

УДК 615.254.3:616.735-092.9

© Ю. А. Дёмин, П. В. Белецкая, И. Д. Гапунин, 2013.

БРИНЗОЛАМИД-ИНДУЦИРОВАННАЯ РЕТИНОПАТИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС: АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ЖИВОТНАЯ МОДЕЛЬ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ СЕТЧАТКИ

¹Ю. А. Дёмин, ²П. В. Белецкая, ³И. Д. Гапунин¹Харьковская медицинская академия последипломного образования, кафедра офтальмологии (зав. каф. – д. мед. н., профессор Демин Ю.А.); 61176, Украина, м. Харків, вул. Корчагинців, 5²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, E-mail: doctor_ps@mail.ru³СМСЧ № 13 МОЗ Украины, г. Харьков.

BRINZOLAMIDE-INDUCED RETINOPATHY IN NEONATAL RAT: AN ALTERNATIVE ANIMAL MODEL OF RETINAL NEOVASCULARIZATION

Y. A. Dyomin, P. V. Biletska, I. D. Gapunin

SUMMARY

Neovascular retinal pathology is still uncertain. Thus, there is great need to investigate new modeling, diagnostic and treatment technologies. In the present study the influence of brinzolamide-induced acidosis on preretinal neovascularization in neonatal rat was investigated. All studies used newborn Wistar rats. Neovascularization occurred in 71% of rats receiving brinzolamide. Hence, brinzolamide injected intraperitoneal is associated with preretinal neovascularization in neonatal rats. This can be useful in retinal neovascular pathology modeling.

БРИНЗОЛАМІД-ІНДУКОВАНА РЕТИНОПАТІЯ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ: АЛЬТЕРНАТИВНА ТВАРИННА МОДЕЛЬ НЕОВАСКУЛЯРНОЇ ПАТОЛОГІЇ СІТКІВКИ

Ю. А. Дьомін, П. В. Білецька, І. Д. Гапунін

РЕЗЮМЕ

Проблема неоваскуляризації сітківки штовхає дослідників до пошуку нових підходів до моделювання, діагностики та лікування неоваскуляризації сітківки новонароджених щурів. Дослідження виконувалося на новонароджених щурах лінії Wistar. У 71% щурів, що отримували бринзоламід на гістологічних зразках виявлена преретинальна неоваскуляризація. Отже, бринзоламід, що введений інтраперитонеально, викликає преретинальну неоваскуляризацію; це може бути використано в подальших дослідженнях неоваскуляризації сітківки.

Ключевые слова: ретинопатия, неоваскуляризация, ангиогенез, ацидоз, животная модель.

Заболівання органа зору, характеризуються процесом неоваскуляризації, серед яких діабетическа ретинопатія, вікна макулярна дегенерація і ретинопатія недоношених [2, 3, 4, 10], часто мають рефрактерне до лікування течення і приводять до слепоти. При всіх цих станах ангиогенез стимулюється локальною ішемією, гіпоксією і ацидозом нервової тканини, що супроводжується провоспалительними змінами і оксидативним стресом. В неоваскуляризації сітківки VEGF (vascular endothelial growth factor – судинний ендотеліальний фактор росту) грає центральну роль [1, 3, 11]. На сьогоднішній день виявлено п'ять типів клітин сітківки, здатних продукувати VEGF: клітини пігментного епітелію сітківки, астроцити, клітини Мюллера, ендотеліальні і гангліонарні клітини. Однак всі ці клітини відрізняються одна від одної в своїй відповіді на гіпоксію. В дослідженнях *in vitro* було показано, що клітини

Мюллера і астроцити продукують значущу кількість VEGF в умовах гіпоксії і ацидозу [4, 5, 8].

Процеси неоваскуляризації активно вивчалися *in vivo* на експериментальних тваринах. Загальноприйнятою тваринною моделлю ретинопатії з неоваскуляризацією є оксиген індукційна ретинопатія у новонароджених мишей, запропонована Lois E. H. Smith в 1994 році. В подальшому вченими різних країн були опубліковані численні модифікації даної методики. Були запропоновані моделі CO₂-індукованої, NH₄Cl- і ацетазоламід-індукованої ретинопатії новонароджених крыс. Дані методики викликають в організмі новонароджених крыс метаболічний ацидоз, стимулюючи, тим самим, неоваскуляризацію незрелої сітківки [7, 8, 12]. Відомо, що препарати групи інгібіторів карбоангідрازی при системному використанні в високих дозах здатні викликати

метаболический ацидоз у людей и животных [12].

Нами впервые предложено системное (внутрибрюшинное) введение препарата Бринзоламид (ингибитор карбоангидразы) в эксперименте для моделирования неоваскулярной ретинопатии у новорожденных крыс. Целью работы было изучить влияние бринзоламид-индуцированного ацидоза на состояние сетчатки новорожденных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на новорожденных крысах линии Wistar из двух пометов, всего 17 (9 и 8 крыс в каждом). Препарат или 0,9% NaCl вводился интраперитонеально каждой новорожденной крысе дважды в день со второго по седьмой день жизни. Крысы из первого помета (n=9) получали 0,1 мл 1% раствора бринзоламида (из расчета 200 мг/кг массы тела), крысы из второго помета – группа контроля (n=8) получали 0,1 мл 0,9% NaCl. С 8 по 12 день жизни инъекции не проводились. На 13 день жизни крысы из двух пометов были подвергнуты эвтаназии согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986) и постановления IV Национального конгресса

по биоэтике (Киев, 2010). Энуклеация проводилась по стандартному протоколу. После энуклеации глазные яблоки были зафиксированы в 10 % растворе формалина на 21 день для дальнейшего гистологического исследования. Зафиксированные глазные яблоки отмывали от фиксатора, обезвоживали в батарее спиртов возрастающих концентраций, заливали в парафин и получали сагитальные срезы толщиной 10 мкм при помощи микротомы (по пять срезов каждого глаза), что позволило исследовать центральный и периферические отделы сетчатки.

Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты исследовались в световом микроскопе «AxioStar Plus» (Carl Zeiss, Германия). Фотографии сделаны с помощью аппарата Nikon COOLPIX 4500 (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При исследовании с помощью светового микроскопа, сетчатка крыс в норме (контрольная группа) представлена десятью четко выраженными слоями, которые имеют разную толщину в центральной и периферической ее участках ($205,82 \pm 8,13 \mu\text{m}$ и $154,44 \pm 7,69 \mu\text{m}$ соответственно). Также сетчатка крысы имеет разное количество нейронов на единицу пло-

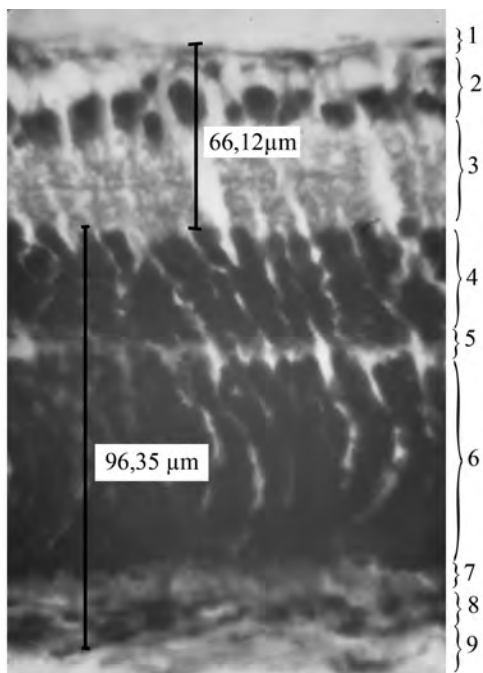


Рис. 1. Поперечный срез сетчатки крысы на шестой день после введения 0,9% NaCl. Окраска гематоксилин-эозином. х400. 1-внутренняя пограничная мембрана, 2-слой ганглиозных клеток, 3-внутренний плексиформный слой, 4- внутренний ядерный слой, 5-наружный плексиформный слой, 6-наружный ядерный слой, 7-слой фоторецепторов, 8-пигментный эпителий, 9 -хориоидея.

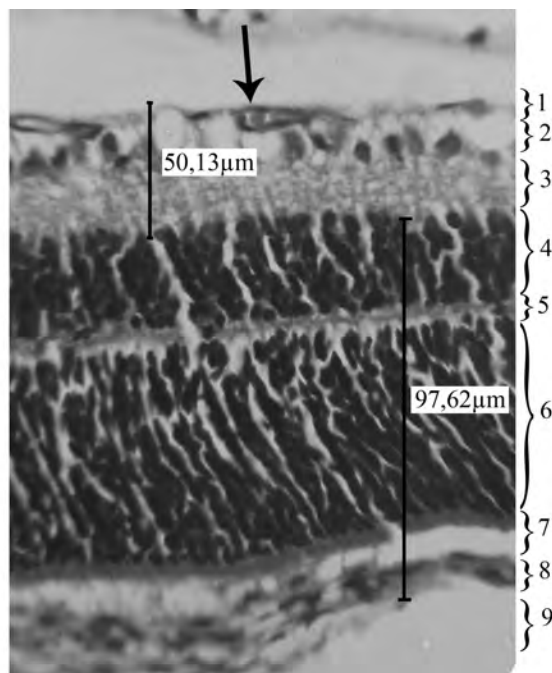


Рис. 2. Поперечный срез сетчатки крысы на шестой день после интраперитонеального введения бринзоламида. Окраска гематоксилин-эозином. х400.1-внутренняя пограничная мембрана, 2-слой ганглиозных клеток, 3-внутренний плексиформный слой, 4- внутренний ядерный слой, 5-наружный плексиформный слой 6-наружный ядерный слой, 7-слой фоторецепторов, 8-пигментный эпителий, 9-хориоидея, стрелкой показан узелок преретинальной неоваскуляризации.

щади ($301,72 \pm 11,69$ и $228,82 \pm 17,09$ — в наружном ядерном слое; $165,74 \pm 14,81$ и $150,02 \pm 16,52$ — во внутреннем ядерном слое; $4,98 \pm 1,24$, $2,74 \pm 1,08$ — в слое ганглионарных клеток центральной и периферической участков сетчатки соответственно). В норме сосуды гемомикроциркуляторного русла обнаружены только во внутренних слоях сетчатки крысы.

Преретинальная неоваскуляризация развилась у 71% (n=5) крыс, получавших бринзоламид, у крыс из контрольной группы, получавших 0,9% NaCl ретинопатии не было выявлено (рис. 1). Узелки неоваскуляризации обнаруживались на средней и крайней периферии сетчатки, 4 - 7 на каждом срезе. Новообразованные сосуды сетчатки новорожденных крыс на срезе, окрашенном гематоксилин-эозином, располагаются преретинально, впереди от внутренней пограничной мембраны, имеют вид узелков. Стенка узелка состоит из одного слоя эндотелиальных клеток с вытянутым ядром и базальной мембраны, в просвете — интенсивно розовые эритроциты (рис. 2).

Побочным эффектом введения бринзоламида стало помутнение хрусталика у всех крыс (100%) из первого помета, что не дало возможности офтальмокопически исследовать состояние сетчатки на живом глазу.

Угнетение карбоангидразы приводит к уменьшению образования угольной кислоты и снижению реабсорбции бикарбоната и натрия эпителием канальцев, в связи с чем значительно увеличивается выделение воды, при этом рН мочи (в отличие от действия других диуретиков) повышается. Вследствие усиленного выведения из организма большого количества бикарбонатов развивается метаболический ацидоз, компенсаторная гипервентиляция [9] и, как следствие, — временная гипероксия, которая сменяется нормоксией, после прекращения введения бринзоламида. Гипероксия приводит к сужению и запустеванию капилляров незрелой сетчатки и ингибирует продукцию факторов роста сосудов. Малое количество факторов роста сосудов ведет к образованию аваскулярных зон в периферических отделах сетчатки, которым не хватает кислорода в условиях наступившей нормоксии. Рост и развитие сетчатки происходит в условиях повышенной потребности в кислороде, что усугубляет гипоксию аваскулярных зон сетчатки. Клетки аваскулярной сетчатки в условиях гипоксии выделяют VEGF, запускается каскад неоваскуляризации и формируется ретинопатия.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании обнаружено, что бринзоламид — ингибитор карбоангидразы, вызывающий метаболический ацидоз вследствие выведения бикарбонатов почками, при интраперитонеальном введении приводит к формированию преретинальной неоваскуляризации у новорожденных крыс. Данная методика может быть использована в качестве экспериментальной модели ретинопатии с

неоангиогенезом в офтальмологических исследованиях по изучению ретинопатии недоношенных, диабетической ретинопатии, возрастной макулярной дегенерации и ретинопатий после окклюзий сосудов сетчатки. Реализация данной модели ретинопатии с неоангиогенезом требует меньших затрат времени и ресурсов, а также исключает применение взрывоопасного кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blaauwgeers H.G.T. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris — evidence for a trophic paracrine relation / H.G.T. Blaauwgeers, B.W. Hotkamp, H. Rutten, A.N. Witmer [et al.] // *Am. J. Pathol.* — 1999. — №155. — P.421–428.
2. Campochiaro P.A., Ocular neovascularization: a valuable model system / P.A. Campochiaro, S.F.Hackett // *Oncogene.* — 2003. — № 22. — P.6537–6548.
3. Gariano R.F., Retinal angiogenesis in development and disease / T.W. Gardner, R.F. Gariano // *Nature.* — 2005. — № 438. — P.960–966.
4. Gariano R.F. Cellular mechanisms in retinal vascular development / R.F. Gariano // *Prog. Retin. Eye Res.* — 2003. — № 22. — P.295–306.
5. Gerhardt H. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia / H. Gerhardt, M.Golding, M. Fruttiger, [et al.] // *J. Cell Biol.* — 2003. — № 161. — P.1163–1177.
6. Holmes J.M. Carbon dioxide-induced retinopathy in the neonatal rat/ J.M. Holmes, S. Zhang, D.A. Leske, W.L. Lanier // *Curr. Eye Res.* — 1998. — № 17. — P.608–616.
7. Holmes J.M. Metabolic acidosis-induced retinopathy in the neonatal rat/, J.M. Holmes, S. Zhang, D.A. Leske, W.L. Lanier // *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* — 1999. — №40. — P.804–809.
8. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling/ S. Patan // *J. Neurooncol.* — 2000. — № 50. — P.1–15.
9. Porth, Carol. Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states /Carol Mattson Porth, J. Gaspard, Kim A. Noble. —Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins, 2011 — 3rd ed.P.199–202.
10. Schlingemann R.O. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists/ R.O. Schlingemann, A.N. Witmer // *Prog. Brain Res.* 2009. — № 175. — P.253–267.
11. Witmer A.N. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease/ G.F.J.M. Vrensen, C.J.F. van Noorden, R.O.Schlingemann // *Prog. Retin.Eye Res.* — 2003. — №22. — P.1–29.
12. Zhang S. Preretinal neovascularization associated with acetazolamide-induced systemic acidosis in the neonatal rat/ S. Zhang, D.A. Leske, W.L. Lanier, [et al.]// *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* — 2001. — № 40. — P.1066–1071.