

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ АДЕНОЗИН - ДЕЗАМИНАЗЫ - 2 В ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Диана Николаевна Титаева

студент, ФГБОУ ВО Минздрава России Оренбургский Государственный Медицинский Университет, РФ, г. Оренбург

Архипова Владислава Александровна

студент, ФГБОУ ВО Минздрава России Оренбургский Государственный Медицинский Университет, РФ, г. Оренбург

Боровская Екатерина Николаевна

научный руководитель, ассистент, ФГБОУ ВО Минздрава России Оренбургский Государственный Медицинский Университет, РФ, г. Оренбург

POTENTIAL ROLES OF ADENOSINE DEAMINASE-2 IN DIABETIC RETINOPATHY

Diana Titaeva

Student of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Orenburg state medical university, Russia, Orenburg

Vladislava Arkhipova

Student of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Orenburg state medical university, Russia, Orenburg

Ekaterina Borovskaya

Scientific director, Assistant of the department of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Orenburg state medical university, Russia, Orenburg

Аннотация. Экспериментально определено увеличение экспрессии и активности аденозин-дезаминаза -2 в сетчатке человека и свиньи с диабетом, а также у гликозилированного альбумина Амадори (AGA) - или гипергликемии в обработанной микроглии свиньи и человека. Эти результаты предполагают, что воспаление сетчатки, при диабетической ретинопатии опосредовано с аденозин-дезаминаза -2.

Abstract. The increase in the expression and activity of adenosine deaminase -2 in the retina of humans and pigs with diabetes, as well as in glycosylated albumin Amadori (AGA) or hyperglycemia, in treated pig and human microglia was experimentally determined. These results suggest that retinal inflammation in diabetic retinopath is mediated with adenosine deaminase -2.

Ключевые слова: Диабетическая ретинопатия; ингибитор аденозинкиназы; аденозин деаминаза-2.

Keywords: Diabetic retinopathy; adenosine kinase inhibitor; adenosine deaminase-2.

Цель: изучения роли аденозина-дезаминазы- 2 в развитии осложнений при диабетической ретинопатии

Метод: Клиническое исследование посмертных образцов глаза у лиц с диабетом и без. Проведение вестерн-блот анализа с сетчатками свиней, страдающих диабетом и реакции ПЦР в реальном времени. А также изучения влияния лекарственной терапии и лечения гипоксии на культивируемые клетки микроглии. Все подсчеты проводились с помощью компьютерной программы. Диабетическая ретинопатия является основной причиной слепоты среди взрослого трудоспособного населения. Аденозинергическая система рассматривается как значительный модулятор нейротрансмиссии и воспалительного ответа посредством действий четырех типов рецепторов (A1R, A2AR, A2BR, A3R). Описанные ниже экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что на эту систему в значительной степени влияют диабетические условия и что модуляция ее компонентов может выявить потенциальные терапевтические мишени для лечения диабетической ретинопатии, особенно на ранних стадиях заболевания.[6, стр.1]. На ранних стадиях заболевания, решающее значения в развитии основных осложнений диабетической ретинопатии играет активация микроглии сетчатки.

Аденозин – пуриновый нуклеотид, повышен в местах повреждения тканей в результате воспаления или гипоксии. Путь удаление аденозина с помощью аденозин-дезаминазы-1 играет незначительную роль в регуляции аденозинергической функции; основная роль аденозин-дезаминазы-1 заключается в поддержании низкого уровня 20-деоксиаденозина для правильного функционирования иммунной системы клетки. Так же кроме аденозин-дезаминазы -1 был обнаружен аденозин – деаминаза – 2 у млекопитающих, низших позвоночных, насекомых как внеклеточный фермент. Во время воспалительного процесса происходит непропорциональное увеличение аденозин – деаминаза – 2. Обнаруживается в тканях, богатых макрофагами, включая кровь. Внеклеточный аденозин активирует аденозиновые рецепторы. Возбуждение рецепторов A2AAR оказывает противовоспалительное действие, защищает поврежденные клетки. Экспериментально, было доказано, что активация A2AAR в клетках микроглии сетчатки было наиболее эффективной в подавлении ингибирования фактора некроза опухоли (TNF), и что лечение агонистом A2AAR приводило к снижению вызванной диабетом гибели клеток сетчатки и высвобождению TNF-а. Последние данные, демонстрирующие, что агонист A2AAR защищает от вызванного диабетом воспаления сетчатки, свидетельствует о том, что нарушение метаболизма аденозина может способствовать осложнениям сетчатки при диабете. Определяя причинно – следственную связь между высвобождением TNF- а, экспрессией и активностью аденозин – деаминаза – 2 у свиней с диабетической ретинопатией, экспериментальные результаты позволяют предположить, что нарушение метаболизма аденозина при диабете, связано с повышенной экспрессией и активностью аденозин – деаминаза – 2. [2, стр.179-184].

1.Материалы и методы

1.1. Посмертные образцы глаза.

Человеческие глаза – 9 недиабетических больных и 8 больных диабетом.

Критерии отбора следующие:

- старше 50 лет
- инсулин - зависимый диабет или без диабета
- глаза энуклеированы в среднем через 6,71 ч после смерти.

1.2. Индукция диабета.

Взято 12 самок йоркширских свиной весом 30 кг. Концентрации глюкозы в сыворотке были измерены ежедневно перед инъекцией, через день в течение следующих двух недель, и каждую вторую неделю на протяжении 12 недель. Свины были обработаны подкожной инъекцией инсулина короткого действия (Нормулин) для удержания крови концентрации глюкозы от 350 до 550 мг.[6, стр.4].

1.3. Вестерн - блот анализ. Отдельные сетчатки свиной гомогенизировали в буфере RIPA [6, стр. 5]. Проводилась количественная ПЦР в реальном времени, а так же РНК-интерференция. Клетки микроглии трансфицировали свиной или контрольной малой интерферирующей (si) РНК (Ambion) с использованием HiPerFect (Qiagen). Анализировали активность аденозин - дезаминаза - 2. Активность аденозин - дезаминазы - 1 ингибируется аденозин - дезаминазы - 1 -специфическим ингибитором. [5, стр.274].

1.4. Влияние лекарственной терапии или лечения гипоксии на культивируемые клетки микроглии.

Клетки микроглии высеивали с плотностью 5×10^5 клеток / лунке в предварительно обработанный коллагеном-1 12-луночный планшет для тканевых культур. Активация микроглии достигалась добавлением амадори-гликированного альбумина, с необнаружимым эндотоксином липополисахарида.[6,стр.5-6].

2.Результаты

2.1. Повышенная экспрессия и активность аденозин - дезаминазы - 2 идентифицирована в сетчатке человека и свиной с диабетом и в клетках микроглии, обработанных AGA или гипергликемией.

Повышение экспрессии и активности аденозин - дезаминазы - 2 было обнаружено в сыворотке от пациентов с диабетом, что указывает на роль в воспалении аденозин - дезаминазы - 2. С помощью вестерн-анализа повышенная экспрессия аденозин - дезаминазы - 2 была идентифицирована в сетчатке глаз донора человека с диабетом. Более того, повышенная экспрессия аденозин - дезаминазы - 2 была выявлена в сетчатке свиной с 12 неделями диабета. В тех же самых сетчатках экспрессия аденозин - дезаминазы - 1 и CD73 оказалась неизменной. Повышение активности аденозин - дезаминазы - 2 > в 2 раза было выявлено в стекловидном теле у свиной с диабетом. Было выявлено с помощью анализа что, хотя уровни экспрессии дифференцировочного кластера 73 (CD73) оставались неизменными, повышенная экспрессия TNF- α , A2AAR и аденозин - дезаминазы - 2, но сниженная аденозинкиназа, была выявлена в сетчатке свиной с диабетом. Кроме того, было проанализировано влияние гипоксии, гипергликемии и экспрессии AGA на аденозин - дезаминазы - 2 и активности в клетках микроглии человека. [6,стр.5]. Эти результаты предполагают, что изменение экспрессии аденозинкиназы во время воспаления может служить эндогенным защитным механизмом для повышения уровня внеклеточного аденозина и того, что активация всех других механизмов может быть связана с воспалением в диабетической сетчатке. [1, стр.520-526].

2.2. Аденозин - дезаминазы - 2 экспрессируется в активированной микроглии человека и сетчатки свиной при диабете. Во время воспаления диспропорциональное увеличение аденозин - дезаминазы - 2 было обнаружено в тканях, богатых макрофагами. Это говорит о том, что аденозин - дезаминазы - 2 участвует в воспалении в макрофагах. Была сделана иммунологическая метка аденозин - дезаминазы - 2 (зеленый) и Iba-1 (красный), маркера активированной микроглии или макрофагов, в сетчатке человека и свиной при нормальных и диабетических условиях. Совместная локализация аденозин - дезаминазы - 2 и Iba1, идентифицируется только в сетчатке с диабетом. Эти результаты предполагают, что активация в аденозин - дезаминазы - 2 сетчатке диабетической свиной происходит в активированной микроглии или макрофагах. [3, стр. 232-245].

2.3. Противовоспалительная A2AAR-сигнализация идентифицируется в AGA-активированных клетках сетчатки свиной сетчатки. Передача аденозина через A2AAR в микроглии играет основную роль в противовоспалительном воздействии на сетчатку грызунов во время диабета. Чтобы проверить, играет ли A2AAR роль в противовоспалительной функции свиной сетчатки

микроглии при диабете, определяли высвобождение TNF. Было показано, что лечение микроглии AGA, фактором риска развития диабета, симулирует воспаление. Обработка микроглиальных клеток сетчатки свиньи AGA вызывала заметное увеличение высвобождения TNF-а. Эти результаты идентифицируют передачу сигналов свиньи через A2AAR в качестве критической контрольной точки для TNF-аренды в обработанных AGA клетках сетчатки микроглии. [4, стр.45-54].

2.4. AGA -индуцированное высвобождением GA - индуцированное высвобождением TNF - а в микроглии сетчатки опосредуется ADA2. Чтобы определить причинную роль аденозин - дезаминазы - 2 в опосредовании высвобождения TNF-а, были использованы два подхода. Во-первых, ADA2-нейтрализующее антитело значительно ингибировало AGA-индуцированное высвобождение TNF-а почти дозозависимым образом. Во-вторых, микроглиальные клетки сетчатки свиньи, временно трансфицировали м-РНК аденозин - дезаминазы - 2 и обрабатывали AGA, как и ранее. Лечение микроглии AGA усиливало высвобождение TNF-а, и этот эффект был значительно снижен в клетках, трансфицированных м-РНК аденозин - дезаминазы - 2. Этот результат был подтвержден снижением активности аденозин - дезаминазы - 2 в клетках, трансфицированных м-РНК, но не скремблированной м-РНК. Этот результат предполагает, что аденозин - дезаминазы - 2 опосредует AGA-индуцированное высвобождение TNF в микроглии сетчатки. [6, стр. 6].

Выводы

Во время воспаления повышается активность аденозин - дезаминазы - 2 в тканях богатых макрофагами. Аденозин - дезаминазы - 2 является маркером для больных со следующими патологиями: сахарный диабет, туберкулез, ВИЧ - инфицированные. Аденозин - дезаминазы - 2 выражает свою активность только в условиях гипоксии или воспаления. Исследования подтвердили, что A2AAR повышены, CD73 не изменяется, аденозинкиназа понижается во время воспаления. Понижение экспрессии аденозинкиназы, служит в качестве эндогенного механизма защиты, повышающего уровень внутриклеточного аденозина. Повышенная активность аденозин - дезаминазы - 2 может усиливать воспаление сетчатки, метаболизируя внеклеточный аденозин и повышенная активность, связана с развитием воспаления при диабете. Аденозин - дезаминазы - 2 выступает как фактор роста, который способствует активации микроглии и пролиферации макрофагов. Таким образом, накопление гликозилированного альбумина Амандори (AGA) в сетчатке вызывает активацию микроглии и аденозин - дезаминазы - 2.[6,стр. 7].

Список литературы:

1. R. Klein, B.E. Klein, S.E., The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years, Arch. Ophthalmol. (1984).
2. K. Manousaridis, J. Talks, Macular ischaemia: a contraindication for anti-VEGF treatment in retinal vascular disease, Br. J. Ophthalmol. 96 (2012).
3. C. Martin, M. Leone, X. Viviani, High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock, Crit. Care Med. 28 (2000).
4. B. Sperlagh, M. Doda, M. Baranyi, G. Hasko, Ischemic-like condition releases norepinephrine and purines from different sources in superfused rat spleen strips, J. Neuroimmunol. 111 (2000).
5. G.B. Sala-Newby, A.C. Skladanowski, A.C. Newby, The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 50 -nucleotidase-I, J. Biol. Chem. 274 (1999).
6. Potential roles of adenosine deaminase-2 in diabetic retinopathy Nehal M. (2013).