

На правах рукописи



ЕРДЯКОВ АЛЕКСЕЙ КОНСТАНТИНОВИЧ

**РОЛЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ В РАЗВИТИИ
КОНКАНАВАЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ
ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ
У КРЫС**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины (заведующий – доктор биологических наук, профессор В.Б. Кошелев) ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель: **Гаврилова Светлана Анатольевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты: **Куликов Александр Владимирович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточно-тканевых механизмов компенсации функций биообъектов ФГБУН ИТЭБ РАН.

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ "НИИ общей патологии и патофизиологии".
Ведущая организация: ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ.

Защита состоится «12» декабря 2016 г. в 15-30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.93 при биологическом факультете ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 12, аудитория М1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д.27) и на сайте <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Пролиферативная витреоретинопатия (ПВР) – это социально значимое заболевание, которое возникает у людей трудоспособного возраста и приводит к ухудшению зрения вплоть до слепоты. ПВР характеризуется активным делением и миграцией клеток пигментного эпителия, глиальных клеток, макрофагов и фибробластов, что влечет за собой образование периретинальных мембран, приобретающих сократительную способность (Newsome D.A. et al., 1981). В настоящее время развитие ПВР связывают с травмой сетчатки и ее регматогенной отслойкой.

Единственным способом лечения ПВР считают хирургический (de Silva D.J. et al., 2008). После тщательного удаления мембран с поверхности сетчатки частота рецидивов ПВР в первые три месяца составляет в среднем 30% (Кон С.Н. et al., 2000). В связи с этим, актуальной является разработка методов профилактики и лечения ПВР на экспериментальных моделях.

Существует ряд подходов к моделированию ПВР. Это хирургическая или вызванная введением ферментов травма сетчатки, либо введение в стекловидное тело клеток, которые участвуют в формировании фиброзных периретинальных мембран. В любой модели развитие заболевания сопровождается воспалительной реакцией: именно она приводит к активации клеточной миграции и вызывает пролиферативные изменения сетчатки (Pastor J., 1998). Однако вопрос о том, способно ли воспаление вызвать ПВР, остается открытым.

Метаболический каскад арахидоновой кислоты в ответ на повреждение активируется одним из первых и является ключевым регулятором воспаления. Арахидоновая кислота образуется под действием фосфолипазы A2 (ФЛА2) и далее подвергается четырем основным путям метаболизма, два из которых – циклооксигеназный и липоксигеназный – наиболее изучены. Циклооксигеназный путь регулируют два фермента: циклооксигеназа-1 (ЦОГ-1) и циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2). Важно, что обе изоформы участвуют в поддержании

нормального функционирования тканей глаза (Ju W.K. et al., 2002). При нарушении целостности сетчатки происходит избыточная выработка провоспалительных простагландинов, организующих процесс воспаления в поврежденной области (Radi Z.A., 2012). Это может усугублять дальнейшее течение воспалительного процесса путем влияния на продукцию ЦОГ по механизму положительной обратной связи. Такая связь была показана на легочных фибробластах мыши (Vichai V. et al., 2005).

В качестве блокатора ФЛА2 и всего метаболического каскада арахидоновой кислоты мы использовали глюкокортикостероид (ГКС) триамцинолон, разрешенный для внутриглазного введения (Acar N. et al., 2010; Chen W. et al., 2011). Важно отметить, что ГКС имеют ряд нежелательных реакций: они повышают внутриглазное давление (ВГД), вызывают развитие катаракты, подавляют иммунитет (Janse van Rensburg E., 2013).

Эффективность нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) при интравитреальном введении не изучена. В качестве блокатора ЦОГ мы выбрали лорноксикам, обладающий выраженным обезболивающим, противовоспалительным и антиагрегантным действием (Prasad Byrav D.S. et al., 2009). Препарат не ретинотоксичен (Diakonis V.F. et al., 2013), обладает меньшим спектром нежелательных лекарственных реакций, чем ГКС, и способен уменьшать пролиферацию фибробластов и глиальных клеток (Гаврилова С.А. и соавт., 2008)

Таким образом, настоящее исследование направлено на выявление взаимосвязи между активацией ЦОГ, силой воспалительного ответа, выраженностью пролиферативных и репаративных процессов, протекающих в сетчатке, и механизмами регуляции экспрессии ЦОГ и простагландинсинтаз тканями глаза. Результаты исследования имеют прямой практический выход в форме разработки новых путей терапии пролиферативных заболеваний глаза.

Цель исследования

Изучить роль циклооксигеназ в развитии конканавалин-индуцированной пролиферативной витреоретинопатии у крыс.

Задачи исследования

1. Разработать модель конканавалин-индуцированной пролиферативной витреоретинопатии у крыс, инициатором пролиферации в которой является воспаление; создать шкалу оценки повреждения и ремоделирования сетчатки с учетом стадийности развития заболевания.
2. Охарактеризовать особенности протекания воспалительной реакции и развития пролиферативной витреоретинопатии в сетчатке глаза крыс на фоне блокирования фосфолипазы A2 и циклооксигеназ.
3. Изучить уровень продукции белка циклооксигеназ в хориоиде и слоях сетчатки у здоровых животных и динамику его изменения при развитии пролиферативной витреоретинопатии у крыс.
4. Изучить влияние блокирования фосфолипазы A2 и циклооксигеназ в начальный период развития внутриглазного воспаления на последующую продукцию белка циклооксигеназ в хориоиде и слоях сетчатки при развитии пролиферативной витреоретинопатии у крыс.
5. Изучить динамику экспрессии мРНК генов циклооксигеназ и простагландинсинтаз D2 и E2 в витреоретинальном блоке у здоровых животных и при развитии пролиферативной витреоретинопатии.
6. Изучить влияние блокады фосфолипазы A2 и циклооксигеназ в начальный период развития воспаления в глазу на последующую экспрессию мРНК генов циклооксигеназ и простагландинсинтаз D2 и E2 в витреоретинальном блоке при развитии пролиферативной витреоретинопатии.

Положения, выносимые на защиту

1. Конканавалин-индуцированное воспаление в заднем отделе глаза инициирует пролиферативные процессы в сетчатке и влечет за собой развитие у экспериментальных животных пролиферативной витреоретинопатии.
2. Циклооксигеназное звено метаболизма арахидоновой кислоты играет важную роль в инициации внутриглазного воспаления и патогенезе пролиферативной витреоретинопатии. Его ингибирование в начальный период развития воспаления препятствует появлению ЦОГ-2 в хориоиде и увеличению продукции ЦОГ-2 в некоторых слоях сетчатки в острые сроки, что позволяет говорить о существовании положительной обратной связи между выработкой простагландинов и увеличением продукции ЦОГ-2 в сетчатке.
3. Неселективное блокирование циклооксигеназы нестероидным противовоспалительным средством лорноксикамом в начальный период развития воспаления способствует снижению выраженности внутриглазной воспалительной реакции, замедлению развития пролиферативной витреоретинопатии и снижению частоты формирования мембран.
4. Тотальная экспрессия мРНК генов COX-1 и COX-2 в витреоретинальных блоках в конканавалиновой модели воспаления практически не отличается между экспериментальными группами в отличие от продукции этих ферментов отдельными слоями сетчатки. Этот факт доказывает, что процессы воспаления в сетчатке тонко регулируются, и существенное значение имеет увеличение регуляторов воспаления в определенных слоях сетчатки или их появление в хориоиде, где они изначально отсутствовали. Профили экспрессии мРНК простагландинсинтаз E2 и D2 в конканавалиновой модели воспаления меняются практически идентично друг другу и связаны с экспрессией мРНК COX-1 и COX-2, в то время как неселективное ингибирование ЦОГ в момент инициации воспаления нарушает эту взаимосвязь.

Научная новизна полученных результатов

Впервые создана уникальная канканавалиновая модель, в которой увеличение пролиферации и синтетической активности клеток сетчатки инициируется воспалительной реакцией, что в конечном счете приводит к развитию ПВР у крыс. Впервые разработаны офтальмоскопические критерии оценки состояния глаза и гистологические критерии оценки состояния сетчатки с учетом специфики данной модели. Впервые показано, что инициация воспаления изменяет профиль продукции белков ЦОГ, а блокирование ФЛА2 и ЦОГ в начальный период воспаления изменяет дальнейший профиль продукции белков ЦОГ слоями сетчатки. Как лорноксикам, так и триамцинолон препятствуют появлению ЦОГ-2 в хориоиде и увеличению продукции ЦОГ-2 в некоторых слоях сетчатки, что приводит к изменению течения воспалительной реакции и говорит о существовании в глазу положительной обратной связи между продукцией ЦОГ-2 и простагландиновым звеном метаболизма арахидоновой кислоты. Впервые выявлено, что применение ингибитора ЦОГ, а не ФЛА2, разобщает взаимосвязь между экспрессией мРНК простагландинсинтаз и циклооксигеназ, в большей степени вызывает улучшение состояния глаза и сетчатки и предотвращает развитие ПВР.

Научно-практическая значимость работы

В настоящем исследовании показано, что белки ЦОГ-1 и ЦОГ-2 экспрессируют только определенные слои сетчатки здорового глаза крысы. Моделирование воспаления приводит к изменению профиля их продукции как количественно, так и качественно: в разных слоях сетчатки наблюдали свой изолированный ответ на инициацию воспаления.

Выявленная в сетчатке взаимосвязь между ингибированием ЦОГ/ФЛА2 и дальнейшим профилем продукции ЦОГ различными слоями сетчатки говорит о наличии регуляторного контура между метаболитами арахидоновой кислоты и продукцией ЦОГ-2.

Обнаружена способность лорноксикама разобщать взаимосвязь между экспрессией генов простагландинсинтаз и

циклооксигеназ. Этот факт свидетельствует в пользу наличия регуляторного контура продукции ЦОГ простагландинами и говорит о том, что циклооксигеназная ветвь метаболизма арахидоновой кислоты занимает ключевую позицию в развитии пролиферативных заболеваний сетчатки. С практической точки зрения этот факт дает основание для разработки терапевтических стратегий, где ЦОГ будут являться важной мишенью фармакологического воздействия.

Была разработана и запатентована новая конканавалиновая модель развития ПВР у крыс, с помощью которой впервые показано, что активация воспаления может быть причиной развития ПВР. Разработанная модель ПВР и введенные критерии оценки состояния глаза и сетчатки позволяют исследовать регуляторные механизмы, приводящие к увеличению клеточной подвижности, синтетической активности, а также разрабатывать новые терапевтические подходы к профилактике и лечению пролиферативных заболеваний сетчатки.

Впервые показано, что ингибирование ЦОГ эффективно снижает частоту возникновения ПВР. Этот факт позволяет рекомендовать введение НПВС в офтальмологическую практику для интравитреального введения в качестве средств профилактики и лечения различных воспалительных заболеваний, в том числе, пролиферативных. Полное ингибирование каскада арахидоновой кислоты приводит к неоднозначным результатам, и применение ГКС в офтальмологической практике требует дополнительной осторожности.

Внедрение в практику

Разработанная модель конканавалин-индуцированной ПВР у крыс и введенные критерии оценки состояния глаза и сетчатки внедрены и успешно используются в научных целях на кафедре физиологии и общей патологии ФФМ МГУ как для изучения процессов протекания воспалительной реакции в тканях глаза, так и для разработки новых терапевтических подходов в лечении различных глазных заболеваний воспалительной этиологии. Результаты работы используются

для обучения студентов в курсах физиологии и патологической физиологии. Экспериментальная работа и анализ получаемых результатов включены в обучающий план кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ.

Личный вклад диссертанта в исследования

Приведённые в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах исследования.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на XIX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), на XI Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2015), на XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2015), на XII Международной научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии – 2014» (Москва, 2014), на 5-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013), на международной конференции «ISOCB Ocular Cell Biology Conference» (Оксфорд, 2013) и на XI Научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии – 2013» (Москва, 2013).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе, 3 статьи, из них 2 в центральных рецензируемых журналах из списка ВАК РФ, 2 иностранные публикации, 1 патент РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований (включающих описание материала и методов, результатов и их обсуждения), заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 158 страницах компьютерного текста, содержит 14 таблиц, 29 рисунков. Список литературы включает 323 источника, из них 12 отечественных и 311 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Работа выполнена на самцах популяции Вистар массой 250-450 г (N=220). В ходе эксперимента оценивали общее состояние животных: массу, внешний вид, активность; проводили внешний осмотр глаза и выполняли непрямую офтальмоскопию с видеорегистрацией глазного дна и стекловидного тела.

Разработка конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР у крыс

Для инициации внутриглазного воспаления и моделирования ПВР интравитреально вводили конканавалин А (КонаА) – лектин растительного происхождения, который обладает Т-митогенной активностью и активирует тучные клетки (Кравцов Г.М. и соавт., 1989; Dwyer J.M. et al., 1981). Вызванная воспалительная реакция сопровождается нарушением гематоофтальмического барьера, в результате повышается его проницаемость для клеток иммунной системы, и это создает условия развития аутоиммунного увеита (Kapin M.A. et al., 2003; Hamdi E.R., 1999; Gwon A. et al., 1993; Chennamaneni S.R. et al., 2014). Увеит часто осложняется возникновением характерных для ПВР эпиретинальных мембран, обнаруживаемых у 41% пациентов (Nicholson B.P. et al., 2014).

КонаА в концентрации 0,1 г/мл в объеме 5 мкл вводили интравитреально в правый глаз стерильно. В левый глаз вводили раствор 0,9 % хлорида натрия эквивалентно. Для оценки динамики изменения сетчатки, крыс (n=35)

рандомизировали на группы: интактный контроль (ИК) (n=5) и шесть экспериментальных групп по 5 крыс в каждой по срокам энуклеации глаз на 1-5 и 7 сутки после инъекции КонА.

Изучение влияния ингибиторов метаболического каскада арахидоновой кислоты на динамику развития конканавалин-индуцированного внутриглазного воспаления и ПВР у крыс

Воспалительную реакцию моделировали путем интравитреальной инъекции КонА в концентрации 0,25 мг/мл в объеме 2 мкл в правый глаз стерильно. Крыс (n=120) рандомизировали по массе на группы: интактный контроль (ИК) (n=10), контрольная группа с введением 2 мкл физиологического раствора (Фр) (n=20) с энуклеацией глаз на 1, 3, 7 и 56 сутки после его введения и шесть групп по 15 крыс в каждой по срокам энуклеации глаз на 1, 3, 7, 14, 28 и 56 сутки после инъекции КонА. Экспериментальные группы с введением КонА разделяли на 3 подгруппы по 5 крыс в каждой в зависимости от вводимого препарата: физиологического раствора хлорида натрия (КонА+Фр), лорноксикама (КонА+Л) или триамцинолона (КонА+Т). Препараты вводили через 20 минут после внутриглазного введения КонА интравитреально в объеме 2 мкл в дозах: лорноксикам 0,016 мг, триамцинолон 0,08 мг. На 1-е и 2-е сутки после введения КонА препараты вводили системно из расчета 50 мкл на 100 г животного: физиологический раствор и лорноксикам (230 мкг/кг) внутривенно, триамцинолон (571 мкг/кг) внутримышечно.

Получение гистологических препаратов глаз, метод их обсчета. Осуществляли фиксацию глаз в оригинальном фиксаторе Дэвидсона (Latendresse J.R. et al., 2002), проводку проводили по классической схеме. Получали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином. Изображения рассматривали под микроскопом ImagerA1 AxioZeiss, получение снимков и обсчет данных осуществляли в программе AxioVision. Подсчет проводили на 4 срезах глаза, выполняя по 3-4 измерения отдельно в измененных и неизмененных участках сетчатки. Для определения состояния

хориоидеи/сетчатки суммировали средние значения толщины хориоидеи/слоев сетчатки в измененных и неизмененных участках с учетом протяженности этих участков относительно общей длины сетчатки (в процентах) и получали интегральный показатель толщины хориоидеи/слоев сетчатки. Также оценивали наличие «розеток» и волнистых изменений сетчатки, состояние сегментов фоторецепторов по 8-балльной шкале (0 – отсутствие деструкции, 8 – максимальная деструкция), наличие периретинальных мембран.

Исследование продукции циклооксигеназ хориоидеи и отдельными слоями сетчатки в конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР. Влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс

Использовали гистологический материал, полученный в ходе предыдущей серии экспериментов. Осуществляли иммуногистохимическое окрашивание срезов с использованием первичных антител, специфичных к ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (отдельные стекла), и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Срезы отрицательного контроля окрашивали стандартно, но без применения первичных антител. Подсчет количества ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в хориоидеи и отдельных слоях сетчатки производили в программе «ImagePro» на 4 срезах глаза по 1 полю зрения с каждого среза. Вычисляли количество пикселей, окрашенных с такой же интенсивностью, как в группе ИК, в хориоидеи и отдельных слоях сетчатки в опытных группах, и делили получившийся результат на общее число пикселей в хориоидеи/слое сетчатки.

Исследование экспрессии мРНК генов COX-1, COX-2, PTGE2S и PTGD2S витреоретинальными блоками крыс в конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР. Влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс

Воспаление и ПВР моделировали по описанной выше методике. Крыс (n=65) рандомизировали по массе на группы:

интактный контроль (ИК) ($n=5$) и четыре группы по 15 крыс в каждой по срокам извлечения витреоретинальных блоков на 1-е, 3-е, 7-е и 56-е сутки после инъекции КонаА. Экспериментальные группы с инъекцией КонаА делили на 3 подгруппы по 5 крыс в каждой: первой вводили физиологический раствор (КонаА+Фр), второй - лорноксикам (КонаА+Л), третьей - триамцинолон (КонаА+Т). Препараты вводили по описанной выше схеме. Витреоретинальные блоки извлекали из глаз крыс и в этот же день проводили выделение тотальной РНК. Определяли количество РНК в пробах, уравнивали их по содержанию РНК между собой, осуществляли ДНКазную обработку, проводили обратную транскрипцию. Для всех проб в качестве отрицательного контроля использовали пробы без проведения обратной транскрипции. Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени выполняли в амплификаторе 7500 Fast Real-Time Applied Biosystems с использованием пар праймеров, подобранных в программе Vector NTI (ThermoFisher Scientific).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программах Microsoft Excel 2011, IBM SPSS Statistics v.22. Для оценки межгрупповых различий качественных переменных использовали метод хи-квадрат, точный критерий Фишера или тест Барнарда. Для оценки межгрупповых различий количественных переменных осуществляли многофакторный вложенный дисперсионный анализ с построением смешанной линейной модели с последующими попарными межгрупповыми сравнениями методом наименьшей значимой разницы Фишера. Для оценки межгрупповых различий количественных переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Корреляцию между параметрами определяли методом ранговой корреляции по Спирмену. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени обсчитывали в программе REST 2009. Различия признавали значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследований и обсуждение

Разработка конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР у крыс

Сетчатка крысы из группы ИК представлена на рис. 1А и характеризуется строгой архитектурой.

На 7-е сутки после введения КонА у большинства животных развиваются признаки пролиферативных изменений сетчатки: нарушается ее архитектура, утолщаются слои, обнаруживаются «мигрирующие ядра», у 4 крыс из 5 формируются эпиретинальные мембраны (рис. 1Б). Всё говорит о том, что конканавалин-индуцированное воспаление инициирует пролиферативные процессы в сетчатке и приводит к развитию ПВР.

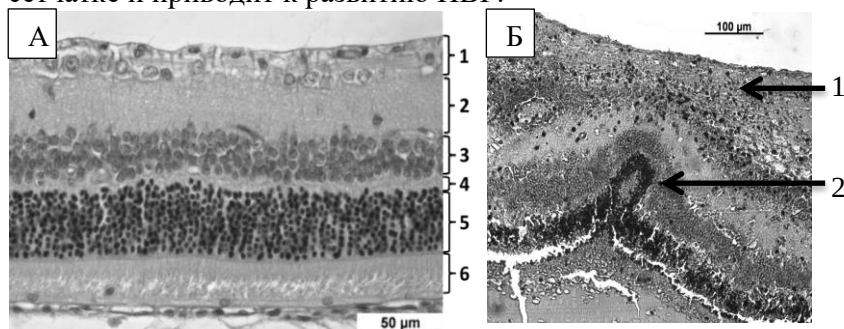


Рисунок 1. А. Сетчатка крысы из группы ИК. 1 – НГС (нейроганглионарный слой); 2 – ВПС (внутренний плексиформный слой); 3 – ВЯС (внутренний ядерный слой); 4 – НПС (наружный плексиформный слой); 5 – НЯС (наружный ядерный слой); 6 – СПК (слой палочек и колбочек). Б. Вид сетчатки через 7 суток после введения КонА. 1 – эпиретинальная мембрана; 2 – волнистые изменения сетчатки под мембраной.

Изучение влияния ингибиторов метаболического каскада арахидоновой кислоты на динамику развития конканавалин- индуцированного внутриглазного воспаления и ПВР у крыс

Введение КонА в группе КонА+Фр приводило к развитию катаракты и гемофтальма у 43% животных. Препараты не повлияли на общую частоту развития катаракты. Гемофтальм регистрировали у 22% животных в

группе КонА+Л и у 27% - в группе КонА+Т. Применение лорноксикама в начальный период развития воспаления привело к снижению частоты развития гемофтальма на 21% ($p=0,049$) по сравнению с группой КонА+Фр.

Общий балл, отражающий состояние фоторецепторов на всех экспериментальных сроках, составил 4,2 в группе КонА+Фр, 2,8 в группе КонА+Л и 3,7 в группе КонА+Т, при этом лорноксикам значительно улучшал состояние фоторецепторов как по сравнению с триамцинолоном ($p=0,009$), так и по сравнению с физиологическим раствором в группе КонА+Фр ($p<0,001$).

В группе КонА+Фр наблюдали значимое увеличение толщины хориоидеи практически в 2 раза на 1-е сутки ($p<0,001$), в 1,5 раза на 3-и сутки ($p=0,001$), в 1,67 раза на 28-е ($p=0,026$) и 56-е сутки ($p=0,021$) по сравнению с группой ИК (рис. 2).

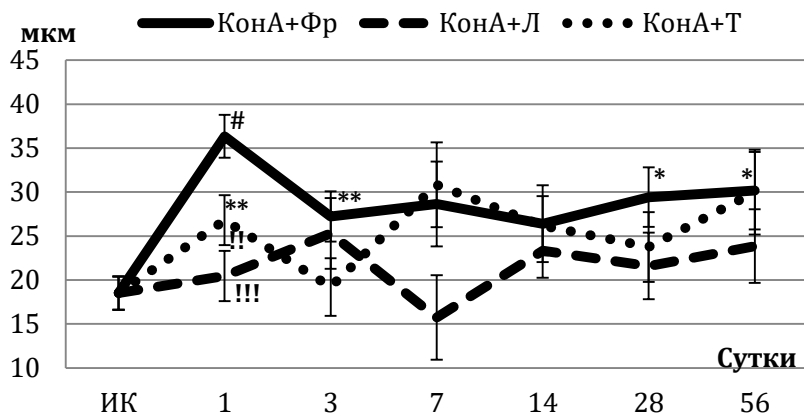


Рисунок 2. Динамика изменения толщины хориоидеи в конканавалиновой модели воспаления: влияние препаратов. Значения представлены как среднее±стандартная ошибка. * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, # - $p<0,001$ по сравнению с группой ИК. !! - $p<0,01$, !!! - $p<0,001$ по сравнению с группой КонА+Фр.

На 1-е сутки ингибирование ЦОГ препятствовало утолщению ($p<0,001$) хориоидеи, а блокирование ФЛА2 снижало ее толщину по сравнению с группой КонА+Фр ($p=0,007$), но не до уровня ИК. На всех экспериментальных

сроках толщина хориоидеи в группе КонА+Л не отличалась от таковой в группе ИК.

Развитие внутриглазного конканавалин-индуцированного воспаления сопровождалось двумя пиками увеличения общей толщины сетчатки преимущественно за счет СПК, ядерных слоев и НГС, вероятно, из-за отека – на 1-е сутки в 1,7 раза и на 7-е сутки в 1,5 раза по сравнению с группой ИК ($p=0,006$ и $p=0,009$ соответственно). При этом толщина сетчатки к 56-м суткам также оставалась увеличенной по сравнению с группой ИК в 1,4 раза ($p=0,023$) за счет ядерных слоев и ВПС, что может быть объяснено процессами интратретиального глиоза и фиброза (рис. 3).

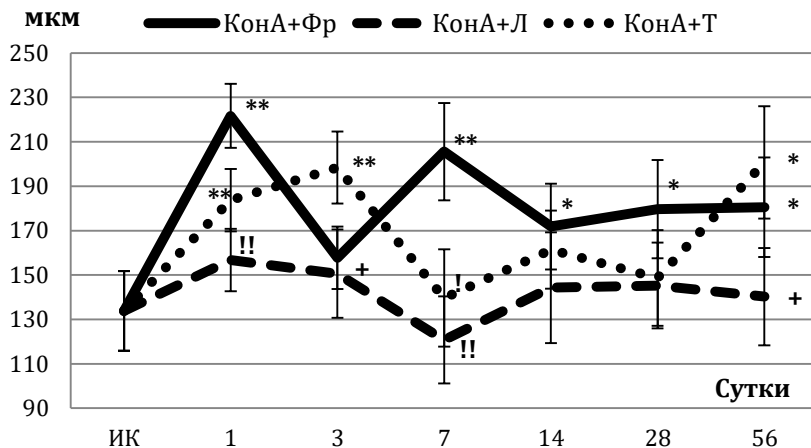


Рисунок 3. Динамика изменения общей толщины сетчатки в конканавалиновой модели воспаления: влияние препаратов. Значения представлены как среднее±стандартная ошибка. * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$ по сравнению с группой ИК. ! – $p<0,05$, !! – $p<0,01$ по сравнению с группой КонА+Фр. + - $p<0,05$ по сравнению с группой КонА+Т.

Триамцинолон практически не повлиял на толщину сетчатки, но на 7-ые сутки в этой группе толщина сетчатки была ниже, чем в группе КонА+Фр. Применение лорноксикама в начальный период воспаления препятствовало развитию отека сетчатки на 1-е сутки и снижало выраженность процессов глиоза и фиброза к 56-м

суткам после моделирования ПВР. Лорноксикам значимо снижал толщину сетчатки по сравнению с группой, получавшей триамцинолон, на 3-и 56-е сутки эксперимента ($p=0,033$), удерживая ее на уровне значений ИК.

Применение лорноксикама в начальный период воспаления замедляет развитие ПВР и отодвигает срок формирования мембран до 7-ых суток включительно. Общая частота формирования мембран в группе КонА+Л на 31% меньше, чем в группе КонА+Фр ($p=0,033$ – тест Барнарда, $p=0,055$ – точный критерий Фишера, $p=0,054$ – хи-квадрат). Применение триамцинолона вызывает тенденцию к снижению частоты образования мембран по сравнению с группой КонА+Фр на 27% ($p=0,075$ – тест Барнарда, $p=0,111$ – точный критерий Фишера, $p=0,118$ – хи-квадрат).

Таким образом, применение лорноксикама в начальный период воспаления препятствует развитию гемофтальма, предупреждает ремоделирование сетчатки и хориоидеи, снижает частоту мембранообразования. Триамцинолон не влияет на развитие отека сетчатки и на явление интратретиальной пролиферации. Он блокирует ФЛА2 и подавляет весь метаболический каскад арахидоновой кислоты (Chen W. et al., 2011; Acar N. et al., 2010), в том числе и образование противовоспалительных липоксинов, способствующих разрешению воспаления (Gronert K., 2010). Лорноксикам, примененный в острую стадию развития заболевания, блокирует только циклооксигеназную ветвь метаболизма арахидоновой кислоты, не препятствует синтезу липоксинов, и это приводит к значительному улучшению состояния глаза, сохранности сетчатки и замедлению развития ПВР.

Исследование продукции циклооксигеназ хориоидеи и отдельными слоями сетчатки в конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР. Влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс

Практически на всех сроках эксперимента регистрировали изменение продукции ЦОГ-2, но не ЦОГ-1, слоями сетчатки и хориоидеи. Так, на 1-е сутки ЦОГ-2 в

группе КонА+Фр появляется в хориоидее (в норме в этом слое она отсутствует), а также значительно возрастает на 19% в НПС ($p=0,013$) и на 25% ($p=0,01$) в НГС по сравнению с группой ИК (рис. 4).

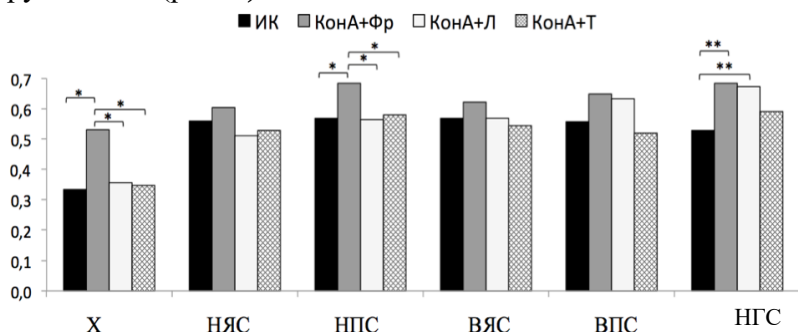


Рисунок 4. Продукция ЦОГ-2 (у.е.) на 1-е сутки слоями сетчатки и хориоидеей в группах ИК (черный цвет), КонА+Фр (серый цвет), КонА+Л (белый цвет), КонА+Т (штриховка). Скобка указывает, между какими группами найдены значимые отличия (*- $p<0,05$, ** - $p<0,01$).

На 7-е, 14-е и 28-е сутки воспаления продукция ЦОГ-2 снижается во всех трех опытных группах в ряде слоев сетчатки. Это может быть связано с развитием аутоиммунного увеита, при котором повышается ВГД (Baneke A.J. et al., 2015), что ассоциировано со снижением уровня ЦОГ-2 (Maihofner C. et al., 2001). Показано, что в ходе развития аутоиммунного увеита продуцируется интерферон гамма (ИФН- γ) (Kaufmann U. et al., 2012), который уменьшает уровень экспрессии гена ЦОГ-2 (Deng W.-G. et al., 2007; Barrios-Rodiles M. et al., 1998). Аналогично продукцию ЦОГ-2 снижает трансформирующий фактор бета (TGF- β), уровень которого повышается при ПВР (Takai E. et al., 2013).

На 56-е сутки в группах с применением противовоспалительной терапии продукция ЦОГ-2 соответствовала уровню интактного контроля, но в группе без лечения ее продукция была снижена. Применение противовоспалительных препаратов на начальных этапах развития воспалительной реакции улучшает сохранность сетчатки и возвращает уровень продукции ЦОГ к

контрольным значениям (Karim M.A. et al., 2003). В отсутствие лечения воспалительные процессы усугубляются, клетки сетчатки гибнут, снижается продукция ЦОГ-2.

Таким образом, применение противовоспалительной терапии в начальный период воспаления влияет на продукцию ЦОГ-2 не только на 1-е сутки развития ПВР, но и в долгосрочной перспективе, что доказывает наличие положительной обратной связи между активированием каскада арахидоновой кислоты на острых сроках и дальнейшей продукцией ЦОГ-2.

Исследование экспрессии мРНК генов COX-1, COX-2, PTGE2S и PTGD2S витреоретинальными блоками крыс в конканавалиновой модели внутриглазного воспаления и ПВР. Влияние ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты на этот процесс

Введение Кона не сопровождается тотальным увеличением экспрессии мРНК генов COX-1 и COX-2 витреоретинальными блоками на 1-е - 56-е сутки эксперимента. Возможно, пик экспрессии мРНК этих генов наступил в течение нескольких часов после инъекции Кона, так как эти гены относятся к генам раннего реагирования.

Через 24 часа в группе Кона+Фр наблюдали значимое увеличение в 3 раза экспрессии мРНК гена простагландин-D2-синтазы (PTGD2S) по сравнению с группой ИК ($p=0,041$). Экспрессия мРНК гена COX-2 на 56-е сутки имеет тенденцию к снижению практически в 3 раза относительно группы ИК ($p=0,057$). Этот результат подтверждает данные иммуногистохимического анализа по падению продукции ЦОГ-2 в ядерных слоях сетчатки и говорит в пользу тонкой регуляции экспрессии гена COX-2 сетчаткой, нежели клетками стекловидного тела. В группе Кона+Фр между экспрессией мРНК всех изучаемых генов существуют значимые положительные корреляции.

В группе Кона+Л на 3-и сутки выявили значимое увеличение экспрессии мРНК COX-1 в 3,5 раза относительно ИК ($p=0,017$). Возможно, лорноксикам сдвигает пик экспрессии мРНК COX-1 с первых часов после введения

КонА на 3-и сутки. К 56-м суткам лорноксикам значимо снижает экспрессию мРНК PTGE2S по сравнению с триамцинолоном практически в 2 раза ($p < 0,05$).

В группе КонА+Т уже на 1-е сутки выявили значимое снижение экспрессии мРНК COX-2 относительно группы ИК примерно в два раза ($p = 0,039$). На 1-е сутки триамцинолон в 2,5 раза снижает экспрессию мРНК PTGE2S относительно группы без противовоспалительной терапии ($p = 0,038$). К 56-м суткам триамцинолон способствует увеличению экспрессии мРНК COX-1 и PTGE2S относительно ИК в 3 и 2 раза соответственно ($p = 0,048$ и $0,047$), т.е. в этот срок в этой группе процессы внутриглазного воспаления не завершены. Интересно, что в группе КонА+Т сохраняется корреляционная связь исключительно между экспрессией генов простагландинсинтаз E2 и D2 и COX-1.

Применение лорноксикама приводит к полному разобщению взаимосвязи между экспрессией мРНК всех изучаемых генов, что, вероятно, можно рассматривать как положительный эффект противовоспалительной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования разработана оригинальная конканавалиновая модель ПВР у крыс, на которой продемонстрирована взаимосвязь между инициацией внутриглазного воспаления, гиперпродукцией белка ЦОГ-2 в начальный период воспаления и активацией пролиферации и миграции клеток сетчатки, характеризующейся образованием периретинальных мембран со специфичными нарушениями архитектоники сетчатки.

Применение лорноксикама в начальный период развития воспаления снижает частоту развития гемофтальма по сравнению с группой без лечения, что говорит о значительном вкладе циклооксигеназного звена метаболизма арахидоновой кислоты в процесс нарушения проницаемости гематоофтальмического барьера. Кроме этого, применение лорноксикама, но не триамцинолона способствует дальнейшему поддержанию толщины хориоидеи, сетчатки и ее слоев на уровне ИК и приводит к снижению частоты

формирования эпиретинальных мембран по сравнению с группой без лечения. Все это говорит о том, что блокирование ЦОГ в начальный период воспаления подавляет выраженность пролиферативных процессов в сетчатке и замедляет развитие ПВР, то есть простагландиновое звено является одним из определяющих факторов в инициализации процессов пролиферации и миграции клеток сетчатки.

В нашем исследовании мы показали, что применение как лорноксикама, так и триамцинолона в начальный период воспаления препятствует появлению ЦОГ-2 в хориоиде и возрастанию ЦОГ-2 в некоторых слоях сетчатки на 1-е сутки эксперимента. Это означает, что продукты именно циклооксигеназного звена метаболизма арахидоновой кислоты, вероятно, простагландины, массово синтезирующиеся после инициации воспалительной реакции, воздействуют на продукцию ЦОГ-2 по механизму положительной обратной связи. Таким образом, применение противовоспалительных препаратов способно сдерживать эту патогенетическую обратную связь и обеспечивать более «мягкое» течение воспалительной реакции. В то же время, триамцинолон практически не улучшает состояние сетчатки и хориоидеи в конканавалиновой модели воспаления в отличие от лорноксикама. Вероятно, блокирование всего метаболического каскада арахидоновой кислоты в начальный период развития воспаления приводит к тому, что в достаточном количестве не вырабатываются противовоспалительные факторы, такие как липоксин A4.

Тотальная экспрессия мРНК генов COX-1 и COX-2 витреоретинальным блоком мало отличается между экспериментальными группами в отличие от продукции этих ферментов отдельными слоями сетчатки, что подчеркивает значительный вклад стекловидного тела в процесс ауторегуляции внутриглазного воспаления. Применение лорноксикама эффективно разобщает взаимосвязь между экспрессией генов простагландинсинтаз E2 и D2 и циклооксигеназ, что также может являться причиной

замедления развития пролиферативных процессов, протекающих в сетчатке глаза.

Таким образом, мы показали, что циклооксигеназная ветвь метаболизма арахидоновой кислоты играет важную роль в инициации пролиферации и миграции клеток сетчатки и в развитии ПВР, в особенности, в течение первых трех суток после провокации воспаления. Ее блокирование в этот период существенно улучшает дальнейшее состояние глаза и сетчатки, по меньшей мере замедляя развитие пролиферативных процессов.

ВЫВОДЫ

1. В ходе исследования была разработана модель конканавалин-индуцированной пролиферативной витреоретинопатии у крыс. Способ позволяет получить развернутую динамику процессов от инициации воспалительной реакции до формирования эпиретинальных мембран в течение восьми недель после введения конканавалина. Создана шкала оценки повреждения и ремоделирования сетчатки с учетом стадийности развития заболевания.
2. Блокирование циклооксигеназ в начальный период развития воспаления при помощи лорноксикама снижает частоту развития гемофтальмов, предупреждает ремоделирование сетчатки и снижает частоту образования мембран. Ингибирование фосфолипазы A2 с помощью триамцинолона не приводит к значительным улучшениям состояния глаза и сетчатки на всех сроках развития ПВР, при этом его влияние на пролиферацию является неоднозначным.
3. У здоровых животных циклооксигеназы отсутствуют в хориоиде, но присутствуют в некоторых слоях сетчатки. Развитие пролиферативной витреоретинопатии у крыс сопровождается вовлечением в процесс в основном ЦОГ-2, а не ЦОГ-1. Так, на 1-е сутки ЦОГ-2 появляется в хориоиде, увеличивается ее продукция некоторыми слоями сетчатки. На 7-е и 56-е сутки развития ПВР

продукция ЦОГ-2 ядерными слоями сетчатки значимо снижена относительно группы интактного контроля.

4. Блокирование фосфолипазы А2 и циклооксигеназы в начальный период развития воспаления препятствует появлению ЦОГ-2 в хориоиде и увеличению ЦОГ-2 в некоторых слоях сетчатки на 1-е сутки эксперимента. Кроме этого, к 56-ым суткам нормализуется продукция ЦОГ-2 ядерными слоями сетчатки.
5. Хориоидея, сетчатка и стекловидное тело суммарно экспрессируют мРНК генов циклооксигеназ и простагландинсинтаз Е2 и D2. Экспрессия мРНК генов циклооксигеназ и простагландинсинтазы Е2 в витреоретинальном блоке при развитии пролиферативной витреоретинопатии в конканавалиновой модели внутриглазного воспаления на всех сроках не отличается от группы интактного контроля. Экспрессия мРНК гена простагландинсинтазы D2 увеличивается в три раза по сравнению с группой ИК на 1-е сутки эксперимента. Профили экспрессии мРНК простагландинсинтаз Е2 и D2 в конканавалиновой модели воспаления меняются практически идентично друг другу и связаны с экспрессией мРНК СОХ-1 и СОХ-2.
6. Неселективное ингибирование ЦОГ лорноксикамом в начальный период развития воспаления приводит к увеличению экспрессии мРНК СОХ-1 на 3-и сутки по сравнению с группой интактного контроля и нарушает взаимосвязь между экспрессией мРНК генов простагландинсинтаз Е2 и D2 и циклооксигеназ. Блокирование фосфолипазы А2 триамцинолоном в начальный период развития воспаления вызывает снижение экспрессии мРНК СОХ-2 относительно группы интактного контроля и простагландинсинтазы Е2 относительно группы без лечения на 1-е сутки эксперимента. Кроме этого, триамцинолон способствует значимому увеличению экспрессии СОХ-1 и простагландинсинтазы Е2 относительно группы интактного контроля к 56-ым суткам эксперимента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГД – внутриглазное давление	НЯС – наружный ядерный слой
ВЯС – внутренний ядерный слой	ОТ – обратная транскрипция
ВПС – внутренний плексиформный слой	ПВР – пролиферативная витреоретинопатия
ГКС – глюкокортикостероиды	ПЦР – полимеразная цепная реакция
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ФЛА2 – фосфолипаза A2
ИК – интактный контроль	Фр – физиологический раствор
ИФН- γ – интерферон γ	ЦОГ – циклооксигеназа (-ы)
Кона – конканавалин А	COX(s) – циклооксигеназа (-ы) (гены)
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота	PTGD2S – простагландинсинтаза D2 (ген)
НГС – нейроганглионарный слой	PTGE2S – простагландинсинтаза E2 (ген)
НПВС – нестероидное противовоспалительное средство	TGF- β – трансформирующий фактор роста β
НПС – наружный плексиформный слой	

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патент

Ердяков А.К., Гаврилова С.А. Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии у крыс после внутриглазной инъекции конканавалина А и диспазы / **А. К. Ердяков, М. В. Тихонович, Е. М. Ржавина, С. А. Гаврилова** // **Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова.** — 2015. — Т. 101, № 5. — С. 572–585.

Статьи в журналах из списка ВАК

1. **Ердяков А.К.** 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** // **Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова.** — 2015. — Т. 101, № 5. — С. 572–585.
2. Дементьева А.А. Влияние ингибирования метаболического каскада арахидоновой кислоты на последующий профиль экспрессии циклооксигеназ и простагландинсинтаз в глазу крысы в конканавалиновой модели воспаления / А.А. Дементьева, А.А. Кибитов, **А.К. Ердяков, А.В. Балацкий, С.А. Гаврилова** // **Технологии живых систем.** — 2016. — Т. 13, № 7. — [Статья принята к печати].

Статьи в других изданиях

Ердяков А. К., Гаврилова С. А. Влияние лорноксикама и триамцинолона на общее состояние глаза и сетчатки в конканавалиновой модели воспаления // **"Современные технологии в офтальмологии": "Современные технологии лечения витреоретинальной патологии".** — 2014. — № 1. — С. 42–43.

Тезисы докладов

1. Тихонович М. В., **Ердяков А. К.**, Ржавина Е. М. Влияние лорноксикама на состояние глаза и образование эпиретинальных мембран в модели воспаления // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: XIV Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием). — Издательство СПбГУ Санкт-Петербург, 2011. — С. 269–270.
2. Тихонович М. В., **Ердяков А. К.**, Ржавина Е. М. Влияние лорноксикама на общее состояние глаза и образование эпиретинальных мембран в модели воспаления у крыс // Материалы 6-й Всероссийской научной конференции молодых ученых "Актуальные проблемы офтальмологии". — 2011.
3. Тихонович М. В., Ржавина Е. М., **Ердяков А. К.** Влияние неселективного блокатора циклооксигеназ на развитие эпиретинального фиброза в моделях необратимой ишемии глаза и диспазовыванной пролиферативной витреоретинопатии // Механизмы функционирования висцеральных систем. VIII Всероссийская конференция с международным участием. 25-28 сентября 2012 года, Санкт-Петербург. — Санкт-Петербург, 2012. — С. 238.
4. Тихонович М. В., Ржавина Е. М., **Ердяков А. К.** Влияние неселективного блокатора циклооксигеназ на общее состояние глаза и сетчатки в моделях воспаления // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии-2013. — Офтальмология, Москва, 2013. — С. 191-192.
5. **Ердяков А. К.**, Ржавина Е. М., Тихонович М. В. Влияние лорноксикама на общее состояние глаза и сетчатки в различных моделях воспаления // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы V Междунар. науч.-практ. конф., г. Ростов-на-Дону, 3–5 октября 2013 г. — Издательство ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2013. — С. 344–345.
6. Tikhonovich M. Influence of nonselective cyclooxygenase inhibitor on the overall state of the eye in inflammatory models / M. Tikhonovich, E. Rzhavina, **A. Erdyakov**, S. Gavrilova // ARVO/ISOCB Ocular Cell Biology Conference. — Oxford, United Kingdom, 2013. — P. 89–89.
7. **Erdiakov A.**, Gavrilova S. Influence of lornoxicam and triamcinolone on the dynamics of eye remodeling in concanavalin model of inflammation // Acta Ophthalmologica. — Vol. 92 of Issue Supplement s253, EVER 2014 Abstract book. — John Wiley & Sons Ltd John Wiley & Sons Ltd, 2014. — P. F077–F077.
8. **Ердяков А. К.**, Гаврилова С. А. Динамика экспрессии циклооксигеназ 1 и 2 типа на фоне ремоделирования сетчатки в конканавалиновой модели воспаления. Результат противовоспалительной терапии // Нейронаука для медицины и психологии: 11-й Международный Междисциплинарный

- Конгресс. Труды Конгресса / Под редакцией Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. — 2015. — С. 163–164.
9. **Ердяков А. К.**, Ржавина Е. М., Гаврилова С. А. Динамика развития внутриглазной воспалительной реакции при интравитреальном введении конканавалина А. Разработка модели пролиферативной витреоретинопатии // Актуальные проблемы патофизиологии: XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием. — Издательство СПбГМУ, Санкт-Петербург, 2015. — С. 58–59.
 10. **Ердяков А. К.**, Дементьева А. А., Кибитов А. А. Особенности развития воспаления сетчатки у крыс с пролиферативной витреоретинопатией (ПВР) на фоне противовоспалительной терапии // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: тезисы XIX международной медико-биологической конференции молодых исследователей. — Т. 18. — Издательство СПбГУ, Санкт-Петербург, 2016. — С. 207-208.
 11. Кибитов А. А., Дементьева А. А., **Ердяков А. К.** Изменение продукции циклооксигеназ слоями сетчатки в конканавалиновой модели воспаления под действием противовоспалительной терапии // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2016. — Фундаментальная медицина. — МГУ, Москва, 2016.
 12. Дементьева А. А., Кибитов А. А., **Ердяков А. К.** Влияние противовоспалительной терапии на продукцию циклооксигеназ слоями сетчатки в конканавалиновой модели воспаления // Актуальные проблемы патофизиологии: XXII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием. — Издательство ПСПбГМУ, Санкт-Петербург, 2016. — С. 27–28.
 13. **Ердяков А. К.**, Гаврилова С. А. Влияние противовоспалительной терапии на морфологические показатели сетчатки и продукцию циклооксигеназ в конканавалиновой модели воспаления // Физиология кровообращения: VI Всероссийская с международным участием школа-конференция. — МАКС Пресс, Москва, 2016. — С. 52-53.
 14. Евтеев С.А. Влияние противовоспалительной терапии на клеточную миграцию в сетчатке при пролиферативной витреоретинопатии / С. А. Евтеев, Р. И. Исаков, М. В. Тихонович, **А. К. Ердяков** // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: тезисы XIX международной медико-биологической конференции молодых исследователей. — Т. 18. — Издательство СПбГУ, Санкт-Петербург, 2016. — С. 203-204.