

Qəlbinur. T.P.

PARA-AMİNOBENZOY TURŞUSUNUN TOR QIŞANIN PIQMENTLİ DİSTROFIYASI OLAN SIÇAN MODELİNDƏ FOTORESEPTORLARA TƏSİRİNİN ÖYRƏNİLMƏSİ.

Hadassah-Hebrev Universiteti Tibb Mərkəzi, Oftalmologiya Kafedrası, Yerusəlim, İsrail

Açar sözlər: tor qişanın piqmentli distrofiyası, fotoreseptor, rd10 tipli siçanlar, para-aminobenzoy turşusu.

Tor qişanın piqmentli distrofiyası (PD) – tor qişanın irsi distrofiyalarından olub heterogen qrup xəstəliyidir [1-3]. Degenerativ proses zamanı ilk olaraq çöpçük fotoreseptorları və tor qişanın piqment epitelisi zədələnir. Daha sonra ikincili disfunksiya və kolbacıq fotoreseptorlarının məhvi baş verir ki, bu da yalnız periferik deyil, həm də mərkəzi görmənin itkisinə gətirib çıxarır. PD zamanı da kolbacıqlar apaptoz yolu ilə məhv olurlar, bunun da induksiyasında əsas rollardan biri oksidativ stressdir [4]. PD modeli heyvanlarda aparılan tədqiqatlar nəticəsində fotoreseptorlarda malondialdehid və digər növ lipidlərin peroksid oksidləşməsinin səviyyəsinin artması müəyyən edilmişdir [5]. PD patogenezinə oksidləşdirici stresin əsas rol oynadığı nəzərə alındığından, antioksidant müalicənin aparılması daha perspektiv hesab olunur. PD olan siçan modellərində müəyyən olunmuşdur ki, antioksidant müalicə, fotoreseptor məhvinin azalmasına gətirib çıxara bilər [6].

Para-aminobenzoy turşusu (PABT) – vitamin Bx və benzoy turşusu törəməsidir. PABT ultrabənövşəyi şualardan müdafiəni təmin edir, endogen interferon və interleykin-6 sintezinə səbəb olur⁷ və antikoagulyant fəallığa malikdir [7-8]. PABT antioksidant xüsusiyyətlərə malikdir- hidroperoksid və malondialdehidin miqdarını aşağı salır, buynuz qişa və büllürdə katalazanın aktivliyini normallaşdırır [9-10] və səbəb olunmuş hipoksiyadan sonra torlu qişada lipidlərin peroksid oksidləşməsinin intensivliyini aşağı salır [11]. Aparılan çalışmalarda aydın olmuşdur ki, PABT irsi abiotrofiyalı PD olan siçanlarda fotoreseptorların xarici seqment disklərinin morfogenezini stimullaşdırır [12].

rd10 (retinal degeneration 10) tipli siçanlar PD-in eksperimental modellərindən biridir¹². Bu növ heyvanlar həyatlarının ilk aylarında proqres edici torlu qişa degenerasiyasının zəif formada olması ilə xarakterizə olunur. rd10 növlü siçanlar çöpçüklərin fosfodiesterazası genində resessiv mutasiya üzrə homoziqotdurlar. Mutasiya amin turşuların ferment β-subunitdə dəyişilməsinə, çöpçük fotoreseptorlarının disfunksiya və apoptozuna gətirib çıxarır. Retinal degenerasiya postnatal inkişafın təxminən 18-ci günündən çöpçüklərin məhv olması ilə başlayır. Onların məhvinin ən pik nöqtəsi 20-25 günə təsadüf edir və tor qişanın praktik olaraq tam degenerasiyası 6-8 həftəyə təsadüf edir. Patoloji prosesin ilk mərhələlərində kolbacıqlar funksional fəallığı qoruyub saxlaya bilirlər. Lakin sonralar sitotoksik amillərin ikincili zədələnməsi və ya oksidativ stress nəticəsində həlak olurlar [13].

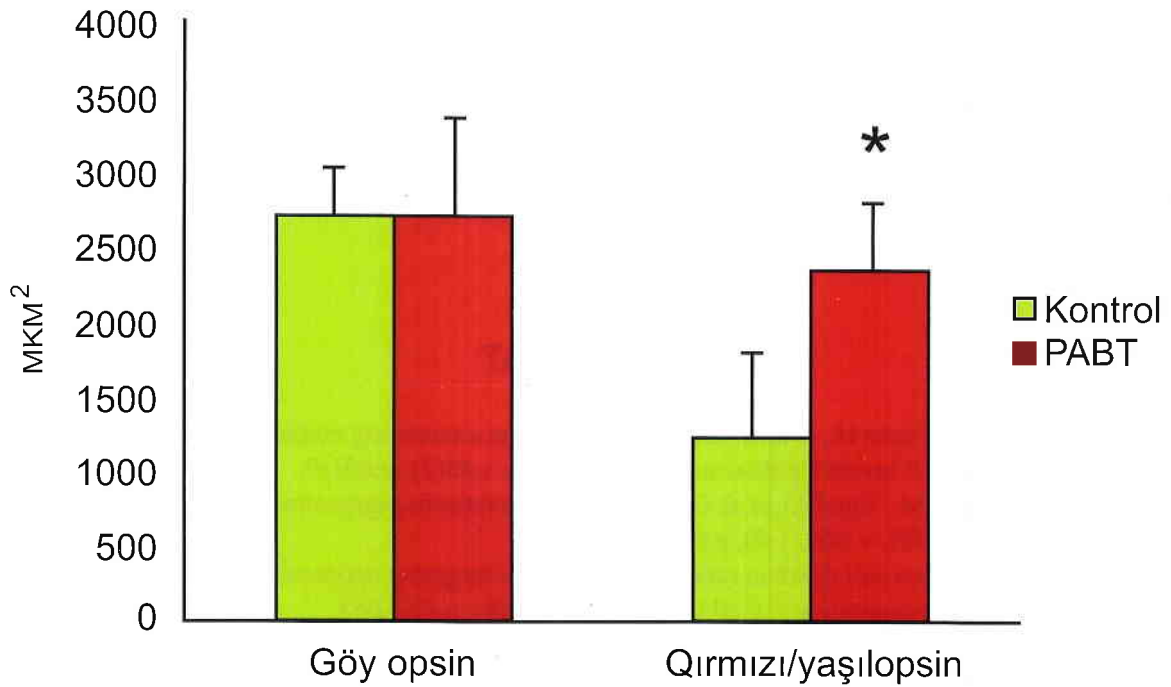
Hazırkı tədqiqatın məqsədi, eksperimental şəraitdə PABT-nun rd10 tipli siçanların fotoreseptorlarının həyat fəaliyyətinə təsirinə öyrənilməsi idi.

Material və metodlar. Eksperimental olaraq müalicə 2 qrupa bölünmüş rd10 tipli 62 siçanda aparılmışdır (Jackson laboratoriyası, Meyn ştatı, ABŞ)- müalicə qrupu (n=33) və kontrol qrupu (n=29). Müalicə qrupuna aid olan heyvanlara doğulmalarının 3-cü günündən 4,5 həftəyə qədər həftədə 6 dəfə fizioloji məhlulda PABT inyeksiyası intraperitoneal olaraq yeridilmişdir (50mq/kg). Kontrol qrupunda olan heyvanlara isə paralel olaraq eyni həcmdə fizioloji məhlul intraperitoneal inyeksiya şəklində yeridilmişdir.

İmmunohistokimyəvi müayinə üçün gözlər 3 və 4,5 həftədə enukleasiya olunmuşlar; Fiksasiya və dehidratasiya olunduqdan sonra nümunələr paraplasta yerləşdirilmişlər. Qalınlığı 4mkm olan hissəvi kəsiklər standartlaşdırma üçün görmə sinirinin mərkəzindən aparılır. Hazırlanmış və qurudulmuş kəsiklərdə deparafinlənmə aparılmışdır. Anticisimlərin qeyri spesifik bağlanması qarşısını almaq üçün 110°C-de 10mm sitrat buferdə (pH=6.0) və PBS (1% albumin, 0.1% Triton-X100, 3% zərdab) ilə qapalı şüşəqəbuledicilərdə inkubasiya edilmişdir. Daha sonra kəsiklər 1 saat ərzində birincili anticisimlərlə inkubasiya olunmuşdur. Şəkillər rəqəmli kamerayla təchiz edilmiş fluoressensiya mikroskopunda yerinə yetirilmişdir (Olympus BX41, Yaponiya). Şəkillərin işlənməsi və kəmiyyət analizi Photoshop 7.0 və ImageJ proqramlarından istifadəylə həyata keçirilmişdir. Qırmızı/yaşıl və göy opsininin miqdarı preparatların rəqəmli şəkillərində flyuoresensiyanın sahəsinin ölçülməsi yolu ilə təyin edilirdi. Fluoresseyinin kənar intensivliyi qoşulmuşdur. Bu zaman yalnız rənglənmənin daha intensiv olan sahələri əsas götürülür. Hər göz üçün ən azı dörd kəsikdən ölçüldü, bu ölçülərin orta nəticəsi və orta nəticə olaraq standart səhvlər hesablanmışdır.

Nəticələr. rd10 tipli siçanların tor qişa kəsiklərində miqdar immunofluoresensiya metodu ilə göy və qırmızı yaşıl opsininin miqdarının qiymətləndirilməsi aparılmışdır.

PABT yeridilmiş heyvanların tor qişasında qırmızı/yaşıl opsinlərin miqdarının yetərinə çox olduğu müşahidə olunmuşdur. Opsinin miqdarında statistik əhəmiyyətli fərqlər 3 və 4,5-ci həftələrdə aşkar olunmuşdur ($p < 0,05$, şəkil 1 və 2). 4,5-ci həftədə PABT yeridilmiş heyvanların tor qişasında qırmızı/yaşıl opsinin miqdarı müayinə qrupunda olan heyvanlara nisbətə 2,4 dəfə çox olmuşdur. Beləliklə biz PABT-nun qırmızı/yaşıl opsinlərin həyat fəaliyyətinə müsbət təsir etdiyini müşahidə etdik. Maraqlı nəticələr rd10 tipli sıçanların tor qişasında olan göy opsinlərin tərkibinin müayinəsi zamanı alınmışdır. Həm PABT yeridilmiş qrupda, həm də kontrol qrupunda göy opsinlərin miqdarı müayinə zamanı praktik olaraq dəyişməz qalmışdır. PABT inyeksiyası yeridilmiş heyvanların torlu qişasında opsinlərin miqdarı əhəmiyyətli dərəcədə yuxarı olduğu müəyyən olunmuşdur. Ehtimal olunur ki, PABT oksidativ zədənin qismən müdafiəsini təmin edir və kolbacıq fotoreseptorlarının sağ qalmasına imkan yaradır.



Şəkil 1. Kontrol qrupunda (yaşıl sütun) və PABT yeridilmiş müalicə qrupunda (qırmızı sütun) olan rd10 tipli sıçanların tor qişasında 3-cü həftədə, qırmızı/yaşıl və göy opsinlərin miqdarı.



Şəkil 2. Kontrol qrupunda (yaşıl sütun) və PABT yeridilmiş müalicə qrupunda (qırmızı sütun) olan rd10 tipli sıçanların tor qişasında 4,5-ci həftədə, qırmızı/yaşıl və göy opsinlərin miqdarı.

Müzakirə. Tor qişada opsinlərin qiymətləndirilməsi göstərmişdir ki, PABT-nun sistem şəkilli yeridilməsi rd10 tipli siçanların tor qişasında gedən degenerativ proseslərə stabilizə edici təsir göstərmişdir və kolbacıq fotoreseptorunun yaşamasına təsir etmişdir. Çox güman ki, PD zamanı çöpcük fotoreseptorlarının məhvi müəyyən olunmuşdur. Çöpcüklərdə sintez olunan mutant zülal digər faktorlardan asılı olmayaraq və daha tez onların apaptozunu induce edir. Çöpcüklərin müdafiəsi üçün proapoptik kaskadlara tuşlanmış gen terapiyasının və ya dərman vasitələrinin hazırlanması perspektivlidir.

Aparılan tədqiqatda PABT tətbiqi həm 3, həm 4,5-ci həftədə kolbacıqların sağ qalma dərəcəsinə əhəmiyyətli dərəcədə yaxşılaşdırmışdır. PABT yeridilmiş müalicə qrupu heyvanların tor qişasında qırmızı/yaşıl opsinlərin miqdarı 2,4 dəfə çox olmuşdur, fərqlər statistik etibarlı olmuşdur. Çöpcüklərdən fərqli olaraq kolbacıqların itgisi təkrari olaraq baş verir və oksidativ zədələnmənin intensivliyini azaltmaqla onların məhvinə qarşısını almaq imkanı mövcuddur. PABT-nun müdafiə qabiliyyəti çox güman ki, onun antioksidant xüsusiyyətilə bağlıdır. PABT lipidlərdə peroksid oksidləşməsinin intensivliyini aşağı salır, fotoreseptorların zədələnməsinin qarşısını alır və yaşamasına şərait yaradır.

Yekun. Heyvanlar üzərində aparılan tədqiqatlar göstərmişdir ki, antioksidantların kompleks tətbiqi fotoreseptorların yaşama qabiliyyətini artırır 6,13. Beləliklə, PABT kolbacıqları oksidativ zədələnmədən qoruyur və PD zamanı antioksidant müalicəyə əlavə effektiv təsir göstərir.

ƏDƏBİYYAT:

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(2), p.601-9.
2. Wang D.Y., Chan W.M., Tam P.O. et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications // *ClinChimActa.*, 2005, v. 351(1-2), 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(6), 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. 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.
7. 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. офтальмологии*, 2001, №1, с.33-36.
8. Дрозд Н.Н., Акберова С.И., Строева О.Г. и др. Антитромботическая активность пара-аминобензойной кислоты // *Эксп. клин. фармакол.*, 2000, №3, с.40-44.
9. Акберова С.И., Строева О.Г., Магомедов Н.М. и др. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксипина в роговице и хрусталике (экспериментальные исследования) // *Вестн. офтальмол.*, 2001, №4, с.25-29.
10. 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.
11. 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, 314, с.483-487.
12. Gargini, C., Terzibasi, 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.
13. Komeima, K., Rogers, B.S., Lu, L., et al. Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, v.103, p.11300-11305.

Гальбинур Т.П.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПАРА-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА ФОТОРЕЦЕПТОРЫ ПРИ ПИГМЕНТНОЙ ДИСТРОФИИ СЕТЧАТКИ НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ.

Кафедра офтальмологии, Медицинский Центр Университета Hadassah-Hebrev, Иерусалим, Израиль

Ключевые слова: пигментная дистрофия сетчатки, фоторецепторы, мыши линии rd10, пара-аминобензойная кислота.

РЕЗЮМЕ

Цель: экспериментальное изучение влияния пара-аминобензойной кислоты (ПАБК) на жизнеспособность фоторецепторов у мышей линии rd10 путем измерения содержания красного/зеленого и синего опсинов.

Методы: эксперимент проведен на животных моделях пигментной дистрофии сетчатки (ПД) – мышцах линии rd10. Животным из группы лечения (n=33) 6 раз в неделю с третьего дня после рождения до 4,5 недели проводились интраперитонеальные инъекции ПАБК (50 мг/кг), животным из контрольной группы (n=29) - инъекции того же объема физиологического раствора. Для сравнения групп использовался непарный двухсторонний t-критерий, уровень статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты: Содержание красного/зеленого опсина было значительно выше в сетчатке животных, которым выполнялись инъекции ПАБК и на 3 и на 4,5 неделе ($p < 0,05$). На 4,5 неделе содержание красного/зеленого опсина в сетчатке животных, получавших ПАБК было в 2,4 раза выше, чем в сетчатке животных контрольной группы.

Заключение: оценка содержания опсинов в сетчатке показывает, что системное введение ПАБК способствует выживанию колбочковых фоторецепторов при ретиальной дегенерации у мышей линии rd10. Таким образом, ПАБК обеспечивает защиту колбочек от повреждения и может стать перспективным дополнением к антиоксидантной терапии ПД.

Galbinur T.P.

STUDY OF PARA-AMINOBENZOIC ACID EFFECT ON THE PHOTORECEPTORS OF THE RETINAL PIGMENT DYSTROPHY OF MICE MODELS.

Faculty of ophthalmology, Medical Centre of Hadassah-Hebrev, Jerusalem, Israel

Keywords: retinal pigment dystrophy, photoreceptors, rd10 mice model, para-aminobenzoic acid.

SUMMARY

Aims: An experimental study of the effect of para-aminobenzoic acid (PABA) on the viability of the photoreceptors of rd10 mice by measuring the content of red/green and blue opsins.

Methods: The experiment was conducted in animal models of retinal pigment dystrophy (PD) in rd10 mice. Animals of the treatment group (n = 33) were intraperitoneally injected with PABA in saline (50 mg / kg) 6 times a week from the third day after birth till 4.5 weeks of age. Animals in the control group (n = 29) were intraperitoneally injected with saline using the same protocol. T-test was used to compare the difference between two groups ($p \leq 0,05$, unpaired two-tailed t-test).

Results: The content of the red/green opsin was significantly higher in the retina of mice treated with PABA at 3 and 4.5 weeks of age ($P < 0.05$). At 4.5 weeks of age the contents of the red / green opsin in the retina of animals treated with PABA was 2.4 times higher in the treatment group compared with the control group.

Conclusions: The evaluation of the content of opsin in the retina shows that systemic administration of PABA promotes the survival of cone photoreceptors in rd10 mice with retinal degeneration. Thus, PABA helps to protect against oxidative damage of cones and can be an effective addition to the antioxidant therapy of retinal pigment dystrophy.

Korrespondensiya üçün:

Qəlbınur Tural Paşa oğlu

Email: tgalbinur@gmail.com