

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ УЧАСТИЯ МЕЛАТОНИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ОБСКУРАЦИОННОЙ АМБЛИОПИИ У КРОЛИКОВ

Чупров А.Д.¹, Воронина А.Е.¹

¹Оренбургский филиал ФГАУ НМИЦ «МНТК “Микрохирургия глаза” имени академика С.Н. Федорова» МЗ РФ, Оренбург, e-mail: ofmntkvoronina@gmail.com

Считается, что мелатонин в глазах участвует в модуляции многих важных функций сетчатки, например, он может модулировать реакцию электроретинограммы. Задача заключалась в оценке уровня мелатонина в структурах глазного яблока при обскурационной амблиопии у кроликов в экспериментальных условиях с целью обоснования участия мелатонина в патогенезе амблиопии. Материалы и методы. Данное исследование реализовано на 12 новорожденных кроликах-самцах (24 глаза) породы шиншилла. Животные были разделены на 2 группы: 1-я (опытная) группа - 12 глаз, 2-я (контрольная) группа - 12 глаз. На глаза 1-й группы хирургическим путем был наложен блефарорафический шов нитью викрил 5,0. Сформирована модель обскурационной амблиопии. В возрасте 1, 2, 3 месяцев (30, 60, 90 дней) по 4 особи были выведены из эксперимента, из энуклеированных глаз была получена влага передней камеры, комплекс сетчатка / стекловидное тело и венозная кровь. Концентрацию мелатонина в различных биосубстратах глаза определяли с помощью иммуноферментного анализа. Результаты. Была отмечена максимальная концентрация мелатонина в сыворотке крови, затем в комплексе сетчатка / стекловидное тело и потом во влаги передней камеры глаза. На протяжении всего эксперимента его содержание в сыворотке крови всех кроликов не претерпевало значительных изменений и было стабильным. Содержание мелатонина во влаги передней камеры экспериментального глаза (OD) было ниже, чем в контроле (OS), на протяжении всего эксперимента. Аналогичная тенденция изменения содержания мелатонина наблюдалась в комплексе сетчатка / стекловидное тело: концентрация мелатонина была ниже в экспериментальном глазу (OD) относительно контрольного глаза (OS). Фиксировалась тенденция к снижению уровня мелатонина от 1-го месяца исследования к 3-му месяцу исследования в обоих глазах. Полученные новые данные об уровне мелатонина в структурах глазного яблока с амблиопией в эксперименте позволяют рассмотреть возможность его применения в реальной клинической практике, но этот вопрос требует дальнейшего изучения. Вывод. Уровень мелатонина в структурах глазного яблока при обскурационной амблиопии у кроликов ниже, чем в структурах здорового глазного яблока, что свидетельствует об участии мелатонина в патогенезе обскурационной амблиопии.

Ключевые слова: патогенез амблиопии, мелатонин, сетчатка, стекловидное тело, обскурационная амблиопия, эксперимент.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF MELATONIN PARTICIPATION IN THE PATHOGENESIS OF OBSCURATIVE AMBLYOPIA IN RABBITS

Chuprov A.D.¹, Voronina A.E.¹

¹Orenburg branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Orenburg, e-mail: ofmntkvoronina@gmail.com

Melatonin in eyes is believed to be involved in the modulation of many important retinal functions, for example, it can modulate the electroretinogram response. The task was to assess the level of melatonin in the eyeball structures at amblyopia of obscure origin in rabbits under the conditions of an experimental model. The task was to assess the level of melatonin in the structures of the eyeball with obscure amblyopia in rabbits under experimental conditions in order to substantiate the involvement of melatonin in the pathogenesis of amblyopia. Materials and methods. The study was conducted on 12 chinchilla male rabbits (24 eyes). The animals were divided into 2 groups: group 1 (experimental) - 12 eyes, group 2 (control) - 12 eyes. A blepharophic suture with 5.0 Vicryl thread was surgically applied to the eyes of group 1. A model of obscure amblyopia has been formed. At the age of 1, 2, 3 months (30, 60, 90 days), 4 individuals were sacrificed, aqueous humor of the anterior chamber, retina / vitreous complex, and venous blood were taken from the enucleated eyes. The concentration of melatonin in various biosubstrates of the eye was determined using enzyme immunoassay. Results. The maximum concentration of melatonin was noted in the blood serum, then in the retina / vitreous complex and then in the aqueous humor of the eye anterior chamber. Throughout the experiment, its content in the blood serum of all rabbits did not undergo significant changes and was stable. The content of melatonin in the anterior chamber humor of the experimental eye (OD) was lower than in the control (OS) throughout the experiment. A similar trend in melatonin content was observed in the retina / vitreous body complex: the melatonin concentration was lower in the experimental eye (OD) relative to the control eye (OS). There was a trend towards a decrease in the level of melatonin from 1 month

of the study to 3 months of the study in both eyes. The obtained new data on the level of melatonin in the structures of the eyeball with amblyopia in the experiment allow us to consider the possibility of its use in real clinical practice, but this subject requires further study. Conclusion. The level of melatonin in the eyeball structures with obscure amblyopia in rabbits is lower than in the structures of a healthy eyeball, which indicates the involvement of melatonin in the pathogenesis of obscure amblyopia.

Keywords: pathogenesis of amblyopia, melatonin, retina, vitreous body, obscure amblyopia, experiment.

Свойства мелатонина (МТ), обусловленные биологией гормона эпифиза (мозговой железы), известны с конца прошлого века, вызывают повышенный интерес исследователей в силу его универсальных возможностей в лечении различных патологий [1]. Считается, что мелатонин в глазах участвует в модуляции многих важных функций сетчатки, например, он может модулировать реакцию электроретинограммы. Мелатонин модулирует зрительную функцию и жизнеспособность клеток в сетчатке мыши через рецептор мелатонина МТ1. Мелатонин синтезируется в фоторецепторных клетках сетчатки, хрусталике и цилиарном теле [1].

Чувствительные специфические рецепторы к гормону эпифиза мелатонину распространены во многих структурах глазного яблока, что доказывает немаловажную роль мелатонина как в физиологических, так и в биологических процессах глазного яблока [2-4].

Мелатонин также может оказывать защитное действие на фоторецепторы и на другие типы клеток, такие как ганглиозные клетки. Некоторые исследования выявили участие мелатонина в патогенезе возрастной дегенерации желтого пятна. В литературе есть сообщения, что выработка мелатонина снижена у пациентов с ВМД по сравнению с контрольной группой того же возраста, что позволяет предположить, что дефицит мелатонина может играть роль в патогенезе ВМД [1; 5].

Мелатонин, обладающий антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, регулирующий циркадный ритм, может представлять мощный инструмент для противодействия возрастным изменениям, в том числе болезням глаз [6].

Агрессивные воздействия солнечного излучения и токсикантов окружающей среды подвергают орган зрения окислительным атакам. В настоящее время накоплено большое количество доказательств участия оксидативного стресса в развитии многих глазных заболеваний, включая катаракту, глаукому, возрастную макулярную дегенерацию и диабетическую ретинопатию.

Концентрация мелатонина в сыворотке значительно различается в зависимости от возраста. Максимальный уровень мелатонина наблюдается у новорожденных, с возрастом его количество уменьшается, и наименьшие значения фиксируются у пожилых людей. Этот факт, возможно, объясняется ухудшением работы супрахиазматического ядра [7].

Мелатонин синтезируется в фоторецепторных клетках сетчатки, хрусталике и цилиарном теле [5; 8]. Кроме того, специфические рецепторы мелатонина расположены в ряде

других структур глаза, что еще раз подчеркивает важную роль мелатонина в биохимических и физиологических процессах глаза [9; 10].

В глобальном масштабе число людей всех возрастов с нарушениями зрения оценивается в 285 миллионов. Амблиопия в последние годы является одной из наиболее частых причин значительного снижения максимально скорректированной остроты зрения у детей дошкольного и школьного возраста [8].

Задача заключалась в оценке уровня мелатонина в структурах глазного яблока при обскурационной амблиопии у кроликов в условиях эксперимента с целью обоснования участия мелатонина в патогенезе амблиопии.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнялось на двенадцати новорожденных кроликах-самцах (24 глаза) породы шиншилла. Подопытные животные были разделены на 2 группы: 1-я (опытная) группа - 12 глаз, 2-я (контрольная) группа - 12 глаз. При рождении, на 3-и сутки, на глаза хирургическим путем был наложен блефарорафический шов нитью викрил 5,0. Таким путём сформирована модель обскурационной амблиопии, или депривационной амблиопии. В возрасте 1, 2, 3 месяцев (30, 60, 90 дней) по четыре особи (2 – из основной группы и 2 – из контрольной группы) были выведены из эксперимента. Далее из энуклеированных глаз при помощи шприца 1 мл путём аспирации была получена влага передней камеры в объёме 0,75 мл, роговица иссечена вдоль лимба корнеосклеральными ножницами, сосудистая оболочка отделена от склеральной шпоры шпателем, радужка и хрусталик были удалены пинцетом, при помощи ложки для эвисцерации комплекс сетчатка / стекловидное тело был извлечен из склеральной полости, а также из периферической вены уха кролика произведен забор 0,75 мл венозной крови шприцем 1 мл. Животные выводились из эксперимента методом воздушной эмболии после введения кролика в наркоз. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) и «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (согласно приказу Минвуза СССР № 742 от 13.11.1984 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных»).

Концентрацию мелатонина в различных биосубстратах глаза (влага передней камеры и комплекс сетчатка / стекловидное тело) и сыворотке венозной крови кроликов оценивали с помощью иммуноферментного анализа на приборе MULTISKAN FC (Thermo Scientific, США) с применением специального набора Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Melatonin (Elabscience, США). Согласно инструкции к набору выполнялись все этапы иммуноферментного анализа.

Обработку полученных данных проводили при помощи методов вариационной статистики с применением статистического пакета Statistica 13,0 (StatSoft Inc., США). Хранение результатов исследования и первичную обработку материала осуществляли в оригинальной базе данных Excel 2010 (Microsoft, США). Гипотеза о принадлежности данных нормальному распределению была отклонена во всех случаях с вероятностью 95%, что обосновало применение непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Полученные данные представлены в виде медианы (Me) и 25-75-го квартилей (Q₂₅-Q₇₅). Уровень статистической значимости оценивали во всех процедурах статистического анализа (p), при этом уровнем критической значимости считали $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице представлены результаты иммуноферментного анализа.

Уровень мелатонина (пг/мл) в различных биосубстратах глаза и сыворотке крови, данные представлены в виде Me (Q₂₅-Q₇₅)

Возраст	Эксперимент (OD)			Контроль (OS)		
	ВПК	ССТ	СК	ВПК	ССТ	СК
1	1,53 (1,47- 1,61)*	12,25 (11,95- 12,75)*	295,7 (291,0- 298,6)	1,99 (1,95- 2,02)	41,53 (40,29- 42,62)	282,0 (275,7- 288,3)
2	1,31 (1,28- 1,35)*#	7,85 (7,61- 8,06)*#	276,8 (262,0- 295,4)	1,82 (1,79- 1,85)#	27,58 (27,15- 28,50)#	297,1 (285,4- 308,4)
3	0,97 (0,89- 1,05)*#	1,20 (1,13- 1,23)*#	301,3 (297,4- 305,8)	1,46 (1,39- 1,53)#	13,80 (12,34- 15,72)#	300,4 (289,2- 303,3)

Примечание: ВПК – влага передней камеры;

ССТ – комплекс сетчатка / стекловидное тело;

СК – сыворотка крови;

* – $p < 0,05$ при сравнении эксперимента (OD) с контролем (OS);

– $p < 0,05$ при сравнении первого месяца с последующими.

При изучении содержания мелатонина в различных биосубстратах была отмечена его максимальная концентрация в сыворотке крови, затем в комплексе сетчатка / стекловидное тело и потом во влаге передней камеры глаза.

Как видно из представленных данных, на протяжении всего эксперимента содержание мелатонина в сыворотке крови всех кроликов не претерпевало значительных изменений и было стабильным.

Содержание мелатонина во влаге передней камеры экспериментального глаза (OD) было статистически значимо ниже, чем в контроле (OS), на протяжении всего эксперимента. На первом месяце эксперимента значение медианы OD было ниже на 23,1% ($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 17,4% ($p < 0,05$). На втором месяце значение медианы OD было ниже на 28% ($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 24,5% ($p < 0,05$). На третьем месяце значение медианы OD было ниже на 33,5% ($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 24,4% ($p < 0,05$). Для большей наглядности полученные данные представлены в виде рисунка (рис. 1).

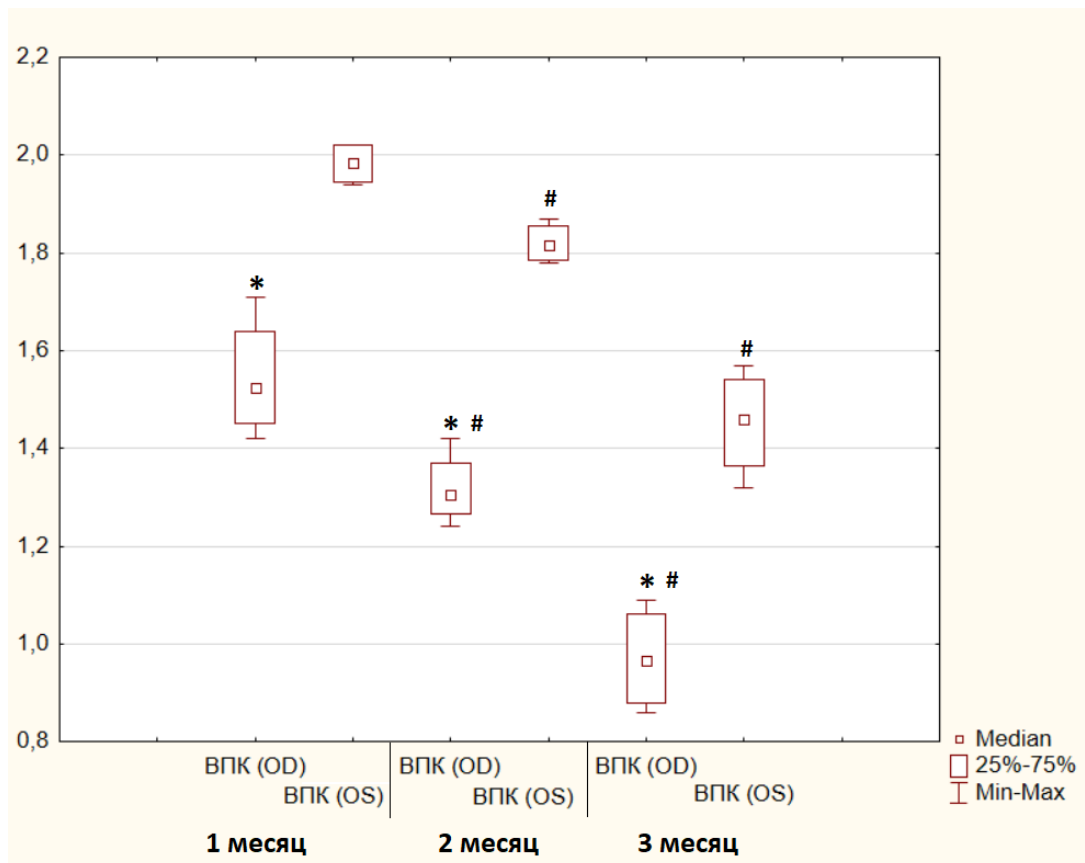


Рис. 1. Динамика уровня мелатонина во влаге передней камеры глаз кроликов, ng/ml

Примечание: ВПК (OD) – влага передней камеры экспериментального глаза (OD);

ВПК (OS) – влага передней камеры контрольного глаза (OS);

* – $p < 0,05$ при сравнении эксперимента (OD) с контролем (OS);

– $p < 0,05$ при сравнении первого месяца с последующими.

Аналогичная тенденция изменения содержания мелатонина наблюдалась в комплексе сетчатка / стекловидное тело. Концентрация мелатонина была статистически значимо ниже в экспериментальном глазу (OD) относительно контрольного глаза (OS). На первом месяце эксперимента значение медианы OD было ниже на 70,5% ($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 68,3% ($p < 0,05$). На втором месяце значение медианы OD было ниже на 71,5% ($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 70,3% ($p < 0,05$). На третьем месяце значение медианы OD было ниже на 90,8%

($p < 0,05$); Q_{75} OD ниже Q_{25} OS на 90% ($p < 0,05$). Как и в случае с влагой передней камеры глаза, на протяжении всего эксперимента фиксировалась статистическая достоверная тенденция к снижению уровня мелатонина в комплексе сетчатка / стекловидное тело от 1-го месяца исследования к 3-му месяцу исследования в обоих глазах. Для большей наглядности полученные данные представлены в виде рисунка (рис. 2).

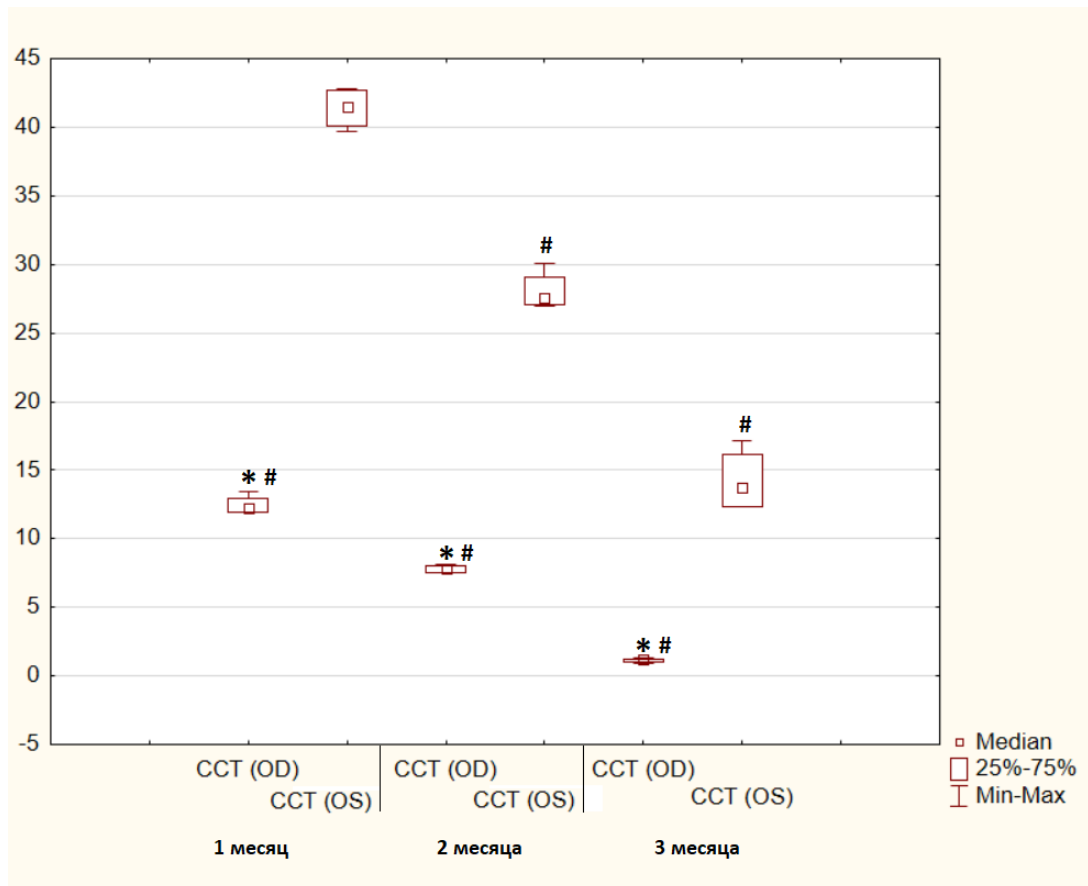


Рис. 2. Динамика уровня мелатонина в комплексе сетчатка / стекловидное тело глаз кроликов, ng/ml

Примечание: CCT (OD) – комплекс сетчатка / стекловидное тело экспериментального глаза (OD);
 CCT (OS) – комплекс сетчатка / стекловидное тело контрольного глаза (OS);
 * – $p < 0,05$ при сравнении эксперимента (OD) с контролем (OS);
 # – $p < 0,05$ при сравнении первого месяца с последующими.

Полученные в эксперименте результаты содержания мелатонина во влаге передней камеры и комплексе сетчатка / стекловидное тело статистически значимо ниже в экспериментальных глазах (обскурационная амблиопия), чем в контрольных, на протяжении всего эксперимента, что может свидетельствовать об участии мелатонина в формировании депривационной (обскурационной) амблиопии. Также на протяжении всего эксперимента фиксировалась статистически достоверная тенденция к снижению уровня мелатонина от 1-го месяца исследования к 3-му месяцу исследования в обоих глазах, что соответствует данным

литературы о снижении уровня мелатонина в крови детей по мере их роста и взросления. Однако снижение уровня мелатонина в структурах глазного яблока экспериментальных животных с депривационной амблиопией может говорить о вероятном применении мелатонина при лечении пациентов с амблиопией. Фармакотерапевтическое лечение амблиопии широко обсуждается среди офтальмологов, занимающихся лечением амблиопии. Если нейропротекторные препараты, имеющие ноотропный эффект, применяются достаточно часто и их назначение обосновано коллегами из России и из-за рубежа, то применение «естественных метаболитов биохимических процессов» редко встречается в литературе, тогда как мелатонин является регулятором метаболических процессов в организме [11; 12]. В настоящее время ни в российской, ни в зарубежной литературе данных об участии мелатонина как фактора патогенеза нами не найдено, но, судя по полученным в исследовании данным, гипотеза о его участии имеет право на существование и требует дальнейшего изучения данного вопроса.

Вывод. Уровень мелатонина в структурах глазного яблока при обскурационной амблиопии у кроликов ниже, чем в структурах здорового глазного яблока, что свидетельствует об участии мелатонина в патогенезе обскурационной амблиопии.

Список литературы

1. Sengupta A., Baba K., Mazzoni F., Pozdeyev N.V., Strettoi E., Iuvone P.M., Tosini G. Localization of melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. *Public Library of Science*. 2011. vol. 6. no. 9. P. e24483. DOI: 10.1371/journal.pone.0024483.
2. Tosini G., Baba K., Hwang C.K., Iuvone P.M. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Experimental Eye Research*. 2012. vol. 103. P. 82–89. DOI: 10.1016/j.exer.2012.08.009.
3. Alarma-Estrany P., Pintor J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007. vol. 113. no. 3. P. 507-522. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.003.
4. Ходжаев Н.С., Чупров А.Д., Ким С.М. Патогенетические аспекты развития возрастной макулярной дегенерации. Роль мелатонина. *Обзор литературы // Саратовский научно-медицинский журнал*. 2019. Т. 15. № 2. С. 559-563.
5. Ходжаев Н.С., Чупров А.Д., Смолягин А.И., Ким С.М., Филиппова Ю.В. Сравнительная характеристика содержания мелатонина в слезе и сыворотке крови в зависимости от стадии

сенильной катаракты при возрастной макулярной дегенерации // Саратовский научно-медицинский журнал. 2020. Т. 16. № 2. С. 673-678.

6. Baba K., Pozdeyev N., Mazzoni F., Contreras-Alcantara S., Liu C., Kasamatsu M., Martinez-Merlos T., Strettoi E., Iuvone P.M., Tosini G. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. vol. 106. no. 35. P. 15043-15048. DOI: 10.1073/pnas.0904400106.

7. Farajnia S., Michel S., Deboer T., vanderLeest H.T., Houben T., Rohling J.H., Ramkisoensing A., Yassenkov R., Meijer J.H. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock. *Journal of Neuroscience*. 2012. vol. 32. no. 17. P. 5891-5899. DOI: 10.1073/pnas.0904400106.

8. Чупров А.Д., Боршук Е.Л., Воронина А.Е. Некоторые аспекты лечения амблиопии у детей // Российский офтальмологический журнал. 2018. Т. 11. № 1. С. 24–29. DOI: 10.21516/2072-0076-2018-11-1-24-29.

9. Blasiak J., Reiter R.J., Kaarniranta K. Melatonin in retinal physiology and pathology: the case of age-related macular degeneration. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2016. vol. 2016. P. 6819736. DOI: 10.1155/2016/6819736.

10. Tosini G., Baba K., Hwang C.K., Iuvone P.M. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Experimental Eye Research*. 2012. vol. 103. P. 82-89. DOI: 10.1016/j.exer.2012.08.009.

11. Ханларова Н.А., Гаджиева Н.Р., Гулиева В.В., Гулиева Т.Д. Эффективность включения офтальмологических нейропротекторов в комплексное лечение амблиопии у детей // Офтальмология. 2015. Т. 3. № 19. С. 87-91.

12. Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н., Солнушкин С.Д. Влияние косоглазия и монокулярной депривации на структуру межполушарных связей в проекционных зрительных полях коры кошки // Сенсорные системы. 2012. Т. 26. № 2. С. 106–116.