

РЕТИНОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ SkQ1 – ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ВИЗОМИТИН – СВЯЗАН С ПОДАВЛЕНИЕМ АКТИВНОСТИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ p38МАПК И ERK1/2

© 2024 Н.А. Муралёва^{1*}, А.А. Жданкина², А.Ж. Фурсова^{1,3,4}, Н.Г. Колосова¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН,

630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: Myrалева@bionet.nsc.ru

² Сибирский государственный медицинский университет, 634050 Томск, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
630091 Новосибирск, Россия

⁴ Государственная новосибирская областная клиническая больница, 630087 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 18.09.2023

После доработки 20.11.2023

Принята к публикации 22.11.2023

Глазные капли Визомитин – первый и пока единственный лекарственный препарат на основе SkQ1 – митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония, синтезированного в лабораториях МГУ под руководством академика В.П. Скулачёва. SkQ1 рассматривается как потенциальный инструмент борьбы с программой старения. Ранее мы показали, что он способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений преждевременного старения у крыс OXYS, в том числе – ретинопатии, аналогичной возрастной макулярной дегенерации (ВМД). В настоящей работе мы оценили эффект инстилляций Визомитина (с возраста 9 до 12 мес.) на прогрессию признаков ВМД и активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. Контролем служили крысы Wistar и OXYS, получавшие плацебо (с идентичным Визомитину составом, за исключением SkQ1). Офтальмологический осмотр показал, что у крыс OXYS, получавших плацебо, ретинопатия прогрессировала, и по выраженности клинических проявлений они не отличались от интактных животных. Визомитин подавил прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS и существенно улучшил структурно-функциональные параметры клеток ретинального пигментного эпителия и состояние микроциркуляции в хориоиде, что, можно полагать, способствовало сохранности фоторецепторов, ассоциативных и ганглионарных нейронов. Установлено, что активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке 12-месячных крыс OXYS выше, чем у одновозрастных крыс Wistar, на что указывает повышенное содержание фосфорилированных форм p38МАПК и ERK1/2 и их белка-мишени тау (в положении T181 и S396). Визомитин снизил уровень фосфорилирования p38МАПК, ERK1/2 и тау, что свидетельствует о подавлении активности сигнальных каскадов МАПК. Таким образом, глазные капли Визомитин способны подавлять прогрессию ретинопатии у крыс OXYS, и их эффект связан со снижением активности сигнальных каскадов МАПК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: возрастная макулярная дегенерация, митохондриальный антиоксидант SkQ1, Визомитин, p38МАПК, ERK1/2, фосфорилирование, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972524020024 EDN: XNFJGE

ВВЕДЕНИЕ

Глазные капли Визомитин – первый и пока единственный лекарственный препарат на

основе SkQ1 – митохондриального антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония, синтезированного в лабораториях МГУ под руководством академика В.П. Скулачёва [1].

Принятые сокращения: ВМД – возрастная макулярная дегенерация; МАПК – митоген-активируемые протеинкиназы; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; Аβ – амилоид бета; ERK1/2 – внеклеточные сигнал-регулируемые протеинкиназы 1 и 2; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; PEDF – фактор пигментного эпителия; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

Его создание стало возможным благодаря исследованиям, которые были выполнены в самом начале работы над проектом «Ионы Скулачёва» на крысах OXYS – созданной в ИЦиГ СО РАН модели преждевременного старения. Преждевременное старение крыс OXYS проявляется ранним развитием комплекса гериатрических заболеваний, в том числе катаракты и ретинопатии, по клиническим, морфологическим и молекулярным признакам аналогичной возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей [2, 3]. Несколько месяцев исследования оказалось достаточно, чтобы показать – приём SkQ1 с кормом способен подавлять развитие всего комплекса фенотипических проявлений преждевременного старения крыс OXYS, что в дальнейшем было подтверждено многочисленными исследованиями. При первом обсуждении результатов наших пилотных исследований на семинаре у В.П. Скулачёва самым впечатляющим эффектом SkQ1 была признана его способность подавлять развитие катаракты и ретинопатии. В ходе обсуждения А.М. Оловников высказал идею о перспективности создания глазных капель на основе этого митохондриального антиоксиданта. Уже в 2005 г. мы приступили к исследованиям способности SkQ1 влиять на развитие у крыс OXYS катаракты и признаков ВМД при его приёме не только с кормом, но и в форме глазных капель, результаты которых были опубликованы в 2008 г. [4]. Параллельно в рамках проекта «Ионы Скулачёва» началась работа по созданию лекарственной формы, её клиническим испытаниям, в результате чего в 2012 г. Минздравом РФ был зарегистрирован препарат Визомитин – кератопротектор для профилактики синдрома сухого глаза. В дальнейшем показания к его применению были дополнены профилактикой ранней катаракты [5]. Исследования, выполненные на крысах OXYS, позволяют надеяться, что в дальнейшем одним из показаний к применению Визомитина может стать ВМД – многофакторное нейродегенеративное заболевание сетчатки, которое становится основной причиной потери и снижения качества зрения у людей старше 60 лет в развитых странах [6]. Как показали наши исследования, развивающаяся у крыс OXYS ретинопатия аналогична сухой, или атрофической, форме ВМД у людей [3, 7]. Клинические проявления ретинопатии развиваются у крыс OXYS (100%) к возрасту ~3–4 мес. на фоне структурно-функциональных изменений клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и нарушения хориоидальной микроциркуляции, которые прогрессируют с возрастом и приводят к снижению толщины слоя фоторецепторов и наружного ядерного слоя – событиям, лежащим в основе потери зрения при ВМД [8, 9].

Рассматривая митохондриальный антиоксидант SkQ1 как инструмент борьбы с программой старения, В.П. Скулачёв связывал его эффекты, прежде всего, с антирадикальной активностью, способностью подавлять генерацию активных форм кислорода непосредственно в митохондриях [10]. Наши исследования показали, что преждевременное старение крыс OXYS связано с дисфункцией митохондрий, но при этом прямых ассоциаций с окислительным стрессом выявить не удалось. Тем не менее SkQ1 способен предупреждать и/или подавлять развитие всех проявлений преждевременного старения у крыс OXYS, в том числе – признаков ВМД [11]. Так, было показано, что его приём с кормом, начатый в возрасте 1,5 мес., предотвращает развитие клинических проявления ретинопатии у крыс OXYS вплоть до двухлетнего возраста и способен существенно подавлять их прогрессию у животных с уже выраженными признаками заболевания [4, 10]. Его ретинопротекторные эффекты связаны с нормализацией микроциркуляции в сосудах хориоидеи, ультраструктуры клеток РПЭ и фоторецепторов [12, 13], влиянием на экспрессию генов-регуляторов ангиогенеза – фактора роста пигментного эпителия (VEGF) и его антагониста – фактора пигментного эпителия (PEDF) [8], а также нормализацией в сетчатке крыс OXYS процессов аутофагии [14]. Проявлением характерного для ВМД нарушения протеостаза в сетчатке крыс OXYS становится накопление токсического амилоида бета (A β), которое существенно подавлялось на фоне приёма SkQ1 [15]. Закономерно, что в случае приёма с кормом SkQ1 действовал системно. Его эффекты были тесно связаны с предупреждением нарушений структурно-функциональных параметров митохондрий и/или их восстановлением [16, 17]. Примечательно, что длительный приём SkQ1 подавлял сигнальный путь mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) [15], активация которого рассматривается как один из основных механизмов старения и развития, связанных с ним нейродегенеративных заболеваний [18].

Ранее мы показали, что манифестация и прогрессия признаков ВМД и болезни Альцгеймера у крыс OXYS происходят на фоне активации в сетчатке и мозге сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) [19–23], а способность SkQ1 подавлять их развитие и прогрессию, в том числе накопление токсических агрегатов A β и гиперфосфорилированного тау-белка в мозге крыс OXYS, оказалась связанной со снижением активности сигнальных путей p38МАПК и ERK1/2 (внеклеточных сигнал-регулируемых протеинкиназ 1 и 2) [20, 21]. Изменениям активности МАПК в последние годы отводят важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и рассматривают их как потенциальную мишень

для терапевтических воздействий [24]. В настоящем исследовании мы оценили связь способности SkQ1 – капель Визомитин – подавлять прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS с его влиянием на активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа выполнена на самцах крыс Wistar и OXYS, которых содержали в стандартных лабораторных условиях ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ и 12-часовой цикл свет/темнота) в клетках ($57 \times 36 \times 20$ см) по пять животных с доступом к стандартному корму для грызунов (ПК-120-1; «Лабораторснаб», Россия) и воде *ad libitum*.

Воздействие. Крысы OXYS опытной группы ($n = 15$) с возраста 9 мес., в период активной прогрессии клинических проявлений ретинопатии, получали ежедневно инстилляцию по одной капле SkQ1 – глазных капель Визомитин («НИИ Митохондриологии МГУ», Россия). Контрольные крысы OXYS ($n = 15$) и крысы Wistar ($n = 15$) получали плацебо – препарат, идентичный по составу Визомитину, за исключением SkQ1.

Офтальмологические осмотры. В возрасте 9 и 12 мес. (до и после воздействия) состояние глазного дна животных исследовали с помощью прямого офтальмоскопа Beta («HEINE», Германия) на фоне расширения зрачков 1%-ным тропикамидом. Выраженность патологических изменений сетчатки оценивали, согласно общепринятой в клинической практике классификации, в соответствии с протоколом Age-Related Eye Disease Study (AREDS) (<http://eyephoto.ophth.wisc.edu>): 0 баллов – изменения отсутствуют; 1 балл – 1-я неэкссудативная стадия заболевания, при которой появляются точечные кровоизлияния, отеки, друзы в заднем полюсе глаза, дефекты в РПЭ, перераспределение пигмента, атрофия хориокапиллярного слоя и РПЭ; 2 балла – 2-я экссудативная стадия – экссудативной отслойкой РПЭ, нейроэпителия; 3 балла – 3-я стадия – экссудативно-геморрагическая отслойка пигментного и/или нейроэпителия сетчатки, неоваскуляризация, рубцевание.

Гистологическое исследование. Заднюю стенку глаз фиксировали в растворе 12%-ного нейтрального формалина в течение 1 суток, как проводили ранее [2]. Далее два часа отмывали проточной водой, обезжировали, уплотняли и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы задней стенки глаз толщиной 4–5 мкм готовили с помощью ротационного микротомы, окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ проводили на микроскопе Carl Zeiss Axiostar plus («Carl Zeiss», Германия) с помощью программы Carl Zeiss AxioVision 8.0 при увеличении 10×100 . Подсчёт

удельной площади сосудов хориоидеи (открытых, со стазом, сладжем форменных элементов или тромбозом), удельной площади РПЭ, слоя фоторецепторов и наружного ядерного слоя, открытых интравитреальных сосудов в срезе сетчатки, а также средней площади цитоплазмы и ядра клеток РПЭ проводили на клетках каждой сетчатки (по 50 штук соответственно). Количество слоёв сетчатки и плотность клеток в наружном ядерном слое определяли при помощи окулярной сетки Автандилова в рамке на площади 900 мкм^2 . Анализ включал по 5 срезов каждой сетчатки при увеличении 10×100 . Подсчёт фоторецепторов с пикноморфными ядрами проводили на 1000 фоторецепторов, пикноморфных радиальных глиоцитов, нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоёв – (по 200 клеток каждой сетчатки соответственно).

Анализ Вестерн-блот. Сетчатку крыс Wistar и OXYS, получавших инстилляцию плацебо, и получавших инстилляцию Визомитина крыс OXYS ($n = 5$) гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich», США), как описано ранее [22, 23]. Концентрацию общего белка определяли с помощью бицинхониновой кислоты (BCA) («Thermo Fisher Scientific», США). Белки разделяли электрофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) и блокировали 5%-ным бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (10 мМ; pH 7,4) в течение 1 ч. Далее мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к p38МАПК, phospho-p38МАПК (Thr180, Tyr182), ERK1/ERK2, phospho-ERK1/ERK2 (Thr202, Tyr204) (# 33-1300, # 36-8500, # 36-8800, # 13-6200 соответственно; разведение 1 : 1000; «Invitrogen», США), Tau, phospho-Tau (S396), phospho-Tau (T181) или GAPDH (ab80579, ab75679, ab109390, ab8245 соответственно; разведение 1 : 1000; «Abcam», США) и в течение 1 ч со вторичными анти-кроличьими и анти-мышинными антителами (ab6721, ab6808, «Abcam»; разведение 1 : 5000). Интенсивность свечения обнаруживали с помощью системы визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad») и оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Статистический анализ. Статистический анализ производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 («Statsoft», США). Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с *post hoc* сравнением групповых средних (Newman-Keul test). Данные представлены в виде медианы (q1–q3). Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Визомитин замедлил прогрессию клинических признаков ретинопатии. При предварительном офтальмологическом осмотре в возрасте 9 мес. опытная и контрольная группы крыс OXYS не различались по выраженности патологических изменений сетчатки ($p = 0,74$), которые были представлены первой стадией ретинопатии. В возрасте 9–12 мес. у крыс OXYS, получавших плацебо, патологические изменения активно прогрессировали и в 87% глаз они соответствовали второй, а в 13% – третьей, наиболее тяжёлой стадии ВМД. На фоне инстилляций Визомитина выраженность патологических изменений сетчатки была существенно ниже: в 90% глаз патологические изменения соответствовали первой и только в 10% – второй стадии ВМД. Средние значения выраженности патологических изменений составили $2,14 \pm 0,07$ и $1,33 \pm 0,09$ соответственно и были достоверными (согласно однофакторному анализу ANOVA, $F_{1,59} = 53,8$, $p < 0,0000$ и критерию Манна–Уитни – $p = 0,000003$). У крыс Wistar патологические изменения не были выявлены ни при первом, ни при повторном осмотре – инстилляций плацебо не повлияли на состояние сетчатки.

Визомитин подавил патологические изменения в сетчатке крыс OXYS. При гистологическом исследовании во всех слоях сетчатки 12-месячных крыс OXYS, получавших плацебо, в отличие от крыс Wistar, были выявлены изменения, характерные для ВМД (рис. 1, таблица). Удельная площадь открытых сосудов хориоидеи у крыс OXYS была вдвое меньше ($p < 0,01$), а доля сосудов с признаками окклюзии (со стазом, сладжем или тромбозом) – вдвое больше ($p < 0,01$), чем у крыс Wistar (таблица). Со стороны интратретиальных сосудов сетчатки у OXYS также отмечались микроциркуляторные изменения в виде появления расширенных полнокровных сосудов со стазом и сладжем

форменных элементов, однако количественно достоверных изменений не выявлено. Средняя площадь клеток РПЭ в срезе сетчатки крыс OXYS была в 2 раза меньше, чем у крыс Wistar ($p < 0,01$), главным образом за счёт уплощения ядер и снижения объёма цитоплазмы, при этом выявлялись ядра с признаками пикноза (рис. 1, таблица).

Часть фоторецепторов в сетчатке крыс OXYS также подвергалась деструкции: процент пикнотично изменённых ядер был в 2 раза выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,01$). Гибель клеток закономерно сопровождалась снижением в 1,7 раза количества рядов фоторецепторов ($p < 0,01$). Во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс OXYS была повышена, по сравнению с крысами Wistar, доля ассоциативных нейронов с отёком цитоплазмы и сморщиванием ядра, а также пикноморфных гиперхромных радиальных глиоцитов (в 1,4 и в 1,84 раза соответственно, $p < 0,05$; рис. 2, а и б; таблица). В ганглионарном слое у крыс OXYS был повышен процент нейронов с очаговым, тотальным хроматолизом и нейронов с признаками пикноза в 1,4 ($p < 0,05$), 6,4 и 11,2 раза соответственно ($p < 0,01$; таблица).

Ежедневные инстилляций Визомитина в возрасте 9–12 мес. замедлили прогрессирование ретинопатии у крыс OXYS. На фоне его приёма существенно улучшалось состояние микроциркуляции в сосудах хориоидеи: удельная площадь сосудов с признаками окклюзии снизилась у крыс OXYS вдвое ($p < 0,01$), а площадь открытых сосудов возросла в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными, получавшими плацебо. Анализ состояния РПЭ выявил активацию компенсаторно-приспособительных процессов, которая проявлялась у крыс OXYS увеличением средней площади ядер клеток РПЭ на 7,5% ($p < 0,01$), в результате чего отличия от крыс Wistar по этому параметру нивелировались (таблица).

Визомитин проявил выраженный нейропротекторный и глиопротекторный эффекты –

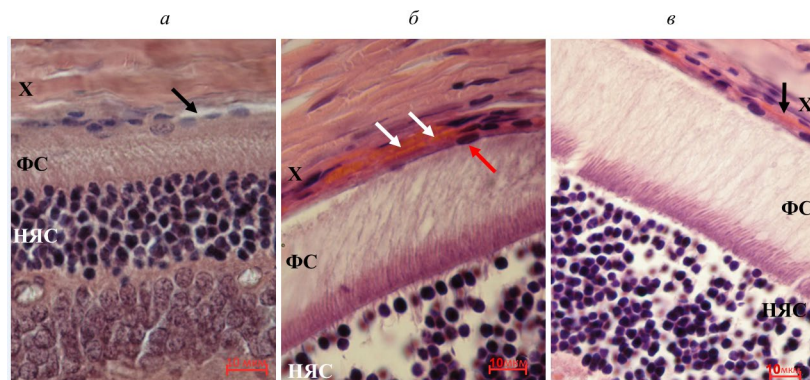


Рис. 1. Хориоретинальный комплекс крыс Wistar (а) и OXYS (б), получавших плацебо, и крысы OXYS, получавшей Визомитин (в) в возрасте 9–12 мес. X – хориоидея; ФС – фоторецепторный слой; НЯС – наружный ядерный слой. Чёрные стрелки – хориокапилляры с открытым просветом; белые стрелки – тромбированные хориокапилляры; красная стрелка – пикноз ядра РПЭ

Влияние Визомитина на морфометрические параметры сетчатки крыс OXYS

Параметры	Wistar	OXYS	OXYS + Визомитин
Удельная площадь открытых сосудов, %	19,50 ± 1,93	9,67 ± 1,06* <i>p</i> < 0,01	15,04 ± 1,43# <i>p</i> < 0,05
Удельная площадь сосудов со стазом или тромбозом, %	6,10 ± 0,44	11,36 ± 0,90* <i>p</i> < 0,01	5,71 ± 0,83# <i>p</i> < 0,01
Удельная площадь пигментного эпителия в срезе сетчатки, %	5,77 ± 0,41	2,64 ± 0,19* <i>p</i> < 0,01	2,47 ± 0,19* <i>p</i> < 0,01
Средняя площадь клетки РПЭ, мкм ²	247,49 ± 3,96	183,65 ± 2,82* <i>p</i> < 0,01	207,98 ± 3,52*# <i>p</i> < 0,01
Средняя площадь ядра клетки РПЭ, мкм ²	53,71 ± 0,82	48,11 ± 0,59* <i>p</i> < 0,01	51,72 ± 0,90# <i>p</i> < 0,01
Количество рядов фоторецепторов	11,0 ± 0,42	6,62 ± 0,35* <i>p</i> < 0,01	7,57 ± 0,29* <i>p</i> < 0,01
Пикноз ядер фоторецепторов, %	0,37 ± 0,09	0,72 ± 0,06* <i>p</i> < 0,01	0,57 ± 0,07
Пикноморфные ассоциативные нейроны, %	0,54 ± 0,06	0,75 ± 0,06* <i>p</i> < 0,05	0,48 ± 0,05# <i>p</i> < 0,01
Пикноморфные радиальные глиоциты, %	3,61 ± 0,78	6,67 ± 0,65* <i>p</i> < 0,01	3,40 ± 0,59# <i>p</i> < 0,01
Ганглионарные нейроны с очаговым хроматолизом, %	3,25 ± 0,31	4,41 ± 0,30* <i>p</i> < 0,05	4,54 ± 0,16* <i>p</i> < 0,01
Ганглионарные нейроны с тотальным хроматолизом, %	0,71 ± 0,19	4,53 ± 0,59* <i>p</i> < 0,01	0,85 ± 0,08#
Ганглионарные пикноморфные нейроны, %	0,28 ± 0,05	3,13 ± 0,38* <i>p</i> < 0,01	0,44 ± 0,05#
Удельная площадь интравитреальных сосудов, %	0,97 ± 0,10	1,13 ± 0,23	0,76 ± 0,13

Примечание. Данные представлены mean ± SEM. * – Достоверные различия между крысами OXYS и Wistar, получавшими препарат плацебо; # – статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05. РПЭ – ретикулярный пигментный эпителий.

защитил нейроны и радиальные глиоциты сетчатки крыс OXYS от повреждения. В результате процент пикнотичных ядер фоторецепторов у получавших его крыс OXYS не превышал значения этого показателя у крыс Wistar, доля пикноморфных ассоциативных нейронов снизилась по сравнению с крысами OXYS, получавшими плацебо, на 36% (*p* < 0,01), а радиальных глиоцитов – на 51% (*p* < 0,01), достигнув характерных для крыс Wistar значений (рис. 2; таблица). В популяции ганглионарных нейронов доля клеток с признаками деструкции была сопоставима у крыс OXYS, получавших Визомитин, и у крыс Wistar, получавших плацебо (таблица).

Визомитин снизил уровень фосфорилирования p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. В возрасте 12 мес. содержание белка p38МАПК и его фосфорилированной формы (p-p38МАПК) в сетчатке крыс OXYS, получавших плацебо, было выше, чем у крыс Wistar (*p* < 0,005 и *p* < 0,001 соответственно; рис. 3, а–в). Уровень фосфорилирования

p38МАПК (оценивали по отношению p-p38МАПК к p38МАПК) у крыс OXYS превышал значение у крыс Wistar (*p* < 0,017; рис. 3, г). Инстиляции Визомитина не повлияли на содержание p38МАПК, но снизили содержание p-p38МАПК на уровне тенденции (*p* = 0,054; рис. 3, б и в). Отношение p-p38МАПК к p38МАПК в этой группе было достоверно ниже, чем у крыс OXYS из группы плацебо (*p* < 0,050), но оставалось выше, чем у крыс Wistar (рис. 3, г).

Содержание ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS, получавших плацебо, в возрасте 12 мес. не отличалось от крыс Wistar (рис. 3, д). Как и следовало ожидать, содержание фосфорилированной формы (p-ERK1/2) у крыс OXYS превышало значения у крыс Wistar (*p* < 0,005; рис. 3, е). В соответствии с этими данными, уровень фосфорилирования ERK1/2 у крыс OXYS, получавших плацебо, был выше, чем у крыс Wistar (*p* < 0,005; рис. 3, ж), что свидетельствует об активации сигнального пути ERK1/2 в сетчатке этих животных. Несмотря на то что инстиляции Визомитина не повлияли на содержание ERK1/2

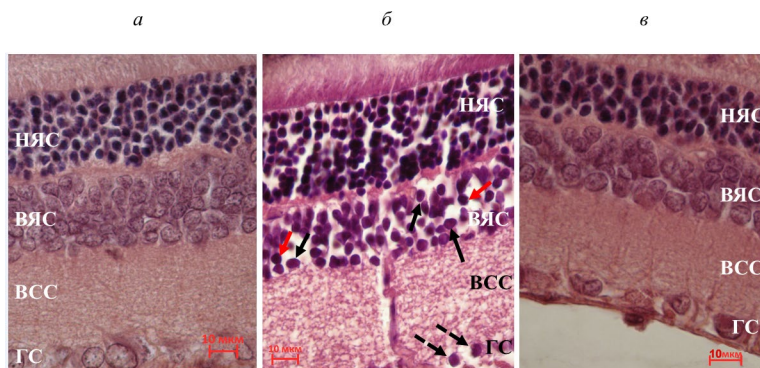


Рис. 2. Сетчатка крыс Wistar (а) и OXYs (б), получавших плацебо, и крысы OXYs, получавшей Визомитин (в). Чёрные стрелки – отёчные ассоциативные нейроны; красные стрелки – гиперхромные пикноморфные ассоциативные нейроны; пунктирные стрелки – пикноморфные ганглионарные нейроны. НЯС – наружный ядерный слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; ГС – ганглионарный слой. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка – 10 мкм

в сетчатке крыс OXYs, они снизили на уровне тенденции содержание p-ERK1/2 ($p = 0,069$; рис. 3, д и е). Важно, что Визомитин достоверно снизил отношение p-ERK1/2 к ERK1/2 у крыс OXYs ($p < 0,040$; рис. 3, жс) до уровня крыс Wistar.

Влияние Визомитина на содержание тау, p-тауT181 и p-тауS396 в сетчатке крыс OXYs. Для подтверждения ингибирующего влияния инстилляций Визомитана на активность p38МАПК и

ERK1/2 в сетчатке мы оценили уровень сайт-специфичного фосфорилирования их мишени тау-белка. Содержание общего тау в сетчатке крыс Wistar и OXYs, получавших плацебо, в возрасте 12 мес. не отличалось. и Визомитин не повлиял на его содержание в сетчатке крыс OXYs (рис. 4, а и б). Было выявлено повышенное содержание p-тауT181 и p-тауS396 в сетчатке крыс OXYs относительно крыс Wistar ($p < 0,025$ и $p < 0,001$ соответственно).

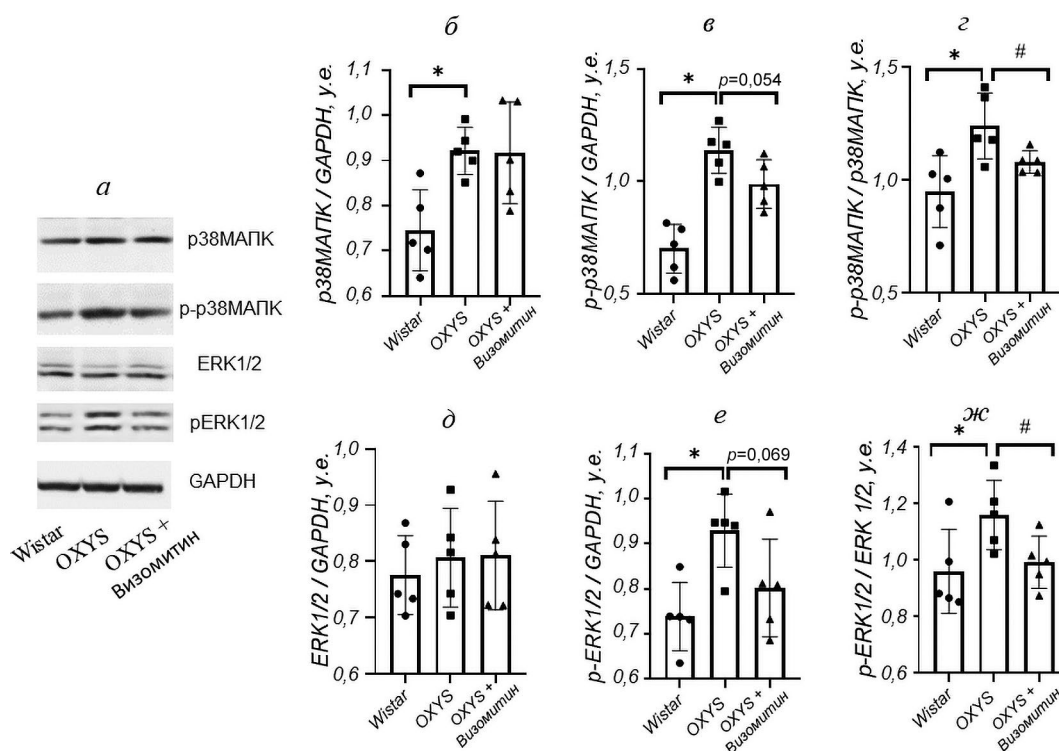


Рис. 3. Влияние инстилляций Визомитина на содержание p38МАПК, p-p38МАПК, ERK1/2 и p-ERK1/2 в сетчатке крыс OXYs. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание p-38МАПК (б), p-p38МАПК (в), отношение p-p38МАПК к p38МАПК (г), ERK1/2 (д), p-ERK1/2 (е) и отношение p-ERK1/2 к ERK1/2 (ж) в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYs, получавших плацебо или Визомитин. В качестве контроля использовали GAPDH. Данные представлены в виде медианы (q1–q3). * Достоверные различия между крысами OXYs и Wistar, получавшими плацебо; # статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$

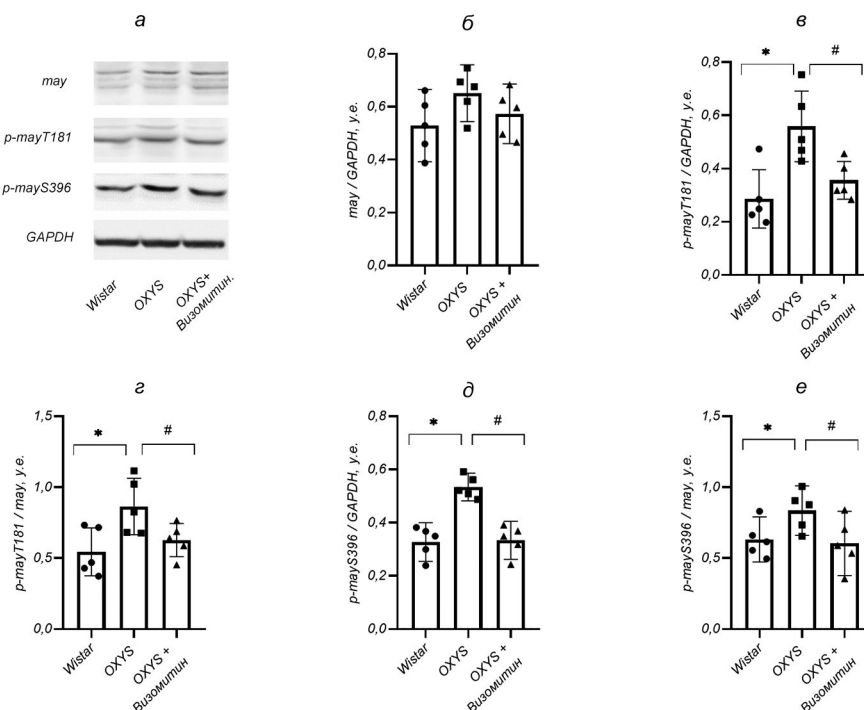


Рис. 4. Влияние Визомитина на содержание тау, p-тауT181 и p-тауS396 в сетчатке крыс OXYS. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание тау (б), p-тауT181 (в), отношение p-тауT181 к тау (г), p-тауS396 (д), отношение p-тауS396 к тау (е) в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYS, получавших плацебо или Визомитин. В качестве контроля использовали GAPDH. Данные представлены в виде медианы (q1–q3). * Достоверные различия между крысами OXYS и Wistar, получавшими плацебо; # статистически значимый эффект препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$

В группе крыс OXYS, получавших инстилляцию Визомитина, содержание p-тауT181 и p-тауS396 было ниже, чем у контрольных крыс OXYS ($p < 0,017$ и $p < 0,001$ соответственно), так же, как и отношения p-тауT181/тау и p-тауS396/тау ($p < 0,05$ и $p < 0,05$ соответственно; рис. 4, в и г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее при исследовании эффективности инстилляций SkQ1 (250 нм водный раствор) мы показали, что и в этой лекарственной форме он способен не только предупреждать развитие и подавлять прогрессию признаков ВМД, но, как и в случае приёма с кормом, в определённой степени снижать выраженность патологических изменений в сетчатке крыс OXYS [4, 10, 25]. В настоящей работе мы впервые приводим результаты оценки влияния фармакологического препарата – глазных капель Визомитин – на развитие ретинопатии и активность МАПК в сетчатке крыс OXYS.

Как показали результаты офтальмологического осмотра, инстилляцией Визомитина, начатые в возрасте 9 мес., подавили прогрессию признаков ВМД у крыс OXYS: в возрасте 12 мес. выраженность патологических изменений сетчатки у получавших препарат животных была в 1,6 раза

менее выражена, чем у контрольных. Препарат существенно улучшил структурно-функциональные параметры РПЭ, фоторецепторов, нейронов и радиальной глии. Можно полагать, нейропротекторный эффект препарата связан с его способностью восстанавливать микроциркуляцию в сосудах хориоидеи – на фоне его приёма существенно снизилось количество сосудов с признаками нарушения кровотока.

Патогенез ВМД тесно связан с воспалением, окислительным стрессом и прогрессирующим нарушением протеостаза – процессами, в регуляции которых важная роль отводится МАПК-сигнальным каскадам, обеспечивающим передачу сигнала от клеточной мембраны к ядру [26]. Последовательное фосфорилирование нижестоящих киназ в конечном итоге вызывает фосфорилирование и активацию целевых белков и ядерных факторов транскрипции. Это событие служит индикатором как эффективности передачи сигнала, так и активности сигнального пути в целом. Подавление активности сигнальных путей МАПК рассматривается как перспективный подход к лечению ВМД, несмотря на то что информация об их состоянии при развитии ВМД остаётся крайне ограниченной и основана на данных, полученных в исследованиях на культурах клеток РПЭ [24].

Ранее мы показали, что манифестация и прогрессия признаков ВМД у крыс OXYS происходят на фоне активации сигнальных каскадов p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке [22, 23]. Это подтвердило и настоящее исследование: в сетчатке 12-месячных крыс OXYS активность сигнальных каскадов p38МАПК и ERK1/2 была выше, чем у крыс Wistar. Инстилляцией Визомитина повлияли на активность p38МАПК и ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS. При этом препарат снизил содержание p-p38МАПК и p-ERK1/2 только на уровне тенденции, тогда как соотношения фосфорилированных форм киназ к общему их содержанию было снижено достоверно.

Клетки сетчатки обладают уникальной морфологией, продолжительностью жизни и функциональной организацией, которые в значительной степени зависят от структурной и функциональной сохранности белков. Дисфункция митохондрий при развитии ВМД запускает нарушение протеостаза – накопление патологических агрегатов, которое выявляется в сетчатке пациентов с ВМД ещё до нарушения остроты зрения [27, 28]. Такие агрегаты, образованные липофусцином, токсическим Аβ и гиперфосфорилированным тау-белком, способны вызывать повреждение нейронов. Сигнальные пути МАПК участвуют в регуляции протеостаза через фосфорилирование белков-мишеней, включая тау. Ранее мы показали, что в возрасте 18 мес., когда нейродегенеративные изменения в сетчатке крыс OXYS ярко выражены, в ней существенно повышено содержание Аβ и фосфорилированного тау-белка за счёт его фосфорилирования по МАПК-зависимым сайтам [3, 23]. В настоящем исследовании мы показали, что фосфорилирование тау-белка в сетчатке крыс OXYS усилено уже в возрасте 12 мес., а инстилляцией Визомитина снизили его за счёт угнетения МАПК-зависимого фосфорилирования. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния на динамику накопления фосфорилированного тау и Аβ в мозге и сетчатке крыс OXYS после приёма SkQ1 с кормом [15, 21].

Накоплению патологических агрегатов способствует снижение с возрастом активности процессов аутофагии – клеточной системы контроля качества белков. Дисфункция аутофагии приводит к нарушению гомеостаза, накоплению повреждённых органелл и токсичных белков, которые способствуют нарушению функций митохондрий и окислительному стрессу [29]. Усиленное накопление липофусцина и Аβ в сетчатке на фоне нарушения процесса аутофагии характерно как для крыс OXYS с выраженными признаками ВМД [30, 31], так и для людей с поздней стадией этого заболевания [32]. Приём SkQ1 с кормом способствовал активации аутофагии в сетчатке крыс OXYS [14]. Имеющиеся в литературе данные

позволяют предположить наличие прямой связи между клеточными системами контроля качества, изменениями динамики митохондрий и сигнальными путями МАПК. Ранее мы показали, что механизмы нейропротекторного действия SkQ1 как при профилактическом приёме с кормом, начатом в молодом возрасте, так в случае его приёма крысами OXYS с выраженными нейродегенеративными изменениями связаны с восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий в мозге [33, 34].

Снижение активности сигнальных каскадов МАПК антиоксидантами было продемонстрировано ранее на различных моделях окислительного повреждения клеток РПЭ человека. Так, защитный эффект ресвератрола был связан с ингибированием активности ERK 1/2 в клетках РПЭ [35]. Экстракт черники увеличил уровень эндогенных антиоксидантных ферментов при одновременном снижении активных форм кислорода и ингибирования МАПК в модели окислительного повреждения *in vitro* [36]. Следует отметить, что приведённые выше эффекты антиоксидантов были связаны не только с частичным ингибированием МАПК, но и других сигнальных путей. Это обусловлено наличием связи передачи сигналов МАПК с такими сигнальными путями, как VEGF, mTOR, аутофагия и др. Известно, что p38МАПК и ERK1/2 способствуют увеличению экспрессии VEGF [37, 38], который является основным проангиогенным фактором, участвующим в патогенезе ВМД [39]. Глазные капли с SkQ1 (его водный раствор) снижали экспрессию VEGF в сетчатке крыс OXYS как на уровне мРНК, так и на уровне белка [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что глазные капли Визомитин способны подавлять прогрессию ретинопатии у крыс OXYS и могут быть в перспективе рекомендованы для применения в комплексной терапии ВМД у людей. Полученные нами ранее данные и результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что механизмы терапевтических эффектов SkQ1 – активного вещества капель Визомитин – многогранны и связаны с воздействием на редокс-зависимые сигнальные пути, в том числе – со снижением активности МАПК-сигнальных каскадов.

Вклад авторов. Н.А. Муралёва – концепция исследования, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; А.Ж. Фурсова – офтальмологический осмотр животных; А.А. Жданкина – гистоморфометрический анализ препаратов сетчатки; А.Ж. Фурсова, А.А. Жданкина,

Н.А. Муралёва и Н.Г. Колосова – подготовка и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 22-25-00224).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена на крысах линии OXYS и Wistar (контрольная линия) на базе Центра коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Инсти-

тута цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных (включая соответствующие помещения, квалифицированный персонал, необходимую документацию) и все эксперименты с животными проводили в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 85/1 от 18.06.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev V. P. (2007) A biochemical approach to the problem of aging: “megaproject” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1385-1396, <https://doi.org/10.1134/s0006297907120139>.
2. Zhdankina, A. A., Fursova, A., Logvinov, S. V., and Kolosova, N. G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455-458, <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0298-4>.
3. Kozhevnikova, O. S., Korbolina, E. E., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Orlov, Y. L., and Kolosova, N. G. (2013) Association of AMD-like retinopathy development with an Alzheimer’s disease metabolic pathway in OXYS rats, *Biogerontology*, **14**, 753-762, <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9439-2>.
4. Neroev, V. V., Archipova, M. M., Bakeeva, L. E., Fursova, A., Grigorian, E. N., Grishanova, A. Y., Iomdina, E. N., Ivashchenko, Z. h. N., Katargina, L. A., Khoroshilova-Maslova, I. P., Kilina, O. V., Kolosova, N. G., Kopenkin, E. P., Korshunov, S. S., Kovaleva, N. A., Novikova, Y. P., Philippov, P. P., Pilipenko, D. I., Robustova, O. V., Saprunkova, V. B., and Skulachev, V. P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1317-1328, <https://doi.org/10.1134/s0006297908120043>.
5. Еричев В. П., Козлова И. В. Решикова В. С., Алексеев В. Н., Левко М. А., Замятин А. А., Гудкова Е. Ю., Ковалёва Н. А., Выгодин В. А., Федоркин О. Н., Остапенко В., Сенин И. И., Савченко А. Ю., Попеко Н. А., Скулачев В. П., Скулачев М. В. (2016) Клиническое исследование эффективности и безопасности препарата Визомитин®, глазные капли, у пациентов с возрастной катарактой, *Национальный журнал Глаукома*, **15**, 61-69.
6. Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y., and Wong, T. Y. (2014) Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *Lancet*, **2**, e106-e116, [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1).
7. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Korbolina, E. E., Fursova, A. Zh., and Kozhevnikova, O. S. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases, *Adv. Gerontol.*, **4**, 294-298, <https://doi.org/10.1134/S2079057014040146>.
8. Markovets, A. M., Saprunkova, V. B., Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh., Bakeeva, L. E., and Kolosova, N. G. (2011) Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Aging*, **3**, 44-54, <https://doi.org/10.18632/aging.100243>.
9. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Bayborodin, S. I., and Kolosova, N. G. (2017) Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats, *Sci. Rep.*, **7**, 41533, <https://doi.org/10.1038/srep41533>.
10. Skulachev, M. V., Antonenko, Y. N., Anisimov, V. N., Chernyak, B. V., Cherepanov, D. A., Chistyakov, V. A., Egorov, M. V., Kolosova, N. G., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Plotnikov, E. Y., Roginsky, V. A., Savchenko, A. Y., Severina, I. I., Severin, F. F., Shkurat, T. P., Tashlitsky, V. N., Shidlovsky, K. M., Vyssokikh, M. Y., Zamyatnin, A. A., Jr, and Skulachev, V. P. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug Targets*, **12**, 800-826, <https://doi.org/10.2174/138945011795528859>.
11. Kolosova, N. G., Kozhevnikova, O. S., Muraleva, N. A., Rudnitskaya, E. A., Rumyantseva, Y. V., Stefanova, N. A., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., and Fursova, A. Z. (2022) SkQ1 as a tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1552-1562, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120124>.
12. Saprunkova, V. B., Lelekova, M. A., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of Wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648-658, <https://doi.org/10.1134/S0006297912060120>.

13. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Karamysheva, T. V., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 restores α B-crystallin expression and protects against AMD-like retinopathy in OXYS rats, *Cell Cycle*, **13**, 3499-3505, <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.958393>.
14. Telegina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2020) Autophagy as a target for the retinoprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1640-1649, <https://doi.org/10.1134/S0006297920120159>.
15. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of AMD-like pathology by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 is associated with a decrease in the accumulation of amyloid β and in mTOR activity, *Antioxidants*, **8**, 177, <https://doi.org/10.3390/antiox8060177>.
16. Tyumentsev, M. A., Stefanova, N. A., Kiseleva, E. V., and Kolosova, N. G. (2018) Mitochondria with morphology characteristic for Alzheimer's disease patients are found in the brain of OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1083-1088, <https://doi.org/10.1134/S0006297918090109>.
17. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2019) Suppression of Alzheimer's disease-like pathology progression by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1: a transcriptome profiling study, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 3984906, <https://doi.org/10.1155/2019/3984906>.
18. Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., and Jaworski, J. (2017) Molecular neurobiology of mTOR, *Neuroscience*, **341**, 112-153, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>.
19. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) p38 MAPK-dependent α B-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **119**, 45-52, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.017>.
20. Muraleva, N. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) SkQ1 suppresses the p38 MAPK signaling pathway involved in Alzheimer's disease like pathology in OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 676, <https://doi.org/10.3390/antiox9080676>.
21. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021) MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: a study in senescence-accelerated OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1058, <https://doi.org/10.3390/antiox10071058>.
22. Muraleva, N. A. and Kolosova, N. G. (2023) P38 MAPK signaling in the retina: effects of aging and age-related macular degeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 11586, <https://doi.org/10.3390/ijms241411586>.
23. Muraleva, N. A. and Kolosova, N. G. (2023) Alteration of the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway in the retina associated with age and development of AMD-like retinopathy, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 179-188, <https://doi.org/10.1134/S0006297923020025>.
24. Kyosseva, S. V. (2016) Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration, *Ophthalmol. Eye Dis.*, **8**, 23-30, <https://doi.org/10.4137/OED.S32200>.
25. Markovets, A. M., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2011) Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression, *PLoS One*, **6**, e21682, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021682>.
26. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689-737, <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>.
27. Bhutto, I., and Luttj, G. (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex, *Mol. Aspects Med.*, **33**, 295-317, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.005>.
28. Khandhadia, S., Cherry, J., and Lotery, A. J. (2012) Age-related macular degeneration, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **724**, 15-36, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_2.
29. Blasiak, J., Pawlowska, E., Szczepanska, J., and Kaarniranta, K. (2019) Interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system and its role in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 210, <https://doi.org/10.3390/ijms20010210>.
30. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Devyatkin, V. A., and Kolosova, N. G. (2018) Involvement of the autophagic pathway in the progression of AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Biogerontology*, **19**, 223-235, <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9751-y>.
31. Kozhevnikova, O. S., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., and Kolosova, N. G. (2019) Disruptions of autophagy in the rat retina with age during the development of age-related-macular-degeneration-like retinopathy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4804, <https://doi.org/10.3390/ijms20194804>.
32. Kaarniranta, K., Blasiak, J., Liton, P., Boulton, M., Klionsky, D. J., and Sinha, D. (2023) Autophagy in age-related macular degeneration, *Autophagy*, **19**, 388-400, <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2069437>.
33. Tyumentsev, M. A., Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Rummyantseva, Y. V., Kiseleva, E., Vavilin, V. A., and Kolosova, N. G. (2018) Mitochondrial dysfunction as a predictor and driver of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *J. Alzheimer's Dis.*, **63**, 1075-1088, <https://doi.org/10.3233/JAD-180065>.

34. Kolosova, N. G., Tyumentsev, M. A., Muraleva, N. A., Kiseleva, E., Vitovtov, A. O., and Stefanova, N. A. (2017) Antioxidant SkQ1 alleviates signs of Alzheimer's disease-like pathology in old OXYS rats by reversing mitochondrial deterioration, *Curr. Alzheimer's Res.*, **14**, 1283-1292, <https://doi.org/10.2174/1567205014666170621111033>.
35. King, R. E., Kent, K. D., and Bomser, J. A. (2005) Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition, *Chem. Biol. Interac.*, **151**, 143-149, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.11.003>.
36. Huang, W. Y., Wu, H., Li, D. J., Song, J. F., Xiao, Y. D., Liu, C. Q., Zhou, J. Z., and Sui, Z. Q. (2018) Protective effects of blueberry anthocyanins against H₂O₂-induced oxidative injuries in human retinal pigment epithelial cells, *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 1638-1648, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06135>.
37. Milanini, J., Viñals, F., Pouyssegur, J., and Pagès, G. (1998) p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **273**, 18165-18172, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18165>.
38. Pagès, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A. P., and Pouyssegur, J. (2000) Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability, *J. Biol. Chem.*, **275**, 26484-26491, <https://doi.org/10.1074/jbc.M002104200>.
39. Bhutto, I. A., McLeod, D. S., Hasegawa, T., Kim, S. Y., Merges, C., Tong, P., and Lutty, G. A. (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration, *Exp. Eye Res.*, **82**, 99-110, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.05.007>.

RETINOPROTECTIVE EFFECT SkQ1 – VISOMITIN EYE DROPS – IS ASSOCIATED WITH SUPPRESSION p38MAPK AND ERK1/2 SIGNALING PATHWAYS ACTIVITY

N. A. Muraleva^{1*}, A. A. Zhdankina², A. Zh. Fursova^{1,3,4}, and N. G. Kolosova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: myraleva@bionet.nsc.ru

² Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, 634055 Tomsk, Russia

³ Department of Ophthalmology, Novosibirsk State Medical University, 630091 Novosibirsk, Russia

⁴ State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, 630087 Novosibirsk, Russia

Visomitin eye drops are the first and so far the only drug based on SkQ1 – the mitochondrial antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium, synthesized in the laboratories of Moscow State University under the leadership of Academician V.P. Skulachev. SkQ1 is considered as a potential tool to combat the aging program. We have previously shown that it is able to prevent and/or suppress the development of all manifestations of accelerated senescence in OXYS rats, including retinopathy, similar to age-related macular degeneration (AMD). Here, we assessed the effect of Visomitin instillations (from the age of 9 to 12 months) on the progression of AMD-like pathology and p38MAPK and ERK1/2 activity in OXYS rat retina. Wistar and OXYS rats treated with placebo (with a composition identical to Visomitin with the exception of SkQ1) used as controls. Ophthalmological examination showed that in OXYS rats receiving placebo, retinopathy progressed and the severity of clinical manifestations did not differ from intact OXYS rats. Visomitin suppressed the progression of AMD-like pathology in OXYS rats and significantly improved the structural and functional parameters of retinal pigment epithelium cells and the state of microcirculation in the choroid, which, presumably, contributed to the preservation of photoreceptors, associative and ganglion neurons. It was found that the activity of p38MAPK and ERK1/2 in the retina of 12-month-old OXYS rats is higher than that of Wistar rats of the same age, as indicated by the increased content of phosphorylated forms of p38MAPK and ERK1/2 and their target protein tau (at position T181 and S396). Visomitin decreased the phosphorylation of p38MAPK, ERK1/2 and tau, indicating suppression of the activity of these MAPK signaling cascades. Thus, Visomitin eye drops are able to suppress the progression of AMD-like pathology in OXYS rats and their effect is associated with a decrease in the activity of MAPK signaling cascades.

Keywords: age-related macular degeneration, mitochondrial antioxidant SkQ1, Visomitin, p38MAPK, ERK1/2, phosphorylation, OXYS rats