

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПИГМЕНТНОЙ ДИСТРОФИИ СЕТЧАТКИ

*Национальный Центр Офтальмологии имени акад. Зарифы Алиевой, г.Баку, Азербайджан  
Институт физиологии имени акад. А.И.Караева, г.Баку, Азербайджан*

**Ключевые слова:** пигментная дистрофия сетчатки, гипоталамус, иммуноферментный анализ, серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок, белок теплового шока 70 кДа, родопсин

Пигментная дистрофия сетчатки является тяжёлой и, на сегодняшний день, incurable формой офтальмологической патологии. При этом виде заболевания наблюдается разрушение рецепторного аппарата сетчатки с последующей утратой зрительной функции. По мнению некоторых авторов, этиология и патогенез пигментной дистрофии сетчатки связаны с нарушением нормального взаимодействия гипоталамуса с сетчаткой, при этом первопричина данной патологии обусловлена дисфункцией собственно гипоталамуса и соответственно ослаблением трофического обеспечения клеточных элементов сетчатки [1]. Эта идея была частично подтверждена результатами исследований проф. Н.А.Гаджиевой с коллегами на модели пигментной дистрофии сетчатки у кроликов, у которых импульсная стимуляция вентро-медиального ядра гипоталамуса способствовала более быстрому восстановлению амплитуды электроретинограммы, регистрируемой при предъявлении вспышек света разной интенсивности [2].

Ранее в Институте физиологии имени А.И.Караева НАН Азербайджана из головного мозга крыс был выделен серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок (СМАБ), обладающий антимуtagenной и антиоксидантной активностью к токсинам химической и бактериальной природы [3, 4].

**Цель** – изучить молекулярные патогенетические и репаративные механизмы сетчатки и гипоталамуса в модели дистрофии сетчатки на кроликах и у больных с пигментной дистрофией сетчатки.

### Материал и методы

Выделение СМАБ осуществляли из головного мозга быка. Основными этапами фракционирования были: 1) осаждение сульфатом аммония в интервале 0-40%-ного насыщения; 2) гель-хроматография на колонке (3 X 60 см) сефадекса G-150 [2].

Для выявления пигментной дистрофии был разработан метод определения уровня родопсина в сетчатке методом непрямого иммуноферментного анализа (НИФА). Для этого из 35 глаз коров путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы выделили 1.6 мг родопсина [5], который использовали для получения к нему иммуноглобулинов. Выделение сетчатки из глаз коров и все последующие операции по очистке родопсина осуществляли в затемнённой комнате, освещаемой фотографическим фонарём (25 Вт) с красным светофильтром.

Имуноглобулины к СМАБ и родопсину получали в результате 5-6-месячной иммунизации кроликов. Кровь забирали из ушной вены кролика через 10 дней после 3-й и последующих инъекций, выделяли сыворотку и осаждали иммуноглобулины равным объёмом 100%-ного сульфата аммония.

Определение уровня родопсина и шаперона – белков теплового шока (БТШ) 70 кДа [6, 7] в сетчатке и СМАБ в гипоталамусе кроликов осуществляли методом НИФА на полистироловых планшетах (Sigma, Германия). В качестве антигенов использовали суммарные белки сетчатки и гипоталамуса кроликов. В качестве первых антител использовали кроличьи иммуноглобулины к этим белкам, а в качестве вторых антител – козы противокроличьи иммуноглобулины с конъюгированной пероксидазой хрена. Визуализацию реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – ортофенилендиамина. Реакцию останавливали 3 М раствором NaOH, а результаты считывали в фотометре для иммуноферментного анализа “Molecular Devices Spectra Max 250” (MTX Lab Systems, США) на длине волны 492 нм.

Исследования выполнены на кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2.2-2.6 кг. Пигментную дистрофию сетчатки создавали путём однократного внутривенного введения кроликам моноидоуксусная кислота (МЙУК) в физиологическом растворе из расчёта 26 мг на 1 кг массы животного в 2.5 мл стерильного физиологического раствора (тяжёлая степень дистрофии).

Основные серии исследований были выполнены по следующей схеме. В 1-й серии исследований кроликам (n=3) в.в. вводили МЙУК и через 5, 13 и 27 сут регистрировали амплитуду суммарной ЭРГ на предъявление вспышек света различной интенсивности. В отдельной группе животным на 15-ые сутки после введения МЙУК в боковой желудочек головного мозга кроликов вводили СМАБ в количестве 20 мкл в концентрации 1.5 мг/мл.

Во 2-й серии исследований кроликам ( $n=4$ ) в.в. вводили МЙУК и через 12 сут животных умерщвляли и выделяли сетчатку из обоих глаз (8 глаз) и гипоталамус; в сетчатке методом НИФА определяли уровень родопсина и БТШ70, а в гипоталамусе – уровень СМАБ.

В 3-й серии были созданы 3 группы животных: 1) интактная; 2) контрольная – в.в. введение МЙУК плюс интравитреальное введение инактивир. СМАБ и 3) опытная – в.в. введение МЙУК плюс и.в. введение СМАБ. Препараты вводили в объёме 150 мкл, в стерильном физиологическом растворе, в концентрации 1.5 мг/мл, на 5-е сут после введения МЙУК и через 7 сут методом НИФА в сетчатке определяли уровень родопсина и БТШ70.

В 4-й серии исследования проводили у больных пигментной дистрофией сетчатки, диагностированной в Национальном Центре Офтальмологии имени акад. Зарифы Алиевой с регистрацией ЭРГ на приборе "Roland Consult" (фирма "Electrophysiological Diagnostic Systems", Германия) при предъявлении вспышек света с частотой 0.2 Гц и продолжительностью одного стимула 200 мсек. У больных ( $n=9$ ) и у здоровых испытуемых ( $n=9$ ) из вены забирали пробы крови, отделяли сыворотку и определяли в ней уровень естественных аутоантител к СМАБ [8].

Полученные значения уровня исследованных антигенов в гипоталамусе и сетчатке обоих глаз у кроликов, а также уровень естественных аутоантител в сыворотке крови больных и здоровых испытуемых усредняли по группам животных и сравнивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

В 1-й серии исследований при предъявлении вспышек света интенсивностью 0.016, 0.068, 0.45 и 1.4 Дж регистрируемая суммарная ЭРГ у интактных животных составляла, соответственно,  $162\pm 10$  мкВ,  $234\pm 12$  мкВ,  $317\pm 8$  мкВ и  $396\pm 15$  мкВ (Рис. 1). На 5-ые сутки после в.в. введения МЙУК наблюдалось отсутствие ЭРГ на предъявление света интенсивностью 0.016 Дж, а амплитуда ЭРГ на предъявление вспышек света остальных интенсивностей составляла, соответственно,  $50\pm 5$  мкВ,  $75\pm 5$  мкВ и  $83.3\pm 10$  мкВ. На 13-ые сутки после в.в. введения МЙУК регистрировали ЭРГ со следующими значениями амплитуд:  $50\pm 4$  мкВ,  $77\pm 6$  мкВ,  $80\pm 8$  мкВ и  $100\pm 11$  мкВ, соответственно (Рис. 1). На 27-ые сутки после в.в. введения МЙУК ЭРГ имела следующие значения амплитуд:  $67\pm 5$  мкВ,  $108\pm 7$  мкВ,  $125\pm 8$  мкВ и  $133\pm 12$  мкВ.

Введении СМАБ в боковой желудочек головного мозга кроликов приводило через 7 сут к значительному возрастанию амплитуды ЭРГ на предъявления вспышек света всех использованных интенсивностей. В частности, под влиянием СМАБ амплитуды ЭРГ были следующими:  $150\pm 12$  мкВ,  $175\pm 13$  мкВ,  $183\pm 12$  мкВ и  $225\pm 15$  мкВ (Рис. 1).

Во 2-й серии исследований через 12 сут после введения МЙУК животных умерщвляли и выделяли сетчатку из обоих глаз и гипоталамус. Методом НИФА было выявлено заметное снижение уровня родопсина и повышение уровня БТШ70. В частности, если уровень родопсина у интактных животных составлял  $0.275\pm 0.011$  оптических единиц, то у животных опытной группы его уровень равнялся  $0.207\pm 0.007$  опт. ед. ( $p<0.001$ ; рис. 2). При этом уровень БТШ70 в сетчатке у интактных животных составлял  $0.094\pm 0.004$  опт. ед., тогда как у опытных животных его уровень соответствовал  $0.14\pm 0.007$  опт. ед. ( $p<0.001$ ; Рис. 2). Вместе с тем, определение СМАБ в гипоталамусе выявило увеличение его уровня при тяжёлой формы пигментной дистрофии сетчатки. В частности, уровень СМАБ у животных с пигментной дистрофией сетчатки составлял  $0.298\pm 0.009$  опт. ед., в то время как у интактных животных –  $0.24\pm 0.01$  опт. ед. ( $p<0.01$ ; рис. 2).

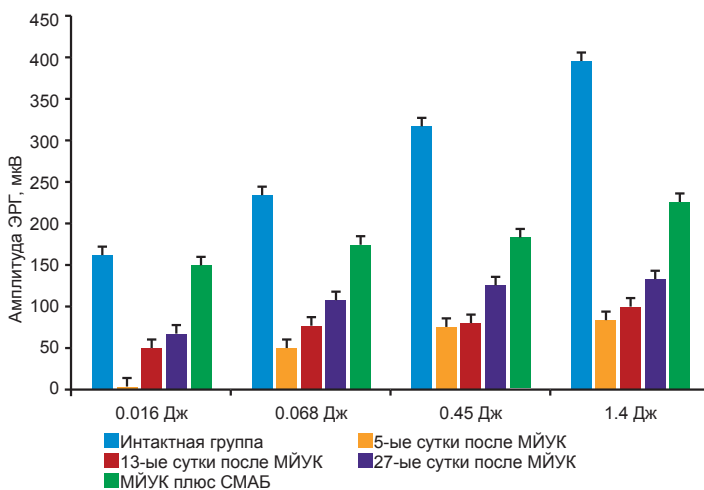


Рис. 1. Изменение амплитуды суммарной ЭРГ через разные интервалы времени после введения МЙУК и под влиянием СМАБ

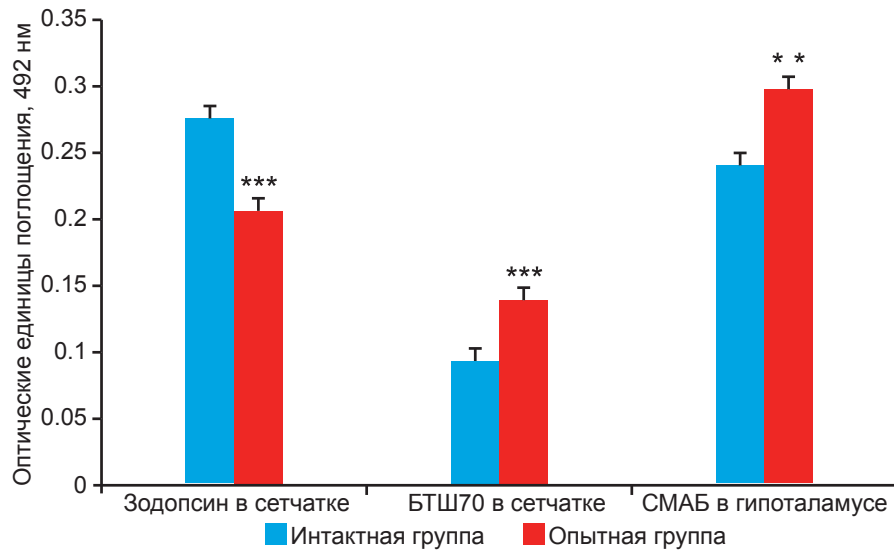


Рис. 2. Изменение уровня родопсина и БТШ70 в сетчатке и СМАБ в гипоталамусе кроликов после в.в. введения МЙУК. \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$

В 3-й серии исследований (на 5-ые сутки после в.в. введения МЙУК) животным интравитреально вводили инактивированный нагреванием СМАБ (контрольная группа) и активный СМАБ (опытная группа). Было обнаружено, что через 7 сут. после введения СМАБ в сетчатку кроликов отмечается заметное повышение уровня родопсина. В частности, у интактных животных уровень родопсина в сетчатке составлял  $0.187 \pm 0.005$  опт. ед., у контрольных животных, получавших инъекции инактивированного СМАБ, –  $0.13 \pm 0.008$  опт. ед. ( $p < 0.001$ ), а у животных опытной группы (СМАБ) –  $0.193 \pm 0.011$  опт. ед. ( $p < 0.001$ ; рис. 3). В этой же серии экспериментов по указанной выше схеме определяли также уровень БТШ70 в сетчатке у животных. При этом уровень БТШ70 в сетчатке у интактных кроликов составлял  $0.085 \pm 0.004$  опт. ед., у контрольных животных –  $0.102 \pm 0.004$  опт. ед. ( $p < 0.05$ ), у животных опытной группы –  $0.123 \pm 0.005$  опт. ед. ( $p < 0.001$ ; рис. 4).

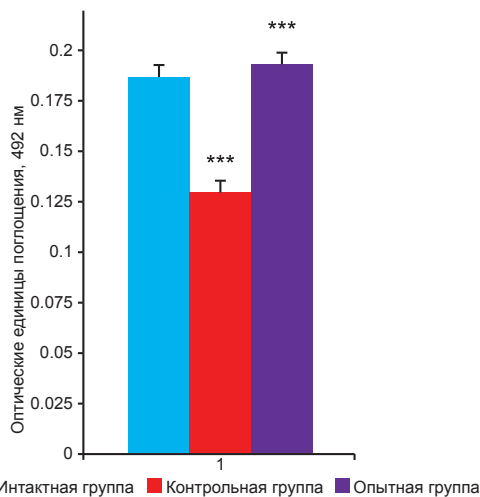


Рис. 3. Влияние интравитреального введения СМАБ через 5 сут после МЙУК на уровень родопсина в сетчатке кроликов. \*\*\* -  $p < 0.001$

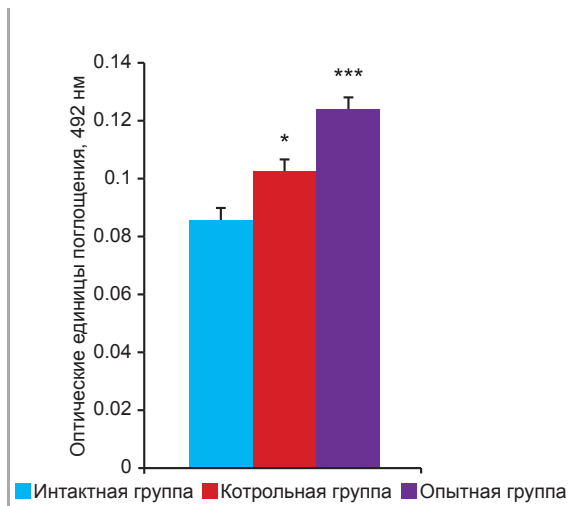


Рис. 4. Влияние интравитреального введения СМАБ через 5 сут после МЙУК на уровень БТШ70 в сетчатке у кроликов. \*\*\* -  $p < 0.001$

Таким образом, под влиянием интравитреального введения СМАБ на 5-ые сутки после введения МЙУК в сетчатке животных опытной группы отмечалось одновременное повышение уровня родопсина и БТШ70.

В 4-й серии исследований было проведено изучение уровня естественных аутоантител к СМАБ в сыворотке крови больных, страдающих пигментной дистрофией сетчатки. У всех 9 обследованных больных пигментная дистрофия сетчатки была диагностирована в условиях клиники с помощью регистрации ЭРГ. В результате проведенных исследований у 9 больных ЭРГ не регистрировалась, что дало основание для постановки диагноза пигментной дистрофии сетчатки.

В результате проведенных исследований методом НИФА было выявлено, что в сыворотке крови у больных с пигментной дистрофией сетчатки уровень естественных аутоантител к СМАБ был значительно ниже, чем у здоровых испытуемых той же возрастной группы. В частности, если уровень естественных аутоантител к СМАБ в сыворотке крови здоровых испытуемых составлял  $0.106 \pm 0.008$  опт. ед., то у больных их уровень составлял  $0.076 \pm 0.004$  опт. ед. ( $p < 0.01$ ; рис. 5).

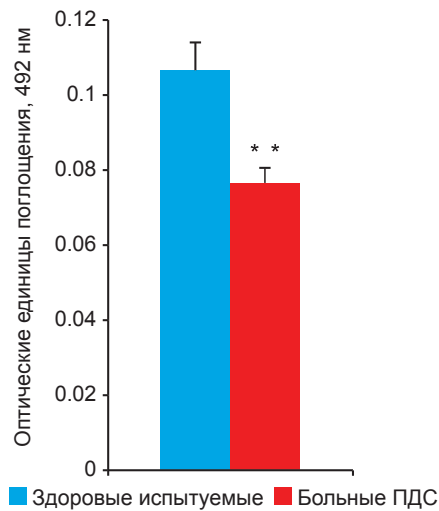


Рис. 5. Изменение уровня естественных аутоантител к СМАБ в сыворотке крови у больных, страдающих пигментной дистрофией сетчатки. \*\* -  $p < 0.01$

Подводя итог проведенным четырем сериям исследований, можно сделать заключение о том, моделирование тяжелой степени пигментной дистрофии сетчатки на кроликах вызывает серьезные изменения в характере функционирования рецепторного аппарата сетчатки в виде резкого снижения амплитуды суммарной ЭРГ и снижения уровня родопсина.

Вместе с тем, при формировании тяжелой степени пигментной дистрофии сетчатки наблюдается ряд молекулярных изменений в сетчатке, по-видимому, обуславливающих инициацию и протекание репаративных процессов как в самой сетчатке, так и в гипоталамусе. В частности, при развитии этой патологии наряду со снижением уровня родопсина происходит повышение уровня БТШ70 в сетчатке и увеличение уровня СМАБ в гипоталамусе.

С другой стороны, одновременное повышение уровней БТШ70 и родопсина в сетчатке у животных с тяжелой формой дистрофии сетчатки под влиянием интравитреального введения СМАБ дает основание для заключения о том, что ядра гипоталамуса осуществляют трофическую регуляцию рецепторного аппарата сетчатки и поддержание конформации родопсина в функционально активной форме за счет синтеза СМАБ в гипоталамусе, транспортируемого к клеткам сетчатки посредством ретроградного аксонного транспорта и моторного белка дайнеина [9] и индуцирующего синтез БТШ70 в клетках сетчатки. Повышение амплитуды ЭРГ под влиянием внутривитреального введения СМАБ кроликам с пигментной дистрофией сетчатки подтверждает заключение о трофической функции, осуществляемой СМАБ.

#### Заключение

Принимая во внимание тот факт, что уровни естественных аутоантител отражают уровни всех присутствующих в организме антигенов [10, 11, 12], можно сделать заключение о том, что выявленный в 4-й серии исследований сниженный титр естественных аутоантител к СМАБ у больных с диагностированной пигментной дистрофией сетчатки по сравнению с его уровнем у здоровых испытуемых отражает сниженный уровень СМАБ в тканях организма, в том числе в гипоталамусе и сетчатке. Эти результаты, а также результаты других серий исследований позволяют высказать предположение о том, что формирование дан-

ной патологии сетчатки у больных может быть вызвано недостаточностью синтеза СМАБ в ядрах гипоталамуса и, соответственно, недостаточностью осуществления ими трофической регуляции рецепторного аппарата сетчатки.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Кацнельсон А.Б. Аномалии развития и заболевания глаз в раннем детском возрасте. М.: Медицина, 1958.
2. Агаев Т.М., Гаджиева Н.А., Дмитренко А.И., Рзаева Н.М. Нейрофизиологическое исследование роли гипоталамуса в механизме регуляции функции различных отделов зрительного анализатора. Баку: Елм; 2004.
3. Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами. Бюллетень эксперим. биол. мед. 2000; 129(8):147-150
4. Мовсум-заде С.К., Мехтиев А.А., Мехтиев Х.Ш., Телфорд У.Г., Гайсина А.А., Зейналов Ш.Х. Детоксикационные свойства серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка в отношении токсинов химической и бактериальной природы. Известия НАН Азербайджана, Серия биологическая. 2013; 68(1): 24-29.
5. Ohguro H., Hooser J.P., Milam A.H., Palczewski K. Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. J. Biol. Chem. 1995; 270:14259–14262.
6. Evans Ch.G., Chang L., Gestwicki J.E. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target. J. Med. Chem. 2010; 53(12):4585–4602. [https://doi.org/ 10.1021/ jm100054f](https://doi.org/10.1021/jm100054f).
7. Malyshev I. The Functions of HSP70 in Normal Cells. Chapter 2. In: Immunity, Tumors and Aging: The Role of HSP70. Springer Briefs in Biochemistry and Molecular Biology. 2013. DOI: 10.1007/978-94-007-5943- 5.
8. Полетаев А.Б. Регуляторные ауто-АТ. В сб.: Моноклональные антитела в нейробиологии. Новосибирск. 1995. С. 37-47.
9. Susalka S.J., Pfister K.K. Cytoplasmatic dynein heterogeneity: implications for axonal transport. J. Neurocytol. 2000; 29 (11-12):819-829.
10. Avrameas S. Natural autoantibodies: from “horror autotoxins” to “gnothi seaton”. Immunology Today. 1991. V. 12, pp. 154-158.
11. Bendtzen K., Svenson M., Jonsson V., Hippe E. Autoantibodies to cytokines – friends or foes. Immunology Today. 1990. V. 11, pp. 167-169.
12. Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L., Ayouba A., Malachere E., Coutinho A., Kazaychkin M.D. Self-reactive natural autoantibodies in healthy individuals. J. Immunology Methods. 1998. V. 216, pp. 117-137.

İsmayılova Ü.S.

## TORLU QIŞANIN PIQMENT DİSTROFİYASININ MOLEKULAR VƏ İMMUNOLOJİ MEXANİZMLƏRİNİN EKSPERİMENTAL-KLİNİK ÖYRƏNİLMƏSİ

*Akad. Zərifə Əliyeva adına Milli Oftalmologiya Mərkəzi, Bakı şəh., Azərbaycan  
AMEA-nın akad. A.İ. Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu, Bakı şəh., Azərbaycan\**

**Açar sözlər:** torlu qişanın piqment distrofiyası, hipotalamus, immunoenzim üsulu, serotonin-modullu antikonsolidasiya zülalı, 70 kDa istilik şoku zülalı, rodopsin

## XÜLASƏ

**Məqsəd** - ada dovşanların eksperimental modelində yaranan torlu qışa pigment distrofiyasının və bu patologiyadan zərər çəkən xəstələrin üzərində tədqiqatların aparılması.

**Material və metodlar**

Torlu qışa pigment distrofiyası ada dovşanlarında monoyodsirkə turşusunun venadaxili yeridilməsi ilə yaradılıb. Hipotalamusda serotonin mübadiləsi ilə düz mütənasib əlaqədə olan serotonin-modullu antikonsolidasiya zülalın (SMAZ; Mekhtiev, 2000), torlu qışada 70 kDa istilik şoku zülalın və rodopsinin miqdarları və pigment disyotofiyası olan xəstələrin zərdabında SMAZ-a qarşı təbii autoimmun anticisimlərin miqdarı dolaylı immunoenzim üsulu ilə təyin olunub.

**Nəticə**

Torlu qışanın reseptor hüceyrələrinə hipotalamus tərəfindən trofik tənzimedicisi təsirin əsasında duran molekulyar mexanizm təhlil olunub. Sağlam şəxslərə nisbətən elektoretinoqram vasitəsilə diaqnoz olunan torlu qışanın pigment distrofiyası xəstələrinin zərdabında təbii autoimmun SMAZ-a qarşı anticisimlərin miqdarının azalması müşahidə olunur.

**Yekun**

Torlu qışanın pigment distrofiyasının etiologiyası, çox güman ki, torlu qışanın reseptor hüceyrələrinə hipotalamus nüvələrinin tərəfindən görünən trofik təchizadının pozulmasıdır.

Ismailova U.S.

## EXPERIMENTAL-CLINICAL STUDY OF MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF RETINITIS PIGMENTOSA

*National Ophthalmology Centre named after acad. Zarifa Aliyeva, Baku, Azerbaijan  
Institute of Physiology named after acad. A.I.Garayev, Baku, Azerbaijan*

**Key words:** *retinitis pigmentosa, hypothalamus, ELISA-test, serotonin-modulating anticonsolidation protein, heat shock proteins 70 kDa, rhodopsin*

## SUMMARY

**Aim** - study of probable underlying molecular mechanisms of retinal pigmental dystrophy on the experimental model on the rabbits and on the patients having this pathology.

**Material and methods**

Retinitis pigmentosa was formed on the rabbits through intravitreal administration of monoiodoacetic acid. The levels of serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP; Mekhtiev, 2000) related directly to serotonin turnover, in the hypothalamus, heat shock protein 70 kD and rhodopsin in the retina and natural autoimmune anti-SMAP antibodies in the serum of the patients with retinal dystrophy were evaluated with application of the indirect ELISA-test.

**Results**

The molecular mechanism of underlying hypothalamic trophic regulatory effects on retina receptor cells is analysed. Downregulation of natural autoimmune anti-SMAP antibodies in the serum of the electroretinogram-diagnosed patients with retina dystrophy relatively to healthy persons of the same age is revealed.

**Conclusion**

The etiology of retinitis pigmentosa is perhaps related to impairment of trophic support of the retinal receptor cells by the hypothalamic nuclei.

## Для корреспонденции:

*Исмаилова Улькер Сурхай кызы, врач-лаборант Национального Центра Офтальмологии имени акад. Зарифы Алиевой  
Тел.: (99412) 569-09-07; (99412) 569-09-47  
Адрес: AZ 1114, г.Баку, ул. Джавадхан, 32/15  
Email: administrator@eye.az; www.eye.az*