

Экспериментальное исследование патогенеза ретинопатии недоношенных как перспективное направление поиска новых медикаментозных подходов к ее профилактике и лечению

Л.А. Катаргина, Н.Б. Чеснокова, О.В. Безнос, Н.А. Осипова, Б.В. Витер

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

Проведено экспериментальное исследование, в ходе которого воспроизведена модель кислород-индуцированной ретинопатии (КИР) у крысят, перспективная для изучения патогенеза ретинопатии недоношенных (РН) и поиска новых подходов к ее профилактике и лечению. Установлено, что в условиях развития КИР на всех сроках наблюдения в стекловидном теле повышено содержание общего белка, с максимумом на 14-е сутки, а также отмечается фазность изменений уровня антиокислительной активности (АОА) в стекловидном теле: на 7-е сутки у крысят с КИР она не отличается от контроля, на 14-е сутки становится выше контрольного уровня в 6,4 раза, а на 18-е сутки (после окончания действия кислорода) снижается, однако по-прежнему превышает норму. Полученные данные свидетельствуют о нарушении проницаемости гематоретинального барьера в условиях развития КИР, подтверждают важную роль окислительного стресса в патогенезе РН, а также актуальность коррекции его параметров путем включения антиоксидантов в комплексную терапию РН и необходимость дифференцированного подхода к срокам их назначения.

Ключевые слова: ретинопатия недоношенных, экспериментальное моделирование, патогенез, гематоретинальный барьер, окислительный стресс.

Российский офтальмологический журнал, 2016; 1: 68–72

Ретинопатия недоношенных (РН) — тяжелое вазопролиферативное заболевание, приводящее к необратимым нарушениям зрительных функций у детей. Патогенез РН до сих пор до конца не изучен и носит сложный многофакторный характер [1].

Известно, что важную роль в развитии заболевания играет окислительный стресс [2–4] и ключевым фактором, запускающим патологический процесс при РН, являются колебания степени оксигенации крови недоношенных детей на этапах выхаживания. Условно процесс развития заболевания делят на две фазы: фазу задержки физиологического роста ретинальных сосудов в направлении к зубчатой линии и фазу патологической вазопролиферации [5]. В ряде экспериментальных работ показано, что активные

формы кислорода способствуют развитию первой фазы РН посредством прямого цитотоксического действия на клетки эндотелия сосудов, а также путем инициации начальной фазы вазоконстрикции, что в комплексе приводит к снижению тканевой перфузии [6]. Следует также отметить, что незрелая сетчатка недоношенных детей чрезвычайно чувствительна к воздействию кислорода, поскольку, во-первых, клетки сетчатки в норме обладают высокими темпами потребления кислорода и крайне чувствительны как к его недостатку, так и к избытку, во-вторых, ткань сетчатки содержит высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот — известных субстратов реакций перекисного окисления, а в-третьих, сетчатка в силу своего функционального назначения

практически постоянно подвергается воздействию света — активного инициатора формирования активных форм кислорода. Повреждающее действие кислорода потенцируется также в силу того, что защитные свойства антиоксидантной системы недоношенных детей значительно снижены [7].

Большой вклад в изучение патогенеза РН вносит экспериментальное моделирование заболевания. Одной из самых «популярных» среди исследователей является модель кислород-индуцированной ретинопатии (КИР) у крысят, поскольку течение последней обладает большим сходством с РН у детей: под влиянием эпизодов гипероксии у крысят отмечается облитерация преимущественно периферических сосудов, в то время как, например, в модели КИР у мышат в патологический процесс первыми вовлекаются центральные сосуды. Кроме того, развитие патологического процесса у крысят так же, как у детей, носит двухфазный характер [8]. Следует также отметить, что сетчатка и ее сосудистая сеть у крысят на момент рождения являются глубоко незрелыми и сравнимы с таковыми у 24–26-недельного плода человека [9, 10]: в норме сосуды сетчатки крысят достигают зубчатой линии лишь к 14–15-м суткам после рождения [11, 12]. К числу несомненных плюсов модели также можно отнести относительно большую численность пометов — в среднем 10–18 крысят, что повышает достоверность результатов экспериментов, а также относительно низкую стоимость и малый размер животных [11].

Важно подчеркнуть, что развитие КИР у крысят обусловлено именно создаваемыми в ходе эксперимента перепадами уровня подаваемого кислорода, что основывается на данных исследований, согласно которым уровень кислорода в крови недоношенных детей подвержен частым колебаниям в первые две недели жизни [13–15], что приводит к дисбалансу сосудистых ростовых факторов у недоношенных детей и развитию РН. Подобные колебания являются, вероятно, результатом развивающихся эпизодов

гипоксии вследствие апноэ, бронхопальмональной дисплазии и других респираторных и метаболических осложнений [16]. Существуют различные модификации модели КИР у крысят, отличающиеся между собой схемами подачи кислорода (циклическостью колебаний и уровнем подаваемого кислорода) в первые две недели жизни животных, в разной степени копирующими подобные колебания оксигенации крови недоношенных детей.

ЦЕЛЬЮ работы стало воспроизведение модели РН и оценка содержания общего белка и антиоксидантного потенциала в стекловидном теле крысят с КИР на разных этапах ее развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Крысята породы Вистар вместе с родившей их самкой, начиная с первых суток после рождения, на 2 недели помещались в инкубатор, где каждые 12 ч концентрация кислорода менялась от 60 до 15 % (рис. 1).

Затем крысята помещались в условия с нормальным содержанием кислорода (21 %). На всем протяжении эксперимента в помещении поддерживался постоянный температурный (+26 °С) и световой (12 часов — день, 12 часов — ночь) режим. Контрольную группу составили крысята, находившиеся с момента рождения в условиях с нормальным содержанием кислорода.

Крысята выводились из эксперимента на 7 (N = 4), 14 (N = 4) и 18-е (N = 4) сутки. Всем крысятам в указанные сроки проводилась бинокулярная энуклеация (рис. 2), после чего глазное яблоко вскрывалось по лимбу (рис. 3), удалялся хрусталик и с помощью фильтровальной бумаги производился забор образцов стекловидного тела (рис. 4).

Компоненты стекловидного тела элюировали фосфатным буфером pH7,4 в соотношении 1:50 и в каждом образце стекловидного тела определяли антиокислительную активность (АОА) по параметрам кинетики хемилюминесценции в модельной



Рис. 1. Крысята опытной группы в инкубаторе.

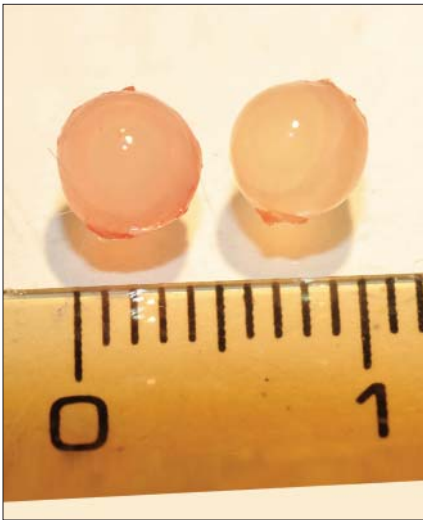


Рис. 2. Энуклеированные глазные яблоки 14-дневных крысят.

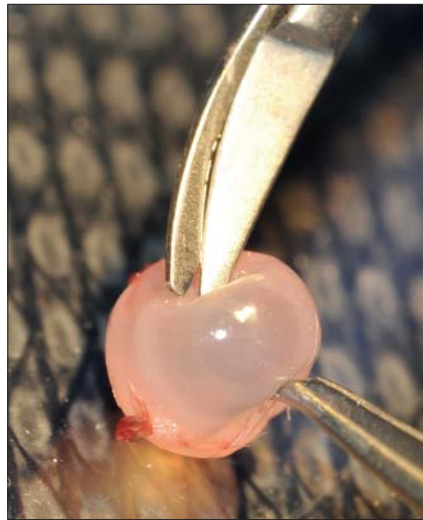


Рис. 3. Вскрытие глазного яблока.

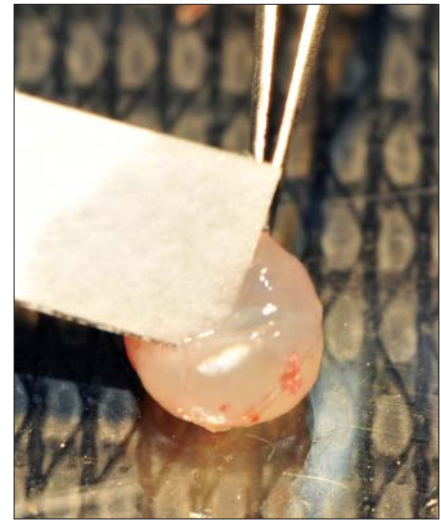


Рис. 4. Получение образца стекловидного тела с помощью фильтровальной бумаги.

системе гемоглобин- H_2O_2 -люминол и концентрацию общего белка по Лоури [17, 18]. Для калибровки АОА использовали тролокс (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman) и выражали ее в эквивалентной концентрации тролокса.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета Excel. Достоверность различий между группами животных оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2.

Как видно из таблицы 1, у крысят контрольной группы содержание общего белка в стекловидном теле на 7-е сутки после рождения было практически

Таблица 1. Концентрация общего белка в стекловидном теле крысят, мг/мл

Срок после рождения	Контрольная группа	Опытная группа
7-е сутки	4,75 ± 0,54	7,01 ± 1,06*
14-е сутки	2,38 ± 0,29	6,71 ± 1,94*
18-е сутки	2,77 ± 0,43	5,38 ± 1,55*

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,01$.

Таблица 2. Уровень антиокислительной активности в стекловидном теле крысят, мкМ тролокса

Срок после рождения	Контрольная группа	Опытная группа
7-е сутки	29,25 ± 8,88	33,5 ± 13,5
14-е сутки	47,75 ± 16,56	307,25 ± 90,41*
18-е сутки	75,60 ± 16,22	155,36 ± 22,95*

Примечание. * — достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,01$.

вдвое выше, чем в последующие сроки наблюдения. Поскольку данный показатель можно рассматривать в качестве индикатора проницаемости стенок кровеносных сосудов сетчатки, полученные результаты можно объяснить незаконченным к данному сроку формированием гематоретинального барьера. Кроме того, еще одним источником белка в стекловидном теле может являться еще функционирующая система гиалоидных сосудов, инволюция которой окончательно завершается на более поздних сроках.

Сравнительный анализ уровня общего белка в стекловидном теле крысят двух групп показал, что данный показатель у опытных крысят существенно превышал таковой у крысят контрольной группы: на 7-е сутки — в 1,5 раза, на 14-е сутки — почти в 3 раза и на 18-е сутки — в 2 раза. Это можно объяснить тем, что при КИР, помимо описанной незрелости гематоретинального барьера, имеют место выраженные нарушения его структуры и функции на всех сроках наблюдения с максимумом на 14-е сутки, что согласуется с данными литературы [19, 20].

Общая тенденция к снижению содержания общего белка в стекловидном теле в динамике в обеих группах крысят может объясняться постепенным созреванием структуры гематоретинального барьера, а также отчасти, возможно, инволюцией гиалоидных сосудов в процессе постнатального развития.

АОА в стекловидном теле крысят контрольной группы постепенно нарастала в динамике, что можно объяснить естественными процессами созревания и совершенствования системы защиты от свободно-радикального воздействия. У крысят с КИР АОА на 7-е сутки не отличалась от контроля, но на 14-е сутки становилась выше контрольного уровня в 6,4 раза. На 18-е сутки (после окончания действия кислорода) АОА так же, как и содержание белка, снижалась, однако по-прежнему превышала норму.

Полученные данные подтверждают фазность течения КИР. В течение первой недели, несмотря на повышенную по сравнению с контролем проницаемость гематоретинального барьера, АОА не увеличивалась, возможно, в силу «расходования» плазменных антиоксидантов на связывание свободных радикалов, содержание которых в этот период возрастает. Значительное увеличение АОА на второй неделе может быть связано с поступлением компонентов антиокислительной системы в стекловидное тело из патологически измененной ретинальной сосудистой сети, что подтверждается значительным увеличением в этот период содержания общего белка в стекловидном теле. Кроме того, определенный вклад может вносить возможное увеличение синтеза антиоксидантов *in situ* в самой сетчатке (таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, мелатонин и др. [21]) в ответ на развивающийся окислительный стресс. Последующее снижение АОА у крысят опытной группы на 18-е сутки говорит скорее не об уменьшении интенсивности процессов перекисного окисления и начавшейся нормализации состояния стенок сосудов сетчатки, а о возросших затратах антиоксидантов в борьбе с активными формами кислорода, поскольку сохраняющаяся высокая концентрация белка в стекловидном теле свидетельствует о том, что проницаемость гематоретинального барьера по-прежнему остается нарушенной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспроизведена модель КИР на крысятах, по условиям проведения эксперимента (подача переменных концентраций кислорода) и характеру течения (фазность) максимально приближенная к клинике РН и перспективная для изучения различных аспектов патогенеза заболевания и возможности влияния на них.

Полученные в эксперименте данные свидетельствуют о выраженных нарушениях гематоретинального барьера в условиях развития КИР и важной роли окислительного стресса в этиопатогенезе РН, подтверждая патогенетически обусловленную обоснованность назначения антиоксидантов при ее развитии. Следует отметить, что на основании подтвержденной в нашем эксперименте фазности течения КИР можно сделать вывод о важности дифференцированного подхода к выбору сроков их назначения, в частности возможной неэффективности и необоснованности их применения в период всплеска уровня АОА на фоне патологической вазопротекции.

Очевидно, наиболее перспективными для профилактики и лечения РН являются препараты, способные, помимо антиоксидантного действия, оказывать влияние на другие звенья патогенеза РН. Это обеспечит их независимость от фазы заболевания, а также позволит повысить эффективность

при низких дозах и, соответственно, более высоким уровне безопасности, что крайне важно для соматически отягощенных недоношенных детей, учитывая ранний неоднозначный опыт применения антиоксидантов [5].

Литература/References

1. Слепова О.С., Катаргина Л.А., Гвоздюк Н.А., Белова М.В. Влияние системной продукции ростовых факторов (VEGF и IGF-I) на течение заболевания у детей с ретинопатией недоношенных. Российский офтальмологический журнал. 2011; 4(4): 60–6.
Slepova O.S., Katargina L.A., Gvozdyuk N.A., Belova M.V. The effect of systemic production of growth factors (VEGF and IGF-I) on the disease course in children with retinopathy of prematurity. Russian Ophthalmological Journal. 2011; 4(4): 60–6 (in Russian).
2. Сидоренко Е.И., Асташева И.Б., Кан И.Г. и др. Ретроспективный анализ факторов риска ретинопатии недоношенных. Российская педиатрическая офтальмология. 2010; (1): 13–6.
Sidorenko E.I., Astasheva I. B., Kan I. G., et al. The retrospective analysis of risk factors for retinopathy of prematurity. Russian Pediatric Ophthalmology. 2010; (1): 13–6 (in Russian).
3. O'Donovan D.J., Fernandes C.J. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6(1): 169–76.
4. Garg U., Jain A., Singla P., et al. Free radical status in retinopathy of prematurity. *Ind J Clin Biochem.* 2012; 27(2): 196–9.
5. Hartnett M.E., Penn J.S. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(26): 2515–26.
6. Dorfman A.L., Polosa A., Joly S., Chemtob S., Lachapelle P. Functional and structural changes resulting from strain differences in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50(5): 2436–50.
7. Saito Y., Geisen P., Uppal A., Hartnett M.E. Inhibition of NAD(P)H oxidase reduces apoptosis and avascular retina in an animal model of retinopathy of prematurity. *Mol. Vis.* 2007; 13: 840–53.
8. Grossniklaus H.E., Kang S.J., Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog. Retin. Eye Res.* 2010; 29(6): 500–19.
9. Dorfman A., Dembinska O., Chemtob S., Lachapelle P. Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the neonatal rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(1): 458–66.
10. Dorfman A.L., Cuenca N., Pinilla I., Chemtob S., Lachapelle P. Immunohistochemical evidence of synaptic retraction, cytoarchitectural remodeling, and cell death in the inner retina of the rat model of oxygen-induced retinopathy (OIR). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(3): 1693–708.
11. Barnett J.M., Yanni S.E., Penn J.S. The development of rat model of retinopathy of prematurity. *Doc. Ophthalmol.* 2010; 120(1): 3–12.
12. Zhang W., Ito Y., Berlin E., Roberts R., Berkowitz B.A. Role of hypoxia during normal retinal vessel development and in experimental retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(7): 3119–23.
13. Cunningham S., McColm J.R., Wade J., et al. A novel model of retinopathy of prematurity simulating preterm oxygen variability in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41(13): 4275–80.
14. Geisen P., Peterson L.J., Martiniuk D., et al. Neutralizing antibody to VEGF reduces intravitreal neovascularization and may not interfere with ongoing intraretinal vascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Mol. Vis.* 2008; 14: 345–57.
15. Liu K., Akula J.D., Falk C., Hansen R.M., Fulton A.B. The Retinal Vasculature and Function of the Neural Retina in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47(6): 2639–47.
16. Hartnett M.E. Studies on the pathogenesis of avascular retina and neovascularization into the vitreous in peripheral severe retinopathy of prematurity (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2010; 108: 96–119.

17. Гулидова О.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Чеснокова Н.Б. Изменение антиокислительной активности слезной жидкости при экспериментальной ожоговой болезни глаз. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 128(11): 571–4.
Gulidova O.V., Lubitsky O.B., Klebanov G.I., Chesnokova N.B. Changes of antioxidant activity in tears in experimental eye burns. Bulletin' Experimental'noy Biologii i Meditsiny. 1999; 128(11): 571–4 (in Russian).
18. Lowry O., Rozebrough N., Farr A., Randell R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Bio Chem. 1951; 193: 265–75.
19. Berkowitz B.A., Roberto K.A., Penn J.S. The vitreous protein concentration is increased prior to neovascularization in experimental ROP. Curr Eye Res. 1998; 17: 218–21.
20. Zhang Sarah X., Ma Jian-xing, Sima Jing, et al. Genetic Difference in Susceptibility to the Blood-Retina Barrier Breakdown in Diabetes and Oxygen-Induced Retinopathy. AJP. 2005; 166(1): 313–21.
21. Wiechmann A.F., Summers J.A. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. Prog. Retin. Eye Res. 2008; 27(2): 137–60.

An experimental Study of the Pathogenesis of Retinopathy of Prematurity as a Promising Direction of Search for New Medicinal Approaches to its Prevention and Treatment

L.A. Katargina, N.B. Chesnokova, O.V. Beznos, N.A. Osipova, B.V. Viter

Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia
natashamma@mail.ru

An experimental study was performed to reproduce the model of oxygen-induced retinopathy (OIR) in young rats. This model is promising for the study of the pathogenesis of retinopathy of prematurity (ROP) and for the search of new approaches to the prevention and treatment of the disease. It was found that the total protein content in the vitreous was increased during OIR at all observation times, with a maximum reached on the day 14. The phasal character was revealed in the changes of the level of antioxidant activity (AOA): on the day 7 AOA of rats with OIR is no different from the control, on the day 14, it becomes 6.4 times higher than the reference level, and on the day 18 (when the oxygen is no more active) it is falling but still remains higher than the norm. These findings suggest that the permeability of the blood-retinal barrier is damaged during OIR, and confirm the important role of oxidative stress in the pathogenesis of ROP, the advisability of the correction of its parameters by introducing antioxidants in the combined treatment of ROP, and the need for a differentiated approach to the times of their application.

Keywords: retinopathy of prematurity, experimental modeling, pathogenesis, blood-retinal barrier, oxidative stress.

Russian Ophthalmological Journal, 2016; 1: 68–72

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