

УДК 616-092.9; 616-092.11; 617.735;

Новые экспериментальные модели фоторецепторной дегенерации сетчатки для скрининга молекулярных фотохромных блокаторов ионных каналов

А. Ю. Ротов^{1,2}, Л. А. Астахова², В. С. Ситникова^{1,2}, А. А. Евдокимов³, В. М. Бойцов⁴, М. В. Дубина⁴, М. Н. Рязанцев^{5,6*}, М. Л. Фирсов²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

³Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

⁴Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8, корп. 3, лит. А

⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, 198504, Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский просп., 26

⁶Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский просп., 49

*E-mail: mikhail.n.ryazantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2017

Принята к печати 24.01.2018

РЕФЕРАТ Применение фотохромных блокаторов ионных каналов для восстановления зрительной функции дегенерированной сетчатки является одним из новых перспективных направлений оптофармакологии. На данный момент исследован ряд фотохромных лигандов на основе азобензола, их активность показана на клеточных линиях и на моделях с «нокаутными» мышами. Для дальнейшего развития этого направления необходимо изучение физиологического действия большого количества различных фотохромных блокаторов. Цель данной работы – предложить животную модель фоторецепторной дегенерации сетчатки, более простую для получения, чем нокаутные мыши, но при этом включающую основные эффекты, необходимые для тестирования физиологического действия молекулярных фотохромных соединений. Мы изучили две новые животные модели на основе амфибий и протестировали одно из наиболее исследованных в других физиологических моделях вещество – 2-[(4-{(E)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил}фенил)амино]-N,N,N-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид (AAQ). Первый подход заключается в механическом удалении наружных сегментов фоторецепторов. Второй предполагает индукцию процесса дегенерации палочек и колбочек внутриглазным введением антибиотика туникамицина. Данные о действии AAQ на электроретинограмму согласуются с результатами работ, в которых было показано, что это соединение способно придавать дегенерированной сетчатке светочувствительность в УФ-области спектра. Таким образом, предложенные нами модели могут быть использованы для первичного скрининга потенциальных кандидатов на восстановление зрительной функции сетчатки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярные фотохромные блокаторы калиевых каналов, зрение, фоторецепторная дегенерация сетчатки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AAQ — 2-[(4-{(E)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил}фенил)амино]-N,N,N-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид; ЭРГ – электроретинограмма.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широко распространены нарушения зрения, связанные с дегенерацией фоторецепторного слоя сетчатки, такие, как пигментный ретинит и возрастная макулодистрофия [1, 2]. При этом палочки и колбочки погибают, в то время как другие типы нейронов – ганглиозные, амакриновые, биполярные и горизонтальные клетки – сохраняются (рис. 1А,Б). Из-за потери фоторецепторных клеток прекращается передача информации в мозг, т.е. утрачивается зрительная функция.

В настоящее время не существует методов, гарантирующих полное излечение от этих заболеваний. Тем не менее активно разрабатываются новые стратегии, направленные на восстановление зрения после полной дегенерации фоторецепторов. К настоящему времени известно несколько подходов к решению этой проблемы. Например, показано, что имплантируемые электронные протезы сетчатки частично восстанавливают зрительную функцию у пациентов с полным отсутствием зрения [4]. Трансплантация стволовых клеток в сетчатку приводила к восстановлению реакции на свет у слепых мышей [5], а трансплантация пигментного эпителия позволила улучшить зрение у пациентов с возрастной макулодистрофией [6]. Другой подход – оптогенетический – подразумевает встраивание в нейроны сетчатки светочувствительных белков методами генетической инженерии. Это могут быть бактериальные опсины, которые представляют собой активируемые светом ионные каналы, или гибридные белки, содержащие светочувствительные домены зрительных пигментов и С-концевые домены метаболотропных рецепторов, запускающие внутриклеточную сигнализацию. Оба

оптогенетических метода приводят к частичному восстановлению реакции на свет [7, 8].

Однако все эти методы характеризуются либо высокой инвазивностью, либо необратимостью негативных побочных эффектов. Недавно был предложен альтернативный подход к восстановлению зрительной функции сетчатки с фоторецепторной дегенерацией. Он предполагает введение в сетчатку фоточувствительных молекул, связывающихся с потенциал-зависимыми калиевыми каналами на мембране сохраненных клеток – ганглиозных, амакриновых, биполярных и горизонтальных. Однако последние не имеют прямого выхода на ганглиозные клетки, поэтому в дальнейшем не рассматриваются. Связанная молекула находится в *транс*-форме и блокирует ток ионов через канал до тех пор, пока не произойдет поглощение кванта света с определенной длиной волны. В результате происходит изомеризация фотохромного соединения в *цис*-форму, не блокирующую канал, что приводит к возникновению ионного тока, изменению мембранного потенциала и генерации фотоответа (рис. 2). Молекула изомеризуется обратно в стабильную *транс*-форму либо в темноте, либо под действием света с большей длиной волны [10]. Таким образом, клетки, активированные фотохромным блокатором, начинают отвечать на световую стимуляцию в некотором диапазоне длин волн, и появляется возможность восстановить афферентную сигнализацию от глаза к мозгу (рис. 1В).

Перспективность подобного подхода показана в электрофизиологических экспериментах на клетках линии НЕК293, экспрессирующих потенциал-зависимые калиевые каналы, а также на культуре

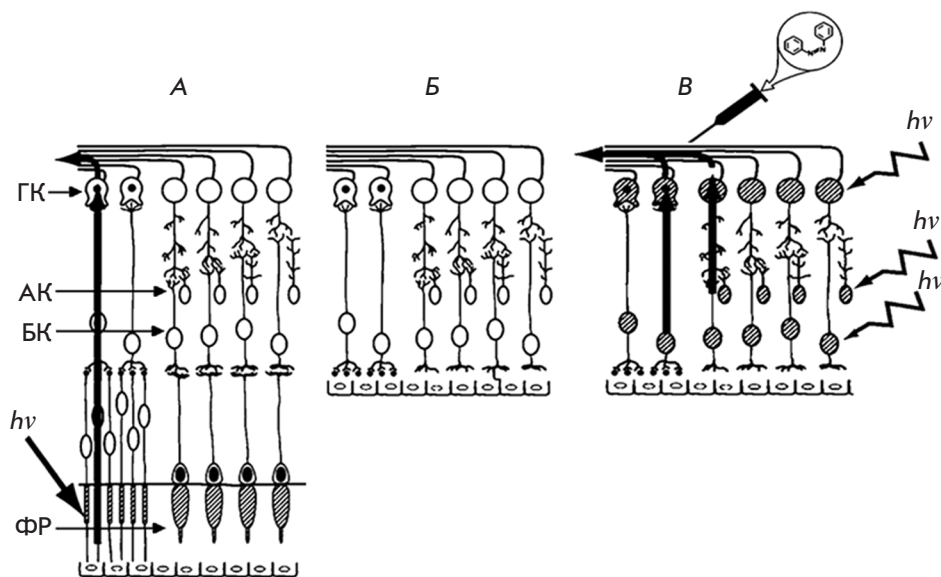


Рис. 1. Схематическое изображение сетчатки. А – здоровая сетчатка, Б – сетчатка с дегенерировавшими фоторецепторами, В – сетчатка с дегенерировавшими фоторецепторами после введения фотохромных соединений. ГК – ганглиозные клетки, АК – амакриновые клетки, БК – биполярные клетки, ФР – фоторецепторы, $h\nu$ – падающий свет. Штриховкой обозначены светочувствительные клетки. Поскольку горизонтальные не имеют прямого выхода на ганглиозные, на схеме они не представлены. Схема адаптирована из работы [3] с изменениями

нейронов гиппокампа [11]. В обоих случаях клетки приобретали светочувствительность, которая в случае нейронов проявлялась в изменении частоты генерации спайков под действием света, изомеризующего молекулы фотохромного соединения. Эксперименты на слепых мышках линии rd1 с нокаутом гена Pde6b показали не только появление ответа на световую стимуляцию у выделенной и инкубированной с фотохромным соединением сетчатки, но и восстановление поведенческих реакций на свет у животных с внутриглазным введением препарата [12, 13].

Однако при дальнейшей работе в этом направлении возникает необходимость физиологического скрининга большого количества веществ с целью выявить наиболее эффективные. Поэтому требуется более простая в использовании животная модель фоторецепторной дегенерации сетчатки, нежели мыши с нокаутом. На основе амфибий мы создали две новые животные модели. Первый подход заключается в механическом удалении наружных сегментов фоторецепторов. Второй предполагает индукцию процесса дегенерации палочек и колбочек внутриглазным введением антибиотика туникамицина. Известно, что туникамицин нарушает процесс гликозилирования опсина и формирования мембранных дисков в наружных сегментах фоторецепторов, что приводит к их деградации в течение примерно 15–25 дней [14, 15]. Преимущество этой модели перед мышьиной заключается в простоте работы с сетчаткой холоднокровных животных по сравнению с теплокровными.

К настоящему времени разработано несколько моделей дегенерации фоторецепторов у холоднокровных, но все они выполнены на рыбах [16], в том числе с применением инъекций туникамицина [17]. Однако проведение прижизненного контроля процесса дегенерации сетчатки, необходимого для отбора животных, у которых исчезла светочувствительность, с использованием таких моделей представляется крайне проблематичным по сравнению с амфибиями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез азобензола, содержащего тетраэтиламмонийный фрагмент (AAQ, схема)

4-[(E)-(4-Нитрофенил)диазенил]анилин (1a). 4-Нитроанилин (16.9 г, 0.12 моль) растворяли в смеси воды (50 мл) и водной концентрированной соляной кислоты (50 мл) при нагревании на водяной бане. К полученному раствору при охлаждении льдом добавляли раствор нитрита натрия (8.4 г, 0.12 моль) в воде (31 мл). Образовавшийся гомогенный раствор перемешивали в течение 1 ч, а затем медленно добавляли раствор анилина (11.4 г, 0.12 моль) в смеси

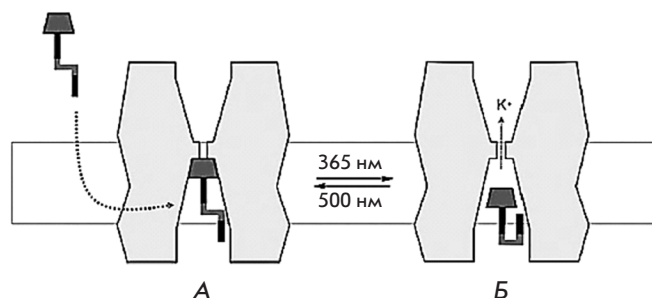


Рис. 2. Механизм действия молекулярных фотохромных соединений на K^+ -каналы. А – транс-форма фотохромного соединения, блокирующая ток ионов через канал, Б – цис-форма, не препятствующая движению ионов. Переход из одной конформации в другую происходит под действием света с определенной длиной волны. Схема адаптирована из работы [9] с изменениями

воды (122 мл) и водной концентрированной соляной кислоты (25 мл) при температуре $0-5^{\circ}\text{C}$. Смесь перемешивали при охлаждении в течение еще 2 ч, нейтрализовали с помощью водного раствора аммиака. Полученную смесь отфильтровывали и промывали водой и этанолом. Красно-коричневый порошок высушивали в вакууме. Получали (1a) с выходом 66%. $R_f = 0.74$ (гексан–этилацетат 1 : 1). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.41 (уш. с, 2H), 6.63 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 7.88 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 8.08 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 8.35 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H).

4,4'-(E)-Диазено-1,2-диилдианилин (16). Раствор амина (1a) (5.0 г, 18.5 ммоль) и нонагидрата сульфида натрия (9.8 г, 37 ммоль, 2 экв.) в этаноле (300 мл) кипятили в течение 3 ч. Растворитель отгоняли в вакууме. Образовавшееся коричневое масло перерастворяли в смеси воды (250 мл) и насыщенного водного раствора соли (15 мл), экстрагировали этилацетатом (3×100 мл), сушили над сульфатом магния, упаривали до примерно 50 мл и отфильтровывали через слой силикагеля (25 г). Получали (16) в виде красноватого порошка с выходом 80%. $R_f = 0.55$ (гексан–этилацетат 1 : 1). ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 5.73 (с, 4H), 6.61 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 7.52 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H). ^{13}C -ЯМР (100 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 113.3, 124.2, 142.8, 151.4.

N-{4-[(E)-(4-Аминофенил)диазенил]фенил}акриламид (2a) и *N,N'*-[(E)-диазено-1,2-диилбис(4,1-фенилен)]бисакриламид (2б). К интенсивно перемешиваемому раствору амина (16) (1.0 г, 4.7 ммоль) в хлористом метиле (200 мл) прикапывали раствор хлорангидрида акриловой кислоты (0.38 мл, 4.7 ммоль) в хлористом метиле (10 мл) при 0°C .

Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Растворитель отгоняли в вакууме. Продукты анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и разделяли на колонке с силикагелем (элюент гексан–этилацетат).

Соединение (**2a**): красно-оранжевый порошок (19%); ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 4.72 (с, 2H), 5.78 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.31 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.47 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.65 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.79–7.94 (м, 6H), 10.34 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (100 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 114.6 (2C), 121.3 (2C), 124.2 (2C), 125.7, 127.9 (2C), 132.4, 141.3, 145.3, 149.9, 152.5, 164.5. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$: 268.1319, найдено: 268.1324.

Соединение (**2b**): красно-коричневый порошок (42%); ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 5.82 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 2H), 6.33 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 2H), 6.50 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 2H), 7.85–7.93 (м, 8H), 10.51 (с, 1H). HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$: 322.1424, найдено: 322.1431.

N-[4-((*E*)-{4-[(2-Хлорацетил)амино]фенил}дiazенил)-фенил]акриламид (**3**). К интенсивно перемешиваемому раствору амина (**2a**) (0.5 г, 1.8 ммоль) и DIPEA (диизопропилэтиламин, 0.9 мл, 3 экв.) в хлористом метиле (15 мл) добавляли раствор хлорангидрида хлоруксусной кислоты (0.17 мл, 1.2 экв.) в хлористом метиле (5 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 12 ч при комнатной температуре, разбавляли водой и экстрагировали хлористым метилом (2 × 20 мл). Объединенные органические вытяжки промывали 5% водным раствором соляной кислоты (15 мл) и воды (15 мл), сушили над сульфатом магния. Полученный после отгонки растворителя коричневый порошок очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (элюент гексан–этилацетат). Получали (**3**) в виде красного порошка с выходом 53%. ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 4.32 (с, 2H), 5.83 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.32 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.50 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.81–7.90 (м, 8H), 10.48 (с, 1H), 10.64 (с, 1H). HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2$: 344.1035, найдено: 344.1031.

2-[(4-((*E*)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил)фенил)-амино]-*N,N,N*-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид (**4**), AAQ. К раствору соединения (**3**) (0.3 г, 0.9 ммоль) в диметилформамиде (5 мл) добавляли триэтиламин (0.2 мл). Смесь перемешивали в течение 12 ч в атмосфере азота при 50°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, растворитель отгоняли в вакууме. Образовавшийся красный продукт растворяли в дистиллированной воде и отфиль-

тровывали нерастворившийся осадок. Растворитель отгоняли в вакууме с образованием чистого продукта (**4**), AAQ в виде красного порошка с выходом 45%. ^1H -ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 1.12 (т, $J = 7$ Гц, 9H), 3.37 (м, 6H), 4.35 (с, 2H), 5.77 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.29 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.47 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.69–7.75 (м, 4H), 7.82–7.89 (м, 4H), 11.71 (с, 1H), 12.11 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (100 МГц, D_2O): 7.8 (3C), 53.3, 56.5 (3C), 120.5 (2C), 121.1 (2C), 123.2, 125.2 (2C), 128.8 (2C), 132.8, 141.8, 142.6, 148.5, 149.7, 160.4, 163.9. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2$: 409.2472, найдено: 409.2469.

Модели дегенерации фоторецепторов у холоднокровных

В качестве экспериментальных животных использовали озерных лягушек (*Rana ridibunda*), отловленных в Астраханской области. Животных содержали в виварии института при температуре 20°C и цикле освещенности 12 : 12 ч, и кормили мучными червями.

Модель с механическим удалением фоторецепторов

В рамках первого подхода отработывали метод механического отделения фоторецепторного слоя от сетчатки. Выделенную из глазного бокала сетчатку наслаивали фоторецепторами на фильтровальную бумагу, а затем снимали с нее. Наружные сегменты фоторецепторов соединяются с внутренними тонкой, легко обламывающейся ресничкой, поэтому в результате описанных манипуляций они отрываются и остаются на бумаге. Таким образом, получается модель сетчатки, лишенной светочувствительных наружных сегментов фоторецепторов.

Полученный препарат тестировали электрофизиологическими методами, чтобы убедиться в отсутствии электроретинограммы (ЭРГ) в ответ на световую стимуляцию. Препарат помещали в камеру с раствором Рингера для амфибий, для регистрации трансретинальной ЭРГ от препарата сетчатки применяли пару одинаковых хлор-серебряных электродов (World Precision Instruments, Inc., США), контактирующих со средой по разные стороны сетчатки. Состав раствора Рингера для препаратов изолированной сетчатки был следующим: 90 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.4 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы, 1.05 мМ CaCl_2 , 5 мМ NaHCO_3 , 5 мМ HEPES, 0.05 мМ EDTA, 50 мг/л бычьего сывороточного альбумина. Для стимуляции использовали белый (415–745 нм) и ультрафиолетовый (УФ, 365 нм) светодиоды. Интенсивность стимулов по обоим каналам контролировалась током через светодиоды и нейтральными светофильтрами. ЭРГ регистрировали с дискретизацией 5 мс на точку, с аналоговой фильтрацией в полосе 0–100 Гц вось-

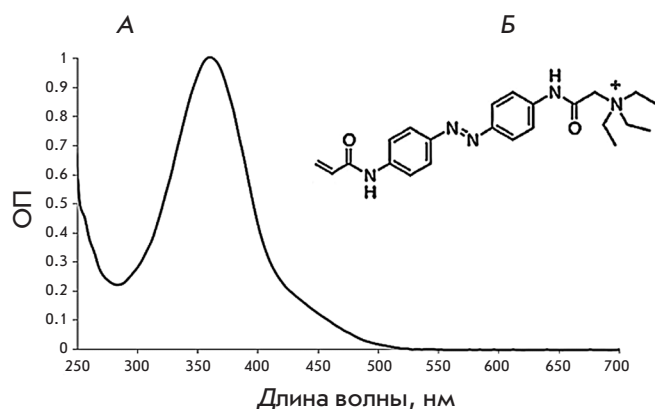


Рис 3. Спектр транс-формы ААQ в растворе Рингера для амфибий (А) и структурная формула ААQ (Б)

миполосным фильтром Бесселя. Управляющая программа была создана в лаборатории в среде Microsoft Visual Basic 96.

Модель сетчатки без фоторецепторов тестировали в эксперименте с фотохромным соединением на основе азобензола ААQ, чья эффективность известна из работы, выполненной на нокаутных мышах [12]. Для этого экспериментальную камеру заполняли 1 мМ раствором ААQ (в растворе Рингера), в котором инкубировали сетчатку в течение 30 мин. Далее раствор заменяли на чистый раствор Рингера и проводили запись ЭРГ. Известно, что ААQ меняет пространственную конформацию под действием света длиной волны 365 нм (рис. 3), поэтому его действие на дегенерировавшую сетчатку проверяли при помощи коротких вспышек и длительных засветок от УФ-светодиода. В качестве контроля использовали зеленый свет (520 нм, белый светодиод с соответствующим светофильтром).

Модель туникамицин-индуцированной фоторецепторной дегенерации

Лягушкам вводили раствор туникамицина (Sigma, из расчета 1 мкг антибиотика на 10 г массы лягушки) в DMSO в концентрации 0.5 мг/мл в один глаз; второй глаз служил контролем, в него вводили чистый растворитель в том же объеме. Через 2 ч после инъекции, а затем с интервалом в 7 дней регистрировали прижизненную ЭРГ. Перед инъекциями и записью ЭРГ лягушек анестезировали препаратом MS-222 (Sigma, водный раствор 1 мг/мл). Регистрацию с поверхности роговицы глаза анестезированного животного проводили в той же экспериментальной установке, что и для записей от препарата изолированной сетчатки. Для этого применяли серебряный проволочный кольцевой электрод, контактирующий с роговицей при помощи токопроводящего офталь-

мологического геля, с молочно-белым диффузором, распределяющим свет равномерно по площади зрачка. Электродом сравнения служил серебряный проволочный электрод, закладываемый животному в ротовую полость. Световую стимуляцию проводили с помощью коротких (10 мс) насыщающих вспышек белого светодиода. Таким образом прослеживали процесс дегенерации фоторецепторов. После того как у животных пропадал фотоответ, их декапитировали и получали препарат сетчатки, лишенной фоторецепторов. Параметры записи (дискретизация и полоса фильтрации) были такими же, как при регистрации ЭРГ от изолированной сетчатки с механически удаленными фоторецепторами.

Препарат сетчатки, выделенной из глаза, подвергнувшегося действию туникамицина и потерявшего светочувствительность, дополнительно проверяли на отсутствие ЭРГ, а затем тестировали с фотохромным соединением ААQ так же, как и в случае модели с механическим удалением фоторецепторов.

Морфологический контроль фоторецепторной дегенерации

После исчезновения фотоответов в глазу, в который вводили туникамицин, у трех лягушек после декапитации производили забор глазных бокалов для последующего гистологического исследования. Использовали такой же протокол фиксации препаратов, как в работе Силлмана и соавт. [18]. Глазные бокалы на 1.5 ч помещали в 1% раствор глutarового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере. Затем препараты дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере в течение 4 ч и хранили в течение нескольких недель в 1% растворе параформальдегида. Потом препараты подвергали отмывке в 0.1 М фосфатном буфере, дегидратации в этаноле и заливали в эпоксидную смолу LR White (Fluka). Срезы толщиной 1–3 мкм изготавливали с помощью ультрамикротомы LKB, окрашивали толуидиновым синим и проводили световую микроскопию с целью выявления слоя фоторецепторных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез азобензола, содержащего тетраэтиламмонийный фрагмент (ААQ)

Водорастворимый азобензол, содержащий тетраэтиламмонийный фрагмент, был синтезирован в несколько стадий из простых и легкодоступных соединений. Азогруппу вводили реакцией азосочетания соответствующей соли диазония с анилином (схема). Полученный 4-нитроазобензол (1a) может быть восстановлен до 4,4'-диаминоазобензола (1б) с помощью

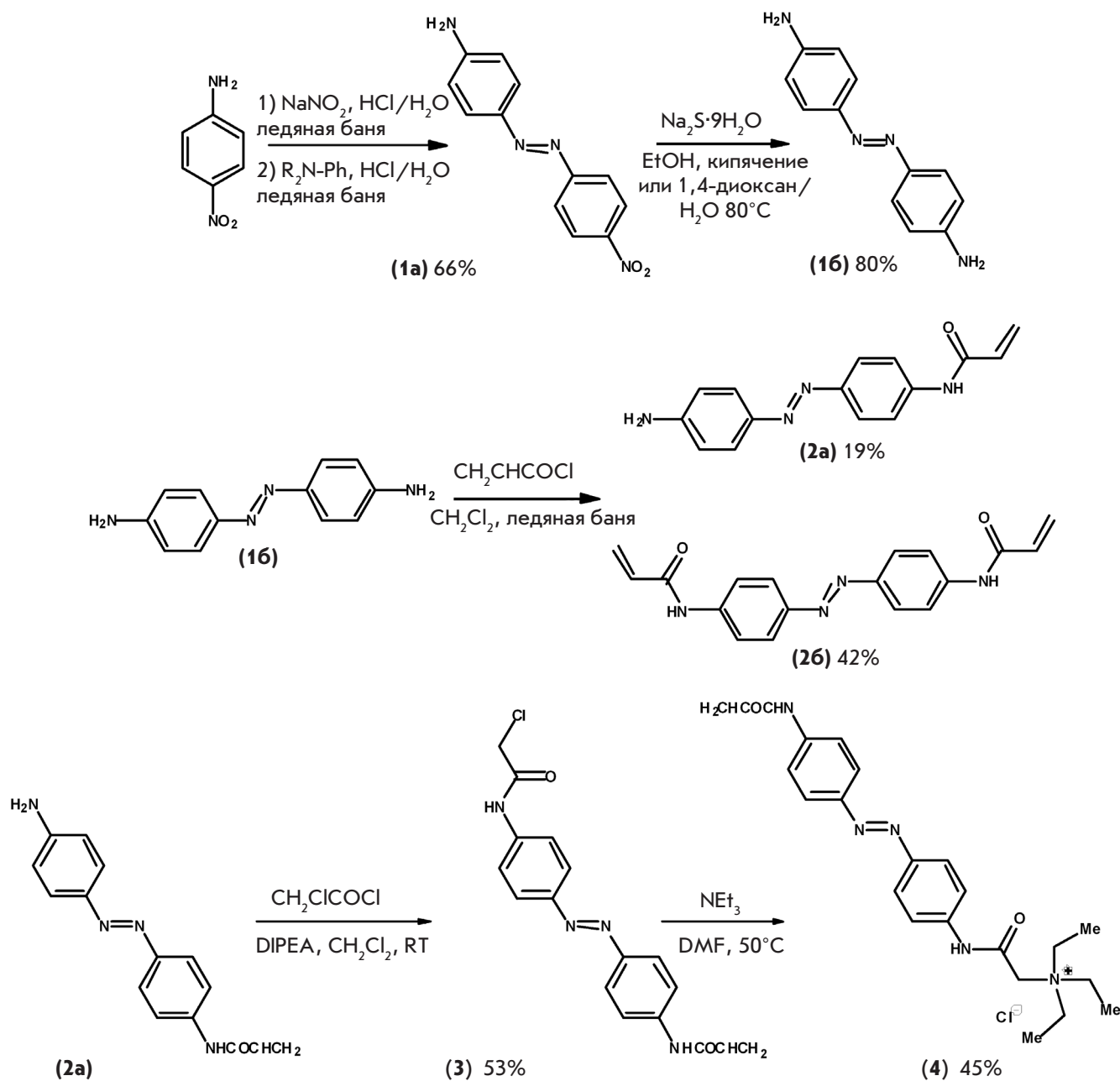


Схема. Синтез аминоазобензола, содержащего четвертичный аммонийный катион

сульфида натрия как в кипящем этаноле, так и в водном 1,4-диоксане (схема). Монозамещенный 4,4'-диаминоазобензол (2a) был получен в результате реакции азобензола (16) с хлорангидридом акриловой кислоты. В качестве побочного продукта в данной реакции образуется соответствующий диаддукт (26) (схема). Четвертичный аммонийный катион был введен в целевой продукт в две стадии (схема). На первой стадии в результате обработки аминоазобензола (2a) хлорангидридом хлоруксусной кислоты образу-

ется амид (3), взаимодействие которого с триэтиламино приводит к образованию целевого соединения (4) (AAQ) с умеренными выходами.

Модели дегенерации фоторецепторов у холоднокровных

Модель с механическим удалением фоторецепторов. Регистрация ЭРГ показала, что препарат интактной сетчатки содержит все основные компоненты

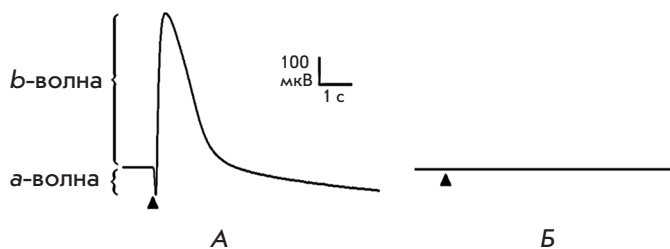


Рис. 4. ЭРГ препарата интактной сетчатки в ответ на световую стимуляцию (А) и ЭРГ препарата сетчатки после механического удаления фоторецепторов (Б). Стимуляция зеленым светом (520 нм), длительность вспышки 10 мс, интенсивность 2.9×10^6 фотонов/мкм²/с. Момент вспышки обозначен треугольником

ретинограммы: а-волну, характеризующую гиперполяризацию фоторецепторов, и b-волну, которая проявляется как результат работы мюллеровских и биполярных клеток (рис. 4А). После механического удаления фоторецепторного слоя наблюдается либо отсутствие ответа на стимуляцию светом как видимого диапазона, так и УФ, либо наличие слабых остаточных ответов амплитудой несколько мкВ (рис. 4). При этом у остаточного ответа сохраняется только b-волна, в то время как а-волна полностью исчеза-

ет (рис. 5А,В). Эти результаты говорят о том, что использованный подход позволяет получить рабочую модель дегенерировавшей сетчатки, которую можно использовать в дальнейших исследованиях.

Результаты проверки с фотохромным соединением ААQ. Стимуляция сетчатки зеленым светом, проведенная после инкубации в растворе ААQ, как и ожидалось, не привела к возникновению ответа (рис. 5Б). Реакции на короткие вспышки УФ-света не возникали, в то время как длительная стимуляция УФ приводит к возникновению ответа, направленного в ту же сторону, что и а-волна нормальной ЭРГ амплитудой от 10 до 100 мкВ (рис. 5Г). Ответ заключается в изменении потенциала, которое прекращается сразу после выключения засветки, после чего потенциал сохраняет стабильное значение. Возврата потенциала к исходному уровню либо не происходит, либо он слишком медленный. Амплитуда возникающего ответа зависит от интенсивности светового стимула: чем выше интенсивность УФ-стимула, тем больше изменение потенциала (рис. 6).

Модель туникамицин-индуцированной фоторецепторной дегенерации. Инъекции туникамицина приводили к прогрессирующему уменьшению амплитуды ответа на короткие вспышки света (рис. 7). На панели а видно, что амплитуда ЭРГ глаза, в ко-

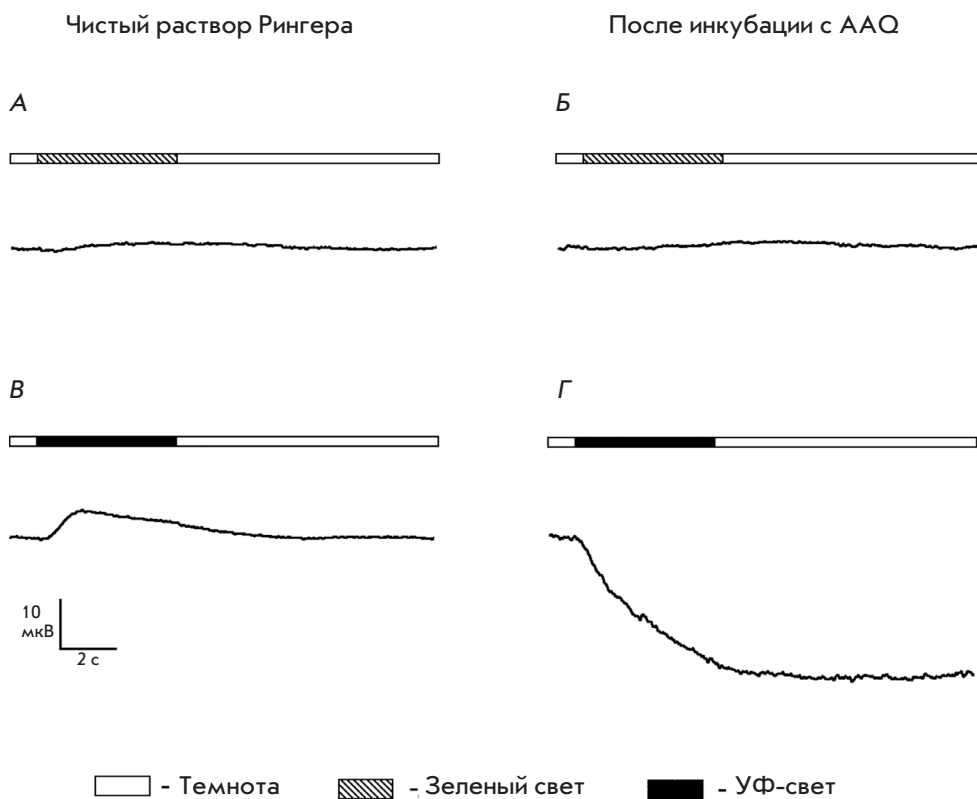


Рис. 5. Сравнение трансретиальной ЭРГ сетчатки с механически удаленными фоторецепторами, возникающей в ответ на зеленый и УФ-стимул в чистом растворе Рингера (А, В), и после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (Б, Г). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Длительность световой стимуляции 5 с. Интенсивность зеленого света (520 нм) – 2.9×10^6 фотонов/мкм²/с. Интенсивность УФ (365 нм) – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с

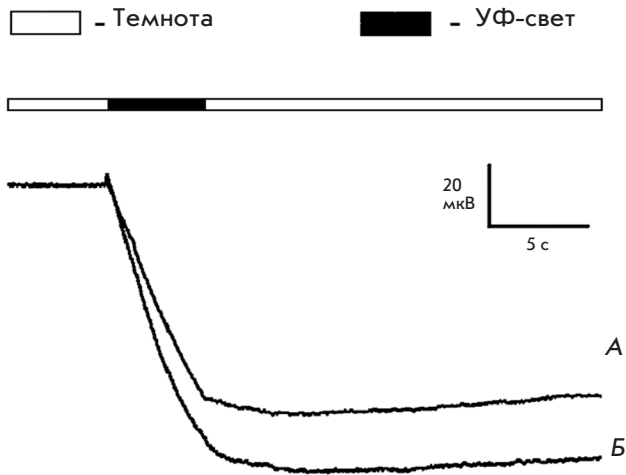


Рис. 6. Ответы сетчатки с механически удаленными фоторецепторами на длительную (5 с) УФ-засветку (365 нм) разной интенсивности после инкубации с ААQ. А – интенсивность 2.7×10^8 фотонов/мкм²/с, Б – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с. Сверху приведена схема световой стимуляции

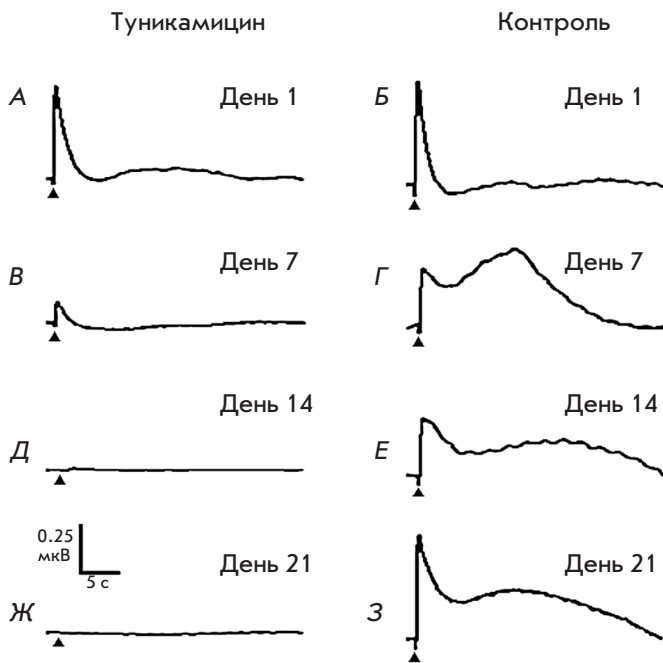


Рис. 7. ЭРГ, регистрируемая с роговицы анестезированной лягушки на разных сроках после инъекций. А, В, Д, Ж – от глаза, в который вводили туникамицин. Б, Г, Е, З – от глаза, в который вводили только растворитель (DMSO). Стимуляция белым светом (диапазон 415–745 нм), длительность вспышки 10 мс, интенсивность примерно 9 Вт/мкм² площади зрачка. Момент вспышки обозначен треугольником

торый был введен туникамицин, на насыщающую вспышку света постепенно снижалась, и на 14–21 день ответ исчезал полностью, что говорит о дегенерации фоторецепторного слоя и утрате светочувствительности сетчатки в целом. Контрольный глаз, в который вводили чистый растворитель (DMSO) (рис. 7Б), сохранял реакцию на световую стимуляцию на всех сроках после инъекции, что свидетельствует о том, что сама по себе инъекция не нарушает работу сетчатки.

Микроскопия срезов глазных бокалов подтвердила селективную дегенерацию фоторецепторных клеток сетчатки под действием туникамицина. На рис. 8А, где показан поперечный срез глазного бокала, выделенного из контрольного глаза лягушки (инъекция DMSO), хорошо видны все слои сетчатки. В сетчатке глаза, подвергнутого действию туникамицина, слой фоторецепторных клеток отсутствует (рис. 8Б), но биполярные, амакриновые и ганглиозные клетки сохраняются. Следовательно, такая модель дегенерации потенциально может использоваться для тестирования молекулярных фотохромных соединений.

Изолированная сетчатка из глаза, подвергнутого действию туникамицина, не отвечала на стимуляцию ни зеленым светом, ни УФ (рис. 9А,В), что подтверждает результаты записи прижизненной ЭРГ и наглядно показывает, что проведенные манипуляции привели к желаемому результату – получению модели фоторецепторной дегенерации.

Результаты проверки с фотохромным соединением ААQ. Инкубация в растворе ААQ приводит к тому, что длительная засветка УФ, как и в модели сетчатки с механически удаленными фоторецепторами, вызывает возникновение ответа, направленного в ту же сторону, что и а-волна нормальной ЭРГ амплитудой 10–30 мкВ (рис. 9Б,Г). Регистрируемый сигнал после выключения засветки сохраняет стабильное значение, т.е. характер ответа совпадает с ответом модели с механически удаленными фоторецепторами. Стимуляция зеленым светом не приводит к возникновению ответа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ААQ восстанавливает светочувствительность модельного препарата в области ближнего УФ, предположительно за счет светозависимой регуляции ионных каналов молекулами фотохромного соединения, причем оба подхода к получению модели дегенеративной сетчатки дают сходные результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данного исследования стали две новые экспериментальные модели фоторецепторной дегенерации сетчатки, которые можно в дальнейшем ис-

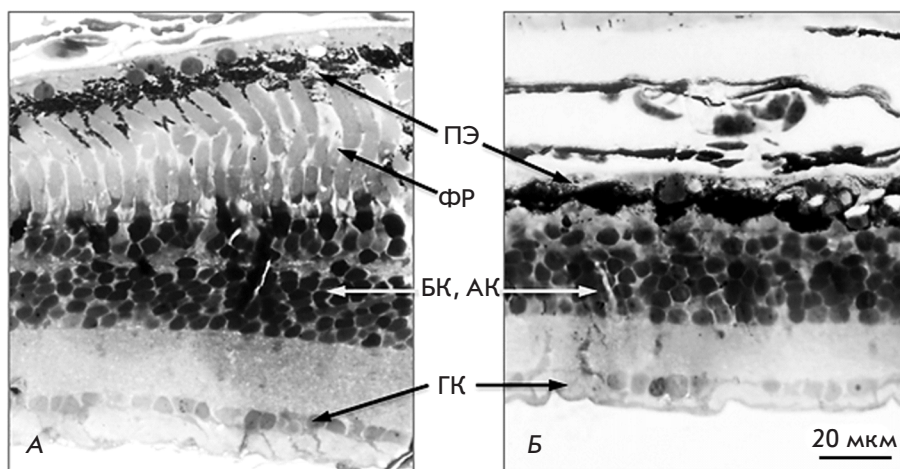


Рис. 8. Световая микроскопия препаратов сетчатки. А – сетчатка контрольного глаза, в который вводили DMSO. Б – сетчатка глаза, в который вводили туникамицин. ПЭ – пигментный эпителий, ГК – ганглиозные клетки, АК – амакриновые клетки, БК – биполярные клетки, ФР – фоторецепторы. В сетчатке, подвергнутой действию туникамицина, фоторецепторный слой отсутствует, однако сохранились другие типы клеток

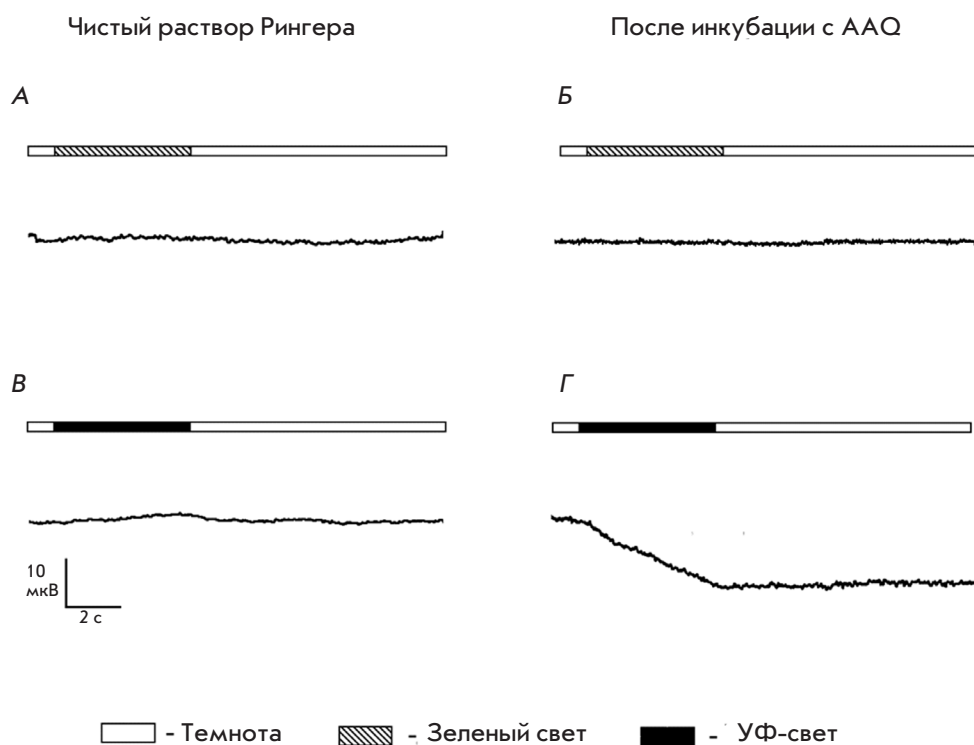


Рис. 9. Сравнение трансретинальной ЭРГ сетчатки, дегенерировавшей под действием туникамицина, возникающей в ответ на зеленую и УФ-засветки, в чистом растворе Рингера (А, В) и после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (Б, Г). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Длительность световой стимуляции 5 с. Интенсивность зеленого света (520 нм) – 2.9×10^8 фотонов/ $\text{мкм}^2/\text{с}$. Интенсивность УФ (365 нм) – 6.5×10^8 фотонов/ $\text{мкм}^2/\text{с}$

пользовать для первичного скрининга новых молекулярных фотохромных блокаторов калиевых каналов.

Полученные нами данные о действии ААQ на ЭРГ согласуются с результатами других авторов, которые показали, что это соединение способно придавать дегенерировавшей сетчатке светочувствительность в УФ-области спектра [12]. Продемонстрированный авторами эффект молекулярных фотохромных соединений выражался в том, что под действием длительной стимуляции УФ частота генерации спайков

ганглиозными клетками заметно возрастала (регистрация с помощью мультиэлектродной матрицы), а при выключении света или замены его на зеленый – возвращалась к исходному уровню. В настоящей работе мы показали, что при чередовании УФ-стимула и темноты, а также УФ и зеленого света наблюдается несколько иная картина: потенциал изменяется только во время УФ-засветки, а в темноте или при зеленом освещении уровень сигнала остается стабильным, но без возврата к исходному уровню (рис. 10).

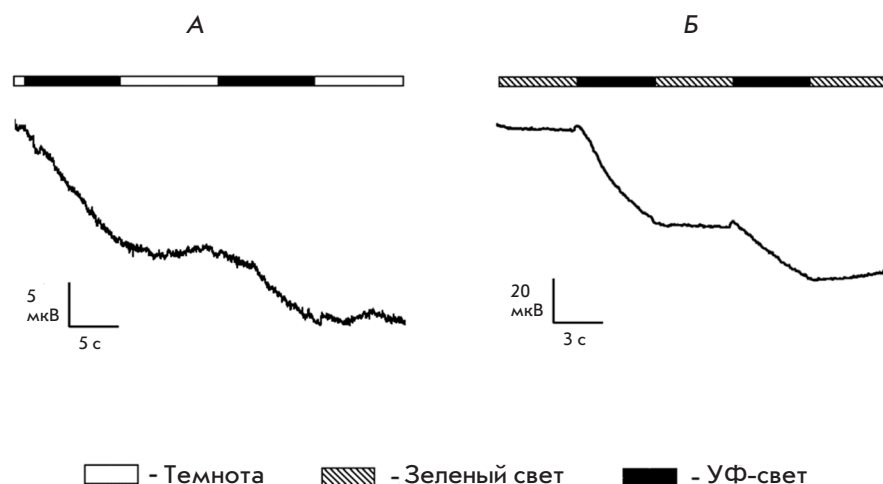


Рис. 10. Запись ЭРГ от сетчатки, дегенерировавшей под действием туникамицина, при чередовании УФ-засветки (365 нм) с периодами темноты после 30 мин инкубации в 1 мМ ААО (А) и запись ЭРГ от сетчатки с механически удаленными фоторецепторами при чередовании УФ (365 нм) засветок с зелеными (520 нм) после 30 мин инкубации в 1 мМ ААО (Б). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Интенсивность зеленого света – 2.9×10^8 фотонов/мкм²/с. Интенсивность УФ – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с

Наши данные также говорят о том, что ААО не может рассматриваться как кандидат на применение в клинической практике для восстановления зрительной функции, не только ввиду своей неспособности к работе под действием света, видимого человеческим глазом, но также из-за сверхмедленной кинетики выключения возникающих фотоответов. Однако полученные на амфибиях модели фоторецепторной дегенерации могут быть использованы для тестирования новых соединений и выявления наиболее перспективных. Подход, предполагающий механическое удаление фоторецепторов, позволяет получить модельный препарат быстро, и его применение ускоряет процесс скрининга фотохромных соединений. В то же время туникамициновая дегенерация фоторецепторов происходит постепенно, и в сетчатке успевают произойти структурные перестройки, характерные для таких заболеваний, как пигментный ретинит и возрастная макулодистрофия [19]. Туникамициновая модель позволяет исследовать действие молекулярных фотохромных соединений в ремоделированной сетчатке.

В дальнейшем модель туникамициновой дегенерации можно будет апробировать на лабораторных крысах с целью получения модели, более прибли-

женной к человеку, и изучения эффекта действия соединений на сетчатке теплокровных. Попытки создать модель туникамициновой дегенерации фоторецепторов на крысах уже предпринимались и описаны [20], однако действие молекулярных фотохромных соединений в рамках такой модели не изучено. ●

Выражаем благодарность В.И. Говардовскому (ИЭФБ РАН) за консультации и помощь в проведении электрофизиологических экспериментов и микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-29-03872).

М. Н. Рязанцев и В.М. Бойцов благодарят за финансовую поддержку Фонд «Сколково» (Соглашение о предоставлении гранта российской образовательной и научной организации № 7 от 19.12.2017) и Сколковский институт науки и технологий (Генеральное соглашение о научно-исследовательской деятельности № 3663-MRA от 25.12.2017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamel C. // Orphanet J. Rare Dis. 2006. V. 1 (1). P. 1–40.
2. Guadagni V., Novelli E., Piano I., Gargini C., Strettoi E. // Prog. Retinal Eye Res. 2015. V. 48. P. 62–81.
3. Drivas T.G., Bennett J. // Neuron. 2012. V. 75 (2). P. 185–187.
4. Weiland J.D., Cho A.K., Humayun M.S. // Ophthalmology. 2011. V. 118 (11). P. 2227–2237.
5. Lamba D.A., Gust J., Reh T.A. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4 (1). P. 73–79.

6. Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C.K., Ostrick R.M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., Lanza R. // Lancet. 2012. V. 379 (9817). P. 713–720.
7. Sahel J.A., Roska B. // Annu. Rev. Neurosci. 2013. V. 36. P. 467–488.
8. van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S. // PLoS Biol. 2015. V. 13 (5). e1002143.
9. Mourot A., Kienzler M.A., Banghart M.R., Fehrentz T., Huber F.M., Stein M., Kramer R.H., Trauner D. // ACS Chem. Neurosci. 2011. V. 2 (9). P. 536–543.

10. Banghart M.R., Mourot A., Fortin D.L., Yao J.Z., Kramer R.H., Trauner D. // *Angewandte Chem. Internat. Ed.* 2009. V. 48 (48). P. 9097–9101.
11. Fortin D.L., Banghart M.R., Dunn T.W., Borges K., Wagenaar D.A., Gaudry Q., Karakossian M.H., Otis T.S., Kristan W.B., Trauner D., Kramer R.H. // *Nat. Meth.* 2008. V. 5 (4). P. 331–338.
12. Polosukhina A., Litt J., Tochitsky I., Nemargut J., Sychev Y., De Kouchkovsky I., Huang T., Borges K., Trauner D., van Gelder R.N., Kramer R.H. // *Neuron.* 2012. V. 75 (2). P. 271–282.
13. Tochitsky I., Polosukhina A., Degtyar V.E., Gallerani N., Smith C.M., Friedman A., van Gelder R.N., Trauner D., Kaufer D., Kramer R.H. // *Neuron.* 2014. V. 81 (4). P. 800–813.
14. Fliesler S.J., Basinger S.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82 (4). P. 1116–1120.
15. Fliesler S.J., Rapp L.M., Hollyfield J.G. // *Nature.* 1984. V. 311 (5986). P. 575–577.
16. Blanco-Sánchez B., Clément A., Phillips J.B., Westerfield M. // *Meth. Cell Biol.* 2017. V. 138. P. 415–467.
17. Negishi K., Sugawara K., Shinagawa S., Teranishi T., Kuo C.H., Takasaki Y. // *Developmental Brain Res.* 1991. V. 63 (1–2). P. 71–83.
18. Sillman A.J., Govardovskii V.I., Röhlich P., Southard J.A., Loew E.R. // *J. Comparative Physiol. A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiol.* 1997. V. 181 (2). P. 89–101.
19. Marc R., Pfeiffer R., Jones B. // *ACS Chem. Neurosci.* 2014. V. 5 (10). P. 895–901.
20. Shirai Y., Mori A., Nakahara T., Sakamoto K., Ishii K. // *Biol. Pharmaceut. Bull.* 2015. V. 38 (7). P. 1076–1080.