МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

*На правах рукописи*

РЖАВИНА ЕКАТЕРИНА МИХАЙЛОВНА Роль простагландинового звена каскада арахидоновой кислоты в развитии ишемического повреждения сетчатки у крыс

Специальность: 03.03.01 - Физиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент Гаврилова Светлана Анатольевна

Москва, 2019 год

**Оглавление**

[Введение 5](#bookmark1)

[Глава 1. Обзор литературы 12](#bookmark12)

1. [Основные структуры глаза 12](#bookmark13)
2. [Особенности строения глаза крысы 15](#bookmark17)
	1. [Жидкости глаза и его кровоснабжение 17](#bookmark20)
		1. [Кровоснабжение глаза и его регуляция 17](#bookmark21)
			1. [Нарушение кровоснабжения глаза при сахарном диабете 20](#bookmark23)
		2. [Секреция внутриглазной жидкости и ее регуляция 25](#bookmark25)
		3. [Барьеры 28](#bookmark27)
		4. [Отток внутриглазной жидкости 33](#bookmark28)
	2. [Функциональная активность сетчатки 35](#bookmark30)
	3. [Повреждающее действие ишемии на сетчатку 43](#bookmark33)
	4. [Анализ моделей ишемии сетчатки 49](#bookmark35)

[Глава 2. Материал и методы исследования 54](#bookmark37)

1. [Объект исследования 54](#bookmark38)
2. [Ишемическая модель воспаления сетчатки глаза 55](#bookmark41)
3. [Премедикаментация и постмедикаментация 56](#bookmark43)
4. [Интравитреальное введение препарата 57](#bookmark45)
5. [Объемы и дозы препаратов 57](#bookmark47)
6. [Протокол эксперимента модели необратимой ишемии глаза 57](#bookmark49)
7. [Моделирование сахарного диабета 58](#bookmark51)
8. Протокол эксперимента модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 59
9. [Морфологическое исследование глаза крысы 60](#bookmark53)
10. [Морфологические критерии 61](#bookmark55)
11. [Офтальмоскопия 63](#bookmark57)
12. [Электроретинография 66](#bookmark59)
13. [Иммуногистохимия 70](#bookmark61)
14. [ОТ-ПЦР 71](#bookmark64)
15. [Статистическая обработка результатов 74](#bookmark66)

[Глава 3. Результаты и обсуждение 75](#bookmark67)

1. Сравнительный анализ ишемического повреждения сетчатки на морфологическом, офтальмоскопическом и функциональном уровне в моделях необратимой ишемии и на фоне сахарного диабета 75
2. Общее состояние животных 75
3. [Морфологический анализ состояния сетчатки при ишемии 77](#bookmark72)
4. [Офтальмоскопические изменения при ишемии сетчатки 81](#bookmark74)
5. [Сравнение функциональной активности ишемизированной сетчатки в двух моделях 83](#bookmark76)
6. [Обсуждение результатов оценки ишемического повреждения сетчатки в моделях необратимой ишемии и сахарного диабета 89](#bookmark79)
7. [Иммуногистохимическая оценка экспрессии циклооксигеназ при](#bookmark80)

[ишемии сетчатки 96](#bookmark82)

1. [Обсуждение результатов иммуногистохимической оценки экспрессии циклооксигеназ 99](#bookmark81)
2. [ОТ-ПЦР анализ ферментов воспалительного каскада при ишемии сетчатки 102](#bookmark86)
3. Обсуждение результатов экспрессии мРНК ферментов каскада арахидоновой кислоты 105
4. [Результаты оценки ишемического повреждения сетчатки в модели](#bookmark89) [необратимой ишемии на фоне блокады каскада арахидоновой кислоты.. 107](#bookmark89)
5. Общее состояние животных в модели необратимой ишемии на фоне блокаторов каскада арахидоновой кислоты 107
6. [Гистологическая оценка ишемического повреждения сетчатки при](#bookmark91) [необратимой ишемии на фоне блокаторов каскада арахидоновой кислоты .. 110](#bookmark91)
7. [Офтальмоскопические изменения при необратимой ишемии на фоне блокаторов каскада арахидоновой кислоты 115](#bookmark95)
8. [Оценка функциональных нарушений в модели необратимой ишемии сетчатки на фоне блокаторов каскада арахидоновой кислоты 119](#bookmark97)
9. [Обсуждение результатов оценки ишемического повреждения сетчатки](#bookmark98)

на фоне блокаторов каскада арахидоновой кислоты 121

[Глава 4. Заключение 126](#bookmark100)

[Выводы 128](#bookmark102)

[Список сокращений 130](#bookmark104)

[Список литературы 132](#bookmark106)

**Введение**

Актуальность работы и степень ее разработанности

Ишемия сетчатки может сопровождать такие офтальмологические заболевания, как макулярные дегенеративные заболевания, глаукома или быть самостоятельным заболеванием [168]. Системные заболевания - атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь и сахарный диабет - могут вызывать нарушения микроциркуляторного кровотока сетчатки глаза, гипоксию и ишемию тканей глаза [1]. Доля ретинопатий сосудистого генеза составляет 34,7­54,9% от общего количества заболеваний сетчатки и зрительного нерва [2]. К 2025 году по данным ВОЗ ожидается увеличение данной цифры за счет роста числа сердечно-сосудистых заболеваний.

Медленное и незаметное развитие клинических симптомов приводит к незаметной потере зрения пациентами, так как они легко адаптируются к сужению полей зрения и другим нарушениям, поэтому ишемию сетчатки диагностируют при значительном нарушении функции клеток, которое часто является необратимым. Современные терапевтические подходы направлены на возобновление и улучшение кровотока и часто оказываются малоэффективными [126]. Терапии, поддерживающей жизнеспособность клеток сетчатки во время ишемии не разработано. Поэтому результаты исследований, определяющих ключевые механизмы ишемического повреждения нейронов сетчатки, являются актуальными.

Фосфолипаза А2 в ответ на ишемию увеличивает продукцию арахидоновой кислоты и ее метаболитов. Показано, что в сетчатке в норме присутствуют две изоформы циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2) - ключевые ферменты биосинтеза простагландинов [84]. В норме они локализованы в слое ганглионарных клеток, внутреннем плексиформном, внутреннем ядерном, наружном ядерном слоях, а ЦОГ2 дополнительно в наружном плексиформном. ЦОГ и синтезируемые простагландины влияют на функции нейронов сетчатки и участвуют в кровоснабжении глаза и регуляции внутриглазных жидкостей [56, 170]. Спектр и концентрация продуцируемых клеткой простагландинов зависит от изо формы фермента ЦОГ, ЦОГ1 или ЦОГ2, и наличия разных простагландинсинтаз. ЦОГ1 считается конститутивной изоформой, выполняющей регуляторную функцию в здоровых клетках. Экспрессия ЦОГ2 увеличивается в ответ на ишемию, развитие воспаления и при других патологических процессах, активность этого фермента существенно выше, чем ЦОГ1. При воспалении и ишемии изменяется спектр секретируемых простагландинов. Как правило, в ткани и крови увеличивается концентрация простагландина Е2 и снижается простагландина D2 [10]. Исследования, касающиеся роли простагландинов в глазу фрагментарны, в основном направлены на изучение эффектов различных простагландинов на отдельные клетки сетчатки in vitro.

Нами проведено комплексное, многоуровневое исследование, которое нацелено на изучение роли простагландинового звена арахидоновой кислоты в развитии ишемического поражения сетчатки в экспериментах in vivo.

Цель исследования

Исследовать признаки ишемического повреждения сетчатки глаза у крыс с необратимой ишемией глаза и на фоне сахарного диабета, определить роль простагландинового звена метаболизма арахидоновой кислоты в развитии ишемического повреждения сетчатки.

Задачи исследования:

1. Сравнить морфологические признаки ишемического повреждения сетчатки и глазного дна в моделях необратимой ишемии и сахарного диабета.
2. Сравнить изменения электрофизиологической активности сетчатки у крыс с необратимой ишемией глаза и при сахарном диабете.
3. Оценить уровень продукции белка циклооксигеназ 1 и 2 в отдельных слоях сетчатки и хориоидеи при ишемии глаза, а также на фоне блокатора фосфолипазы А2, триамцинолона, и неселективного ингибитора циклооксигеназ, лорноксикама.
4. Оценить экспрессию мРНК генов циклооксигеназ 1 и 2, простагландин D2 и Е2-синтаз в витреоретинальном блоке при ишемии глаза и на фоне блокаторов фосфолипазы А2 и циклооксигеназ.
5. Изучить влияние блокаторов циклооксигеназ и фосфолипазы А2 на динамику офтальмоскопических показателей и морфо-функциональное состояние сетчатки в модели ишемии глаза.

Положения, выносимые на защиту

1. Длительная ишемия при видимой сохранности структуры сетчатки приводит к неравномерному угасанию ее функции: менее устойчивыми к ишемии являются ее внутренние слои, а более устойчивыми - наружные, включающие фоторецепторы.
2. Признаки ишемического повреждения сетчатки глаза на фоне сахарного диабета аналогичны нарушениям при моделировании необратимой ишемии, их развитие по сравнению с ишемической моделью замедленно.
3. Появление волнообразных и розеточных структур в ответ на интравитреальную инъекцию на фоне ишемии зависит от активации простагландинового звена каскада арахидоновой кислоты: его ингибирование предотвращает развитие данных морфологических изменений.
4. Длительная сохранность структур при блокаде простагландинового звена связана со снижением продукции ЦОГ2 и, вероятно, повышением активности простагландин Е2-синтазы, которая может выполнять нейропротекторную функцию.

Научная новизна полученных результатов

Впервые проведен сравнительный анализ состояния сетчатки у крыс с длительной ишемией и с длительным диабетом на морфологическом и функциональном уровне. Также впервые исследовано в динамике изменение продукции белков ЦОГ при необратимой ишемии глаза и показано, что ингибиторы фосфолипазы А2 и циклооксигеназ, примененные в острые сроки развития ишемии, изменяют спектр экспрессируемых воспалительных белков, а также уровень мРНК циклооксигеназ и простагландинсинтаз даже в отдаленные сроки развития ишемии.

Впервые было показано, что ингибитор циклооксигеназ значительно улучшает морфо-функциональное состояние сетчатки в ишемической модели по сравнению с блокатором фосфолипазы А2 за счет снижения уровня мРНК и белка ЦОГ2, что указывает на важнейшую роль простагландинового звена метаболизма арахидоновой кислоты в ишемическом повреждении сетчатки, особенно на ранней стадии. Дополнительно, впервые было показано, что интравитреальная инъекция при ишемии глаза является отягчающим фактором развития патологии и не рекомендуется для назначения пациентам с ишемией сетчатки глаза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты существенно расширяют представления о механизмах повреждения сетчатки во время ишемии. Так было показано, что необратимая ишемия сетчатки приводит к крайне медленному нарушению функций сетчатки и постепенному угасанию толщины ее слоев.

В настоящем исследовании показано, что во время развития ишемии глаза в витреоретинальном блоке (комплекс тканей сетчатки и стекловидного тела) активируется продукция мРНК белков, принимающих участие в биосинтезе простагландинов. Ингибитор циклооксигеназ, примененный в острую фазу ишемии, способен значительно изменить дальнейший профиль продукции белка циклооксигеназ и мРНК циклооксигеназ и простагландин синтаз, что улучшает морфо-функциональные характеристики сетчатки ишемизированного глаза крыс. Полное ингибирование каскада арахидоновой кислоты вызывает кратковременное улучшение всех показателей состояния глаза, а затем резкое ухудшение до состояния контрольного глаза с интравитреальным введением физиологического раствора.

Полученные результаты позволяют рассматривать простагландиновое звено метаболизма арахидоновой кислоты как дополнительную мишень терапии ишемических состояний глаза. Применение глюкокортикостероидов (в частности, триамцинолона) в офтальмологической практике требует дополнительной осторожности.

Стоит отметить, что ишемия является отягчающим фактором для интравитреальной инъекции, а, следовательно, данный способ введения не рекомендуется для пациентов с подозрением на ишемию или выявленную патологию. Применение предложенной мишени терапии потребует разработки новых способов доставки препаратов.

Методология и методы исследования

Для того, чтобы всесторонне охарактеризовать состояние сетчатки при ишемии использовали комплекс методов. Гистологический метод был использован в качестве базовой стандартной методики, для которой были разработаны специальные алгоритмы анализа. Офтальмоскопический метод позволял оценить состояние сосудов сетчатки, при этом важными достоинствами метода являются его неинвазивность и возможность оценки в динамике. Электроретинографический метод позволял оценить функцию клеток сетчатки.

Для решения поставленной задачи о характеристике продукции ферментов воспалительного каскада были применены два метода - ПЦР и иммуногистохимический, так как продукция мРНК не позволяет однозначно судить о продукции белка.

Степень достоверности данных

Разработанные алгоритмы анализа морфологических и офтальмоскопических данных позволяют оценить описательные признаки ишемического повреждения сетчатки глаза с помощью статистических методов анализа, что повышает их объективность. В исследовании использованы современные стандартные экспериментальные методики, позволяющие оценить состояние сетчатки глаза при ишемии. Методы статистического анализа, примененные в работе, подобраны с учетом характера факторов, размера выборок и числа повторяющихся измерений. Результаты доложены на российских и зарубежных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на 11 конференциях, таких как XI Научно-практическая конференция «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии — 2013» (Москва, 2013), 112. DOG-Kongress der Deutschen Ophtalmologischen Gesellschaft (Лейпциг, Германия, 2014), Актуальные проблемы патофизиологии: XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием (Санкт-Петербург, 2015), Нейронаука для медицины и психологии: 11 Международный междисциплинарный конгресс (Судак, 2015), X Международная конференция "Микроциркуляция и гемореология (клиника и эксперимент: из лаборатории к постели больного)" (Ярославль, 2015), 113. DOG- Kongress "Audenheilkunde - grundladenbasiert und interdisziplinar" (Берлин, Германия, 2015), VI Всероссийская с международным участием школа- конференция по физиологии кровообращения (Москва, 2015), DOG-Kongress 2016 „Augenheilkunde - ein groBes Fach“ (Берлин, Германия, 2016), III Всероссийская конференция с международным участием Клинические и теоретические аспекты современной медицины - 2018 (Москва, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе, 5 статей, из них 1 - в журнале, индексируемом Scopus, 2 - в журналах, индексируемых Web of Science и RSCI, 1 - в рецензируемом журнале из списка ВАК РФ.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, выполнении экспериментов, анализе и статистической обработке результатов, обобщении полученных данных, подготовке тезисов и представлении результатов работы на всероссийских и международных конференциях, написании статей.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований (включающих описание материала и методов, результатов и их обсуждения), заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 149 страницах компьютерного текста, содержит 10 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 185 источников, из них 6 отечественных и 179 зарубежных.

Выводы

1. В модели необратимой ишемии признаки ишемического повреждения сетчатки и сосудов глазного дна развивались с первых суток после окклюзии. При сахарном диабете аналогичные нарушения появлялись на 66 сутки и соответствовали признакам 7-х суток необратимой ишемии.
2. Функциональные нарушения сетчатки в двух моделях имели особенности. В модели сахарного диабета наиболее выражено увеличение латентности b- волны колбочкового ответа. При необратимой ишемии снижалась амплитуда b-волны максимального и колбочкового ответов. При электроретинографическом исследовании в двух моделях снижался ответ на ритмическую стимуляцию.
3. Развитие ишемического повреждения сетчатки приводило к снижению продукции ЦОГ1. Блокатор ФЛ А2 и ингибитор ЦОГ не повлияли на продукцию ЦОГ1. Продукция ЦОГ2 увеличивалась с 7 суток после окклюзии. Блокатор ФЛ А2 на 7 сутки снижал продукцию ЦОГ2. Ингибитор ЦОГ на 56 сутки увеличивал продукцию ЦОГ2 в наружном ядерном слое.
4. Необратимая ишемия сетчатки крыс сопровождалась статистически значимым повышением мРНК генов ЦОГ1 и простагландин D2-синтазы в течение всего исследования и повышением ЦОГ2 и простагландин Е2-синтазы с 7 суток. Блокатор ФЛ А2 стимулировал продукцию ЦОГ 2 и простагландин Е2- синтазы на всех сроках. Ингибитор ЦОГ приводил к увеличению продукции мРНК только простагландин Е2-синтазы.
5. Блокада фосфолипазы А2 и ингибитор ЦОГ замедляли угасание внутренних слоев сетчатки и снижали отек сетчатки на 7 сутки. Улучшения, вызванные блокатором ФЛ А2, носили кратковременный характер и не отразились на функциональной активности сетчатки. Ингибитор ЦОГ замедлял окклюзию капилляров сетчатки и увеличивал амплитуду b-волны электрических ответов сетчатки.

Блокада простагландинового звена метаболизма арахидоновой кислоты в ранние сроки развития ишемии препятствует активации ЦОГ2 даже в отставленный период и способствует длительной сохранности сетчатки, что подтверждается результатами офтальмоскопических и морфо­функциональных исследований.