитарной активности клеток РПЭ (у старых крыс - на 80%), что приводит к нарушению гомеостаза сетчатки и способствует накоплению побочных продуктов фагоцитоза наружных сегментов фоторецепторов, в частности липофусциновых гранул, что провоцирует развитие ВМД (Li et al., 2013).

Результатом патологических изменений в РПЭ и хориоидеи становится гибель клеток нейронов сетчатки. Гибель фоторецепторов является причиной необратимой потери зрения при сухой форме ВМД и может происходить путем апоптоза, аутофагии или некроза. Несмотря на интенсивные исследования патогенеза ВМД, механизмы гибели нейронов сетчатки при ВМД, за исключением единичных работ, практически не изучены, что затрудняет поиск эффективных методов лечения заболевания.

1.2. Классификация типов клеточной гибели: апоптоз, некроз и аутофагия

Апоптоз, аутофагия, и некроз - три основных механизма клеточной смерти, при этом наиболее охарактеризован апоптоз (Galluzzi et al., 2012). Schweichel и Merker

(1973) предложили такую классификацию механизмов гибели клеток, основываясь на ультраструктурных исследования физиологической гибели клеток в пренатальных тканях. Морфологические характеристики каждого вида клеточной смерти различны: тип I - апоптоз - характеризуется конденсацией цитоплазмы, уплотнением хроматина и фрагментацией ДНК, образованием апоптотических телец, уменьшением объема и округлением клетки. Клетки, подвергшиеся апоптозу, распознаются макрофагами или другими фагоцитирующими клетками и быстро элиминируются, минуя развитие воспалительной реакции. Для типа II - аутофагии - характерно формирование крупных включений (аутофагосом и аутолизосом) в цитоплазме и отсутствие конденсации и фрагментации клеток. Тип III - некроз - характеризуется отеком цитоплазмы и органелл, увеличением объема клетки, разрывом мембраны, изменением межклеточного вещества. Хотя есть некоторые исключения в критериях или номенклатуре механизмов гибели клеток на основе биохимических особенностей, эта классификация принята как основная и широко используется в литературе начиная с 1970-х годов до настоящего времени (Murakami et al., 2013).

1.2.1. Молекулярный механизм апоптоза

Апоптоз является наиболее хорошо охарактеризованным типом программируемой клеточной гибели, и большинство дефектных клеток погибают именно через механизм апоптоза. Известно, что неапоптотические формы запрограммированной клеточной гибели могут быть активированы одновременно с апоптозом при нейродегенеративных заболеваниях (Boya et al., 2008).

Молекулярный механизм апоптоза включает в себя последовательную активацию ряда цистеиновых протеаз, которые называются каспазами. Эти белки

функционально разделены на две группы: инициаторные (каспазы 2, 8, 9 и 10) и эффекторные (каспазы 3, 6 и 7) каспазы. Каспазы присутствуют в цитоплазме большинства клеток в основном в неактивной форме (прокаспазы) и активируются в присутствии апоптотических стимулов: происходит аутокаталитическое расщепления прокаспазы и образование активной формы, затем активированные каспазы расщепляют и активируют другие каспазы, создавая тем самым автономный усилительный каскад (Shalini et al., 2015). Существует два основных пути, ведущих к активации каспаз: внешний путь, инициируемый рецепторами клеточной гибели, и внутренний путь, который регулируется в митохондриях (рис. 2).

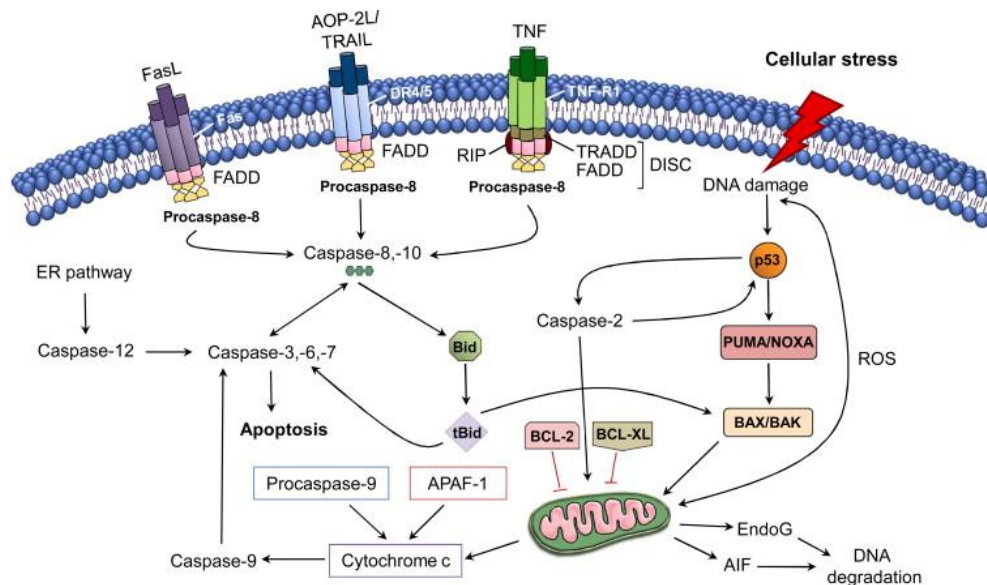


Рис. 2. Схематическое изображение молекулярных событий при апоптозе (из обзора Ghavami et al., 2014).

Активации **внутреннего пути** апоптоза способствуют повреждения ДНК, активация онкогенов, гипоксия, окислительный стресс и облучение. Эти стимулы приводят к изменению проницаемости митохондриальной мембраны и выходу апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки (рис. 2) (Tower, 2015). Целостность митохондриальной мембраны

регулируется балансом между проапоптотическими и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2. Когда проапоптотическая активация сигнала превышает определенное пороговое значение в ответ на внутренний и экологический стресс, Bcl-2-ассоциированный X белок (Bax) встраивается в мембрану митохондрий и олигомеризуется, образуя каналы на наружной мембране (Choudhury et al., 2012). Это приводит к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий (МОМР) и высвобождению из межмембранного пространства в цитозоль цитохрома *c* и вторичного митохондриального активатора каспаз (Smac). Цитохром *c* связывается с активирующим фактором апоптотической протеазы-1 (Araf-1), тем самым вызывая его конформационные изменения и олигомеризацию. Этот белковый комплекс Araf-1 – цитохром *c*, названный «апоптосомой», димеризуется и опосредует конформационное изменение и активацию инициаторной каспазы-9. Активированная каспаза-9, в свою очередь, расщепляет эффекторные прокаспазы 3 и 7, которые в дальнейшем расщепляют большинство клеточных белков, включая белки цитоскелета (Martinou et al., 2011). Кроме того, Smac повышает активацию каспаз через нейтрализацию белков – ингибиторов апоптоза (IAP) (рис. 2).

Активация как внешнего, так и внутреннего пути апоптоза приводит к изменению проницаемости наружной митохондриальной мембраны. Митохондрии богаты проапоптатическими белками, и изменение МОМР является необратимым шагом при запуске клеточной гибели (Kilbride et al., 2013). Проапоптатические белки имеют двойную функцию. С одной стороны, они участвуют в цепи переноса электронов, например, цитохром *c* транспортирует электроны с комплекса IV (Wu et al., 2013), а апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) стабилизирует и устраняет АФК из комплекса I цепи электронного переноса электронов (Polster, 2013). Но

высвобождаясь в цитоплазматическое пространство, цитохром *c* и AIF могут активировать различные протеазы, что приводит к образованию апоптосомы, а при перемещении в ядро цитохром *c* и AIF способны непосредственно расщеплять ДНК (Wu et al., 2013). Таким образом, сохранение целостности митохондриальной мембраны и предотвращение образования МOMP является одним из антиапоптотических механизмов, которые защищают клетки от гибели.

На данный момент наиболее полно исследована роль в регуляции апоптоза и МOMP семейства белков Bcl-2. Семейство белков Bcl-2 подразделяется на три группы на основании их про- или антиапоптотического действия и наличия гомологичных Bcl-2 (BH) доменов. Антиапоптотические Bcl-2-подобные белки (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 и A1/Bfl-1) и проапоптотические Bax-подобные белки (Bax, Bak и Bok/Mtd) имеют четыре BH домена. Проапоптотические BH3 белки (Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma и Hrk/DP5) обладают лишь коротким мотивом, называемый BH3 домен (Martinou et al., 2011). Белки Bax и Bak способствуют повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий, Bcl-2 и Bcl-XL в наружной мембране митохондрий снижают МOMP. BH3 белки, такие как Bim, Bid и Puma (p53-активируемый модулятор апоптоза), не запускают апоптоз сами по себе, а действуют как регуляторы про- и антиапоптотических Bcl-2 белков. Через домен BH3 эти белки могут взаимодействовать с антиапоптотическими белками и ингибировать их функции и/или непосредственно взаимодействовать с многодоменными белками, такими как Bax или Bak, стимулируя их активность (Czabotar et al., 2014). Кроме того, BH3 белки могут выступать в качестве связующего звена между другими типами запрограммированной гибели клетки. Например, Bid является одним из связующих звеньев между внутренним и внешним

апоптозом и способен усилить формирование ВАХ/ВАК-индуцированного МOMP (Delbridge et al., 2015).

Внешний путь апоптоза активируется через передачу сигнала с помощью трансмембранных рецепторов клеточной гибели, которые имеют N-концевой внеклеточный домен, ответственный за связывание с лигандом и C-концевую внутриклеточную часть, которая служит для передачи сигнала апоптоза. Все рецепторы смерти характеризуются наличием высоко консервативного внутриклеточного цитоплазматического домена («домена смерти»), состоящего примерно из 60 – 80 аминокислот, необходимого для трансдукции сигнала (Thorburn, 2008). Известно восемь основных рецепторов смерти: рецептор фактора некроза опухоли 1 (TNFR1; также известный как DR1, CD120a, p55 и p60), CD95 (также известной как DR2, APO-1 и FAS), DR3 (также известный как Apo-3, LARD, TRAMP и WSL1), рецептор родственного фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганда 1 (TRAILR1; также известный как DR4 и APO-2), TRAILR2 (также известный как DR5, KILLER и TRICK2), DR6 (TR-7), рецептор эктодисплазина (EDAR) и рецептор фактора роста нервов (NGFR) (Lavrik et al., 2005). Шесть из этих рецепторов (TNFR1, FAS, DR3, TRAILR1, TRAILR2, DR6) относятся к суперсемейству рецепторов факторов некроза опухоли и характеризуются наличием, помимо домена смерти, от двух до четырех богатых цистеином повторов во внеклеточном домене (Lavrik, 2014).

Наиболее полно исследованы два типа мультибелковых смерть-индуцирующих сигнальных комплексов (DISC). Первый тип характерен для FAS, TRAILR1 и TRAILR2 (Lavrik et al., 2005). При взаимодействии рецептора с внеклеточным лигандом, например FasL, происходит агрегация (тримеризация или

олигомеризация) ранее сформированных триммеров FAS на плазматическую мембрану клетки. С олигомерным рецептором через гомотипические домены смерти связывается Fas-адапторный белок FADD. На N – конце FADD находится участок, названный эффекторным доменом смерти DED, который связывает аналогичный домен прокаспазы 8 (прокаспазы-10 у человека), формируя таким образом DISC (рис. 2) (Singh et al., 2015). Каспаза-8 присутствует в здоровых клетках в виде неактивного профермента (зимогена). В сигнальном комплексе DISC прокаспазы-8 подвергается аутопротеолитической активации с образованием активной формы каспазы-8. Активированная каспаза-8 способна расщеплять специфические субстраты в цитозоле, в частности эффекторные прокаспазы (каспазы-3, -6, -7) и проапоптотический домен BH4 белка Bid, которые имеют решающее значение для Fas-опосредованного апоптоза (Kaufmann et al., 2012; Flusberg et al., 2015).

Второй комплекс DISC связан с TNF-опосредованным апоптозом и имеет ряд отличительных черт в молекулярном механизме от сигнального пути рецептора FAS и TRAILR1/R2. Ряд провоспалительных и иммуностимулирующих молекул способны инициировать активацию TNFR1 (Zamaraev et al., 2015). Стимуляция рецептора TNFR1 приводит к образованию двух сигнальных комплексов DISC: комплекса I и комплекса II (A/B). После связывания с лигандом, рецептор TNFR1 связывается белком, ассоциированным с доменом смерти рецептора фактора некроза опухолей (TRADD), RIP1, связанными с TNFR факторами 1 и 2 (TRAF-1/2), клеточным ингибитором апоптоза (cIAP-1/2) и линейный комплекс лигазы-убиквитина (LUBAC), в итоге образуя комплекс I TNF-R1. Комплекс I может способствовать эффективной активации пути NF- κ B (Ashkenazi et al., 2014).

Процесс формирования комплекса II до конца не ясен, но известно, что происходит диссоциация RIPK1 и TRAF-1 от комплекса I, усиливающая высвобождение TRADD в цитоплазму клетки и его ассоциацию с FADD через домены смерти. FADD по выше описанному механизму связывается с прокаспазой-8, образуя комплекс II (TRADDosome), в котором происходит активация каспазы-8, в конечном итоге приводящая к запуску механизма апоптоза (Zamaraev et al., 2015; Singh et al., 2015).

Регуляция активности каспазы-8 в DISC и комплексе II TNFR1 происходит с помощью c-FLIP – клеточного белка ингибирующего FLICE (другое название каспазы-8). Альтернативный сплайсинг приводит к образованию трех изоформ c-FLIP: L (длинной), S (короткой) и R (Раджи). Все три изоформы содержат тандемные эффекторные домены смерти DED, с помощью которых c-FLIP связывается с комплексом DISC. Изоформ c-FLIP_S и c-FLIP_R негативно регулирует активацию прокаспазы-8, изоформа c-FLIP_L при низких концентрациях катализирует активацию прокаспазы-8, образуя каталитически активные гетеродимеры прокаспазы-8/c-FLIP_L, усиливая таким образом апоптоз, а при высоких концентрациях c-FLIP_L выполняет антиапоптотическую функцию, конкурируя с каспазой-8 за связывание с FADD (Chang et al., 2002; Kaufmann et al., 2012). Разнонаправленность эффектов c-FLIP_L объясняется наличием дополнительного C-концевого неактивного каспаз-подобного домена (Nair et al., 2014).

Клеточный ингибитор белков апоптоза cIAP (Birc3) у позвоночных имеет восемь изоформ, три из которых (XIAP и cIAP-1/2) оказывают антиапоптотическое действие. cIAP-1/2 в комплексе I TNFR1 убиквитинируют RIP1, таким образом

предотвращая образование комплекса II, и следовательно, активацию прокаспазы-8 (Vucic et al., 2014).

Как внутренний, так и внешний пути апоптоза приводят к активации эффекторных каспаз 3 и 7. Регуляция апоптоза в этой точке происходит с помощью одного известного эндогенного ингибитора XIAP (X-связанного ингибитора белков апоптоза). Активированные каспазы действуют как димеры, которые состоят из взаимодействующих больших и малых каталитических субъединиц (Berthelet et al., 2013). XIAP имеет домен BIR3, который способен связывать четыре консервативные аминоконцевые аминокислоты малой субъединицы. Таким образом XIAP предотвращает димеризацию каспазы-9 и блокирует ее активацию, регулируя формирование апоптосомы. XIAP стабилизирует связи в прокаспазе 3 и 7, ингибируя их активацию (Berthelet et al., 2013; Vucic et al., 2014).

1.2.2 Молекулярный механизм аутофагии

Аутофагия - это внутриклеточный процесс деградации цитоплазматических компонентов в лизосомах, поддерживающий клеточный гомеостаз и производство энергии. Процесс аутофагии служит не только для деградации поврежденных органелл и долгоживущих белков, он также является рециркуляторной динамической системой, необходимой для поддержания гомеостаза и метаболической адаптации. Показано, что процессы аутофагии - деградация белков и органелл в цитоплазме - активируются в условиях голодания для получения энергии и синтеза необходимых для выживания компонентов. В последнее время процесс аутофагии часто рассматривают в качестве механизма антистарения (Bergamini, 2006), поддержания ремоделирования клеток при развитии или защиты клеток от патогенов (Todde et al., 2009). Возрастает количество публикаций,

указывающих на то, что дисбаланс в системе аутофагии (чрезмерное подавление или активация) вносит свой вклад в патогенез различных нейродегенеративных и воспалительных заболеваний.

Существуют три основных типа аутофагии: микроаутофагия, макроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (СМА) (Mizushima et al., 2011). СМА описана только у млекопитающих и участвует в деградации отдельных растворимых белков, тогда как микро- и макроаутофагия обнаружены у большинства эукариот, включая млекопитающих, растения и грибы, и обеспечивают деградацию частей цитоплазмы и клеточных органелл (Mizushima et al., 2011).

Микроаутофагия является неселективным процессом деградации, ее точные физиологические функции у млекопитающих до конца не выяснены. При микроаутофагии цитозольный материал захватывается непосредственно инвагинациями мембраны лизосомы. Эта мембранная динамика очень схожа с формированием сортировочного комплекса эндосом (ESCRT), необходимым для транспорта (Sahu et al., 2011). ESCRT способствует финальным стадиям разделения мембран при формировании мультивезикулярных телец и расхождении делящихся клеток. Считается, что основной функцией микроаутофагии является поддержание размера органелл, гомеостаза мембран и обеспечение выживаемости клеток при ограничении количества азота (Li et al., 2012).

Шаперон-опосредованная аутофагия характеризуется отсутствием мембранный реорганизации, при этом происходит направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость. Белок теплового шока hsc70 при участии кошаперонов hsp (белка, стимулирующего связывание hsc70, hsc40 и субстрата), hop (стимулирует

связывание hsc70 и hsc90), hsc40 (стимулирует АТФ-азную активность hsp70), hsp90 (предотвращает обратное сворачивание развернутых белков и образование ими агрегатов) и bag1 (специфически распознает цитозольные белки, содержащие пентапептид KFERQ или его аналоги) (Cuervo et al., 2014). Полагают, что приобретение белком-мишенью пентапептида KFERQ является одним из этапов посттрансляционной модификации белков. Комплекс hsc70 с белком-мишенью доставляется к мембране лизосомы, где связывается с трансмембранным белком LAMP2A - ассоциированным с мембраной лизосомы белком 2A, действующим как рецептор на лизосоме. Второй шаперон, лизосомальный hsc70 (lys-hsc70), способствует перемещению белка-мишени в просвет лизосомы, где тот окончательно разрушается протеазами (Li et al., 2011).

Этот тип аутофагии отличают селективность деградированных белков и прямая транслокация белков-мишеней через лизосомальную мембрану без формирования дополнительных везикул. В настоящее время полагают, что развитие значительного количества заболеваний, в том числе нейродегенеративных, связано со снижением функциональной активности СМА и/или с его недостатком либо блокировкой его активности каким-либо другим фактором (Arias et al., 2011; Li et al., 2011)

Макроаутофагия - наиболее изученный путь аутофагии, который часто так и называют (далее в обзоре - просто аутофагия). Несмотря на то, что аутофагосомные структуры были обнаружены с помощью электронной микроскопии еще в 1950-х годах, представления о молекулярном механизме аутофагии начали формироваться только в 1990-х годах после открытия аутофагия-зависимых генов (Atg) у дрожжей (Shimizu et al., 2014; Noda et al., 2015). Из 40 генов, кодирующие Atg белки, 15 обнаружены также и у высших млекопитающих (Atg1–Atg10, Atg12–Atg14, Atg16 и

Atg18) (Mizushima et al., 2011). Этот факт указывает на то, что аутофагия является эволюционно консервативным механизмом. Как и у дрожжей, у млекопитающих белки Atg формируют несколько функциональных комплексов, регулирующие разные этапы аутофагии: комплекс ULK, ATG9L, комплекс PI класса III (phosphatidylinositol-3-ОН-киназы), комплекс Atg2-WIP1, Atg12 и LC3 конъюгированные системы (Shibutani et al., 2015).

Процесс аутофагии принято разделять на 5 этапов: инициация (1), образование двойной мембраны и формирование аутофагосомы (2), элонгация (3), слияние с лизосомой (4) и деградация поглощенных компонентов (5) (Lapierre et al., 2015) (рис. 3). Считается, что инициация аутофагии происходит при образовании изолирующей мембраны, называемой фагофор, в непосредственной близости от эндоплазматического ретикулума (ЭР). Исследования показывают, что субстратом для формирования фагофора являются различные органеллы, в том числе ЭР, аппарат Гольджи, митохондрии, плазматическая мембрана и эндосомы (Mizushima et al., 2011).

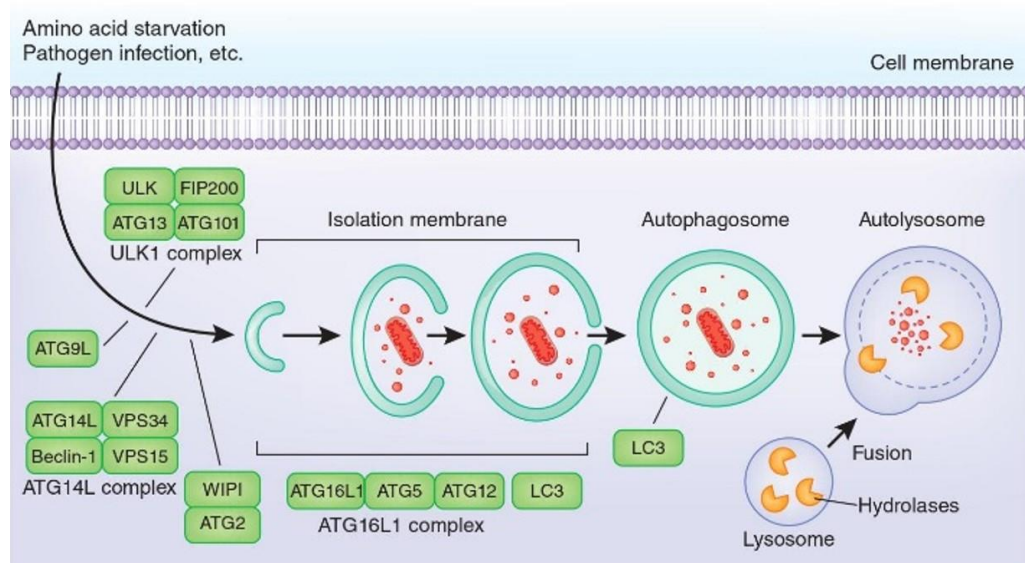


Рис. 3. Схематическое изображение событий, происходящих при макроаутофагии (из обзора Shibutani et al., 2015).

Поскольку аутофагия является весьма динамичным процессом, ее активация в значительной степени зависит от набора посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование и убиквитилирование.

Для инициации процесса аутофагии необходимы два протеинкиназных комплекса. Первый комплекс ULK1, состоящий из белков ULK1, Atg13 и FIP200, подавляет mTORC1 (mTOR комплекс 1), который является основным негативным регулятором аутофагии. При нормальных условиях, комплекс mTORC1 соединяется с комплексом ULK1 и фосфорилирует белки ULK1 и Atg13, тем самым ингибируя комплекс ULK1 (рис. 3). В стрессовых условиях (например, при дефиците питательных веществ), АМПК (АМР-активированная протеинкиназа) способна как фосфорилировать ULK1, так и ингибировать mTORC1 (Rocchi et al., 2015). Эти события приводят к активации комплекса ULK1, который способствует формированию второго протеинкиназного комплекса - комплекса PI класса III, состоящего из белков Beclin 1, Atg6, Atg14, Vps15, Vps34 и Ambra1. Этот киназный комплекс способствует образованию PI3P липидов (фосфатидилинозитол 3-фосфат), необходимых для формирования везикул (Shimizu et al., 2014).

Во время стадии элонгации происходят две убиквитин-подобные реакции. В первой реакции участвуют несколько Atg белков: Atg7, Atg10, Atg5 и Atg12 (рис. 3). При этом, Atg7 и Atg 10 обладают ферментативной активностью (E1- и E2-фермент, соответственно) и выступают в качестве «метки» для материала, подлежащего удалению (Noda et al., 2015). После распознавания материала, происходит присоединение белка Atg12 к своему субстрату, белку Atg 5, а далее на комплексе Atg5-Atg12 происходит мультимеризация Atg16L1 (Shibutani et al., 2015). Образовавшийся комплекс белков ассоциируется с фагофором, образуя

аутофагосому. Далее происходит вторая убиквитин-подобная реакция: ферменты Atg7 (E1-фермент) и Atg3 (E2-фермент) способствуют активации и присоединению убиквитин-подобных молекул семейства Atg8 (наиболее известный у млекопитающих - LC3) к мембране аутофагосомы за счет модификации мембраны и образованию липидного «якоря» (Noda et al., 2015). Белок Atg8 ассоциирован с микротрубочками цитоскелета, благодаря чему происходит движение и расширение аутофагосомы для последующего слияния с лизосомой или эндосомой. При закрытии аутофагосомы происходит отделение комплекса Atg5-Atg12-Atg16L1, однако белок LC3-II (липидная форма LC3) остается связанным с аутофагосомой до ее слияния с лизосомой (Laraquette et al., 2015). Таким образом, LC3 может использоваться как белковый маркер аутофагосом.

Аутофагия регулируется множеством разнообразных факторов и может быть индуцирована различными стимулами: ограничением питательных веществ, гипоксией, активными формами кислорода, а также наличием белковых агрегатов и поврежденных органелл. Помимо упомянутых выше mTOR и AMPK, к регуляторам аутофагии относятся такие белковые факторы как Beclin 1, Bcl2, Atg1, ГТФаза, p53, ферменты комплекса PI-3K/ПКВ (например, PtdIns3K), PTEN и др. (Yang et al., 2010). Эти белки осуществляют регуляцию на разных этапах процесса аутофагии.

Показано, что многие метаболические факторы регуляции транскрипции участвуют в регуляции аутофагии, например PPAR, CREB, TFEB, Foxo 1/3 и FXR (Lapierre et al., 2015). Среди них PPAR, CREB, TFEB и FoxO3 усиливают экспрессию генов аутофагии в условиях голодания или стресса, а FXR является ядерным рецептором, который при наличии питательных веществ супрессирует аутофагию. Однако механизм регуляции транскрипции аутофагии во многих органах до сих пор

неясен, и предполагается наличие многих других факторов и ко-факторов транскрипции, регулирующих процесс аутофагии.

1.2.3 Молекулярный механизм программируемого некроза

Некроз, как правило, является результатом чрезмерного цитотоксического либо механического повреждения и не имеет конкретных молекулярных механизмов. Однако в последнее десятилетие охарактеризована регулируемая форма некротической гибели клеток – некроптоз, осуществляемый с помощью серин/треонин киназ RIP и псевдокиназы MLKL (Khan et al., 2014). Некроптоз имеет черты как апоптоза, так и некроза. Как и апоптоз, некроптоз характеризуется определенным молекулярным каскадом. Как и при некрозе, наблюдается ряд морфологических изменений (отек клетки и органелл, разрыв плазматической мембраны, митохондриальная дисфункция).

Наиболее хорошо изучен механизм инициации некроптоза с помощью TNF, но некроптоз также может быть активирован другими рецепторами смерти (FAS, TRAIL), интерферонами, поверхностными Toll-подобными рецепторами, в том числе TLR3 и TLR4, а также вирусной инфекцией через внутриклеточные стимулы, например, ДНК-зависимые регуляторные факторы интерферона (DAI) (de Almagro et al., 2015). Поскольку существует несколько различных инициаторов некроптоза, неясно, имеют ли они общие последующие стадии сигнального пути. Далее описан наиболее изученный молекулярный механизм некроптоза, активированный с помощью TNF (рис. 4).

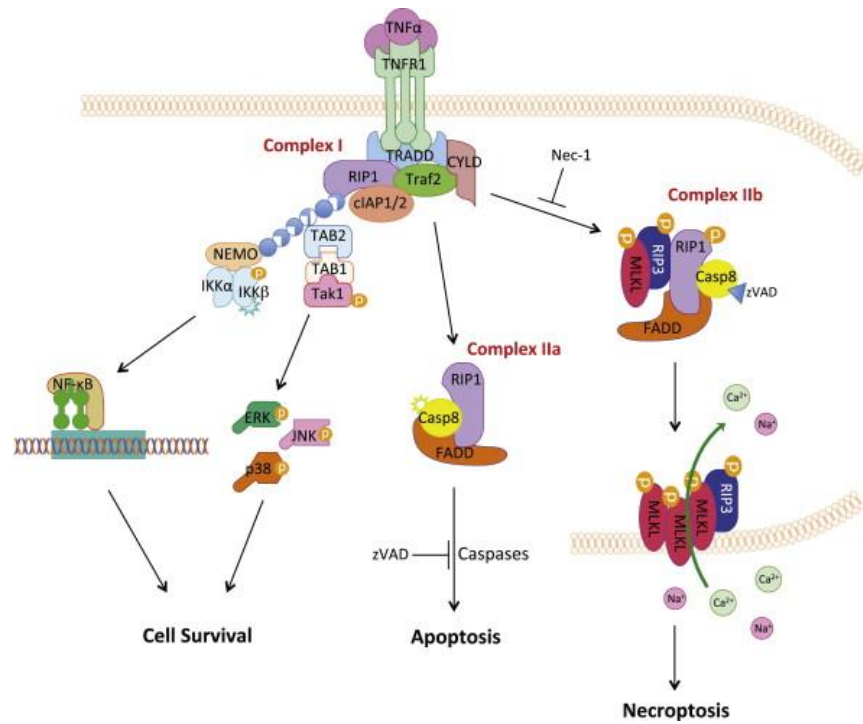


Рис. 4. Молекулярный механизм некроптоза (из обзора Zhou et al., 2014).

Как описано выше в главе 1.2.1, стимуляция TNFR1 приводит к формированию комплекса I, который либо способствует активации сигнального пути NF- κ B, либо переходит в комплекс II. В условиях индукции апоптоза, активированная каспаза-8 расщепляет RIP1 и инактивирует его, но при ингибировании каспазы – 8 происходит инициация некроптоза. Центральную роль в трансдукции сигнала некроптоза играют RIP киназы: при ингибировании каспазы-8 RIP1 и RIP3 не расщепляются и могут взаимодействовать через домены Rhim, функционируя как киназы, которые управляют некроптозом. RIP1 и RIP3 совместно с MLKL участвуют в формировании некрсомы – комплекса, который включает в себя FADD, MLKL, каспазу-8, RIP1 и RIP3 (Feoktistova et al., 2015). Адаптерная молекула TRADD также может быть частью этого комплекса при определенных условиях (Cho et al., 2009).

Посттрансляционная модификация RIP1 играет ключевую роль в индукции некроптоза: его деубиквитинирование и фосфорилирование важно для инициации

процесса. Хотя основные компоненты некрсомы определены, стехиометрия этого комплекса до сих пор неизвестна.

В некрсоме RIP1 фосфорилирует RIP3, который, в свою очередь фосфорилирует MLKL, приводя к олигомеризации псевдокиназы MLKL. MLKL имеет два суперспирализованных (CC) домена с различными функциями, необходимыми для некроптоза. CC2 несет ответственность за олигомеризацию MLKL, а домен CC1 участвует в транслокации к плазматической мембране (рис. 4) (Cai et al., 2014). Роль MLKL после транслокации к мембране не вполне ясна. С одной стороны, показано что MLKL способствует притоку ионов Ca^{2+} (Cai et al., 2014) и Na^+ (Chen et al., 2014) в клетку, увеличивая осмотическое давление и вызывая разрыв мембраны с последующей гибелью. С другой стороны, существуют данные, что олигомеризованный MLKL связывает мембранные липиды через положительно заряженные аминокислоты на его N-конце и непосредственно отвечает за формирование пор на мембране и нарушения ее целостности (рис. 4) (Wang et al., 2014; Dondelinger et al., 2014).

Недавние исследования показали, что RIP3 способен также вызывать некроптоз по RIP1–независимому механизму (Khan et al., 2014). Таким образом, молекулярный механизм некроптоза все еще остается неясным и требует дальнейшей детализации.

1.3. Роль апоптоза, аутофагии и некроптоза в патогенезе ВМД

Гибель фоторецепторов является причиной потери зрения при различных заболеваниях сетчатки, в том числе при отслойке сетчатки и ВМД. Принято считать, что гибель клеток при развитии ВМД, особенно «сухой» формы заболевания, происходит через механизм апоптоза (Dunaief et al., 2002). Однако существует парадокс: ингибирование каспаз не обеспечивает достаточную защиту

фоторецепторов от гибели, что послужило основанием для формулировки гипотезы, согласно которой гибель фоторецепторов происходит и в соответствии с другими механизмами клеточной смерти. Действительно, анализ литературы показывает, что не только апоптотические, но и аутофагические, и некротические сигнальные каскады участвуют в клеточной гибели фоторецепторов. Известно также, что при ВМД происходят изменения в иммунной системе, приводящие к воспалению и опосредованной воспалением клеточной смерти. Тем не менее преобладающий тип клеточной гибели в разных фенотипах ВМД остается неизвестным.

Концепция, согласно которой апоптоз является основным механизмом гибели клеток при индуцированной или наследственной дегенерации сетчатки, была сформулирована в 2000-х годах (German et al., 2015; Halaby, 2012; Reme et al, 1998, 2000, 2003). Потеря зрительных клеток путем апоптоза как ключевая характеристика ВМД была описана Reme и соавт. (Reme et al, 1998, 2000, 2003), а Curcio и соавт. показали, что при ВМД происходит гибель в основном колбочек, а не палочек (Curcio et al., 1996, 2001). Авторы предположили, что дегенерация и потеря фоторецепторов по времени опережает дисфункции в комплексе РПЭ и мембраны Бруха (Curcio, 2001). Позже был описан апоптоз фоторецепторов, РПЭ и клеток внутреннего ядерного слоя в постмортальных образцах сетчатки пациентов с ВМД и высказано предположение, что в апоптоз вовлечена система FasL/Fas (Dunaief et al., 2002). Было выявлено присутствие TUNEL⁺ клеток в РПЭ и фоторецепторном слое по краям атрофических регионов, с появлением которых связана потеря зрения пациентами с географической атрофией (Dunaief et al., 2002). Maeda и коллеги показали, что в орнитин-индуцированной дегенерации апоптотическая потеря фоторецепторов непосредственно связана с гибелью клеток РПЭ. Эти результаты

свидетельствовали о важной роли клеток РПЭ в сохранении жизнеспособности фоторецепторов (Maeda et al., 1998).

Показано, что гибель палочек в сетчатке характеризуется фрагментацией хроматина, однако участие каспаз зависит от возраста и характера заболевания. Во время развития сетчатки активация каспаз происходит через митохондриальный путь, о чем свидетельствует высокая экспрессия проапоптотических генов семейства Bcl-2, таких как Bax, Bak, Bim и Puma, а также Araf-1 и каспазы-3 в сетчатке на ранних стадиях развития (German et al., 2015). С возрастом фоторецепторы становятся более устойчивыми к проапоптотическим стимулам и, скорее всего, погибают по каспаз-независимому пути (Doonan et al., 2012). По мнению ряда авторов, после завершения развития сетчатки классический каспаз-зависимый апоптотический механизм подавляется. Фоторецепторные клетки являются постмитотическими. Для их выживания необходим жесткий контроль апоптоза, так как быстрая активация каспаз и клеточная гибель будут иметь серьезные последствия для зрелой сетчатки. Возможно, что при дегенерации сетчатки в ответ на стресс происходит активация каспаз-независимого пути апоптоза через альтернативные протеазы – катепсины, гранзимы и кальпаины (Doonan et al., 2012). Вопрос о роли апоптоза, а также его механизме (каспаз-зависимом или каспаз-независимом пути) при ВМД остается спорным и активно исследуется (Wright et al., 2010).

Существенный вклад в понимание механизмов регуляции апоптоза при ВМД внесли исследования на животных с фотоиндуцированными повреждениями сетчатки (Wenzel et al., 2005). Доказана повышенная восприимчивость к световым повреждениям сетчатки животных – моделей наследственной дегенерации сетчатки

(LaVail et al., 1999). Чрезмерное световое воздействие вызывает апоптоз фоторецепторов, обеспечивая, таким образом, доступную модель для анализа механизмов этого процесса (Halaby, 2012). Закономерно, что процесс апоптоза фоторецепторных клеток зависит от интенсивности света и, возможно, от конкретных биологических моделей (Wenzel et al., 2005). Так, показано, что при легкой интенсивности воздействия наблюдается увеличение уровня мРНК нескольких каспаз (Organisciak et al., 2010). Уровень мРНК каспазы 3 был повышен в сетчатке крыс после 6-12 часового светового воздействия, но ферментативная активность каспазы 3 не изменялась (Tomita et al., 2005). Активность каспазы 3 не была увеличена при светоиндуцированной дегенерации сетчатки (Li et al., 2003), тогда как активность кальций-зависимых кальпаинов возрастала, способствуя блокировке кальциевых каналов и подавлению апоптоза фоторецепторов (Doonan et al., 2012). Увеличение активности каспазы 3, а также катепсина и лизоцима, участвующих в аутофагии, было обнаружено после умеренного светового повреждения (Lohr et al., 2006).

Постепенно сформировалась привлекательная гипотеза, согласно которой апоптоз является основным путем клеточной гибели при развитии ВМД, а ингибирование апоптоза может стать одним из перспективных терапевтических подходов к лечению заболевания. Однако попытки фармакологического ингибирования каспазного пути не предотвратили потерю клеток при отслоении сетчатки (Murakami et al., 2013). Более того, в масштабном исследовании дегенерации сетчатки на 10 биологических моделях, соответствующих всем основным группам наследственной слепоты человека (rd1, rd2, rd10, Cngb1 KO, Rho KO, S334ter, P23H, Cnga3 KO, cpfl1, Rpe65 KO), было установлено, что апоптоз

играет незначительную роль в гибели клеток при этих заболеваниях. При этом авторы продемонстрировали существенную роль в наследственной дегенерации сетчатки альтернативных механизмов клеточной гибели (Arango-Gonzalez et al., 2014).

В последнее время накапливаются данные о роли некроза в патологиях сетчатки (Hanus et al., 2013; Szaboa et al., 2014; Wang et al., 2014). Некоторые исследователи полагают, что основным путем гибели клеток в сетчатке после различных видов повреждения может быть некроптоз (Dvorianchikova et al., 2014; Gao et al., 2014; Hisatomi et al., 2001). Так, некроптоз становится причиной потери клеток и повреждения нейронов при экспериментальном отслоении сетчатки (Dong et al., 2011, 2012). Эту гипотезу поддерживает тот факт, что специфический ингибитор некроптоза - некростатин-1 - снижает нейрональную клеточную гибель после отслоения сетчатки (Dong et al., 2012). Также при ингибировании каспазного пути апоптоза RIP киназа способствует некротической гибели клеток, подавляя при этом апоптоз (Trichonas et al., 2010). Один из основных регуляторов некроптоза RIP3 принимает участие в ишемической реакции в ответ на стресс в сетчатке (Liang et al., 2014). На слепых рдебс рыбках данио-рерио (zebrafish) показано, что механизмом гибели колбочек является преимущественно некроптоз, тогда как палочки гибнут путем каспаз-зависимого апоптоза (Viringipurampeer et al., 2014).

В настоящее время в центре внимания исследователей механизмов гибели клеток в сетчатке оказался РПЭ, поскольку существует гипотеза, согласно которой его клетки способствуют развитию хронических воспалительных процессов (Ardeljan et al., 2013), которым отводится важная роль в патогенезе ВМД (Hanus et al., 2015). Клетки РПЭ являются постмитотическими и поэтому имеют

ограниченный апоптотический потенциал, а некроз, в отличие от апоптоза, может индуцировать воспалительный и иммунный ответ. Недавно на мышинной модели dsRNA-индуцированной дегенерации сетчатки было показано, что RIPK3-опосредованная секреция HMGB1 в стекловидное тело коррелирует с некрозом клеток РПЭ и продукцией TNF α и IL-6 (Murakami et al., 2014). Эти результаты показывают, что некроз клеток РПЭ в ответ на окислительный стресс оказывает отрицательное влияние при воспалении.

Установлено, что некроптоз – основной путь гибели клеток РПЭ (ARPE-19) в культуре в ответ на окислительный стресс (Hanus et al., 2013). В условиях острого окислительного стресса, вызванного введением иодата натрия (NaIO₃), обладающего селективной токсичностью для клеток РПЭ, клетки пигментного эпителия также подвергались некрозу, за которым следовали апоптоз фоторецепторов и истончение сетчатки (Wang et al., 2014). На другой модели окислительного повреждения сетчатки, линии мышей, дефицитных по генам фероксидаз церулоплазмينا (Cp) и гефестина (Heph), показано, что структурно-функциональные нарушения и некроз клеток РПЭ происходят у этих животных в возрасте 6-9 месяцев и предшествуют субретинальной инфильтрации макрофагов и гибели фоторецепторов, которые происходят в возрасте 12 месяцев (Hadziahmetovic et al., 2008; Hahn et al., 2004). Отек и вакуолизация клеток РПЭ, характерные для некроза и некроптоза, наблюдаются в нескольких мышинных моделях ВМД, в том числе у мышей Ccl2^{-/-}/Cx3cr1^{-/-} (Chu et al., 2013; Mattapallil et al., 2012) и у мышей-нокауты по apoE2 и apoE4 на диете с высоким содержанием жиров (Hanus et al., 2015). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что некроз может играть существенную роль в гибели клеток РПЭ при развитии нейродегенеративных процессов в сетчатке.

Единого мнения о механизме гибели клеток РПЭ при развитии ВМД у людей по-прежнему нет, дискуссия между сторонниками доминирующей роли апоптоза и некроза продолжается (Nanus et al., 2015). Возможно, это обусловлено тем, что значительная часть исследований проведена раньше, чем некроптоз был охарактеризован как регулируемый путь гибели клеток. Кроме того, из-за медленного прогрессирования ВМД (5-15 лет) трудно отслеживать события, происходящие в клетках РПЭ при развитии заболевания. К тому же работать приходится, как правило, с постмортальными образцами, что диктует необходимость трактовать результаты исследования сетчатки пациентов с ВМД с большой осторожностью. Тем не менее, основываясь на данных о характере гибели клеток РПЭ *in vitro*, на результатах исследований на мышинных моделях ВМД и гистологических препаратах сетчатки больных, Nanus с коллегами (Nanus et al., 2015) предложили гипотезу, согласно которой некроз является основным механизмом гибели клеток РПЭ при развитии ВМД. Авторы предполагают, что окислительный стресс и/или другие стрессоры индуцируют некроз и дисфункцию клеток РПЭ, что, в свою очередь, приводит к формированию друз, активации компонентов комплимента и иммунного ответа и, как следствие, гибели фоторецепторов (подробнее в обзоре (Nanus et al., 2015)).

Дисфункция аутофагии с возрастом в постмитотических клетках, в том числе клетках РПЭ, может привести к накоплению в них поврежденных белков и, как следствие, к деградации и гибели клеток (Klettner et al., 2013). Закономерно, что накопление белковых агрегатов в результате нарушения процессов аутофагии является общей чертой патогенеза ВМД и других ассоциированных со старением нейродегенеративных заболеваний (Kumar et al., 2014). При этом в качестве

индукторов аутофагии выступают гипоксия, окислительный стресс и воспаление (Blasiak et al., 2014). Протеолитическая активность компенсаторно повышается в клетках с возрастом в связи с увеличением количества поврежденных белков и органелл, которые должны быть удалены. Недавние исследования Rodríguez-Muela и соавт. продемонстрировали изменения протеолитического потенциала в сетчатке мышей C57BL6 с возрастом. По их данным, с возрастом заметно снижается активность макроаутофагии, что сопровождается соответствующим повышением активности шаперон-опосредованной аутофагии, в частности, повышением уровня белков Lamp2A и Hsc70 (Rodríguez-Muela et al., 2013). При этом нарушение механизма макроаутофагии происходит на стадии формирования аутофагосом, а не на стадии деградации компонентов.

Закономерно, что исследования роли аутофагии в патогенезе ВМД в основном сосредоточены на изучении этого процесса в клетках РПЭ, которые выполняют ряд важных для сетчатки функций, включая фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов. На протяжении всей жизни РПЭ подвергается высокому напряжению кислорода и яркому световому освещению, сохраняя при этом способность к фагоцитозу и удалению продуктов распада (Li, 2013). Процессы аутофагии усиливаются в клетках РПЭ при нормальном старении и в начале развития ВМД, компенсируя усиление окислительного стресса и увеличение количества повреждённых белков и органелл (Mitter et al., 2014). На двух мышинных моделях ВМД и на образцах сетчатки пациентов с ВМД выявлено повышение экспрессии маркеров аутофагии LC3, Atg7 и Atg9 в клетках РПЭ и нейрональных слоях сетчатки. Повышение уровня белков Atg12-Atg5 и LC3 в мембране Бруха и РПЭ зарегистрировано у старых мышей (Klettner et al., 2013). В настоящее время

существуют убедительные доказательства того, что нарушение аутофагии приводит к накоплению липофусцина и повреждению клеток РПЭ, характерным для ВМД (Klettner et al., 2013; Mitter et al., 2014). Предполагается, что характер изменений процесса аутофагии зависит от стадии заболевания. При прогрессии заболевания клетки РПЭ становятся «перегруженными» протеолитической активностью, что приводит к снижению уровня белков-маркеров аутофагии LC3, Atg7 и Atg9 (Mitter et al., 2014). Возможно также, что активность лизосомальных ферментов подавляется из-за чрезмерного накопления липофусцина в РПЭ с возрастом (Ferrington et al., 2016; Mitter et al., 2014). Очевидно, что как накопление липофусцина, так и повышение чувствительности к окислительному стрессу, нарушение митохондриальной и лизосомальной регуляции, характерные для ВМД, могут быть связаны с нарушениями процесса аутофагии. Тем не менее остается неясным, является ли дисбаланс аутофагии причиной или следствием заболевания, или эти изменения отражают дисбаланс в формировании и ликвидации аутофагосом (Ferrington et al., 2016).

Доказательство программируемого характера биохимических изменений, приводящих к некрозу, и результаты исследования молекулярного каскада аутофагии привели к пересмотру представлений о механизмах гибели клеток сетчатки при ВМД. Согласно современным представлениям она реализуется как путем апоптоза, так и некроза и аутофагии. Предполагается, что эти процессы протекают параллельно: дисрегуляция в одном пути вызывает нарушения в остальных. Все три формы гибели клеток имеют ряд общих механизмов регуляции, знания о взаимодействии которых при старении сетчатки и развитии ВМД крайне ограничены. Несмотря на интенсивные исследования патогенеза ВМД, информация

о молекулярно-генетических предпосылках событий, ведущих к гибели фоторецепторов, так же, как и о путях их гибели, крайне ограничена, что затрудняет поиск эффективных методов лечения ВМД, прежде всего – наиболее распространенной атрофической («сухой») формы заболевания.

1.4. Роль глиальных клеток в патогенезе ВМД

Нарушение гомеостаза в сетчатке является одной из основных причин многих заболеваний глаз, в том числе нейродегенеративных, ассоциированных со старением, таких как возрастная макулярная дегенерация. В сетчатке, как и в центральной нервной системе в целом, иммунный ответ и поддержание целостности и гомеостаза ткани осуществляется с участием глиальных клеток. Несмотря на то, что в сетчатке глиальные клетки составляют лишь небольшую часть от общего числа клеток, они оказывают существенное воздействие на нейроны, сосуды и другие типы клеток. Показано, что экспериментальная или патологическая глиальная дисфункция вызывает нарушение гомеостаза с последующей дисфункцией нейронов во многих моделях заболевания глаз (Coorey et al., 2012).

Клетки глиии в ЦНС обеспечивают ряд вспомогательных функций для нейронов, в том числе питание, поддержание и регуляцию гомеостаза (в основном астроциты), фагоцитоз и адаптивный иммунный ответ (микроглия), миелинизация аксонов (олигодендроциты) (Jessen, 2004). Сетчатка имеет некоторые отличительные особенности: в ней отсутствуют олигодендроциты поскольку аксоны нейронов достаточно короткие и не требуют дополнительной электрической изоляции, наблюдается небольшое число астроцитов и существует дополнительная группа глиальных клеток – клетки Мюллера (Karlstetter et al., 2015). Клетки Мюллера выполняют важные метаболические функции для нейронов сетчатки, часто с

участием межклеточных контактов или с помощью растворимых факторов (Reichenbach et al., 2013).

Все глиальные клетки сетчатки принято разделять на макроглию (клетки Мюллера и астроциты) и микроглию, которые имеют свои особые морфологические, физиологические и антигенные характеристики.

1.4.1. Астроциты

Астроглия в сетчатке выполняет нейротрофическую функцию, механическую поддержку поврежденных нейронов, регуляцию микроокружения, обеспечивая оптимальную производительность нейронов и вазомодуляцию, участвует в создании и поддержании внутреннего гематоретинального барьера (Coorey et al., 2012). Экспрессируя большое количество калиевых каналов на плазматической мембране, астроциты могут внести свой вклад в снижение концентрации внеклеточного K^+ во время интенсивной синаптической передачи, препятствуя тем самым чрезмерной деполяризации и возбудимости нейронов. Кроме этого, астроциты модулируют синаптическую пластичность нейронов, регулируя внеклеточную концентрацию нейротрансмиттеров (Rossi, 2015).

Тела астроцитов локализуются в слое нервных волокон и выполняют вспомогательные функции, необходимые для правильного развития сосудистой сети сетчатки (Kur et al., 2012). При эмбриональном развитии сетчатки астроциты мигрируют от зрительного нерва во время прорастания кровеносных сосудов, а в последующем постнатальном развитии отмечена корреляция между васкуляризацией и пространственным распределением астроцитов (Vecino et al, 2016).

Активация астроцитов и реактивный глиоз сопровождают большинство нейродегенеративных заболеваний мозга и сетчатки. При травме и заболеваниях астроциты секретируют ряд белков, способных нарушить целостность гематоретинального барьера, усиливают экспрессию различных генов, кодирующих цитокины, хемокины, элементы каскада комплимента, тем самым способствуя дегенерации сетчатки (Kim et al., 2006; Vecino et al., 2016). Реактивные астроциты в сетчатке экспрессируют повышенные уровни MMP-9 и uPA, негативно влияя на внеклеточный матрикс, ассоциированный с внутренней пограничной мембраной, и тем самым способствуют гибели ретинальных ганглионарных клеток через индукцию апоптоза (Zhang et al., 2004). В зрелой сетчатке астроциты и клетки Мюллера участвуют в неоваскуляризации, связанной с патологическими процессами при ВМД, диабетической ретинопатии и ретинопатии недоношенных, экспрессируя проангиогенные факторы в ответ на патогенные стимулы (Coorey et al., 2012).

1.4.2. Клетки Мюллера

Клетки Мюллера являются радиальными глиальными клетками сетчатки и соответственно имеют стандартную биполярную морфологию радиальной глии. К этому типу относится 90% всех глиальных клеток в сетчатке. Клетки Мюллера возникают из плюрипотентных предшественников (Goldman, 2014), и, хотя этот процесс плохо изучен, ясно, что он включает в себя активацию Notch, Rax и Janus-activated kinase (Jak) сигнальных путей (Jadhav et al., 2006, 2009; Furukawa et al., 2000; Xian et al., 2004; Bhattacharya et al., 2008). Клетки Мюллера являются единственным типом клеток глии, тела которых находятся во внутреннем ядерном слое, а отростки охватывают все слои сетчатки, способствуют контакту между соседними нейронами

и участвуют в формировании внешней и внутренней пограничных мембран (Goldman, 2014). Показано, что апоптоз нейронов и дегенерация сетчатки в раннем постнатальном развитии у мышей происходит исключительно в тех местах, где экспериментально индуцирована гибель клеток Мюллера (Dubois-Dauphin et al., 1999).

Клетки Мюллера обеспечивают трофическую функцию, доставляя питательные вещества (глюкозу, пируват, лактат и аминокислоты) к фоторецепторам (Coorey et al., 2012). Прямо или косвенно они поддерживают гомеостаз нейронов, усиливая экспрессию трофических факторов и антиоксидантов, включая такие цитокины и факторы роста, как нейротрофический фактор мозга (BDNF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), нейротрофин-3 (NT-3) и фактор пигментного эпителия (PEDF) (Gallina et al., 2014; Kolomeyer et al., 2014). Клетки Мюллера также экспрессируют транспортеры и ферменты, которые поглощают и утилизируют нейротрансмиттеры (Hurley et al., 2014). Клетки Мюллера способны защищать нейроны от окислительного стресса, усиливая секрецию антиоксидантов – глутатиона, ферроксидазы и гемоксигеназы (Reichenbach et al., 2013). Поддержание гомеостаза микросреды сетчатки клетками Мюллера происходит через регуляцию ионного состава межклеточной среды. При высокой активности нейроны сетчатки секретируют в межклеточное пространство ионы K^+ и воду, усиливая тем самым входящий ток ионов Na^+ и Ca^{2+} в клетки. Клетки Мюллера восстанавливают физиологические концентрации ионов и pH, экспрессируя на плазматической мембране ионные K^+ каналы, в частности Kir4.1.

Последний депортирует ионы K^+ из областей с высокой концентрацией в области с низкой или постоянной концентрацией: субретинальное пространство, стекловидное тело и кровеносные сосуды (Bringmann et al., 2012). Аналогичным образом работают аквапорины (в частности аквапорин-4), регулирующие концентрацию воды в сетчатке (Schey et al., 2014).

Все эти факторы прямо или косвенно влияют на активность нейронов. Клетки Мюллера поддерживают жизнеспособность фоторецепторов и нейронов, направляют свет на фоторецепторы, несут ответственность за структурную стабилизацию сетчатки, способны модулировать иммунные и воспалительные реакции (Bringmann et al., 2012). Практически все патогенные раздражители способны активировать клетки Мюллера, вызывая реактивный глиоз этих клеток (Bringmann et al., 2006). Реактивные клетки Мюллера могут как оказывать нейропротекторное действие, так и способствовать дегенерации нейронов (Bringmann et al., 2009). В настоящее время, роль клеток Мюллера при различных патологиях сетчатки полностью не ясна и остается предметом активных научных исследований.

1.4.3. Глиоз

Ретинальные макроглиальные клетки, астроциты и клетки Мюллера, поддерживают гомеостаз внеклеточной среды, обеспечивая таким образом функционирование здоровой сетчатки. На ранних стадиях дегенерации глиальные клетки активируются и вовлекаются в процесс, называемый глиозом. Реактивный глиоз имеет прямое нейропротекторное действие на сетчатку, способствует сохранению гомеостаза и защищает ткань от дальнейшего повреждения, увеличивая экспрессию цитопротекторных факторов, восстанавливая равновесие

нейромедиаторов, концентрации ионов и воды, и ограничивает ремоделирование сетчатки (Bringmann et al., 2012). В отличие от реактивного, пролиферативный глиоз может ускорить нейродегенерацию во время хронических заболеваний, нанося прямой и косвенный ущерб нейронам и сосудам. Хронический глиоз усугубляет прогрессирование заболевания, усиливая проницаемость сосудов, инфильтрацию токсичных соединений и даже неоваскуляризацию (Cuenca et al., 2014).

Глиоз характеризуется физиологическими, биохимическими и морфологическими изменениями, степень которых варьируется в зависимости от тяжести повреждения. Глиоз в сетчатке может быть индуцирован ретинальной дегенерацией, механическим повреждением, воспалением и/или старением (Hirret et al., 2015). Отличительной чертой реактивного глиоза является усиление экспрессии промежуточных филаментов, таких, как виментин, нестин и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) (Coorey et al., 2012). Регуляция экспрессии GFAP настолько чувствительна, что может быть использована в качестве индикатора стресса и повреждения сетчатки, а также активации клеток Мюллера (Luna et al., 2010). В сетчатке глиозу подвержены главным образом клетки Мюллера, которые проходят при его развитии следующие стадии: гипертрофия клеток, потеря функциональности, нейропротекция, воспаление, пролиферация и участие в ремоделировании (Belecky-Adams et al., 2013).

Почти все заболевания сетчатки связаны с глиозом клеток Мюллера и астроцитов (Ardeljan et al., 2013). Изменение экспрессии промежуточных филаментов (виментина, GFAP и нестина) в клетках макроглии наблюдается при ВМД, в частности, образование друз ассоциировано с повышением экспрессии белка GFAP в отдельных районах сетчатки (Wu et al., 2003).

Реактивные изменения клеток Мюллера в ответ на повреждение могут иметь как цитопротекторные, так и цитотоксические эффекты на нейроны сетчатки. Нейропротекция наблюдается на ранних стадиях после повреждения сетчатки, функциональные и биохимические изменения в клетках Мюллера описываются как "консервативные" или непролиферативные. При повреждении гематоретинального барьера глиоз клеток Мюллера приобретает характер "массового" или пролиферативного (Reichenbach et al., 2013). При пролиферативном глиозе клетки Мюллера имеют непосредственный нейротоксический эффект и могут способствовать гибели нейронов путем синтеза и секреции TNF- α , моноцитарного хемотаксического белка 1-го типа (MCP-1 или Ccl-2) и оксида азота (NO). Избыточное количество NO приводит к формированию свободных радикалов и нитрозилированию белков, что оказывает токсическое действие на нейроны (Bringmann et al., 2009). При глиозе клетки Мюллера могут экспрессировать ряд воспалительных молекул, таких как TNF- α , IL, интерферон и молекула межклеточной адгезии 1 (CD54), а также, при патологических состояниях, выступать в качестве антиген-представляющих клеток (Bringmann et al., 2009; Wang et al., 2011).

Прролиферативный глиоз клеток Мюллера может препятствовать восстановлению и регенерации сетчатки. Клетки Мюллера принимают участие в образовании глиальных шрамов, которые заполняют разрывы сетчатки, заменяя деградировавшие нейроны и фоторецепторы. Глиальные шрамы участвуют в формировании эпиретинальных мембран (Bringmann et al., 2009), которые часто формируются при отслоении сетчатки, диабетической ретинопатии, ВМД и пролиферативной ретинопатии (Cuenca et al., 2014).

Изменение морфологии астроцитов при реактивном глиозе в сетчатке аналогично изменениям, происходящим в клетках Мюллера: усиливается экспрессия промежуточных филаментов GFAP и виментина (Luna et al., 2010; Hol et al., 2015). Как и в случае с глиозом клеток Мюллера, реактивная астроглия экспрессирует либо нейротрофические факторы для сохранения клеток, либо молекулы, которые ингибируют регенерацию и восстановление аксонов, усиливая нейротоксичность или вторичное повреждение соседних нейронов и глиальных клеток (Nakazawa et al., 2007). При ВМД обнаруживается большое количество гипертрофированных реактивных астроцитов, которые фагоцитируют остатки ганглиозных клеток, погибших путем некроза или апоптоза (Edwards et al., 2015). С другой стороны, реактивный глиоз связан с регуляцией ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты, которая может повысить способность астроцитов защищать нейроны от свободных радикалов (Barreto et al., 2011; Verkhatsky et al., 2014).

Для GFAP- и виментин-дефицитных мышей характерны снижение глиоза и миграция моноцитов при отслоении сетчатки, что ведет к пониженной клеточной гибели и защищает от дегенерации фоторецепторные клетки (Nakazawa et al., 2007). Кроме того, химическое ингибирование глиоза может защитить ганглионарные клетки от эксайтотоксичности (Ganesh et al., 2011). У линии мышей *rds*, характеризующейся медленной дегенерацией сетчатки, усиление экспрессии GFAP предшествует нейрональному апоптозу, тогда как у линии мышей с ретиальной дегенерацией (*rd*) сначала наблюдается нейрональный апоптоз, а уже затем усиление экспрессии промежуточных филаментов (Sarthy et al., 1989).

1.4.4. Микроглия

Клетки микроглии, третий тип глиальных клеток сетчатки, являются резидентными макрофагами центральной нервной системы и экспрессируют многие характерные для макрофагов маркеры, такие, как CD11b, CD14, CD68 и EMR (Kettenmann et al., 2011), а также кальций-связывающий белок Iba1, являющийся специфичным маркером микроглии (Ohsawa et al., 2004). Основной функцией клеток микроглии в сетчатке является участие в иммуно-опосредованных защитных механизмах. Клетки микроглии выступают в качестве фагоцитов и формируют совместно с периваскулярными клетками сеть потенциальных иммунных эффекторных клеток ЦНС (Cuena et al., 2014). Активация микроглии является общим патофизиологическим механизмом при различных ретинальных дегенеративных заболеваниях и часто происходит одновременно или до явно выраженной клеточной гибели (Langmann, 2007). Как и все макрофаги, клетки микроглии мозга и сетчатки имеют различные фенотипы. В физиологических условиях клетки микроглии не активны и имеют небольшое тело с разветвленными отростками. В ответ на повреждение клетки микроглии приобретают амeboидную морфологию, мигрируют и накапливаются в местах повреждения. Активированные клетки микроглии обладают высокой способностью к фагоцитозу и экспрессируют ряд про- и противовоспалительных молекул (Fu et al., 2014). Однако исследования показывают, что реактивная микроглия может обладать нейротоксичностью и приводить к дегенерации фоторецепторов. Микроглия совместно с хориоидальными макрофагами способствует хроническому паравоспалению, которое присутствует при некоторых возрастных патологиях сетчатки (Xu et al., 2009).

В сетчатке клетки микроглии обнаруживаются в сетчатых слоях и имеют разветвленное строение, характеризующиеся небольшим телом клетки и длинными отростками, способными проникать в ядерные слои. Обладая динамической подвижностью, клетки микроглии активно участвуют в межклеточных взаимодействиях с другими нейронами и макроглией, фагоцитозе и поддержании гомеостазы сетчатки (Nimmerjahn et al, 2005). Клетки микроглии воспринимают окружающую среду через поверхностные рецепторы, включающие рецепторы цитокинов, хемокинов, компонентов комплимента, антител и пр. (подробнее в обзоре Karlstetter et al., 2015). В норме активация клеток микроглии регулируется также и рядом ингибирующих механизмов: молекулы хемокина CX3CL1, лектина CD22 и других мембранных белков, в том числе CD200, CD47 и молекулы клеточной адгезии нейронов сдерживают активацию микроглии (Perry et al., 2013). Немаловажную роль здесь играют клетки РПЭ, так как секретируемый ими TGF β индуцирует выход IL-10 из микроглии, который затем снижает экспрессию антигенпредставляющих белков МНС-II, CD80, и CD86 (Karlstetter et al., 2015). Анализ глобального профиля экспрессии генов показал, что TGF β также способен напрямую способствовать переходу клеток микроглии к противовоспалительному фенотипу (Paglinawan et al., 2003).

Регулирование гомеостаза в здоровой сетчатке невозможно без поддержания постоянного уровня нейротрофических факторов, которые обеспечивают взаимодействие между макроглией и клетками Мюллера. Клетки микроглии способны непосредственно активировать секрецию некоторых нейротрофических факторов из клеток Мюллера, таких как глиальный нейротрофический фактор (GDNF), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), цилиарный нейротрофический

фактор (CNTF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3 (NT-3) и основной фактор роста фибробластов (bFGF), которые способствуют сохранению фоторецепторов при стрессе и содействуют их восстановлению при повреждении (Karlstetter et al., 2015). Активированные клетки Мюллера также секретируют диазепам-связывающий ингибитор (DBI), лиганд для 18 кДа транслокаторного белка (TSPO), который экспрессируется в активированной микроглии и модулирует микроглиальное воспаление и фагоцитоз, подавляя чрезмерную активацию микроглии (Karlstetter et al., 2014; Wang et al., 2014).

Еще одним важным механизмом контроля активации микроглии является прямое физическое взаимодействие микроглии с другими ретинальными клетками (Langmann, 2007). Белок CX3CL1 (фракталкин) конститутивно секретируется здоровыми нейронами сетчатки и эндотелиальными клетками и связывается с рецептором CX3CR1 клеток микроглии, препятствуя нейротоксичности (Cardona et al., 2006). Сигнальный путь CX3CR1 играет важную роль в микроглиальных процессах и клеточной миграции и таким образом определяет уровень наблюдаемой микроглии в здоровой сетчатке (Liang et al., 2009). В физиологических условиях фракталкин ингибирует чрезмерную активацию микроглии, но при воспалении способствует активации как микроглии, так и астроцитов, что обеспечивает одновременно и нейропротекторные, и нейротоксические эффекты микроглии (Sheridan et al., 2013) Дефицит CX3CR1 ингибирует ответ микроглии, что приводит к нейротоксичности и дегенерации (Cuenca et al., 2014).

Последние данные показывают, что с возрастом в сетчатке изменяются количество и локализация клеток микроглии, меняется морфология отдельных клеток, их динамическое поведение (снижается скорость миграции) и уровень

экспрессии некоторых генов. При старении плотность клеток микроглии во внутреннем и наружном сетчатых слоях несколько возрастает (примерно на 19-21%). При этом микроглия способна мигрировать из внутренних слоев сетчатки во внешние и накапливаться в субретинальном пространстве (Damani et al., 2011). Это перераспределение приводит к контакту микроглии с фоторецепторами и клетками ретинального пигментного эпителия, инициируя в этих клетках секрецию иммунных факторов, характерных для патологических фенотипов ВМД (Ma et al., 2012; 2016).

В дополнение к изменениям в анатомии микроглия демонстрирует изменения с возрастом в иммунной физиологии. Многими исследователями показано, что при здоровом старении клетки микроглии находятся в базальном состоянии активации, имеют повышенные уровни экспрессии компонента главного комплекса гистосовместимости II (МНСII), CD11b, и воспалительных цитокинов (таких, как IL1 β , TNF- α , IL6). В целом активированное базальное состояние микроглии при здоровом старении указывает на то, что с возрастом микроглия может способствовать паравоспалению (Medzhitov, 2008), которое ассоциировано с повышенной восприимчивостью ЦНС к нейродегенеративным заболеваниям, характеризующимся хроническим нейровоспалением.

1.4.5. Роль микроглии при дегенерации сетчатки

Активация клеток микроглии является общей чертой многих заболеваний сетчатки, так как клетки микроглии очень быстро реагируют на различные триггеры, связанные с апоптозом и дегенерацией нейронов. Хотя точный стимул, активирующий клетки микроглии при дегенеративных заболеваниях остается неизвестным, показано, что активации микроглии, секреции хемокинов и α TNF, предшествуют астроглиоз, изменения в физиологии нейронов, апоптоз

фоторецепторов и дегенерация сетчатки (Karlstetter et al., 2010). На первых этапах нейродегенерации микроглия запускает механизмы репарации, например образование глиальных рубцов (Ardeljan et al., 2013). Но чрезмерная или длительная активация микроглии может способствовать хроническому воспалению с тяжелыми патологическими побочными эффектами, которые могут привести к необратимой гибели нейронов (Langmann, 2007). Активированные клетки микроглии способны экспрессировать целый комплекс нейротоксических и нейротрофических посредников, в том числе оксид азота (NO) - одну из ключевых сигнальных молекул, регулирующих функции сердечнососудистой, нервной и иммунных систем организма (Saijo et al., 2011). NO – ключевой вазодилататор, эффективный модулятор синаптической пластичности, вовлечен в процессы памяти, обучения, иммунный ответ и др., обладает свойствами цитопротектора, и его недостаточный синтез приводит к повреждению мембран клеток активными формами кислорода (АФК), развитию дисфункции эндотелия, атеросклероза. В то же время избыточный синтез NO может инициировать апоптотическую гибель клеток (Pacher et al., 2007). NO образуется с помощью синтаз оксида азота (NOS). Эндотелиальная (eNOS) и нейронная (nNOS) синтазы конститутивно генерируют небольшое количество NO, выполняющего роль сигнальной молекулы; для их активации необходимы кальций и кальмодулин. Индуцибельная iNOS не зависит от кальция и кальмодулина, её экспрессия многократно усиливается в патологических условиях. При этом NO, реагируя с супероксидом кислорода, образует мощный окислитель пероксинитрит, который, обеспечивая микробицидный потенциал клеток иммунной системы, способен также вызывать необратимые повреждения ДНК, приводить к гибели клеток.

Вероятно, что изменения в нейронах и/или, глиальных клетках могут усиливать ответ микроглии, что, в конечном счете, влияет на выживаемость нейронов. С другой стороны, дисфункция и потеря защитных функций микроглией (секреции трофических факторов, антиоксидантов и цитокинов, а также фагоцитоза), также может приводить к гибели нейронов (Polazzi et al., 2010).

Активация микроглии способствует дегенерации ткани при ВМД: иммунологические реакции микроглии связаны с изменениями в клетках РПЭ, формированием друз и амилоидных бляшек. Вероятно, что на ранних стадиях заболевания активация микроглии направлена на удаление амилоидных бляшек, а на более поздних этапах индуцированные микроглией провоспалительные цитокины могут способствовать нейродегенерации (Ardeljan et al., 2013). У пациентов с географической атрофией выявляются амёбовидные клетки микроглии во внутреннем и внешнем ядерных слоях, которые активно фагоцитируют остатки погибших фоторецепторов (Gupta et al., 2003).

На многих мышинных моделях показано, что с усилением накопления микроглии в субретинальном пространстве нарастают повреждение и дегенерация сетчатки (Combadiere et al., 2007; Luhmann et al., 2012). Например, в модели географической атрофии, индуцированной иммунизацией мышей карбокси-этил пиррол-конъюгированным альбумином (СЕР-мыши) (Hollyfield et al., 2008) наблюдается образование друзоподобных отложений в РПЭ (Hollyfield et al., 2010). У этих животных провоспалительные макрофаги и микроглия находятся между РПЭ и наружными сегментами фоторецепторов. При этом показано, что *CCR2* необходим для миграции иммунных клеток, связан с повреждением сетчатки, так как у СЕР - иммунизированных *CCR2*^{-/-} мышей не развивается повреждение сетчатки и

полностью отсутствуют реактивные фагоциты (Cruz-Guilloty et al., 2013). Количество макрофагов и микроглии увеличено в субретинальном пространстве у трансгенных мышей, экспрессирующих фактор комплимента Н (CFH) – регулятор альтернативного пути активации системы комплимента – с одиночным полиморфизмом Y402H. Эта линия мышей демонстрирует аномалии, схожие с ВМД у людей (Ufret-Vincenty et al., 2010). Накопление микроглии в субретинальном пространстве наблюдается также у $Cx3cr1^{-/-}$ линии мышей уже в возрасте 12 месяцев (Combadiere et al., 2007). У $Ccl2$ -дефицитных мышей наблюдается накопление активированных макрофагов в субретинальном пространстве (Luhmann et al., 2009). Двойные нокауты $Ccl2^{-/-}Cx3cr1^{-/-}$ демонстрируют утолщение мембраны Бруха, повышение уровня А2Е, инфильтрацию микроглии и атрофию фоторецепторов (Chan et al., 2008). Эти данные, демонстрирующие, что дефицит хемокинов приводит к развитию ВМД-подобных признаков, привели к формулировке гипотезы, согласно которой фагоцитарная дисфункция может играть ключевую роль в патогенезе ВМД (Pennesi et al., 2012).

Световое повреждение сетчатки имитирует фотоокислительные повреждения при ВМД. Свет является фактором, способствующим развитию многих заболеваний сетчатки. В этом убеждают исследования на моделях животных, у которых дегенерация сетчатки ускорялась с усилением уровня освещенности, поскольку световое повреждение вызывает апоптоз быстрее, чем это происходит при наследственной дегенерации (Karlstetter et al., 2010). Несмотря на различия в интенсивности и продолжительности воздействия света, повреждение сетчатки сопровождается потерей фоторецепторов и усилением реактивности и миграции клеток микроглии. Так, показано, что сразу после экспозиции светом клетки

амебоидной микроглии быстро вторгались в наружный ядерный слой и субретинальное пространство. Плотность фагоцитирующей микроглии увеличивалась до 2 дня после воздействия, а затем уменьшалась до исходного уровня (Santos et al., 2010). Интересно, что амебоидные клетки микроглии, вернувшись к разветвленной структуре через 10 дней, демонстрировали скрытый иммунофенотипический профиль активации (Santos et al., 2010).

Таким образом, клетки микроглии быстро реагируют на различные повреждения и дегенерацию нейронов сетчатки, мигрируя в ядерные слои и субретинальное пространство, которое разделяет фоторецепторы и РПЭ и в физиологических условиях лишено врожденных и адаптивных иммунных клеток (Xu et al., 2009). Это изменение в распределении иммунных клеток в наружной сетчатке может привести к патологическим изменениям иммунной среды вокруг фоторецепторов и клеток РПЭ. Активированная микроглия способна индуцировать изменения в морфологии клеток РПЭ и усилить экспрессию в них провоспалительных, хемотоксических и проангиогенных молекул, способствуя неоваскуляризации (Ma et al., 2009; 2012). Учитывая, что накопление микроглии и макрофагов в субретинальном пространстве обнаружено в гистопатологических образцах сетчатки как у старых людей, так и у пациентов с ВМД, изменения с возрастом распределения микроглии может вносить вклад в характерные для ВМД изменения среды (Ma et al., 2013).

В настоящее время накоплено достаточно данных, свидетельствующих о том, что патогенез ВМД связан с нарушением регуляции иммунной системы, главным образом - компонентов комплимента и реактивных макрофагов, а также глиальных

клеток сетчатки (Fritsche et al., 2014), однако механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологическое русло остаются неясными.

1.5. Крысы OXYS как модель ВМД

Линия крыс OXYS создана в 70-е годы в Институте цитологии и генетики СО АН СССР под руководством академика Р.И. Салганика. Отбор происходил путем инбридинга и селекции из крыс линии Вистар по признаку ранней спонтанной катаракты. В пяти первых поколениях её развитие провоцировали диетой, обогащенной галактозой (Соловьева и др., 1975, Obukhova et al., 2009). Накопление галактозы в тканях токсично. Первоначально у крыс, чувствительных к галактозе, наблюдалось существенное снижение продолжительности жизни (до 14 месяцев), низкая фертильность, высокий процент развития «болезней пожилого возраста» - катаракты, кардиомиопатии, сколиоза, эмфиземы, повышенная частота возникновения опухолей, нарушения памяти (Salganik et al., 1994). Далее отбор проводили по признаку ранней спонтанной катаракты. В 1996 году линия OXYS была зарегистрирована в международной базе данных с ключевой характеристикой «врожденная гиперпродукция кислородных радикалов». Позднее было обнаружено, что сцеплено с катарактой крысы OXYS наследуют ретинопатию, аналогичную по клиническим признакам ВМД человека.

На данный момент линия крыс OXYS - признанная модель ВМД (Pennesi et al., 2012, Kolosova et al., 2014). Ретинопатия, аналогичная по клиническим и морфологическим проявлениям ВМД, развивается у крыс OXYS к возрасту 3 месяцев и затем прогрессирует, достигая выраженных стадий к возрасту 12-14 месяцев. Для первого периода характерно наличие ишемических очагов, единичных кровоизлияний, атрофия хориокапиллярного слоя и пигментного эпителия, что

соответствует 1-й стадии развития ВМД. Второй период соответствует 2 и 3 стадии с выраженными экссудативными изменениями, большими мягкими и твердыми друзами с тенденцией к сливанию, отёком центральной зоны, достигающей 2-3 диаметров диска зрительного нерва, с экссудативной отслойкой РПЭ и/или нейроэпителлия. В 10% случаев регистрируются признаки неоваскуляризации с экссудативно-геморрагической отслойкой РПЭ и/или нейроэпителлия сетчатки и рубцеванием (Фурсова, 2009).

По данным гистологических исследований у крыс OXYS патологическим изменениям подвержены все структурные компоненты сетчатки: хориоидальные и интратретинальные сосуды, мембрана Бруха, РПЭ, фоторецепторы, ассоциативные и ганглионарные нейроны. Установлено, что структурно-функциональные нарушения клеток РПЭ у крыс OXYS – изменение размеров, продукция ими ключевых регуляторов ангиогенеза фактора роста эндотелия сосудов VEGF и его антагониста нейротрофного фактора пигментного эпителия PEDF (Markovets et al., 2011a), - первичны. Именно они в конечном итоге приводят к атрофии хориокапилляров, клеток фоторецепторов и, как результат, развитию гипоксии во внешней сетчатке (Zhdankina et al., 2008). Одна из функций ретинального пигментного эпителия – фагоцитоз и переработка внешних сегментов фоторецепторов, связанных с ферментативной генерацией АФК. Развитие ретинопатии у крыс OXYS связано с нарушением этой функции, перераспределением и избыточным накоплением липофусциновых гранул в участках пигментного эпителия, прилегающих к клеткам палочек (Saprunova et al., 2010). С возрастом патологические изменения нарастают и сопровождаются гибелью фоторецепторов (Zhdankina et al., 2008, Saprunova et al., 2010). К возрасту 24 месяцев она становится практически тотальной, что

подтверждают результаты электроретинографии, которые выявили у крыс OXYS снижение амплитуды b-волны – показателя функционального состояния нейросенсорных клеток, значения которой к возрасту 24 месяцев драматически снижается на фоне практически полного исчезновения фоторецепторов (Neroev et al., 2008).

С дисфункцией РПЭ связывают существенное снижение ключевых регуляторов ангиогенеза в сетчатке - генов эндотелиального фактора роста VEGF и его антагониста фактора пигментного эпителия PEDF в критический период манифестации ранних стадий ретинопатии практически у 100% крыс OXYS в возрасте 3 мес. С возрастом и по мере прогрессии ретинопатии экспрессия генов VEGF и PEDF в сетчатке у OXYS увеличивается, как и у крыс Вистар (Markovets et al., 2011b), но её повышенный уровень регистрируется. Увеличение экспрессии VEGF является одной из причин хориоидальной неоваскуляризации (Grisanti et al., 2008), что согласуется с данными по крысам OXYS.

Ассоциативные и ганглионарные нейроны сетчатки крыс OXYS характеризуются отеком перикарионов и дегенеративными нарушениями, характерными для кариопикноза и хроматолиза. Процент гиперхромных и пикнотических ассоциативных и ганглионарных нейронов в 3-4 раза превышает аналогичные показатели крыс Вистар. Также достоверно увеличен процент пикноморфных радиальных глиоцитов (Zhdankina et al., 2008). Об обширной дегенерации нейроретины свидетельствует уменьшение толщины наружного и внутреннего сетчатого слоев сетчатки, которые состоят из отростков нейронов и синаптических контактов между ними. На полутонких срезах были выявлены

изменения синаптических контактов по светлomu типу с набуханием отростков, дезагрегацией синаптических везикул и отеком митохондрий (Жданкина и др. 2013).

Ранее двумя независимыми способами было установлено, что в организме крыс OXYS в период развития признаков преждевременного старения продукция NO снижена. Основанием послужило непосредственное измерение его уровня в крови методом ЭПР-спектроскопии спиновых ловушек и содержания в ней стабильных метаболитов NO – нитратов и нитритов (Bobko et al., 2005).

Выясняя механизмы развития у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации у людей, О. С. Кожевникова и соавт. исследовали транскриптом сетчатки крыс Вистар и крыс OXYS на разных стадиях заболевания (в возрасте 3 и 18 месяцев) методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq на платформе Illumina). Анализ результатов показал (Kozhevnikova et al., 2013), что развитие ретинопатии у крыс OXYS ассоциировано с изменением уровней мРНК более 600 генов. Подавляющее большинство этих генов имели у крыс OXYS сниженный уровень мРНК. Их основная часть связана с иммунным ответом, воспалением, ответом на окислительный стресс, Ca^{2+} гомеостазом, апоптозом, клеточной адгезией и метаболизмом ретиноевой кислоты. С возрастом у крыс обеих линий изменяется экспрессия более 100 генов. Большинство из них связано с организацией внеклеточного матрикса, клеточной адгезией и иммунной системой. Несмотря на то, что эти гены принадлежат к одним и тем же категориям генных онтологий и представляют общие метаболические пути, только 24 из них оказались общими для крыс Вистар и OXYS. Важно, что у крыс Вистар в 18 месяцев уровень мРНК многих генов становился таким, как у крыс OXYS в 3 месяца, что указывает на ускоренное старение последних.

Таким образом, уникальность созданной модели определяет комплексность проявлений признаков уже в молодом возрасте. Это позволяет использовать крыс OXYS как для исследования молекулярно-генетических механизмов старения и развития, связанных с ним заболеваний, так и для объективной оценки новых способов их лечения и профилактики.

ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Работа выполнена на 118 крысах-самцах линий OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3, 7 и 18 мес. на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. С возраста 4 недель животных содержали группами по 5 особей в клетках размером 57×36×20 см при температуре 22±2°C в условиях фиксированного режима освещения (12 ч свет /12 ч темнота) при свободном доступе к воде и пище - стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (Чара, ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия).

Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-seq)

RNA-seq проводили на крысах OXYS и Вистар в возрасте 20 дней (по 3 животных для каждой линии). Выделенные от каждого животного сетчатки помещались в 1 мл RNeasy (Qiagen) и замораживались при -20°C. Образцы были переданы в ОАО «Геноаналитика» для выделения тотальной РНК и выполнения секвенирования на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в соответствии с протоколами секвенирования Illumina (mRNA-Seq Sample Prep Kit, Cat. 1004816). Поли-А фракция РНК (мРНК) была очищена от остальной РНК при помощи магнитных шариков (Sera-Mag Magnetic Oligo (dT) beads) и фрагментирована. В реакции обратной транскрипции с использованием Random праймеров была синтезирована кДНК. Смесь кДНК затем была обработана T4 ДНК полимеразой и ДНК полимеразой Кленова для получения тупых концов. Основание аденина было добавлено к 3' тупому концу фосфорилированного ДНК фрагмента, после чего к нему лигировали адаптор Illumina с довеском одиночного тимина на 3' конце. После

реакции лигирования адаптеров полученные библиотеки кДНК были амплифицированы и секвенированы на приборе Genome Analyzer IIx с использованием реактивов Single-Read Cluster Generation Kit v2 Sequencing by synthesis (SBS) (Illumina, Cat. FC-940-4001). Каждый образец был просеквенирован на отдельной дорожке ячейки. Для каждого образца было получено около 40 млн. прочтений (ридов) длиной 50 нуклеотидов.

Картирование и анализ дифференциальной экспрессии

Оценка качества прочтений проводилась после удаления последовательностей баркодов с использованием программы FastQC. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* (Rnor, v5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10). Картированные последовательности были использованы для сборки транскриптома по референсному геному с помощью Cufflinks (v2.2.1). Полученная аннотация транскриптов была объединена с известными аннотациями ENSEMBL (Rnor, v5.0.76) и RefSeq (Rnor, v5.0) и использована совместно с данными картирования для составления таблиц числа ридов на ген (HTSeq2, с параметром MAQ>10). Оценку качества секвенирования мы проводили с использованием программы Trimmomatic для удаления адаптерных последовательностей и нуклеотидов низкого качества. Различия в экспрессии оценивали с помощью программных пакетов DESeq и DESeq2, использующих статистическую модель отрицательного биномиального распределения (Anders et al., 2010). В DESeq значимость дифференциальной экспрессии тестировали методом GLM (Generalized Linear Model) при сравнении эффектов действия двух факторов (возраст и генотип). Уровень значимости изменения экспрессии рассчитывали с учетом поправки для множественных сравнений Бенжамини-Хохберга (BX $p\text{-value}<0,05$, DESeq). 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 клеточной гибели, экспрессия изменяется с возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар

Данные по уровню экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS и Вистар были получены методом секвенирования транскриптома RNA-seq на платформе Illumina: для возраста 3 и 18 месяцев – в ранее проведенных исследованиях (Kozhevnikova et al., 2013), а для 20-дневных животных - в настоящей работе. Различия в экспрессии с возрастом оценивались с помощью программного пакета DESeq2. 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://www.webgestalt.org/>) для отбора ДЭ генов, включенных в регуляцию апоптоза и аутофагии, и Rat genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>), для выявления генов-регуляторов программируемого некроза.

Реконструкция и анализ ассоциативных генных сетей генов-регуляторов апоптоза, экспрессия которых в сетчатке крыс OXYS и Вистар различна

Для построения ассоциативных сетей были выбраны дифференциально экспрессирующиеся гены с уровнем значимости $p < 0,01$ без поправки на множественное сравнение, продукты которых участвуют в процессах (в терминах Gene Ontology): «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)(<https://david.ncifcrf.gov/>).

Ассоциативные сети были реконструированы при помощи онлайн ресурса GeneMANIA (Gene Multiple Association Network Integration Algorithm) (<http://genemania.org/>) для возраста 20 дней, 3 и 18 мес. При построении сети используется метод сопряженных градиентов (сопряженный градиентный оптимизированный алгоритм). Анализ структуры сетей был произведен с помощью Network Analyzer plugin в программе Cytoscape (ver. 2.8.2).

Для выявления центральных или наиболее значимых вершин в полученных генных сетях использовался метод расчета различных показателей центральности вершин, включая:

1. Среднюю длину кратчайшего пути – среднее расстояние от одной вершины до другой;

2. Центральность вершины по посредничеству – взвешенная сумма всех кратчайших путей между вершинами в графе, проходящих через данную вершину. Центральность по посредничеству оценивает участника сети именно в контексте его степени контроля над передачей информации и возможностью контролировать связи между другими ее участниками;

3. Центральность вершины графа по близости – показатель, обратно пропорциональный сумме кратчайших расстояний от этой вершины до других вершин в графе. Этот показатель отображает, насколько близко вершина расположена к остальным вершинам сети;

4. Кластерный коэффициент – нормированное число взаимодействий между соседними генами для каждой вершины;

5. Степень вершины – определяемую по числу дуг, связанных с вершиной.

Вершины, имеющие наиболее низкую среднюю длину кратчайшего пути, высокие кластерный коэффициент и центральность вершины графа по близости, низкую центральность вершины по посредничеству и наиболее высокую степень вершины, были идентифицированы как центральные или наиболее значимые вершины.

Кластерный анализ сетей проводился с помощью ClusterMarket plugin (ver 1.11) community cluster (GLay) для Cytoscape (ver. 2.8.2). Биологическая интерпретация кластеров выполнялась на основе базы данных Reactome (<http://www.reactome.org/>).

Забор и хранение образцов

Крыс декапитировали, извлекали глаза животного и помещали их на охлажденную чашку Петри. Глаз очищали от всех посторонних тканей, затем разрезали стерильными инструментами по линии лимба. После удаления передней части глаза и стекловидного тела с внутренней поверхности задней части склеры забирали сетчатку вместе с сосудистой оболочкой и пигментным эпителием. Ткань помещали в пластиковые пробирки и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до момента использования.

Вестерн блот анализ

Все операции выделения белка проводили при 4°C . Для выделения белка из двух сетчаток (50-100 мг) использовали 500 мкл буфера RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолат натрия (Sodium Deoxycholate)) с коктейлем ингибиторов протеаз (P8340 Sigma-Aldrich). После тщательного гомогенизирования раствор белка центрифугировали на 12 000 g при

4⁰С в течение 10 минут. Супернатант собирали, разделяли на аликвоты для дальнейшего использования, замораживали и хранили при -20⁰С. Концентрацию тотального белка определяли с помощью реактивов BioRad ProteinAssay на основе метода Бредфорда (Kruger, 2009).

Образцы белка смешивали с 5X буфером для загрузки (10% SDS, 15% меркаптоэтанол, 50% глицерин, 0,3М Tris-HCl pH 6,8, бром-феноловый синий), инкубировали 10 минут при комнатной температуре и затем прогревали 5 минут при 95⁰С. На основании замеров концентрации белка равное количество белка (30 мкг) наносили на форец в 12% акриламидном геле в трис-глициновом буфере (25 mM Trisbase, 190 mM glycine, 0,1% SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-CEextra, Amersham) проводили в камере для «влажного» переноса. Качество переноса белков контролировали окрашиванием мембраны раствора РонсеауS в 1% уксусной кислоте и окрашиванием геля раствором PageBlue (Fermentas). Далее мембрану блокировали 5% BSA в растворе PBST (0,01M фосфатно-солевой буфер с 0,1% Tween20), и инкубировали 18 часов с первичными антителами против GFAP и β -актина в 5% BSA в растворе PBST (1:1000, Abcam) при 4⁰С. После отмывок первичных антител проводили инкубацию с вторичными антителами Goat Anti-Rabbit в растворе PBST (1:5000, Abcam) в течение 1 часа при комнатной температуре. Интенсивность свечения оценивалась с помощью программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Иммуноферментный анализ

Содержание индуцибельной синтазы азота iNOS в сетчатке 3-х и 18 мес. животных оценивали иммуноферментным анализом (ИФА), используя набор Rat

Nitric oxide synthase inducible ELISA Kit (EIAab®), согласно рекомендациям производителя.

Выделение РНК для real-time PCR

Выделение тотальной РНК из замороженной ткани сетчатки крыс с помощью TRI®Reagent (Ambion) проводилась по методу производителя. Используемую при работе с РНК воду подвергали двойной дистилляции и автоклавировали. Образцы ткани 50 – 100 мг гомогенизировали на льду в стерильном стеклянном гомогенизаторе в 1 мл TRI®Reagent. Гомогенат переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл и давали отстояться 5-10 мин при комнатной температуре. Проводили первое центрифугирование на центрифуге Eppendorf-5804D в течение 10 мин на 12 000 об/мин при температуре +4°C. Супернатант, содержащий РНК, отбирали в чистую пластиковую пробирку. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивали, после чего смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре и проводили второе центрифугирование при тех же условиях, что и первое в течение 15 мин. Водную фазу отбирали в чистую пластиковую пробирку. Добавляли 0,5 мл изопропанола, тщательно перемешивали, инкубировали образцы при температуре +4°C в течение 2 часов и проводили третье центрифугирование в течение 10 мин на 12 000 об/мин при комнатной температуре. Аккуратно удаляли супернатант. Осадок РНК промывали 75% этиловым спиртом. Для этого в пробирку добавляли 1 мл 75% этилового спирта, встряхивали на вортексе и проводили центрифугирование на центрифуге в течение 5 мин на 7 500 об/мин при комнатной температуре. Высушивали осадок РНК на воздухе в течение 5 мин и растворяли в 20-30 мкл автоклавированной воды. Концентрацию выделенной РНК определяли на

спектрофотометре Eppendorf Biophotometer ($\lambda = 260$ нм). Качество выделенной РНК контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Образцы хранили при -70°C .

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

Заливали 8% полиакриламидный гель (ПААГ) – 1,2 мл $10\times$ ТВЕ (54 г трис, 27,5 г борной кислоты, 20 мл ЭДТА, рН 8.0, дистиллированной воды до 0,5 л); 0,150 мл 10% персульфата аммония; 8,6 мл дистиллированной воды; 3,2 мл 30% раствора акриламида (1 г бисакриламида, 29 г акриламида, дистиллированной воды до 100 мл); 6 мкл ТЕМЕД. В течение 20 минут гель оставляли для полимеризации, после чего помещали в камеру для вертикального гель-электрофореза. При нанесении в карманы к каждой пробе добавляли 40% глицерин, содержащий красители бромфеноловый синий и ксиленцианол (электрофоретические маркеры). Для электрофореза использовали источник питания постоянного тока «Эльф-4» («ДНК-Технология», Россия). Электрофорез проводили при комнатной температуре в $0,5\times$ буфере ТВЕ при напряженности 13,5 В/см. Для визуализации фрагментов ДНК после электрофореза гель обрабатывали раствором бромистого этидия (в концентрации 0,5 мкг/мл) и наблюдали в УФ свете на трансиллюминаторе Vilbert Lourmat.

Очистка образцов РНК методом ДНКазной обработки

Для удаления загрязнения геномной ДНК и исключения контаминаций при ПЦР проводили обработку полученных образцов РНК ДНКазой I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega). В пробирку добавляли 1 мкл $10\times$ реакционного буфера (400 мМ Tris-HCl рН 8.0, 100 мМ MgSO_4 , 10 мМ CaCl_2), раствор РНК в воде, фермент в

расчете 0,5 е.а. на 1 мкг РНК до суммарного объема смеси 10 мкл. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37⁰С в микротермостате. Затем проводили выделение РНК методом фенол-хлороформной экстракции и осаждение этанолом. Объем смеси доводили до 200 мкл водой и добавляли хлороформ и фенол по 100 мкл каждого. Смесь перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин на 13 000 об/мин. Водную фазу аккуратно отбирали в чистую пробирку с 200 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали 3 мин на 13 000 об/мин. Водную фазу отбирали в пробирку с 600 мкл 96% этилового спирта и 20 мкл 2М NaAc. Пробирки оставляли на 2 часа при температуре -70⁰С. Затем пробирки центрифугировали 10 мин на 13 000 об/мин. Осадок промывали 200 мкл 70% этилового спирта. После центрифугирования в течение 3 мин на 13000 об/мин осадок РНК высушивали на воздухе и растворяли в 25 мкл воды. Концентрацию выделенной РНК определяли на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer ($\lambda = 260$ нм). Контроль качества выделенной РНК проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Образцы хранили при -70⁰С.

Реакция обратной транскрипции для получения кДНК

Синтез одноцепочечной кДНК на РНК-матрице проводили с помощью фермента M-MLV Reverse Transcriptase. 2 мкг очищенной РНК смешивали с 0,5 мкг Random праймеров (случайные гексамеры нуклеотидов) в общем объеме 15 мкл. Смесь прогревали 5 мин при 70⁰С, а затем помещали в снег. В реакционную смесь добавляли 5 мкл 5x реакционного буфера (250 мМ Tris-HCl pH 8,3, 375 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT), 5 мкл нуклеотидов (dNTP mix, 10 мМ каждого) и 200 ед. обратной транскриптазы. Реакцию проводили в течение часа при 37⁰С. Инактивацию фермента проводили при 70⁰С в течение 5 мин.

Приготовление смеси «стандартной» кДНК

Из всех полученных образцов кДНК отбирали равные объемы и смешивали. Полученный «усредненный» раствор использовали для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительный уровень кДНК для целевых генов и гена сравнения в экспериментальных образцах.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR) для определения уровня мРНК исследуемых генов

Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I ("Molecular Probes", США) на амплификаторе iCycler iQ4 (Bio-Rad laboratories, США) и CFX 1000 (BioRad laboratories, США). В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» *RPL 30* (белок 30 большой субъединицы рибосомы). Праймеры подбирали с помощью программы VectorNTI 10.1.1 (Invitrogen Corporation) и с помощью on-line пакета IDT SciTool (<http://eu.idtdna.com/pages/scitools>). Использовали следующие праймеры:

5'_ATGGTGGCTGCAAAGAAGAC_3' и 5'_CAAAGCTGGACAGTTGTTGG_3' для *Rpl30*;

5'_CGCTACGCGGGCTACAAGCA_3' и 5'_GCAGGAGAGGCAGCACGTCG_3' для *nNOS*;

5'_TGGGCTGGAAGCCCCGCTAT_3' и 5'_GGCAGGCAGCGCATACCACT_3' для *iNOS*;

5'_GCACTTCTGTGCSTTTGCTC_3' и 5'_TGGCATCTTCTCCCACACAG_3' для *eNOS*.

Ожидаемый размер продукта: 166 п.н. для *Rpl03*; 130 п.н. для *nNOS*; 176 п.н. для *iNOS* и 149 п.н. для *eNOS*.

Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала стандартный буфер для ПЦР (67 мМ трис-НСl с рН 8.9, 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween20, 10 мМ β-меркаптоэтанол), 20 мМ MgCl₂, 10 мМ dNTPs, SYBR Green I в разведении 1:20 000, праймеры (по 250 нМ для *RPL30*, и *NOSs*) и 0,2 ед hot-start Taq-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск).

Реакцию проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при 95⁰С – 20 сек; 40 циклов: денатурация – 20 сек, отжиг (60⁰) – 5 мин, элонгация при 72⁰С – 20 сек. После окончания ПЦР снимали кривые плавления для контроля специфичности реакции.

В каждом эксперименте на один планшет помещали образцы исследуемых кДНК с праймерами на целевой ген (по 3 повтора на образец кДНК); аналогичные образцы с праймерами на ген сравнения (также по 3 повтора); «стандартную» кДНК в разведениях от 1:1 до 1:1000 с теми же праймерами (3 повтора). Для каждого образца кДНК ПЦР проводили не менее 2-х раз.

Для оценки изменения экспрессии генов *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* использовали метод $\Delta\Delta C(T)$ (Pfaffl et al., 2002), обработку результатов и статистический анализ производили в программе REST 2009. Эта программа ведет расчет по следующей формуле:

$$R = E^{-C(T)/E_{ref}^{-C(T)_{ref}}},$$

где E – эффективность реакции, E_{ref} – эффективность контрольной последовательности, R – относительная концентрация субстрата. В качестве контрольной последовательности использовался ген *Rpl 30*.

Таким образом определяли межлинейные различия в уровнях экспрессии изучаемых генов, а также влияние на них возраста животных. Статистический анализ производился по критерию Манна-Уитни, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Иммунофлуоресцентный анализ

Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде и проводили по растворам сахарозы восходящей концентрации (10%, 20% и 30%). Фиксированную заднюю часть глаза заключали в криогель Killik (Bio-Optica) и замораживали при -70°C . На криотоме HM 550 готовили срезы (14 мкм). Использовали первичные антитела к Iba1 (1:250, ab5076, Abcam), Gfap (1:250, ab7260, Abcam), CD68 (1:250, ab7260, Abcam), виментину (1:250, ab24525, Abcam), RIPK1 (1:200, ab106393, Abcam) и RIPK3 (1:200, ab62344, Abcam) соответствующими вторичными антителами (1:250), раствор Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam). TUNEL окрашивание (метод основан на выявлении 3'-ОН концов в молекуле ядерной ДНК, образующихся при её фрагментации в клетках, вступивших в апоптоз) проводили, используя DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) согласно предложенному протоколу. Препараты монтировали в растворе Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam). Анализ проводился на флуоресцентном микроскопе AXIOSKOP 2 plus. Флуоресценцию DAPI фиксировали используя фильтр Set 02 (G 365, FT 395, LP 420) (Zeiss), специфический сигнал Iba1, GFAP, RIPK1, RIPK3 и TUNEL регистрировали используя фильтр Set 10 (BP 450-490, FT 510, BP 515-565) (Zeiss), специфический сигнал CD68 и виментина регистрировали с помощью фильтра Set 15 (BP 546/12, FT 580, LP 590) (Zeiss).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде, затем отделяли переднюю камеру глаза, хрусталик и нейроретину от задней камеры глаза. Оставшийся слой РПЭ с подлежащей сосудистой оболочкой инкубировали в растворе FITC-phalloidin (1:500) в PBS при +4°C в течение 18 часов. После инкубации препараты помещали на полилизинные стекла, окрашивали раствором Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam) и накрывали покровным стеклом. Анализ проводили на лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 META (Zeiss). При проведении конфокальной сканирующей микроскопии использовали режим multitrack (последовательное сканирование при раздельном возбуждении флуорохромов лазерами с разной длиной волны), объектив Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Флуоресценцию DAPI регистрировали в диапазоне эмиссии 410-483 нм при возбуждении лазером 405 нм, специфичный сигнал FITC-phalloidin регистрировали в диапазоне эмиссии от 493-628 нм при возбуждении 488 нм.

Анализ и обработка изображений

Для количественной оценки площади окрашенного поля клетками микроглии и плотности активированных клеток микроглии и макрофагов анализировали изображения (225×170 μm, площадью 38250 μm²) сетчатки (n=3-4 по 3-5 последовательных срезов для каждой линии), нормировали на площадь сетчатки и высчитывали численную плотность клеток на 1000 мкм². Для количественной оценки плотности клеток РПЭ анализировали фотографии (707,8×707,8 μm) монослоя РПЭ (n=3-4 по 2-4 участка центральной зоны) и высчитывали численную

плотность клеток на 1мм^2 . Данные анализировали с помощью программы ZEN (Zeiss, Германия) и ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

Статистический анализ

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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ

3. 1. Анализ данных секвенирования транскриптома (RNA-seq) для 20-дневных крыс Вистар и OXYS

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.

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 выравненных прочтений, которые пересекаются с геном. Для оценки параметра дисперсии методом DESeq используется 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 составило 328 760. Средние значения уровня экспрессии по всем детектируемым генам было 322 рида.

При заданной глубине секвенирования установлено, что 245 генов являются дифференциально экспрессирующимися между крысами Вистар и OXYS: 160 из них имеют пониженную экспрессию в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами

Вистар, а 85 - повышенную. С помощью терминов Gene Ontology была проведена функциональная аннотация групп ДЭ генов в сетчатке между крысами OXYS и Вистар (межлинейные различия) (рис. 5).

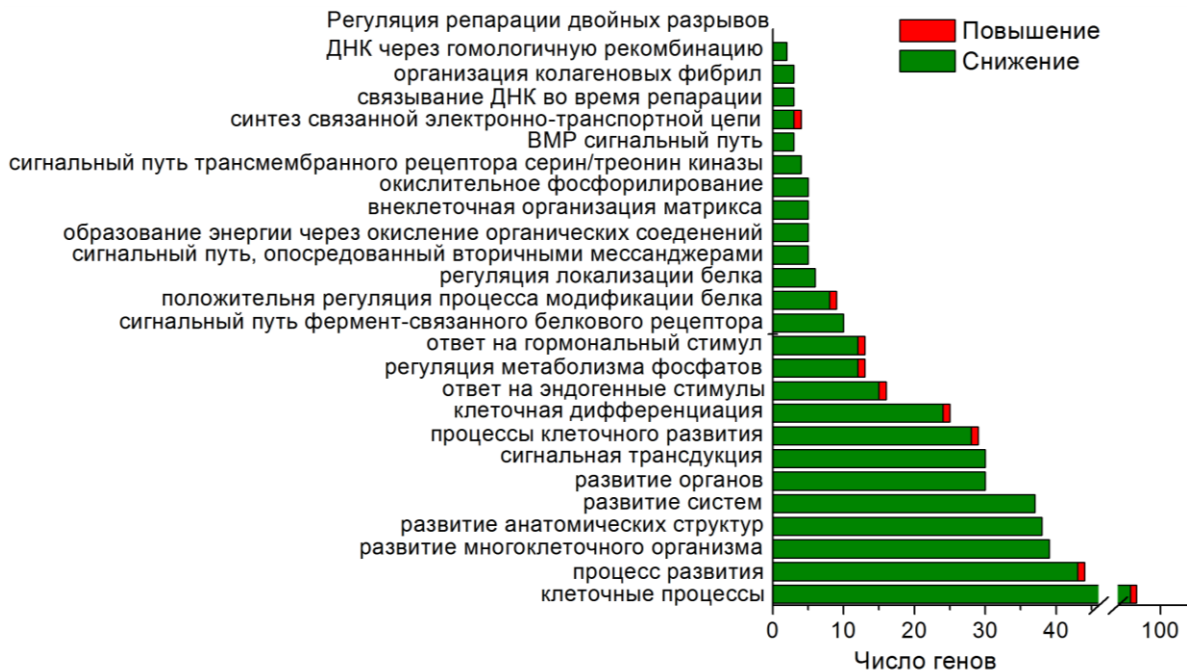


Рис. 5. Значимые термины генных онтологий (Gene Ontology, BP_FAT, $p < 0,05$), объединяющие гены, экспрессия которых изменяется в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в возрасте 20 дней (БХ $p\text{-value} < 0,05$).

Анализ специфичных для возраста 20 дней ДЭГ показал, что на доклинической стадии ретинопатии в сетчатке крыс OXYS изменено относительно крыс Вистар наиболее обогащены ДЭ генами 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), процесс клеточного развития (28 генов) и клеточную дифференцировку (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

фермента и белкового рецептора (10 генов), положительную регуляцию процесса модификации белка (9 генов), сигнальный путь, опосредованный вторичными посредниками (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).

В Приложении 1 представлены 82 гена с экспрессией, измененной более чем в 2 раза, при этом все гены имели пониженный уровень мРНК у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар.

Наиболее существенно изменены в сетчатке 20 дневных крыс OXYS мРНК генов *Tmem221* – интегральный компонент мембраны (трансмембранный белок 221, Fold Change > 75) and *GSTA6* (глутатион-S-трансферазе А6, Fold Change >70), регулирующего конъюгацию сульфгидрильной SH₂ группы с электрофильными атомами С, N, S, О молекул ксенобиотиков.

Обнаружено значительное снижение экспрессии генов, кодирующих субъединицы митохондриальной дыхательной цепи: *mt-ND4*, *mt-ND5*, *mt-ND4L* (комплекс I, НАДН/убихинон оксидоредуктаза), *Atp5f1* (комплекс V, АТФ-синтаза), а также других митохондриальных генов в сетчатке крыс OXYS в возрасте 20 дней.

При сравнении ранее полученных данных транскриптома сетчатки на стадии манифестации клинических признаков ретинопатии (3 мес.) и прогрессии заболевания (18 мес.) (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*), и метаболические процессы (n=24) и катаболические процессы, связанные с липидами (*Acadslb*, *Pla2g2c* и *Lipa*). При сравнении 20-дневного возраста 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 термины генных онтологий (GO term) 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).

Таким образом, в возрасте 20 дней у крыс OXYS изменена экспрессии 245 генов, основная часть которых связана с процессами развития, сигнальной трансдукции и клеточной дифференцировкой. Для транскриптома 20-дневных крыс не обнаружено обогащения по категориям генных онтологий, выявленных ранее для транскриптомов сетчатки 3 и 18 мес. крыс OXYS: иммунной системой, воспалением, окислительным стрессом, гомеостазом кальция (Kozhevnikova et al., 2013).

3. 2. Реконструкция генных сетей, ассоциированных с апоптозом в сетчатке крыс OXYS на разных стадиях ретинопатии

Для реконструкции генных сетей, ассоциированных с клеточной гибелью, были использованы данные RNA-seq сетчатки для крыс Вистар и OXYS в возрасте 3 и 18

мес. (Kozhevnikova et al. 2013) и результаты RNA-seq сетчатки 20-дневных животных, полученные в настоящей работе.

Согласно базе данных DAVID, в возрасте 20 дней обнаружены межлинейные различия в уровне экспрессии для 32 генов, включенных в пути апоптоза. Из них 26 генов имели у крыс OXYS пониженный уровень мРНК по сравнению с крысами Вистар, а 6 генов - повышенный уровень мРНК по сравнению с крысами Вистар. В возрасте 3 мес. из 48 аннотированных генов экспрессия 6 генов у крыс OXYS была выше, чем у крыс Вистар, экспрессия остальных 42 ДЭГ была снижена. В возрасте 18 мес. 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 (рис. 6А).

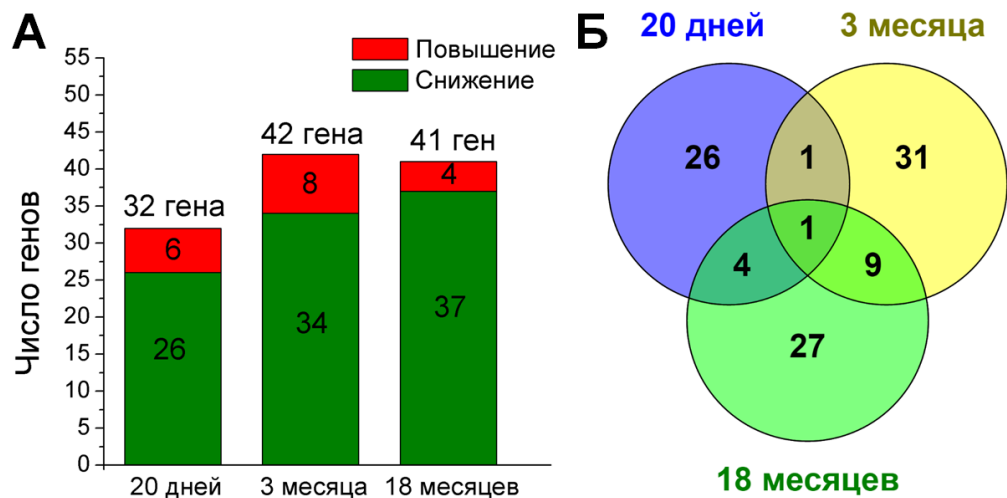


Рис. 6. А) Количество дифференциально экспрессирующихся генов апоптоза в сетчатке крыс OXYS со сниженным и повышенным, по сравнению с крысами Вистар, уровнем мРНК в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев ($p < 0,05$). Б) Диаграмма Венна для дифференциально экспрессирующихся генов апоптоза у крыс OXYS, по сравнению с крысами Вистар в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев, и пересечения между группами генов.

Диаграмма Венна показывает совпадающие ДЭ гены в трех возрастных группах (рис. 6Б). 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 ДЭГ найдено у 3 и 18 мес. животных (*Bcl2l10*, *Cd24*, *Casp8*, *Casp7*, *LOC298795*, *C6*, *Cdk1*, *Alox12*, *Mud88*), и 3 общих гена - у 20 дневных и 18-месячных животных (*ErbB3*, *Tgfa*, *Cttna1*).

Мы использовали алгоритм GeneMANIA для построения ассоциативной сети и анализа изменений транскриптома, связанных с функциональными категориями клеточной гибели. На рис. 7 представлены полученные ассоциативные генные сети апоптоза для 20 дней, 3 месяцев и 18 месяцев. Видно, что большинство генов прямо или косвенно связаны друг с другом (рис. 7).

Для построения ассоциативных сетей программа использует следующие взаимодействия: соэкспрессия, солокализация, физическая взаимосвязь, одиноковые белковые домены, генетическая связь, пути, прогнозируемые функциональные связи. В графах ассоциативных сетей ДЭ гены (черный цвет) имеют одинаковый диаметр вершин. Размер вершин, предложенных программой (серый цвет), пропорционален рейтингу гена (score), величине, которая дает информацию о связанности вершины с остальными участниками ассоциативной сети (рис. 7). Параметр определяется автоматически (Zuberi et al., 2013).

Для понимания характеристик полученных графов ассоциативных генных сетей был проведен топологический анализ с использованием Network analyzer plugin для программы Cytoscape. Реконструкция сигнального пути апоптоза представлена как неориентированная сеть.

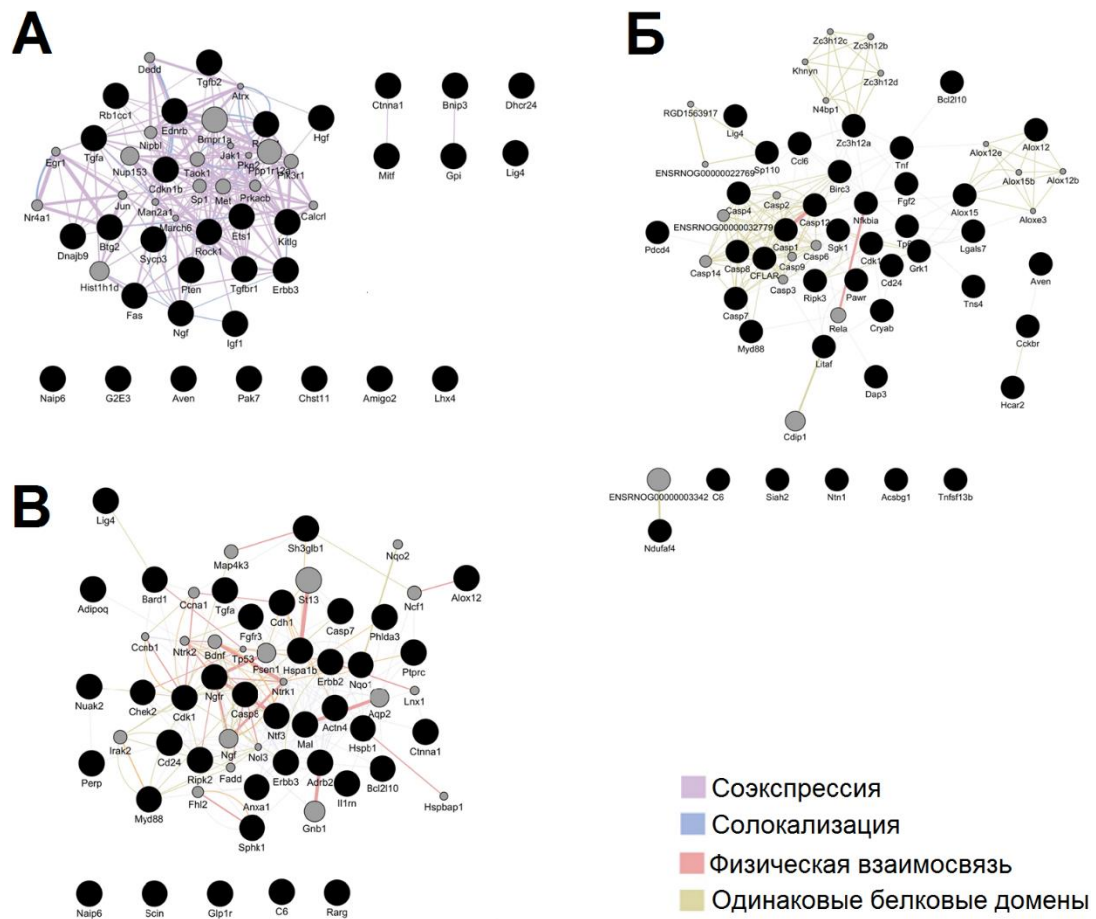


Рис. 7. Графы ассоциативных генных сетей апоптоза для 20-дневных (**А**), 3-месячных (**Б**) и 18-месячных (**В**) крыс OXYS. В каждой сети черным отмечены ДЭ гены, а серым – гены, предложенные программой GeneMania.

В таблице 1 показаны основные характеристики графов генных сетей: размер графа определяет число вершин, диаметр графа соответствует максимальному расстоянию между его вершинами, среднее расстояние между вершинами определяет усредненное расстояние между всеми парами вершин сети.

Таблица 1. Топологические характеристики ассоциативных генных сетей апоптоза.

Возраст	Число вершин	Диаметр графа	Среднее расстояние между вершинами
20 дней	52	4	1.871
3 месяца	60	5	2.532
18 месяцев	58	6	2.581

Полученные характеристики определяют разновидность полученных графов как «Мир тесен» («Small-world network»), общей чертой этих сетей является то, что любые две вершины могут быть соединены между собой посредством небольшого количества переходов через другие вершины. Такой граф типичен для естественных и искусственных биологических сетей.

Степень вершины - это наиболее простой и важный параметр: чем выше степень вершины, тем выше вероятность того, что эта вершина является центральной или наиболее значимой. Мы определили гены со степенью вершины больше 10 и исследовали для этих генов другие топологические параметры, такие как средняя длина кратчайшего пути, центральность вершины по посредничеству, центральность вершины графа по близости, кластерный коэффициент для того чтобы идентифицировать вершины, выполняющие центральную структурную роль. В Приложении 2 жирным шрифтом выделены наиболее важные вершины и оптимальные значения параметров. Вершины, которые имели наименьшие среднюю длину кратчайшего пути и центральность вершины по посредничеству, наибольшие коэффициент кластеризации и центральность вершины по близости, а также более высокую степень вершины были идентифицированы как центральные.

Таким образом, в возрасте 20 дней было определено 8 центральных вершин, из которых экспрессия только одного гена – *Rasa1* – достоверно различалась у крыс OXYS и Вистар, а остальные гены были предложены программой GeneMANIA. В возрасте 3 мес. было выявлено 8 центральных вершин, из которых у 7 генов экспрессия достоверно различается у крыс OXYS и Вистар (*Casp1*, *Casp12*, *Casp4*, *CFLAR*, *Birc3*, *Casp7*, *Nfkb1a*). В возрасте 18 мес. из 5 центральных вершин, 4 гена

являются дифференциально экспрессирующимися между линиями (*Cdk1*, *Hspa1b*, *ErbB3*, *Ntf3*) (Приложение 4).

Алгоритм GeneMANIA также предлагает для полученных генных сетей клеточной гибели описание функции белков с помощью аннотации Gene Ontology. Сводные данные представлены в Приложении 3.

3. 2. 1. Кластерный анализ графов ассоциативных генных сетей

На следующем этапе для крыс каждого возраста были выявлены структурные модули, или кластеры, в графах генных сетей апоптоза. Анализ производился с помощью ClusterMarket plugin community cluster (GLay), использующего быстрый жадный алгоритм. Близкие друг к другу вершины объединены в единый кластер. Каждая вершина может входить только в один кластер. Биологическая интерпретация кластеров с числом вершин больше трех проводилась с использованием базы данных Reactome (<http://www.reactome.org/>).

В генной сети 20-дневных крыс были идентифицированы 3 кластера (рис. 8А). Кластерный анализ показывает, что первый кластер генов участвует в регуляции сигнального пути многих факторов, в том числе VEGF, BMP, TGF-beta и интерликинов 2 и 7, а гены, включенные во второй и третий кластеры, участвуют в регуляции апоптоза, преимущественно внешнего пути (FasL/CD95L сигнального пути) (Приложение 4).

В ассоциативной генной сети 3-мес. крыс было определено 6 кластеров, среди которых наибольшее число ДЭ генов, регулирующих процесс апоптоза, включено в первые два кластера (рис. 8Б; Приложение 4). В третий кластер объединены гены, регулирующие метаболизм липидов и липопротеинов (регуляция метаболизма арахидоновой кислоты), но в тоже время гены этого кластера способны

индуцировать апоптоз. Четвертый кластер характеризуется наличием семейства белков с доменами типа СССН-цинковых пальцев, который включает четыре члена *Zc3h12a/MCPIP1*, *Zc3h12b*, *Zc3h12c* и *Zc3h12d/TFL*. Это семейство белков регулирует TLR сигнальный путь и активацию макрофагов, играя роль в воспалительных заболеваниях (Minagawa et al., 2014).

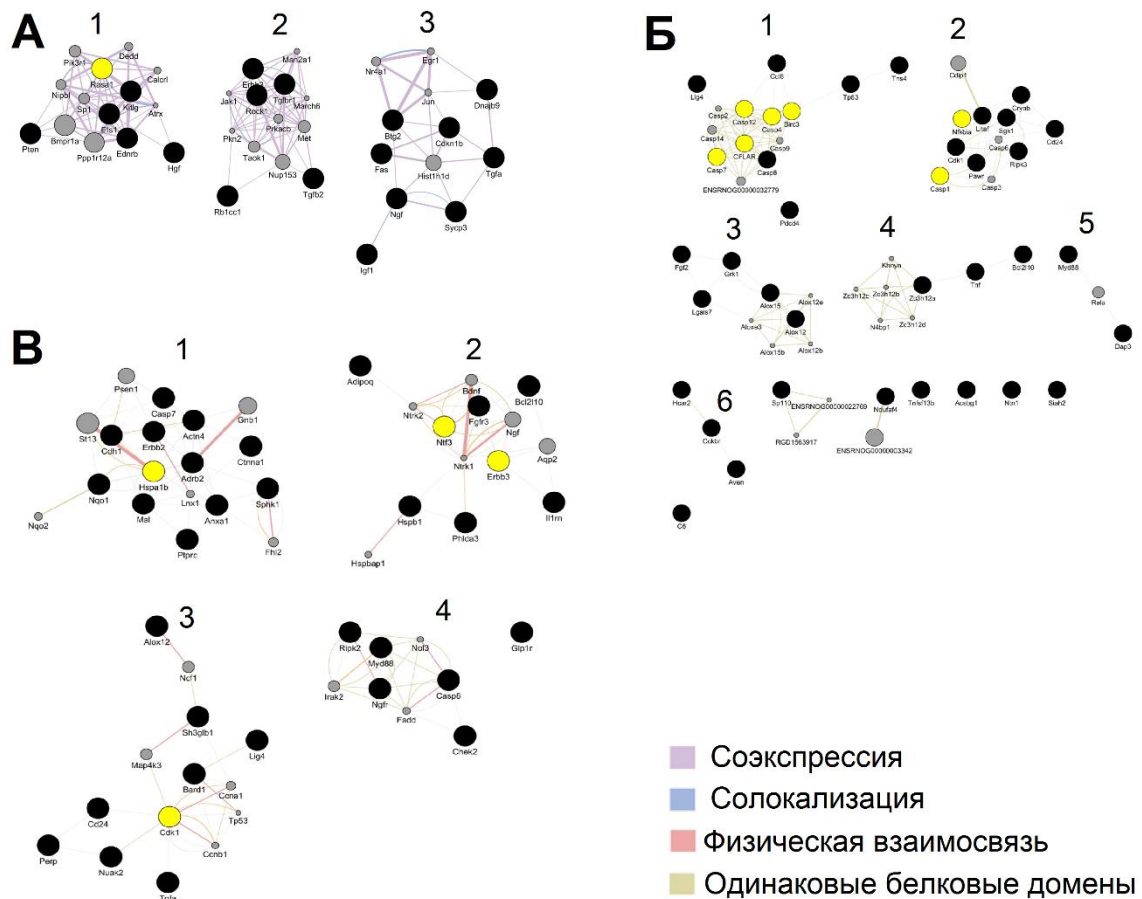


Рис. 8. Кластерный анализ ассоциативных генных сетей для 20-дневных (**А**), 3-месячных (**Б**) и 18-месячных (**В**) крыс. В каждой генной сети черным отмечены ДЭ гены, серым – гены, предложенные программой GeneMania, желтым цветом отмечены центральные вершины.

Четвертый кластер также включает в себя ген *TNF* – важный воспалительный агент и *Diva* (другое название *Bcl2l10*). Интересно, что *Diva* – член семейства белков *Bcl2* – играет важную роль в выживании клетки через подавление

митохондриального пути апоптоза (Liu et al., 2012). Гены *Myd88*, *Dap3* и *Rela* вместе составляют пятый кластер. DAP3 (Death-associated protein 3) – нуклеотид-связывающий белок, является положительным медиатором апоптоза, *Myd88* регулирует Toll-like сигнальный путь, и также, как известно, определяет путь клеточной гибели (апоптоз или некроз) после УФ-облучения (Harberts et al., 2013).

Анализ геной сети у 18-месячных животных показал наличие 6 кластеров: двух крупных и четырех более мелких (рис. 8В; Приложение 4). Только в первый и второй кластеры включены гены, участвующие как во внешнем, так и во внутреннем пути апоптоза. Другие четыре кластера регулируют пути, отличные от путей клеточной гибели, но имеющие возможные эффекты на инициацию/подавление апоптоза. Так, третий кластер включается в интеграцию энергетического метаболизма, передачу информации через химические синапсы, регуляцию калиевых каналов в нервной системе и сигнальный путь NGF, а четвертый кластер участвует в регуляции внутреннего иммунитета и метаболизме липидов и липопротеинов.

Таким образом, согласно результатам реконструкции ассоциативных геновых сетей, предсказаны связи ДЭ генов, ассоциированные с апоптозом у крыс OXYS, с другими генами, прямо или косвенно влияющими на процесс клеточной гибели. Установлено, что наиболее изменен сигнальный каскад внешнего пути апоптоза во всех возрастах (Приложение 3). Были выявлены биологические процессы, в которых задействованы гены ассоциативных сетей. В целом помимо апоптоза участники ассоциативных сетей включены в иммунные процессы и метаболизм липидов (Приложение 4).

3. 3. Сравнение изменений с возрастом процессов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар

Для определения кластеров генов, участвующих в реализации различных механизмов клеточной гибели, анализировались результаты исследования транскриптома сетчатки животных в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес., полученные методом RNA-seq и обработанные Н.И. Ершовым. Анализировались только дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭ гены) между возрастными группами 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, только с возраста 20 дней до 3 месяцев изменяется уровень мРНК генов, включенных в регуляцию апоптоза, некроза и аутофагии у крыс Вистар и OXYS (рис. 9).

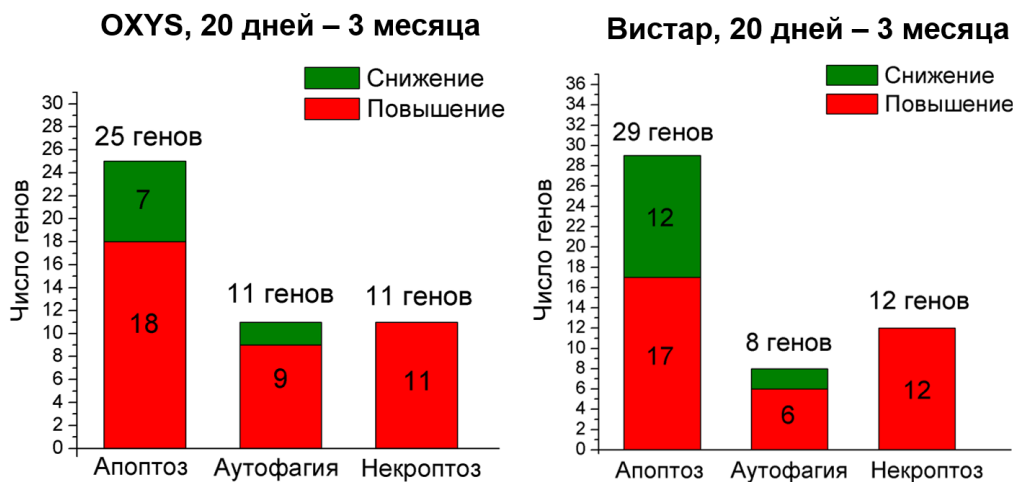


Рис. 9. Количество генов - регуляторов клеточной гибели, снизивших и повысивших уровень мРНК с возраста 20 дней до 3 месяцев у крыс OXYS и Вистар (согласно базам данных KEGG и RGD) ($p_{adj} < 0,05$).

При этом показано, что с возраста 20 дней до 3 мес. в сетчатке крыс OXYS изменяется экспрессия 25 генов-регуляторов апоптоза, у крыс Вистар - 29, из

которых 14 – общие для них и крыс OXYS. 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.

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.

3. 4. Исследование активности гибели клеток сетчатки методом TUNEL

Работа выполнена на крысах OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3 месяцев и 18 месяцев. В возрасте 20 дней у крыс Вистар и OXYS детектируются TUNEL⁺ клетки (апоптотические) в ганглионарном, внутреннем ядерном, наружном сетчатом и ядерном слоях сетчатки (рис. 10Б).

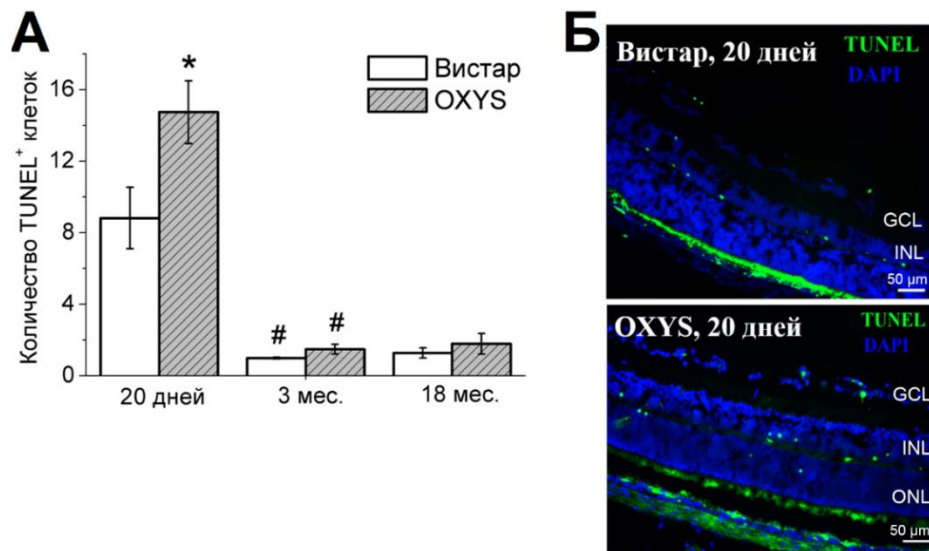


Рис. 10. А) Количество TUNEL⁺ клеток на 500 мкм² в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Достоверны: * - межлинейные отличия, # - различия по сравнению с предыдущем возрастом, $p < 0,05$. Б) Иммуногистохимическое

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.

Это указывает на высокую активность процессов апоптоза в сетчатке крыс обеих линий этого возраста, при этом у крыс OXYS количество TUNEL⁺ клеток достоверно выше, чем у крыс Вистар. Но уже к возрасту 3 мес. количество TUNEL⁺ клеток снижается до единичных событий и у крыс OXYS, и у крыс Вистар. Эта тенденция сохраняется и в возрасте 18 мес. (рис. 10А). Таким образом, максимальная активность гибели клеток приходится на возраст 20 дней – период, когда завершается созревание сетчатки.

3. 5. 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. 11). Специфичными 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 (рис. 11).

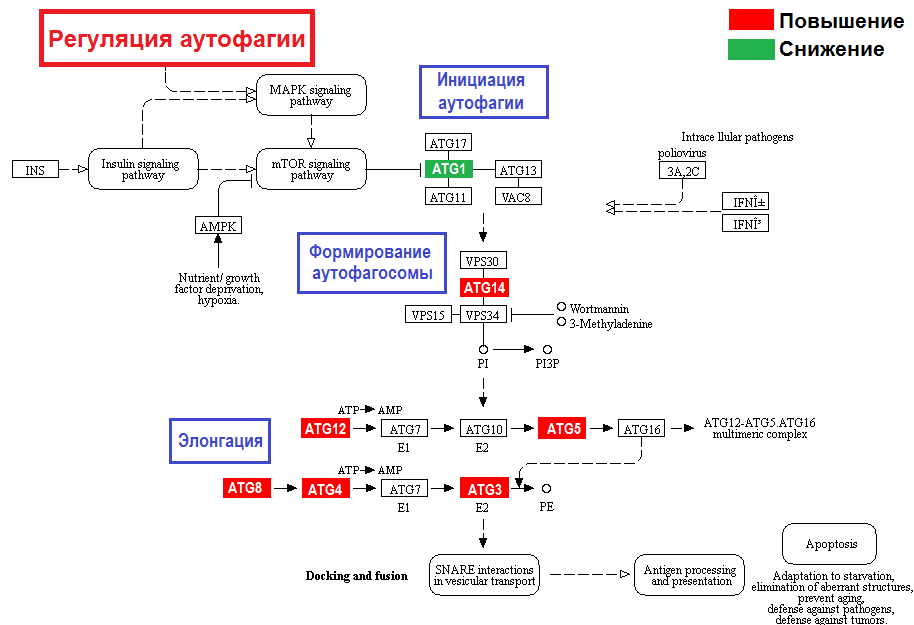


Рис. 11. Согласно базе данных KEGG pathway, 11 ДЭ генов в сетчатке крыс OXYS вовлечены в регуляцию аутофагии. На схеме отмечены 7 из 11 ДЭ генов.

3. 6. 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. Специфичными для крыс OXYS были изменения экспрессии 5 генов (*Birc2*, *Dnm11*, *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 (рис. 12).

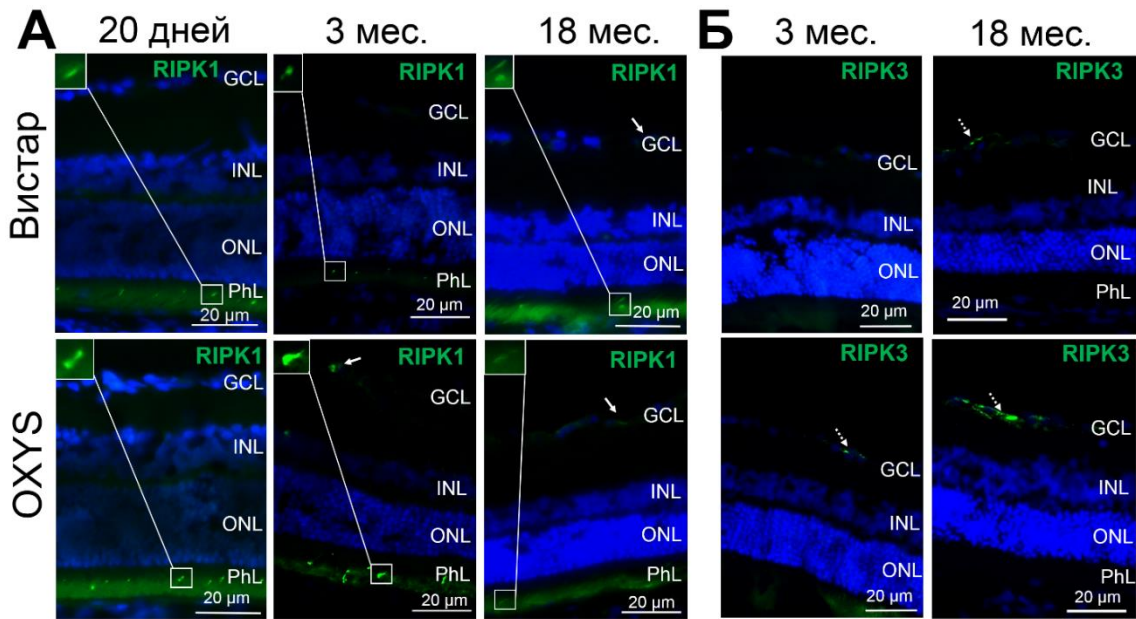


Рис. 12. Локализация RIPK1 (А) и RIPK3 (Б) – маркеров некроптоза (зеленый) - в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Ядра окрашены DAPI (синий). GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, ONL – внешний ядерный слой, PhL – фотосенсорный слой.

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. 12А, 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. 12Б, белые пунктирные стрелки).

3. 7. Морфофункциональные изменения клеток РПЭ с возрастом и при развитии ретинопатии

Для анализа вклада морфофункциональных изменений клеток РПЭ в развитии ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, было проведено исследование морфологии клеток РПЭ с помощью сканирующей конфокальной микроскопии у крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней – период окончания созревания сетчатки, 3 мес. – период манифестации клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS и в возрасте 18 мес. – период активной прогрессии заболевания. Анализировалась только центральная зона сетчатки, находящаяся в непосредственной близости от места выхода оптического нерва (рис. 13А).

Post-hoc сравнения показали, что у крыс обеих линий с возрастом происходит постепенное снижение плотности РПЭ, но только у крыс OXYS в возрасте 3 мес. происходит резкое уменьшение плотности клеток почти на 41% по сравнению с 20 дневными животными ($F_{1,7}=45,023$; $p<0,05$), что приравнивается к уровню плотности клеток РПЭ 18 мес. крыс Вистар, и в этом возрасте обнаружены достоверные межлинейные различия ($F_{1,8}=10,9$; $p<0,05$) (рис. 13Б).

Мы наблюдали атрофические изменения клеток РПЭ у крыс OXYS начиная с возраста 3 мес., обнаружена гипертрофия и гиперплазия, а также наличие аутофлуоресцирующего содержимого – гранул липофусцина - в некоторых клетках. Часть клеток имеет нарушение гексагональной структуры (4 грани и многогранные), что не влияет на мозаичную структуру; такие клетки некоторые авторы относят к здоровым, нормально функционирующим (Ach et al., 2014) (рис. 13А).

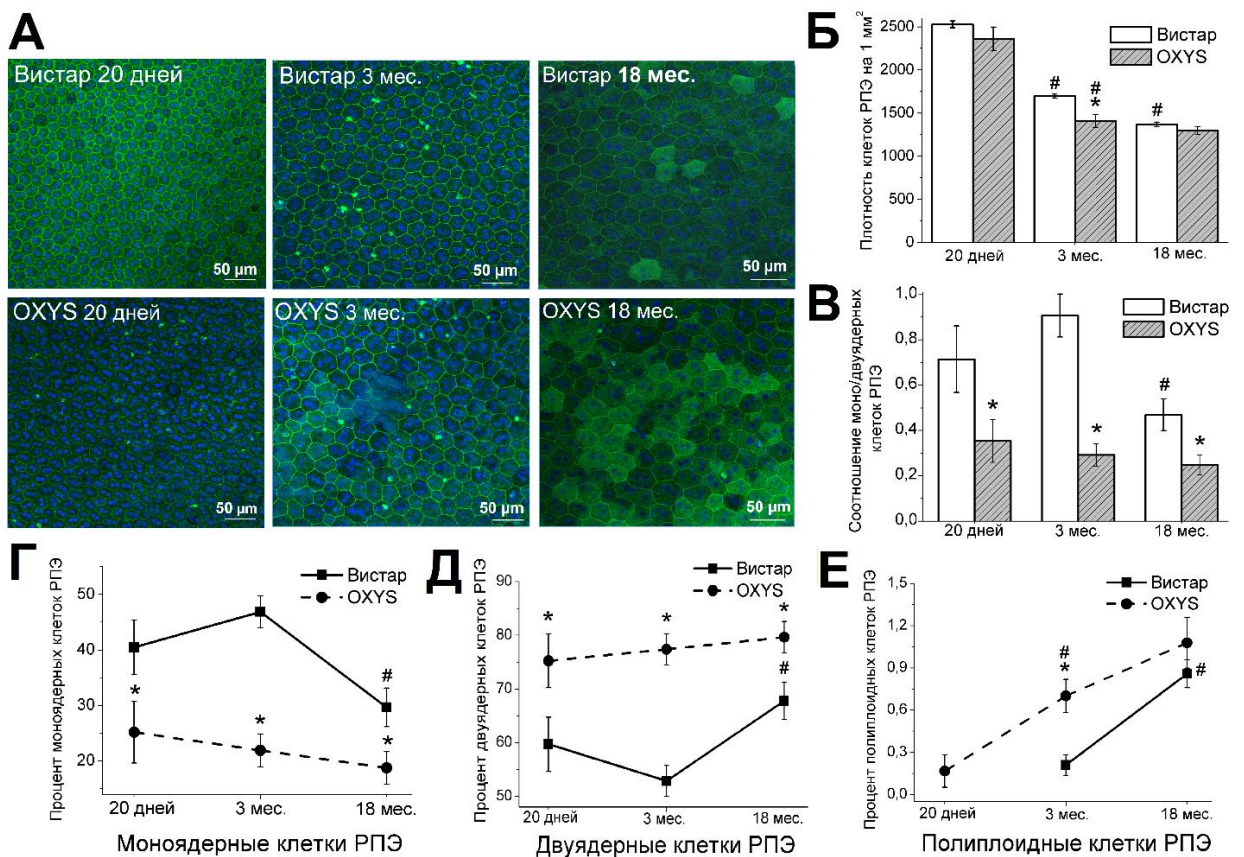


Рис. 13. Изменения у крыс Вистар и OXYS с возрастом **А)** структуры клеток РПЭ (окрашивание FITC-Phalloidine, F-actin); **Б)** плотности клеток на 1мм²; **В)** отношения количества моно- к двухядерным клеткам; процента моно- (**Г**), двухядерных (**Д**) и полиплоидных (**Е**) клеток РПЭ на 1 мм². Данные представлены как М±SEM. Достоверны: * - межлинейные отличия, # - различия по сравнению с предыдущем возрастом, p<0,05.

В период активной прогрессии заболевания все вышеописанные изменения усиливаются, некоторые клетки полностью теряют свою структуру и принимают круглую форму, что приводит в некоторых регионах к нарушению мозаичной структуры (рис. 14Г).

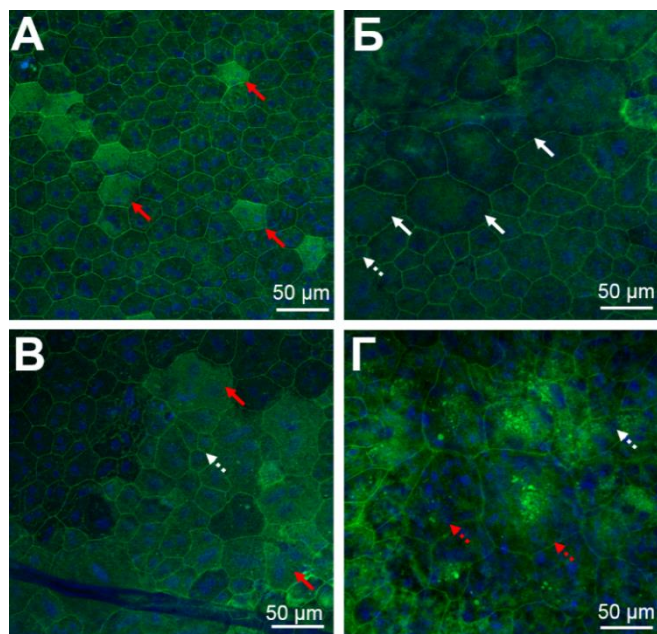


Рис. 14. Клетки РПЭ 18-месячных крыс. А. Крыса Вистар, красные стрелки - скопления аутофлуоресцирующих продуктов. **Б.** Ярко выраженная гипертрофия (белые стрелки) и гиперплазия (белые пунктирные стрелки) клеток РПЭ крысы OXYS. **В.** Накопление аутофлуоресцирующего содержимого и гранул липофусцина (красные стрелки) в клетках РПЭ крысы OXYS. **Г.** Полная потеря формы клеток РПЭ (красные пунктирные линии) у крысы OXYS.

Интересно, что часто около гипертрофированных клеток РПЭ обнаруживаются регионы с большим количеством мелких пяти- и шестигранных клеток (рис. 14Б). Пролиферация мелких клеток в центре сетчатки, скорее всего, является следствием фиброза, замещением утраченных клеток РПЭ. Наличие таких локальных рубцов характерно для поздних стадий ВМД. Кроме того, в возрасте 18 мес. у крыс OXYS наблюдается усиление аутофлуоресценции монослоя РПЭ из-за накопления гранул липофусцина (рис. 14В). У крыс Вистар деструктивные изменения клеток РПЭ (гипертрофия, гипереплазия, накопление гранул липофусцина) наблюдаются в возрасте 18 мес., но они значительно менее выражены чем у крыс OXYS (рис. 14А).

3. 7. 1. 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).

Количественный анализ процентного содержания моноядерных, двуядерных и полиплоидных клеток от общего числа клеток РПЭ на 1 мм² показал, что в возрасте 20 дней процентное содержание моноядерных и двуядерных клеток РПЭ у крыс OXYS изменено по сравнению крысам Вистар: достоверно снижен процент моноядерных и повышен - двуядерных клеток ($p < 0,01$), а соотношение этих типов клеток, соответственно, снижено (рис. 13В - Д). Уже в возрасте 20 дней у крыс OXYS присутствуют полиплоидные клетки РПЭ (0,16% от их общего числа) (рис. 13Е). Соотношение доли моноядерных 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. При этом процент 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 доля существенно меньше, чем у крыс OXYS (рис. 13В, Е). В возрасте 18 мес. у крыс Вистар доля моноядерных клеток РПЭ становится ниже, а двуядерных и полиплоидных клеток – выше, чем в возрасте 3 месяцев ($p < 0,05$) (рис. 13В-Е), соответственно, соотношение этих типов клеток снижается, приближаясь к уровню крыс OXYS.

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).

3. 8. Исследование изменения микроглии в сетчатке при старении и развитии ретинопатии

Иммуногистохимический анализ маркера микроглии Iba-1 в сетчатке 20 дневных, 3-х, 7 и 18-мес. животных показал, что у крыс OXYS и Вистар 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 обнаружил снижение к возрасту 18 мес. площади окрашенного поля в сетчатке крыс обеих линий ($p < 0,05$) (рис. 15А - В). При этом мы не наблюдали у крыс OXYS характерной для ВМД миграции микроглии в слой наружных сегментов фоторецепторов. Такие результаты свидетельствуют об отсутствии полноценного иммунного ответа и согласуются с полученными ранее данными о снижении активности иммунной системы у крыс OXYS (Obukhova et al., 2009), которое проявляется в сетчатке на фоне изменения уровней мРНК генов, связанных с воспалением и иммунным ответом (Kozhevnikova et al., 2013).

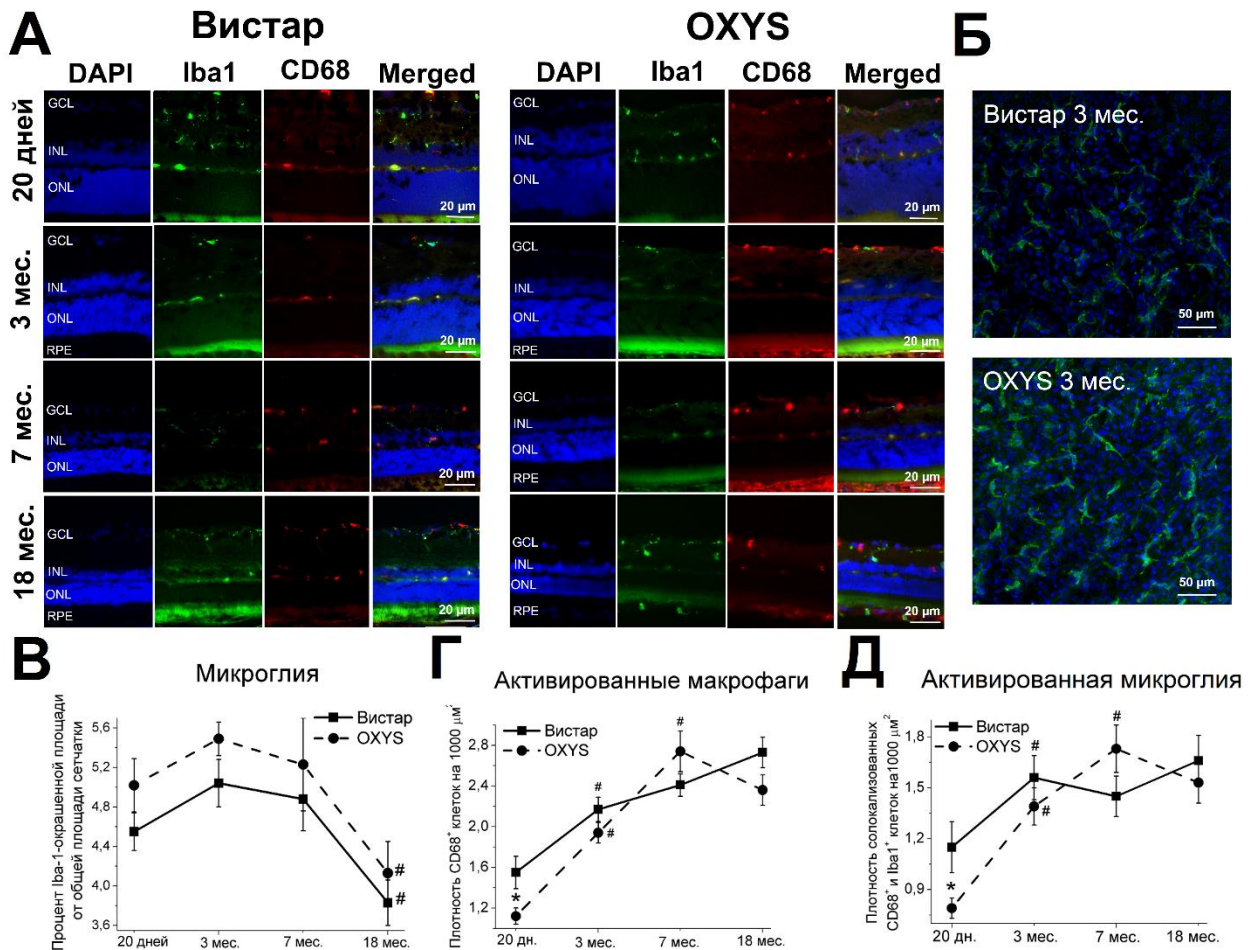


Рис. 15. Изменения микроглии в сетчатке крыс OXYS и Вистар с возрастом.

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⁺ клеток - на 1000 μm^2 . Д) Плотность солокализированных Iba1⁺ и CD68⁺ клеток (активированной микроглии) на 1000 μm^2 . Данные представлены как $M \pm \text{SEM}$. Достоверны: * - межлинейные различия, $p < 0,05$; # - изменения с возрастом, $p < 0,05$. GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, ONL – внешний ядерный слой, RPE – ретикулярный пигментный эпителий.

3. 8. 1. Анализ изменений активированных макрофагов в сетчатке крыс

Вистар и OXYS

Для исследования вклада возрастных изменений активированных макрофагов в развитие ретинопатии, было проведено иммуноокрашивание сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста специфичными антителами к CD68, экспрессирующегося на лизосомальной мембране активированных макрофагов.

Как и клетки микроглии, активированные макрофаги (CD68⁺ клетки) детектировались в ганглионарном, внутреннем ядерном, внутреннем сетчатом, наружном сетчатом и наружным ядерном слоях. При этом миграции макрофагов в слой наружных сегментов фоторецепторов у крыс исследуемых возрастных групп не наблюдалась (рис. 15А). Согласно количественному анализу, в возрасте 20 дней у крыс OXYS число активированных макрофагов было достоверно ниже, чем у Вистар ($F_{1,35}=7,151$, $p<0,05$) (рис. 15Г). К 3 месяцам у крыс Вистар происходило постепенное повышение числа CD68⁺ клеток ($p<0,01$) и в 18 мес. количество активированных макрофагов выше, чем в возрасте 3 мес. ($p<0,01$) (рис. 15Г). У крыс OXYS происходит постепенное повышение количества активированных макрофагов с возраста 20 дней до 7 мес., однако в период активной прогрессии ретинопатии у крыс OXYS – с возраста 7 мес. до 18 мес. - достоверных различий не обнаружено.

Исследование распределения активированных макрофагов (CD68⁺ клетки) по слоям сетчатки выявило их наличие преимущественно в ганглионарном, внутреннем ядерном и наружном сетчатом слоях. Мы наблюдали также единичные события во внешнем ядерном слое, и небольшое число активированных макрофагов во внутреннем сетчатом слое (Табл. 2). С возраста 20 дней до 18 мес. у крыс Вистар с нормальном темпом старение происходит перераспределение CD68⁺ клеток в слоях

сетчатки: если в возрасте 20 дней, в период окончания созревания сетчатки, наибольшее число активированных макрофагов ($41,66 \pm 4,2\%$) сосредоточено в ганглионарном слое, а во внешнем сетчатом слое только $33,02 \pm 3,07\%$ $CD68^+$ клеток, то к возрасту 3 месяцев распределение смещается в сторону внешнего сетчатого слоя (Табл. 2; рис. 16А, В). Эта тенденция у крыс Вистар сохраняется и к возрасту 18 месяцев. При этом процент $CD68^+$ клеток во внутреннем ядерном слое сохраняется примерно на уровне 15% с возраста 20 дней до 7 месяцев, и имеет тенденцию к повышению в возрасте 18 мес. по сравнению с 20 дневными (Табл. 2; рис. 16Б).

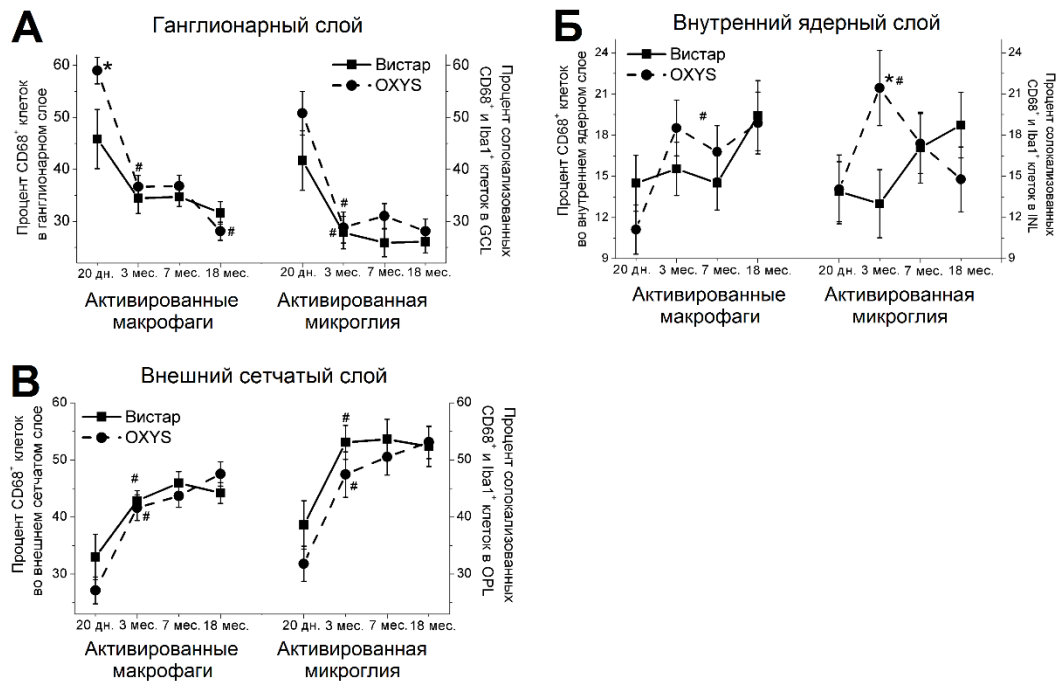


Рис. 16 . Количество активированных макрофагов ($CD68^+$ клетки) и клеток микроглии ($CD68^+$ и $Iba1^+$ клетки) в ганглионарном (А), внутреннем ядерном (Б) и во внешнем сетчатом (В) слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как $M \pm SEM$. Достоверны: * - межлинейные различия, $p < 0,05$; # - изменения с возрастом, $p < 0,05$. GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, OPL – внешний сетчатый слой.

У крыс OXYS к моменту окончания созревания сетчатки наблюдается тенденция, аналогичная крысам Вистар, однако процент CD68⁺ клеток в ганглионарном слое у крыс OXYS достоверно выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,001$, $F_{1,34} = 14,035$) (рис. 16А). При прогрессии заболевания у крыс OXYS процент активированных макрофагов в ганглионарном слое продолжает достоверно снижаться, и достигает $28,12 \pm 1,76\%$ к возрасту 18 месяцев против $58,98 \pm 2,55\%$ в 20 дней, а во внешнем сетчатом – повышается к возрасту в 18 месяцев по сравнению с возрастом 20 дней (рис. 16А, В; Табл. 2). Во внутреннем ядерном слое у крыс OXYS процент CD68⁺ клеток достоверно повышается с возраста 20 дней до 3 месяцев, оставаясь на этом уровне при прогрессии болезни. При этом мы наблюдаем тенденцию к снижению числа активированных макрофагов в ганглионарном слое у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в возрасте 18 мес ($p = 0,078$) (Табл. 2, рис. 16А).

Таблица 2. Процент CD68⁺ клеток в разных слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS.

Линия	Возраст	GCL	IPL	INL	OPL	ONL
Вистар	20 дней	41,66±4,2	5,15±1,36	14,5±2,04	33,02±3,07	0
Вистар	3 мес.	34,45±2,92	6,73±1,13	15,56±1,95	42,84±1,79[#]	0,64±0,38
Вистар	7 мес.	34,74±1,9	3,37±0,82[#]	14,51±1,98	45,94±2,00	1,19±0,50
Вистар	18 мес.	31,64±2,16^{&}	4,05±1,07	19,43±2,56	44,22±1,22^{&}	0,67±0,47
OXYS	20 дней	58,98±2,55[*]	1,73±0,74[*]	11,12±1,79	27,15±2,35	0,55±0,38
OXYS	3 мес.	36,65±2,16[#]	2,86±0,7[*]	18,52±2,04[#]	41,63±2,25[#]	0
OXYS	7 мес.	36,08±2,09	0,67±0,39[*]	16,79±1,91	43,69±1,98	1,67±0,52
OXYS	18 мес.	28,12±1,76^{#+}	4,13±1,02[#]	18,89±2,26	47,55±2,10^{&}	1,03±0,49

Данные представлены как $M \pm SEM$. Различия достоверны: * - по сравнению с крысами Вистар одного возраста, $p < 0,05$; #- по сравнению с предыдущим возрастом

одной линии $p < 0,05$; ^ - сравнению с возрастом 3 мес. одной линии, $p < 0,05$; & - по сравнению с возрастом 20 дней одной линии $p < 0,05$; + - тенденция между линиями ($0,05 < p < 0,1$). Условные обозначения: GCL – ганглионарный слой, IPL – внутренний сетчатый слой, INL – внутренний ядерный слой, OPL – внешний сетчатый слой, ONL – внешний ядерный слой.

3. 8. 2. Анализ распределения активированных клеток микроглии в сетчатке крыс Вистар и OXYS

Для определения иммунного статуса микроглии было проведено совместное иммуногистохимическое окрашивание маркера микроглии Iba1 с маркером активированных макрофагов CD68 в сетчатки крыс OXYS и Вистар разного возраста. Процент солокализованных Iba1⁺ и CD68⁺ клеток от общего числа CD68⁺ клеток был на достаточно высоком уровне, в пределах от 61% до 73% во всех исследуемых группах, и не изменялся с возрастом у крыс OXYS и Вистар, что свидетельствует о том, что большинство активированных макрофагов в сетчатки являются микроглиальными клетками.

Распределение клеток активированной микроглии (Iba1⁺ и CD68⁺ клеток) в слоях сетчатки аналогично распределению активированных макрофагов у обеих линий животных: в возрасте 20 дней клеток активированной микроглии расположены преимущественно в ганглионарном слое, при этом у OXYS процент достоверно выше, чем у Вистар ($p < 0,05$, $F_{1,34} = 4,79$). К возрасту 3 мес. у крыс Вистар и OXYS процент клеток активированной микроглии достоверно снижается в ганглионарном слое по сравнению с 20-дневными животными, и достигает примерно одного уровня в 27-28%, в дальнейшем не изменяясь с возрастом (рис. 16А). При этом с возраста 20 дней до 3 мес. у крыс Вистар и OXYS возрастает

процент клеток активированной микроглии во внешнем сетчатом слое ($p < 0,01$) (рис. 16B). Во внутреннем ядерном слое у крыс Вистар не наблюдается изменений с возрастом, а у крыс OXYS происходит резкое увеличение процента клеток активированной микроглии в период манифестации первых признаков ретинопатии – в возрасте 3 мес., обнаружены достоверные межвозрастные ($p < 0,05$, $F_{1,45}=3,91$) и межлинейные различия ($p < 0,05$, $F_{1,47}=5,22$) (рис. 16B; Табл. 3).

Таблица. 3. Процент клеток активированной микроглии ($CD68^+$ и $Iba1^+$ клеток) в разных слоях сетчатки крыс Вистар и OXYS.

Линия	Возраст	GCL	IPL	INL	OPL	ONL
Вистар	20 дней	37,21±3,82	4,85±1,41	13,89±2,19	38,61±4,64	0,95±0,95
Вистар	3 мес.	27,85±3,11[#]	5,81±1,40	13,00±2,48	53,08±2,7[#]	0,26±0,26
Вистар	7 мес.	25,89±2,69	2,75±1,98	17,09±2,59	53,65±3,45	0,64±0,50
Вистар	18 мес.	26,08±2,14	3,43±1,29	18,73±2,39	52,34±3,50	0
OXYS	20 дней	50,78±4,18[*]	2,20±1,10	14,05±2,51	31,83±31,07	0,76±0,52
OXYS	3 мес.	28,83±2,98[#]	2,98±1,17[*]	21,44±2,74^{*#}	47,45±3,99[#]	0
OXYS	7 мес.	31,05±2,40	0,22±0,22[*]	17,39±2,19	50,52±3,18	0,81±0,57
OXYS	18 мес.	28,13±2,35[#]	2,27±0,82	14,77±2,37[^]	53,11±2,87	0,86±0,86

Данные представлены как $M \pm SEM$. Условные обозначения: GCL – ганглионарный слой, IPL – внутренний сетчатый слой, INL – внутренний ядерный слой, OPL – внешний сетчатый слой, ONL – внешний ядерный слой. Различия достоверны: * - по сравнению с крысами Вистар одного возраста, $p < 0,05$; #- по сравнению с предыдущим возрастом одной линии $p < 0,05$.

3. 9. Исследование изменения 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; Fernández-Sánchez et al., 2015).

Для оценки вклада астроцитов и клеток Мюллера в развитие ретинопатии у крыс OXYS исследовали изменения с возрастом белков GFAP и виментина. Согласно данным Вестерн блот анализа в возрасте 20 дней у крыс OXYS экспрессия белка GFAP была значительно ниже ($p < 0,05$), а в 7 мес. - выше ($p < 0,05$) чем у крыс Вистар (рис. 17Б, В).

Иммуногистохимическое окрашивание выявило флуоресцентное свечение виментина (маркера клеток Мюллера) в ганглионарном слое у крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, частично солокализованного 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 солокализация и прорастание GFAP/виментин⁺ апикальных глиальных отростков до внешнего ядерного слоя, что свидетельствует об ярко выраженной активации астроцитов и клеток Мюллера и, как следствие, глиоза, начиная с возраста 7 мес. (рис. 17А).

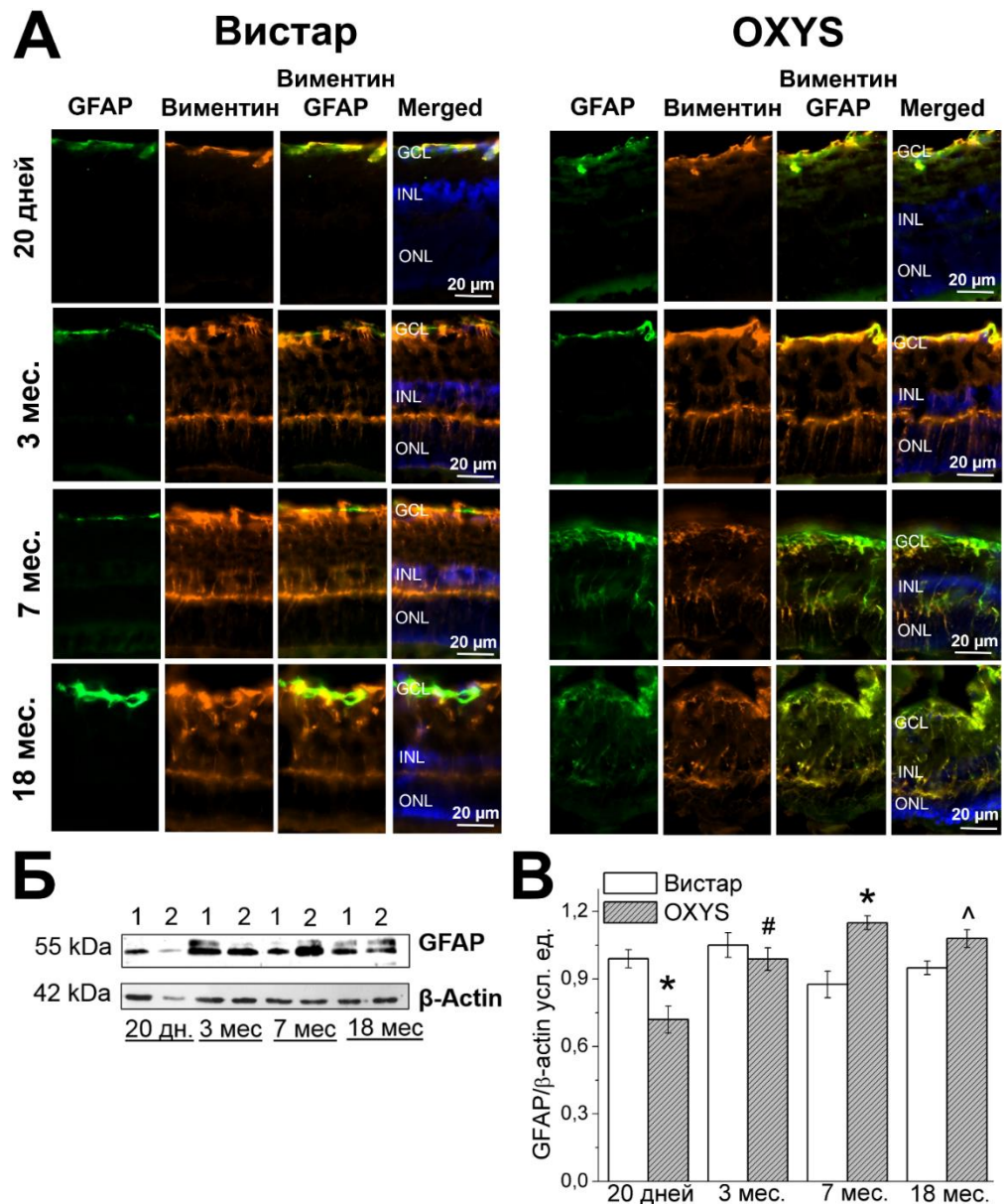


Рис. 17. Экспрессия белков GFAP и виментина в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. А) окрашивание сетчатки антителами к GFAP (зеленый) и виментину (оранжевый), и их солокализация. Ядра окрашены DAPI (синий). Вестер-блот анализ уровня GFAP: Б) крысы Вистар - полоса 1, OXYS - полоса 2; В) количественный анализ результатов. Данные представлены как $M \pm SEM$. Достоверны: * - межлинейные различия, $p < 0,05$; # - изменения с возрастом, $p < 0,05$, \wedge - тенденция по сравнению с крысами Вистар одного возраста, $0,1 < p < 0,05$. GCL – ганглионарный слой, INL – внутренний ядерный слой, ONL – внешний ядерный слой.

У крыс Вистар во всех исследованных возрастах GFAP детектировался только в ганглионарном слое, частично соклокализированный с виментином, при этом в возрасте 18 мес. обнаружена небольшая частичная активация клеток Мюллера (рис. 17А). Отсутствие активации макроглии в период манифестации клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS, возможно, связано с недостаточной реактивностью иммунной системы.

3. 10. Изменение уровня мРНК *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* в сетчатке крыс OXYS при манифестации и прогрессии ретинопатии

Активированные клетки микроглии, астроциты и клетки Мюллера способны экспрессировать целый комплекс нейротоксических и нейротрофических посредников, в том числе - оксид азота (NO) (Saijo et al., 2011). Как недостаток, так и избыточная генерация NO вносят вклад в патогенез связанных со старением заболеваний, в том числе – ВМД. Результатом избыточной продукция NO становятся усиление генерации активных форм кислорода и нитрозилирования белков, оказывающие токсическое действие на нейроны (Bringmann et al., 2009). NO синтезируется синтазами оксида азота (NOS). Известны три изоформы NOS, и все они генерируют NO каталитической конверсией аргинина в цитруллин. Эндотелиальная (eNOS) и нейронная (nNOS) синтазы конститутивно генерируют небольшое количество NO, выполняющего роль сигнальной молекулы; для их активации необходимы кальций и кальмодулин. Индуцибельная iNOS не зависит от кальция и кальмодулина, её экспрессия многократно усиливается в патологических условиях.

Анализ экспрессии генов *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* был проведен с помощью метода ПЦР-РВ. Данные представлены как отношение соответствующего уровня мРНК *NOSs* крыс OXYS к уровню РНК *NOSs* крыс Вистар (рис. 18А).

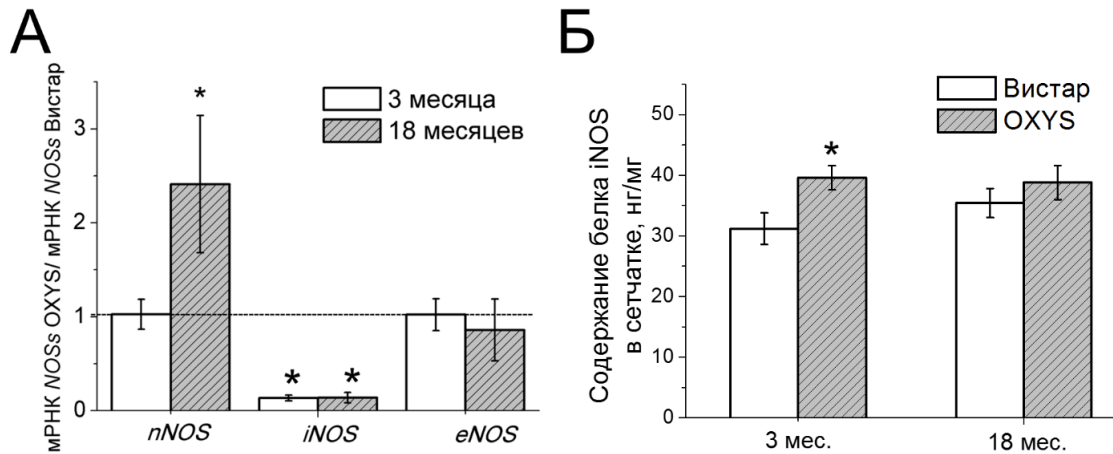


Рис. 18. А) Отношение экспрессии мРНК генов *nNOS*, *iNOS* и *eNOS* в сетчатке крыс Вистар и крыс OXYS в возрасте 3 и 18 месяцев. Данные получены методом ПЦР-РВ. Пунктирной линией отмечен уровень экспрессии мРНК *NOSs* крыс Вистар, принятый за единицу. Б) Содержание белка *iNOS* в сетчатке крыс Вистар и OXYS в возрасте 3 и 18 мес. Данные представлены как $M \pm SEM$. Различия достоверны: * - по сравнению с крысами Вистар одного возраста, $p < 0,05$.

Статистический анализ показал, что наиболее существенные межлинейные различия имеются в уровне мРНК гена *iNOS*. Независимо от возраста и выраженности патологических изменений уровень мРНК этого гена в сетчатке крыс OXYS был в семь раз ниже, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$).

Межлинейные отличия в уровнях мРНК гена *nNOS* в возрасте 3 месяцев отсутствовали, а в возрасте 18 месяцев уровень мРНК *nNOS* у крыс OXYS был в 2,4 раза выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$) (рис. 18 А). Достоверных различий в уровне экспрессии гена *eNOS* не выявлено. Эти данные подтвердили результаты

секвенирования транскриптома сетчатки, полученного ранее (Kozhevnikova et al. 2013).

3. 11. Содержание белка iNOS в сетчатке в возрасте 3 и 18 месяцев крыс OXYS и Вистар

Поскольку наиболее яркие различия уровня мРНК были получены для гена *iNOS*, было оценено содержание белка iNOS в сетчатке методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Двухфакторный анализ (ANOVA) показал, что содержания белка iNOS в сетчатке не зависит от возраста, но зависит от генотипа животных: достоверно выше у крыс OXYS ($F_{1,35}=5,35$, $p<0,05$). Однако значимые межлинейные различия были выявлены только у трехмесячных животных. *Post-hoc* сравнения показали, что в этом возрасте у крыс OXYS удельное количество белка iNOS в 1,3 раза выше, чем у крыс Вистар: 39,5 против 31 нг/мг ($F_{1,17}=6,34$, $p<0,05$). В возрасте 18 месяцев достоверных отличий в содержании белка iNOS между крысами OXYS и Вистар не выявлено (рис. 18Б).

Возможно, такая парадоксальная ситуация отражает характерное для крыс OXYS снижение реактивности иммунной системы.

ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Старение и возрастные заболевания связаны с изменениями в экспрессии многих генов. На сегодня исследования транскриптома - наиболее распространенный и продуктивный подход к их выявлению. Анализ результатов проводится с привлечением биоинформатических подходов и позволяет устанавливать конкретные молекулярно-генетические механизмы, определяющие развитие заболевания, а также выявлять новые гены-мишени для терапевтических воздействий, об участии которых в этиологии и патогенезе заболевания было ранее неизвестно, или таких, которые были недостаточно исследованы. Проведение таких исследований на людях крайне проблематично, особенно на ранних стадиях заболеваний, предшествующих манифестации их клинических проявлений. Закономерно, что исследование молекулярно-генетических предпосылок развития у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД, мы начали с анализа транскриптома сетчатки 20-дневных животных, в период завершения постнатального развития органа зрения, когда у крыс OXYS клинические проявления ВМД отсутствуют (Markovets et al., 2011a).

4.1. Сравнительный анализ транскриптома сетчатки 20-дневных крыс

OXYS и Вистар

Принципиально важно, что уже в возрасте 20 дней экспрессия 245 генов в сетчатке крыс OXYS отличалась от таковой у контрольных крыс Вистар. Уровень мРНК большинства ДЭ генов с измененной экспрессией более чем в 2 раза (cutoff >2,0-fold) был у крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар. Это позволило предположить, что у крыс OXYS может быть изменена транскрипционная регуляция процесса

развития, но следует отметить, что такая тенденция – преобладание среди ДЭ генов с пониженной экспрессией – сохранялась и в возрасте 3 и 18 мес.

Развитие сетчатки представляет собой сложный процесс, включающий дифференцировку 6 типов клеток – глии, нейронов и фоторецепторов, а также создание специфических нейронных путей, формирование функциональных синапсов и сосудистых сплетений (Grün, 2012). Среди генов, уровень мРНК которых в сетчатке 20-дневных крыс OXYS изменен, были гены, продукты которых связаны с процессами развития и дифференцировки клеток. Можно полагать, что выявленные нами изменения в экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS в доклинический период могут лежать в основе развития и прогрессии ретинопатии в более позднем возрасте.

4.2. Изменения экспрессии генов, ассоциированных с клеточной гибелью с возрастом и при развитии ретинопатии

Определение путей гибели клеток в сетчатке при физиологическом старении крыс Вистар и при развитии у крыс OXYS ретинопатии явилось основной целью настоящего исследования. Мы установили, что самой высокой активностью апоптоза в сетчатке была в возрасте 20 дней как у крыс OXYS, так и у крыс Вистар. При этом только в этом возрасте, когда клинические признаки ретинопатии у крыс OXYS отсутствуют, количество TUNEL⁺ клеток у них было в 1,5 раза больше, чем у крыс Вистар. В возрасте 3 и 18 мес. случаи регистрации TUNEL⁺ клеток в сетчатке OXYS и Вистар были единичными (рис. 10). Таким образом, в период активной манифестации ретинопатии (3 мес) и прогрессии заболевания (18 мес) число апоптотических клеток в сетчатке крыс OXYS не отличалось от уровня крыс Вистар.

Анализ особенностей профиля экспрессии генов апоптоза у крыс OXYS и Вистар разного возраста показал, что во-первых, независимо от возраста большинство ДЭ генов, вовлеченных в пути клеточной гибели, имели в сетчатке крыс OXYS сниженный по сравнению с крысами Вистар уровень мРНК. Во-вторых, сравнение данных RNA-Seq крыс в возрасте 20 дней, 3 и 18 мес. показало, что каждый этап развития ретинопатии характеризуется характерным для него набором ДЭ генов, ассоциированных с гибелью клеток. Но при этом, несмотря на такие различия, мы обнаружили, что большинство ДЭ генов, которые связаны с апоптозом в сетчатке крыс OXYS всех возрастных групп участвуют во внешнем пути апоптоза (Приложение 3).

Программируемая клеточная гибель является необходимым условием для нормального развития сетчатки и мозга. Апоптоз - это основной механизм поддержания клеточного гомеостаза при развитии сетчатки, он обеспечивает отбор и элиминацию избыточно образованных нейронов, способствует адекватному нейрогенезу. В период эмбрионального развития выделяют три этапа гибели клеток сетчатки: первый связан с морфогенезом зрительного пузыря, второй - с пролиферацией и нейрогенезом клеток сетчатки и прорастанием их отростков, и третий, осуществляющий редукцию дифференцированных нейронов (Grün, 2012). В период раннего постнатального развития апоптоз рассматривается как элемент становления пластичности формирующихся нервных связей (Gregory-Evans, 2013). Нарушения в сигнальном пути клеточной гибели на ранних стадиях развития способствуют развитию многих заболеваний, связанных с потерей зрения (таких, как дистрофия сетчатки и ретинопатия недоношенных) (Valenciano et al., 2009). Возможно, выявленные нами изменения в регуляции апоптоза в сетчатке в период

завершения ее развития в раннем онтогенезе, в том числе - снижение экспрессии мРНК ряда генов, вовлеченных в процессы регуляции программируемой клеточной гибели у крыс OXYS, способствуют развитию у них признаков ВМД уже к возрасту 3 мес.

Анализ показал, что общими для всех трех возрастных групп животных явились различия в уровне мРНК гена *Lig4* – ДНК-лигазы 4 (рис. 6Б), участвующей в репарации двухцепочечных разрывов ДНК через путь NHEJ (соединение негомологичных концов) (Jeppesen et al., 2011). Экспрессия мРНК *Lig4* у крыс OXYS снижена в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев. Известно, что изменения экспрессии *Lig4* приводит к аномальной репарации ДНК через NHEJ. Если нерепарированные двухцепочечные разрывы являются триггером апоптоза (через ATM–ATR сигнальный путь), то репарация их является в свою очередь очень важным антиапоптозным механизмом. Тем не менее путь NHEJ происходит преимущественно в G1 фазе клеточного цикла и подвержен ошибкам, и, как считается, ответственен за образование хромосомных перестроек. На сегодняшний день существует гипотеза, согласно которой репарация ДНК через NHEJ путь может спровоцировать апоптоз (Roos et al., 2013). Известно, что с возрастом происходит накопление окислительных повреждений ДНК и понижение репарационных возможностей клеток, потенциально усиливающее клеточную гибель через апоптотический путь (Roos et al., 2013). Подавление системы репарации одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК характерно для многих нейродегенеративных заболеваний, в том числе - для ВМД (Tokarz et al., 2013) и болезни Альцгеймера (Santos et al., 2013). Показано, что для мышей с дефектным NHEJ путем также характерно ускоренное старение (Jeppesen et al., 2011). Известно

также, что при дефиците DNA-Lig4 (синдром Lig4) наблюдается ряд симптомов, основным из которых является иммунодефицит (Singh et al., 2014). Ранее на основании анализа данных RNA-seq сетчатки было установлено, что уже в возрасте 3 месяцев у крыс OXYS существенно подавлен иммунный ответ и активность цитокинов (Kozhevnikova et al., 2013).

В ассоциативной сети 20-дневных животных центральной вершиной является ген *Rasal* (экспрессия снижена у крыс OXYS), который, согласно GO относится к категории «нейрональный апоптотический процесс» (табл. 4). Ген *Rasal* является известным негативным регулятором Ras-пути через усиление активности белка GAP (GTPase activating proteins) (Kawasaki et al., 2014). Линия мышей, дефицитных по гену *Rasal*, характеризуется гибелью нейрональных клеток, дезорганизацией сосудов и высокой эмбриональной смертностью (Henkemeyer et al., 1995).

Наиболее существенные изменения в уровне экспрессии генов, вовлеченных в процессы регуляции клеточной гибели, были обнаружены в сетчатке 3-месячных крыс OXYS. GO аннотация для центральных вершин (*Casp1*, *Casp12*, *Casp6*, *cFLAR*, *Birc3*, *Casp7*, *Nfkb1a*, *Casp14*) определила их так: «позитивная регуляция нейронального апоптотического процесса», «некроптотический процесс», «фаза экзекуции апоптоза», «апоптотические митохондриальные изменения», «внутренний путь апоптоза» (табл. 4). Одной из таких вершин является клеточный FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme), который представляет собой ингибиторный белок (c-flip, cFLAR), контролирующей активацию инициаторных каспаз, способный также подавлять апоптоз, индуцированный цитокинами и химиотерапией (Safa et al., 2013). Его экспрессия у крыс OXYS снижена. Кроме того cFLAR играет важную роль в некроптозе (Tenev et al., 2011; Feoktistova et al., 2011)

и аутофагии (Lee et al., 2009). На культурах ARPE-19 клеток показано, что экзогенный TNF-а усиливает экспрессию cFLAR через PI3 путь, что свидетельствует о том, что cFLAR является одним из факторов, определяющих судьбу клеток РПЭ в условиях повышенной экспрессии TNF-а (Zhang et al., 2003). Известно также, что устойчивые к TNF-а-опосредованному апоптозу клетки РПЭ имеют низкий уровень экспрессии каспазы-8 и высокий уровень экспрессии cFLAR (Zhang et al., 2002; Yang et al., 2005).

Birc3 относится к семейству белков ингибиторов апоптоза (IAPs) и выполняет различные биологические функции: регулирует апоптоз, внутренний иммунный ответ и воспаление, миграцию и пролиферацию клеток. Birc3 может связываться с эффекторными каспазами 3 и 7, способствуя их протеосомной деградации (Choi et al., 2009). Известно также, что Birc3 способен активировать E3-зависимым способом NF-кВ сигнальный путь, который приводит к повышению экспрессии молекул провыживания (Estornes et al., 2014). Кроме того, Birc3 защищает клетки от смерти, регулируя активность RIPK 1 и RIPK 3 (Berthelet et al., 2013). Сниженная экспрессия *Birc3* и *cFLAR* в сетчатке 3-месячных крыс OXYS, как и снижение экспрессии *RIPK3*, косвенно указывает на нарушение регуляции процессов клеточной гибели.

В возрасте 18 мес. центральные гены располагаются в первых трех кластерах (рис. 8B). Анализ категорий генных онтологий определил, что вершины (*Cdk1*, *Hspa1b*, *ErbB3*, *Ntf3*) включены в следующие категории: «нейрональная смерть» и «внешний апоптотический сигнальный путь» (приложение 4). Один из центральных генов *Cdk1* (циклин-зависимая киназа 1) - ключевой регулятор митотического перехода. Активация киназы происходит в период начала митоза, а инактивация - в его конце (Potapova et al., 2009). Исследования также показали способность Cdk1 в

комплексе с циклином В1 стимулировать клеточную гибель через непосредственное фосфорилирование белков Bcl-2, Bcl-X1 и Mcl1-1 (Potapova et al., 2009; Harley et al., 2010). Изменение его экспрессии у 18 мес. крыс OXYS может быть связано с гиперплазией РПЭ (пролиферация мелких клеток в центре сетчатки), являющейся следствием фиброза ткани.

Антиапоптотический эффект члена семейства белков теплового шока Hspa1b (Hsp70.1) обусловлен его способностью защищать клетки от большего количества проапоптотических стимулов и регулировать индукцию апоптоза, подавляя высвобождение Smac, цитохрома с и AIF из митохондрий, активацию каспазы 3 и 9 и, выход катепсинов (Terrano et al., 2010). Регулировать как выживание, так и гибель клеток способен нейротрофин 3 (Ntf3), связывающийся в сетчатке преимущественно с рецептором TrkC, который экспрессируется фоторецепторами и клетками Мюллера. Trk рецепторы преимущественно отвечают за созревание нейротрофинов, способствуют выживаемости и дифференцировке нейронов, а также синаптической функции (Jiang et al., 2011). Недавно было показано, что в отсутствие лиганда рецептор TrkC способен индуцировать апоптоз в различных клеточных линиях (Friedman et al., 2010). Кроме того, в отличие от зрелых нейротрофинов, их предшественники способны опосредовать апоптотический эффект через комплекс с p75NTR и сортилин. Эти рецепторы преимущественно находятся в клетках Мюллера (Ichim et al., 2012; Shen et al., 2013).

Таким образом, мы провели анализ транскриптома на доклинической стадии ретинопатии и выявили снижение экспрессии генов из сигнальных путей, регулирующих процесс развития сетчатки. Исследование путей гибели клеток на разных стадиях развития ретинопатии у крыс OXYS с помощью методов системной

биологии позволили нам установить, что несмотря на устойчивое представление о том, что гибель клеток при ВМД происходит путем апоптоза, у крыс OXYS наблюдается снижение экспрессии генов, участвующих в апоптозе как на доклинической стадии заболевания, так и во время манифестации первых признаков и прогрессии заболевания.

4.3. Изменения механизмов клеточной гибели в сетчатке крыс OXYS и Вистар с возрастом

Апоптоз и аутофагия - это два наиболее важных типа клеточной гибели, поддерживающие нормальное функционирование ткани. Исследования показали, что для нормального развития мозга и сетчатки необходима не только элиминация нейронов через процесс апоптоза, но и активация аутофагии (Gregory-Evans et al., 2013). Так, например, мыши – нокауты *Atg5*^{-/-} (участника элонгации аутофагии) погибают через 24 часа после рождения, при этом число TUNEL⁺ клеток у них в 7-8 раз выше в ганглионарном и внешнем ядерном слоях во время эмбриогенеза (Qu et al., 2007).

Как обсуждалось выше, анализ транскриптома выявил межлинейные различия в экспрессии генов-регуляторов клеточной гибели только для пути апоптоза. Отсутствие обогащенных категорий генных онтологий и KEGG путей аутофагии и некроптоза может свидетельствовать о преимущественной регуляции этих процессов на трансляционном уровне.

Аутофагия способствует нейрогенезу, обеспечивая энергией клетку за счет рециркуляции аминокислот в цикле Кребса (Boya et al., 2008), а нарушение механизма аутофагии связано с патогенезом ВМД (Kaarniranta et al., 2013). Так как нейроны и фоторецепторы являются постмитотическими и высоко

специализированными клетками организма, они более чувствительны к токсическим эффектам поврежденных белков и органелл. В нейронах аутофагия является важным инструментом для удаления поврежденных компонентов клетки и сохранения гомеостаза ткани (Boya, 2012), в фоторецепторах аутофагия способна защищать клетки от светового повреждения (Chen et al., 2013), а в РПЭ аутофагия, помимо описанных выше функций, выполняет также и цитопротективную роль (Herrero-Martín et al., 2009). Сетчатка - самая метаболически активная ткань организма с высоким уровнем окислительного стресса. Ряд авторов предполагает, что после окончания постнатального развития нейроны и фоторецепторы становятся устойчивыми к проапоптотическим стимулам (Doonan et al., 2012). Анализ транскриптома выявил изменения с возрастом экспрессии генов, связанных с механизмом аутофагии: 11 генов у крыс OXYS и 8 - у крыс Вистар (рис. 9). При этом обнаружено повышение уровня мРНК генов, регулирующих элонгацию и созревание аутофагосом у крыс OXYS и Вистар - *Atg3*, *Atg5* и *Atg12*, что может свидетельствовать о закономерном усилении аутофагии к возрасту 3 мес. у крыс обеих линий. У крыс OXYS и Вистар к возрасту 3 мес. наблюдается изменение уровня мРНК генов, регулирующих внешний и внутренний пути апоптоза, а также резкое снижение апоптотических клеток в сетчатке. В целом такие результаты дают основание полагать, что с возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар происходит усиление аутофагии и снижение апоптоза.

Основным ингибитором аутофагии является mTOR-сигнальный путь (Meijer et al., 2015). Ранее было показано, что прием ингибитора mTOR сигнального пути рапамацина в период активной манифестации ретинопатии у крыс OXYS (с 1,5 до 3

мес.) существенно подавляет у них развитие заболевания (Kolossova et al., 2012), можно полагать, и за счет активации аутофагии.

В настоящем исследовании мы показали, что для крыс OXYS характерно повышение экспрессии 4 генов-регуляторов аутофагии: 1) *Atg14* - одного из ферментов, активирующего формирование комплекса PIK3 и генерацию фосфоинозитол-3-фосфата, необходимого для ранних стадий формирования аутофагосомы; 2) *Atg8* – один из ключевых белков, подвергающийся убиквитин-подобной реакции и необходимый для формирования аутофагосомы; 3) *Atg4c* – одной из цистеиновых протеаз, расщепляющей проLC3 до LC3-1, и регулирующей стадию формирования аутофагосомы (Arachiche et al., 2015), и 4) *Atg16l2* – малоизученной изоформы гена *Atg16*, предположительно, одного из возможных регуляторов эффективности аутофагии, при образовании *Atg5-Atg12-Atg16* комплекса (Ishibashi et al., 2012). Увеличение уровня мРНК этих генов у крыс OXYS к возрасту 3 мес. может свидетельствовать об усилении формирования и созревания аутофагосом, что, возможно, связано с усилением аутофагии в ответ на накопление поврежденных органелл на ранней стадии ретинопатии (Mitter et al., 2014), или о компенсаторной реакции в ответ на снижение уровня аутофагии. Ранее сообщалось об повышении экспрессии маркеров аутофагии *Atg12-Atg5*, *LC3*, *Atg7* и *Atg9* в клетках РПЭ, мембране Бруха и нейрональных слоях сетчатки на ранних стадиях ретинопатии (Wang et al., 2009).

Стоит отметить, что усиление аутофагии является характерной реакцией нейронов на стресс и различные воздействия, такие, как ишемия или токсины, и часто способствует восстановлению гомеостаза (Sridhar et al., 2012). Тем не менее, ряд авторов отмечает, что чрезмерное усиление аутофагии может быть опасным для

нейронов (Russo et al., 2011). Кроме того, недавние исследования показали, что при определенных условиях аутофагосомы могут стать источником активных форм кислорода и тем самым усугублять нейротоксичность (Kubota et al., 2010).

Изменения процесса аутофагии на разных стадиях развития нейродегенеративных изменений может иметь неодинаковые причины и последствия. Так, увеличение скорости инициации аутофагии происходит в ответ на стрессовые сигналы, в то время как снижение скорости формирования аутофагосом приводит к накоплению белковых агрегатов и поврежденных органелл (Levine et al., 2008). Обнаруженные нами изменения экспрессии специфичных генов аутофагии у крыс OXYS свидетельствуют об изменении регуляции стадии как формирования, так и элонгации аутофагосом, что согласуется с данными других авторов (рис. 11). Так, показано, что нарушение аутофагии в сетчатке мышей при старении происходит на стадии формирования аутофагосом, а не деградации. Примечательно, что авторы этой работы обнаружили признаки нарушения процесса аутофагии у мышей в возрасте 12 мес., до выявления признаков дегенеративных изменений сетчатки (Rodríguez-Muela et al., 2013), что свидетельствует об активации с возрастом компенсаторных механизмов, таких как шаперон-опосредованная аутофагия. Результаты анализа изменений транскриптома сетчатки с возраста 20 дней до 3 мес. позволяют заключить, что при развитии клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS происходят компенсаторные изменения элонгации и формирования аутофагосом.

Несмотря на то, что программируемый некроз начал исследоваться относительно недавно, уже получены доказательства его участия в патогенезе ряда связанных с возрастом заболеваний глаз, в том числе - ВМД (Murakami et al, 2013).

Установлено, что рецептор-взаимодействующий белок (RIP) опосредует некроз и усиливает воспаление в мышечной модели дегенерации сетчатки, индуцированной dsRNA (компонент друз при ВМД) (Murakami et al, 2014). С помощью гистологического и ультраструктурного анализа было показано, что клетки РПЭ при ВМД вырождаются путем некроза (Yam et al., 2014). Инициация некроза в клетках приводит к морфологическим изменениям, разрыву мембраны и к выходу из клеток цитоплазматического содержимого, которое провоцирует активацию системы комплимента, индуцируя локальное воспаление (Anand, 2014). Высвобождающиеся при этом гистоны впоследствии входят в состав друз (Ambati, 2013). Эти события приводит к атрофии клеток РПЭ, а затем и к географической атрофии. В ряде работ на основании исследования ответа клеток РПЭ на окислительный стресс *in vitro* высказывается предположение, что некроз - основной механизм их гибели (Hanus et al, 2013; Li et al, 2010).

Анализ транскриптома выявил изменение экспрессии генов из пути программируемого некроза у крыс Вистар и OXYS с возраста 20 дней до 3 мес., при этом повышена экспрессия как активаторов, так и ингибиторов (рис. 9). Согласно иммуногистохимическому анализу белков-регуляторов некроптоза RIPK1 и RIPK3, белок RIPK1 присутствует в фоторецепторном слое сетчатки начиная с 20 дневного возраста у крыс обеих линий (рис. 12). Белок RIPK1 участвует в формировании комплекса I TNF-R1. Комплекс I может способствовать эффективной активации пути NF- κ B (Ashkenazi et al., 2014), а также участвует в запуске апоптоза или некроптоза в зависимости от условий среды (Singh et al., 2015). К возрасту 3 мес. у крыс OXYS происходит накопление белков RIPK1 и RIPK3 в ганглионарном слое, а к возрасту 18 мес. все эти изменения у крыс OXYS усиливаются, что может

свидетельствовать о гибели ганглионарных нейронов путем некроптоза при развитии ретинопатии. У крыс Вистар подобные изменения наблюдаются только в возрасте 18 мес (рис. 12).

В сетчатке фоторецепторы передают сигнал интернейронам, а те, в свою очередь, ганглионарным нейронам, аксоны которых формируют зрительный нерв. Механизмы гибели ганглионарных клеток мало изучены, тем не менее известна роль деривации нейротрофических факторов, усиление окислительного стресса и эксайтотоксичности в запуске этого процесса (Okamoto et al., 2009). Ранее проведенные гистологические исследования показали, что в возрасте 3 мес. в сетчатке крыс OXYS повышено по сравнению с крысами Вистар количество патологически измененных ганглионарных клеток (с пикнотическими ядрами и общим хроматолизом) (Kolosova et al., 2012). Гибель ганглионарных нейронов в сетчатке и атрофия зрительного нерва являются отличительными признаками ряда заболеваний, связанных с митохондриальными нарушениями (Geisler et al., 2010). Именно ганглионарные нейроны сетчатки становятся основной мишенью при митохондриальной дисфункции, которая рассматривается нами как одна из наиболее вероятных причин преждевременного старения и развития нейродегенеративных заболеваний у крыс OXYS.

Накопление белка RIPK3 в ганглионарном слое сетчатки выявлено при ишемическом повреждении (Rosenbaum et al., 2010; Ding et al., 2015), как и его солокализация в ганглионарных нейронах с RIPK1 (Dvorianchikova et al., 2014). На одной из моделей ВМД показано повышение экспрессии RIPK3 при дегенерации сетчатки (Murakami et al., 2013) однако большинство авторов склоняется к тому, что при развитии ВМД программируемый некроз является основным механизмом

гибели прежде всего клеток РПЭ и впоследствии способствует потере фоторецепторов (Hanus et al., 2015). Мы показали, что при развитии у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, начиная с периода манифестации клинических признаков заболевания гибель ганглионарных нейронов происходит путем программируемого некроза.

4.4. Роль дисфункции клеток РПЭ и глии в развитии ретинопатии у крыс OXYS

Многочисленными исследованиями показано, что нарушение функций клеток РПЭ способствует дегенерации нейронов сетчатки и накоплению гранул липофусцина в друзах и, возможно, является основной причиной развития ВМД (Rickman et al., 2013).

В течение первых двух недель постнатального развития, после завершения пролиферации клеток в РПЭ у грызунов, часть клеток РПЭ подвергается неполному клеточному делению (без цитокинеза), в результате чего образуются двуядерные клетки РПЭ, преимущественно в центральной части (Stroeva et al., 1983). Механизмы и физиологический смысл этого явления не совсем ясны, есть предположение, что образование двуядерных клеток РПЭ связано с ростом глаза или специализацией РПЭ (Stroeva et al., 1983). Показано, что окислительный стресс способствует нарушению цитокинеза и образованию полиплоидных клеток РПЭ (Chen et al., 2016). Мы обнаружили нарушение соотношения моноядерных и двуядерных клеток РПЭ, а также наличие полиплоидных клеток у крыс OXYS начиная с 20-дневного возраста (рис. 13В, Е). Соотношение моно-/двуядерных клеток РПЭ у крыс OXYS остается на более низком, чем у крыс Вистар, уровне и при манифестации, и прогрессии заболевания. В то же время процент полиплоидных клеток РПЭ у крыс OXYS

увеличивается с возрастом и остается выше, чем у крыс Вистар. У крыс Вистар соотношение моно-/двуядерных клеток РПЭ изменяется в том же направлении, но только к 18 мес. достигают уровня 20-дневных крыс OXYS, что позволяет рассматривать их как типичные проявления старения (рис.13В). Можно предположить, что такие изменения отражают нарушение способности к пролиферации клеток РПЭ у крыс OXYS уже в возрасте 20 дней, что, возможно, способствует развитию деструктивных изменений сетчатки к возрасту 3 мес., а затем и их прогрессию с возрастом. Полученные результаты согласуются с данными об увеличении числа полиплоидных клеток РПЭ при исследованиях на животных моделях ВМД (Ding et al., 2011; Seo et al., 2012) и в сетчатки пациентов с ВМД (Al-Hussaini et al., 2008; De et al., 2007).

Известно, что дедифференцировка и гипертрофия клеток РПЭ является реакцией на стресс и впоследствии влечет за собой небольшое деление клеток и, как следствие, увеличение клеточной биомассы и утолщение РПЭ (Zhao et al., 2011). Клетки РПЭ в течение всей жизни способны к пролиферации. При нормальных условиях зрелые клетки РПЭ поддерживаются в состоянии клеточного старения (сенесценса) соседней нейроретиной. Повреждение и отслоение сетчатки приводит к пролиферации клеток РПЭ (Chiba, 2014). Кроме того, РПЭ крыс-альбиносов в большей степени способны к пролиферации из-за отсутствия дофы и мелонина, стимулирующих выход из клеточного цикла (Grant et al., 2001; Roffler-Tarlov et al., 2013; Iwai-Takekoshi et al., 2016), а также благодаря сниженной фагоцитарной нагрузке: у альбиносов внешние сегменты фоторецепторов гораздо меньше, чем у пигментированных животных (Al-Hussaini et al., 2008). Нами обнаружено, что у крыс OXYS в период прогрессии ретинопатии часто рядом с гипертрофированными

клетками РПЭ выявляются регионы с большим количеством мелких пяти- и шестигранных клеток (рис. 14Б, В). Мы интерпретируем пролиферацию мелких клеток в центре сетчатки как явление фиброза - замещения потери клеток РПЭ. Аналогичные локальные изменения - рубцевания - характерны для сетчатки людей с поздними стадиями ВМД (Rickman et al., 2013).

Важно отметить, что манифестация ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне типичных для ВМД атрофических и деструктивных изменений клеток РПЭ - гипертрофии, гиперплазии, нарушения мозаичной структуры – которые усиливаются с возрастом и по мере прогрессии заболевания (рис. 13А; 14Б – Г). Мы полагаем, что атрофия клеток РПЭ становится у крыс OXYS первичным событием в развитии ретинопатии, которое приводит к развитию клинических признаков ВМД к возрасту 3 мес. В пользу этого свидетельствует ранее проведенный ультраструктурный анализ клеток РПЭ. Он показал, что в сетчатке 20-дневных крыс OXYS наряду с нормально функционирующими клетками присутствуют клетки с вакуолями в цитоплазме, с нарушениями микроворсинок, с базальной складчатостью и сниженным количеством фагосом (Markovets et al., 2011a).

Участие глиальных клеток сетчатки – астроцитов, клеток Мюллера и микроглии – в развитии ВМД доказано многочисленными исследованиями. Макроглия в сетчатке включает в себя астроциты и клетки Мюллера, которые помимо трофической функции способствуют контакту между соседними нейронами и участвуют в формировании внешней и внутренней пограничных мембран (Goldman, 2014). В возрасте 20 дней в сетчатке крыс OXYS уровень белка GFAP – маркера астроцитов и клеток Мюллера – был ниже, чем у одновозрастных крыс Вистар. В ранний постнатальный период при завершении развития в сетчатке, как и

ЦНС в целом, происходит элиминация путем апоптоза нейронов, не сформировавших контакты с другими клетками. В данной работе показано, что в возрасте 20 дней в сетчатке крыс OXYS апоптоз усилен, а экспрессия генов (данные RNA-seq), вовлеченных в процессы развития, снижена (рис. 5; рис. 10). Это позволяет предположить, что у крыс OXYS нарушен процесс созревания сетчатки. Выявленные в настоящем исследовании изменения клеток макроглии могут приводить к нарушению трофики и способствовать усиленному апоптозу клеток в сетчатке 20-дневных крыс OXYS (рис. 10).

Многие заболевания сетчатки связаны с глиозом клеток Мюллера и астроцитов (Ardeljan et al., 2013), показано усиление при ВМД экспрессии промежуточных филаментов, в том числе GFAP и виментина, с повышением экспрессии которого ассоциировано образование друз (Wu et al., 2003). Следует подчеркнуть, что усиление экспрессии GFAP используется в качестве индикатора повреждения сетчатки и глиоза (Luna et al., 2010). Мы не выявили активации макроглии в период манифестации клинических признаков ретинопатии у крыс OXYS в возрасте 3 мес., но в период активной прогрессии заболевания – в возрасте 7, и в 18 мес., когда у большинства животных диагностируются изменения, соответствующие 3 стадии ВМД, экспрессия GFAP и виментина в сетчатке была повышена (рис. 17).

Показано, что при здоровом старении клетки микроглии находятся в базальном состоянии активации, имеют повышенные уровни экспрессии компонента главного комплекса гистосовместимости II (MHCII), CD11b, и воспалительных цитокинов (таких как IL1 β , TNF- α , IL6). Активация клеток микроглии, их переход в амeboидное состояние и миграция в фоторецепторный слой

сетчатки, как и миграция хориоидальных макрофагов, способствует хроническому паравоспалению, которое определяется как состояние адаптивного ответа ткани и участвует как в инициации, так и прогрессии ВМД и других нейродегенеративных заболеваний (Xu et al., 2009; Ma et al., 2016; Medzhitov, 2008). Усиленное накопление микроглии в субретинальном пространстве, сопровождающееся дегенеративными изменениями, описанными и на многих мышиных моделях ВМД (Combadiere et al., 2007; Hollyfield et al., 2010; Luhmann et al., 2012; Ufret-Vincenty et al., 2010; Chan et al., 2008). Парадоксально, но мы не наблюдали миграцию активированных макрофагов и клеток микроглии в фоторецепторный слой ни в период манифестации клинических признаков ретинопатии, ни при прогрессии заболевания у крыс OXYS, а на доклинической стадии заболевания – в возрасте 20 дней – в сетчатке крыс OXYS количество активированных макрофагов было меньше, чем у Вистар (рис. 15). С возрастом миграция активированных макрофагов и микроглии во внутренние слои нейроретины усиливалась у крыс обеих линий, но только у крыс OXYS было обнаружено повышение числа активированных клеток микроглии во внутреннем ядерном слое в возрасте 3 мес. – в период активной манифестации клинических признаков ретинопатии (рис. 16Б). Интересно, что только в этом возрасте мы выявили в сетчатке крыс OXYS повышенное содержание белка индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) (рис. 18Б), продуцирующей большое количество оксида азота и участвующей в иммуноопосредованных механизмах. Внутренний ядерный слой содержит тела биполярных, амакриновых, горизонтальных и мюллеровских клеток (рис. 1А). Возможно, усиленная миграция клеток микроглии о внутренний ядерный слой обусловлена тем, что амакриновые и биполярные нейроны - наиболее чувствительные ассоциативные нейроны в сетчатке OXYS и, скорее всего, первыми

подвергаются дегенеративным процессам при развитии ретинопатии, аналогичной ВМД, у крыс OXYS (Zhdankina et al., 2008).

В целом эти, а также ранее полученные данные демонстрируют, что у крыс OXYS ретинопатия, аналогичная ВМД у людей, развивается на фоне дисбаланса иммунного ответа, в том числе и воспаления. Ранее полученные данные секвенирования транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар в возрасте 3 и 18 мес. выявили значительное снижение экспрессии генов, участвующих в регуляции иммунной системы у крыс OXYS, таких как маркеров лейкоцитов, хемокинов, цитокинов, компонентов комплемента, интерферон-индуцибельных белков и МНС (главного компонента гистосовместимости) (Kozhevnikova et al., 2013). Одной из возможных причин дисфункции иммунной системы у крыс OXYS может быть ускоренная инволюция и снижение активности Т-клеточного звена иммунной системы (Obukhova et al., 2009). Прогрессивная инволюция вилочковой железы является отличительным признаком старения и приводит к снижению тех иммунных функций, которые связаны с Т-клеточным звеном иммунитета. Мы предполагаем, что иммунный дисбаланс может создать специфический метаболический фон для развития и прогрессирования ВМД-подобной ретинопатии, а также многих других проявлений ускоренного старения у крыс OXYS.

Таким образом, деструктивные изменения клеток РПЭ первичны при развитии ретинопатии у крыс OXYS. На доклинической стадии развития ретинопатии мы наблюдаем нарушение созревания сетчатки и снижение иммунного ответа у крыс OXYS, а также нарушение пролиферации и способности к делению клеток РПЭ. При прогрессии заболевания у крыс OXYS нарастают атрофические

изменения клеток РПЭ, в период активной прогрессии заболевания наблюдается реактивный глиоз, но сохраняется сниженный иммунный ответ.

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 экспрессии 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жданкина А.А., Кон Г.А., Плотников М.Б., Варакута Е.Ю., Логвинов С.В., Просенко А.Е., Колосова Н.Г. Исследование нейроретинопротекторной активности тиофана при инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS //Бюлл.сибирской медицины. – 2013. – Т. 12. – № 3. – С. 24–31.
2. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей //Генетика. - 1975. - Т.18. - N 5. - С.63-71.
3. Фурсова А. Ж. Хориоретинальная дистрофия: особенности развития у преждевременно стареющих крыс OXYS и её коррекция митохондриальным антиоксидантом: Дис.док. мед. наук. – Новосибирск. – 2009. – 189 с.
4. Ach T., Huisinigh C., McGwin G. J., Messinger J. D., Zhang T., Bentley M. J., Gutierrez D. B., Ablonczy Z., Smith R. T., Sloan K. R., Curcio C. A. Quantitative Autofluorescence and Cell Density Maps of the Human Retinal Pigment EpitheliumRPE Autofluorescence and Cell Density //Investigative ophthalmology & visual science. – 2014. – Т. 55. – №. 8. – С. 4832-4841.
5. Al-Hussaini H., Kam J. H., Vugler A., Semo M. Y., Jeffery G. Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo // Molecular Vision. – 2008. – Vol. 14. – P.1784-91.
6. Ambati J., Atkinson J. P., Gelfand B. D. Immunology of age-related macular degeneration //Nature Reviews Immunology. – 2013. – Т. 13. – №. 6. – С. 438-451.
7. Anand A., Sharma N. K., Singh R., Gupta A., Prabhakar S., Jindal N., Bhatt A. K., Sharma S. K., Gupta P. K. Does DcR1 (TNF-related apoptosis-inducing-ligand Receptor 3) have any role in human AMD pathogenesis? //Scientific reports. – 2014. – Т. 4.

8. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data //Genome biology. – 2010. – T. 11. – №. 10. – C. 1.
9. Arachiche A., Gozuacik D. Regulation of Autophagy in Health and Disease //Toxicity and Autophagy in Neurodegenerative Disorders. – Springer International Publishing, 2015. – P. 1-24.
10. Arango-Gonzalez B., Trifunović D., Sahaboglu A., Kranz K., Michalakis S., Farinelli P., Koch S., Koch F., Cottet S., Janssen-Bienhold U., Dedek K., Biel M., Zrenner E., Euler T., Ekström P., Ueffing M., Paquet-Durand F. Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration //PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – №. 11. – P. e112142.
11. Ardeljan D., Chan C. C. Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging //Progress in retinal and eye research. – 2013. – Vol. 37. – P. 68-89.
12. Arias E., Cuervo A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control // Current opinion in cell biology. – 2011. – Vol. 23. – №. 2. – P. 184-89.
13. Ashkenazi A., Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms //Annual review of cell and developmental biology. – 2014. – Vol. 30. – P. 337-56.
14. Barreto G., E White R., Ouyang Y., Xu L., G Giffard R. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke //Central nervous system agents in medicinal chemistry. – 2011. – Vol. 11. – №. 2. – P. 164.
15. Belecky-Adams T. L., Chernoff E. C., Wilson J. M., Dharmarajan S. Reactive muller glia as potential retinal progenitors. – INTECH Open Access Publisher, 2013.

16. Bergamini E. Autophagy: a cell repair mechanism that retards ageing and age-associated diseases and can be intensified pharmacologically //Molecular aspects of medicine. – 2006. – Vol. 27. – №. 5. – P. 403-410.
17. Berthelet J., Dubrez L. Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs) //Cells. – 2013. – Vol. 2. – №. 1. – P. 163-187.
18. Bhattacharya S., Das A. V., Mallya K. B., Ahmad I. Ciliary Neurotrophic Factor-Mediated Signaling Regulates Neuronal Versus Glial Differentiation of Retinal Stem Cells/Progenitors by Concentration-Dependent Recruitment of Mitogen-Activated Protein Kinase and Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription Pathways in Conjunction with Notch Signaling //Stem Cells. – 2008. – Vol. 26. – №. 10. – P. 2611-24.
19. Bhutto I., Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex //Molecular aspects of medicine. – 2012. – Vol. 33. – №. 4. – P. 295-317.
20. Blasiak J., Petrovski G., Veréb Z., Facskó A., Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration // BioMed research international. – 2014. – Vol. 2014.
21. Bobko A.A., Sergeeva S.V., Bagryanskaya E.G., Markel A.L., Khramtsov V.V., Reznikov V.A., Kolosova N.G. ¹⁹F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and OXYS rats // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2005. - Vol. 330. - P. 367-70.
22. Boya P. Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease //Antioxidants & redox signaling. – 2012. – Vol. 17. – №. 5. – P. 766-774.

23. Boya P., Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death //Oncogene. – 2008. – Vol. 27. – №. 50. – P. 6434-51.
24. Bringmann A., Pannicke T., Grosche J., Francke M., Wiedemann P., Skatchkov S. N., Osborne N. N., Reichenbach A. 1. Müller cells in the healthy and diseased retina //Progress in retinal and eye research. – 2006. – Vol. 25. – №. 4. – P. 397-424.
25. Bringmann A., Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation //Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2009. – Vol. 247. – №. 7. – P. 865-83.
26. Bringmann A., Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease //Ophthalmologica. – 2012. – Vol. 227. – №. 1. – P. 1-19.
27. Cai Z., Jitkaew S., Zhao J., Chiang H. C., Choksi S., Liu J., Ward Y., Wu L. G., Liu Z. G. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis // Nature cell biology. – 2014. – Vol. 16. – №. 1. – P. 55-65.
28. Cardona A. E., Pioro E. P., Sasse M. E., Kostenko V., Cardona S. M., Dijkstra I. M., Huang D., Kidd G., Dombrowski S., Dutta R., Lee J. C., Cook D. N., Jung S., Lira S. A., Littman D. R., Ransohoff R. M. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor //Nature neuroscience. – 2006. – Vol. 9. – №. 7. – P. 917-24.
29. Chan C. C., Ross R. J., Shen D., Ding X., Majumdar Z., Bojanowski C. M., Zhou M., Salem N. Jr., Bonner R., Tuo J. Ccl2/Cx3cr1-deficient mice: an animal model for age-related macular degeneration //Ophthalmic research. – 2008. – Vol. 40. – №. 3-4. – P. 124-28.
30. Chang D. W., Xing Z., Pan Y., Algeciras-Schimnich A., Barnhart B. C., Yaish-Ohad S., Peter M. E., Yang X. c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation

- and CD95-mediated apoptosis //The EMBO journal. – 2002. – Vol. 21. – №. 14. – P. 3704-14.
31. Chen X., Li W., Ren J., Huang D., He W. T., Song Y., Yang C., Li W., Zheng X., Chen P., Han J. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death // Cell research. – 2014. – Vol. 24. – №. 1. – P. 105-121.
32. Chen Y., Sawada O., Kohno H., Le Y. Z., Subauste C., Maeda T., Maeda A. Autophagy protects the retina from light-induced degeneration //Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – №. 11. – P. 7506-7518.
33. Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J. V., & Xu, H. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye—a mechanism to repair damage and maintain homoeostasis// Aging cell. - 2016. – Vol. 15. - №. 3. – P. 436-445.
34. Chiba C. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration //Experimental eye research. – 2014. – Vol. 123. – P. 107-114.
35. Cho, Y., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T. D., Guildford M., Chan F. K. M. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation // Cell. – 2009. – Vol. 137. – №. 6. – P. 1112-23.
36. Choi Y. E., Butterworth M., Malladi S., Duckett C. S., Cohen G. M., Bratton S. B. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 12772-82.
37. Choudhury J. D., Kumar S., Mayank V., Mehta J., Bardalai D. A review on apoptosis and its different pathway //International Journal of Biological and Pharmaceutical Research. – 2012. – Vol. 3. – P. 848-61.

38. Chu X. K., Wang Y., Ardeljan D., Tuo J., Chan C. C. Controversial view of a genetically altered mouse model of focal retinal degeneration //Bioengineered. – 2013. – Vol. 4. – №. 3. – P. 130-5.
39. Combadière C., Feumi C., Raoul W., Keller N., Rodéro M., Pézard A., Lavalette S., Houssier M., Jonet L., Picard E., Debré P., Sirinyan M., Deterre P., Ferroukhi T., Cohen S. Y., Chauvaud D., Jeanny J. C., Chemtob S., Behar-Cohen F., Sennlaub F. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration //The Journal of clinical investigation. – 2007. – Vol. 117. – №. 117 (10). – P. 2920-28.
40. Coorey N. J., Shen W., Chung S. H., Zhu L., Gillies M. C. The role of glia in retinal vascular disease //Clinical and Experimental Optometry. – 2012. – Vol. 95. – №. 3. – P. 266-81.
41. Cruz-Guilloty F., Saeed A. M., Echegaray J. J., Duffort S., Ballmick A., Tan Y., Betancourt M., Viteri E., Ramkellawan G. C., Ewald E., Feuer W., Huang D., Wen R., Hong L., Wang H., Laird J. M., Sene A., Apte R. S., Salomon R. G., Hollyfield J. G., Perez V. L. Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration //International journal of inflammation. – 2013. – Vol. 2013.
42. Cuenca N., Fernández-Sánchez L., Campello L., Maneu V., De la Villa P., Lax P., Pinilla I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases // Progress in retinal and eye research. – 2014. – Vol. 43. – P. 17-75.
43. Cuervo A. M., Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging //Cell research. – 2014. – Vol. 24. – №. 1. – P. 92-104.

44. Curcio C. A. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy //Eye. – 2001. – Vol. 15. – №. 3. – P. 376-83.
45. Curcio C. A., Medeiros N. E., Millican C. L. Photoreceptor loss in age-related macular degeneration //Investigative ophthalmology & visual science. – 1996. – Vol. 37. – №. 7. – P. 1236-49.
46. Czabotar P. E., Lessene G., Strasser A., Adams J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy // Nature reviews Molecular cell biology. – 2014. – Vol. 15. – №. 1. – P. 49-63.
47. Damani M. R., Zhao L., Fontainhas A. M., Amaral J., Fariss R. N., Wong W. T. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia //Aging cell. – 2011. – Vol. 10. – №. 2. – P. 263-76.
48. de Almagro M. C., Vucic D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2015. – Vol. 39. – P. 56-62.
49. De S., Rabin D. M., Salero E., Lederman P. L., Temple S., Stern J. H. Human retinal pigment epithelium cell changes and expression of α B-crystallin: a biomarker for retinal pigment epithelium cell change in age-related macular degeneration //Archives of Ophthalmology. – 2007. – Vol. 125. – №. 5. – P. 641-645.
50. Delbridge A. R. D., Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy // Cell Death & Differentiation. – 2015. – Vol. 22. – №. 7. – P. 1071-80.
51. Ding J. D., Johnson L. V., Herrmann R., Farsiu S., Smith S. G., Groelle M., Mace B. E., Sullivan P., Jamison J. A., Kelly U., Harrabi O., Bollini S. S., Dilley J., Kobayashi D., Kuang B., Li W., Pons J., Lin J. C., Bowes Rickman C. Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related

macular degeneration //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108. – №. 28. – P. E279-E287.

52. Ding W., Shang L., Huang J. F., Li N., Chen D., Xue L. X., Xiong K. Receptor interacting protein 3-induced RGC-5 cell necroptosis following oxygen glucose deprivation //BMC neuroscience. – 2015. – Vol. 16. – №. 1. – P. 49.

53. Dondelinger Y., Declercq W., Montessuit S., Roelandt R., Goncalves A., Bruggeman I., Hulpiau P., Weber K., Sehon C. A., Marquis R. W., Bertin J., Gough P. J., Savvides S., Martinou J. C., Bertrand M. J., Vandenabeele P. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates // Cell reports. – 2014. – Vol. 7. – №. 4. – P. 971-81.

54. Dong K., Sun X. Targeting death receptor induced apoptosis and necroptosis: a novel therapeutic strategy to prevent neuronal damage in retinal detachment //Medical hypotheses. – 2011. – Vol. 77. – №. 1. – P. 144-46.

55. Dong K., Zhu H., Song Z., Gong Y., Wang F., Wang W., Zheng Z., Yu Z., Gu Q., Xu X., Sun X. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment // The American journal of pathology. – 2012. – Vol. 181. – №. 5. – P. 1634-41.

56. Doonan F., Groeger G., Cotter T. G. Preventing retinal apoptosis—Is there a common therapeutic theme? // Experimental cell research. – 2012. – Vol. 318. – №. 11. – P. 1278-84.

57. Dubois-Dauphin M., Poitry-Yamate C., De Bilbao F., Julliard A. K., Jourdan F., Donati G. Early postnatal Müller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice //Neuroscience. – 1999. – Vol. 95. – №. 1. – P. 9-21.

58. Dunaief J. L., Dentchev T., Ying G. S., Milam A. H. The role of apoptosis in age-related macular degeneration // *Archives of ophthalmology*. – 2002. – Vol. 120. – №. 11. – P. 1435-42.
59. Dvorianchikova G., Degterev A., Ivanov D. Retinal ganglion cell (RGC) programmed necrosis contributes to ischemia–reperfusion-induced retinal damage // *Experimental eye research*. – 2014. – Vol. 123. – P. 1-7.
60. Edwards M. M., McLeod D. S., Bhutto I. A., Villalonga M. B., Seddon J. M., Luttly G. A. Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration // *Experimental eye research*. – 2015.
61. Estornes Y., Bertrand M. J. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation // *Semin Cell Dev Biology* . – 2014. – Vol. 39. – P. 1-9.
62. Feigl B. Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis // *Prog Retin Eye Res*. – 2009. – Vol. 28. – P. 63-86.
63. Feoktistova M., Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling // *FEBS Journal*. – 2015. – Vol. 282. – №. 1. – P. 19-31.
64. Fernández-Sánchez L., Lax P., Campello L., Pinilla I., Cuenca N. Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 484.

65. Ferrington D. A., Sinha D., Kaarniranta K. Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration // *Progress in retinal and eye research*. – 2016. – Vol. 51. – P. 69-89.
66. Flusberg D. A., Sorger P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells // *Trends in cell biology*. – 2015. – Vol. 25. – №. 8. – P. 446-458.
67. Friedman W. J. Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis // *The Neuroscientist*. – 2010. – Vol. 16. – №. 3. – P. 244-252.
68. Fritsche L. G., Fariss R. N., Stambolian D., Abecasis G. R., Curcio C. A., Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together // *Annual review of genomics and human genetics*. – 2014. – Vol. 15. – P. 151.
69. Fu R., Shen Q., Xu P., Luo J. J., Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases // *Molecular neurobiology*. – 2014. – Vol. 49. – №. 3. – P. 1422-34.
70. Furukawa T., Mukherjee S., Bao Z. Z., Morrow E. M., Cepko C. L. *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells // *Neuron*. – 2000. – Vol. 26. – №. 2. – P. 383-94.
71. Gallina D., Todd L., Fischer A. J. A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina // *Experimental eye research*. – 2014. – Vol. 123. – P.121-130.
72. Galluzzi L., Vitale I., J M Abrams J. M., E S Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., Dawson V. L., El-Deiry W. S., Fulda S., Gottlieb E., Green D. R., Hengartner M. O., Kepp O., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M. E., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Shi Y., Simon H-U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino

G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 //Cell Death & Differentiation. – 2012. – Vol. 19. – №. 1. – P. 107-20.

73. Ganesh B. S., Chintala S. K. Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells //PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – №. 3. – P. e18305.

74. Gao S., Andreeva K., Cooper N. G. F. Ischemia-reperfusion injury of the retina is linked to necroptosis via the ERK1/2-RIP3 pathway // Molecular vision. – 2014. – Vol. 20. – P. 1374.

75. Geisler S., Holmström K. M., Treis A., Skujat D., Weber S. S., Fiesel F. C., Kahle P. J., Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 //Nature cell biology. – 2010. – Vol. 12. – №. 2. – P. 119-131.

76. German O. L., Agnolazza D. L., Politi L. E., Rotstein N. P. Light, lipids and photoreceptor survival: live or let die? // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2015. – Vol. 14. – №. 9. – P. 1737-53.

77. Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S., Jangamreddy J. R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A. R., Kashani H. H., Hashemi M., Owji A. A., Los M. J. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders // Progress in neurobiology. – 2014. – Vol. 112. – P. 24-49.

78. Goldman D. Muller glial cell reprogramming and retina regeneration //Nature Reviews Neuroscience. – 2014. – Vol. 15. – №. 7. – P. 431-42.

79. Grant S., Patel N. N., Philp A. R., Grey C. N., Lucas R. D., Foster R. G., Bowmaker J. K., Jeffery G. Rod photopigment deficits in albinos are specific to mammals and arise during retinal development //Visual neuroscience. – 2001. – Vol. 18. – №. 02. – P. 245-251.

80. Gregory-Evans C. Y., Wallace V. A., Gregory-Evans K. Gene networks: dissecting pathways in retinal development and disease // *Prog Retin Eye Res.* – 2013. – Vol. 33. - P. 40-66.
81. Grisanti S., Tatar O. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration // *Progress in retinal and eye research.* – 2008. – T. 27. – №. 4. – C. 372-390.
82. Grün G. The development of the vertebrate retina: a comparative survey // *Adv Anat Embryol Cell Biol.* – 2012. - Vol. 78. – P.1-85.
83. Gupta N., Brown K. E., Milam A. H. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration // *Experimental eye research.* – 2003. – Vol. 76. – №. 4. – P. 463-71.
84. Hadziahmetovic M., Dentchev T., Song Y., Haddad N., He X., Hahn P., Pratico D., Wen R., Harris Z. L., Lambris J. D., Beard J., Dunaief J. L. Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2008. – Vol. 49. – №. 6. – P. 2728-36.
85. Hageman G.S., Luthert P.J., Victor Chong N.H., Johnson L.V., Anderson D.H., Mullins R.F. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration // *Prog. Retin. Eye. Res.* - 2001. - Vol. 20. - P. 705-32.
86. Hahn P., Qian Y., Dentchev T., Chen L., Beard J., Harris Z. L., Dunaief J. L. Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2004. – Vol. 101. – №. 38. – P. 13850-55.

87. Halaby R. Does apoptosis regulate the function of retinal photoreceptors? // *Medical Hypothesis, Discovery and Innovation in Ophthalmology*. – 2012. – Vol. 1. – №. 2. – P. 21.
88. Hanus J., Anderson C., Wang S. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD // *Ageing Research Reviews*. – 2015. – Vol. 24. – P. 286-98.
89. Hanus J., Zhang H., Wang Z., Liu Q., Zhou Q., Wang S. Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells // *Cell death & disease*. – 2013. – Vol. 4. – №. 12. – P. e965.
90. Harberts E., Fischelevich R., Liu J., Atamas S., Gaspari A. MyD88 plays a role in deciding between apoptotic and necroptotic cell death after UV irradiation (P1238) // *The Journal of Immunology*. – 2013. – T. 190. – №. Meeting Abstracts 1. – C. 138.17.
91. Harley M. E., Allan L. A., Sanderson H. S., Clarke P. R. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1–cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest // *EMBO J*. – 2010. – Vol. 29. – P. 2407-20.
92. Henkemeyer M., Rossi D. J., Holmyard D. P., Puri M. C., Mbamalu G., Harpal K., Shih T. S., Jacks T., Pawson T. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein // *Nature*. – 1995. – Vol. 377. – P. 695-701.
93. Herrero-Martín G., Høyer-Hansen M., García-García C., Fumarola C., Farkas T., López-Rivas A., Jäättelä M. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells // *The EMBO journal*. – 2009. – Vol. 28. – №. 6. – P. 677-685.
94. Hippert C., Graca A. B., Barber A. C., West E. L., Smith A. J., Ali R. R., Pearson R. A. Müller Glia Activation in Response to Inherited Retinal Degeneration Is Highly Varied and Disease-Specific // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – №. 3. – P. e0120415.

95. Hisatomi T., Sakamoto T., Murata T., Yamanaka I., Oshima Y., Hata Y., Ishibashi T., Inomata H., Susin S. A., Kroemer G. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo // *The American journal of pathology*. – 2001. – Vol. 158. – №. 4. – P. 1271-78.
96. Hol E. M., Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system // *Current opinion in cell biology*. – 2015. – Vol. 32. – P. 121-130.
97. Hollyfield J. G., Bonilha V. L., Rayborn M. E., Yang X. Shadrach K. G., Lu L., Ufret R. L., Salomon R. G., Perez V. L. Oxidative damage–induced inflammation initiates age-related macular degeneration // *Nature medicine*. – 2008. – T. 14. – №. 2. – C. 194-98.
98. Hollyfield J. G., Perez V. L., Salomon R. G. A hapten generated from an oxidation fragment of docosahexaenoic acid is sufficient to initiate age-related macular degeneration // *Molecular neurobiology*. – 2010. – Vol. 41. – №. 2-3. – P. 290-98.
99. Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // *Nature protocols*. – 2009. – T. 4. – №. 1. – C. 44-57.
100. Hurley J. B., Chertov A. O., Lindsay K., Giamarco M., Cleghorn W., Du J., Brockerhoff S. Energy metabolism in the vertebrate retina // *Vertebrate Photoreceptors*. – Springer Japan, 2014. – P. 91-137.
101. Ichim G., Tauszig-Delamasure S., Mehlen P. Neurotrophins and cell death // *Experimental cell research*. – 2012. – T. 318. – №. 11. – C. 1221-1228.
102. Ishibashi K., Uemura T., Waguri S., Fukuda M. Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, participates in hormone secretion from PC12 cells independently of

autophagic activity //Molecular biology of the cell. – 2012. – Vol. 23. – №. 16. – P. 3193-3202.

103. Iwai-Takekoshi L., Ramos A., Schaler A., Weinreb S., Blazeski R., Mason C. Retinal pigment epithelial integrity is compromised in the developing albino mouse retina //Journal of Comparative Neurology. – 2016.

104. Jadhav A. P., Cho S. H., Cepko C. L. Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103. – №. 50. – P. 18998-19003.

105. Jadhav A. P., Roesch K., Cepko C. L. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina //Progress in retinal and eye research. – 2009. – Vol. 28. – №. 4. – P. 249-62.

106. Jeppesen D. K., Bohr V. A., Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration // Prog Neurobiol. – 2011. – Vol. 94. P. 166-200.

107. Jessen K. R. Glial cells //The international journal of biochemistry & cell biology. – 2004. – Vol. 36. – №. 10. – P. 1861-67.

108. Jiang B., Liang P., Deng G., Tu Z., Liu M., Xiao X. Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress // Cell Stress Chaperones. – 2011. – Vol. 16. – P. 143-52.

109. Kaarniranta K., Sinha D., Blasiak J., Kauppinen A., Veréb Z., Salminen A., Boulton M. E., Petrovski G. Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration //Autophagy. – 2013. – Vol. 9. – №. 7. – P. 973-84.

110. Karlstetter M., Ebert S., Langmann T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models //Immunobiology. – 2010. – Vol. 215. – №. 9. – P. 685-91.
111. Karlstetter M., Nothdurfter C., Aslanidis A., Moeller K., Horn F., Scholz R., Neumann H., Weber B. H., Rupprecht R., Langmann T. Translocator protein (18 kDa)(TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis //Journal of neuroinflammation. – 2014. – Vol. 11. – №. 1. – P. 3.
112. Karlstetter M., Scholz R., Rutar M., Wong W. T., Provis J. M., Langmann T. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? //Progress in retinal and eye research. – 2015. – Vol. 45. – P.30-57.
113. Kaufmann T., Strasser A., Jost P. J. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP // Cell Death & Differentiation. – 2012. – Vol. 19. – №. 1. – P. 42-50.
114. Kawasaki J., Aegerter S., Fevurly R. D., Mammoto A., Mammoto T., Sahin M., Mably J. D., Fishman S. J., Chan J. RASA1 functions in EPHB4 signaling pathway to suppress endothelial mTORC1 activity // J Clin Invest . – 2014. – Vol. 124. – P. 2774-84.
115. Kettenmann H., Hanisch U. K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia //Physiological reviews. – 2011. – Vol. 91. – №. 2. – P. 461-553.
116. Khan N., Lawlor K. E., Murphy J. M., Vince J. E. More to life than death: molecular determinants of necroptotic and non-necroptotic RIP3 kinase signaling //Current opinion in immunology. – 2014. – Vol. 26. – P. 76-89.
117. Kilbride S. M., Prehn J. H. M. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function //Oncogene. – 2013. – T. 32. – №. 22. – C. 2703-2711.

118. Kim J. H., Kim J. H., Park J., Lee S. W., Kim W. J., Yu Y. S., Kim K. W. Blood-neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface //BMB Reports. – 2006. – Vol. 39. – №. 4. – P. 339-45.
119. Klettner A., Kauppinen A., Blasiak J., Roeder J., Salminen A., Kaarniranta K. Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration: from impaired autophagy to neovascularization //The international journal of biochemistry & cell biology. – 2013. – T. 45. – №. 7. – C. 1457-67.
120. Kolomeyer A. M., Zarbin M. A. Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases //survey of ophthalmology. – 2014. – Vol. 59. – №. 2. – P. 134-65.
121. Kolosova N. G., Muraleva N. A., Zhdankina A. A., Stefanova N. A., Fursova A. Z., Blagosklonny M. V. Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in Rats //The American journal of pathology. – 2012. – T. 181. – №. 2. – C. 472-477.
122. Kolosova N. G., Stefanova N. A., Korbolina E. E., Fursova A. Z., Kozhevnikova O. S. Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases //Advances in Gerontology. – 2014. – T. 4. – №. 4. – C. 294-298.
123. Kozhevnikova O.S., Korbolina E.E., Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy // Cell Cycle. – 2013. – V.12. – N.11. – P.1745–1761.
124. Kruger N. J. The Bradford method for protein quantitation// The protein protocols handbook. – 2009. – P. 17-24.
125. Kubota C., Torii S., Hou N., Saito N., Yoshimoto Y., Imai H., Takeuchi T. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in

neuronal oxidative toxicity //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – №. 1. – P. 667-74.

126. Kumar S., Fu Y. Age Related Macular Degeneration: a Complex Pathology //Austin J Genet Genomic Res. – 2014. – Vol. 1. – №. 1. – P. 5.

127. Kur J., Newman E. A., Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease //Progress in retinal and eye research. – 2012. – Vol. 31. – №. 5. – P. 377-406.

128. Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration //Journal of leukocyte biology. – 2007. – Vol. 81. – №. 6. – P. 1345-51.

129. Lapaquette P., Guzzo J., Bretillon L., Bringer M. A. Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation // Mediators of inflammation. – 2015. – Vol. 2015.

130. Lapierre L. R., Kumsta C., Sandri M., Ballabio A., Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging //Autophagy. – 2015. – Vol. 11. – №. 6. – P. 867-80.

131. LaVail M. M., Gorrin G. M., Yasumura D., Matthes M. T. Increased susceptibility to constant light in nr and pcd mice with inherited retinal degenerations // Investigative ophthalmology & visual science. – 1999. – Vol. 40. – №. 5. – P. 1020-24.

132. Lavrik I. N. Systems biology of death receptor networks: live and let die //Cell death & disease. – 2014. – Vol. 5. – №. 5. – P. e1259.

133. Lavrik I., Golks A., Krammer P. H. Death receptor signaling //Journal of cell science. – 2005. – Vol. 118. – №. 2. – P. 265-67.

134. Lee J. S., Li Q., Lee J. Y., Lee S. H., Jeong J. H., Lee H. R., Chang H., Zhou F. C., Gao S. J., Liang C., Jung J. U. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control // *Nat Cell Biol.* – 2009. – Vol. 11. – P. 1355-62.
135. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease // *Cell.* – 2008. – Vol. 132. – №. 1. – P. 27-42.
136. Li F., Cao W., Anderson R. E. Alleviation of Constant-Light-Induced Photoreceptor Degeneration by Adaptation of Adult Albino Rat to Bright Cyclic Light // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2003. – Vol. 44. – №. 11. – P. 4968-75.
137. Li G. Y., Fan B., Zheng Y. C. Calcium overload is a critical step in programmed necrosis of ARPE-19 cells induced by high-concentration H₂O₂ // *Biomedical and Environmental Sciences.* – 2010. – T. 23. – №. 5. – C. 371.
138. Li W. Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration // *Ageing research reviews.* – 2013. – Vol. 12. – №. 4. – P. 1005-12.
139. Li W., Li J., Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2012. – Vol. 69. – №. 7. – P. 1125-36.
140. Li W., Yang Q., Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2011. – Vol. 68. – №. 5. – P. 749-763.
141. Liang K. J., Lee J. E., Wang Y. D., Ma W., Fontainhas A. M., Fariss R. N., Wong W. T. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2009. – Vol. 50. – №. 9. – P. 4444.
142. Liang X., Chen Y., Zhang L., Jiang F., Wang W., Ye Z., Liu S., Yu C., Shi W. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to renal epithelial

cell damage in an ATP-depleted renal ischemia model //Molecular medicine reports. – 2014. – Vol. 10. – №. 2. – P. 719-24.

143. Liu N. S., Du X., Lu J., He B. P. Diva reduces cell death in response to oxidative stress and cytotoxicity //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 8. – C. e43180.

144. Lohr H. R., Kuntchithapautham K., Sharma A. K., Rohrer B. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death // Experimental eye research. – 2006. – Vol. 83. – №. 2. – P. 380-89.

145. Luhmann U. F., Lange C. A., Robbie S., Munro P. M., Cowing J. A., Armer H. E., Luong V., Carvalho L. S., MacLaren R. E., Fitzke F. W., Bainbridge J. W., Ali R. R. Differential modulation of retinal degeneration by Ccl2 and Cx3cr1 chemokine signalling //PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – №. 4. – P. e35551.

146. Luhmann U. F., Robbie S., Munro P. M., Barker S. E., Duran Y., Luong V., Fitzke F. W., Bainbridge J. W., Ali R. R., MacLaren R. E. The drusen-like phenotype in aging Ccl2 knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages //Investigative ophthalmology & visual science. – 2009. – Vol. 50. – №. 12. – P. 5934.

147. Luna G., Lewis G. P., Banna C. D., Skalli O., Fisher S. K. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin //Molecular vision. – 2010. – Vol. 16. – P. 2511.

148. Ma W., Coon S., Zhao L., Fariss R. N., Wong W. T. A2E accumulation influences retinal microglial activation and complement regulation //Neurobiology of aging. – 2013. – Vol. 34. – №. 3. – P. 943-60.

149. Ma W., Wong W. T. Aging Changes in Retinal Microglia and their Relevance to Age-related Retinal Disease //Retinal Degenerative Diseases. – Springer International Publishing, 2016. – P. 73-78.
150. Ma W., Zhao L., Fontainhas A. M., Fariss R. N., Wong W. T. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD //PloS one. – 2009. – Vol. 4. – №. 11. – P. e7945.
151. Ma W., Zhao L., Wong W. T. Microglia in the outer retina and their relevance to pathogenesis of age-related macular degeneration //Retinal Degenerative Diseases. – Springer US, 2012. – P.37-42.
152. Maeda H., Ogata N., Yi X., Takeuchi M., Ohkuma H., Uyama M. Apoptosis of photoreceptor cells in ornithine-induced retinopathy //Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology. – 1998. – Vol. 236. – №. 3. – P. 207-12.
153. Markovets A. M., Saprunova V. B., Zhdankina A. A., Fursova A. Zh., Bakeeva L. E.,d Kolosova N. G. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // Aging (Albany NY). – 2011a. - Vol. 3. - P. 44–54.
154. Markovets A.M., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression // PloS One. – 2011b. – N. 6(7):e21682
155. Martinou J. C., Youle R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics //Developmental cell. – 2011. – Vol. 21. – №. 1. – P. 92-101.
156. Mattapallil M. J., Wawrousek E. F., Chan C. C., Zhao H., Roychoudhury J., Ferguson T. A., Caspi R. R. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant

- phenotypes // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2012. – Vol. 53. – №. 6. – P. 2921.
157. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation // *Nature*. – 2008. – Vol. 454. – №. 7203. – P. 428-435.
158. Meijer A. J., Lorin S., Blommaert E. F., Codogno P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction // *Amino acids*. – 2015. – Vol. 47. – №. 10. – P. 2037-63.
159. Minagawa K., Katayama Y., Matsui T. TFL, a hidden post-transcriptional modulator behind inflammation // *Inflammation and Cell Signaling*. – 2014. – T. 1. – №. 3.
160. Mitter S. K., Song C., Qi X., Mao H., Rao H., Akin D., Lewin A., Grant M., Dunn W. Jr., Ding J., Bowes Rickman C., Boulton M. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD // *Autophagy*. – 2014. – Vol. 10. – №. 11. – P. 1989-2005.
161. Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues // *Cell*. – 2011. – Vol. 147. – №. 4. – P. 728-41.
162. Murakami Y., Matsumoto H., Roh M., Giani A., Kataoka K., Morizane Y., Kayama M., Thanos A., Nakatake S., Notomi S., Hisatomi T., Ikeda Y., Ishibashi T., Connor K. M., Miller J. W., Vavvas D. G. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration // *Cell Death & Differentiation*. – 2014. – Vol. 21. – №. 2. – P. 270-7.
163. Murakami Y., Notomi S., Hisatomi T., Nakazawa T., Ishibashi T., Miller J. W., Vavvas D. G. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations // *Progress in retinal and eye research*. – 2013. – Vol. 37. – P. 114-40.

164. Nair P., Lu M., Petersen S., Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway // *Methods Enzymol.* – 2014. – Vol. 544. – P. 99-128.
165. Nakazawa T., Takeda M., Lewis G. P., Cho K. S., Jiao J., Wilhelmsson U., Fisher S. K., Pekny M., Chen D. F., Miller J. W. 1. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin // *Investigative ophthalmology & visual science.* – 2007. – Vol. 48. – №. 6. – P. 2760.
166. Neroev V.V., Archipova M.M., Bakeeva L.E., Fursova A.Zh., Grigorian E.N., Grishanova A.Y., Iomdina E.N., Ivashchenko Zh.N., Katargina L.A., Khoroshilova-Maslova I.P., Kilina O.V., Kolosova N.G., Kopenkin E.P., Korshunov S.S., Kovaleva N.A., Novikova Y.P., Philippov P.P., Pilipenko D.I., Robustova O.V., Saprunova V.B., Senin I.I., Skulachev M.V., Sotnikova L.F., Stefanova N.A. Tikhomirova N.K., Tsapenko I.V., Shchipanova A.I., Zinovkin R.A., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of aging program. 4. Age-related eye diseases. SkQ1 returns vision to blind animals // *Biochemistry (Mosc).* - 2008. - V. 73. - P. 1317-28.
167. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – №. 5726. – P. 1314-18.
168. Noda N. N., Inagaki F. Mechanisms of autophagy // *Annual review of biophysics.* – 2015. – Vol. 44. – p. 101-122.
169. Nowak J. Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy // *Pharm. Reports.* - 2006. - Vol. 58. - P. 353-63.

170. Obukhova L.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats // *Aging*. - 2009. - Vol. 1. - P. 389-401.
171. Ohsawa K., Imai Y., Sasaki Y., Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity // *Journal of neurochemistry*. – 2004. – T. 88. – №. 4. – C. 844-856.
172. Okamoto K., Kondo-Okamoto N., Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy // *Developmental cell*. – 2009. – T. 17. – №. 1. – C. 87-97.
173. Olson N., van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease // *Nitric Oxide*. - 2011. - Vol. 25. - P.125-37.
174. Organisciak D. T., Vaughan D. K. Retinal light damage: mechanisms and protection // *Progress in retinal and eye research*. – 2010. – Vol. 29. – №. 2. – P. 113-34.
175. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 315–424.
176. Paglinawan R., Malipiero U., Schlapbach R., Frei K., Reith W., Fontana A. TGF β directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes // *Glia*. – 2003. – Vol. 44. – №. 3. – P. 219-31.
177. Penfold P.L., Liew S.C., Madigan M.C., Provis J.M. Modulation of major histocompatibility complex class II expression in retinas with age-related macular degeneration // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 1997. - Vol. 38. - P. 2125-33.

178. Pennesi M. E., Neuringer M., Courtney R. J. Animal models of age related macular degeneration //Molecular aspects of medicine. – 2012. – Vol. 33. – №. 4. – P. 487-509.
179. Perry V. H., Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – Vol. 35. – №. 5. – P. 601-12.
180. Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR //Nucleic acids research. – 2002. – Vol. 30. – №. 9. – P. e36-e36.
181. Polazzi E., Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications //Progress in neurobiology. – 2010. – Vol. 92. – №. 3. – P. 293-315.
182. Polster B. M. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a “complex” problem //Neurochemistry international. – 2013. – Vol. 62. – №. 5. – P. 695-702.
183. Potapova T. A., Daum J. R., Byrd K. S., Gorbsky G. J. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit // Mol Biol Cell. – 2009. – Vol. 20. – P. 1737-48.
184. Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R. N., Gilpin C., Levine B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development //Cell. – 2007. – Vol. 128. – №. 5. – P. 931-946.
185. Rattner A., Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities //Nature Reviews Neuroscience. – 2006. – Vol. 7. – №. 11. – P. 860-872.
186. Reichenbach A., Bringmann A. New functions of Müller cells //Glia. – 2013. – Vol. 61. – №. 5. – P. 651-78.

187. Reme C. E., Grimm C., Hafezi F., Iseli H. P., Wenzel A. Why study rod cell death in retinal degenerations and how? // *Documenta ophthalmologica*. – 2003. – Vol. 106. – №. 1. – P. 25-29.
188. Reme C. E., Grimm C., Hafezi F., Marti A., Wenzel A. Apoptotic cell death in retinal degenerations // *Progress in retinal and eye research*. – 1998. – Vol. 17. – №. 4. – P. 443-64.
189. Reme C. E., Grimm C., Hafezi F., Wenzel A., Williams T. P. Apoptosis in the retina: the silent death of vision // *Physiology*. – 2000. – Vol. 15. – №. 3. – P. 120-4.
190. Rickman C. B., Farsiu S., Toth C. A., Klingeborn M. Dry Age-Related Macular Degeneration: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Imaging // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2013. – Vol. 54. – №. 14. – P. ORSF68-ORSF80.
191. Rocchi A., He C. Emerging roles of autophagy in metabolism and metabolic disorders // *Frontiers in Biology*. – 2015. – Vol. 10. – №. 2. – P. 154-64.
192. Rodríguez-Muela N., Koga H., García-Ledo L., Villa P., Rosa E. J., Cuervo A. M., Boya P. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis // *Aging cell*. – 2013. – Vol. 12. – №. 3. – P. 478-88.
193. Roffler-Tarlov S., Liu J. H., Naumova E. N., Bernal-Ayala M. M., Mason C. A. L-Dopa and the albino riddle: content of L-Dopa in the developing retina of pigmented and albino mice // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – №. 3. – P. e57184.
194. Roos W. P., Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis // *Cancer Lett*. – 2013. – Vol. 332. – P. 237-48.
195. Rosenbaum D. M., Degterev A., David J., Rosenbaum P. S., Roth S., Grotta J. C., Cuny G. D., Yuan J., Savitz S. I. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell

- death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model //Journal of neuroscience research. – 2010. – Vol. 88. – №. 7. – P. 1569-76.
196. Rossi D. Astrocyte physiopathology: at the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death //Progress in neurobiology. – 2015. – Vol. 130. – P. 86-120.
197. Russo R., Berliocchi L., Adornetto A., Varano G. P., Cavaliere F., Nucci C., Rotiroti D., Morrone L. A., Bagetta G., Corasaniti M. T. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo //Cell death & disease. – 2011. – Vol. 2. – №. 4. – P. e144.
198. Safa A. R. Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy //Journal of carcinogenesis & mutagenesis. – 2013. – Vol. Suppl 6. - P. 003.
199. Sahu R., Kaushik S., Clement C. C., Cannizzo E. S., Scharf B., Follenzi A., Potalicchio I., Nieves E., Cuervo A. M., Santambrogio L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes //Developmental cell. – 2011. – Vol. 20. – №. 1. – P. 131-39.
200. Saijo K., Glass C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease //Nature Reviews Immunology. – 2011. – Vol. 11. – №. 11. – P. 775-87.
201. Salganik R.I., Shabalina I.G., Solovyova N.A., Kolosova N.G., Solovyov V.N., Kolpakov A.R. Impairment of respiratory functions in mitochondria of rats with an inherited hyperproduction of free radicals // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1994. - Vol. 205. - P.180-85.
202. Santos A. M., Martín-Oliva D., Ferrer-Martín R. M., Tassi M., Calvente R., Sierra A., Carrasco M. C., Marín-Teva J. L., Navascués J., Cuadros M. A. Microglial response to light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina //Journal of Comparative Neurology. – 2010. – Vol. 518. – №. 4. – P. 477-92.

203. Santos R. X., Correia S. C., Zhu X., Smith M. A., Moreira P. I., Castellani R. J., Nunomura A., Perry G. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease // *Antioxid Redox Signal* . – 2013. – Vol. 18. P. 2444-57.
204. Saprunova V.B., Pilipenko D.I., Alexeevsky A.V., Fursova A.Zh., Kolosovs N.G, Bakeeva L.E. Lipofuscin granule dynamics during the development of age-related macular degeneration // *Biochemistry (Mosc)*. - 2010. - V. 75. - P. 130-38.
205. Sarthy P.V., Fu M. Transcriptional activation of an intermediate filament protein gene in mice with retinal dystrophy // *Dna*. – 1989. – Vol. 8. – №. 6. – P. 437-46.
206. Schey K. L., Wang Z., Wenke J. L., Qi Y. Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2014. – Vol. 1840. – №. 5. – P. 1513-23.
207. Seo S. J., Krebs M. P., Mao H., Jones K., Connors M., Lewin A. S. Pathological consequences of long-term mitochondrial oxidative stress in the mouse retinal pigment epithelium // *Experimental eye research*. – 2012. – Vol. 101. – P. 60-71.
208. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases // *Cell Death & Differentiation*. – 2015. – Vol. 22. – №. 4. – P. 526-39.
209. Shen W., Zhu L., Lee S. R., Chung S. H., Gillies M. C. Involvement of NT3 and P75NTR in photoreceptor degeneration following selective Müller cell ablation // *J Neuroinflammation*. – 2013. – Vol. 10. – P. 137.
210. Sheridan G. K., Murphy K. J. Neuron–glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage // *Open biology*. – 2013. – Vol. 3. – №. 12. – P. 130181.

211. Shibutani S. T., Saitoh T., Nowag H., Münz C., Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system // *Nature Immunology*. – 2015. – Vol. 16. – №. 10. – P. 1014-24.
212. Shimizu S., Yoshida T., Tsujioka M., Arakawa S. Autophagic cell death and cancer // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – Vol. 15. – №. 2. – P. 3145-53.
213. Singh D. K., Krishna S., Chandra S., Shameem M., Deshmukh A. L., Banerjee D. Human DNA ligases: A comprehensive new look for cancer therapy // *Med Res Rev*. – 2014. – Vol. 34. P. 567-95.
214. Singh N., Bose K. Apoptosis: Pathways, Molecules and beyond // *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*. – Springer International Publishing, 2015. – P. 1-30.
215. Sridhar S., Botbol Y., Macian F., Cuervo A. M. Autophagy and disease: always two sides to a problem // *The Journal of pathology*. – 2012. – Vol. 226. – №. 2. – P. 255-273.
216. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // *Physiological reviews*. – 2005. – Vol. 85. – №. 3. – P. 845-81.
217. Stroeveva O. G., Mitashov V. I. Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration // *International review of cytology*. – 1983. – Vol. 83. – P. 221.
218. Szaboa D.J., Toth M., Doro Z., Nagymihaly R., Josifovska N., Facsko A., Petrovskia G. Cell death, clearance and inflammation: molecular crossroads and gene polymorphisms in the pathogenesis of age-related macular degeneration // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*. – 2014 - Vol. 2. – P. 132-43.

219. Tenev T., Bianchi K., Darding M., Broemer M., Langlais C., Wallberg F., Zachariou A., Lopez J., MacFarlane M., Cain K., Meier P. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. // *Mol Cell*. – 2011. – Vol. 43. – P. 432-48.
220. Terrano D. T., Upreti M., Chambers T. C. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis // *Mol Cell Biol*. – 2010. – Vol. 30. – P. 640-56.
221. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes // *Apoptosis*. – 2008. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1-9.
222. Todde V., Veenhuis M., Van Der Klei I. J. Autophagy: principles and significance in health and disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2009. – Vol. 1792. – №. 1. – P. 3-13.
223. Tokarz P., Kauppinen A., Kaarniranta K. A., Blasiak J. Oxidative DNA Damage and Proteostasis in Age-Related Macular Degeneration // *J Biochem Pharmacol Res*. – 2013. – Vol. 1. – P. 106-13.
224. Tomita H., Kotake Y., Anderson R. E. Mechanism of protection from light-induced retinal degeneration by the synthetic antioxidant phenyl-N-tert-butyl nitron // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2005. – Vol. 46. – №. 2. – P. 427-34.
225. Tower J. Programmed cell death in aging // *Ageing research reviews*. – 2015. – Vol. 23. – P. 90-100.
226. Trichonas G., Murakami Y., Thanos A., Morizane Y., Kayama M., Debouck C. M., Hisatomi T., Miller J. W., Vavvas D. G. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of

apoptosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107. – №. 50. – P. 21695-700.

227. Troutbeck R., Al-Qureshi S., Guymer R. H. Therapeutic targeting of the complement system in age-related macular degeneration: a review //Clinical & experimental ophthalmology. – 2012. – Vol. 40. – №. 1. – P. 18-26.

228. Ufret-Vincenty R. L., Aredo B., Liu X., McMahon A., Chen P. W., Sun H., Niederkorn J. Y., Kedzierski W. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings //Investigative ophthalmology & visual science. – 2010. – Vol. 51. – №. 11. – P. 5878-87.

229. Valenciano A. I., Boya P., de la Rosa E. J. Early neuronal cell death: numbers and cues from the developing neuroretina // Int J Dev Biol. – 2009. – Vol. 53. – P. 1515-28.

230. van Lookeren Campagne M., LeCouter J., Yaspan B. L., Ye W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities// The Journal of pathology. – 2014. – Vol. 232. – №. 2. – P. 151-164.

231. Vecino E., Rodríguez F. D., Ruzafa N., Pereiro X., Sharma S. C. Glia–neuron interactions in the mammalian retina //Progress in retinal and eye research. – 2016. – Vol. 51. – P. 1-40.

232. Verkhatsky A., Rodríguez J. J., Parpura V. Neuroglia in ageing and disease //Cell and tissue research. – 2014. – Vol. 357. – №. 2. – P. 493-503.

233. Viringipurampeer I. A., Shan X., Gregory-Evans K., Zhang J. P., Mohammadi Z., Gregory-Evans C. Y. Rip3 knockdown rescues photoreceptor cell death in blind pde6c zebrafish // Cell Death & Differentiation. – 2014. – Vol. 21. – №. 5. – P. 665-75.

234. Vucic D. IAP Proteins and Their Therapeutic Potential // Cell Death. – Springer New York, 2014. – P. 97-119.

235. Wang A. L., Lukas T. J., Yuan M., Du N., Tso M. O., Neufeld A. H. Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration // *PloS one*. – 2009. – Vol. 4. – №. 1. – P. e4160.
236. Wang H., Sun L., Su L., Rizo J., Liu L., Wang L. F., Wang F. S., Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 // *Molecular cell*. – 2014. – Vol. 54. – №. 1. – P. 133-46.
237. Wang J., Iacovelli J., Spencer C., Saint-Geniez M. Direct effect of sodium iodate on neurosensory retina // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2014. – Vol. 55. – №. 3. – P. 1941.
238. Wang M., Ma W., Zhao L., Fariss R. N., Wong W. T. Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina // *Journal of neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8. – №. 1. – P. 173.
239. Wang M., Wang X., Zhao L., Ma W., Rodriguez I. R., Fariss R. N., Wong W. T. Macroglia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34. – №. 10. – P. 3793-3806.
240. Wenzel A., Grimm C., Samardzija M., Remé, C. E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration // *Progress in retinal and eye research*. – 2005. – Vol. 24. – №. 2. – P. 275-306.
241. Wright A. F., Chakarova C. F., El-Aziz M. M. A., Bhattacharya S. S. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait // *Nature Reviews Genetics*. – 2010. – Vol. 11. – №. 4. – P. 273-284.
242. Wu C. C., Bratton S. B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species // *Antioxidants & redox signaling*. – 2013. – Vol. 19. – №. 6. – P. 546-558.

243. Wu K. H. C., Madigan M. C., Billson F. A., Penfold P. L. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis //British journal of ophthalmology. – 2003. – Vol. 87. – №. 9. – P. 1159-66.
244. Xian O. G. K. D. R., Yanga J. Ciliary neurotrophic factor promotes Müller glia differentiation from the postnatal retinal progenitor pool //Development of the Visual System. – 2004. – Vol. 26. – №. 5-6. – P. 359-70.
245. Xu H., Chen M., Forrester J. V. Para-inflammation in the aging retina //Progress in retinal and eye research. – 2009. – Vol. 28. – №. 5. – P. 348-368.
246. Yam J. C. S., Kwok A. K. H. Ultraviolet light and ocular diseases //International ophthalmology. – 2014. – Vol. 34. – №. 2. – P. 383-400.
247. Yang P., Wisner J. L., Peairs J. J., Ebright J. N., Zavodni Z. J., Rickman C. B., Jaffe G. J. Human RPE expression of cell survival factors //Investigative ophthalmology & visual science. – 2005. – Vol. 46. – №. 5. – P. 1755-1764.
248. Yang Z., Klionsky D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation // Current opinion in cell biology. – 2010. – Vol. 22. – №. 2. – P. 124-31.
249. Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., Lavrik, I. N. Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2015. – Vol. 72. – №. 3. – P. 505-517.
250. Zhang C., Caplen N. J., Strunnikova N., Baffi J., Chan C. C., Cousins S. W., Csaky K. G. Regulation of c-FLIP Prevents Tumor Necrosis Factor–Alpha (TNF-a) Induced Programmed Cell Death in Human Retinal Pigment Epithelium (hRPE) //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2003. – Vol. 44. – №. 13. – P. 473-473.

251. Zhang C., Strunnikova N., Baffi J., Cousins S., Csaky K. Ratio of Caspase-8 to C-Flip Determines the Susceptibility of Human Retinal Pigment Epithelium (hRPE) to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Induced Cell Death //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2002. – Vol. 43. – №. 13. – P. 686-686.
252. Zhang X., Cheng M., Chintala S. K. Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration //Investigative ophthalmology & visual science. – 2004. – Vol. 45. – №. 7. – P. 2374-83.
253. Zhao C., Yasumura D., Li X., Matthes M., Lloyd M., Nielsen G., Ahern K, Snyder M., Bok D., Dunaief J. L., LaVail M. M., Vollrath D. mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice //The Journal of clinical investigation. – 2011. – Vol. 121. – №. 1. – P. 369-83.
254. Zhdankina A., Fursova A.Zh., Logvinov S.V., Kolosova N.G. Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats //Bulletin of experimental biology and medicine. – 2008. – Vol. 146. – №. 4. – P. 455-58.
255. Zhou W., Yuan J. Necroptosis in health and diseases //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2014. – Vol. 35. – P. 14-23.
256. Zuberi K., Franz M., Rodriguez H., Montojo J., Lopes C. T., Bader G. D., Morris Q. GeneMANIA prediction server 2013 update //Nucleic acids research. – 2013. – Vol. 41. – №. W1. –P. W115-W122.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) с порогом более чем 2 раза (fold change (FC)) и уровнем значимости с поправкой на множественные сравнения p values $<0,05$.

Название гена	Категория GO	Имя гена	FC	adjP
transmembrane protein 221	Интегральный компонент мембраны	Tmem221	-87,46	6,78E-52
ENSRNOG00000045967	Неизвестен	Неизвестен	-75,01	6,71E-14
similar to Glutathione S-transferase A1	Глутатион-трансферазная активность	GSTA6	-74,77	0,00104
ENSRNOG00000045691	Неизвестен	Неизвестен	-47,64	5,89E-05
ENSRNOG00000017412	Неизвестен	Неизвестен	-42,43	0,0058
ribosomal protein L28-like	Структурная составляющая рибосом	RGD1565183	-16,22	0,013
ENSRNOG00000030351	Неизвестен	Неизвестен	-14,96	2,5E-10
ENSRNOG00000033517	Неизвестен	Неизвестен	-13,24	0,021
ENSRNOG00000030548	Неизвестен	Неизвестен	-10,41	5,59E-12
nitric oxide synthase 2, inducible	Присоединение аргинина	NOS2	-8,83	0,0067
RT1 class I, locus CE4	Связывание пептидного антигена	RT1-CE4	-8,73	0,0099
ENSRNOG00000031667	Неизвестен	Неизвестен	-8,57	0,021
Osteopontin	Связывание внеклеточного матрикса	Spp1	-8,57	4,38E-13
NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process	Naip2	-7,33	0,033
ENSRNOG00000029389	Неизвестен	Неизвестен	-6,89	0,0011

SNRPN upstream reading frame protein-like	Убиквитин-трансферазная активность	Snurf	-6,86	1,48E-11
neuropeptide precursor VF	Связывание рецептора	Npvf	-6,6	0,0089
ENSRNOG00000031454	Неизвестен	Неизвестен	-6,56	0,02
family with sequence similarity 3, member B	Неизвестен	Fam3b	-6,31	0,035
ENSRNOG00000032578	Неизвестен	Неизвестен	-6,24	0,026
patatin-like phospholipase domain containing 1	Метаболический процесс липидов	Pnpla1	-5,75	0,0028
coiled-coil domain containing 152	Неизвестен	Ccdc152	-5,42	0,021
Family with sequence similarity 70, member B	Неизвестен	Tmem255b	-5,28	0,01
thrombospondin 4	Связывание ионов кальций	Thbs4	-5,11	0,034
lumican	Внеклеточное пространство	Lum	-4,74	0,01
Cerebroside sulfotransferase	Галактозилцерамид сульфотрансферазная активность	Gal3st1	-4,67	0,022
phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	3',5'-цикло-АМФ фосфодиэстеразная активность	Pde4d	-4,61	0,00055
matrilin 3	Белковый внеклеточный матрикс	Matn3	-4,48	0,01
carbonic anhydrase 9	Карбонат дегидратазная активность	Car9	-4,14	0,011
ENSRNOG00000033957	Неизвестен	Неизвестен	-3,93	0,003
ENSRNOG00000017661	Неизвестен	Неизвестен	-3,86	0,003
fibrinogen-like 2	Пептидазная активность	Fgl2	-3,83	4,23E-05
Trp53rk binding protein	Процессинг тРНК	TPRKB	-3,7	0,00098
STEAP family member 4	Двухвалентная редуктаза	Steap4	-3,57	4,43E-05
ENSRNOG00000029070	Неизвестен	Неизвестен	-3,57	0,018

ligase IV, DNA, ATP-dependen	ДНК лигазная (АТФ) активность	Lig4	-3,46	7,49E-19
gremlin 1, DAN family BMP antagonist	Протеинтирозинкиназный активатор активности трансмембранного рецептора	GREM1	-3,44	0,0015
myosin VIIb	Связывание АТФ	Myo7b	-3,331	0,012
family with sequence similarity 129, member A	Отрицательная регуляция фосфорилирования белка	Fam129a	-3,26	0,036
wingless-type MMTV integration site family, member 16	Связывание frizzled	Wnt16	-3,05	0,031
interferon induced transmembrane protein 1	Интегральный компонент мембраны	Ifitm1	-2,88	0,0033
retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)	транс-ретинол 13,14-редуктазная активность	Retsat	-2,87	1,81E-11
EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	Связывание ионов кальция	Emr1	-2,86	0,00076
cellular retinoic acid binding protein 1	Ретинальное связывание	Crabp1	-2,85	5,2E-18
ENSRNOG00000039025	Неизвестен	Неизвестен	-2,84	0,012
coiled-coil domain containing 146	Неизвестен	Ccdc146	-2,8	9,9E-05
BAI1-associated protein 2-like 1	Связывание пролин-обогащенного региона	Baiap2l1	-2,71	8,3E-06
sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	Активность натриевых каналов	Scn7a	-2,64	0,031
zinc finger protein 182-like	Связывание ионов металлов	Zfp943	-2,62	7,96E-05
family with sequence similarity 65, member C	Неизвестен	Fam65c	-2,59	3,2E-11
ENSRNOG00000032997	Неизвестен	Неизвестен	-2,56	0,046

ENSRNOG00000039790	Неизвестен	Неизвестен	-2,56	0,00045
YME1-like 1 (S. cerevisiae)	Связывание АТФ	Yme111	-2,54	5,51E-10
solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	Активность транспортера трансмембранных аминокислот	Slc7a11	-2,53	0,0013
Slc24a5 solute carrier family 24, member 5	Активность антипорта натрия	Slc24a5	-2,53	0,0049
Cd48 molecule	Связывание антигена	Cd48	-2,51	0,037
cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Связывание ионов уальдия	Cubn	-2,49	0,0018
coiled-coil domain containing 80	Связывание гепарина	Ccdc80	-2,48	0,032
mitochondrially encoded NADH 4L	NADH дегидрогеназная (убиквинон) активность	MT-ND4L	-2,46	7,58E-07
phospholipase A2, group II	Внеклеточные регионы	Pla2g2c	-2,37	0,023
advillin	Связывание актина	Avil	-2,35	5,62E-05
CGRP receptor component	РНК активность ДНК-направленной полимеразы	Crcp	-2,35	9,8E-14
asparaginase like 1	Аспарагиназная активность	Asrgl1	-2,34	5,6E-06
testis expressed 15	Оплодотворение	Tex15	-2,33	4,23E-05
zinc finger protein 420-like	Связывание ионов металлов	Zfp677	-2,27	0,0012
bone morphogenetic protein 6	Связывание рецептора BMP	Bmp6	-2,25	0,0032
disabled 2, mitogen-responsive phosphoprotein	Связывание фосфатидилинозитол 3-киназы	Dab2	-2,25	0,0098
calcitonin receptor-like	Активность рецептора адреномедулина	Calcrl	-2,23	0,035
HAUS augmin-like complex, subunit 1	Клеточное деление	Haus1	-2,22	1,67E-07

lysyl oxidase	Связывание карбогидрата	Lox	-2,21	0,0033
sterile alpha motif domain containing 9-like	Общий меилоидный предшественник пролиферации клеток	Samd9l	-2,2	0,0065
hypothetical LOC300751	Неизвестен	RGD1311874	-2,15	0,033
zinc finger protein 873	Связывание ионов металлов	Zfp873	-2,16	0,013
myosin IC	Актин-зависимая АТФазная активность	Myo1c	-2,11	4,88E-08
inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Инозитол монофосфат 1-фосфатазная активность	Impa2	-2,10	0,0012
cadherin 19, type 2	Связывание ионов кальция	Cdh19	-2,09	0,007
ENSRNOG00000048784	Неизвестен	Неизвестен	-2,08	1,42E-06
regulator of telomere elongation helicase 1	АТФ-зависимая ДНК хеликазная активность	Rtel1	-2,07	2,19E-10
diacylglycerol kinase, gamma	Связывание АТФ	Dgkg	-2,06	0,035
similar to Centromeric protein E (CENP-E protein)	Неизвестен	Ccdc175	-2,05	0,00989
DNA primase, p49 subunit	Активность ДНК праймазы	Prim1	-2,02	1,12E-06
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	Связывание АДФ	Prps2	-2,00	0,013

Приложение 2. Топологические параметры вершин ассоциативных генных сетей апоптоза для возраста 20 дней, 3 и 18 месяцев крыс OXYS. Вершины, которые имели наименьшие среднюю длину кратчайшего пути и центральность вершины по посредничеству, наибольшие коэффициент кластеризации и центральность вершины по близости, а также более высокую степень вершины были идентифицированы как центральные. Жирным шрифтом выделены центральные вершины и оптимальные значения параметров.

20 дней					
Имя гена	Средняя длина кратчайшего пути	Центральность вершины по близости	Центральность вершины по посредничеству	Коэффициент кластеризации	Степень вершины
<i>Cdkn1b</i>	1.68	0.064	0.59	0.27	15
<i>Rasa1</i>	1.74	0.0095	0.58	0.64	14
<i>Kitlg</i>	1.74	0.031	0.58	0.56	14
<i>Ets1</i>	1.71	0.08	0.59	0.41	14
<i>Tgfbr1</i>	1.71	0.024	0.59	0.63	13
<i>Rock1</i>	1.74	0.019	0.58	0.5	13
<i>Ednrb</i>	1.71	0.037	0.59	0.47	12
<i>ErbB3</i>	1.84	0.012	0.54	0.56	12
<i>Nup153</i>	1.87	0.034	0.54	0.51	11
<i>Ngf</i>	1.97	0.031	0.51	0.14	10
<i>Tgfa</i>	1.76	0.04	0.57	0.27	10
<i>Pten</i>	1.82	0.013	0.55	0.53	10
3 мес					
Имя гена	Средняя длина кратчайшего пути	Центральность вершины по близости	Центральность вершины по посредничеству	Коэффициент кластеризации	Степень вершины
<i>Casp1</i>	1.92	0.077	0.52	0.52	22
<i>Casp12</i>	1.92	0.084	0.52	0.58	22
<i>Casp8</i>	2.02	0.094	0.49	0.49	21
<i>Casp4</i>	2.17	0.009	0.46	0.73	16

<i>CFLAR</i>	2.17	0.015	0.46	0.79	16
<i>Birc3</i>	1.96	0.091	0.51	0.44	15
<i>Casp7</i>	2.27	0.0	0.44	1.0	13
<i>Nfkbia</i>	1.88	0.189	0.53	0.2	13
<i>Zc3h12a</i>	2.04	0.142	0.49	0.32	13
<i>Casp14</i>	2.27	0.0	0.44	1.0	11
<i>Alox15</i>	2.42	0.127	0.41	0.39	10
<i>Ripk3</i>	2.10	0.057	0.48	0.33	10
<i>Sgk1</i>	2.17	0.030	0.46	0.31	10
18 мес					
Имя гена	Средняя длина кратчайшего пути	Центральность вершины по близости	Центральность вершины по посредничеству	Коэффициент кластеризации	Степень вершины
<i>Cdk1</i>	1.94	0.20	0.51	0.09	21
<i>Ngfr</i>	2.11	0.08	0.47	0.26	17
<i>Hspa1b</i>	1.93	0.13	0.52	0.19	17
<i>ErbB3</i>	2.04	0.07	0.49	0.24	13
<i>Adrb2</i>	2.13	0.08	0.47	0.18	13
<i>Ngf</i>	2.217	0.03	0.45	0.29	12
<i>Ntf3</i>	2.26	0.03	0.44	0.38	12
<i>Mal</i>	2.11	0.05	0.47	0.24	12
<i>ErbB2</i>	2.02	0.08	0.50	0.25	12
<i>Actn4</i>	2.17	0.07	0.46	0.27	11
<i>Casp8</i>	2.43	0.01	0.41	0.33	10

Приложение 3. Категории генных онтологий клеточной гибели для графов ассоциативных генных сетей (20 дней, 3 мес. и 18 мес).

20 дней		
Категории генных онтологий	Гены/общее число генов в пути	p value

GO:0097191	внешний сигнальный путь апоптоза	13/200	3.53e-11
GO:0051402	апоптотический процесс нейронов	12/218	1.77e-9
GO:0097192	внешний сигнальный путь апоптоза в отсутствии лиганда	7/73	1.43e-6
GO:0043154	отрицательная регуляция цистеиновой эндопептидазной активности, вовлеченной в апоптотический процесс	6/75	3.21e-5
GO:2001234	отрицательная регуляция сигнального пути апоптоза	7/151	6.94e-5
GO:0008625	внешний сигнальный путь апоптоза через рецепторы смерти	5/56	1.7e-4
GO:2001235	положительная регуляция сигнального пути апоптоза	5/123	2.93e-3
GO:0008637	апоптотические митохондриальные изменения	4/90	1.14e-2
GO:0090199	регуляция выхода цитохрома с из митохондрий	3/37	1.45e-2
3 мес			
Категории генных онтологий		Гены/общее число генов в пути	p value
GO:0043525	положительная регуляция апоптотического процесса нейронов	6/52	1.82e-5
GO:0070266	некрототический процесс	5/26	2.13e-5
GO:0097193	внутренний сигнальный путь апоптоза	8/215	1.26e-4
GO:0097191	внешний сигнальный путь апоптоза	8/200	8.73e-5
GO:0097194	фаза экзекуции апоптоза	4/60	7.24e-3

GO:0097300	программируемая клеточная гибель	некротическая	5/32	4.3e-5
GO:0008637	апоптотические изменения	митохондриальные	4/90	2.4e-2
GO:0008625	внешний сигнальный путь апоптоза через рецепторы смерти		4/56	5.89e-3
GO:1901214	регуляция гибели нейронов		7/217	1.19e-3
GO:0043280	положительная регуляция цистеиновой эндопептидазной активности, вовлеченной в апоптотический процесс		9/179	1.02e-5
18 мес				
Категории генных онтологий			Гены/общее число генов в пути	p value
GO:0051402	апоптотический процесс нейронов		15/218	6.2e-13
GO:0070997	гибель нейронов		15/253	1.45e-12
GO:0097191	внешний сигнальный путь апоптоза		10/200	3.06e-7
GO:0097194	фаза экзекуции апоптоза		3/60	3.64e-2
GO:0008637	апоптотические изменения	митохондриальные	4/90	1.09e-2
GO:0043281	регуляция цистеиновой эндопептидазной активности, вовлеченной в апоптотический процесс		5/179	1.25e-2
GO:0070265	некротическая клеточная гибель		3/39	1.44e-2
GO:0072332	внутренний сигнальный путь апоптоза через класс медиаторов p53		3/60	3.64e-2

Приложение 4. Кластерный анализ графов ассоциативных генных сетей апоптоза для 20-дневных, 3 мес и 18 мес животных. Показаны кластеры с числом вершин больше трех (согласно базе данных Reactome).

20 дней		
Кластер	Список генов	Биологические процессы
1	<i>Pten, Rasal, Hgf, Ets1, Kitlg, Ednrb</i>	Регуляция сигнального пути интерликинов (И-2 и И-7) и сигнальной трансдукции EGFR, VEGF, FGFR, рецептора инсулина, NGF, PDGF, SCF-KIT, ERBB2, ERBB4, активация PIP3 с АКТ сигнального пути, сигнальный путь BMP, сигнальный путь рецептора β -TGF, сигнальный путь GPCR; метаболизм инозитолфосфатов, липидов и липопротеинов; поиск аксонального пути.
2	<i>Rock1, Erbb3, Tgfb1, Tgfb2, Rblcc1</i>	Фаза экзекуции апоптоза, сигнальный путь CaM, кальмодулин-индуцированные события, иммунная система и сигнальная трансдукция.
3	<i>Fas, Btg2, Dnajb9, Cdkn1b, Tgfa, Ngf, Sycp3, Igf1</i>	Активация каспазы-8 через расщепление, FasL/ CD95L сигнальный путь, регуляция с помощью c-FLIP, внутренняя иммунная система.
3 мес		
Кластер	Список генов	Биологические процессы
1	<i>Lig4, Ccl6, Tns4, Trp63, Casp8, Pcd4, Casp12, Casp4, Casp7, cFlar, Birc3</i>	TRAIL сигнальный путь, сигнальный путь рецепторов смерти, регуляция через c-FLIP, Активация каспазы 8 через расщепление и димеризация прокаспазы 8.
2	<i>Casp1, Cdk1, Litaf, Cryab, Sgk1,</i>	Роль DCC в регуляции апоптоза и фаза экзекуции апоптоза.

	<i>Pawr, Ripk3, Cd24, Nfkbia</i>	
3	<i>Fgf2, Lgals7, Grk1, Alox15, Alox12</i>	Метаболизм липидов и липопротеинов (регуляция метаболизма арахидоновой кислоты).
18 мес		
Кластер	Список генов	Биологические процессы
1	<i>Hspa1b, Nqo1, Mal, Ptprc, Anxa1, Sphk1, Cttna1, Adrb2, Cdh1, Erbb2, Actn4, Casp7</i>	FasL/CD95L сигнальный путь, TRAIL сигнальный путь, регуляция апоптоза через c-FLIP, димеризация прокаспазы 8, регуляция иммунной системы.
2	<i>Hspb1, Phlda3, Il1rn, Erbb3, Ntf3, Fgfr3, Bcl2l10, Adipoq</i>	апоптотическое расщепление клеточных белков (фаза экзекуции апоптоза); миристоилирование BID и транслокация к митохондриямапоптотический фактор-опосредованный ответ (цитохром c опосредованный и SMAC-опосредованный апоптотический ответ) во внутреннем пути; активация каспазы 8 через расщепление и димеризация прокаспазы 8.
3	<i>Alox12, Sh3glb1, Lig4, Bard1, Cdk1, Cd24, Perp, Nuak2, Tgfa</i>	интеграция энергетического обмена, передача сигнала через химические синапсы, калиевые каналы в нервной системе, сигнальный путь NGF.
4	<i>Ripk2, Myd88, Ngfr, Casp8, Chek2</i>	Регуляция внутренней иммунной системы и метаболизм липидов и липопротеинов.