

*На правах рукописи*

**ПАНОВА АННА ЮРЬЕВНА**

**Роль факторов патологического ангиогенеза в патогенезе ретинопатии недоношенных. Клинико-экспериментальное исследование.**

**14.01.07 – глазные болезни**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва – 2020**

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор, д.м.н. **В.В. Нероев**)

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
**Катаргина Людмила Анатольевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ведущая организация:**

Защита диссертации состоится « » 2020 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 208.042.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19). С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте [www.igb.ru](http://www.igb.ru) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России (105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19)

Автореферат разослан « » 2020 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета**  
доктор медицинских наук

**Филатова И.А.**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Ретинопатия недоношенных (РН) остается одной из ведущих причин слепоты в детском возрасте, несмотря на разработку и активное применение современных стандартов диагностики и лечения данной патологии.

Частота развития РН в группе риска по данным разных авторов составляет 11,96-47%. (Садовникова Н.А., Бржеский В.В., 2017, Сайдашева Э.И., 2014, Park SH, 2016, Holmström 2017, Holm M 2017, Zhu X 2017).

Во многом проблема РН решена путем внедрения в широкую практику профилактических осмотров пациентов группы риска и проведения лазеркоагуляции (ЛК) аваскулярных зон сетчатки в пороговой стадии заболевания. В зависимости от локализации и степени активности заболевания, эффективность ЛК составляет 65-98% (Нероев В.В., Катаргина Л.А., Коголева Л.В., 2013, 2015). РН I зоны и задняя агрессивная форма РН (ЗАРН), характерные для глубоконедоношенных детей, часто резистентны к традиционной ЛК, что является одним из актуальных вопросов в проблеме РН на сегодняшний день.

Многие офтальмологи рассматривают анти-VEGF терапию как метод выбора при РН I зоны и ЗАРН (Stahl A., 2019, Sankar M., 2018, Li Z., 2018, Mintz-Hittner H., 2011). Однако блокирование только лишь VEGF не может полностью подавить патологический ангиогенез, так как в процессе задействованы и другие факторы, о чем свидетельствуют рецидивы РН в отдаленном периоде.

Кроме того, актуальной проблемой является оптимизация профилактических осмотров. Организация скрининга детей группы риска очень затратное и трудоемкое мероприятие, при том, что не более 10% пациентов достигают стадии заболевания, требующей лечения. В связи с этим крайне актуальным является поиск прогностических факторов течения заболевания, что позволит оптимизировать тактику наблюдения.

Регуляция ангиогенеза осуществляется сложной системой взаимодействующих факторов роста, компонентов нейроэндокринной системы и цитокинов. Их изучение представляет собой перспективное направление исследований, учитывая сложный плеiotропный характер их свойств и зачастую противоречивость имеющихся на сегодняшний день данных. В частности, активно изучается роль нарушений иммунного статуса недоношенных детей в этиопатогенезе РН (Катаргина Л.А., Слепова О.С., Осипова Н.А., 2015, Катаргина Л.А., Белова М.В., 2011, 2012; Балашова Л.М., 2018; Скрипец П.П., 2003; 2010; Silveira R., 2011, Kurtul B.E., 2015).

Сравнительно недавно стала изучаться роль моноаминов в регуляции ангиогенеза. Работы, посвященные изучению их участия в развитии вазопротеративных заболеваний сетчатки, немногочисленны и в основном касаются изучения роли адренорецепторов и норадреналина (Ristori, 2011, Makhoul, 2013).

Таким образом, актуальным является дальнейшее изучение патогенеза РН с поиском новых и совершенствованием имеющихся методов своевременной диагностики и лечения заболевания.

**Цель исследования:** изучение роли моноаминов и комплекса цитокинов в патологической вазопротерации при РН в эксперименте и клинике.

**Задачи исследования:**

1. Изучить частоту развития и тяжесть ретинопатии недоношенных при современных условиях выхаживания и уточнить основные факторы риска развития заболевания у глубоко недоношенных детей.

2. Исследовать концентрацию биогенных аминов в сыворотке крови и сетчатке новорожденных крысят в норме и при развитии экспериментальной ретинопатии недоношенных (ЭРН).

3. Исследовать концентрацию биогенных аминов в плазме крови недоношенных детей группы риска развития РН и оценить их возможную роль в патогенезе РН.

4. Оценить взаимосвязь показателей концентрации цитокинов и ростовых факторов в плазме крови недоношенных детей с развитием и особенностями течения РН.

5. Проанализировать роль биогенных аминов и ростовых факторов в патогенезе РН с целью разработки новых патогенетически обоснованных путей влияния на ее развитие и течение.

### **Научная новизна**

1. На большом клиническом материале (678 недоношенных детей) выявлено, что при современных условиях выхаживания частота развития ретинопатии недоношенных составляет 28,5% среди детей группы риска, достигая 77% у глубоконедоношенных детей. Частота пороговых стадий составила 7,2% среди всех детей группы риска. Впервые установлено, что в группе глубоко недоношенных детей с массой тела при рождении до 1000 г не всегда присутствует четкая связь развития РН с изученными клиническими факторами риска, что может свидетельствовать о некоторых патогенетических особенностях РН в разных группах.

2. Впервые на модели ЭРН на крысятах выявлено снижение предшественника дофамина L-ДОФА в сетчатке и крови крысят и максимальное падение его концентрации на пике неоваскуляризации. При ЭРН уровень ретинального норадреналина значительно повышается, достигая максимальных значений при появлении начальной патологической вазопролиферации, что свидетельствует о важной роли L-ДОФА и норадреналина в ангиогенезе.

3. Впервые проведен анализ содержания моноаминов (дофамин, норадреналин, серотонин) в плазме крови детей группы риска по развитию РН. В группе детей с РН с постконцептуальным возрастом (ПКВ) до 35 нед. в плазме выявлен более низкий уровень серотонина по сравнению с детьми без РН, а также тенденция к повышению содержания норадреналина по мере прогрессирования РН.

4. Впервые изучен развернутый системный цитокиновый статус (47 показателей различного биологического действия) недоношенных детей группы риска развития РН и проведен сравнительный динамический анализ исследуемых показателей в клинических группах в зависимости от развития и течения заболевания. Установлено, что до манифестации заболевания (на этапе выявления аваскулярных зон на глазном дне) определяется более высокий уровень MCP1 и более низкий уровень TGF $\beta$ 1 в крови у детей с развившейся впоследствии РН, что позволяет рассматривать данные показатели как новые факторы риска развития РН. Обнаружено повышенное содержание VEGF-A, TGF $\beta$ 2, PDGF-BB в начальных стадиях РН у детей с развившейся впоследствии пороговой РН, что также может служить прогностическим признаком неблагоприятного течения заболевания.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Подтверждено, что основными факторами риска развития РН по-прежнему остаются низкие гестационный возраст и масса тела при рождении, длительная ИВЛ. У детей с более высокой массой тела при рождении (более 1000 г) частота развития тяжелых форм РН коррелирует с наличием некротизирующего энтероколита (НЭК) и внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК). У детей с ЭНМТ частота развития РН не имеет четкой зависимости от клинических факторов риска, что свидетельствует об особенностях течения заболевания в этой группе.

2. Доказано, что патологическая вазопрлиферация при ЭРН сопровождается снижением концентрации L-ДОФА в крови и сетчатке, что говорит о важной роли L-ДОФА в регуляции ангиогенеза и ставит вопрос о разработке новых подходов к терапии РН.

3. В качестве прогностических критериев развития РН до манифестации заболевания могут быть использованы повышение уровня MCP1 (>95 пг/мл) и снижение TGF $\beta$ 1 (< 18000 пг/мл) в плазме крови. На этапе I-II стадий РН в

качестве предикторов дальнейшего неблагоприятного течения заболевания могут служить повышенный уровень VEGF-A (>108 пг/мл), TGFβ2 (>100 пг/мл), PDGF-BB (>1800 пг/мл), нарастание уровня норадреналина, а также более низкий уровень серотонина (<17,0 пг/мл) в крови.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого сравнительного нерандомизированного исследования с использованием экспериментальных, клинических, инструментальных и статистических методов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Частота развития РН при современных условиях выхаживания составляет 28,5% среди всех детей группы риска, достигая 77% у детей с ЭНМТ. Прогрессирование РН до пороговых стадий происходит у 7,2% из всех детей группы риска и у 32% глубоко недоношенных детей. У детей с массой тела при рождении более 1000 г развитие и тяжесть РН коррелируют с длительностью ИВЛ, НЭК и ВЖК. У глубоко недоношенных детей частота развития РН в большей степени зависит от наличия БЛД, тогда как на тяжесть РН оказывают влияние длительность ИВЛ и наличие БЛД, что может объясняться патогенетическими особенностями ретинопатии при ранних сроках гестации.

2. Впервые в эксперименте установлено, что норадреналин, дофамин и его предшественник L-ДОФА на местном уровне принимают участие в регуляции патологического ангиогенеза при ЭРН. Развитие неоваскуляризации при ЭРН сопровождается снижением системного уровня L-DOPA.

3. Впервые установлено, что у детей с РН на сроке 32-35 нед ПКВ отмечается более низкий уровень серотонина (<17,0 пг/мл) в плазме, а при

прогрессировании заболевания отмечается тенденция к нарастанию уровня норадреналина, что говорит об участии данных катехоламинов регуляции течения РН на системном уровне и может быть использовано для диагностических целей.

4. Высокая концентрация MCP1 и низкая концентрация TGFβ1 в крови у детей позволяют выявить группу высокого риска развития РН до появления первых признаков заболевания, что может быть использовано для дифференцированной тактики наблюдения. Повышенное содержание TGFβ2, VEGF-A, PDGF-BB на этапе начальных стадий РН служит признаком неблагоприятного течения заболевания.

#### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Степень достоверности полученных результатов исследований определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок исследований, работа выполнена с использованием современных методов обследования. Методы статистической обработки результатов адекватны поставленным задачам. Положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, аргументированы и являются результатом многоуровневого анализа.

Основные положения работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции с международным участием: "XI Российский общенациональный офтальмологический форум", Москва, 2018 г.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 4 – в печатных изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованный ВАК РФ.

## **Внедрение в практику**

Результаты исследования внедрены в клиническую практику отдела патологии глаз у детей и детского консультативно-поликлинического отделений ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Содержит 14 таблиц, 40 рисунков. Список литературы включает 238 источников, в том числе 34 отечественных и 204 зарубежных авторов.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на базе отдела патологии глаз у детей (руководитель – профессор, д.м.н. Л.А. Катаргина) ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор, д.м.н. В.В. Нероев), совместно с отделом иммунологии и вирусологии (начальник отдела, к.б.н. Н.В. Балацкая), научно-экспериментальным центром (руководитель – к.б.н. А.И. Щипанова), отделением патологической анатомии и гистологии глаза (руководитель – профессор И.П. Хорошилова-Маслова), отделом патофизиологии и биохимии (руководитель – профессор Н.Б. Чеснокова). Часть биохимических исследований были выполнены на базе лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций (руководитель – академик РАН, д.б.н., профессор М.В. Угрюмов) ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН (директор д.б.н. чл.-корр. РАН А.В. Васильев).

Обследование недоношенных детей проводилось на базе отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных (заведующая – к.м.н.

А.С. Петрова) и отделения патологии новорожденных и недоношенных детей (заведующая – С.А. Трусова) ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр» (главный врач – профессор, д.м.н. О.Ф. Серова), который соответствует всем современным требованиям по оснащению и выхаживанию недоношенных детей.

**Клиническая часть.** Проведен анализ частоты развития и структуры РН у 678 детей группы риска, находившихся на лечении в Московском Областном перинатальном центре в 2017-2018 гг.

Офтальмологическое обследование проводилось согласно принятому в России протоколу скрининга РН (Федеральные клинические рекомендации, 2015). Офтальмоскопическое обследование и лечение детей осуществлялось совместно с врачом-офтальмологом О.А. Шеверной.

Для исследования цитокинового статуса было обследовано 44 недоношенных ребенка. У 14 детей иммунологические показатели были исследованы в динамике до развития и на фоне РН (от 2 до 4 раз). Всего исследовано 73 образца венозной крови. В 0,5 мл каждого из образцов методом мультиплексного анализа на проточном цитометре было исследовано содержание 45 цитокинов. Содержание TGF $\beta$ 1 и TGF $\beta$ 2 в плазме было определено методом ИФА. Иммунологическое исследование плазмы крови проводилось совместно со старшим научным сотрудником отдела иммунологии и вирусологии И.Г. Куликовой и лаборантом Н.С. Славинской под руководством начальника отдела, к.б.н. Н.В. Балацкой.

Определение содержания моноаминов (дофамина, норадреналина и серотонина) было проведено 36 недоношенным детям (39 образцов плазмы) методом ИФА. Биохимические исследования выполнены совместно со старшим научным сотрудником отдела патофизиологии и биохимии к.м.н. Т.А. Павленко под руководством начальника отдела д.б.н. профессора Н.Б. Чесноковой. Забор образцов венозной крови осуществлялся у всех детей

одновременно с плановым динамическим контролем биохимических показателей.

**Экспериментальная часть.** Исследование выполнено на 59 крысятах породы Вистар на модели ЭРН (Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Осипова Н.А., 2017г.). В опытную группу вошел 21 крысенок, у которых была воспроизведена ЭРН, в контрольную группу – 20 крысят, содержащихся в обычных условиях. Соблюдение условий эксперимента осуществлялись совместно с сотрудником научно-экспериментального центра старшим лаборантом Б.В. Витер под руководством к.б.н. А.И. Щипановой.

Крысят выводили из эксперимента на 7-е (n=10), 14-е (n=10), 21-е (n=11) и 30-е (n=10) сутки. Всем крысятам в указанные сроки проводили бинокулярную энуклеацию и забор крови. В образцах сетчатки глаз и в крови определяли содержание норадреналина, дофамина и предшественника дофамина L-3,4 дигидроксифенилаланина (L-ДОФА). Выбор сроков энуклеации основывался на данных о нормальном ангиогенезе сетчатки крысят и о фазах развития ретинопатии в эксперименте. Энуклеация и забор образцов стекловидного тела проводились совместно с к.м.н. Н.А. Осиповой, биохимические исследования - совместно с научными сотрудниками лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН к.м.н. Ю.О. Никишиной и к.м.н. А.Р. Мургазиной под руководством академика РАН, д.б.н., профессора М.В. Угрюмова.

36 глазных яблок на 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки подвергали гистологическому исследованию, которое проводилось совместно с сотрудником отделения патологической анатомии и гистологии глаза врачом-патологоанатомом А.М. Майбогиным под руководством профессора И.П. Хорошиловой-Масловой.

**Статистическая обработка** результатов проводилась в программе IBM SPSS Statistics (версия 22) и с использованием статистического пакета

Microsoft Excel. Статистическая обработка выполнена автором самостоятельно.

## Результаты исследований

### Анализ частоты и факторов риска развития РН при современных условиях выхаживания

Анализ частоты и тяжести РН был проведен у 678 детей группы риска (табл. 1).

Таблица 1.

Частота РН в группах детей с разной массой тела при рождении.

Масса тела при рождении, г	Общее число детей в группе	Частота РН в группе (абс./ %)	Частота самопроизвольного регресса РН (абс./ %)	Частота прогрессирования до пороговых стадий РН (абс./ %)
1500-2740 г	351	31 / 8,8%	30 / 8,5%	1 / 0,3%
1000-1499 г	209	71 / 34%	61 / 29,2%	10 / 4,8%
500-999 г	102	77 / 75,5%	51 / 50%	26 / 25,5%
380-499 г	16	14 / 87,5%	2 / 12,5%	12 / 75%
Итого (средняя частота):	678	193 / 28,5%	144 / 21,2%	49 / 7,2%

РН была диагностирована у 193 из 678 детей группы риска (28,5%), в группе маловесных детей она достигала 75,5-87,5%. Частота пороговых форм РН увеличивается со снижением массы тела при рождении, достигая 32% у детей с массой тела при рождении менее 1000 г.

Для оценки влияния послеродовых факторов риска на развитие РН мы провели анализ длительности ИВЛ, наличия бронхо-легочной дисплазии (БЛД), некротизирующего энтероколита (НЭК), внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК), частоты переливаний эритроцитарной массы, обеднённой лейкоцитами и тромбоцитами (ЭМОЛТ) и частоты развития

артериальной гипотонии, потребовавшей применения допамина, на характер течения РН (табл.2-7).

Таблица 2.

Средняя продолжительность ИВЛ у детей с различным течением РН (сут.)

Масса тела при рождении, г	Дети без РН	Дети с самопроизвольным регрессом РН	Дети с пороговой РН
1500-2740 г	0,57±0,07	0,7±0,21	3,0
1000-1499 г	1,1±0,21	1,8±0,28	4,8±1,57
380-999 г	6,5±1,56	9,5±1,61	20,3±3,84

Выявлена связь частоты и тяжести РН с продолжительностью ИВЛ у детей с весом при рождении от 1000 до 1500 г (табл. 2). В группе детей с весом до 999 г продолжительность ИВЛ была выше у детей с индуцированным регрессом по сравнению с детьми без РН и по сравнению с детьми с самопроизвольным регрессом РН ( $p < 0,01$ ), тогда как различия между детьми без РН и с самопроизвольным регрессом РН выявлено не было.

Таблица 3.

Частота БЛД (%) у детей с различным течением РН.

Масса тела при рождении	Дети без РН	Дети с самопроизвольным регрессом РН	Дети с пороговой РН
1500-2740 г	1,3	0	0
1000-1499 г	30,8	68	40
380-999 г	18,5	86,8	76,3

В весовой категории 1000-1499 г частота встречаемости БЛД (таб. 3) в группе детей с самопроизвольным регрессом выше, чем в группе детей без РН ( $p < 0,01$ ) и чем в группе детей с индуцированным регрессом ( $p = 0,098$ ), однако не было выявлено достоверных различий между группами детей без РН и с индуцированным регрессом РН. Среди детей с ЭНМТ БЛД выявлялась чаще у детей с самопроизвольным и индуцированным регрессом РН по сравнению с детьми без РН.

Таблица 4.

## Частота НЭК (%) у детей с различным течением РН.

Масса тела при рождении	Дети без РН	Дети с самопроизвольным регрессом РН	Дети с пороговой РН
1500-2740 г	16,4	28,6	100
1000-1499 г	32,7	31,8	60
380-999 г	48,1	46,2	56,8

У детей с весом при рождении более 1500 г частота НЭК (табл. 4) и ВЖК (табл. 5) была выше у детей с РН. В весовой категории от 1000 до 1499 г было выявлено влияние НЭК и ВЖК на возникновение только тяжелых форм РН. У детей с меньшим весом достоверных различий по частоте НЭК и ВЖК выявлено не было.

Таблица 5.

## Частота ВЖК (%) у детей с различным течением РН.

Масса тела при рождении	Дети без РН	Дети с самопроизвольным регрессом РН	Дети с пороговой РН
1500-2740 г	7,2	42,9	100
1000-1499 г	25	27,3	60
380-999 г	66,7	52,8	68,4

Таблица 6.

## Частота переливания ЭМОЛТ (%) у детей с разным течением РН.

Масса тела при рождении	Дети без РН	Дети с самопроизвольным регрессом РН	Дети с пороговой РН
1500-2740 г	1,3	0	0
1000-1499 г	7,7	22,7	20
380-999 г	40,7	55,8	63,2

В группе детей с весом при рождении 1000-1499 г частота переливаний ЭМОЛТ была выше у детей с РН, как с самопроизвольным, так и с индуцированным регрессом ( $p < 0,1$ ), но не различалась между двумя

подгруппами. У детей с ЭНМТ переливания ЭМОЛТ выполнялись чаще в случаях индуцированного регресса РН по сравнению с детьми без РН ( $p < 0,1$ ). Различий между другими группами выявлено не было.

Для оценки возможного влияния на развитие РН допамина, который назначается в первые сутки жизни при выраженной артериальной гипотонии, проанализирована частота его применения у 132 детей с гестационным возрастом до 30 нед. (табл.7).

Таблица 7.

Частота назначения допамина у детей с разным течением РН.

Группа	Число детей в группе, чел.	Частота назначения допамина, %
Дети без РН	36	13,89%
Дети с самопроизвольным регрессом РН	53	18,87%
Дети с пороговой РН	32	28,12%

В группе детей с развившейся впоследствии пороговой РН допамин применялся в 2 раза чаще, чем в группе без РН, но достоверных различий между группами не выявлено.

Таким образом, частота развития РН при современных условиях выхаживания составляет 28,5% среди всех детей группы риска и 77,1% у детей с ЭНМТ. Прогрессирование РН до пороговых стадий происходит у 7,2% детей группы риска и 32% детей с ЭНМТ. Анализ соматической отягощенности подтвердил, что наиболее значимыми факторами риска развития РН являются низкие гестационный возраст и масса тела при рождении. Длительность ИВЛ коррелирует с развитием и тяжестью РН у детей с массой тела при рождении до 1499 г. Среди детей с массой тела при рождении более 1000 г РН чаще развивается при наличии НЭК и ВЖК.

Среди детей с ЭНМТ частота и тяжесть РН по нашим данным в меньшей степени зависят от степени выраженности соматической патологии

и определяются в первую очередь глубокой незрелостью структур глаза глубоко недоношенных детей, что предполагает наличие патогенетических особенностей РН у детей с ранним сроком гестации.

### Экспериментальная часть

#### Определение уровня катехоламинов в сетчатке крысят при экспериментальной ретинопатии недоношенных

На 7-е сутки (табл.8), когда гистологически выявляются аваскулярные зоны и отсутствуют признаки патологической вазопротиферации, не было выявлено различий по содержанию катехоламинов в сетчатке крысят двух групп. Дофамин на данном сроке не определялся, так как на этом сроке отсутствуют дофаминсинтезирующие амакриновые клетки (ДАК), и синтез дофамина в сетчатке не происходит (Zhang, 2013).

Таблица 8.

#### Содержание катехоламинов в сетчатке опытной и контрольной групп

Возраст живот-ных, сут.	Средний уровень дофамина, пмоль/г		Средний уровень L-ДОФА, пмоль/г		Средний уровень норадреналина, пмоль/г	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
7	-	-	0,482±0,086	0,368±0,115	0,0398±0,02	0,0283±0,006
14	0,5	0,16±0,177	1,95±0,728#	1,22±0,168	0,97±0,229*#	0,14±0,046
21	18,71±7,48#	18,2±3,38	8,26±4,281*#	17,01±5,247	-	-
30	74,2±17,203#	85,54±8,159	19,03±8,767*#	32,85±10,867	-	-

\*- различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем

# - различия достоверны по сравнению с предыдущим сроком исследования

На 14-е сутки при ЭРН гистологически появляются признаки начинающейся пролиферации клеток эндотелия ретинальных сосудов. Содержание L-DOPA и норадреналина в сетчатке опытной группы на этом

сроке повышалось по сравнению с контролем. Выявлено нарастание содержания норадреналина по сравнению с 7-ми сутками. Это говорит о стимулирующей роли норадреналина в ходе завершения нормальной васкуляризации сетчатки. Повышение норадреналина в группе с ЭРН также говорит в пользу его проангиогенных свойств.

На данном сроке в сетчатке начинает синтезироваться и определяться дофамин, что подтверждается данными литературы о появлении единичных ДАК в этом возрасте в сетчатке крысят в норме (Zhang, 2013).

На 21-е сутки, что гистологически соответствует пику неоваскуляризации, уровень L-DOPA был достоверно ниже в сетчатке крыс с ЭРН. Уровень дофамина в группах не различался, что может говорить о его активном синтезе и высоком расходе L-DOPA. Возможно, что именно создающийся к данному сроку дефицит L-DOPA и является причиной развития патологической неоваскуляризации.

На 30-е сутки, когда гистологически отмечается начало регресса ЭРН, содержание L-DOPA также снижено по сравнению с группой контроля, однако наблюдается нарастание его концентрации относительно 21-х суток. Нарастание уровня L-DOPA и дофамина на этом сроке может свидетельствовать в пользу их участия в регрессе ЭРН и подтверждает их антиангиогенные свойства.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии дофамина, L-DOPA и норадреналина в регуляции ангиогенеза при РН и ставят вопрос об изучении их влияния на системном уровне.

#### **Определение уровня катехоламинов в плазме крысят при экспериментальной ретинопатии недоношенных.**

Учитывая приведенные выше данные об участии моноаминов в патологическом ангиогенезе при ЭРН, а также в связи с тем, что для анализа клинических корреляций необходимо исследование доступных материалов, мы провели анализ содержания моноаминов в плазме крови (Таб.9).

Таблица 9.

## Содержание катехоламинов в плазме опытной и контрольной групп

Возраст животных, сут.	Уровень дофамина, пмоль/г		Уровень L-ДОФА, пмоль/г		Уровень норадреналина, пмоль/г	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
14	0,23±0,13	0,26±0,18	0,31±,04*	0,42±0,08	3,03±1,54	3,67±1,73
21	0,15±0,06	0,18±0,05	0,87±0,29*	1,53±0,61	3,39±1,92	3,64±1,22
30	0,09±0,02	0,09±0,03	0,33±0,198	0,21±0,08	2,83±0,58	3,42±1,72

\*- различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем

На 14-е сутки было выявлено достоверное снижение уровня L-ДОФА в опытной группе. Содержание норадреналина и дофамина не различалось между группами. Снижение L-ДОФА в системном кровотоке позволяет рассматривать его как потенциальный предиктор развития тяжелых форм РН на стадии ранних клинических изменений у недоношенных детей.

В плазме крови на 21-е сутки уровень L-ДОФА повышался по сравнению с 14-ми сутками и был достоверно ниже в плазме крысят с ЭРН. Появилась тенденция к снижению уровня дофамина у крысят с ЭРН. Это позволяет предположить наличие влияния сниженных концентраций L-ДОФА и дофамина на определяющийся на этом сроке гистологически пик неоваскуляризации.

На 30-е сутки не было выявлено достоверных различий в содержании моноаминов. Регресс ЭРН сопровождался нормализацией их системного уровня и достижением контрольных значений.

Выявленные системные изменения уровня катехоламинов говорят о вовлечении центральных регуляторных механизмов в патогенез РН, что должно учитываться при поиске новых методов диагностики и лечения этого заболевания. Снижение уровня L-ДОФА в плазме на 14 сут ЭРН (что соответствует начальным стадиям РН) делает перспективным изучение содержания катехоламинов в плазме у недоношенных детей для прогнозирования характера течения РН в клинике.

## Определение уровня катехоламинов в плазме крови недоношенных детей

Учитывая выявленную роль катехоламинов в патогенезе экспериментальной РН, нами проведено исследование уровней катехоламинов в плазме недоношенных детей.

Было изучено 39 проб (у 36 детей). Дети были разделены на 2 группы: без РН и с РН. В каждой группе анализ содержания катехоламинов (дофамин, норадреналин, серотонин) проводился на сроках 32-35 нед. и 36-39 нед. ПКВ, что клинически соответствуют срокам манифестации и пика прогрессирования РН. Дофамин определялся в 44,4% проб, серотонин и норадреналин в 100% проб. Достоверных различий по содержанию дофамина у детей разных групп выявлено не было. Уровень серотонина был достоверно снижен у детей с РН по сравнению с детьми без РН на сроке 32-35 нед. ПКВ (рис. 1), что говорит о его антиангиогенных свойствах и согласуется с данными литературы о подавлении серотонином синтеза VEGF (Cerezo A.B., 2017). Кроме того, серотонин является предшественником мелатонина, который благодаря своим антиангиогенным и антиоксидантным свойствам способен ингибировать патологический ангиогенез при ЭРН (Катаргина Л.А., Осипова Н.А., 2016, Xu Y., 2018).

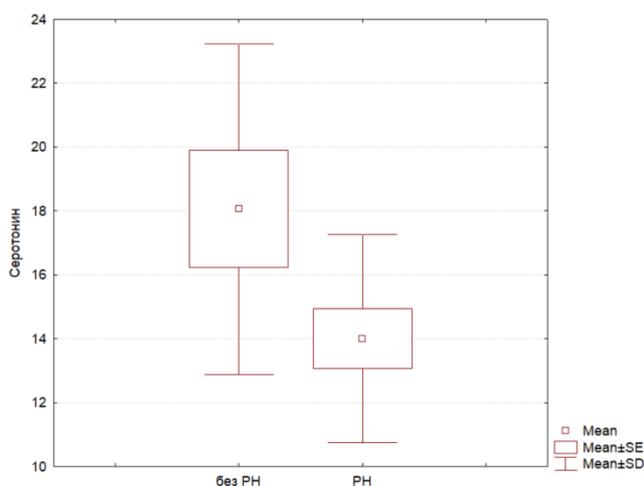


Рисунок 1. Содержание серотонина (пг/мл) в плазме у детей с и без РН на сроке до 35 нед. ПКВ.

Уровень норадреналина не различался между группами детей с и без РН, однако выявлена тенденция к повышению его концентрации ( $p=0,06$ ) в группе детей с РН на сроке 36-39 нед. ПКВ (т.е. при прогрессировании заболевания) (рис. 2), что вместе с данными, полученными в эксперименте, подтверждает проангиогенные свойства норадреналина.

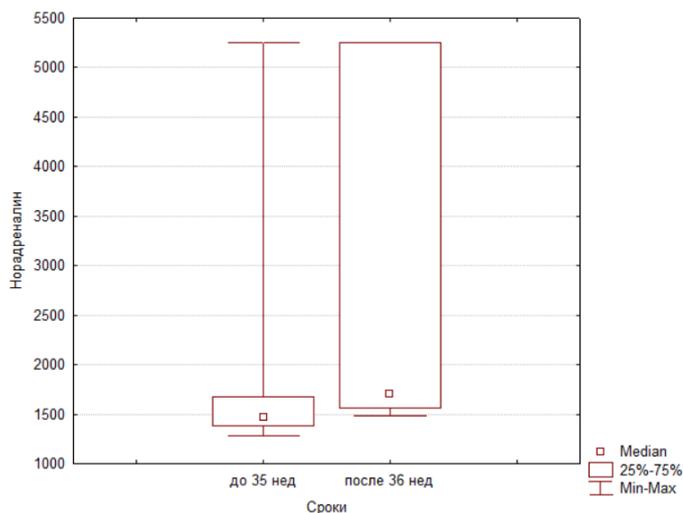


Рисунок 2. Содержание норадреналина (пг/мл) в плазме детей с РН.

Таким образом, неблагоприятным фактором развития РН может служить низкое содержание серотонина ( $<17,0$  пг/мл) на сроке 32-35 нед. ПКВ. Также у детей с начальными стадиями РН нарастание концентрации норадреналина при динамическом наблюдении может служить маркером прогрессирования заболевания. Полученные данные подтверждают роль биогенных аминов в ангиогенезе и могут служить основой для разработки новых методов диагностики и терапии РН.

### **Анализ цитокинового статуса у детей с различным течением РН**

Ранее в работе Н.А. Осиповой (2016г.) было показано, что высокая концентрации VEGF-A и низкое значение концентрации TGF- $\beta$  в сыворотке крови недоношенных детей с развившейся в динамике пороговой стадией РН позволяют еще до появления офтальмоскопических признаков заболевания выделить группу детей с высоким риском неблагоприятного течения заболевания. Мы провели дополнительное исследование цитокинового

статуса для накопления большего количества данных и поиска новых факторов риска развития тяжелых форм РН.

Ретроспективно дети были разделены на 3 группы: 12 детей без РН, 15 с самопроизвольным регрессом, 17 - с индуцированным. Обследование детей проводилось на сроке от 32 до 41 нед. ПКВ на разных этапах течения РН.

Из 47 цитокинов у всех детей определялись 20: IL-2, IL-18, IL-15, IL-7, Eotaxin, GRO- $\alpha$ , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , IL-1RA, LIF, BDNF, VEGFA, GRO $\alpha$ , HGF, PDGF BB, SCF, SDF1 $\alpha$ , TGF $\beta$  1. Частота определения других цитокинов представлена в таблице 10.

Таблица 10.

Частота определения цитокинов в плазме крови у детей с различным течением РН.

Цитокин	Дети с АЗ, у которых РН не развилась (n=10)	Дети с АЗ с развившейся впоследствии РН (n=11)	Дети с РН 1-2 стадии (с самопроизвольным регрессом впоследствии) (n=9)	Дети с РН 1-2 стадии (с прогрессированием до пороговых стадий впоследствии) (n=9)	Дети с пороговой стадией РН (n=8)
IL1 $\beta$	100%	100%	100%	100%	88%
PIGF	100%	100%	100%	100%	88%
IL 17A	100%	100%	100%	100%	88%
IL 6	89%	100%	100%	100%	50%
TNF $\alpha$	89%	91%	100%	100%	63%
EGF	89%	73%	100%	89%	63%
IFN $\gamma$	83%	82%	67%	100%	63%
IL 27	89%	73%	100%	89%	50%
GM SCF	78%	64%	100%	100%	38%
VEGF D	67%	73%	56%	67%	100%
FGF $\beta$	44%	64%	100%	67%	63%
IL 4	78%	91%	100%	100%	50%
IL 13	78%	73%	100%	89%	63%
IL 5	44%	36%	67%	44%	13%
TGF $\beta$ 2	60%	36%	22%*	88,9%*	25%*
MIP 1 $\alpha$	67%	73%	56%	67%	50%
IL 21	44,9%	45,5%	56%	33%	13%

IL 22	44%	54,5%	78%	56%	13%
IL 10	0%	0%	22%	0%	0%
IL 23	22%	9%	22%	22%	13%
IFN $\alpha$	0	0	22%	0	13%
IL 1 $\alpha$	11%	9%	0	33%	13%
IL 10	0%	0%	22%	0%	0%

Достоверные различия были обнаружены по частоте определения TGF $\beta$ 2 ( $p=0,08$ ). IL12p70, IL9, IL31, NGF $\beta$ , TNF $\beta$  определялись крайне редко.

Мы проанализировали количественное содержание наиболее часто определяемых цитокинов у детей с различным течением РН. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Среднее содержание цитокинов и факторов роста в плазме крови у детей с различным течением РН (пг/мл).

цитокин	Дети с АЗ, у которых РН не развилась (n=10)	Дети с АЗ с развившейся впоследствии РН (n=11)	Дети с РН 1-2 стадии (с самопроизвольным регрессом впоследствии) (n=9)	Дети с РН 1-2 стадии (с прогрессированием до пороговых стадий впоследствии) (n=9)
MCP-1	124,87 $\pm$ 30,52**	251,2 $\pm$ 67,73**	118,09 $\pm$ 19,06	200,9 $\pm$ 40,95
TGF $\beta$ 1	40983,4 $\pm$ 20273,1**	12667,27 $\pm$ 3065,1**	11906,25 $\pm$ 1405,1	25269,71 $\pm$ 8357,2
TGF $\beta$ 2	315,92 $\pm$ 113,2	206,79 $\pm$ 122,4	35,65 $\pm$ 28,8*	163,32 $\pm$ 39,6*
VEGF-A	195,2 $\pm$ 77,2	134,4 $\pm$ 23,8	88,5 $\pm$ 10,9*	175,3 $\pm$ 37,6*
PDGFBB	3230,4 $\pm$ 814,6	2467,1 $\pm$ 646,1	1395,4 $\pm$ 243,3**	3417,3 $\pm$ 1131,4**

\* различия достоверны по Манн-Уитни; \*\* различия на уровне тенденции по Стьюденту.

До манифестации заболевания мы выявили более низкий уровень MCP1 и более высокий уровень TGF $\beta$ 1 у детей без РН. Данные по TGF $\beta$ 1 совпадают с результатами работы Н.А. Осиповой и могут служить прогностическими признаками развития РН в дальнейшем. Кроме того, средний уровень VEGF-A, TGF $\beta$ 2, PDGF BB был повышен у детей с неблагоприятным течением РН по сравнению с детьми с самопроизвольным регрессом.

Достоверных различий по содержанию IL-8, IL-18, IL-15, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-1RA, VEGF-A, HGF, LIF, IL-7, Eotaxin, GRO- $\alpha$ , BDNF, RANTES, SDF-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , SCF, PDGF-BB, PlGF, IP-10 выявлено не было.

Таким образом, высокая концентрация MCP1 (>95 пг/мл) и низкая концентрация TGFβ1 (<18000 пг/мл) в крови у недоношенного ребенка позволяют выявить группу высокого риска развития РН до появления первых признаков заболевания. Повышенное содержание VEGF-A, PDGF BB, TGFβ2 на начальных стадиях РН служит признаком неблагоприятного течения заболевания. Полученные данные расширяют представления о патогенезе РН и открывают перспективы для разработки новых методов диагностики и лечения данного заболевания.

### Выводы

1. Частота развития РН при современных условиях выхаживания составляет 28,5% среди всех детей группы риска, достигая 77,1 % среди детей с ЭНМТ, частота развития пороговых стадий составила 7,2% среди всех детей группы риска и 32% среди детей с ЭНМТ. Установлено, что в разных весовых категориях частота развития и тяжесть РН зависят от наличия различной соматической патологии. У детей с массой тела при рождении (более 1000 г) частота развития тяжелых форм РН коррелирует с наличием НЭК и ВЖК. У детей с ЭНМТ частота развития РН зависит от наличия БЛД, а на тяжесть РН у детей в этой весовой категории оказывают влияние длительность ИВЛ и наличие БЛД.
2. Установлена важная роль моноаминов в патогенезе РН, показана динамика изменений их уровней в сетчатке и плазме крысят с ЭРН на разных стадиях заболевания. Выявленное снижение системного уровня L-ДОФА на начальных стадиях ЭРН делает перспективным исследование возможности его использования для выявления детей с высоким риском развития РН.
3. Анализ содержания моноаминов в плазме недоношенных детей выявил снижение уровня серотонина у детей с РН на начальных стадиях заболевания, что говорит о его антиангиогенных свойствах. Нарастание содержания норадреналина по мере прогрессирования заболевания

подтверждает полученные в эксперименте данные о проангиогенных свойствах норадреналина.

4. Обобщение результатов эксперимента и клиники показало наличие возможных проангиогенных свойств у норадреналина, а также участие в антиангиогенных процессах серотонина и L-ДОФА. Выявленные изменения позволяют использовать биогенные амины в качестве маркеров прогрессирования РН и делают перспективным возможность их изучения в качестве терапевтических мишеней.

5. Анализ содержания цитокинов и факторов роста в плазме недоношенных детей показал, что повышение MCP1 ( $>95$  пг/мл) и снижение TGF $\beta$ 1 ( $<18000$  пг/мл) на этапе до развития РН, а также высокий уровень VEGF-A ( $>108$  пг/мл), TGF $\beta$ 2 ( $>100$  пг/мл), PDGF-BB ( $>1800$  пг/мл) при манифестации РН можно рассматривать как новые факторы риска развития и тяжелого течения РН.

#### **Практические рекомендации**

1. При выявлении НЭК и ВЖК у недоношенных детей с массой тела при рождении более 1000 г следует отнести данного ребенка в группу высокого риска развития пороговой формы РН и планировать его дальнейшее ведение таким образом, чтобы обеспечить возможность незамедлительного лечения.
2. Следует определять содержание MCP1, TGF $\beta$ 1, VEGF-A, TGF $\beta$ 2, PDGF-BB, серотонина и норадреналина в плазме крови недоношенных детей группы риска развития РН. В случае выявления содержания MCP1 более 95 пг/мл или TGF $\beta$ 1 менее 18000 пг/мл следует отнести данного ребенка в группу высокого риска развития РН. При определении содержания в плазме VEGF-A  $>108$  пг/мл, TGF $\beta$ 2  $>100$  пг/мл, PDGF-BB  $>1800$  пг/мл, серотонина  $<17,0$  пг/мл или при нарастании уровня норадреналина следует учитывать высокий риск прогрессирования РН и планировать проведение ЛК сетчатки.

## Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Катаргина Л.А., Осипова Н.А., Панова А.Ю., и др. Роль катехоламинов в развитии патологической неоваскуляризации сетчатки на экспериментальной модели ретинопатии недоношенных у крыс // Доклады Академии наук. - 2019. - Т. 489. - №3. - С. 313-317. doi: 10.31857/S0869-56524893313-317
2. Катаргина Л.А., Осипова Н.А., Панова А.Ю., Бондаренко Н.С., Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Угрюмов М.В. Изучение патогенетического значения катехоламинов в развитии ретинопатии недоношенных на экспериментальной модели заболевания. Российский офтальмологический журнал. 2019;12(4):64-69. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2019-12-4-64-69>
3. Катаргина Л.А., Хорошилова-Маслова И.П., Бондаренко Н.С., Никишина Ю.О., Муртазина А.Р., Майбогин А.М., Осипова Н.А., Панова А.Ю., Судовская Т.В., Угрюмов М.В. Ангиогенные свойства катехоламинов в аспекте патогенеза ретинопатии недоношенных. Российский офтальмологический журнал. 2018;11(4):49-54. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-4-49-54>
4. Катаргина Л.А., Денисова Е.В., Осипова Н.А., Панова А.Ю. Роль моноаминов в регуляции ангиогенеза и перспективы их применения при ретинопатии недоношенных. Российская педиатрическая офтальмология. 2018; 13(2): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1993-1859-2018-13-2>
5. Роль дофамина в патологическом ангиогенезе при ретинопатии недоношенных. / Катаргина Л.А., Панова А.Ю. [и др.] // Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. науч.- практ. конф. с междунар. участием. – Москва, 2018. - Т. 2. - С. 501-503.

## Список сокращений

БЛД – бронхо-легочная дисплазия

ВЖК – внутрижелудочковое кровоизлияние

ЗАРН – задняя агрессивная форма ретинопатии недоношенных

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

НЭК – некротизирующий энтероколит

ПКВ – постконцептуальный возраст

РН – ретинопатия недоношенных

ЭМОЛТ – эритроцитная масса, обеднённая лейкоцитами и тромбоцитами

ЭРН – экспериментальная ретинопатия недоношенных

HGF (Hepatocyte growth factor) – гепатоцитарный фактор роста

IFN (Interferon) – интерферон

IGF (Insulin-like Growth Factor) – инсулиноподобный фактор роста

IL (Interleukin) – интерлейкин

L-DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine) - Дигидроксифенилаланин

LIF – (Leukemia Inhibitory Factor) - Лейкемия-ингибирующий фактор

MCP1 – (Monocyte Chemoattractant Protein 1) - Моноцитарный хемотаксический белок 1

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) - трансформирующий фактор роста- $\beta$

TNF (Tumor Necrosis Factor) – фактор некроза опухоли

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) - фактор роста эндотелия сосудов