УДК 577.175.82, 57.054

РОЛЬ КАТЕХОЛАМИНОВ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ СЕТЧАТКИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РЕТИНОПАТИИ НЕДОНОШЕННЫХ У КРЫС

Л. А. Катаргина¹, Н. А. Осипова¹, А. Ю. Панова¹, А. В. Петровская²,
Ю. О. Никишина^{2,*}, А. Р. Муртазина², академик РАН М. В. Угрюмов²

Поступило 09.09.2019 г.

Работа посвящена проверке нашей гипотезы о том, что катехоламины и их метаболиты играют важную роль в развитии тяжёлой инвалидизирующей ретинопатии недоношенных. Исследования проведены на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных на новорожденных крысах на 7-, 14-, 21-, 30-й дни жизни. Содержание катехоламинов и метаболитов в сетчатке у крыс определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Показано, что у крыс при моделировании ретинопатии содержание L-дезоксифенилаланина на 21-й и 30-й дни жизни снижалось по сравнению с контролем, а норадреналин на 14-й день жизни возрастал по сравнению с контролем, в то время как изменений в содержании дофамина ни на одном из изученных сроков не было обнаружено. Учитывая данные литературы об участии катехоламинов в регуляции васкулогенеза в сетчатке в норме, полученные данные об изменении метаболизма катехоламинов в сетчатке на модели ретинопатии недоношенных рассматриваются как показатель важной роли катехоламинов в патогенезе этого тяжелейшего заболевания.

Ключевые слова: катехоламины, крыса, ретинопатия недоношенных.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524893313-317>

Ретинопатия недоношенных (РН) — тяжёлое инвалидизирующее заболевание, развивающееся у преждевременно рождённых детей, характеризующееся нарушением нормального ангиогенеза сетчатки и приводящее при прогрессирующем течении к экстраретинальному росту патологических сосудов с развитием экссудативно-тракционной отслойки сетчатки. Изучению механизмов регулирования ретинального ангиогенеза у недоношенных детей посвящено большое количество работ. Однако до сих пор нет чёткого понимания, какие именно факторы запускают процесс аномального роста сосудов, а также почему в некоторых случаях данное заболевание не поддаётся существующим методам лечения.

В последние годы предметом активного изучения являются ангиогенные свойства моноаминов [1]. Значительная часть проводимых в данном направлении исследований посвящена опухолевому неоваскулогенезу. Показано, что эндогенный дофамин (ДА) является важным ингибитором ангиогенеза опухоли и, как следствие, её роста. Установлено, что

ДА, действуя через D2-рецепторы, блокирует эффекты фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также нормализует аномальные опухолевые кровеносные сосуды путём воздействия на два клеточных компонента сосудистой стенки: перициты и эндотелиальные клетки [1]. Наряду с этим выявлено, что норадреналин (НА) и адреналин, действуя на β-адренорецепторы, наоборот, повышают экспрессию VEGF в ряде опухолей у человека [2], что приводит к повышению ангиогенеза опухоли и её росту [3].

Учитывая наличие катехоламинов в сетчатке [4], интересно исследовать именно их роль в регуляции ретинального ангиогенеза при вазопролиферативных заболеваниях сетчатки.

Целью нашего исследования явилось изучение роли ДА, L-дезоксифенилаланина (L-ДОФА) и НА в патогенезе РН на оригинальной модели заболевания.

Задачи исследования: определение содержания моноаминов на разных сроках экспериментальной модели РН.

Исследование выполнено на новорождённых самцах крыс популяции Вистар. Все манипуляции с животными проведены согласно протоколу, утверждённому комиссиями по биоэтике Института био-

¹ Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской Академии наук, Москва

*E-mail: zubova@gmail.com

логии развития им. Н.К. Кольцова РАН и НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца и находящемуся в соответствии с национальными и международными требованиями.

С целью воспроизведения экспериментальной РН новорождённых крысят на 14 суток помещали в инкубатор вместе с родившей их самкой ($n = 21$). Каждые 12 часов концентрация кислорода в инкубаторе колебалась от 60 до 15%. Затем крысят помещали в условия с нормальным содержанием кислорода (21%). На протяжении эксперимента в помещении поддерживали постоянный температурный ($+26\text{ }^{\circ}\text{C}$) и световой (12 часов день, 12 часов ночь) режимы. Контрольную группу составили крысята, находившиеся с момента рождения в условиях с нормальным содержанием кислорода ($n = 20$).

Крысят выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 21–23-е и 30-е сутки. Всем крысятам в указанные сроки проводили бинокулярную энуклеацию. В образцах сетчатки глаз определяли содержание НА, ДА и L-ДОФА. Выделенные сетчатки гомогенизировали в 10 объёмах $0,1\text{ N HClO}_4$, содержащей $50\text{ }\mu\text{моль/мл}$ ДГБА, при помощи ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M, Sartorius), центрифугировали при $16\,500\text{ g}$ в течение 20 мин и в полученном супернатанте определяли катехоламины.

Измерение веществ проводили при помощи обратноточной высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) на хроматографе LC-20ADsp (“Shimadzu”, Japan). Электрохимический детектор DECADE II (“Antec”, Нидерланды) был оборудован стеклянной углеродной проточной кюветой и солевым мостиком Ag/AgCl , электрод сравнения с потенциалом, установленным на $+0,85\text{ В}$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 6. Достоверность различий между группами с уровнем значимости не менее 95% оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Нарушение развития кровеносных сосудов в сетчатке у недоношенных детей приводит к возникновению РН. Чтобы раскрыть механизмы, лежащие в основе данного заболевания, РН моделируется на новорождённых животных, у которых вследствие изменения концентрации вдыхаемого кислорода развивается кислородиндуцированная ретинопатия. Одной из наиболее распространённых среди исследователей животных моделей кислородиндуцированной ретинопатии является модель, разработанная на крысах, что обусловлено высоким сходством те-

чения данного заболевания с ретинопатией у недоношенных детей.

Учитывая, что в последние годы предметом активного изучения являются ангиогенные свойства моноаминов, мы решили определить их содержание на разработанной нами ранее модели РН [5].

Дофамин. Единственным источником синтеза ДА в сетчатке является подкласс специализированных дофаминергических амакриновых клеток (ДАК). Впервые в онтогенезе эти клетки, содержащие тирозингидроксилазу, выявляются в сетчатке крыс на 10–14-е постнатальные (П) дни жизни [6]. Эти данные хорошо согласуются с результатами данной работы. Действительно, ДА нами также впервые обнаружен в сетчатке у крыс на П14, причём его содержание незначительно и составляет около $0,5\text{ }\mu\text{моль}$ (рис. 1). Далее содержание ДА в сетчатке у крыс в норме (контроль) растёт и к П30 увеличивается более чем в 10 раз (рис. 1), что согласуется с данными морфологии об увеличении числа амакриновых клеток и разрастании их отростков [6]. Из этих данных следует, что развитие сети амакриновых клеток и становление их физиологической функции приходится на основной период развития заболевания — неоваскуляризацию и регресс новообразованных сосудов.

В мировой литературе существуют единичные работы, посвящённые определению содержания ДА в сетчатках крыс при РН, и данные в них весьма противоречивы. Так, Zhang с соавт. на крысиной модели и Spix с соавт. на мышинной модели РН выявили снижение содержания ДА и его метаболита (ДОФУК) в сетчатке животных с РН [7, 8]. Авторам удалось доказать, что на их моделях дефицит ДА

Рис. 1. Содержание дофамина в сетчатке крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе. П — постнатальный день развития. * $P < 0,05$ различия по сравнению с предыдущим сроком исследования между контрольными группами.

вызван гибелью ДАК. В нашем исследовании наблюдалась лишь тенденция ($p = 0,14$) к снижению уровня ДА в экспериментальной группе на П30. Данный период соответствует фазе регресса новообразованных сосудов. Принимая во внимание то, что ДА способен проявлять антиангиогенную активность, можно предположить, что поддержание нормального физиологического уровня ДА в сетчатке (на уровне контроля) в процессе неоваскуляризации проявляется как компенсаторное усиление синтеза ДА в выживших ДАК, направленное на подавление неконтролируемого ангиогенеза. Когда же рост сосудов приостанавливается и наступает фаза регресса, выжившие клетки прекращают гиперсекрецию ДА и мы видим тенденцию к снижению его уровня в наших экспериментах. Однако данное предположение требует дальнейших исследований.

Л-ДОФА. Кроме определения ДА в данной работе мы также определяли содержание в сетчатке Л-ДОФА. Л-ДОФА в нервной системе является предшественником ДА и синтезируется из тирозина с участием фермента тирозингидроксилазы. Однако Л-ДОФА также является предшественником меланина, который синтезируется в пигментном эпителии сетчатки с помощью фермента тирозиназы. Более того, не так давно в сетчатке был найден рецептор GPR143, эндогенным лигандом которого является Л-ДОФА [9]. В то же время на культуре клеток пигментного эпителия человека было показано, что Л-ДОФА является антиангиогенным фактором, вызывая снижение VEGF через путь GPR143 [10]. Эти данные позволяют рассматривать Л-ДОФА как ключевую молекулу, вовлечённую в патогенез РН.

В нашем исследовании Л-ДОФА детектируется в образцах сетчатки у крыс в норме (контроль) уже на П7, первый изученный срок (рис. 2а). Поскольку ДА не выявлялся в пробах до П14, можно предположить, что основным источником Л-ДОФА на протяжении первых двух недель жизни крыс являются клетки пигментного эпителия сетчатки. Интересно, что в течение третьей недели постнатального развития происходит значительное увеличение уровня Л-ДОФА. По-видимому, это связано с увеличением числа и созреванием как ДАК, так и клеток пигментного эпителия.

На экспериментальной модели РН мы не обнаружили достоверных изменений в уровне Л-ДОФА в первые три недели постнатального развития, при этом на П21 его содержание у экспериментальных животных падает в 2 раза по сравнению с контролем, данное падение сохраняется и на П30 (рис. 2а). Интересно, что на период с П18 по П22 приходится пик неоваскуляризации. С учётом того что Л-ДОФА в сетчатке ингибирует продукцию VEGF через рецепторы GPR143, а следовательно, проявляет антиангиогенную активность [10], снижение его содержания может вносить вклад в развитие неконтролируемой неоваскуляризации сетчатки.

Норадреналин. Согласно данным литературы НА является проангиогенным фактором, повышающим продукцию VEGF через воздействие на β -адренорецепторы. Более того, было показано усиление синтеза НА при моделировании кислородиндуцированной ретинопатии у мышей, а также эффективность пропранолола в ингибировании процессов неоваскуляризации [11]. В ходе пилотного рандомизированного контролируемого исследования при

Рис. 2. Содержание Л-дезоксифенилаланина (Л-ДОФА) (а) и норадреналина (б) в сетчатке крыс на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных в онтогенезе. П — постнатальный день развития. Значками * и # отмечены $P < 0,05$ различия по сравнению с предыдущим сроком исследования между контрольными группами (*) и $P < 0,05$ различия по сравнению с контролем (#).

активной фазе РН на 2-й стадии II зоны у детей были получены положительные результаты в отношении торможения прогрессирования РН при пероральном введении пропранолола, однако наблюдалось развитие системных побочных эффектов в виде брадикардии и гипотензии [12].

В связи с этим мы в своей работе также оценивали уровень НА на модели РН на всех исследуемых сроках. На П7 НА детектируется в сетчатке, но различий в его содержании между опытной и контрольной группами нет (рис. 26). На П14, когда согласно результатам проведённых нами ранее исследований [5] выявляется экспрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток — PCNA в клетках эндотелия, свидетельствующая об активизации их репликативного потенциала, содержание НА возрастало на порядок у экспериментальных животных по сравнению с контролем. Начиная с П21 в нашем исследовании НА не детектировался в сетчатке ни у контрольных, ни у экспериментальных животных. Этот факт заслуживает особого внимания, поскольку на протяжении всего периода постнатального развития в сетчатке присутствует норадренергическая иннервация и выявляются адренорецепторы [4, 11].

К сожалению, работ посвящённых изучению возрастной динамики содержания НА в сетчатке крайне мало, однако Shelke и соавт. детектировали НА в сетчатке крыс на П21, но для этого они пулировали по 6–8 образцов на пробу [13]. По-видимому, содержание свободного НА в сетчатке после второй недели постнатального развития достаточно мало и находится за пределами разрешающей способности ВЭЖХ-ЭД. Эти данные дают возможность предполагать, что именно в первые две недели постнатального онтогенеза, когда содержание НА максимально, он играет особую роль в развитии сетчатки. В это же время в процессе нормального развития происходит васкуляризация сетчатки. На основании полученных данных и анализа литературы с высокой долей вероятности можно полагать, что НА участвует в нормальном ангиогенезе сетчатки, а также играет немаловажную роль в про-

цессе развития РН. Однако данное предположение требует дальнейшей проверки.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об участии ДА, L-ДОФА и НА в регуляции ангиогенеза при РН и открывают широкие перспективы для поиска новых подходов к лечению данного тяжёлого заболевания.

Источники финансирования. Работу проводили при поддержке государственного задания по темам НИР и НИОКТР (номера государственной регистрации 0108–2019–0006 и АААА-А18–118032390091–7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chakroborty D., Sarkar C., Yu H., et al. // PNAS. 2011. V. 108. № 51. P. 20 730–20 735. DOI: 10.1073/pnas.1108696108.
2. Moreno-Smith M., Lutgendorf S.K., Sood A.K. // Future Oncol. 2010. V. 6. № 12. P. 1863–1881.
3. Dvorak H.F. // J. Thromb. Haemost. 2005. V. 3. № 8. P. 1835–1842.
4. Hadjiconstantinou M., Neff N.H. // Life Sciences. 1984. V. 35. № 11. P. 1135–1147.
5. Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Майбогин А.М. и др. // Межд. журн. прикладных и фундаментальных иссл. 2017. Т. 3. С. 190–194.
6. Witkovsky P., Arango Gonzalez B., Haycock J.W., et al. // J. Comp. Neurol. 2005. V. 481. № 4. P. 352–362.
7. Spix N.J., Liu L.L., Zhang Z., et al. // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 7. P. 3047–3057.
8. Zhang N., Favazza T.L., Baglieri A.M., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. № 13. P. 8275–8284.
9. Lopez V.M., Decatur C.L., Stamer W.D., et al. // PLoS Boil. 2008. V. 6. № 9. P. 236.
10. Falk T., Congrove N.R., Zhang S., et al. // J. Biomed. Biotechnol. 2012. V. 2012.
11. Dal Monte M., Cammalleri M., Mattei E., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. V. 56. № 1. P. 59–73.
12. Makhoul I.R., Peleg O., Miller B., et al. // Arch. Dis. Child. 2013. V. 98. P. 565–567.
13. Shelke R.R., Lakshmana M.K., Ramamohan Y., et al. // Int J. Dev. Neurosci. 1997. V. 15. № 1. P. 139–143.

THE ROLE OF CATECHOLAMINES IN THE DEVELOPMENT OF PATHOLOGICAL RETINA NEOVASCULARIZATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF RETINOPATHY OF PREMATURITY IN RATS

L. A. Katargina¹, N. A. Osipova¹, A. Y. Panova¹, A. V. Petrovskaya²,
Y. O. Nikishina², A. R. Murtazina², Academician of the RAS M. V. Ugrumov²

¹*Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases Ministry of Health
of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

Received September 9, 2019

This work is dedicated to prove our hypothesis that catecholamines and their metabolites play crucial role in development of retinopathy of prematurity, severe disabling fibrovasoproliferative vitreoretinal pathology of premature infants. Research was done on experimental model of retinopathy achieved by hyperoxygenation in rats on 7th, 14th, 21st and 30th day of life. Amount of catecholamines and their metabolites in retina of rats was measured by HPLC with electrochemical detection. It was shown that L-DOPA on 21st and 30th day of life were lowered in model animals than in control and noradrenaline on 14 th day increased in model animals than in control. However we did not observed dopamine changes between experimental model and control. Given the literature data on catecholamines and their role in regulation of vasculogenesis in retina, our data shows that changes in catecholamine metabolism play crucial role in pathology of this severe illness.

Keywords: catecholamines, rat, retinopathy of prematurity.