

Современные биомодели глаукомы и интраокулярное введение нанокатионитов на основе РМС 16 в эксперименте



**Ж.Ю.Алябьева ^{1,2}, Е.А. Егоров ^{1,2}, Т.Б. Романова¹,
Д.З. Дзукаева ^{1,2}, Т.И. Баранич ¹**

- 1. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И Пирогова,**
- 2. Московский глаукомный центр, Городская клиническая больница №15 им. О.М. Филатова,**

Москва, Россия



В последние годы произошел экспоненциальный рост информации касательно молекулярного базиса гибели ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) на основе данных полученных в экспериментальных моделях острого и хронического повреждения зрительного нерва на животных, а также экспериментальной глаукомы. Существует множество молекулярных сигналов, запускающих апоптоз (генетически запрограммированную гибель ГКС). Причинами апоптоза ГКС могут быть: нарушение аксонального транспорта, отсутствие поступления нейротрофических факторов, токсические пронеуротрофины, активация внутренних и внешних сигналов апоптоза, митохондриальная дисфункция, эксайтотоксическое повреждение, окислительный стресс, дисфункция реактивной глиальной ткани и утрата синаптических контактов.

- В нашем сообщении мы ограничимся только моделями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) (включая нормотензивную глаукому), составляющей до 90% случаев от всей первичной глаукомы.**



НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ

Нейропротекция – лечение, направленное на замедление или предотвращение смерти нейронов с сохранением их физиологической функции, одна из серьезнейших и до сих пор неразрешенных задач нейробиологии, а также клинической и фундаментальной медицины.



ПАТОГЕНЕЗ ГЛАУКОМНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

- Ключевым моментом патогенеза всех форм глаукомы является гибель ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) – группы нейронов центральной нервной системы) (ЦНС), тела которых находятся в сетчатке (слой ГКС), а аксоны формируют зрительный нерв (ЗН).
- Окислительный стресс ассоциирован с патогенетическими механизмами, ведущими к глаукомной нейродегенерации.
- Увеличение продукции активных форм кислорода, включающих ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси как неорганического так и органического происхождения ведет к дегенерации ГКС, дисфункции нейроглии и активации иммунного ответа при глаукоме.
- активные формы кислорода могут быть напрямую токсичны для ГКС либо обеспечивать вклад во вторичную дегенерацию, вызываемую дисфункцией нейроглии, а также могут функционировать как сигнальные молекулы, выполняя роль вторичного мессенджера и/или регулируя окислительно-восстановительные модификации нисходящих эффекторов.

Bouhenni R., Dunmire J., Sewell A., Edward D.P. Animal Models of Glaucoma // J. Biomed. Biotechnol. 2012. Vol. 2012. Article ID692609, 11 pages doi:10.1155/2012/692609.



ПАТОГЕНЕЗ ГЛАУКОМНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ И ЗАДАЧИ МОДЕЛИРОВАНИЯ

- Хроническое повышение ВГД приводит к прогрессирующим изменениям головки ЗН и сетчатки, меняющим устойчивость оставшихся (сохранившихся) волокон ЗН к ВГД. Для того чтобы понять природу этих прогрессирующих изменений, необходимы соответствующие патогенезу, приемлемые по цене модели экспериментальной глаукомы на животных и методы измерения полученного ВГД, а также методы оценки степени повреждения сетчатки и ЗН.
- В головке ЗН эти повреждения включают аксональный и неаксональный эффекты, последний указывает на вовлеченность внеклеточного матрикса и реакцию астроглии. ГКС, по-видимому, претерпевают изменения, связанные с действием нейротрофинов, а также морфологические изменения, до собственно смерти клеток. Эти и другие, непознанные пока, патологические изменения ЗН и сетчатки могут вызывать снижение их толерантности к повышению ВГД, прогрессирующую оптическую нейропатию и ухудшение поля зрения даже при клинически адекватном контроле ВГД.

Morrison JC¹, Johnson EC, Cepurna W, Jia L. **Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage.** Prog Retin Eye Res. 2005 Mar;24(2):217-40.



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ

- По типу запуска патогенетического механизма:
 - 1) Не связанные с повышением внутриглазного давления (ВГД) – например, «чистые» модели ишемии/реперфузии и модели нормотензивной глаукомы
 - 2) Основанные на провокации подъема ВГД
- По объекту: IN VITRO и IN VIVO



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ IN VITRO

Объекты

- Изолированные ГКС и их культуры
- Изолированные астроциты и их культуры
- Изолированные клетки микроглии и их культуры
- Изолированная сетчатка
- Периферические клетки крови (лимфобласты)

Вид воздействия для моделирования глаукомы

- Действие давления
- Экзогенное воздействие эндотелином
- Культуры клеток, обеспечивающие повышенную продукцию эндотелина (ЕТ-1) и т.д.



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ IN VITRO

□ In Vitro Астроциты

In-vitro модель гипоксии на культивированных первичных астроцитах головки зрительного нерва человека (ГЗН). Экспланты, приготовленные из изолированных ГЗН от здоровых донорских глаз были культивированы для получения первичных клеточных линий. Полученные астроциты были активированы гипоксией, моделирующей ишемический инсульт, выявлены типичные пики гипоксического ответа между 5 и 8 часами. Модель предлагается использовать в сочетании с биомеханическим инсультом.

ISER 2012 Program Number: 3862 Time Course of Hypoxia Response in Primary Human Optic Nerve Head *Darren W. Chan¹, Jeremy M. Sivak, John G. Flanagan*

- Интактные астроциты (экзогенное воздействие активными формами кислорода) для исследования действия нейропротекторов.

Jou MJ. **Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes.** Adv Drug Deliv Rev. 2008 Oct-Nov;60(13-14):1512-26. Epub 2008 Jul 5.



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ IN VITRO

- **Культуры клеток сетчатки:** в большинстве моделей клеточных культур для исследования возможностей нейропротекции используют клетки сетчатки. Механизмы патогенеза, которые могут быть исследованы, включают: аксонотомию и сывороточную депривацию либо депривацию факторами роста.

Levin LA **Animal and culture models of glaucoma for studying neuroprotection.** Eur J Ophthalmol. 2001 Jul-Sep;11 Suppl 2:S23-9.

- Исследования с использованием периферических тканей, в частности **периферических лимфоцитов**, пациентов с ПОУГ предполагают наличие системной митохондриальной дисфункции у этих больных. Изолированные лимфоциты из периферической крови с антикоагулянтами применялись для изучения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях пациентов с ПОУГ.

ISER 2012 , Program Number: Mitochondrial damage in glaucoma

GLAUCOMA I. Trounce, N. Van Bergen, S. Lee & al.



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ IN VITRO И КОМБИНАЦИЯ С IN VIVO

- In Vitro: Модель ретинальной ишемии на плоско монтированных изолированных сетчатках мышей. Устойчивость ГКС к ишемии тестировалась в ходе лишения их кислорода/глюкозы (кислородно-глюкозной депривации), а также модели ретинальной ишемии/реперфузии. Смерть ГКС (уровень апоптоза) определяли, используя метку (с помощью окрашивания) аннексином V-FITC (Annexin V-FITC) и пропидиум йодидом или подсчетом β -III-тубулин иммунопозитивных нейронов в слое ГКС плоско монтированной сетчатки.
- In Vitro & in Vivo: В эксперименте на крысах in vivo монолатерально была смоделирована офтальмогипертензия введением гипертонического раствора в эписклеральные вены, чтобы нарушить отток водянистой влаги. Мониторинг ВГД проводили на протяжении 5 нед., затем слой ГКС изолировали методом лазерной захватывающей микродиссекции и с использованием микрочипов комплементарной ДНК определяли значительно большее количество генов с измененной экспрессией, чем если бы анализировались все слои сетчатки. Затем полученные данные сравнивались с данными по модели in vitro – культуре ГКС, подвергнутой воздействию высокого давления

ISER 2012 : P313 GANGLION CELL LOSS INDUCED BY PANNEXIN1 CHANNEL ACTIVATION IN RETINAL ISCHEMIA V.I. Shestopalov, B.T. Sagdullaev, G. Dvorianchikova, C. Yee, V.Z. Slepak



МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ IN VIVO

Генетическая обусловленность ПОУГ

К настоящему времени выявлено более 20 генетических локусов, связанных с глаукомой, но только три гена определены, как непосредственно обуславливающие её развитие: миоциллин, оптиневрин и WDR36 или GLC1G – ген, ответственный за развитие апоптоза.

- Спонтанное наследование: обезьяны, собаки.
- Трансгенные животные: мыши, крысы, данио-рерио «дамский чулок» (Zebrafish) или брахиданио-рерио (лат. *Danio rerio*) — вид пресноводных рыб семейства карповых (лат. *Cyprinidae*), популярная аквариумная рыбка.
- Вызываемые: обезьяны, крысы, кролики, овцы, коровы, птицы.



IN VIVO МОДЕЛИ ГЛАУКОМЫ: ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ

□ Мыши:

I. Гипертензивная ПОУГ:

- 1) трансгенные мыши с мутацией миоциллинового гена;
- 2) трансгенные мыши, α -1 субъединица коллагена I типа.

II. Нормотензивная ПОУГ:

- 1) трансгенные мыши, Glast;
- 2) трансгенные мыши, мутация Eaac1.

□ Крысы: Мутация «bug eye».

□ Данио-рерио:

- 1) трансгенные, Irp2 мутация;
- 2) трансгенные, wdr36 (Glc1) мутация.



IN VIVO МОДЕЛИ: ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЛАУКОМА

□ Обезьяны:

- I. Лазеркоагуляция всей трабекулярной сети (снижение оттока водянистой влаги).
- II. Внутрикамерная инъекция латексных микросфер (блокада трабекулярной сети).
- III. Внутрикамерная инъекция аутологичных фиксированных эритроцитов (блокада трабекулярной сети).

□ Крысы: местная аппликация преднизолона

□ Кролики:

- I. Субконъюнктивальная инъекция бетаметазона.
- II. Инъекция α -химотрипсина в заднюю камеру глаза (блокада трабекулярной сети).

□ Овцы: местная аппликация преднизолона.

□ Коровы: местная аппликация преднизолона.

□ Птицы: светоиндуцированная глаукома (снижение оттока водянистой влаги).



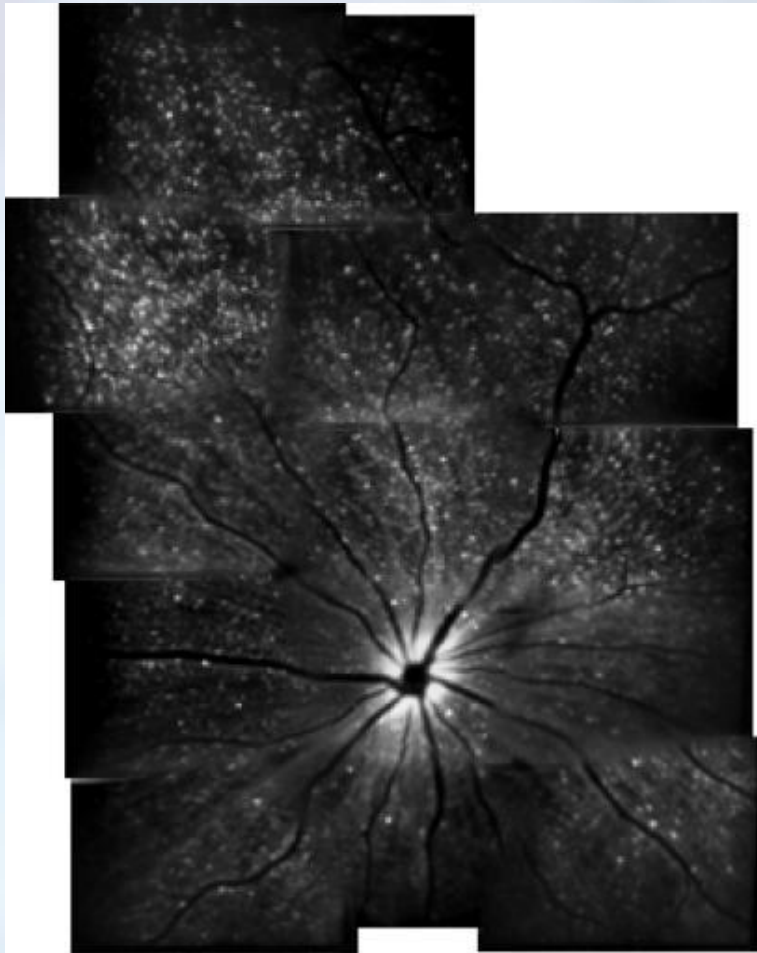
IN VIVO МОДЕЛИ: ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЛАУКОМА

- Из моделей нормотензивной ПОУГ - одна из наиболее простых, но учитывающая важнейшее звено патогенеза - модель ишемического стресса на мышах (в предыдущих исследованиях – на крысах) с хроническим введением вазоконстрикторного пептида эндотелина – ET-1 в зрительный нерв, вызывающем снижение кровотока и гибель ГКС.
- Новая модификация: ишемический стресс, обуславливающий повреждение ГКС и нейроглии, обеспечивается хронической повышенной выработкой ET-1 в сетчатке. Взрослым C57BL/6 мышам вводили интравитреально аденовирусный вектор с геном человеческого эндотелина вместе с аденовирусным вектором, отвечающим за экспрессию GFP (green fluorescein protein – зеленый флюоресцентный белок). Анализ, проведенный через 6 мес. после интравитреальной инъекции, показал снижение на 37% количества ГКС в глазах, экспрессировавших ET-1, по сравнению с контрольной группой глаз, экспрессировавших GFP.

ISER 2012 **Program Number: 2485 Establishing a New Mouse Glaucoma Model**
Izzy Livne-Bar, Xiaoxin Guo, Jeremy M. Sivak.



In vivo модели апоптоза с использованием флюоресцентных белков (аннексин-5)



- Copyright © 2004, The National Academy of Sciences

- Cited from:

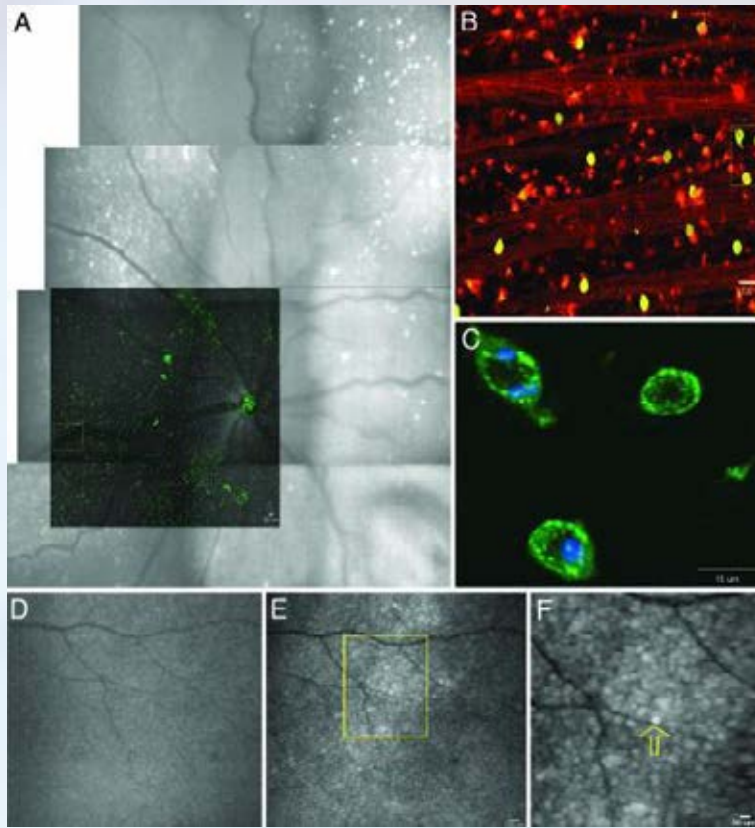
Proc Natl Acad Sci U S A.
2004 Sep 7;101(36):13352-6.
Epub 2004 Aug 30.

**Real-time imaging of
single nerve cell apoptosis
in retinal
neurodegeneration.**

Cordeiro MF, Guo L, Luong V,
et al.



Гистологическое подтверждение апоптоза с использованием флюоресцентных белков (аннексин-5)



□ Cited from:

Proc Natl Acad Sci U S A.
2004 Sep 7;101(36):13352-6.
Epub 2004 Aug 30.

**Real-time imaging of
single nerve cell apoptosis
in retinal
neurodegeneration.**

Cordeiro MF, Guo L, Luong V,
et al.



IN VIVO МОДЕЛИ: ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЛАУКОМА

- Модель ишемии/реперфузии на фоне высокого внутриглазного давления (канюлированные глаза мышей).

Ретинальная ишемия/реперфузия – важная причина нарушения зрительных функций не только при глаукоме, но и при иной глазной патологии, такой как окклюзии сосудов сетчатки, диабетическая ретинопатия, глаукома и глазная травма.

Pathologic Progression Of Retinal Ischemia And Reperfusion Injury In Mice Associated With Defective Retinal Function. Byung-Jin Kim, Robert J. Wordinger, Abbot F. Clark.

ISER 2012 Program Number: 2477 Poster Board Number: A203

Наиболее отработанные модели глаукомы *in vivo*, не требующие значительных финансовых ресурсов и удобные для содержания в лабораторных условиях, являются модели на грызунах (лабораторные мыши и крысы): введение гипертонического раствора в эписклеральные вены, лазеркоагуляция, термокоагуляция эписклеральных вен, а также на кроликах: адреналин-индуцированная глаукома, введение эндотелина, лазериндуцированная глаукома.



ИНТРАОКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОКАТИОНИТОВ НА ОСНОВЕ РМС 16

Препараты митохондриально-ориентированного действия перспективны для лечения глаукомной оптической нейропатии. К этой группе относятся низкотоксичные нанокатиониты с Mg^{25+} на основе порфиринового аддукта фуллерена-С60 (РМС 16), разработанные научно-образовательным центром. «Нанотехнологии» РНИМУ им. Н.И. Пирогова. В 2010 году был запатентован метод терапии тканевой гипоксии с помощью медицинских углеродных нанокатионитов. К настоящему времени уже апробировано применение этого нанокатионита для коррекции функции митохондрий при ишемических заболеваниях сердечной мышцы и диабетической нейропатии. Местное применение нанокатионитов данного класса для защиты нервной ткани от апоптоза при глаукоме нуждается в экспериментальном изучении.

1. Buchachenko A. L., Kuznetsov D. A., Arkhangelsky S. E., Orlova M. A. Spin biochemistry: ^{24}Mg - ^{25}Mg - ^{26}Mg isotope effect in mitochondrial ADP phosphorylation processes // Cell Biochemistry and Biophysics. 2005. Vol. 43, P. 2432–2452.
2. Hosseini A., Sharifzadeh M., Rezayat, S. M. Benefit of magnesium-25 carrying porphyrin-fullerene nanoparticles in experimental diabetic neuropathy // International Journal of Nanomedicine. 2010. № 5. P. 517–523.
3. Rezayat S.M., Boushehri S.V.S., Salmanian B. The porphyrin–fullerene nanoparticles to promote the ATP overproduction in myocardium: $^{25}Mg^{2+}$ -magnetic isotope effect // Eur. J. Med. Chem. 2009. Vol. 44 (4), P. 1554–1569.



ИНТРАОКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОКАТИОНИТОВ НА ОСНОВЕ РМС 16

Цель работы: определение возможности локального применения нанокатионитов с $Mg25^{2+}$ на основе порфиринового аддукта фуллерена- C_{60} (РМС 16) при лечении офтальмопатологии в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы: введение нанокатионита в переднюю камеру глаза и интравитреально было проведено на 3 здоровых кроликах (в дозах 10 мкг, 100 мкг и 1000 мкг) и 6 кроликах с адреналининдуцированной глаукомой (в дозе 10 мкг). Еще один кролик с адреналининдуцированной глаукомой был контролем. Оценка состояния тканей глаза осуществлялась *in vivo* методами биомикроскопии и прямой офтальмоскопии, контроль внутриглазного давления - тонометрией по Маклакову, *post mortem* (эвтаназия кроликов углекислым газом с предварительным наркозом золетил-ксилазином) глаза оценивались с помощью световой микроскопии (окраска гематоксилин-эозином).

ИНТРАОКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОКАТИОНИТА НА ОСНОВЕ РМС-16

Состояние структур глаза кролика через 2 недели после введения 10 мкг нанокатионита в переднюю камеру глаза.

Рис. 1. Роговица (увел. 400).

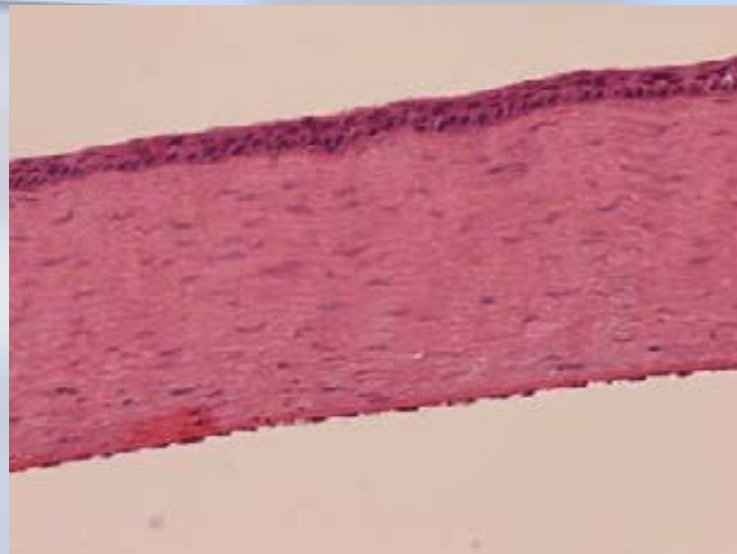
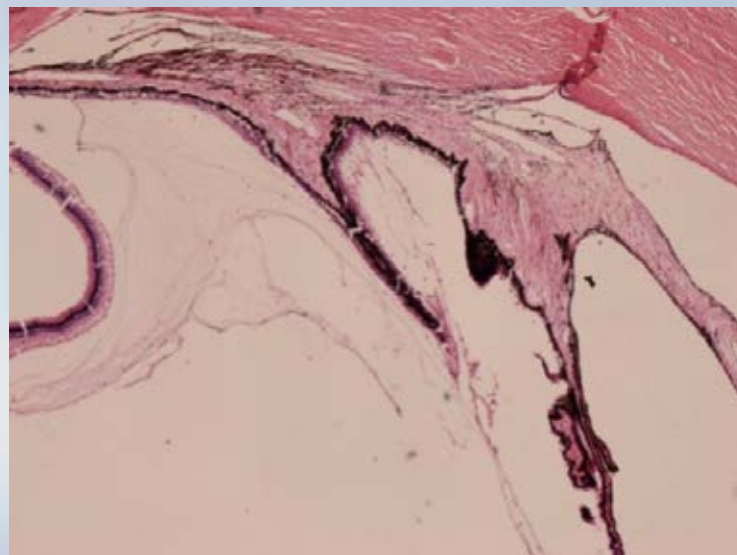


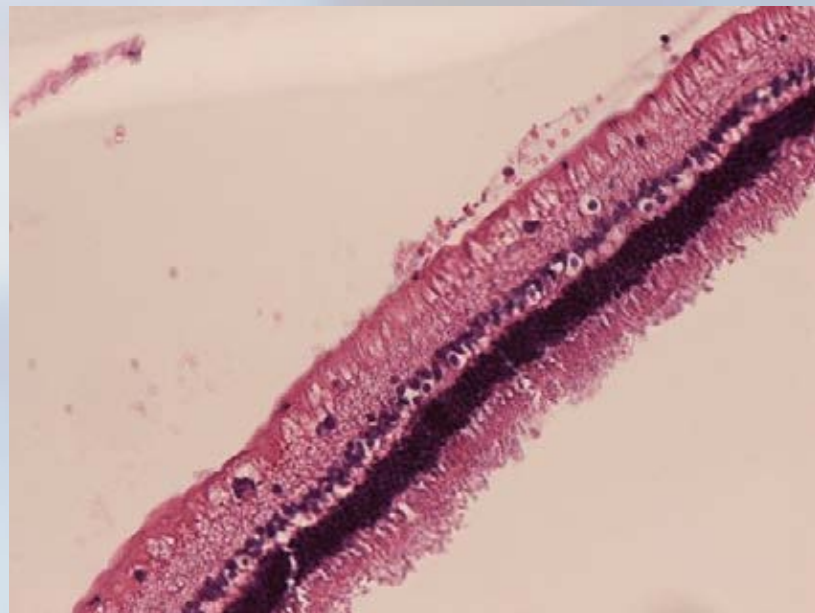
Рис. 2. Угол передней камеры глаза (увел. 200)



ИНТРАОКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОКАТИОНИТА НА ОСНОВЕ РМС-16

Состояние структур глаза кролика через 2 недели после введения 10 мкг нанокатионита в переднюю камеру глаза.
Рис. 3. Сетчатка (увел. 200).

Результаты: по данным визуального контроля и гистологического исследования при всех дозах вводимого препарата воспалительных явлений либо токсических реакций не определялось. Отмечалось временное умеренное повышение внутриглазного давления (ВГД) при введении нанокатионита РМС 16 с Mg^{2+} в дозе 10 мкг у кроликов без офтальмогипертензии и снижение - у кроликов с повышенным ВГД.





Заключение

1. Нанокатионит РМС16 с Mg^{2+} в дозе 10 мкг безопасен для интравитреального и интракамерального введения, не вызывает воспаления, токсических реакций и значимого помутнения оптических сред.
2. При введении препарата на фоне повышенного ВГД наблюдается снижение внутриглазного давления при обоих путях введения, при введении у кроликов с низкими цифрами внутриглазного давления - умеренное повышение ВГД в сроки до 14 дней от момента введения препарата.

Модели глаукомы и клиническая практика L.A. Levin (2001): «Необходима осторожность в переложении данных, полученных на моделях, применительно к людям, и не существует единственного универсального критерия для определения того, какая модель – in vitro или in vivo – наиболее подходит для данной клинической ситуации. Наиболее важным является корреляция результатов, полученных на модели, с результатами клинической практики, которые станут доступны лишь с течением времени, когда заканчиваются рандомизированные клинические исследования и можно оценить их результаты». Eur J Ophthalmol. 2001 Jul-Sep;11 Suppl 2:S23-9. **Animal and culture models of glaucoma for studying neuroprotection.** Levin I A



Спасибо за внимание

