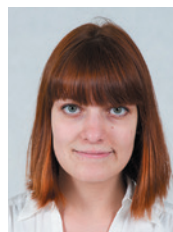


Оценка влияния пара-аминобензойной кислоты на морфологическое состояние сетчатки мышей линии rd10 — модели пигментного ретинита

Т. П. Гальбинур¹Е. А. Новикова²

¹ Кафедра офтальмологии, отделение витреоретинальных заболеваний и хирургии, Университет Иврит, Хадассах Медицинский Центр, Иерусалим, Израиль

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель. Гистологическая оценка влияния пара-аминобензойной кислоты (ПАБК) на течение ретиальной дегенерации и состояние наружного ядерного слоя сетчатки (НЯС) у мышей линии rd10.

Методы. Проведено сравнительное экспериментальное исследование на моделях пигментного ретинита (ПР) — мышях линии rd10 (Jackson Labs, Maine, USA), гомозиготных по рецессивной мутации в гене β -субъединицы фосфодиэстеразы палочек. Животным из группы лечения ($n = 28$) проводились внутрибрюшные инъекции ПАБК в физиологическом растворе (50 мг/кг) 6 раз в неделю с третьего дня после рождения до 4,5 недель. Животным из контрольной группы ($n = 24$) по тому же протоколу проводились внутрибрюшные инъекции физиологического раствора. Глаза энуклеировали на сроке 3 и 4,5 недели. После фиксации и дегидратации образцы помещались в парафин и выполнялись серийные срезы толщиной 4 мкм через центр зрительного нерва с целью стандартизации измерений у разных животных. Для оценки морфологического состояния сетчатки проведен анализ толщины НЯС и количества рядов ядер фоторецепторов в НЯС в центральной, средней и периферической частях сетчатки. Для сравнения групп использован t-критерий (непарный двусторонний, $p \leq 0,05$).

Результаты. К возрасту трех недель толщина НЯС и число рядов ядер в нем снижается более чем в два раза в обеих экспериментальных группах по сравнению со здоровыми мышами. На 3 неделе имеется тенденция к большей толщине НЯС и большему количеству рядов ядер в центральной зоне и средней периферии сетчатки в группе животных, которым проводились инъекции ПАБК по сравнению с контрольной группой. В возрасте 4,5 недель и толщина НЯС, и количество рядов ядер НЯС были значительно больше в периферической части сетчатки животных в группе лечения по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Заключение. Системное введение ПАБК оказывает стабилизирующее влияние на процессы дегенерации, развивающиеся в НЯС сетчатки мышей линии rd10. ПАБК с его хорошим профилем безопасности может служить эффективным дополнением к антиоксидантной терапии пигментного ретинита.

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

ABSTRACT

T. Galbinur, E. A. Novikova

Effect of para-aminobenzoic acid on morphologic changes of the retina in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa

Purpose: Histological evaluation of the influence of PABA on the course of retinal degeneration and the state of outer nuclear layer (ONL) of the retina in rd10 mice.

Methods: The present experiment studied PR model in rd10 mice (Jackson Labs, Maine, USA) homozygous for a recessive mutation in the β -subunit of rod phosphodiesterase. Animals in the treatment group ($n = 28$) 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 ($n = 24$) were intraperitoneally injected with saline using the same protocol. At 3 and 4.5 weeks of age, eyes were enucleated. After fixation and dehydration, the samples were placed in paraffin and serial sections, 4 microns thick, were obtained through the center of the optic nerve. Thickness of ONL and the number of rows of photoreceptor nuclei in the ONL of central, middle and peripheral parts of the retina were analyzed to assess the morphological condition of retina. T-test was used to compare the difference between two groups ($p \leq 0.05$, unpaired two-tailed t-test).

Results: At the age of three weeks, the thickness of ONL and the number of rows of photoreceptor nuclei in the ONL is reducing more than twofold in both experimental groups compared with healthy mice group. There is a tendency toward greater thickness of the ONL and the greater number of rows of nuclei in the central zone and mid-peripheral retina at the age of three weeks in the group of animals that were injected with PABA compared to the control group. At the age of 4.5 weeks both the thickness of the ONL, and the number of rows of photoreceptor nuclei in the ONL were significantly greater in the peripheral retina of the animals in the treatment group compared with the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: Systemic administration of PABA has a stabilizing effect on the degeneration process of ONL of the retina in rd10 mice. Thus, PABA, with its good safety profile can be an effective addition to the antioxidant therapy of retinitis pigmentosa.

Key words: retinitis pigmentosa, rd10 mice, para-aminobenzoic acid, PABA

Офтальмология. — 2012. — Т. 9, № 3. — С. 57–60.

Поступила 15.05.12. Принята к печати 19.07.12

Пигментный ретинит (ПР) — это группа наследственных прогрессирующих дистрофий сетчатки с первичным поражением палочковых фоторецепторов, встречается с частотой 1:4000 [1]. ПР — генетически очень гетерогенная группа заболеваний, может иметь различный тип наследования и связан с мутациями более 100 различных генов. Это гены белков зрительного цикла, белков мембран дисков наружных сегментов палочек, метаболизма ретинола, фолдинга, транскрипционных факторов фоторецепторов. Около 10% всей популяции являются носителями рецессивных генов ПР [2]. Мутантный ген экспрессируется в основном в палочках, индуцирует их апоптоз [3], что приводит к потере палочковых фоторецепторов уже в раннем детском возрасте. Клинические проявления ПР — никталопия и прогрессивное сужение поля зрения. Колбочки в последующем тоже вовлекаются в патологический процесс, что приводит к потере не только периферического, но и центрального зрения.

Мыши линии rd10 (retinal degeneration 10) — одна из экспериментальных моделей пигментного ретинита, демонстрирующая ретиальную дегенерацию с мягким течением, имеющая широкий терапевтический интервал и наиболее точно соответствующая течению ПР у человека. Данная линия мышей имеют мутации в гене фосфодиэстеразы, приводящей к постепенной гибели палочек, но в последующем погибают и колбочковые фоторецепторы [4]. Приблизительно 5% больных ПР имеют мутации в этом гене [5].

При пигментном ретините фоторецепторы гибнут путем апоптоза, ключевую роль в индукции которого играют активные формы кислорода и оксидативный стресс [6]. В исследованиях на животных моделях ПР получены данные о повышении уровня малонового диальдегида и других продуктов перекисного окисления липидов в фоторецепторах и снижении активности глутатионпероксидазы в сетчатке модельных животных [7]. Показано, что лечение антиоксидантами может уменьшить гибель фоторецепторов на животных моделях ПР [8]. Эти открытия подчеркивают важность оксидативного повреждения и терапевтический потенциал антиоксидантов в лечении пигментного ретинита.

Пара-аминобензойная кислота (ПАБК) — непотеиногенная аминокислота, широко распространенная в природе. По химическому строению ПАБК — производное бензойной кислоты, содержащее аминогруппу заместитель в пара-положении. ПАБК

относят к группе витаминов В (В10). 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 [9], имеет антикоагулянтную активность [10]. ПАБК обладает антиоксидантными свойствами: снижает уровень гидропероксида и малонового диальдегида, нормализует активность каталазы в роговице и хрусталике глаза [11], снижает интенсивность перекисного окисления липидов в сетчатке после индуцированной гипоксии [12]. О.Г. Строева и соавт. показали, что ПАБК стимулирует морфогенез дисков наружных сегментов фоторецепторов у крыс с наследственной абиотрофией сетчатки типа пигментного ретинита [13].

Целью настоящего исследования являлась гистологическая оценка влияния пара-аминобензойной кислоты на течение ретиальной дегенерации и состояние наружного ядерного слоя сетчатки у мышей линии rd10.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на мышах линии rd10 (JacksonLabs, Maine, USA). Животные были разделены на 2 группы: группа лечения и контрольная группа. В группу лечения включено 28 мышей, которым проводились внутрибрюшные инъекции ПАБК в физиологическом растворе (доза 50 мг/кг) 6 раз в неделю с третьего дня после рождения до 4,5 недель. Животным из контрольной группы (n = 24) по тому же протоколу проводились внутрибрюшные инъекции физиологического раствора. Глаза энуклеировали на сроке 3 и 4,5 недели. После фиксации и дегидратации образцы помещались в парафин и выполнялись серийные срезы толщиной 4 мкм через центр зрительного нерва. Окраска препаратов проводилась по стандартной методике красителями гематоксилин-эозин. Все фотографии выполнены на микроскопе OlympusBX41, оснащенном цифровой камерой DP70. Обработка изображений проводилась с использованием прикладных программ AdobePhotoshop 7.0 и ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

Так как ретиальная дегенерация у мышей линии rd10 связана с постепенной гибелью фоторецепторов, морфологическое состояние сетчатки и течение ретиальной дегенерации оценивалось по анализу гистологиче-

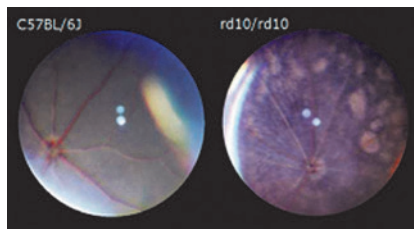


Рисунок 1. Фотографии глазного дна здоровых мышей C57BL/6J (слева) и мышей линии rd10/rd10 с ретиальной дегенерацией (справа).

ской структуры наружного ядерного слоя сетчатки (НЯС), содержащего ядра фоторецепторов. Оценивались следующие параметры: общая толщина НЯС и количество рядов ядер фоторецепторов в нем. Данные параметры являются прямой морфологической характеристикой выживаемости фоторецепторов.

Как при ПР, так и у мышей линии rd10, дегенерация не является равномерной, сроки и степень дегенерации отличаются в разных областях сетчатки [14]. Чтобы стандартизировать измерения у разных животных, срезы для гистологического исследования во всех случаях проводились через зрительный нерв. Каждая половина сетчатки разделялась на 3 равные части — центральная, средняя и периферическая. Толщина наружного ядерного слоя и количество рядов ядер фоторецепторов измерялось три раза в центре каждой части и соответствующих участках второй половины сетчатки, рассчитывалось среднее \pm стандартная ошибка среднего.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведена оценка влияния ПАБК на морфологическое состояние сетчатки и течение ретинальной дегенерации у мышей линии rd10. Данная линия животных характеризуется мягкой формой прогрессирующей ретинальной дегенерации, развивающейся в течение первых нескольких месяцев жизни, имитирующей течение ПР у человека. Офтальмоскопические проявления ретинальной дегенерации у мутантных животных включают оскудение артериального русла, бледность диска зрительного нерва и периферические дистрофические изменения сетчатки [4] (рис. 1), что наблюдается и при ПР у человека.

Мыши линии rd10 являются гомозиготами по рецессивной мутации в гене β -субъединицы фосфодиэстеразы палочек. Мутация расположена в 13 экзоне гена и приводит к замене аминокислоты в белке (миссенс-мутация), дисфункции и апоптозу палочковых, а в последующем и колбочковых фоторецепторов. Гибель фоторецепторов начинается на 2-3 неделе, и практически вся сетчатка де-

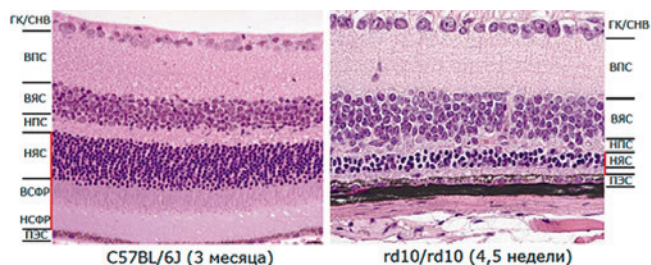


Рисунок 2. Сетчатка здоровых мышей C57BL/6J (слева) и мутантных мышей линии rd10 (справа), окраска гематоксилин-эозин. ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, ВСФР/НСФР — слой сетчатки, содержащий внутренние/наружные сегменты фоторецепторов, НЯС — наружный ядерный слой, содержит ядра фоторецепторов, НПС — наружный плексиформный слой, ВЯС — внутренний ядерный слой, ВПС — внутренний плексиформный слой, GK/СНВ — слой ганглиозных клеток/слой нервных волокон. У мышей линии rd10 значительно истончается НЯС, уменьшается количество рядов ядер фоторецепторов и толщина слоев, содержащих внутренние и наружные сегменты фоторецепторов (выделены красным) [8].

генерирует к 6-8 неделе. При гистологическом исследовании сетчатки мутантных животных выявляется значительное истончение слоев сетчатки, содержащих наружные и внутренние сегменты фоторецепторов и их ядра, степень дегенерации зависит от возраста животного. В сетчатке млекопитающих ядра фоторецепторов расположены в НЯС. У здоровых мышей НЯС содержит 10-12 рядов ядер, у мутантных животных со 2-3 недели количество ядер постепенно уменьшается, после 6-8 недели на срезах определяются лишь единичные ядра фоторецепторов. Параллельно уменьшению количества рядов ядер уменьшается и толщина самого НЯС [4]. Сравнение морфологии и толщины слоев в сетчатке здоровых мышей C57BL/6J и мутантных мышей линии rd10 представлено на рисунке 2.

Определена толщина НЯС, содержащего ядра фоторецепторов, и число рядов ядер в НЯС в группах лечения и контроля. Сравнение полученных результатов (среднее \pm стандартная ошибка среднего) представлено на рисунках 3 и 4. В обеих экспериментальных группах уже к возрасту трех недель в наружном ядерном слое развиваются дегенеративные изменения, толщина и число рядов ядер в нем снижается более чем в два раза по сравнению со здоровыми мышами линии C57BL/6J, которые обыч-

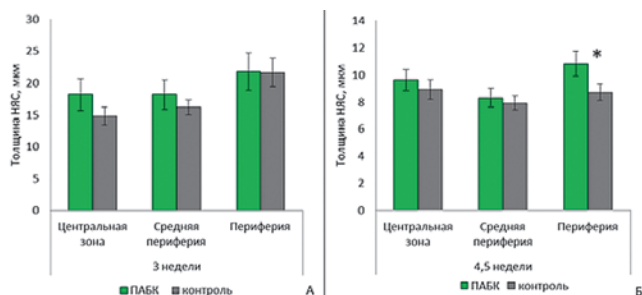


Рисунок 3. Сравнение толщины НЯС в двух группах на 3 (А) и 4,5 (Б) неделе.

Плankи погрешностей — стандартная ошибка среднего. Статистически значимые различия отмечены*.

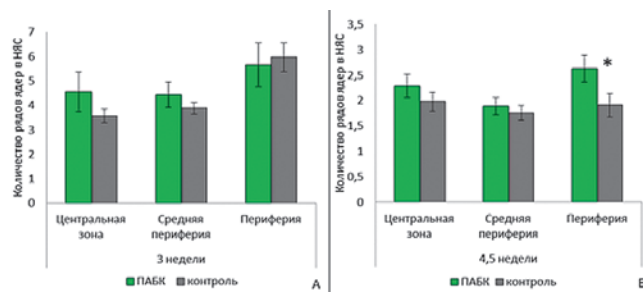


Рисунок 4. Количество рядов ядер фоторецепторов в НЯС сетчатки в двух группах на 3 (А) и 4,5 (Б) неделе.

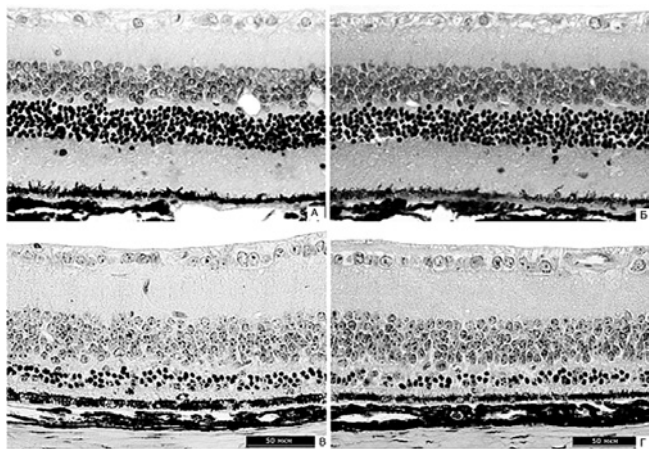


Рисунок 5. Гистологическая структура сетчатки мышей обеих групп на 3 (Б) и 4,5 неделе (Г). Окраска гематоксилин-эозин, увеличение 40х.

но имеют 10-12 рядов ядер фоторецепторов в НЯС в этом возрасте. В течение следующих 1,5 недель в обеих группах наблюдалась дальнейшая потеря фоторецепторов, истончение НЯС и уменьшение количества рядов ядер фоторецепторов. На 3 неделе имеется тенденция к большей толщине НЯС и большему количеству рядов ядер фоторецепторов в центральной зоне и средней периферии сетчатки в группе животных, которым проводились инъекции ПАБК по сравнению с контрольной группой (рис. 3А и 4А). В возрасте 4,5 недель и толщина НЯС, и количество рядов ядер НЯС были больше в периферической части сетчатки животных в группе лечения по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (рис. 3Б, 4Б, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка морфологических параметров НЯС показывает, что системное введение ПАБК оказывает стабили-

зирующее влияние на развитие дегенеративных процессов в сетчатке мышей линии rd10 — экспериментальной модели ПР. В этой линии животных мутация гена β -субъединицы фосфодиэстеразы палочек приводит к прогрессивной, массовой гибели фоторецепторов в первые месяцы жизни. ПАБК обеспечивает частичную защиту фоторецепторов от гибели. Морфологические различия между группами контроля и лечения были отмечены на сроке 3 и 4,5 недели, статистически значимые различия получены на 4,5 неделе. Протективное действие ПАБК, вероятно, связано с ее антиоксидантными свойствами, ПАБК снижает интенсивность перекисного окисления липидов, предотвращает повреждение фоторецепторов и способствует их выживанию. ПАБК имеет хороший профиль безопасности, ее применение не ограничивается. В настоящем исследовании животные, получавшие ПАБК, не отличались от контрольной группы по весу, поведению и выживаемости.

На сегодняшний день перспективным методом лечения региональных дегенераций является патогенетически ориентированная терапия с использованием антиоксидантов. Единичные исследования уже раскрывают потенциал эффективности антиоксидантов в лечении ПР: показано увеличение выживаемости фоторецепторов на животных моделях при применении комплексов лютеин + зеаксантин + α -липовая кислота [8, 15], α -токоферол + аскорбиновая кислота + Mn (III) + порфирин + α -липовая кислота [16]. Тем не менее, эффект каждого препарата в отдельности в этих исследованиях часто был очень небольшим, но при совместном применении была достигнута высокая эффективность, связанная с аддитивным или даже синергическим эффектом антиоксидантов в различных комбинациях [8, 15, 16]. Таким образом, ПАБК с его хорошим профилем безопасности может служить эффективным дополнением к антиоксидантной терапии пигментного ретинита.

ЛИТЕРАТУРА

- 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. — Vol. 45. — P. 601-609.
- Wang DY, Chan WM, Tam PO, et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta* // 2005. — Vol. 351. — P. 5-16.
- Marigo V. Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration // *Cell Cycle.* — 2007. — Vol. 6. — P. 652-5. Epub 2007 Mar 17.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, et al. Retinal degeneration mutants in the mouse // *Vision Res.* — 2002. — Vol. 42. — P. 517-525.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa // *Lancet.* — 2006. — Vol. 368. — P. 1795-1809.
- 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. — Vol. 47. — P. 3683-3689.
- Ahuja-Jensen, P., Johnsen-Soriano, S., Ahuja, S., et al. Low glutathione peroxidase in rd1 mouse retina increases oxidative stress and proteases // *Neuroreport.* — 2007. — Vol. 18. — P. 797-801.
- Komeima, K., Rogers, B. S., Campochiaro, P.A. Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa // *J. Cell. Physiol.* — 2007. — Vol. 213. — P. 809-815.
- Акберова С.И., Ершов Ф.И., Мусаев Галбинур П.И. и др. Динамика интерферонового статуса у больных с герпетическими кератитами при лечении нового индукто-
- ра интерферона актиполом // *Вестн. офтальмологии.* — 2001. — №1. — С. 33-36.
- Дрозд Н.Н., Акберова С.И., Строева О.Г. и др. Антитромботическая активность пара-аминобензойной кислоты // *Эксп. клин. фармакол.* — 2000. — №3. — С. 40-44.
- 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.
- 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. 39-44.
- 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.
- Gargini, C., Terzibas, E., Mazzoni, F., et al. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study // *J. Comp. Neurol.* — 2007. — Vol. 500. — P. 222-238.
- 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. — Vol. 103. — P. 11300-11305.
- 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. — Vol. 145. — P. 1120-1129.