УДК 617.735:616-053.32

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РЕТИНОПАТИИ НЕДОНОШЕННЫХ****¹Катаргина Л.А., ¹Хорошилова-Маслова И.П., ¹Майбогин А.М., ²Панова И.Г.,
¹Осипова Н.А.**¹ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава РФ, Москва, e-mail: kanc@igb.ru;²ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, e-mail: idb@idbras.ru

Исследованы патоморфологические признаки экспериментальной ретинопатии недоношенных (РН) на крысиной модели заболевания. Новорожденных крысят Вистар на 14 суток помещали в инкубатор, где каждые 12 часов концентрация кислорода колебалась между 60 и 15% (модель «60/15»). На 10, 14, 18 и 28 сутки проводили энуклеацию с последующими гистологическим и иммуногистохимическим исследованиями, выявившими динамику нарушений процесса васкуляризации сетчатки и изменений ее структуры. На 10 сутки отмечалась недоразвитость слоев сетчатки и задержка васкуляризации ее периферических отделов. Начиная с 14 суток наблюдались нормализация ее структурных элементов и усиление вазопротрофических процессов, преимущественно на периферии (в постэкваториальной зоне). На 18 и 28 сутки отмечалось прогрессирование вазопротрофии с прорастанием сосудов через внутреннюю пограничную мембрану сетчатки в полость стекловидного тела. Выявленные нарушения процесса васкуляризации сетчатки аналогичны наблюдаемым при РН в клинике.

Ключевые слова: крысиная модель ретинопатии недоношенных, эндотелиальные клетки, гиперхромные ядра, PCNA, патологическая вазопротрофия сетчатки

**PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF THE DEVELOPMENT OF
EXPERIMENTAL RETINOPATHY OF PREMATURITY****¹Katargina L.A., ¹Khoroshilova-Maslova I.P., ¹Maybodin A.M., ²Panova I.G.,
¹Osipova N.A.**¹Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, e-mail: kanc@igb.ru;²Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, e-mail: idb@idbras.ru

The pathological features of experimental retinopathy of prematurity (ROP) have been studied on the experimental rat model. Newborn Wistar rats were placed for 14 days in an incubator, in which every 12 hours the concentration of oxygen was varied between 60 and 15% («60/15»). At 10, 14, 18 and 28 days, enucleation was performed, followed by histological and immunohistochemical studies, which revealed dynamics of disorders of the retinal vascularization process and changes of its structure. At 10 days, delays of vascularization at the periphery of the retina and immaturity of its layers were observed in the experimental rats. Starting from 14 days, normalization of its structural elements and an enhancement of vasoproliferative processes were observed both in the periphery and in the central areas of the retina. At 18 and 28 days, progress of vasoproliferation was detected with penetration of vessels through inner limiting membrane into the vitreous cavity. The revealed disorders of the process of retinal vascularization are analogous to those observed at ROP in the clinic.

Keywords: rat model of retinopathy of prematurity, endothelial cells, hyperchromic nuclei, PCNA, pathological vasoproliferation of retina

Ретинопатия недоношенных (РН) – тяжелое вазопротрофическое заболевание, которое является одной из ведущих причин детской инвалидности по зрению [1,6]. Патогенез заболевания до конца не изучен и является предметом многочисленных исследований, немалая доля которых базируется на эксперименте [7,8].

В настоящее время наиболее популярными являются модели РН на крысах, что во многом основано на данных о высоком сходстве строения сосудистой системы глаз человека и крыс, а также сходстве процесса ретиальной васкуляризации [4,7,8]. Известно, что, при адекватном моделировании триггерную роль в развитии РН у животных играют колебания концентрации подаваемого в ходе эксперимента кислорода, которые,

как было показано, приводят к дисбалансу про- и антиангиогенных факторов роста сосудов при развитии РН у детей [3].

Веки новорожденных крысят сращены до 14–15 суток. Данная особенность постнатального развития придаточного аппарата органа зрения делает невозможным проведение биомикроскопического и офтальмоскопического обследования глаз крысят в данный период времени, который, как известно, является критическим для развития РН, поэтому основную роль в оценке развития и течения заболевания играют морфологические и биохимические методы исследования.

Целью работы явилось изучение патоморфологических изменений при экспериментальной РН на разных сроках ее развития.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 64 новорожденных крыс породы Вистар, которые были разделены на 2 равные по числу крыс группы: опытную, с экспериментальной РН, и контрольную. С целью воспроизведения экспериментальной РН новорожденных крыс на 14 суток помещали в инкубатор вместе с самкой. Каждые 12 часов концентрация кислорода в инкубаторе колебалась от 60 до 15% (модель «60/15»). Выбранная схема подачи кислорода основывается на знании о том, что использование переменных концентраций кислорода является значительно более эффективным стимулом развития пролиферативной ретинопатии у новорожденных крыс в сравнении с воздействием постоянной гипероксии, и ряд исследователей полагают, что эпизоды гипоксии могут играть ключевую роль в патогенезе РН [7, 8]. Затем крыс помещали в условия с нормальным содержанием кислорода (21%). На протяжении эксперимента в помещении поддерживали постоянный температурный (26°C) и световой (12 часов день, 12 часов ночь) режимы. Контрольную группу составили крысята, находившиеся с момента рождения в условиях с нормальным содержанием кислорода.

Крыс вывели из эксперимента на 10-е, 14-е, 18-е и 28-е сутки. Выбор сроков энуклеации основывался на сведениях о нормальном ангиогенезе сетчатки крыс, а также на результатах полученных ранее биохимических исследований [2]. Глаза (по 12 глаз из каждой группы на каждый срок) фиксировали в растворе Буэна 24 часа. На фиксированных глазах производили срединный разрез в области лимба и удаляли роговицу и хрусталик. После этого глаза подвергали стандартной гистологической проводке с последующей заливкой в парафин. Готовили серийные меридиональные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Готовые препараты исследовали с помощью микроскопической системы фирмы Leica со встроенной цифровой камерой.

Энуклеированные на 14-е и 28-е сутки глаза (по 8 глаз из каждой группы) использовали для приготовления полутонких срезов и иммуногистохимического анализа. Для приготовления полутонких срезов глазные яблоки фиксировали в 10% нейтральном формалине 2-е суток. После промывания и вскрытия глаз, выделенные фрагменты сетчатки дофиксировали в 4% плутаральдегиде 1 сутки и в OsO_4 1 час. Затем

проводились обезживание в спиртах восходящей крепости и заливка в эпоксидную смолу. Срезы готовили на ультрамикротоме фирмы Leica (толщина срезов 1 микрон), помещали на предметные стекла и окрашивали метиленовым синим. Исследование осуществляли с помощью микроскопической системы фирмы Leica со встроенной цифровой камерой при увеличении $\times 100 - \times 400$. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA (DAKO). Для этого в эпоксидных срезах проводилось удаление эпоксидной смолы (метод Compachiaro) с последующим иммунным окрашиванием путем использования стрептавидин-биотинового пероксидазного метода с использованием коммерческих наборов реагентов (DAKO).

Результаты исследования и их обсуждение

На 10-е сутки слои сетчатки глаз контрольной группы крыс характеризовались четкой дифференцировкой и были представлены: наружным и внутренним ядерным слоями (НЯС и ВЯС), наружным и внутренним плексиформным слоем (НПС и ВПС), слоем ганглиозных клеток (СГК). На крайней периферии НЯС и ВЯС сетчатки были разделены узким НПС, отмечалось наличие микрососудов в слое нервных волокон (СНВ), что является морфологическим маркером васкуляризации сетчатки (рис. 1 А). В глазах крыс из опытной группы на данном сроке наблюдалось нарушение стратификации слоев сетчатки на периферии: полностью отсутствовал НПС, а внутренний и наружный ядерные слои были представлены единым конгломератом без четкой дифференцировки. При этом, на крайней периферии сетчатки определялась аваскулярная зона (рис. 1 Б), что позволяет сделать предположение о взаимосвязи обнаруженных структурных изменений сетчатки с нарушением васкуляризации ее периферических отделов.

А

Б

Рис. 1. Сетчатка новорожденных крыс на 10-е сутки рождения:

А – В контроле:

1 – НЯС; 2 – НПС; 3 – ВЯС; 4 – ВПС; 5 – СГК; 6 – СНВ (стрелками указаны сосуды сетчатки);

Б – В условиях кислородной инкубации в течение 10 суток:

1 – конгломерат ядер; 2 – ВПС; 3 – СГК; 4 – СНВ.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

На 14-е сутки в контрольных глазах структура сетчатки и состояние ее сосудистой системы не имели значительных морфологических отличий по сравнению с аналогичным материалом на 10-е сутки (рис. 2 А). В опытных глазах на 14-е сутки, а именно, к моменту окончания воздействия на крысят переменных концентраций кислорода, отмечалось восстановление структуры сетчатки на периферии, которое сопровождалось вращением сосудов и восстановлением кровообращения в этой зоне (рис. 2 Б). На полутонких срезах сетчатки крыс из опытной группы на данном сроке выявлялась гиперхромия ядер эндотелиальных клеток, наиболее выраженная в сосудах центральной зоны (рис. 2 В). Данные изменения указывали на повышенную функциональную активность эндотелия, не наблюдаемую в сосудах сетчатки крысят из контрольной группы (ядра эндотелиальных клеток крысят контрольной группы были гипохромны). Подтверждением этому служит обнару-

женная нами экспрессия антигена PCNA в клетках эндотелия (рис. 2 Г), которая свидетельствовала об активизации их репликативного потенциала.

На 18-е и 28-е сутки в сетчатке крысят опытной группы отмечалось развитие патологической вазопролиферации. Определялось врастание сосудов до внутренней пограничной мембраны (ВПМ), в которой определялись деструктивные изменения. На 28-е сутки отмечался экстраретинальный рост сосудов в полость стекловидного тела через разрушенную ВПМ, что объективно указывало на прогрессирование патологического процесса (рис. 3. А, Б, В). При этом в эндотелии новообразованных сосудов определялась экспрессия антигенов к PCNA (рис. 3 Г). Полученные данные позволяют предполагать, что формируемые *de novo* сосуды могут принимать участие в формировании эпиретинальной мембраны, характерной для пролиферативной витреоретинопатии любой этиологии, и для РН в частности.

Рис. 2. Сетчатка новорожденных крыс на 14-е сутки после рождения:
 А – В контроле: 1 – НЯС; 2 – НПС; 3 – ВЯС; 4 – ВПС; 5 – СГК; 6 – СНВ; 7 – ВПМ (стрелками указаны сосуды сетчатки);
 Б – В условиях кислородной инкубации в течение 14 суток. Наблюдается появление сосудов на периферии сетчатки:
 1 – НЯС; 2 – НПС; 3 – ВЯС; 4 – ВПС; 5 – СГК; 6 – СНВ; 7 – ВПМ (стрелками указаны сосуды сетчатки). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. В) Гиперхромные ядра в эндотелии сосудов сетчатки у опытных животных. Полутонкие срезы. Окраска метиленовым синим. Увеличение $\times 400$;
 Г – Положительная экспрессия PCNA в ядрах эндотелиальных клеток ретинального сосуда у опытных крысят. Полутонкие срезы. Увеличение $\times 400$

*Рис. 3. Сетчатка новорожденных крысят на 18 и 28-е сутки после рождения:
А – Сосуд сетчатки крысенка опытной группы на 18-е сутки, стенка которого располагается вплотную к ВПМ;
Б – Сосуд сетчатки крысенка опытной группы на 28-е сутки. Разрушение ВПМ в зоне прорастания сосуда в стекловидное тело. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$;
В – Зона экстраретинального прорастания сосудов сетчатки в стекловидное тело у крысенка опытной группы на 28-е сутки. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим. $\times 400$;
Г – Сохранение положительной экспрессии PCNA в ядрах эндотелиальных клеток ретинальных сосудов крысенка опытной группы на 28-е сутки. Полутонкий срез. $\times 400$*

Полученные на нашей крысиной модели РН «60/15» результаты согласуются с данными литературы. Так, группой ученых на мышинной модели заболевания было показано, что при развитии ретинопатии на сроке, соответствующем пику неоваскуляризации, в препаратах сетчатки мышат определяются пролиферирующие ядра клеток, локализующихся с витреальной стороны от ВПМ сетчатки, в которых при иммуногистохимическом исследовании выявлялась повышенная экспрессия PCNA [9]. В ряде других исследований на крысиной модели РН «50/10» в препаратах сетчатки на 18-е сутки, которые также представляют собой пик неоваскуляризации в данной модели, определялись новообразованные сосуды на поверхности сетчатки в периферических отделах [5]. В нашей работе наряду с процессом патологической вазопротиферации сетчатки глаз крысят с экспериментальной РН, выявлены изменения структурной организации ядер эндотелиальных клеток ретинальных сосудов (появление гиперхром-

ных ядер), коррелирующие с выраженной экспрессией PCNA. Это свидетельствует об изменении метаболизма эндотелиальных клеток в сторону активации их пролиферативного потенциала, что, в конечном итоге, определяет их избыточный патологический рост и прорастание через ВПМ сетчатки.

Закключение

Результаты проведенных патоморфологических и иммуногистохимических методов исследования доказывают стадийность изменений со стороны ретинальных сосудов в условиях экспериментальной РН. Наблюдающиеся в воспроизведенной нами оригинальной крысиной модели заболевания изменения аналогичны последовательным 1–3 стадиям активной фазы РН в клинике. Это свидетельствует об адекватности представленной экспериментальной модели и возможности ее использования для изучения различных аспектов патогенеза заболевания и поиска новых методов воздействия на ее развитие и течение.

Список литературы

1. Катаргина, Л.А. Ретинопатия недоношенных / Л.А. Катаргина, Л.В. Коголева // Избранные лекции по детской офтальмологии. – М., 2009. – С. 27–61.
2. Катаргина Л.А. Экспериментальное исследование роли окислительного стресса в патогенезе ретинопатии недоношенных как перспективное направление поиска новых медикаментозных подходов к ее профилактике и лечению // Российский офтальмологический журнал. – 2016. – Т. 9, № 1. – С. 68 – 73.
3. Dorfman A. Early Manifestations of Postnatal Hyperoxia on the Retinal Structure and Function of the Neonatal Rat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008.- Vol.1, № 49. – P. 458–66.
4. Dorfman A. Immunohistochemical Evidence of Synaptic Retraction, Cytoarchitectural Remodeling, and Cell Death in the Inner Retina of the Rat Model of Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 3, № 52. – P. 1693–1708.
5. Fletcher E.L. The significance of neuronal and glial cell changes in the rat retina during oxygen-induced retinopathy. Doc. Ophthalmol. – 2010. № 120. – P. 67–86.
6. Gilbert C. Retinopathy of prematurity as of blindness worldwide and babies at risk / C. Gilbert // III World Retinopathy of prematurity Congress: abstract Book. – Shanghai, 2012. – P. 36.
7. Grossniklaus H.E., Kang S.J., Berglin L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization // Prog. Retin. Eye Res. 2010. Vol. 6. № 29. P. 500–19.
8. Hartnett M.E. Studies on the Pathogenesis of Avascular Retina and Neovascularization into the Vitreous in Peripheral Severe Retinopathy of Prematurity (An American Ophthalmological Society Thesis) // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. – 2010. – № 108. – P. 96–119.
9. Xiao-Ling Liu. Genetic Inactivation of the Adenosine A2A Receptor Attenuates Pathologic but Not Developmental Angiogenesis in the Mouse Retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2010. – Vol. 12. № 51. – P. 6625–32.