

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРА-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕТЧАТКИ НА МОДЕЛИ ПИГМЕНТНОГО РЕТИНИТА

Клиника Добромед, отделение глазных болезней, Баку, Азербайджан.

Ключевые слова: пигментный ретинит, мыши линии rd10, пара-аминобензойная кислота, электро-ретинография

Пигментный ретинит (ПР) является наиболее распространенной причиной наследуемой слепоты: заболевание встречается с частотой 1 случай на 4000 человек [1] и около 10% всей популяции являются носителями рецессивных генов ПР [2].

ПР – это группа генетически и фенотипически гетерогенных прогрессирующих дистрофий сетчатки с первичным поражением палочковых фоторецепторов. Идентифицировано более 100 различных генов, мутации в которых приводят к развитию ПР. Мутантный ген чаще всего кодирует специфические белки и экспрессируется только в палочках, где синтез дефектного белка индуцирует их апоптоз [3]. Несмотря на то, что при ПР первично поражаются палочки, колбочки, в последующем, тоже вовлекаются в патологический процесс, что приводит к потере не только периферического, но и центрального зрения. При пигментном ретините колбочки так же гибнут путем апоптоза, ключевую роль в индукции которого играют активные формы кислорода и оксидативный стресс [4]. В исследованиях на животных моделях ПР получены данные о повышении уровня малондиальдегида и других продуктов перекисного окисления липидов в фоторецепторах, и снижении активности глутатионпероксидазы в сетчатке [5]. Кроме того, определенную роль в гибели колбочек играет локальное высвобождение цитотоксических факторов после гибели палочек активированными клетками Мюллера [6].

На данный момент не существует эффективного способа лечения ПР. Принимая во внимание важность оксидативного повреждения в патогенезе пигментного ретинита, перспективна разработка патогенетически ориентированной лекарственной терапии ПР с использованием антиоксидантов. На животных моделях ПР показано, что лечение антиоксидантами может уменьшить гибель фоторецепторов [7].

Пара-аминобензойная кислота (ПАБК) - витамин В10, производной бензойной кислоты, предшественник синтеза фолиевой кислоты в клетках бактерий. В настоящее время, ПАБК и ее производные продолжают привлекать внимание исследователей в связи с их широким спектром биологического действия и низкой токсичностью. ПАБК обеспечивает защиту от ультрафиолетовых лучей, индуцирует синтез эндогенного интерферона и интерлейкина-6 [8], имеет антикоагулянтную активность [9]. ПАБК обладает антиоксидантными свойствами: снижает уровень гидропероксида и малонового диальдегида, нормализует активность каталазы в роговице и хрусталике глаза [10], снижает интенсивность перекисного окисления липидов в сетчатке после индуцированной гипоксии [11]. О.Г.Строева и соавт. показали, что ПАБК стимулирует морфогенез дисков наружных сегментов фоторецепторов у крыс с наследственной абiotрофией сетчатки типа пигментного ретинита [12].

Для экспериментального изучения патогенеза и разработки терапии наследственных дегенераций сетчатки используются линии лабораторных животных, имеющие мутации в специфических генах. Мыши линии rd10 (retinal degeneration 10) являются одной из наиболее перспективных экспериментальных моделей ПР [13]. Данная линия животных характеризуется мягкой формой прогрессирующей ретинальной дегенерации, развивающейся в течение первых нескольких месяцев жизни. Мыши линии rd10 являются гомозиготами по рецессивной мутации в гене фосфодиэстеразы палочек. Мутация приводит к замене аминокислоты в β -субъединице фермента, дисфункции и апоптозу палочковых фоторецепторов. Ретинальная дегенерация начинается с гибели палочек примерно с 18 дня постнатального развития, пик их гибели приходится на 20-25 день и практически вся сетчатка дегенерирует к 6-8 неделе. На первых этапах патологического процесса колбочки сохраняют функциональную активность, но в последующем так же погибают в связи с вторичным повреждением цитотоксическими факторами или вследствие оксидативного стресса [3].

Электроретинография (ЭРГ) позволяет выявить и оценить в динамике функции палочковых и колбочковых фоторецепторов. Скотопическая ЭРГ и использование стимулов низкой интенсивности позволяют получить изолированный палочковый ответ, а фотопическая ЭРГ с более яркими стимулами характеризует функции колбочек. Колбочковый фликер – это изолированный колбочковый ответ, регистрируемый при стимуляции мерцающими световыми стимулами с высокой частотой, которые не воспринимаются палочками. Комплексный анализ данных признаков отражает функциональное состояние сетчатки и удобен для оценки прогрессирования ретиальной дегенерации.

При регистрации потенциалов действия фоторецепторов в сетчатке мышей линии rd10 методом ЭРГ выявляется уменьшение амплитуды и а, и b-волн, задержка и замедление ответа, снижение светочувствительности сетчатки по сравнению со здоровыми мышами [13]. Более того, амплитуда волн ЭРГ уменьшается с возрастом мышей линии rd10 в связи с прогрессированием ретиальной дегенерации, после 6-8 недели в связи с полной потерей фоторецепторов ответ не регистрируется [1].

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния пара-аминобензойной кислоты на функциональное состояние палочковых и колбочковых фоторецепторов сетчатки мышей линии rd10 по данным электроретинографии

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проведено на 52 мышах линии rd10 (JacksonLabs, Maine, USA), разделенных на 2 группы: группа лечения (n=28) и контрольная группа (n=24). Животным из группы лечения 6 раз в неделю с третьего дня после рождения до 4,5 недели проводились интраперитонеальные инъекции ПАБК в физиологическом растворе (доза 50 мг/кг). Животным из контрольной группы параллельно проводились интраперитонеальные инъекции того же объема физиологического раствора.

Регистрация ЭРГ проводилась с использованием мини-ганцфельд стимулятора на сроке 3 и 4,5 недель постнатального развития мышей. Данный интервал времени включает и гибель палочек, и гибель колбочек, является критическим в течение ретиальной дегенерации и оптимальным моментом для оценки влияния препаратов на выживание фоторецепторов и сохранение функциональной активности сетчатки. Регистрация ЭРГ производилась с помощью роговичного контактного электрода, референтный электрод помещался на язык, игольчатый заземляющий электрод – внутримышечно в область бедра.

Перед выполнением ЭРГ животным проводилась премедикация и наркоз (внутримышечно кетамин HCl (50 мг/кг) в комбинации с ксилазином (5 мг/кг)). Для достижения мириаза выполнялись инстилляции 1% раствора тропикамида и 2,5 % фенилэфрина. Перед установкой активного электрода на центр роговицы применялись локальные анестезирующие капли беноксинат HCl, 0,4%. Запись скотопической ЭРГ проводилась после темновой адаптации в течение 12 часов, регистрировался палочковый и смешанный палочко-колбочковый ответ на серии вспышек света с возрастающей интенсивностью (0,0132 - 48 кд·сек/м²). При выполнении фотопической ЭРГ регистрировался колбочковый ответ на более яркие вспышки (1,32-96 кд·сек/м²), предъявляемые с частотой 1 Гц или 16 Гц (колбочковый фликер). Для количественной оценки интенсивности ответа производился анализ максимальной амплитуды а и b волн ЭРГ и амплитуды колбочкового фликера (мкВ) при различной интенсивности светового стимула, рассчитывалось среднее в группе при данной интенсивности стимула ± стандартная ошибка среднего.

Сравнение амплитуды волн ЭРГ между группами лечения и контроля проводилось с использованием непарного двустороннего t-критерия, уровень статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты. ПАБК при системном применении оказывает положительное влияние на функциональное состояние сетчатки у мышей линии rd10, в частности способствует сохранению функциональной активности колбочек. Сравнение полученных результатов скотопической ЭРГ в группах лечения и контроля (среднее ± стандартная ошибка среднего) представлено на рисунке 1, фотопической ЭРГ – на рисунке 2.

Функциональное состояние палочковых фоторецепторов оценивалось по амплитуде b-волны при регистрации скотопического палочкового ответа. При исследовании на 3 неделе амплитуда b-волны скотопической ЭРГ была в 1,3 раза выше в группе лечения по сравнению с группой контроля, но к возрасту 4,5 недель, ввиду неуклонного прогрессирования ретиальной дегенерации и гибели палочек, амплитуда палочкового ответа снизилась в обеих группах и не имела больше статистических отличий при средней и высокой интенсивности стимула. В 4,5 недели при низкой интенсивности светового стимула в контрольной группе амплитуда палочкового ответа была крайне низкой, наблюдалось снижение светочувствительности сетчатки, в то время как в группе лечения светочувствительность сохраняется на прежнем уровне ($p < 0,05$).

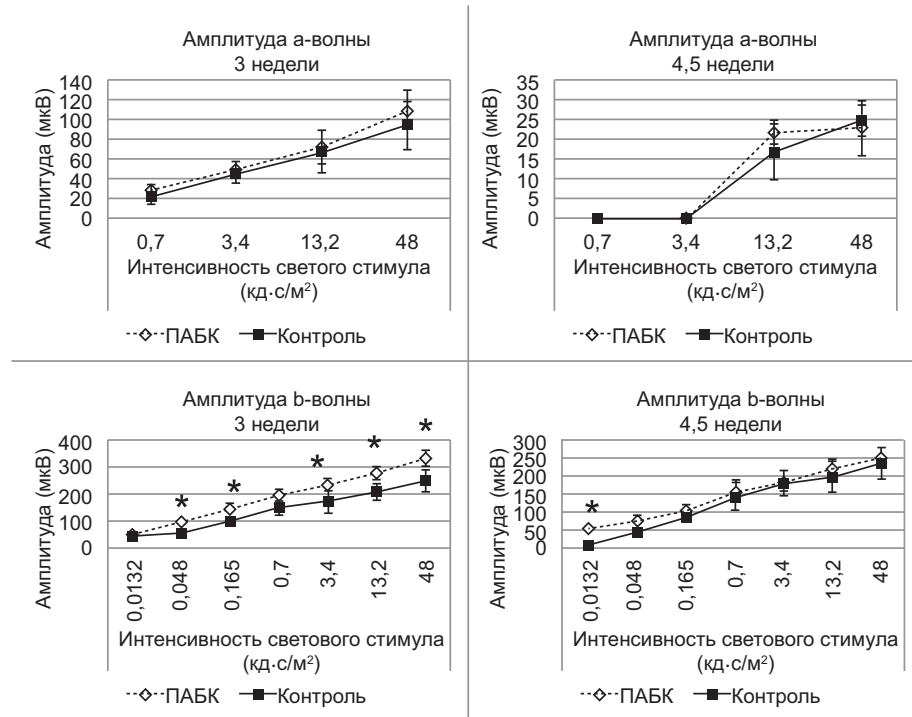


Рис.1. Динамика амплитуды а-волны (вверху) и b-волны (внизу) скотопической ЭРГ в группах лечения и контроля. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего. Статистически значимые различия отмечены*.

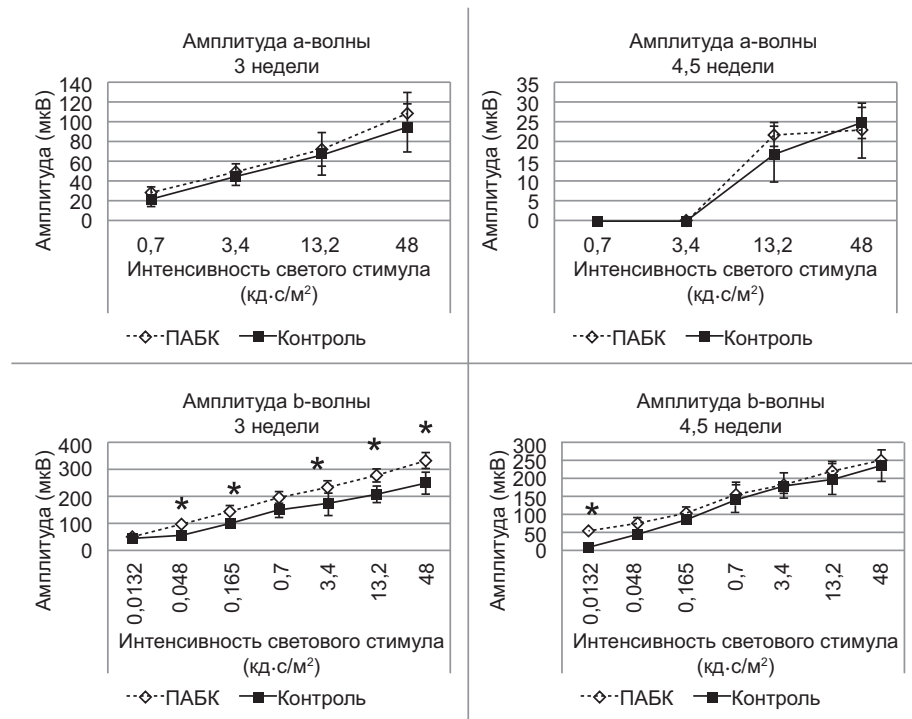


Рис.2. Динамика амплитуды различных видов ответа фотопической ЭРГ в группах лечения и контроля: амплитуда b-волны колбочкового ответа (вверху), амплитуда колбочкового фликера (внизу). Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего. Статистически значимые различия отмечены*.

Сохранность функции колбочковых фоторецепторов оценивалась по амплитуде фотопического колбочкового ответа и колбочкового фликера. И на 3, и 4,5 неделях амплитуда обоих видов колбочкового ответа во всех точках была выше в группе животных, получавших ПАБК, во многих случаях различия являлись статистически значимыми. Таким образом, ПАБК способствует сохранению функциональной активности колбочек, предотвращает их гибель.

Обсуждение. Оценка функционального состояния сетчатки показывает, что системное введение ПАБК оказывает стабилизирующее влияние на развитие дегенеративных процессов в сетчатке мышей линии rd10 и способствует выживанию колбочковых фоторецепторов.

Положительное влияние ПАБК на функции палочек отмечено на 3 неделе, но, тем не менее, не удалось предотвратить их гибель на более поздних сроках. Гибель палочек при ПР генетически детерминирована, синтезирующийся в палочках мутантный белок быстро и независимо от других факторов индуцирует их апоптоз. Для защиты палочек перспективна разработка генной терапии или лекарственных средств, нацеленных на внутриклеточные каскады, запускающие апоптоз. Тем не менее, ПАБК способна отсрочить гибель палочек и вместе с ней начало ретиальной дегенерации.

В настоящем исследовании применение ПАБК значительно улучшало выживаемость колбочек и на 3, и на 4,5 неделе. Амплитуда колбочкового ответа во всех точках была выше в группе животных, получавших ПАБК, во многих случаях различия являлись статистически значимыми. В отличие от палочек, потеря колбочек происходит вторично, и существует возможность предотвратить их гибель, снизив интенсивность оксидативного повреждения или повреждения цитотоксическими факторами. Протективное действие ПАБК, вероятно, связано с ее антиоксидантными свойствами, ПАБК снижает интенсивность перекисного окисления липидов, предотвращает повреждение фоторецепторов и способствует их выживанию. Единичные исследования на животных моделях показывают увеличение выживаемости фоторецепторов при применении комплексов антиоксидантов: лютеин + зеаксантин + α -липовая кислота [10], [11], α -токоферол + аскорбиновая кислота + Mn (III) + порфирин + α -липовая кислота [14]. Тем не менее, действие каждого препарата в отдельности в этих исследованиях часто было очень небольшим, но при совместном применении была достигнута высокая эффективность, связанная с аддитивным или даже синергическим эффектом антиоксидантов в различных комбинациях [10, 11, 14]. Таким образом, ПАБК, способствующая защите колбочек от оксидативного повреждения, может служить эффективным дополнением к антиоксидантной терапии пигментного ретинита.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Dalke C., Löster J., Fuchs H., et al. Electroretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, v.45, N2, p.601-609.
2. Wang D.Y., Chan W.M., Tam P.O. et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications // *Clin. Chim. Acta*, 2005, v.351, N1, p.5-16.
3. Marigo V. Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration // *Cell Cycle*, 2007, v.6, N6, p.652-655.
4. Padnick-Silver L., Derwent J.J., Giuliano E. et al. Retinal oxygenation and oxygen metabolism in Abyssinian cats with a hereditary retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006. V. 47. P.3683–3689.
5. Ahuja-Jensen P., Johnsen-Soriano S., Ahuja S. et al. Low glutathione peroxidase in rd1 mouse retina increases oxidative stress and proteases // *Neuroreport*, 2007, v.18, p.797–801.
6. Combadière C., Feumi C., Raoul W., et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration // *J. Clin. Invest.*, 2007, v.117, N10, p.2920-2928.
7. Komeima K., Rogers B.S., and Campochiaro P.A. Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa // *J. Cell. Physiol.*, 2007, v.213, p.809–815.
8. Акберова С.И., Ершов Ф.И., Мусаев Галбинур П.И. и др. Динамика интерферонового статуса у больных с герпетическими кератитами при лечении нового индуктора интерферона актиполом // *Вестн. офтальмол.*, 2001, №1, с.33-36.
9. Дрозд Н.Н., Акберова С.И., Строева О.Г. и др. Антитромботическая активность пара-аминобензойной кислоты // *Эксп. клин. фармакол.*, 2000, №3, с.40-44.

10. Акберова С.И., Строева О.Г., Магомедов Н.М. и др. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксипина в роговице и хрусталике // Вестн. офтальмол., 2001, №4, с.25-29.
11. Акберова С.И., Строева О.Г., Магомедов Н.М. и др. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксипина в сетчатке // Вестн. офтальмол., 1998, №6, с.39-34.
12. Строева О.Г., Поплинская В.А., Хорошилова-Маслова И.П. и др. Стимуляция образования мембранных дисков наружных сегментов фоторецепторных клеток сетчатки у крыс с помощью парааминобензойной кислоты // ДАН-СССР, 1990, т.314, №2, с.483-487.
13. Gargini C., Terzibası E., Mazzoni F., et al. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study // J. Comp. Neurol., 2007, v.500, p.222–238.
14. Komeima K., Rogers B.S., Lu L., et al. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa // Proc. Natl Acad. Sci., 2006, v.103, p.11300–11305.
15. Sanz M.M., Johnson L.E., Ahuja S. et al. Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration // Neuroscience, 2007, v.145, p.1120–1129.

Qəlbınur T.P.

PARA-AMİNOBENZOY TURŞUSUNUN PİQMENTLİ RETİNİT MODELİNDƏ TOR QIŞANIN FUNKSİONAL VƏZİYYƏTİNƏ TƏSİRİNİN EKSPERİMENTAL ÖYRƏNİLMƏSİ

Dobromed klinikası, göz xəstəlikləri şöbəsi, Bakı şəh., Azərbaycan

Açar sözlər: *piqmentli retinit, rd10 tipli siçanlar, para-aminobenzoy turşusu, elektoretinoqrafiya*

XÜLASƏ

Elektoretinoqrafiya (ERQ) üsulu ilə rd10 tipli siçanlarda para-aminobenzoy turşusunun (PABK) fotoreseptorların funksional vəziyyətinə təsiri qiymətləndirilib. ERQ göstəricilərinə görə PABK tətbiqi rd10 tipli siçanlarla kolbacıqların sağalma prosesini yaxşılaşdırır və piqmentli retinitin terapiyasına effektiv əlavə xidmətini göstərə bilər.

Galbinur T.P.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF PARA-AMINOBENZOIC ACID ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE RETINA ON THE MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA

The Dobromed clinic, eye disease department, Azerbaijan, Baku.

Key words: *retinitis pigmentosa, rd10 mice, para-aminobenzoic acid, electroretinography.*

The effect of para-amino-benzoic acid (PABA) on the functional state of photoreceptors in rd10 mice by electroretinography (ERG) is estimated. According to the data of ERG, PABA improves survival of cones in rd10 mice and may serve as an effective addition to the treatment of retinitis pigmentosa.

Korrespondensiya üçün:

Qəlbınur Tural Paşa oğlu

Email: tgalbinur@gmail.com