



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 57.089

EDN LINDCS

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-2-233-245>

Усовершенствованная процедура интравитреальных инъекций мышам с электроретинографической оценкой результатов

И. С. Романов^{1,2}, А. Ю. Ротов², Л. А. Астахова^{✉2}, М. Л. Фирсов²

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Сведения об авторах

Иван Сергеевич Романов, e-mail: sacco.di.riso@gmail.com

Александр Юрьевич Ротов, SPIN-код: 2142-5480, Scopus AuthorID: [57194768778](https://orcid.org/57194768778), ResearcherID: [K-2543-2018](https://orcid.org/K-2543-2018), ORCID ID: [0000-0002-7903-6262](https://orcid.org/0000-0002-7903-6262), e-mail: rotovau@gmail.com

Любовь Александровна Астахова, SPIN-код: 1828-5971, Scopus AuthorID: [55178656000](https://orcid.org/55178656000), ResearcherID: [K-2233-2018](https://orcid.org/K-2233-2018), ORCID ID: [0000-0003-3162-2446](https://orcid.org/0000-0003-3162-2446), e-mail: lubkins@yandex.ru

Михаил Леонидович Фирсов, SPIN-код: 2378-4778, Scopus AuthorID: [16156463600](https://orcid.org/16156463600), ResearcherID: [E-8837-2018](https://orcid.org/E-8837-2018), ORCID ID: [0000-0001-9395-1160](https://orcid.org/0000-0001-9395-1160), e-mail: michael.firsov@gmail.com

Для цитирования: Романов, И. С., Ротов, А. Ю., Астахова, Л. А., Фирсов, М. Л. (2022) Усовершенствованная процедура интравитреальных инъекций мышам с электроретинографической оценкой результатов. *Интегративная физиология*, т. 3, № 2, с. 233–245. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-2-233-245>
EDN LINDCS

Получена 21 апреля 2022; прошла рецензирование 3 июня 2022; принята 5 июня 2022.

Финансирование: Исследование было выполнено при поддержке гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ Павловский центр «Интегративная физиология — персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».

Права: © И. С. Романов, А. Ю. Ротов, Л. А. Астахова, М. Л. Фирсов (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. В настоящее время в научном сообществе активно исследуются и внедряются в практику методы лечения широко распространенных патологий органа зрения, поражающих сетчатку глаза. Как в клинических условиях, так и при исследованиях новых методов лечения дегенеративных и других заболеваний сетчатки для доставки терапевтических веществ все чаще используют инъекции в стекловидное тело глаза (интравитреальные инъекции, ИВИ). И хотя к настоящему времени данная процедура применительно к человеку уже достаточно хорошо изучена и отработана, существует необходимость делать такие инъекции модельным животным, в частности мышам, чей глаз по многим параметрам существенно отличается от человеческого. В настоящей работе описан пройденный нами путь усовершенствования техники ИВИ мышам, в ходе которого влияние разных условий проведения инъекции на функциональное состояние сетчатки оценивали методом прижизненной электроретинографии. В качестве итога нашей работы предложен эффективный и безопасный протокол ИВИ для введения различных веществ в глаз мыши, который позволит оценивать возможные, в том числе неблагоприятные эффекты самого вводимого вещества, а не последствия процедуры инъекции.

Ключевые слова: интравитреальная инъекция, сетчатка, модельные животные, электроретинография, глаз, стекловидное тело

Improved intravitreal injection procedure in mice with electroretinographic evaluation of results

I. S. Romanov^{1,2}, A. Yu. Rotov², L. A. Astakhova^{✉2}, M. L. Firsov²

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thorez Ave., Saint Petersburg 194223, Russia

Authors

Ivan S. Romanov, e-mail: sacco.di.riso@gmail.com

Alexander Yu. Rotov, SPIN: 2142-5480, Scopus AuthorID: 57194768778, ResearcherID: K-2543-2018, ORCID ID: 0000-0002-7903-6262, e-mail: rotovau@gmail.com

Luba A. Astakhova, SPIN: 1828-5971, Scopus AuthorID: 55178656000, ResearcherID: K-2233-2018, ORCID ID: 0000-0003-3162-2446, e-mail: lubkins@yandex.ru

Michael L. Firsov, SPIN: 2378-4778, Scopus AuthorID: 16156463600, ResearcherID: E-8837-2018, ORCID ID: 0000-0001-9395-1160, e-mail: michael.firsov@gmail.com

For citation: Romanov, I. S., Rotov, A. Yu., Astakhova, L. A., Firsov, M. L. (2022) Improved intravitreal injection in mice with electroretinographic evaluation of results. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 2, pp. 233–245. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-2-233-245> EDN LINDCS

Received 21 April 2022; reviewed 3 June 2022; accepted 5 June 2022.

Funding: This study was supported by a grant from the Federal budget as part of the government programme that supports the creation and development of the world-class research center Pavlov Center for Integrative Physiology to Medicine, High-Tech Healthcare and Technologies of Stress Resistance.

Copyright: © I. S. Romanov, A. Yu. Rotov, L. A. Astakhova, M. L. Firsov, (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. At the present time vision pathologies affecting the retina are widespread. This prompts the scientific community to conduct research focusing on the methods of treating retinal conditions and their practical application. Injections of therapeutic agents into the vitreous body (intravitreal injections) are being increasingly used both in clinical settings and in research to develop new approaches in treating degenerative and other retinal diseases. The technique of human intravitreal injections is well-developed and sufficiently studied. However, there is also a need to apply intravitreal technique in model animals, in particular, in mice, whose eye is very much different from that of a human. The paper describes the steps we took to improve the technique of intravitreal injections in mice. We assessed the effect of different approaches to intravitreal injection on the retinal function by in vivo electroretinography. As a result, we propose an efficient and safe protocol for the intravitreal administration of various agents into the murine eye. The improved protocol allows to assess the possible adverse effects of the agent itself, rather than induced by injection.

Keywords: intravitreal injection, retina, model animals, electroretinography, eye, vitreous body

Введение

Внутриглазные инъекции и область их применения

Орган зрения позвоночных животных — глаз — состоит из глазного яблока и глазного нерва. Снаружи глаз покрыт фиброзной оболочкой; в передней части это прозрачная роговица, а в задней части — непрозрачная склера. С задней стороны изнутри глаз выстилает сетчатка, состоящая из нейронов, участвующих в восприятии светового стимула (рис. 1А). На сетчатку попадает свет, прошедший через зрачок и сфокусированный хрусталиком. Пространство за хрусталиком называется стекловидным телом и представляет собой матрикс, преимущественно

но состоящий из гликозаминогликанов (Rodieck 1998).

И в клинической практике, и в научных исследованиях есть потребность в доставке лекарственных средств внутрь глаза, в том числе в сетчатку. В таких случаях местный способ нанесения веществ (глазные капли) малоэффективен (Kim, Woo 2021). Поэтому прибегают к инъекциям, когда вещество с помощью иглы напрямую вводится внутрь глаза. В настоящее время с помощью инъекций доставляют широкий спектр веществ. Например, для терапии интраокулярной неоваскуляризации применяют ингибиторы фактора роста сосудистого эндотелия (Kim, Woo 2021; Korotkikh et al. 2019). В генной терапии дегенерации сетчатки и оптогенетических исследованиях различные типы

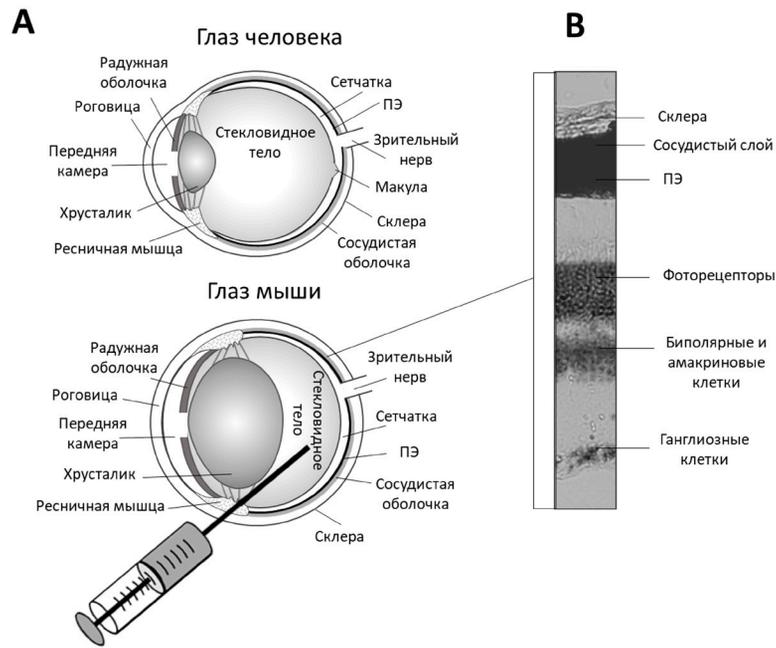


Рис. 1. Схема строения глаза человека и мыши (А) и поперечный срез глазного бокала мыши (В). ПЭ — пигментный эпителий (адаптировано из Veleri et al. 2015)

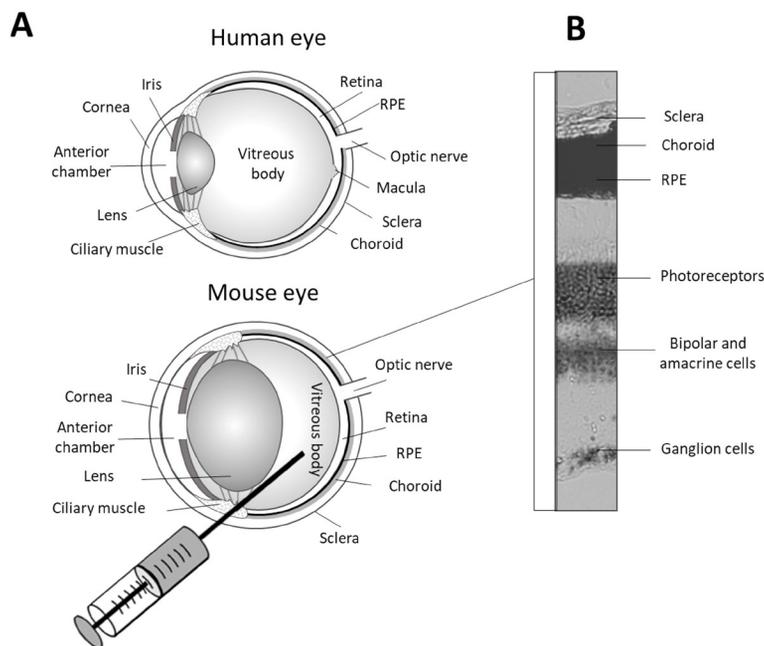


Fig. 1. Schematic view of human and mouse eye (A) and cross-section of the mouse eyecup (B). RPE—retinal pigment epithelium (adapted from Veleri et al. 2015)

инъекций используют для доставки внутрь глаза векторов — вирусов или синтетических наночастиц (Gorantla et al. 2020; Planul, Dalkara 2017; Rotov et al. 2021).

Мыши как модельный организм в исследованиях сетчатки

Существует множество модельных организмов для исследований патологий сетчатки.

Несомненно, наиболее близкой по строению к человеческой является сетчатка других приматов, прежде всего благодаря наличию у них центральной ямки. Однако эти животные не оптимальны для проведения исследований ввиду этических и экономических аспектов их содержания и сложностей в генетическом манипулировании для создания новых моделей.

Поэтому в большинстве случаев используют другие модельные организмы: например, для изучения генетических основ формирования глаза используют дрозофилу, а эмбрионального развития сетчатки — рыб (данио) (Veleri et al. 2015).

Наиболее часто модельными объектами для изучения дегенеративных заболеваний сетчатки служат грызуны — крысы, а еще чаще мыши. Несмотря на то, что глаз мыши имеет анатомические отличия от человеческого — более крупный хрусталик относительно глазного яблока и отсутствие центральной ямки в сетчатке (рис. 1А), основной план строения глаза и сетчатки един для большинства позвоночных (Veleri et al. 2015). Возбудимые клетки сетчатки всегда образуют упорядоченные слои и включают фоторецепторные, горизонтальные, биполярные, амакриновые и ганглиозные клетки (рис. 1В). Глиальные мюллеровские клетки пронизывают сетчатку и образуют пограничные мембраны, отделяющие сетчатку от пигментного эпителия и стекловидного тела соответственно. Важно, что в сетчатке мышей, как и у человека, преобладают фоторецепторы ночного зрения (палочки), а число дневных фоторецепторов (колбочек) сравнительно мало.

Преимущества мышей как модельных организмов включают простоту их содержания в лабораторных условиях, быстрое размножение и хорошо отработанные методы манипуляции геномом для создания моделей патологий сетчатки (Baugildin et al. 2021). Различные линии мышей с наследственной дегенерацией сетчатки на поздних стадиях патологии имеют сходную клиническую картину — полную потерю зрения в результате гибели фоторецепторов. Они различаются мутациями, вызывающими патологию, механизмами и скоростью гибели фоторецепторов и соотносятся с 40% известных заболеваний сетчатки у человека (Collin et al. 2020).

Пути доставки веществ внутрь глаза

Интравитреальная инъекция (ИВИ) — наиболее простой способ доставки веществ к сетчатке. Она проводится в стекловидное тело, после чего вещество должно пройти через внутриглазные барьеры, поэтому данная процедура чаще используется для воздействия на клетки внутренних слоев сетчатки (ганглиозные, амакриновые и биполярные). При правильном проведении ИВИ воздействие происходит на большую часть площади сетчатки, а риск возникновения различных осложнений минимален, хотя и требует введения вещества

в большей концентрации, чем методы, о которых будет сказано ниже (Ioshin 2017).

Помимо ИВИ, для доставки веществ в сетчатку на практике также применяются и считаются достаточно эффективными субретинальные (СРИ) и супрахориоидальные (СХИ) инъекции. При СРИ иглу проводят сквозь сетчатку, в область между фоторецепторами и пигментным эпителием. При таком пути введения материал быстрее поступает к сетчатке, и кроме того, можно использовать меньшие концентрации веществ, а значит снизить потенциальную токсичность. СРИ больше подходят для целевой доставки к фоторецепторам или горизонтальным клеткам, но число подвергшихся воздействию клеток будет ограничено небольшой областью вокруг точки введения. Также этот метод может быть опасен для сетчатки, так как ее легко повредить иглой или вызвать отслоение.

СХИ проводят в область сосудистой оболочки глаза, лежащей за пигментным эпителием, и в результате доставляемое вещество может попадать непосредственно в кровоток. Таким образом, оно разносится по всей площади сетчатки, избегая многих тканевых барьеров глаза, что повышает эффективность вводимого вещества. СХИ считаются более безопасными, чем СРИ; тем не менее существует риск отслойки сосудистой оболочки и кровоизлияния. Поэтому процедура введения, сложная сама по себе из-за пути введения через жесткую склеру, требует дополнительных предосторожностей — подбора подходящей длины иглы и прикладываемого давления при введении (Kim, Woo 2021).

Поскольку глаз мыши имеет небольшой размер при сравнительно крупном хрусталике, тонкие манипуляции, необходимые для проведения СРИ и СХИ, становятся еще более затруднительными. Таким образом, при работе с мышами в ряде случаев наиболее удобным становится метод с введением вещества в стекловидное тело. В случае человека эта методика также предпочтительна ввиду наименьшей инвазивности, поэтому отработка оптимального протокола проведения ИВИ модельным животным является актуальной задачей.

Прижизненная электроретинография как метод оценки состояния сетчатки

Часто после инъекции бывает необходимо оценивать состояние сетчатки, поскольку сама инъекция или доставляемый агент могут оказывать на ткани глаза неблагоприятное влияние. Для этих целей ценным способом оценки состояния сетчатки является прижизненная элек-

троретинография. Данный метод основан на изменении мембранного потенциала клеток сетчатки во время генерации ответа на свет. В результате изменяется потенциал на роговице глаза, который можно зарегистрировать с помощью накладываемых электродов.

Электроретинограмма (ЭРГ) отражает электрическую активность сетчатки, возникающую в ответ на световую стимуляцию. Форма и амплитуда компонент ЭРГ определяется вкладом разных типов клеток сетчатки, что позволяет использовать ее для дифференциальной оценки состояния всей ткани в целом. В ЭРГ выделяют 2 основных компоненты — а- и b-волны (рис. 2А). А-волна отражает ответ фоторецепторов — палочек и колбочек, а b-волна (обратной полярности) формируется преимущественно ответом ОН-биполярных клеток (Perlman 2015). Также в ЭРГ выделяют медленные компоненты, возникающие в результате активности мюллеровских клеток и клеток пигментного эпителия. Ответы горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток распространяются радиально в плоскости сетчатки (в отличие от фоторецепторов и биполярных клеток) и вносят незначительный вклад в ЭРГ (Leinonen, Tanila 2018).

Преимуществом электроретинографии является неинвазивность и простота проведения. Можно многократно прижизненно регистрировать ЭРГ у одного испытуемого животного, наблюдая эффект какого-либо воздействия в динамике сколь угодно долгое время (Тао et al. 2020).

В рамках данной работы мы апробировали различные протоколы проведения ИВИ лабораторным мышам с последующей оценкой состояния сетчатки путем регистрации ЭРГ. В качестве итога приведен оптимальный, на наш взгляд, протокол проведения таких инъекций, оказавший наименьшее влияние на функциональное состояние сетчатки. Такой протокол будет полезен для проведения исследований и доклинических испытаний препаратов, вводимых интравитреально.

Материалы и методы

Интравитреальные инъекции (ИВИ)

Для проведения ИВИ мышей наркотизируют путем внутримышечного введения тилетамин + золазепам («Золетил», 26,7 мг/кг веса животного) и ксилазина («Ксила», расчет 6,7 мг/кг), разведенных в физиологическом растворе для инъекций. Голову мыши фиксируют в держателе, позволяющем удерживать животное

в положении на боку для проведения инъекций в правый или левый глаз. Держатель был сконструирован в ИЭФБ РАН и аналогичен коммерческой модели SG-4N (Narishige). Для подавления мигательного рефлекса на глаз наносят местный анестетик — оксибупрокаин («Инокаин» 0,4% раствор, «Сентисс Рус»). Для визуализации движения иглы внутри глаза также наносят расширитель зрачка — тропикамид («Мидримакс» 0,8% раствор, «Сентисс Рус»). Все манипуляции с зафиксированным животным проводят под бинокулярным микроскопом МС-2-ZOOM («Микромед»).

Инъекцию проводят в два этапа: (I) глаз прокалывают одноразовой остроконечной иглой калибра 30G в области перехода между склерой и роговицей; (II) в место прокола вводят ультратонкую тупоконечную иглу (калибр 33G), присоединенную к гамильтоновскому шприцу (10 мкл), и раствор вводят в стекловидное тело (Kay et al. 2013). Конечный объем инъекции — 1,5–2 мкл. Отдельные этапы подготовки материалов и процедуры, отличавшиеся между протоколами, отработанными нами в рамках данной работы, описаны в последующих разделах.

Электроретинография

Для оценки функционального состояния сетчатки регистрацию ЭРГ проводили до инъекции, и далее спустя 1, 3, 7 и 14 дней после ее проведения. Эксперименты проводили на мышах дикого типа (линия C57Bl, питомник «Рапполово», Ленинградская область). Перед регистрацией ЭРГ мыши проходили темновую адаптацию в течение ночи. Эксперименты проводили в темной комнате, все манипуляции с животными выполняли при свете тусклого красного фонаря.

Процедуру регистрации ЭРГ проводили, как было описано ранее (Goriachenkov et al. 2021). На время регистрации ЭРГ мышей подвергали ингаляционному наркозу газовой смесью 2,5% изофлурана (Laboratorios Karizoo) и кислорода, на поверхность глаза наносили местный анестетик и расширитель зрачка. Ответ на световые стимулы регистрировали с помощью волосковых электродов с серебряным напылением с роговицы обоих глаз. Фиксацию электродов на глазах и их электрический контакт обеспечивали при помощи токопроводящего глазного геля «Видисик» (карбомер 0,2%, Bausch & Lomb) и наложения линз: прозрачной на стимулируемый светом глаз и черной на второй.

Протокол световой стимуляции включал в себя серию коротких (10–50 мс) вспышек зеленого света ($\lambda_{\max} = 525 \text{ нм}$) возрастающей интенсивности (от $5,8 \times 10^{-5}$ до $31,6 \text{ кд} \times \text{с/м}^2$).

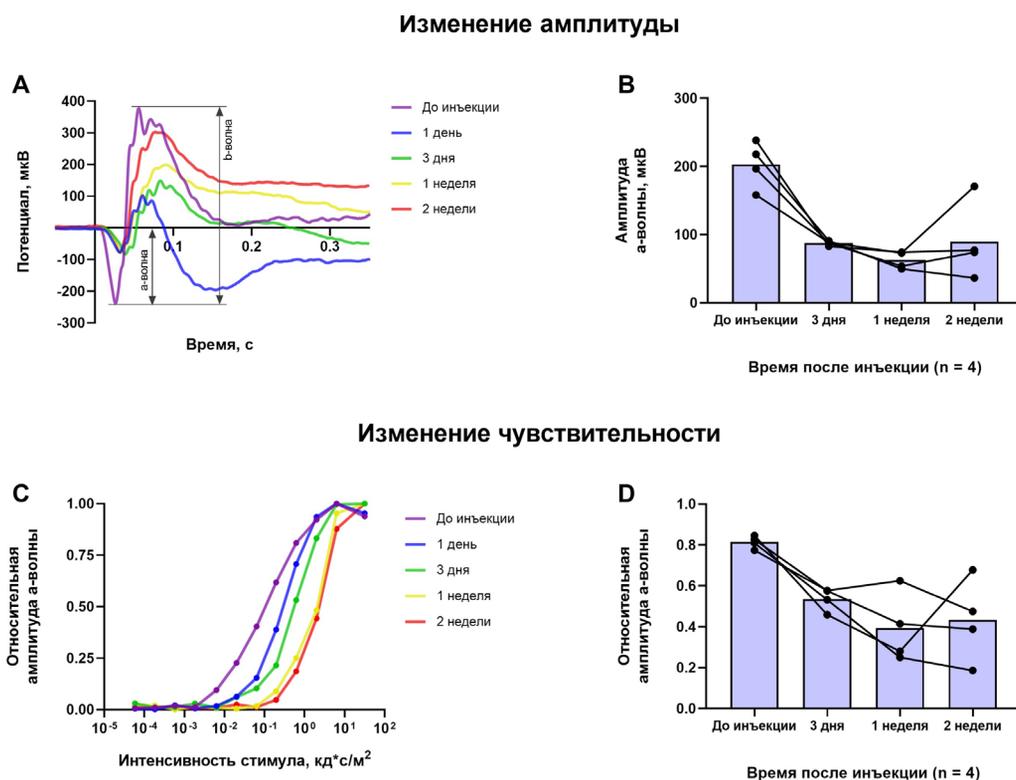


Рис. 2. Изменения в ЭРГ у мышей в разные временные точки после ИВИ ФСБ по первому протоколу. Приведены ответы и амплитуды для вспышки интенсивностью $0,62 \text{ кд} \times \text{с}/\text{м}^2$. (А) пример ответов, записанных до и после инъекции; (В) изменения в амплитуде а-волны ЭРГ; (С) пример зависимостей «ответ — интенсивность» для а-волны; (D) изменения относительной амплитуды а-волны (нормированной на максимальную), характеризующие сдвиг в чувствительности глаза

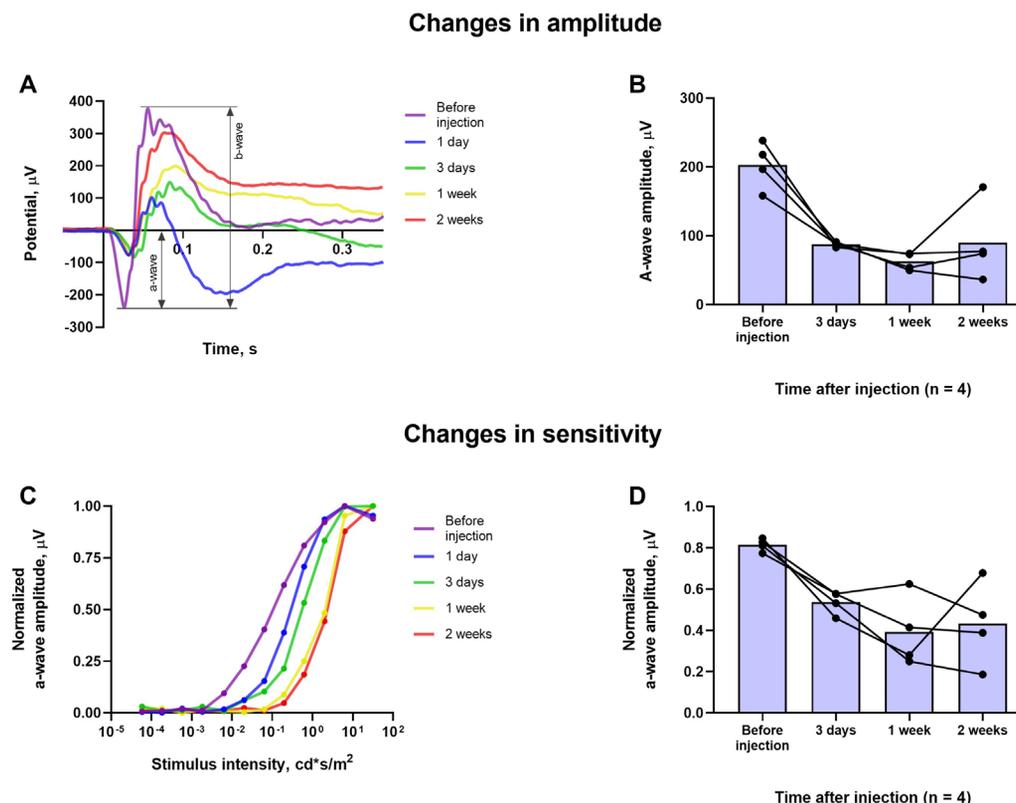


Fig. 2. Changes in ERGs recorded from murine eyes at different time points before and after intravitreal injection of PBS according to the first protocol. Given responses and amplitudes correspond to flashes with intensity $0.62 \text{ cd} \times \text{s}/\text{m}^2$. (A) an example of responses recorded before and after injection; (B) changes in the amplitude of the ERG a-wave; (C) an example of a-wave response-intensity curves; (D) changes in the normalised amplitude of the a-wave indicating a shift in the eye sensitivity

Ответы на вспышки регистрировали с помощью усилителя Model 3000 (A-M Systems), плат и программ LabView (National Instruments) с аналоговой низкочастотной фильтрацией 3 кГц и частотой дискретизации 1 мс/точку. Анализ ЭРГ включал в себя оценку амплитуды а-волны (отсчитывали от нулевой линии) и b-волны (отсчитывали от пика а-волны, рис. 2А), а также построение зависимостей «ответ — интенсивность» для оценки возможного сдвига чувствительности глаза к свету.

Первый вариант процедуры ИВИ

Первый из отработанных нами протоколов ИВИ предполагал введение 0,1 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), который был приготовлен из коммерческих реактивов (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Sigma-Aldrich) и проавтоклавирован. Имеются данные, что ФСБ не обладает токсическим действием на сетчатку (в отличие от физиологического раствора для инъекций) (Hombrebueno et al. 2014). Между процедурами по проведению инъекций ультратонкие иглы гамилтоновского шприца постоянно хранили в 70% этаноле, также иглы промывали последовательно этанолом и дистиллированной водой после каждой инъекции. По завершении инъекции на место прокола наносили мазь с антибиотиком тетрациклином (1%, «Татхимфармпрепараты»), а также гель «Корнерегель» (декспантенол 5%, Vausch & Lomb) для профилактики бактериальной инфекции и высыхания роговицы, соответственно. На время выхода из наркоза (1,5–3 часа) клетку с мышами размещали на термоковрике при температуре 30–35° С.

Регистрация ЭРГ на 1-й день после инъекции показала снижение амплитуд как а-, так и b-волны по сравнению с записями до инъекции. Также у ответов на вспышки высокой интенсивности наблюдали значительное увеличение амплитуды глиальной компоненты, что может свидетельствовать о развитии иммунного ответа в сетчатке. Спустя 1 и 2 недели форма ответов вернулась к норме, однако амплитуды а- и b-волны по-прежнему были сниженными, хотя у некоторых животных была тенденция к их увеличению (рис. 2А, В). Чувствительность глаза к световым стимулам снижалась после инъекций ФСБ, и у большинства животных продолжала уменьшаться со временем (рис. 2С, D). Причиной этого, вероятно, является постепенно нарастающее помутнение хрусталика, которое мы наблюдали по ходу регистрации ЭРГ на разных сроках после инъекции.

Второй вариант процедуры ИВИ

Второй вариант протокола отличался от первого по ряду пунктов подготовки: для инъекций использовали коммерческий, стерильный и апиrogenный 0,1 М ФСБ («Биолот»); препараты для местной анестезии глаза и расширения зрачка были предварительно профильтрованы (фильтр Millex-GV, Millipore, диаметр пор 0,22 мкм); стерилизацию ультратонких игл для инъекций производили не этанолом, а путем кипячения перед каждой инъекцией в воде в течение 5–10 минут. Также после инъекции мышам вводили антиседативный препарат атипамезол («Антимедин», из расчета 1 мг/кг веса животного) для быстрого выхода из наркоза (до 10 минут). В результате к мышам быстрее возвращается мигательный рефлекс, благодаря которому место прокола скрывается в конъюнктивальном мешке. Предположительно в этом случае риск развития инфекции ниже, чем при постоперационной обработке антибиотиком глаза мыши, медленно выходящей из наркоза (Campbell et al. 2012). Соответственно, на глаза мышам в рамках данного протокола антибиотик и глазной гель не наносили.

Анализ ЭРГ также выявил снижение амплитуды как а-волны, так и b-волны после инъекции по сравнению с записями, сделанными до нее, но менее выраженное, чем при первой версии протокола. Несмотря на то, что ко второй неделе у части животных сохранялась отрицательная динамика амплитуды а- и b-волн, патологического увеличения амплитуды глиальной компоненты не наблюдали ни у одного из них (рис. 3А, В). Следует также отметить, что чувствительность глаза после инъекций ФСБ по новому протоколу со временем практически не изменялась, и не развивалось помутнение хрусталика (рис. 3С, D). Таким образом, наши результаты показывают, что процедура ИВИ по новому протоколу является менее инвазивной, чем проведенная по первому протоколу.

Сравнение ФСБ и раствора Рингера в качестве растворителя для ИВИ

Дополнительно мы провели инъекции по второму протоколу, но вместо ФСБ вводили раствор Рингера, оптимизированный для сетчатки грызунов. Его состав (в мМ): 133,3 NaCl, 3,3 KCl, 2,0 MgCl₂, 1,0 CaCl₂, 10,0 глюкоза, 0,01 EDTA, 12,0 ХЕПЕС; pH 7,5 (Turunen, Koskelainen 2017). Перед ИВИ раствор профильтровали аналогично препаратам для местной анестезии и расширения зрачка (фильтр Millipore, 0,22 мкм). Результаты

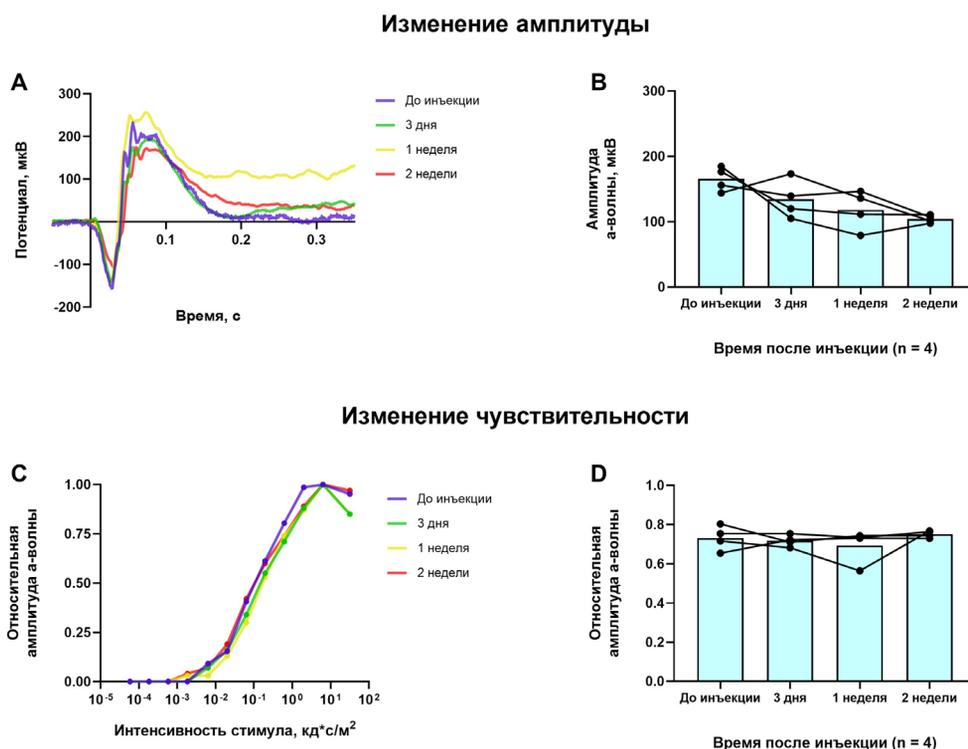


Рис. 3. Изменения в прижизненной ЭРГ у мышей в разные временные точки после ИВИ ФСБ по второму протоколу. Приведены ответы и амплитуды для вспышки интенсивностью $0,62 \text{ кд} \times \text{с}/\text{м}^2$. (А) пример ответов, записанных до и после инъекции; (В) изменения в амплитуде а-волны ЭРГ; (С) пример зависимости «ответ — интенсивность» для а-волны; (D) изменения относительной амплитуды а-волны (нормированной на максимальную), характеризующие сдвиг в чувствительности глаза

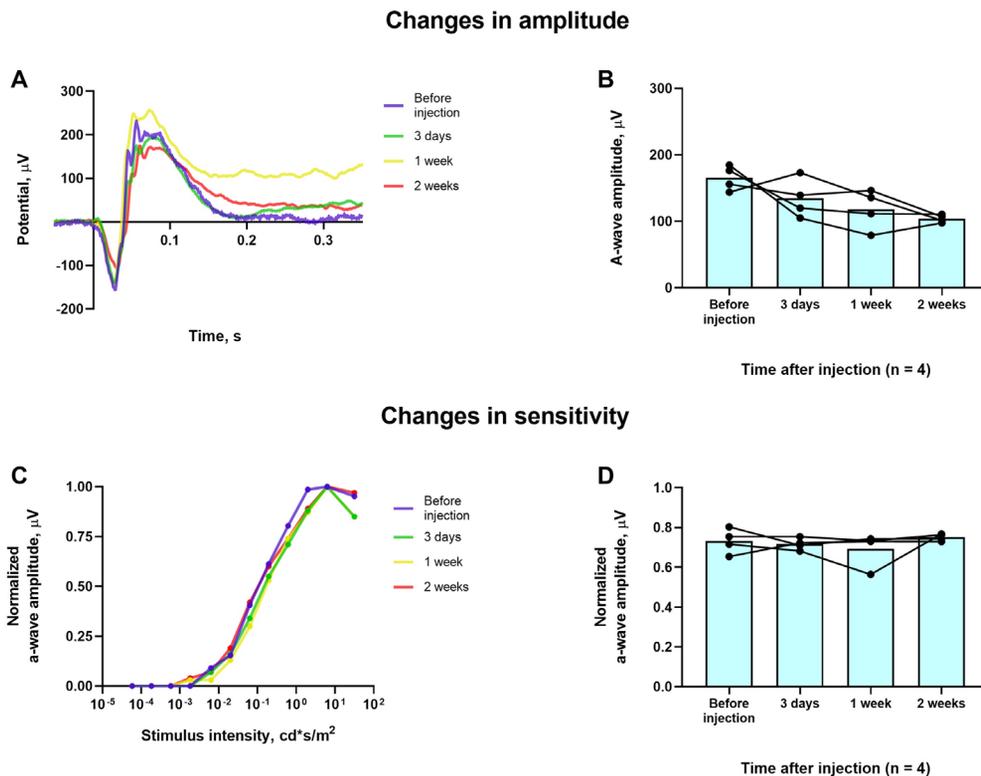


Fig. 3. Changes in ERGs recorded from murine eyes at different time points before and after intravitreal injection of PBS according to the second protocol. Given responses and amplitudes correspond to flashes with intensity $0.62 \text{ cd} \times \text{s} / \text{m}^2$. (A) an example of responses recorded before and after injection; (B) changes in the amplitude of the ERG a-wave; (C) an example of a-wave response-intensity curves; (D) changes in the normalised amplitude of the a-wave indicating a shift in the eye sensitivity

принципиально не отличались от инъекций ФСБ: амплитуды основных волн ЭРГ ко второй неделе после инъекции снижались незначительно, а патологической формы или снижения чув-

ствительности не наблюдали в течение всего периода наблюдения (рис. 4).

Таким образом, использование специализированного многокомпонентного раствора для

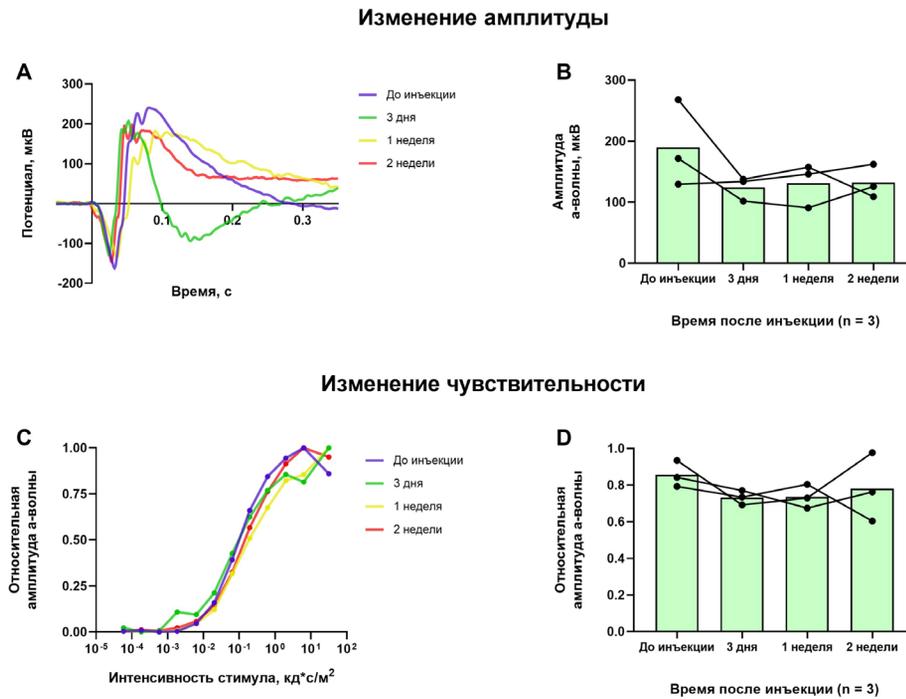


Рис. 4. Изменения в прижизненной ЭРГ у мышей в разные временные точки после ИВИ раствора Рингера по второму протоколу. Приведены ответы и амплитуды для вспышки интенсивностью $0,62 \text{ кд} \times \text{с}/\text{м}^2$. (А) пример ответов, записанных до и после инъекции; (В) изменения в амплитуде а-волны ЭРГ; (С) пример зависимостей «ответ — интенсивность» для а-волны; (D) изменения относительной амплитуды а-волны (нормированной на максимальную), характеризующие сдвиг в чувствительности глаза

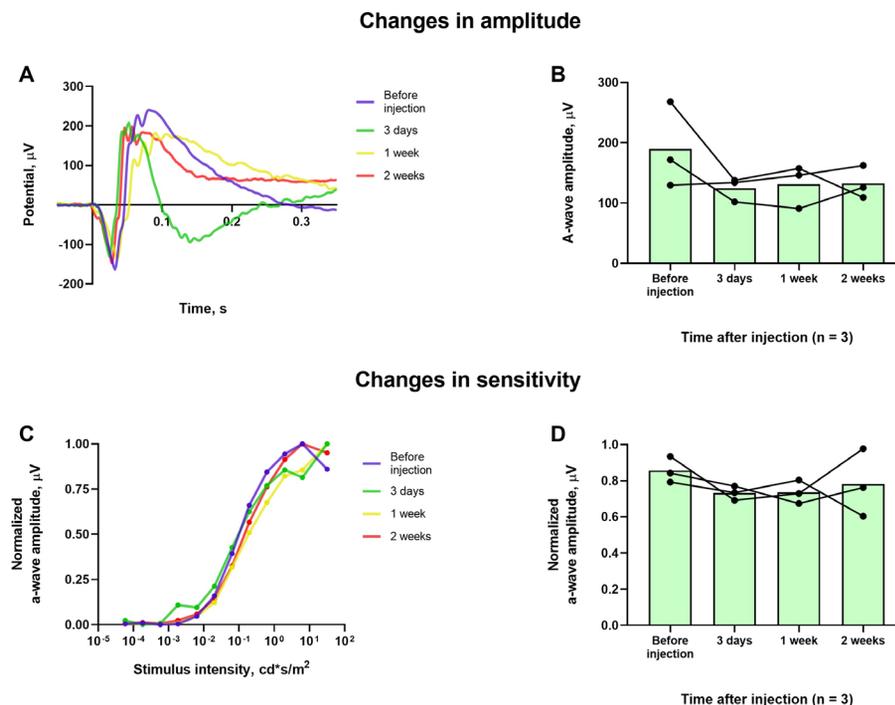


Fig. 4. Changes in ERGs recorded from murine eyes at different time points before and after intravitreal injection of PBS according to the second protocol. Given responses and amplitudes correspond to flashes with intensity $0.62 \text{ cd} \times \text{s}/\text{m}^2$. (A) an example of responses recorded before and after injection; (B) changes in the amplitude of the ERG a-wave; (C) an example of a-wave response-intensity curves; (D) changes in the normalised amplitude of the a-wave indicating a shift in the eye sensitivity

работы с сетчаткой не улучшило состояние сетчатки после ИВИ по сравнению с ФСБ. Оба растворителя можно использовать равноправно в зависимости от того, в каком вводимые вещества или векторы будут более стабильными.

Факторы, потенциально ухудшающие функцию сетчатки при ИВИ

Воспаление тканей глаза, вызванное проникновением микроорганизмов и чужеродных веществ

Долгосрочные изменения параметров ЭРГ могут быть связаны с соблюдением принципов асептики проведения ИВИ и чистотой (стерильностью) вводимых при этом растворов. Микроорганизмы — бактерии и вирусы из окружающей среды, попадая во внутреннюю среду глаза с поверхности инъекционных игл, с поверхности глаза, обработанного нестерильными каплями для расширения зрачка и (или) для анестезии, через прокол в склере после процедуры инъекции и в составе нестерильных вводимых растворов, способны вызвать тяжелое инфекционное воспаление тканей глаза. Такие случаи известны, хотя и с частотой в доли процента, даже у человека в клинической практике, где асептике уделяется пристальное внимание (Kim 2015; Wickremasinghet al. 2008). Такое осложнение у пациентов приводило к стремительному развитию патологии тканей глаза, сопровождающейся резким снижением зрения уже через 2–3 дня. Такая динамика коррелирует с тем, что мы наблюдали у некоторых испытуемых мышей в ранних экспериментах, когда принципам стерильности и асептики еще не уделялось достаточного внимания. Введение дополнительных мер по контролю над стерильностью инструментов, вводимых растворов, наносимых на глаз перед инъекцией глазных капель, значительно улучшило ситуацию с сохранением функции сетчатки мышей после инъекций.

Кроме того, по нашему мнению, нельзя исключать и потенциал неинфекционного воспаления. Одной из причин такого воспаления может стать введение в глаз растворителя, где микроорганизмы обезврежены, например, путем предварительного автоклавирования, но остаются их фрагменты, которые могут служить эндотоксинами (Rietschel et al. 1994). Поэтому на позднем этапе отработки методики ИВИ мы стали использовать коммерческий стерильный фосфатно-солевой буфер, который, насколько нам известно, лишен таких эндотоксинов (Hombrebueno et al. 2014). Кроме того, мы пред-

полагаем, что при стерилизации этиловым спиртом на игле может оставаться некоторое его количество, и дальнейшее попадание его в полость глаза даже в малом объеме может наносить вред сетчатке. Исходя из этого, мы заменили стерилизацию иглы между инъекциями разным животным этиловым спиртом на кипячение игл в воде в течение 5–10 минут.

Довольно спорным пунктом является нанесение препаратов антибиотиков на роговицу глаза мыши по завершении инъекции. В некоторых протоколах, специфичных для лабораторных грызунов, данная мера рекомендована, однако, согласно сведениям от специалистов из других научных групп, мазь антибиотика запечатывает область прокола и препятствует нормальному заживлению раны. При разработке оптимальной методики ИВИ мы отказались от нанесения антибактериальной мази и сделали ставку на быстрый (медикаментозный) вывод животных из наркоза и, как следствие, быстрое восстановление мигательного рефлекса и смачивание поверхности глаза слезной жидкостью, которая, как мы предполагаем, является естественным антисептиком для склеры и роговицы.

Изменение уровня внутриглазного давления

Как для пациентов в клинической практике, так и для глаза модельных животных показано, что ИВИ приводят к повышению внутриглазного давления (ВГД) (Bauer et al. 2021; Mears 2018; Pierscionek et al. 2007). В то же время его изменение временно, и гомеостатический механизм глаза быстро выравнивает его до исходного уровня (Bubnova, Kurguzova 2018). Такое повышение зависит от объема вводимого препарата, и в некоторых случаях восстановление уровня ВГД до нормальных значений может занимать 40–60 минут (Seo, Choi 2015). Изменения амплитуды компонент ЭРГ после ИВИ у мышей может быть связано с такими колебаниями ВГД: если десятки минут ткани глаза, в том числе сетчатка, находились при повышенном механическом давлении, это может плохо сказаться на состоянии клеток сетчатки за счет ишемического эффекта. Наиболее чувствительны к ишемии и в первую очередь к недостатку кислорода биполярные клетки, которые определяют амплитуду b-волны (Abbas et al. 2022). В ходе разработки оптимальной техники ИВИ мышам мы учитывали данный фактор и варьировали объем введения от 1,5 до 2 микролитров на глаз, но не проводили систематического изучения, как влияет данный фактор на конечный результат состояния глаза, оцениваемый по ЭРГ.

Выводы

По итогам проведенной работы мы предлагаем следующий протокол для проведения ИВИ лабораторным мышам.

- 1) Непосредственно перед процедурой все инструменты (офтальмологические пинцеты, гамильтоновский шприц) стерилизуют ультрафиолетом в течение 15–30 минут. Доводят воду до кипения и помещают в нее ультратонкие иглы для инъекций. Устройство для фиксации головы мыши и поверхность предметного столика бинокулярного микроскопа дезинфицируют 70% этанолом. Перед каждой новой инъекцией следует повторять дезинфекцию фиксирующего устройства и предметного столика и выдерживать инъекционную иглу в кипящей воде в течение минимум 5 минут.
- 2) Для проведения ИВИ рекомендуется спустить поршень гамильтоновского шприца либо с помощью автоматического инжектора, либо проводить процедуру с ассистентом. Таким образом основной оператор сможет сосредоточиться на контроле положения иглы в глазу.
- 3) В качестве растворителя для вводимого вещества следует использовать профильтрованный (через фильтр с порами 0,22 мкм) или коммерческий стерильный растворитель (ФСБ или специализированные растворы для работы с сетчаткой).
- 4) Перед ИВИ мышь наркотизируют внутримышечным введением раствора смеси тилетамин + золазепам (26,7 мг/кг веса животного) и ксилазина (6,7 мг/кг) в физиологическом растворе для инъекций.
- 5) Голову мыши фиксируют в держателе под бинокулярным микроскопом так, чтобы глаз полностью находился в поле зрения оператора. На глаз наносят по 3–4 мкл местного анестетика (оксибупрокаин, 0,4% раствор) и расширителя зрачка (тропикамид, 0,8%). Процедуру ИВИ следует начинать после полного расширения зрачка, предварительно выведя глаз из орбиты с помощью офтальмологического пинцета.
- 6) Для проведения ИВИ глаз прокалывают одноразовой остроконечной иглой калибра 30G в области лимба (светлое кольцо между склерой и роговицей). Затем в место прокола вводят ультратонкую тупоконечную иглу (калибр 33G), присоединенную к гамильтоновскому шприцу.

Вводить иглу следует под углом около 45° к плоскости радужной оболочки и зрачка, т. к. в противном случае есть риск повредить крупный хрусталик. Движение иглы внутри глаза отслеживают через расширенный зрачок.

- 7) Когда кончик ультратонкой иглы окажется примерно в центре глаза, гамильтоновским шприцем в стекловидное тело вводят раствор. Конечный объем ИВИ не должен превышать 2 мкл во избежание резкого повышения ВГД. После окончания введения следует зафиксировать иглу внутри глаза еще на 30–60 секунд, т. к. быстрое извлечение может привести к вытеканию части введенного раствора через место прокола. В конце процедуры с помощью пинцета вернуть глаз в орбиту (до контакта с веками).
- 8) Ввести внутримышечно антиседативный препарат (атипамезола гидрохлорид, 1 мг/кг веса животного). После завершения операции поместить мышь в чистую клетку, расположенную на термоковрике с температурой около 30–35 °С, до ее полного выхода из наркоза.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Работа на животных была проведена с соблюдением принципов гуманности (Директивы Совета Европейских сообществ 1986 г. 86/609/ЕЕС).

Ethics Approval

Animal experiments were carried out in accordance with the ethical standards of the European Union Directive 86/609/EEC.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Морвен Камерон, Тээму Турунени и Айаману Абдул Азизу за неоценимые советы по усовершенствованию методики. Интравитреальные инъекции выполняли в стерильной операционной на базе ЦКП научного оборудования для физиологиче-

ских, биохимических и молекулярно-биологических исследований ИЭФБ РАН.

Acknowledgements

The authors extend their gratitude to Dr. Morven Cameron, Dr. Teemu Turunen, and Dr. Ayaman Abdul Aziz for their invaluable advice on improving the injection protocol. The authors are also thankful to the staff of the Research Resource Center for Physiological, Biochemical and Molecular-Biological Research (Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences).

Вклад авторов

а. Романов Иван Сергеевич — постановка экспериментов, написание рукописи;

б. Ротов Александр Юрьевич — концепция и постановка экспериментов, редактирование рукописи;

с. Астахова Любовь Александровна — концепция и постановка экспериментов, редактирование рукописи;

д. Фирсов Михаил Леонидович — концепция экспериментов, редактирование рукописи.

Author Contributions

a. Ivan S. Romanov conducted experiments, wrote the manuscript;

b. Alexander Yu. Rotov developed the concept and conducted experiments, edited the manuscript;

c. Lubov A. Astakhova developed the concept and conducted experiments, edited the manuscript;

d. Michael L. Firsov developed the concept of experiments, edited the manuscript.

References

- Abbas, F., Becker, S., Jones, B. W. et al. (2022) Revival of light signalling in the postmortem mouse and human retina. *Nature*, vol. 606, no. 7913, pp. 351–357. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04709-x> (In English)
- Bauer, S. M., Voronkova, E. B., Kotliar, K. E. (2021) О повышении внутривитреального давления после интравитреальных инъекций [On elevation of intraocular pressure after intravitreal injections]. *Rossijskij oftal'mologicheskij zhurnal — Russian Ophthalmological Journal*, vol. 14, no. 4, pp. 126–129. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-202114-4-126-129> (In Russian)
- Baygildin, S. S., Musina, L. A., Khimatullina, Z. R. (2021) Geneticheskie i indutsirovannye modeli zhivotnykh s degeneratsiej setchatki [Experimental animal models of retinal degeneration]. *Biomeditsina — Journal Biomed*, vol. 17, no. 1, pp. 70–81. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-70-81> (In Russian)
- Bubnova, I. A., Kurguzova, A. G. (2018) Izmeneniya urovnya VGD posle intravitreal'nykh in'ektsij [Changes in intraocular pressure after intravitreal injections]. *Vestnik Oftalmologii — The Russian Annals of Ophthalmology*, vol. 134, no. 4, pp. 47–51. <https://doi.org/10.17116/oftalma201813404147> (In Russian)
- Campbell, M., Humphries, M. M., Humphries, P. (2012) Barrier modulation in drug delivery to the retina. *Methods in Molecular Biology*, vol. 935, pp. 371–380. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-080-9_26 (In English)
- Collin, G. B., Gogna, N., Chang, B. et al. (2020) Mouse models of inherited retinal degeneration with photoreceptor cell loss. *Cells*, vol. 9, no. 4, article 931. <https://doi.org/10.3390/cells9040931> (In English)
- Gorantla, S., Rapalli, V. K., Waghule, T. et al. (2020) Nanocarriers for ocular drug delivery: Current status and translational opportunity. *RSC Advances*, vol. 10, no. 46, pp. 27835–27855. <https://doi.org/10.1039/D0RA04971A> (In English)
- Goriachenkov, A. A., Rotov, A. Yu., Firsov, M. L. (2021) Developmental dynamics of the functional state of the retina in mice with inherited photoreceptor degeneration. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 51, no. 6, pp. 807–815. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01137-8> (In English)
- Hombrebueno, J. R., Luo, C., Guo, L. et al. (2014) Intravitreal injection of normal saline induces retinal degeneration in the C57BL/6J mouse. *Translational Vision Science and Technology*, vol. 3, no. 2, article 3. <https://doi.org/10.1167/tvst.3.2.3> (In English)
- Ioshin, I. E. (2017) Bezopasnost' intravitreal'nykh in'ektsij [Safety of intravitreal injection]. *Oftal'mokhirurgiya — Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*, vol. 3, pp. 71–79. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2017-3-71-79> (In Russian)
- Kay, C. N., Ryals, R. C., Aslanidi, G. V. et al. (2013) Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. *PLOS One*, vol. 8, no. 4, article e62097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062097> (In English)
- Kim, H. M., Woo, S. J. (2021) Ocular drug delivery to the retina: Current innovations and future perspectives. *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 1, article 108. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010108> (In English)
- Kim, S. J. (2015) Intravitreal injections and endophthalmitis. *International Ophthalmology Clinics*, vol. 55, no. 2, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1097/iio.0000000000000062> (In English)
- Korotkikh, S. A., Bobykin, E. V., Ekgardt, V. F. et al. (2019) Intravitreal'nye in'ektsii v usloviyakh real'noj klinicheskoy praktiki: rezul'taty oprosa vrachej-oftal'mokhirurgov ural'skogo federal'nogo okruga [Intravitreal injections

- in clinical practice: Results of a survey of eye surgeons in the Ural federal district]. *Oftal'mologicheskij zhurnal — Ophthalmology Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 27–36. <https://doi.org/10.17816/OV2019127-36> (In Russian)
- Leinonen, H., Tanila, H. (2018) Vision in laboratory rodents—tools to measure it and implications for behavioral research. *Behavioural brain research*, vol. 352, pp. 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.040> (In English)
- Mears, K. (2018) Evaluation of intravitreal injection techniques and intraocular pressure spikes. *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 227, no. 4, article e188. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2018.08.509> (In English)
- Perlman, I. (2015) The electroretinogram: ERG by IDO Perlman. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. [Online]. Available at: <https://webvision.med.utah.edu/book/electrophysiology/the-electroretinogram-erg> (accessed 01.04.2022). (In English)
- Pierscionek, B. K., Asejczyk-Widlicka, M., Schachar, R. A. (2007) The effect of changing intraocular pressure on the corneal and scleral curvatures in the fresh porcine eye. *British Journal of Ophthalmology*, vol. 91, no. 6, pp. 801–803. <https://doi.org/10.1136/bjo.2006.110221> (In English)
- Planul, A., Dalkara, D. (2017) Vectors and gene delivery to the retina. *Annual Review of Vision Science*, vol. 3, no. 1, pp. 121–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061413> (In English)
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U. et al. (1994) Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, vol. 8, no. 2, pp. 217–225. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1096/fasebj.8.2.8119492> (In English)
- Rodieck, R. W. (1998) *The first steps in seeing*. Sunderland: Sinauer Associates Publ., 562 p. (In English)
- Rotov, A. Yu., Romanov, I. S., Tarakanchikova, Ya. V., Astakhova L. A. (2021) Application prospects for synthetic nanoparticles in optogenetic retinal prosthetics. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 57, no. 6, pp. 1333–1350. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060132> (In English)
- Seo, D. R., Choi, K. S. (2015) Fluctuation of the intraocular pressure during intravitreal injection. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 6, no. 6, article 506. <https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000506> (In English)
- Tao, Y., Hu, B., Ma, Z. et al. (2020) Intravitreal delivery of melatonin affects the retinal neuron survival and visual signal transmission: *In vivo* and *ex vivo* study. *Drug Delivery*, vol. 27, no. 1, pp. 1386–1396. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1818882> (In English)
- Turunen, T. T., Koskelainen, A. (2017) Transretinal ERG in studying mouse rod phototransduction: Comparison with local ERG across the rod outer segments. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 58, no. 14, pp. 6133–6145. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22248> (In English)
- Veleri, S., Lazar, C. H., Chang, B. et al. (2015) Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models. *Disease Models and Mechanisms*, vol. 8, no. 2, pp. 109–129. <https://doi.org/10.1242/dmm.017913> (In English)
- Wickremasinghe, S. S., Michalova, K., Gilhotra, J. et al. (2008) Acute intraocular inflammation after intravitreal injections of bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, vol. 115, no. 11, pp. 1911–1915. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.05.007> (In English)