

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas



Vilniaus
universitetas

Neurobiologijos magistro II kurso studentas

Kernius Mickevičius

Magistrinis darbas

**Akies ikiklinikinio padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio indukavimas
Dutch Belted triušiuose ir jo funkcinė bei morfolginė charakteristika**

Darbo vadovas:

Dr. Symantas Ragauskas, InVivo padalinio vadovas, UAB Experimentica

Konsultantas:

Prof. Habil. Dr. Osvaldas Rukšėnas, Vilniaus universitetas

Vilnius, 2020

Akies ikiklinikinio padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio indukavimas
***Dutch Belted* triušiuose ir jo funkcinė bei morfolginė charakteristika**

Darbas atliktas

Įmonėje UAB „Experimentica“.

Kernius Mickevičius /_____/

Darbo vadovas:

Dr. Symantas Ragauskas /_____/

SANTRUMPOS

DR - Diabetine retinopatija

DME - Diabetinė geltonosios dėmės edema

ERG - Elektroretinografija

FA - Fluoresceino angiografija

mfERG - Multifokalinė ERG

PDR - Proliferacinė diabetinė retinopatija

OKT - Optinė koherentinė tomografija

pERG - Šabloninė ERG

VEGF - Vaskuliarinis endotelio augimo faktorius

TURINYS

ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Akies sandara	8
1.1.2 Išorinis skaidulinis dangalas	8
1.1.2 Vidurinis kraujagyslinis dangalas	9
1.1.3 Vidinis dangalas	11
1.1.4 Triušio ir žmogaus akies sandaros skirtumai	14
1.2 Diabetinė retinopatija	16
1.2.1 Etiologija ir patogenezė	17
1.2.2 Tinklainės nervinio audinio patogenezė	19
1.3 Gyvūnų modeliai	21
1.3.1 Triušio DR modeliai	21
1.3.2 Streptozotocinas	22
1.3.3 Vaskuliarinis endotelio augimo faktorius (VEGF)	22
1.3.4 VEGF veikimo mechanizmas	23
1.3.5 Gydymas anti-vaskuliariniais endotelio augimo faktoriais	24
1.4 Modelių charakterizavimas	24
1.4.1 Elektrofiziologija	25
1.4.2 Optinė koherentinė tomografija	26
1.4.3 Flouresceino angiografija	27
2. METODOLOGIJA	29
2.1 Įranga ir medžiagos	29
2.2 Eksperimento eiga	31
2.3 Tyrimo metodai	32
2.3.1 Gyvūnai	32
2.3.2 Intravitrealinės injekcijos	33
2.3.3 Akies struktūrų vaizdinimas	33
2.3.4 Elektroretinografija	34
2.3.5 Kiekybinė rezultatų analizė	35
3. REZULTATAI	36
3.1 VEGF koncentracijos nustatymo eksperimentas	36
3.1.1 Makroskopiniai tinklainės pokyčiai	36

3.1.2	Kraujagyslinio nuotėkio plotas.....	39
3.2	Modelio validavimo eksperimentas.....	39
3.2.1	Makroskopiniai tinklainės pokyčiai.....	40
3.2.2	Vaskuliarinio nuotėkio plotas.....	43
3.3.3	Elektroretinografija.....	44
4.	REZULTATŲ APTARIMAS.....	46
4.1	VEGF koncentracijos nustatymo eksperimentas.....	46
4.2	Modelio validavimo eksperimentas.....	47
	IŠVADOS.....	49
	SANTRAUKA.....	50
	SUMMARY.....	51

ĮVADAS

Diabetinė retinopatija (DR) pasireiškia daugiau nei vienam trečdaliui asmenų sergančių diabetu ir yra viena pagrindinių priežasčių, lemiančių 24-70 metų amžiaus asmenų aklumą. Remiantis 2017 m. duomenimis DR pasireiškė apie 92,6 mln. suaugusiųjų, iš kurių 28,4 mln. asmenų buvo sutrikęs regėjimas. Dėl didėjančio susirgimų diabetu skaičiaus ir ilgesnės gyvenimo trukmės šie skaičiai kasmet ženkliai auga (Zheng et al., 2012). DR atsiradimas ir progresavimas yra sąlygojamas daugelio veiksnių, tokių kaip susirgimo diabetu trukmė, nepakankama gliukozės kiekio kontrolė kraujyje bei padidėjęs kraujo spaudimas. Hiperglikemija sukelia mikroangiopatijos vystymąsi, įskaitant mikroaneurizmas, hemoragijas ir kapiliarų pamatinės membranos plonėjimą. Tai toliau lemia padidėjusį kraujo-tinklainės barjero kraujagyslių pralaidumą bei diabetinę geltonosios dėmės edemą (angl. *diabetic macular edema (DME)*) (Shah and Gardner, 2017). Kraujagyslių pralaidumas sukelia tinklainės išemiją bei skatina didesnę kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) išsiskyrimą, o tai savo ruožtu sukelia neovaskuliarizaciją. DR skirstoma į dvi pagrindines kategorijas – ankstyvosios stadijos neproliferacinę diabetinę retinopatiją ir pažengusios stadijos proliferacinę DR (Badaro et al., 2014; Stitt et al., 2016).

Vienas iš didžiausių iššūkių kuriant vaistus skirtus tiek ankstyvos, tiek ir pažengusios DR stadijų gydymui išlieka tinkamų biomodelių gyvūnuose kūrimas. Gyvūnų modeliai sudarytų sąlygas vaistinių medžiagų (angl. *drug candidates*) efektyvumo tyrimams, kurie būtų charakterizuoti morfologiniais ir funkciniais parametrais.

Darbo tikslas: Indukuoti padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelį *Dutch Belted* triušiuose ir validuoti jį įvertinant elektrofiziologinius ir morfologinius rodiklius.

Darbo tikslui įgyvendinti buvo iškelti šie uždaviniai:

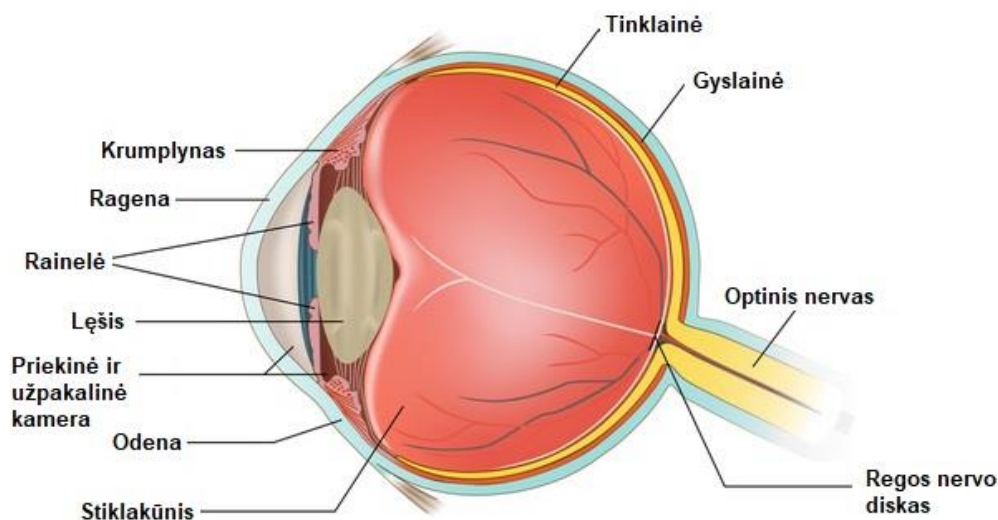
- Nustatyti tinkamą kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) koncentraciją padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modeliui triušiuose indukuoti.
- Įvertinti akies dugno ir tinklainės pokyčius fluoresceino angiografijos (FA) ir optinės koherentinės tomografijos vaizdinimo metodais.
- Įvertinti triušio akies tinklainės ląstelių elektrinį atsaką į stimulą taikant elektroretinografiją (ERG).
- Įvertinti padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio efektyvumą testuojant anti-VEGF (afliberceptas) vaistus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Rega yra viena svarbiausių jutiminių sistemų mūsų išgyvenimui ir orientavimuisi aplinkoje. Nuo akių ligų pasaulyje kenčia milijonai žmonių. Žmogaus organizme šias ligas sukelia įvairūs patologiniai mechanizmai, o vienas dažniausiai pasitaikančių yra kraujagyslinio audinio pokyčiai. Pagrindiniai DR simptomai yra padidėjęs kraujagyslių pralaidumas ir neovaskuliarizacija. Kraujagyslinis endotelio barjeras pasižymi pralaidumu įvairioms medžiagoms. Šis požymis leidžia reguliuoti organizmo fiziologines funkcijas bei palaikyti audinių homeostazę (Park-Windhol and D'Amore, 2016). Įvairūs faktoriai, tokie kaip kapiliarų ir mikrokraujagyslių savybės, kraujotakos pokyčiai ir tarpląstelinų jungčių pakitimai, reguliuoja kraujagyslių pralaidumą (Mehta and Malik, 2006). Neovaskuliarizacija yra naujų kapiliarų susidarymas iš jau esamų kraujagyslių. Sveikame organizme šis procesas yra lokalizuotas ir reguliuojamas, tačiau esant patologinėms sąlygoms proceso valdymas sutrinka ir išsivysto nekontroliuojama neovaskuliarizacija. Ši būklė būdinga aterosklerozei, reumatoidiniam artritui, taip pat akių ligoms – su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneracijai ir diabetinei retinopatijai (DR) (Park-Windhol and D'Amore, 2016). DR pasireiškia daugiau nei vienam trečdaliui asmenų sergančių diabetu ir tai yra viena pagrindinių priežasčių, sąlygojanti 24-70 metų amžiaus asmenų aklumą. Dėl kasmet augančios gyvenimo trukmės ir jo kokybės didėja diabetu sergančių žmonių skaičius. Manoma, kad dėl šios priežasties 2050 metais DR susirgimų skaičius JAV pasieks 16 mln. bei didės poreikis naujiems vaistams ir terapiniams metodams (Lee et al., 2015; Shah and Gardner, 2017). Naujų gydymo metodų kūrimas reikalauja gilaus ir informatyvaus ligos vystymosi mechanizmų supratimo. Vis dėlto, dauguma struktūrinių, funkcinių ir biocheminių eksperimentų negali būti atliekami su žmonėmis, todėl patikimi ir eksperimentiškai atkartojami gyvūnų modeliai yra esminiai DR tyrimuose. Tai yra vienas efektyviausių būdų tirti šios ligos patogenezės mechanizmus ir ieškoti naujų gydymo būdų (Liu et al., 2017; Robinson et al., 2012). Dažniausiai yra naudojami graužikų modeliai, tačiau yra kitų rūšių gyvūnų, pavyzdžiui, triušių, šunų ar primatų, kurių akies sandara yra struktūriškai panašesnė į žmogaus. Šių gyvūnų DB modeliuose išsivysto morfologiškai panašūs tinklainės ir kraujagyslių pažeidimai (Olivares et al., 2017). Tačiau dauguma praktikoje naudojamų ikiklinikinių modelių nepakankamai tiksliai atkartoja ligos eigą, todėl yra svarbu kurti naujus *in vivo* modelius ir tobulinti jau esamus, kurie kuo įmanoma tiksliau atkurtų DB patologiją ir simptomus bei būtų tinkami naujų vaistų testavimui.

1.1 Akies sandara

Šviesa teikia daugiausiai informacijos apie mus supančią aplinką, todėl per milijonus metų evoliucijos procesų eigoje išsivystė viena sudėtingiausių jutiminių sistemų, kuri pasižymi jautrumu šviesos bangoms. Pagrindinis šios sistemos organas yra akis, kuri tinklainėje esančių specializuotų nervinių ląstelių pagalba verčia iš aplinkos gautą šviesos informaciją į elektrocheminius signalus. Šie signalai iš tinklainės regos nervu keliauja į smegenis, kur gauta informacija yra galutinai apdorojama regos žievėje ir sąmoningai arba nesąmoningai suvokiama (Forrester et al., 2016, p. 13). Akis yra sudaryta iš akies obuolio ir priedinių organų (ašarų aparato, akies obuolio raumenų, voko, junginės, blakstienų ir antakių). Akies obuolys yra ne visiškai taisyklingos formos rutulys, kurį sudaro išorinio skaidulinio, vidurinio kraujagyslinio ir vidinio dangalų kapsulė bei branduolys, kuriame yra užpakalinė ir priekinė akies kameros, lęšiukas ir stiklakūnis (1.1 pav.) (Stropus et al., 2005, p. 371).

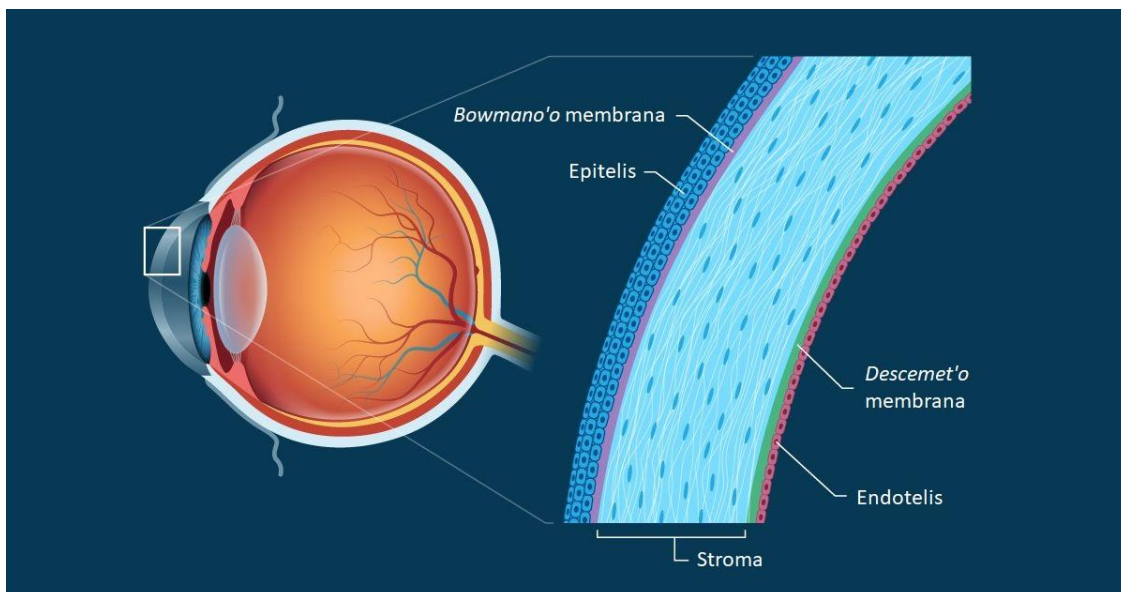


1.1 pav. Akies sandara (<https://www.glaucoma.org/glaucoma/anatomy-of-the-eye.php>).

1.1.2 Išorinis skaidulinis dangalas

Skaidulinį dangalą sudaro priekinė permatoma dalis – rageną ir užpakalinė nepermatoma dalis – odena. Odena yra plona ir tvirta kiaušinio baltymo spalvos skaidulinio jungiamojo audinio plokštelė. Odena ir vidinis akispūdis palaiko akies obuolio formą, bei apsaugo viduje esančias akies struktūras (Forrester et al., 2016, p. 20). Priekinėje akies dalyje odena pereina į skaidrią ir ploną plokštelę – rageną, kuri sudaryta iš epitelio, keratinocitų ir endotelio ląstelių bei neląstelinų struktūrų – kolageno ir glikozaminoglikanų. Rageną (1.2 pav.) sudaro penki sluoksniai: 1) Epitelis, kuris atlieka apsauginę funkciją nuo mikrobu, cheminių medžiagų ir vandens. Šio sluoksnio ląstelės

reguliariai atsinaujina kas 7 - 10 dienų. Taip pat šiame sluoksnyje yra didelis kiekis nociceptorių, todėl jis ypač jautrus skausmui; 2) Priekinis elastinis sluoksnis, arba *Bowman'o* membrana, sudarytas iš kolageno fibrilių ir kuri padeda ragenai išlaikyti formą; 3) Stroma, kurią sudaro kolageno fibrilės bei vanduo. Šis sluoksnis suteikia ragenai skaidrumo ir tvirtumo; 4) Užpakalinė elastinė arba *Descemet'o* membrana, kurią taip pat sudaro kolageno fibrilės. Šis sluoksnis veikia kaip apsauginis bajoras nuo infekcijų ir sužalojimų; 5) Endotelis, kuris sudarytas iš vieno sluoksnio plokščiųjų daugiakampių ląstelių. Šio sluoksnio pagrindinė funkcija yra palaikyti skysčių balansą ragenos stromoje (Sridhar, 2018). Viena svarbiausių ragenos savybių yra skaidrumas. Dėl to skirtingai nei kituose akies audiniuose, joje nėra kraujagyslių, kurios aprūpintu ją maisto medžiagomis ir deguonimi. Todėl šias molekules rageną gauna iš ašarų ir priekinėje akies kameroje esančio vandeningojo humoro (Forrester et al., 2016, p. 14; Sridhar, 2018).



1.2 pav. Ragenos sluoksniai (<https://www.allaboutvision.com/resources/cornea.htm>).

1.1.2 Vidurinis kraujagyslinis dangalas

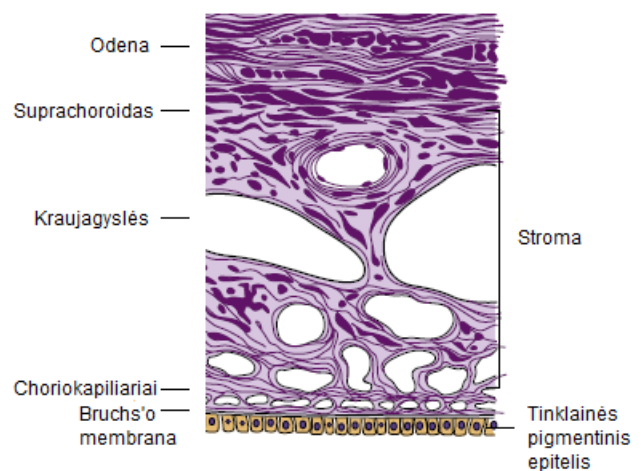
Kraujagyslinis dangalas skirstomas į tris skirtingos sandaros ir funkcijos dalis: rainelę, krumplyną ir gyslainę. Rainelė yra akies raumeninė diafragma, kuri savo funkcija ir veikimo principu yra fotokamerų diafragmos analogas. Raumenų susitraukinėjimo pagalba rainelė reguliuoja į akies vidų patenkančią šviesos kiekį (Forrester et al., 2016). Rainelę sudaro keturi sluoksniai: priekinis kraštinis, stromos ir sfinkterio raumens, priekinio epitelio ir dilatacinio raumens bei užpakalinis epitelio. Priekiniame kraštiniame sluoksnyje yra gausu melanocitų, kurie gamina eumelaniną ir feomelaniną. Šių pigmentų kiekio santykis lemia žmogaus akių spalvą (Remington and Remington, 2012). Raineles stromą sudaro netankiai išsidėstę fibroblastai,

melanocitai ir kolageno skaidulos. Dėl netankaus ląstelių išsidėstymo šis audinys pasižymi elastingumu vyzdžio išsiplėtimo ir susitraukimo metu. Taip pat stromoje yra iš lygiųjų raumens ląstelių sudarytas sfinkterio raumuo, kuris sutraukia vyzdį (miozė). Dilatacinio raumens sluoksnį sudaro mioepitelinės ląstelės, šios raumeninės ląstelės atsakingos už vyzdžio išsiplėtimą (midriazė). Rainelės užpakalinis epitelio sluoksnis sudarytas iš didelių vienasluoksnių kubinių epitelinių ląstelių (Hogan, 1971; Remington and Remington, 2012).

Krumplynas yra vidurinė kraujagyslinio dangalo dalis esanti tarp tinklainės ir rainelės. Jį sudaro jungiamasis audinys, pigmentinės ir lygiųjų raumenų ląstelės bei kraujagyslių tinklas. Krumplyną sudaro trys raumenų grupės: žiediniai, radialiniai ir išilginiai raumenų pluoštai. Raumeninės skaidulos susitraukdamos gali keisti lęšiuko išlenkimą taip padėdamos lęšiui sufokusuoti stebimo objekto vaizdą (Forrester et al., 2016).

Gyslainė yra didžiausia kraujagyslinio dangalo dalis, besitęsianti nuo dantytosios linijos (angl. *ora serrata*) iki regos nervo. Tai plonas, tankiai pigmentuotas, kraujagyslinis jungiamasis audinys esantis tarp odenos ir tinklainės. Pagrindinė jo funkcija yra aprūpinti išorinius tinklainės sluoksnius maisto medžiagomis ir deguonimi (Borrelli et al., 2018). Taip pat gyslainės kraujotakos procesai prisideda prie akispūdžio reguliavimo ir termoreguliacijos. Histologiškai gyslainę sudaro keturi sluoksniai: *Bruchs'o* membrana, choriokapiliarai, kraujagyslinis sluoksnis ir suprachoroidas (1.3 pav.) (Remington and Remington, 2012). *Bruchs'o* membrana atskiria tinklainės pigmentinio epitelio sluoksnį nuo gyslainės. Ši membrana tarnauja kaip molekulinis filtras ir reguliuoja medžiagų mainus tarp tinklainės ir kraujo.

Virš *Bruchs'o* membranos esantis choriokapiliarų sluoksnis tankiausiai išsidėstęs geltonosios dėmės srityje, aprūpindamas šią mažą tinklainės sritį krauju. Kraujagysliniame sluoksnyje yra pagrindinės didžiosios kraujagyslės, kurios aprūpina gyslainę maisto medžiagomis. Suprachoroidas yra plona pereinamoji zona skirianti gyslainę nuo odenos. Šį sluoksnį sudaro melanocitai, fibroblastai ir jungiamasis audinys (Forrester et al., 2016).



1.3 pav. Histologinis gyslainės pjūvis (Remington and Remington, 2012).

1.1.3 Vidinis dangalas

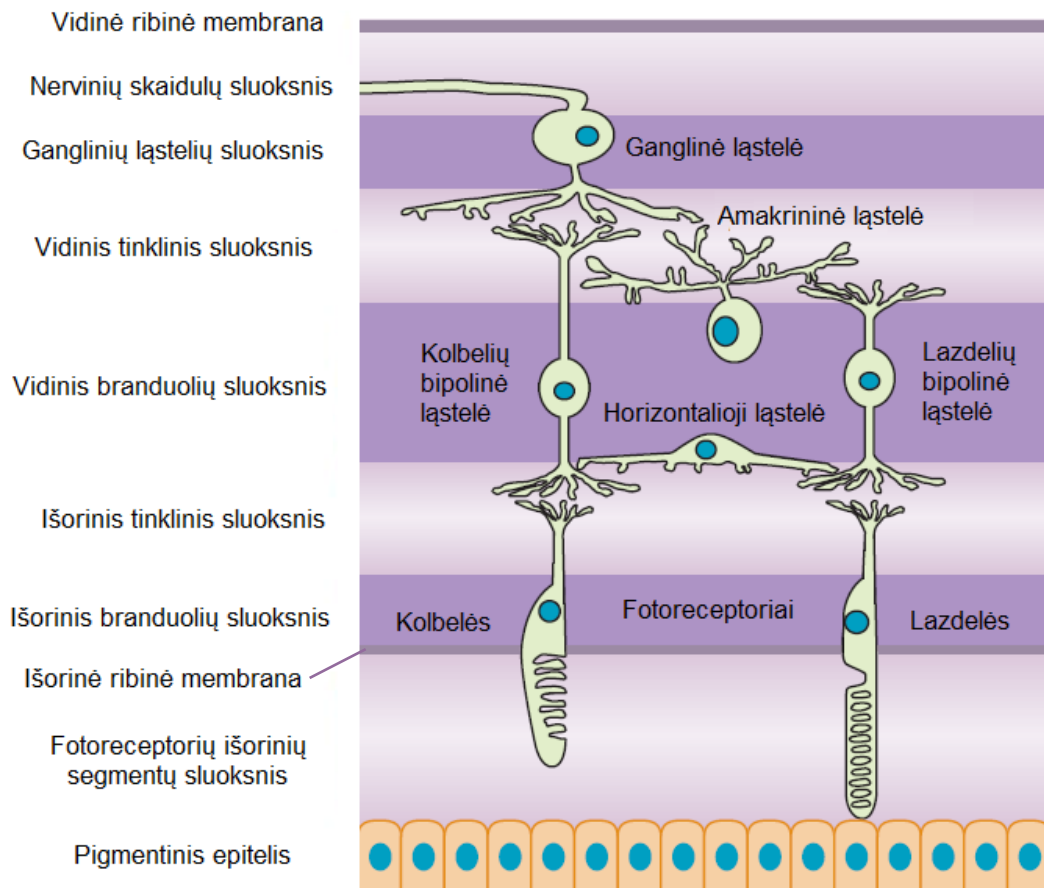
Akies obuolio vidinis dangalas iškloja akies obuolio kapsulę iš vidaus, šį dangalą sudaro tinklainė – plona ir skaidri smegenų audinio dalis. Tinklainė yra pati svarbiausia akies dalis, kadangi ją sudaro skirtingais sluoksniais išsidėsčiusios, šviesai jautrios nervinės ląstelės (1.4 pav.) (Stropus et al., 2005). Šios ląstelės atsakingos už tinkamą nervinio impulso perdavimą į regos nervą ir vėliau į smegenų dalis - šoninį kelinį kūną bei regos žievę. Fotoreceptoriai transdukcijos metu transformuoja šviesos fotonų energiją į nervinį impulsą, kuris toliau yra perduodamas į bipolines ląsteles. Jų aksonais nervinis signalas keliauja iki sinapsės, kur informacija perduodama ganglinių ląstelių dendritams. Šios ląstelės yra galutinė nervinio signalo apdorojimo stotelė tinklainėje ir ganglinių ląstelių aksonai sudarydami regos nervą perduoda informaciją smegenims (Forrester et al., 2016; Remington and Remington, 2012). Yra skiriamos dvi pagrindinės tinklainės dalys: išorinis pigmentinis ir vidinis neurosensorinis sluoksniai.

Tinklainės išorinis pigmentinis epitelis tai ištisinis kubinių/stulpelinių ląstelių viena sluoksnis audinys. Žmogaus akis turi apie 4.2 – 6.1 milijonų ląstelių. Jos skiriasi savo dydžiu ir forma, kurios priklauso nuo lokacijos tinklainėje ir amžiaus. Centrinėje tinklainės dalyje ląstelės yra stulpelinės formos, o periferijoje – kubinės (Kolb, 1995). Be to, geltonojoje dėmėje epitelio ląstelių diametras siekia apie 14 mikrometrų, o periferijoje esančių ląstelių diametras didėja net iki 60 mikrometrų. Savo basalinėje dalyje pigmentinio epitelio ląstelės jungiasi su gyslainėje esančia *Bruch'o* membrana, o apikalinėje – su lazdelių ir kolbelių išoriniais segmentais. Lateraliai šio audinio ląstelės jungiasi tarpusavyje tankiosiomis jungtimis (angl. *tight junctions*), sudarydamos išorinį kraujo-tinklainės barjerą (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). Išorinis pigmentinis epitelis atlieka daug svarbių funkcijų, kurios būtinos normaliam regėjimo procesui: fizinę, transportinę, metabolinę ir optinę. Jis dalyvauja neurosensorinės tinklainės adhezijos palaikyme; užtikrina selektyvų ir pralaidų medžiagų judėjimą tarp neurosensorinės tinklainės ir gyslainės; vykdo kolbelių ir lazdelių išorinių segmentų fagocitozę; sintetina interfotoreceptorinį matriksą; sugeria ir sumažina šviesos sklaidą akyje tokiu būdu gerindamas vaizdo skiriamąją gebą; transportuoja ir saugo metabolitus bei vitaminus (Forrester et al., 2016).

Vidinė neurosensorinė tinklainė yra plonas skaidrus nervinio audinio sluoksnis, kuriame šviesos stimulus virsta nerviniais impulsais. Šiame audinyje dominuoja keletu tipų nervinės ląstelės, tačiau jame taip pat galima rasti glijos, mikroglijos, vaskuliarinio epitelio ląstelių bei pericitų. Trys pagrindiniai neuronų ląstelių tipai, perduodantys šviesos generuojamus impulsus yra fotoreceptoriai, bipolinės ir ganglinės ląstelės, kurios taip pat turi sinapses su horizontaliosiomis ir

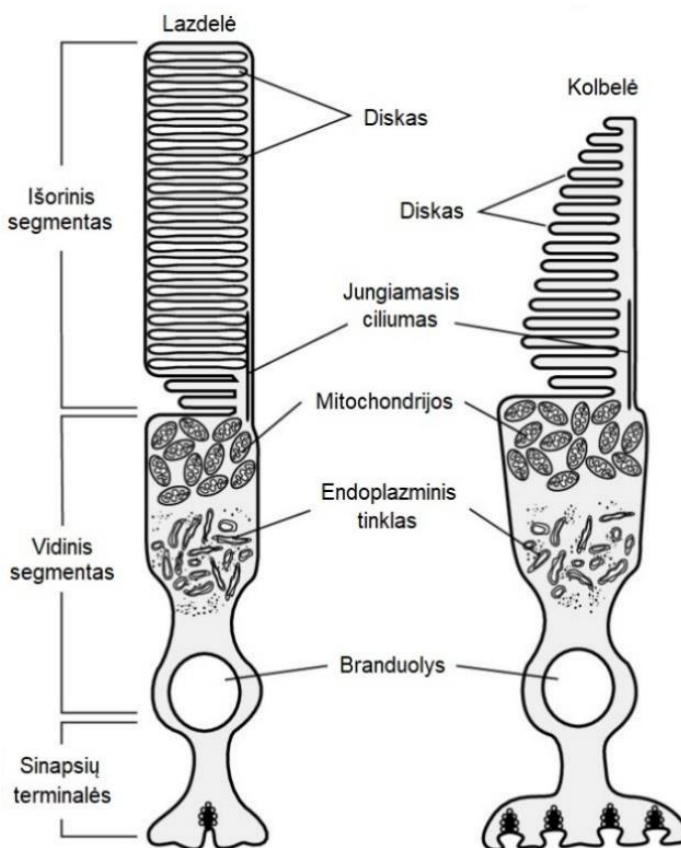
amakrininėmis ląstelėmis. Pastarųjų funkcija – nervinio signalo moduliacija (Kolb et al., 1992). Tinklainės ląstelės yra išsidėsčiusios organizuota tvarka, sudarydamos 8 skirtingus sluoksnius ir 2 ribines membranas (1.4 pav.) (Remington and Remington, 2012).

Tinklainės sluoksniai ir nervinių ląstelių tipai



1.4 pav. Tinklainės sluoksniai ir nervinių ląstelių tipai (Hartong et al., 2006).

Pirmąjį neurosensorinį tinklainės sluoksnį sudaro dviejų tipų fotoreceptorinės ląstelės – lazdelės ir kolbelės. Vidutiniškai viena žmogaus akis turi apie 115 milijonų kolbelių ir 6.5 milijonų lazdelių. Lazdelės yra atsakingos už regimo vaizdo kontrastą, ryškumą ir judėjimo suvokimą, o kolbelės prisideda prie erdvės ir spalvų suvokimo. Kiekviena receptorinė ląstelė turi išorinį ir vidinį segmentus, kurie sujungti kojele (1.5 pav.). Šiuos segmentus skiria išorinė ribinė membrana. Fotoreceptorių diskai yra sudaryti iš membranų, kuriose yra tankiai išsidėstę regos pigmentai konopsinas (kolbelės) ir rodopsinas (lazdelės) (Cote, 2006; Ding et al., 2015). Jie fotooksidacinės reakcijos metu šviesinį signalą verčia cheminiu. Tinklainės išorinių branduolių sluoksnį sudaro lazdelių ir kolbelių vidiniai segmentai, kuriuose išsidėsto organelės – branduolys, endoplazminis tinklas ir mitochondrijos (Forrester et al., 2016).



1.5 pav. Fotoreceptorių struktūra (Cote, 2006).

Nervinis impulsas sklisdamas fotoreceptorių kūnais pasiekia aksonus, kurie sinapsėmis susijungia su bipolinių ir horizontaliųjų ląstelių dendritais, sudarydami tinklainės išorinį tinklinį sluoksnį. Tinklainėje yra apie 35 milijonai bipolinių ląstelių, o pagrindinė jų funkcija yra perduoti nervinį signalą ganglinėms ląstelėms (Remington and Remington, 2012). Literatūroje galima rasti skirtingų bipolinių ląstelių klasifikacijų – pagal jungtis su kitomis tinklainės ląstelėmis, signalo perdavimo tipą ar morfologiją. Tinklainėje yra apie 11 morfologinių šių ląstelių tipų, jos skiriasi dendritinių ataugų skaičiumi ir fiziologinėmis savybėmis. Su kolbelėmis sinapsės sudaro 10 bipolinių ląstelių rūšių, o su lazdelėmis – viena (Ghosh et al., 2004). Bipolinės ląstelės signalo perdavimas gali būti dvejopas, kuris priklauso nuo fotoreceptorių atsako. Ląstelės, kurios gauna hiperpolarizuojantį atsaką, yra vadinamos įjungtomis (angl. *ON*), o depolarizuojantį – išjungtomis (angl. *OFF*) (Tsukamoto and Omi, 2017).

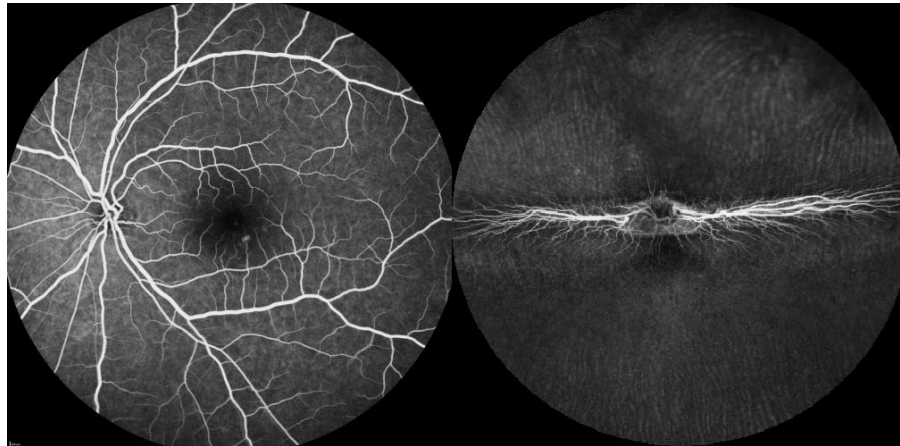
Vidinis branduolių sluoksnis sudarytas iš bipolinių ir horizontaliųjų ląstelių bei amakrininių ląstelių branduolių. Horizontaliosios ląstelės yra trijų tipų: HI, HII ir HIII (Forrester et al., 2016). Šios ląstelės turi vieną ilgą aksoną ir kelis trumpus dendritus su išsišakojančiomis terminalėmis. Horizontaliosios ląstelės sudaro sinapses su fotoreceptoriais, bipolinėmis ląstelėmis ir kitomis

horizontaliosiomis ląstelėmis. Jos perduoda nervinį impulsą išilgai tinklainės ir atlieka signalo integravimo funkciją sekretuodamos γ -aminobutirinę rūgštį (GABA), slopinantį neurotransmiterį (Remington and Remington, 2012). Amakrininės ląstelės – tai asociaciaciniai neuronai, kurie yra ovalios formos ir didesni už bipolines ląsteles. Jos pasižymi didele įvairove. Žmogaus tinklainėje yra daugiau nei 25 skirtingų šių ląstelių tipų, kurie skiriasi dendritinio medžio dydžiu, forma ir struktūra. Amakrininės ląstelės vidiniame tinkliniame sluoksnyje sudaro sinapses su bipolinėmis ir ganglinėmis ląstelėmis. Svarbiausia amakrininių neuronų funkcija yra į ganglines ląstelės siunčiamų nervinių impulsų moduliacija (MacNeil and Masland, 1998).

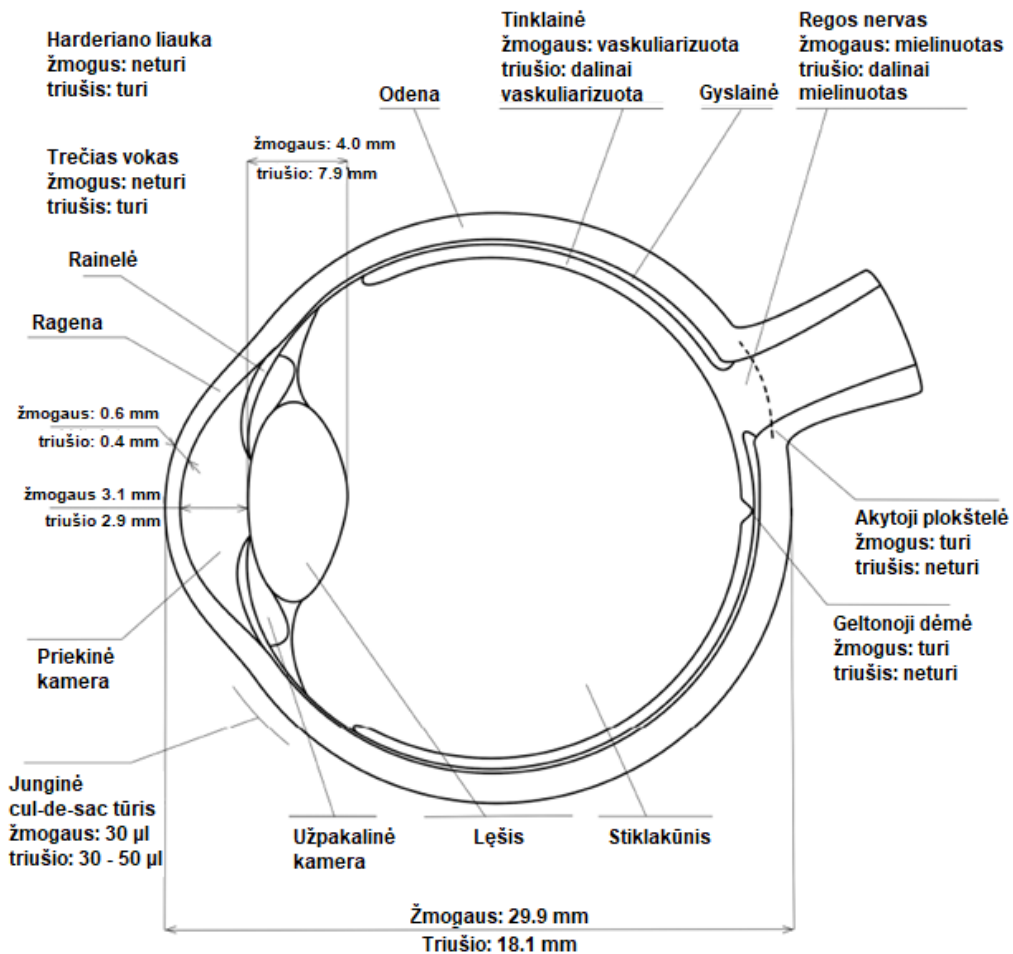
Tinklainės ganglinių ląstelių sluoksnyje išsidėsto gangliniai neuronai, kurių aksonai sudaro nervinių skaidulų sluoksnį, o dendritai pereina į vidinį tinklinį sluoksnį. Ganglinės ląstelės yra paskutinis tinklainės neuroninis komponentas dalyvaujantis regėjimo procesuose. Jos yra klasifikuojamos pagal dydį, dendritų skaičių, dendritinių terminalių orientaciją ir dendritinį išsišakojimą (Remington and Remington, 2012). Didelės ląstelės su retu dendritiniu medžiu dalyvauja greitame atsake ir siejamos su judesio detektavimu, o mažesnės ląstelės su retesniu dendritiniu medžiu atsako už vaizdo ryškumą. Kiekviena ganglinė ląstelė turi vieną aksoną, kuris sinapsėse išskiria glutamatą. Regos diske aksonai susilieja ir sudaro regos nervą, kuris gumbure jungiasi su šoninio kelinio kūno neuronų dendritais (Curcio and Allen, 1990).

1.1.4 Triušio ir žmogaus akies sandaros skirtumai

Triušiai turi gana didelę akį, kuri anatomiškai daugeliu atveju yra artima žmogaus akiai. Žmogus ir triušis turi panašų akies obuolio dydį, akispūdį ir vidinę struktūrą bei biochemines ir biomechanines ypatybes. Nepaisant panašumų triušio ir žmogaus akys turi ir skirtumų, į kuriuos yra svarbu atkreipti dėmesį dirbant su triušių oftalmologinių ligų modeliais (1.7 pav.). Skirtingai nei žmogaus, triušio akies priekinis segmentas yra didesnis ir lęšis užima daugiau vietos, todėl atsiranda rainelės ir priekinės kameros išgaubtumas. Be to, triušio akis turi Harderiano liauką, kurios pagrindinė funkcija yra drėkinant akį sumažinti mirksėjimo dažnį. Taip pat triušio akyje visas regos nervas yra padengtas mielino dangalu ir joje nėra geltonosios dėmės (Zernii et al., 2016). Vienas svarbiausių žmogaus ir triušio akies tinklainės skirtumų yra jos vaskuliarizacija. Žmogaus tinklainė, kaip šuns ar katės, yra holangiotinė (angl. *holangiotic*), kai kraujagyslės tolygiai padengia tinklainę. Triušio tinklainė yra merangiotinė (angl. *merangiotic*), nes išeinančios iš regos nervo kraujagyslės kartu su mielino padengtais nervais šakojasi tik į medialinę ir lateralinę puses (1.6 pav.).



1.6 pav. Žmogaus ir triušio akies dugno FA nuotraukos. Žmogaus tinklainėje kraujagyslės pasiskirsčiusios po visą tinklainę, o triušio – į lateralinę ir medialinę puses (autoriaus nuotrauka).



1.7 pav. Pagrindiniai triušio ir žmogaus akies skirtumai. Lyginant žmogaus ir triušio akis išryškėja struktūrų dydžių skirtumai ir tinklainės vaskuliarizacijos laipsnis. Taip pat triušio akis skirtingai nei žmogaus turi Harderiano liauką, nikuojančią membraną ir akytąją plokštelę (angl. *lamina cribosa*), tačiau triušio tinklainėje nėra geltonosios dėmės (Zernii et al., 2016).

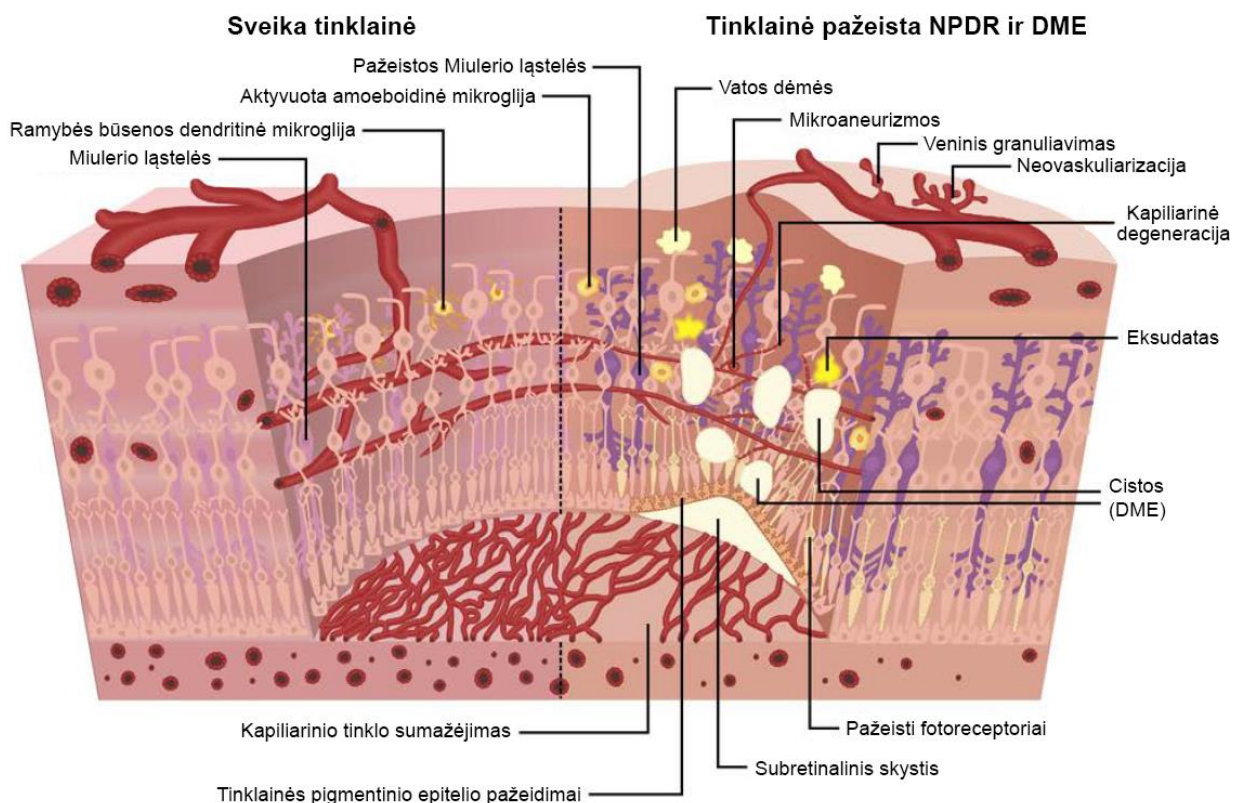
1.2 Diabetinė retinopatija

Pasaulyje DR yra dažniausia cukrinio diabeto komplikacija, kuri 2010 m. duomenimis pasireiškia apie 130 mln. žmonių. Ilgėjant žmonių gyvenimo trukmei bei didėjant diabetinių susirgimų skaičiui yra manoma, kad 2030 m. globaliai DR sergančių žmonių skaičius išaugs iki 191 mln. (Zheng et al., 2012). Beveik visiems asmenims, kuriems diagnozuojamas I tipo cukrinis diabetas praėjus 20 metų po diagnozės išsivystys tam tikro laipsnio diabetinė retinopatija, o II tipo diabetui šios komplikacijos tikimybė po 20 metų yra 80% (Stitt et al., 2016). Tačiau svarbu paminėti, jog ne kiekvienam individui sergančiam DR išsivystys dalinis ar visiškas aklumas. Regos praradimas pasireiškia pažengusioje ligos stadijoje, kai ši progresuoja į diabetinę geltonosios dėmės edemą (DME) ir proliferacinę diabetinę retinopatiją (PDR) (Heintz et al., 2010). Nepaisant pasaulyje augančio diabetinių susirgimų skaičiaus, su DR susijęs aklumas išsivysčiusiose šalyse sumažėjo. Šis rezultatas buvo pasiektas investuojant finansinius ir žmogiškuosius resursus į ankstyvą ligos diagnozę bei fundamentaliuosius ir farmacinius tyrimus (Sabanayagam et al., 2016).

Svarbus veiksnys DR gydyme ir ligos progresavimo sustabdymui yra ankstyva diagnozė. Vienas akivaizdžiausių DR simptomų yra mikrovaskuliarinių pakitimų pasireiškimas tinklainėje, sergant cukriniu diabetu tai yra vienas pagrindinių kriterijų diagnozuojant DR. Ligos diagnostiką palengvino naujos fluoresceino angiografijos (FA) ir plataus spektro lauko (angl. *ultra-wide field*) vaizdinimo procedūros, kurių metu gaunamos detalios tinklainės ir jos kraujagyslinio tinklo nuotraukos (Duh et al., 2017). Verta paminėti, jog diabeto sukelti pokyčiai pažeidžia ne vien tik endotelio ir kraujagyslių, bet ir tinklainės nervines bei glijos ląsteles. Tai leidžia DR diagnostikoje kaip ligos biomarkerį naudoti optinės koherentinės tomografijos (OKT) metodą, kurio galima įvertinti tinklainės nervinio audinio struktūrinius pokyčius (Shin et al., 2012). Dešimtmečius atliekami DR patofiziologiniai tyrimai bei naujų diagnostikos ir gydymo metodų paieška padėjo sukaupti žinių apie ligos simptomatiką ir patologinius mechanizmus. Tačiau šios ligos patologinių mechanizmų kompleksškumas ir biocheminis bei molekulinis jų veikimas išlieka vienas didžiausių iššūkių kuriant pažangius vaistus (Heng et al., 2013).

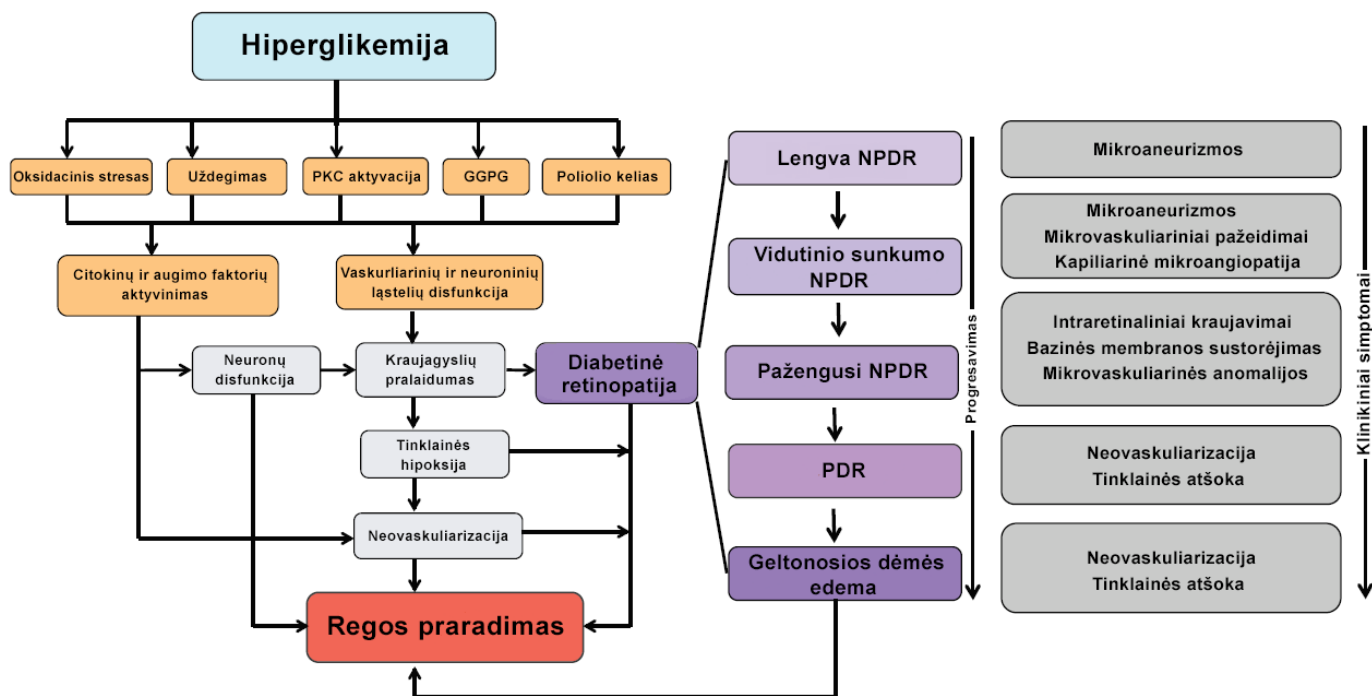
1.2.1 Diabetinės retinopatijos etiologija ir patogenezė

Dešimtmečius atliekami DR patofiziologiniai ir naujų gydymo metodų paieškos tyrimai padėjo teorinius pamatus šios ligos procesų supratimui. DR būdinga sudėtinga biocheminių ir metabolinių pokyčių, tokių kaip oksidacinis stresas bei skirtingų fermentų ir baltyminių signalo perdavimo kelių, sąveika. Kadangi tinklainė yra metaboliškai aktyvus audinys, kuriam reikia didelio kiekio deguonies, ši sąveika sutrikdo aprūpinimą deguonimi ir sukelia patologinius bei funkcinis pakitimus tinklainės ląstelėse (Arden and Sivaprasad, 2012; Heng et al., 2013). Atlikus tinklainės kraujagyslių *post mortem* žmogaus akies histologinius tyrimus buvo matomas vaskuliarinės bazinės membranos sustorėjimas bei pericitų ir endotelio ląstelių nekrozė. Taip pat DR pažeistai tinklainei būdinga (1.8 pav.) neovaskuliarizacija, intraretinaliniai kraujavimai, mikroaneurizmos, venų diametro pakitimai, cistų formavimasis, mikroglijos aktyvacija, kapiliarinio tinklo pokyčiai bei tinklainės neuronų ir astrocitų nekrozė (Duh et al., 2017; Ljubimov et al., 1996).



1.8 Pav. Sveikos ir neproliferacinės diabetinės retinopatijos bei diabetinės geltonosios dėmės edemos pažeistos tinklainės ląstelių struktūrų palyginimas (Duh et al., 2017).

Be to, DR turi panašumų su lėtinėmis uždegiminėmis ligomis: pagrindiniai jos simptomai yra padidėjęs kraujagyslių pralaidumas, edemos, uždegiminių ląstelių infiltracija, audinių nekrozė ir priešuždegiminių citokinų bei chemokinų ekspresija. Padidėjusi vazoaktyviųjų faktorių ir citokinų ekspresija atlieka svarbų vaidmenį vykstant struktūriniais ir funkciniais tinklainės pokyčiams. Neseniai atliktų eksperimentinių DR studijų rezultatai rodo, kad uždegimas yra svarbus veiksnys ankstyvosiose DR patogenezės stadijose (Wirotko et al., 2008). 1.9 pav. struktūrinėje schemoje vaizduojami ligos vystymosi etapai. DR yra daugiafunkcinė liga, apimanti kelis patologinius mechanizmus, tarp jų padidėjusį oksidacinį stresą, uždegimą, poliolio kelią, kuris sukelia sorbitolio kaupimąsi, glikacijos galutinių produktų gamybą (GGPG) ir baltymo kinazės C (PKC) kelio aktyvavimą. Šie signaliniai keliai gali aktyvuoti citokinų ir daugelio vazoaktyviųjų faktorių, tokių kaip kraujagyslių endotelio augimo faktorius (VEGF) ir pigmento epitelio faktorius (PEDF) gamybą. Šie baltymai yra esminiai vykstant DR struktūriniais ir funkciniais pokyčiams. Kliniškai reikšminga DME gali pasireikšti vėlyvose DR neproliferacinėse arba proliferacinėse retinopatijos stadijose ir yra dažniausia regėjimo praradimo priežasčių (Robinson et al., 2012).



1.9 pav. Struktūrinė schema vaizduojanti veiksnius, kurie susiję su DR patogenezė, ir klininius simptomus, kurie yra pastebimi įvairiuose DR etapuose (Robinson et al., 2012).

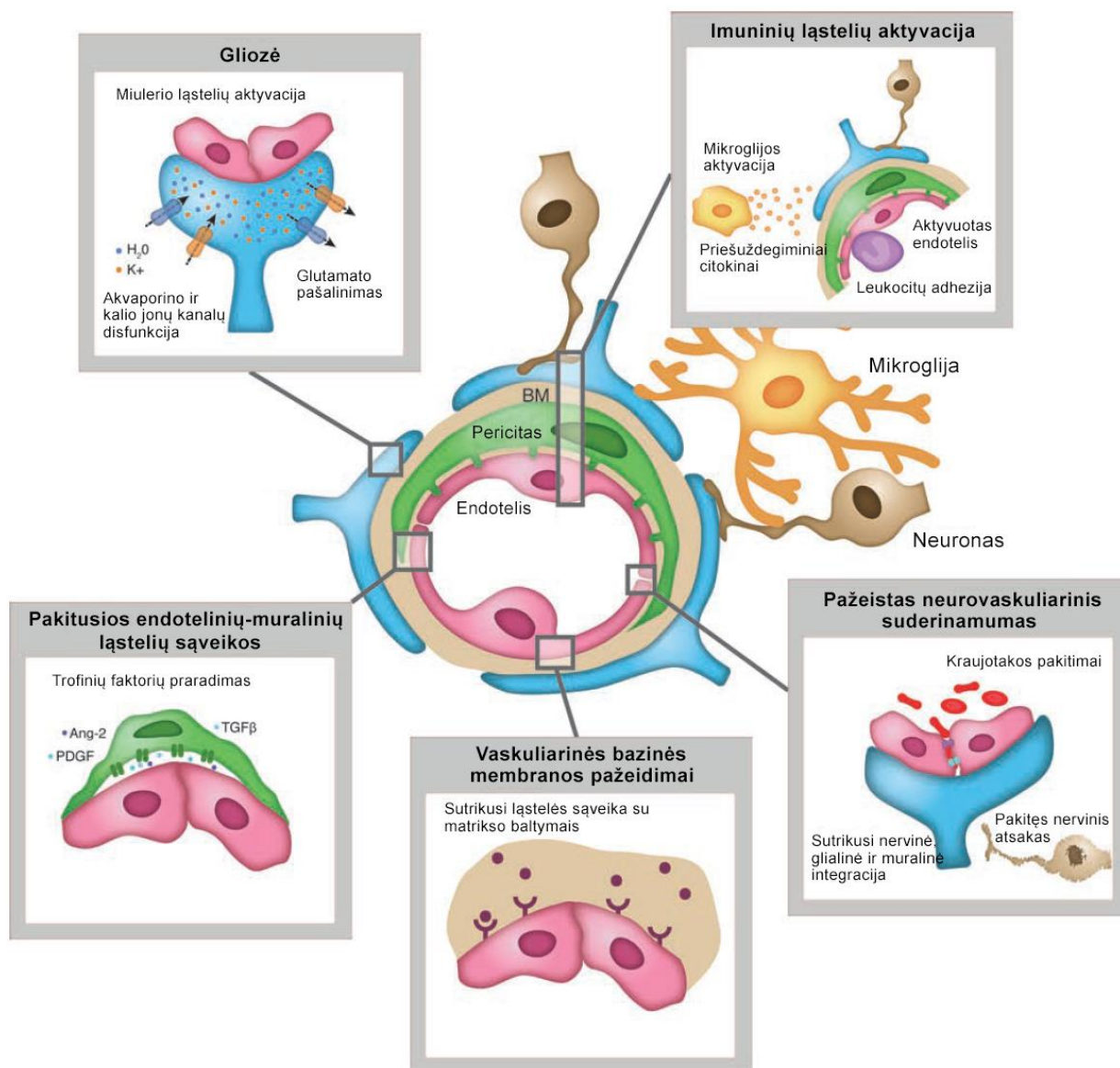
1.2.2 Tinklainės nervinio audinio patogenėzė

Šiuo metu DR nebelaikoma vien tiktai mikrovaskuliarine liga, nauji molekuliniai ir ląsteliniai tyrimų metodai bei patobulėjusios tinklainės vaizdinimo procedūros suteikė galimybių suprasti patologinius pakitimus vykstančius akies tinklainėje. Pavyzdžiui, sergant diabetu, optinės koherentinės tomografijos studijų metu pastebėtas vidinių tinklainės nervinių ląstelių sluoksnių diametro sumažėjimas, o atlikus molekulinis tyrimus rastos didesnės angiogeninių citokinų koncentracijos kraujyje. Todėl aiškinantis DB mechanizmus ypatingas dėmesys skiriamas neurovaskuliarinio vieneto (angl. *neurovascular unit*) patofiziologijai, kurią sukelia mikrovaskuliarinių ir neuroninių elementų sąveikos (1.10 pav.) (Duh et al., 2017; Simó et al., 2018). Neurovaskuliarinį vienetą sudaro skirtingų tipų neuroninės ląstelės (horizontaliosios, bipolinės, ganglinės ir amakrininės ląstelės), glija (Mulerio ląstelės ir astrocitai), imuninės ląstelės (mikroglija ir perivaskuliariniai makrofagai) ir vaskuliarinės ląstelės (endotelio ląstelės ir pericitai) (Gardner and Davila, 2017). Tinklainėje visos šios ląstelės yra glaudžiai susijusios ir palaiko vidinio kraujo-tinklainės barjero vientisumą, reguliuodamos kraujotaką atsižvelgiant į metabolinius audinio poreikius. Šių reguliacinių mechanizmų pokyčiai yra viena pagrindinių DB atsiradimo priežasčių (Simó et al., 2018).

Tinklainė pasižymi aukštu metaboliniu aktyvumu, todėl ji yra jautri deguonies pokyčiams. Vidinė tinklainės dalis turi retesnę kraujagyslių tinklą lyginant su išorine, kuri yra aprūpinama krauju su deguonimi iš gyslainės (Heng et al., 2013). Tinklainėje didžiąją dalį deguonies ir energijos sunaudoja neuronai, ypatingai adaptacijai tamsoje ir neurotransmiterių signalo perdavimui. DR metu esant nepakankamam energetiniam aprūpinimui neuronuose sutrinka glutamaterginis bei dopaminerginis signalo perdavimas, sumažėja dendritų skaičius ir sinapsinių baltymų ekspresija (Gardner and Davila, 2017). Taip pat diabetinių ligų gyvūnų modeliuose pasireiškė tinklainės ganglinių ir amakrininių ląstelių apoptozė (Barber et al., 1998). Be to, tinklainės neuroninės struktūros gali išskirti molekules, pvz. semaforiną 3A, kurios prisideda prie vidinio kraujo-tinklainės barjero suardymo (Cerani et al., 2013).

DR paveikia glijos ląsteles, sutrinka Mulerio ląstelių ir astrocitų homeostazinės funkcijos, kurios reguliuoja tinklainės kraujotaką, palaiko vandens balansą neuroninėje parenchimoje ir tinklainės-kraujo barjero vientisumą (Bringmann and Wiedemann, 2012). Taip pat glijos ląstelėse yra sutrikdomas glutamato-glutamino interkonversinis ciklas ir kalio kanalų reguliacija (Gardner and Davila, 2017). Kitas svarbus faktorius DB progresavime yra padidėjusi imuninių mikroglijos ląstelių gaminamų uždegiminių citokinų ir augimo faktorių ekspresija. Pavyzdžiui, kraujagyslių

endotelio augimo faktorius (angl. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) yra priešūždegiminis peptidas, kurio pagrindinė funkcija yra didinti tinklainės kraujagyslių pralaidumą. Manoma, kad VEGF atlieka svarbų vaidmenį ir DR bei DME patogenezėje. DME pacientams, kurie buvo gydomi antiangiogeniniais vaistais sumažėjo kraujagyslių pralaidumas bei kapiliarių išemija (Duh et al., 2017).



1.10 Pav. Neurovaskulinio vieneto pokyčiai DR metu. Pilkuose kvadratuose vaizduojami patologiniai ląsteliniai pokyčiai skirtingose audinio vietose, kurie kartu lemia neurovaskuliarinius ir kraujo-tinklainės barjero pažeidimus (Duh et al., 2017).

1.3 Diabetinės retinopatijos gyvūnų modeliai

Tyrimai su laboratoriniais gyvūnais ir jų DR modelių vystymas reikšmingai prisideda prie šios būklės etiologijos ir progresavimo supratimo bei naujų vaistų testavimo. DR yra kompleksinė liga, kurią lemia genetiniai ir aplinkos veiksniai, todėl yra kuriami panašūs gyvūnų modeliai atsižvelgiant į šiuos veiksnius. Modeliai gali būti kuriami genetinėmis mutacijomis arba juos indukuojant. Indukcija atliekama vaistais, operacijomis, dieta, cheminėmis medžiagomis ir lazerio pagalba. Genetiniai modeliai kuriami naudojant selektyvų veisimą ir genų redagavimo įrankius. Iki šiol DR tyrimuose naudojamos įvairios gyvūnų rūšys, įskaitant peles, žiurkes, triušius, šunis, kates, kiaules ir nežmoginius primatus (Olivares et al., 2017; Robinson et al., 2012). Dažniausiai DR modeliams yra naudojamos pelės ir žiurkės, kadangi su jomis yra patogiau dirbti dėl jų mažo dydžio, greito veisimosi ir galimybių naudoti genetiškai išvestas linijas, kurios pasižymi paveldima hiperglikemija ir nutukimu (Pearson et al., 2016). Pastaruoju metu yra plačiau taikomi transgeniniai ir „*knockout*“ pelių modeliai, kurie leidžia tirti molekulinis kelius dalyvaujančius DR patologijoje (Robinson et al., 2012). Visgi, kitų rūšių gyvūnų, pavyzdžiui triušių, šunų ar primatų akies sandara yra struktūriškai panašesnė į žmogaus. Todėl šių gyvūnų DR modeliai pasižymi morfologiškai žmogui panašesniais tinklainės ir kraujagyslių pažeidimais, dėl to jie kartais naudojami kaip alternatyva graužikų modeliams (Olivares et al., 2017).

1.3.1 Triušio DR modeliai

Triušiai oftalmologiniuose tyrimuose buvo pradėti naudoti dėl akies panašumų su žmogumi. Taip pat dėl jų paklusnumo ir didesnių akių su jais yra lengviau atlikti eksperimentines procedūras (Zernii et al., 2016). Triušiai pasižymi ilgesne gyvenimo trukme nei pelės ar žiurkės, todėl jie yra tinkamesni ilgalaikiams tyrimams, kurie ypač aktualūs DR tyrimuose, kadangi ši liga vystosi ilgus metus. DR simptomai triušiams gali būti sukeliama farmakologiškai streptozotocinu ir VEGF arba specialia cukrozės dieta. Streptozotocinas naikina kasoje esančias β tipo ląsteles ir sukelia I tipo diabetą. Vienas iš šio modelio trūkumų yra didelė retinopatogenezės variacija. 19 savaitę po streptozotocino injekcijų 50% triušių išryškėjo proliferacinė retinopatija, 40% stiprūs tinklainės ir kitų akies dalių kraujavimai, likusiems 10% pasireiškė nedidelė vaskulopatija. Kitas metodas indukuoti DB triušiuose yra injekuojant vaskuliarinį endotelio augimo faktorių į stiklakūnį. Šis modelis pasižymi greitu veikimu ir jau pirmąją savaitę yra pastebimi kraujavimai ir neovaskuliarizacija. Tačiau antrą savaitę tinklainė pradeda gyti savaime, manoma, kad to priežastis yra VEGF kiekio sumažėjimas iki normos ribų (Lai and Lo, 2013).

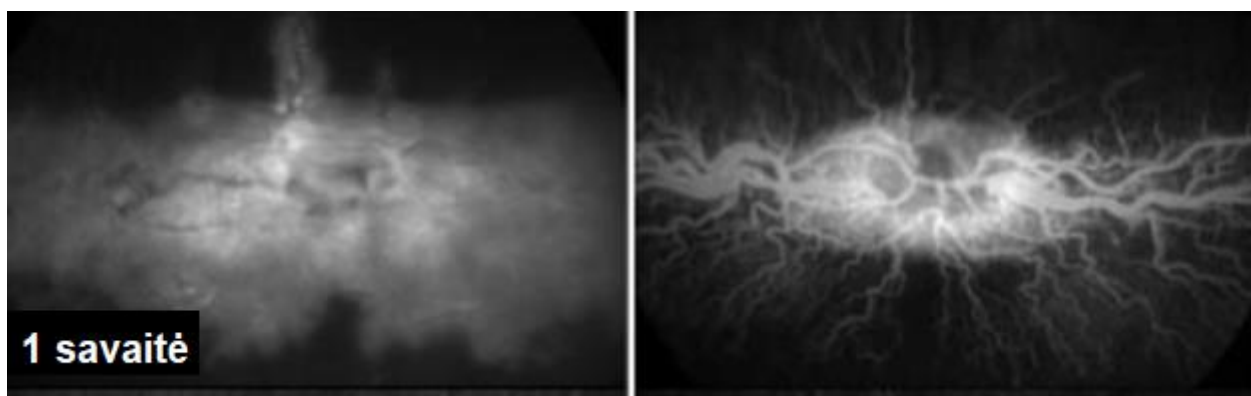
1.3.2 Streptozotocinas

Streptozotocinas arba aloksanas yra dažniausiai naudojamos cheminės medžiagos indukuoti DR modeliui gyvūnuose. Šios medžiagos sunaikina kasoje esančias β tipo ląsteles, kurios sintezuoja insuliną tokiu būdu sukeldami I tipo diabetą (Robinson et al., 2012). Cheminės indukcijos metodas atkuria ankstyvuosius DR simptomus: tinklainės pericitų ir kapiliarų praradimą, vaskuliarinės bazinės membranos sustorėjimą, kraujagyslių okliuziją ir padidėjusį jų pralaidumą (Cai and McGinnis, 2016). Streptozotocino modelyje fiziologiniai ir biocheminiai pokyčiai žiurkių tinklainėje pradeda ryškėti praėjus 1-2 mėnesiams po hiperglikemijos pradžios, o diabeto sukeliama neuroniniai ir glijos ląstelių pokyčiai pastebimi dar anksčiau (Robinson et al., 2012). Vis dėlto, šis modelis pasižymi variacija tarp individų. Po 8 mėnesių *Lewis* žiurkėse buvo matomas tinklainės kapiliarų ir ganglinių ląstelių praradimas, *Wistar* linijoje pastebėti tik neurovaskuliariniai pokyčiai be neurodegeneracijos, o *Sprague Dawley* individuose nebuvo jokių tinklainės audinio pakitimų (Kern et al., 2010). Indukuoti modeliui triušiuose bei primatuose yra naudojami vienos streptozotocino dozės protokolai, o patologiniai pokyčiai išryškėja 5 mėnesiai po injekcijos (Drago et al., 1998).

1.3.3 Kraujagyslių endotelio augimo faktorius (VEGF)

VEGF yra dimerinis signalinis baltymas, kuris žinomas dėl savo didelio potencialo skatinti endotelio ląstelių augimą, taip sukeldamas sveiką arba pataloginę neovaskuliarizaciją ir padidindamas kapiliarinių kraujagyslių pralaidumą (Miller, 1997). VEGF ekspresuojamas daugelyje skirtingų ląstelių, įskaitant navikines ląsteles, makrofagus, trombocitus, keratinocitus ir inkstų mezangialines ląsteles. VEGF neapsiriboja vien tik kraujotakos sistema, taip pat jis atlieka svarbų vaidmenį kituose fiziologiniuose procesuose – kaulų formavime, hematopoezėje ir žaizdų gijime (Duffy et al., 2013). Patologinė VEGF baltymo ekspresija ir jo sukelta padidėjusi angiogenezė yra vieni pagrindinių faktorių daugelio ligų patogenezėje, tarp jų ir diabetinės retinopatijos (Sydorova and Lee, 2005). Proliferacinės retinopatijos modelis gyvūnuose taikant VEGF gali būti sukiamas naudojant transgeninius gyvūnus ir atliekant jiems genetines modifikacijas arba injekuojant VEGF gyvūnui tiesiogiai į akies struktūras (Lai and Lo, 2013). Praktikoje dažnai naudojamas Kimba (trVEGF029) transgeninių pelių neovaskuliarizacijos modelis. Šios pelės pasižymi padidėjusia VEGF₁₆₅ geno ekspresija rodopsiną ekspresuojančiose ląstelėse. Šiam modeliui būdingas tinklainės ganglijinių ląstelių, vidinio branduolių ir išorinio branduolių sluoksnių suplonėjimas, taip pat mikroaneurizmos, intraretinalinės mikrovaskuliarinės anomalijos bei kapiliarinė angiogenezė (Eeden et al., 2006). VEGF modelis naudojamas ir

triušiuose bei kiaulėse, nes šių gyvūnų rūšių akies anatomija struktūriškai yra artima žmogui (Badaro et al., 2014). Ameri et al., 2007 tyrime intravitrealinė VEGF injekcija po 7 dienų triušiuose sukėlė disko hiperemiją, kraujagyslių išsiplėtimą ir vaskuliarinį nuotėkį (1.11 pav.). Taip pat tyrimo rezultatai parodė, jog ankstyvos intravitrealinės antivaskuliarinių vaistų injekcijos gali sustabdyti patologinius procesus inaktyvuodami receptorių ir sumažindami VEGF koncentraciją (Ameri et al., 2007).



1.11 pav. Triušių akies dugno fluoresceino angiografijos nuotraukos. Kairėje pusėje matome nuotrauką triušio, kuriam buvo suleista VEGF injekcija, o dešinėje – kontrolinę grupę (Ameri et al., 2007). VEGF grupėje matomas tinklainės kraujagyslinis nuotėkis (angl. *vascular leak*).

1.3.4 VEGF veikimo mechanizmas

Vienas pagrindinių PDR simptomų yra tinklainės ląstelių hipoksija, kuri lemia VEGF koncentracijos padidėjimą ląstelėse. (Ferrara, 2004). VEGF yra sintezuojamas išeminių tinklainės ląstelių, ir difuzijos būdu pasiekia tinklainės vaskuliarinio epitelio ląsteles. Šios ląstelės savo paviršiuje ekspresuoja keletą tipų VEGF tirozino kinazės receptorių. VEGFR-2 receptorių yra vienas pagrindinių angiogeninių mediatorių, kuris didina kraujagyslių pralaidumą (Wu et al., 2019). VEGF prisijungia prie VEGFR-2 receptoriaus ir lemia VEGF dimerizaciją bei tarpląstelių tirozino liekanų autofosforilinimą. Šie procesai aktyvuoja signalo perdavimą, kuris sukelia endotelio proliferaciją ir migraciją, transkripcijos aktyvaciją bei padidina kraujagyslių pralaidumą (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Tinklainės išemijos gyvūnų modelių tyrimai rodo koreliaciją tarp VEGF mRNA koncentracijos padidėjimo vandeningame humoraliniame skystyje ir tinklainės neovaskuliarizacijos. Šiuose modeliuose VEGF inaktyvacija atitinkamai sumažina ir tinklainės neovaskuliarizaciją, todėl antivaskuliariniai vaistai yra vienas efektyvesnių būdų stabdant PDR patogenezę (Miller et al., 1994; Wu et al., 2019)

1.3.5 DR gydymas anti-kraujagyslių endotelio augimo faktoriais

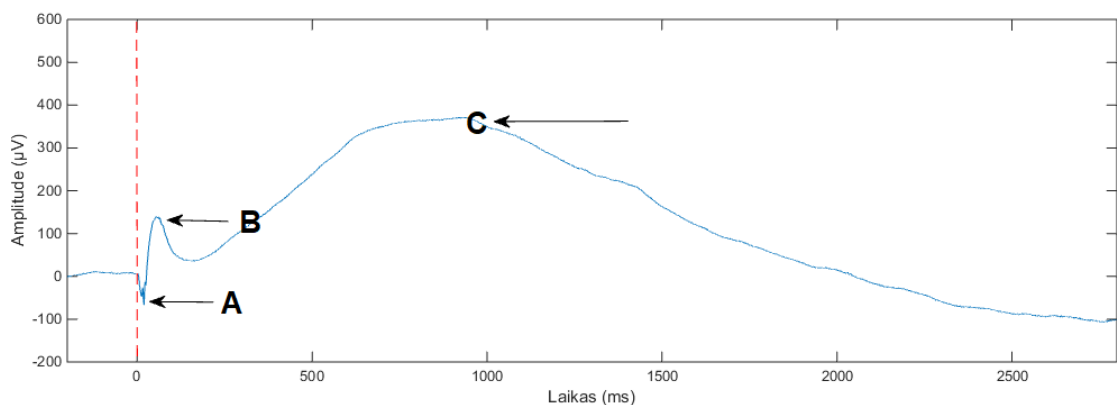
Vienas didžiausių iššūkių tinklainės neovaskuliarinių ligų gydyme išlieka naujų terapinių metodų ir farmakologinių vaistų kūrimas. „The American Journal of Pathology“ 1994 m. išspausdintas straipsnis apie VEGF vaidmenį angiogenezės procesuose atvėrė naują vaistų kūrimo etapą tinklainės neovaskuliarizacijai gydyti. Buvo pradėti tyrimai su medžiagomis, stabdančiomis VEGF veikimą. Pirmoji medžiaga naudota VEGF neutralizacijai buvo medikamentas bevacizumabas (Avastin), humanizuotas anti-VEGF antikūnas, kuris stabdo visų VEGF izoformų veikimą (Kim and D’Amore, 2012). Pradžioje šiuo preparatu buvo gydomos pažengusios vėžio formos (Gordon et al., 2001), kiek vėliau oftalmologai pradėjo injekuoti šį vaistą į stiklakūnio ertmę amžinės geltonosios dėmės degeneracijos pacientams. Intravitrealinės bevacizumabo injekcijos pagerino regėjimo funkciją su minimaliais šalutiniais poveikiais (Rosenfeld et al., 2005). Vėliau kaip alternatyva šiam vaistui buvo sukurtas ranibizumabas. Ši medžiaga turėjo efektyviau difunduoti per tinklainės audinius į gyslainę lyginant su bevacizumabu, tačiau atlikti tyrimai parodė, kad šios dvi glaudžiai susijusios molekulės turi tokį patį klinikinį efektyvumą (CATT Research Group et al., 2011). Po keleto metų įmonė „Regeneron Pharmaceuticals“ sukūrė baltymą (afliberceptas), kurį sudaro antrinis VEGF 1 receptoriaus bei tretinis VEGF 2 receptoriaus imunoglobulino domenai ir žmogaus IgG1 fragmentinis kristalizuojamasis regionas (angl. *fragment crystallizable region*) (Holash et al., 2002). Dėl ypatingos struktūros afliberceptas pasižymi apie 100 kartų didesniu afiniškumu nei bevacizumabas ir ranibizumabas. Manoma, kad efektyvesnė aflibercepto farmakokinetika sumažina dozavimo dažnį pacientams, o vaisto veiksmingumas išlieka nepakitęs (Kim and D’Amore, 2012).

1.4 DR modelių charakterizavimas

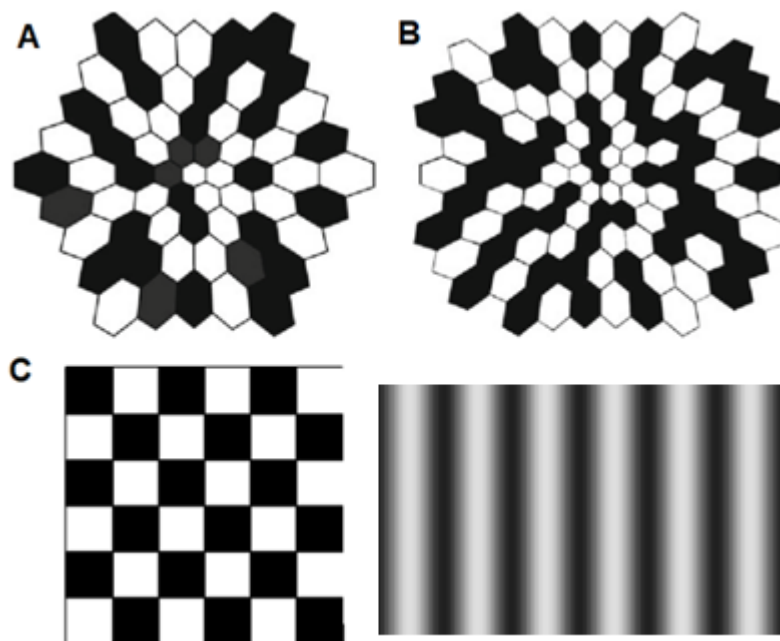
Visų pirma, norint eksperimentiškai tirti ir aprašyti DR yra labai svarbu naudoti tinkamus tyrimo metodus ligos gyvūnų modeliams analizuoti. Eksperimento metu po perfuzijų surinktos akys gali būti įvertintos įvairias histologiniais metodais, jog būtų galima išsamiai ištirti tinklainės ir kraujagyslinius audinių pokyčius. Be to, galima tirti norimų genų ir baltymų ekspresiją gyvūno akyje naudojant įvairius molekulinis ir biocheminius metodus, tokius kaip kiekybinis PGR, „microarray“ ir „western blotting“ analizė. Tyrimo metu gyvūnams esant gyviems atliekamos in-vivo vaizdinimo procedūros (akies dugno fotografija (FP), fluoresceino angiografija (FA) ir optinė koherentinė tomografija (OKT) vizualiam tinklainės ir kraujagyslių tinklo įvertinimui. Taikant elektrofiziologinius metodus (pvz. multifokalinę ir šabloninę elektroretinografiją) galima įvertinti įvairių tinklainės ląstelių elektrinių atsakų stiprumą (Lai and Lo, 2013; Robinson et al., 2012).

1.4.1 Elektrofiziologija

Tinklainės audinio elektrofiziologiniai tyrimai yra metodas neinvaziškai įvertinti regėjimo funkcijas gyvūnų modeliuose. Dažniausiai naudojami metodai yra blyksnio elektoretinografija (fERG), šabloninė ERG (pERG), multifokalinė ERG (mfERG) ir regėjimo stimuliacijos sukelti potencialai (Robinson et al., 2012). Elektoretinografijos metodas išmatuoja įvairių ląstelių tipų elektrinį atsaką tinklainėje, įskaitant fotoreceptorius (lazdeles ir kolbeles), vidines tinklainės ląsteles (bipolines ir amakrinines) ir ganglines ląsteles. fERG bangą sudaro trys pagrindiniai komponentai (1.12 pav.). Pradinis neigiamas bangos įlinkis vadinamas a banga, tai fotoreceptorinių ląstelių atsakai. Vėlesnis kilimas link teigiamos amplitudės viršūnės vadinamas b-banga, kurią sukelia signalai iš bipolinių ląstelių. Paskutinį komponentą, c bangą, sudaro krūvio kitimas tinklainės pigmentinio epitelio ląstelėse (Belusic, 2011). Pagrindiniai ERG komponentų parametrai yra: atsako pradžios latencija (praėjęs laiko tarpas nuo stimulo pradžios iki atsako pradžios), piko latencija (praėjęs laikas tarp stimulo pradžios ir atsako piko) bei amplitudė (pvz. įtampos bangos) (Pescosolido et al., 2015). Šabloninė ir multifokalinė ERG skiriasi eksperimento metu naudojamais metodikų protokolais ir stimulais. mfERG stimulus yra heksagoninių elementų matrica, kurioje kiekvienas iš šių heksagonu keičia savo spalvą tarp baltos ir juodos pasirinkto dažnio atsitiktine seka (Dettoraki and Moschos, 2016). Šabloninės ERG metu yra registruojamas atsakas tik iš tinklainės ganglinių ląstelių (Bach et al., 2013). 1.13 pav. pavaizduoti mfERG ir pERG naudojami stimulai. Tinklainės elektrinių potencialų atsakų pokyčiai yra vienas pirmųjų DR pasireiškimo požymių. Tyrimai rodo, kad elektrofiziologiniai pakitimai įvyksta anksčiau negu vaskuliariniai (Kohzaki et al., 2008). ERG tyrimai su gyvūnais parodė sumažėjusias a ir b bangų amplitudes bei padidėjusią piko latenciją (Robinson et al., 2012).



1.12 Pav. Triušio fERG signalas. fERG sudaro 3 bangas: a-banga, b-banga ir c-banga (autorius nuotrauka).

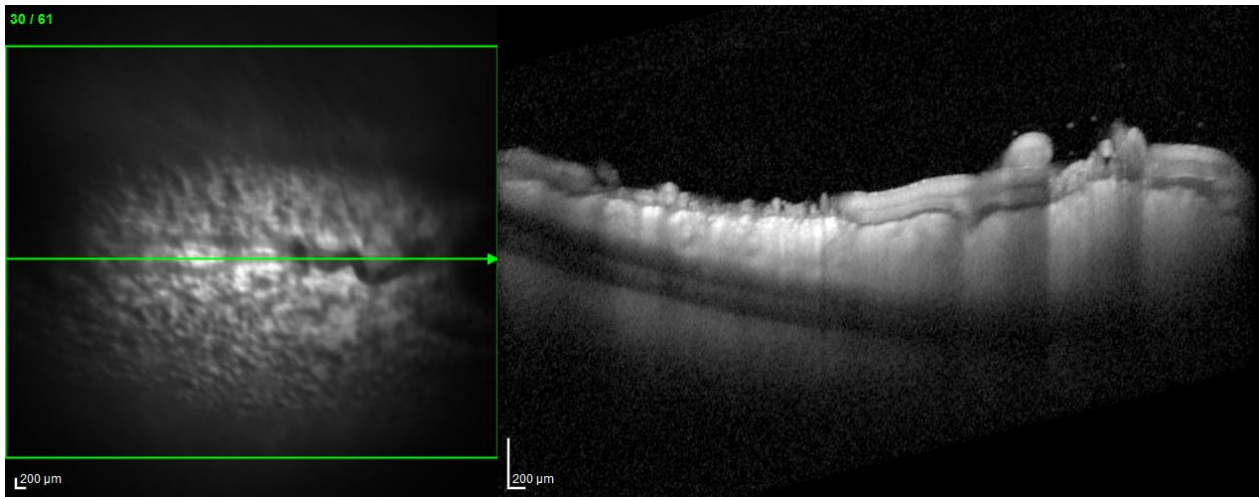


1.13 Pav. Elektrotretinografijos metu naudojami stimulai. A ir B – mfERG heksagoninių elementų matricos, A matricą sudaro 61 elementas, B – 102 elementai (Hood et al., 2012). C – pERG metu naudojamas šachmatų lentos arba juodai baltų juostų stimulai (Belusic, 2011).

1.4.2 Optinė koherentinė tomografija

Optinė koherentinė tomografija (OKT) yra vis plačiau taikomas ir vienas efektyviausių neinvazinių *in vivo* tinklainės audinių struktūrų analizės metodų neurooftalmologiniuose tyrimuose (Chan and Chan, 2017). Pagrindinis šio metodo veikimo principas yra šviesos sklidimas interferometru ir audinių kertančio šviesos spindulio dispersija arba absorbcija. Audinio vietos atspindinčios daugiau šviesos sukuria didesnio intensyvumo signalą, o vietos, kurios sugeria šviesą, atvirkščiai – mažesnio. Kaip šviesos šaltinis dažniausiai yra naudojamas superliuminescencinis diodas, kurio bangos ilgis varijuoja nuo 820 iki 870 nm. Iš tinklainės audinių grįžtanti šviesos banga yra apdorojama spektrometre Fourier transformacijos ir palyginama su atskaitos spinduliu. Fourier transformacija yra matematinis algoritmas, kuris kompleksines bangas verčia į atskirus nesudėtingus vienetus (Lumbroso et al., 2007). Atliekant tyrimus naudojama spektrinio domeno optinė koherentinė tomografija (SD-OCT), kuri veikia tokiu pačiu principu kaip ir anksčiau minėtoji, tačiau vietoje šviesos detektoriaus naudojamas spektrometras. Tokiu būdu gaunamas detalesnis vaizdas, tinklainės sluoksniai labiau išsiskiria bei matomi gilesni audinių sluoksniai (1.14 pav.) (Ibne Mokbul, 2017). Tinklainės storio matavimas yra naudojamas kaip progresuojančios neuroninės tinklainės patologijos indikatorius DB gyvūnų modeliuose. Didelės

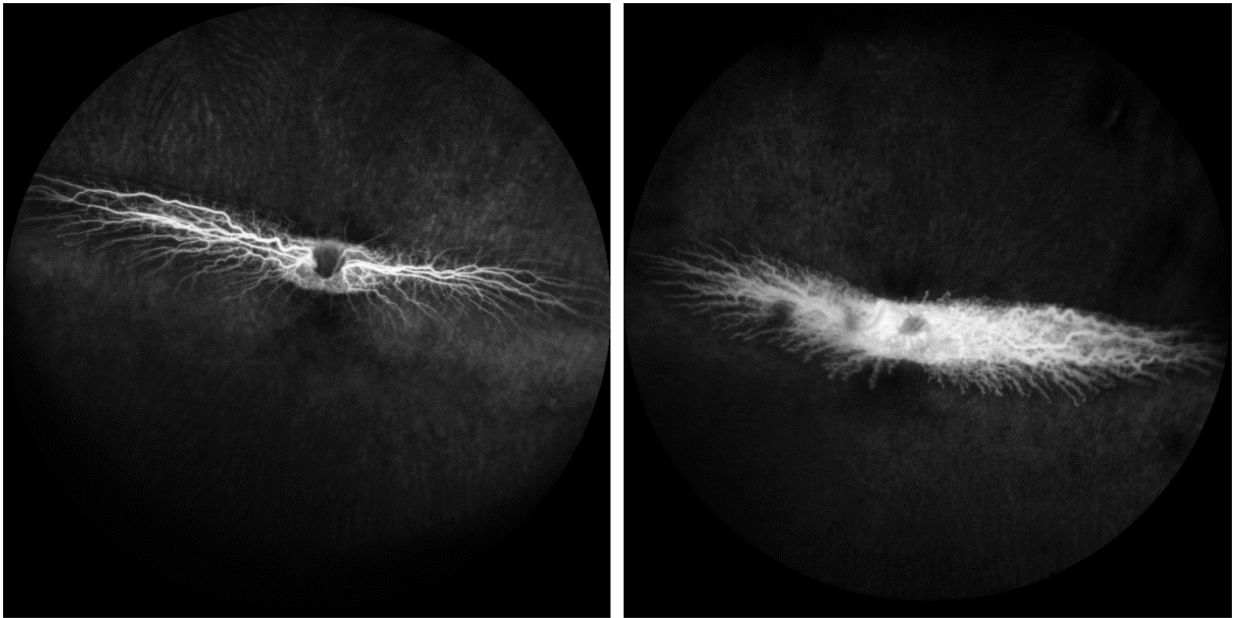
skiriamosios gebos OKT neinvaziniu būdu matuoja tinklainės storį graužikams ir triušiams, o naujausia įranga gali reprodukuoti vaizdus, kurie leidžia analizuoti tinklainę histologiškai vertinant jos sluoksnius (Robinson et al., 2012). Graužikų tyrimai taip pat parodė, kad ERG amplitudės sumažėjimas koreliuoja su sumažėjusiu tinklainės diametru, kuris buvo išmatuotas OKT metu (Fischer et al., 2009).



1.14 pav. Triušio tinklainės sluoksnių nuotrauka padaryta optiniu koherentiniu tomografu (autorius nuotrauka).

1.4.3 Fluoresceino angiografija

Fluoresceino angiografija (FA) arba akies dugno fluoresceino angiografija yra tinklainės ir gyslainės kraujo cirkuliacijos vaizdinimo metodas. Procedūros metu gyvūnams po oda arba į kojos raumenis yra injekuojamas natrio fluoresceinas, kuris patenka į kraujotaką, tuo metu tinklainė yra apšviečiama 490 nanometrų bangos ilgio mėlyna šviesa. Dažas skleidžia žalią fluorescencinę šviesą ir išryškėja tinklainės ir gyslainės kraujagyslinių audinių struktūros. Tokiu būdu gaunama akies angiograma fotografuojant fluorescencinę žalią šviesą (Cicinelli et al., 2019). FA metu galima stebėti naujų kraujagyslių susidarymą, jų išvešėjimus bei diametro pokyčius. Taip pat fluorescencinis dažas išryškina gyslainės kraujagyslių ir kapiliarų subretinalinio skysčio difuziją, kuri dar vadinama kraujagysliniu nuotėkiu (angl. *vascular leak*) (1.15 pav.). Be to, vertinant kraujagyslinio išsiliejimo plotus galima nustatyti pažeidimo ir gijimo laipsnį. FA vaizdinimas yra svarbus ir antivaskuliarinių vaistų testavime, kadangi metodas suteikia galimybę matyti tikslų morfologinį tinklainės kraujagyslinio audinio pokytį laike (Robinson et al., 2012).



1.15 Pav. Sveiko ir VEGF paveikto triušio FA tinklainės nuotraukos. Kairėje esančioje nuotraukoje matome sveiko triušio tinklainę, o dešinėje triušio, kuriam intravitrealiniu būdu buvo suleistas VEGF. Matomas kraujagyslinio tinklo padidėjimas ir kraujagyslių bei kapiliarių subretinalinio skysčio difuzija (autoriaus nuotrauka).

2. METODOLOGIJA

2.1 Įranga ir medžiagos

Apačioje pateikta eksperimento metu naudotos įrangos lentelė su pavadinimais ir funkciniais panaudojimais eksperimentų metu.

Įranga	Panaudojimas eksperimento metu
Flouresceino angiografas „Heidelberg Spectralis HRA+OCT“	Įranga skirta tinklainės ir gyslainės vaizdinimui naudojant fluoresceino dažą bei aukštos kokybės neinvazinei <i>in vivo</i> tinklainės audinio analizei.
Inkubatorius „Ohmeda Ohio Care Plus 3000“	Naudojamas palaikyti anestezuotų gyvūnų termoreguliaciją po procedūrų atlikimo.
Lęšinis elektrodas „Erg-Jet“	Elektroretinografijos metu naudojami elektrodai.
Duomenų rinkimo sąsaja/sistema „Power 1401“	Įranga skirta elektroretinografijos duomenų įrašymui.
Stiprintuvas „Iso-DAM8A“	Naudojamas elektriniam atsakui iš tinklainės stiprinimui.
2 ir 5 ml. tūrio švirkštai „Jiangsu Zhengkang Medical Apparatus Co., Ltd.“	Naudojami medžiagų ir anestezijos injekcijoms į gyvūnus (triušius) procedūrų metu.
Konusiniai polipropileningiai ir polistireniniai mėgintuvėliai	15, 50 ml mėgintuvėliai naudojami anestezijai ir fluoresceinui laikyti.
Svarstyklės „FKB 30K1A Kern“	Triušių svoriui įvertinti.
Vienkartinės sterilios adatos 23G	Naudojami medžiagų ir anestezijos injekcijoms į gyvūnus (triušius) procedūrų metu.
100 μl Insulininiai švirkštai	Naudojami intravitrealinėms VEGF ir aflibercepto injekcijoms į triušio akį.
Akių valymo lazdelės „Bvi Weck-Cel“	Naudojama dulkių ir kitų svetimkūnių nuvalymui nuo triušio akies FA ir OCT vaizdinimo metu.

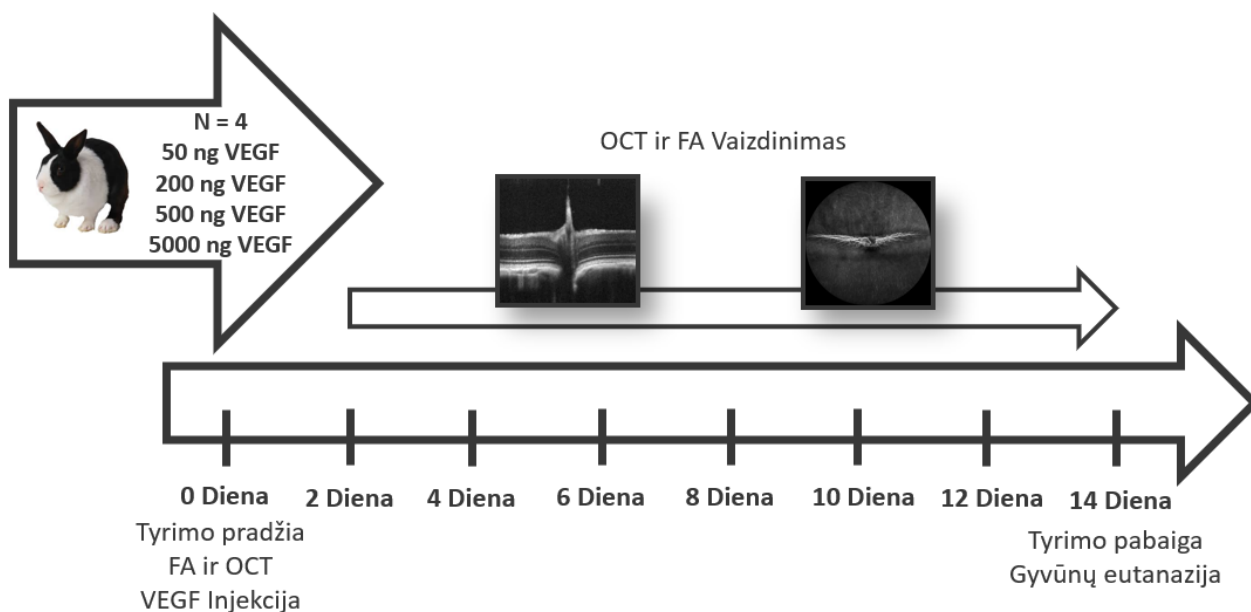
Eksperimento metu naudotų medžiagų sąrašas su pavadinimais ir jų panaudojimas atliktų procedūrų metu.

Medžiagos	Panaudojimas tyrimų metuose
Ketaminas (75 mg/kg; „Ketamidor“, Richter Pharma, Austria); Medetomidinas (1 mg/kg; Sedator, Eurovet, Netherlands), 0,9% natrio chlorido fiziologinis tirpalas (B.Braun Melsungen AG, Germany)	Triušių anestezavimui elektroretinografijos ir tinklainės vaizdinimo metu.
Oksibuprokaino lašai („Oftan Obucain“, Santen Pharmaceutical, Japan)	Triušio akies nuskausminimas intravitrealinių injekcijų ir <i>in vivo</i> vaizdinimo procedūrų metu
Tropikamido lašai (10 mg/ml; „Mydriacil“, S.A Alcon-Couvreur N.V, Belgium)	Triušio akies vyzdžio praplėtimui <i>in vivo</i> vaizdinimo procedūrų metu.
Drėkinamieji akių lašai („Systane ultra“, Alcon Laboratories, USA)	Gyvūno akies sudrėkinimui <i>in vivo</i> vaizdinimo procedūrų metu su tikslu apsaugoti gyvūno rageną nuo išdžiūvimo.
Rekombinantinis žmogaus VEGF 165 baltymas (R&D systems, USA)	Diabetinės retinopatijos modelio indukcijai triušiuose.
Pentobarbitalis (100 ml; „Exagon“, Richter Pharma, Germany)	Triušio eutanazijai paskutinę eksperimento dieną.
10% Natrio fluoresceino tirpalas (Sigma-Aldrich, USA)	Injekuojamas tinklainės kraujagyslių nudažymui FA vaizdinimo metu.
2.5% hipromeliozės kontaktinis gelis (Goniovisc, Hub Pharmaceuticals, USA)	Elektroretinografijos metu naudojamas kaip laidininkas tarp akies ir elektrodo.
Deksametazono ir chloramfenikolio akių lašai (Oftan Dexa-Chlora, Santen Pharmaceutical Co., Japan)	Antibiotiniai akių lašai naudojami apsaugoti triušio akį nuo infekcijų po intravitrealinių injekcijų.
Afliberceptas (Eylea, Bayer AG, Germany)	Injekcinis tirpalas sukkelto modelio gydymui.

2.2 Eksperimento eiga

Siekiant sukurti DR modelį triušiuose atlikti 2 tyrimai. Pirmojo tyrimo (2.1 pav.) tikslas buvo nustatyti tinkamą VEGF koncentraciją modelio indukcijai. Eksperimento metu 4 triušiams į abi akis buvo suleista atitinkamai po 50, 200, 500 ir 5000 ng VEGF. Šio tyrimo metu OCT ir FA vaizdinimo metu buvo vertinami kraujagyslinio tinklo pagausėjimas, naujų kraujagyslių susidarymas, kraujagyslių ir kapiliarų subretinalinio skysčio difuzija bei buvo apskaičiuotas kraujagyslinis nuotėkio plotas. Skiriamas dėmesys pažeidimų laipsniui, jog sukurtas modelis būtų efektyviausias validacijai, kai sukeltoms patologijoms gydyti yra išbandomi jau rinkoje esantys farmaciniai preparatai.

Apibendrinus pirmojo tyrimo gautus rezultatus buvo pasirinkta efektyviausia VEGF koncentracija modelio indukcijai (2.2 pav.). 4 triušiai buvo padalinti į dvi grupes: kontrolinę ir gydytą afliberceptu. FA ir OCT in vivo vaizdinimo metu buvo vertinamas tinklainės kraujagyslinis tinklas ir jo pokyčiai. Triušių fotoreceptorių ir bipolinių ląstelių atsakas buvo matuojamas elektroretinografijos metu. Paskutinę tyrimo dieną triušiai buvo eutanazuojami naudojant pentobarbitalį. Eutanazija atlikta suleidžiant 400 mg/kg į ausies veną.



2.1 Pav. Pirmojo tyrimo schema.

2.3.2 Intravitrealinės injekcijos

Prieš injekciją triušiai buvo anestezuojami suleidžiant 20 mg/kg medetomidino ir 40 mg/kg ketamino į kojos raumenį. Kiekvienam triušiu į akį sulašinta nuskausminamųjų oksibuprokaino lašų („Oftan Obucain“, Santen Pharmaceutical, Japan). Pirmajame tyrime DB modelio sukėlimui triušiams intravitrealiniu būdu į abi akis buvo suleista atitinkamai po 100 µl 50, 200, 500, 5000 ng koncentracijos VEGF tirpalo (*Sigma, USA*). Pilotinio tyrimo metu buvo nustatyta, jog iš tirtų koncentracijų 5000 ng konc. VEGF tirpalas efektyviausiai sukelia neovaskuliarizaciją. Antrajame tyrime kiekvienam triušiu buvo injekuotas 100 µl 5000 ng koncentracijos VEGF tirpalas. Po kiekvienos injekcijos ant akies buvo užlašinta deksametazono ir chloramfenikolio lašų apsaugoti akiai nuo infekcijos.

Analoginėmis sąlygomis antrojo tyrimo metu 4 dieną po VEGF injekcijos intravitrealiniu būdu į pažeistas akis buvo suleista 40 mg/ml 100 µl aflibercepto.

2.3.3 Akies dugno vaizdinimas

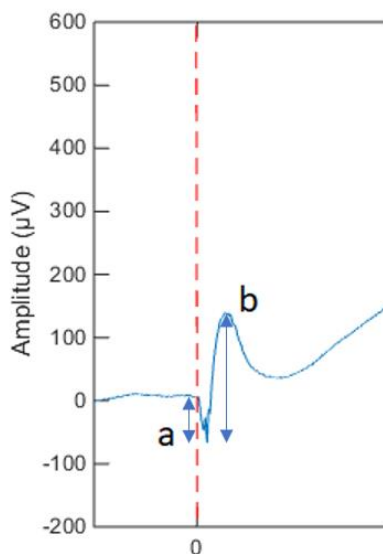
Akies dugno ir tinklainės struktūrų vaizdinimui atlikta fluoresceino angiografija (FA) ir optinė koherentinė tomografija (OKT) naudojant Fluoresceino angiografą „Heidelberg Spectralis HRA+OCT“. Prieš vaizdinimo procedūras gyvūnai užmigdomi anestezinio ketamino (75 mg/kg; Ketamidol, Richter Pharma, Austria) ir medetomidino (1 mg/kg; Sedator, Eurovet, Netherlands) tirpalo injekcija į raumenį. Gyvūnas įtvirtinamas į specialų metalinį įtaisą, triušio galva pozicionuojama priešais objektyvą. Vyzdžiams praplėsti į akis sulašinamas 1% tropikamido tirpalas (Santen oy, Finland). Prieš pat tinklainės vaizdinimą akies vokai buvo išplečiami akies voko plėstuvu. Siekiant procedūros metu apsaugoti gyvūno rageną nuo išdžiūvimo akys buvo drėkinamos akių lašais (Systane® Ultra, Norbrook, England).

Vyzdžiui išsiplėtus, OKT objektyvas yra nutaikomas į akies dugną ir padaromos 35 nuotraukos po 68 pakartojimus. Iš gautų nuotraukų vertinami tinklainės sluoksnių makroskopiniai pokyčiai.

Fluoresceino angiografijos metu plataus spektro (angl. *ultra-widefield*) objektyvas nutaikomas į akies dugną. Triušiu *in musculus* suleidžiama 10% natrio fluoresceino tirpalo (1ml/kg) ir su fluoresceino angiografu 5 min. padaromos tinklainės nuotraukos. Iš gautų nuotraukų buvo apskaičiuotas kraujagyslinio nuotėkio plotas.

2.3.4 Elektrotretinografija

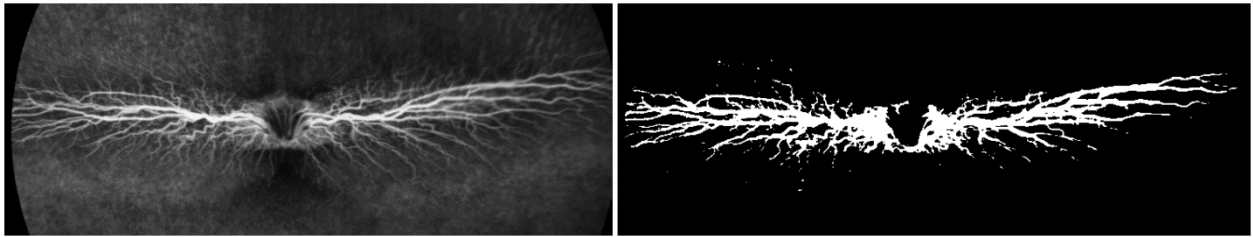
Prieš fERG registravimą, triušiai 30 min buvo adaptuojami tamsoje, o visi bandymai atlikti prie silpno raudono 3 lux apšvietimo. Triušiai anestezuoti suleidus 1 mg/kg ketamino (75 mg/kg; Ketamidol, Richter Pharma, Austria) ir medetomidino (1 mg/kg; Sedator, Eurovet, Netherlands) tirpalo injekcija į raumenį. Gyvūnas buvo pritvirtinamas prie jam pritaikyto stereotaksinio rėmo ir paguldomas ant fiziologinio kaitinimo paminkštino. Procedūros metu akys yra sudrėkinamos, lašinant 2,5% GonioVisc oftalmologinio tepalo tirpalo (Hub Pharmaceuticals, JAV), kuris taip pat užtikrina elektrinį kontaktą ir laidumą tarp ragenos ir ragenos elektrodų (t.y. ERG elektrodo). Elektrotretinografijai atlikti buvo naudojami kontaktinio lęšio tipo elektrodai ERG-Jet (Fabrinal, Šveicarija). Vienu metu yra registruojamas vienos akies atsakas, kol kita akis yra mechaniniu būdu uždengiama. Šviesos blyksnio stimulus buvo pateikiamas pozicionuojant LED stimuliatorių su paraboliniu veidrodžiu 0,5 cm atstumu nuo akies, siekiant apšviesti visą tinklainės paviršių. Naudotas 3 ms trukmės $1.65 [\log(\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2})]$ intensyvumo šviesos blyksnio stimulus, intervalas tarp stimulų 10 s. Vienos sesijos metu registruota 10 atsakų iš kiekvienos akies, jie buvo vidurkinami. ERG signalas stiprinamas 1000 kartų. Po fERG registravimo a ir b bangų pikai išrenkami ir nustatomos jų amplitudės naudojant „Matlab“ programą. A bangos amplitudė matuojama nuo bazinės linijos iki pirmo neigiamo ekstremumo, b bangos amplitudė – nuo pirmo neigiamo ekstremumo iki pirmo teigiamo ekstremumo (2.3 pav.).



2.3 pav. fERG a ir b bangų amplitudės. Trumpesnė mėlyna rodyklė žymi a bangos amplitudę nuo bazinės linijos iki pirmo neigiamo ekstremumo, ilgesnė - b bangos amplitudę, nuo pirmo neigiamo ekstremumo iki pirmo teigiamo ekstremumo.

2.3.5 Kiekybinė rezultatų analizė

Kraujagyslinio nuotėkio plotas buvo vertinamas analizuojant FA vaizdinimo metu gautas triušio tinklainės nuotraukas ImageJ (v. 1.52u, Scion Corporation) programoje. Naudojant ImageJ kiekviena nuotrauka buvo konvertuojama į 8-bit formatą ir pakeičiama jos riba (angl. *threshhold*) iki kol išryškėja visas fluoresceinu šviečiantis kraujagyslinis tinklas (2.4 pav.). Šis plotas ImageJ programoje yra suskaičiuojamas pikseliais, todėl naudojant mastelį iš FA nuotraukų pikseliai buvo konvertuojami į mm².



2.4 Pav. FA nuotraukų analizė. Dešinėje pusėje matome 5 minutės FA vaizdinimo metu gauta triušio tinklainės kraujagyslinio tinklo nuotrauka. Kairėje nuotrauka modifikuota su ImageJ programine įranga išryškintant kraujagyslinį tinklą.

Statistinė eksperimentų duomenų analizė atlikta GraphPad Prism (v. 8.4.2, GraphPad Software Inc., San Diego, California, CA, JAV) programine įranga. Kiekybiniai duomenys buvo pateikiami grafiku ir apskaičiuoti jų standartiniai nuokrypiai (SD) ir paklaida (SEM). Duomenys buvo analizuojami naudojant dviejų krypčių vidurkių palyginimo ir dispersinę analizę (two-way ANOVA). Skirtumai buvo įvertinami kaip statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$. Naudojant Kolmogorov–Smirnov testą buvo patikrintas duomenų normalingumas.

3. REZULTATAI

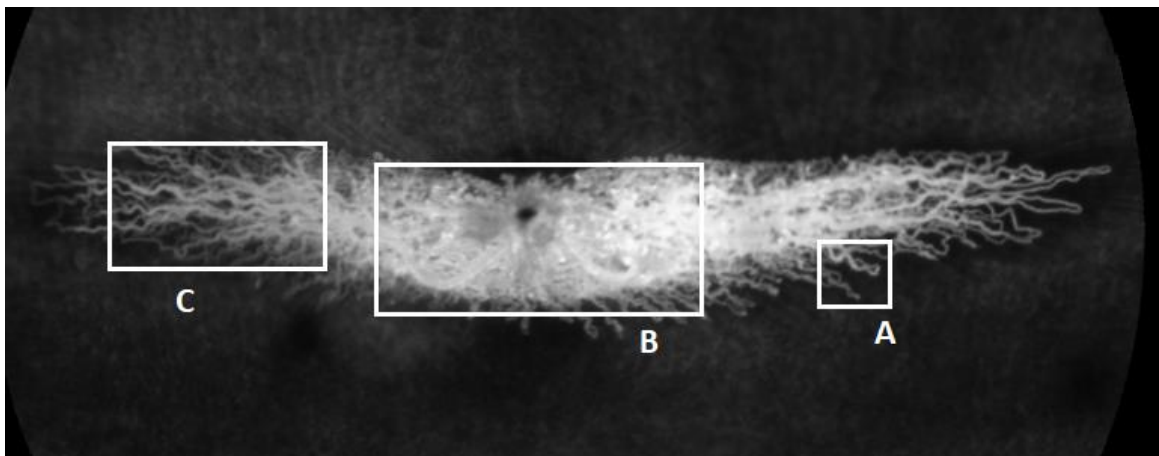
Padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio indukcijai buvo atlikti du tyrimai, kurių metu buvo vertinami morfologiniai ir funkciniai tinklainės ir jos kraujagyslinio audinio pokyčiai. Pirmojo tyrimo tikslas buvo nustatyti optimalią koncentraciją modelio indukcijai, antrojo tyrimo tikslas – charakterizuoti modelį ir įvertinti jo efektyvumą testuojant anti-VEGF vaistus.

3.1 VEGF koncentracijos nustatymo eksperimentas

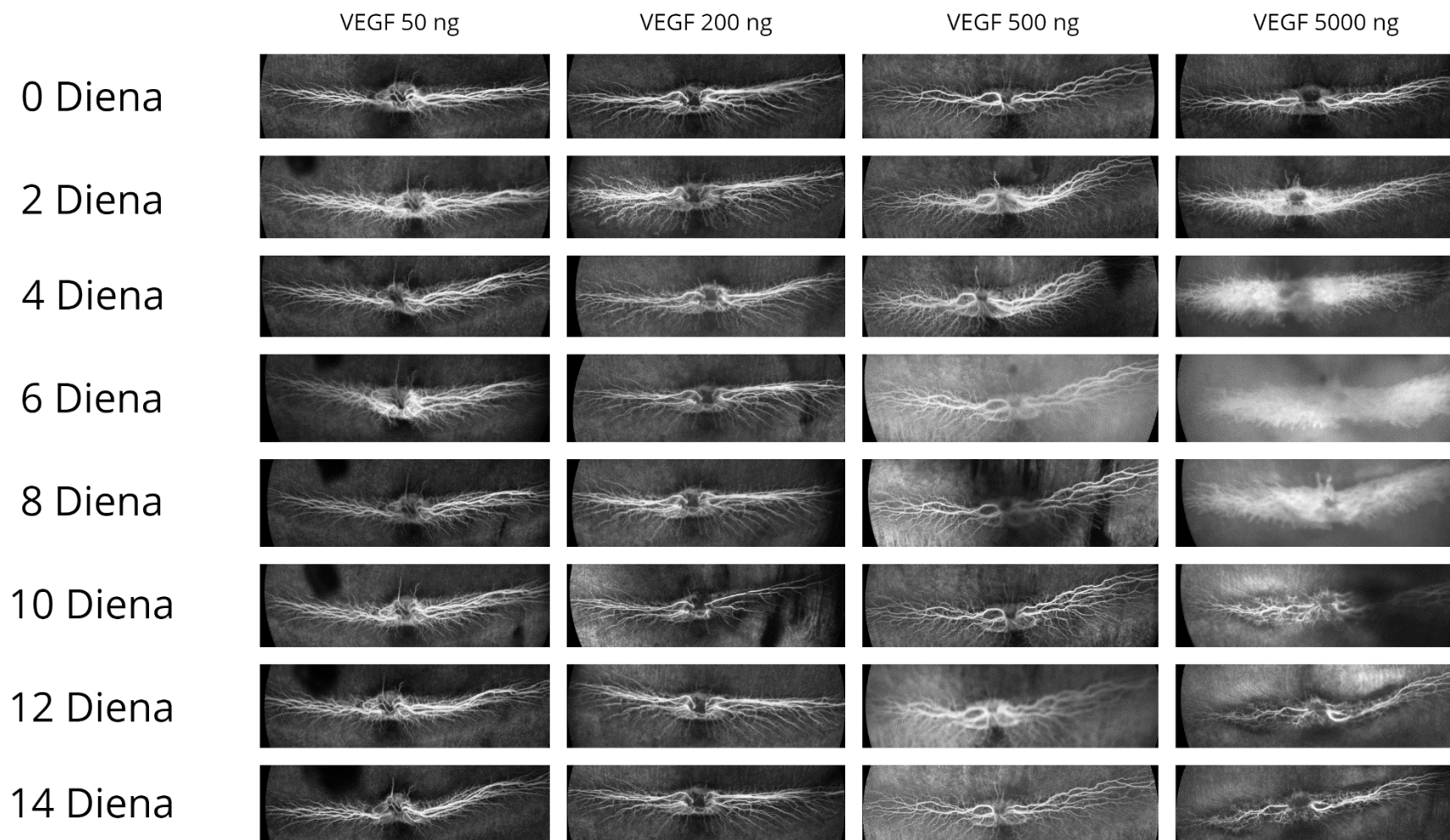
Pirmojo tyrimo metu 4 triušiai buvo padalinti į keturias skirtingos VEGF koncentracijos grupes: 50, 200, 500 ir 5000 ng. Gyvūnams į abi akis intravitrealiniu būdu buvo suleista 100 µl skirtingų koncentracijos VEGF tirpalo. FA ir OKT vaizdinimo metu morfologiškai buvo įvertintas visų grupių akių (n=8) tinklainių kraujagyslinis tinklas ir apskaičiuotas bei grafiškai pateiktas nuotėkio plotas.

3.1.1 Makroskopiniai tinklainės pokyčiai

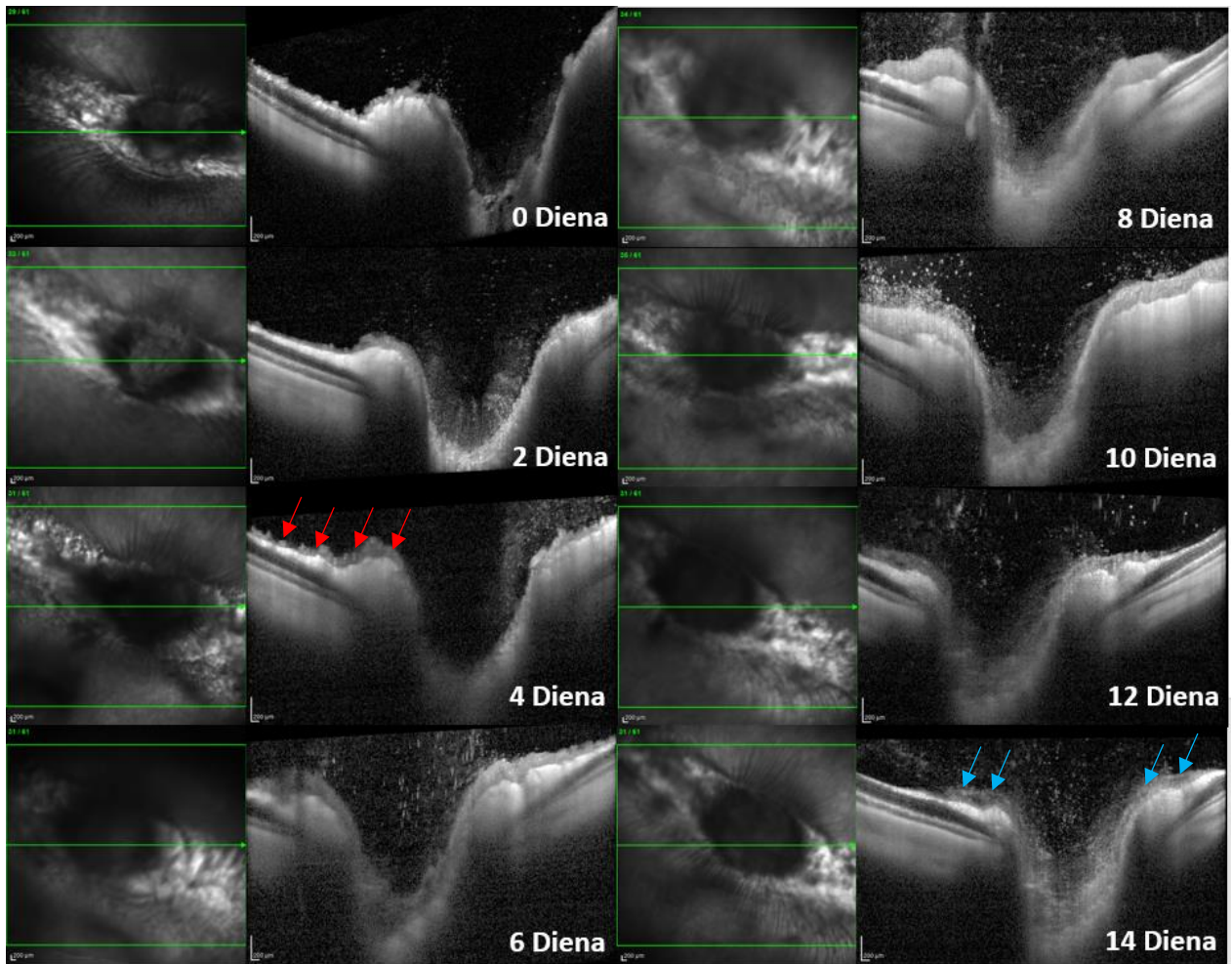
FA ir OKT vaizdinimo metu buvo vertinami morfologiniai tinklainės audinio pokyčiai po intravitrealinės VEGF injekcijos. Padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modeliui yra būdinga neovaskuliarizacija, kraujagyslių vingiuotumas ir kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuzija (3.1 pav). Tyrimo grupėse, kurios gavo mažesnes VEGF dozes (50, 200 ir 500 ng), 3.2 pav. užfiksuota nežymi neovaskuliarizacija. Ryškiausia neovaskuliarizacija, kraujagyslių vingiuotumas ir kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuzija matoma 5000 ng VEGF grupėje, kurioje patologija pasireiškė 4 dieną po injekcijos. Patologija 10-tą dieną išnyko ir susidarė randiniai audiniai. Taip pat 5000 ng VEGF grupėje OKT metu buvo pastebėtas naujų kraujagyslių formavimasis (3.3 pav.).



3.1 pav. Morfologiniai padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio tinklainės kraujagyslinio audinio pokyčiai. A – kraujagyslių vingiuotumas, B – kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuzija, C – neovaskuliarizacija.

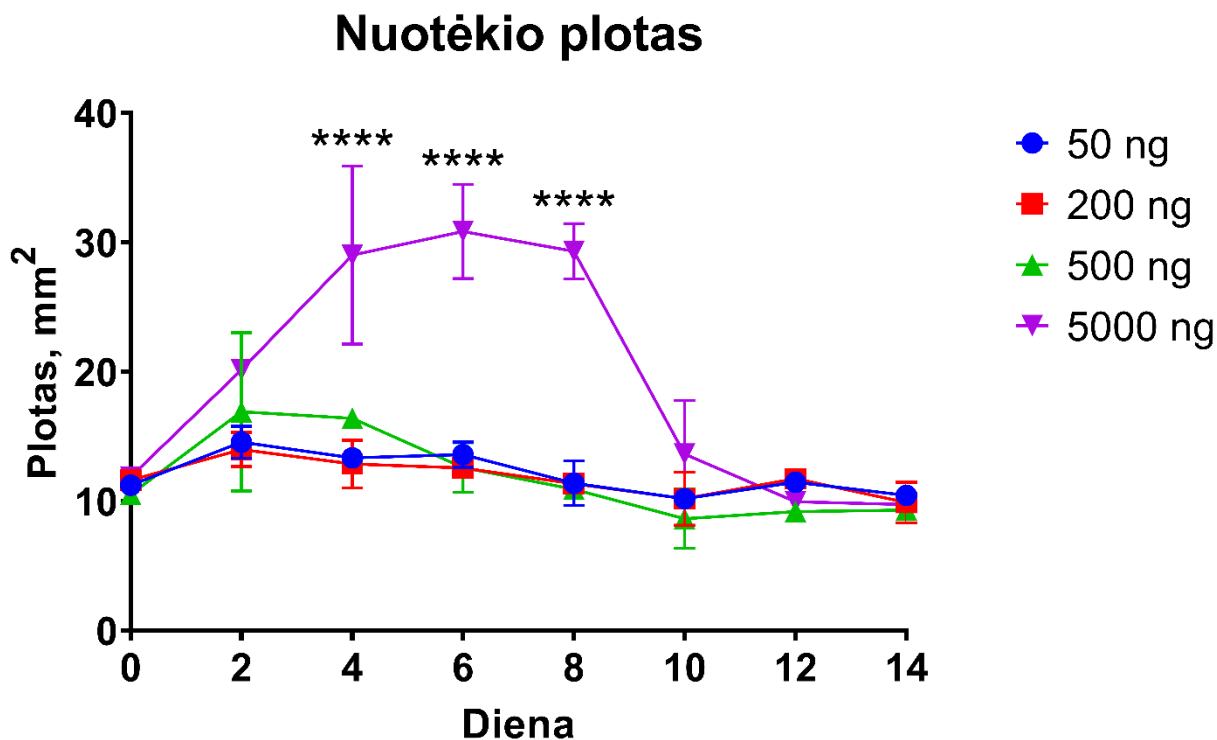


3.2 pav. Skirtingomis VEGF koncentracijomis paveiktų tinklainių pokyčiai laike prieš ir po VEGF injekcijos.



3.3 Pav. 5000 ng VEGF grupės tinklainės audinio OKT makroskopinės nuotraukos. 4-tą dieną po VEGF injekcijos tinklainėje pradėjo formuotis kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuzija, kuri pradėjo nykti 10-tą dieną ir surandėjo 14-tą dieną po injekcijos (mėlynos rodyklės).

3.1.2 Kraujagyslinio nuotėkio plotas



3.4 Pav. Kraujagyslinio nuotėkio pokytis laike (n=8).

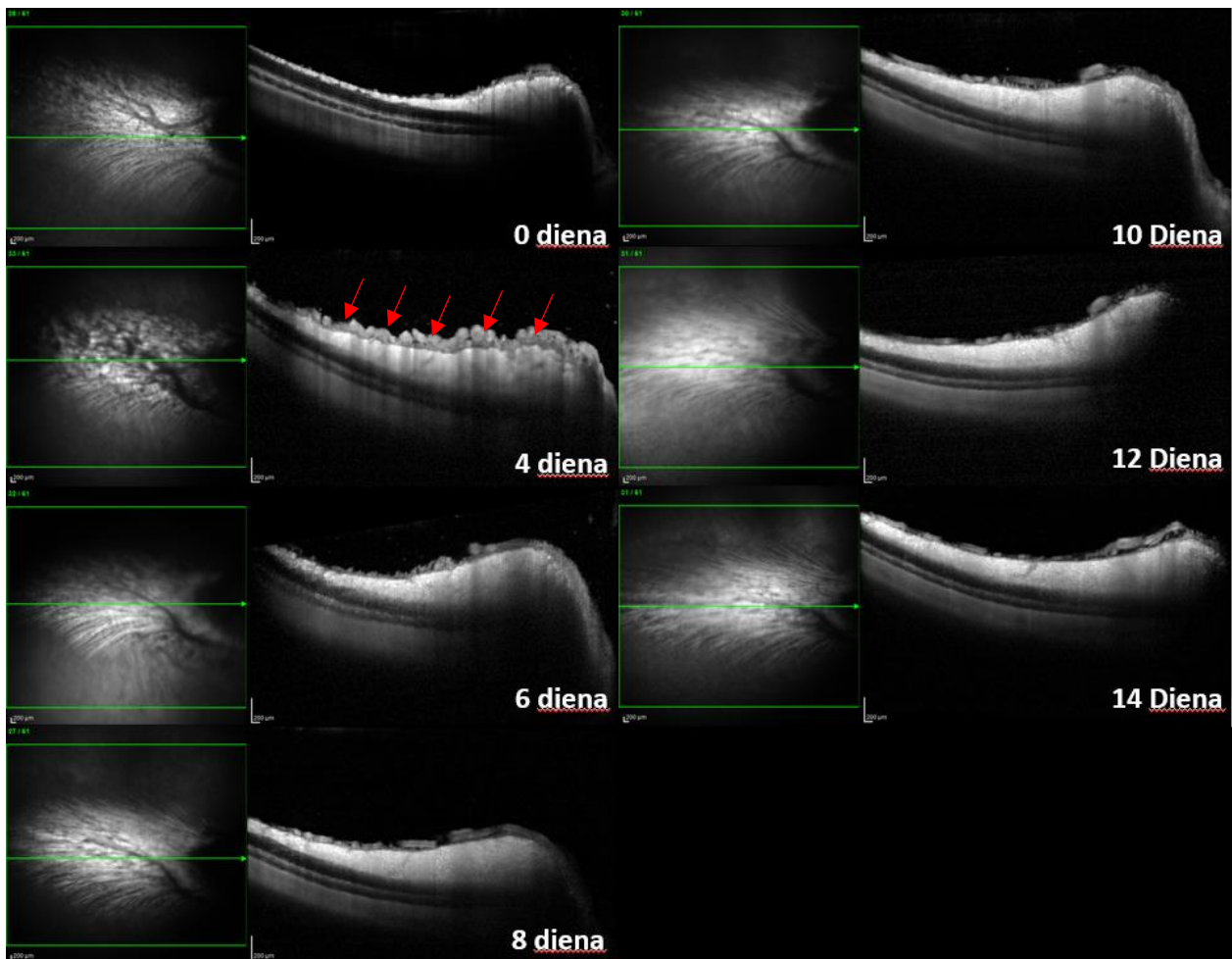
Akyse, kurioms buvo injekuota 5000 ng VEGF, matoma ryški neovaskuliarizacija bei kraujagyslių ir kapiliarų subretinalinio skysčio difuzija (nuotėkis), kurie prasidėjo antrą dieną po injekcijos (nuotėkio plotas $20,13 \pm 0,37 \text{ mm}^2$) ir pasiekė maksimalią vertę 6-tą dieną po injekcijos ($30,82 \pm 3,65 \text{ mm}^2$). Tyrimo 10 dieną nuotėkio plotas grįžo į pradinį lygį. Akyse, kurios atitinkamai gavo 50, 200 ir 500 ng VEGF injekcijas, matomas nežymus padidėjimas 2-tą dieną ir grįžimas į pradinį lygį 10 dieną. Palyginus 5000 ng grupę su mažesnės koncentracijos grupėmis buvo gautas statistiškai reikšmingas skirtumas 4-tą, 6-tą ir 8-tą dienomis (ANOVA Sidak'o daugybinio palyginimo testas, **** $< 0,0001$).

3.2 Modelio validavimo eksperimentas

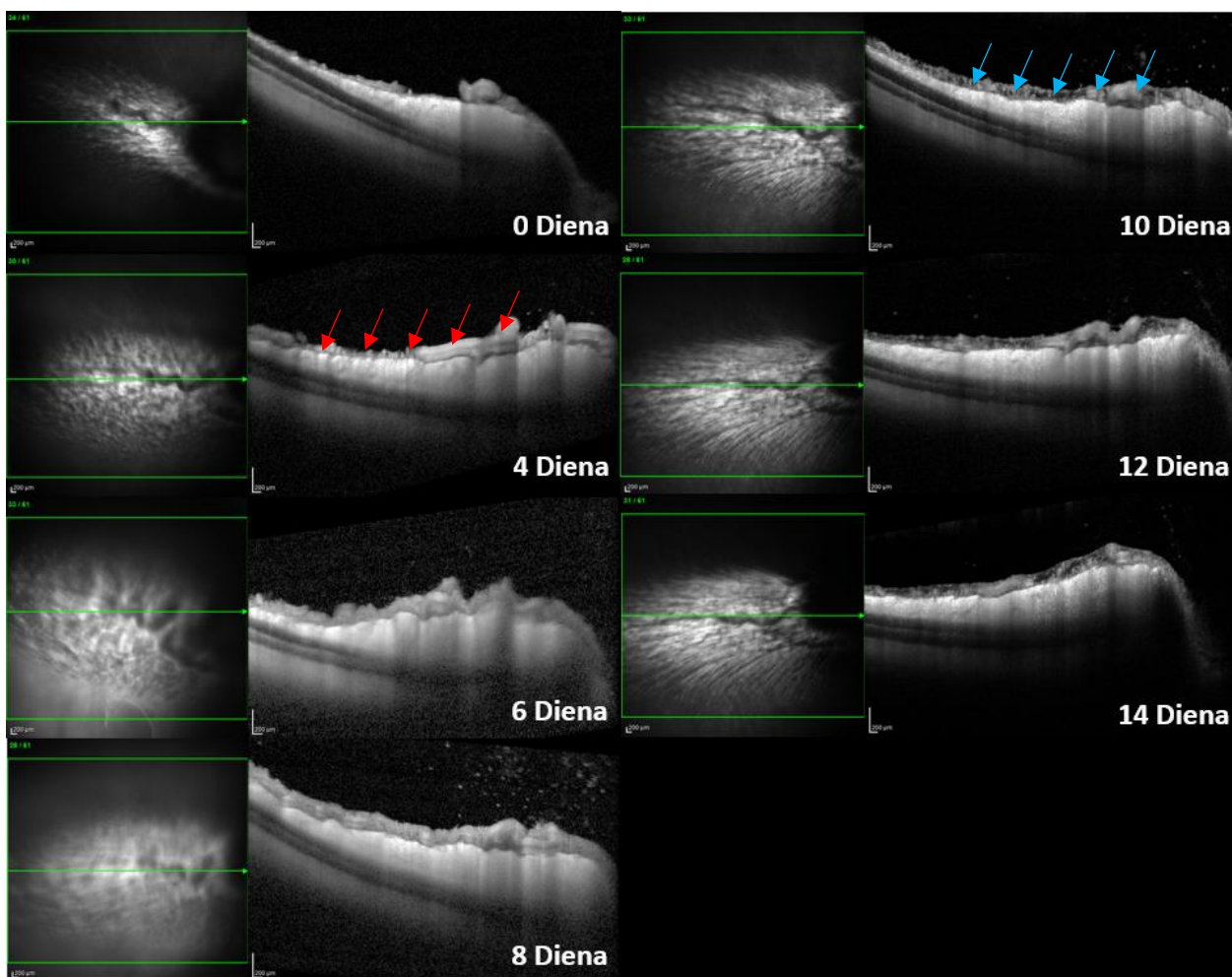
Antrojo tyrimo metu 4 triušiai buvo padalinti į dvi grupes: kontrolinę ir gydytą afliberceptu. FA ir OKT vaizdinimo metu morfologiškai buvo įvertintas abiejų grupių akių (n=8) tinklainių kraujagyslinis tinklas ir apskaičiuotas bei grafiškai pateiktas nuotėkio plotas. Blyksnio elektrotretinografijos metodu buvo įvertintas tinklainės bipolinių ir fotoreceptorinių ląstelių elektrinis atsakas ir grafiškai pateiktos a ir b bangų amplitudės.

3.2.1 Makroskopiniai tinklainės pokyčiai

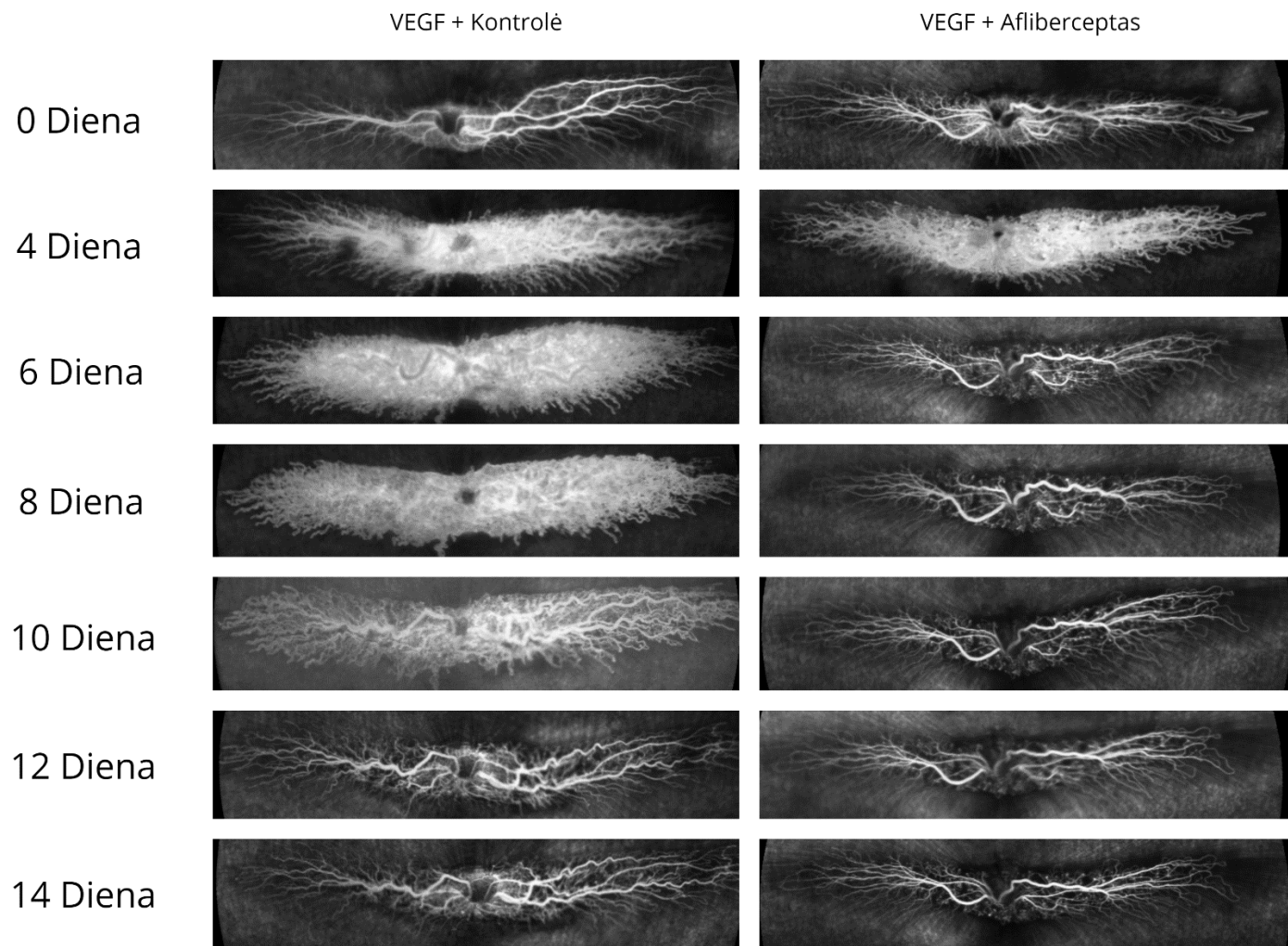
Antrojo tyrimo metu buvo vertinami tinklainės kraujagyslinio audinio pokyčiai po gydymo. 4-tą dieną gydytai grupei intravitrealiniu būdu buvo suleista 100 μ l 40mg/ml aflibercepto. Iš FA nuotraukų 3.7 pav. matoma, kad 6-tą dieną vaistas pilnai sustabdė neovaskuliarizacijos ir kraujagyslinio nuotėkio procesus. Kontrolinėje grupėje audiniai savaime sugijo 10-tą dieną po indukcijos. OKT skanavimo (3.5 pav.) metu matoma, kad aflibercepto grupėje 4 dieną prasidėjo subretinalinio skysčio difuzija, kuri išnyko po gydymo, kontrolinėje grupėje (3.6 pav.) procesas savaime išnyko 10 dieną.



3.5 Pav. Aflibercepto grupės tinklainės audinio OKT makroskopinės nuotraukos. 4-tą dieną po VEGF injekcijos prasidėjo subretinalinio skysčio difuzija (raudonos rodyklės), kuri praėjus 2 dienoms po aflibercepto injekcijos išnyko.



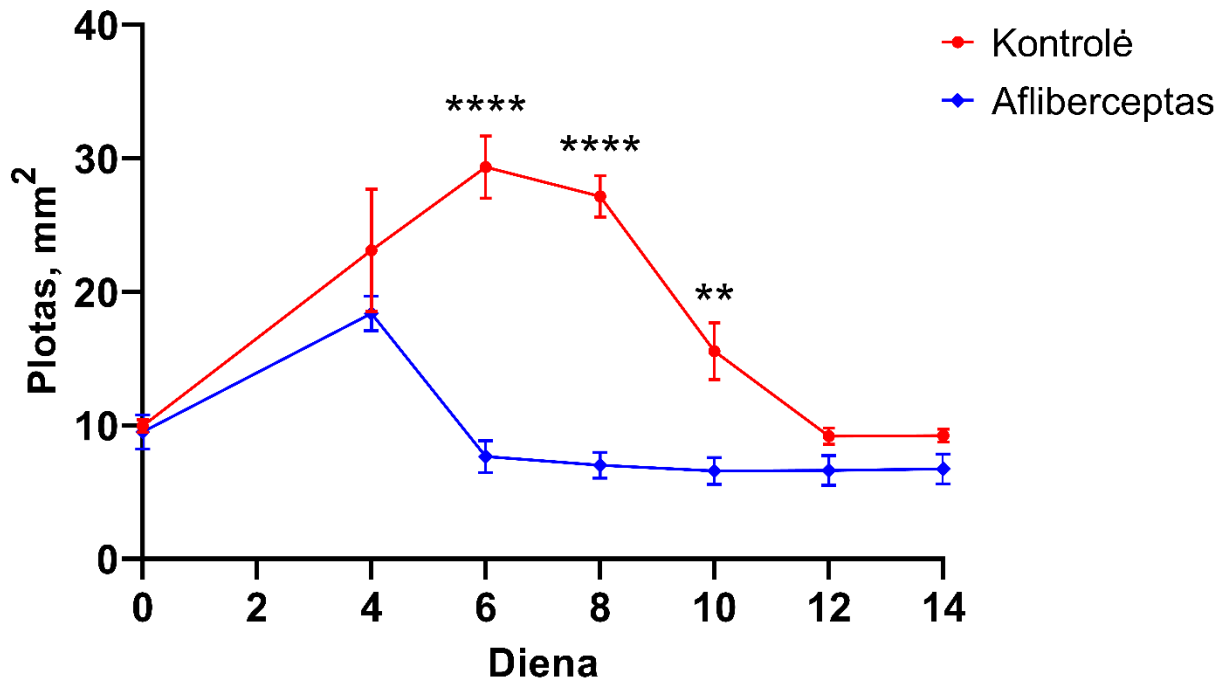
3.6 Pav. Kontrolinės grupės tinklainės audinio OKT makroskopinės nuotraukos. 4-tą dieną po VEGF injekcijos tinklainėje prasidėjo subretinalinio skysčio difuzija (raudonos rodyklės), kuri išnyko (mėlynos rodyklės) 10-tą dieną po modelio indukcijos.



3.7 pav. Kontrolinės ir afliberceptu gydytos grupės triušių akių tinklainių 5 minutės FA nuotraukos.

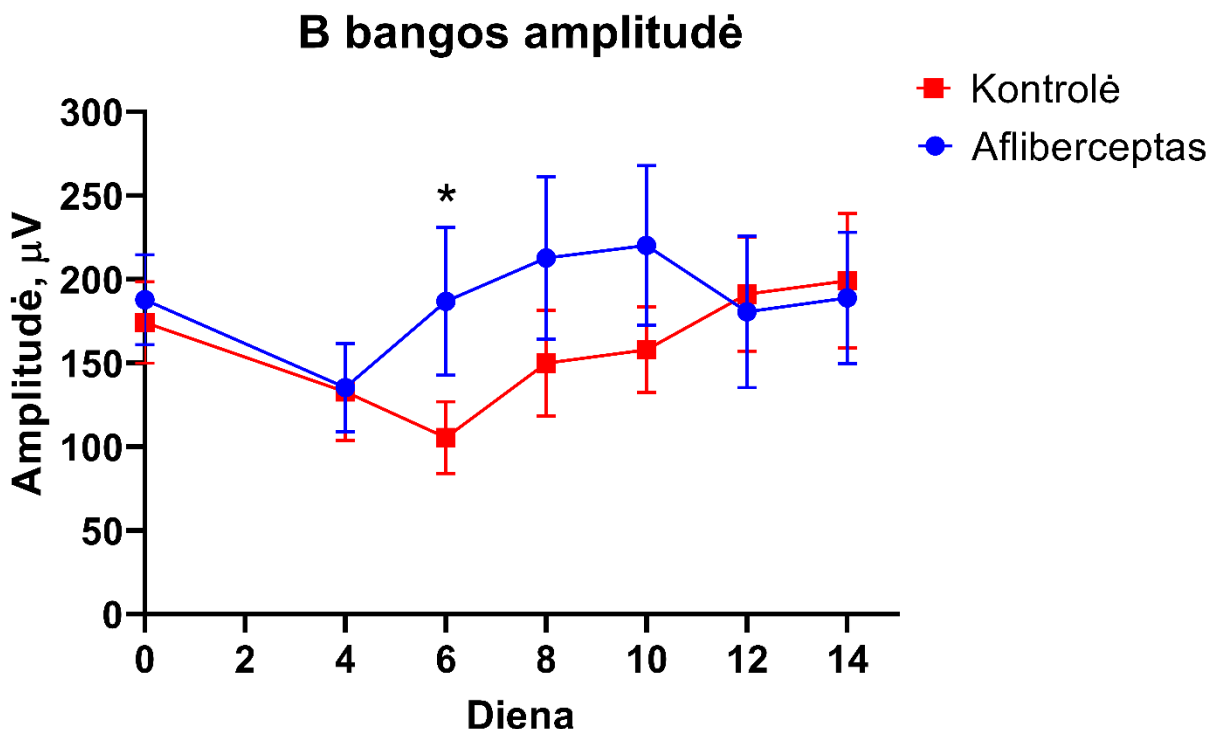
3.2.2 Vaskuliarinio nuotėkio plotas

Nuotėkio plotas



3.8 Pav. Vaskuliarinio nuotėkio ploto pokytis laiko eigoje (n = 8).

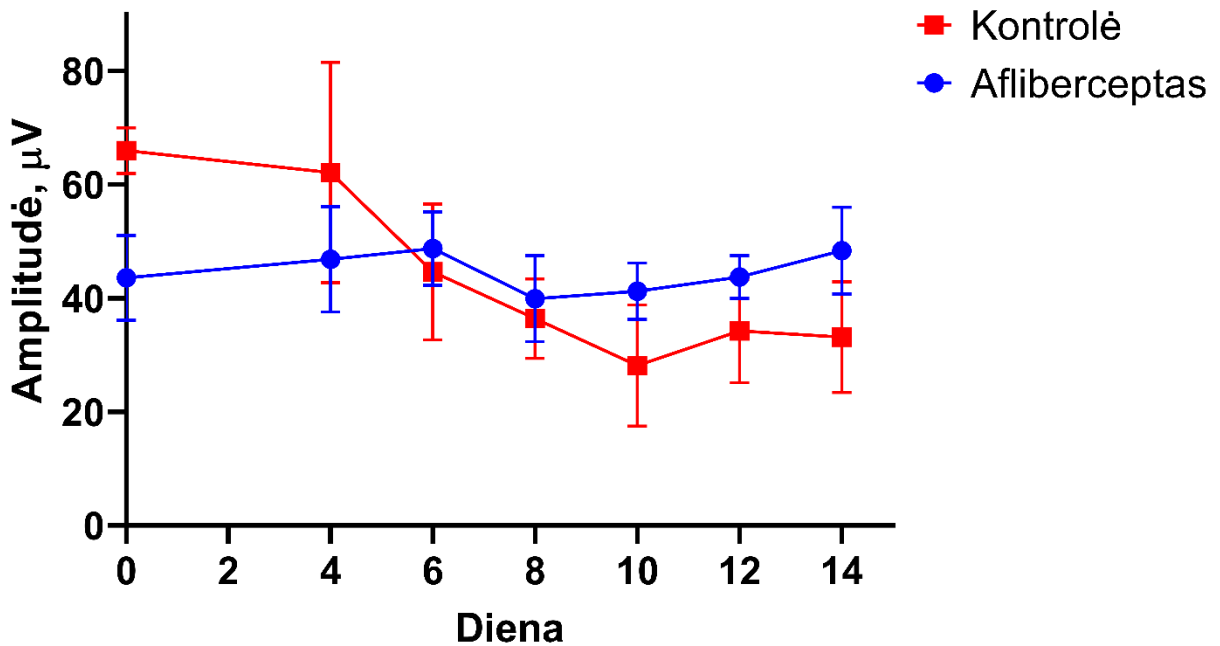
3.8 pav. matome, jog neovaskuliarizacija buvo sėkmingai indukuota abiejuose grupėse į stiklakūnį suleidus 5000 ng VEGF. Kontrolinėje grupėje nuotėkio plotas pasiekė maksimalią vertę 6-tą dieną po injekcijos (nuotėkio plotas $29,34 \pm 2,34 \text{ mm}^2$) ir 12-tą dieną grįžo į pradinį lygį (nuotėkio plotas $9,18 \pm 0,62 \text{ mm}^2$). Aflibercepto grupėje nuotėkio plotas pasiekė maksimalią vertę 4 dieną (nuotėkio plotas $18,38 \pm 1,31 \text{ mm}^2$). Tą pačią dieną po gydymo pradžios pradėjo kryptingai mažėti ir 6 dieną grįžo į pradinį tašką (nuotėkio plotas $7,66 \pm 1,2 \text{ mm}^2$). Palyginus kontrolinę grupę su afliberceptu gydyta grupe, buvo gautas statistiškai reikšmingas skirtumas 6-tą, 8-tą ir 10-tą dienomis (ANOVA Sidak'o daugybinio palyginimo testas, **** $< 0,0001$, ** $< 0,01$).



3.9 Pav. fERG B bangos amplitudės pokytis laiko eigoje.

3.9 pav. kontrolinėje ir aflibercepto grupėse po modelio indukcijos B bangos amplitudė 4-tą dieną sumažėjo atitinkamai iki $135,29 \pm 26,42 \mu\text{V}$ ir $132,79 \pm 28,92 \mu\text{V}$. Kontrolinėje grupėje B bangos amplitudė 6-tą dieną pasiekė žemiausią vertę ($105,42 \pm 21,41 \mu\text{V}$) ir 12 dieną grįžo į pradinį tašką ($191,15 \pm 34,05 \mu\text{V}$). Afliberceptu gydytoje grupėje amplitudė 6-tą dieną grįžo į pradinį lygį ($186,68 \pm 44,2 \mu\text{V}$), vėliau 12-tą dieną aflibercepto grupės amplitudės vertė ($180,54 \pm 45,24 \mu\text{V}$) susilygino su kontroline grupe. Lyginant kontrolinę grupę su aflibercepto buvo gautas statistiškai reikšmingas skirtumas 6-tą dieną (ANOVA *Sidak*'o daugybinio palyginimo testas, * $p = 0,0346$).

A bangos amplitudė



3.10 Pav. fERG A bangos pokytis laiko eigoje.

3.10 pav. Kontrolinėje grupėje po modelio indukcijos A bangos amplitudė 10-tą dieną sumažėjo iki $28,13 \pm 10,66 \mu\text{V}$ ir po modelio indukcijos neatsistatė į pradinį lygį. Grafike matoma, kad afliberceptu gydytoje grupėje pasireiškė nežymūs svyravimai, tačiau a bangos amplitudė laiko eigoje išliko panašaus dydžio.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Tinklainės ląstelėse vyksta sudėtingi fotoelektrocheminiai procesai, kurių metu fotonų energija yra verčiama į elektrinius signalus, kurie vėliau yra perduodami į smegenų centrus. Dėl šios priežasties tinklainė pasižymi unikalėmis anatomicinėmis ir fiziologinėmis savybėmis. Viena šių savybių yra specializuota sąveika tarp nervinių ir endotelių ląstelių, kurios kartu sudaro tinklainės neurovaskuliarinį barjerą. Literatūroje daugėja įrodymų (Ameri et al., 2007; Badaro et al., 2014; Edelman et al., 2005), jog prie šio barjero patologinių procesų prisideda hipoksijos sukeltas, signalinio VEGF baltymo koncentracijos padidėjimas. VEGF skatina kraujagyslių endotelio ląstelių dalijimąsi, didina kraujagyslinį pralaidumą bei atlieka svarbų vaidmenį gyslainės kraujagyslių augime. Šią VEGF savybę minėtų tyrimų autoriai panaudojo tinklainės neovaskuliarizacijos indukcijai gyvūnuose, siekiant sukurti efektyvų modelį antineovaskuliarinių vaistų testavimui. Pagrindinis VEGF modelio pranašumas yra greitai išsivystanti neovaskuliarizacija, kuri triušiams pasireiškia jau pirmosiomis dienomis po injekcijos. Neovaskuliarizacijos modeliuose yra vertinami morfologiniai vaizdinimo parametrai ir histologiniai pokyčiai, tačiau praktikoje nėra atlikta funkcinio modelio įvertinimo atliekant tinklainės elektrofiziologinius tyrimus. Toks modelis padėtų įvertinti ne tik morfologinius bet ir funkcinis pokyčius. Todėl šio darbo metu buvo vertinami elektrofiziologiniai VEGF neovaskuliarizacijos modelio parametrai ir jų koreliacija su morfologiniais tinklainės pokyčiais.

4.1 VEGF koncentracijos nustatymo eksperimentas

Literatūroje apžvelgtuose tyrimuose VEGF koncentracija, kuria buvo indukuojamas neovaskuliarizacijos modelis triušiuose varijuoja tarp tyrimų. Dėl to pirmojo eksperimento tikslas buvo nustatyti optimalią VEGF koncentraciją modeliui indukuoti. Tyrimo rezultatai parodė, kad 5000 ng intravitrealinė VEGF injekcija yra efektyvus būdas sukelti neovaskuliarizaciją triušių tinklainėje. 3.1 ir 3.2 pav. FA nuotraukose matomi ryškūs morfologiniai skirtumai tarp 5000 ng konc. ir likusių grupių. Jau 2-trą dieną po injekcijos 5000 ng grupėje pradėjo ryškėti kraujagyslių vingiuotumas (angl. *tortuosity*) ir išsiplėtimas, kurie 4-tą dieną progresavo į kraujagyslinio subretinalio skysčio difuziją (angl. *vascular leakage*). 3.1 Grafike akivaizdžiai matomas kraujagyslinio nuotėkio ploto padidėjimo skirtumas tarp 5000 ng grupės ir kitų trijų grupių. Taip pat 3.3 pav. OKT metu gauti tinklainės skanavimai rodė naujo kraujagyslinio sluoksnio susidarymą 4-tą dieną. Kitų autorių tyrimuose (Ameri et al., 2007), fluorescencinis nuotėkis išryškėjo 7-ios dienos po injekcijos ir jų manymu tai tinkamiausias laikas injekuoti antivaskuliarinius preparatus. Tačiau autoriai neatsižvelgė į tai, jog jie atliko *in vivo* vaizdinimą tik 0-ąją ir 7-tą dieną, dėl šios

priežasties nebuvo tiksliai įvertinta kaip patologija progresuoja pirmosiomis dienomis. Šio tyrimo metu gauti FA duomenys rodo, kad ryškus kraujagyslinis nuotėkis prasideda jau 4-tą dieną po intravitrealinės VEGF injekcijos ir tai yra efektyvesnis laikas antivaskuliariųjų vaistų injekcijai siekiant sustabdyti neovaskuliarizaciją. Šiame tyrime ir kitų autorių rezultatuose (Ameri et al., 2007; Badaro et al., 2014) pastebėta, jog 10-tą dieną po VEGF injekcijos neovaskuliarizacija ir kraujagyslinis nuotėkis išnyksta, tinklainės kraujagyslės surandėja. Iš to galime daryti išvadą, kad šie procesai yra priklausomi nuo VEGF koncentracijos. Norint išlaikyti naujų kraujagyslių susidarymą yra reikalingas tam tikras VEGF kiekis, kuris jungtųsi prie endotelio ląstelių VEGF tirozino kinazės receptorių ir palaikytų neovaskuliarizaciją. VEGF koncentracijai sumažėjus iki tam tikros ribos prasideda kraujagyslių regresija.

Išanalizavus pirmojo eksperimento tinklainės pokyčius ir rezultatus antrajame tyrime buvo pasirinkta 5000 ng VEGF koncentracijos intravitrealinė injekcija neovaskuliarizacijai indukuoti, kadangi šios grupės tinklainėse jau 4-tą dieną pastebėtas kraujagyslinis nuotėkis ir struktūriniai kraujagyslių pokyčiai.

4.2 Modelio validavimo eksperimentas

Vienas iš didžiausių iššūkių kuriant tinkamus gyvūnų modelius, kurie sudarytų sąlygas vaistinių medžiagų efektyvumo tyrimams yra morfologinė ir funkcinė jų charakterizacija. Mūsų tyrimo pranašumas prieš anksčiau atliktas studijas yra funkcinis modelio įvertinimas elektroretinografijos metodu. Abiejose tyrimo grupėse 4-tą dieną po 5000 ng injekcijos buvo sėkmingai indukuota patologija. *In vivo* vaizdinimo metu matoma neovaskuliarizacija ir kraujagyslinis nuotėkis, o elektrofiziologijos duomenys rodė bipolinių ląstelių atsako sumažėjimą. Išanalizavus gautus duomenis išryškėja tendencija, jog didėjant kraujagyslinio nuotėkio plotui tendencingai mažėja elektrofiziologinis tinklainės ląstelių atsakas į šviesos stimulą (pav. 3.2 ir 3.3).

Akių ligų ikiklinikinių tyrimų modeliuose svarbu jog patologiniai procesai būtų efektyvūs ir tinkami vaistų testavimui. Stipriai sužalotos akies struktūros gali visiškai nereaguoti į gydymą ir toks modelis yra netinkamas nustatyti vaistų efektyvumui. Šiame tyrime pavyko indukuoti efektyvius patologinius pokyčius, kuriuos sustabdė antivaskuliarinis preparatas afliberceptas. Įvertinus afliberceptu gydytos ir kontrolinės grupių kraujagyslinio nuotėkio plotą 6-tą, 8-tą ir 10-tą dieną matomas statistiškai reikšmingas skirtumas (6-ta ir 8-ta diena $p < 0,0001$, 10-ta diena $p = 0,0059$). Panašūs rezultatai gauti Ameri et al., 2007 tyrime, 2-tą dieną po antivaskuliariųjų vaistų injekcijos VEGF yra inaktyvuojamas ir sustabdomai neovaskuliarizacijos bei subretinalinio skysčio difuzijos procesai. Mūsų vaisto testavimo tyrime panašūs rezultatai gauti ir atlikus

elektroretinografiją. 6-tą dieną apskaičiavus kontrolinės ir aflibercepto grupių b bangų amplitudes, gaunamas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p = 0,0346$). Aštuntą ir dešimtą eksperimento dieną buvo matomas skirtumas tačiau statistinio patikimumo jis nepasiekė (6-tos dienos p reikšmė buvo 0,1552, o 8-tos – 0,1605). Literatūroje yra akcentuojama, jog triušių ERG atsakų variabilumas yra gana didelis (Ioshimoto et al., 2018) ir tai galėtų būti viena priežasčių, kodėl šiomis dienomis nebuvo gautas statistinis patikimumas. Skirtingi rezultatai gauti įvertinus A bangų amplitudes, po aflibercepto injekcijos fotoreceptorių atsakas nepakito, o kontrolinėje grupėje neatsistatė. Tai būtų galima paaiškinti, jog negydoma neovaskuliarizacija ląsteliniu lygiu negrįžtamai pažeidžia tinklainės pigmentinio epitelio ir fotoreceptorių sluoksnių ląsteles. Taip pat patologija nepasiekia giliau esančių bipolinių ląstelių, tačiau jų atsakas sumažėja, nes jos yra mechaniškai uždengiamos naujai susidariusių kraujagyslių ir padidėjusio kraujagyslinio nuotėkio. Tačiau negalima daryti tikslių išvadų ar funkciniai nervinių ląstelių pakitimai buvo sukelti mechaninio uždengimo ar ląstelinio pažeidimo. Norint detaliau išanalizuoti VEGF daromą žalą tinklainės ląstelėms reikia atlikti histologinius tyrimus ir įvertinti ląstelių struktūrinius pokyčius.

Apžvelgus tyrimo rezultatus išryškėja pagrindiniai VEGF modelio pranašumai prieš kitus neovaskuliarizacijos modelius. Visų pirma jis yra greitai ir lengvai indukuojamas. Indukcijai užtenka vienos intravitrealinės VEGF injekcijos į triušio akį ir jau po poros dienų išryškėja pirmieji tinklainės kraujagyslinio ir nervinio audinio pokyčiai. Atsiranda neovaskuliarizacija, kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuzija, kraujagyslių vingiuotumas ir sumažėja bipolinių ląstelių atsakas į šviesos stimulą. Taip pat modelis yra lengvai atkartojamas, po indukcijos beveik visiems triušiams atsiranda vienodi morfologiniai ir funkciniai pakitimai. Be to, tyrime panaudoti triušiai gali būti panaudojami kitiems tyrimams, kadangi modelio patologiniai parametrai tiesiogiai priklauso nuo VEGF koncentracijos. Jai sumažėjus tinklainės kraujagyslinio audinio neovaskuliarizacija išnykta ir atsistato bipolinių ląstelių elektrofiziologinis atsakas. Galiausiai dėl aiškiai charakterizuotų parametrų šis modelis yra patikimas vertinant antivaskuliarinių vaistų spontaninį veikimą. Tačiau svarbu atkreipti dėmesį, jog triušio akies tinklainės kraujagyslių sistema skirtingai nei žmogaus yra tik dalinai vaskuliarizuota, todėl prieš pereinant į klinikinių tyrimų fazę rezultatams patvirtinti reikėtų atlikti tyrimus su kitais gyvūnais ir skirtingomis DR modelių sistemomis. Verta paminėti, jog šis modelis atkartoja tik dalį visų DR simptomų, kurie pasireiškia žmonėms. Ilgalaiams tyrimams, kai DR simptomai išsivysto dėl hipoglikemijos yra tinkamesni streptozotocino, dietos arba transgeninių gyvūnų modeliai.

IŠVADOS

1. Įvertinus tinklainės kraujagyslinio tinklo morfologinius pokyčius *in vivo* vaizdinimo metu ir apskaičiavus kraujagyslinio subretinalinio skysčio difuziją buvo nustatyta, jog 5000 ng koncentracijos intravitrealinė VEGF injekcija yra efektyvi modelio indukcijai.
2. Tinklainės kraujagysliniame audinyje 4-tą dieną po VEGF injekcijos prasidėjo neovaskuliarizacija ir subretinalinio skysčio difuzija, kurie yra grįžtami procesai. Laiko eigoje sumažėjus VEGF koncentracijai savaime arba inaktyvavus VEGF antivaskuliariniais vaistais morfologiniai patologiniai pokyčiai išnyksta.
3. 4 dieną po VEGF injekcijos sumažėjo tinklainės bipolinių ląstelių b bangos amplitudė, tačiau injekavus afliberceptą ląstelių atsakas atsistato. Negydant bipolinių ląstelių atsakų atsistatymas trunka ilgiau ir grįžta į pradinį lygį 10-tą dieną po modelio indukcijos.
4. DR modelis yra greitas, lengvai atkartojamas ir jam indukuoti užtenka vienos VEGF injekcijos. Ligos simptomatika pasireiškia jau 4 dieną po injekcijos. Taip pat šis modelis pasižymi aiškiai išreikštais morfologiniais ir elektrofiziologiniais kiekybiniais rodikliais, kurie yra jautrūs antivaskuliariniams vaistams.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Kernius Mickevičius

Magistro baigiamasis darbas

**Akies ikiklinikinio padidėjusio kraujagyslių pralaidumo modelio indukavimas
Dutch Belted triušiuose ir jo morfologinė bei funkcinė charakteristika**

SANTRAUKA

DR pasireiškia daugiau nei vienam trečdaliui asmenų sergančių diabetu ir tai yra viena pagrindinių priežasčių, sąlygojanti 24-70 metų amžiaus asmenų aklumą (Lee et al., 2015). Ši liga pasižymi tinklainės neovaskuliarizacija ir padidėjusiu kraujagyslių pralaidumu. Tyrimo metu buvo siekiama sukurti efektyvų ikiklinikinį ligos modelį, kuris pasižymėtų aiškiai įvertinamais morfologiniais ir funkciniais rodikliais vaistinių medžiagų testavimui. Patologija triušiuose buvo indukuota intravitrealinėmis VEGF injekcijomis. Modelis buvo charakterizuojamas vertinant morfologinius parametrus optinės koherentinės tomografijos ir fluorescencinės angiografijos metodais bei elektrofiziologinius parametrus nustatant bipolinių ir fotoreceptorių ląstelių atsaką. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad modelio indukcijai efektyviausia VEGF dozė yra 5000 ng. Modelis pasižymėjo neovaskuliarizacija, kraujagyslinio subretinalio skysčio difuziją ir sumažėjusiu bipoliniu ląstelių atsaku. Intravitrealinėmis vaistinio preparato aflibecepto injekcijomis gydytoje triušių grupėje 4 dieną po modelio indukcijos buvo sustabdyti patologiniai pokyčiai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Kernius Mickevičius

Master thesis

Induction of a preclinical ocular vascular permeability model in *Dutch Belted* rabbits and its functional and morphological characterization

SUMMARY

DR affects more than one-third of people with diabetes and it is one of the leading causes of blindness in individuals aged 24–70 years (Lee et al., 2015). The disease is characterized by retinal neovascularization and increased vascular permeability. The aim of the study was to develop an effective preclinical model of the disease with clearly measurable morphological and functional parameters for drug testing. Pathology in rabbits was induced by intravitreal VEGF injections. The model was characterized by evaluating morphological parameters using optical coherence tomography and fluorescein angiography methods. Functional parameters of this model were assessed using electrophysiological methods by determining the response of bipolar and photoreceptor cells. The results of the study revealed that the effective VEGF dose to induce the model is 5000 ng. The model was characterized by neovascularization, vascular leak and decreased bipolar cell response. Day 4 intravitreal injection of aflibercept reversed pathological changes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ameri, H., Chader, G.J., Kim, J.-G., Sadda, S.R., Rao, N.A., and Humayun, M.S. (2007). The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and normal capillaries in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5708–5715.
2. Arden, G.B., and Sivaprasad, S. (2012). The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 124, 15–26.
3. Bach, M., Brigell, M.G., Hawlina, M., Holder, G.E., Johnson, M.A., McCulloch, D.L., Meigen, T., and Viswanathan, S. (2013). ISCEV standard for clinical pattern electroretinography (PERG): 2012 update. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 126, 1–7.
4. Badaro, E., Novais, E.A., Abdala, K., Chun, M., Urias, M., de Arruda Melo Filho, P.A., Farah, M.E., and Rodrigues, E.B. (2014). Development of an Experimental Model of Proliferative Retinopathy by Intravitreal Injection of VEGF165. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 30, 752–756.
5. Barber, A.J., Lieth, E., Khin, S.A., Antonetti, D.A., Buchanan, A.G., and Gardner, T.W. (1998). Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.* 102, 783–791.
6. Belusic, G. (2011). Electroretinograms.
7. Borrelli, E., Sarraf, D., Freund, K.B., and Sadda, S.R. (2018). OCT angiography and evaluation of the choroid and choroidal vascular disorders. *Prog. Retin. Eye Res.* 67, 30–55.
8. Boulton, M., and Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* 15, 384–389.
9. Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2012). Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica* 227, 1–19.
10. Cai, X., and McGinnis, J.F. (2016). Diabetic Retinopathy: Animal Models, Therapies, and Perspectives. *J. Diabetes Res.* 2016.
11. CATT Research Group, Martin, D.F., Maguire, M.G., Ying, G., Grunwald, J.E., Fine, S.L., and Jaffe, G.J. (2011). Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 364, 1897–1908.
12. Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., Beaudoin, F., Leboeuf, D., De Guire, V., Binet, F., et al. (2013). Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab.* 18, 505–518.
13. Chan, N.C.Y., and Chan, C.K.M. (2017). The use of optical coherence tomography in neuro-ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 28, 552–557.
14. Cicinelli, M.V., Cavalleri, M., Brambati, M., Lattanzio, R., and Bandello, F. (2019). New imaging systems in diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.*

15. Cote, R. (2006). Photoreceptor phosphodiesterase (PDE6): a G-protein-activated PDE regulating visual excitation in rod and cone photoreceptor cells. *Mol. Cell. Biomed. Sci. Scholarsh.*
16. Curcio, C.A., and Allen, K.A. (1990). Topography of ganglion cells in human retina. *J. Comp. Neurol.* *300*, 5–25.
17. Dettoraki, M., and Moschos, M.M. (2016). The Role of Multifocal Electroretinography in the Assessment of Drug-Induced Retinopathy: A Review of the Literature. *Ophthalmic Res.* *56*, 169–177.
18. Ding, J.-D., Salinas, R.Y., and Arshavsky, V.Y. (2015). Discs of mammalian rod photoreceptors form through the membrane evagination mechanism. *J. Cell Biol.* *211*, 495–502.
19. Drago, F., La Manna, C., Emmi, I., and Marino, A. (1998). Effects of sulfinpyrazone on retinal damage induced by experimental diabetes mellitus in rabbits. *Pharmacol. Res.* *38*, 97–100.
20. Duffy, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2013). *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF* (Landes Bioscience).
21. Duh, E.J., Sun, J.K., and Stitt, A.W. (2017). Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight* *2*.
22. Edelman, J.L., Lutz, D., and Castro, M.R. (2005). Corticosteroids inhibit VEGF-induced vascular leakage in a rabbit model of blood–retinal and blood–aqueous barrier breakdown. *Exp. Eye Res.* *80*, 249–258.
23. Eeden, P.E. van, Tee, L.B.G., Lukehurst, S., Lai, C.-M., Rakoczy, E.P., Beazley, L.D., and Dunlop, S.A. (2006). Early Vascular and Neuronal Changes in a VEGF Transgenic Mouse Model of Retinal Neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 4638–4645.
24. Ferrara, N. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.* *25*, 581–611.
25. Fischer, M.D., Huber, G., Beck, S.C., Tanimoto, N., Muehlfriedel, R., Fahl, E., Grimm, C., Wenzel, A., Remé, C.E., van de Pavert, S.A., et al. (2009). Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. *PloS One* *4*, e7507.
26. Forrester, J.V., Dick, A.D., McMenamin, P.G., Roberts, F., and Pearlman, E. (2016). *The eye: basic sciences in practice* (Edinburgh New York: Saunders/Elsevier).
27. Gardner, T.W., and Davila, J.R. (2017). The Neurovascular Unit and the Pathophysiologic Basis of Diabetic Retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* *255*, 1–6.
28. Ghosh, K.K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A., and Wässle, H. (2004). Types of bipolar cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* *469*, 70–82.

29. Gordon, M.S., Margolin, K., Talpaz, M., Sledge, G.W., Holmgren, E., Benjamin, R., Stalter, S., Shak, S., and Adelman, D. (2001). Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *19*, 843–850.
30. Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *The Lancet* *368*, 1795–1809.
31. Heintz, E., Wiréhn, A.-B., Peebo, B.B., Rosenqvist, U., and Levin, L.-A. (2010). Prevalence and healthcare costs of diabetic retinopathy: a population-based register study in Sweden. *Diabetologia* *53*, 2147–2154.
32. Heng, L.Z., Comyn, O., Peto, T., Tadros, C., Ng, E., Sivaprasad, S., and Hykin, P.G. (2013). Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *30*, 640–650.
33. HOGAN, M. (1971). *Histology of the Human Eye. Atlas Textb.*
34. Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., et al. (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11393–11398.
35. Hood, D.C., Bach, M., Brigell, M., Keating, D., Kondo, M., Lyons, J.S., Marmor, M.F., McCulloch, D.L., and Palmowski-Wolfe, A.M. (2012). ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* *124*, 1–13.
36. Ibne Mokbul, M. (2017). *Optical Coherence Tomography: Basic Concepts and Applications in Neuroscience Research. J. Med. Eng.* *2017*.
37. Ioshimoto, G.L., Camargo, A.A., Liber, A.M.P., Nagy, B.V., Damico, F.M., and Ventura, D.F. (2018). Comparison between albino and pigmented rabbit ERGs. *Doc. Ophthalmol.* *136*, 113–123.
38. Kern, T.S., Miller, C.M., Tang, J., Du, Y., Ball, S.L., and Berti-Matera, L. (2010). Comparison of three strains of diabetic rats with respect to the rate at which retinopathy and tactile allodynia develop. *Mol. Vis.* *16*, 1629–1639.
39. Kim, L.A., and D’Amore, P.A. (2012). A Brief History of Anti-VEGF for the Treatment of Ocular Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *181*, 376–379.
40. Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006502.
41. Kohzaki, K., Vingrys, A.J., and Bui, B.V. (2008). Early Inner Retinal Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 3595–3604.
42. Kolb, H. (1995). *Gross Anatomy of the Eye. In Webvision: The Organization of the Retina and Visual System, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.*

43. Kolb, H., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1992). Neurons of the human retina: A Golgi study. *J. Comp. Neurol.* *318*, 147–187.
44. Lai, A.K.W., and Lo, A.C.Y. (2013). Animal Models of Diabetic Retinopathy: Summary and Comparison.
45. Lee, R., Wong, T.Y., and Sabanayagam, C. (2015). Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis. Lond. Engl.* *2*, 17.
46. Liu, C.-H., Wang, Z., Sun, Y., and Chen, J. (2017). Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *31*, 4665–4681.
47. Ljubimov, A.V., Burgeson, R.E., Butkowski, R.J., Couchman, J.R., Zardi, L., Ninomiya, Y., Sado, Y., Huang, Z.S., Nesburn, A.B., and Kenney, M.C. (1996). Basement membrane abnormalities in human eyes with diabetic retinopathy. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *44*, 1469–1479.
48. Lumbroso, B., Rispoli, M., and Rosen, R. (2007). Understanding spectral oct (Roma: I.N.C. innovation-news-communication).
49. MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme Diversity among Amacrine Cells: Implications for Function. *Neuron* *20*, 971–982.
50. Mehta, D., and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* *86*, 279–367.
51. Miller, J.W. (1997). Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am. J. Pathol.* *151*, 13–23.
52. Miller, J.W., Adamis, A.P., Shima, D.T., D’Amore, P.A., Moulton, R.S., O’Reilly, M.S., Folkman, J., Dvorak, H.F., Brown, L.F., and Berse, B. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.* *145*, 574–584.
53. Olivares, A.M., Althoff, K., Chen, G.F., Wu, S., Morrisson, M.A., DeAngelis, M.M., and Haider, N. (2017). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr. Diab. Rep.* *17*, 93.
54. Park-Windhol, C., and D’Amore, P.A. (2016). Disorders of Vascular Permeability. *Annu. Rev. Pathol.* *11*, 251–281.
55. Pearson, J.A., Wong, F.S., and Wen, L. (2016). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* *66*, 76–88.
56. Pescosolido, N., Barbato, A., Stefanucci, A., and Buomprisco, G. (2015). Role of Electrophysiology in the Early Diagnosis and Follow-Up of Diabetic Retinopathy.
57. Remington, L.A., and Remington, L.A. (2012). Clinical anatomy and physiology of the visual system (St. Louis, Mo: Elsevier/Butterworth Heinemann).

58. Rimvydas Stropus, Kazys Algimantas Tamašauskas, and Neringa Paužienė (2005). Žmogaus anatomija.
59. Robinson, R., Barathi, V.A., Chaurasia, S.S., Wong, T.Y., and Kern, T.S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis. Model. Mech.* 5, 444–456.
60. Rosenfeld, P.J., Moshfeghi, A.A., and Puliafito, C.A. (2005). Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging Off. J. Int. Soc. Imaging Eye* 36, 331–335.
61. Sabanayagam, C., Yip, W., Ting, D.S.W., Tan, G., and Wong, T.Y. (2016). Ten Emerging Trends in the Epidemiology of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol.* 23, 209–222.
62. Shah, A.R., and Gardner, T.W. (2017). Diabetic retinopathy: research to clinical practice. *Clin. Diabetes Endocrinol.* 3, 9.
63. Shin, H.J., Lee, S.H., Chung, H., and Kim, H.C. (2012). Association between photoreceptor integrity and visual outcome in diabetic macular edema. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 250, 61–70.
64. Simó, R., Stitt, A.W., and Gardner, T.W. (2018). Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia* 61, 1902–1912.
65. Sridhar, M.S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J. Ophthalmol.* 66, 190–194.
66. Stitt, A.W., Curtis, T.M., Chen, M., Medina, R.J., McKay, G.J., Jenkins, A., Gardiner, T.A., Lyons, T.J., Hammes, H.-P., Simó, R., et al. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 156–186.
67. Sydorova, M., and Lee, M.S. (2005). Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res.* 37, 188–190.
68. Tsukamoto, Y., and Omi, N. (2017). Classification of Mouse Retinal Bipolar Cells: Type-Specific Connectivity with Special Reference to Rod-Driven AII Amacrine Pathways. *Front. Neuroanat.* 11.
69. Wirostko, B., Wong, T.Y., and Simó, R. (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog. Retin. Eye Res.* 27, 608–621.
70. Wu, L., Acón, D., Wu, A., and Wu, M. (2019). Vascular endothelial growth factor inhibition and proliferative diabetic retinopathy, a changing treatment paradigm? *Taiwan J. Ophthalmol.* 9, 216–223.
71. Zernii, E.Y., Baksheeva, V.E., Iomdina, E.N., Averina, O.A., Permyakov, S.E., Philippov, P.P., Zamyatnin, A.A., and Senin, I.I. (2016). Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 15, 267–291.

72. Zheng, Y., He, M., and Congdon, N. (2012). The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J. Ophthalmol.* 60, 428–431.