



А.М. Марковец\*, О.С. Кожевникова\*,  
В.М. Ефимов\*, А.Ж. Фурсова\*,  
Н.Г. Колосова\*

С момента решения проблемы замены катарактального хрусталика возрастная макулярная дегенерация (ВМД) стала основной причиной снижения и потери зрения людьми старшего возраста в развитых странах. С постарением их населения заболеваемость ВМД стремительно растет. Средства лечения ВМД ограничены и в основном лишь снижают скорость потери зрения при «влажной» форме заболевания, а эффективных способов лечения «сухой» формы нет. Высокие социальная цена и стоимость содержания больных ВМД диктуют необходимость использования новых способов лечения, разработка которых невозможна без знания молекулярных механизмов развития заболевания. Выяснение патогенеза, особенно на ранних доклинических стадиях, возможно только в экспериментальных исследованиях, для которых необходимы биологические модели. Исследования последних лет показали, что моделью ВМД (первой и единственной в России) может служить созданная в ИЦиГ СО РАН линия крыс ОХYS, которая уже сегодня используется для объективной оценки новых способов лечения. Клинические и структурно-функциональные проявления, молекулярные факторы, вовлеченные в патогенез развивающейся у крыс ОХYS ретинопатии, соответствуют таковым у людей с ВМД:

- Первые клинические признаки заболевания (друзы, ишемические области, изменение пигментации сетчатки) появляются у крыс ОХYS с 1,5 мес. К 3–4 мес. заболеваемость достигает 100% (рис. 1) и соответствует в этот период «сухой» форме ВМД.
- Патологический процесс прогрессирует, и к возрасту 12–14 мес. у части животных развивается «влажная» форма заболевания (отеки, серозная отслойка пигментного эпителия, большие друзы), в ряде случаев (как и у людей ~ у 7–10%) развивается неоваскуляризация.
- Экспрессия генов основных молекулярных маркеров ВМД и регуляторов ангиогенеза в сетчатке – ангиогенного фактора роста эндотелия сосудов VEGF и его антагониста фактора пигментного эпителия PEDF на ранних стадиях ретинопатии (возраст 1,5–3 мес.) у крыс ОХYS

## Изменения транскрипционного профиля сетчатки как основа развития ретинопатии у преждевременно стареющих крыс ОХYS

существенно снижена. У контрольных крыс Вистар экспрессия этих генов снижается до уровня экспрессии генов у крыс ОХYS лишь к возрасту 17–24 мес.

- С возраста 20 дней при отсутствии у крыс ОХYS клинических проявлений в их сетчатке снижена площадь клеток пигментного эпителия и просвета открытых сосудов, увеличена площадь сосудов хориоидеи с нарушениями кровотока (стазом и тромбозом). С возраста 5 мес. появляются нарушения в фоторецепторном слое и в радиальной глии, а к 24 мес. происходит практически полная дегенерация фоторецепторов.

Известно, что фенотипическим проявлениям старения и развитию связанных с ним заболеваний предшествуют характерные изменения транскриптома. Выясняя молекулярно-генетические основы развития ретинопатии у крыс ОХYS, мы исследовали профиль экспрессии генов в их сетчатке на разных стадиях заболевания, сравнивая его с таковым у крыс Вистар (использовали кДНК микрочипы «Shanghai Biochip», 12 000 генов). Сам анализ на сегодня – рутинный процесс, но обработка его результатов остается серьезной биоинформационной задачей. Анализируя результаты, мы использовали оригинальный метод объединения данных разных микрочиповых анализов для отбора генов, достоверно изменивших свою экспрессию в одном направлении (повышение или снижение) в двух различных экспериментах. Далее метод был развит и адаптирован для анализа большого массива данных различных экспериментов. Суть процесса такого отбора описывается формулой:

$$Z_{(z=x,y)} = \begin{cases} \text{sign}(z_1) \sqrt{z_1 z_2}, & z_1 z_2 > 0 \\ 0, & z_1 z_2 \leq 0 \end{cases}$$

где  $z_1, z_2$  – значения экспрессии одного и того же гена у крыс ОХYS в разных экспериментах относительно крыс Вистар; знак указывает на повышение (+) или снижение (-) экспрессии.

Анализ транскриптомов сетчатки в возрасте 20 дней, 3 и 16 мес. показал, что количество генов, экспрессия которых у крыс Вистар и ОХYS различается в 2 и более раз ( $p < 0,05$ ), с возрастом растет, но не критично (рис. 1). Количество таких генов при отсутствии клинических проявлений ретинопатии у 20-дневных крыс ОХYS равнялось 132. В 3 мес., когда начальная стадия заболевания выявляется у всех животных, их было 151 и в 16 мес. на фоне активного прогрессирования заболевания – 168. Во все возрастные периоды были широко представлены гены из функциональных групп «ответ на гипоксию», «ответ на стресс» и «энергетический метаболизм», изменения экспрессии которых характерны для старения. Важно, что типичные для старения изменения транскриптома у крыс ОХYS присутствовали уже в возрасте 20 дней. Неожиданным оказалось то, что в зависимости от возраста названные функциональные группы были в значительной степени представлены разными генами.

Для поиска генетических детерминант развития ретинопатии особый интерес представляют гены, экспрессия которых изменена у крыс ОХYS всех возрастных групп. Объединение данных экспериментов указанным выше способом позволило выявить ряд тканеспецифичных генов, предсказать вклад которых в развитие ретинопатии, опираясь на литературные данные, невозможно. Так, в сетчатке крыс ОХYS выявлены изменения экспрессии гена септина 3 (SEPT3): в возрасте

20 дней и в 3 мес. она была в 2,4 и в 9 раз выше, а в 16 мес., напротив, в 5 раз ниже, чем у крыс Вистар. SEPT3 – новый представитель семейства ГТФ-аз, экспрессирующийся исключительно в нейронах. Им обогащены пресинаптические терминалы нервов, где SEPT3, как предполагается, играет уникальную роль в формировании синапса в процессах экзоцитоза и/или эндоцитоза. Его экспрессия в сетчатке ранее не исследовалась. Экспрессия генов MPP4 (membrane palmitoylated protein-4) и HSP70 в сетчатке крыс ОХYS вдвое снижена в 20 дней и повышена в 3 мес. (подтверждено qRT-PCR). MPP4 – специфичный для сетчатки белок из семейства мембранных гуанилат киназ, играющий ключевую роль в формировании мультипротеинового пресинаптического комплекса палочек. В него входят белки-адаптеры PSD95, VELL3, а также кальциевая АТФ-аза плазматической мембраны,  $Ca^{2+}$ -связывающий белок рековерин и HSP70.

Таким образом, изменения экспрессии генов в сетчатке предшествуют манифестации признаков ретинопатии у крыс ОХYS. Впервые выявлена связь между изменениями экспрессии генов SEPT3, MPP4 и HSP70 и развитием ретинопатии, аналогичной ВМД у людей. Вклад этих изменений в развитие дегенеративных изменений сетчатки, можно полагать, определяется кумулятивными эффектами этих и других генов, реализующимися в возрастной период от 20 дней до 3 мес.

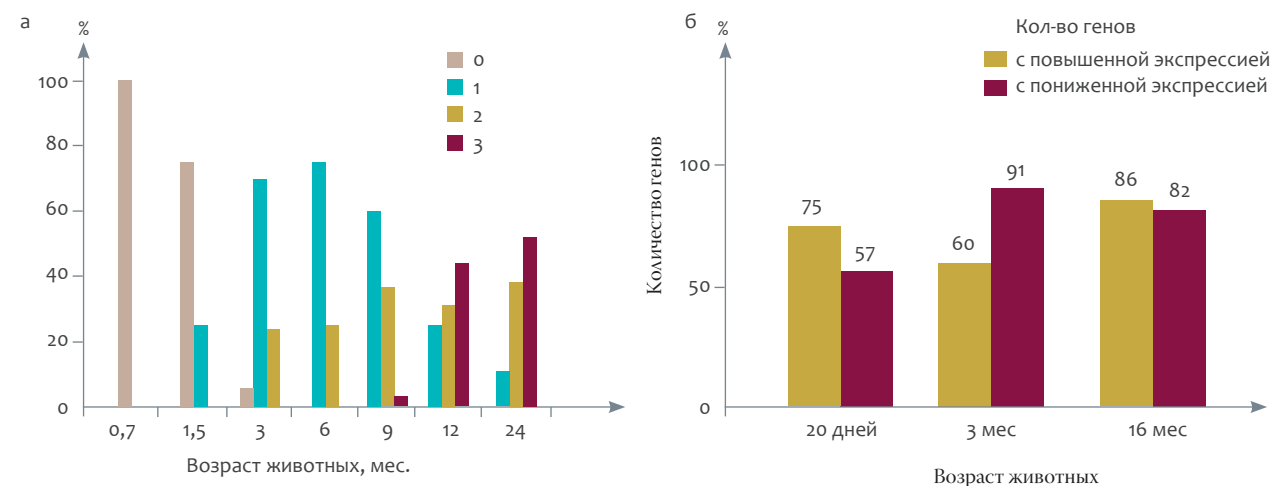


Рис. 1. а – распределение глаз крыс ОХYS по стадиям ретинопатии: 0 – сетчатка без изменений, 1, 2 и 3 – изменения, соответствующие стадиям ВМД. б – количество генов, экспрессия которых в сетчатке крыс ОХYS и Вистар разного возраста различается в 2 и более раз ( $p < 0,05$ ).