

DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2018-1-78-82>
УДК 577.344

Сравнительная оценка содержания меланина в составе меланосом и меланолипофусциновых гранул клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека

Н.Л. Сакина¹, А.Е. Донцов¹, Е.Н. Дегтярев¹, А.Л. Коварский¹, П.М. Арбуханова²,
С.А. Борзенко², М.А. Островский^{1, 2}

¹ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

² ФГБУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Изучение содержания меланина в меланосомах и меланолипофусциновых гранулах из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека.

Материал и методы. Работа была проведена на меланинсодержащих гранулах из клеток ретинального пигментного эпителия каверных глаз человека разных возрастов с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Результаты. Показано, что основные параметры спектров ЭПР обоих типов меланиновых гранул соответствуют спек-

трам ЭПР природных эумеланинов и синтетического ДОФА-меланина.

Выводы. 1. В меланолипофусциновых гранулах так же, как и в меланосомах, содержится пигмент меланин (эумеланин), о чем свидетельствует сходство их парамагнитных свойств.

2. Содержание меланина в меланосомах выше, чем в меланолипофусциновых гранулах, исходя из концентрации их парамагнитных центров при расчёте на одну гранулу, в среднем в полтора раза.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, меланин, меланосомы, меланолипофусциновые гранулы, липофусцин, электронный парамагнитный резонанс. ■

Офтальмохирургия.– 2018.– № 1.– С. 78–82.

ABSTRACT

Comparative evaluation of melanin content in melanosomes and melanolipofuscin granules from the human retinal pigment epithelium cells

N.L. Sakina¹, A.E. Dontsov¹, E.N. Degtyarev¹, A.L. Kovarsky¹, P.M. Arbukhanova², S.A. Borzenok², M.A. Ostrovsky^{1,2}

¹ The Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow;

² The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

Purpose. Comparative study of the melanin content in melanosomes and melanolipofuscin granules from cells of the retinal pigment epithelium of the human eye.

Material and methods. The research and comparison of melanosomes and melanolipofuscin granules from cells of human retinal pigment epithelium was carried out by the method of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.

Results. It was shown that the EPR spectra in both types of melanin granules, including the main parameters, were similar and corresponded to the EPR spectra characteristic of natural eumelanins and synthetic DOPA-melanin.

Conclusion. The results of study indicate that in melanolipofuscin granules as well as in melanosomes, the pigment melanin (eumelanin) is contained, as evidenced by the similarity of their paramagnetic properties. Melanin content in melanosomes is higher than in melanolipofuscin granules on average of one and a half times, which follows from the concentration of their paramagnetic centers per granule.

Key words: retinal pigment epithelium, melanin, melanosomes, melanolipofuscin granules, lipofuscin, electron paramagnetic resonance. ■

Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.– 2018.– No. 1.– P. 78–82.

Для корреспонденции:

Сакина Наталья Леонидовна, ст. науч. сотрудник, канд. биол. наук
E-mail: nsakina@mail.ru

АКТУАЛЬНОСТЬ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) глаза человека содержит три основных типа пигментных гранул: меланопротеиновые гранулы или меланосомы, липофусциновые гранулы («пигмент старости») и сложные меланолипофусциновые гранулы, образующиеся при слиянии липофусциновых гранул с меланосомами [7, 9].

Меланосомы – гранулы, в которых синтезируется меланопротеиновый биополимер, образуются в клетках РПЭ еще на стадии эмбрионального развития и выполняют свои физиологические функции в течение всей жизни организма, поскольку меланин в этих постмитотических клетках практически не обновляется [4].

Два других типа пигментных гранул – липофусциновые и меланолипофусциновые – появляются и накапливаются в клетках РПЭ с возрастом [7, 9].

Меланосомы, локализованные в теле и отростках клетки РПЭ глаза, выполняют несколько функций: экранирующую, уменьшая хроматическую абerrацию и тем самым увеличивая остроту зрения, и антиоксидантную, защищая клетку от окислительного стресса [10, 11, 13, 15]. С возрастом (как правило, после 40 лет) в клетках РПЭ происходит постепенное уменьшение концентрации меланина и количества меланосом, что было установлено еще в 80-е гг. в работах Feeney-Burns с использованием морфологических и биохимических методов [8, 16]. Если в возрастной группе до 20 лет меланосомы занимают примерно 8% объема клетки РПЭ, то в возрастной группе 41-90 лет этот объем постепенно уменьшается до 3,5% [9], а в возрастной группе 90-101 год меланосомы практически полностью заменяются смешанными меланолипофусциновыми гранулами [8].

Предполагается, что меланолипофусциновые гранулы образуются как результат слияния меланосом с липофусциновыми гранулами, что происходит в клетках РПЭ с возрастом [7]. Именно этот процесс, возможно, и ведет к уменьшению количества меланосом в клетках РПЭ, а меланиновый пигмент в возраст-

ной группе после 90 лет существует в основном только в виде меланолипофусцина [8]. Таким образом, с возрастом в клетках РПЭ количество меланосом уменьшается, а количество липофусциновых и меланолипофусциновых гранул увеличивается [7-9].

Известно, что меланиновые пигменты как в составе меланосом, так и в виде синтетического меланина дают стабильный синглетный сигнал ЭПР с высокой концентрацией спинов и g-фактором свободного электрона [2, 6]. Поэтому метод ЭПР активно используется для исследования меланинсодержащих структур и тканей [2, 6].

ЦЕЛЬ

Изучение содержания меланина в составе меланосом и меланолипофусциновых гранул, выделенных из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали реактивы производства «Sigma», «Sigma-Aldrich» и «Fluka».

Выделение меланосом и меланолипофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверного глаза человека

Кадаверные глаза доноров разных возрастов без видимых патологий были получены из Глазного тканевого банка ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Пигментные гранулы были выделены из клеток ретинального пигментного эпителия с помощью модифицированной методики, предложенной в работе [5]. Клетки РПЭ в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,4, обрабатывали ультразвуком два раза по 45 с, при 4°C и максимальном резонансе, после чего неразрушенные клеточные мембраны удаляли центрифугированием при 60g в течение 15 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 6000g в течение 15 мин, осадок ресуспендировали в 0,3 М сахарозе и центрифугирова-

ли в градиенте плотности сахарозы (2,0; 1,8; 1,6; 1,55; 1,5; 1,4; 1,2; 1,0;) при 103000g в течение 1 часа. В процессе центрифугирования происходило разделение пигментных гранул на фракции. Меланосомы образовывали темно-коричневый осадок. Между слоями с плотностью сахарозы 1,5 и 1,6 М концентрировались слой меланолипофусциновых гранул.

Осадок меланосом, слой меланолипофусциновых гранул отмывали от сахарозы К-фосфатным буфером, ресуспендировали в фосфатном буфере и хранили в морозильной камере при -20°C.

Количество гранул определяли микроскопически, используя флуоресцентный микроскоп, снабженный фотокамерой (Olympus DP22), и камеру Горяева.

Измерение сигнала ЭПР меланина

Спектры ЭПР-образцов были получены в Центре магнитной спектроскопии Института биохимической физики РАН.

Образцы меланосом и меланолипофусциновых гранул для анализа методом ЭПР готовили с помощью насадки из тефлоновой трубочки длиной 10-15 мм и внутренним диаметром 0,45 мм. На каждую пробу отбирали суспензию меланосом и меланолипофусциновых гранул объемом 0,3 мл и быстро в тефлоновой трубочке замораживали в жидком азоте (-196°C). Затем из трубочки поршнем выдавливали замороженный столбик образца. Образцы сохраняли в замороженном виде до момента измерения. Регистрацию спектров ЭПР-образцов проводили при 77°K на радиоспектрометре ЭПР «Bruker EMX» (Германия). Условия записи спектров ЭПР: ΔH развертка – 50 Гс; H центр – 3476 Гс; амплитуда модуляции – 3 Гс, постоянная времени – 100 мсек, мощность СВЧ – 20 мкВт. Эталон для определения концентрации спинов – УДА № 5, сертификат о калибровке № 905/910-2012.

Синтез ДОФА-меланина

Синтетический ДОФА-меланин был получен в ходе окислительной полимеризации диоксифенилаланина в слабощелочной среде (pH 8,2) и очищен по методике, описанной в работе [12].

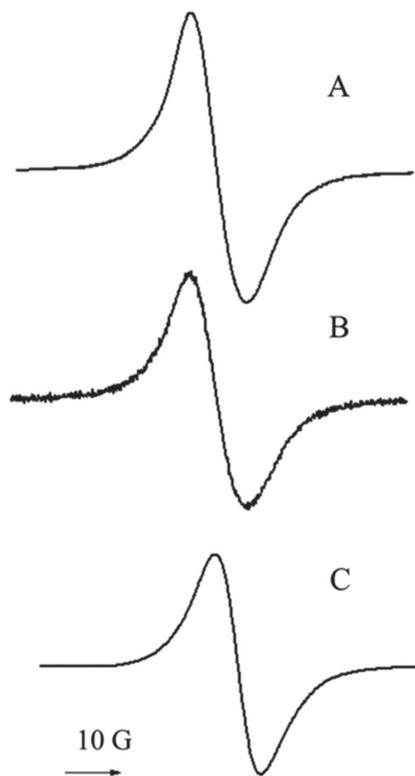


Рис. Сравнение спектров ЭПР меланосом (А), меланолипофусциновых гранул (В) из клеток РПЭ человека и синтетического ДОФА-меланина (С)

Fig. Comparison of the EPR spectra of melanosomes (A), melanolipofuscin granules (B) from human RPE cells and synthetic DOPA melanin (C)

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием t-критерия Стьюдента с доверительным интервалом 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии опытов изучались и сравнивались спектры ЭПР и параметры этих спектров для меланосом и меланолипофусциновых гранул, выделенных из клеток РПЭ кадаверных глаз человека, и синтетического ДОФА-меланина (рис., табл. 1).

На рисунке представлены спектры ЭПР меланосом (А) и меланолипофусциновых гранул (В), выделенных из клеток РПЭ доноров разных возрастов, и синтетического ДОФА-меланина (С).

Как видно из рисунка, спектры ЭПР обоих типов гранул похожи и представляют собой одиночную синглетную линию, слегка ассиметричную. Стабильный узкий сигнал с высокой концентрацией спинов характерен для природных эумеланинов и ДОФА-меланина – синтетического аналога эумеланинов [1, 3, 6, 14].

В таблице 1 сравниваются основные параметры спектров ЭПР – g-фактор и ΔН (полуширина линии) меланосом и меланолипофусциновых гранул РПЭ доноров разных возрастов и ДОФА-меланина. Как видно, значения данных параметров спектров ЭПР для обоих типов гранул и синтетического ДОФА-меланина достаточно близки и свидетельствуют об одном источнике происхождения этих спектров – меланине.

В следующей серии опытов (табл. 2) изучались и сравнивались концентрации парамагнитных центров в меланосомах и меланолипофусциновых гранул из РПЭ глаз доноров разных возрастных категорий.

Как следует из табл. 2, практически для всех РПЭ разных возрастных групп соблюдается следующая тенденция: концентрация парамагнитных центров в одной меланосоме превышает концентрацию парамагнитных центров в одной меланолипофусциновой грануле.

Из девяти исследованных возрастных групп доноров только в двух группах концентрация спинов на одну гранулу была примерно одинакова для меланосом и меланолипофусциновых гранул РПЭ.

Наблюдаемый разброс в концентрации парамагнитных центров на одну гранулу для меланосом варьирует в пределах $(0,8-3,5) \times 10^6$ спинов, а для меланолипофусциновых гранул – в пределах $(0,8-2,4) \times 10^6$ спинов. Подобный разброс, возможно, связан с индивидуальными особенностями доноров, а именно с различиями в пигментации глаз доноров [9].

В среднем, по всем изученным глазам (160 глаз, $p < 0,05$) концентрация парамагнитных центров, отнесенная на одну гранулу, составляла $(2,37 \pm 0,36) \times 10^6$ и $(1,60 \pm 0,22) \times 10^6$ для меланосом и меланолипофусциновых гранул соответственно.

Средняя величина (по всем образцам и всем возрастным категориям)

превышения концентрации меланина в меланосоме по сравнению с меланолипофусциновой гранулой (т.е. величина отношения концентрации парамагнитных центров МС/МЛФ) составляла $1,49 \pm 0,35$ ($p < 0,05$). То есть в среднем содержание меланина в меланосомах в полтора раза выше содержания меланина в меланолипофусциновых гранулах; в отдельных опытах количество меланина в меланосомах превышало количество меланина в меланолипофусциновых гранулах даже в два раза.

Падение концентрации меланина в меланолипофусциновой грануле может быть связано с его деструкцией в этой сложной грануле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Следует отметить, что изучению парамагнитных свойств меланосом РПЭ человека посвящено довольно много работ [1, 3, 14], в то время как данных по ЭПР-спектрам меланолипофусциновых гранул РПЭ в литературе практически нет.

В нашей работе получены и сравнивались спектры ЭПР меланолипофусциновых гранул из клеток РПЭ со спектрами ЭПР меланосом и синтетическим ДОФА-меланином. Обнаружено, что спектры ЭПР меланолипофусциновых гранул по своим параметрам соответствуют как спектрам ЭПР меланосом, так и синтетического ДОФА-меланина. Это позволяет говорить об одном и том же источнике происхождения парамагнитных свойств меланолипофусциновых гранул и меланосом РПЭ – меланине (эумеланине). Результат этот является достаточно ожидаемым, поскольку меланолипофусциновые гранулы, как предполагается многими авторами [7-9, 13], образуются в результате слияния липофусциновых гранул с меланосомами.

Сравнение концентрации парамагнитных центров в меланосомах и меланолипофусциновых гранулах из клеток РПЭ глаз разных возрастных групп доноров позволяет сделать вывод о том, что концентрация парамагнитных центров в одной меланосоме, как правило, превышает концентрацию парамагнитных центров в одной меланолипофусциновой грануле. В среднем это

Таблица 1

Сравнение параметров спектров ЭПР меланинсодержащих гранул РПЭ глаза человека и синтетического ДОФА-меланина

Table 1

Comparison of the parameters of the EPR spectra of melanin-containing granules from human RPE and synthetic DOPA melanin

Гранулы РПЭ человека Granules of human RPE	ΔH , Гс ΔH , G	g-фактор g-factor
меланосомы melanosomes	6,5±0,1	2,0042±0,0001
меланолипофусциновые гранулы melanolipofuscin granules	6,4±0,2	2,0040±0,0003
Синтетический ДОФА-меланин Synthetic DOPA-melanin	5,8	2,0026

Таблица 2

Сравнение количества парамагнитных центров в меланосоме (МС) и меланолипофусциновой грануле (МЛФ) РПЭ доноров разных возрастных категорий

Table 2

Comparison of the amount of paramagnetic centers in melanosome (MS) and melanolipofuscin granule (MLF) from RPE of donors in different age categories

Образец Sample	Возрастная категория (средний возраст; число глаз) Age category (mean age; amount of eyes)	Концентрация парамагнитных центров в одной грануле, спин/гранула, 10 ⁶ Concentration of paramagnetic centers in one granule, spins / granule, 10 ⁶		Отношение концентрации парамагнитных центров, [МС]/[МЛФ] Ratio in concentration of paramagnetic centers, [MS] / [MLF]
		МС гранула MS granule	МЛФ гранула MLF granule	
I	35,4±1,2 года; 18 глаз 35,4±1,2 years old; 18 eyes	3,0	2,0	1,50
	53,5±1,0 года; 21 глаз 53,5±1,0 years old; 21 eyes	2,8	2,2	1,27
	63,6±0,6 года; 19 глаз 63,6±0,6 years old; 19 eyes	3,0	2,3	1,30
II	48,4±1,4 года; 15 глаз 48,4±1,4 years old; 15 eyes	3,2	1,1	2,91
	61,7±1,2 года; 14 глаз 61,7±1,2 years old; 14 eyes	2,8	1,8	1,56
III	54±0,9 года; 16 глаз 54±0,9 years old; 16 eyes	3,5	2,4	1,46
IV	44,1±0,6 года; 28 глаз 44,1±0,6 years old; 28 eyes	1,4	0,9	1,56
	67,9±0,6 года; 16 глаз 67,9±0,6 years old; 16 eyes	0,8	0,9	0,89
	59,1±1,1 года; 13 глаз 59,1±1,1 years old; 13 eyes	0,8	0,8	1,00

превышение могло достигать 50%.

Только в двух группах из девяти исследованных возрастных групп доноров концентрация спинов на одну гранулу была примерно оди-

накова для меланосом и меланолипофусциновых гранул РПЭ.

Напомним, что меланолипофусциновые гранулы, как и липофусциновые, образуются с возрастом

в клетках РПЭ человека, вероятнее всего, при слиянии меланосом и липофусциновых гранул.

Полученные нами данные позволяют полагать, что меланолипофусци-

новые гранулы, вероятнее всего, образуются в результате слияния одной меланосомы с одной липофусциновой гранулой, так как концентрация меланина в меланолипофусциновой грануле никогда не превышала концентрации меланина в меланосоме.

Можно также предположить, что уменьшенная концентрация меланина в меланолипофусциновых гранулах по сравнению с меланосомой в клетках РПЭ человека связана с его деструкцией под действием активных форм кислорода, образующихся в ходе фотоиндуцированного восстановления кислорода флуорофорами липофусцина.

ВЫВОДЫ

1. В меланолипофусциновых гранулах так же, как и в меланосомах, содержится пигмент меланин (эумеланин), о чем свидетельствует сходство их парамагнитных свойств.

2. Содержание меланина в меланосомах выше, чем в меланолипо-

фусциновых гранулах, исходя из концентрации парамагнитных центров при расчёте на одну гранулу, в среднем в полтора раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуляев А.Б., Донцов А.Е., Ильцова В.Б., Островский М.А. Определение содержания меланина в меланосомах пигментного эпителия глаза в зависимости от возраста человека // Доклады Академии наук. – 1993. – Т. 333. – С. 257-259.
2. Островский М.А., Каюшин Л.П. Изучение электронного парамагнитного резонанса в сетчатке при действии света // Доклады Академии наук. – 1963. – Т. 151. – С. 986-988.
3. Bilinska B., Pilawa B., Zawada Z., Wylegala, E. et al. Electron spin resonance investigations of human retinal pigment epithelium melanosomes from young and old donors // Spectrochimica Acta A: Mol. Biomol. Spectroscopy – 2002. – Vol. 58. – P. 2257-2264.
4. Boulton M. Melanin and the retinal pigment epithelium // M.F. Marmor, T.J. Wolfensberger. The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease – NewYork: Oxford University Press, 1998. – P. 65-85.
5. Boulton M., Marshall J. Re-pigmentation of human retinal pigment epithelial cell in vitro // Exp. Eye Res. – 1985. – Vol. 41. – P. 209-218.
6. Enochs W.S., Nilges M.J., Swartz H.M. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy // Pigment Cell Res. – 1993. – Vol. 6. – P. 91-99.
7. Feeney-Burns L. The pigments of the retinal pigment epithelium // Curr. Top. Eye Res. – 1980. – Vol. 2. – P. 119-178.

8. Feeney-Burns L., Burn R.P., Gao C.L. Age-related macular changes in humans over 90 years old // Am. J. Ophthalmol. – 1990. – Vol. 109. – P. 265-278.

9. Feeney-Burns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1984. – Vol. 25. – P. 195-200.

10. Kollians N., Sayre R.M., Zeise L., Chedekel M.R. Photoprotection by melanin // J. Photochem. Photobiol. – 1991. – Vol. 9. – P. 135-160.

11. Ostrovsky M.A., Sakina N.L., Dontsov A.E. An antioxidative role of ocular screening pigments // Vision Res. – 1987. – Vol. 27. – P. 893-899.

12. Porebska-Budny M., Sakina N., Stepien K., Dontsov A. et al. Antioxidative activity of synthetic melanins. Cardiolipin liposome model // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 1116. – P. 11-16.

13. Rozanowska M., Sarna T., Land E.J., Truscott T.G. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidizing radicals // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – Vol. 24. – P. 518-525.

14. Sarna T., Burke J.M., Korytowski W., Rozanowska M. et al. Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation // Exp. Eye Res. – 2003. – Vol. 78. – P. 89-98.

15. Wang Z., Dillon J., Gaillard E.R. Antioxidant properties of melanin in RPE cell // Photochem. Photobiol. – 2006. – Vol. 82. – P. 474-479.

16. Weiter J.J., Delori F.C., Wing G.L., Fitch K.A. Retinal pigment epithelium lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1986. – Vol. 27. – P. 145-152.

Поступила 12.10.2017

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-03831).

КНИГИ



Сомов Е.Е.

КЛИНИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ ОРГАНА ЗРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Клиническая анатомия органа зрения человека / Е.Е. Сомов. – 4-е изд. – М.: МЕДпресс-информ. 2016. – 136 с.: ил. ISBN 978-5-00030-366-5

В книге последовательно изложены современные сведения, касающиеся анатомического строения зрительного анализатора человека в их взаимосвязи с клинической нормой и патологией. Внесены, в соответствии с принятой и ныне действующей Международной анатомической номенклатурой, необходимые коррективы в специальную терминологию.

Рекомендовано Департаментом образовательных медицинских учреждений и кадровой политики Министерства здравоохранения Российской Федерации в качестве учебного пособия для студентов, врачей-интернов и клинических ординаторов медицинских вузов.

УДК 611:617.7 (075.5)

ББК 28.91

Адрес издательства «Офтальмология»: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а.
Тел.: 8 (499) 488-89-25. Факс: 8 (499) 488-84-09.
E-mail: publish_mntk@mail.ru