

УДК 576.311:591.484.3:598.617.1

**ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР РЕТИНАЛЬНОГО  
ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПЕРЕПЕЛА  
*Coturnix japonica***

© 2015 П.П. Зак<sup>1\*</sup>, Н.Б. Сережникова<sup>1,2</sup>, Л.С. Погодина<sup>2</sup>,  
Н.Н. Трофимова<sup>1</sup>, Т.С. Гурьева<sup>3</sup>, О.А. Дадашева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
119934 Москва; электронная почта: pavelzak@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119991 Москва

<sup>3</sup> Институт медико-биологических проблем РАН,  
123007 Москва, Хорошевское шоссе, 76А

Поступила в редакцию 12.01.15  
После доработки 10.03.15

Работа выполнена на молодых 15-недельных половозрелых самках японского перепела *Coturnix japonica*, выращенных при разных спектральных видах освещения. Показано, что после 95-дневной ежедневной световой экспозиции в ретиальном пигментном эпителии птиц, содержавшихся при синем освещении (440–470 нм), по сравнению с птицами, выращенными при освещении со сниженной синей световой компонентой, наблюдалось повышение в полтора раза численности митохондрий и фагосом. Также найдено, что содержание птиц при синем освещении по сравнению с другими световыми режимами приводит к увеличению на 15% яйценоскости. Сделан вывод о том, что синее освещение повышает метаболическую активность и ускоряет темп жизни *Coturnix japonica*. Предполагается, что вероятным механизмом действия синего света является торможение синтеза мелатонина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ретиальный пигментный эпителий, синий свет, митохондрии, японский перепел, электронная микроскопия.

Синий свет видимого диапазона ( $\lambda_{\text{макс}}$  450 нм) известен как небезопасный «незрительный» фактор фотобиологического действия на сетчатку глаза человека и животных. Реальная опасность кратковременных мощных экспозиций синим светом оценена на различных животных моделях, включая приматов (макак-резус, *Macaca mulatta*) [1, 2]. Показано, что видимый свет синего диапазона с  $\lambda$  450 нм ( $B_{\lambda}$  согласно светотехнической номенклатуре по зрительной безопасности) при однократных кратковременных экспозициях вызывает распознаваемые дегенерации сетчатки при дозах  $\sim 50$  Дж/см<sup>2</sup> на поверхности роговицы, в то время как для света длинноволнового видимого диапазона 500–650 нм пороговые дозы фотоповреждения находятся в пределах 500–1000 Дж/см<sup>2</sup> [3]. Существует обширная литература о возможной роли синего света в провоцировании глазных заболеваний и развитии старения сетчатки [4]. Известными мишенями патогенного действия синего света

являются фототоксичные бис-ретиноиды липофусциновых гранул в клетках ретиального пигментного эпителия (РПЭ), генерирующие свободные радикалы [5, 6]. Существует ряд работ, в которых показано, что свет синего диапазона способен оказывать повреждающее действие на митохондрии РПЭ, приводя к выходу из них в цитоплазму цитохрома *c* и последующему запуску апоптотической гибели клеток [7, 8]. При этом ограничивающим фактором негативного действия синего света, вероятно, является мелатонин, синтез которого регулируется синечувствительными меланопсиновыми клетками сетчатки [9]. Для исследования механизмов патогенного действия синего света на сетчатку используется целый ряд животных моделей. Одной из наиболее удачных моделей является мелкая домашняя птица – японский перепел *Coturnix japonica* [10–12]. По сравнению с обычными лабораторными животными (грызуны, кошки, собаки и др.) эти птицы, наравне с человеком и приматами, имеют центральную область острого зрения, защищенную от синего

\* Адресат для корреспонденции.

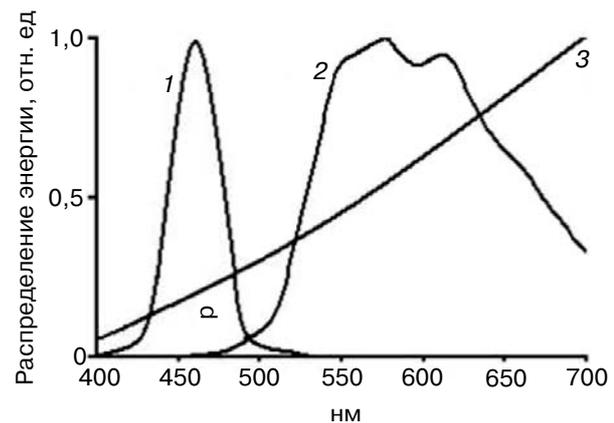
света оксикаротиноидами лютеин-зеаксантинового ряда. Биологический срок жизни *Coturnix japonica*, в среднем, составляет около полутора лет, за которые его сетчатка претерпевает те же старческие изменения, что и у человека к 70–80-летнему возрасту. Так, к 9-месячному возрасту в РПЭ японского перепела концентрация липофусциновых гранул достигает тех же величин, что и у 80-летних людей [13], а ретиальная острота зрения этих птиц с возрастом существенно падает [14]. Ранее, в статье Зака и соавт. [15] мы показали, что синий свет (440–470 нм, 4 Дж/см<sup>2</sup> при 40-минутной экспозиции) вызывал выраженные нарушения гематоретинального барьера РПЭ *Coturnix japonica*, аналогичные возрастным изменениям. Показано также, что такой синий свет вызывал структурные изменения в ядрах некоторых клеток РПЭ, характерные для апоптоза. Кроме того, установлено [15, 16], что общим свойством старения и повреждающего действия синего света в клетках РПЭ *Coturnix japonica* является повышение численности видоизмененных (чашевидных) митохондрий, которые, согласно литературным данным [17–19], свидетельствуют о неблагоприятии клеточной жизнедеятельности. Наряду с использованием *Coturnix japonica* как модели ускоренного старения, эти домашние птицы используются при изучении мелатонин-регулируемых циркадных ритмов. Для этих животных характерны резко выраженные суточные изменения мелатонина, причем 30% мелатонина крови *Coturnix japonica* синтезируется непосредственно в фоторецепторных клетках сетчатки, в то время как у человека ретиальный мелатонин составляет ~15% общего пула [20]. В настоящее время активно дискутируется тема возможных отдаленных последствий избыточного синего света в провоцировании возрастной слепоты [21], в частности, возрастной макулярной дегенерации [4]. Так, в заключении Европейской комиссии по глазным рискам от 2012 г. (<http://ec.europa.eu/health/scientificcommittees/policy/index>) считается приоритетным проведение исследований по оценке отдаленных негативных последствий повседневного освещения с избыточной синей компонентой, в частности, светодиодного освещения. Представленная нами работа направлена на оценку возможных рисков повседневного хронического освещения с избыточной синей компонентой.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на 15-недельных самках *Coturnix japonica*, содержащихся изолированно без присутствия самцов. По

достижении полуторамесячного возраста птицы были разделены на три группы с разными условиями освещения. Контрольную группу животных содержали при общепринятом стандартизированном освещении лампой накаливания, которая по светотехнической номенклатуре является одним из источников искусственного белого света. Одну из опытных групп содержали при синем светодиодном освещении в спектральной полосе 440–470 нм, а вторую освещали «желтым» светом (спектральная полоса 500–650 нм), сформированным «белым» светодиодным светильником в сочетании со светофильтром, отсекающим свет короче 500 нм. Согласно приведенным спектрам излучения (рис. 1), лампа накаливания и источник «желтого» освещения должны быть близки по фотобиологическому действию, поскольку оба световых источника имеют доминирующую световую полосу излучения в длинноволновой области спектра (от 500 нм и более) без заметного долевого участия в синей области спектра (от 500 нм и менее).

Был использован общепринятый цикл суточного освещения при содержании перепелов: 15 ч постоянного освещения и 9 ч темного перерыва. Включение и выключение света производили автоматически таймером-контроллером. Все три вида освещения были выровнены по мощности: 0,002 Вт/см<sup>2</sup> по центру птичьей клетки (40 см от источника освещения). В единицах освещенности использованный свет составлял около 200–25 Лк. Фото- и спектрометрические калибровки производили спектрометрами Avantes-2048 («Avantes», Голландия) и МК-350 («Uptech», Тайвань).



**Рис. 1.** Спектральное распределение энергии трех видов источников освещения. 1 — Синее освещение (доминирующая спектральная полоса 440–470 нм); 2 — желтое освещение (доминирующая спектральная полоса 530–650 нм и отсутствие излучения в синей области спектра); 3 — лампа накаливания (спектр излучения со сниженной синей компонентой и с преобладанием желтой области спектра)

Раздельное содержание птиц при разных условиях освещения было начато с их полуторамесячного возраста. Общая длительность раздельного содержания птиц при разном спектральном освещении составила 95 сут. Птиц декапировали, и отпрепарированные глазные бокалы, включающие склеру, сосудистую оболочку, РПЭ и нейрональную сетчатку, помещали в фиксирующий раствор согласно методике, подробно описанной в нашей предыдущей работе [16]. Использовали трансмиссионную электронную микроскопию (микроскопы JEM-100В и JEM-1011 («JEOL», Япония, увеличение 8000× и 25 000×) поперечных срезов РПЭ центральной (макулярной) зоны сетчатки размером ~1 мм<sup>2</sup>. Для количественной оценки на электронно-микроскопических фотографиях в программе «Adobe Photoshop CS4» («Adobe Systems, Incorporated», США) и с помощью квадратной тестовой решетки 8 × 8 мкм стандартным морфометрическим методом [22] определяли численность (количество на 100 мкм<sup>2</sup>) функционально значимых субклеточных структур РПЭ (митохондрий, липофусциновых гранул, миелоидных телец, фагосом), которые, как показано нами ранее [16], сосредоточены преимущественно в слое базальной части цитоплазмы толщиной ~8 мкм. Для каждого животного было проанализировано около 50-ти клеток РПЭ разных участков макулярной зоны. В измерениях были использованы глаза пяти птиц из каждой группы.

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica 5.5 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, различия признавали достоверными при  $p < 0,05$ . Соответствие эмпирического распределения нормальному проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова ( $\alpha = 0,05$ ).

Светоиндуцированные изменения общего статуса организма разных групп самок *C. japonica* оценивали по среднесуточной яйценоскости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке среднесуточной яйценоскости было найдено, что птицы, содержащиеся при синем освещении, обладали повышенной на 15% яйценоскостью по сравнению с птицами, выращенными при освещении со сниженной синей световой компонентой, т.е. при желтом освещении и освещении лампами накаливания.

На рис. 2 представлена обзорная электронно-микроскопическая фотография, демонстрирующая типичную картину распределения и состояния субклеточных частиц в области базальной мембраны клеток РПЭ *Coturnix japonica*.

Согласно приведенной фотографии, субклеточные структуры РПЭ молодых 15-недельных *Coturnix japonica* имеют строгое послойное распределение, которое отражает их функциональную роль и направленность метаболических процессов. Наиболее значимой функцией клеток РПЭ является создание гематоретинального барьера, аналога гематоэнцефалического барьера. Пассивную фильтрацию веществ из кровяного русла обеспечивает соединительнотканная мембрана Бруха. Активный транспорт веществ между РПЭ и внеклеточным пространством выполняется многочисленными базальными отростками клеточной мембраны РПЭ. Энергетическое обеспечение активного транспорта и переработку метаболитов обеспечивают многочисленные митохондрии, расположенные слоем у оснований базальных отростков РПЭ. Для РПЭ птиц молодого возраста 15-недельного возраста, как это видно на рис. 2, характерны высокая упорядоченность в расположении базальных отростков, округлые формы клеточных ядер и митохондрий, гомогенная структура мембраны Бруха и малая численность липофусциновых гранул.

При повседневном содержании птиц с разными спектральными условиями освещения достоверные различия ( $p < 0,05$ ) наблюдались в численности митохондрий, а также в изменении численности фагосом (таблица).

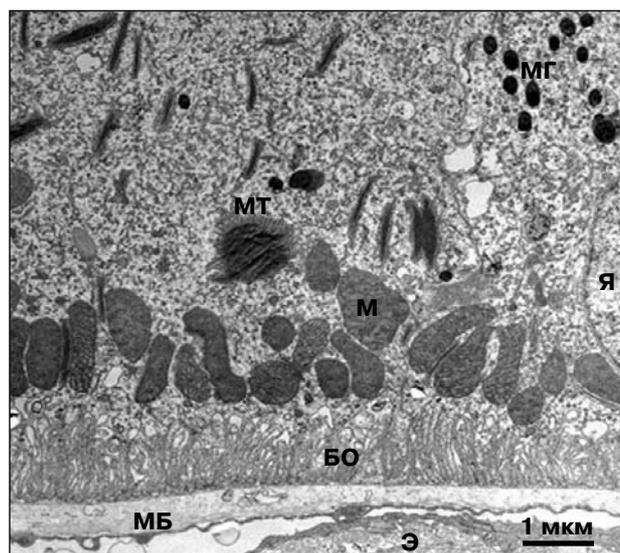


Рис. 2. Электронно-микроскопическая фотография поперечного среза клетки РПЭ *C. japonica*, демонстрирующая чрезвычайно стратифицированное распределение субклеточных структур. Я – клеточное ядро; М – митохондрии; БО – базальные отростки; МБ – мембрана Бруха; Э – эндотелий кровеносных капилляров; МТ – миелоидные тельца; МГ – меланиновые гранулы

Численность (количество на 100 мкм<sup>2</sup> цитоплазмы) субклеточных структур клеток РПЭ японского перепела при трех спектральных видах ежедневного освещения

Спектральная полоса освещения	Митохондрии (общая численность)	Чашевидные митохондрии	Гранулы липофусцина	Фагосомы	Миелоидные тельца
400–650 нм Лампа накаливания	17,35 ± 0,90	3,10 ± 0,40	1,66 ± 0,40	1,02 ± 0,30	10,36 ± 0,60
530–650 нм Желтый свет	22,32 ± 0,70	5,13 ± 0,40	2,07 ± 0,30	0,89 ± 0,20	7,69 ± 0,30
440–470 нм Синий свет	26,63 ± 0,70	7,83 ± 0,60	1,47 ± 0,20	1,49 ± 0,30	8,76 ± 0,50

Примечание. Данные представлены в виде средних значений  $M \pm m$ .

Так, у птиц, содержащихся при синем освещении, общая численность митохондрий была значительно выше, чем у птиц, содержащихся при освещении с заниженной синей компонентой – желтом свете и при освещении лампой накаливания (в 1,2 и в 1,5 раза соответственно). При этом, у птиц, содержащихся при синем освещении, увеличивалась численность митохондрий чашевидной формы, имеющих на срезах вид колец и гантелей (рис. 3), а именно: их было в 1,5 раза больше, чем при желтом освещении и в 2,5 раза больше, чем при освещении лампой накаливания.

Появление чашевидных митохондрий с увеличенной площадью контактной поверхности, согласно существующей литературе, рассматри-

вается как адаптивная защитная реакция при клеточном стрессе [17–19]. Можно предполагать, что, как увеличение общей численности митохондрий при синем освещении, так и повышение содержания чашевидных митохондрий свидетельствует о происходящей при этом повышенной нагрузке на клеточный метаболизм РПЭ.

Как следует из данных таблицы, содержание птиц при синем освещении приводит также к полуторакратному увеличению численности фагосом, по сравнению с желтым освещением и освещением лампами накаливания. Мы рассматриваем эти изменения, как еще одно свидетельство того, что повседневное пребывание птиц при синем освещении вызывает повышение об-

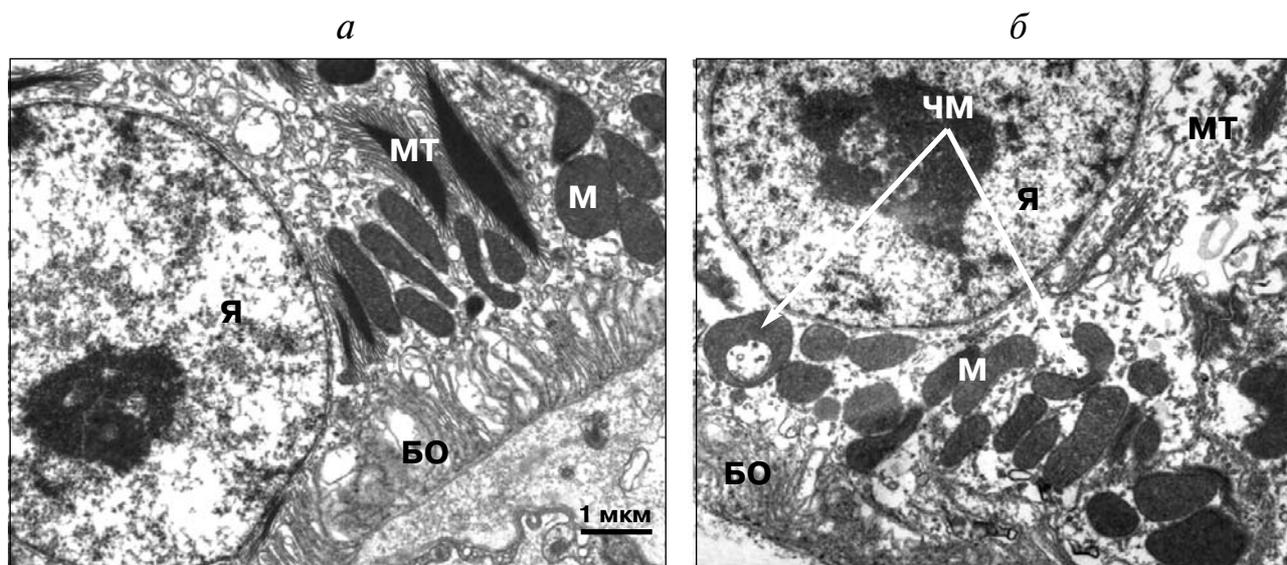


Рис. 3. Пример характерных различий в ультраструктуре РПЭ птиц, содержащихся при повседневном 95-суточном освещении лампой накаливания (а) и синим светом (б) (440–470 нм). Я – ядро клетки РПЭ; БО – базальные отростки; М – митохондрии; ЧМ – чашевидные митохондрии; МТ – миелоидные тельца

менно-энергетических процессов в клетках РПЭ. Как известно, фагоцитарные процессы клеток РПЭ по захвату фоторецепторных мембран являются светозависимыми и имеют суточную ритмику [23].

При этом не было отмечено статистически достоверных отличий в содержании липофусциновых гранул и миелоидных телец в зависимости от условий освещения.

В целом полученные данные по повышению численности митохондрий и фагосом в клетках РПЭ, а также повышение яйценоскости птиц в условиях повседневного синего освещения, дают основание предполагать о фотостимулирующем действии синего света на обменно-энергетические процессы в РПЭ и в организме в целом. По нашему мнению, наиболее вероятной причиной активирующего действия синего света может быть повышенное содержание мелатонина, поскольку, как сейчас показано [24],

именно синий свет в полосе 440–470 нм является главным регулятором содержания мелатонина в крови и органах. Представляется маловероятным, что полученные нами эффекты могут быть как-то связаны с фототоксическими свободнорадикальными реакциями липофусциновых гранул, поскольку нами были использованы очень низкие уровни повседневного освещения.

В настоящее время мы ведем постоянный возрастной мониторинг *Coturnix japonica* для того, чтобы в дальнейшем оценивать скорость старения птиц и их РПЭ в зависимости от спектрального состава освещения.

Авторы выражают признательность Т.В. Липиной за ассистирование в выполнении данного исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01072А).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ham, W.T., Mueller, H.A., and Sliney, D.H. (1976) Retinal sensitivity to damage from short wavelength light, *Nature*, **260**, 153–155.
2. Ham, W.T., Mueller, H.A., Ruffolo, J.J., Guerry, D., and Guerry, R.K. (1982) Action spectrum for retinal injury from near-ultraviolet radiation in the aphakic monkey, *Am. J. Ophthalmol.*, **93**, 299–306.
3. Van Norren, D., and Gorgels, T.G. (2011) The action spectrum of photochemical to the retina: a review of monochromatical threshold data, *Photochem. Photobiol.*, **87**, 747–753.
4. Algere, P.V., Marshall, J., and Seregard, S. (2006) Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard, *Acta Ophthalmol. Scand.*, **84**, 4–15.
5. Boulton, M., Dontsov, A., Ostrovsky, M., Jarvis-Evans, J., and Svistunenko, D. (1993) Lipofuscin is a photoinducible free radical generator, *J. Photochem. Photobiol.*, **19**, 201–204.
6. Schutt, F., Davies, S., Kopitz, J., Holz, F.G., and Boulton, M.E. (2000) Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 2303–2308.
7. Suter, M., Reme, C., Grimm, C., Wenzel, A., Jaattela, M., Esser, P., Kociok, N., Leist, M., and Richter, C. (2000) Age-related macular degeneration. The lipofuscin component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39625–39630.
8. Sparrow, J.R., and Cai, B. (2001) Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 1356–1362.
9. Tosini, G., Baba, K., Hwang, C.K., and Iuvone, P.M. (2012) Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology, *Exp. Eye Res.*, **103**, 82–89.
10. Зак П.П., Зыкова А.В., Трофимова Н.Н., Абу Хамидах А.Е., Фокин А.И., Эскина Э.Н., Островский М.А. (2010) Экспериментальная модель для исследования механизмов возрастных и дегенеративных изменений в сетчатке глаза человека (японский перепел *C. japonica*), *Доклады АН*, **434**, 272–274.
11. Зак П.П., Зыкова А.В., Трофимова Н.Н., Эскина Э.Н., Островский М.А. (2012) Экспериментальная модель ускоренного старения сетчатки: японский перепел *Coturnix japonica*, *Сенсорные системы*, **26**, 3–10.
12. Зак П.П., Зыкова А.В., Трофимова Н.Н., Островский М.А. (2013) Японский перепел *Coturnix japonica* как модель ускоренного старения сетчатки глаза человека. Сообщение 1. Зависимость накопления липофусцина в клетках ретинального пигментного эпителия от уровня содержания ретинальных оксикаротиноидов, *Офтальмохирургия*, **1**, 9–12.
13. Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E.S., and Eldridge, S. (1984) Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**, 195–200.
14. Lee, J.Y., Holden, L.A., and Djamgoz, M.B. (1997) Effects of ageing on spatial aspects of the pattern electroretinogram in male and female quail, *Vision Res.*, **37**, 505–514.
15. Зак П.П., Сержникова Н.Б., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Островский М.А. (2014) Оценка возрастной чувствительности ретинального пигментного эпителия японского перепела *Coturnix japonica* к световому повреждению, *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **100**, 841–851.
16. Сержникова Н.Б., Зак П.П., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Липина Т.В., Островский М.А. (2013) Субклеточные маркеры старения ретинального пигментного эпителия японского перепела *Coturnix japonica* (электронно-микроскопическое исследование), *Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология*, **3**, 9–16.
17. Liang, H., Crewther, S.G., and Crewther, D.P. (1995) A model for the formation of ring mitochondria in retinal pigment epithelium, *Yan Ke Xue Bao*, **11**, 9–15.
18. Liu, X., and Hajnoczky, G. (2011) Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria

- during hypoxia-reoxygenation stress, *Cell Death Differ.*, **18**, 1561–1572.
19. Lauber, J.K. (1982-83) Retinal pigment epithelium: ring mitochondria and lesions induced by continuous light, *Curr. Eye Res.*, **2**, 855–862.
  20. Steele, C.T., Tosini, G., Siopes, T., and Underwood, H. (2006) Time keeping by the quail's eye: circadian regulation of melatonin production, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **145**, 232–236.
  21. Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Vienot, F., Zissis, G., Barlier-Salsi, A., Cesarini, J.P., Enouf, O., Garcia, M., Picaud, S., and Attia, D. (2011) Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Prog. Retin. Eye Res.*, **30**, 239–257.
  22. Автандилов Г.Г. (1980) *Введение в количественную патологическую морфологию*, Медицина, Москва.
  23. Dickson, D.H., and Morrison, C. (1993) Diurnal variation in myeloid bodies of the chick retinal pigment epithelium, *Curr. Eye Res.*, **12**, 37–43.
  24. Rahman, S.A., Flynn-Evans, E.E., Aeschbach, D., Brainard, G.C., Czeisler, C.A., and Lockley, S.W. (2014) Diurnal spectral sensitivity of the acute alerting effects of light, *Sleep*, **37**, 271–281.

## PHOTOINDUCED CHANGES IN SUBCELLULAR STRUCTURES OF RETINAL PIGMENT EPITHELIUM OF JAPANESE QUAIL *Coturnix japonica*

P. P. Zak<sup>1\*</sup>, N. B. Serezhnikova<sup>1,2</sup>, L. S. Pogodina<sup>2</sup>,  
N. N. Trofimova<sup>1</sup>, T. S. Gurieva<sup>3</sup>, O. A. Dadasheva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian  
Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow 119934,  
Russia; E-mail: pavelzak@mail.ru

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University,  
Faculty of Biology, Moscow 119991, Russia

<sup>3</sup> Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,  
Khoroshevskoye shosse 76a, Moscow 123007, Russia

Received January 12, 2015

Revision received March 10, 2015

Young 15-week-old female mature Japanese quails *Coturnix japonica*, grown under different spectral kinds of light, were used in the study. It was found that after 95 days of light exposure number of mitochondria and phagosomes were increased 1.5-fold in retinal pigment epithelium of birds kept under blue light (440–470nm) in comparison with birds reared under light with reduced blue light component. It was also found that keeping the bird under blue light led to increase by 15% of egg production of these birds in comparison with birds bred under other light conditions. It can be concluded that blue light raises metabolic activity and accelerates life rate of *Coturnix japonica*. It is supposed that the inhibition of melatonin synthesis is a probable mechanism of the blue light effect.

**Key words:** retinal pigment epithelium, blue light, mitochondria, Japanese quail, electron microscopy