

© Коллектив авторов, 2023

УДК 576.32/.36

Яковлева М.А.<sup>1</sup>, Островский Д.С.<sup>2</sup>, Хубецова М.Х.<sup>2</sup>, Борзенко С.А.<sup>2</sup>, Фельдман Т.Б.<sup>1,3</sup>, Островский М.А.<sup>1,3</sup>

## Изучение цитотоксичных свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля», РАН,  
119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

<sup>2</sup>ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова,  
127486, Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, д. 59 а;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,  
119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1

**Введение.** Липофусциновые гранулы (ЛГ) в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека содержат бисретиноиды – флуорофоры, способные при поглощении видимого света генерировать активные формы кислорода с образованием, в конечном итоге, окисленных продуктов (окси-БисРет). В состав окси-БисРет входят альдегиды и кетоны, способные диффундировать из ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ и оказывать на неё токсическое действие уже в отсутствие света.

**Цель исследования** – изучение механизмов развития апоптоза при цитотоксическом воздействии активных соединений, входящих в составе ЛГ на клетки РПЭ после их облучения видимым светом и последующей темновой адаптации.

**Методика.** Были проведены эксперименты по исследованию цитотоксичных свойств окси-БисРет в темновых условиях с использованием клеточной культуры АРПЭ-19, нагруженной ЛГ. Для поставленной цели применяли следующие методы – определение жизнеспособности, МТТ-тест, ДНК-кометы, флуоресцентный анализ, ВЭЖХ-анализ, проведение иммуногистохимии (апоптоз: каспаза7, каспаза8, BAX).

**Результаты.** Сравнительный анализ исходных и предварительно облученных видимым светом образцов показал, что в обоих случаях в клетках РПЭ после темновой адаптации в течение 4 сут запускается апоптоз. Он проходит как по митохондриальному, так и по каспазному пути, однако в случае предварительно облученных образцов с более высоким содержанием окси-БисРет этот процесс проходит заметно интенсивнее.

**Заключение.** Таким образом, можно предположить, что окси-БисРет оказывают цитотоксическое воздействие на клетку РПЭ в отсутствие света и могут рассматриваться как усугубляющий фактор прогрессирования возрастной макулярной дегенерации.

**Ключевые слова:** липофусциновые гранулы; культура клеток АРПЭ-19; бисретиноиды; продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов; апоптоз

**Для цитирования:** Яковлева М.А., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Борзенко С.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Изучение цитотоксичных свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 76–87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.76-87

**Участие авторов:** подготовка образцов, проведение хроматографического анализа, участие в обсуждении результатов и написании статьи – Яковлева М.А.; проведение экспериментов на клетках, участие в обсуждении результатов и написании статьи – Островский Д.С.; подготовка биологических объектов кадаверных глаз человека для дальнейшего анализа – Хубецова М.Х.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Борзенко С.А.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Фельдман Т.Б.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Островский М.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Яковлева Марина Андреевна, e-mail: lina.invers@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00549).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Yakovleva M.A.<sup>1</sup>, Ostrovsky D.S.<sup>2</sup>, Khubetsova M.Kh.<sup>2</sup>, Borzenok S.A.<sup>2</sup>, Feldman T.B.<sup>1,3</sup>, Ostrovsky M.A.<sup>1,3</sup>

## Study of the cytotoxic properties of non-oxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells

<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Kosygina St. 4, Moscow, 119334, Russian Federation;

<sup>2</sup>Fedorov National Medical Research Center «Eye Microsurgery», Beskudnikovskiy Blvd. 59a, Moscow, 127486, Russian Federation;

<sup>3</sup>Biology School, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1, Moscow, 119234, Russian Federation

Lipofuscin granules (LG) in the cells of the human retinal pigment epithelium (RPE) contain bisretinoids. These fluorophores are capable of generating reactive oxygen species upon absorption of visible light, and this results ultimately in the formation of oxidized products (oxy-BisRet). Oxy-BisRet contains aldehydes and ketones, which can diffuse from the LG into the RPE cell cytoplasm and there have a toxic effect, even in the absence of light.

**The aim** of this study was to determine the mechanisms of apoptosis that results from the cytotoxic effect of active compounds included into LG on RPE cells following their irradiation with visible light and subsequent dark adaptation.

**Methods.** Experiments were carried out to study the cytotoxic properties of oxy-BisRet under dark conditions by using cultured ARPE-19 cells loaded with LG. The following methods were used: determination of viability, MTT test, DNA comets, fluorescent analysis, HPLC analysis, immunohistochemistry for apoptosis, caspase 7, caspase 8, and BAX.

**Results.** A comparative analysis of the control samples and those pre-irradiated with visible light showed that in both cases, apoptosis was triggered in RPE cells after dark adaptation within 4 days. Apoptosis took either the mitochondrial or caspase pathways; however, in pre-irradiated samples with a higher content of oxy-BisRet, this process was noticeably more intense.

**Conclusion.** Thus, oxy-BisRet has a cytotoxic effect on RPE cells in the absence of light and can be considered an aggravating factor in the progression of age-related macular degeneration.

**Keywords:** lipofuscin granules; ARPE-19 cell culture; bisretinoids; products of photooxidation and photodegradation of bisretinoids; apoptosis

**For citation:** Yakovleva M.A., Ostrovsky D.S., Khubetsova M.Kh., Borzenok S.A., Feldman T.B., Ostrovsky M.A. Study of the cytotoxic properties of non-oxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 76–87. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.76-87

**Author's contribution:** sample preparation, chromatographic analysis, participation in discussion of results and writing of the article – Yakovleva M.A.; conducting experiments on cells, participating in the discussion of the results and writing the article – Ostrovsky D.S.; preparation of biological objects of human cadaver eyes for further analysis – Khubetsova M.Kh.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Borzenok S.A.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Feldman T.B.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Ostrovsky M.A. Approval of the final version of the article – all authors.

**For correspondence:** Marina A. Yakovleva, Ph.D. biol. Sci., Senior Researcher, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, e-mail: lina.invers@gmail.com

### Information about the authors:

Yakovleva M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4243-2787>

Ostrovsky M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4350-2812>

Feldman T.B., <https://orcid.org/0000-0003-2613-056X>

**Financing.** This work was supported financially by the Russian Science Foundation (grant no. 22–24–00549).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 29.05.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

## Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одним из наиболее распространенных заболеваний среди пожилых людей [1]. Одним из маркеров развития патологии сетчатки, ВМД в том числе, является более интенсивное накопление липофуциновых гранул (ЛГ) в клетках ретиального пигментного эпителия (РПЭ) по сравнению с нормой [2–4]. ЛГ являются про-

дуктами неполной лизосомальной деградации обломков наружных сегментов палочек сетчатки (НСП) [5]. В состав ЛГ входят бисретиноиды (БисРет) – продукты модификации полностью-*транс*-ретиная (ПТР) [6]. Наиболее изученным из них является N-ретинилиден-N-ретилилэтаноламин (A2E) [7]. БисРет в ЛГ являются фотоиндуцируемыми генераторами активных форм

кислорода (АФК) [8], которые, в свою очередь, могут окислять БисРет (окси-БисРет) с образованием высоко реактивных альдегидов и кетонов [9, 10]. Окси-БисРет обладают гидрофильными и амфифильными свойствами, что позволяет им диффундировать через мембрану ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ [11]. Поскольку карбонильные продукты являются долгоживущими, они могут прочно связываться с долгоживущими белками, такими как коллаген [12] или гемоглобин [13], что приводит к образованию конечных продуктов гликирования, которые могут активировать воспалительные процессы. Результаты наших экспериментов *in vitro* [14–15] показали, что водорастворимые карбонильные продукты, образующиеся при фотоокислении БисРет, приводят к образованию модифицированных белков. Этот факт указывает на то, что окси-БисРет могут приводить к повреждению клеточных структур и, в конечном итоге, к гибели клетки РПЭ. Ранее нами было показано, что после воздействия света на клетки АРПЭ-19 с ЛГ и последующей темновой адаптацией происходит их гибель [16]. Можно предположить, что одним из механизмов клеточной гибели является развитие апоптоза. Известно 2 основных пути развития апоптоза клеток РПЭ – митохондриальный и каспазный.

Целью данной работы было выяснение механизмов цитотоксического воздействия окси-БисРет на клетку РПЭ. Эксперименты проводили с использованием клеточной культуры АРПЭ-19, нагруженной ЛГ, полученных из клеток РПЭ кадаверных глаз человека. Для выяснения механизма развития апоптоза в качестве стандартных маркеров каспазного пути использовали каспазы 7 (экзекуторная) и 8 (иницирующая), а митохондриального – BAX [17].

### Методика

**Реактивы.** В работе были использованы реактивы производства «Sigma-Aldrich», «Fluka», «Компонент-реактив». Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали растворители производства «Sigma-Aldrich» и «Fluka» хроматографической чистоты. Для культивирования клеток использовали реактивы «Thermo Fisher Scientific» и культуральный пластик «Corning». Для проведения иммуногистохимического анализа использовали реактивы «Abcam», МТТ-тест производитель компания «ПанЭко» для электронно-сканирующей микроскопии «SPI».

**Материал.** Кадаверные глаза человека были получены Глазным тканевым банком ФГАУ «НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»

от доноров из танатологических отделений московского бюро судебно-медицинской экспертизы на основании действующего договора между московским бюро судебно-медицинской экспертизы и ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», а также договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» [18]. На данное исследование было получено одобрение со стороны локального этического комитета. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Кадаверные глаза человека поступали на исследование не позднее 10 ч после смерти донора после удаления роговицы для трансплантации. Каждый кадаверный глаз подвергался вскрытию офтальмологом. После удаления хрусталика, стекловидного тела и сетчатки проводилось детальное описание глазного дна. Анализ и скрининговый отбор донорского материала проводили по клиническим, половым и возрастным признакам. Исследование образцов проводили при приглушенном освещении.

**Выделение липофусциновых гранул и получение хлороформных экстрактов бисретиноидов и их производных.** ЛГ были выделены из РПЭ 100 кадаверных глаз доноров (возраст 50–75 лет) без признаков патологии согласно методике, описанной в работе [19] и суспендированы в растворе 0.1 М К-фосфатного буфера, pH=7.3. Концентрацию гранул определяли по стандартной методике в камере Горяева. Исходная концентрация гранул составляла  $3 \times 10^8$  гранул/мл. Содержание продуктов фотоокисления и фотодегградации бисретиноидов контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Приготовление хлороформных экстрактов из ЛГ.** Бисретиноиды и их производные экстрагировали из ЛГ по методу Фолча смесью хлороформ – метанол (1:1) [20]. К суспензии ЛГ добавляли 2-кратный избыток смеси хлороформ: метанол (2:1 v/v). Смесью перемешивали на электрической мешалке в течение 2 мин и инкубировали 10 мин при 4 °С. Смесью центрифугировали при 680 g в течение 10 мин при 4 °С. Нижнюю фазу хлороформа отбирали шприцем, переносили в колбу и упаривали с помощью вакуумного насоса (Vacuubrand MZ 2CNT + AK + M + D, Германия). Для дальнейшего хроматографического анализа каждый высушенный образец ресуспендировали в 200 мкл метанола.

**ВЭЖХ-анализ.** Хроматографическое разделение бисретиноидов, продуктов их фотоокисления и фотодегградации в хлороформных экстрактах ЛГ из РПЭ проводили на хроматографе фирмы

«Кнауер» (Германия) с колонкой «Kromasil-100–5–C18» (4×250 мм, размер сорбента 5 мкм). Разделение осуществляли путем линейного градиентного элюирования в системе: от 80% ацетонитрила + 20% воды (+ 0.05% трифторуксусной кислоты) до 100% ацетонитрила за 20 мин; скорость потока 1.0 мл/мин [10]. Продукты хроматографического разделения измеряли при помощи фотометрического детектора «Кнауер К-2501».

#### *Измерение спектров поглощения и флуоресценции.*

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония). Сбор данных по флуоресценции осуществляли с помощью флуориметра RF-5301 PC (Shimadzu, Киото, Япония), оборудованного детектором на фотоэлектронных умножителях R955 (Hamamatsu, Сидзуока, Япония). Программное обеспечение RFPC версии 2.0 (Shimadzu) использовалось для компиляции данных. Спектры излучения регистрировали при возбуждении 488 нм с интервалом дискретизации 1 нм. Спектры флуоресценции корректировались с учетом интенсивности возбуждения с помощью спектрального отклика (квантовой эффективности) детектора с фотоумножителем R955. Все спектры флуоресценции нормированы на длину волны 592 нм.

**Синтез А2Е.** В качестве стандарта использовали синтезированный А2Е. А2Е получали из полностью транс-ретинала и этаноламина в уксусной кислоте и этаноле, как описано в работе [21]. Чистоту А2Е контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Кнауер» (Германия). А2Е идентифицировали с помощью масс-спектрометра 7T LTQ FT (Thermo Electron Corp., Германия), оборудованного источником ионов с электрораспылением, как описано в [10]. Масс-спектры обрабатывали и анализировали с помощью программы Qual Browser 1.4.

**Культура клеток АРПЭ-19.** Была использована клеточная линия АРПЭ-19, предоставленная УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. На всех этапах работы культивирование проводили в полной ростовой среде (ПРС) согласно стандартной методике (<https://www.atcc.org/products/crl-2302>). Фагоцитоз ЛГ клетками АРПЭ-19 осуществляли по методике, описанной в работе [22].

Для изучения цитотоксического воздействия ЛГ на культуру клеток АРПЭ-19 было сформировано 2 группы образцов: 1-я группа содержалась в темноте в течение всего эксперимента, 2-я была облу-

чена видимым светом в течение 18 ч, а затем содержалась 3 сут в темноте после воздействия света. Облучение образцов осуществляли видимым светом (430–570 нм) лампой Led15w – 4000К (0,38 мВт/см<sup>2</sup>, определенная фотометром Spectra-Physics 407A, США). В каждой группе был контрольный образец культуры клеток АРПЭ-19 без ЛГ и образец культуры клеток АРПЭ-19, нагруженных ЛГ.

Для анализа на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) клетки обрабатывали раствором ацутаза по стандартному протоколу. Анализ образцов на электронном сканирующем микроскопе проводили со следующими параметрами: высокий вакуум, ускоряющее напряжение 15kV, увеличение x1000. Для изучения образцов на конфокальном лазерно-сканирующем микроскопе образцы фиксировались 10% раствором формалина в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Анализ на конфокальном микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония) производили при использовании каналов Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594.

#### **Тесты на жизнеспособность клеток**

**Тест «Живые и мертвые».** Для качественного и количественного анализа все образцы клеток АРПЭ-19 окрашивали флуоресцентным красителем Live and Dead (ab 115347 Abcam, Кембридж, Великобритания) по протоколу производителя. Для количественного анализа суспензию клеток РПЭ получали путем ферментативного удаления клеток с последующим анализом на проточном цитофлуориметре (CytoFlex, Beckman Coulter, Калифорния, США) с использованием канала обнаружения FITC (Ex 493 нм/Em 528 нм) и Су3 (Ex 550 нм/Em 615 нм).

**МТТ-тест.** Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом (<https://www.abcam.com/mtt-assay-kit-cell-пролиферация-ab211091.html>) на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, США). Поглощение измеряли на длине волны 570 нм и нормализовали по отношению к поглощению контрольного образца (клетки РПЭ без ЛГ) и выражали как жизнеспособность в процентах от поглощения контроля.

**Аноптоз.** Для определения путей развития апоптоза были использованы антитела к каспазе 8, 7 и ВАХ, по стандартному протоколу окрашивания с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Для этого к суспензии клеток было добавлено по 10 мкл каждого вида антитела, время экспозиция составило 10 мин, далее клетки 3-кратно отмывались раствором PBS. Для детекции антител были использованы вторичные антитела

Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594, инкубация составила 30 мин. Далее клетки 3-кратно промывали раствором PBS, добавляли 200 мкр BD CellWash и анализировали на проточном цитофлуориметре.

**ДНК-кометы.** Клеточную культуру готовили по стандартной методике. Отрицательный контроль – клетки АРПЭ-19 без ЛГ после облучения УФ-светом согласно стандартной методике. Данный метод включал в себя подготовку предметных стекол с нанесением слоя агарозы. Клеточную культуру промывали раствором Версена, далее добавляли 0,25% раствор Трипсина-Версена 1:1, инкубировали 10 мин при +37 °С. Полученную суспензию центрифугировали 1100 об/мин 5 мин, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН-7.4), забирали пробу объемом 10 мкл (концентрация клеток  $1 \times 10^4$ ) и переносили в пробирки типа Эппендорф с 1% раствором легкоплавкой агарозы объемом 75 мкл. Полученную суспензию помещали на предметные стекла с агарозным покрытием и охлаждали в течение 10 мин при +4 °С. Далее переносили в лизирующий раствор (10 мМ Триса, 2,5 М NaCl, 100мМ ЭДТА) и инкубировали 1 ч при +4 °С.

Полученные препараты переносили в щелочной раствор (рН>13) для проведения электрофореза 1В на 1 см, 20 мин, нейтрализацию проводили используя фосфатно-солевой буфер (рН-7.4). Для окрашивания использовали раствор этидиума бромид в дистиллированной воде, экспозиция составила 2 ч при +4 °С в темноте. Анализ препаратов проводили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV10i. Полученные изображения

анализировали при помощи встроенного программного обеспечения микроскопа.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением Prisma 6 (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния, США). Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (М) и стандартного отклонения ( $\pm\sigma$ ). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при уровне  $p < 0.05$ .

**Результаты**

Для изучения цитотоксического воздействия ЛГ на культуру клеток АРПЭ-19 было сформировано 2 группы образцов: 1-я группа содержалась в темноте в течение всего эксперимента, а вторая была облучена видимым светом в течение 18 ч, а затем содержалась 3 сут в темноте. В каждой группе был контрольный образец культуры клеток АРПЭ-19 без ЛГ и образец культуры клеток АРПЭ-19, нагруженных ЛГ.

**МТТ анализ жизнеспособности клеток.** Анализ МТТ показал, что во всех случаях, независимо от условий эксперимента, относительный уровень живых клеток был заметно ниже в образцах РПЭ с липофусцином (в среднем на 30%) по сравнению с контрольным образцом РПЭ без ЛГ (табл. 1). При этом, в случае предварительного облучения образцов РПЭ с ЛГ

Таблица 1/Table 1

**Сравнительный МТТ анализ жизнеспособности клеток РПЭ темноадаптированных и предварительно облученных видимым светом**  
**Comparative MTT cell viability assay when RPE samples maintained in the dark or after irradiation of RPE samples by visible light**

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте (%) Samples maintained in the dark (%)			Образцы, облученные видимым светом 18 часов (%) Samples irradiated with visible light for 18 hours (%)	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	100.0±28.3	71.8±16.0	0 сут 0 days	100.0±33.4	67.8±16.4
4 сут 4 days	100.0±24.9	77.4±17.8	4 сут 4 days	100.0±15.3	53.8±15.9

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов,  $p < 0.05$ .

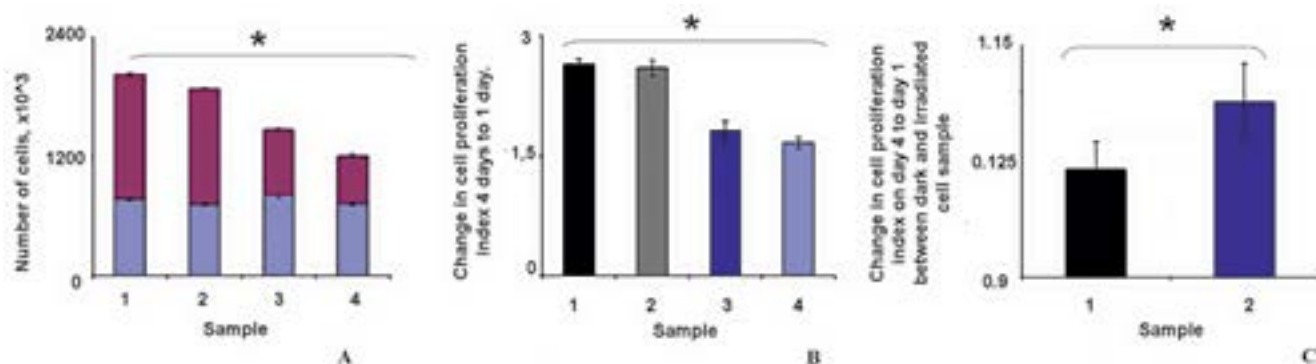
**Note.** \* The data are presented as means ± SD from three independent experiments,  $p < 0.05$ .

степень гибели клеток РПЭ заметно возрастала (примерно на 14%,  $p < 0.05$ ) (табл 1). Таким образом, фотоокисление ЛГ в составе РПЭ приводит к росту гибели клеток даже после завершения облучения. Это значит, что окисленные продукты ЛГ повреждают клетки РПЭ уже в темноте за счет их токсического воздействия на клеточные структуры.

Таким образом, наибольшую цитотоксичность в отношении клеток РПЭ проявляли образцы РПЭ, содержащие липофусцин и выдерживаемые в темноте после облучения. Эти результаты подтверждают

наше предположение [14, 15] о том, что окси-БисРет с гидрофильными и амфифильными свойствами могут оказывать цитотоксическое действие на клетки РПЭ. Результаты наших экспериментов коррелируют с данными, полученными другими авторами [23–25].

Пролиферативная активность. Исходная пролиферативная активность клеток в 1-е сут, как контрольных, так и после добавления ЛГ и воздействия светом, была сходной во всех образцах (рис. 1, табл. 2, 3). Однако, через 4 сут после фагоцитирования клетками АРПЭ-19 ЛГ в темноте или после воздействия све-



**Рис. 1. А** – совокупная пролиферативная активность по подгруппам эксперимента. На оси ординат отмечено количество клеток  $\times 10^3/\text{мл}$ , 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – контроль РПЭ без ЛГ+свет, 3 – ЛГ-РПЭ, 4 – ЛГ-РПЭ+свет, **Б** – Динамическое отношение изменения пролиферативной активности от 4 дня к 1, 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – контроль РПЭ без ЛГ+свет, 3 – ЛГ-РПЭ, 4 – ЛГ-РПЭ+свет, **В** – Динамическое отношение изменения пролиферативной активности в группах сравнения под воздействием света и без него. 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – РПЭ-ЛГ. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD от 3-х независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент). \* Значения  $P < 0.05$  считались значимыми.

**Fig. 1. А** – Cumulative proliferative activity by subgroups of the experiment. The y-axis shows the number of cells  $\times 10^3/\text{ml}$ , 1 – RPE control without LG, 2 – RPE control without LG + light, 3 – LG-RPE, 4 – LG-RPE + light, **Б** – Dynamic ratio of changes in proliferative activity from day 4 to 1, 1 – RPE control without LG, 2 – RPE control without LG + light, 3 – LG-RPE, 4 – LG-RPE + light, **В** – Dynamic ratio of changes in proliferative activity in the comparison groups under the influence of light and without it. 1 – control RPE without LG, 2 – RPE-LG. Data are presented as mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). \*  $P < 0.05$  were considered significant.

Таблица 2/Table 2

**Количество клеток (посевная концентрация  $1.5 \times 10^5$  клеток)**

**Number of cells (inoculation concentration  $1.5 \times 10^5$  cells)**

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	$7.75 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$	$8.10 \times 10^5 \pm 0.18 \times 10^5$	0 сут 0 days	$7.25 \times 10^5 \pm 0.14 \times 10^5$	$7.27 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$
4 сут 4 days	$2.03 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$	$1.47 \times 10^6 \pm 0.05 \times 10^6$	4 сут 4 days	$1.88 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$	$1.21 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее  $\pm$ SD от трех независимых экспериментов,  $p < 0.05$ .

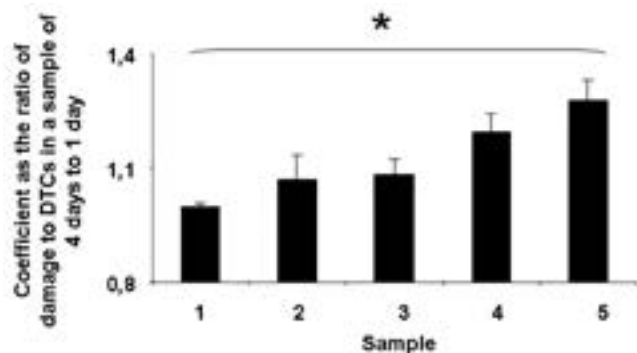
**Note.** \* The data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments,  $p < 0.05$ .

том было отмечено заметное снижение пролиферативной активности клеток во всех подгруппах кроме контрольных (табл. 3). Также стоит отметить, что наи-

меньшую –1.66 ед (для сравнения в контроле 2.64 ед, **рис. 1, Б**) пролиферативную активность на 4-е сут показала группа клеток АРПЭ-19 с ЛГ после облучения светом.

Итак, можно сделать предположение о том, что исходно ЛГ обладают выраженной фототоксичностью. Кроме того, полученные нами данные говорят о том, что эффект от наличия ЛГ в составе клеток АРПЭ-19 имеет пролонгированное влияние (**рис. 1, Б, В**). Наибольший эффект на пролиферацию клеток оказывает исходные ЛГ после облучения светом. Присутствие в клетках РПЭ ЛГ способствуют замедлению пролиферативной активности клеток, содержащихся, как в темноте, так и после облучения (на 3.7 и 5.5, соответственно) (табл. 3).

**Анализ повреждения клеточных структур методом ДНК-комет.** Методом ДНК-комет был определен уровень повреждения ДНК в единичных клетках и рассчитан коэффициент повреждения (табл. 4). На рисунке 2 представлены данные для каждого образца в виде соотношения количества повреждений в клетках на 4-е сут темновой адаптации к 1-м сут. Из полученных результатов видно, что присутствие ЛГ в клетках АРПЭ-19 увеличивает количество повреждений ДНК (в среднем в 1.15 раз). При этом наибольший эффект наблюдается в образцах, предварительно облученных видимым светом в течение 18 ч (в 1.18 раз) (**рис. 2**). Другими словами, в клетках с повышенным содержанием Оксис-БисРет через 4 сут темновой адаптации наблюдается самый высокий процент повреждения ДНК ( $0.96 \pm 0.01$ ). Полученные результаты коррелируют с данными работы [26] о темновом повреждении ДНК продуктами окисления А2Е. Также они подтверждают наши предполо-



**Рис. 2.** Диаграмма распределения индекса ДНК-комет в образцах на 4-е сут темной адаптации по сравнению с исходным состоянием. 1 – отрицательный контроль (АРПЭ-19 без ЛГ+UV свет); 2 – контроль (АРПЭ-19 без ЛГ) после 4 сут темновой адаптации; 3 – контроль (АРПЭ-19 без ЛГ), предварительно облученный в течение 18 ч видимым светом, а затем темной адаптированный в течение еще 3 сут; 4 – образец АРПЭ-19 с ЛГ после 4 сут темновой адаптации; 5 – образец АРПЭ-19 с ЛГ, предварительно облученный в течение 18 ч видимым светом, а затем темной адаптированный в течение еще 3 сут. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD от 3 независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент). \* –  $p < 0.05$

**Fig. 2.** Diagram of the distribution of the DNA comet index in samples on the 4th day of dark adaptation compared to the initial state. 1 – negative control (ARPE-19 without LG+UV light); 2 – control (ARPE-19 without LG) after 4 days of dark adaptation; 3 – control (ARPE-19 without LG), pre-irradiated for 18 hours with visible light, and then dark-adapted for another 3 days; 4 – ARPE-19 sample with LG after 4 days of dark adaptation; 5 – sample of ARPE-19 with LG preliminarily irradiated for 18 hours with visible light and then dark-adapted for another 3 days. Data are presented as mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). \* –  $p < 0.05$  were considered significant.

Таблица 3/Table 3

**Индекс пролиферации клеточной культуры**

**Cell culture proliferation index**

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	5.1 $\pm$ 0.07	5.4 $\pm$ 0.12	0 сут 0 days	4.8 $\pm$ 0.09	4.8 $\pm$ 0.07
4 сут 4 days	13.5 $\pm$ 0.28	9.8 $\pm$ 0.32	4 сут 4 days	12.5 $\pm$ 0.08	8.0 $\pm$ 0.09

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее  $\pm$  SD от трех независимых экспериментов,  $p < 0.05$ .

**Note.** \* The data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments,  $p < 0.05$ .

жения о том, что альдегиды, образующиеся при окислении БисРет, будучи гидрофильными соединениями, диффундируют из ЛГ в цитоплазму клетки АРПЭ-19 и повреждают клеточные структуры уже без участия АФК и света, проявляя цитотоксичные свойства.

**Анализ процесса апоптоза.** Полученные данные свидетельствуют о повышении интенсивности процесса апоптоза в клетках РПЭ, нагруженных ЛГ, по сравнению с контрольными клетками в среднем на 7.5% (табл. 5). Облучение клеток РПЭ, нагруженных ЛГ,

по сравнению с клетками, содержащимися в темноте, приводит к усилению запрограммированной гибели клеток --апоптозу в среднем на 3.8%. Таким образом, присутствие в клетках РПЭ ЛГ приводит к запуску апоптоза, а облучение светом, даже с последующей темновой адаптацией, усиливает этот процесс.

**Анализ путей апоптоза.** Для определения механизма развития апоптоза в клетках АРПЭ-19 после цитотоксического воздействия окси-БисРет было проанализировано наличие маркеров двух путей апоп-

Таблица 4/Table 4

**Индекс ДНК-комет**

**Comet DNA Index**

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Отрицательный контроль Negative control	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
		Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	3.5±0.03	0.56±0.03	0.67±0.01	0 дней 0 days	0.6±0.01	0.75±0.02
4 дня 4 days	3.5±0.02	0.6±0.01	0.8±0.03	4 дня 4 days	0.65±0.02	0.96±0.01

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов, p <0.05.

**Note.** \* The data are presented as means ± SD from three independent experiments, p <0.05.

Таблица 5/Table 5

**Сравнительный анализ апоптоза в клетках РПЭ, темноадаптированных и предварительно облученных видимым светом**

**Comparative analysis of apoptosis in RPE cells, dark-adapted and pre-irradiated with visible light**

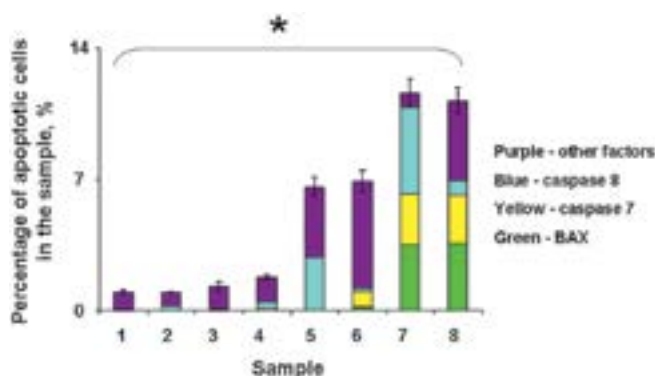
Клетки Cells	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ в темноте, % ARPE-19 without LG in the dark, %	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ с облучением 18 часов, % Control ARPE-19 without LG with irradiation for 18 hours, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ, % with LG, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ с облучением 18 часов, % with LG with irradiation for 18 hours, %
Живые – 1-е сут live – 1 day	98.44±0.83	97.76±0.86	84.9±3.31	79.72±6.36
Живые – 4-е сут live – 4 day	98.28±0.87	96.34±0.91	80.46±4.13	74.76±4.30
апоптотные – 1-е сут apoptotic – 1 day	0.58±0.26	0.86±0.32	7.64±1.28	12.14±2.98
апоптотные – 4-е сут apoptotic – 4 day	0.70±0.27	1.5±1.29	8.58±1.48	12.06±2.01
мертвые – 1-е сут dead – 1 day	0.98±0.54	1.38±0.58	7.46±2.40	8.14±3.52
мертвые – 4-е сут dead – 4 day	1.02±0.61	2.18±0.46	10.96±2.68	13.18±2.51

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов, p <0.05.

**Note.** \* The data are presented as means ± SD from three independent experiments, p <0.05.



тоза – каспазного (каспаза 7 и 8) и митохондриального (BAХ). Показано, что уже на 1-е сут темновой адаптации в подгруппе клеток АРПЭ-19 с ЛГ наблюдается увеличение активности каспазы 8 (на 41%), а в предварительно облученных образцах наблюдается увеличение количества каспазы 7 и белков субсемейства ВАХ (на 22 и 28% соответственно) (рис. 3, табл. 6). В случае воздействия светом на клетки АРПЭ-19 с ЛГ каспаза 7 присутствует сразу в большом количестве (23%), а на 3-и сут темновой адаптации уровень сохраняется (23%) на фоне небольшого снижения числа апоптозных клеток (на 1%). Кроме того, при действии света относительный вклад каспазы 7 также увеличивается во всех образцах, но с ЛГ значимо больше (в 2–4 раза), чем в контрольном образце клеток АРПЭ-19 без ЛГ.



**Рис. 3.** Диаграмма распределения факторов апоптоза в клетках АРПЭ-19 до и после добавления ЛГ и влияния светового воздействия. На оси ординат – процент апоптозных клеток в образце (суммарная высота столбика). Цветом в столбике указан процентный вклад различных факторов апоптоза в данном образце. 1 – контроль клеток в темноте 1 сут; 2 – контроль клеток в темноте 4-е сут; 3 – контроль клеток, облученных 18 ч; 4 – контроль клеток, облученных 18 ч, и затем инкубированных еще 3 сут в темноте, 5 – клетки со встроенными ЛГ в темноте 0 сут; 6 – клетки со встроенными ЛГ в темноте 4 сут, 7 – клетки со встроенными ЛГ, предварительно облученные 18 ч; 8 – клетки со встроенными ЛГ, предварительно облученные 18 ч и затем инкубированные еще 3 сут в темноте. Данные представлены как среднее значение ± SD от 3 независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент); \* –  $p < 0.05$  считались значимыми.

**Fig. 3.** Diagram of the distribution of apoptosis factors in ARPE-19 cells before and after the addition of LG and the effect of light exposure. The y-axis indicates the percentage of apoptotic cells in the sample (total bar height). The color in the column indicates the percentage contribution of various apoptosis factors in this sample. 1 – control of cells in the dark on 1 day, 2 – control of cells in the dark on 4 days, 3 – control of cells irradiated for 18 hours, 4 – control of cells irradiated for 18 hours and then incubated for another 3 days in the dark, 5 – cells with built-in LG in the dark on 0 day, 6 – cells with built-in LG in the dark on 4 days, 7 – cells with built-in LG, irradiated for 18 hours, 8 – cells with built-in LG, irradiated for 18 hours, and then incubated for another 3 days in the dark. Data are presented as mean ± SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). \*  $P < 0.05$  were considered significant.

Через 4 сут темновой адаптации в контрольных образцах (АРПЭ-19 без ЛГ) отмечается увеличение вклада каспазы 8 (на 23%), а в контрольной подгруппе после облучения еще и появление каспазы 7 в незначительном количестве (6,5%). Однако в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, отмечается снижение уровня каспазы 8 (на 41%) и увеличение эффекторного белка каспазы 7 (на 12%). Такой результат может свидетельствовать о запуске необратимого апоптоза в клетках АРПЭ-19, особенно в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, предварительно облученных в течение 18 ч видимым светом (рис. 3).

### Обсуждение

Полученные результаты показали, что сразу после воздействия видимым светом в течении 18 ч нарушения в жизнеспособности клеток были незначительными. Однако результат, полученный через 4 сут темновой адаптации, показал, что в образцах клеток РПЭ с ЛГ, цитотоксический эффект от ЛГ на клетки РПЭ даже в темновых образцах, без воздействия света, весьма значителен (снижение жизнеспособности на 29% по сравнению с контролем). При этом в предварительно облученных видимым светом процент гибели клеток значительно выше (снижение жизнеспособности на 50% по сравнению с контролем). Можно предположить, что окси-БисРет в составе ЛГ, которые образовались в результате воздействия света, в течение последующих 4 сут темновой адаптации диффундируют из ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ и проявляют свои цитотоксичные свойства в отношении клеточных структур и макромолекул, инициируя развитие апоптоза. Таким образом, мы делаем вывод о том, что цитотоксический эффект от ЛГ имеет пролонгированное влияние на клетки РПЭ. Кроме того, исходные неокисленные бисретиноиды ЛГ обладают в основном фототоксическим эффектом, а уже окси-БисРет обладают темновым цитотоксическим влиянием на клетки РПЭ.

На примере повреждения ДНК показано, что наиболее выраженное повреждение было детектировано в образцах клеток РПЭ с ЛГ, предварительно облученных видимым светом (0,96). Эксперименты по исследованию путей апоптоза показали, что спустя 4 сут темновой адаптации в контрольных образцах клеток АРПЭ-19 без ЛГ увеличивается количество каспазы 8 (на 23%), а в случае предварительного облучения – еще и каспазы 7 (на 6,5%). Однако в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, отмечается снижение уровня каспазы 8 (на 41%) и увеличение эффекторного белка каспазы 7 (на 12%). Увеличение уровня эффекторного белка каспазы 7 может свидетельствовать о запу-

## Распределение процентного содержания факторов апоптоза в клетках АРПЭ-1

## Distribution of the percentage of apoptosis factors in ARPE-19 cells

Фактор апоптоза Apoptosis factor	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ в темноте, % Control ARPE-19 without LG in the dark, %	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ с облучением 18 часов, % Control ARPE-19 without LG with irradiation for 18 hours, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ, % ARPE-19 cells with LG, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ с облучением 18 часов, % ARPE-19 cells with LG with irradiation for 18 hours, %
ВАХ – 1-е сут BAX – 1 day	0±0	2±0.15	0±0	30.5±1.21
ВАХ – 4-е сут BAX – 4 day	0±0	0±0	3±0.92	32±0.51
каспаза 8 – 1-е сут caspase 8 – 1 day	1.2±0.17	4±0.57	43±1.71	40±1.41
каспаза 8 – 4-е сут caspase 8 – 4 day	25±2.01	20±1.29	2±0.75	6.8±0.08
каспаза 7 – 1-е сут caspase 7 – 1 day	1±0.05	0±0	0±0	23±2.01
каспаза 7 – 4-е сут caspase 7 – 4 day	0±0	6.5±0.65	12±0.85	23±1.25

**Примечание.** \* Данные представлены как среднее±SD от 3 независимых экспериментов,  $p<0.05$ .

**Note.** \* The data are presented as means ± SD from three independent experiments,  $p<0.05$ .

ске необратимого апоптоза в клетках АРПЭ-19, особенно в образцах, содержащих ЛГ и предварительно облученных видимым светом (рис. 2).

Таким образом, присутствие ЛГ в клетках АРПЭ-19 само по себе вызывает клеточные повреждения в темноте, которые запускают механизм апоптоза (8%), а после воздействия светом степень развития апоптоза значительно увеличивается (до 12%). Можно предположить, что это связано с образованием окси-БисРет, содержащих высоко реактивные альдегиды и кетоны. Обладая гидрофильными свойствами, окси-БисРет могут диффундировать из ЛГ в цитоплазму клетки АРПЭ-19 и вызывать повреждение клеточных структур, инициируя запуск необратимого апоптоза. Полученные результаты указывают на развитие нескольких путей апоптоза. Первый путь инициируется при воздействии света, в результате чего активируются семейство Bcl-белков и белки субсемейства ВАХ, которые воздействуют на митохондрии. Далее происходит активация каспазы-7, что может привести в свою очередь к фрагментации ДНК и апоптозу. Данный путь апоптоза возникает также при повреждении ДНК. Второй путь развития апоптоза связан с активацией ранней инициаторной каспазы-8, которая обеспечивает прямую связь между рецепторами клеточной гибели и каспазами. Активация каспазы -8 происходит по так называемому внешнему пути через рецепторы клеточной

гибели. Мы проанализировали динамику 3 белков, отвечающих за апоптоз: митохондриальный – ВАХ, каспазный – каспаза 7 и 8. При анализе данных было выявлено, что на первый день преобладает экспрессия каспазы 8 во всех группах исследования. После четырех суток наблюдения в группах с добавлением ЛГ при темновой адаптации содержание каспазы 8 уменьшается, а каспазы 7 и ВАХ увеличивается. Исходя из вышесказанных результатов мы можем предположить, что липофусциновые гранулы в клетках АРЭ-19 активируют в основном каспазный путь апоптоза – каспаза 8 инициировала запуск митохондриального пути апоптоза через белок ВАХ и дальнейший каспазный путь через каспазу 7.

Таким образом, в данной работе показано, что ЛГ в клетках РПЭ в темноте запускают процессы апоптоза, причем, этот процесс усиливается, если на клетки РПЭ, нагруженные ЛГ предварительно воздействовать видимым светом.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом (грант № 22–24–00549). Клеточная линия АРПЭ-19 любезно предоставлена УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.*

## Литература

(п.п. 1–7; 9–16; 18–26 см. References)

8. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Боултон М., Джарвис-Эванс Дж. Способность липофусциновых гранул из ретиального пигментного эпителия глаза человека фотосенсибилизировать окисление липидов при действии видимого света. <https://elibrary.ru/contents.asp?titleid=8212> *Сенсорные системы*. 1992; 6(3): 51–2.
17. Фрешни Р.Я. *Культура животной клетки: практическое руководство*. Бином. Лаборатория знаний. 2010.

## References

1. Sentation to pathology. *Optom Vis Sci* 2014; 91: 832–848. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000281
2. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M., et al. Age-related macular degeneration: linking clinical preKennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye* 1995; 9: 763–71. DOI: 10.1038/eye.1995.192
3. Holz F.G., Pauleikhoff D., Klein R., Bird A.C. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am. J. Ophthalmol.* 2004; 137: 504–10. DOI: 10.1016/j.ajo.2003.11.026
4. Sparrow J.R., Boulton M.E. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye. Res.* 2005, 80, 595–606. DOI: 10.1016/j.exer.2005.01.007
5. Feeney-Burns L., Eldred G.E. The fate of the phagosome: conversion to ‘age-pigment’ and impact in human retinal pigment epithelium. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1983; 103: 416–21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6589859/>
6. Adler IV. L., Chen C., Koutalos Y. All-trans retinal levels and formation of lipofuscin precursors after bleaching in rod photoreceptors from wild type and Abca4 -/- mice. *Exp Eye Res.* 2017; 155: 121–7. DOI: 10.1016/j.exer.2017.02.007
7. Sakai N., Decatur J., Nakanishi K., & Eldred G., et al. Ocular age pigment «A2-E»: an unprecedented pyridinium bisretinoid. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118, 1559–1560. <https://doi.org/10.1021/ja953480g>
8. Ostrovsky M.A., Dontsov A.E., Sakina N.L., et al. The ability of lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium of the human eye a photosensitized peroxidation lipid by the action of visible light. *Sensor Systems* 1992; 6: 51–4. (in Russian)
9. Wu Y., Yanase E., Feng X., Siegel M.M., et al. Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 7275–80. DOI: 10.1073/pnas.0913112107
10. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., et al. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407: 1075–88. DOI: 10.1007/s00216-014-8353-z
11. Dontsov A.E., Sakina N.L., Golubkov A.M., Ostrovsky M.A. Light-induced release of A2E photooxidation toxic products from lipofuscin granules of human retinal pigment epithelium. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2009; 425: 98–101. DOI: 10.1134/s1607672909020112
12. Munch G., Schick Tanz D., Behme A., Gerlach M., Riederer P., Palm D., et al. Amino acid specificity of glycation and protein-AGE cross-linking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17: 1006–10. DOI: 10.1038/13704
13. Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox. Biol.* 2014, 2, 411–29. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.016
14. Yakovleva M., Dontsov A., Trofimova N., Sakina N., Kononikhin A., Aybush A., et al. Lipofuscin granule bisretinoid oxidation in the human retinal pigment epithelium forms cytotoxic carbonyls. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 222. DOI: 10.3390/ijms23010222
15. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulina A., Aybush A., et al. Water-soluble products of photooxidative destruction of the bisretinoid A2E cause proteins modification in the dark. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 1534. DOI: 10.3390/ijms23031534
16. Feldman T., Ostrovskiy D., Yakovleva M., Dontsov A., Borzenok S., Ostrovsky M. Lipofuscin-mediated photic stress induces a dark toxic effect on ARPE-19 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 12234. DOI: 10.3390/ijms232012234
17. Freshni R.Ya. *Animal Cell Culture: A Practical Guide. [Kultura zhivotnoy kletki]*. Binom. Laboratoriya znaniy. Moscow: 2010. (in Russian)
18. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.Sh., Borzenok S.A., et al. Spectral analysis of fundus autofluorescence pattern as a tool to detect early stages of degeneration in the retina and retinal pigment epithelium. *Eye.* 2018; 32(9): 1440–8. DOI: 10.1038/s41433-018-0109-0
19. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M., Svistunenko D. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1993; 19: 201–4. DOI: 10.1016/1011-1344(93)87085-2
20. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497–509. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>
21. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 14609–13. DOI: 10.1073/pnas.95.25.14609
22. Farrukh A. Shamsi and Mike Boulton. Inhibition of RPE Lysosomal and Antioxidant Activity by the Age Pigment Lipofuscin, Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2001; 42(12): 3041–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687553/>
23. Godley B.F., Shamsi F.A., Liang F.-Q., Jarrett S.G., Davies S., Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 21061–6. DOI: 10.1074/jbc.M502194200
24. Shamsi F.A., Boulton M. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42: 3041–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687553/>
25. Alaimo A., Liñares G.G., Bujjamer J.M., Gorjod R.M., Alcon S.P., Martínez J.H., et al. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration. *Arch. Toxicol.* 2019; 93: 1401–15. DOI: 10.1007/s00204-019-02409-6
26. Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J., Jang Y.P., Jockusch S., Itagaki Y., et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 18207–13. DOI: 10.1074/jbc.M300457200

**Сведения об авторах:**

**Яковлева Марина Андреевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, e-mail: lina.invers@gmail.com;

**Островский Дмитрий Сергеевич**, зав. лаб., ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com;

**Хубецова Мадина Хетаговна**, врач-офтальмолог, ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: rogorina@inbox.ru;

**Борзенко Сергей Анатольевич**, проф. каф., акад. РАЕН, ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: MDBorzenok@yandex.ru;

**Фельдман Татьяна Борисовна**, вед. науч. сотр., ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: feldmantb@mail.ru;

**Островский Михаил Аркадьевич**, зав. лаб., ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: ostrovsky3535@mail.ru