

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХОРИОИДЕИ И СЕТЧАТКИ КРОЛИКОВ ПРИ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ СЕЛЕКТИВНЫХ И НЕСЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

Н. Е. Думброва, д-р мед. наук, проф., **А. Р. Король**, канд. мед. наук,

И. О. Насинник, мл. науч. сотр., **Т. Б. Кустрин**

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова
НАМН Украины», г. Одесса, Украина

Авторами за допомогою електронної мікроскопії були вивчені структурні зміни хоріоїдеї та сітківки кроликів при інтравітреальному введенні селективних і неселективних інгібіторів факторів росту ендотелію судин. Було визначено, що пегаптаниб натрію та ранібізумаб, на відміну від бевацизумаба, не призводять до ушкодження фоторецепторних клітин. Однак пегаптаниб натрію, в порівнянні з моноклональними антитілами призводить до ультраструктурних пошкоджень гангліозних клітин і пігментного епітелію сітківки.

Ключевые слова: ингибиторы факторов роста эндотелия сосудов, ультраструктурные изменения, интравитреальное введение

Ключові слова: інгібітори факторів росту ендотелію судин, ультраструктурні зміни, інтравітреальне введення ліків

Введение. В последнее время ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов получили широкое применение в офтальмологической практике для лечения пациентов с заболеваниями сетчатой оболочки [7, 20].

Ангиогенез играет важную роль в развитии пролиферативных заболеваний сетчатки, таких как пролиферативная диабетическая ретинопатия, экссудативная форма возрастной дегенерации макулы и ретинопатия недоношенных [4, 15]. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС, в англоязычной литературе VEGF) специфичен для эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и отвечает за их митотическую активность. Он также влияет на проницаемость капилляров для различных макромолекул, в результате чего может нарушаться гематофтальмический барьер [3, 12].

На данный момент в офтальмологии широко применяются три препарата: Бевацизумаб, Пегаптаниб натрия и Ранибизумаб.

Бевацизумаб представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело мыши, которое является биологически активным в отношении всех изоформ VEGF-A. Гистологические исследования показали что бевацизумаб приводит к изменению клеток сетчатки, субретинальной неоваскулярной мембраны и хориокапилляров [1, 5, 8, 17, 21], а также клеточной культуры [11, 13, 22]. Кроме того при электронномикроскопических исследованиях глаз кроликов были обнаружены ультраструктурные изменения в митохондриях внутренних сегментов фоторецепторов после применения бевацизумаба [8, 9, 19].

Inan U. U. и соавт. в ранее опубликованных исследованиях обнаружили повреждение митохондрий фоторецепторов через 4 недели после интравитреальной инъекции бевацизумаба у кроликов [9].

Пегаптаниб натрия — это модифицированный олигонуклеотид, селективно связывающийся и обладающий высоким сродством к изоформе VEGF₁₆₅, подавляя его активность. VEGF₁₆₅ встречается только при патологической глазной неоваскуляризации [10]. Важной особенностью этого препарата является отсутствие иммуногенности [6, 14, 18].

Ранибизумаб является антигенсвязывающим фрагментом гуманизированного моноклонального антитела к эндотелиальному фактору роста А (VEGF-A: VEGF₁₁₀, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅) и предотвращает взаимодействие всех изоформ VEGF-A с его рецепторами на поверхности клеток эндотелия (VEGR1 и VEGR2), что приводит к подавлению пролиферации сосудов и неоваскуляризации [16].

Сравнительное исследование токсичности ингибиторов ФРЭС на крысах в группах с применением Бевацизумаба и Ранибизумаба продемонстрировало отсутствие изменений ганглиозных клеток сетчатки (ГК) после однократной инъекции. Однако при введении пегаптаниба натрия были обнаружены ультраструктурные изменения ГК [23]. При этом видимых повреждений митохондрий фоторецепторов не наблюдалось, что соответствовало данным, полученным Yandiev Y. и соавторами на свиньях [24].

Тем не менее, влияние ингибиторов ФРЭС на эндотелиальные клетки сосудов сетчатки и пигментный эпителий не было тщательно изучено.

Цель. Изучить влияние селективных и неселективных ингибиторов ФРЭС на структуры хориоидеи и сетчатки кроликов при интравитреальном введении по данным электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Работа выполнена на 12 взрослых кроликах (24 глаза) породы шиншилла, массой 2–3,5 кг, подразделенных на группы: I — 4 кролика (8 глаз) однократное введение бевацизумаба в дозировке 0,025 мл, срок наблюдения 1 месяц; II — 4 кролика (8 глаз) однократное введение пегаптана натрия в дозировке 0,05 мл, срок наблюдения 1,5 месяца; III — 4 кролика (8 глаз) однократное введение ранибизумаба в дозировке 0,025 мл, срок наблюдения 1 месяц.

Забор материала в I и III группах производился через 1 месяц и во II группе — через 1,5 месяца после интравитреального введения препарата.

В качестве контроля проводилось электронно-микроскопическое исследование нормальной хориоидеи и пигментного эпителия сетчатки.

Эвтаназия животных осуществлялась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 ЕЕС).

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани фиксировались в 2,5 % растворе глутаральдегида на фосфатном буфере при значении pH — 7,4 с последующей дофиксацией 1 % раствором осмиевой кислоты при том же pH буферного раствора. Затем образцы обезживались в спиртах восходящей концентрации. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Ультратонкие срезы окрашивались растворами уранилацетата и цитрата свинца. Срезы просматривались и фотографировались срезы в электронном микроскопе ПЭМ-100–01.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. В первой группе (однократное введение бевацизумаба, забор материала через 1 месяц) отмечается расширение сосудов сосудистой оболочки, рассоединение и разрыхление межучточной соединительной ткани вследствие отёка в прилегающих непосредственно к сосудам областях. Эндотелиальные клетки содержат крупные ядра и обильную цитоплазму с просветлённым матриксом и уменьшенным числом органелл, что свидетельствует о внутриклеточном отёке (Рис. 1). В некоторых клетках часть цитоплазматических структур разрушена. В хориокапиллярах (ХК) на одних участках эндотелиальные клетки крупные, округлённые, с большим ядром и цитоплазмой, содержащей повышенное число типичных органелл. На других — эндотелиальные клетки имеют просветлённую цитоплазму, при этом часть цитоплазматических ультраструктур в них разрушена. Просвет хориокапилляров значительно расширен. Фенестрация стенок эндотелиальной выстилки хорошо выражена. В области эндотелия с признаками внутриклеточной деструкции имеются признаки отёка ткани окружающего межкапиллярного пространства.

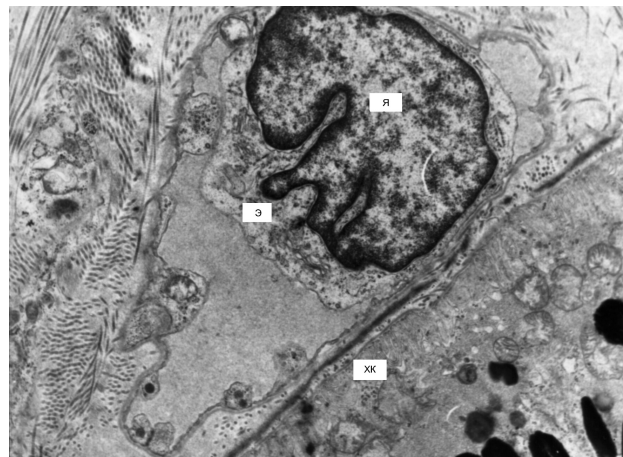


Рис. 1. Ультраструктура хориокапилляра кролика через 1 месяц после однократного интравитреального введения бевацизумаба. Фрагмент хориокапилляра с эндотелиоцитом, содержащим крупное ядро. Электронная микрофотография. X 6 000.

Условные обозначения: ХК — хориокапилляр, Э — эндотелиоцит, Я — ядро

Клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) близки по структуре к норме, за исключением набухания в их цитоплазме небольшой части ультраструктур. Митохондрии с укорочением или разрушением внутримитохондриальных крист. Вместе с тем, часть клеток ПЭС содержит повышенное число цитоплазматических органелл, в основном, элементов гладкой эндоплазматической сети (ГЭС) и свободных рибосом. В слое фоторецепторов все отделы фоторецепторных клеток (ФК) в основном не отличаются от нормы. Встречаются лишь единичные внутренние сегменты ФК, в которых резко выражена патология митохондрий, набухание органелл в виде «ракетки», деструкция крист, разрушение наружной мембраны, т.е. полное разрушение части митохондрий (Рис. 2). Это подтверждает данные, полученные другими исследователями [9]. Клеточные элементы биполярного слоя сетчатки, включая центральную ядерную область мюллеровских клеток (МЮК), сохранились практически без изменений. В слое ганглиозных клеток сами ганглиозные клетки (ГК) обычной структуры. Лишь в цитоплазме некоторых ГК встречаются набухшие или лишённые крист митохондрии. Микрососуды, лежащие вне сетчатки, между её внутренней пограничной мембраной и стекловидным телом, в области головки зрительного нерва, содержат типичные для эндотелиальных клеток ядра и цитоплазматические органеллы обычного вида.

Во второй группе (однократное введение пегаптана натрия, забор материала через 1,5 месяца) в сосудистой оболочке сосуды расширены, наблюдается отёк межучточной ткани. Эндотелиальные клетки, в основном, с нормальной ультраструктурой. ХК с просветом неоднородной ширины. В расширенных

участках эндотелиальные клетки с просветлённым цитоплазматическим матриксом и небольшим, числом типичных органелл. На других участках эндотелиальные клетки крупные, с большим количеством органелл, перекрывающие просвет ХК. Фенестрация эндотелиальной стенки слабо выражена. Наблюдается рыхлость, нечёткость плазмолеммы эндотелиальных клеток. В клетках ПЭС выражены гидропические изменения цитоплазматических структур (Рис. 3). Базальная складчатость и апикальные микровиллы сохранены. В клетках фоторецепторного слоя ультраструктура сохранена. Во внутреннем сетчатом слое — слое нервных волокон — отмечается набухание аксоплазмы части нервных волокон. В ГК наблюдается набухание митохондрий в цитоплазме клеток, что подтверждает ранее полученные данные [23]. Микрососуды вне ВПМ состоят из нормальных элементов.



Рис. 2. Ультраструктура фоторецепторных клеток сетчатки кролика через 1 месяц после однократного интравитреального введения бевацизумаба. Наружные и внутренние сегменты с нормальной структурой, лишь единичные внутренние сегменты с патологией митохондрий. Электронная микрофотография. X 8 000.

Условные обозначения: НСФР — наружные сегменты фоторецепторов, ВСФР — внутренние сегменты фоторецепторов, М — митохондрии.

В третьей группе (однократное введение ранибизумаба, забор материала через 1 месяц) сосуды сосудистой оболочки слегка расширены, включая и ХК. Эндотелиальные клетки их ядерной области содержат цитоплазму с большим числом типичных органелл. Уплотнённые отростки клеток также обычного строения. В ХК хорошо выражена фенестрация сосудистой стенки (Рис. 4).

ПЭС состоит из клеток типичной ультраструктуры, свойственной нормальному состоянию. При изучении ультраструктуры фоторецепторных клеток изменений не обнаружено, что согласуется с исследованиями, проведенными Yandiev Y. и соавторами на свиньях [24]. То же установлено при из-

учении остальных отделов сетчатки. Микрососуды вне ВПМ обычного вида.

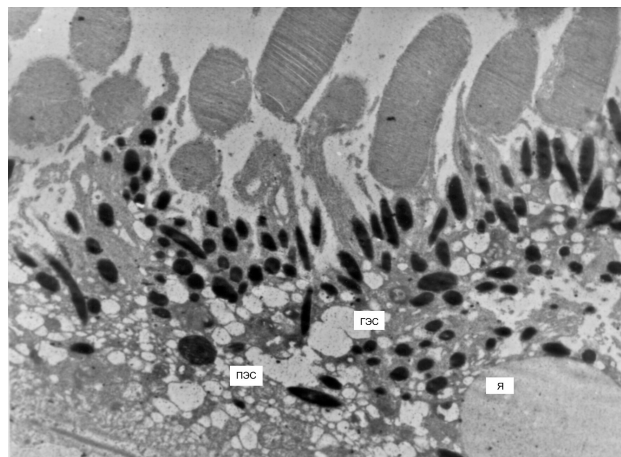


Рис. 3. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки кролика через 1,5 месяца после однократного интравитреального введения пегалтаниба натрия. Гидропические изменения клетки пигментного эпителия. Электронная микрофотография. X 5 000.

Условные обозначения: ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, Я — ядро, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть.

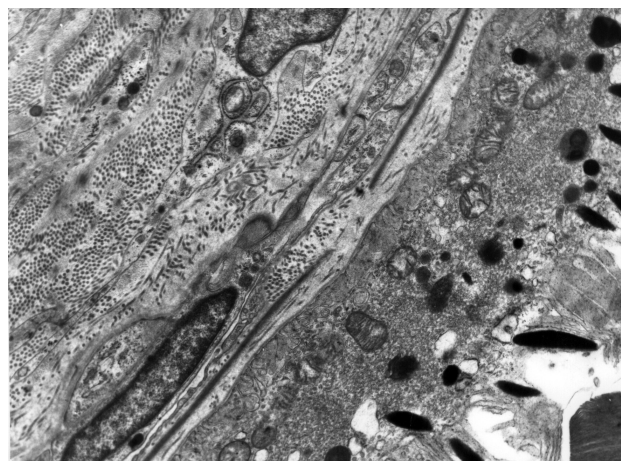


Рис. 4. Нормальная ультраструктура хориокапилляра и пигментного эпителия сетчатки кролика через 1 месяц после однократного интравитреального введения ранибизумаба.

Анализ полученных нами результатов свидетельствует, что пегалтаниб натрия и ранибизумаб не приводят к повреждению фоторецепторных клеток, в то время как бевацизумаб приводит к ультраструктурным изменениям ФК. Это частично подтверждается данными, полученными группой ученых, исследовавших действие пегалтаниба натрия и бевацизумаба, в различных дозировках. После однократной интравитреальной инъекции препаратов, в сроки 14 и 90 дней, а также через 3 месяца после трехкратного введения препаратов (один раз в месяц) были выявлены повреждения фоторецепторов сетчатки во всех группах [2]. Пегалтаниб на-

трия, по сравнению с моноклональными антителами приводит к ультраструктурным повреждениям ГК [23] и ПЭС.

Заключение. Таким образом, через один месяц после интравитреальной инъекции ранибизумаба в дозировке 0,025 мл ультраструктурные изменения были близки к норме, что свидетельствует о наименьшем повреждающем действии в отношении сетчатки и хориоидеи. Интравитреальное введение бевацизумаба в дозировке 0,025 мл, через месяц после инъекции, приводило к ультраструктурным изменениям в фоторецепторных клетках, что говорит о повреждающем действии препарата для сетчатки. Пегаптаниб натрия через 1,5 месяца после интравитреальной инъекции 0,05 мл не приводил к изменению фоторецепторных клеток, однако полученные данные о влиянии пегаптанита натрия на ганглиозные клетки и пигментный эпителий сетчатки требуют осторожного применения этого препарата в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ameri H.** The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and capillaries in rabbits / H. Ameri, G. J. Chader, J. G. Kim [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2007. — Vol.48. — P.5708–5714.
2. **Avcı B.** Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits / B. Avcı, R. Avcı, U. U. Inan [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2009. — Vol.50. — P.3438–3446.
3. **Congdon N.** Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States / N. Congdon, B. O'Colmain, C. C. Klaver [et al.] // *Arch Ophthalmol.* — 2004. — Vol.122. — P.477–485.
4. **D'Amore P. A.** Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization / P. A. D'Amore // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 1994. — Vol.35. — P.3974–3979.
5. **Dib E.** Subretinal bevacizumab detection after intravitreal injection in rabbits / E. Dib, M. Maria, I. M. Longo-Maugeri [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2008. — Vol.49. — P.1097–1100.
6. **Gragoudas E. S.** Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration / E. S. Gragoudas, A. P. Adamis, E. T. Cunningham [et al.] // *N Engl J Med.* — 2004. Vol.351. — P.2805–2816.
7. **Grossniklaus H. E.** Choroidal neovascularization / H. E. Grossniklaus, W. R. Green // *Am J Ophthalmol.* — 2004. — Vol.137. — P.496–503.
8. **Heiduschka P.** Penetration of Bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey / P. Heiduschka, H. Fietz, S. Hofmeister [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2007. — Vol.48. — P.2814–2823.
9. **Inan U. U.** Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes / U. U. Inan, B. Avcı, T. Kusbeci [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2007. — Vol.48. — P.1773–1781.
10. **Ishida S.** VEGF₁₆₄-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization / S. Ishida, T. Usui, K. Yamashiro [et al.] // *J Exp Med.* — 2003. — Vol. 198. — P. 483–489.
11. **Kaempf S.** Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture / S. Kaempf, S. Johnen, A. K. Salz [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2008. Vol.49. — P.3164–3170.
12. **Kepmen J. H.** The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States / J. H. Kepmen, B. J. O'Colmain, M. C. Leske [et al.] // *Arch Ophthalmol.* — 2004. — Vol.122. — P.552–563.
13. **Klettner A. K.** Comparison of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in vitro efficiency and possible additional pathways / A. K. Klettner, J. Roeder // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2008. — Vol.49. — P.4523–4527.
14. **Kourlas H.** Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review / H. Kourlas, D. S. Schiller // *Clin Ther.* — 2006. — Vol.28. — P.36–44.
15. **Leung D. W.** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen / D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang [et al.] // *Science.* — 1989. — Vol.246. — P.1306–1309.
16. **Lowe J.** Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo / J. Lowe, J. Araujo, J. Yang [et al.] // *Exp Eye Res.* — 2007. — Vol.85. — P.425–430.
17. **Manzano R. P.** Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin) / R. P. Manzano, G. A. Peyman, P. Khan [et al.] // *Retina.* — 2006. — Vol.26. — P.257–261.
18. **Ng E. W. M.** Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease / E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias [et al.] // *Nat Rev Drug Discov.* — 2006. — Vol.5. — P.123–132.
19. **Peters S.** Ultrastructural findings in the primate eye after intravitreal injection of bevacizumab / S. Peters, P. Heiduschka, S. Julien [et al.] // *Am J Ophthalmol.* — 2007. — Vol.143. — P.995–1002.
20. **Saxe S. J.** Ultrastructural features of surgically excised subretinal neovascular membranes in the ocular histoplasmosis syndrome / S. J. Saxe, H. E. Grossniklaus, P. F. Lopez [et al.] // *Arch Ophthalmol.* — 1993. — Vol.111. — P.88–95.
21. **Shahar J.** Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) / J. Shahar, R. L. Avery, G. Heilweil [et al.] // *Retina.* — 2006. — Vol.26. — P.262–269.
22. **Spitzer M. S.** Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells / M. S. Spitzer, E. Yoeruek, A. Sierra [et al.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* — 2007. — Vol. 245. — P.1837–1842.
23. **Thaler S.** Toxicity testing of the VEGF inhibitors bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in rats both with and without prior retinal ganglion cell damage / S. Thaler, M. Fiedorowicz, T. Jr. Choragiewicz [et al.] // *Acta Ophthalmol.* — 2010. Vol.88. — P.170–176
24. **Yandiev Y.** Intravitreal avastin does not induce pathological changes in the pig retina / Y. Yandiev, M. Francke, A. Reichenbach [et al.] // *ARVO Meeting* — 2008. Abstracts 49. — P.5580.

Поступила 02.04.2012
Рецензент к. м. н. Н. Н. Уманец

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF THE CHOROID AND RETINA OF RABBITS IN INTRAVITREAL INJECTION OF SELECTIVE AND NONSELECTIVE INHIBITORS OF GROWTH FACTORS OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM

N. E. Dumbrova, A. R. Korol, I. O. Nasinnyk, T. B. Kustrin

Odessa, Ukraine

The authors investigated structural changes of the choroid and retina of rabbits after intravitreal injection selective and nonselective anti-VEGF. It has been revealed that pegaptanib sodium and ranibizumab do not damage photoreceptors cells. However, pegaptanib sodium leads to ultrastructural damages of the ganglion cells and pigment epithelium of the retina.



Обзор литературы

УДК 617.711-044.4-089.

СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ ПТЕРІГІУМУ

Е. В. Мальцев, д-р мед. наук., проф., **В. Я. Усов**, д-р мед. наук., **Н. Ю. Крицун**, асп.

Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова АМН України

Ключові слова: птеригіум, хірургічне лікування, рецидив, патоморфологічні дослідження.

Ключевые слова: птеригиум, хирургическое лечение, рецидив, патоморфологические исследования.

Дистрофічні ураження очного яблука займають друге місце після запальних захворювань органа зору. Однією з форм прояву дистрофії переднього відрізка ока є птеригіум [15]. Термін птеригіум походить з грецької мови (πτερυγιον), що означає — маленьке крило [63]. Птеригіум — це доброякісне фіброваскулярне утворення, яке представляє собою наростання кон'юнктивальної тканини на рогівку в напрямку від лімба до її центру, за рахунок гіперпроліферації лімбальних епітеліальних клітин, яке супроводжується формуванням новоутворених судин [54]. Частина птеригіума, яка знаходиться на рогівці, називається голівкою, місце переходу з рогівки на кон'юнктиву — шийкою, а частина, яка лежить на кон'юнктиві — тілом. Одні птеригіуми стаціонарні, інші мають схильність до прогресування, і видалення їх, найчастіше, призводить до рецидиву [12, 13, 63]. Птеригіум, як захворювання, що має здатність до рецидивування, досліджували як вітчизняні автори, так і закордонні [8, 11, 13, 34, 44, 49, 54, 59]. Первинний птеригіум має, як правило, форму трикутника основою до лімба, частіше з носової і рідше з темпоральної сторони, іноді, носить поширений характер, прогресуючи на значній території лімба [50]. Досягаючи оптичної зони рогівки, птеригіум призводить до зниження гостроти зору, може сприяти розвитку астигматизму [6, 15, 54, 60, 61]. Як правило, зустрічається в осіб працев-

датного віку (30–55 років) [63]. Це захворювання досить поширене (від 3 до 20 %), особливо, в районах з жарким кліматом і високим рівнем інсоляції [1, 4, 5, 26, 50, 63].

Не дивлячись на багаточисленні роботи, які присвячені птеригіуму, етіологія та патогенез його до кінця не вивчені [4, 6, 42, 43, 57, 59, 68]. Захворюваність на птеригіум підвищується у напрямку до екватора земної кулі, тобто, з підвищенням кліматичної температури і сонячної активності. Сприятливим фактором є негативний вплив зовнішнього середовища: сонячне випромінювання, запиленість навколишнього простору, вітер, підвищення вмісту солей в повітрі (морський клімат) та т. ін. [4, 5, 6, 50, 63].

Теорії виникнення птеригіуму різнобічні та підчас спірні. В ряді робіт показано, що птеригіум є аутоімунним ураженням сполучної тканини і посилюється під дією ультрафіолетового випромінювання [4, 5, 6, 36, 42, 43, 50, 54, 57]. Відомо, що за останні роки зростає тенденція до збільшення поширення птеригіуму, а в деяких регіонах дана патологія прогресує [15, 33]. В підвищенні частоти птеригіуму відіграють роль такі фактори, як зростання тривалості життя населення, зростання часу проведеного на відкритому повітрі, еколого-географічні особливості, руйнування озонового шару, поши-

© Е. В. Мальцев, В. Я. Усов, Н. Ю. Крицун, 2012