

İsmayılova Ü.S.

HİPOTALAMUSUN TOR QIŞAYA TROFİK DƏSTƏYİ: EKSPERİMENTAL HEYVAN MODELİ VƏ KLİNİK TƏDQIQATLAR

Akademik Abdulla Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu, Bakı, Azərbaycan

Akademik Zərifə Əliyeva adına Milli Oftalmologiya Mərkəzi, Bakı, Azərbaycan

E-mail: ulker-is@mail.ru

<https://www.doi.org/>

Giriş

Tor qişanın piqmentli distrofiyası (retinit piqmentli - RP) fotoreseptor aparatının və piqment epitelin zədələnməsi səbəbindən görmə funksiyasının itirilməsi ilə təzahür edən ağır oftalmoloji patologiyadır [1]. Tədqiqatçıların əksəriyyəti RP-nin etiologiyasını reseptor hüceyrələrinin anadangəlmə mutasiyaları ilə əlaqələndirsə də [2], digər alimlər bunu hipotalamusun tor qişa ilə normal qarşılıqlı əlaqəsinin pozulması və tor qişanın hüceyrə elementlərinə hipotalamik trofik dəstəyin azalması ilə izah edirlər [3]. Bu fikir Akademik Abdulla Qarayev adına Fiziologiya İnstitutunun professoru N.A.Hacıyevanın həmkarları ilə birlikdə dovşanlarda RP-nin modelində apardıqları tədqiqatlarla qismən təsdiqlənmişdir; həmin tədqiqatlarda hipotalamusun ventromedial nüvəsinin impuls stimulyasiyası elektoretinoqrammanın (ERG) “a” və “b” dalğaların amplitudalarının sürətlə bərpasına səbəb olmuşdur [4]. Bu nəticələr göstərir ki, hipotalamus nüvələri tor qişanın funksiyalarının qorunub saxlanılmasında mühüm trofik təsir göstərir.

Şaperon zülalları, xüsusilə molekulyar çəkisi 70 kDa olan istilik-şok zülalı (İŞZ70) maddələr zülalların pozulmuş konformasiyasını bərpa etməyə kömək edir [5]. Hazırkı tədqiqatlarda trofik amil kimi serotonin-modullu antikonsolidasiya zülalı (SMAZ) istifadə olunmuşdur. SMAZ Akademik Abdulla Qarayev adına Fiziologiya İnstitutunda siçovulların beynindən təcrid edilmişdir [6]. Bu zülal birbaşa serotonin səviyyəsindən asılıdır və onun funksiyalarını hüceyrədaxili səviyyədə həyata keçirir. Müxtəlif onurğalılda SMAZ-ın kimyəvi və bakterial xarakterli mənfi amillərə qarşı antimutagen və antitoksik aktivliyə malik olduğu göstərilmişdir [7]. Westernblotting metodundan istifadə edərək siçanlar üzərində aparılan təcrübələrdə SMAZ-ın intraperitoneal tətbiqinin qaraciyərdə İŞZ70 sintezinin artmasına səbəb olduğu sübut edilmişdir [8].

Məqsəd – RP diaqnozu olan xəstələrdə və dovşanlarda yaradılmış eksperimental model üzərində tor qişanın hipotalamus tərəfindən təmin olunan mərkəzi serotoninergik trofik dəstəyini və RP-nin əsas molekulyar mexanizmlərini təhlil etmək.

Material və metodlar

Tədqiqatlar bədən çəkisi 2,2-2,6 kq olan 65 erkək Şiñşilla dovşanları üzərində aparılmışdır. RP modeli 26 mq/kq dozada 2 ml steril fizioloji məhlulda həll

olunmuş monoyodsirkə turusunu (MYST) yeridilməsi yolu ilə yaradılmışdır [9]. Dolayısı immunoferment analizini (DİFA) istifadə etməklə tor qişada İŞZ70 və rodopsinin səviyyələri ölçülmüşdür. RP diaqnozu olan xəstələrdən əldə edilmiş qan zərdabında SMAZ-a qarşı təbii autoanticisimlərinin miqdarı DİFA ilə təyin edilmişdir.

Tədqiqatlarda istifadə edilən SMAZ öküzlərin beynindən təmizlənmə yolu ilə əldə edilmişdir. Təmizlənmənin əsas mərhələləri aşağıdakılar olmuşdur:

1. Beyin ekstraktından zülalların 40%-li ammonium sulfatda çökdürülməsi;
2. Sephadex G-150 kolonunda gel-xromatoqrafiya. Hər mərhələdən sonra immunoloji cəhətdən pozitiv zülal fraksiyalarının seçilməsi prosesi DİFA ilə aparılmışdır [10].

Tədqiq olunan preparatların təsiri fonunda RP-da baş verən dəyişiklikləri izləmək məqsədilə tor qişada rodopsinin səviyyəsinin müəyyən etmək üçün DİFA əsasında orijinal metod işlənilib hazırlanmışdır. 40 öküz gözündən tor qişa cərrahi yolla çıxarılmış, suda həll olan zülallar ekstraksiya edilmiş və 1,6 mq rodopsin saxaroza sıxlıq qradiyentində sentrifüqalaşdırma yolu ilə təmizlənməmişdir [11]; daha sonra bu material rodopsinə qarşı immunoqlobulinlərinin əldə olunması üçün istifadə edilmişdir. Rodopsinin təmizlənməsi üzrə bütün əməliyyatlar qaranlıqlaşdırılmış otaqda, qırmızı filtrli (25 Vt) fənerin işığında həyata keçirilmişdir.

SMAZ və rodopsinə qarşı immunoqlobulinləri dovşanların 5-6 ay müddətində immunizasiyası yolu ilə əldə edilmişdir; hər heyvana müvafiq olaraq təmizlənməmiş zülalın 300 mkq miqdarı tam Freund adjuvantı ilə qarışdırılaraq dərialtı yeridilmişdir.

İntakt, nəzarət və eksperimental qruplara aid olan dovşanların tor qişasında rodopsin və İŞZ70-in, hipotalamusunda isə SMAZ-in səviyyələrinin ölçülməsi DİFA üsulu ilə polistirel lövhələrdə (Sigma, Almaniya) aparılmışdır [12]. Testə başlamazdan əvvəl tədqiq olunan nümunələrdən suda həll olan zülallar ekstraksiya edilmişdir. Reaksiyanın nəticələri 492 nm dalğa uzunluğunda "Spectra Max 250" (Molecular Devices Co., ABŞ) ELISA fotometrində qeyd olunmuşdur.

Tədqiqatların əsas seriyası aşağıdakı sxem üzrə aparılmışdır. 1-ci seriyada dovşanlara (n = 4, 8 göz) venadaxili olaraq MYST yeridilmiş və 5-ci, 13-cü və 27-ci müxtəlif intensivlikli işığa (0,016; 0,068; 0,45 və 1,4 C) ERG-ın "a" və "b" dalğalarının amplitudaları qeydə alınmışdır.

Bu seriyada MYST yeridilməsindən 15 gün sonra narkoz altında olan dovşanların beyninin yan mədəciyinə stereotaksik koordinatlar üzrə [13] Hamilton şprisi vasitəsilə SMAZ (20 µL, 1,5 mq/mL) yeridilmiş və 7 gün sonra ERG-ın "a" və "b" dalğalarının amplitudaları yenidən qeydə alınmışdır.

2-ci seriyada heyvanlar üç qrupa bölünmüşdür: 1) intakt qrup (n = 4; 8 göz); 2) nəzarət qrupu (n = 4; 8 göz) – venadaxili MYST və inaktivləşdirilmiş SMAZ-in (60°C-də su hamamında 30 dəqiqə) intravitreal yeridilməsi; 3) eksperimental qrup (n = 4; 8 göz) – venadaxili MYST və SMAZ-in intravitreal yeridilməsi.

Preparatlar 1,5 mq/mL konsentrasiyada 150 µL həcmdə steril fizioloji məhlulda MYST yeridilməsindən 5 gün sonra tətbiq edilmişdir, yeddi gündən sonra dovşanlar

evtanaziya edildi. Tor qişanın zülal ekstraktında rodopsin və İŞZ70-in səviyyələri qiymətləndirilmişdir.

3-cü tədqiqat seriyasında Akademik Zərifə Əliyeva adına Milli Oftalmologiya Mərkəzində “Roland Consult” (Almaniya) cihazı ilə Beynəlxalq Klinik Görmə Elektrofiziologiyası Cəmiyyəti (ISCEV) standartlarına uyğun RP diaqnozu olan xəstələrdə ERQ qeydə alınmışdır. Xəstələrdən ($n = 9$) və sağlam könüllülərdən ($n = 9$) venadan 5 ml həcmində qan nümunələri götürülmüş, zərdab ayrı-laraq, DİFA-ilə SMAZ-a qarşı autoanticisimlərinin səviyyəsini müəyyən etmək üçün ilk anticisimlər kimi istifadə olunmuşdur [14]. Heyvanlar üzərində bütün tədqiqatlar Avropa Birliyi Şurasının (86/609/ECC) Direktivinin tələblərinə əsasən və yerli bioetika komitəsinin nəzarəti altında həyata keçirilmişdir.

Hər bir qrup daxilində dovşanların hipotalamusu və tor qişasında tədqiq olunan antigenlərin səviyyələrinin orta göstəriciləri, eləcə də xəstələrin qan zərdabında SMAZ-a qarşı təbii anticisimlərinin səviyyələri hesablanmış və Student t-kriteriyasına əsasən təhlil edilmişdir.

Nəticələr

Tədqiqatın 1-ci seriyasında RP modeli olan dovşanlarda ($n = 4$, 8 göz) müxtəlif intensivliyində işıq stimullarına qarşı ERG-ın “a” və “b” dalğaların amplitudaları qeydə alınması MYST yeridilməsindən sonra 5-ci və 13-cü günlərdə amplitudaların normal nəticələrə nisbətən nəzərəcarpacaq dərəcədə azalmasını göstərmişdir ($p < 0,001$) (**şəkil 1**).

MYST yeridilməsindən 15 gün sonra dovşanların beyninin yan mədəciyinə SMAZ-in yeridilməsi 7 gün sonra ERG-ın “a” və “b” dalğaların amplitudalarının əhəmiyyətli şəkildə artmasına səbəb olmuşdur ($p < 0,001$) (**şəkil 1**).

1-ci seriyanın nəticələrinə əsaslanaraq, 2-ci tədqiqat seriyasında heyvanlara venadaxili MYST yeridilməsindən 5 gün sonra heyvanlara intravitreal olaraq aktiv SMAZ və istiliklə inaktivləşdirilmiş SMAZ yeridilmişdir. SMAZ-ın yeridilməsindən 7 gün sonra tor qişada rodopsin səviyyəsinin nəzərəcarpacaq dərəcədə artımı aşkar edilmişdir.

Xüsusilə, intakt heyvanlarda ($n = 4$; 8 göz) tor qişada rodopsin səviyyəsi $0,187 \pm 0,005$ optik vahid olmuşdur; nəzarət qrupundakı heyvanlarda ($n = 4$; 8 göz; inaktiv SMAZ) – $0,13 \pm 0,008$ optik vahid ($p < 0,001$), eksperimental qrupdakı heyvanlarda (SMAZ; $n = 4$; 8 göz) isə $0,193 \pm 0,011$ optik vahid olmuşdur ($p < 0,001$); (**şəkil 2**).

Bundan əlavə, intakt heyvanların tor qişasında HSP70 səviyyəsi $0,085 \pm 0,004$ optik vahid olmuş, nəzarət heyvanlarında – $0,102 \pm 0,004$ optik vahid ($p < 0,05$), eksperimental qrupdakı heyvanlarda isə $0,123 \pm 0,005$ optik vahid təşkil etmişdir ($p < 0,001$); (**şəkil 3**).

Beləliklə, MYST yeridilməsindən 5 gün sonra intravitreal SMAP tətbiqi eksperimental qrup heyvanlarının tor qişalarında rodopsin və HSP70 səviyyələrinin eyni zamanda artımına səbəb olmuşdur.

Üçüncü tədqiqat seriyasında RP olan xəstələrin qan zərdabında SMAZ-a qarşı təbii autoanticisimlərinin səviyyələri qiymətləndirilmişdir. Qan zərdabı DİFA

testində ilk anticisimlər kimi istifadə olunmuşdur. Sağlam insanların orqanizmində müxtəlif konsentrasiyalarda bütün antigenlərə qarşı təbii autoanticisimlər mövcuddur. Buna görə də, müəyyən antigenlərə qarşı təbii autoanticisimlərin titrlərinə əsaslanaraq, bu antigenlərin toxumalardakı səviyyəsi haqqında nəticə çıxarmaq mümkündür [15, 16].

Hər bir 9 xəstədə RP diaqnozu ERG muayinəsinin aparılması ilə təstiqlənmişdir. Nəticədə, bütün 9 xəstədə “full-field” ERG qeyd olunmamışdır, bu da tor qişanın reseptor aparatında ciddi pozulmanın, yəni RP-nin mövcudluğunu güclü şəkildə göstərir.

Aparılan tədqiqatlar göstərmişdir ki, RP xəstələrin qan zərdabında SMAZ-a qarşı təbii anticisimlərinin səviyyəsi eyni yaşlı sağlam şəxslərlə müqayisədə əhəmiyyətli dərəcədə aşağıdır. Xüsusilə, sağlam şəxslərin ($n = 9$) qan zərdabında SMAZ-a qarşı autoanticisimlərinin səviyyəsi $0,106 \pm 0,008$ optik vahid olmuş, xəstələrdə ($n = 9$) isə $0,076 \pm 0,004$ optik vahid təşkil etmişdir ($p < 0,01$); (**şəkil 4**).

Müzakirə

Buna əsaslanaraq RP xəstələrin hipotalamus və tor qişasında SMAZ-ın aktivliyinin azaldığı barədə əsaslandırılmış nəticə çıxarmaq mümkündür.

Tor qişanın pigmentli distrofiyası modelində aparılan 3 seriyalı tədqiqatların nəticələrini yekunlaşdıraraq aşağıdakı nəticələr çıxarıla bilər. Dovşanlarda MYST-nin venadaxili yeridilməsi yolu ilə RP modelinin yaradılması tor qişanın reseptor aparatının funksiyasında nəzərəcarpacaq dəyişikliklərə səbəb olur. Bu halda ERG-ın “a” və “b” dalğalarının amplitudalarında kəskin azalma və rodopsin səviyyəsinin aşağı düşməsi müşahidə olunur.

Formalaşmış RP modeli dovşanlarda SMAZ-ın intraventrikulyar tətbiqindən sonra ERG-ın “a” və “b” dalğalarının amplitudalarının əhəmiyyətli dərəcədə bərpası (demək olar ki intakt heyvandan alınan göstəricilərə yaxın) tor qişanın reseptor aparatına hipotalamik serotoninə trofik dəstəyin mövcudluğu barədə nəticə çıxarmağa əsas verir.

Bundan əlavə, RP-li heyvanlarda SMAZ-ın intravitreal tətbiqindən sonra tor qişada rodopsin və İŞZ70-in səviyyələrinin artımı müşahidə olunur. SMAZ İŞZ70-in sintezini artırmaqla, rodopsinin səviyyəsinə birbaşa və digər vasitəçi elementlərin iştirakı olmadan bərpaedici təsir göstərdiyini sübut edir.

Tor qişanın pigmentli distrofiyası olan xəstələrdə SMAZ-a qarşı təbii autoanticisimlərinin azalmış titri, bu orqanizmin toxumalarında SMAZ-ın ekspressiyasının azalmasını əks etdirir. Dovşanlar üzərində aparılan digər tədqiqat seriyalarının nəticələri də belə bir fərziyyəni irəli sürməyə əsas verir: bu RP-nin formalaşması hipotalamik nüvələrdə SMAZ-ın yetərsiz sintezi və tor qişanın reseptor aparatına trofik dəstəyin zəifləməsi ilə başlana bilər.

Bundan əlavə, RP-nin təsvir olunan molekulyar mexanizminin mövcudluğu 1-ci və 2-ci tədqiqat seriyalarının nəticələri ilə də dəstəklənir; həmin seriyalarda SMAZ-ın heyvanlara intraventrikulyar və intravitreal yeridilməsi tor qişanın funksional göstəricilərinin normallaşmasına səbəb olmuşdur (ERG-ın “a” və “b” dalğalarının amplitudalarının və rodopsin səviyyəsinin bərpası müvafiq olaraq).

Beləliklə, nəticələrin ümumi təhlili əvvəlki müəlliflər tərəfindən irəli sürülmüş [3, 9] fikirə əsas verməyə imkan yaradır: RP-nin patogenetik mexanizmi tor qışaya hipotalamik nüvələr tərəfindən trofik dəstəyin pozulması ilə əlaqəlidir.

Yekun

Tor qışanın reseptor hüceyrələrinə hipotalamusun serotoninergik trofik tənzimləyici təsirlərinin retrograd və anteroqrad akson nəqli vasitəsilə həyata keçən molekulyar mexanizmləri və onların RP patologiyasında pozulması nəzərdən keçirilir.

Heyvan modellərində və RP diaqnozu qoyulmuş xəstələrdə əldə etdiyimiz eksperimental nəticələr göstərir ki, xəstəliyin patogenezinin səbəblərindən biri hipotalamusun trofik təsirinin zəifləməsi sayıla bilər. Buna görə də, hipotalamusa yönəldilmiş təsir bu ağır xəstəliyin terapevtik müdaxiləsi üçün potensial istiqamət kimi nəzərdən keçirilə bilər.

***Açar sözlər:** tor qışanın pigmentli distrofiyası, serotonin-modullu antikonsolidasiya zülalı - SMAZ, rodopsin, istilik-şok zülalı 70kDa, SMAZ-a qarşı anticismlər, tor qışa, təbii SMAZ-a qarşı təbii autoanticisimlər*

Ismailova U.S.

HYPOTHALAMIC TROPHIC SUPPORT OF RETINA: STUDY ON ANIMAL MODEL AND CLINICS

*Institute of Physiology named after Academician Abdulla Garayev, Baku, Azerbaijan, National Ophthalmology Centre named after Academician Zarifa Aliyeva, Baku, Azerbaijan
E-mail: ulker-is@mail.ru*

<https://www.doi.org/>

Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is a severe and to-date incurable form of ophthalmological pathology, manifesting by a damage of receptor apparatus and pigment epithelium of the retina along with loss of visual function [1]. Although most of researchers relate aetiology of RP to inborn mutations of the receptor cells [2], others relate it to disturbances of normal interaction of hypothalamus with the retina and to decline of hypothalamic trophic support of the cellular elements of the retina [3]. This idea was partially confirmed by studies conducted on a rabbit model of RP by Professor N.A. Hajiyeva of the Institute of Physiology named after acad. A. Garayev together with her colleagues, wherein pulse stimulation of ventromedial nucleus of hypothalamus promoted quick recovery of the amplitudes of “a” and “b” waves of the electroretinogram (ERG) [4]. These results indicate that the hypothalamic nuclei exert a significant trophic effect on maintaining retinal functions.

Chaperone proteins, particularly the 70 kDa molecular weight heat shock protein (HSP70), help restore the disrupted conformation of proteins [5]. In the present study, serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP) was used as a trophic factor. SMAP was isolated from the brains of rats at the Institute of Physiology named after acad. A. Garayev. This protein is directly dependent on serotonin levels and carries out its functions at the intracellular level. In various vertebrates, SMAP has been shown to possess antimutagenic and antitoxic activity against chemical and bacteriological adverse factors [7].

Experiments conducted on rats using the Western blotting method demonstrated that intraperitoneal administration of SMAP leads to an increase in HSP70 [8].

Purpose – to analyse the central serotonergic trophic support of the retina provided by the hypothalamus and the key molecular mechanisms of RP in patients with RP and in an experimental model established in rabbits.

Material and Methods

The studies were undertaken on Chinchilla male rabbits of 2.2-2.6 kg body. The RP model was induced by administration of monoiodoacetic acid (MIAA) at a dose of 26 mg/kg dissolved in 2 ml of sterile physiological saline. [9]. With the application of indirect ELISA-test the levels of heat shock protein 70 kDa (HSP70) and rhodopsin in the retina. The level of natural anti-SMAZ autoantibodies in the blood serum obtained from patients diagnosed with RP was determined by indirect ELISA.

SMAP was purified from the cow brains. The main stages of purification were: 1) precipitation of proteins from the brain extract in 40% ammonium sulphate; 2) gel-chromatography on the column of Sephadex G-150. Process of picking up the immune positive protein fractions after each stage was conducted under control of indirect ELISA-test [10].

In order to pursue changes of RP under the studied preparations, the method of measurement of rhodopsin in the retina by indirect ELISA-test was elaborated. Retinas were removed surgically from 40 cow eyes, water-soluble proteins were extracted and 1.6 mg of rhodopsin were purified through centrifugation in sucrose density gradient [11] and used for production of anti-rhodopsin immunoglobulins. All operations on purification of rhodopsin were realized in the darkened room, elucidated by lantern (25 W) with red filter. Anti-SMAP and anti-rhodopsin immunoglobulins were produced through 5-6-month immunization of the rabbits by sub-cutaneous administration of 300 µg of the purified correspondent protein per animal, in mixture with complete Freund adjuvant.

Measurements of the levels of rhodopsin and HSP70 in the retina and SMAP – in hypothalamus of the rabbits of the intact, control and experimental groups were carried out by indirect ELISA-test on polystyrene plates (Sigma, Germany) [12]. Prior to the beginning test, the water-soluble proteins were extracted from the studied samples. The results of the reaction were registered in the photometer for the ELISA-test “Spectra Max 250” (Molecular Devices Co., USA) on the wavelength 492 nm.

The main series of the studies were conducted over the following scheme. In the 1st series of studies, the rabbits (n = 4, 8 eyes) were intravenously administered with MIAA and after 5-, 13- and 27-days the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG in response to exposure to light of different intensities (0.016, 0.068, 0.45 and 1.4 J) were recorded. In this series on the 15th day after administration of MIAA the anaesthetized rabbits were injected with SMAP (20 µL, 1.5 mg/mL) into the brain lateral ventricle over stereotaxic coordinates [13] with Hamilton’s syringe and 7 days later the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG was recorded.

In the 2nd series 3 groups of animals were formed: 1) intact group (n = 4; 8 eyes); 2) control group (n = 4; 8 eyes) – intravenous administration of MIAA plus intravitreal administration of inactivated SMAP (60 °C water bath for 30 minutes); and 3) experimental group (n = 4; 8 eyes) – intravenous administration of MIAA plus intravitreal administration of SMAP. The preparations were administered in an amount of 150 µL at a concentration 1.5 mg/mL in a sterile saline on the 5th day after administration of MIAA and 7 days later animals were sacrificed. Levels of rhodopsin and HSP were evaluated in the protein extract of the retina.

In the 3th series of studies in the observed patients RP was diagnosed in the clinics of National Ophthalmology Centre named after Academician Zarifa Aliyeva. The patients had full-field ERG recorded using a “Roland Consult” device (Germany) according to standards ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision). From patients (n = 9) and healthy volunteers (n = 9) blood samples were taken from the vein, serum was saved, diluted 100 times and used as the first antibodies in the indirect ELISA-test in order to determine the level of natural anti-SMAP antibodies [14]. All experiments on animals were carried out in accordance with the requirements of Directive 86/609/EEC of the Council of the European Union and under the supervision of the local bioethics committee.

The averages of the levels of the studied antigens in the hypothalamus and retina of the rabbits as well as the levels of natural anti-SMAP autoantibodies in the serum of patients were calculated within each group and analyzed on Student’s t-criterion.

Results

The 1st series of studies recording of the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG in the rabbits with RP (n = 4, 8 eyes) in response to exposure to the flashes of light of different intensities revealed a noticeable decline of the amplitudes on the 5th and 13th days after the administration of MIAA relative to their original values ($p < 0.001$); (Figure 1). Administration of SMAP into the lateral ventricle of the rabbits’ brain on the 15th day after administration of MIAA brought 7 days later to significant upregulation of the amplitudes of total ERG ($p < 0.001$); (Figure 1).

On the basis of the results of the 1st series, in the 2nd series of studies the animals were intravenously administered with MIAA and on 5th day the animals were administered intravitreally with active SMAP or heat-inactivated SMAP.

After 7 days since administration of SMAP noticeable upregulation of rhodopsin in the retina was revealed. In particular, in the intact animals (n = 4; 8 eyes) the level of rhodopsin in the retina made 0.187 ± 0.005 optic units, in the animals of the control group (n = 4; 8 eyes; inactivated SMAP) - 0.13 ± 0.008 optic units ($p < 0.001$), while in the animals of the experimental group (SMAP; n = 4; 8 eyes) – 0.193 ± 0.011 optic units ($p < 0.001$); (**Figure 2**).

Moreover, the level of HSP70 in the retinas of the intact animals made 0.085 ± 0.004 optic units, while in the control animals – 0.102 ± 0.004 optic units ($p < 0.05$), and in the animals of the experimental group – 0.123 ± 0.005 optic units ($p < 0.001$); (**Figure 3**).

Hence, under intravitreal administration of SMAP on the 5th day after injection of MIAA group simultaneous upregulations of rhodopsin and HSP70 in the retinas of the animals of the experimental were noted.

In the 3th series of studies the levels of natural anti-SMAP autoantibodies in the blood serum of the patients with RP were evaluated. The blood serum was used as the first antibodies in the indirect ELISA-test. In the bodies of healthy individuals, natural autoantibodies against all antigens are present at varying concentrations. Therefore, based on the titres of natural autoantibodies directed against specific antigens, it is possible to draw conclusions about the levels of these antigens in tissues [15, 16]. In each of 9 patients, the diagnosis of RP was confirmed by performing an ERG examination. As a result, full-field ERG was absent in all 9 patients, which strongly indicates the presence of severe impairment in the receptor apparatus of the retina, i.e., RP.

The conducted studies revealed that in the blood serum of the patients with diagnosis of RP the level of natural anti-SMAP autoantibodies was significantly lower than in the healthy persons of the same age. Particularly, if the level of natural anti-SMAP autoantibodies in the blood serum of the healthy persons (n = 9) made 0.106 ± 0.008 optic units, in the patients (n = 9) their level made 0.076 ± 0.004 optic units ($p < 0.01$); (**Figure 4**).

Discussion

On these grounds one can make a conclusion on downregulation of SMAP in the hypothalamus and retina of the patients with RP.

Finalizing the results of the conducted four series of studies on the model of RP, the following conclusions could be made. Modeling RP on the rabbits through intravenous administration of MIAA induces noticeable changes in a character of functioning of the receptor apparatus of the retina. In this case, sharp decline in the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG and downregulation of rhodopsin is noticed.

Significant restoration of the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG (almost up to the values of the intact animals) in the animals with formed RP after intra-ventricular SMAP administration gives grounds to making a conclusion concerning existence of the hypothalamic serotonergic trophic support of the receptor apparatus of the retina. Moreover, in animals with RP, intravitreal

administration of SMAZ leads to an increase in the levels of rhodopsin and İŞZ70 in the retina. SMAZ demonstrates a reparative effect on rhodopsin levels by directly enhancing the synthesis of İŞZ70 without the involvement of other intermediary factors.

The revealed declined titer of natural anti-SMAP autoantibodies in the patients with RP, reflecting, correspondently, downregulation of SMAP in the organism's tissues, as well as the results of other series of the studies, conducted on the rabbits, provide solid grounds to put forward a conjecture that formation of RP might be launched by insufficient synthesis of SMAP in the hypothalamic nuclei and poor realization of trophic support of the receptor apparatus of the retina.

In addition, possible existence of the described molecular mechanism of RP as well is supported by the results of the 1st and 2nd series of the studies; in those series, intraventricular and intravitreal administration of SMAZ to animals resulted in normalization of the functional parameters of the retina (restoration of the amplitudes of "a" and "b" waves of the ERG and rhodopsin levels, respectively).

Hence, the overall analysis of the results provides grounds to support the view previously advanced by the authors [3, 9]: the pathogenetic mechanism of RP is associated with impaired trophic support to the retina from the hypothalamic nuclei.

Conclusion

Molecular mechanisms underlying hypothalamic serotonergic trophic regulatory effects on retina receptor cells through retrograde and anterograde axonal transports and their impairment in RP pathology are considered. As our experimental data, obtained on animal models and patients having RP diagnosis, apparently, indicate to hypothalamus insufficient trophic support as a culprit of pathogenesis of RP, then targeted impact on hypothalamus can be considered as a way of pathogenetic therapy of this severe disease.

Keywords: *retinitis pigmentosa, serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP), rhodopsin, heat-shock protein 70 kDa, anti-SMAP antibodies, retina, natural anti-SMAP autoantibodies.*

Şəkil 1. ERG-in “a” və “b” dalğalarının amplitudalarının müxtəlif vaxt intervallarında MYST-nun tətbiqindən sonra və SMAZ-ın təsiri altında dəyişməsi.

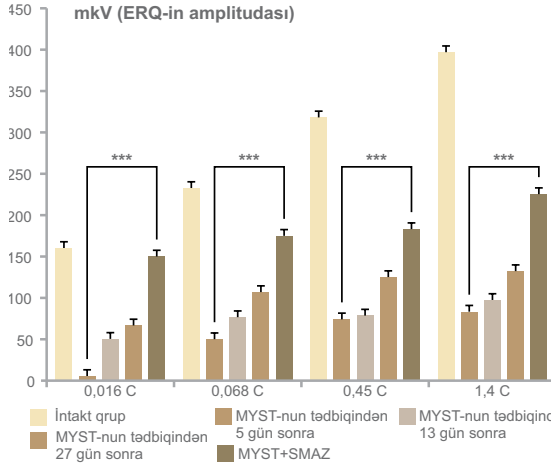


Figure 1. Changes of the amplitudes of “a” and “b” waves of the ERG at different time intervals after the injection of MIAA and under the effects of SMAP.

Şəkil 2. Dovşanlara MYST-nun inyeksiyasından 5 gün sonra tətbiq olunan SMAZ-ın intravitreal inyeksiyasının 12 gündən sonra rodopsininin səviyyəsinə təsiri, *** - $p < 0.001$.

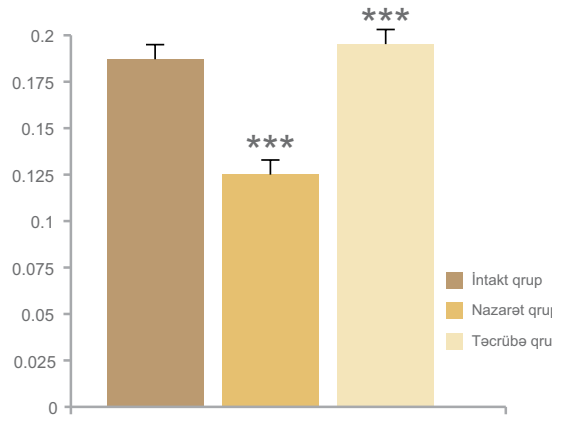


Figure 2. Effect of intravitreal injection of SMAP administered 5 days after injection of MIAA on rhodopsin levels on 12th day in the rabbit retina, *** - $p < 0.001$.

Şəkil 3. MYST inyeksiyasından 5 gün sonra tətbiq olunan SMAZ-ın intravitreal inyeksiyasının 12 gündən sonra İŞZ70-in səviyyəsinə təsiri, *** - $p < 0.001$.

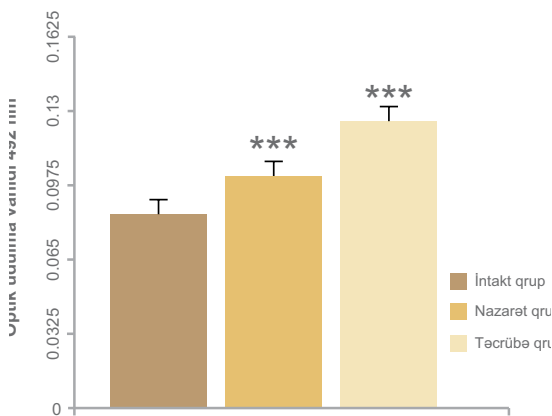


Figure 3. Effect of intravitreal injection of SMAP administered 5 days after injection of MIAA on HSP70 level on 12th day in the rabbit retina, *** - $p < 0.001$.

Şəkil 4. RP ilə xəstələrin qan zərdabında SMAZ-a qarşı təbii autoanticisimlərin səviyyəsinin dəyişməsi, ** - $p < 0.01$.

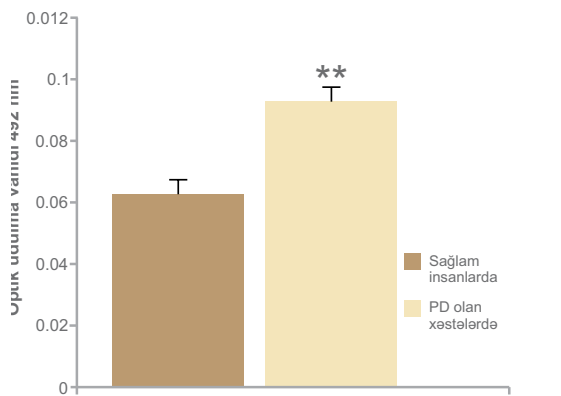


Figure 4. The change of the level of natural anti-SMAP autoantibodies in the blood serum of the patients with RP, ** - $p < 0.01$.

ƏDƏBİYYAT | REFERENCES

1. *Aleman, T.S. Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases / ed. D.Albert, J.Miller, D.Azar [et al.] // Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology: Springer, Cham, – 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42634-7_1*
2. *Шурыгина, М.Ф. Диагностика наследственных дистрофий сетчатки с позиции генной терапии / М.Ф.Шурыгина, А.М.Хотеева // Вестник офтальмологии, – 2021. 137, №4, – с. 145-151. <https://doi.org/10.17116/ofalma2021137041145>*
3. *Katsnelson, A.B. Abnormalities of Development and Diseases of Eyes in Early Childhood age // Medicine, – Moscow: – 1958.*
4. *Гаджиева, Н.А. Исследование влияния переднего гипоталамуса на электрическую активность сетчатки / Н.А.Гаджиева, Н.М.Рзаева // Физиологический журнал СССР, – 1992. 78, №11, – с. 61-71.*
5. *Belenichev, I.F. Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators / I.F.Belenichev, O.G.Aliyeva, O.O.Popazova [et al.] // Front Cell Neurosci., –2023. Apr; 17. 17, – p. 1131683. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131683>*
6. *Мехтиева, А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами // Бюлл. экпер. биол. мед., – 2000. 129, №8, – с. 147-150.*
7. *Аллахвердиева, Т.Н. Активация серотонинергической системы способствует выживанию животных разных видов при воздействии бактериальных и химических токсинов / Т.Н.Аллахвердиева, Х.Ш.Мехтиева, А.А.Гайсина [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, – 2019. 55, №1, – с. 23-27. <https://doi.org/10.1134/S0044452919010029>*
8. *Allahverdiyeva, T.N. Serotonin-modulating aniconsolidation protein promotes survival of animals of different species under bacterial and chemical toxins / T.N.Allahverdiyeva, Kh.Sh.Mehdiyev, A.A.Gaisina [et al.] // J. Evol. Biochem. Physiol., – 2019. 54, (1), – p. 7-10.*
9. *Agayev, T.M. Neurophysiological Studies of Role of Hypothalamus in Mechanism of Regulation of Functions of Different Portions of Visual Analyzator / T.M.Agayev, N.A.Gadjiyeva, A.I.Dmitrenko [et al.] // Elm, – Baku: – 2004.*
10. *Mekhtiev, A.A. Revealing in the brain of albino rats the protein possessing anticonsolidation properties // Bulletin Experim. Biol. Med., – 2000. 129(8), – p. 147-150.*
11. *Ohguro, H. Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo / H.Ohguro, J.P.Hooser, A.H.Milam [et al.] // J. Biol. Chem., – 1995. 270, – p. 14259-14262. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14259>*
12. *Antibodies Volume II: A Practical Approach Press // Edited by D. Catty. Oxford University Press. IRL Press, – Oxford: – 1989. – p. 259.*
13. *Urban, I. A Stereotaxic Atlas of the New Zealand Rabbit's Brain / I.Urban, Ph.Richard // Charles C Thomas, – New York: – 1972.*
14. *Lacroix-Desmazes, S. Self-reactive natural autoantibodies in healthy individuals / S.Lacroix-Desmazes, S.V.Kaveri, L.Mouthon [et al.] // J. Immunology Methods, – 1998, 216, – p. 117-137. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00074-X)*
15. *Siloși, I. The role of autoantibodies in health and disease / I.Siloși, C.A.Siloși, M.V.Boldeanu [et al.] // Rom. J. Morphol. Embryol., – 2016. 57(2), – p. 633-638.*
16. *Palma, J. Natural antibodies – facts known and unknown / J.Palma, B.Tokarz-Deptuła, J.Deptuła [et al.] // Central European Journal of Immunology, – 2018. 43(4), – p. 466-475. <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.81354>*