Современные технологии в офтальмологии

Научно-практический журнал

№ 1 (26) / 2019 г.

Современные технологии лечения витреоретинальной патологии

cover_166x275_2018.indd 1 20.03.19 12:09

DOI: https://doi.org/10.25276/2312-4911-2019-1-285-288

П шт ев Н.П.[1, 2, 3], Поздеев Н.А.[1, 2], Г глоев Б.В.[1], Крестов Д.С.[2]

Влияние кр ткосрочной инсулинотер пии н концентр цию VEGF-A во внутригл зной жидкости крыс с ллокс новой моделью с х рного ди бет

[1] ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия гл з » им. к д. С.Н. Фёдоров » Минздр в России, Чебокс рский фили л;

[2] ГАУ ЧР «Институт усовершенствов ния вр чей»;

[3] ФГБУ ВПО «Чув шский госуд рственный университет им. И.Н. Ульянов »

Pashtaev N.P.[1, 2, 3], Pozdeyeva N.A.[1, 2], Gagloev B.V.[1], Krestov D.S.[2]

Influence of short-term insulin therapy on concentration of VEGF-A factor in intraocular liquid in case of diabetes alloxan model in rats

[1] Cheboksary Branch of the S. Fyodorov «Eye Microsurgery» Federal State Institution of Russian Health Ministry, Cheboksary;

[2] State Autonomous Institution «Doctors' training institute»;

[3] FSBI HPE «The Chuvash State University» named after I.N. Ulianov»

РЕФЕРАТ

Целью эксперимент являлось определение влияния кр ткосрочной инсулинотер пии н концентр цию VEGF-A во внутригл зной жидкости крыс с ллокс новой моделью с х рного ди бет .

М терил и метод. Эксперимент был проведён н 80 беспородных крыс х, которым вызыв ли ди- бет инъекцией ллокс н моногидр т . Эксперимент льных животных р зделили н 2 группы. В основной группе был н ч т з местительн я инсулинотер пия, в контрольной группе животные не получ ли специфической тер пии. После трехдневной инсулинотер пии эксперимент льные животные из обеих групп были выведены из исследов ния для получения внутригл зных жидкостей, в которых был определен концентр ция VEGF-A.

Результ т. Мы не выявили достоверного снижения концентр ции VEGF-A во внутригл зной жидкости между групп ми.

Вывод. Инсулинотер пия н р нних срок х ее н ч л не приводит к снижению уровня VEGF-A во внутригл зной жидкости крыс.

Ключевые слов : *модель с х рного ди бет , ллокс н, ди бетическ я ретиноп тия, VEGF-A, гипергликэмия, инсулин.*

Акту льность

Клинические исследов ния пок зыв ют, что з местительн я инсулинотер пия вызыв ет тр нзиторное усугубление ди бетической ретиноп тии у п циентов с с х рным ди бетом I и II тип [4, 6, 10, 11]. Тем не менее, длительн я инсулинотер пия способствует ст билиз ции ди бетической ретиноп тии и з метному снижению рисков ее прогрессиров ния [9, 10].

Мех низмы, леж щие в основе тр нзиторного усугубления ди бетической ретиноп тии н фоне инсулинотер пии, м лоизучены. Клинические исследов ния пок з ли, что VEGF игр ет в жную роль в п тогенезе к к непролифер тивной, т к и пролифер тивной ди бетической ретиноп тии [5]. Док з но повышение уровня VEGF в гл з х п циентов с призн к ми н рушения гем торетин льного б рьер и неов скуляриз цией [3].

V. Poulaki с со вт. пок з ли, что инсулинотер - пия приводит к повышению уровня VEGF и HIF-1a in vitro в культуре клеток ретин льного пигментного эпителия человек , что приводит к клинически зн чимому н рушению гем торетин льного б рьер (ГРБ). Более того, было определено, что инсулин-индуциров нн я экспрессия VEGF яв-

ляется HIF-1a з висимой и осуществляется посредством p38 MAPK и фосфоинозитид-3-кин зы (PI3Ks), тогд к к экспрессия VEGF, индуциров н н я гиперкликэмией, является HIF-1a нез висимой и осуществляется посредством протеинкин зы C (PKC) и p42/p44 MAPK [8].

Y. Liu с со вт. пок з ли, что инсулин стимулирует нгиогенез и зн чительно под вляет индуциров нную тромбином прониц емость микроциркуляторного русл , тем с мым улучш я б рьерные функции ГРБ [7].

Цель

Определить влияние кр ткосрочной инсулинотер пии н концентр цию VEGF-A во внутригл зной жидкости крыс с ллокс новой моделью с х рного ди бет .

М тери л и методы

Эксперимент выполнен с соблюдением принципов гум нности, изложенных в директив х Европейского обществ и Хельсинкской декл р ции, в соответствии с «Пр вил ми проведения р бот с использов нием эксперимент льных животных».

Для моделиров ния с х рного ди бет были использов ны 80 беспородных крыс со средней м ссой тел 204±78,67 гр (117-407 гр). Животных содерж ли в индивиду льных клетк х н ст нд ртном р ционе со свободным доступом к пище и воде в условиях вив рия. Всем 80 крыс м ди бет вызыв ли однокр тным внутрибрюшинным введением ллокс н гидр т (La Chema, Чехия) в дозе 170 мг/кг в 0,4 мл р створ цитр тного буфер .

При пл ниров нии эксперимент т кже учитыв ли, что ди бетогенное действие ллокс н более ктивно проявляется у животных, н ходящихся н предв рительной диете, поэтому все животные в течение 24 ч сов до н ч л эксперимент не получ ли пищу, но имели свободный доступ к воде.

Через 3 дня после введения ллокс н моногидр т погибло 19 крыс. В исследов нии ост лось 61 эксперимент льное животное. Для уст новления ди бетического ст тус осуществляли контроль концентр ции глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены.

При пл ниров нии диз йн эксперимент мы учитыв ли трехф зную ре кцию орг низм н введение подопытным животным ллокс н моногидр т . Он з ключ ется в первон ч льном повышении уровня с х р крови, достиг ющем м ксимум через 2-4 ч с после введения преп р т , котор я сменяется ф зой гипогликемии продолжительностью 15-20 ч сов. Если л бор торное животное в эту ф зу не погиб ет, то возник ет вторичн я гипергликемия, свидетельствующ я о р звитии с х рного ди бет . Поэтому уст новление ди бетического ст тус и ст рт инсулинотер пии проводили через 72 ч с после внутрибрюшинного введения ллокс н моногидр т .

Д лее эксперимент льных животных р зделили н 2 группы. В основной группе крыс м (n=30) было н ч то ежедневное однокр тное внутрибрюшинное введение инсулин продленного действия в тер певтической дозе 0,9 Ед/кг м ссы тел . Животным контрольной группы (n=31) ежедневно внутрибрюшинно вводили физиологический р створ. З 3 дня инсулинотер пии в основной и контрольной групп х погибло 10 и 17 крыс соответственно. Эксперимент льные животные из обеих групп были выведены из исследов ния путём дек пит ции.

Из обоих гл з к ждого животного были получены внутригл зные жидкости, в которых методом иммуноферментного н лиз с использов нием тест-системы «ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor A» (Cloud-Clone Corp, США), в л бор торных условиях был определен концентр ция VEGF-A.

Д нные предст влены в виде M±m (min-max), где: M – среднее, m – ст нд ртн я ошибк , min – миним льное зн чение, max – м ксим льное зн чение. Ст тистическую обр ботку полученных цифровых д нных и выявление их ст тистической зн чимости проводили в прогр мме Statistica 10 п р метрическим методом при помощи t-критерия Стьюдент . Вероятность нулевой гипотезы принимали при 5% уровне зн чимости.

Результ ты

В контрольной группе (n=14) концентр ция VEGF-A во внутригл зной жидкости сост вил 90,79±10,83 мкг (71-110 мкг), в основной группе (n=20) – 87,0±10,63 мкг (62-100 мкг) *(рис.)*. Р зличия концентр ций VEGF-A между групп ми ст тистически недостоверны (p=0,33).

Аллокс нов я модель с х рного ди бет является одной из с мых р спростр нённых и изученных. Он ктивно применяется исследов телями по всему миру.

Аллокс н является структурным н логом глюкозы, з счёт чего он н к плив ется в B-клетк х поджелудочной железы и приводит к их гибели с последующим р звитием ди бет . Пор жению B-клеток сопутствуют дегенер тивные изменения в почк х и печени, что обусл влив ет высокую смертность л бор торных животных в первые сут-

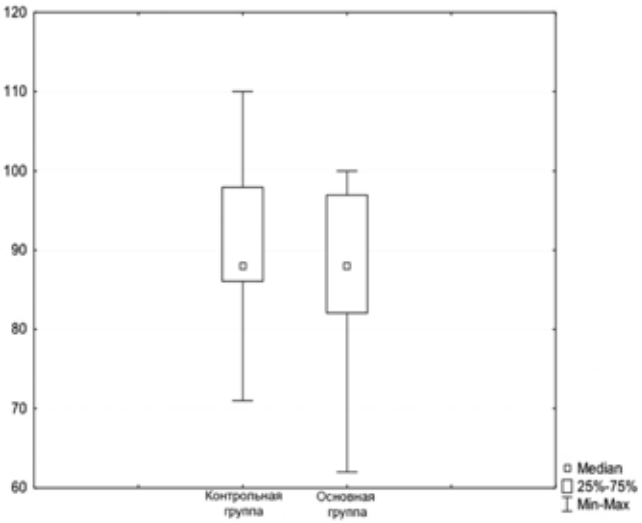

Рис. *Концентр ция VEGF-A во внутригл зной жидкости в контрольной и основной групп х*

ки после введения ллокс н [1]. Более того, индивиду льн я чувствительность к ллокс ну животных одного и того же вид в рьирует в очень широких предел х. Причины р зличной чувствительности в ответ н введение ди бетогенных доз ллокс н определяются большим количеством ф кторов, в том числе возр стом, полом, состоянием нервной и эндокринной систем, х р ктером обмен веществ, состоянием внутренних орг нов. В к честве пример можно привести р боту Н.А. П льчиковой с со вт., в которой исследов ли гормон льно-биохимические особенности ллокс новой и стрептозоциновой моделей с х рного ди бет у крыс. Авторы выявили высокую индивиду льную гетерогенность животных по ре кции н введение ллокс н уже в первые сутки после введения преп р т . З первые 5 суток исследов ния н фоне постепенного отк з от потребления воды и экскреции мочи погибли 31% подопытных животных [2].

Высок я смертность л бор торных животных является ещё одним недост тком д нной модели с х рного ди бет , с которой мы столкнулись во время проведения эксперимент . Т к через 3 дня после внутрибрюшинного введения ллокс н моногидр т смертность л бор торных животных сост вил 24% (19 крыс), через 6 дней – 58% (46 крыс).

Т кже высокой смертности, по н шему мнению, могло способствов ть большое число животных с низкой м ссой тел , использов нных в исследов нии. Низк я м сс тел может свидетельствов ть о недост точной зрелости животного и соответственно приводить к более выр женной токсической ре кции н введение ллокс н . Эти ф кторы должны учитыв ться при подборе вводимой дозы ллокс н в сторону ее уменьшения.

Н ми будет проведен р сширенный эксперимент н крыс х, сходных по возр сту и м ссе. Будет пересмотрен дозировк ллокс н в сторону ее уменьшения. Эксперимент льные животные будут р зделены н три группы: группу здоровых животных, группу больных с х рным ди бетом без инсулинотер пии и группу больных н инсулинотер пии. Более того, мы пл нируем увеличить срок инсулинотер пии до 30-90 дней.

Вывод

Инсулинотер пия н р нних срок х ее н ч л не приводит к снижению уровня VEGF-A во внутригл зной жидкости крыс. Необходимо проведение эксперимент н модели хронического с х рного ди бет с более длительным сроком инсулинотер пии н половозрелых крыс х сходных по м ссе и возр сту.

Р бот выполнен при поддержке гр нт РФФИ № 18-315-00029\18.

Литер тур

1. Б р нов В.Г., Соколоверов И.М., Г сп рян Э.Г. Эксперимент льный с х рный ди бет. Роль в клинической ди бетологии. – Л.: Н ук , 1983. – 240 с.

2. П льчиков А.А., Кузнецов Н.В., Кузьминов О.И., Селятицк я В.Г. Гормон льно-биохимические особенности ллокс новой и стрептозоциновой моделей эксперимент льного ди бет // Бюллетень СО РАМН. – 2013. – Т. 33, № 6. – С. 18-24.

3. Adamis A.P., Miller J.W., Rodrigues Bernal M.T., Damico D.J., Folkman J.M., Yeo T.K. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy // Am. J. Ophthalmol. – 1994. – Vol. 118. – P. 445-450.

4. Agardh C.D., Eckert B., Agardh E. Irreversible progression of severe retinopathy in young type I insulin-dependent diabetes mellitus patients after improved metabolic control // J. Diabetes Complications. – 1992. – Vol. 6, P. 96-100.

5. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M., Park J.E. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 331. – P. 1480-1487.

6. Brinchmann-Hansen O., Dahl-Jorgensen K., Sandvik L., Hanssen K. F. Blood glucose concentrations and progression of diabetic retinopathy: the seven year results of the Oslo study // BMJ. – 1992. – Vol. 304. – P. 19-22.

7. Liu Y., Chen X. I., Wang L., Martins-Green M. Insulin Antagonizes thrombin-induced blood vessel leakage // J. Vasc. Res. – 2017. – Vol. 54. – P. 143-155.

8. Poulaki V., Qin W., Joussen A. M., Hurlbut P., Wiegand S.J., Rudge J., Yankopoulos G.D., Adamis A. P. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF // The Journal of clinical investigation. – 2002. – Vol. 109. – P. 805-815.

9. Reichard P., Nilsson B.Y., Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus// N. Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 329. – P. 304-309.

10. Roysarkar T.K., Gupta A., Dash R.J., Dogra M.R. Effect of insulin therapy on progression of retinopathy in noninsulin-dependent diabetes mellitus // Am. J. Ophthalmol. – 1993. – Vol. 115. – P. 569-574.

11. The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial // Arch. Ophthalmol. – 1995. – Vol. 113. – P. 36-51.