

Влияние ресвератрола на микроциркуляцию и структурные изменения тканей глаза при моделировании ишемии-реперфузии сетчатки в эксперименте

Т.Н. Киселева, А.В. Чудин, А.И. Шипанова, И.П. Хорошилова-Маслова

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России

Цель работы — изучить в эксперименте воздействие антиоксиданта ресвератрола на гемодинамику и морфологические изменения структур глаза при ретинальной ишемии-реперфузии. **Материал и методы.** Экспериментальное исследование выполнено на 50 крысах породы Wistar. На первом этапе животные были разделены на две группы: в I группу вошли 20 интактных животных, во II группу — 30 животных, которые получали ресвератрол per os в течение одного месяца. На втором этапе моделировали одностороннюю ишемию-реперфузию путем повышения внутриглазного давления в течение 30 минут до 110 мм рт. ст. с помощью введения воздуха в переднюю камеру. Животные I группы были разделены на IA подгруппу — 10 животных, которым проводили моделирование ишемии-реперфузии одного глаза, и IB (контрольную) подгруппу, которую составили 10 интактных крыс. Во II группе, после месячного приема ресвератрола, также моделировали ишемию-реперфузию глаза, после чего прием препарата был продолжен еще месяц. Кровоток в орбитальных сосудах оценивали с помощью энергетического картирования и импульсной доплерографии в норме и через 3, 7 и 30 суток после моделирования ишемии. Энуклеацию глазного яблока производили на 3, 7 и 30-е сутки в постишемическом периоде эксперимента для проведения патоморфологического исследования. **Результаты.** У животных, подвергшихся моделированию ишемии-реперфузии сетчатки, пероральное применение ресвератрола в до- и постишемическом периоде сопровождалось уменьшением симптомов ишемического повреждения переднего и заднего отделов глаза с частичным сохранением структур сетчатки. Отмечалось статистически достоверное увеличение показателей максимальной систолической, конечной диастолической скорости кровотока и снижение индекса периферического сопротивления в центральной артерии сетчатки и задних длинных цилиарных артериях по сравнению с данными показателями в группе животных, не получавших ресвератрол. Патогистологическое исследование выявило сохранение целостности отдельных структур сетчатки у животных, получавших препарат в течение 1–2 месяцев. **Заключение.** В эксперименте на модели ишемии-реперфузии сетчатки у крыс установлено улучшение гемодинамики глаза под влиянием антиоксиданта ресвератрола и определены его нейропротекторные свойства.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия сетчатки, глазной кровоток, энергетическое картирование, ресвератрол.

Российский офтальмологический журнал, 2016; 3: 66–74

Ретинальная ишемия является одним из патогенетических факторов развития многих патологических состояний (окклюзии ретинальных и каротидных сосудов, возрастной макулярной дегенерации, передней ишемической нейропатии, amaurosis fugax, диабетической ретинопатии, первичной глаукомы и

др.) [1–3] и может привести к значительной потере зрения и слепоте.

Ишемия сетчатки возникает на фоне гипоксии, приводящей к угнетению метаболических процессов в тканях глаза с апоптозом ретинальных клеток [4, 5]. Отсутствие кислорода полностью тормозит

активность окислительно-восстановительных процессов в дыхательной цепи, приводя к падению синтеза АТФ, усилению гликолиза, гиперпродукции молочной кислоты, ускоренному образованию продуктов перекисного окисления липидов, активации оксидантного стресса — универсального механизма повреждения тканей [6]. В связи с этим представляет интерес моделирование ретинальной ишемии в эксперименте, изучение механизмов ее развития и способов коррекции [7–15]. Для создания ретинальной ишемии многие авторы используют модель высокого внутриглазного давления (ВГД), при которой ВГД повышают до 110–130 мм рт. ст. путем активного введения физиологического раствора в переднюю камеру, что ведет к прекращению ретинальной и хориоидальной циркуляции [9, 13–18]. А. Lagrèze Wolf и соавт. [14] для повышения ВГД вводили воздух в переднюю камеру крысам породы Sprague-Dawley. Авторы вызывали острую ишемию давлением 120 мм рт. ст. в течение часа и подтверждали появление ишемии офтальмоскопически. На данной модели был показан нейропротекторный эффект габапентин-лактама, который проявлялся сохранением до 70 % клеток ганглиозного слоя по сравнению с контролем. Известно, что ишемический эффект может быть дозирован длительностью воздействия и степенью повышения давления [18, 19].

Изучению постишемической сосудистой реакции посвящены единичные исследования [16–19]. S. Roth, Y. Pietrzyk [16] наблюдали увеличение скорости кровотока (гиперперфузию) на 200 % в ретинальных сосудах и на 108 % в хориоидальных сосудах через 15 мин. после ретинальной ишемии у кошек. Нормализацию скорости кровотока в этих сосудах авторы отмечали через час после реперфузии.

K. Matsuura, Z. Kawai [17] через 10, 30, 50 мин. после моделирования ретинальной ишемии путем повышения ВГД у молодых четырехмесячных крыс и пожилых крыс (в возрасте 18 мес.) отмечали усиление хориоидального кровотока на $117,1 \pm 4,9$, $208,6 \pm 16,1$ и $176,6 \pm 17,1$ % от исходных значений. M. Ishihara и соавт. [18] после 30-минутной ишемии у молодых четырехмесячных крыс отмечали гиперперфузию хориоидального кровотока (в среднем на 186 ± 9 %) через минуту после окончания воздействия высокого ВГД с нормализацией микроциркуляции через 9 мин. Исследование показало менее выраженную гиперперфузию хориоидеи при длительной ишемии в течение 120 мин. Через 5–6 ч скорость хориоидального кровотока у молодых крыс была в пределах исходных значений, а у пожилых крыс (старше 18 мес.) снижалась до 80 %.

В исследовании А.С. Шабельниковой и соавт. [19] установлено, что 30-минутная ишемия сетчатки методом высокого ВГД у крыс приводит к значительно большему повышению скорости кровотока в период реперфузии по сравнению с краткосрочной — 10-минутной и более длительной — 50-ми-

нутной ишемией. Авторы показали, что продолжительность гиперперфузии зависит от длительности ишемии.

Единичные публикации посвящены изучению влияния ресвератрола (3,5,4-тригидростилбен) — полифенольного фитоалексина растительного происхождения — на изменения в сетчатке после ишемии-реперфузии [20–24].

C. Li и соавт. [20] отмечали уменьшение дегенерации ретинальных сосудов на модели ретинальной ишемии при повышении ВГД у мышей на фоне приема ресвератрола в суточной дозе 25 мг/кг. Другие авторы установили уменьшение у крыс ишемического повреждения в виде сохранения толщины сетчатки, уменьшения числа апоптотических клеток [21, 22, 24], отсутствие снижения амплитуды а- и b-волн на скотопической электроретинограмме на фоне введения от 20 до 30 мг/кг ресвератрола [21, 23].

Влияние ресвератрола на гемодинамические изменения в глазных сосудах в сочетании с морфологической оценкой повреждений сетчатки после ретинальной ишемии-реперфузии специально не изучалось. Кроме того, отсутствуют сведения о состоянии кровотока в орбитальных сосудах при моделировании ретинальной ишемии путем повышения ВГД.

ЦЕЛЬ исследования — изучить в эксперименте воздействие антиоксиданта ресвератрола на гемодинамику и морфологические изменения структур глаза при ретинальной ишемии-реперфузии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе экспериментального научного центра МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России (руководитель — к. б. н. А.И. Щипанова). Исследование проведено на 50 крысах породы Wistar со средней массой 200–250 г. Обследования выполняли в условиях общей анестезии, принятой в лабораторной практике для работы с крысами [25], а также местной анестезии 0,4 % раствором оксибупрокаина (инокаин). Возраст животных составлял от 3 до 5 мес.

I этап (доишемический) состоял в оценке глазного кровотока до приема антиоксиданта ресвератрола и через 30 дней от начала его приема. Все животные были разделены на две группы: I группа — 20 интактных животных, II группа — 30 животных, которые получали ресвератрол перорально с питьевой водой в течение 30 дней. Суточная доза ресвератрола, в соответствии с данными литературы, составляла 20 мг/кг [20, 21, 23].

II этап включал моделирование односторонней ишемии-реперфузии с помощью введения воздуха в переднюю камеру через прокол иглой в зоне лимба левого глаза (рис. 1.) и повышения ВГД в течение 30 мин. до 110 мм рт. ст. В постишемическом периоде (после моделирования ишемии-реперфузии) животные I группы были разделены на две подгруппы.



Рис. 1. Устройство для моделирования ретиальной ишемии-реперфузии путем повышения ВГД воздухом.

В IA подгруппу вошли 10 крыс, которым моделировали ишемию-реперфузию одного глаза, IB (контрольную) подгруппу составили 10 интактных крыс. Во II группе у 30 крыс, продолжавших прием ресвератрола, также моделировали ишемию-реперфузию (30 глаз).

Критериями исключения из исследования явились: отслойка сетчатки, цилиохориоидальная отслойка, эндофтальмит, возникшие после моделирования ишемии. В IA подгруппе 2 крысы были исключены из исследования: у одного животного развился эндофтальмит, у другого — отслойка сетчатки, подтвержденная при В-сканировании. Эвтаназию в IA группе выполняли на 3-и сутки (3 крысы), на 7-е сутки (3 крысы) и на 30-е сутки (2 крысы). Во II груп-

пе осложнение в виде цилиохориоидальной отслойки возникло лишь у одного животного. В этой группе эвтаназию осуществляли на 3-и сутки (9 крыс), на 7-е сутки (10 крыс) и на 30-е сутки (10 крыс).

Оценку повреждения переднего отрезка глаза проводили с помощью бинокулярной лупы. Выраженность реакции переднего отрезка глаза оценивали по шкале в условных баллах по 5 критериям (табл. 1).

Помимо визуального осмотра и офтальмоскопии проводилось ультразвуковое исследование глаза и орбиты с регистрацией показателей кровотока в орбитальных сосудах на многофункциональной ультразвуковой диагностической системе Voluson E8 Expert (GE Healthcare) с использованием мультисекторного линейного датчика ML6-15-D и объемного датчика RSP6-16-D в режиме сканирования Small Part. Для исследования сосудов и регистрации показателей гемодинамики использовали дуплексное сканирование в режимах энергетического картирования (ЭК) и импульсной доплерографии. С помощью импульсной доплерографии регистрировали спектр доплеровского сдвига частот (СДСЧ) с определением основных количественных показателей кровотока: максимальной систолической скорости (V_{syst}), конечной диастолической скорости (V_{diast}) и индекса резистентности, или периферического сопротивления (RI). Определение показателей кровотока в каждом сосуде проводили трехкратно с регистрацией максимальных значений. Оценивали параметры кровотока в верхней глазной артерии (ВГА), нижней глазной артерии (НГА), центральной артерии сетчатки (ЦАС), задних длинных цилиарных артериях (ЗДЦА), центральной вене сетчатки (ЦВС) и задней цилиарной вене (ЗЦВ) до начала приема ресвератрола,

Таблица 1. Показатели выраженности повреждения переднего отрезка глаза у крыс

Признак	Степень выраженности	Баллы
Отек роговицы	— отсутствует	0
	— слабовыраженный (неравномерный частичный отек, преимущественно эпителиальный)	1
	— умеренный (равномерный отек всей роговицы, преимущественно эпителиальный)	2
	— выраженный «матовое стекло» (диффузный с вовлечением стромы)	3
	— резко выраженный «фарфоровое стекло»	4
Отек радужки	— отсутствует	0
	— слабовыраженный (сглаженный рельеф, незначительное расширение сосудов)	1
	— умеренный (сильно сглажен рельеф, расширение сосудов)	2
	— выраженный (рельеф практически отсутствует, сосуды значительно расширены)	3
Кровь в передней камере	— отсутствует	0
	— меньше или = 1/3	1
	— меньше или = 2/3	2
	— вся передняя камера	3
Светобоязнь и блефароспазм	— отсутствует	0
	— присутствует	1
Неоваскуляризация роговицы	— отсутствует	0
	— умеренная (поверхностная или глубокая неоваскуляризация меньше 3/4 площади роговицы)	1
	— выраженная (поверхностная и/или глубокая больше 3/4 площади роговицы)	2

через 30 дней после начала перорального применения антиоксиданта, сразу после моделирования ишемии-реперфузии и через 3, 7 и 30 суток.

Оценка гемодинамических параметров проводилась после измерения системного артериального давления (АД) под наркозом с помощью системы неинвазивного измерения артериального давления с хвостовой манжетой ИТС (Mouse Rat Blood Pressure System ИТС Life Science Inc., США).

Патогистологическое исследование осуществлялось на базе отдела патологической анатомии и гистологии МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России (руководитель — д. м. н., профессор И.П. Хорошилова-Маслова). Энуклеацию глазного яблока производили на 3, 7 и 30-е сутки в постишемическом периоде эксперимента, материал фиксировали в растворе Боуэна. После макроскопического исследования вырезали колодку глазного яблока, которую обезжизняли в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 0,5–1,5 мкм готовили на микротоме Leica RM2235 (Германия) и окрашивали гематоксилин-эозином. Препараты исследовали и фотографировали с помощью светового микроскопа на микросистеме Leica (Германия) при увеличении 40, 100, 200, 400.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ Microsoft Excel, Statistica 6.0 (Stat. Soft. Inc, США). Вычисляли среднеарифме-

тические величины (M), ошибку средней арифметической величины (m), квадратическое отклонение (σ). Оценку достоверности различия средних величин производили по достоверному коэффициенту (t) с помощью критерия достоверности (p), определяемого по таблице Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень нормального артериального давления (АД) в хвостовой артерии интактных крыс в среднем ($M \pm \sigma$) составлял для систолического АД $121,1 \pm 9,5$ мм рт. ст., для диастолического — $80,0 \pm 14,3$ мм рт. ст. Уровень системного АД в хвостовой артерии крыс I и II группы до ультразвукового исследования в доишемическом и постишемическом периоде в среднем достоверно не отличался от контроля.

В доишемическом периоде исследование глазного кровотока показало статистически достоверное увеличение показателей V_{syst} и V_{diast} и снижение RI в артериальных сосудах животных, получавших ресвератрол (II группа), по сравнению с I группой. Средние значения V_{syst} были достоверно выше в ЦАС в среднем на 26,2 %, в ЗДЦА — на 23,4 %, в НГА — на 21,1 % и в ВГА — на 24,2 %; RI снижался во всех артериях ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, длительное пероральное применение антиоксиданта ресвератрола в течение 30 дней

Таблица 2. Средние параметры кровотока в орбитальных сосудах у крыс до и после моделирования ишемии-реперфузии сетчатки путем повышения ВГД ($M \pm m$)

Сосуды	Доишемический период		Через 3 суток после ишемии		Через 7 суток после ишемии		Через 30 суток после ишемии	
	I группа (контроль), n = 20	II группа, n = 30	II группа, n = 29	IA подгруппа, n = 8	II группа, n = 20	IA подгруппа, n = 5	II группа, n = 10	IA подгруппа, n = 2
ЦАС								
V_{syst} , см/с	$7,02 \pm 1,11$	$9,52 \pm 1,01^{**}$	$9,06 \pm 0,65^*$	$6,08 \pm 0,86^{***}$	$6,76 \pm 1,05^*$	$4,78 \pm 0,76^*$	$6,56 \pm 1,20^*$	$4,65 \pm 0,90^{**}$
V_{diast} , см/с	$3,35 \pm 0,57$	$4,2 \pm 1,1^*$	$4,8 \pm 0,8^*$	$2,65 \pm 0,41^*$	$3,25 \pm 0,70^*$	$2,34 \pm 0,49^*$	$3,35 \pm 0,70^*$	$2,10 \pm 0,48^{**}$
RI	$0,52 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,10^{**}$	$0,47 \pm 0,10^{**}$	$0,56 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,08$	$0,51 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,09$	$0,55 \pm 0,08$
ЗДЦА								
V_{syst} , см/с	$6,74 \pm 1,46$	$8,8 \pm 1,3^{**}$	$7,63 \pm 1,10^*$	$5,75 \pm 1,02^{**}$	$6,03 \pm 1,15^*$	$4,65 \pm 1,12^*$	$6,13 \pm 1,10^*$	$4,3 \pm 1,3^{**}$
V_{diast} , см/с	$3,43 \pm 0,74$	$4,2 \pm 1,5^*$	$4,17 \pm 1,20^*$	$2,58 \pm 0,78^*$	$3,20 \pm 1,03^*$	$2,2 \pm 0,8^*$	$3,2 \pm 1,2^*$	$2,1 \pm 0,8^{**}$
RI	$0,49 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,11^{**}$	$0,45 \pm 0,06^{**}$	$0,5 \pm 0,1$	$0,49 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,09$	$0,51 \pm 0,08$
НГА								
V_{syst} , см/с	$11,91 \pm 1,09$	$15,1 \pm 1,1^{**}$	$13,10 \pm 1,11^*$	$11,15 \pm 1,50$	$11,51 \pm 1,08$	$11,15 \pm 1,20^{**}$	$11,63 \pm 1,30$	$11,05 \pm 1,20$
V_{diast} , см/с	$6,08 \pm 1,74$	$8,52 \pm 1,45^*$	$7,01 \pm 1,40^{**}$	$6,04 \pm 1,11$	$5,5 \pm 1,4$	$5,04 \pm 1,04^{**}$	$5,60 \pm 1,05$	$5,10 \pm 1,24$
RI	$0,49 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,15^{**}$	$0,47 \pm 0,10$	$0,46 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,09$	$0,51 \pm 0,15$	$0,54 \pm 0,10$
ВГА								
V_{syst} , см/с	$12,51 \pm 0,77$	$16,51 \pm 1,53^{**}$	$14,02 \pm 1,30^*$	$11,98 \pm 0,90$	$12,86 \pm 1,30$	$12,03 \pm 0,80$	$12,61 \pm 1,20$	$12,4 \pm 1,1$
V_{diast} , см/с	$4,96 \pm 1,26$	$5,90 \pm 0,98^{**}$	$5,62 \pm 1,14$	$5,20 \pm 1,13$	$6,12 \pm 1,14$	$5,20 \pm 1,06$	$5,40 \pm 1,15$	$4,8 \pm 1,5$
RI	$0,60 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,14^{**}$	$0,59 \pm 0,14$	$0,56 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,08$	$0,57 \pm 0,08$	$0,61 \pm 0,09$

Примечание. n — число глаз; $p < 0,001^*$ — достоверно относительно показателей в IA группе; $p < 0,05^{**}$ — достоверно относительно показателей в IA группе; $p < 0,001^*$ — достоверно относительно показателей в группе контроля; $p < 0,05^{**}$ — достоверно относительно показателей в группе контроля; $p < 0,01^{***}$ — достоверно относительно показателей в группе контроля.

сопровождалось увеличением скорости кровотока в ЦАС, ЗДЦА, НГА, ВГА и снижением показателей периферического сопротивления в орбитальных сосудах, что свидетельствовало об улучшении гемоперфузии глаза. Возможными механизмами повышения скорости кровотока под влиянием антиоксидантов можно считать усиление высвобождения эндотелий-зависимого гиперполяризующего фактора, оксида азота и активацию ГАМК-А-рецепторов сосудов [26–30].

В постишемическом периоде у всех животных после введения воздуха в переднюю камеру и увеличения давления до 110 мм рт. ст. наблюдалось побледнение сосудов конъюнктивы и глазного дна, что подтверждалось при внешнем объективном осмотре и офтальмоскопически. В первую минуту реперфузии регистрировали повышенный приток крови к сосудам конъюнктивы и глазного дна. Розовый рефлекс глазного дна восстанавливался до исходного уровня сразу после снижения ВГД.

Через 3 суток в IA подгруппе картина повреждения переднего отрезка глаза характеризовалась следующими симптомами: светобоязнь и блефароспазм, отек роговицы и гифема. Клиническая оценка по шкале выраженности симптомов в среднем составила 8 баллов. Во II группе выраженность отека роговицы и радужки проявлялась в меньшей степени — 4 балла по шкале оценки клинических симптомов.

Через 7 суток в обеих группах наблюдался отек роговицы и радужки, сохранялся блефароспазм, при наличии гифемы происходила частичная резорбция крови. Средний балл по шкале клинической оценки в IA подгруппе составил 10, во II группе — 6 баллов.

Через 30 суток у животных в IA подгруппе отмечался блефароспазм и светобоязнь, гифема, выраженный отек и неоваскуляризация роговицы. Средний балл выраженности клинических симптомов составил 12. У животных II группы исчез блефароспазм, светобоязнь, у 7 животных из 10 отмечалась умеренная неоваскуляризация роговицы, частичное или полное рассасывание гифемы. Средний показатель выраженности клинических симптомов составил 5 баллов.

Таким образом, результаты внешнего осмотра свидетельствуют о травматичности данного метода моделирования для переднего отрезка глаза, что проявляется блефароспазмом, выраженным отеком роговицы и радужки в раннем постишемическом периоде и выраженной неоваскуляризацией роговицы к концу периода наблюдения. Применение ресвератрола в течение длительного времени (1–2 месяца) способствует снижению степени выраженности и исчезновению ряда симптомов повреждения после транзиторного воздействия высокого ВГД.

В связи с тем, что регистрация показателей кровотока в первые сутки после моделирования не представлялась возможной из-за артефактов, которые создавались наличием воздуха в передней камере,

нам не удалось определить гиперперфузию, которая, по данным ряда авторов, наблюдается именно в первые часы после прекращения влияния высокого давления [16–19].

При исследовании глазного кровотока через 3 суток после моделирования ишемии-реперфузии сетчатки у животных IA подгруппы регистрировали статистически достоверное снижение V_{syst} в ЦАС и ЗДЦА в среднем на 15,8 и 14,7 % ($p < 0,05$) и V_{diast} на 21 и 24,7 % соответственно. Во II группе также имело место снижение скорости кровотока во всех артериях, однако средние показатели V_{syst} были достоверно выше, а RI в ЦАС, ЗДЦА — ниже (на 16 и 10 % соответственно) по сравнению с IA подгруппой ($p < 0,05$) (см. табл. 2).

Через 7 суток после моделирования ретинальной ишемии-реперфузии продолжалось снижение V_{syst} и V_{diast} в ЦАС и ЗДЦА в обеих группах (табл. 2). В IA подгруппе имело место достоверное снижение V_{syst} в ЦАС в среднем на 31,9 %, V_{diast} — на 30 %; V_{syst} в ЗДЦА — на 31 %, V_{diast} — на 31,2 %; V_{syst} в НГА — на 7,2 %, V_{diast} — на 17 %, а RI достоверно не отличался от нормы. Во II группе регистрировали достоверно более высокие значения V_{syst} в ЦАС и ЗДЦА — на 37,2 и 29,6 % соответственно ($p < 0,001$) (см. табл. 2).

Через 30 суток в IA подгруппе средние показатели V_{syst} в ЦАС были достоверно ниже — на 33,7 %, V_{diast} — на 37,3 %; V_{syst} в ЗДЦА — на 36,2 %, V_{diast} — на 38,8 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Во II группе показатели скорости кровотока V_{syst} во всех артериях были достоверно выше по сравнению с IA подгруппой — на 49 % в ЦАС, 32,6 % в ЗДЦА, 18,6 % в НГА и 17 % в ВГА ($p < 0,001$) (см. табл. 2).

Конечная диастолическая скорость кровотока (V_{diast}) в ЦАС и ЗДЦА в постишемическом периоде снижается вместе с V_{syst} в обеих группах (см. табл. 2). Статистически значимых изменений показателей скорости кровотока в венозных сосудах на протяжении всего периода наблюдения не отмечалось ($p > 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженном нарушении кровообращения в ЦАС и ЗДЦА при ретинальной ишемии-реперфузии, индуцированной с помощью высокого ВГД.

Через 3 дня после ишемии параметры скорости кровотока имели тенденцию к снижению как у животных, не получавших антиоксидант, так и у тех, которые получали его до моделирования ишемии-реперфузии (см. табл. 2). Однако после длительного применения ресвератрола (1–2 месяца) показатели скорости кровотока (V_{syst} и V_{diast}) в ЦАС и ЗДЦА были достоверно выше на протяжении всего периода наблюдения ($p < 0,001$), чем у животных, не получавших препарат. В нашем исследовании моделирование ишемии-реперфузии сетчатки путем повышения ВГД не оказывало влияния на крово-

ток в венах орбиты на протяжении всего периода наблюдения.

Морфологическая картина состояния тканей оболочек глаза у животных IA подгруппы через 3 суток после ишемии была следующей: нормальный размер глазного яблока, отек роговицы с участками истончения и эктазией, инфильтрация роговицы, радужки и цилиарного тела лимфоцитами, отек сетчатки, преимущественно за счет внутреннего плексиформного слоя и слоя нервных волокон. Обращало на себя внимание частичное разрушение фоторецепторного слоя, апоптоз ганглиозных клеток, в то время как наружный и внутренний ядерный слой сохраняли нормальную толщину (6–8 рядов и 8–10 рядов клеток соответственно). Многочисленные сосуды поверхностного капиллярного сплетения были значительно расширены (рис. 2), а стенка венозных сосудов истончена.

Через 7 суток после ишемии особенности патогистологической картины включали увеличение площади разрушенного фоторецепторного слоя, уменьшение толщины наружного ядерного слоя (5–6 рядов клеток) на фоне сохраняющегося отека сетчатки. Через 30 суток у всех животных этой группы отмечалась васкуляризация роговицы, выраженные фиброзные изменения в виде образования тонкой пленки в углу передней камеры и у основания цилиарного тела, атрофия радужки. Кроме того, наблю-

далась инфильтрация хориоидеи лимфоцитами и ее истончение (рис. 3, А), а также выраженные изменения сетчатки в виде пролиферации глиальной ткани, отсутствия фоторецепторного слоя, уменьшения наружного ядерного слоя до одного ряда и исчезновения наружного плексиформного слоя. Определяли гипохромию ядер во внутреннем зернистом слое, уменьшение числа ганглиозных клеток (рис. 3, Б).

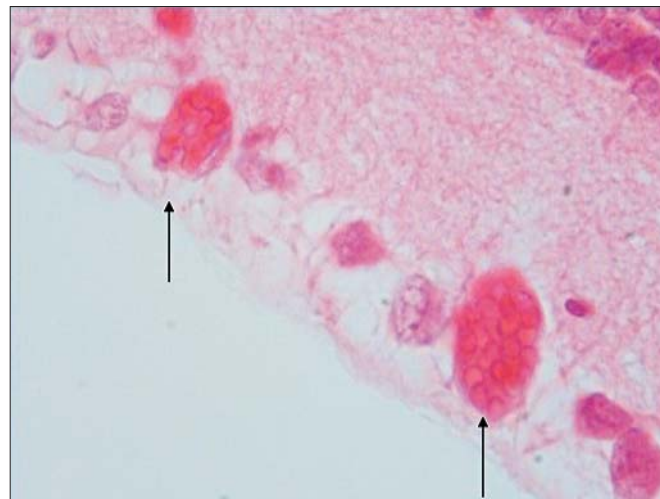


Рис. 2. Патогистологическая картина ткани сетчатки через 3 суток после ишемии без применения ресвератрола (IA подгруппа). Расширение сосудов поверхностного капиллярного сплетения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

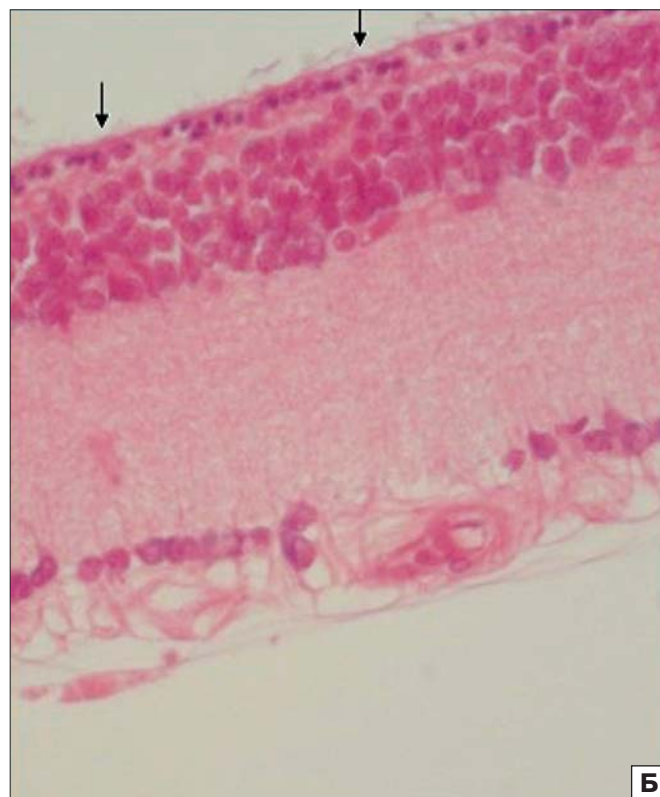
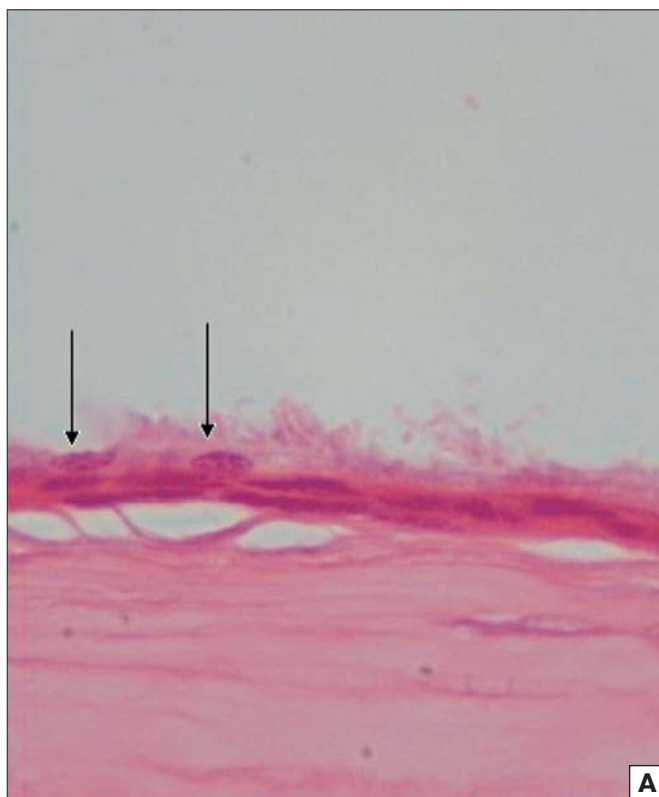


Рис. 3. Патогистологическая картина глаза крысы через 30 суток после моделирования ретинальной ишемии-реперфузии. IA подгруппа. А — хориоидея истончена и инфильтрирована лимфоцитами. Ув. 200; Б — повреждение сетчатки в виде разрушения фоторецепторного слоя. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

Патогистологическая картина сетчатки животных II группы, получавших ресвератрол, отличалась менее выраженным отеком внутреннего плексiformного слоя, наличием неповрежденных участков на фоне признаков нарушения структуры сетчатки в виде разрушения фоторецепторного слоя и апоптоза части ганглиозных клеток через 3 суток после ишемии. Через 7 суток в имеющихся измененных участках сетчатки толщина наружного ядерного слоя составляла 5–6 рядов и внутреннего ядерного — 7–8 рядов клеток. Наблюдались зоны сохранной сетчатки, в том числе фоторецепторного слоя, и переходные зоны с частично разрушенным слоем палочек и колбочек (рис. 4). Через 30 суток, в отличие от IA подгруппы, не отмечалось фиброзных изменений в углу передней камеры и у основания цилиарного тела. В сетчатке имели место участки с частичным разрушением фоторецепторного слоя (рис. 5, А) и зоны, где все слои были полностью сохранены (рис. 5, Б).

В единичных публикациях представлены данные о патогистологических изменениях в оболочках глаза в ранний период после моделирования ретинальной ишемии-реперфузии под влиянием высокого ВГД, которые характеризуются отеком сетчатки и апоптозом ганглиозных клеток [9, 14, 19, 31], что согласуется с результатами нашего исследования. Нами впервые выявлены патогистологические изменения сетчатки в отдаленном постишемическом

периоде (30-е сутки), которые показали повреждение внутренних и наружных слоев сетчатки, вероятно, вследствие компрессионно-ишемической травмы хориоидеи, приводящей к ее истончению и инфильтрации лимфоцитами (см. рис. 3, А). У всех животных, получавших ресвератрол в течение длительного времени (более месяца), при

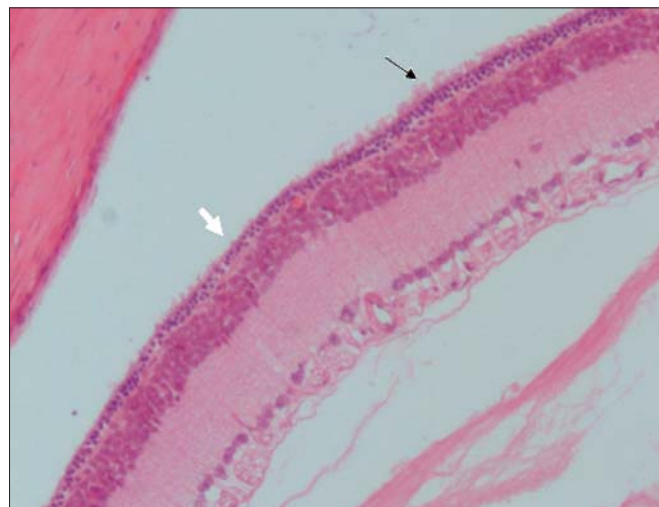


Рис. 4. Патогистологическая картина ткани сетчатки через 7 суток после моделирования ретинальной ишемии-реперфузии. Зона сетчатки на границе сохранного (чёрная стрелка) и разрушенного фоторецепторного слоя (белая стрелка) (II группа животных). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 40.

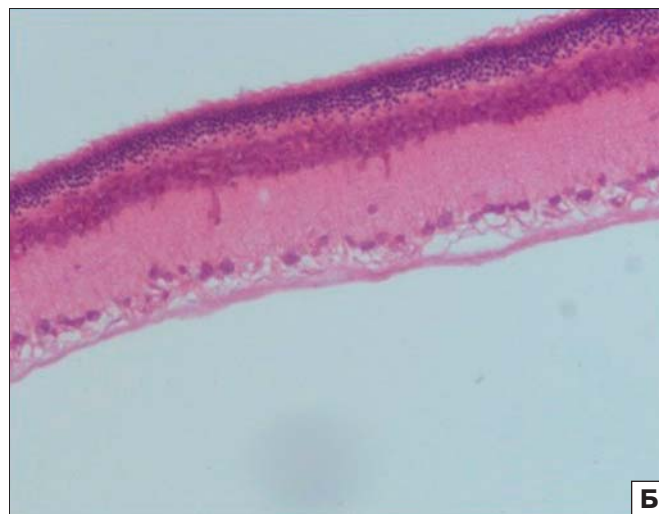
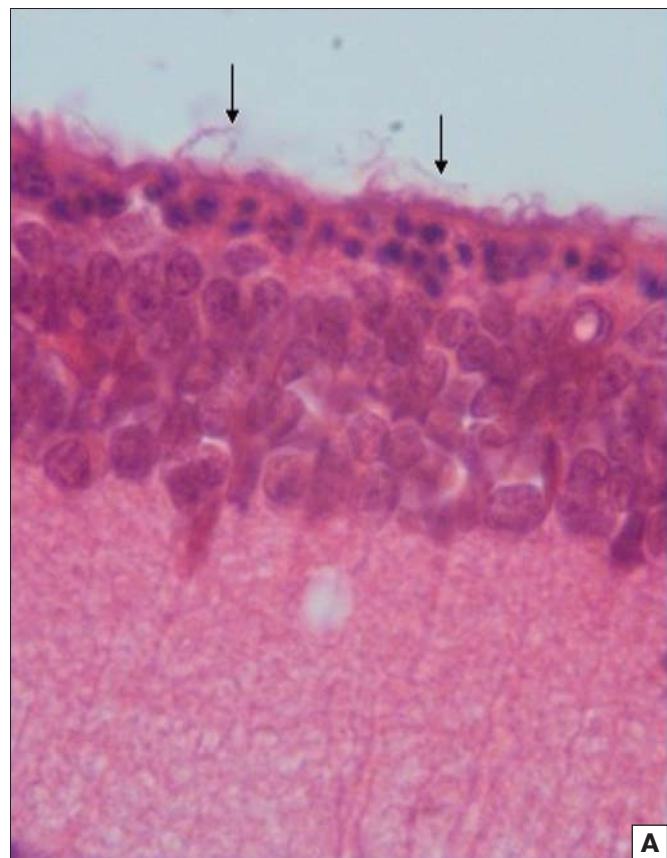


Рис. 5. Патогистологическая картина сетчатки крысы через 30 суток после моделирования ретинальной ишемии-реперфузии на фоне приема ресвератрола (II группа животных). А — участок истончения наружного ядерного слоя, частичное разрушение фоторецепторного слоя. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400; Б — участок неповрежденной сетчатки при ишемии-реперфузии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 40.

патогистологическом исследовании оболочек глаза установлено наличие интактных участков сетчатки с сохранными ганглиозным и фоторецепторным слоями.

ВЫВОДЫ

С помощью ультразвуковых доплеровских методов определены нормативы показателей гемодинамики в орбитальных сосудах у крыс, позволяющие оценить состояние глазного кровотока при моделировании ишемии-реперфузии сетчатки в эксперименте.

Параллельные изменения параметров гемодинамики глаза (дефицит кровотока) и повреждение ядерных слоев сетчатки в позднем постишемическом периоде подтверждают эффективность моделирования ретинальной ишемии путем повышения ВГД.

Экспериментальное моделирование ишемии-реперфузии сетчатки у крыс показало наиболее выраженные нарушения гемодинамики в сосудах малого калибра: в ЦАС и ЗДЦА — и более высокие показатели скорости кровотока в этих сосудах (улучшение гемодинамики) на фоне длительного применения (1–2 месяца) антиоксиданта ресвератрола.

Длительное применение (1–2 месяца) ресвератрола в суточной дозе 20 мг/кг для коррекции ретинальной ишемии-реперфузии обеспечивает улучшение регионарной гемодинамики и снижение выраженности структурных изменений сетчатки (нейропротекторный эффект).

Литература/References

1. Курешева Н. И. Глаукомная оптическая нейропатия. Москва: МЕДпресс-информ; 2006.
2. Kurysheva N. I. Glaucomatous optic neuropathy. Moscow: MEDpress-inform; 2006 (in Russian).
3. Нероев В. В., Колчин А. А., Зуева М. В. и др. Изменение функциональной активности сетчатки и гемодинамики глаза у пациентов с тяжелыми стадиями диабетической ретинопатии. Российский офтальмологический журнал. 2014; 7(3): 19–26.
4. Neroyev V. V., Kolchin A. A., Zueva M. V., et al. Changes in eye hemodynamics and functional activity of the retina in patients with severe stages of diabetic retinopathy. Russian Ophthalmological Journal. 2014; 7(3): 19–26 (in Russian).
5. Нероев В. В., Зуева М. В., Цапенко И. В. и др. Ишемические аспекты патогенеза заболеваний сетчатки. Российский офтальмологический журнал. 2010; 3 (1): 42–9.
6. Neroyev V. V., Zueva M. V., Tsapenko I. V., et al. Ischemic aspects in pathogenesis of retinal diseases. Russian Ophthalmological Journal. 2010; 3(1): 42–9 (in Russian).
7. Janáky M., Grósz A., Tóth E., Benedek K., Benedek G. Hypobaric hypoxia reduces the amplitude of oscillatory potentials in the human ERG. Doc. Ophthalmol. 2007; 114(1): 45–51.
8. Hedges W. F. Quantification of ischemic damage in the retina. Exp Eye Res. 1991; 53(5): 573–82.
9. Нечипуренко Н. И., Пашковская И. Д., Мусиенко Ю. И. Основные патофизиологические механизмы ишемии головного мозга. Медицинские новости; 2008; 1: 7–13.
10. Nechipurenko N. I., Pashkovskaya I. D., Musienko Yu. I. The main pathophysiological mechanisms of the cerebral ischemia. Meditsinskie novosti. 2008; 1: 7–13 (in Russian).
11. Киселева Т. Н., Чудин А. В. Экспериментальное моделирование ишемического поражения глаза. Вестник РАМН. 2014; 11–12: 97–103.
12. Kiseleva T. N., Chudin A. V. Experimental model of ocular ischemic diseases. Vestnik RAMN. 2014; 11–12: 97–103 (in Russian).
13. Prasad S. S., Kojic L., Wen Y. H., et al. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion. Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010; 51(12): 6207–19.
14. Buchi E. R., Suvaizdis I., Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. Ophthalmologica. 1991; 203(3): 138–47.
15. Daugele L., Niwa M., Hara A., et al. Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000; 41(9): 2743–7.
16. Masuzawa K., Jesmin S., Maeda S., et al. A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by subconjunctival injection of endothelin-1. Exp. Biol. Med. (Maywood). 2006; 231(6): 1085–9.
17. Flower R. W., Patz A. The effect of hyperbaric oxygenation on retinal ischemia. Ophthalmology and Visual Science. 1971; 10(8): 605–16.
18. Peachey N. S., Green D. J., Ripps H. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Science. 1993; 34(1): 58–65.
19. Lagrèze W. A., Müller-Velten R., Feuerstein T. J. The neuroprotective properties of gabapentin-lactam. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001; 239: 845–9.
20. Osborne N. N., Larsen A. K. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. Neurochem. Int. 1996; 29(3): 263–70.
21. Roth S., Pietrzyk Z. Blood flow after retinal ischemia in cats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994; 35: 3209–17.
22. Matsuura K., Kawai Y. Effects of hypothermia and aging on postischemic reperfusion in rat eyes. Jpn. J. Physiol. 1998; 48(1): 9–15.
23. Ishihara M., Nakano T., Ohama E., Kawai Y. Postischemic reperfusion in the eyes of young and aged rats. Jpn. J. Physiol. 2000; 50(1): 125–32.
24. Шабельникова А. С., Кашуба А. С., Пересыпкина А. А. и др. Протективное действие эритропоэтина при моделировании ишемии-реперфузии сетчатки. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2014; 182 (11–1): 109–12.
25. Shabel'nikova A. S., Kashuba A. S., Peresypkina A. A., et al. Protective effect of erythropoietin in the simulation of retinal ischemia-reperfusion. Nauchnye vedomosti belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. 2014; 182 (11–1): 109–12 (in Russian).
26. Li C., Wang L., Huang K., Zheng L. Endoplasmic reticulum stress in retinal vascular degeneration: protective role of resveratrol. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53(6): 3241–9.
27. Vin A. P., Hu H., Zhai Y., et al. Neuroprotective effect of resveratrol prophylaxis on experimental retinal ischemic injury. Exp Eye Res. 2013; 108: 72–5.
28. Liu X. Q., Wu B. J., Pan W. H., et al. Resveratrol mitigates rat retinal ischemic injury: the roles of matrix metalloproteinase-9, inducible nitric oxide, and heme oxygenase-1. J Ocul Pharmacol Ther. 2013; 29(1): 33–40.
29. Huang W., Li G., Qiu J., Gonzalez P., Challa P. Protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment. PLoS One. 2013; 8(9): e75735.
30. Kim Y. H., Kim Y. S., Kang S. S., Cho G. J., Choi W. S. Resveratrol inhibits neuronal apoptosis and elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in diabetic mouse retina. Diabetes. 2010; 59(7): 1825–35.
31. Marshall S., Milligan A., Yates R. Experimental techniques and anesthesia in the rat and mouse. ANZCCART News. 1944; 7(1): 1–4.
32. Гнездилова А. В., Ганьшина Т. С., Мирзоян Р. С. ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного эффекта мексидола. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010; 73(10): 11–3.
33. Gnezdilova A. V., Gan'shina T. S., Mirzoyan R. S. GABAergic mechanism of cerebrovascular effect mexidol. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2010; 73(10): 11–3 (in Russian).

27. Bertuglia S., Malandrino S., Colantuoni A. Effect of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Pharmacol Res.* 1995; 31 (3–4): 183–7.
28. Киселева Т.Н. Роль антоцианозидов в коррекции нарушений микроциркуляции и гемодинамики глаза при офтальмопатологии. *Российский офтальмологический журнал.* 2013; 6(1): 8–10.
Kiseleva T.N. The role of anthocyanosides in the correction of eye microcirculation and hemodynamic disorders in ophthalmic pathology. *Russian Ophthalmological Journal.* 2013; 6(1): 8–10 (in Russian).
29. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С. Некоторые механизмы корректирующего влияния эндогенных антиоксидантов на метаболические и гемодинамические нарушения при экспериментальном сахарном диабете. *Фундаментальные исследования.* 2011; 11(3): 499–502.
Dzugkoev S.G., Dzugkoeva F.S. Some mechanisms of therapeutic influence of endogenous antioxidants on metabolic and hemodynamic infringements at experimental diabetes mellitus. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2011; 11(3): 499–502 (in Russian).
30. Zhihua H., Liangdong L., Xiao L., Fang C., Jing Z. Effect of 3'(-)-daidzein sulfonic sodium on the anti-oxidation of retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 664: 585–91.
31. Ozden S., Müftüoğlu S., Tatlipinar S., et al. Protective effects of antithrombin III on retinal ischemia/reperfusion injury in rats: a histopathologic study. *Eur J Ophthalmol.* 2005; 15(3): 367–73.

The impact of resveratrol on ocular microcirculation and унуешыгыstructural changes in an experimental model of ischemia-reperfusion of the retina

T.N. Kiseleva, A.V. Chudin, A.I. Shchipanova, I.P. Khoroshilova-Maslova

Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia
tkisseleva@yandex.ru

Purpose. To study the effect of antioxidant resveratrol on hemodynamics and morphological changes in the ocular structure of rats with retinal ischemia-reperfusion injury. **Material and Methods.** The experimental study was performed on 50 Wistar rats. The animals were divided into two groups: group I (20 intact animals) and, group II (30 animals who received resveratrol per os for one month. We modeled unilateral ischemia-reperfusion of the eye by increasing IOP to the level of 110 mm Hg within 30 minutes, pumping air into the anterior chamber. Group I was further divided into subgroup IA (10 animals undergoing ischemia-reperfusion modeling of one eye and IB (control) which consisted of 10 intact rats. All animals of group II kept receiving resveratrol for 1 month and underwent the modeling of ischemia-reperfusion of the eye, whereupon the administration of resveratrol was resumed for another month. Ocular blood flow was estimated using power Doppler (PD) and pulsed-wave spectral Doppler ultrasonography before ischemia-reperfusion and 3, 7, 30 days after it. The eyeball was enucleated on the 3rd, 7th, or 30th day in the post-ischemic period of the experiment to enable a pathomorphological study. **Results.** The signs of ischemic damage of the anterior and posterior segments of the eye were reduced in rats who received resveratrol during the pre-ischemic (within 30 days) and the post-ischemic follow up period (30 days). We noted a statistically significant increase of peak systolic velocity (V_{syst}), increase of end diastolic velocity (V_{diast}) and decreased resistance index (RI) in the central retinal artery and short posterior ciliary arteries of rats that were treated with resveratrol as compared to the respective values found in rats with ischemia-reperfusion of the retina who were not given resveratrol. A histopathological examination revealed areas with intact retinal layers in rats who received resveratrol for a long period (1–2 months). **Conclusions.** An improvement of ocular blood flow and a neuroprotective effect was found in rats with ischemia-reperfusion who received resveratrol.

Keywords: ischemia-reperfusion of the retina, ocular blood flow, Power Doppler, resveratrol.

Russian Ophthalmological Journal, 2016; 3: 66–74

doi: 10.21516/2072-0076-2016-9-3-66-74

Адрес для корреспонденции: 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19; ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России
tkisseleva@yandex.ru