ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):325-330

Acute Induction of Ganglion Cell Death and Generation of Mouse Model of Glaucoma by N-Methyl-D-Aspartate

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Ranaei Pirmardan E.[1] *PhD*,
Soheili Z.S.*[2] *PhD*,
Samiei Sh.[3] *MSc*,
Ahmadieh H.[4] *MD*,
Mowla S.J.[1] *PhD*,
Masoumi M.[2] *MSc*,
Naseri M.[5] *MSc*

How to cite this article
Ranaei Pirmardan E, Soheili Z S, Samiei Sh, Ahmadieh H, Mowla S J, Masoumi M, Naseri M. Acute Induction of Ganglion Cell Death and Generation of Mouse Model of Glaucoma by N-Methyl-D-Aspartate. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):325-330.

[1]Molecular Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Molecular Medicine Department, Medical Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran
[3]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research & Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[4]Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Molecular Medicine Department, Advanced Technologies in Medicine Faculty, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Correspondence
Address: National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Pajoohesh Boulevard, Pajoohesh Township, Kilometer 15, Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1497716316
Phone: -+98 (21) 44787379
Fax: +98 (21) 44787399
soheili@nigeb.ac.ir

Article History
Received: July 01, 2016
Accepted: August 22, 2016
ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims Glaucoma is an optic neuropathy that causes loss of retinal ganglion cells (RGC) and leads to blindness. This disease is a leading cause of blindness worldwide. For pre-clinical studies and finding novel therapies, using functional animal models is unavoidable. One of these models is the mice treated with N-Methyl-D-Aspartate (NMDA). The aim of this study was the acute induction of ganglion cell death and generation of mouse experimental model of glaucoma by N-Methyl-D-Aspartate.

Materials & Methods In this experimental study, the creation of model mice with NMDA neurotoxin were created. For this purpose, retinal cell damage was induced in vivo in mice by intravitreal injection of NMDA. After removing the eyes, tissue analyses were performed on sample and control eyes. After tissue staining, the number of ganglion cells and the thickness of the retina layers and Ganglion Cell Complex (GCC) were evaluated. In addition, number of ganglion cells, thicknesses of the retina, and GCC of the optic nerve disc were measured in samples.

One-way ANOVA and SPSS 22 software were used to analyze the data.

Findings Only 3 days after the injection to eye samples of NMDA, the thickness of the GCC and retinal layers as well as the number of ganglion cells significantly decreased compared to the control samples. The 50% reduction in the number of ganglion cells in the glucoma sample was confirmed.

Conclusion Three days after the injection of NMDA to eye samples, the thickness of the GCC and retinal layers as well as the number of ganglion cells is significantly decreased compared to the control samples.

Keywords Glaucoma; Mice; N-Methyl-D-aspartate; Retina

CITATION LINKS

[1] The number of people with glaucoma worldwide in ... [2] Available data on ... [3] Animal models of ... [4] Mouse models of ocular ... [5] Mouse model resources for vision ... [6] Animal models in the study of the glaucoma: Past, present ... [7] Primate glaucoma ... [8] Feline ... [9] The pig eye as a novel model of ... [10] Rodent models for glaucoma retinopathy ... [11] Mouse models for studies of retinal degeneration ... [12] Three experimental glaucoma models in rats: Comparison ... [13] Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma ... [14] Assessment of rat and mouse RGC apoptosis imaging in ... [15] Bax-dependent and independent pathways ... [16] N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated excitotoxic damage ... [17] Nickells, Mouse models of retinal ganglion cell death ... [18] Glaucoma animal ... [19] Hypoxia-ischemia and retinal ganglion ... [20] Neuroprotection in diabetic ... [21] NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic ... [22] NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity ... [23] NMDA-induced retinal injury is mediated by an endoplasmic reticulum ... [24] Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell ... [25] NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development ... [26] Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are resistant to N-methyl-D-aspartic ... [27] Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion ... [28] A novel calpain inhibitor, ((1S)-1-((((1S)-1-Benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-dioxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester ... [29] Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using ... [30] Thickness mapping of the inner retina by spectral-domain optical coherence tomography in an N-methyl-D-aspartate-induced ... [31] Quantitative analysis of mouse retinal layers using automated segmentation of spectral domain optical coherence tomography ... [32] Stimulation of neural regeneration in the mouse ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

القای حاد مرگ سلول‌های گانگلیونی و تولید موش مدل آزمایشگاهی بیماری گلوکوما توسط N-متیل، D-آسپارتات

احسان رعنایی‌پیرمردان PhD
گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
زهرا سهیلا سهیلی* PhD
گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
شهرام سمیعی MSc
مرکز تحقیقات انتقال خون- موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
حمید احمدیه MD
مرکز تحقیقات چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
سیدجواد مولی PhD
گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
مریم معصومی MSc
گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
مرضیه ناصری MSc
گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: گلوکوما یک بیماری عصبی- چشمی است که با نابودی سلول‌های گانگلیون شبکیه منجر به نابینایی می‌شود. این بیماری از علل اصلی نابینایی در جهان است. برای مطالعات پیش‌کلینیکی و یافتن درمان‌های جدید استفاده از مدل‌های حیوانی کارآمد اجتناب‌ناپذیر است. یک نوع از این مدل‌ها، موش‌هایی هستند که چشم آنها با N-متیل، D-آسپارتات (NMDA) تیمار شده است. هدف مطالعه حاضر القای حاد مرگ سلول‌های گانگلیونی و تولید موش مدل آزمایشگاهی بیماری گلوکوما توسط N-متیل، D-آسپارتات بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر موش‌های مدل با نوروتوکسین NMDA تولید شدند. برای این منظور تخریب سلولی با تزریق داخل زجاجیه NMDA به چشم موش‌ها انجام شد و پس از خارج‌کردن چشم‌ها، آنالیزهای بافتی روی چشم‌های نمونه و کنترل صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی بافتی تعداد سلول‌های گانگلیون و ضخامت لایه‌های شبکیه و کمپلکس سلولی گانگلیون (GCC) ارزیابی شدند. علاوه بر این ضخامت لایه‌های هسته‌ای داخلی و بیرونی در نمونه‌ها مقایسه شد. آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS 22 به کار رفتند.

یافته‌ها: تنها سه روز پس از تزریق NMDA به نمونه‌های چشم، ضخامت لایه‌های GCC، شبکیه و همچنین تعداد سلول‌های گانگلیون در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌طور چشمگیری کاهش یافت. کاهش ۵۰% تعداد سلول‌های گانگلیون در نمونه گلوکوما تایید شد.

نتیجه‌گیری: پس از تزریق NMDA به نمونه‌های چشم، ضخامت لایه‌های GCC، شبکیه و همچنین تعداد سلول‌های گانگلیون در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: گلوکوما، موش مدل، N-متیل، D-آسپارتات، شبکیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۰۱
*نویسنده مسئول: soheili@nigeb.ac.ir

مقدمه

گلوکوما یکی از مهم‌ترین دلایل نابینایی در سراسر جهان است که ۷۰میلیون نفر از آن رنج می‌برند[1]. این بیماری یکی از اختلالات تخریب‌کننده عصبی است که منجر به ازبین‌رفتن سلول‌های گانگلیون، ازبین‌رفتن میدان دید و در نهایت نابینایی می‌شود[2]. با وجود اهمیت تحقیق در زمینه گلوکوما، مکانیزم‌های پاتوفیزیولوژیکی منجر به این بیماری، به‌طور کامل مشخص نشده است[3]. زمانی که بیمار توسط چشم‌پزشک معاینه شود تشخیص اختلالات نورودژنراتیو (تخریب‌کننده اعصاب) شبکیه دشوار نیست، اما بررسی تخریب شبکیه به دلایل مختلف و از جمله عدم امکان انجام بیوپسی محدود است[4]. در مقایسه با انسان، تشخیص در مدل‌های جانوری بیماری‌های تخریبی شبکیه آسان نیست اما مدل‌های جانوری انجام تحقیقات پیشرفته و نمونه‌گیری‌های مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد[5]. مدل‌های حیوانی متنوعی از گونه‌های مختلف برای مطالعه بیماری گلوکوما استفاده شده‌اند[6]. از آن جمله می‌توان به جانوران بزرگی مانند میمون[7]، سگ، گربه[8]، خوک[9] و جانوران کوچکی مثل جوندگان اشاره کرد[10]. ایجاد گلوکوما در این حیوانات به روش‌های القایی یا خودبه‌خودی است. در این میان موش‌های مدل به‌دلیل شباهت‌هایی که از نظر فیزیولوژی، آناتومی و ژنتیکی با انسان دارند، ابزار قدرتمندی در تحقیقات آسیب‌شناختی بیماری‌های تخریبی شبکیه انسان هستند[11]. با گسترش این مدل‌های موشی، اطلاعات در زمینه‌های ژن‌های موثر در بیماری‌های شبکیه، درک مکانیزم‌های منجر به این بیماری‌ها و طراحی درمان‌های موثر توسعه یافته است.

انواع مختلفی از گلوکوما شناخته شده است که عمدتاً تحت عناوین حاد، مزمن، ثانویه و اولیه طبقه‌بندی می‌شوند. در میان مدل‌های موشی، نمونه‌هایی با روش‌های القایی[12]، خودبه‌خودی و ترانس‌ژن مانند سویه DBA/2J ایجاد شده‌اند[13]. برای القای مرگ سریع و نسبتاً اختصاصی سلول‌های گانگلیون، به مدل‌های القایی ضروری نیاز است. این مدل‌ها با تزریق مستقیم داخل چشمی توکسین‌هایی ایجاد می‌شوند که مرگ سلول‌های گانگلیون را تسهیل می‌کنند. استاروسپورین[14] یا N-متیل، D-آسپارتات (NMDA) که آنالوگ غیرهیدرولیزشونده گلوتومات است، مثال‌هایی از این توکسین‌ها هستند[15]. مقادیر بالای گلوتامات اثرات مخربی در بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون، آلزایمر و گلوکوما دارد. گلوتامات به گیرنده اختصاصی خود به نام گیرنده NMDA اتصال می‌یابد. آمینواسید NMDA می‌تواند نقش گلوتامات را تقلید و با اتصال به گیرندهای آن این مسیر را فعال کند. در شبکیه چشم، سلول‌های گانگلیون و بعضی از سلول‌های لایه پلکسی‌فرم داخلی (IPL) زیرواحدهای این گیرندها را بیان می‌کنند. سلول‌های گانگلیون نسبت به گلوتامات یا NMDA بسیار حساس بوده و افزایش عملکرد گیرندهای NMDA در آنها موجب مرگ سلولی می‌شود، البته گزارش‌هایی مبنی بر تخریب سلول‌های آماکراین نیز منتشر شده است[16].

در مطالعه حاضر به‌وسیله تزریق نوروتوکسین NMDA به درون زجاجیه موش، القای حاد مرگ سلول‌های گانگلیونی و موش‌های مدل آزمایشگاهی بیماری چشمی گلوکوما تولید شدند. تهیه این مدل‌ها با ازبین‌رفتن سریع تعداد زیادی از سلول‌های گانگلیون و همچنین کاهش ضخامت کمپلکس سلولی گانگلیون (GCC) که شامل لایه فیبر عصبی شبکیه (RNFL)، لایه سلولی گانگلیون (GCL) و لایه پلکسی‌فرم داخلی (IPL) می‌شود، مورد ارزیابی قرار گرفت.

هدف مطالعه حاضر القای حاد مرگ سلول‌های گانگلیونی و ایجاد موش مدل آزمایشگاهی بیماری گلوکوما توسط N-متیل، D-آسپارتات بود.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، موش‌های نژاد NMRI با محدوده سنی ۸ تا ۱۲ماهه به کار رفتند. آنها از واحد حیوان‌خانه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه و در همان مکان نگهداری شدند.

تمامی مراحل کار و نگهداری این جانوران طبق قوانین اخلاقی مرکز با توجه به بیانیه انجمن تحقیقات بینایی و چشم‌پزشکی (ARVO) برای استفاده از حیوانات در تحقیقات چشم و بینایی انجام شد.

موش‌ها در شرایط روشنایی کنترل‌شده (۱۲ساعت نور؛ ۱۲ساعت تاریکی) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

تهیه استوک NMDA: پودر NMDA (M3262؛ سیگما؛ ایالات متحده) با غلظت ۱۰۰میلی‌مولار در آب دیونیزه استریل حل و پس از الیکوت‌کردن دور از نور در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد و هنگام استفاده (حداکثر یک ماه پس از تهیه) با بافر PBS به غلظت ۲۰میلی‌مولار رسید.

تزریق داخل چشمی: موش‌ها با مخلوط کتامین- زایلزین (alfasan؛ هلند) به‌ازای وزن موش با احتساب ۱۰۰میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین و ۱۰میلی‌گرم/کیلوگرم زایلزین بیهوش شدند و عمل تزریق زیر میکروسکوپ تشریح صورت گرفت. پیش از تزریق برای بازشدن عنبیه چشم، از قطره چشمی میدراکس ۰/۵% (سینادارو؛ ایران) حدوداً به‌مدت ۵دقیقه استفاده شد. برای تزریق، سوزن‌های شیشه‌ای با قطر داخلی ۸۰میکرومتر به کار رفت که از مرکز ملی موش تاریخت در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شده بودند. همچنین از پمپ روغنی Celltram (اپندورف؛ آلمان) به‌عنوان نیروی پیش‌برنده تزریق استفاده شد. به هر چشم ۲میکرولیتر NMDA با غلظت ۲۰میلی‌مولار و برای نمونه کنترل ۲میکرولیتر PBS داخل زجاجیه تزریق شد. پس از هر تزریق داخل چشمی، به‌منظور جلوگیری از خشک‌شدن چشم، ژل چشمی لیپوزیک (Bausch and Lomb؛ ایالات متحده) و برای جلوگیری از عفونت، قطره چشمی جنتامایسین (سینادارو؛ ایران) استفاده شد.

خارج‌کردن چشم‌ها و انجام مراحل بافت‌شناسی: سه روز پس از تزریق، موش‌ها با روش جابه‌جایی مهره گردن کشته و چشم‌ها پس از خارج‌کردن در PBS قرار داده شدند. چشم‌ها با پارافرم آلدئید ۴% به‌مدت یک شب در ۴°C فیکس شدند. پس از شست‌وشو، مراحل آب‌زدایی با درصدهای الکل ۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰% و سپس با زایلن صورت گرفت و بافت‌ها پارافینه شدند. سپس به‌وسیله میکروتوم RM2125RT (Leica Biosystems؛ آلمان) برش‌هایی با ضخامت ۵میکرومتر ایجاد شد و روی لام‌های پوشش‌داده‌شده، قرار گرفتند. مقطع‌گیری به‌گونه‌ای انجام شد که کره‌های چشم حداکثر قطر را داشته و عصب بینایی در آنها مشخص باشد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین طبق پروتکل‌های استاندارد انجام شد. پس از مراحل آب‌زدایی، محیط مانتلام (DPX mounting medium؛ سیگماآلدریچ؛ ایالات متحده) روی نمونه‌ها ریخته و لامل‌گذاری شدند.

عکس‌برداری و آنالیزهای کمی: لام‌ها با میکروسکوپ axiophot (Zeiss؛ آلمان) مشاهده و با دوربین (JENOPTIK I Optical Systems GmbH؛ آلمان) و نرم‌افزار ProgRes® CapturePro 2.8.8 از آنها عکس‌برداری شد. سپس آنالیزهای کمی صورت گرفت.

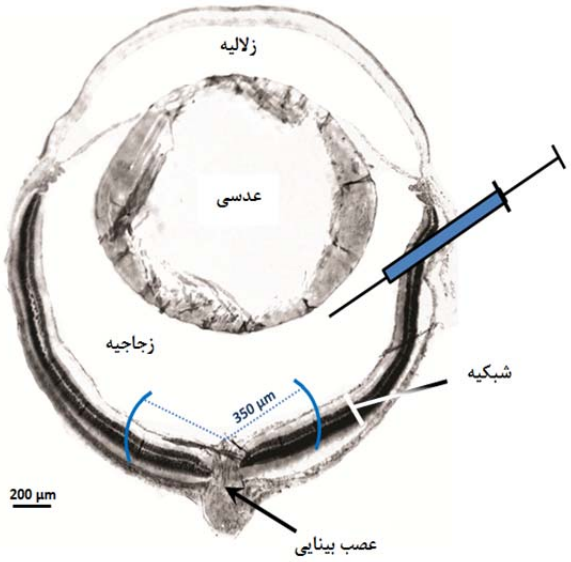
برای اندازه‌گیری ضخامت لایه‌ها، از فاصله ۳۵۰میکرومتری عصب بینایی و از حداقل ۶ مقطع از هر نمونه، محاسبات انجام شد. برای شمارش سلول‌های گانگلیون نیز فاصله ۳۰۰میکرومتری از همان مقطع‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

کاهش تعداد سلول‌های گانگلیون در اثر تزریق NMDA مهم‌ترین پارامتر در ارزیابی تکنیک و فرآیند تولید این نوع موش‌های مدل است.

تکنیک تزریق با استفاده از سوزن‌های شیشه‌ای و celltram انجام شد. با این روش تزریق، تکرارپذیری نتایج به‌طور قابل قبولی افزایش و ضایعات چشمی حاصل از تزریق مانند آسیب به عدسی چشم به تعداد بسیار ناچیزی کاهش یافت.

برای انجام آنالیزهای کمی مربوط به ضخامت لایه‌ها و همچنین شمارش سلول‌های گانگلیون، حفظ ساختار چشم و لایه‌های شبکیه طی انجام مراحل بافت‌شناسی و مقطع‌گیری بسیار حایز اهمیت بود، به این منظور مقطع‌هایی از چشم موش که ساختار آناتومیک آنها کاملاً سالم و مشخص بود، بررسی شدند (شکل ۱).

آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS 22 برای تحلیل نتایج به کار رفتند.



شکل ۱) تصویری شماتیک از محل تزریق و روش آنالیز برش‌های چشمی موش؛ برش‌های بافتی دارای بیشترین قطر، آنالیز شدند و از طرفی عصب بینایی در آنها حضور داشت؛ آنالیز ضخامت لایه‌های شبکیه با یک فاصله مشخص ۳۵۰میکرومتری از مرکز عصب بینایی صورت گرفت

یافته‌ها

تصاویر میکروسکوپ نوری از برش‌های بافتی نمونه‌های تزریق‌شده با NMDA، PBS و همچنین چشم‌های دست‌نخورده به‌وضوح بیانگر کاهش ضخامت شبکیه پس از تزریق NMDA بود (شکل ۲).

در نمونه تزریق‌شده با NMDA در مقایسه با نمونه‌های کنترل، ضخامت شبکیه به‌طور آشکاری کاهش یافت.

بررسی آماری ضخامت شبکیه تغییر معنی‌دار ضخامت در نمونه‌های تزریق‌شده با NMDA را نشان داد و مشخص شد فرآیند تزریق تاثیری بر قطر آن نداشت، بررسی آماری ضخامت لایه GCC نیز تاثیر NMDA بر کاهش ضخامت این لایه را نشان داد (نمودار ۱).

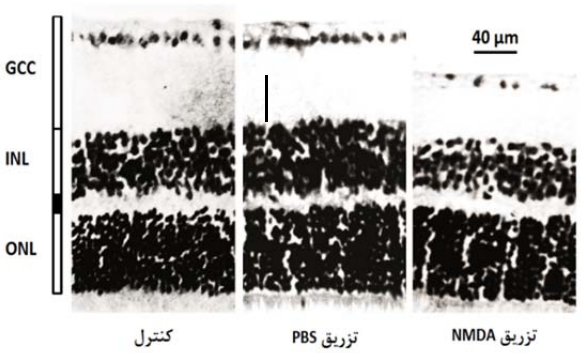
www.SID.ir

هم در تصاویر میکروسکوپ نوری و هم در محاسبات آماری اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های تزریق‌شده با PBS و نمونه‌های دست‌نخورده از نظر قطر لایه‌های شبکیه مشاهده نشد.

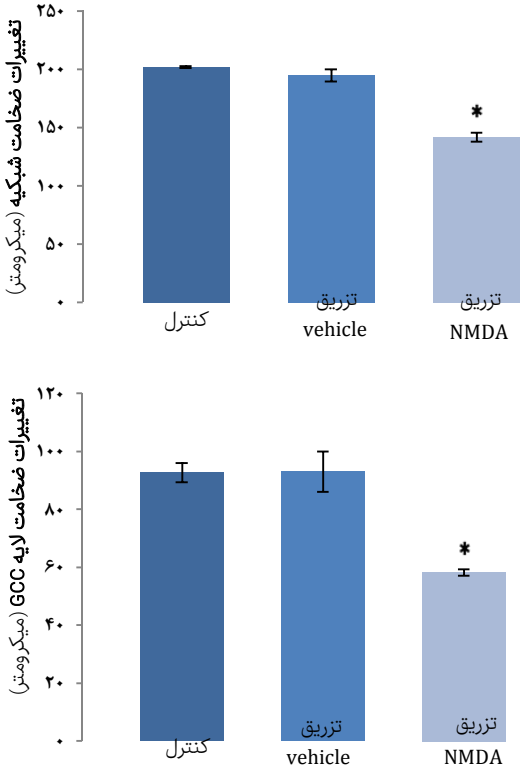
کاهش معنی‌دار ضخامت لایه INL پس از تزریق NMDA مشاهده شد. از طرف دیگر ضخامت لایه ONL در این نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند (نمودار ۲).

برش‌های بافتی پس از تزریق NMDA به وضوح کاهش تعداد سلول‌های گانگلیون را نشان دادند (شکل ۳).

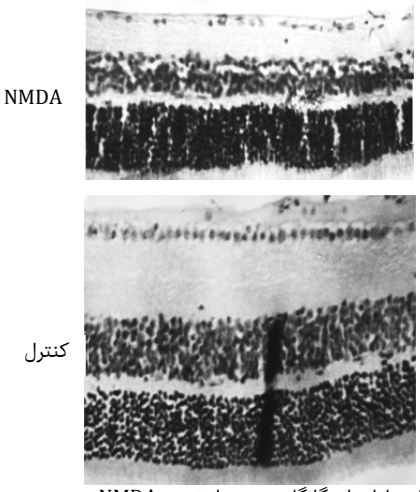
کاهش ۵۰% تعداد سلول‌های گانگلیون در نمونه گلوکوما تایید شد (نمودار ۳).



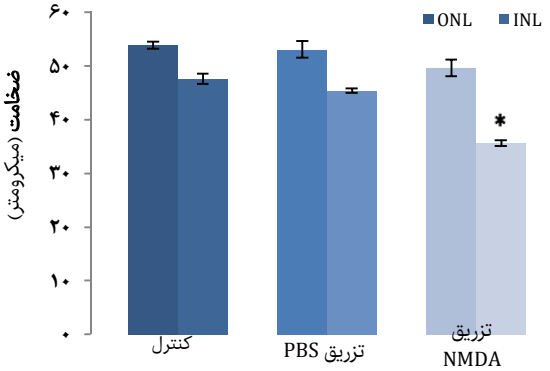
شکل ۲) بررسی ضخامت لایه‌های شبکیه؛ مقایسه ضخامت لایه شبکیه در نمونه‌های تزریق‌شده با NMDA، PBS (vehicle) و نمونه طبیعی چشم در نمونه تزریق‌شده با NMDA در مقایسه با نمونه‌های کنترل ضخامت شبکیه به‌طور آشکاری کاهش یافت.



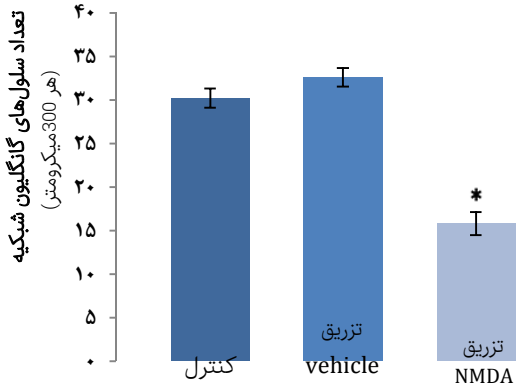
نمودار ۱) تغییرات ضخامت شبکیه، سمت بالا) بررسی آماری ضخامت شبکیه تغییر معنی‌دار ضخامت در نمونه‌های تزریق‌شده با NMDA را نشان داد و مشخص شد فرآیند تزریق تاثیری بر قطر آن نداشت، نمودار سمت پایین) بررسی آماری ضخامت لایه GCC نیز تاثیر NMDA بر کاهش ضخامت این لایه را نشان داد؛ معنی‌داری اختلافات با $p<0.05$ نسبت به نمونه کنترل لحاظ شد



شکل ۳) بررسی تعداد سلول‌های گانگلیون پس از تزریق NMDA



نمودار ۲) مقایسه ضخامت لایه‌های ONL و INL در نمونه تزریق‌شده با NMDA و کنترل‌ها؛ ضخامت لایه ONL بین نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما ضخامت لایه INL به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) در نمونه تزریق‌شده با NMDA نسبت به گروه نرمال کاهش یافت



نمودار ۳) بررسی تعداد سلول‌های گانگلیون پس از تزریق NMDA؛ بررسی‌های آماری نیز نشان‌دهنده کاهش اساسی در تعداد سلول‌های گانگلیون در نمونه مدل گلوکوما بود

بحث

هدف مطالعه حاضر القای حاد مرگ سلول‌های گانگلیونی و تولید موش مدل آزمایشگاهی بیماری گلوکوما توسط N-متیل، D-آسپارتات بود.

اختلالات بینایی زندگی میلیون‌ها نفر از افراد جهان را تحت تاثیر قرار داده است. در دهه گذشته پیشرفت‌های بسیاری در زمینه مطالعات بیماری گلوکوما ایجاد شده و بخشی از این پیشرفت‌ها

www.SID.ir

مرهون استفاده از جوندگان مدل گلوکوما است[17]. مدل‌های موشی گلوکوما در خصوص پاتولوژی مولکولی مرگ سلول‌های گانگلیون شبکیه و بیماری‌های عصب بینایی، اطلاعات جدید و ارزشمندی ارایه می‌دهند[11]. مطالعات روی موش نسبت به سایر جوندگان این مزیت را دارد که محققان می‌توانند دستکاری‌های ژنتیکی پیچیده‌ای را به‌منظور بررسی عملکرد ژن‌ها و مسیرهای بیوشیمیایی حایز اهمیت، روی آنها انجام دهند[18]. در کنار این ویژگی‌ها کار روی این جانوران با مشکلاتی نیز همراه است. به‌دلیل کوچکی چشم موش که قطری در حدود ۲میلی‌متر دارد و همچنین عدسی بزرگ این جانور، تزریق داخل چشمی از لحاظ تکنیکی و تکرارپذیری دشوار و احتمال آسیب‌رسیدن به چشم در آنها بالا است. عموماً برای تزریق به داخل چشم موش از سرنگ‌های همیلتون ۱۰میکرولیتری یا سوزن‌های شیشه‌ای متصل به سرنگ استفاده می‌شود. در این پروژه از سوزن‌های شیشه‌ای که به پمپ روغنی celltram متصل بود، استفاده شد. در این روش تزریق، به‌دلیل ماهیت فشار حاصل از پمپ، نیروی قابل کنترل و ثابتی برای تزریق به وجود می‌آید و از طرفی چنانچه نوک سوزن در مکان مناسب نباشد و در تماس مستقیم با اجزای چشم باشد، عمل تزریق انجام نمی‌شود.

ازبین‌رفتن سلول‌های گانگلیون از علایم مهم در بیماری‌های مختلف شبکیه نظیر گلوکوما، ایسکمی شبکیه و رتینوپاتی دیابتی است[19, 20]. مرگ سلولی القاشده با NMDA یک مدل شناخته‌شده و قابل قبول در ایجاد آسیب در سلول‌های گانگلیون است و در پاتوژنز گلوکوما دخالت اساسی دارد. در مورد نحوه عملکرد گیرنده‌های NMDA در سطح غشای سلول‌های شبکیه[21, 22] و مکانیزم عملکرد NMDA [23-25] تحقیقات فراوانی انجام شده که به‌طور حتم تولید موش‌های مدل کمک شایان توجهی در این زمینه خواهد کرد. هر چند در تحقیقات مختلف مشخص شده است که NMDA در تخریب سلول‌های گانگلیون و آماکراین نقش دارد اما این ماده در تخریب زیرمجموعه‌ای از سلول‌های گانگلیون به نام سلول‌های گانگلیون حساس به نور ذاتی، که حدود ۱ تا ۳% جمعیت این نوع سلول‌ها را شامل می‌شوند، ناتوان است[26]. درصد تخریب این سلول‌ها در موش‌های مدل به دلایل تکنیکی متفاوت خواهد بود. در برخی از گزارش‌ها، از یک روز پس از تزریق ۲۰نانومول NMDA، بیش از ۷۰% سلول‌های گانگلیون تخریب شده است [27, 28]. در گزارش حاضر میزان تخریب، سه روز پس از تزریق، حدوداً ۵۰% بود که البته به‌دلیل تکنیک کار و میزان نشتی پس از تزریق و به‌دنبال آن مقدار NMDA واردشده درون چشم، این تفاوت‌ها حتی بین موش‌های یک گروه مورد آزمایش طبیعی به نظر می‌رسد. در هر صورت استفاده از یک روش تکرارپذیر و تزریق با مهارت بالا می‌تواند اختلافات مشاهده‌شده در میزان تخریب سلول‌های شبکیه را کاهش دهد.

هر چند که مطالعات بافت‌شناسی برای بررسی آسیب‌های شبکیه به‌عنوان استانداردهای طلایی برای این گونه آزمایش‌ها محسوب می‌شود اما استفاده از تجهیزات چشم‌پزشکی مانند توموگرافی انسجام نوری (OCT) یا افتالموسکوپ اسکن لیزری (cSLO) خاص حیوانات کوچکی مثل موش‌ها این امکان را فراهم می‌کند که اندازه‌گیری‌های لایه‌های شبکیه در حالت "درون بدن موجود زنده" و در کمترین زمان انجام گیرد[27, 29-31]. متاسفانه به‌دلیل کوچکی چشم موش، دستگاه‌های OCT انسان قدرت تطبیق لازم برای جوندگان را ندارد و تجهیزات خاص آن بسیار پرهزینه است. به هر حال تهیه نقشه‌های ضخامت و اندازه‌گیری‌های کمی لایه‌های شبکیه می‌تواند ابزاری مفید در ارزیابی آسیب شبکیه در مدل‌های موش آزمایشگاهی باشد. ایجاد موش مدل گلوکوما توسط تزریق نوروتوکسین NMDA ضمن فراهم‌کردن مدلی مناسب برای مطالعه مولکولی پاتوژنز این بیماری می‌تواند در بررسی آثار درمانی فاکتورهای مختلف در بیماری‌های دیگر چشمی نیز کاربرد داشته باشد[32].

در مطالعه حاضر تکنیک‌های لازم برای تزریق داخل چشمی موش‌های آزمایشگاهی راه‌اندازی شد و پس از آنالیزهای بافتی چشمی و اندازه‌گیری‌های کمی ضخامت لایه‌های شبکیه و تعداد سلول‌های گانگلیون و بدون نیاز به ابزارهای پیشرفته و غیرقابل دسترس برای اولین بار در ایران تولید این نوع موش‌های مدل گلوکوما گزارش شد.

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم امکان استفاده از OCTهای جوندگان اشاره کرد که در نتیجه امکان بررسی‌های "*درون محیط زنده*" و بررسی‌های بیشتر زمانی و توپوگرافی وجود نداشت. پیشنهاد می‌شود با توجه به اهمیت بحث این نوع از مطالعات چشم، امکان استفاده از این تجهیزات فراهم شود و مطالعات بیشتری در زمان‌های مختلف صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

پس از تزریق NMDA به نمونه‌های چشم، ضخامت لایه‌های GCC، شبکیه و همچنین تعداد سلول‌های گانگلیون در مقایسه با نمونه‌های کنترل به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان صمیمانه از همکاری دکتر *آزیتا پروانه‌تفرشی* برای مشاوره‌های علمی و همچنین دکتر *مهدی شمس‌آرا* و دکتر *مرتضی دلیری‌جوپاری* از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای همکاری‌های علمی سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه‌اخلاقی: تمامی روش‌ها و پروتکل‌های کار با موش‌های آزمایشگاهی طبق مقررات بین‌المللی تحقیقات بینایی و چشم‌پزشکی (ARVO) بود و با نظارت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و همچنین مرکز تحقیقات چشم دانشگاه شهید بهشتی صورت گرفت.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی میان آنها وجود ندارد.

سهم نویسندگان: احسان رعنایی پیرمردان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۷/۵%)؛ زهرا سهیلا سهیلی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۷/۵%)؛ شهرام سمیعی (نویسنده سوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ حمید احمدیه (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ سیدجواد مولی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ مریم معصومی (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ مرضیه ناصری (نویسنده هفتم)، پژوهشگر کمکی (۵%)

منابع مالی: پژوهش حاضر توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و دانشگاه تربیت مدرس حمایت مالی شده است.

منابع

1- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol.

Archive of SID
www.SID.ir

2008;2(4):879-89.
20- Hernández C, Simó R. Simo. Neuroprotection in diabetic retinopathy. Curr Diab Rep. 2012;12(4):329-37.
21- Zhou X, Hollern D, Liao J, Andrechek E, Wang H. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. Cell Death Dis. 2013;4:e560.
22- Bai N, Aida T, Yanagisawa M, Katou S, Sakimura K, Mishina M, et al. NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. Mol Brain. 2013;6:34-42.
23- Awai M, Koga T, Inomata Y, Oyadomari S, Gotoh T, Mori M, et al. NMDA-induced retinal injury is mediated by an endoplasmic reticulum stress-related protein, CHOP/GADD153. J Neurochem. 2006;96(1):43-52.
24- Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapieha P, Bourgeois P, et al. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. J Neurosci. 2009;29(17):5536-45.
25- Martins RA, Silveira MS, Curado MR, Police AI, Linden R. NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: A BDNF-dependent mechanism. J Neurochem. 2005;95(1):244-53.
26- DeParis SW, Caprara C, Grimm C. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are resistant to N-methyl-D-aspartic acid excitotoxicity. Mol Vis. 2012;18:2814-27.
27- Nakano N, Ikeda HO, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, Kakizuka A. et al. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(12):8754-62.
28- Shimazawa M, Suemori S, Inokuchi Y, Matsunaga N, Nakajima Y, Oka T, et al. A novel calpain inhibitor, ((1S)-1-((((1S)-1-Benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-di-oxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl)carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester (SNJ-1945), reduces murine retinal cell death in vitro and in vivo. J Pharmacol Exp Ther. 2010;332(2):380-7.
29- Fischer MD, Huber G, Beck SC, Tanimoto N, Muehlfriedel R, Fahl E, et al. Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. PLoS One. 2009;4(10):e7507.
30- Ohno Y, Makita S, Shimazawa M, Tsuruma K, Yasuno Y, Hara H. Thickness mapping of the inner retina by spectral-domain optical coherence tomography in an N-methyl-D-aspartate-induced retinal damage model. Exp Eye Res. 2013;113:19-25.
31- Dysli C, Enzmann V, Sznitman R, Zinkernagel MS. Quantitative analysis of mouse retinal layers using automated segmentation of spectral domain optical coherence tomography images. Transl Vis Sci Technol. 2015;4(4):9.
32- Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(49):19508-13.
2006;90(3):262-7.
2- Thylefors B, Megrel ADI, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Available data on blindness (update 1994). Ophthalmic Epidemiol. 1995;2(1):5-39.
3- Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, Edward DP . Animal models of glaucoma. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:1-12.
4- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Wang J, Howell D, Davisson MT, et al. Mouse models of ocular diseases. Vis Neurosci. 2005;22(5):587-93.
5- Won J, Ying Shi L, Hicks W, Wang J, Hurd R, Naggert JK, et al. Mouse model resources for vision research. J Ophthalmol. 2011;2011:1-13.
6- Vecino E. Animal models in the study of the glaucoma: Past, present and future. Arch Soc Esp Oftalmol. 2008;83(9):517-20.
7- Rasmussen CA, Kaufman PL. Primate glaucoma models. J Glaucoma. 2005;14(4):311-4.
8- Dietrich U. Feline glaucomas. Clin Tech Small Anim Pract. 2005;20(2):108-16.
9- Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández-Barbáchano E, Araiz J, et al. The pig eye as a novel model of glaucoma. Exp Eye Res. 2005;81(5):561-9.
10- Pang IH, Clark AF. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. J Glaucoma. 2007;16(5):483-505.
11- Chang B. Mouse models for studies of retinal degeneration and diseases. Methods Mol Biol. 2013;935:27-39.
12- Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. Exp Eye Res. 2006;83(2):429-37.
13- John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998;39(6):951-62.
14- Maass A, Von Leithner PL, Luong V, Guo L, Salt TE, Fitzke FW, et al. Assessment of rat and mouse RGC apoptosis imaging in vivo with different scanning laser ophthalmoscopes. Curr Eye Res. 2007;32(10):851-61.
15- Li Y, Schlamp CL, Poulsen KP, Nickells RW. Bax-dependent and independent pathways of retinal ganglion cell death induced by different damaging stimuli. Exp Eye Res. 2000;71(2):209-13.
16- Seitz R, Tamm ER. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated excitotoxic damage: A mouse model of acute retinal ganglion cell damage. Methods Mol Biol. 2013;935:99-109.
17- McKinnon, SJ, Schlamp CL, Nickells RW. Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. Exp Eye Res. 2009;88(4):816-24.
18- Vecino E, Sharma SC. Glaucoma animal models. London: Intech Open Access Publisher; 2011. 319-29.
19- Kaur C, S Foulds W Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. Clin Ophthalmol.

Archive of SID
www.SID.ir