

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДЕЛИ ГЛАУКОМНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ NMDA, У КРЫС

Мясникова В.В.^{1,2}, Сахнов С.Н.^{1,2}, Каде А.Х.², Ханжина Е.А.², Кравченко С.В.¹, Закараия Т.Г.¹

¹ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Минздрава России», Краснодарский филиал, Краснодар, e-mail: office@okocentr.ru;

²ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России, Краснодар

Глаукомная оптическая нейропатия является одной из основных причин слепоты в мире, ее прогрессирование обусловлено гибелью ганглиозных клеток сетчатки глаза. Лечение такого рода заболеваний направлено на остановку нейродегенерации сетчатки и зрительного нерва. N-метил-D-аспартат(NMDA)-опосредованная эксайтотоксичность представляет собой общий путь развития оптической нейропатии и поэтому может рассматриваться в качестве одной из мишеней в нейропротекторных исследованиях, нуждающихся в качественных моделях нейродегенеративных процессов при глаукоме. Цель данного исследования заключалась в оценке эффективности модели оптической нейропатии, вызванной интравитреальным введением NMDA крысам линии Sprague Dawley (SD). Животным в группах с моделированием оптической нейропатии вводили интравитреально 3 мкл раствор NMDA в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 120 ммоль/л и капельно на поверхность глаза в концентрации 120 ммоль/л. Контрольной группе вводился фосфатный буфер. В ходе эксперимента крысам проводилась офтальмоскопия и поведенческое тестирование в черно-белой камере. Также после забора биологического материала (глаза) оценивались толщина внутреннего плексиморфного слоя и количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки. В рамках проведенного исследования по созданию модели оптической нейропатии было показано, что интравитреальное введение NMDA в концентрациях 50, 100 и 120 ммоль/л вызывает уменьшение толщины внутреннего плексиморфного слоя и снижает количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки. Оптимальной является концентрация 120 ммоль/л. Эффект тестируемого вещества не наблюдался при проведении офтальмоскопического обследования. Введение NMDA во всех изученных концентрациях для моделирования оптической нейропатии не влияет на поведение животных, что показывает эффективность модели при отсутствии функциональных нарушений зрения.

Ключевые слова: глаукома, модель глаукомной оптической нейропатии, N-метил-D-аспартат, NMDA, нейродегенерация, оптическая нейропатия, ганглиозные клетки сетчатки.

ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF THE MODEL OF NMDA-INDUCED GLAUCOMATOUS OPTIC NEUROPATHY IN RATS.

Myasnikova V.V.^{1,2}, Sakhnov S.N.^{1,2}, Kade A.Kh.², Khanzhina E.A.², Kravchenko S.V.¹, Zakaraiya T.G.¹

¹Fyodorov Federal State Institution of the Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Krasnodar branch, Krasnodar, e-mail: office@okocentr.ru;

²Kuban State Medical University, Krasnodar

Glaucomatous optic neuropathy is one of the main cause of blindness in the world, which progression accompanied by dying of the ganglion cells of retina. Treatment of the diseases like this is focused on retina and optic nerve degeneration stopping. N-methyl-D-aspartate(NMDA)-induced excitotoxicity is the common way of optic neuropathy development, and thus is the able be viewed as one of the target in the researches of neuroprotection. The researches of neuroprotection are needed the high quality models of neurodegenerative processes in glaucoma. The aim of this research was the estimation of the efficiency of the model of NMDA-induced glaucomatous optic neuropathy in Sprague Dawley (SD) rats. Groups of animals with optic neuropathy model are received 3 μ L of NMDA solution in 10, 25, 50, 100 and 120 mmol/L intravitreal and 120 mmol/l as eye drops. The control group received phosphate buffer solution. During the experiment light-dark box test and ophthalmoscopy were performed. After obtaining of the histological material (eyes), the inner pleximorph layer and ganglion cells number were examined. Performed experiment showed, that intravitreal NMDA injections in 10, 25, 50, 100 and 120 mmol/L concentrations causes inner pleximorph layer and number of ganglion cells decrease. The 120 mmol/L concentration is optimal. The ophthalmoscopy and behavior tests didn't show any effects. This shoves the efficacy of the model without functional sight alterations.

Keywords: glaucoma, model of glaucomatous optic neuropathy, N-methyl-D-aspartate, NMDA, neurodegeneration, optic neuropathy, ganglion cells of retina.

Глаукома, будучи широко распространённым нейродегенеративным заболеванием, является одной из частых причин слепоты, в том числе и необратимой [1; 2]. Течение данного заболевания характеризуется прогрессирующей селективной гибелью ганглиозных клеток сетчатки глаза [3], повреждением волокон зрительного нерва [2] и необратимыми дефектами поля зрения [1]. Одного только снижения внутриглазного давления для стабилизации глаукомного процесса обычно оказывается недостаточно, и важным моментом является принятие мер, направленных на остановку процессов нейродегенерации сетчатки и зрительного нерва путем применения различных нейропротекторных методов [4]. При проведении доклинических испытаний нейропротекторных препаратов корректность и достоверность полученных данных во многом зависят от качественной, проработанной и хорошо воспроизводимой модели нейродегенеративного процесса, для терапии которого планируется применять исследуемый препарат, в связи с чем разработка моделей нейродегенеративных процессов и их оценка отличаются высокой степенью актуальности. Кроме того, моделирование патогенеза глаукомы может быть полезным при разработке и оптимизации методов ее диагностики. Поскольку N-метил-D-аспартат(NMDA)-опосредованная эксайтотоксичность представляет собой общий путь развития оптической нейропатии при глаукоме, она может рассматриваться в качестве одной из мишеней в нейропротекторных исследованиях [5].

Цель исследования – оценка эффективности модели глаукомной оптической нейропатии, вызванной интравитреальным введением NMDA крысам Sprague Dawley (SD).

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовались самцы крыс линии Sprague Dawley (SD) возрастом 10-12 недель, массой тела 221 ± 13 г, в количестве 120 шт., полученные из НПП ФИБХ РАН питомника лабораторных животных «Пушино». Животные содержались согласно стандартам, определенным Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. В эксперимент после клинического осмотра были отобраны животные без видимых признаков заболеваний и распределены по группам с применением принципа рандомизации, используя в качестве критерия массу тела. Было сформировано 7 групп: 1 контрольная, которая не подвергалась воздействию NMDA, получая только фосфатный буфер (PBS 1 М), 5 экспериментальных, которым интравитреально вводили NMDA в разных концентрациях, и 1 экспериментальная, которой NMDA вводился капельно на поверхность глаза. Сформированные группы животных и их характеристики представлены в таблице 1.

Группы животных, вводимые им препараты и дозы

№ группы	Кол-во животных	Вводимый препарат, концентрация	Объем и способ введения препарата
1	30	PBS 1M (контроль)	3 мкл интравитреально
2	18	NMDA, 10 ммоль/л	3 мкл интравитреально
3	18	NMDA, 25 ммоль/л	3 мкл интравитреально
4	18	NMDA, 50 ммоль/л	3 мкл интравитреально
5	18	NMDA, 100 ммоль/л	3 мкл интравитреально
6	18	NMDA, 120 ммоль/л	3 мкл интравитреально
7	18	NMDA, 120 ммоль/л	Наружно, на поверхность глаза

Для моделирования оптической нейропатии использовался N-метил-D-аспартат (NMDA) производства Sigma-Aldrich (США). Раствор NMDA в 1 М PBS приготавливался путем внесения необходимого количества порошка препарата в рассчитанный объем буфера с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 минут. Дозы для введения готовились ежедневно и до введения хранились при +4 ...+8 °С не более 24 часов.

Группам с моделированием оптической нейропатии на 0-й день исследования выполнялось однократное введение в левый глаз раствора NMDA в 1 М PBS объемом 3 мкл [6; 7] в концентрациях 10, 25, 50, 100 и 120 ммоль/л и капельно на поверхность глаза в концентрации 120 ммоль/л для достижения разных уровней повреждения ганглиозных клеток сетчатки. Контрольной группе вводился 1 М PBS объемом 3 мкл. Для выполнения интравитреальной инъекции животным выполнялась анестезия смесью Золетил® + Рометар® (тилетамин /золазепам + ксилазин) внутримышечно в дозировке 24/24 + 12 мг/кг. Наркотизированное животное укладывали на бок. На иглу шприца Гамильтона одним концом надевали полиэтиленовую трубку катетера, в другой конец трубки вставляли иглу 30G, катетер заполняли раствором NMDA. Иглу вводили во внутренний угол глаза под лимбом перпендикулярно главному яблоку на глубину 1-2 мм и производили аспирацию внутриглазной жидкости в объеме 3 мкл для снижения внутриглазного давления, после чего иглу вынимали и освобождали катетер от внутриглазной жидкости. Раствор NMDA продвигали по трубке катетера до появления капли на игле. Иглу вставляли в ранее сделанный прокол и вводили моделирующее вещество в объеме 3 мкл. Для инфильтрации вещества иглу фиксировали в полости глаза не менее чем на 20 секунд. Процедуру выполняли с использованием стерильных инструментов и материалов, после введения препарата глаза

орошали стерильным изотоническим раствором натрия хлорида до восстановления рефлекса моргания.

Офтальмоскопия проводилась с помощью офтальмоскопа *gi-mini/pen-scope Riester* (Германия) на 0-й день до интравитреального введения NMDA и после инъекции препарата: через 24 часа, на 3, 7, 14-й дни исследования у животных всех групп. Для расширения зрачка перед манипуляцией применяли глазные капли 0,5-1% атропина сульфата. Оценивали прозрачность хрусталика, состояние зрительного диска и поверхностных сосудов сетчатки.

Поведение и световую чувствительность в тесте «Черно-белая камера» регистрировали у животных из групп №№ 1, 3, 6 и 7 в конце исследования (на 7-й или 14-й день). Тест проводили в камере, разделенной на два отсека: черный светонепроницаемый отсек и отсек с ярким светом. Для начала процедуры тестирования животное помещали в светлый отсек. Оценивались следующие параметры: время первого перехода в темный отсек; количество заходов в темный отсек; время, проведенное животным в темном отсеке [8-10].

После плановой эвтаназии путем помещения животных в CO₂-камеру до первых признаков смерти (на 7-е и 14-е сутки эксперимента) у всех животных осуществляли забор глазных яблок с глазным нервом и их фиксацию в растворе Дэвидсона [11]. Фиксированные ткани обезживали, пропитывали парафином; из парафиновых блоков делали срезы и окрашивали стандартно гематоксилином и эозином. Гистологические препараты изучали с помощью световой микроскопии на микроскопе *AxioScope.A1* (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с помощью камеры *Axiocam 305 color* (Carl Zeiss, Германия), морфометрию слоев сетчатки производили с использованием программного обеспечения *ZEN 2.6 lite* (Carl Zeiss, Германия). Оценивали следующие параметры: толщину внутреннего плексиморфного слоя и количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки (количество ядер на отрезке сетчатки протяженностью 200 мкм).

В связи отличным от нормального распределением полученных числовых данных они представлены в виде медианы и 1 и 3 квартилей (Me [Q_{25%}; Q_{75%}]). Для установления межгрупповых различий данные массы тела были проанализированы многофакторным дисперсионным анализом ANOVA-2 с последующим тестом Duncan. В случае когда дисперсионный анализ показывал уровень значимости *p*, близкий или равный 0,05, применялся тест Mann-Whitney для попарного сравнения групп с контрольной группой № 1. Данные гистологических изменений по степени выраженности сравнивали с помощью теста Mann-Whitney. Статистический анализ проводили с использованием программы *Statistica 7.1* (StatSoft Inc., США). Для визуализации полученных данных использовался программный пакет *GraphPad Prism 6.01* (GraphPad Software Inc., США). Различия определяли при 5%-ном уровне значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Средние значения массы тела животных по группам начальной массы тела и перед некропсией указаны в таблице 2. Было выявлено, что на 14-й день после инъекции масса тела у групп с интравитреальным введением NMDA в концентрациях 50 и 100 ммоль/л статистически значимо ($p < 0,05$, тест Mann-Whitney) ниже, по сравнению с контрольной группой и группой с введением NMDA в концентрации 10 ммоль/л, что, вероятно, связано с эффектами препарата.

Таблица 2

Суммарные данные массы тела

Группа	1 - контроль	2 - NMDA 10 ммоль/л	4 - NMDA 50 ммоль/л	5 - NMDA 100 ммоль/л
День исследования	Масса тела, г			
	Me [Q _{25%} ; Q _{75%}]			
	N=18	N=18	N=18	N=18
День 1	221,5 [219,0; 231,0]	230,0 [226,0; 235,0]	223,0 [218,0; 226,0]	221,5 [207,0; 235,0]
	N=6	N=6	N=6	N=6
День 3	215,0 [209,0; 219,0]	220,5 [211,0; 225,0]	219,5 [214,0; 230,0]	224,5 [220,0; 236,0]
	N=6	N=6	N=6	N=6
День 7	229,0 [213,0; 240,0]	222,0 [214,0; 228,0]	220,0 [208,0; 229,0]	228,5 [222,0; 236,0]
	N=6	N=6	N=6	N=6
День 14	231,0 [228,0; 236,0]	234,0 [232,0; 240]	222,0 [209,0; 228,0] *#	214,0 [208,0; 220,0] *#

N – количество животных в группе; * – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) относительно значений группы 1 – контроль (тест Mann-Whitney); # – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) относительно значений группы 2 – интравитреальное введение NMDA 10 ммоль/л (тест Mann-Whitney).

При офтальмоскопии у животных из группы № 7, с капельным введением NMDA 120 ммоль/л, было выявлено минимальное количество наблюдаемых патологических изменений. У животных же, которым выполнялись интравитреальные инъекции, как NMDA (группы №№ 2, 3, 4, 5, 6), так и 1 М PBS в контрольной группе (группа № 1), наблюдалось увеличение объема сосудов, изменение цвета зрительного диска, за исключением нескольких животных. Наличие патологических изменений у животных, подвергавшихся инъекциям, вне зависимости от концентрации NMDA, и их отсутствие у животных, получавших препарат на поверхность глаза, позволяет заключить, что на результат офтальмоскопии оказывает влияние нарушение целостности склеры глаза в результате инъекции, а не тестируемое вещество.

Суммарные данные по группам светочувствительного теста с черно-белой камерой указаны в таблице 3. В ходе их анализа статистически значимых различий между сравниваемыми группами выявлено не было ($p > 0,05$, тест Mann-Whitney). Подобные

результаты могут свидетельствовать о том, что вводимый препарат не оказывает влияния на поведение крыс в тесте с черно-белой камерой и не вызывает функциональных нарушений зрения.

Таблица 3

Суммарные данные поведенческого тестирования в тесте «Черно-белая камера»,

Me [Q_{25%}; Q_{75%}]

Группа	1 - Контроль	3 – NMDA 25 ммоль/л	6 – NMDA 120 ммоль/л	7 – NMDA 120 ммоль/л капли в глаз
7-й день исследования				
	N=6	N=6	N=6	N=6
Количество заходов в темный отсек	1,0 [1,0; 1,0]	2,0 [2,0; 3,0]	2,5 [2,0; 3,0]	1,5 [1,0; 2,0]
Время первого перехода в темный отсек, с	12,5 [3,7; 19,6]	11,5 [8,5; 14,4]	29,7 [18,4; 51,5]	20,0 [11,0; 23,7]
Время, проведенное в темной камере, с	287,5 [262,1; 296,3]	276,7 [271,2; 284,5]	226,0 [181,6; 268,4]	262,1 [251,6; 275,5]
14-й день исследования				
	N=6	N=6	N=6	N=6
Количество заходов в темный отсек	2,0 [1,0; 2,0]	1,0 [1,0; 1,0]	2,0 [1,0; 3,0]	1,5 [1,0; 2,0]
Время первого перехода в темный отсек, с	18,2 [8,4; 30,6]	10,6 [7,5; 15,0]	26,9 [17,1; 30,1]	9,3 [4,9; 15,4]
Время, проведенное в темной камере, с	274 [266,1; 286,3]	287,4 [282,0; 294,7]	256,0 [245,8; 260,1]	286,1 [281,7; 293,7]

N – количество животных в группе; статистически значимых значений между сравниваемыми группами не выявлено ($p > 0,05$, тест Mann-Whitney).

Данные морфометрии сетчатки представлены в таблице 4 и на рисунке 1. Наиболее показательным вариантом модели, выявленным при анализе морфометрических показателей, является вариант с интравитреальным введением 3 мкл NMDA в концентрации 120 ммоль/л. При применении этой концентрации наблюдается статистически значимое ($p < 0,05$) снижение толщины внутреннего плексиморфного слоя и снижение количества ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки на 7-й и 14-й дни после введения относительно контрольной группы. Интравитреальное введение 3 мкл NMDA в концентрациях 50 и 100 моль/л привело к статистически значимому ($p < 0,05$) снижению количества ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки на 7-й день после введения, что является показателем гибели нейронов сетчатки и развития оптической нейропатии. Применение капельного введения не сопровождалось развитием патоморфологических изменений в сетчатке. Примеры наблюдаемых изменений гистологического строения сетчатки представлены на микрофотографиях на рисунке 2. Группы с концентрациями 50, 100 и 120 ммоль/л имели выраженные изменения морфометрических показателей в сетчатке, и толщина внутреннего

плексиморфного слоя у этих групп была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже по сравнению с группой 7 (капельное введение). Отличий в морфометрических показателях сетчатки не обнаружено у животных группы с применением NMDA в концентрации 25 ммоль/л через 7 и 14 дней после его интравитреального введения, по сравнению с контрольной группой, из чего следует, что данная концентрация в испытанном дизайне эксперимента является недостаточной для индукции нейродегенеративных изменений.

Таблица 4

Данные морфометрии сетчатки, Ме [Q_{25%}; Q_{75%}]

Группа	1 - контроль	3 – NMDA 25 ммоль/л	4 – NMDA 50 ммоль/л	5 – NMDA 100 ммоль/л	6 – NMDA 120 ммоль/л	7 – NMDA 120 ммоль/л, глазные капли
7-й день исследования						
	N = 8	N = 3	N = 6	N = 6	N = 3	N = 3
Толщина внутреннего плексиморфного слоя, мкм	39,9 [36,5; 43,5]	39,9 [36,4; 41,6]	30,7 [27,9; 32,0] #	34,5 [29,6; 42,4] #	34,8 [29,5; 35,0] *#	47,0 [46,3; 48,2]
Количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки	14,3 [13,6; 15,6]	12,0 [11,8; 16,3]	9,4 [8,5; 12,5] *#	10,7 [9,5; 12,5] *#	10,0 [7,5; 12,3] *#	15,0 [12,8; 15,8]
14-й день исследования						
	N = 9	N = 3	N = 6	N = 6	N = 3	N = 3
Толщина внутреннего плексиморфного слоя, мкм	44,5 [41,4; 46,1]	37,9 [35,6; 44,4]	32,9 [31,6; 40,7] #	35,1 [33,5; 40,0] #	32,5 [30,5; 39,9] *#	49,6 [42,0; 54,3]
Количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки	15,5 [12,8; 18,3]	13,8 [11,5; 14,0]	13,9 [11,0; 14,8]	10,2 [9,0; 13,8]	10,0 [9,5; 12,0] *#	15,8 [13,3; 17,3]

N – количество животных в группе;

* – статистически значимое отличие ($p < 0,05$) относительно значений контрольной группы 1 (тест Mann-Whitney);

– статистически значимое отличие ($p < 0,05$) относительно значений группы 7 с введением тестируемого препарата капельно (тест Mann-Whitney).

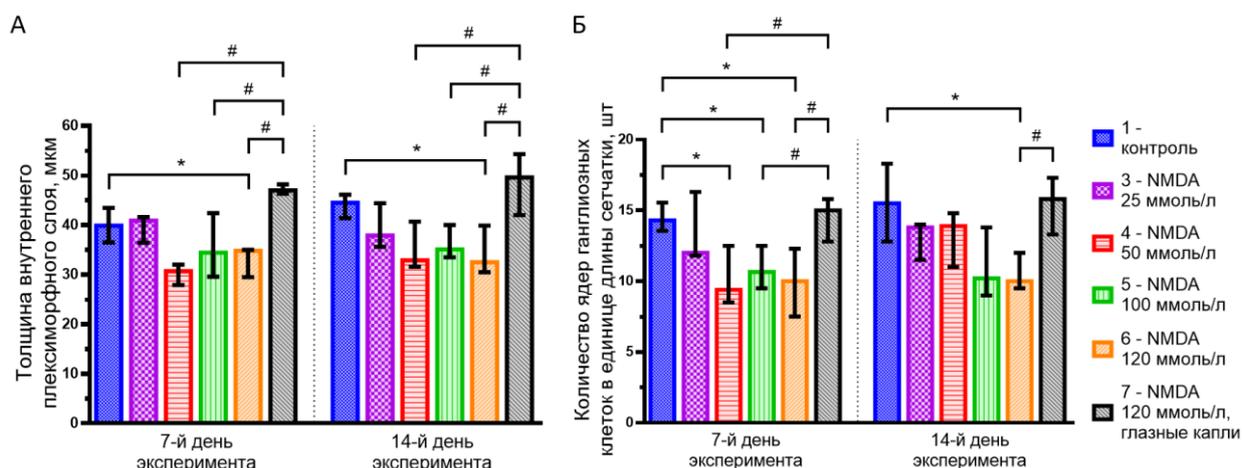


Рис. 1. Данные морфометрии сетчатки ($Me [Q_{25\%}; Q_{75\%}]$). А – толщина внутреннего плексиморфного слоя, мкм. * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы 1 (тест Mann-Whitney); # – $p < 0,05$ относительно группы 7 с капельным введением NMDA (тест Mann-Whitney); Б – количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки, шт., * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы 1 (тест Mann-Whitney); # – $p < 0,05$ относительно группы 7 с введением тестируемого препарата капельно (тест Mann-Whitney)

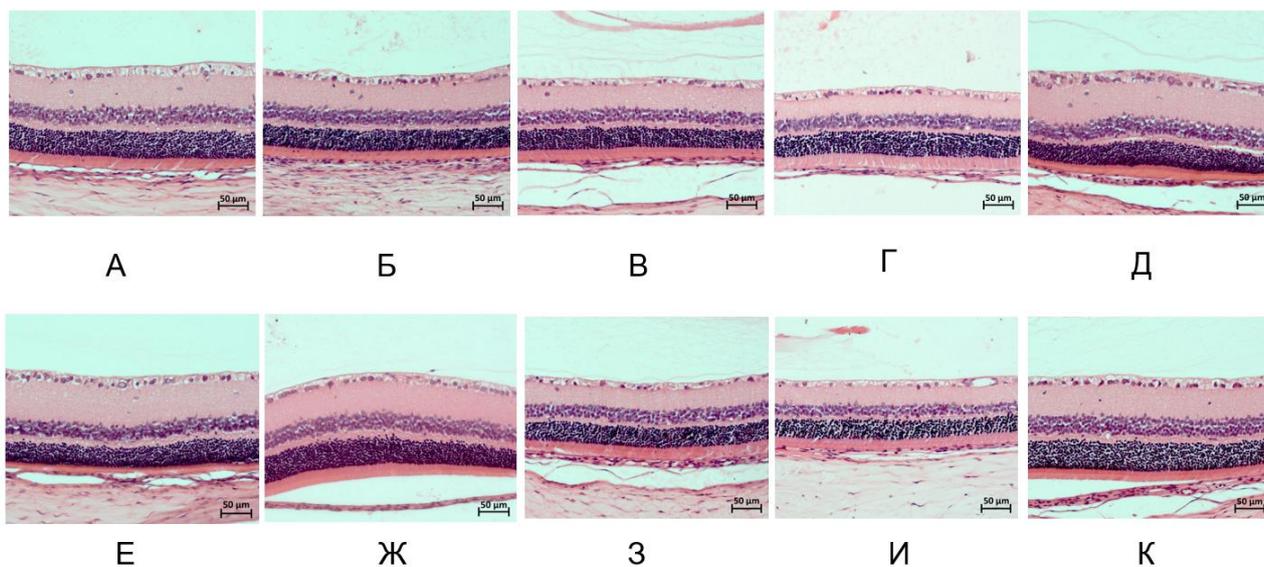


Рис. 2. Микрофотографии препаратов сетчатки крыс разных групп на 7-й (А-Д) и 14-й (Е-К) дни эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение X200

Пояснения. А - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 7-й день после интравитреального введения PBS в объеме 3 мкл. Обычное гистологическое строение слоев сетчатки. Толщина внутреннего плексиморфного слоя (IPL) 48,7 мкм. Б - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 7-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 50 ммоль/л. Незначительное сужение внутреннего плексиморфного слоя до 41,4 мкм. В - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 7-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 100 ммоль/л. Умеренное сужение внутреннего плексиморфного слоя до 38,5 мкм. Г - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 7-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 120 ммоль/л. Выраженное сужение внутреннего плексиморфного слоя до 28,7 мкм. Д - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 7-й день после наружного капельного нанесения 3 мкл NMDA в дозе 120 ммоль/л. Обычное гистологическое строение слоев сетчатки. Толщина внутреннего плексиморфного слоя (IPL) 50,8 мкм. Е - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 14-й день после интравитреального введения PBS в объеме 3 мкл. Обычное гистологическое строение слоев сетчатки. Толщина внутреннего плексиморфного слоя (IPL) 54,9 мкм. Ж - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 14-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 50 ммоль/л. Обычное

гистологическое строение слоев сетчатки. Толщина внутреннего плексиморфного слоя (IPL) 49,4 мкм. З - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 14-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 100 ммоль/л. Выраженное сужение внутреннего плексиморфного слоя до 31,9 мкм. И - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 14-й день после интравитреального введения 3 мкл NMDA в дозе 120 ммоль/л. Выраженное сужение внутреннего плексиморфного слоя до 29,7 мкм. К - фрагмент сетчатки глаза самца крысы SD на 14-й день после наружного капельного нанесения 3 мкл NMDA в дозе 120 ммоль/л. Обычное гистологическое строение слоев сетчатки. Толщина внутреннего плексиморфного слоя (IPL) 48,8 мкм.

Отсутствие патологических изменений при офтальмоскопическом исследовании и изменений поведения в тесте «Черно-белая камера» говорит о том, что испытанная модель на основе интравитреального введения NMDA не вызывает функциональных нарушений зрения, индуцируя исключительно развитие патологических процессов, связанных с нейродегенеративными изменениями в структуре сетчатки, характерными для глаукомы [12]. Это положение находит подтверждение и при морфометрическом анализе препаратов сетчатки. Такой характер изменений говорит о том, что испытанная модель оптимальна при проведении доклинических испытаний нейропротекторных препаратов, поскольку исключает искажения, связанные с функциональными нарушениями зрения. Воссозданные изменения толщины внутреннего плексиморфного слоя сетчатки в условиях испытанной модели воспроизводят явления, наблюдаемые при оптической когерентной томографии сетчатки, что позволяет выполнять разработку и оптимизацию протоколов диагностики глаукомы и выявления этой патологии на ранних стадиях.

Заключение

В рамках проведенного исследования по оценке эффективности модели оптической нейропатии было показано, что интравитреальное введение 3 мкл N-метил-D-аспартата в концентрациях 50, 100 и 120 ммоль/л вызывает уменьшение толщины внутреннего плексиморфного слоя и снижает количество ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки к 7-му дню после инъекции, что является подтверждением создания эффективной модели оптической нейропатии.

Оптимальной для интравитреального введения является концентрация 120 ммоль/л, вызывающая статистически значимое снижение толщины внутреннего плексиморфного слоя и количества ядер ганглиозных клеток в единице длины сетчатки на 7-й и 14-й дни эксперимента, относительно как группы, получавшей интравитреальные инъекции PBS, так и группы животных, которым препарат наносился капельно на поверхность глаза.

Эффект тестируемого вещества не наблюдался при проведении офтальмоскопического обследования. Введение N-метил-D-аспартата во всех изученных концентрациях для моделирования оптической нейропатии не приводит к изменениям при тестировании поведения животных.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод об эффективности модели при отсутствии функциональных нарушений зрения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории биологических испытаний (ЛБИ) Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН) и персонально руководителю лаборатории - к.б.н. Дьяченко Игорю Александровичу, за предоставленный материал.

Список литературы

1. Михайлова Т.Н. Нейропротекторные свойства бримонидина // Офтальмохирургия. 2019. № 3. С. 78-91. DOI: 10.25276/0235-4160-2019-3-78-91.
2. Гузун О.В., Храменко Н.И., Слободяник С. Б., Пономарчук В.С., Перетягин О.А. Эффективность комплексной нейропротекции ганглиозных клеток сетчатки при глаукомной оптической нейропатии // Офтальмологический журнал. 2018. № 5. С. 32-38.
3. Аветисов С.Э., Еричев В.П., Федоров А.А., Яременко Т.В., Мураховская Ю.К. Оценка терапевтической чувствительности ганглиозных клеток сетчатки в культуре к таргетному пептидному биорегулятору // Вестник офтальмологии. 2019. Т. 135. № 1. С. 84-89. DOI: 10.17116/oftalma201913501184.
4. Апрельев А.Е., Пидодний Е.А. Первичная нейропротекция глаукомы // Оренбургский медицинский вестник. 2020. Т. 8. № 2 (30). С. 5-9.
5. Lambuk L., Jafri A.J.A., Iezhitsa I., Agarwal R., Bakar N.S., Agarwal P., Abdullah A., Ismail N.M. Dose-dependent effects of NMDA on retinal and optic nerve morphology in rats. International journal of ophthalmology. 2019. vol. 12 no 5. P. 746-753. DOI: 10.18240/ijo.2019.05.08.
6. Wang S., Gu D., Zhang P., Chen J., Li Y., Xiao H., Zhou G. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are relatively resistant to excitotoxicity induced by N-methyl-d-aspartate. Neuroscience letters. 2018. vol. 662. P. 368-373. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.10.055.
7. Kassumeh S., Leopold S., Fuchshofer R., Thomas C.N., Priglinger S.G., Tamm E.R., Ohlmann A. Norrin protects retinal ganglion cells from excitotoxic damage via the induction of leukemia inhibitory factor. Cells. 2020. vol. 9. no 2. P. 277. DOI: 10.3390/cells9020277.
8. Каде А.Х., Кравченко С.В., Трофименко А.И., Поляков П.П., Липатова А.С., Ананьева Е.И., Чаплыгина К.Ю., Уварова Е.А. Терещенко О.А. Современные методы оценки уровня тревожности грызунов в поведенческих тестах, основанных на моделях без предварительного обусловливания // Кубанский научный медицинский вестник. 2018. Т. 25. № 6. С. 171-176. DOI: 10.25207/1608-6228-2018-25-6-171-176.

9. Кравченко С.В., Каде А.Х., Вчерашнюк С.П., Поляков П.П., Булатова В.В., Мищенко А.С. Влияние ТЭС-терапии на динамику тревожного состояния крыс с моделью ротенонового паркинсонизма // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28903> (дата обращения: 22.06.2021). DOI: 10.17513/spno.28903.
10. Jin X., Zhang Y., Celniker S.E., Xia Y., Mao J.H., Snijders A.M., Chang H. Gut microbiome partially mediates and coordinates the effects of genetics on anxiety-like behavior in Collaborative Cross mice. *Scientific reports*. 2021. vol. 1. no 11. P. 270. DOI: 10.1038/s41598-020-79538-x.
11. Ваганова А.Н. Методы исследований влияние фиксации гистологического материала на результат иммуногистохимического окрашивания // Гены и клетки. 2015. Т. 10. № 3. С. 113-119.
12. Макогон С.И., Макогон А.С. Некоторые аспекты сосудистой теории развития и прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы. Обзор литературы. Часть 1 // Офтальмология. 2019. Т. 16. № 1. С. 12-18. DOI: 10.18008/1816-5095-2019-1-12-18.