

АНАЛИЗ РЕТИНАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА И ФУНКЦИЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 577 НМ В НЕПРЕРЫВНОМ РЕЖИМЕ НА СЕТЧАТКУ

© Гаврилова Н.А., Гуревич К.Г., Комова О.Ю., Зиновьева А.В.

Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова (МГМСУ)

Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Цель исследования – изучение ретиальной экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме на сетчатку в экспериментальных условиях после интравитреального введения VEGF165 (Vascular endothelial growth factor).

Материалы и методы. Исследование проводилось на 4-5-недельных самцах мышей линии C57BL/6J. Было сформировано 4 группы по 5 мышей в каждой группе, один глаз животных был экспериментальным, второй глаз оставался неповрежденным. Животным первой группы проводили интравитреальную инъекцию фосфатно-солевого буфера (PBS); животным второй, третьей и четвертой групп проводили интравитреальную инъекцию 50 нг/мл рекомбинантного VEGF165; в третьей и четвертой группах через один день после интравитреального введения VEGF165 производилось лазерное воздействие с длиной волны 577 нм на сетчатку в микроимпульсном и непрерывном режимах соответственно. Образцы тканей у животных из первой и второй групп были взяты через 2 дня после введения PBS и VEGF165, у животных из третьей и четвертой групп через один день после лазерного воздействия на сетчатку.

Результаты. Изучена ретиальная экспрессия генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера в результате воздействия на сетчатку лазерного излучения 577 нм в непрерывном режиме после интравитреального введения VEGF165. Идентифицированы гены с достоверным изменением уровней экспрессии.

Заключение. Понимание механизмов модуляции экспрессии генов сетчатки может помочь выявить ключевые регуляторные факторы, обеспечивающие терапевтический эффект лазерного излучения в непрерывном и микроимпульсном режимах, а также послужить основой для реализации будущей терапевтической тактики лечения заболеваний сетчатки.

Ключевые слова: лазерное излучение в непрерывном режиме; сетчатка; фактор роста эндотелия сосудов; экспрессия генов.

Гаврилова Наталья Александровна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой глазных болезней, МГМСУ им. А.И. Евдокимова, г. Москва. ORCID iD: 0000-0003-0368-296X. E-mail: n.gavrilova@mail.ru

Гуревич Константин Георгиевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития», МГМСУ им. А.И. Евдокимова, г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-7603-6064. E-mail: kgurevich@mail.ru

Комова Ольга Юрьевна – ассистент кафедры глазных болезней, МГМСУ им. А.И. Евдокимова, г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-7337-0833. E-mail: ol-komo@yandex.ru (автор, ответственный за переписку)

Зиновьева Александра Витальевна – старший лаборант кафедры глазных болезней, МГМСУ им. А.И. Евдокимова, г. Москва. ORCID iD: 0000-0003-4373-3135. E-mail: aleksandra.r@live.ru

Лазерное излучение в непрерывном режиме традиционно используется в лечении ретино-васкулярных заболеваний, таких как диабетическая ретинопатия, ретиальная венозная окклюзия, ретинопатия недоношенных, экссудативная форма возрастной макулярной дегенерации и др., в течение последних десятилетий. При воздействии лазерного излучения в непрерывном режиме происходит преобразование световой энергии в тепловую в пигментосодержащих структурах сетчатки (гранулы меланина пигментного эпителия) с их термическим повреждением [32]. Эффективность данного вида излучения подтверждена в ходе многоцентровых рандомизированных исследований групп по диабетической ретинопатии (DRS) и раннему

лечению диабетической ретинопатии (ETDRS) [27, 11]. Несмотря на продемонстрированную клиническую эффективность, лазерное воздействие в непрерывном режиме может сопровождаться развитием ряда неблагоприятных последствий вследствие необратимой термической абляции структур сетчатки: повышением порога темновой адаптации, снижением цветоощущения и контрастной чувствительности, формированием дефектов поля зрения, прогрессирующей атрофией пигментного эпителия сетчатки (ползучая атрофия), субретиальной хороидальной неоваскуляризацией и фиброзом [18]. На сегодняшний день точные молекулярные механизмы лазерного воздействия в непрерывном режиме, приводящие к терапевтическому

эффекту, остаются недостаточно изученными [30].

Известно, что модуляция экспрессии генов сетчатки приводит к модифицированию ряда биологических процессов вследствие изменения регуляции клеточных белков, играя важную роль в терапевтических эффектах лазерного излучения [34]. Понимание данных механизмов может помочь идентифицировать ключевые регуляторные факторы, обеспечивающие терапевтический эффект лазерного излучения в непрерывном и микроимпульсном режимах, а также послужить основой для реализации будущих терапевтических стратегий в лечении ретиноваскулярных заболеваний. На сегодняшний день анализ транскрипции микрочипов широко используется в офтальмологии, так как позволяет исследовать молекулярно-генетическую основу офтальмологических заболеваний, разрабатывать новые методы лечения и оценивать результаты их применения [37].

В предыдущем исследовании нами было изучено изменение ретинальной экспрессии генов после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме на основе анализа транскрипции микрочипов в условиях VEGF-индуцированной патологии (Vascular Endothelial Growth Factor) [14]. Преимущества лазерного излучения с длиной волны 577 нм заключаются в его минимальном поглощении макулярным ксантофильным пигментом, что делает его применение относительно безопасным вблизи фовеа [30], а также в высоком поглощении оксигемоглобином и меланином, что вызывает меньшее рассеивание в сравнении с длиной волны 532 нм или другими желтыми волнами (561/568 нм) [36]. Поскольку фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет важную роль в развитии ангиогенных заболеваний сетчатки, нами было проведено исследование ретинальной экспрессии генов после облучения с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме на сетчатке в условиях повышенных уровней VEGF и VEGF-индуцированной патологии. Было установлено, что через день после однократного интравитреального введения 50 нг/мл VEGF проницаемость сосудов увеличилась более чем в 3 раза, и развился отек сетчатки [25], и в период от 3 до 7 дней (3,5 мкг VEGF) активно развивалась неоваскуляризация сетчатки.

Целью настоящего исследования было изучение ретинальной экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера после воздействия на сетчатку лазерного излучения с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на самцах мышей линии C57BL / 6J в возрасте 4-5 недель. Животные были разделены на 4 группы по 5 мышей в каждой:

1 группа – интравитреальное введение PBS (Phosphate-Buffered Saline);

2 группа – интравитреальное введение VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor);

3 группа – интравитреальное введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в микроимпульсном режиме;

4 группа – интравитреальное введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в непрерывном режиме.

Для исключения возможных двусторонних биологических эффектов во время инъекции VEGF и проведения лазерного воздействия, контралатеральные глаза у животных оставались интактными и не были включены в исследование [13].

Под общей анестезией мышам в стекловидное тело вводили 50 нг/мл рекомбинантного VEGF165 (R&D Systems) в 2 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). В контрольные глаза вводили PBS. Сетчатку облучали лазерным излучением с длиной волны 577 нм через сутки после интравитреального введения VEGF. Для сравнения использовался лазер в микроимпульсном и непрерывном режимах. Параметры микроимпульсного режима: длительность одного микроимпульса 0,1 мс, длительность макроимпульса 0,1 с, рабочий цикл 5%, мощность лазера 100 мВт и диаметр пятна 100 мкм. Параметры непрерывного режима: длительность импульса 0,1 с при мощности лазера 100 мВт и диаметре пятна 100 мкм. Лазерные аппликаты наносились по всей области сетчатки и распределялись концентрически вокруг диска зрительного нерва по 6 точек на каждом глазу.

Образцы тканей (нейроэпителий, пигментный эпителий) для анализа транскрипции микрочипов у животных 1 и 2 групп брали через 2 дня после введения PBS и VEGF, у животных 3 и 4 групп – через день после воздействия лазерного излучения на сетчатку.

Суммарную РНК из выделенных образцов ткани экстрагировали реагентом TRIzol (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Количество полученной тотальной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop (NanoDrop Technologies, США) согласно протоколу производителя. Количество РНК проверяли с помощью микрочипа Agilent Total RNA Nano 6000 (Agilent Technologies, США). 400 нг каждого об-

разца общей РНК амплифицировали с помощью набора для амплификации РНК Illumina® TotalPrep™ (Ambion, США). Амплифицированную РНК гибридизовали с чипами MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips (Illumina) в соответствии с протоколом, предоставленным Illumina. Анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета GenomeStudio (Illumina, США) – модуля экспрессии генов. Интерпретацию профиля транскрипции проводили по транскриптам с параметром Detection_Pval <0,01. Рассчитывалось значение отношения, которое показывало, сколько раз уровень РНК изменялся при различной экспрессии генов в экспериментальных группах. Данные микрочипов были размещены в базе данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (номер: GSE131046).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После интравитреального введения VEGF₁₆₅, из числа генов, экспрессия которых достоверно изменилась после лазерного воздействия в непрерывном режиме, достоверно изменилась экспрессия гена *LTF* ($p < 0,01$), участвующего в регуляции процессов врожденного иммунитета и механизмов ангиогенеза и гена *IGFBP4* ($p < 0,01$), ингибирующего FGF-2 и IGF-1-индуцированный ангиогенез.

Изменения экспрессии остальных генов после введения VEGF₁₆₅ не были достоверными, но для того, чтобы оценить механизм действия лазерного излучения в непрерывном режиме необходимо провести анализ этих изменений (табл. 1). Экспрессия генов с проангиогенными свойствами как повысилась (*HSP90B1*, *SDCBP*, *XBP1*, *S100A10*, *CCNG1* при $p > 0,01$), так и снизилась (*CSF1R*, *MGP*, *FGF1*, *OLFML3* при $p > 0,01$); экспрессия генов с антиангиогенными свойствами также повысилась (*RAB6B*, *CTNNA1*, *F11R*, *IGFBP4* при $p > 0,01$) и снизилась (*TKT* при $p > 0,01$).

Наблюдалось достоверное изменение ретикулярной экспрессии генов при лазерном воздействии с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме после введения VEGF₁₆₅: экспрессия генов с антиангиогенными свойствами как повысилась (*TKT* – нормализовалась после снижения при введении VEGF, и *IGFBP4*, $p < 0,01$), так и снизилась (*RAB6B*, *CTNNA1*, *F11R*, *EIF4A1*, *EIFH4*, $p < 0,01$), экспрессия генов с проангиогенными свойствами также повысилась (*CSF1R*, *MGP*, *FGF1*, *OLFML3*, *PTN*, $p < 0,01$) и снизилась (*HSP90B1*, *SDCBP*, *XBP1*, *S100A10*, *LTF*, $p < 0,01$).

После снижения при введении VEGF нормализовалась экспрессия гена *TKT*, кодирующего белок с транскетотазной активностью. Установ-

лено, что у животных с стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в результате активации *TKT* при использовании бенфотиамин (жирорастворимое производное тиамина) блокируются все пути образования метаболитов глюкозы, предотвращается развитие сосудистых патологических изменений и диабетической ретинопатии [14]. При проведении аргонлазерной коагуляции сетчатки мышей C75Bl/6J экспрессия гена *TKT* остается повышенной в течение длительного времени (90 дней); авторы считают, что этот ген может являться потенциальным геном-мишенью в отношении предотвращения развития диабетической ретинопатии и неоваскуляризации [1].

Повысилась экспрессия гена *IGFBP4*, который является членом семейства белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBP) и кодирует белки с доменом IGFBP и доменом тиреоглобулина типа I. *IGFBP-4* ингибирует FGF-2- и IGF-1-индуцируемый ангиогенез, но не способен ингибировать VEGF-индуцированный ангиогенез [6].

После снижения при введении VEGF увеличилась экспрессия гена *CSF1R*, белковым продуктом которого является рецептор колоние-стимулирующего фактора 1 из семейства тирозин-специфичных протеинкиназ, участвующий в процессах дифференцировки и регуляции работы макрофагов и моноцитов. В то же время на экспериментальной модели лазерной индуцированной хориоидальной неоваскуляризации было выявлено, что при использовании селективного ингибитора CSF-1R – PLX5622 (Plexxikon, Berkeley, CA) площадь развивающейся неоваскуляризации достоверно меньше, чем в контрольной группе [31].

После снижения при введении VEGF повысилась экспрессия гена *MGP* – матричного глиального белка, в соответствии с генетической базой данных по глазным тканям наиболее высокая его экспрессия отмечается в ретикулярном пигментном эпителии (RPE) и сосудистой оболочке. Установлено также, что *MGP* экспрессируется в эндотелиальных клетках; было показано, что *MGP* стимулирует экспрессию VEGF посредством увеличения активности трансформирующего фактора роста – $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) в эндотелиальных клетках аорты [4].

После снижения при введении VEGF увеличилась экспрессия гена *FGF1*, кодирующего белок из семейства факторов роста фибробластов (FGF), участвующих в ангиогенезе. FGF1 и FGF2 являются более мощными ангиогенными факторами, чем факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и тромбоцитов (PDGF) [5]. Установлено, что высокий уровень продукции FGF1 в клетках RPE коррелирует с активностью процесса

Сравнительный анализ ретиальной экспрессии генов ангиогенеза в первой и второй (* = $p < 0,01$), во второй и четвертой опытных группах ($p < 0,01$)

Comparative analysis of retinal gene expression of angiogenesis in the first and second (* = $p < 0.01$), in the second and fourth experimental groups ($p < 0.01$)

Аббревиатура Abbreviation	Наименование гена Gene	Accession №	Соотношение между группами 2/1 Correlation between groups 2/1	Соотношение между группами 4/2 Correlation between groups 4/2
LTF	Lactotransferrin	NM_008522.2	3.8*	-0.3
HSP90B1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	NM_011631.1	1.5	-0.6
SDCBP	Syndecan Binding Protein	NM_001098227.1	1.3	-0.7
S100A10	S100 Calcium Binding ProteinA10	NM_009112.2	1.3	-0.7
XBP1	X-Box Binding Protein 1	NM_013842.2	1.2	-0.5
IGFBP4	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4	NM_010517.3	1.2*	1.3
RAB6B	RAB6B, Member RAS Oncogene Family	NM_173781.3	1.2	-0.8
CTNNA1	Catenin Alpha 1	NM_009818.1	1.1	-0.8
F11R	F11 Receptor	NM_172647.2	1.1	-0.6
CCNG1	Cyclin G1	NM_009831.2	1.1	-0.4
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	NM_008302.3	1.0	-0.8
PTN	Pleiotrophin	NM_008973.2	1.0	1.3
EIFH4	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4H	NM_033561.1	1.0	-0.9
PRDX1	Peroxiredoxin 1	NM_011034.2	1.0	-0.7
TKT	Transketolase	NM_009388.2	-0.5	2.2
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	NM_001037859.2	-0.7	1.8
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1	NM_010197.3	-0.8	1.5
JMJD6	Jumonji Domain Containing 6, Arginine Demethylase And Lysine Hydroxylase	NM_033398.2	-0.8	-0.7
MGP	Matrix Gla Protein	NM_008597.3	-0.9	1.6
OLFML3	Olfactomedin Like 3	NM_133859.2	-0.9	1.5
EIF4A1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	NM_144958.2	-1.0	-0.8

Note: Group 1 – injection of PBS, group 2 – injection of VEGF₁₆₅, group 4 – injection of VEGF₁₆₅ and laser therapy in a continuous mode.

пролиферативной витреоретинопатии [22]. Li D. и соавт. считают, что комбинированная блокада FGF-2 и VEGF может быть более эффективна в отношении патологического ангиогенеза глаза, чем блокада VEGF [21].

Повысилась экспрессия гена *PTN*, кодирующего белок, принадлежащий к семейству гепарин-связывающих факторов роста и обладающего проангиогенной активностью. Zhu X. et al. (2015) было установлено, что у пациентов с ПДР в стекловидном теле концентрация *PTN* выше, чем в контроле и выявлена его высокая концен-

трация в фиброваскулярных мембранах [40]. Авторы считают, что *PTN* у пациентов с ПДР играет определенную роль в развитии неоваскуляризации в результате регуляции секреции VEGF и активации ERK 1/2. Ding X. и соавт. (2017) также были выявлены экспрессия *PTN* в пролиферативных мембранах у пациентов с пролиферативной витреоретинопатией, дефицит *PTN* ингибировал TGF- β 1 и развитие пролиферативной витреоретинопатии [10].

После снижения повысилась экспрессия гена *OLFML3*, кодирующего гликопротеин внекле-

точного матрикса с С-концевым ольфактомединовым доменом, который облегчает белковые, межклеточные взаимодействия и клеточную адгезию. *OLFML3* является проангиогенным фактором, который взаимодействует с BMP4 и способствует ангиогенезу [24]. Предполагается, что он может участвовать в развитии неоваскулярных заболеваний сетчатки и переднего отдела глаза. В 2010 году для использования при лечении заболеваний с неоваскулярной патологией были запатентованы антитела к *OLFML3* в качестве ингибиторов ангиогенеза.

Снизилась экспрессия генов *HSP90B1* и *HSP90AB1*, кодирующих молекулярный шаперон. Установлено, что *HSP90B1* принимает участие в процессах ангиогенеза. Wu W.C. et al. (2007) было установлено, что при использовании ингибитора HSP90 в клетках ретинального пигментного эпителия в условиях экспериментальной гипоксии снижается экспрессия VEGF и выдвинуто предположение, что ингибиторы HSP90 могут рассматриваться в качестве антиангиогенных средств, используемых при офтальмопатологии, сопровождающейся неоваскуляризацией [35]. Снизилась экспрессия гена еще одной изоформы семейства молекулярных шаперонов. *HSP90AB1* стабилизирует мРНК VEGF-А-индуцированного проангиогенного белка *BAZF* и участвует в регуляции ангиогенеза [13].

Уменьшилась экспрессия *XBP1*, кодирующего X-box-связывающий белок 1, являющийся транскрипционным фактором. Предполагается, что в условиях ишемии VEGF активирует сигнальный путь $IRE1\alpha/XBP1$, в результате чего в тканях развивается патологический ангиогенез [38]. По результатам исследования Zeng L. et al. (2013), блокада *XBP1* у мышей (*XBP1*eko) приводит к устранению VEGF-индуцированной пролиферации эндотелиальных клеток [38].

Произошло уменьшение экспрессии гена *SDCBP* – синтенина-1, связывающего С-концы трансмембранных белков. Синтенин стимулирует передачу сигналов VEGF в эндотелиальных клетках посредством PDZ-зависимого взаимодействия с эфрином-B2. [33]. При нокдауне синтенина уменьшается сосудистая проницаемость, снижается активность процессов пролиферации и миграции в эндотелиальных клетках, опосредованных VEGF, снижается продукция оксида азота.

Снизилась экспрессия гена *PRDX1*, кодирующего антиоксидантный фермент перокси-редоксин-1. Установлено, что *PRDX1* стимулирует экспрессию и миграцию VEGF в эндотелиальных клетках сосудов мыши посредством TLR-4 зависимого взаимодействия HIF-1 с элементом гипоксического ответа в промоторе VEGF [26].

Экспрессия гена *JMJD*, кодирующего ядерный белок с доменом $JmjC$, снизилась. Установлено, что угнетение экспрессии (молчание) *JMJD6* нарушает ангиогенную функцию эндотелия и ингибирует ангиогенез путем модулирования сплайсинга VEGF-рецептора 1 (*Flt1*) и увеличения уровня растворимой формы *Flt1*, связывающейся с VEGF и PlGF [2].

Снизилась экспрессия *S100A10*, являющегося членом семейства белков S100. Белки семейства S100 представляют собой маленькие молекулы (10-12 кДа), связывающие ионы кальция. Роль *S100A10* установлена в регуляции процессов фибринолиза и ангиогенеза. *S100A10* (2 субъединицы) образует гетеротетрамерный комплекс с аннексином A2 (2 субъединицы), комплекс является рецептором плазминогена и t-PA и обеспечивает нетромбогенность эндотелия. В эксперименте, на модели кислород-индуцированной ретинопатии было выявлено, что развитие сосудисто-пролиферативной реакции в области сетчатки связано с увеличением *S100A10*, и что у животных *AnxA2*^{-/-} неоангиогенный ответ сетчатки ингибируется в 50% случаев. Авторы высказали предположение, что при офтальмопатологии, связанной с неоваскуляризацией, может быть целесообразным дополнительно с анти-VEGF терапией производить блокаду A2 [17].

Снизилась экспрессия гена *CCNG1*, кодирующего белок циклин G1, участвующего в регуляции клеточного цикла посредством изменения активности циклин-зависимых протеинкиназ. Установлено, что подавление экспрессии *CCNG1* приводит к ингибированию пролиферации гладкомышечных клеток сосудов и препятствию образования неоинтимы у крыс с рестенозом сонных артерий после повреждения баллонным катетером [39].

Снизилась экспрессия гена *LTF*, кодирующего железосвязывающий гликопротеин – лактоферрин. Лактоферрин относят к системе врожденного иммунитета, существуют данные о том, что лактоферрин опосредованно вовлечен в процессы клеточного иммунитета. Главные биологические функции белка – это связывание и транспорт ионов железа, но, кроме этого, лактоферрин обладает антибактериальной, антивирусной, различными каталитическими активностями, иммуномодулирующим действием и участвует в процессе ангиогенеза. Установлено, что лактоферрин стимулирует VEGF-А-опосредованную миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) посредством регуляции в эндотелиальных клетках экспрессии одного из рецепторов VEGF – KDR/Flk-1 [18]. *LTF* экспрессируется

в сосудистой оболочке, сетчатке, в области диска зрительного нерва, пигментном эпителии.

Уменьшилась экспрессия гена *RAB6B*, кодирующего RAS-связанный белок Rab-6B, который участвует в везикулярном транспорте, и была ниже, чем в контроле (после введения VEGF экспрессия была увеличена в 2 раза). Установлено, что при нокдауне *RAB6B* повышается секреция VEGF в клеточной линии ретинального пигментного эпителия мышей (B6-RPE07).

Наблюдалось снижение экспрессии гена *F11R* (уровень экспрессии был ниже, чем в контроле, после введения VEGF экспрессия была увеличена в 1,17 раза), кодирующего молекулу адгезии JAM-1(A). JAM-A является сигнальной молекулой, относящейся к мембранным белкам I типа суперсемейства иммуноглобулинов Ig-SF, экспрессируется в сосудистой эндотелии, участвует в формировании плотных эндотелиальных контактов и регуляции барьерной функции сосудистой стенки [1]. Установлено, что в эндотелиальных клетках сетчатки, подвергнутых воздействию высоких доз глюкозы, снижается экспрессия JAM-A. На основании этого авторы высказали предположение, что увеличение проницаемости эндотелиальных клеток сетчатки, вероятно, связано с селективным уменьшением экспрессии белков плотных контактов (JAM-A), что приводит к увеличению трансцеллюлярной проницаемости [29]. В то же время JAM-A регулирует моторику эндотелиальных клеток, их направленное движение и формирует фокальный контакт в процессе ангиогенеза. JAM-A участвует в регуляции барьерной функции и ретинального пигментного эпителия. Выявлено, что антитела к JAM-A приводят к увеличению проницаемости монослоя ARPE-19 [23]. JAM-A участвует в процессах ангиогенеза в эмбриональной сетчатке [8]. Установлено, что у отрицательных JAM-A (JAM-A^{-/-}) животных, в отличие от положительных JAM-A (JAM-A^{+/+}), в аортальном кольце не развивается сосудистая сеть [7]. Naik M.U. et al. (2012) продемонстрировано, что блокировка внеклеточного домена JAM-A ингибирует индуцированную bFGF пролиферацию и ангиогенез эндотелиальных клеток [26]. Повышение экспрессии F11R и усиление васкуляризации сетчатки наблюдается у мышей с дефицитом гена JAM-C (Jam3) [9].

Снизилась экспрессия гена *CTNNA1*, кодирующего белок клеточной адгезии α -катенин 1, уровень экспрессии был ниже, чем в контроле. Продемонстрировано SPARC-опосредованное (SPARC – кислый секретлируемый протеин, богатый цистеином, играющий важную роль в патогенезе диабетической ретинопатии) снижение экспрессии *CTNNA1* в эндотелиальных клетках капилляров сетчатки человека после

воздействия среды с высоким содержанием глюкозы [12].

Уменьшение экспрессии генов *EIF4A1* и *EIFH4*, кодирующих факторы инициации трансляции, произошло в 1,2 и 1,15 раза соответственно. Зарегистрировано снижение экспрессии EIF4A1 в сетчатке PlGF^{-/-} (плацентарный фактор роста) мышей с сахарным диабетом [20].

Таким образом, при использовании непрерывного режима лазерного воздействия с длиной волны 577 нм изменилась экспрессия генов, которые помимо своих основных функций обладают про- или антиангиогенными свойствами.

Отдельно следует обратить внимание на гены, экспрессия которых достоверно изменилась в результате лазерного воздействия и оставалась неизменной при патологическом состоянии (после введения VEGF₁₆₅).

Снизилась экспрессия генов с проангиогенными свойствами *HSP90AB1*, *PRDX1*, *JMJD*, *CCNG1*. Полученные результаты следует отнести к благоприятным эффектам лазерного воздействия в непрерывном режиме.

Увеличилась экспрессия гена *PTN* с проангиогенными свойствами и снизилась экспрессия генов с антиангиогенными свойствами *F11R*, *EIF4A1*, *EIFH4*.

Таким образом, была изучена ретинальная экспрессия генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера в результате воздействия на сетчатку лазерного излучения 577 нм в непрерывном режиме после интравитреального введения VEGF₁₆₅. Идентифицированы гены с достоверным изменением уровней экспрессии. Выявлен ряд генов, изменение экспрессии которых, возможно, следует трактовать как наличие благоприятных и неблагоприятных эффектов лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме, и учитывать их в дальнейшей практике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Мини-

стерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 07-21 от 15.07.2021 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С., Козина Л.С., Дьяконов М.М. Адгезивная молекула JAM-A и молекулярные механизмы возрастной патологии: обзор литературы и собственных данных. *Успехи геронтологии*. 2015;28(4):656–668 [Kuznik B.I., Khavinson V. Kh., Tarnovskaya S.I., Linkova N.S., Kozina L.S., Dyakonov M.M. Adhesion molecule JAM-A, it's function and mechanism of epigenetic regulation. *Adv Geront*. 2015;28(4):656–668 (in Russ.)]
2. Binz N., Graham C.E., Simpson K., Lai Y.K., Shen W.Y., Lai C.M., Speed T.P., Rakoczy P.E. Long-term effect of therapeutic laser photocoagulation on gene expression in the eye. *FASEB J*. 2006;20(2):383–385. DOI: 10.1096/fj.05-3890fje
3. Boeckel J.N., Guarani V., Koyanagi M., Roexe T., Lengeling A., Schermuly R.T., Gellert P., Braun T. et al. Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3276–3281. DOI: 10.1073/pnas.1008098108
4. Boström K., Zebboudj A.F., Yao Y., Lin T.S., Torres A. Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(51):52904–52913. DOI: 10.1074/jbc.M406868200
5. Cao R., Bråkenhielm E., Pawliuk R., Wariaro D., Post M.J., Wahlberg E., Leboulch P., Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*. 2003;9(5):604–613. DOI: 10.1038/nm848
6. Contois L.W., Nugent D.P., Caron J.M., Cretu A., Tweedie E., Akalu A., Liebes L., Friesel R. et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 differentially inhibits growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem*. 2012;287(3):1779–1789. DOI: 10.1074/jbc.M111.267732
7. Cooke V.G., Naik M.U., Naik U.P. Fibroblast growth factor-2 failed to induce angiogenesis in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9):2005–2011. DOI: 10.1161/01.ATV.0000234923.79173.99
8. Daniele L.L., Adams R.H., Durante D.E., Pugh E.N. Jr., Philp N.J. Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 2007;505(2):166–176. DOI: 10.1002/cne.21489
9. Díaz-Coránguez M., Liu X., Antonetti D.A. Tight Junctions in Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5972. DOI: 10.3390/ijms20235972.
10. Ding X., Bai Y., Zhu X., Li T., Jin E., Huang L., Yu W., Zhao M. The effects of pleiotrophin in proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255(5):873–884. DOI: 10.1007/s00417-016-3582-9
11. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group Photocoagulation for diabetic macular edema. Early treatment diabetic retinopathy study report number 1. *Arch Ophthalmol*. 1985;(103):1796–1806.
12. Fu Y., Tang M., Xiang X., Liu K., Xu X. Glucose affects cell viability, migration, angiogenesis and cellular adhesion of human retinal capillary endothelial cells via SPARC. *Exp Ther Med*. 2019;17(1):273–283. DOI: 10.3892/etm.2018.6970
13. Gallego B.I., Salazar J.J., de Hoz R., Rojas B., Ramírez A.I., Salinas-Navarro M., Ortín-Martínez A., Valiente-Soriano F.J. et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation*. 2012;(9):92. DOI: 10.1186/1742-2094-9-92
14. Gavrilova N.A., Borzenok S.A., Zaletaev D.V., Solomin V.A., Gadzhieva N.S., Tishchenko O.E., Komova O.U., Zinov'eva A.V. Molecular genetic mechanisms of influence of laser radiation with 577 nm wavelength in a microimpulse mode on the condition of the retina. *Exp Eye Res*. 2019;(185):107650. DOI: 10.1016/j.exer.2019.04.018
15. Haase M., Fitze G. HSP90AB1: Helping the good and the bad. *Gene*. 2016;575(2 Pt 1):171–186. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.063
16. Hammes H.P., Du X., Edelstein D., Taguchi T., Matsumura T., Ju Q., Lin J., Bierhaus A. et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003;9(3):294–299. DOI: 10.1038/nm834
17. Hedhli N., Falcone D.J., Huang B., Cesarman-Maus G., Kraemer R., Zhai H., Tsirka S.E., Santambrogio L. et al. The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. *J Biomed Biotechnol*. 2012;(2012):406273. DOI: 10.1155/2012/406273
18. Kim C.W., Son K.N., Choi S.Y., Kim J. Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett*. 2006;580(18):4332–4336. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.091
19. Kozak I., Luttrull J.K. Modern retinal laser therapy. *Saudi J Ophthalmol*. 2015;29(2):137–146. DOI: 10.1016/j.sjopt.2014.09.001
20. Lennikov M.S., Lennikov A., Tang S., Huang H. Proteomics reveals ablation of placental growth factor inhibits the insulin resistance pathways in diabetic mouse retina. *bioRxiv*. 2018. DOI: 10.1101/338368.
21. Li D., Xie K., Zhang L., Yao X., Li H., Xu Q., Wang X., Jiang J. et al. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett*. 2016;377(2):164–173. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.04.036
22. Malecaze F., Mascarelli F., Bugra K., Fuhrmann G., Courtois Y., Hicks D. Fibroblast growth factor receptor deficiency in dystrophic retinal pigmented epithelium. *J Cell Physiol*. 1993;154(3):631–642. DOI: 10.1002/jcp.1041540323

23. Mandell K.J., Berglin L., Severson E.A., Edelhauer H.F., Parkos C.A. Expression of JAM-A in the human corneal endothelium and retinal pigment epithelium: localization and evidence for role in barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):3928–3936. DOI: 10.1167/iovs.06-1536
24. Miljkovic-Licina M., Hammel P., Garrido-Urbani S., Lee B.P., Meguenani M., Chaabane C., Bochaton-Piallat M.L., Imhof B.A. Targeting olfactomedin-like 3 inhibits tumor growth by impairing angiogenesis and pericyte coverage. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(12):2588–2599. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0245
25. Miyamoto K., Khosrof S., Bursell S.E., Moromizato Y., Aiello L.P., Ogura Y., Adamis A.P. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol.* 2000;156(5):1733–1739. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65044-4
26. Naik M.U., Stalker T.J., Brass L.F., Naik U.P. JAM-A protects from thrombosis by suppressing integrin α IIb β 3-dependent outside-in signaling in platelets. *Blood.* 2012;119(14):3352–3360. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397398
27. Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Am J Ophthalmol.* 1976;81(4):383–396. DOI: 10.1016/0002-9394(76)90292-0
28. Riddell J.R., Maier P., Sass S.N., Moser M.T., Foster B.A., Gollnick S.O. Peroxiredoxin 1 Stimulates Endothelial Cell Expression of VEGF via TLR4 Dependent Activation of HIF-1 α . *PLoS ONE.* 2012;7(11):e50394. DOI: 10.1371/journal.pone.0050394
29. Saker S., Stewart E.A., Browning A.C., Allen C.L., Amoaku W.M. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2014;(121):161–167. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.016
30. Scholz P., Altay L., Fauser S. A Review of Subthreshold Micropulse Laser for Treatment of Macular Disorders. *Adv Ther.* 2017;34(7):1528–1555. DOI: 10.1007/s12325-017-0559-y
31. Schwarzer P., Kokona D., Ebnetter A., Zinker-nagel M.S. Effect of Inhibition of Colony-Stimulating Factor 1 Receptor on Choroidal Neovascularization in Mice. *Am J Pathol.* 2020;190(2):412–425. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.10.011
32. Tababat-Khani P., Berglund L.M., Agardh C.D., Gomez M.F., Agardh E. Photocoagulation of human retinal pigment epithelial cells in vitro: evaluation of necrosis, apoptosis, cell migration, cell proliferation and expression of tissue repairing and cytoprotective genes. *PLoS One.* 2013;8(8):e70465. DOI: 10.1371/journal.pone.0070465
33. Tae N., Lee S., Kim O., Park J., Na S., Lee J.H. Syntenin promotes VEGF-induced VEGFR2 endocytosis and angiogenesis by increasing ephrin-B2 function in endothelial cells. *Oncotarget.* 2017;8(24):38886–38901. DOI: 10.18632/oncotarget.16452
34. Wilson A.S., Hobbs B.G., Shen W.Y., Speed T.P., Schmidt U., Begley C.G., Rakoczy P.E. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(4):1426–1434. DOI: 10.1167/iovs.02-0622
35. Wu W.C., Kao Y.H., Hu P.S., Chen J.H. Geldanamycin, a HSP90 inhibitor, attenuates the hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in retinal pigment epithelium cells in vitro. *Exp Eye Res.* 2007;85(5):721–731. DOI: 10.1016/j.exer.2007.08.005
36. Yadav N.K., Jayadev C., Rajendran A., Nagpal M. Recent developments in retinal lasers and delivery systems. *Indian J Ophthalmol.* 2014;62(1):50–54. DOI: 10.4103/0301-4738.126179
37. Yoshida S., Yashar B.M., Hirianna S., Swaroop A. Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2554–2560.
38. Zeng L., Xiao Q., Chen M., Margariti A., Martin D., Ivetic A., Xu H., Mason J. et al. Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis. *Circulation.* 2013;127(16):1712–1722. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001337
39. Zhu N.L., Wu L., Liu P.X., Gordon E.M., Anderson W.F., Starnes V.A., Hall F.L. Downregulation of cyclin G1 expression by retrovirus-mediated antisense gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Circulation.* 1997;96(2):628–635. DOI: 10.1161/01.cir.96.2.628
40. Zhu X., Bai Y., Yu W., Pan C., Jin E., Song D., Xu Q., Yao Y. et al. The effects of pleiotrophin in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2015;10(1):e0115523. DOI: 10.1371/journal.pone.0115523

Поступила в редакцию 22.04.2021

Подписана в печать 23.10.2021

Для цитирования: Гаврилова Н.А., Гуревич К.Г., Комова О.Ю., Зиновьева А.В. Анализ ретиальной экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме на сетчатку. *Человек и его здоровье.* 2021;24(2):37–45. DOI: 10.21626/vestnik/2021-2/05

ANALYSIS OF RETINAL EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE REGULATION OF ANGIOGENESIS AND ENDOTHELIAL BARRIER FUNCTION FOLLOWING EXPOSURE OF THE RETINA TO 577 NM WAVELENGTH LASER LIGHT IN CONTINUOUS MODE

© Gavrilova N.A., Gurevich K.G., Komova O.Yu., Zinoveva A.V.

A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (A.I. Yevdokimov MSMSU)
20, Delegatskaya st., Moscow, 127473, Russian Federation

Objective. The aim of the study was to investigate the retinal expression of genes involved in the regulation of angiogenesis and endothelial barrier function after exposure of the retina to 577 nm laser light in a continuous mode in experimental conditions after intravitreal injection of VEGF₁₆₅ (Vascular endothelial growth factor).

Materials and methods. The study was performed on 4-5 week old male C57BL / 6J mice. 4 groups, 5 mice in each, were formed, one animal eye was experimental and the second remained intact. The animals of the first group received intravitreal injection of phosphate-buffered saline (PBS); animals in the second, third and fourth groups received intravitreal injection of 50 ng/ml of recombinant VEGF₁₆₅; in the third and fourth groups, one day after the VEGF₁₆₅ intravitreal administration, laser irradiation with a wavelength of 577 nm was performed on the retina in micropulse and continuous modes, respectively. Tissue samples from animals of the first and second groups were taken 2 days after PBS and VEGF₁₆₅ administration, and in animals from the third and fourth groups one day after laser exposure to the retina.

Results. Retinal expression of genes involved in the regulation of angiogenesis and endothelial barrier function as a result of retinal exposure to 577 nm laser radiation in continuous mode following intravitreal injection of VEGF₁₆₅ was studied. Genes with significant changes in expression levels were identified (genes that regulate the processes of angiogenesis).

Conclusion. Understanding the mechanisms of modulation of retinal gene expression may help to identify the key regulatory factors providing therapeutic effects of laser radiation in continuous and micropulsed modes and provide the basis for future therapeutic tactics for retinal diseases.

Keywords: continuous wave laser radiation; retina; vascular endothelial growth factor; VEGF; gene expression.

Gavrilova Natalia A. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Eye Diseases, A.I. Yevdokimov MSMSU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-0368-296X. E-mail: n.gavrilova@mail.ru

Gurevich Konstantin G. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of the UNESCO Chair “Healthy lifestyle – the key to successful development”, A.I. Yevdokimov MSMSU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-7603-6064. E-mail: kgurevich@mail.ru

Komova Olga Yu. – Assistant Lecturer of the Department of Eye Diseases, A.I. Yevdokimov MSMSU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-7337-0833. E-mail: ol-komo@yandex.ru (correspondence author)

Zinoveva Alexandra V. – Senior Laboratory Assistant of the Department of Eye Diseases, A.I. Yevdokimov MSMSU, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-4373-3135. E-mail: aleksandra.r@live.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Protocol № 07-21 dated by July 15, 2021).

Received 22.04.2021

Accepted 23.10.2021

For citation: Gavrilova N.A., Gurevich K.G., Komova O.Yu., Zinoveva A.V. Analysis of retinal expression of genes involved in the regulation of angiogenesis and endothelial barrier function following exposure of the retina to 577 nm wavelength laser light in continuous mode. *Humans and their Health*. 2021;24(2):37–45. DOI: 10.21626/vestnik/2021-2/05