

Т.Н. Киселёва, А.В. Чудин

Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Российская Федерация

Экспериментальное моделирование ишемического поражения глаза

В обзоре представлены наиболее распространенные методики моделирования ишемического поражения глаз in vitro (ишемия с использованием йодуксусной кислоты, инкубация клеток ретиального пигментного эпителия с олигомицином, депривация кислорода и глюкозы) и in vivo (модель с повышением внутриглазного давления, окклюзия церебральной артерии, хроническое лигирование сонных артерий, фотокоагуляция ретиальных сосудов, окклюзия центральной артерии сетчатки, введение эндотелина I). В большинстве экспериментальных исследований используют моделирование ишемического повреждения у крыс, кровоснабжение глаз которых имеет сходство с кровотоком глаза у человека. У каждого метода существуют свои преимущества и недостатки, поэтому их использование напрямую зависит от конкретных целей и задач, которые необходимо решить в ходе экспериментального исследования. В настоящее время легко воспроизводимой моделью ишемического повреждения глаза является субконъюнктивальное введение животным в эксперименте мощного вазоконстриктора эндотелина-1. Наиболее часто используют модель с повышением внутриглазного давления у крыс для воспроизведения ишемических повреждений, аналогичных таковым при глаукоме, окклюзии центральной артерии сетчатки или глазной артерии у человека. Разработка экспериментальных моделей ишемического поражения глаза и более детальное изучение механизмов нарушения кровообращения микрососудистого русла необходимы для повышения эффективности диагностики и лечения ишемического повреждения сетчатки и зрительного нерва.

Ключевые слова: ишемия—реперфузия, экспериментальная модель, ретиальная ишемия, эндотелин I.
(Вестник РАМН. 2014; 11—12: 97—103)

97

Известно, что ретиальная ишемия — частая причина снижения и потери зрения, развивающаяся на фоне сосудистых заболеваний (оптические нейропатии, окклюзии ретиальных сосудов и каротидных артерий, диабетическая ретинопатия, глаукома и т.д.). Ретиальная ишемия возникает на фоне гипоксии, когда недостаточное содержание кислорода приводит к угнетению метаболических процессов в тканях глаза и апоптозу клеток сетчатки, при этом ее наружные слои более резистентны к гипоксическому стрессу [1, 2]. В связи с этим актуален вопрос изучения ишемического поражения сетчатки в эксперименте у животных для детального понимания этиологии, патофизиологии и выбора методов лечения данной патологии.

В большинстве экспериментальных исследований используют моделирование ишемического повреждения у крыс, кровоснабжение глаз которых имеет сходство с кровотоком глаза у человека. Известно, что сетчатка — это нервная ткань с высокой метаболической активностью, поэтому она более чувствительна

к изменению концентрации кислорода по сравнению с мозговой тканью, но имеет более длительный период резистентности к гипоксии. Фоторецепторы и большая часть наружного плексиформного слоя получает кровоснабжение из хориокапилляров, а внутренние слои — из центральной артерии сетчатки (ЦАС). Окклюзия ЦАС приводит к ишемии внутренних слоев сетчатки, а окклюзия глазной артерии — к тотальной ретиальной ишемии [3].

В процессе эмбриогенеза млекопитающих ретиальный пигментный эпителий (РПЭ) и собственно сетчатка (нейроретина) развиваются из нейроэктодермы. Сетчатка состоит из трех основных ядерных слоев: слой ганглиозных клеток, внутренний ядерный и наружный ядерный слои. Ганглиозный слой включает амакриновые и ганглиозные клетки, внутренний ядерный слой — биполярные, амакриновые, горизонтальные и мюллеровские клетки. Наружный слой содержит ядра фоторецепторов палочек и колбочек. Установлено, что внутренние слои

T.N. Kiseleva, A.V. Chudin

Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Russian Federation

Experimental Model of Ocular Ischemic Diseases

The review presents the most common methods of modeling of retinal ischemia in vitro (chemical ischemia with iodoacetic acid, incubation of the retinal pigment epithelium cells with oligomycin, deprivation of oxygen and glucose) and in vivo (a model with increased intraocular pressure, cerebral artery occlusion, chronic ligation of the carotid arteries, photocoagulation of the retinal vessels, occlusion of the central retinal artery, endothelin-1 administration). Modeling ischemic injury in rats is the most frequently used method in studies, because the blood supply of their eyes is similar to blood flow in the human eyes. Each method has its own advantages and disadvantages. Application of methods depends on the purpose of the experimental study. Currently model of ocular ischemic disease can be obtained easily by injecting vasoconstrictive drug endothelin-1. It is the most widely used method of high intraocular pressure induced ocular ischemic damage similar to glaucoma, occlusion of central retinal artery or ophthalmic artery in human. The development of experimental models of ocular ischemic diseases and detailed investigation of mechanisms of impairment of microcirculation are useful for improve the efficiency of diagnostic and treatment of ischemic diseases of retina and optic nerve.

Key words: ischemia—reperfusion, experimental model, retinal ischemia, endothelin-1.

(Vestnik Rossijskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 11—12: 97—103)

сетчатки более чувствительны к ишемическому повреждению, чем наружные [1].

S. Kawai и соавт. [4] в эксперименте исследовали разные факторы, связанные с нейрональной травмой на модели ретинальной ишемии, вызванной высоким внутриглазным давлением (ВГД) у крыс, и показали, что с возрастом происходит снижение числа ретинальных ганглиозных клеток, и они становятся более чувствительными к ишемии, что также подтверждено в исследованиях других авторов [5, 6]. G. Gao и соавт. продемонстрировали в эксперименте [7] влияние генетического фона на нарушение ретинального барьера и развитие ретинальной неоваскуляризации. Авторы оценивали вариабельность предрасположенности к повышенной проницаемости сосудов и, соответственно, к ишемически-индуцированной неоваскуляризации у разных пород крыс при определении экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Крысы породы Brown–Norway были более восприимчивы к образованию неососудов по сравнению с крысами породы Sprague–Dawley.

Наиболее часто гибель клеток происходит после преходящей церебральной и ретинальной ишемии. Апоптотический каскад включает активацию гена *p53*, ответственного за процесс повреждения и восстановления ДНК во время преходящей ишемии. Существует экспериментальная порода мышей, выведенных путем генной инженерии, у которых отсутствует ген *p53*. S.X. Zhang и соавт. [8] показали высокую резистентность этих животных к ишемическому повреждению, поэтому ген *p53* считают одной из основных мишеней в терапевтической стратегии ретинальной ишемии.

Депривация кислорода и глюкозы для сетчатки оказывает негативное влияние на клетки в зависимости от их локализации. Например, на ретинальные клетки, находящиеся близко к кровеносным сосудам в насыщенной кислородом среде, гипоксия оказывает большее повреждающее действие. Изменения при ишемии приводят к дисбалансу ионного транспорта, нарушению обмена нейротрансмиттеров, оксидативному стрессу, истощению запасов АТФ. Отсутствие глюкозы как энергетического субстрата — более сильный повреждающий фактор, чем гипоксия. Фоторецепторы — самые чувствительные клетки сетчатки, т.к. они имеют максимальный оксидативный метаболический уровень. При экспериментальном удалении глюкозы и кислорода происходит уменьшение синтеза АТФ, нарушение работы Na^+/K^+ АТФ-зависимого насоса, что ведет к изменению мембранного потенциала и ионного градиента. Это нарушает реполяризацию аксонов и синаптических мембран.

Ряд исследований подтверждает выделение различных нейротрансмиттеров после ишемии [9–12], таких как глутамат, γ -аминомасляная кислота, глицин, допамин, ацетилхолин и других, содержащихся в небольшом количестве экстрацеллюлярно в норме. Глутамат — один из главных ретинальных нейротрансмиттеров, который высвобождается биполярными и ганглиозными клетками во время ретинальной ишемии и аккумулируется в экстрацеллюлярном пространстве [9]. Lucas и Newhouse продемонстрировали нейротоксичность глутамата при ишемической травме [10]. Нейроны внутренней сетчатки и ганглиозные клетки наиболее восприимчивы к ишемии из-за наличия большого числа рецепторов глутамата. Существует несколько путей реализации его нейротоксичности: через поступление ионов Ca^{2+} и Na^+ внутрь клетки с последующей деполяризацией плазматической мембраны и активацию глутаматных N-метил-D-аспаратных (NMDA) и неглутаматных (non-NMDA) рецепторов.

В 1992 г. N.N. Osborne и соавт. [11] установили роль NMDA рецепторов и Ca^{2+} опосредованного повреждения при ишемии сетчатки. Ионы Na^+ связаны с током ионов Cl^- в клетку. Компенсация этого процесса за счет выхода других ионов не происходит, т.к. мембраны непроницаемы для большинства из них. Поэтому транспорт катионов и ионов Cl^- внутрь клетки повышает интрацеллюлярную осмолярность, вызывая «осмотический шок», отек, клеточный лизис и гибель клетки. С. Romano и соавт. [13] на модели ишемии *in vitro* в сетчатке эмбрионов цыплят при отсутствии кислорода и глюкозы подтвердили вовлечение NMDA и non-NMDA рецепторов в процессы ретинальной дегенерации и доказали нейропротекторный эффект блокаторов рецепторов обоих типов. При моделировании ишемии у крыс путем введения NMDA внутрь глаза возникает гибель ганглиозных клеток, истончение внутреннего плексиформного слоя и потеря эндотелиальных клеток, что подтверждает роль глутаматного механизма в повреждении сосудов сетчатки [14].

Реперфузия, т.е. восстановление кровотока после ишемии, — важный повреждающий фактор. Впервые роль реперфузии в клеточном повреждении описана R.B. Jennings и соавт. на модели ишемии–реперфузии миокарда у собак [15]. S.R. Sims и соавт. [12] обнаружили, что значительное повышение лактатдегидрогеназы — маркера клеточной гибели — происходит именно в период реперфузии.

Моделирование ретинальной ишемии *in vitro*

Большинство культур клеток в ишемических моделях состоит из нервных клеток, подвергающихся различным воздействиям, например депривации глюкозы и кислорода, действию глутамата и т.д. Один из методов создания модели — использование линии ганглиозных клеток крыс RGC-5 [16], выделенных из ретинальных клеток путем трансформации аденовирусом типа $\Psi 2$ E1A. Химически индуцированную ишемию получают с использованием йодуксусной кислоты — ингибитора глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, при добавлении которой происходит нарушение межмембранного потенциала, потеря АТФ, формирование активных радикалов кислорода и снижение уровня глутатиона. Для защиты ганглиозных клеток P. Maher и соавт. использовали флавоноиды, которые показали хороший нейропротекторный эффект [17].

Другой способ индукции ишемических повреждений *in vitro* — инкубация клеток РПЭ с олигомицином (ингибитором АТФ-синтазы) и цианидом натрия (ингибитором цитохром-С оксидазы) вместе с йодуксусной кислотой [18].

Модель ишемии, вызванную простой депривацией кислорода и глюкозы, используют для изучения эффективности нейропротекторов. С. Romano и соавт. [19] показали протекторные свойства экстракта китайского шафрана (*Carthamus tinctorius*, *Hong hua*) при моделировании ишемии выращиванием культуры клеток сетчатки эмбрионов цыплят в атмосфере азота с депривацией глюкозы. Для создания оксидативного стресса S.H. Jung и соавт. [20] использовали перекись водорода в культуре клеток RGC-5. Авторы установили значительный нейропротекторный эффект изокверцитрина — мощного антиоксиданта, который используют при лечении подагры и ревматизма.

A. Matteuci и соавт. [21] обнаружили *in vitro* выраженный нейропротекторный эффект куркумина, реализуемый путем повышения продукции субъединиц NMDA рецепторов.

Однако для изучения процессов ишемического повреждения использование только клеточных моделей недостаточно. Основанные на химическом взаимодействии культуральные методы не учитывают параллельно происходящие в глазу физиологические процессы, формирующие в совокупности единый патофизиологический механизм. Кроме того, существуют такие проблемы, как набор достаточного количества клеток, специальные условия для их выращивания, трудность в воспроизведении и сопоставлении данных. Поэтому моделирование патологии на животных — основной метод изучения ишемии—реперфузии [22].

Моделирование ретиальной ишемии *in vivo*

Использование животных для экспериментальных исследований было начато еще во II в. н.э. в Греции, когда были сделаны первые записи результатов диссекции и анатомии. На протяжении многих лет животные служили науке и занимали центральное место в экспериментальных исследованиях, которые способствовали пониманию механизмов патологии и развитию новых терапевтических стратегий для лечения большинства заболеваний у людей.

Для моделирования ретиальной ишемии, заключающейся в прекращении тока крови с нарушением баланса энергетических требований клеток, были использованы обезьяны, кошки, собаки, грызуны [22]. При выборе подходящей модели для исследования необходимо учитывать анатомию сосудистой системы сетчатки и схожесть с таковой у человека. Модель должна иметь аналогичные симптомы и характеристики течения заболевания, быть доступной и легко воспроизводимой. В настоящее время предложен ряд моделей создания ретиальной ишемии, которые рассмотрены ниже.

Модель ретиальной ишемии с повышением внутриглазного давления

Это наиболее широко используемый метод, создаваемый путем повышения и поддержания внутриглазного давления (ВГД) выше уровня системного артериального давления. В 1971 г. R.W. Flower и соавт. [23] предложили модель ретиальной ишемии на кошках. ВГД повышали до 110 мм рт.ст. путем канализации передней камеры с помощью иглы 26 gage (13 мм длиной, 0,45 мм толщиной), которая была связана через нейлоновую трубочку с приподнятым контейнером с физиологическим раствором. Такое повышение давления блокирует ретиальную циркуляцию крови и приводит к ишемии. Авторы продемонстрировали эффективность гипербарической оксигенации после такого рода повреждения. E.R. Vuchi и соавт. [24] воспроизвели подобную модель ишемии—реперфузии на крысах. N.S. Peachey и соавт. [25] описали положительный эффект аллопуринола на функциональные характеристики сетчатки в этой модели. Действие ишемии на иммуногистологическом уровне в этой модели у крыс было продемонстрировано в работах N.N. Osborne и соавт. [26]. После шестидесятиминутной ишемии авторы отмечали снижение уровня Thy-1 антигена, локализованного на мембранах ганглиозных клеток, и уровня кальретинина, связанного с амакриновыми клетками сетчатки. Однако снижения уровня антигена Ret-P1 наружных сегментов фоторецепторов не происходило. Кроме того, в мюллеровских клетках было отмечено повышение экспрессии глиального фибриллярного

кислого протеина (GFAP), который в норме может быть обнаружен лишь в слое ганглиозных клеток сетчатки. На этой модели G. Chidlow и соавт. [27] оценивали защитные свойства α -липоевой кислоты. После 11 дней интраперитонеального введения крысам препарата в дозе 100 мг/кг исследователи вызывали ишемию в течение 45 мин. Ишемия—реперфузия в контрольной группе вызвала значительное уменьшение амплитуды α - и β -волн электроретинограммы (ЭРГ), уровня синтазы оксида азота и Thy-1 антигена и снижение специфической м-РНК ганглиозных клеток. У животных, получавших лечение, эти изменения были менее выражены.

Модель с повышением ВГД использовали для изучения изменений сывороточных антител после ишемии. Увеличивая ВГД до 130 мм рт.ст. в течение 1 ч, S.C. Joachim и соавт. [28] исследовали сывороточный ответ на ишемию—реперфузию. Авторы изучали ионный дисбаланс и роль мюллеровских клеток в развитии дегенерации сетчатки при моделировании ее ишемии [29].

S.H. Jung и соавт. [30] оценивали эффект байкалина (baicalin) — флавоноида, полученного из корня шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), который вводили крысам интраперитонеально. При ретиальной ишемии—реперфузии, обусловленной повышением ВГД до 120 мм рт.ст. в течение 50 мин, в экспериментальной группе животных установлен нейропротекторный эффект флавоноида по сравнению с контрольной группой.

Индукция ретиальной ишемии с помощью повышения ВГД достаточно легко воспроизводима, но имеет значительное ограничение, поскольку высокое ВГД вызывает комбинированную компрессионно-ишемическую травму с повреждением зрительного нерва и сетчатки, что более характерно для глаукомного процесса.

Окклюзия церебральной артерии

Окклюзия средней мозговой артерии у грызунов — одна из часто используемых моделей ишемии в эксперименте. Прекращение артериального тока крови может быть достигнуто интралюминальной перевязкой артерии с последующей реперфузией после удаления нити. К недостатку этого метода следует отнести нарушение мозгового кровотока. Глазная артерия (*a. ophthalmica*), которая в основном питает сетчатку, берет начало от внутренней сонной артерии, проксимальнее средней мозговой артерии, поэтому при ее обструкции происходит блокирование кровотока в ипсилатеральной области сетчатки. Благодаря использованию этой модели были получены доказательства ретиальной ишемии [31]. E.C. Steele и соавт. [32] под анестезией изофлураном вызывали тридцати- и шестидесятиминутную ишемию у мышей и оценивали реперфузию сетчатки с помощью флюоресцентной микроскопии. Авторы отметили, что ишемия в течение 60 мин и двухчасовая реперфузия способствовали объемному клеточному повреждению внутреннего ядерного слоя (более 30% клеток) и слоя ганглиозных клеток (более 50%). Однако после тридцатиминутной ишемии в этой модели не отмечали гистологических изменений даже через 2 сут реперфузии. По мнению S. Kaja и соавт. [33], такая модель наиболее точно имитирует клеточные и молекулярные изменения в сетчатке, происходящие после инсульта. Она воспроизводима, обратима и подходит для оценки эффективности лекарственных веществ во время ишемии сетчатки [34].

Хроническое лигирование (перевязка) сонных артерий

Известно, что внутренняя сонная артерия обеспечивает основное питание головного мозга и глазного яблока.

Окклюзия обеих каротидных артерий приводит к ухудшению кровообращения сетчатки, однако определенное количество крови поступает ретроградно через виллизиев круг. Уровень повреждения в эксперименте значительно варьирует, вероятно, из-за гетерогенности индивидуальной толерантности животных к ишемии.

Модель билатерального лигирования сонных артерий используют для постоянной и длительной окклюзии сосудов при отсутствии возможности реперфузии. F. Block и соавт. [35] подтвердили эффективность такого моделирования ишемии с помощью ЭРГ у крыс. Установлено, что через 2,5 ч после окклюзии происходит уменьшение кортикально-гиппокампального кровотока до 25–50% от нормального уровня и максимальное снижение скорости кровотока в сосудах сетчатки [36].

N.L. Barnett и соавт. [37] показали, что при окклюзии обеих сонных артерий в течение 45 мин происходит снижение амплитуды β -волны ЭРГ на 46% без изменения α -волны и возвращение к нормальным значениям на 30-й мин реперфузии. Однако длительная окклюзия в течение 7 сут способствовала выраженному угнетению β -волны с увеличением амплитуды α -волны. Учитывая тот факт, что амплитуду β -волны считают показателем ишемии, были проведены гистологические исследования с помощью световой микроскопии, которые не подтвердили изменения сетчатки после краткосрочной и долгосрочной окклюзии сонных артерий. Тем не менее результаты исследования показали зависимость длительности ишемии и гиперпродукции глиального фибриллярного кислого протеина в мюллеровских клетках, количество которого достигало 356% к 7-м сут, что свидетельствовало о преобладании процессов глиоза. С.М. Davidson и соавт. [38] обнаружили в этой модели потерю зрачкового рефлекса у 50% животных и установили, что функциональные и структурные изменения происходят одновременно. В эксперименте произошло уменьшение общей толщины сетчатки со 120 до 87 нм, а наиболее уязвимыми были синаптические зоны внутреннего и наружного плексиформного слоя [39]. Т. Atlasz и соавт. [40], используя эту модель, показали нейропротекторный и вазодилатирующий эффект диоксазида. Н.М. Huang и соавт. [41] после одностороннего лигирования общей сонной артерии у крыс семидневного возраста обнаружили на ипсилатеральной стороне повреждение ганглиозного, внутреннего плексиформного и ядерного слоя сетчатки, сопровождавшееся снижением амплитуды β -волны ЭРГ, активацией глиальных и мюллеровских клеток. Модель позволяет имитировать глазные симптомы при патологии сонных артерий.

Фотокоагуляция ретинальных сосудов

В этой модели ишемия происходит вследствие резкого сужения сосудов после лазеркоагуляции. Преимущество данного метода заключается в неинвазивности процедуры, отсутствии повышения ВГД и сдавления сосудов зрительного нерва. Однако имеет место и недостаток — отсутствие возможности изучения реперфузионных изменений.

В 1993 г. С. Romano и соавт. [42] выполняли лазеркоагуляцию сосудов сетчатки с длиной волны излучения 550 нм на крысах Sprague–Dawley после введения бенгальского розового. Вызванная ишемия была выполнена для оценки нейропротекторного эффекта интравитреального введения экстракта Хуа Хун (Hua Hong), содержащего глюкозу (>3,2 ммоль/л). В исследовании на обезьянах вида макак-крабод (Macaca fascicularis) J.W. Miller и соавт. [43] использовали лазер длиной волны 577 нм для коагуляции

ретиальных вен и подтвердили роль VEGF в ангиогенезе при гипоксии сетчатки. Наряду с неоваскуляризацией радужки в эксперименте отмечено повышение содержания VEGF в водянистой влаге, при этом имела место корреляция между степенью ишемии и уровнем повышения VEGF. Избыточная секреция этого фактора при ишемии была установлена с помощью молекулярно-генетических методов. Г.Р. Каламкар и соавт. [44] использовали подобную методику создания ишемии на кроликах. Селективная окклюзия сосудов при использовании лазера позволяла моделировать локальную ретинальную ишемию и выбирать сосуды и дозу экспозиции. В эксперименте внутривенно через хвостовую вену вводили йодированный фоточувствительный краситель — бенгальский розовый, который при семиминутном воздействии лазера 550 нм (пик абсорбции красителя) высвобождает свободные радикалы кислорода, вызывающие интралюминальный тромбоз и окклюзию. Авторы оценивали эффект действия нитритов офтальмоскопически и по амплитуде α -волны ЭРГ.

Для создания ишемии сетчатки и изучения нейропротекторного действия оксида азота исследователи выполняли у кроликов лазерную коагуляцию сосудов I и II порядка [45]. Позже была создана модель ишемии на крысах [46]. Под офтальмоскопическим контролем применяли фотокоагуляцию аргоновым лазером со следующими параметрами воздействия: средняя мощность излучения 200–300 мВт, диаметр пятна 100–200 мкм, длительность импульса 0,1–0,2 с. Авторы коагулировали сосуды I порядка на всем их протяжении в зоне диаметром 1/2 размера диска зрительного нерва. Р.А. Гундорова и соавт. [47] на модели крыс применяли повторное воздействие лазера (аргоновый, ксенонный, диодный или лазер на красителях) от 1 до 3 раз с интервалом от 2 до 7 дней. При этом использовали излучение мощностью импульса 500–1000 мВт, диаметром пятна 200–500 мкм и длительностью импульса 0,1–0,5 с, транспупиллярно воздействуя на сосуды I–III порядка и соответствующую им паравазальную сетчатку.

Y.-Z. Yuan и соавт. [48] использовали подобную технику создания ишемии на крысах для оценки эффективности китайского фитопрепарата Fufang Xueshuantong в комплексном лечении окклюзии ретинальных вен.

Окклюзия центральной артерии сетчатки

Минимальная инвазивная модель переходящей ишемии была представлена L. Daugeliene и соавт. [49], которые моделировали тромбоз ЦАС на крысах с помощью бенгальского розового и зеленого лазера. Другая методика окклюзии ЦАС включала лигирование сосудистого пучка позади глазного яблока с блокированием кровотока в сосудах глаза (ЦАС и цилиарных артериях). S.S. Prasad и соавт. [3] использовали эту модель для оценки экспрессии специфических генов при тридцати- и девяностаминутной ишемии и реперфузии длительностью от 3 до 12 ч. K. Soga и соавт. [50] вводили в общую сонную артерию 0,6 мл воздуха, чтобы вызвать окклюзию ЦАС. Т.А. Ciulla и соавт. [51] предложили экспериментальную модель окклюзии ЦАС на кроликах с использованием человеческих атеросклеротических масс из аорты, которые после обработки и фильтрации в солевом растворе через канюлю вводили в общую сонную артерию. При этом частицы менее 105 мкм вызывали окклюзию ветвей ЦАС, а до 149 мкм — окклюзию ствола ЦАС.

Модель с введением эндотелина-1

Известно, что эндотелин 1 (ЭТ-1) — самый мощный из известных сосудосуживающих агентов, который

состоит из 21 аминокислоты и играет ключевую роль в гомеостазе кровеносных сосудов. Связываясь со специфическими рецепторами клеточных мембран (ETA и ETB), ЭТ-1 повышает внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} , что ведет к усилению сокращения гладких мышц сосудистой стенки. В физиологических условиях концентрация ЭТ-1 в плазме очень мала, что связано прежде всего с ингибированием синтеза вазодилатирующими субстанциями — оксидом азота и простаглиндином PG12. Выработка основного количества эндотелина происходит в эндотелии сосудов. Роль других изоформ, кроме участия в эмбриогенезе, пока неясна. ЭТ-2, вероятно, служит медиатором в почках, ЭТ-3 — в ЦНС и кишечнике [52].

Эндотелин вовлечен в патогенетические звенья развития сердечно-сосудистых заболеваний человека, патологии почек и глаз. В частности, ЭТ-1 вызывает гибель нейронов ЦНС [53].

Доказано, что повышенный уровень ЭТ-1 в крови связан с увеличением частоты развития ишемии. Введение ЭТ-1 внутрь глаза с целью моделирования ишемии впервые было предложено в 1993 г. К. Takei и соавт. [54]. После инъекции ЭТ-1 в стекловидное тело или зрительный нерв у животных возникали клеточные повреждения, обструкция ретинального кровотока, повышение скотопической β -волны ЭРГ и апоптоз клеток в ганглиозном слое сетчатки [55].

Повышение уровня ЭТ-1 и числа его рецепторов происходит при повреждении зрительного нерва, что было показано в исследованиях Н. Оку и соавт. [56]. Авторы продемонстрировали механизм повреждения ЭТ-1 путем активации свободнорадикального окисления и повышения выработки NO, супероксида и пероксинитрита [57]. Т.Т. Sugiyama и соавт. [58] в эксперименте показали взаимосвязь ЭТ-1 с глаукомой нормального давления. Авторы отмечали, что при внутривенном и интравитреальном введении ЭТ-1 снижается ВГД и перфузионное давление в сосудах зрительного нерва. Е. Granstam и соавт. [59] наблюдали аналогичный эффект воздействия ЭТ-1 у кошек.

В исследовании В.С. Chauhan и соавт. [60] после длительного ретробульбарного введения ЭТ-1 крысам с помощью микропомпы, установленной на 84 дня, отмечали снижение ретинального кровотока в среднем на 68% и уменьшение толщины слоя ганглиозных клеток. На-

мнее инвазивным и простым методом считают временную окклюзию сосудов глаза с помощью ЭТ-1.

К. Masuzawa и соавт. [61] использовали субконъюнктивальное введение ЭТ-1 крысам в дозе 0,3 мл 4×10^{-5} М, при этом восстановление перфузии происходило в течение 5–35 мин после инъекции. Были получены доказательства, что высокие дозы ЭТ-1 при субконъюнктивальной инъекции вызывают окклюзию ЦАС с потерей ганглиозных и активацией глиальных клеток без повреждения других тканей.

Модель легковоспроизводима, не требует операционной, и риск возникновения инфекции минимален. Существенный недостаток — необходимость высокой дозы ЭТ-1 для моделирования ишемии, поэтому нельзя исключить вероятность побочных эффектов со стороны системной циркуляции и повреждения других тканей.

Данные литературы показывают, что каждая модель ишемии—реперфузии имеет свои преимущества и недостатки. Выбор модели на животных в первую очередь зависит от вопросов, которые необходимо решить в ходе исследования. Наиболее часто используют модель с повышением ВГД, которая воспроизводит ишемические повреждения, аналогичные таковым при глаукоме, окклюзии ЦАС или глазной артерии у человека и достаточно проста и воспроизводима. Однако эта модель инвазивна и требует установки иглы в переднюю камеру на длительный период времени (около 1 ч). Другие методы получили меньшее распространение в связи с дороговизной, необходимостью операционной, трудностями воспроизведения, дозирования ишемического фактора и отсутствием возможности достоверно оценить реперфузионные изменения после ишемии. Дальнейшая разработка экспериментальных моделей ишемического поражения глаза и более детальное изучение механизмов нарушения кровообращения микрососудистого русла позволит повысить эффективность диагностики и лечения ишемического повреждения сетчатки и зрительного нерва.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Janáky M., Grósz A., Tóth E., Benedek K., Benedek G. Hypobaric hypoxia reduces the amplitude of oscillatory potentials in the human ERG. *Doc. Ophthalmol.* 2007; 114 (1): 45–51.
- Tinjust D., Kergoat H., Lovasik J.V. Neuroretinal function during mild systemic hypoxia. *Aviat. Space Environ. Med.* 2002; 73 (12): 1189–1194.
- Prasad S.S., Kojic L., Wen Y.H., Chen Z., Xiong W., Jia W., Cyander M.S. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51 (12): 6207–6219.
- Kawai S., Vora S., Das S., Gachie E., Becker B., Neufeld A.H. Modeling of risk factors for the degeneration of retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion in rats: effects of age, caloric restriction, diabetes, pigmentation and glaucoma. *J. FASEB.* 2001; 15 (7): 1285–1287.
- Ishihara M., Nakano T., Ohama E., Kawai Y. Posts ischemic reperfusion in the eyes of young and aged rats. *Jpn. J. Physiol.* 2000; 50 (1): 125–132.
- Matsuura K., Kawai Y. Effects of hypothermia and aging on post-ischemic reperfusion in rat eyes. *Jpn. J. Physiol.* 1998; 48 (1): 9–15.
- Gao G., Li Y., Fant J., Craig E., Crosson S., Becerra P., Ma J. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in Brown Norway and Spargue Dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularisation. *Diabetes.* 2002; 51 (4): 1218–1255.
- Zhang S.X., Ma J., Sima J., Chen Y., Hu M.S., Ottlecz A., Lambrou G.N. Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. *Am. J. Pathol.* 2005; 166 (1): 313–321.
- Louzada-Junior P., Dias J.J., Santos W.F., Lachat J.J., Bradford H.F., Goutinho-Netto J. Glutamate release in experimental ischemia of the retina: an approach using microdialysis. *J. Neurochemistry.* 1992; 59 (1): 358–363.
- Lucas D.R., Newhouse J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmology.* 1957; 58 (2): 193–201.
- Osborne N.N., Casson R.J., Wood J.P., Chidlow G., Graham M., Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004; 23 (1): 91–147.

12. Sims S. R. Energy metabolism and selective neuronal vulnerability following global cerebral ischemia. *Neurochemical Research*. 1992; 17 (9): 923–931.
13. Romano C., Price M.T., Almlı T., Olney J.W. Excitotoxic neurodegeneration induced by deprivation of oxygen and glucose in isolated retina. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39 (2): 416–423.
14. Ueda K., Makahara T., Hoshino M., Mori A., Sakamoto K. Retinal blood vessels are damaged in rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *Neurosci. Letters*. 2010; 485 (1): 55–59.
15. Jennings R.B., Sommers H.M., Smyth G.A., Flack H.A., Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Patholog.* 1960; 70: 68–78.
16. Krishnamoorthy R.R., Agarwal P., Prasanna G., Vopat K., Lambert W., Sheedlo H.J., Pang I.H., Shade D., Wordinger R.J., Yorio T., Clark A.F., Agarwal N. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Mol. Brain. Res.* 2001; 86 (1–2): 1–12.
17. Maher P., Hanneken A. Flavonoids protect retinal ganglion cells from ischemia in vitro. *Exp. Eye Res.* 2008; 86 (2): 366–374.
18. Palmero M., Bellow J.L., Castillo M., Garcia-Cabanes C., Miquel J., Orts A. An *in vitro* model of ischemic like stress in retinal pigmented epithelium cells: protective effects of antioxidants. *Mech. Ageing & Dev.* 2000; 114 (3): 185–190.
19. Romano C., Price M., Bai H.Y., Olney J.W. Neuroprotectants in Honghua: glucose attenuates retinal ischemic damage. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34 (1): 72–80.
20. Jung S.H., Kim B.J., Lee E.H., Osborne N.N. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant Thuja orientalis and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochemistry Int.* 2010; 57 (7): 713–721.
21. Matteuci A., Cammarota R., Paradisi S., Varano M., Balduzzi M., Leo L., Bellenchi G.C., de Nuccio C., Carnovale-Scalzo G., Scordia G., Frank C., Mallozzi C., di Stasi A.M., Visentin S., Malchiodi-Albedi F. Circumin protects against NMDA-induced toxicity: a possible role for NR2A subunit. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52 (2): 1070–1077.
22. Minhas G., Anhad A. Animal models of retinal ischemia. Brain Injury Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management. 2011. URL: http://cdn.intechopen.com/pdfs/34006/InTechAnimal_models_of_retinal_ischemia.pdf (available: 26.11.1014).
23. Flower R.W., Patz A. The effect of hyperbaric oxygenation on retinal ischemia. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1971; 10 (8): 605–616.
24. Buchi E.R., Suiwaizdis I., Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica*. 1991; 203 (3): 138–147.
25. Peachey N.S., Green D.J., Ripps H. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34 (1): 58–65.
26. Osborne N.N., Larsen A.K. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem. Int.* 1996; 29 (3): 263–270.
27. Chidlow G., Schmidt K.G., Wood J.P., Melena J., Osborne N.N. Alpha lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacol.* 2002; 43 (6): 1015–1025.
28. Joachim S.C., Wax M.B., Boehm N., Dirk D., Pfeiffer N., Grus F.H. Up regulation of antibody response to heat shock proteins and tissue antigens in an ocular ischemia model. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52 (6): 3468–3474.
29. Hirrlinger P.G., Elke U., Lanors I., Andreas R., Thomas P. Alterations in protein expression and membrane properties during Muller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia. *Neurosci. Letters*. 2010; 472 (1): 73–78.
30. Jung S.H., Kang K.D., Ji D., Fawcett R.J., Safa R., Kamalden T.A., Osborne N.N. The flavonoid baicalin counteracts ischemic and oxidative insults to retinal cells and lipid peroxidation to brain membranes. *Neurochemistry Int.* 2008; 53 (6–8): 325–337.
31. Block F., Grommes C., Kosinski C. Retinal ischemia induced by the intraluminal suture methods in rats. *Neurosci. Letters*. 1997; 232 (1): 45–48.
32. Steele E.C., Guo Q., Namura S. Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to retina in mice. *Stroke*. 2008; 39 (7): 2099–2104.
33. Kaja S., Yang S.H., Wei J., Fujitani K., Liu R., Brun-Zinker-nagel A.M., Simpkins J.W., Inokuchi K., Koulen P. Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of Ves1-1L/Homer-1c immunoreactive synaptic connections. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44 (7): 3155–3162.
34. Li X.M., Ma Y.L., Liu X.J. Effect of the Lucium barbarum polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 111 (3): 504–511.
35. Block F., Schwarz M., Sontag K.H. Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography. *Neurosci. Letters*. 1992; 144 (1–2): 124–126.
36. Yamamoto H., Schmidt-Kasmer R., Hamasaki D.I., Yamamoto H., Parel J.M. Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats. *Exp. Eye Research*. 2006; 82 (5): 767–779.
37. Barnett N.L., Osborne N.N. Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage. *Exp. Eye Res.* 1995; 61 (1): 83–90.
38. Davidson C. M., Pappas B. A., Stevens W. D., Fortin T., Bennett S. A. Chronic cerebral hypoperfusion: loss of papillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration. *Brain Res.* 2000; 859 (1): 96–103.
39. Lavinsky N., Arterni N.S., Achaval M., Netto C.A. Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat. *Arch. Clin. & Exp. Ophthalmol.* 2006; 224 (2): 199–204.
40. Atlasz T., Babai N., Reglodi D., Kiss P., Tamas A., Bari F., Domoki F., Gabriel R. Diazoxide is protective in the rat retina against ischemic injury induced by bilateral carotid occlusion and glutamate-induced degeneration. *Neur. Res.* 2007; 12 (2): 105–111.
41. Huang H.M., Huang C.C., Hung P.L., Chang Y.C. Hypoxic-ischemic retinal injury in rat pups. *Pediatr. Res.* 2012; 72 (3): 224–231.
42. Romano C., Price M., Bai H.Y., Olney J.W. Neuroprotectants in Honghua: glucose attenuates retinal ischemic damage. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34 (1): 72–80.
43. Miller J.W., Adamis A.P., Shima D.T., D'Amore P.A., Moulton R.S., O'Reilly M.S., Folkman J., Dvorak H.F., Brown L.F., Berse B., Yeo T.-K., Yeot K.-T. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathology*. 1994; 145 (3): 574–584.
44. Каламкар Г.Р., Цапенко И.В., Зуева М.В., Иванов А.Н., Резвых С.В., Константинова Т.С., Шевченко Т.Ф. Нитриты способны расширять сосуды при гипоксии и защищать сетчатку от ишемии. *Доклады Академии наук*. 2007; 417 (2): 263–264.
45. Каламкар Г.Р., Бугрова А.Е., Константинова Т.С., Шевченко Т.Ф., Цапенко И.В., Зуева М.В., Иванов А.Н., Резвых С.В. Протекторное и нейротоксическое действие оксида азота в моделях зрительной патологии. Сборник тезисов по материалам конференции. Под ред. Х.П. Тахчиди. М.: *Офтальмология*. 2009. С. 541–542.
46. Каламкар Г.Р., Цапенко И.В., Зуева М.В., Иванов А.Н., Константинова Т.С., Бугрова А.Е., Резвых С.В., Федоров А.А., Шевченко Т.Ф. Экспериментальная модель острой ишемии сетчатки глаза у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008; 6: 634–638.

47. Гундорова Р.А., Швецова Н.Е., Иванов А.Н., Цапенко И.В., Федоров А.А., Зуева М.В., Танковский В.Э., Рябина М.В. Модель ишемии сетчатки: клинично-функциональное и гистологическое исследование. *Вестник офтальмологии*. 2008; 124 (3): 18–22.
48. Yuan Y.Z., Yuan F., Xu Q.Y., Yu J., Li L., Zhang J.L. Effect of Fufang Xueshuantong capsule on a rat model of retinal vein occlusion. *Chinese J. Int. Med.* 2011; 17 (4): 296–301.
49. Daugeliene L., Niwa M., Hara A., Matsuno H., Yamamoto T., Kitazawa Y., Uematsu T. Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41 (9): 2743–2747.
50. Soga K., Fujita H., Andoh T., Okumura F. Retinal artery air embolism in dogs: fluorescein angiographic evaluation of effects of hypotension and hemodilution. *Anesth. Analg.* 1999; 88 (5): 1004–1010.
51. Ciulla T.A., Moulton R., Oberoi A., Miller J.W. Retinal artery occlusion in rabbit eyes using human atheroma. *Curr. Eye Res.* 1995; 14 (7): 573–578.
52. Rubanyi G.M., Polokoff M.A. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 325–415.
53. Syed H., Safa R., Chidlow G., Osborne N.N. Sulfisoxazole, an endothelin receptor antagonist, protects retinal neurons from insults of ischemia/reperfusion or lipopolysaccharide. *Neurochemistry Int.* 2006; 48 (8): 708–717.
54. Takei K., Sato T., Nonoyama T., Miyauchi T., Goto K., Hommura S. A new model of transient complete obstruction of retinal vessels induced by endothelin-1 injection into the posterior vitreous body in rabbits. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1993; 231 (8): 476–481.
55. Lau J., Dang M., Hockmann K., Ball A.K. Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat. *Exp. Eye Res.* 2006; 82 (1): 132–145.
56. Oku H., Fukuhara M., Kurimoto T., Okuno T., Sugiyama T., Ikeda T. Endothelin-1 (ET-1) is increased in rat retina after crushing optic nerve. *Curr. Eye Res.* 2008; 33 (7): 611–620.
57. Oku H., Fukuhara M., Komori A., Okuno T., Sugiyama T., Ikeda T. Endothelin-1 (ET-1) causes death of retinal neurons through activation of nitric oxide synthase (NOS) and production of superoxide anion. *Exp. Eye Res.* 2008; 86 (1): 118–130.
58. Sugiyama T., Moriya S., Oku H., Azuma I. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma — clinical and fundamental studies. *Survey Ophthalmol.* 1995; 39 (1): 49–56.
59. Granstam E., Wang L., Bill A. Ocular effects of endothelin-1 in the cat. *Curr. Eye Res.* 1992; 11(4): 325–332.
60. Chauhan B.C., LeVatte T.L., Jollimore C.A., Yu P.K., Reitsamer H.A., Kelly M.E., Yu D.Y., Tremblay F., Archibald M.L. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45 (1): 144–152.
61. Masuzawa K., Jesmin S., Maeda S., Kaji Y., Oshika T., Zaedi S., Shimojo N., Yaji N., Miyauchi T., Goto K. A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by ю. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2006; 231 (6): 1085–1089.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Киселёва Татьяна Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения ультразвука Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца
Адрес: 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19, **тел.:** +7 (495) 624-31-34, **e-mail:** tkisseleva@yandex.ru
Чудин Антон Вячеславович, аспирант отдела ультразвука Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца
Адрес: 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19, **тел.:** +7 (495) 624-31-34, **e-mail:** ru27@mail.ru