

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.24

Оценка состояния гематоретинального барьера при развитии признаков возрастной макулярной дегенерации у крыс OXYS**Д.В. Телегина , Д.А. Пеунов , Т.А. Козлова , Н.Г. Колосова* , О.С. Кожевникова** *Лаборатория молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской Академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д. 10
e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — многофакторное нейродегенеративное заболевание, которое становится основной причиной необратимой потери зрения людьми старше 55 лет. Развитие влажной формы ВМД связывают с нарушением проницаемости гематоретинального барьера (ГРБ). Недавно было показано, что сухая форма ГРБ также сопровождается изменениями ГРБ, хотя ранее и считалось, что этого не происходит, однако информация о механизмах этих изменений на разных стадиях заболевания, тем более доклинических, ограничена. Целью настоящего исследования явилась оценка возможного вклада изменений проницаемости ГРБ в развитие признаков ВМД у крыс OXYS — модели сухой формы заболевания. В период, когда клинические признаки ВМД у крыс OXYS отсутствуют (возраст 20 сут), а также в периоды их манифестации (~5 мес.) и прогрессии (в 12 и 18 мес.) оценивали проницаемость ГРБ для красителя Эванса синего и содержание в сетчатке белков плотных контактов окклюдина, клаудина-5 и zonula occludens-1 (ZO-1). Контролем служили одновозрастные крысы Вистар. У крыс OXYS выявлено снижение проницаемости ГРБ, следствием которого может быть нарушение трофического обеспечения сетчатки, а также повышение уровня окклюдина в период прогрессии признаков ВМД. Уровень ZO-1 снижался с возрастом, но межлинейных различий не выявлено. Анализ транскриптомов сетчатки (данных RNA-seq) показал, что у крыс обеих линий изменения экспрессии генов, входящих (согласно Kyoto encyclopedia of genes and genomes — KEGG) в категорию плотных контактов, максимальны в период с возраста 20 сут до 3 мес. По сравнению с крысами Вистар у крыс OXYS в возрасте 3 мес. изменена экспрессия генов *Dlg1*, *Cd1d1*, *Map3k5* и *Arhgef2*, а в возрасте 18 мес. — *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* и *Rap2c*. Такие изменения экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД свидетельствуют об активации компенсаторных механизмов.

Ключевые слова: старение, сетчатка, гематоретинальный барьер, возрастная макулярная дегенерация, крысы OXYS

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-8

Введение

Как часть мозга, вынесенная на периферию, сетчатка является иммуно-привилегированным органом, обособленность которого обеспечивает гематоретинальный барьер (ГРБ), состоящий из внутреннего и внешнего барьеров. Внешний ГРБ образован плотными контактами между соседними клетками ретинального пигментного эпителия (РПЭ), капиллярами хориоидеи и мембраной Бруха [1]. Он регулирует процесс транспорта питательных веществ из крови в субретинальное пространство и удаления продуктов жизнедеятельности из него [2, 3]. Внутренний ГРБ образован плотными контактами эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки и обеспечивает высокоселективный транспорт молекул между кровью и тканями сетчатки. Согласованная работа

этих двух барьеров необходима для поддержания гомеостаза сетчатки [4], а нарушение их функций может приводить к накоплению переносимых кровью белков и других потенциально токсичных растворенных веществ в сетчатке [3].

Плотные контакты между клетками как внутреннего, так и внешнего ГРБ состоят из трансмембранных белков и белков периферических мембран, которые взаимодействуют друг с другом, образуя сложную сеть, и обеспечивают высокую степень селективности парацеллюлярной барьерной функции. Все плотные контакты имеют схожую структуру. Они состоят из MAL/MAL-подобных белков везикулярного транспорта и связи с мембраной, чаще всего окклюдина, соединительных молекул адгезии (junctional adhesion molecules — JAM) и белков

семейства клаудинов [5]. Селективность барьера определяется типом белка клаудина: в сетчатке для внешнего ГРБ характерен клаудин-19, а для внутреннего — клаудин-5. Плотные контакты связаны с цитоскелетом через адаптерные белки, такие как zonula occludens (ZO)-1, -2 и -3, которые играют важную роль в формировании и четкой организации плотных контактов [6].

Нарушение проницаемости ГРБ характерно для многих нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе — возрастной макулярной дегенерации (ВМД). ВМД — это сложное многофакторное заболевание, развивающееся в результате дисфункции комплекса «фоторецепторы—РПЭ—мембрана Бруха—хориокапилляры», которое становится основной причиной потери зрения людьми в возрасте старше 55 лет. Заболеваемость ВМД неуклонно растет на фоне увеличения продолжительности жизни населения планеты [7, 8]. Механизмы патогенеза ВМД до конца не раскрыты, но известно, что они существенно различаются при сухой (или атрофической, 10–20% случаев) и влажной (или экссудативной, ~90%) формах заболевания. При сухой ВМД образование друз и дисфункция РПЭ прогрессируют до географической атрофии — поздней стадии ВМД, характеризующейся потерей клеток РПЭ. Первичными причинами поражения при влажной форме ВМД являются нарушение микроциркуляции и потеря хориокапилляров. При этом происходит нарушение ГРБ, следствием которого становится скопление жидкости в субретинальном и/или интратретинальном пространстве, выявляемое методами клинической визуализации [7]. Напротив, принято считать, что ГРБ не страдает у пациентов с сухой формой ВМД. Однако недавно при исследовании посмертных образцов сетчатки людей с этой формой ВМД были выявлены признаки субклинической утечки ГРБ — повышенное количество сывороточных белков, включая компоненты иммунной системы [6]. Такие результаты свидетельствуют о том, что дисфункция ГРБ может способствовать развитию сухой формы ВМД, однако информация о его состоянии на разных стадиях заболевания, тем более доклинических, ограничена.

Этот вопрос мы исследовали на преждевременно стареющих крысах-альбиносах OXYS, у которых спонтанно развивается ретинопатия с основными признаками ВМД [9]. Такая ретинопатия соответствует преимущественно сухой атрофической форме заболевания. Тем не менее, с возрастом у части (~10–20%) крыс развиваются признаки влажной формы заболевания [9]. Первые клинические проявления ВМД-подобной ретинопатии у крыс OXYS — сочетание множественных мелких и немногочисленных средних друзоподобных отложений — развиваются к возрасту 3 мес. на фоне структурно-функциональных изменений РПЭ и нарушения хориоидальной ми-

кроциркуляции [10, 11]. С возрастом дегенеративные изменения сетчатки у крыс OXYS нарастают и сопровождаются избыточным накоплением липофусцина в РПЭ, нарушением морфологии его клеток, увеличением доли многоядерных клеток РПЭ, а также реактивным глиозом и выраженным истончением нейроретины к 18 мес. [12]. Целью настоящей работы стала оценка возможного вклада изменений ГРБ в развитие признаков ВМД у крыс OXYS. Для этого мы провели сравнение изменений с возрастом проницаемости ГРБ и уровня основных белков плотных контактов (окклюдина, клаудина-5 и ZO-1) в сетчатке крыс OXYS и Вистар (контроль).

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на одновозрастных крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контрольная линия), содержащихся на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. С возраста 4 нед. животных содержали группами по пять особей в клетках размером 57 × 36 × 20 см при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в условиях фиксированного режима освещения (10 ч свет (300–400 люкс) / 14 ч темнота (<0,1 люкс)), при свободном доступе к воде и пище — стандартному гранулированному корму для лабораторных животных (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия).

Метод Эванса. Для оценки проницаемости ГРБ 2%-ный раствор Эванса синего (ДИА-М. Россия, кат. № 23860) в физиологическом растворе (NaCl 0,9%) вводили животным (возраст 20 сут, 5, 12 и 18 мес., $n = 8$) внутрибрюшинно в дозировке 3 мл/кг. Через сутки после введения красителя животным вводили авертиновый наркоз в дозировке 2 мл/100 г веса, после чего проводили транскардиальную перфузию 100–120 мл фосфатного буферного раствора. Далее сетчатку извлекали и гомогенизировали в физиологическом растворе с добавлением 50% (масс.) трихлоруксусной кислоты в объемно-массовом соотношении 4:1 (раствор/ткань). Гомогенат центрифугировали при комнатной температуре при 10000 g. Для проведения флуориметрии в каждую лунку планшета наносили по 30 мкл супернатанта/калибровочного раствора и разводили 90 мкл 96%-ного этанола. Для построения калибровочной кривой использовали раствор Эванса синего в физиологическом растворе с добавлением 50% (масс.) трихлоруксусной кислоты. Флуориметрию производили при длинах волн поглощения/излучения — 620/680 нм на многофункциональном планшетном считывателе CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия). При проведении эксперимента за основу были взяты методики, описанные ранее [13, 16], и данные, полученные Вонг и Лай [17].

Вестерн-блот-анализ. Крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 сут, 5 и 18 мес. ($n = 6$) ингаляционно усыпляли углекислотой, декапитуировали и извлекали хориоретинальный комплекс. Белок выделяли с помощью буфера RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1%-ный Triton X100, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,1-ный додецилсульфат натрия (SDS), 1 mM EDTA) с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз (P8340, Sigma, США). После тщательного гомогенизирования раствор белка центрифугировали на при 12000 g (4°C) в течение 20 мин. Собирали супернатант и определяли концентрацию общего белка с помощью Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Образцы белка смешивали с 5-кратным буфером для загрузки (10%-ный SDS, 15%-ный меркаптоэтанол, 50%-ный глицерин, 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8, бромфеноловый синий), инкубировали 10 мин при 95°C . Полученную смесь вносили в карманы геля в объеме, содержащем 30 мкг белка. Для электрофореза использовали 8%-ный SDS-полиакриламидный гель, помещенный в трис-глициновый буфер (25 mM Tris, 190 mM глицин, 0,1%-ный SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Великобритания) осуществляли в камере для влажного переноса (Bio-Rad Laboratories, США) и затем полученную мембрану инкубировали в течение 1 ч в 5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (SLBJ8588V, Sigma-Aldrich, США). Инкубацию с первичными антителами (концентрация 1:500) проводили при 4°C в течение ночи, а со вторичными антителами (концентрация 1:3000) — в течение часа при комнатной температуре. Затем обрабатывали мембрану реагентом для инициации люминесценции «Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate» (Thermo Fisher Scientific, США) и производили съемку на приборе ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, США). Для измерения уровня сигнала изображение анализировали в программе ImageJ (NIH, Bethesda, США). В работе использовались следующие первичные антитела: против клаудина-5 (AF5216, Affinity Biosciences, Китай), окклюдина (DF7504, Affinity Biosciences, Китай), ZO-1 (PAC262Ra01, Cloud-Clone Corp., Китай) и GAPDH (AF7021, Affinity Biosciences, Китай), а также соответствующие вторичные антитела (goat anti-rabbit, S0001, Affinity Biosciences, Китай).

Анализ данных транскриптома. Данные по уровню экспрессии генов в сетчатке крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 сут, 3 и 18 мес. ($n = 3$) были получены ранее методом секвенирования транскриптома (RNA-seq) на платформе Illumina [18, 19]. Статистический анализ дифференциальной экспрессии генов между линиями и возрастами проводили с помощью пакета DESeq2. Различия в уровнях экспрессии считали значимыми при $p_{\text{adj}} < 0,05$.

Для поправки на множественное сравнение использовался метод Бенжамини-Хохберга. Списки дифференциально экспрессирующихся генов сопоставлялись со списком генов, связанных с плотными контактами, базы данных KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/>) для отбора генов, включенных в регуляцию плотных контактов.

Статистический анализ. Статистические расчеты производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 (Statsoft, США). Соответствие распределений условию нормальности проверяли в тесте Шапиро-Уилка, оценку однородности дисперсий проводили в тесте Левена. Для выявления выбросов был использован параметр Диксона, погрешности были исключены из анализа. Использовали факторный дисперсионный анализ ANOVA и непараметрический критерий Краскела — Уоллиса с апостериорным сравнением групповых средних. Следует отметить, что параметрические и непараметрические методы статистики приводили к аналогичным результатам. Как независимые факторы рассматривали генотип и возраст. Результаты анализа представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование проницаемости ГРБ с помощью красителя Эванса синего. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил влияние факторов «генотип» и «возраст» ($F_{1, 43} = 15,46$, $p < 0,001$; и $F_{3, 43} = 4,80$, $p < 0,01$) на проницаемость сетчатки для красителя Эванса синего: она снижалась к возрасту 18 мес. у крыс обеих линий, при этом у крыс OXYS была ниже, чем у крыс Вистар. Концентрация красителя Эванса синего в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар была значимо снижена в возрасте 20 сут ($59 \pm 34 \mu\text{M}$ против $103 \pm 32 \mu\text{M}$), 5 мес. ($64 \pm 22 \mu\text{M}$ против $99 \pm 20 \mu\text{M}$) и 18 мес. ($38 \pm 10 \mu\text{M}$ против $75 \pm 33 \mu\text{M}$), при этом не обнаружено межлинейных различий в 12 мес. ($93 \pm 42 \mu\text{M}$ против $109 \pm 32 \mu\text{M}$). Выявлено существенное снижение этого показателя у крыс OXYS — в 2,4 раза — с 12 до 18 мес. (рис. 1).

Изменение уровня белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 при старении и развитии ретинопатии. Далее был проведен анализ уровня белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 методом анализа Вестерн-блот (рис. 2). Согласно ANOVA, уровень клаудина-5 не зависел от возраста животных, но зависел от генотипа ($F_{1, 24} = 4,38$, $p < 0,05$) — и у крыс OXYS уровень этого белка был выше, чем у крыс Вистар. Однако сравнение групповых средних не выявило достоверных различий (рис. 2). Уровень окклюдина у крыс Вистар снижался с возрастом — выявлены значимые различия в его содержании в сетчатке 20-дневных и 18-месячных животных ($p < 0,05$).

У крыс OXYS уровень этого белка в сетчатке с возрастом не изменялся, но при этом в возрасте 18 мес. уровень окклюдина был у них значимо выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$) (рис. 2). Уровень белка ZO-1 зависел только от возраста животных ($F_{2,23} = 8,1471, p < 0,05$): наблюдалось значимое снижение этого параметра с возраста 20 сут до 5 мес. у крыс обеих линий, а с возраста 5 мес. до 18 мес. — только у крыс Вистар ($p < 0,05$). Различий между линиями обнаружено не было (рис. 2).

Исследование изменений транскриптома сетчатки крыс с возрастом и при развитии ретинопатии. Для оценки изменений экспрессии генов, связанных с плотными контактами, мы проанализировали транскриптомные данные (RNA-seq) сетчатки

20-суточных, 3- и 18-месячных крыс OXYS и Вистар [18, 19]. Из 170 генов, включенных, согласно базе данных KEGG pathway (rno04530, Tight junction), в категорию плотных контактов, у крыс OXYS в возрасте 20 сут была изменена, по сравнению с крысами Вистар, экспрессия 14 генов: уровень мРНК-генов *Lgl2*, *Stk11* и *Tjp2* повышен, а уровень генов *Mpp5*, *Ppp2r2b*, *Nedd4l*, *Rdx*, *Map3k5*, *Actr2*, *Actr3*, *Rock1*, *Prkaa2*, *Rap1a* и *Rap2c* снижен. В возрасте 3 мес. у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар экспрессия генов *Dlg1*, *Cd1d1* и *Map3k5* была снижена, а гена *Arhgef2* повышена. В возрасте 18 мес. был снижен уровень экспрессии *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* и *Rap2c*. При этом экспрессия трех генов была снижена у крыс OXYS в двух возрастах: *Map3k5* —

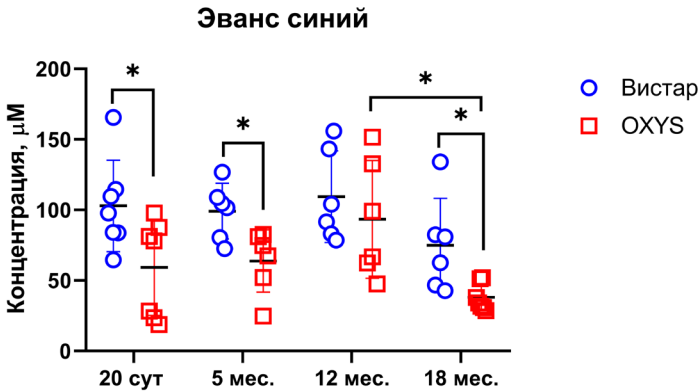


Рис. 1. Проницаемость сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста для красителя Эванса синего. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — различия значимы, $p < 0,05$.

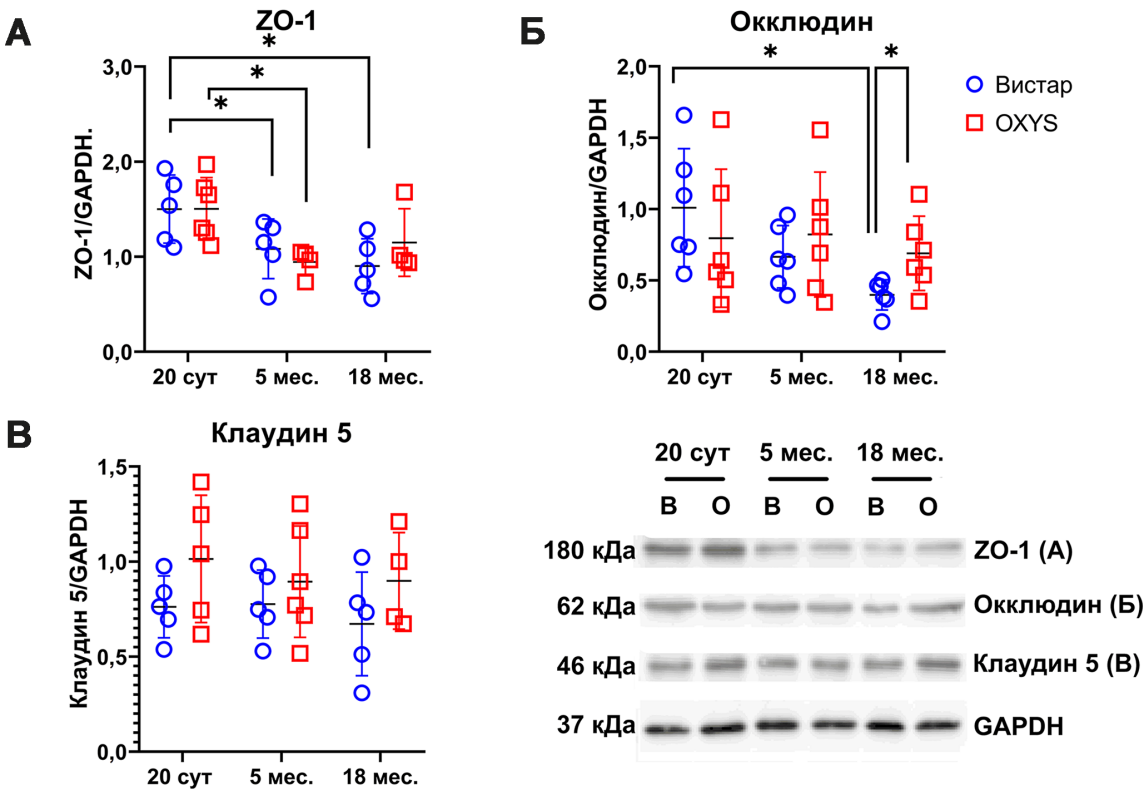


Рис. 2. Уровень белков плотных контактов клаудина-5, окклюдина и ZO-1 в сетчатке крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — различия значимы, $p < 0,05$. Условные обозначения: В — крысы Вистар, О — крысы OXYS.

в 20 сут и в 3 мес., *Cd1d1* – в 3 мес. и в 18 мес., *Rap1a* – в 20 сут и в 18 мес. (рис. 3А).

С возраста 20 сут до 3 мес. в сетчатке крыс Вистар изменялась экспрессия 51 гена: уровень мРНК 26 из них снизился и 25 – вырос. С возраста 3 мес. до 18 мес. у крыс Вистар повышался уровень мРНК трех генов: *Actg1*, *Cgn* и *Cldn9* (рис. 3Б). При этом уровень мРНК гена *Cldn9* увеличивался у крыс Вистар с возраста 20 сут до 18 мес. У крыс ОХУС с возраста 20 сут до 3 мес. изменялась экспрессия 60 генов (экспрессия 27 снижалась, а 33 – возрастала), а с возраста 3 мес. до 18 мес. только одного: повысился уровень мРНК гена *Dlg1*. Следует отметить, что экспрессия гена *Dlg1* у крыс ОХУС неуклонно росла с возраста 20 сут до 18 мес. Таким образом, как у крыс Вистар, так и у крыс ОХУС наиболее значительные изменения экспрессии генов, связанных с плотными контактами, происходили с возраста 20 сут до 3 мес., при этом изменения 35 генов были однонаправленными у крыс обеих линий, а изменения экспрессии 16 генов были характерны только для крыс Вистар и 25 – только для крыс ОХУС (рис. 3В).

Обсуждение

Нарушение проницаемости ГРБ характерно для многих нейродегенеративных заболеваний сетчатки [20], и, как показано, первой нарушается целостность внешнего ГРБ, образованного клетками РПЭ, соединенными плотными контактами, и только потом – внутреннего [21]. Одним из кос-

венных признаков нарушения целостности внешнего ГРБ является потеря клетками РПЭ своей уникальной гексагональной морфологии, которая свидетельствует о необратимом эпителиально-мезенхимальном переходе и проявляется, в том числе, в увеличении доли многоядерных клеток и нарушении плотных контактов между ними [22]. Ранее в своих исследованиях мы показали, что у крыс ОХУС описанные выше морфологические изменения клеток РПЭ детектируются уже в возрасте 20 сут, до появления клинических признаков ретинопатии [11]. По мере развития и прогрессии признаков ВМД нарушения гексагональной организации клеток и их контактов нарастают и приводят к образованию гигантских многоядерных клеток РПЭ без четкой морфологии и с большим количеством аутофлуоресцирующего содержимого [11]. При этом удельная плотность клеток РПЭ с возрастом снижается, а межлинейные различия по этому параметру отсутствуют, с чем согласуется характер изменений уровня ZO-1. В то же время ранее мы выявили ряд патологических нарушений цитоскелета в клетках РПЭ крыс ОХУС на стадии активной прогрессии заболевания: фокальное расщепление, утолщение и истончение границ, округление формы клеток и фрагментацию цитоскелета [23]. Косвенно такие нарушения цитоскелета также указывают, в том числе, на изменения плотных контактов, и, как следствие, внешнего ГРБ [24, 25]. Проявлением нарушения внешнего ГРБ становятся изменения ультраструктуры мембраны Бруха,

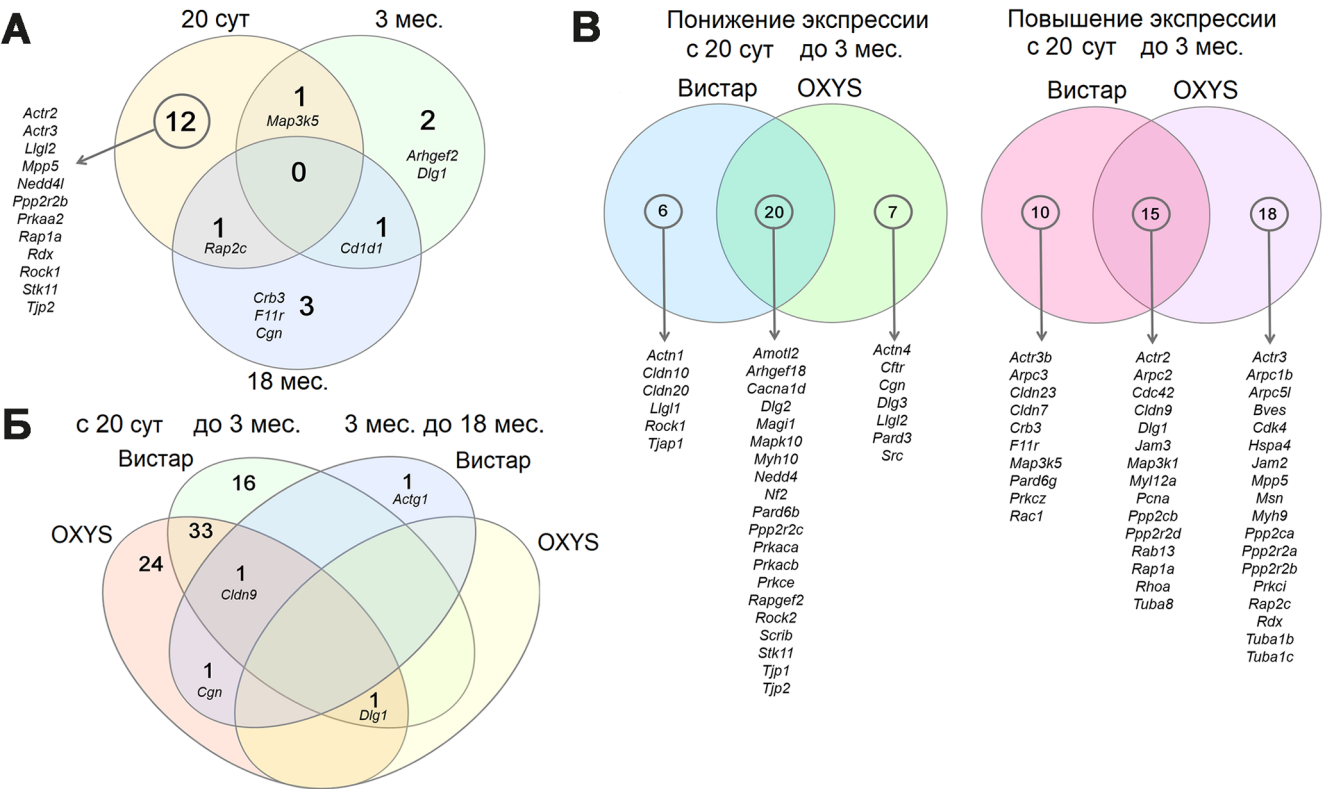


Рис. 3. Различия в экспрессии генов, связанных с плотными контактами, между крысами Вистар и ОХУС в возрасте 20 сут, 3 мес. и 18 мес. (А), а также изменения экспрессии с возраста 20 сут до 3 мес. и с 3 мес. до 18 мес. (Б, В).

которые нарастают у крыс OXYS по мере развития признаков ВМД [26].

Исследование проницаемости ГРБ с помощью введения красителя Эванса синего показало, что его проницаемость у крыс OXYS в возрасте 20 сут, 5 и 18 мес. ниже, чем у крыс Вистар. Считается, что краситель Эванс синий как *in vivo*, так и *in vitro* необратимо связывается с альбумином (69 кДа) в плазме крови в молярном соотношении 10:1 [27]. Транспорт альбумина через ГРБ может осуществляться как трансцеллюлярно через рецепторы, так и с помощью везикул. Важно отметить, что трансцеллюлярную проницаемость эндотелия сосудов сетчатки для многих молекул регулирует фактор роста сосудистого эпителия, повышение уровня которого приводит к активации везикулярного транспорта [4]. У крыс OXYS развитие ретинопатии происходит на фоне пониженного уровня данного фактора [28], что может вносить вклад в выявленное у них снижение проницаемости ГРБ. Можно полагать, что проницаемость ГРБ у крыс OXYS может быть снижена и для питательных веществ, что приводит к трофической недостаточности нейроретины, однако для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования. Согласно литературным данным, под нарушением гематоретинального и/или гематоэнцефалического барьеров при нейродегенеративных заболеваниях чаще всего понимают увеличение проницаемости этих барьеров [30, 31]. Однако очевидно, что как повышение, так и снижение проницаемости ГРБ может вносить вклад в развитие ВМД [2, 6].

Развитие ретинопатии у крыс OXYS характеризуется медленным, как и у людей с сухой формой ВМД, развитием патологии, и, соответственно, активацией компенсаторных механизмов. В пользу этого свидетельствуют результаты исследования уровня белков клаудина-5 и окклюдина в сетчатке крыс OXYS. Известно, что между содержанием белков плотных контактов — в частности, клаудина-5 — и проницаемостью ГРБ существует обратная зависимость, и его проницаемость динамически изменяется, в том числе под влиянием глиальных клеток сетчатки — клеток Мюллера [29, 30]. Клаудин-5 экспрессируется в основном в сосудах внутреннего ГРБ и отсутствует в клетках РПЭ. Тем не менее показано, что в местах атрофии клеток РПЭ отростки глии Мюллера создают уплотнение на мембране Бруха и индуцируют атипичную экспрессию клаудина-5, таким образом восстанавливая ГРБ [21, 31]. Ранее мы показали, что у крыс OXYS с возраста 7 мес. наблюдаются активация и реактивный глиоз клеток Мюллера и астроцитов [11], а в возрасте 3 мес. и 18 мес. у крыс OXYS, по сравнению с крысами Вистар, изменено большее количество генов, связанных с воспалением и иммунным ответом [18]. Таким образом, можно предположить, что отсутствие из-

менений уровня окклюдина и повышенный уровень клаудина-5 в сетчатке крыс OXYS, а также снижение ее проницаемости для Эванса синего на фоне сосудистых нарушений и атрофии клеток РПЭ [10, 28] может быть связано с активацией клеток Мюллера и запуском компенсаторных процессов. В пользу этого свидетельствуют также результаты исследования транскриптома: наиболее существенные различия (по сравнению с крысами Вистар) в экспрессии генов, связанных с плотными контактами, наблюдались у крыс OXYS в возрасте 20 сут — период завершения формирования сетчатки [19]. При этом изменения их экспрессии с возраста 20 сут до 3 мес. были сходными у крыс обеих линий, а на стадии манифестации и активной прогрессии признаков ВМД межлинейные различия были минимальными. Примечательно, что в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД увеличивалась экспрессия гена *Dlg1*, который активирует передачу сигналов бета-катенина — компонента сигнального пути Wnt — и таким образом участвует в регуляции ангиогенеза в сетчатке и проницаемости ГРБ [32]. Недавно было показано, что с мутацией в гене *DLG1* связано развитие семейной экссудативной витреоретинопатии — наследственного заболевания глаз, характеризующегося неполной/аномальной васкуляризацией периферической сетчатки, которая в конечном итоге приводит к полной слепоте [33].

Заключение

Механизмы инициации и прогрессирования ВМД, а также вклад в них структурно-функциональных нарушений ГРБ остаются недостаточно изученными из-за отсутствия адекватных моделей заболевания. В настоящем исследовании мы провели сравнение изменений с возрастом проницаемости ГРБ для красителя Эванса синего у крыс Вистар и крыс OXYS, у которых развивается ретинопатия, аналогичная сухой форме ВМД у людей. Выявлено снижение проницаемости ГРБ у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар на всех стадиях ретинопатии, следствием которого может быть нарушение трофики сетчатки. Анализ изменений экспрессии генов плотных контактов в сетчатке крыс OXYS по мере развития признаков ВМД может свидетельствовать об активации компенсаторных механизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №21-15-00047). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленных в Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета европейского союза от 22 сентября 2010 г., и одобрены Комиссией по биоэтике института цитологии и генетики Российской академии наук (Протокол №85/1 от 18.06.2021). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fields M.A., Del Priore L.V., Adelman R.A., Rizzolo L.J. Interactions of the choroid, Bruch's membrane, retinal pigment epithelium, and neurosensory retina collaborate to form the outer blood-retinal-barrier. *Prog. Retin. Eye Res.* 2020;76:100803.
2. Campbell M., Humphries P. The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;763:70–84.
3. Naylor A., Hopkins A., Hudson N., Campbell M. Tight junctions of the outer blood retina barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;21(1):211.
4. Díaz-Coránguez M., Ramos C., Antonetti D.A. The inner blood-retinal barrier: cellular basis and development. *Vision Res.* 2017;139:123–137.
5. Vermette D., Hu P., Canarie M.F., Funaro M., Glover J., Pierce R.W. Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med. Exp.* 2018;6(1):37.
6. O'Leary F., Campbell M. The blood-retina barrier in health and disease. *FEBS J.* 2023;290(4):878–891.
7. Фурсова А.Ж., Дербенева А.С., Васильева М.А., Никулич И.Ф., Тарасов М.С., Гамза Ю.А., Чубарь Н.В., Гусаревич О.Г., Дмитриева Е.И., Кожевникова О.С., Колосова Н.Г., Елизарова А.А. Новые данные о патогенетических механизмах развития возрастной макулярной дегенерации. *Вестн. офтальмол.* 2022;138(2):120–130.
8. Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Dербенева A.S., Nikulich I.F., Tarasov M.S., Devyatkin V.A., Rummyantseva Y.V., Telegina D.V., Kolosova N.G. Association between polymorphisms in CFH, ARMS2, CFI, and C3 Genes and response to anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Biomedicines.* 2022;10(7):1658.
9. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Kolosova N.G. Disruptions of Autophagy in the rat retina with age during the development of age-related-macular-degeneration-like Retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(19):4804.
10. Kozhevnikova O.S., Telegina D.V., Devyatkin V.A., Kolosova N.G. Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Biogerontology.* 2018;19(3):223–235.
11. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Bayborodin 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;7(1):41533.
12. Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S., Muraleva N.A., Rudnitskaya E.A., Rummyantseva Y.V., Stefanova N.A., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Fursova A.Zh. SkQ1 as a Tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats. *Biochemistry (Mosc.).* 2022;87(12):1552–1562.
13. Kelley K.A. Transport of mouse lines by shipment of live embryos. *Methods enzymology. Guide to techniques in mouse development, part A: Mice, embryos, and cells, 2nd edition, vol. 476.* Eds. P.M. Wassarman and P.M. Soriano. Academic Press; 2010:25–36.
14. Goldim M.P. de S., Della Giustina A., Petronilho F. Using Evans blue dye to determine blood-brain barrier integrity in rodents. *Curr. Protoc. Immunol.* 2019;126(1):e83.
15. Kim Y., Lee S., Zhang H., Lee S., Kim H., Kim Y., Won M.H., Kim Y.M., Kwon Y.G. CLEC14A deficiency exacerbates neuronal loss by increasing blood-brain barrier permeability and inflammation. *J. Neuroinflammation.* 2020;17(1):48.
16. *Perfusion of Mouse – Bridges Lab Protocols* [Электронный ресурс]. URL: http://bridgeslab.sph.umich.edu/protocols/index.php?title=Perfusion_of_Mouse&mobileaction=toggle_view_mobile (дата обращения: 17.01.2023).
17. Wang H.L., Lai T.W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci. Rep.* 2014;4(1):6588.
18. 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;12(11):1745–1761.
19. 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;14(22):3544–3556.
20. Cunha-Vaz J. The blood-retinal barrier in the management of retinal disease: EURETINA award lecture. *Ophthalmologica.* 2017;237(1):1–10.
21. Ivanova E., Alam N.M., Prusky G.T., Sagdulaev B.T. Blood-retina barrier failure and vision loss in neuron-specific degeneration. *JCI Insight.* 2019;4(8):e126747.
22. Shu D.Y., Butcher E., Saint-Geniez M. EMT and EndMT: Emerging roles in age-related macular degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(12):4271.
23. Telegina D.V., Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Autophagy as a target for the retinoprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. *Biochemistry (Mosc.).* 2020;85(12):1640–1649.
24. Rizzolo L.J. Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 2007;258:195–234.
25. Rizzolo L.J., Peng S., Luo Y., Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 2011;30(5):296–323.
26. Markovets A.M., Saprunova V.B., Zhbankina A.A., Fursova A.Zh., Bakeeva L.E., Kolosova N.G. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. *Aging (Albany N.Y.).* 2010;3(1):44–54.
27. Xu Q., Qaum T., Adamis A.P. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42(3):789–794.
28. Kozhevnikova O.S., Fursova A.Z., Markovets A.M., Telegina D.V., Muraleva N.A., Kolosova N.G. VEGF and PEDF levels in the rat retina: effects of aging and AMD-like retinopathy. *Adv. Gerontol.* 2018;31(3):339–344.
29. Barber A.J., Antonetti D.A., Gardner T.W. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(11):3561–3568.
30. Liu X., Dreffs A., Díaz-Coránguez M., Runkle E.A., Gardner T.W., Chiodo V.A., Hauswirth W.W., Antonetti D.A. Occludin S490 phosphorylation regulates vascular endothelial growth factor-induced retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2016;186(9):2486–2499.
31. Edwards M.M., McLeod D.S., Bhutto I.A., Grebe R., Duffy M., Luty G.A. Subretinal glial membranes in eyes with geographic atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(3):1352–1367.

32. Cho C., Wang Y., Smallwood P. M., Williams J., Nathans J. Dlg1 activates beta-catenin signaling to regulate retinal angiogenesis and the blood-retina and blood-brain barriers. *eLife*. 2019;8:e45542.

33. Zhang S., Li X., Liu W., Zhang X., Huang L., Li S., Yang M., Zhao P., Yang J., Fei P., Zhu X., Yang Z. Whole-exome sequencing identified DLG1 as a candidate gene for

familial exudative vitreoretinopathy. *Genet. Test Mol. Biomarkers*. 2021;25(5):309–316.

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 25.10.2023

Принята в печать 30.10.2023

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the state of the blood-retinal barrier during the development of signs of age-related macular degeneration in OXYS rats

D.V. Telegina , D.A. Peunov , T.A. Kozlova , N.G. Kolosova* , O.S. Kozhevnikova 

Laboratory of Ageing Molecular Mechanisms Research, Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 pr. Akademica Lavrentieva, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial neurodegenerative disease that is becoming the leading cause of irreversible vision loss in people over 55 years of age. The development of the wet form of AMD is associated with impaired permeability of the blood-retinal barrier (BRB). It was believed that the BRB does not change in the dry form of the disease, but recently it was shown that dysfunction of the BRB may also contribute to its development; however, information about the state of the BRB at different stages of AMD, especially preclinical ones, is limited. The purpose of this study was to assess the possible contribution of changes in BRB permeability to the development of signs of AMD in OXYS rats, a model of the dry form of the disease. During the period when clinical signs of AMD in OXYS rats are absent (age 20 days), during their manifestation (~5 months) and progression (at 12 and 18 months), the permeability of the BRB for Evans blue dye and the retinal contents of the tight junction proteins occludin, claudin-5, and zonula occludens-1 (ZO-1) were assessed. Wistar rats of the same age served as controls. In OXYS rats, a decrease in the permeability of the BRB was detected, which may result in a violation of the trophic supply of the retina, as well as an increase in the level of occludin during the progression of signs of AMD. ZO-1 level decreased with age, but no interstrain differences were detected. Analysis of retinal transcriptomes (RNA-seq data) showed that in rats of both strains changes in the expression of genes included (according to KEGG) in the category of tight junctions are maximum in the period from 20 days to 3 months. In OXYS rats, the mRNA levels of the *Dlg1*, *Cd1d1*, *Map3k5* and *Arhgef2* genes at the age of 3 months and the *Crb3*, *F11r*, *Cgn*, *Cd1d1* and *Rap2c* genes the age of 18 months are different compared to Wistar rats. Such changes in gene expression in the retina of OXYS rats as AMD signs develop indicate the activation of compensatory mechanisms.

Keywords: aging, retina, blood-retinal barrier, age-related macular degeneration, OXYS rats

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 21-15-00047.

Сведения об авторах

Телегина Дарья Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4128; e-mail: telegina@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8096-0519>

Пеунов Даниил Александрович — аспирант лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4128; e-mail: peunovda@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-0062-5537>

Козлова Татьяна Александровна — мл. науч. сотр. аспирант лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4129; e-mail: kozlova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9922-7496>

Колосова Наталья Гориславовна — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4109; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2398-8544>

Кожевникова Оюна Суранзановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80*4129; e-mail: oidopova@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6475-4061>