

УДК 581.133.12

## **Сравнительное исследование оксидантных свойств окисленных и неокисленных бисретиноидов липофуциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека**

**Яковлева М.А.<sup>1</sup>, Сакина Н.Л.<sup>1</sup>, Кольчугина И.Б.<sup>2</sup>, Арбуханова П.М.<sup>3</sup>, Борзенко С.А.<sup>3</sup>, Фельдман Т.Б.<sup>1,2</sup>, Островский М.А.<sup>1,2</sup>**

- <sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» Российской академии наук. 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4
- <sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
- <sup>3</sup> Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А

**Актуальность.** Недавно нами было показано, что при возрастной макулярной дегенерации сетчатки наблюдается повышенное содержание продуктов фотоокисления и фотодегградации бисретиноидов по сравнению с нормой. Поэтому на сегодняшний день вопрос о фототоксичности этих продуктов становится актуальным для решения проблемы поиска путей лечения и профилактики патологии.

**Цель.** Провести сравнительное исследование фотосенсибилизирующего действия N-ретинолиден-N-ретинолэтанолamina (A2E) и продуктов его фотоокисления и фотодегградации на индуцированную видимым светом пероксидацию липидов фоторецепторных мембран.

**Материалы и методы.** При помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии были получены отдельные фракции неокисленных и окисленных бисретиноидов в хлороформном экстракте липофуциновых гранул из ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз.

**Результаты.** Проведено сравнительное исследование фототоксических свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофуциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека на пероксидацию липидов наружных сегментов фоторецепторных клеток. Выводы. Окисленные бисретиноиды липофуциновых гранул менее фототоксичны по сравнению с их неокисленными формами.

**Ключевые слова:** глаз; ретинальный пигментный эпителий; липофуциновые гранулы; бисретиноиды; пероксидация.

**Для цитирования:** Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кольчугина И.Б., Арбуханова П.М., Борзенко С.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Сравнительное исследование оксидантных свойств окисленных и неокисленных бисретиноидов липофуциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека. *Патогенез*. 2019; 17(1): 66-71.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.01.66-71.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН № 42 «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»

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

**Поступила:** 20.10.2018

### **Comparative study of oxidant properties of oxidized and unoxidized bisretinoids of lipofuscin granules in the retinal pigment epithelium of human eye**

**Yakovleva M.A.<sup>1</sup>, Sakina N.L.<sup>1</sup>, Kolchugina I.B.<sup>2</sup>, Arbukhanova P.M.<sup>3</sup>, Borzenok S.A.<sup>3</sup>, Feldman T.B.<sup>1,2</sup>, Ostrovsky M.A.<sup>1,2</sup>**

- <sup>1</sup> N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics, Kosygina Str. 4, Moscow 119334, Russian Federation
- <sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation
- <sup>3</sup> S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Beskudnikovskij Blvd. 59a, Moscow 127486, Russian Federation

**Background.** Recently we have shown that age-related macular degeneration is associated with higher than normal levels of bisretinoid photo-oxidation and photo-degradation products. Therefore, the issue of their phototoxicity currently becomes relevant for finding ways to treat and prevent this pathology.

**Aim.** To conduct a comparative study of the photosensitizing effect of N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) and its photooxidation and photodegradation products on light-induced lipid peroxidation in photoreceptor membranes.

**Materials and methods.** Using high-performance liquid chromatography fractions of unoxidized and oxidized bisretinoids were isolated in the chloroform extract of lipofuscin granules from the retinal pigment epithelium of cadaver eyes.

**Results.** The study compared phototoxic effects of unoxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules from human retinal pigment epithelial cells on lipid peroxidation in rod outer segments.

**Conclusions.** Oxidized bisretinoids of lipofuscin granules are less phototoxic compared to their unoxidized forms.

**Key words:** eye; retinal pigment epithelium; lipofuscin granules; bisretinoids; peroxidation.

**For citation:** Yakovleva M.A., Sakina N.L., Kolchugina I.B., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Feldman T.B., Ostrovsky M.A.

[Comparative study of oxidant properties of oxidized and unoxidized bisretinoids of lipofuscin granules in the retinal pigment epithelium of human eye]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(1): 66-71. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.01.66-71.

**For correspondence:** Yakovleva Marina Andreevna, e-mail: lina.invers@gmail.com

**Funding.** This work was supported by the program of fundamental research of the Presidium of the Russian Academy of Sciences No. 42 «Basic research for biomedical technologies»

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

**Received:** 20.10.2018

## Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — это хроническая прогрессирующая патология, приводящая к поражению макулярной зоны глазного дна и потере центрального зрения [1]. Предполагается, что развитие этой патологии связано с прогрессирующим накоплением так называемого «пигмента старости» — липофусциновых гранул (ЛГ) в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) [2].

ЛГ — это сложные липидно-белковые структуры, образующиеся в результате неполной лизосомальной деградации обломков фоторецепторов в клетках РПЭ [3]. Они обладают ярко выраженной флуоресценцией, обусловленной наличием в них более чем 20 флуорофоров, представляющих собой бисретиноиды и продукты их фотоокисления и фотодеградации [4, 5]. Структура большей части флуорофоров еще точно не установлена, наиболее изученным является флуорофор — бис-ретинолиден этаноламин (A2E) [6].

Известно, что ЛГ способны генерировать активные формы кислорода (АФК) при поглощении света в видимой области спектра, особенно в его синей спектральной составляющей [7]. АФК, в свою очередь, могут инициировать процессы пероксидного окисления липидов с образованием высоко реактивных низкомолекулярных соединений, альдегидов и кетонов, повреждающих клеточные структуры. Фотосенсибилизаторами в ЛГ являются бисретиноиды и их производные [8-10], при этом сами бисретиноиды могут являться одновременно и тушителями АФК [11]. Продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов могут проявлять токсические свойства и в отсутствие света, повреждая ДНК [12]. Кроме того, эти продукты обладают и слабыми фототоксичными свойствами [10]. Остается невыясненным до конца вопрос, являются ли продукты фотоокисления и фотодеградации более фототоксичными по сравнению с неокисленными бисретиноидами.

Недавно нами было показано, что при ВМД наблюдается повышенное содержание продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [13, 14] по сравнению с нормой. Поэтому на сегодняшний день вопрос о степени фототоксичности этих про-

дуктов становится актуальным для решения проблемы поиска путей лечения и профилактики патологии ВМД.

Целью данной работы было сравнительное изучение влияния бисретиноидов и продуктов их фотоокисления и фотодеградации на процессы пероксидации липидов, вызванные видимым светом.

## Материалы и методы исследования

**Реактивы.** В работе были использованы реактивы производства «Sigma-Aldrich», «Fluka», «Компонент-реактив», пластиковые одноразовые пробирки на 1 мл и одноразовые пипетки производства «Eppendorf». Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали растворители производства «Sigma-Aldrich» и «Fluka» хроматографической чистоты.

**Материал.** Кадаверные глаза человека были получены Глазным тканевым банком ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» от доноров из танатологических отделений московского бюро судебно-медицинской экспертизы на основании действующего договора между московским бюро судебно-медицинской экспертизы и ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова», а также договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» [13]. 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 возраста 50-75 лет согласно методике, описанной в работе [7] и суспендированы в растворе 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 7,3. Бисретиноиды и их производные экстрагировали из ЛГ по методу Фолча смесью хлороформ–метанол (1 : 1) [14].

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ-анализ).** Хроматографическое разделение бисретиноидов и продуктов их фотоокисления и фото-

деградации в хлороформных экстрактах ЛГ из РПЭ проводили на хроматографе фирмы «Кнауер» (Германия) с колонкой «Диасфер 120 С18» (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 1,5 мл / мин. Продукты хроматографического разделения измеряли при помощи фотометрического детектора «Кнауер К-2501» при длине волны поглощения 430 нм. Полученные отдельные фракции упаривали до состояния пленки при помощи вакуумного насоса («Vacuubrand MZ 2CNT+AK+M+D», Германия). Полученные образцы хранили при – 80°С.

*Измерение спектров поглощения.* Абсорбционные спектры измеряли на спектрофотометре «Shimadzu UV-1601PC» (Япония).

*Синтез А2Е.* А2Е был синтезирован и очищен с использованием методов, описанных в работе [15]. Чистоту А2Е контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Кнауер» (Германия). Концентрацию А2Е определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «Shimadzu UV-1700» (Япония) при длине волны 430 нм и  $\epsilon = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Для облучения образцов А2Е (концентрация 23 мкМ) была использована лампа накаливания КГМ 24-150 мощностью 150 Вт, оптическая система слайд-проектора с тепловым фильтром. Облучение образцов осуществляли полным белым светом в видимом диапазоне (390-700 нм) с энергией облучения 0,1 – 0,12 Вт / см<sup>2</sup> при комнатной температуре и непрерывном перемешивании. Поверхностная плотность потока световой энергии, падающей на образец, составляла 100 мВт / см<sup>2</sup> для видимого света (400–700 нм). Мощность потока световой энергии была определена при помощи фотометра «Spectra-Physics» модель 407А (США).

*Получение наружных сегментов палочек сетчатки из глаз быка.* Наружные сегменты палочек (НСП) сетчатки были получены из свежих темноадаптированных (в течение шести часов после забоя животных) бычьих глаз в соответствии с модифицированным методом препаративного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [16]. Выделенные НСП хранили при –20°С. Для проведения дальнейших экспериментов НСП суспендировали в фосфатном буфере.

*Определение ТБК-активных продуктов.* Процесс перекисидации липидов индуцировали облучением видимым светом суспензии НСП в присутствии бисретиноидов и / или продуктов их фотоокисления и фотодеградаци. Бисретиноиды добавляли к НСП в виде раствора в метаноле. В контроль добавляли эквивалентное количество чистого метанола. Конечная концентрация метанола в смеси не превышала 3%. Степень фотоперекисидации липидов определяли по накоплению продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) на длине волны 532 нм [17] на спектрофотометре «Shimadzu UV-1700» (Япония). Среднюю скорость накопления ТБК-активных про-

дуктов рассчитывали путем измерения концентрации ТБК-активных продуктов, образовавшихся через 20, 40 и 60 мин после начала облучения, в трёх повторях. Облучение образцов проводили при условиях, аналогичных облучению А2Е (см. раздел Синтез А2Е).

## Результаты исследования и обсуждение

*Сравнительное изучение влияния А2Е и продуктов его фотоокисления на перекисидацию липидов НСП сетчатки из глаз быка, индуцированную видимым светом.* На рис. 1, А представлены спектры поглощения А2Е до и после воздействия света в видимой области. Как известно, облучение А2Е приводит к образованию эпоксиформ и фуранопроизводных, возникающих как за счет разрыва двойных связей в полиеновой цепи молекулы, так и за счет окисления ее гексановых колец [9, 18]. Характерное снижение интенсивности поглощения в области 350-450 нм и его нарастание в области 260-300 нм указывает на образование продуктов фотоокисления и фотодеградаци этого бисретиноида [13]. Следует отметить, что такие же продукты фотоокисления А2Е обнаружены и в экстрактах ЛГ из РПЭ глаза человека [9].

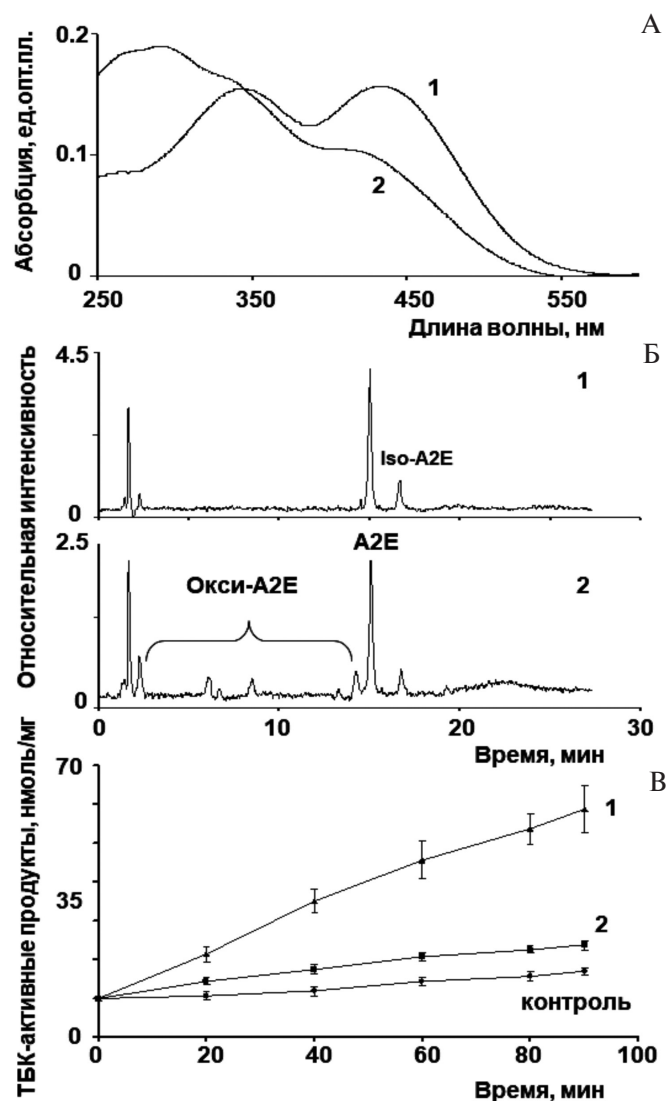
Сравнительный ВЭЖХ анализ (рис. 1, Б) необлученного и облученного А2Е также указывает на то, что воздействие света приводит к образованию продуктов его фотоокисления и фотодеградаци [13]. Это приводит к появлению новых пиков на хроматограмме 2 с меньшими временами удерживания, обусловленных более полярными продуктами по сравнению с самим А2Е (хроматограмма 1).

Для сравнительного изучения фототоксических свойств А2Е и продуктов его фотоокисления и фотодеградаци был индуцирован в их присутствии процесс фотоперекисидации липидов в НСП. Из рис. 1, В видно, что скорость и уровень накопления ТБК-активных продуктов заметно выше в случае, когда в суспензии НСП присутствовал необлученный А2Е. Другими словами, А2Е проявляет фототоксическое воздействие на фоторецепторные мембраны в большей степени по сравнению с продуктами его фотоокисления и фотодеградаци. Скорее всего, этот факт можно объяснить тем, что спектр поглощения продуктов фотоокисления и фотодеградаци А2Е сдвинут в УФ-область, соответственно, они в меньшей мере поглощают видимый свет по сравнению с самим А2Е и, следовательно, степень их фототоксического действия на липиды снижается [10].

Сравнительное изучение влияния неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул на процесс перекисидации липидов НСП, индуцированный видимым светом. Воздействие света на ЛГ приводит к фотоокислению и фотодеградаци входящих в их состав, как самого А2Е, так и других производных полностью-транс ретиналя [13]. Остается открытым вопрос, уменьшается ли степень фототоксичности продуктов фотоокисления и фотодеградаци по сравнению с неокисленными бисретиноидами в ЛГ.

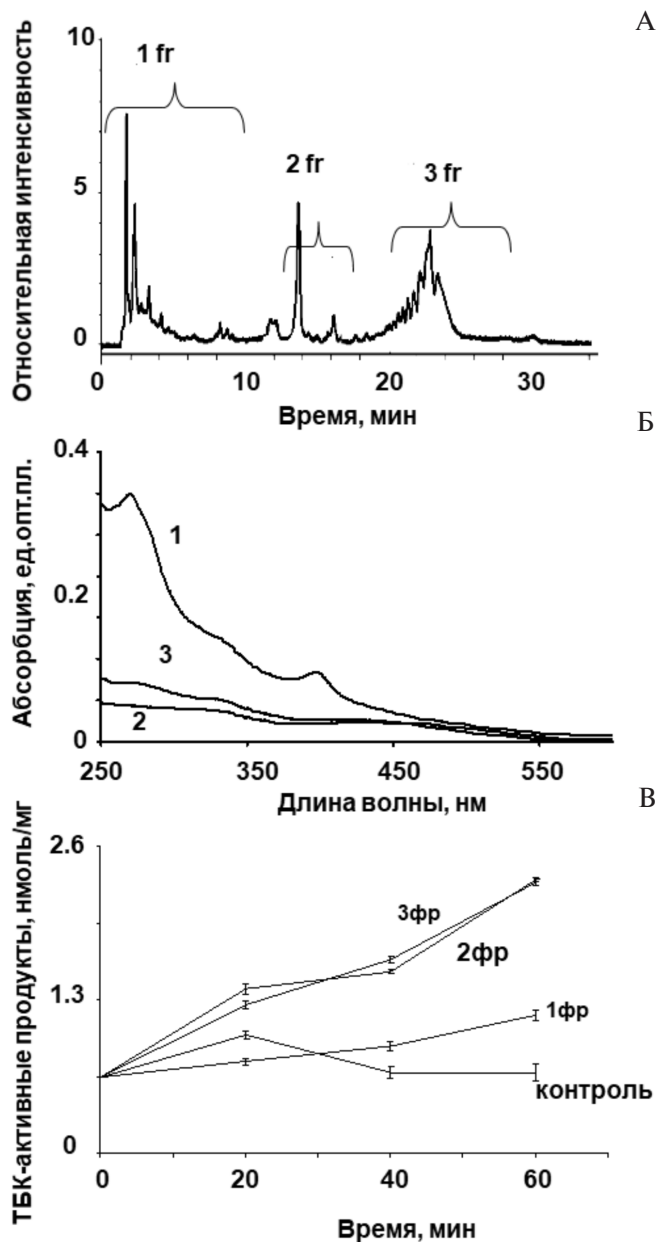
На рис. 2 представлены результаты сравнительного анализа физико-химических свойств отдель-

ных групп ретиноидов в хлороформном экстракте ЛГ из РПЭ кадаверных глаз человека. Хлороформный экстракт ЛГ был разделен хроматографически на три фракции (рис. 2, А). Фракция 1 содержала продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [13]; фракция 2 – А2Е и его изоформу [13]; фракция 3 – другие производные полностью-транс ретинала (неокисленные бисретиноиды) [19]. Спектры поглощения этих фракций, представленные на рис. 2, Б, хорошо согласуются с ранее полученными данными [13].



**Рис. 1.** Влияние облучения на физико-химические характеристики и проокислительную активность синтетического А2Е (1) и продуктов его фотоокисления и фотодеградации (2). А – спектры поглощения; Б – ВЭЖХ анализ, детектирование по поглощению на длине волны 430 нм; В – скорость накопления ТБК-активных продуктов при освещении видимым светом суспензии НСП в присутствии А2Е (1) и / или продуктов его фотоокисления и фотодеградации (2) и в отсутствие бисретиноидов и их производных (контроль); данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (по трём повторам).

Для каждой из полученных фракций было проведено исследование их влияния на пероксидацию липидов НСП, индуцированную видимым светом. Следует



**Рис. 2.** Физико-химические свойства неокисленных и окисленных бисретиноидов в хлороформном экстракте ЛГ из РПЭ **кадаверных глаз человека**. А – ВЭЖХ анализ хлороформного экстракта: фракция 1 – продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов; фракция 2 – А2Е и изо-А2Е; фракция 3 – другие производные полностью-транс ретинала (неокисленные бисретиноиды). Детектирование по поглощению на длине волны 430 нм. Б – спектры поглощения отдельных фракций, полученных при хроматографическом разделении (номера спектров соответствуют номерам фракций на хроматограмме А). В – скорость накопления ТБК-активных продуктов при освещении видимым светом суспензии НСП в присутствии отдельных фракций хлороформного экстракта, содержащих неокисленные и окисленные бисретиноиды; данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (по трём повторам).



отметить, что сравнительный эксперимент проводили при сохранении соотношения концентрации окисленных и неокисленных бисретиноидов, полученных при хроматографическом разделении хлороформного экстракта ЛГ. Из рисунка 2В видно, что наибольший уровень образования ТБК-продуктов при фотоиндуцированной пероксидации липидов НСП наблюдается в присутствии 2-й или 3-й фракций хлороформного экстракта ЛГ, содержащих А2Е и другие неокисленные бисретиноиды. Наименьший эффект на пероксидное окисление липидов НСП оказывали продукты 1-й фракции хлороформного экстракта ЛГ.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что неокисленные бисретиноиды, как и сам А2Е, в составе ЛГ обладают более выраженными фототоксичными свойствами в отношении пероксидации липидов по сравнению с продуктами их фотоокисления и фотодеградаций.

### Заключение

В данной работе было проведено сравнительное исследование фототоксичных свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов ЛГ из РПЭ глаза человека на процесс пероксидации липидов. Показано, что продукты фотоокисления и фотодеградаций бисретиноидов ЛГ менее фототоксичны по сравнению с неокисленными формами бисретиноидов. Изменение этих характеристик, скорее всего, связано с тем, что полоса поглощения этих соединений сдвигается в УФ-область по сравнению с А2Е и другими неокисленными бисретиноидами, которые активно поглощают и в видимой области спектра. Кроме того, можно предположить, что способность окисленных продуктов генерировать АФК также снижается, так как уменьшается способность акцептировать электрон за счет уменьшения в полиеновой цепи количества двойных связей [20].

Таким образом, можно предположить, что воздействие света на флуорофоры ЛГ может приводить к ослаблению их фототоксичности. Поэтому образование окисленных бисретиноидов в течение жизни человека может быть защитным механизмом, снижающим уровень фототоксичных молекул в клетках РПЭ.

### Список литературы

1. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M., Kalloniatis M. Age-related macular degeneration: linking clinical presentation to pathology. *Optom. Vis. Sci.* 2014; 91(8): 832-848. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000281
2. Kennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*. 1995; 9: 763-771.
3. 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: 416-421.
4. Eldred G.E., Katz M.L. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp. Eye Res.* 1988; 47: 71-86.
5. Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J. Phospholipid meets all-trans retinal: the making of RPE bisretinoids. *J. Lipid Res.* 2010; 51(2): 247-261. DOI: 10.1194/jlr.R000687
6. Eldred G.E., Lasky M.R. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature*. 1993; 361: 724-726.

7. Boulton M., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A., Jarvis-Evans J., Svitunenko D. Superoxide radical generation by human RPE lipofuscin: a photoinducible effect. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992; 33(4): 919.
8. Sparrow J.R., Nakanishi K., Parish C.A. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41(7): 1981-1990.
9. Dillon J., Wang Z., Avall L.B., Gaillard E.R. The photochemical oxidation of A2E results in the formation of a 5,8,5',8'-bis-furano-oxide. *Exp. Eye Res.* 2004; 79(4): 537-542. DOI: 10.1016/j.exer.2004.06.024
10. Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Островский М.А. Сравнительное исследование темновой и светоиндуцированной токсичности липофусциновых гранул из ретиального пигментного эпителия глаза человека и их хромофора А2Е на модели кардиолипидных липосом. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2012; 2: 438-444.
11. Liu Z., Ueda K., Kim H.J., Sparrow J.R. Photobleaching and Fluorescence Recovery of RPE Bisretinoids. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0138081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138081>
12. Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J., Jang Y.P., Jockusch S., Itagaki Y., Nakanishi K. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(20): 18207-18213. DOI: 10.1074/jbc.M300457200
13. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407(4): 1075-88. DOI: 10.1007/s00216-014-8353-z
14. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.S., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. 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): 1440-1448. DOI: 10.1038/s41433-018-0109-0
15. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J.R. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 1998; 95: 14609-14613.
16. Смитиенко О.А., Мозговая М.Н., Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Фельдман Т.Б., Надточено В.А., Саркисов О.М., Островский М.А. Фемтосекундная динамика образования первичных продуктов фотопревращения зрительного пигмента родопсина. *Биохимия*. 2010; 75(1): 34-45.
17. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.
18. Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockusch S., Sparrow J.R., Turro N.J., Nakanishi K. Formation of a nona-oxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002; 41: 814-817.
19. Sparrow J.R., Wu Y., Nagasaki T., Yoon K.D., Yamamoto K., Zhou J. Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010; 9(11): 1480-1489. DOI: 10.1039/c0pp00207k
20. Broniec A., Pawlak A., Sarna T., Wielgus A., Roberts J.E., Land E.T., Truscott T.G., Edge R., Navaratnam S. Spectroscopic properties and reactivity of free radical forms of A2E. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 1037-1046. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.023

### References

1. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M., Kalloniatis M. Age-related macular degeneration: linking clinical presentation to pathology. *Optom. Vis. Sci.* 2014; 91(8): 832-848. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000281
2. Kennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye*. 1995; 9: 763-771.
3. 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: 416-421.
4. Eldred G.E., Katz M.L. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp. Eye Res.* 1988; 47: 71-86.

5. Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J. Phospholipid meets all-trans retinal: the making of RPE bisretinoids. *J. Lipid Res.* 2010; 51(2): 247-261. DOI: 10.1194/jlr.R000687
6. Eldred G.E., Lasky M.R. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature.* 1993; 361: 724-726.
7. Boulton M., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A., Jarvis-Evans J., Svitunenko D. Superoxide radical generation by human RPE lipofuscin: a photoinducible effect. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992; 33(4): 919.
8. Sparrow J.R., Nakanishi K., Parish C.A. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41(7): 1981-1990.
9. Dillon J., Wang Z., Avallé L.B., Gaillard E.R. The photochemical oxidation of A2E results in the formation of a 5,8,5',8'-bis-furano-oxide. *Exp. Eye Res.* 2004; 79(4): 537-542. DOI: 10.1016/j.exer.2004.06.024
10. Dontsov A.E., Sakina N.L., Ostrovsky M.A. [A comparative study of the dark and light-induced toxicity of lipofuscin granules from the retinal pigment epithelium of a human eye and their A2E chromophore on a model of cardiolipin liposomes]. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya. [Proceedings of the Academy of Sciences. Chemical series]*. 2012; 2: 438-444.
11. Liu Z., Ueda K., Kim H.J., Sparrow J.R. Photobleaching and Fluorescence Recovery of RPE Bisretinoids. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0138081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138081>
12. Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J., Jang Y.P., Jockusch S., Itagaki Y., Nakanishi K. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(20): 18207-18213. DOI: 10.1074/jbc.M300457200
13. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407(4): 1075-88. DOI: 10.1007/s00216-014-8353-z
14. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.S., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. 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): 1440-1448. DOI: 10.1038/s41433-018-0109-0
15. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J.R. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 14609-14613.
16. Smitienko O.A., M.N. Mozgovaya, Shelaev I.V., Gostev F.E., Feldman T.B., Nadochenko V.A., Sarkisov O.M., Ostrovsky M.A. [Femtosecond dynamics of the formation of primary products of phototransformation of the visual pigment rhodopsin]. *Biokhimiya. [Biochemistry]*. 2010; 75 (1): 34-45.
17. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.
18. Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockusch S., Sparrow J.R., Turro N.J., Nakanishi K. Formation of a nona-oxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002; 41: 814-817.
19. Sparrow J.R., Wu Y., Nagasaki T., Yoon K.D., Yamamoto K., Zhou J. Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010; 9(11): 1480-1489. DOI: 10.1039/c0pp00207k
20. Broniec A., Pawlak A., Sarna T., Wielgus A., Roberts J.E., Land E.T., Truscott T.G., Edge R., Navaratnam S. Spectroscopic properties and reactivity of free radical forms of A2E. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 1037-1046. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.023

#### Сведения об авторах:

**Яковлева Марина Александровна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук

**Сакина Наталья Леонидовна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук

**Кольчугина Ирина Борисовна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры молекулярной физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Арбуханова Патимат Магомедовна** – научный сотрудник Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Борзенко Сергей Анатольевич** – доктор медицинских наук, заведующий центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Фельдман Татьяна Борисовна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; доцент кафедры молекулярной физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Островский Михаил Аркадьевич** – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; заведующий кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»