

ФИЗИОЛОГИЯ СЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

**ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕТЧАТКИ
ПРИ РАЗВИТИИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ
У КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ИНЪЕКЦИИ
КОНКАНАВАЛИНА А И ДИСПАЗЫ**

© А. К. Ердяков, М. В. Тихонович, Е. М. Ржавина, С. А. Гаврилова

Факультет фундаментальной медицины
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия
E-mail: alexey.erdyaakov@ya.ru

В данной статье рассмотрены и обсуждены преимущества двух способов моделирования пролиферативной витреоретинопатии на крысах: с помощью протеолитического фермента диспазы и провоспалительного лектина конканавалина А. Впервые выбраны четкие морфологические критерии оценки состояния сетчатки с учетом динамики воспалительного ответа. Произведено сравнение влияния на сетчатку интравитреальной инъекции диспазы и конканавалина на 7-е сутки после введения препаратов. Сделан вывод об использовании различных доз диспазы и оптимальных сроках формирования устойчивой модели пролиферативной витреоретинопатии.

Ключевые слова: сетчатка, пролиферативная витреоретинопатия, диспаза, конканавалин А, воспаление.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 101. № 5. С. 572—585. 2015

A. K. Erdyaikov, M. V. Tikhonovich, E. M. Rzhavina, S. A. Gavrilova. THE CHARACTERISTICS OF RETINA AT THE DEVELOPMENT OF PROLIFERATIVE VITREORETINOPATHY IN RATS AFTER INTRAOCULAR INJECTION OF CONCAVALIN A AND DISPASE. Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: alexey.erdyaikov@ya.ru.

In this article we review and discuss the advantages of two proliferative vitreoretinopathy models in rats: intravitreal injection of proteolytic enzyme dispase and proinflammatory lectin concanavalin A. For the first time we selected clear morphological criteria for the retina evaluation during the inflammatory response. We also compared the effects of the injection of dispase and concanavalin on the 7th day after the drugs administration. We conclude that different doses of dispase can be used to get a stable model of PVR on different periods after the injection procedure.

Key words: retina, proliferative vitreoretinopathy, dispase, concanavalin A, inflammation.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 101. N 5. P. 572—585. 2015

Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) возникает при регматогенной отслойки сетчатки (РОС) вследствие травмы и как осложнение хирургического вмешательства [5]. ПВР характеризуется пролиферацией клеток пигментного эпителия (ПЭС), глиальных клеток, макрофагов и фибробластов на поверхности сетчатки, их миграцией в стекловидное тело и образованием соединительно-тканых мембран [28]. Клеточная подвижность приводит к формированию складчатости и отслоению сетчатки с ее выраженным укорочением. Показано влияние витреальных факторов роста и цитокинов на пролиферацию и миграцию клеток ПЭС [9, 22, 23, 26]. Ясно, что воспаление играет ключевую роль в развитии ПВР, может являться пусковой точкой развития заболевания и быть причиной постоперационных осложнений.

В настоящее время ПВР моделируют введением в стекловидное тело разных типов клеток: мононуклеаров, клеток ПЭС [1, 2, 13, 18]; проведением хирургических манипуляций с глазом [7, 8]; введением ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс — диспазы, коллагеназы [6, 14, 29]. Перечисленные модели отражают ключевые причины развития ПВР. Хирургические модели рассматривают в качестве начала процесса травмы сетчатки, а внутриглазное введение клеток инициирует развитие ПВР с той стадии процесса, на которой эти клетки уже присутствуют в соединительно-тканых мембранах. Использование диспазы и коллагеназы приводит к воспалительной реакции, сопровождающейся сильной деструкцией сетчатки и гемофтальмом. В литературе нет однозначной характеристики изменения сетчатки глаза при развитии ПВР: основным критерием заболевания считают появление ретинальных мембран, далее изучается их клеточный состав и другие характеристики; ранние стадии развития заболевания, как правило, не рассматривают.

Важной задачей настоящего исследования мы видим разработку четких морфологических критериев изменения сетчатки глаза при развитии пролиферативных заболеваний в острую стадию и хронический период заболевания. Для этого нами впервые отработана диспазная модель ПВР на крысах и впервые предложена неописанная ранее в литературе конканавалиновая модель развития ПВР, заключающаяся во внутриглазном введении лектина конканавалина А.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на самцах крыс линии Вистар с начальной массой 443 ± 44 ($n = 35$) и 354 ± 110 ($n = 60$) в конканавалиновой и диспазной моделях соответственно. В работе соблюдали регламент, определенный приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977, эксперименты разрешены комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова. Все манипуляции, инъекции и энуклеацию глаз проводили на глубоко наркотизированных хлоралгидратом (400 мг/кг) крысах. Все животные получали инстилляцию следующих препаратов: тропикамид 0.5 % — для расширения зрачка, антисептик витабакт 0.05 % и анальгетик Алкаиин 0.5 %.

Конканавалин А вводили интравитреально в концентрации 0.1 г/мл в объеме 5 мкл в правый глаз стерильно (группа КонА). Для учета объемной нагрузки вводимого препарата и внутриглазного вмешательства в левый глаз вводили раствор 0.9%-ного хлорида натрия эквивалентно. Всего исследовали 7 групп: интактный контроль (ИК, $n = 5$) и 6 экспериментальных групп по 5 крыс в каждой по срокам взятия глаз на 1, 2, 3, 4, 5 и 7-е сутки после инъекции конканавалина А.

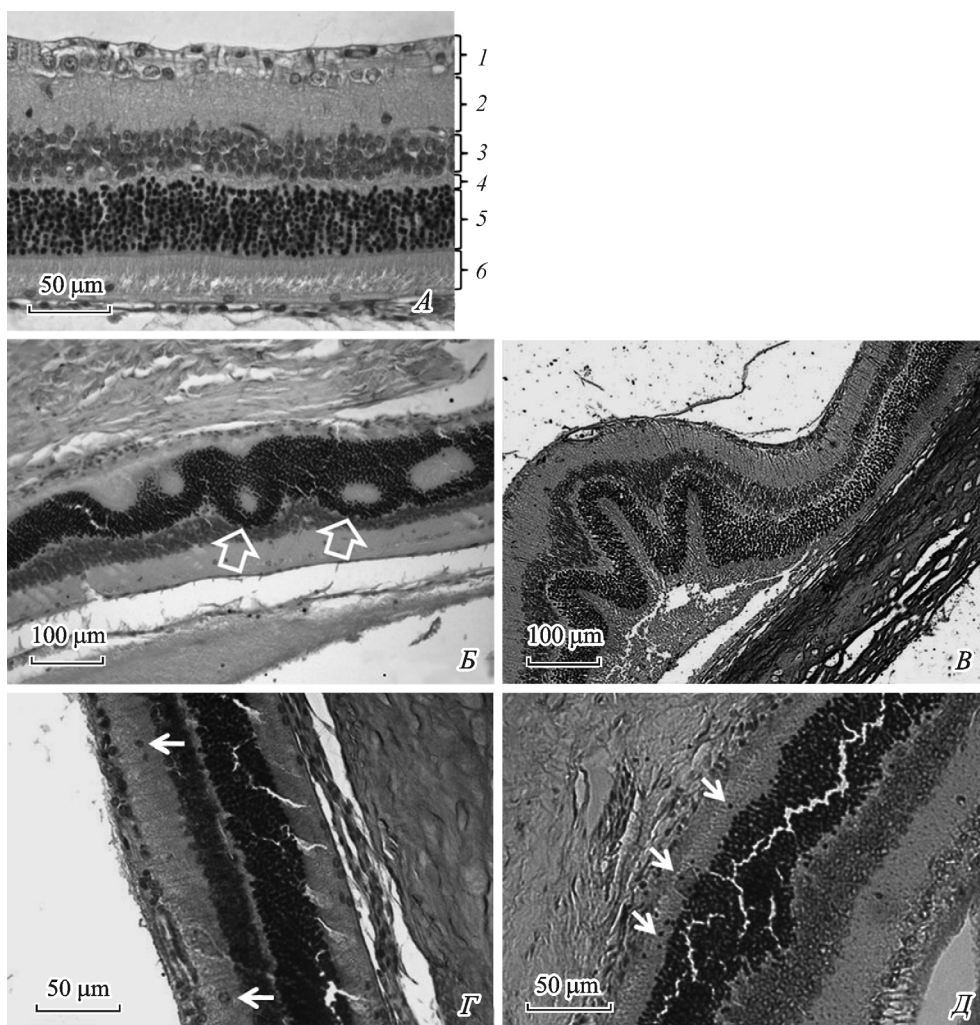


Рис. 1. *А* — интактный контроль. Принцип оценки толщины слоев сетчатки. 1 — слой ганглиозных клеток и слой нервных волокон (СГН); 2 — внутренний плексиформный слой (СВП); 3 — внутренний ядерный слой (СВЯ); 4 — наружный плексиформный слой (СНП); 5 — наружный ядерный слой (СНЯ); 6 — слой палочек и колбочек (СПК); *Б* — деструктивные изменения сетчатки на 5-е сутки после интравитреального введения конканавалина *А*: формирование розеток (отмечены *стрелками*), утолщение наружного ядерного слоя, дистрофия слоя палочек и колбочек; *Б'* — ундулирующие изменения сетчатки через 7 суток после интравитреального введения диспазы; *Г* — миграция клеток «вверх» (отмечены *стрелками*) через 1 неделю после интравитреального введения диспазы; *Д* — миграция клеток «вниз» (отмечены *стрелками*) через 1 неделю после интравитреального введения конканавалина *А*.

В диспазной модели исследовали 5 групп животных: группа интактного контроля, группа с интравитреальной инъекцией 2 мкл 0.9%-ного раствора NaCl в правый глаз и 3 группы с внутриглазным введением диспазы объемом 2 мкл в концентрациях 0.03U (группа Д1), 0.07U (группа Д2) и 0.15U (группа Д3) соответственно. Энуклеацию глаз проводили на 1-, 6- и 8-й неделях эксперимента.

Морфологические исследования. Глаз фиксировали целиком в оригинальном фиксаторе Дэвидсона [21], проводку и заливку в парафин выполняли по стандартным методикам. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином или азаном по Генденгайну стандартно. Фотографировали, анализировали и измеряли выбранные параметры в программе AxioVision.

Выбор морфологических критериев оценки состояния сетчатки был проведен с учетом динамики воспалительного ответа с 1-х по 7-е сутки после внутриглазной инъекции конканавалина А и с 7-х суток по 8-ю неделю после внутриглазной инъекции диспазы.

Пик воспалительной реакции после инъекции конканавалина приходился на 3-и сутки. Каждый слой сетчатки может реагировать на введение препарата изолированно без изменения ее общей толщины. Принцип оценки толщины каждого слоя показан на рис. 1, А.

Параметр «деструктивные изменения» введен для отражения общих патологических изменений сетчатки. В него включены: формирование «розеток», локальная дегенерация слоев сетчатки, дистрофия и атрофия сетчатки или ее отдельных слоев (рис. 1, Б, В).

Волнистые (ундулирующие) изменения характерны для наружного ядерного слоя (СНЯ) и наружного плексиформного слоя (СНП) слоев сетчатки и сопровождают воспалительную реакцию в хроническом периоде. Для оценки тяжести изменений введены два параметра: протяженность волнистого участка в процентах от общей длины сетчатки (длина сетчатки является общей протяженностью сетчатки, измеренной на поперечном срезе), максимальная и усредненная амплитуды волны ундулирующих изменений (рис. 1, В).

Как правило, воспаление после инъекции конканавалина приводило к отслоению сетчатки. Для стандартизации измерений определяли отношение длины отслоения сетчатки к ее общей длине.

Параметр «миграция» обозначает появление ядер, окрашенных аналогично ядрам наружного ядерного слоя, в СНП и слой палочек и колбочек (СПК) и ядер, окрашенных аналогично ядрам внутреннего ядерного слоя (СВЯ), в СНП и внутренний плексиформный слой (СВП) (рис. 1, Г, Д). Термин ввели S. Gartner, P. Henkind [15] в 1981 г. как явление миграции клеток СНЯ, сопровождающее дегенерацию сетчатки; термин принят нами условно как дополнительный критерий воспалительной реакции.

Статистическую обработку результатов проводили в программах Microsoft Excel 2011, Statistica 8.0. Результаты представлены в виде медианных значений. Для оценки межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Различия признавали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внешний осмотр глаз показал, что инъекция конканавалина А или диспазы приводит к развитию воспаления, зрительно характеризующегося полнокровием сосудов радужки, отеком конъюнктивы. Визуально регистрировали развитие катаракты и гемофтальма (рис. 2, А, Б, В). Введение физиологического раствора (ФР) не вызывает подобных изменений. После инъекции конканавалина А на 3-и и 5-е сутки наблюдали максимальное количество катаракт — 5 глаз из 5 в обеих группах, у животных с инъекцией диспазы максимальный катарактогенез у 4 крыс из 5 регистрировали в группе Д2 на 7-е сутки. Инъекция конканавалина А на 7-е сутки приводила к развитию катаракт у 2 крыс из 5. Максимальное регистрируемое число гемофтальмов —

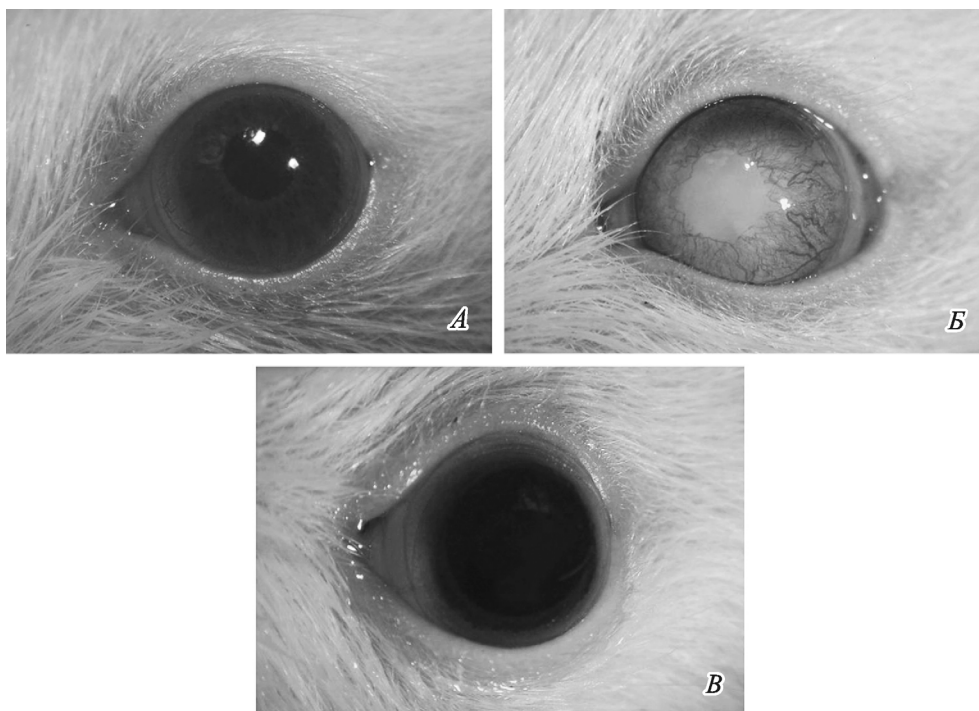


Рис. 2. Внешний осмотр глаза.

A — глаз без патологий, группа интактного контроля; *B* — катарактогенез через 4 суток после интравитреального введения конканавалина *A*; *B* — гемофтальм через 6 недель после интравитреального введения 0.07U диспазы, группа Д2.

1 глаз из 5 — в конканавалиновой модели приходится на 1-е и 7-е сутки после введения. Общая частота встречаемости катаракт и гемофтальмов после инъекции конканавалина *A* составила 23 крысы из 30 и 2 крысы из 35 соответственно. В диспазной модели гемофтальмы на 7-е сутки в группах Д1, Д2 возникают у 1 крысы из 5 и в группе Д3 в 2 из 4 случаев. Также в диспазной модели гемофтальмы зарегистрировали у 2 из 4 крыс на 8-й неделе после инъекции фермента в максимальной дозе. В общем в диспазной модели катаракты в группе Д1 наблюдали у 3 крыс из 15, в группе Д2 у 10 крыс из 14, в группе Д3 у 8 крыс из 13. Гемофтальмы формировались у 2 крыс из 15 в группе Д1, у 2 крыс из 14 в группе Д2 и у 4 крыс из 13 в группе Д3.

Интравитреальное введение ФР через неделю провоцирует увеличение общей толщины сетчатки (ОТС) за счет утолщения всех слоев, кроме слоя ганглиозных клеток и слоя нервных волокон (СГН). На шестой неделе различия с интактным контролем нивелируются. В этой группе через 8 недель после инъекции обнаружили единственный случай тотальной отслойки сетчатки без структурных изменений слоев.

Динамика изменений сетчатки глаза после инъекции конканавалина. Весь период наблюдений после инъекции конканавалина *A* можно разделить на два временных отрезка: 1—3-и сутки, когда наблюдается значительное увеличение толщины слоев сетчатки, и 4—7-е сутки, когда толщина слоев сетчатки начинает постепенно уменьшаться, наблюдается прогрессирование ундулирующих изменений, и различимы деструктивные изменения, поддающиеся классификации.

Через 24 ч после инъекции выявили значимое в 1.46 раза ($p = 0.025$) увеличение толщины СВП в измененном участке сетчатки по сравнению с неизменным сегментом. Толщина СПК и СНП сетчатки в неизменном сегменте снизилась на 37 и 32 % соответственно по сравнению с группой, получавшей инъекции ФР ($p = 0.027$ и $p = 0.014$). На вторые сутки наблюдали статистически значимое истончение на 19 % ($p = 0.028$) СНП в неизменном участке сетчатки по сравнению с группой, получавшей инъекции ФР.

На 4-е сутки развития воспаления происходит уменьшение толщины СВП сетчатки в неизменном сегменте на 14 % ($p = 0.027$) и увеличение СГН в 1.72 раза ($p = 0.014$) в измененном участке сетчатки. Для пятых суток эксперимента характерно общее утолщение сетчатки в измененном сегменте (исключая ПЭС) в 1.4 раза ($p = 0.028$) по сравнению с группой, получавшей инъекции ФР. Причем толщина СВЯ в измененном участке сетчатки выросла по сравнению с неизменным участком в 1.42 раза ($p = 0.028$); толщина наружного СНЯ, СВП и СГН сетчатки в измененном сегменте увеличилась по сравнению со значениями контрольной группы в 1.56, 1.7 и 1.89 раза соответственно ($p = 0.009$ для всех перечисленных слоев).

Аналогично сравнивали толщины слоев в измененном и неизменном участках сетчатки по сравнению с группой ИК (рис. 3, А, Б).

К 5-м суткам протяженность измененного участка сетчатки увеличивалась и достигала 48.5 % от общей ее протяженности. Начиная с 4—5-х суток эксперимента только в группах с инъекцией конканавалина А обнаруживали нарушения структуры слоев (рис. 1, Б). Наибольшее многообразие указанных деструктивных изменений наблюдали на 7-е сутки после инъекции конканавалина А. «Розетки» затрагивают, как правило, СНЯ и СПК. «Розеточные» структуры формировались у 1 крысы из 5 в группе КонА, еще у 1 крысы в этой группе были окончательно сформировавшиеся «розетки». В диспазной модели подобные изменения наблюдали у 1 крысы из 5 и 4 в группах Д2 и Д3 (рис. 1, В).

Со временем происходило как увеличение длины нефункциональной части сетчатки, так и числа особей, у которых наблюдались данные изменения: на 4-е сутки — у 1 из 4 крыс, на 5-е и 7-е сутки — у 4 из 5 крыс. Оценка показателя «отслоение сетчатки» в эти сроки развития воспалительной реакции не информативна.

У всех крыс, которым вводили конканавалин А, наблюдали ядра клеток, находящиеся не «в своих» слоях сетчатки. Подобное явление в литературе обозначается словом «миграция». На 2, 5 и 7-е сутки после введения конканавалина миграцию выявляли у 5 крыс из 5 (рис. 1, Д). В сетчатке глаз животных с инъекцией ФР на 5-е сутки миграция выявлена только у 2 крыс из 5. На 4-е и 7-е сутки в группе с инъекцией ФР явление миграции не обнаружили. В то же время явление миграции было выявлено у 2 интактных крыс из 5.

Изменение сетчатки на 7-е сутки после инъекции конканавалина А и диспазы. Седьмые сутки от начала развития патологии — переходная точка от острой стадии заболевания к хроническому течению, она является общей для диспазной и конканавалиновой моделей и позволяет нам выполнить сравнительный анализ. На 7-е сутки после инъекции диспазы длина измененной сетчатки и протяженность ундулирующих изменений зависели от дозы вводимого фермента: 32.93 % в группе Д1, 60.32 % в группе Д2 и 86.3 % в группе Д3. Волнистость занимала от 14.67, 25.99 до 47.48 % длины сетчатки в группах Д1, Д2 и Д3 соответственно. При инъекции конканавалина А средняя протяженность волнистых изменений в этот срок увеличилась до 62.51 % у 4 крыс из 5.

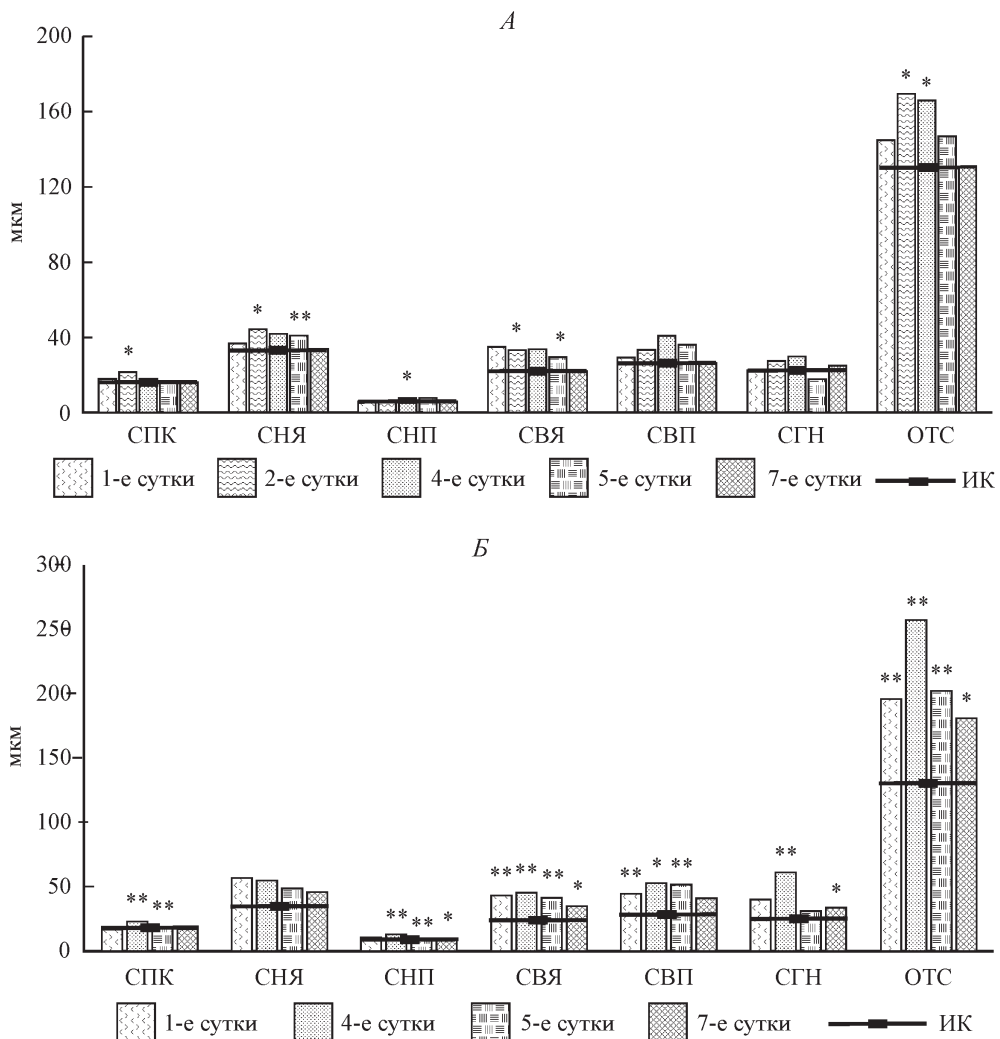


Рис. 3. А — толщина слоев сетчатки в неизменном участке в группах с интравитреальным введением конканавалина А. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с толщиной аналогичных слоев в группе ИК; Б — толщина слоев сетчатки в измененном участке в группах конканавалина А. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с толщиной аналогичных слоев в группе ИК.

Сравнение толщины слоев неповрежденного участка сетчатки между группами КонА, Д1, Д2 и Д3 показало, что СГН в группе КонА толще, чем у животных Д1 ($p = 0.043$) и Д2 ($p = 0.033$), и одинаков с Д3. Толщина остальных слоев в неповрежденном участке сетчатки при сравнении диспазных групп с группой КонА достоверно не отличалась. Введение диспазы приводило к увеличению толщины СПК и уменьшению толщины СГН.

В поврежденном участке сетчатки толщина слоев была практически одинаковой у групп Д1 и КонА. У группы Д3 толщина СВЯ достоверно меньше толщины этого же слоя в группе КонА ($p = 0.043$). Толщина слоев СПК и СВП в поврежденном участке сетчатки достоверно больше в группе Д2 по сравнению с группой КонА ($p = 0.049$ и $p = 0.03$ соответственно), при этом в

группе Д2 по сравнению с группой КонА статистически значимо больше и ОТС ($p = 0.049$).

Миграция клеток СНЯ «вниз», к наружной части сетчатки, максимальна у групп Д2 и Д3 и составляет 75 % животных. В группе КонА у 60 %, а в группе Д1 50 % крыс обнаружена миграция «вниз» (рис. 1, Д). Миграция клеток СНЯ «вверх» максимальна в группе КонА — 80 % животных. В группах Д2 и Д3 она равна 75 %, а в группе Д1 — 50 % (рис. 1, Г). Явлению миграции подвергается и СВЯ: миграция его ядер «вниз» встречается у 75 % животных в группе Д3, у 25 % — в группе Д2 и у 50 % — в группе ФР, в остальных группах отсутствует. Миграция клеток СВЯ «вверх» максимальна в группах Д2 и КонА у 100 %, в группе Д3 и у контрольных крыс 75 %, в группе Д1 у 50 % животных обнаружено это явление.

Через 7 суток после моделирования ПВР на поверхности сетчатки обнаружены фибротические изменения у 2 крыс из 4 в группе Д1, у 2 из 5 в группе Д2 и у 3 из 4 в группе Д3. Аналогичные изменения с «тянущим» компонентом наблюдали у 4 крыс из 5 в группе КонА, у 2 крыс выявили значительные структурные изменения сетчатки. Возможно, это начало формирования эпиретинального фиброза. В области под эпиретинальными мембранами сетчатка увеличена в размерах: происходит разрастание глиальных клеток в СГН и СВЯ, увеличивается толщина СВП.

Итак, на седьмые сутки эксперимента две используемые модели, конканавалиновая и диспазная, обнаруживают общие морфологические признаки изменения сетчатки.

Признаки ПВР в хронический период через 6 и 8 недель после инъекции рассматривали на диспазной модели. Внутриглазная инъекция диспазы в минимальной дозе на шестой неделе в неизмененных участках приводит к уменьшению ОТС на 26 % ($p = 0.03$) в группе Д1 и на 4.6 % в группе Д2 ($p < 0.001$) в основном за счет уменьшения СГН в 1.97, в 1.7 и 1.56 раза ($p < 0.05$) в группах Д1, Д2 и Д3 соответственно.

В измененном сегменте сетчатки минимальная доза фермента за счет утолщения всех слоев кроме СНЯ вызывает общее утолщение сетчатки. Увеличение дозы фермента приводит к деградации слоя фоторецепторов и СГН.

В целом на шестой неделе эксперимента минимальная доза фермента вызывает значительное увеличение СПК в 6.4 раза ($p = 0.02$) и вследствие этого общей толщины сетчатки в 2.4 раза ($p = 0.006$). Максимальная доза фермента на 6-й неделе эксперимента ведет к значительному увеличению слоев — СВЯ в 1.6 раза ($p = 0.04$), СВП в 1.5 раза ($p = 0.005$) и уменьшению СГН в 1.2 раза ($p = 0.02$) (рис. 4, А).

К 6-й неделе после введения диспазы в сетчатке формируются «розеточные» структуры, которые застрагивают СНЯ, либо наружный ядерный и внутренний ядерный слои, у 100 % крыс в группе Д1, у 40 % в группе Д2 и у 60 % в группе Д3. У контрольных крыс подобных изменений не наблюдали. Явление миграции на 6-й неделе встречается у 75—100 % во всех группах, получивших внутриглазную инъекцию диспазы, затрагивает СНЯ и СВЯ и имеет направление «вверх».

Высокие дозы фермента (0.07U и 0.15U) к 8-й неделе приводят к ремоделированию сетчатки до состояния, которое позволяет оценить ОТС, но не дает возможности выделить отдельные ее слои. В связи со значительной деструкцией затруднительно оценить наличие «розеток» во всех группах и явление миграции в группе Д3. В группах Д1 и Д2 явление миграции наблюдали у всех крыс в основном в СВЯ по направлению «вверх».

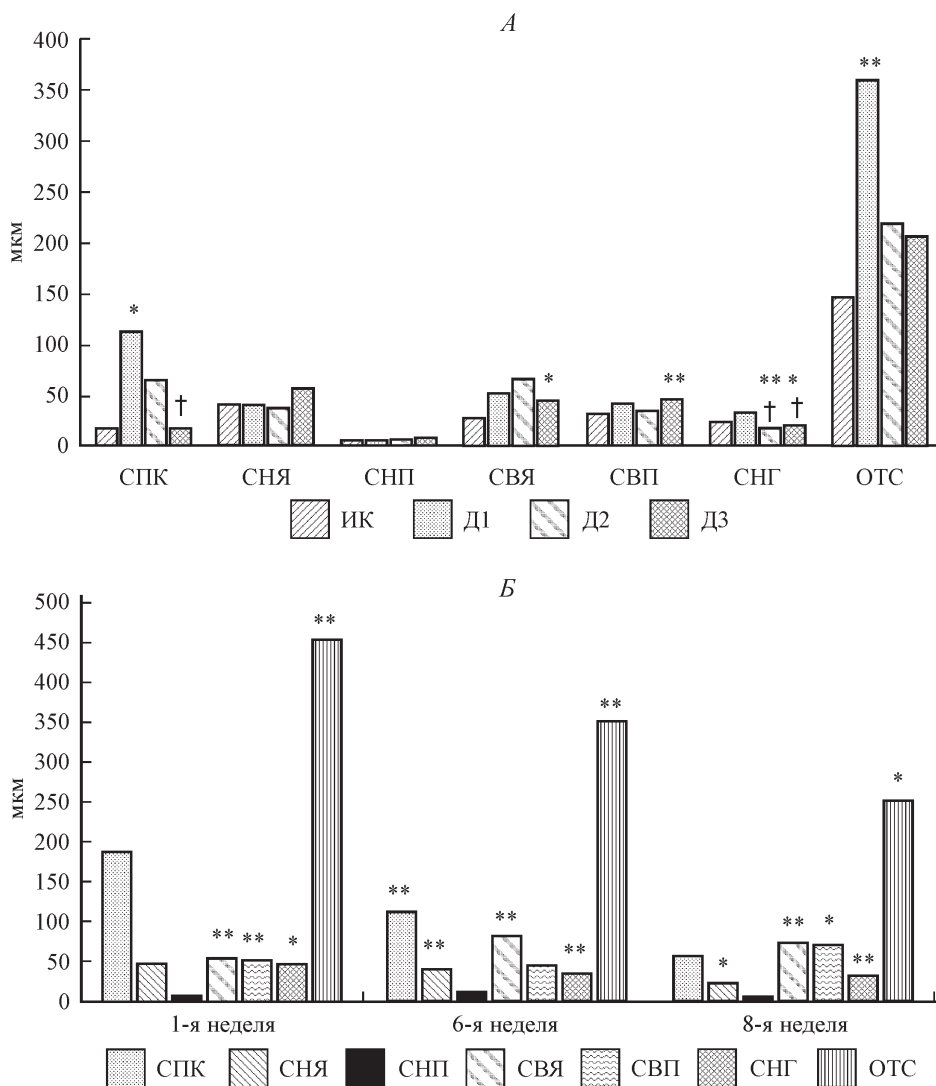


Рис. 4. А — изменение толщины слоев сетчатки при интравитреальном введении диспазы в различной концентрации на сроке 6 недель. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с группой интактного контроля, † $p < 0.05$ по сравнению с группой Д1; Б — толщина слоев сетчатки под эпиретинальной мембраной в группах с интравитреальным введением диспазы. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с участками сетчатки, расположенными вне мембран.

Эпиретинальные мембраны начинают формироваться уже через неделю после введения диспазы в витреальную полость глаза. Так минимальная доза фермента в 20 % случаев вызывает образование мембран, 50 и 75 % — частота развития в группах Д2 и Д3 соответственно. На шестой неделе в группе Д1 мембраны наблюдаются в 100 % случаев и в 67 % — на 8-й неделе. В группе Д2 у 40 % животных обнаружили эпиретинальные мембраны на 6-й неделе и у 67 % — на 8-й неделе. Сильное повреждение структуры сетчатки в группе Д3 не позволяет точно оценить наличие эпиретинальных мембран на 6-й и 8-й неделе.

Развитие мембран на поверхности сетчатки приводит к изменению всех нижележащих слоев сетчатки. На первой неделе увеличиваются в основном внутренние слои: СВЯ в 1.7 раза ($p < 0.001$), СВП в 1.2 ($p = 0.04$) и СГН в 2.4 раза ($p = 0.003$) по сравнению с соответствующими слоями сетчатки в участках без эпиретинальных мембран. На шестой неделе эксперимента происходит утолщение всех слоев сетчатки кроме СНЯ, который уменьшился на 7.6 % ($p = 0.009$). К 8-й неделе он истончается на 47 %, при этом все внутренние слои сетчатки статистически значимо увеличены (рис. 4, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ клинических работ и результатов модельных экспериментов показал, что основную роль в инициации и развитии пролиферативной витреоретинопатии играет воспаление, причем активность воспалительной реакции увеличивает вероятность развития заболевания. Результаты исследования Р. Girard и соавт. [16] показали, что ранняя стадия заболевания является провокационным моментом при проведении операций на сетчатке глаза. В модельных экспериментах ПВР инициируют введением в стекловидное тело разных типов клеток, проведением хирургических манипуляций с глазом, введением протеолитических ферментов и т. д. Для постановки диагноза ПВР необходимо наличие фиброза в заднем отделе глаза. В модельных экспериментах изучают процесс ремоделирования также на поздних стадиях развития заболевания, когда мембраны сформированы. Как правило, исследования касаются состава мембран, характеристики трансформации клеток, формирующих фиброз, и некоторых систем регуляции воспаления. Нужно учесть, что модели с введением клеток в стекловидное тело инициируют ПВР с той стадией заболевания, на которой эти клетки присутствуют в мембранах. Пролиферативный процесс в организме затрагивает различные типы клеток, и их пролиферация в образовании мембран не является первым звеном патологического процесса, т. е. механизмы инициации на таких моделях изучать невозможно. Операционные модели позволяют оценить постоперационные осложнения и могут быть использованы для решения узких задач. Интравитреальное введение диспазы сопровождается выраженным нарушением гематофтальмического барьера, что соответствует клинической картине заболевания, но не дает возможности детально изучить роль клеточного компонента в процессе инициации ПВР, поэтому нами разработана новая лектиновая модель. Инъекция конканавалина А провоцирует псевдоаллергическую реакцию, начало процесса организуют провоспалительные факторы [6, 14, 29] и активация лимфоцитов различных групп [11, 24, 27]. Эта модель позволяет выработать критерии, оценивающие динамику деструктивных изменений сетчатки глаза в острую стадию развития заболевания.

В наших экспериментах в конканавалиновой модели, как в диспазной, и, согласно данным литературы, в моделях интравитреального введения различных клеток [1, 2, 6, 14, 18, 19, 29] происходит формирование эпиретинальных мембран. На 7-е сутки эксперимента на морфологических препаратах выявлен тракционный компонент, и признаки развития заболевания в этой временной точке во многом похожи в двух моделях — конканавалиновой и диспазной, что дает нам право рассмотреть инициацию развития заболевания на конканавалиновой модели (рис. 5, А, Б).

Для полного обсуждения полученных результатов следует отметить, что интравитреальное введение физиологического раствора является травматич-

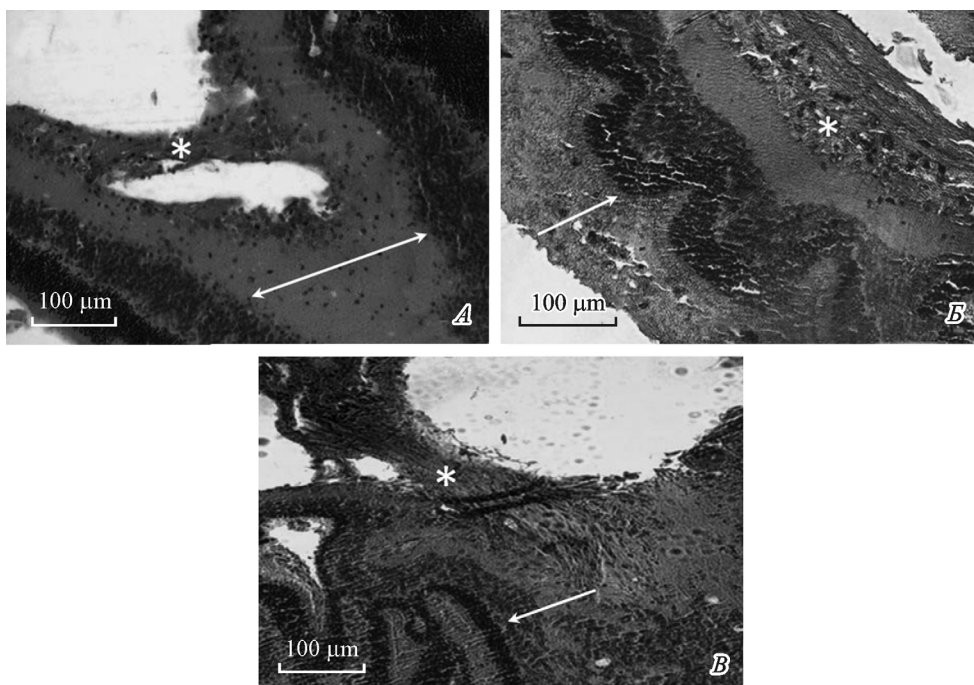


Рис. 5. *А* — «тянущее усилие» (отмечено *звездочкой*), сформированное через 7 суток после введения конканавалина *А*; *Б* — эпиретинальная мембрана (отмечена *звездочкой*) через 1 неделю после введения 0.03U диспазы, группа Д1; *В* — эпиретинальная мембрана (обозначена *звездочкой*) через 6 недель после введения 0.03U диспазы, группа Д1. *Стрелками* обозначена сетчатка.

ной процедурой. Прокол глазного яблока и введение жидкости — это не просто воздействие объемом, а нарушение целостности гематофтальмического барьера, и наличие единичного случая невысокой отслойки сетчатки в группе ФР без структурных изменений слоев — допустимое осложнение при использовании введения вещества внутрь глаза, которое отмечается во всех инструкциях по проведению данной манипуляции [4]. Но, поскольку прокол иглой служит отдельным провокационным фактором для инициации воспаления и пролиферации, динамику заболевания будем оценивать по сравнению с интактным контролем.

Основным эффектом внутриглазной инъекции конканавалина *А* в острый период оказалось увеличение толщины некоторых слоев сетчатки, причем изолированно реагируют измененные и не задетые деструкцией регионы сетчатки. Поскольку толщина СНЯ, СВП и СГН в измененном участке сетчатки к 5-м суткам после введения конканавалина *А* больше, чем у интактных животных и чем у животных, получавших ФР, увеличение толщины скорее вызвано пролиферацией глиальных клеток, чем отеком, и влечет за собой общее увеличение толщины сетчатки. Особое внимание следует обратить на активацию пролиферации в СГН и наблюдаемое уплотнение кортикальных слоев стекловидного тела, что можно рассматривать как начальный этап развития ПВР.

Общей точкой пересечения для двух используемых нами моделей являются 7-е сутки. Нарушение проницаемости гематофтальмического барьера в

случае введения диспазы достаточно выражено и реализуется гемофтальмом. В группе с введением диспазы в минимальной и средней дозах частота возникновения гемофтальма практически соответствует данному оценочному параметру для групп с введением конканавалина. При введении конканавалина в переднюю камеру глаза препарат стимулировал образование катаракт [17]. При его введении в задний отдел глаза в большинстве глаз также развиваются катаракты. Введение диспазы также провоцирует катарактогенез. Однако частота развития катаракт в группах Д2 и Д3 превышает частоту развития катаракт в группе КонА.

На 7-е сутки эксперимента пролиферация СГН в неизменном участке сетчатки после введения конканавалина А статистически одинакова с группой, получившей инъекцию диспазы в максимальной дозе. В поврежденном участке сетчатки толщина слоев неразличима у групп Д1 и КонА. Процессы, запускаемые диспазой в глазу, приводят к апоптозу, отеку с последующим некрозом и дегенерацией наружной части фоторецепторов. Это в свою очередь приводит к истончению СНЯ, СНП. Увеличение протяженности и частоты встречаемости волнистых изменений сетчатки со временем после введения конканавалина А и наличие «розеточных» структур также можно считать устойчивым признаком ремоделирования сетчатки как в группе в ответ на введение конканавалина А, так и в диспазной модели ПВР, что соответствует данным литературы [6]. Протяженность волнистых изменений на 7-е сутки после введения конканавалина А больше, чем в диспазных группах вне зависимости от введенной дозы фермента. Это может быть объяснено активацией аутоиммунных процессов после введения конканавалина, поскольку он является индуктором псевдоаллергической реакции, поэтому патогистологическая картина после инъекции конканавалина напоминает таковую в модели аррестинового аутоиммунного увеита на крысах [3].

Отдельно следует рассмотреть явление «миграции». Мы описали клетки, окрашенные как ядра СНЯ либо как ядра СВЯ, находящиеся при этом «не на своем месте». В литературе подобное явление, сопровождающее дегенерацию сетчатки человека, было описано ранее для клеток СНЯ [15]. Можно рассматривать это явление и как интраретинальную пролиферацию, встречающуюся при отслойке сетчатки и ее пролиферативных заболеваниях [12, 20], и как миграцию ядер клеток Мюллера [25], и даже как регенерацию фоторецепторов из клеток Мюллера после их дегенерации [30]. Так или иначе рассматриваемое явление связано с функциональным ремоделированием сетчатки в ответ на ее повреждение, в том числе в ответ на РОС [10]. Явление миграции в наших экспериментах встречается чаще в группах с введением диспазы/конканавалина, чем после введения физиологического раствора. Данные показывают, что на 7-е сутки воздействие конканавалина А на миграцию клеток СНЯ и СВЯ «вниз» и «вверх» ближе всего к воздействию диспазы в средней дозировке.

Неделя — недостаточный срок для развития полноценной картины ПВР, однако уже на 7-е сутки эпиретинальные мембраны обнаруживали как после введения конканавалина, так и после введения диспазы во всех дозировках. Частоты встречаемости эпиретинальных мембран в конканавалиновой модели и при введении средней и максимальной доз диспазы на 7-е сутки эксперимента были одинаковыми. В диспазной модели увеличение длительности эксперимента приводило к повышению частоты встречаемости эпиретинальных мембран и их площади. Чем больше была доза вводимого фермента, тем более выражены были фиброз и изменения сетчатки, вплоть до полной ее деструкции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в острый период развития ПВР основными признаками заболевания являются изменения толщины слоев сетчатки глаза, появление ундулирующих и розеточных структур. На 7-е сутки эксперимента как в диспазной, так и в конканавалиновой моделях возникают первые признаки развития соединительно-тканых мембран. В диспазной модели выраженность заболевания зависит от дозы и срока развития. Для моделирования пролиферативной витреоретинопатии у крыс нужно интравитреально вводить диспазу в дозе 0.03U, и срок шесть недель от момента инъекции достаточен для оценки состояния сетчатки в этой модели. Явление миграции сопровождается обе модели в течение всего эксперимента. Последствия введения конканавалина А в дозировке 0.5 мг на 7-е сутки больше всего напоминают воздействие диспазы в дозе 0.15U. В течение 1 недели после введения конканавалина возможно использовать выделенные нами признаки для оценки острого ответа сетчатки на развитие внутриглазного воспаления и для регистрации начального этапа развития ПВР.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-01318.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Запускалов И. В., Кривошеина О. И. Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии. Патент RU 2182369.
- [2] Хорошилова И. П., Илатовская Л. В., Строева О. Г., Сологуб А. А., Киселева О. А., Бабижаев М. А., Ганковская Л. В. Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии. Патент RU 2161335.
- [3] Agarwal R. K., Silver P. B., Caspi R. R. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol. Biol.* 2012. Т. 900. — С. 443—469. 900 : 443—460. 2012.
- [4] American Academy of Ophthalmology. POLICY STATEMENT. Intravitreal Injections. 2008.
- [5] Aylward G. W. Chapter 6. Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. Mosby. 2008.
- [6] Canto Soler M. V., Gallo J. E., Dodds R. A., Suburo A. M. A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. *Exp. Eye Res.* 75 (5) : 491—504. 2002.
- [7] Chinn C., Spee C., Barron E., Ryan S. J., Hinton D. R. Strain-dependent gene expression in a lens extraction PVR model. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 46. 2005.
- [8] Cleary P. E., Ryan S. J. Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. II. Histology of wound, vitreous, and retina. *Br. J. Ophthalmol.* 63 (5) : 312—321. 1979.
- [9] Cui J., Lei H., Samad A., Basavanthappa S., Maberley D., Matsubara J., Kazlauskas A. PDGF receptors are activated in human epiretinal membranes. *Exp. Eye. Res.* 88 (3) : 438—444. 2009.
- [10] de Souza C. F., Kalloniatis M., Polkinghorne P. J., McGhee C. N., Acosta M. L. Functional and anatomical remodeling in human retinal detachment. *Exp. Eye. Res.* 97 (1) : 73—89. 2012.
- [11] Dwyer J. M., Johnson C. The use of concanavalin: A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 46 (2) : 237—249. 1981.
- [12] Eibl K. H., Lewis G. P., Betts K., Linberg K. A., Gandorfer A., Kampik A., Fisher S. K. The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 48 (3) : 1305—1311. 2007.
- [13] Fastenberg D. M., Diddie K. R., Sorgente N., Ryan S. J. A comparison of different cellular inocula in an experimental model of massive periretinal proliferation. *Am. J. Ophthalmol.* 93 (5) : 559—564. 1982.
- [14] Frenzel E. M., Neely K. A., Walsh A. W., Cameron J. D., Gregerson D. S. A new model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39 (11) : 2157—2164. 1998.

- [15] *Gartner S., Henkind P.* Aging and degeneration of the human macula. 1. Outer nuclear layer and photoreceptors. *Br. J. Ophthalmol.* 65 (1) : 23—28. 1981.
- [16] *Girard P., Mimoum G., Karpouzas I., Montefiore G.* Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina.* 14 : 417—424. 1994.
- [17] *Gwon A., Mantras C., Gruber L., Cunanan C.* Concanavalin A-induced posterior subcapsular cataract: a new model of cataractogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 34 (13) : 3483—3488. 1993.
- [18] *Hui Y. N., Goodnight R., Sorgente N., Ryan S. J.* Fibrovascular proliferation and retinal detachment after intravitreal injection of activated macrophages in the rabbit eye. *Am. J. Ophthalmol.* 108 (2) : 176—184. 1989.
- [19] *Hui Y. N., Sorgente N., Ryan S. J.* Posterior vitreous separation and retinal detachment induced by macrophages. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 225 (4) : 279—284. 1987.
- [20] *Johnsen E. O., Froen R. C., Albert R., Omdal B. K., Sarang Z., Berta A., Nicolaissen B., Petrivski G., Moe M. C.* Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Exp. Eye Res.* 98 : 28—36. 2012.
- [21] *Latendresse J. R., Warbritton A. R., Jonassen H., Creasy D. M.* Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30 (4) : 524—533. 2002.
- [22] *Lei H., Hovland P., Velez G., Haran A., Gilbertson D., Hirose T., Kazlauskas A.* A potential role for PDGF-C in experimental and clinical proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 48 (5) : 2335—2342. 2007.
- [23] *Lei H., Rheaume M. A., Kazlauskas A.* Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp. Eye Res.* 90 (3) : 376—381. 2010.
- [24] *Lei H. Y., Chang C. P.* Lectin of concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *J. Biomed. Sci.* 2009. T. 16. — C. 10. 16 : 19. 2009.
- [25] *Lewis G. P., Chapin E. A., Luna G., Lindberg K. A., Fisher S. K.* The fate of Muller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. *Mol. Vis.* 16 : 1361—1372. 2010.
- [26] *Limb G. A., Alam A., Earley O., Green W., Chignell A. H., Dumonde D. C.* Distribution of cytokine proteins within epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Curr. Eye Res.* 13 (11) : 791—798. 1994.
- [27] *Nakano T., Goto S., Lai C. Y., Hsu L. W., Takaoka Y., Kawamoto S., Chiang K. C., Shimada Y., Ohmori N., Goto T., Sato S., Ono K., Cheng Y. F., Chen C. L.* Immunological aspects and therapeutic significance of an autoantibody against histone H1 in a rat model of concanavalin A-induced hepatitis. *Immunology.* 129 (4) : 547—555. 2010.
- [28] *Newsome D. A., Rodrigues M. M., Machemer R.* Human massive periretinal proliferative. In vitro characteristics of cellular components. *Arch. Ophthalmol.* 99 (5) : 873—880. 1981.
- [29] *tan J., Liu Y., Li W., Gao Q.* Ocular pathogenesis and immune reaction after intravitreal dispase injection in mice. *Mol. Vis.* 18 : 887—900. 2012.
- [30] *Wan J., Zheng H., Chen Z. L., Xiao H. L., Shen Z. J., Zhou G. M.* Preferential regeneration of photoreceptor from Muller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Res.* 2008. T. 48. № 2. — C. 223—234. 48 (2) : 223—234. 2008.
- [31] *Wang J., Kolko M.* Phospholipases A2 in ocular homeostasis and diseases. *Biochimie.* 92 (6) : 611—619. 2010.
- [32] *Weller M., Heimann K., Wiedemann P.* The pathogenesis of vitreoretinal proliferation and traction: a working hypothesis. *Med. Hypotheses.* 31 (2) : 157—159. 1990.

Поступила 8 XII 2014
После доработки 4 II 2015