

<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-2-55-61>



Моделирование ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке путем локального введения дофаминергического нейротоксина

Т.А. Павленко[✉], Н.Б. Чеснокова, О.В. Безнос, А.В. Григорьев, Т.Д. Охочимская, Н.Н. Шикарева

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, 105062, Россия

Цель работы — разработать модель ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке путем интравитреального введения дофаминергического нейротоксина. **Материал и методы.** Эксперимент проведен на 20 кроликах. В опытных группах в оба глаза интравитреально вводили по 100 мкл раствора 6-гидроксидофамина (6-OHDA) в NaCl 0,9 % с 0,5 % аскорбиновой кислотой, содержащего 0,25 мг или 0,5 мг 6-OHDA. Контрольная группа получала интравитреальные инъекции контрольного раствора без нейротоксина. На 7-е и 14-е сутки после введения нейротоксина определяли внутриглазное давление (ВГД), реакцию зрачка на свет, глазной кровоток, оценивали состояние глазного дна. В гомогенате сетчатки на 7-е сутки после введения 0,25 мг 6-OHDA методом ИФА определяли содержание дофамина и на 14-е сутки после введения 0,5 мг 6-OHDA — содержание дофамина, норадреналина, фактора некроза опухоли (TNF- α), эндотелина-1. **Результаты.** После введения 0,25 мг нейротоксина на 7-е сутки в сетчатке выявлено снижение уровня дофамина ($0,043 \pm 0,130$ нг/мг, в контроле $0,10 \pm 0,03$ нг/мг, $p < 0,01$), а через 2 нед увеличение в 4 раза содержания дофамина ($p < 0,05$) и норадреналина ($p < 0,01$) по сравнению с группой контроля. При дозе 0,5 мг содержание дофамина по сравнению с контролем увеличивалось в 3 раза ($p < 0,05$), а норадреналина — в 5 раз ($p < 0,01$). Содержание эндотелина-1 по отношению к контролю увеличивалось на 14-е сутки после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг на 65 % ($p < 0,01$), а в дозе 0,5 мг — на 45 % ($p < 0,05$). Содержание TNF- α в сетчатке на 14-е сутки после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг увеличивалось на 43 % ($p < 0,05$), а в дозе 0,5 мг — на 20 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. После введения нейротоксина наблюдалось дозозависимое изменение уровня ВГД, нарушение реакции зрачка на свет, снижение глазного кровотока. **Заключение.** Однократно интравитреально введенный дофаминергический нейротоксин 6-OHDA в дозе 0,25 и 0,5 мг вызывает в глазу нейровоспаление и нейроваскулярные нарушения, являющиеся ключевыми звеньями нейродегенеративного процесса. Для моделирования его ранней стадии предпочтительно введение 6-OHDA в дозе 0,25 мг в связи с более легким характером функциональных изменений. Такая модель может быть использована для изучения патогенеза нейродегенеративных процессов в глазу, поиска их ранних прогностических маркеров и оценки эффективности медикаментозных воздействий.

Ключевые слова: нейродегенеративный процесс; сетчатка; катехоламины; эндотелин-1; TNF- α ; нейровоспаление; нейроваскулярные нарушения; внутриглазное давление; реакция зрачка на свет

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Павленко Т.А., Чеснокова Н.Б., Безнос О.В., Григорьев А.В., Охочимская Т.Д., Шикарева Н.Н. Моделирование ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке путем локального введения дофаминергического нейротоксина. Российский офтальмологический журнал. 2024; 17 (2):55-61. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-2-55-61>

Modelling of the early stage of retinal neurodegeneration via a topical injection of dopaminergic neurotoxin

Tatiana A. Pavlenko[✉], Natalya B. Chesnokova, Olga V. Beznos, Andrey V. Grigoryev,
Tatiana D. Okhotsimskaya, Natalia N. Shikareva

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogriazskaya St., Moscow, 105062, Russia
tanya1975_inbox.ru

Purpose: to develop a model of the early stage of retinal neurodegeneration via an intravitreal injection of the dopaminergic neurotoxin. **Material and methods.** The experiment was carried out on 20 Chinchilla rabbits. The experimental groups received intravitreal injection of 0.1 ml of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in NaCl 0.9 % with 0.5 % ascorbate, containing 0.25 or 0.5 mg 6-OHDA. The control group received injections of 0.1 ml of NaCl-ascorbate solution without neurotoxin. On the 7th and the 14th days after the injection, intraocular pressure (IOP), pupillary light reaction and ocular blood flow were estimated and the fundus was examined. On the 7th day after an injection of 0.25 mg 6-OHDA, we used ELISA to measure dopamine concentration in retinal homogenates, while on the 14th day after an injection of 0.5 mg 6-OHDA, the concentrations of dopamine, norepinephrine, TNF- α and endothelin-1 were measured by the same method. **Results.** On the 7th day after a 0.25 mg injection of neurotoxin, we revealed a decrease of dopamine in the retina (0.043 ± 0.130 pg/mg protein compared with 0.10 ± 0.03 pg/mg protein in the controls, $p < 0.01$). On the 14th day, dopamine and norepinephrine levels showed a fourfold increase ($p < 0.05$). An injection of 0.5 mg of 6-OHDA caused a threefold increase of dopamine ($p < 0.05$) and a fivefold increase of norepinephrine ($p < 0.01$) concentration in comparison with the controls. On the 14th day, endothelin-1 level was 65 % higher than in the controls after a 0.25 mg 6-OHDA injection ($p < 0.01$) and 45 % higher after a 0.5 mg injection ($p < 0.05$). At the same time, TNF- α levels increased by 43 % ($p < 0.05$) and 20 % ($p < 0.05$) respectively. We also revealed a dose-dependent change of IOP, a disturbance of pupillary light reaction and decreased ocular blood flow after an injection of neurotoxin. **Conclusion.** A single intravitreal injection of dopaminergic neurotoxin 6-OHDA in the amount of 0.25 or 0.5 mg per eye leads to a neuroinflammation and vascular disorders, which are the main pathogenetic pathways of neurodegeneration. To model its early phase, the 0.25 mg dose is preferable as it causes less dramatic functional disorders. The latter model can be useful for the investigation of retinal neurodegeneration pathogenesis, the search for early diagnostic and prognostic markers thereof and the estimation of therapy effectiveness.

Keywords: neurodegenerative process; retina; catecholamines; endothelin-1; TNF- α ; neuroinflammation; neurovascular disorders; intraocular pressure; pupillary light reaction

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Beznos O.V., Grigoryev A.V., Okhotsimskaya T.D., Shikareva N.N. Modelling of the early stage of retinal neurodegeneration via a topical injection of dopaminergic neurotoxin. Russian ophthalmological journal. 2024; 17 (2): 55-61 (In Russ.).<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2024-17-2-55-61>

Нейродегенеративные процессы в сетчатке являются причиной необратимого снижения зрения при таких распространенных и социально значимых заболеваниях, как возрастная макулярная дегенерация, глаукома, диабетическая ретинопатия и др. [1, 2]. В основе дегенерации нервных клеток головного мозга и сетчатки лежат общие механизмы: стресс эндоплазматического ретикулума, митохондриальная дисфункция, образование неправильно свернутых белков и их конгломератов, нейровоспаление и др. Клинические проявления нейродегенерации обнаруживаются на стадии далеко зашедшего процесса необратимой гибели нервных клеток, и сами заболевания, несмотря на имеющиеся достижения, очень трудно поддаются лечению [3]. Поэтому проблема раннего выявления и разработка методов терапии нейродегенеративных процессов в глазу являются весьма актуальными. Моделирование начальной стадии нейродегенеративного процесса необходимо для изучения молекулярных механизмов его развития, разработки патогенетически обоснованных методов лечения, поиска биомаркеров для ранней диагностики.

Дегенеративный процесс в сетчатке моделируют с помощью химических агентов, путем механического воздействия, воспроизведения аутоиммунного или ишемического процесса [4]. Применение химических соединений — нейротоксинов, вызывающих селективную дегенерацию дофаминергических нейронов, относят к так называемой химической симпатэктомии и используют для моделирования заболеваний, связанных с дефицитом дофамина. Для этих целей в основном применяют дофаминергические нейротоксины 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) и 6-гидроксидофамин (6-OHDA), которые способствуют окислительному стрессу и вызывают митохондриальную дисфункцию, в то время как их сродство к транспортеру дофамина гарантирует, что они достигают токсичных внутриклеточных концентраций исключительно в дофаминергических нейронах [5]. При интравитреальном введении 6-OHDA можно целенаправленно воздействовать на дофаминергические нейроны в сетчатке [6]. Дофаминергическая система широко представлена в глазу, дофаминовые рецепторы присутствуют в структурах глаза,

отвечающих за регуляцию внутриглазного давления (ВГД), реакцию зрачка на свет, передачу зрительного сигнала в сетчатке. Из дофамина синтезируются основные нейротрансмиттеры симпатической нервной системы — норадреналин и адреналин, и поэтому дофамин играет большую роль в контроле функции симпатической нервной системы [7]. В отличие от активно применяемого для моделирования болезни Паркинсона нейротоксина МРТР, проникающего через гистогематические барьеры и поэтому быстро выводящегося из глаза, нейротоксин 6-ОНДА не проходит через эти барьеры, что позволяет путем интравитреального введения создавать необходимую концентрацию внутри глаза и избегать системного воздействия [8, 9]. 6-ОНДА является гидроксированным аналогом дофамина, который захватывается транспортером дофамина, что позволяет ему поступать в катехоламинергические нейроны, где он оказывает нейротоксическое действие. Предполагаются три основных механизма нейротоксического действия 6-ОНДА: 1) внутриклеточное или внеклеточное самоокисление 6-ОНДА способствует образованию перекиси водорода и супероксидных и гидроксильных радикалов, 2) образование перекиси водорода под действием моноаминоксидазы и 3) прямое ингибирование комплекса I в митохондриальной дыхательной цепи. Генерируемый 6-ОНДА окислительный стресс в нервных клетках приводит к нейровоспалению и гибели этих клеток путем апоптоза [9, 10]. 6-ОНДА широко используется для моделирования нейродегенеративных процессов как у животных, так и в клеточных культурах. Однако работы, посвященные моделированию с помощью этого нейротоксина локального нейродегенеративного и нейровоспалительного процесса в глазу, очень немногочисленны. В основном эти работы выполнены на различных видах рыб и грызунов и лишь единичные на кроликах [11]. Поскольку в наши задачи входит изучение различных биохимических процессов в глазу на начальной стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке, нами для моделирования были выбраны кролики, большой глаз которых делает более доступным проведение этих исследований.

ЦЕЛЬ работы — разработать модель ранней стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке путем интравитреального введения дофаминергического нейротоксина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 20 кроликах породы шиншилла, самцы, весом 2,0–2,5 кг. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации» (2016).

Готовили раствор 6-ОНДА (Sigma-Aldrich, USA) в NaCl 0,9 %, содержащий аскорбиновую кислоту в концентрации 0,5 %. Двум опытным группам в оба глаза интравитреально вводили по 100 мкл раствора, содержащего 0,25 мг (4 кролика, 8 глаз) или 0,5 мг (4 кролика, 8 глаз) 6-ОНДА. Контрольная группа (4 кролика, 8 глаз) получала по 100 мкл в оба глаза интравитреальные инъекции контрольного раствора NaCl 0,9 %, содержащего аскорбиновую кислоту в концентрации 0,5 %, без нейротоксина. Для определения содержания дофамина в сетчатке на 7-е сутки после введения 6-ОНДА в дозе 0,25 мг были отдельно сформированы опытная (4 кролика, 8 глаз) и контрольная (4 кролика, 8 глаз) группы.

Сетчатку, полученную после эктаназии животных и последующей энуклеации глаза, гомогенизировали в NaCl 0,9 % с помощью ультразвукового ручного гомогенизатора (UP50H, Hielscher, Germany), гомогенат центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин для отделения нерастворимых

компонентов, измерения проводили в надосадочной жидкости. В гомогенате сетчатки на 14-е сутки определяли содержание дофамина, норадреналина, фактора некроза опухоли (TNF- α), эндотелина-1 методом ИФА (Cloud-Clone Corp., США) в расчете на содержание общего белка (по Lowry). Измерения проводили на фотометре Synergy MX (BioTek, США).

ВГД измеряли с помощью автоматического тонометра (Tonovet, Финляндия) до и после введения нейротоксина на 7-й и 14-й день. За состоянием сетчатки наблюдали с помощью цифровой фундус-камеры (Aurora Optomed, Финляндия).

Для выявления нарушений зрачкового рефлекса проводили измерение прямой реакции зрачка на свет. Исследование проводили в темной комнате, направляя световой источник на 3 с непосредственно на исследуемый глаз. Реакцию зрачка на световое воздействие оценивали в условных единицах (у. е.). Зрачковый дефект ранжировали по шкале от 1 до 4 у. е., где «1» означает легкий (замедленная реакция на свет, около 1 с), «2» — умеренный (замедленная реакция на свет, больше 1 с), «3» — среднетяжелый (реакция на свет отсутствует, но зрачок правильной формы), «4» — тяжелый дефект (полное отсутствие реакции, изменение формы зрачка).

Оценку интенсивности глазного кровотока проводили до и после введения 6-ОНДА на 7-й и 12-й день с помощью «Офтальмоплетизмографа ОП-А», СКТБ «Оптимед» (Москва). Метод офтальмоплетизмографии основан на регистрации пульсовых колебаний объема глазного яблока в течение сердечного цикла, возникающих как следствие пульсации внутриглазных сосудов. Оценивали минутный объем кровотока (МОК) в мм³ — это суммарная величина объема крови, протекающего во время сердечного цикла через систему увеальных и ретинальных сосудов за 1 мин. Расчет проводили по формуле $МОК = ПО * Ps$, где ПО — это пульсовый объем (систолический прирост пульсового объема переднего сегмента в пересчете на площадь всего глазного яблока), Ps — частота пульса. За 1 ч до измерений животные получали внутримышечно ветранквил 1 % в расчете 0,09 мл на 1 кг веса (Ceva Sante Animal, Франция).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Excel и Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биохимические исследования. Для подтверждения известных данных о том, что после интравитреального введения 6-ОНДА в дозах от 0,3 до 1,2 мг через неделю снижается содержание дофамина в сетчатке [12], мы провели исследование содержания дофамина в сетчатке в опытной группе на 7-е сутки после введения нейротоксина 6-ОНДА в дозе 0,25 мг. В результате в сетчатке опытной группы содержание дофамина ($0,043 \pm 0,130$ пг/мг, $p < 0,01$) оказалось более чем в 2 раза ниже, чем в контрольной группе ($0,10 \pm 0,03$ пг/мл).

Далее проведено исследование биохимических показателей в сетчатке через 2 нед после введения в опытных группах разных доз нейротоксина. При введении 6-ОНДА в дозе 0,25 мг выявлено четырехкратное увеличение относительно контроля содержания дофамина ($p < 0,03$) и норадреналина ($p < 0,001$). После введения 6-ОНДА в дозе 0,5 мг содержание дофамина увеличилось в 3 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$), а норадреналин — в 5 раз ($p < 0,001$) (рис. 1).

Содержание эндотелина-1 в сетчатке увеличивалось в обеих опытных группах на 14-е сутки после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг в среднем на 65 % ($p < 0,01$), а в дозе 0,5 мг — на 45 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 2, А).

Обнаружен более высокий уровень $\text{TNF-}\alpha$ в сетчатке опытных кроликов на 14-е сутки после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг в среднем на 43 % ($p < 0,03$), а после введения нейротоксина в дозе 0,5 мг — на 20 % ($p < 0,04$) по сравнению с контролем (рис. 2, Б).

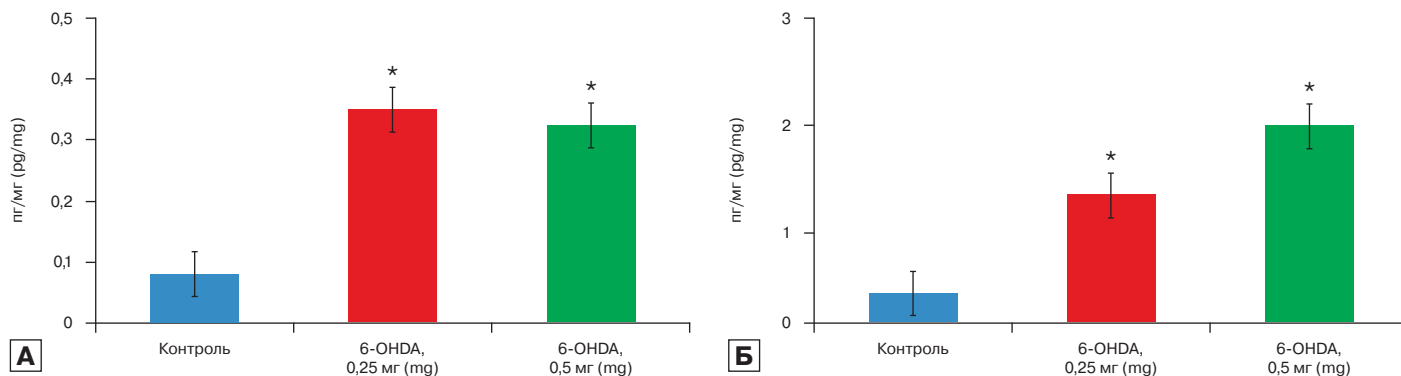


Рис. 1. Содержание дофамина (А) и норадреналина (Б) в сетчатке кроликов на 14-е сутки после интравитреального введения нейротоксина 6-OHDA в дозах 0,25, 0,5 мг и контрольного раствора (контроль). * — $p < 0,05$, достоверно по сравнению с группой контроля. Здесь и на рисунках 2–4: данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение

Fig. 1. Concentration of dopamine (A) and norepinephrine (B) in retinas of rabbits on day 14 after intravitreal injection of 0.25 or 0.5 mg of 6-OHDA and placebo. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Here and in the figure 2: Blue bars — placebo group, red bars — injection of 0.25 mg of 6-OHDA, green bars — injection of 0.5 mg of 6-OHDA. * — $p < 0.05$ significant as compared to placebo group

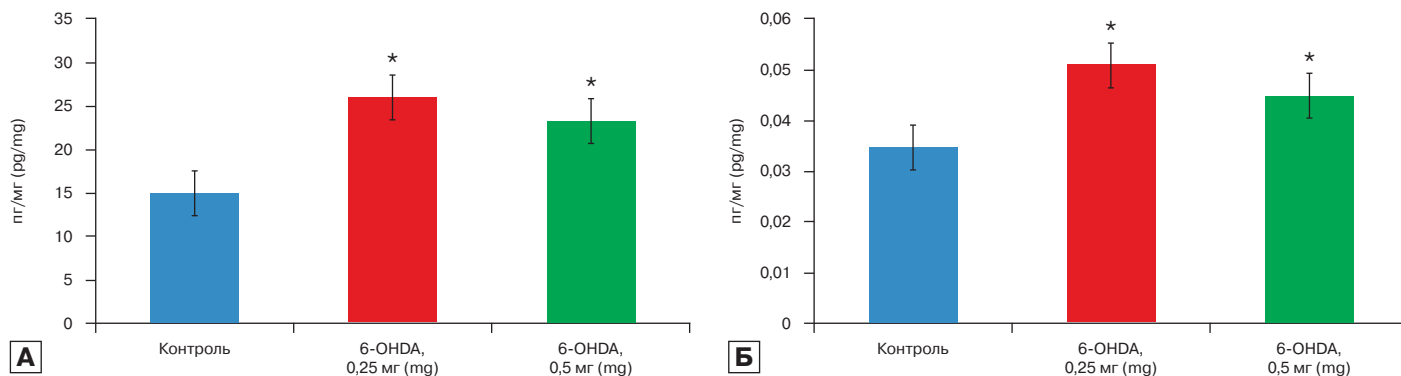


Рис. 2. Содержание эндотелина-1 (А) и $\text{TNF-}\alpha$ (Б) в сетчатке кроликов на 14-е сутки после интравитреального введения нейротоксина 6-OHDA в дозе 0,25 и 0,5 мг и контрольного раствора (контроль). * — $p < 0,05$, достоверно по сравнению с группой контроля

Fig. 2. Concentration of endothelin-1 (A) and $\text{TNF-}\alpha$ (B) in retinas of rabbits on day 14 after intravitreal injection of 0.25 or 0.5 mg of 6-OHDA and placebo. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM

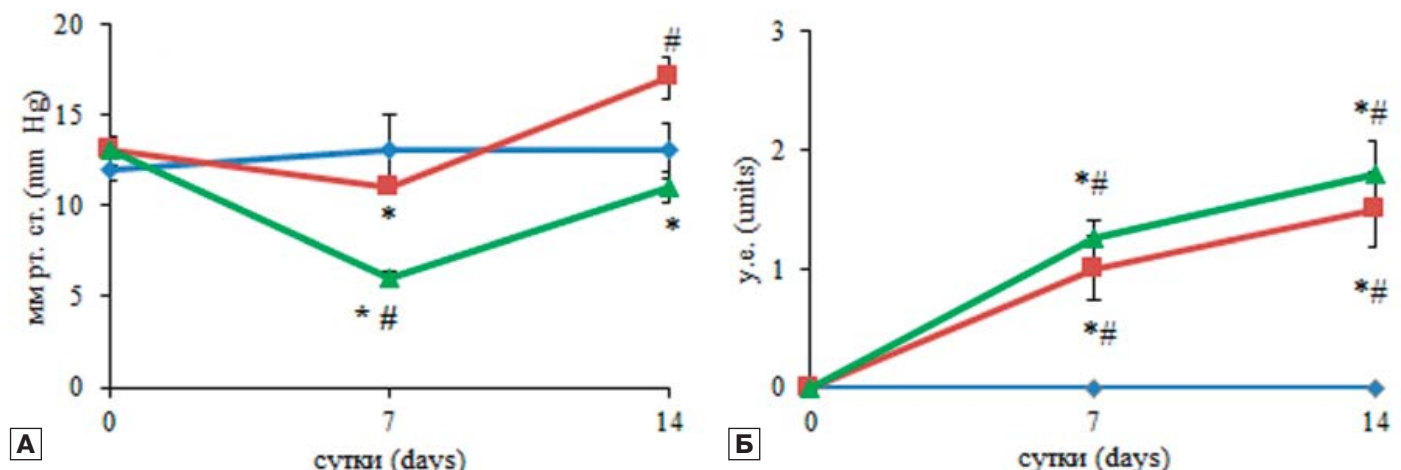


Рис. 3. Изменение ВГД (А) и прямой реакции зрачка на свет (Б) у кроликов на 7-е и 14-е сутки после интравитреального введения 6-OHDA в дозах 0,25 (красная линия), 0,5 мг (зеленая линия) и контрольного раствора (синяя линия). * — $p < 0,05$, достоверно по сравнению с группой контроля, # — $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

Fig. 3. Changes of intraocular pressure (A) and of the pupillary light reaction (B) in rabbits on day 7 and 14 after intravitreal injection of 0.25 or 0.5 mg of 6-OHDA and placebo. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Blue line — placebo group, red line — injection of 0.25 mg of 6-OHDA, green line — injection of 0.5 mg of 6-OHDA. * — $p < 0.05$ significant as compared to placebo group, # — $p < 0.05$ as compared to the initial level

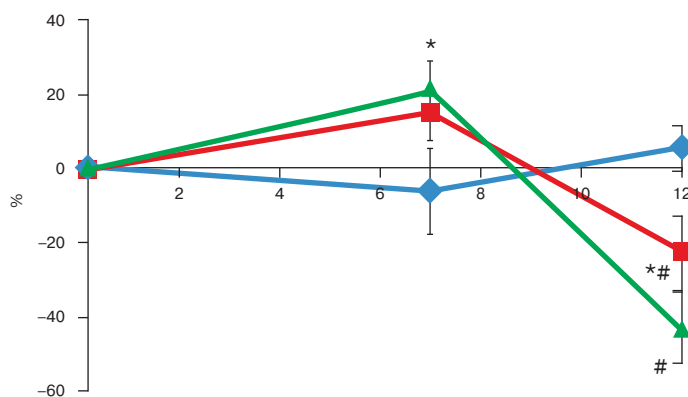


Рис. 4. Изменение минутного объема кровотока (% от исходного уровня) у кроликов на 7-е и 12-е сутки после интравитреального введения 6-OHDA в дозах 0,25 (красная линия), 0,5 мг (зеленая линия) и контрольной сыворотки (синяя линия). * — $p < 0,05$, достоверно по сравнению с группой контроля, # — $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

Fig. 4. Changes of minute ocular blood flow (% from the initial level) in rabbits on day 7 and 12 after intravitreal injection of 0.25 or 0.5 mg of 6-OHDA and placebo. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Blue line — placebo group, red line — injection of 0.25 mg of 6-OHDA, green line — injection of 0.5 mg of 6-OHDA. * — $p < 0.05$ significant as compared to placebo group, # — $p < 0.05$ as compared to the initial level

Функциональные исследования. После введения контрольного раствора наблюдалась тенденция к повышению ВГД на 1–2 мм рт. ст. в течение всего периода наблюдения. Через 7 дней после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг наблюдалось снижение ВГД в среднем на 2–3 мм рт. ст. ($p < 0,05$ относительно контроля). Доза 0,5 мг вызывала достоверно большее снижение ВГД — на 6–7 мм рт. ст. ($p < 0,001$ по сравнению с исходным уровнем и $p < 0,0000002$ относительно контроля). На 14-й день после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг отмечался подъем ВГД, которое было достоверно выше исходного уровня в среднем на 4–5 мм рт. ст. ($p < 0,0007$). После введения нейротоксина в дозе 0,5 мг ВГД повышалось ($p < 0,02$ относительно контроля), но еще не достигало исходного уровня (рис. 3, А).

После введения 6-OHDA у кроликов выявлено нарушение прямой реакции зрачка на свет. В группе введения нейротоксина в дозе 0,25 мг на 7-е и 14-е сутки нарушение зрачкового рефлекса выявлено в 75 % глаз и в среднем составляло 1–2 у. е. (на 7-е сутки $p < 0,02$ и 14-е сутки $p < 0,004$ относительно контроля и исходных значений). После введения нейротоксина в дозе 0,5 мг на 7-е сутки нарушение зрачкового рефлекса, составлявшее в среднем 1–2 у. е. ($p < 0,0008$ относительно контроля и исходных значений), выявлено в 100 % глаз ($p < 0,007$), к 14-м суткам — в 87 % глаз. На протяжении всего периода наблюдения во всех опытных группах изменения формы зрачков не обнаружено (рис. 3, Б).

Данные офтальмоплетизмографии не выявили изменений уровня МОК у контрольных животных. На 7-е сутки после введения нейротоксина в дозе 0,25 мг обнаруживалась тенденция к повышению МОК, а в дозе 0,5 мг — небольшое, но статистически значимое усиление кровотока ($p < 0,004$ относительно контроля). Однако через 12 дней наблюдались признаки ишемии — снижение уровня МОК в обеих опытных группах, причем снижение интенсивности кровотока в сосудах глаза зависело от дозы нейротоксина. После введения 6-OHDA в дозе 0,25 мг МОК снижался в среднем на 24 % ($p < 0,04$ относительно исходных значений и $p < 0,03$ относительно контроля), а после введения 6-OHDA в дозе 0,5 мг — в среднем на 45 % ($p < 0,05$ относительно исходных значений) (рис. 4).

Исследование глазного дна. В опытных группах после введения нейротоксина 6-OHDA в дозах 0,25 и 0,5 мг

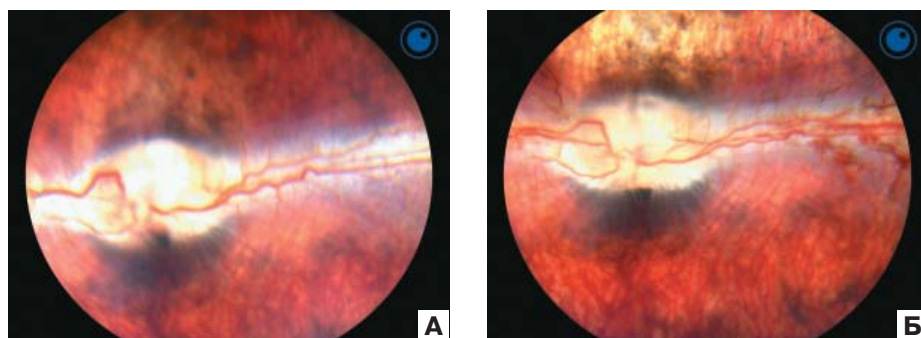


Рис. 5. Глазное дно кролика в норме до введения нейротоксина (А), после интравитреального введения 6-OHDA в дозе 0,25 мг на 14-е сутки (Б). Центральная зона с участком атрофии сверху и геморрагиями ретинальных сосудов справа

Fig. 5. Rabbit fundus normal (A), on the 14 day after intravitreal injection of 0.25 mg of 6-OHDA (B). Central zone with atrophy (above) and haemorrhages (right)

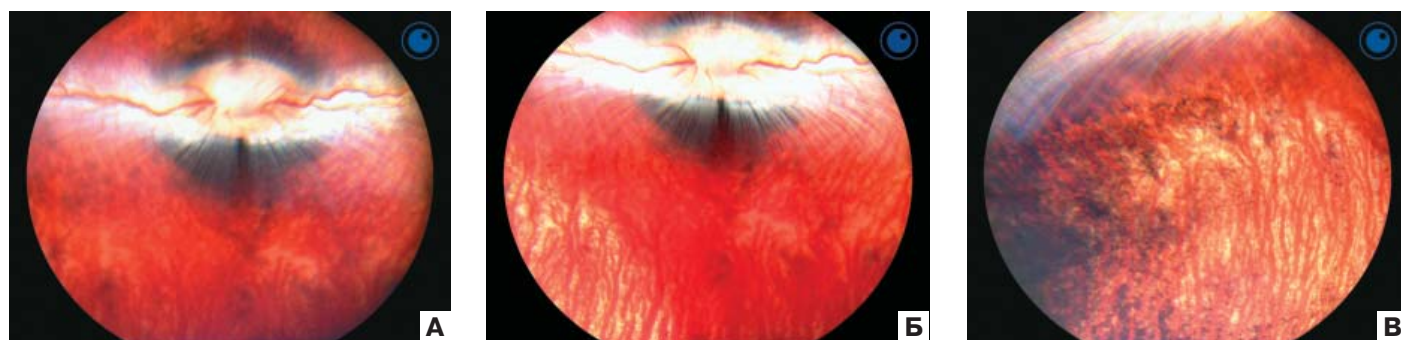


Рис. 6. Глазное дно кролика в норме до введения нейротоксина (А), после интравитреального введения 6-OHDA в дозе 0,5 мг на 14-е сутки, с участком атрофии слева (Б). В — периферическая зона с большим участком атрофии внизу

Fig. 6. Rabbit fundus normal (A), on the 14 day after intravitreal injection of 0.5 mg of 6-OHDA (B) (atrophy zone). B — peripheral area with a vast atrophy zone

на 14-е сутки у всех кроликов выявлены изменения на глазном дне — дезорганизация пигментного эпителия сетчатки, сужение и изменение рисунка ретинальных сосудов, единичные кровоизлияния (рис. 5, 6).

Отмечалось также обеднение рисунка хориоидальных сосудов, особенно выраженное при использовании нейротоксина в дозе 0,5 мг (см. рис. 5). В группе контроля после интравитреального введения контрольного раствора патологических изменений глазного дна не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при моделировании нейродегенерации сетчатки у кроликов путем интравитреального введения 6-ОНДА производимый эффект в значительной степени зависит от введенной дозы нейротоксина [12–14]. Для создания адекватной модели начальной стадии нейродегенеративного процесса в сетчатке с помощью интравитреального введения 6-ОНДА мы подобрали дозу нейротоксина, при которой проявились изменения, характерные для нарушения функционирования катехоламинергической регуляции, а также изменение содержания нейровоспалительных и нейроваскулярных факторов в глазу.

Выявленное снижение содержания дофамина в сетчатке через неделю после введения нейротоксина указывает на нейродегенеративный процесс, который сопровождается гибелью дофаминергических клеток, развивающийся после применения меньшей дозы 6-ОНДА 0,25 мг, что было ранее продемонстрировано другими авторами, применявшими нейротоксин в дозе 0,3 мг [12]. В работе P. Olivier и соавт. [12] показано, что через неделю после введения минимальной дозы 6-ОНДА — 0,06 мг — изменений амплитуды b-волны электроретинограммы (ЭРГ) или концентраций дофамина и его основных метаболитов в сетчатке не происходило, а при максимальной дозе 1,2 мг наблюдалось полное угасание ЭРГ и отсутствие дофамина и его метаболитов в сетчатке. При промежуточной дозе 0,3 мг 6-ОНДА выявлено значительное увеличение амплитуды b-волны и снижение концентрации дофамина и его метаболитов в сетчатке. Однако авторы работы вводили в стекловидное тело препарат в большом объеме — 0,3 мл, что может вызвать значительные изменения гидро- и гемодинамики глаза, а также метаболических процессов только за счет механического воздействия [12]. С другой стороны, мы показали, что не только доза нейротоксина, но и длительность процесса после его введения также влияет на биохимические и физиологические изменения в глазу. Выявленное через 2 нед повышение содержания катехоламинов в сетчатке под действием разных доз 6-ОНДА свидетельствует о компенсаторном эффекте в ответ на нейротоксическое воздействие. Известно, что через месяц после гибели дофаминергических и адренергических ретинальных клеток, вызванной 6-ОНДА, повышается скорость их пролиферации и растет уровень катехоламинов в неповрежденных участках сетчатки [15]. При этом повышение содержания катехоламинов в сетчатке может оказывать дополнительный нейротоксический эффект и чрезмерно стимулировать адренорецепторы, способствуя нейроваскулярным нарушениям, приводя к ишемии и гипоксии в сетчатке [16, 17]. Выявленное нами повышение содержания эндотелина-1 в сетчатке также указывает на повреждение ретинальных сосудов у опытных животных. Известно, что увеличение уровня эндотелина-1 является маркером дисфункции эндотелия, способствует вазоконстрикции, следовательно, ишемии и гипоксии, также

доказано повреждающее действие эндотелина на ганглионарные клетки сетчатки и нейроглию [18]. Сосудистые изменения могут усугублять имеющийся нейродегенеративный процесс, однако могут выявляться и до начала потери нейронов и в целом рассматриваются как признаки нейроваскулярного воспаления [19]. На ретинальный нейровоспалительный процесс указывает выявленный нами повышенный уровень TNF- α в сетчатке после введения нейротоксина, что также может указывать на активацию локальной нейроглии [20]. При нейродегенеративных процессах в сетчатке активируется микроглия, которая сопровождается высвобождением цитокинов, в том числе TNF- α , и хемокинов, что способствует прогрессированию апоптоза фоторецепторов [21].

После введения нейротоксина в разных дозах мы наблюдали нарушения физиологических процессов в глазу: изменения уровня ВГД, реакции зрачка на свет и глазного кровотока. Под влиянием нейротоксина в большей дозе (0,5 мг) снижение ВГД было более выраженным и более продолжительным. В обеих опытных группах ВГД достоверно снижалось в первую неделю наблюдения, что можно объяснить действием 6-ОНДА на симпатическую иннервацию тканей переднего отдела глаза, которые отвечают за образование и отток внутриглазной жидкости. При введении нейротоксина в меньшей дозе (0,25 мг) снижение ВГД отмечалось только в течение недели, однако в конце периода наблюдения ВГД повышалось, вероятно, в связи с меньшим нейротоксическим эффектом, чем при большей дозе 6-ОНДА, и наступающей более быстрой ответной реакцией на развивающуюся локальную дисфункцию симпатической нервной системы. У контрольных кроликов ВГД в течение недели после введения контрольного раствора имело тенденцию к повышению, вероятно, вызванную как самим объемом вводимого раствора, так и низким значением его pH = 6,5. Нарушение зрачкового рефлекса в обеих опытных группах при введении нейротоксина предположительно обуславливается нейротоксическим поражением периферических звеньев иннервации мышц зрачка. Изменения, выявленные на глазном дне, и данные офтальмоплетизмографии свидетельствуют о влиянии локального введения 6-ОНДА на состояние ретинальных и увеальных сосудов глаза. Наблюдались ангиопатия и ретинальные кровоизлияния, снижение глазного кровотока в зависимости от используемой дозы нейротоксина: при большей дозировке ишемические изменения были более выраженными. При этом у контрольных кроликов, получавших интравитреально физиологический раствор с аскорбиновой кислотой, патологических изменений глазного дна, зрачкового рефлекса и МОК не отмечено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно заключить, что однократно введенный интравитреально дофаминергический нейротоксин 6-ОНДА в дозе 0,25 и 0,5 мг вызывает нейровоспалительный процесс и нейроваскулярные нарушения, являющиеся ключевыми звеньями нейродегенеративного процесса. В связи с более легким характером функциональных изменений моделирование ранней стадии нейродегенеративного процесса предпочтительно проводить с помощью интравитреального введения 6-ОНДА в дозе 0,25 мг в 100 мкл раствора NaCl 0,9 %, содержащего аскорбиновую кислоту в концентрации 0,5 %. Данная модель может быть использована для изучения патогенеза нейродегенеративных процессов в глазу, поиска их ранних

прогностических маркеров, а также для количественной оценки эффективности различных медикаментозных воздействий на течение нейровоспаления и характер нейроваскулярных нарушений в глазу.

Литература/References

1. Ashok A, Singh N, Chaudhary S, et al. Retinal degeneration and Alzheimer's disease: an evolving link. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 2; 21 (19): 7290. doi: 10.3390/ijms21197290
2. Chen PJ, Wan L, Lai JN, et al. Increased risk of Parkinson's disease among patients with age-related macular degeneration. *BMC Ophthalmol.* 2021 Dec 9; 21 (1): 426. doi: 10.1186/s12886-021-02196-8
3. Bilbao-Malavé V, González-Zamora J, de la Puente M, et al. Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in age related macular degeneration, role in pathophysiology, and possible new therapeutic strategies. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10 (8): 1170. doi: 10.3390/antiox10081170
4. Niwa M, Aoki H, Hirata A, et al. Retinal cell degeneration in animal models. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (1): 110. doi:10.3390/ijms17010110
5. Massari CM, Constantino LC, Tasca CI. Adenosine A₁ and A_{2A} receptors are involved on guanosine protective effects against oxidative burst and mitochondrial dysfunction induced by 6-OHDA in striatal slices. *Purinergic Signalling.* 2021; 17: 247–54. doi:10.1007/s11302-021-09765-y
6. Witkovsky P, Alones V, Piccolino M. Morphological changes induced in turtle retinal neurons by exposure to 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. *J of Neurocytology.* 1987; 16: 55–67. doi: 10.1007/BF02456697
7. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* 2004; 108 (1): 17–40. doi:10.1023/b:doop.0000019487.88486.0a
8. Singh AK, Banister EW. Effects of 6-hydroxydopamine on brain and blood catecholamines, ammonia, and amino acids in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978; 56 (2): 331–3. doi:10.1139/y78-050
9. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ольшанский А.С. и др. Взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума и их поведенческих проявлений на 6-гидроксидофамин-индуцированной модели паркинсонизма у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2021; 15 (2): 42–9. [Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Olshansky A.S., et al. The relationship between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation and its behavioral manifesta-

- tion in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in rats. *Annals of clinical and experimental neurology.* 2021; 15 (2): 42–9 (In Russ.)). doi: 10.25692/ACEN.2021.2.6
10. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia.* 2017; 32 (8): 533–9. doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.011
11. Wu XH, Qian KW, Xu GZ, et al. The Role of retinal dopamine in C57BL/6 mouse refractive development as revealed by intravitreal administration of 6-hydroxydopamine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 1; 57 (13): 5393–404. doi:10.1167/iov.16-19543
12. Oliver P, Jolicœur FB, Lafond G, et al. Effects of retinal dopamine depletion on the rabbit electroretinogram. *Doc Ophthalmol.* 1987; 66 (4): 359–71. doi: 10.1007/BF00213664
13. Olivier P, Jolicœur FB, Lafond G, et al. Dose related effects of 6-OHDA on rabbit retinal dopamine concentrations and ERG B-wave amplitudes. *Brain Res Bull.* 1986; 16 (5): 751–3. doi: 10.1016/0361-9230(86)90148-6
14. Moro F, Scapagnini U, Gorgone G, et al. Chronic degeneration of aminergic nerve endings and blood-aqueous barrier. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 1979; 8; 209 (4): 225–30. doi: 10.1007/BF00419056
15. Negishi K, Teranishi T, Kato S. Growth zone of the juvenile Goldfish retina revealed by fluorescent flat mounts. *Journal of Neuroscience Research.* 1982; 7: 321–30. doi: 10.1002/jnr.490070310
16. Monte MD, Martini D, Latina V, et al. Beta-adrenoreceptor agonism influences retinal responses to hypoxia in a model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53 (4): 2181–91. doi: 10.1167/iov.11-9408
17. Robbins CB, Thompson AC, Bhullar PK, et al. Characterization of retinal microvascular and choroidal structural changes in Parkinson disease. *JAMA Ophthalmol.* 2021; 1; 139 (2): 182–8. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2020.5730
18. Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol.* 2002; 32 (9): 2393–400. doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2393::AID-IMMU2393>3.0.CO;2-4
19. Gesine P, Elabi OF. Microvascular changes in Parkinson's disease — focus on the neurovascular unit. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2022; 14: 853372. doi:10.3389/fnagi.2022.853372
20. Whitcup SM, Nussenblatt RB, Lightman SL, et al. Inflammation in retinal disease. *Int J Inflamm.* 2013. 2013; 7246478. doi: 10.1155/2013/724648
21. Sene A, Apte RS. Inflammation-induced photoreceptor cell death. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1074: 203–8. doi: 10.1007/978-3-319-75402-4_25

Вклад авторов в работу: Т.А. Павленко — концепция и дизайн исследования, проведение исследований, написание и редактирование текста; Н.Б. Чеснокова — концепция и дизайн исследования, редактирование; О.В. Безнос — проведение исследований, статистическая обработка данных, написание текста, подготовка иллюстраций; А.В. Григорьев, Т.Д. Охотимская, Н.Н. Шикарева — проведение исследований.

Authors' contribution: T.A. Pavlenko — concept and design of the study, writing and editing of the article; N.B. Chesnokova — concept and design of the study, writing and editing of the article; O.V. Beznos — data collection and processing, writing of the article, preparation of illustrations; A.V. Grigoryev, T.D. Okhotsimskaya, N.N. Shikareva — data collection and processing.

Поступила: 24.04.2023. Переработана: 27.04.2023. Принята к печати: 28.04.2023

Originally received: 24.04.2023. Final revision: 27.04.2023. Accepted: 28.04.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

Татьяна Аркадьевна Павленко — канд. мед. наук, начальник отдела патофизиологии и биохимии, ORCID 0000-0001-8032-4248

Наталья Борисовна Чеснокова — д-р биол. наук, профессор, главный специалист отдела патофизиологии и биохимии, ORCID 0000-0002-7856-8005

Ольга Валерьевна Безнос — врач клинической лабораторной диагностики отдела патофизиологии и биохимии, ORCID 0000-0001-7557-4955

Андрей Владимирович Григорьев — канд. мед. наук, заведующий клинико-диагностической лабораторией

Татьяна Дмитриевна Охотимская — канд. мед. наук, врач-офтальмолог отдела патологии сетчатки и зрительного нерва, ORCID 0000-0003-1121-4314

Наталья Николаевна Шикарева — младший научный сотрудник отдела патофизиологии и биохимии

Для контактов: Татьяна Аркадьевна Павленко, tanya1975_@inbox.ru

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogriazskaya st., Moscow, 105062, Russia

Tatiana A. Pavlenko — Cand. of Med. Sci., head of the department of pathophysiology and biochemistry, ORCID 0000-0001-8032-4248

Natalya B. Chesnokova — Dr. of Biol. Sci., professor, principal specialist of the department of pathophysiology and biochemistry, ORCID 0000-0002-7856-8005

Olga V. Beznos — doctor clinical-diagnostic laboratory, department of pathophysiology and biochemistry, ORCID 0000-0001-7557-4955

Andrey V. Grigoryev — Cand. of Med. Sci., head, clinic-diagnostic laboratory

Tatiana D. Okhotsimskaya — Cand. of Med. Sci., ophthalmologist, department of pathology of the retina and optic nerve, ORCID 0000-0003-1121-4314

Natalia N. Shikareva — junior researcher, department of pathophysiology and biochemistry

For contacts: Tatiana A. Pavlenko, tanya1975_@inbox.ru