

Marek Prost

Badania doświadczalne nad rolą kwasu mlekowego w patogenezie neowaskularyzacji

Experimental studies on the role of lactic acid in pathogenesis of neovascularization

Summary: In order to elucidate the controversies whether lactic acid could be the factor responsible for the initiation of neovascularization, the author examined neovascular response of the vessels of the chicken chorioallantoic membrane after implantation of filter discs soaked with different concentrations of this substance. No neovascularization of the vessels of the membrane was seen after implantation of the discs. The results of the study suggest that lactic acid is not the factor which can stimulate neovascularization.

Hasła: neowaskularyzacja, patogeneza, kwas mlekowy

Key words: neovascularization, pathogenesis, lactic acid

Neowaskularyzacja jest ważnym składnikiem prawidłowych procesów fizjologicznych takich jak rozwój embrionalny i gojenie się ran. Odgrywa ona także dużą rolę w patogenezie różnych schorzeń oka, jak np.: retinopatia cukrzycowa, retinopatia wcześniaków, jaskra neowaskularyzacyjna, starcze zwyrodnienie płamki, choroba Eales'a i neowaskularyzacja rogówkowa. Przyczyny tworzenia się nowych naczyń w tkankach nie są do tej pory wyjaśnione. W ostatnich latach wysunięto hipotezę, że rozwój naczyń krwionośnych jest regulowany przez zmiany równowagi stężeń czynników hamujących (najczęściej związanych z właściwościami samej tkanki) oraz czynników pobudzających (w następstwie lokalnych zmian w metabolizmie komórek)^{4,16}. Podwyższenie poziomu czynników pobudzających lub obniżenie stężeń czynników hamujących może spowodować zachwianie się delikatnej równowagi w tkance i rozwój neowaskularyzacji¹⁶. Uważa się, że czynniki pobudzające mogą być uwalniane w niedokrwionej i niedotlenionej tkance powodując proliferację znajdujących się w pobliżu naczyń¹³. Przemawia za tym fakt, że schorzenia związane z niedotlenieniem siatkówki są najczęstszymi stanami chorobowymi, w których obserwuje się neowaskularyzację. Jest więc prawdopodobne, że czynniki pobudzające są produktami procesów katabolicznych związanych z bez-

tlenową przemianą materii. W 1964 roku *Imre* wysunął hipotezę, że czynnikiem odpowiedzialnym za neowaskularyzację w schorzeniach siatkówki jest kwas mlekowy, będący końcowym produktem glikolizy beztlenowej. Hipotezę tę oparł on na wynikach swoich badań doświadczalnych, w których obserwował rozwój neowaskularyzacji siatkówkowej po wstrzyknięciu kwasu mlekowego do ciała szklistego⁸. Wysunięta przez *Imrego* hipoteza nie została jednak potwierdzona przez innych badaczy.

Gerke i wsp. nie stwierdzili zwiększenia stężenia kwasu mlekowego w preparatach siatkówki i naczyń siatkówki pochodzących od kociąt z retinopatią proliferacyjną wywołaną tlenem oraz od szczurów z retinopatią cukrzycową po podaniu streptozotocyny³. Jednakże w siatkówce kociąt z retinopatią proliferacyjną po podaniu tlenu zaobserwowano zwiększony poziom dehydrogenazy mleczanowej, co świadczy o zwiększonym metabolizmie kwasu mlekowego w tkankach z neowaskularyzacją⁷.

W latach osiemdziesiątych *Imre* opublikował dalsze prace dotyczące roli kwasu mlekowego w patogenezie neowaskularyzacji, w których podtrzymywał on słuszność swojej hipotezy^{9,10}. Celem niniejszej pracy jest ustalenie roli kwasu mlekowego w odczynie neowaskularyzacyjnym naczyń błony kosmówkowo-omoczniovej zarodka kurzego.

Materiał i metodyka

Badania przeprowadzono na 48 zarodkach kurzych. Odczyn neowaskularyzacyjny naczyń błony kosmówkowo-omoczniovej zarodka kurzego ocenia-

no po implantacji krążków bibuły nasyczonej różnymi stężeniami kwasu mlekowego. Zastosowano dwie metody implantacji: *Lutty'ego* i wsp.¹² oraz *Glaser'a* i wsp.⁵.

W pierwszej z tych metod u 24 sześciodniowych, zapłodnionych zarodków kurzych wywiercano otwór w skorupce jaja ponad komorą powietrzną. Okienko zaklejano taśmą samoprzylepną i inkubowano zarodki przez 2 dni w temperaturze 37°C i wilgotności 60%. Następnie usuwano taśmę i po odłożeniu na bok błony podskorupkowej umieszczano na błonie kosmówkowo-omoczniovej 3 mm krążki bibuły (*Whatman* 41). Krążki te były uprzednio moczone przez 1 godzinę w 0,1% roztworze kwasu mlekowego (8 krążków), 0,5% roztworze kwasu (8 krążków) oraz w płynie BSS firmy Alcon (8 krążków). Zarodki inkubowano przez 6 dni. Po tym okresie czasu usuwano krążki, otwierano skorupkę jaja i oceniano odczyn neowaskularyzacyjny naczyń wewnętrznej strony błony kosmówkowo-omoczniovej stosując opracowaną uprzednio skalę¹⁴.

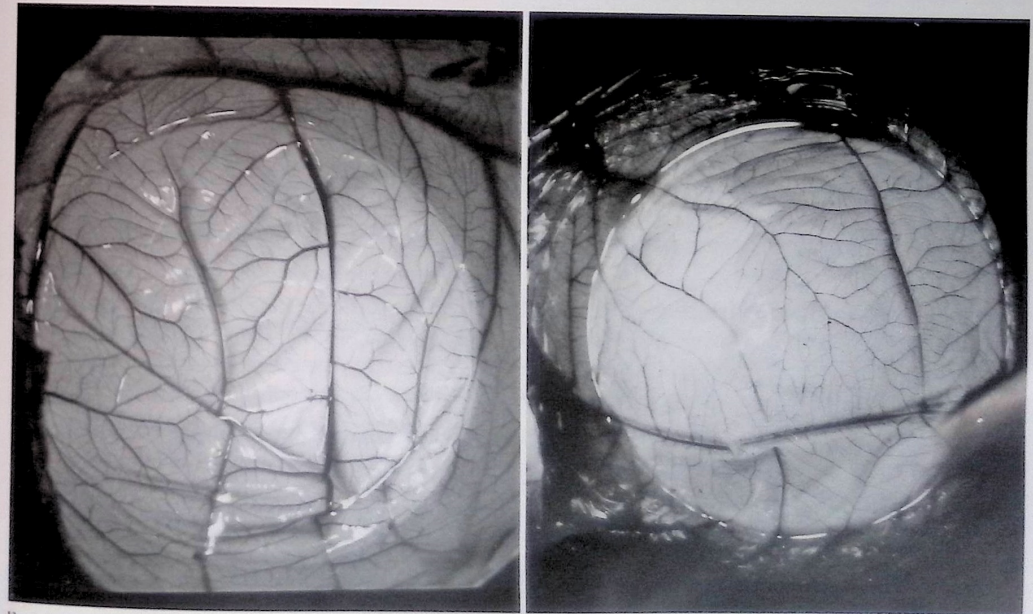
W drugiej metodzie u 24 trzydniowych zarodków kurzych wywiercano otwór w skorupce ponad komorą powietrzną i inkubowano je przez 6 godzin w temperaturze 37°C i wilgotności 60%. Następnie umieszczano na błonie kosmówkowo-omoczniovej krążki bibuły nasyczonej uprzednio 0,1% roztworem kwasu mlekowego (8 krążków), 0,5% roztworem kwasu (8 krążków) oraz płynem BSS (8 krążków). Po 24 godzinach inkubacji oceniano odczyn neowaskularyzacyjny naczyń błony w sposób opisany powyżej.

Wyniki

U żadnego z zarodków, u których implantowano krążki bibuły nasyczone 0,1% i 0,5% roztworem kwasu mlekowego oraz płynem BSS nie stwierdzono odczynu neowaskularyzacyjnego naczyń błony kosmówkowo-omoczniovej. Konfiguracja naczyń błony była prawidłowa we wszystkich trzech grupach doświadczalnych (ryc. 1).

Dyskusja

Ocena odczynu neowaskularyzacyjnego naczyń błony kosmówkowo-omoczniovej zarodków kurzych jest często stosowaną metodą w badaniach doświadczalnych nad angiogenezą. Jest ona używana do oceny czynności naczyniotwórczej tkanek, wyciągów tkankowych i substancji chemicznych^{1,6,11,14,17} oraz do identyfikacji czynników hamujących neowaskularyzację^{2,5,12}. Dlatego też metoda ta została zastosowana w niniejszej pracy do badań czy kwas mlekowy może być czynnikiem stymulującym neowaskularyzację. Przeprowadzone badania wykazały, że 0,1% i 0,5% kwas mlekowy nie powodują odczynu neowaskularyzacyjnego naczyń błony kosmówkowej. Wyniki te przemawiają więc za tym, że związek ten nie jest czynnikiem, który może stymulować rozwój neowaskularyzacji w tkankach.



Ryc. 1. Wygląd błony kosmówkowo-omoczniovej 6 dni po implantacji krążków bibuły nasączonych 0,1% roztworem kwasu mlekowego (po lewej) roztworem BSS (po prawej). Widoczna prawidłowa konfiguracja naczyń błony w obu grupach

Z Kliniki Okulistyki AM w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Toczolowski

Reprint requests to:
Prof. dr hab. Marek Prost
ul. Chmielna 12 m. 6, 20-075 Lublin

Piśmiennictwo

1. Aiaprank D.H., Knighton D.R., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissue grafted to the chick chorioallantois. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 297: 597-610 (1975).
2. Folkman J., Langer R.J., Haudenschild C., Taylor S.: Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221: 719-725 (1983).
3. Gerke E., Spitznas M., Brodde G.E.: The role of lactic acid in retinal neovascularization. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 200: 79-84 (1976).
4. Glaser B.M.: Extracellular Modulating Factors and the control of intracellular neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 106: 603-607 (1988).
5. Glaser B.M., Campochiaro P.A., Davis J.L., Jordan J.A.E.: Retinal pigment epithelial cells release inhibitors of neovascularization. *Ophthalmology* 94: 780-784 (1987).
6. Glaser B.M., D'Amore P.A., Michels R.G., Brunson S.R., Fongselau A.H., Elie T., Patz A.: The demonstration of angiogenic activity from ocular tissues. *Ophthalmology* 87: 440-446 (1980).
7. Grajman C.M.: Possible significance of the isoenzymes of lactic dehydrogenase in the retina of the rat. *Nature* 211: 615-616 (1966).
8. Jänne G.: Studies on the mechanism of the retinal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.* 48: 75-82 (1964).
9. Jänne G.: The role of increased lactic acid concentration in neovascularization. *Acta Ophthalmol. Scand.* 32: 97-105 (1984).

Prasa wplywała: 16.03.1994

10. Jänne G.: The role of lactic acid in the mechanism of neovascularization. w: Ben Ezra D., Ryan S.J., Glaser B.M., Murphy R.B. (red.): *Ocular circulation and neovascularization*. Doc. Ophthalmol. Proceed. Ser. Dordrecht, Boston, Lancaster: Nijhoff, Junk, 1987, str. 511-516.

11. Kissam R.D., Hill C.R., Garner A., Philips P., Kumar S., Weiss J.B.: A low-molecular-weight angiogenic factor in cat retina. *Brit. J. Ophthalmol.* 66: 165-169 (1982).

12. Luty G.A., Thompson G.C., Gallup J.Y., Mell R.J., Patz A., Fongselau A.: Vitreous: an inhibitor of retinal extract-induced neovascularization. *Invest. Ophthalmol.* 23: 52-56 (1983).

13. Patz A.: Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. *Amer. J. Ophthalmol.* 94: 715-743 (1982).

14. Prost M.: Experimental studies on the pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Brit. J. Ophthalmol.* 72: 363-367 (1988).

15. Prost M.: Experimental studies on the angiogenic activity of the detached retina. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 228: 83-85 (1990).

16. Schulz G.S., Grant M.B.: Neovascular growth factors. *Eye* 5: 170-180 (1991).

17. Shalhabuddin S., Kumar S.: Quantitation of angiogenic factor in bovine retina and tumor extracts by means radioimmunoassay. *Brit. J. Ophthalmol.* 76: 286-291 (1983).

Survey of Ophthalmology - Międzynarodowe Czasopismo Referatywne jest dwumiesięcznikiem drukującym przeglądy oraz prace poglądowe na temat najnowszych osiągnięć nauki i praktyki okulistyki. Czasopismo jest wydawane w Bostonie (USA) i należy do jednego z najbardziej prestiżowych światowych czasopism okulistycznych.

Redakcja czasopisma wprowadziła ostatnio możliwość rocznej prenumeraty po obniżonej cenie 30 USD dla osób specjalizujących się w zakresie okulistyki; prenumerata dla pozostałych osób kosztuje 95 USD.

Osoby zainteresowane prenumeratą proszone są o pisemne zgłoszenia do prof. dr hab. Marka Prosta, członka międzynarodowego kolegium redakcyjnego Survey of Ophthalmology, II Klinika Okulistyki AM, ul. Chmielna 1, 20-079 Lublin

Anna Monies i Marek Prost

Badania doświadczalne nad uszkodzeniem tkanek oka w zatruciu kobaltem

Experimental studies on the lesions of eye tissues in cobalt intoxication

Summary: The aim of the paper was to examine the influence of cobalt compound on rabbit eye tissues. The lesions in the eyeball were evaluated basing on ophthalmological examination and in light and electron microscopes. The studies revealed that cobalt intoxication caused the following damages in the rabbit retina: oedema and atrophy of nerve fibres, lesions of ganglion, amacrine, bipolar, horizontal cells and nucleus of photoreceptors. Also, obliteration of choroidal vessels and changes in iris and ciliary body were found. Cataract developed in 42% of rabbits and 25% chronic purulent endophthalmitis in 25%. The results of these experimental investigations indicate that further studies on the influence of this metal on human eye tissues are necessary.

Hasła: kobalt, zatrucie, uszkodzenie siatkówki, zaćma, zapalenie wnętrza oka, króliki

Key words: cobalt, poisoning, retinal damage, cataract, endophthalmitis, rabbits

Kobalt i jego związki po przedostaniu się do organizmu człowieka mogą się w nim kumulować powodując uszkodzenie różnych narządów wewnętrznych. Zatrucie tym metalem ma najczęściej przebieg przewlekły i stwierdza się w nim uszkodzenie płuc, policytemię, niedoczynność tarczycy, neuropatie obwodowe, kardiomiopatie, uszkodzenie trzustki i hiperlipemię^{4, 14}. Ma on także działanie teratogenne i mutagenne³. Wykonane przez nas uprzednio badania wykazały, że kobalt może gromadzić się w tkankach oka, zaś jego stężenie w niektórych częściach gałki jest porównywalne z tym jakie wykryto w sercu i płucach, a więc w narządach, w których najczęściej występują zmiany w trakcie zatrucia tym pierwiastkiem¹³. Przedmiotem niniejszej pracy są badania uszkodzeń tkanek oczu zwierząt doświadczalnych w ostrym i przewlekłym zatruciu związkami kobaltu podawanymi pozajelitowo.

Material i metodyka

I. Badania zmian w gałce ocznej w ostrym zatruciu kobaltem

Badania przeprowadzono na 5 królikach szarych o wadze około 3 kg, którym podawano dootrzew-

nowo 5% roztwór chlorku kobaltu w dawce 100 mg/kg wagi ciała. Po trzech godzinach badano stan oczu, zwierzęta zabijano i usuwano gałki oczne. Tkanki pobrane z prawego oka krojono na skrawki półcienkie, które barwiono 1% błękitem metylenowym z 1% azurem II w 1% boraksie oraz na skrawki ultracienkie, które barwiono przy pomocy preparatu Ultrastain 1 i 2 (f-my LKB — Szwecja). Lewe gałki oczne po utrwaleniu barwiono hematoksyliną i eozyzną.

II. Badania zmian w gałce ocznej w przewlekłym zatruciu kobaltem

Badania przeprowadzono na 10 królikach szarych o wadze około 3 kg. Zwierzętom podawano codziennie przez 25 dni dootrzewnowo 5% roztwór chlorku kobaltu w dawce 8 mg/kg wagi ciała. Po 25 dniach badano stan oczu, króliki zabijano, pobierano gałki oczne i wykonywano preparaty półcienkie, ultracienkie i barwiono hematoksyliną i eozyzną w sposób opisany powyżej.

III. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 5 królików szarych o wadze około 3 kg, którym pobrano gałki oczne i przygotowano do dalszych badań w sposób opisany powyżej.

Z II Kliniki Okulistyki AM w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Jerzy Toczolowski

Reprint requests to:
Prof. dr hab. Marek Prost
ul. Chmielna 12 m. 6, 20-075 Lublin