

Защитный эффект парааминобензойной кислоты при гипоксия-индуцированном апоптозе клеток конъюнктивы и роговицы *in vivo*

А.А. Рябцева¹С.И. Акберова²Г.Х. Али-заде¹Х.Ф. Бабаев³, Ю.В. Марнитантова⁴

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского»
ул. Щепкина, 61/2, Москва, 129110, Российская Федерация

² Медицинский центр «Медквадрат»
Наширское шоссе, 74, к. 1, Москва, 115409, Российская Федерация

³ Институт физиологии им. А.И. Нараева НАН Азербайджана
ул. Шариф-заде, 2, Баку, AZ1100, Азербайджан

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2021;18(2):317–324

Цель. Изучение действия острой гипоксической гипоксии на клетки тканей глаза у взрослых крыс и определение эффективности применения 0,007 % раствора парааминобензойной кислоты (ПАБК) при апоптотическом повреждении тканей глазной поверхности у крыс. **Материалы и методы.** В эксперименте было использовано 27 самцов крыс линии Wistar (54 глаза), разделенных на 5 групп: I группа — интактный контроль, II группа — гипоксический контроль через 1 час, III группа — гипоксический контроль через 3 часа, IV группа — введение препарата через 1 час после гипоксии, V группа — введение препарата за 24 часа до гипоксии. Идентификацию апоптотических клеток в тканях глаза проводили методом TUNEL на замороженных срезах глаза с дополнительным окрашиванием ядерным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Локализацию и интенсивность флуоресцентного свечения в поврежденных клетках анализировали под флуоресцентным микроскопом с использованием компьютерной программы Image J. **Результаты.** В условиях моделируемой острой гипоксической гипоксии наблюдалось апоптотическое поражение конъюнктивы, эпителия роговицы, хориоидеи и фоторецепторного слоя сетчатки. В исследовании детально проанализированы конъюнктивы и роговица. Во II группе количество поврежденных клеток в конъюнктиве было на 67 %, а в III группе на 120 % больше по сравнению с I группой ($p < 0,05$). При введении ПАБК до гипоксии не было отмечено достоверных отличий по сравнению с нормой (I группа) относительно состояния пораженных клеток в конъюнктиве. В группе животных с введением ПАБК после гипоксии через 1 ч (III группа) количество поврежденных клеток статистически не отличалось от группы II (гипоксический контроль через 1 ч), но было достоверно ниже, чем в группе III (гипоксический контроль через 3 часа). Такая же закономерность наблюдалась в отношении эпителия роговицы. **Заключение.** Парааминобензойная кислота (0,007 %) оказывает профилактическое и лечебное действие, предотвращая и стабилизируя процесс развития апоптоза клеток конъюнктивы и переднего эпителия роговицы, индуцированного в условиях экспериментальной острой гипоксической гипоксии.

Ключевые слова: глазная поверхность, роговица, конъюнктивы, апоптоз клеток, парааминобензойная кислота, гипоксия

Для цитирования: Рябцева А.А., Акберова С.И., Али-заде Г.Х., Бабаев Х.Ф., Марнитантова Ю.В. Защитный эффект парааминобензойной кислоты при гипоксия-индуцированном апоптозе клеток конъюнктивы и роговицы *in vivo*. *Офтальмология*. 2021;18(2):317–324. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-317-324>

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует



The Protective Effect of Para-Aminobenzoic Acid in Hypoxia-Induced Apoptosis of Conjunctiva and Cornea Cells *in vivo*

A.A. Ryabtseva¹, S.I. Akberova², G.Hh. Ali-zade¹, H.F. Babayev³, Yu.V. Markitantova⁴

¹ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Institute
Shchepkina str., 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

² Medkvadrat Medical Center
Hashirskoye highway, 74/1, Moscow, 115409, Russian Federation

³ A.I. Karaeva Institute of Physiology of the Azerbaijan Academy of Sciences
Sharif-zade str., 2, Baku, AZ1100, Azerbaijan

⁴ Holtsov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2021;18(2):317–324

Purpose: to evaluate the effects of acute hypoxic hypoxia on eye tissue cells in adult rats and determining the effectiveness of 0.007 % solution of para-aminobenzoic acid (PABA) for apoptotic damage to the tissues of the ocular surface in rats. **Materials and methods.** In the experiment, 27 male Wistar rats (54 eyes) were used, divided into 5 groups. Group I — intact control, Group II — hypoxic control after 1 hour, Group III — hypoxic control after 3 hours, Group IV — with the injection of the drug 1 hour after hypoxia, Group V — injection of the drug 24 hours before hypoxia. The identification of apoptotic cells in the tissues of the eye was performed by the TUNEL method on frozen sections of the eye stained with Hoechst 33342 nuclear fluorescent dye. The localization and fluorescence intensity of the damaged cells was analyzed under a fluorescence microscope using the Image J. computer program. **Results.** Under the conditions of simulated acute hypoxic hypoxia, apoptotic lesions of the conjunctiva, corneal epithelium, choroid, and photoreceptor layer of the retina were observed. In group II, the number of damaged cells in the conjunctiva was 67 %, and in group III it was 120 % more compared to group I — the norm ($p < 0.05$). With the injection of PABA before hypoxia, there were no significant differences compared with the norm (group I) in the state of the affected cells in the conjunctiva. In the group of animals (group III) with the injection of PABA after hypoxia after 1 h, the number of damaged cells does not statistically differ from group II (hypoxic control after 1 h), but significantly lower than in group III (hypoxic control after 3 hours). The same pattern is observed in the corneal epithelium. **Conclusion.** Para-aminobenzoic acid (0.007 %) has a prophylactic and therapeutic effect, preventing and stabilizing the development of apoptosis of conjunctival cells and anterior corneal epithelium induced in experimental acute hypoxic hypoxia.

Keywords: eye surface, cornea, conjunctiva, cell apoptosis, para-aminobenzoic acid, hypoxia

For citation: Ryabtseva A.A., Akberova S.I., Ali-zade G.Hh., Babayev H.F., Markitantova Y.V. The Protective Effect of Para-Aminobenzoic Acid in Hypoxia-Induced Apoptosis of Conjunctiva and Cornea Cells *in vivo*. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(2):317–324. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-317-324>

Financial Disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

There is no conflict of interests

Конъюнктив и эпителий роговицы относятся к структурам передней поверхности глаза, которые в первую очередь поражаются при синдроме сухого глаза (ССГ), который является полиэтиологическим заболеванием и характеризуется как мультифакторная патология, включающая, в основном, повреждения глазной поверхности, воспаление и иммунные изменения [1, 2]. На международном семинаре по синдрому сухого глаза в 2007 году ССГ был обозначен как заболевание, которое проявляется в дисфункции «слезной функциональной единицы» (СФЕ), к которой относятся роговица, конъюнктив, слезная железа, мейбомиевы железы и веки [3]. СФЕ выполняет регулирующую роль в секреции слезы и образовании слезной пленки и поддерживает нормальную физиологию поверхности глаза; повреждение любого компонента СФЕ приводит к дефициту продукции слезы. Гиперосмолярность слезы и нестабильность слезной пленки, вызванные нарушением функции слезной функциональной единицы, являются ключевыми факторами в возникновении ССГ, при котором происходят морфологические изменения с возникновением

апоптоза клеток конъюнктивы и роговицы, повышается риск развития воспаления, что способствует дальнейшей гибели клеток. Все эти факторы в совокупности приводят к возникновению синдрома сухого глаза [4]. У пациентов с ССГ в биопсийном материале из конъюнктивы отмечается возрастание уровня провоспалительных цитокинов и маркеров апоптоза, в частности АР02.7. В ходе развивающегося воспаления активизируются процессы перекисного окисления, что ведет к накоплению образующихся в результате продуктов и нарушениям в системе ферментативной антиоксидантной защиты организма [5, 6].

За последние 10–15 лет среди населения всего мира выявляется неуклонная тенденция к росту показателей заболеваемости ССГ. Эпидемиологические исследования, проведенные в общей популяции населения, показали, что ССГ выявляется у 5–50 % населения в зависимости от таких факторов, как генетические особенности и географическое положение [7, 8]. В США около 7,8 %, или 3,23 миллиона, женщин и 4,7 %, или 1,6 миллиона, мужчин старше 50 лет страдают синдромом сухого глаза

А.А. Рябцева, С.И. Акберова, Г.Х. Али-заде, Х.Ф. Бабаев, Ю.В. Маркитантова

Контактная информация: Рябцева Алла Алексеевна ryabtseva1953@mail.ru

[9, 10], а в Канаде ССГ выявлен у 22 % взрослого населения старше 18 лет [11]. Общая распространенность ССГ в России у пациентов в возрасте до 40 лет составляет 12 %, у пациентов старше 50 лет — более 67 % [12]. Среди пациентов, обратившихся за офтальмологической помощью, ССГ выявлен в 25–45 % случаев [13], среди пользователей монитором компьютера ССГ наблюдается у 76,5 % женщин и 60,2 % мужчин старше 30 лет [14]. Увеличение продолжительности жизни, урбанизация и «технологическая зависимость» также способствуют росту людей, страдающих ССГ, с обилием субъективных расстройств и риском развития тяжелых воспалительных поражений роговицы вплоть до потери глазного яблока.

Таким образом, поиск безопасных и эффективных средств профилактики и лечения ССГ является актуальной проблемой офтальмологии.

Ранее в экспериментальных и клинических исследованиях было установлено, что 0,007 % раствор парааминобензойной кислоты (Актипол®) оказывает противовоспалительное действие, подавляя продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-6 в глазных тканях [18], обладает радиопротекторным [15], репаративным действием при повреждении роговицы [16], а также проявляет антиоксидантные свойства [19], является индуктором эндогенного интерферона (ИИФН) [17] и в клинической практике применяется для лечения кератопатий различного генеза, а также вирусных заболеваний глаз.

В свете современных представлений об этиопатогенезе ССГ и известных фармакологических свойствах ПАБК перспективно изучение его действия в форме лекарственного препарата Актипол® (0,007 % раствор ПАБК) при поражениях структур передней поверхности глаза.

Поэтому целью настоящей работы стало изучение эффективности действия данного препарата в отношении измененных тканей поверхности глаза при экспериментальной острой гипоксической гипоксии.

Первая задача работы состояла в моделировании острого гипоксического повреждения и изучении его проявлений в тканях глаза у взрослых крыс. Вторая задача заключалась в изучении возможного защитного и лечебного действия парааминобензойной кислоты в форме лекарственного препарата Актипол® на ткани передней поверхности глаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперимент было включено 5 серий опытов на 27 самцах крыс (54 глаза) линии Wistar в возрасте 3–4 мес. Для моделирования острого гипоксического повреждения и изучения действия ПАБК экспериментальные животные были разделены на 5 групп: I группа — интактный контроль ($n = 6$, где n — количество животных в каждой экспериментальной группе; 12 глаз), II группа — гипоксический контроль через 1 час после воздействия ($n = 6$; 12 глаз), III группа — гипоксический контроль через 3 часа после воздействия ($n = 5$; 10 глаз),

IV группа — введение препарата через 1 час после гипоксии ($n = 5$; 10 глаз), V группа — введение препарата за 24 часа до гипоксии ($n = 5$; 10 глаз).

Животных помещали в герметично закрывающуюся камеру объемом 0,10–0,15 м³, в которую осуществляли подачу газообразного азота со скоростью 2,0–2,4 л/мин до появления судорог у экспериментального животного. Из общего числа животных 21 крыса была подвергнута однократному действию азота, замещающего вдыхаемый воздух. Скорость подачи азота контролировали с помощью лабораторного реометра (патент RU 2614937, 12.04.2016). В интактном контроле без поражения гипоксией и введения препарата 6 животных оставались в лабораторных условиях. Результаты опытов анализировали через 1 и 3 часа после завершения гипоксического воздействия. Крыс выводили из эксперимента с помощью внутривенной инъекции хлоралгидрата (Riedel-de-Haen, Германия). Энуклеированные глаза подвергали обработке для выявления клеток, находящихся в состоянии апоптоза.

Исследование проводили в соответствии с правилами использования лабораторных животных и положениями «Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Лечебное действие парааминобензойной кислоты (ПАБК) изучали путем парабульбарной инъекции препарата в объеме 0,1 мл через 1 ч после гипоксии с регистрацией результата через 3 ч после инъекции (группа IV, $n = 5$, 10 глаз). Для исследования возможности предотвращения апоптотического поражения глаза (профилактическое действие парааминобензойной кислоты) препарат вводили методом периокулярной инъекции в объеме 0,1 мл за 24 ч до гипоксии, а глаза фиксировали через 3 ч после гипоксии (группа V, $n = 5$; 10 глаз).

Для выявления апоптотических клеток применяли метод TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl transferase — mediated desoxyuridine triphosphate (UTP) — nick end — labeling), включающий идентификацию в тканях глаза поврежденных клеток с фрагментированной ДНК с использованием набора Dead End Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, США). Глаза в течение 4 ч фиксировали в 4%-ном нейтральном формалине, приготовленном на 0,1-м фосфатном буфере (pH 7,4). Образцы отмывали в фосфатном буфере, затем последовательно в растворе фосфатного буфера с 5, 10 и 20%-ной сахарозой (в каждом растворе в трех сменах по 15 минут) и оставляли на 16 часов в фосфатном буфере с 20%-ной сахарозой при температуре 4 °С. Глаза замораживали в среде Tissue-Tec OCT (Leica, Германия). С помощью криостата (Leica M1900, Германия) получали поперечные срезы глазного яблока толщиной 12 микрон (мкм). При анализе замороженных срезов глаза выявляли гибель клеток. Затем использовали флуоресцентную метку фрагментированной ДНК по методу TUNEL по рекомендациям фирмы-производителя. Перед проведением

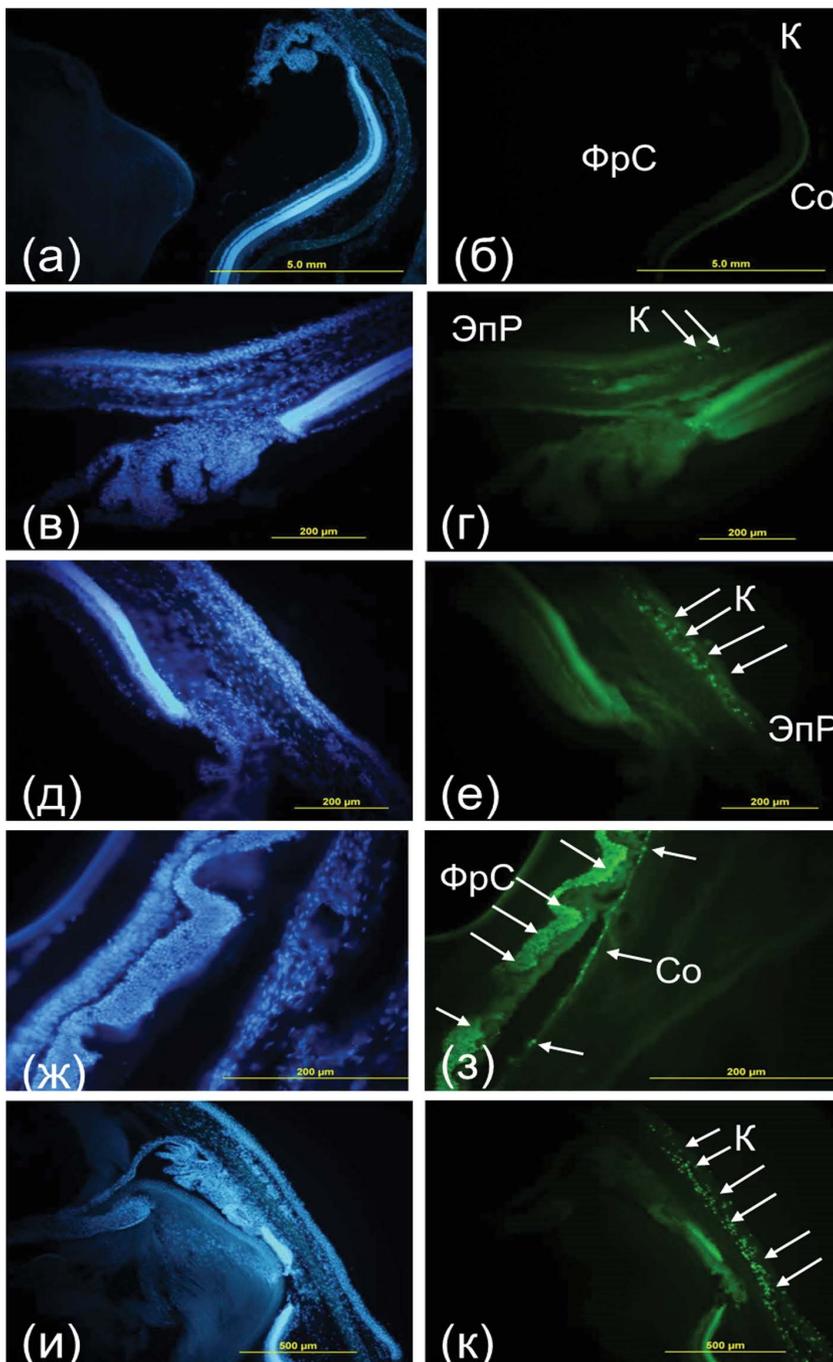


Рис. 1. Апоптотические клетки (указаны стрелками) в тканях глаза крысы в норме и после экспериментальной гипоксии: а, б — интактный контроль (увеличение $\times 5$) — конъюнктура (К), сосудистая оболочка (Со), фоторецепторный слой сетчатки (ФрС); в, г — интактный конъюнктивный контроль (ув. $\times 10$) — конъюнктура (К); д, е — гипоксический контроль через 1 час после воздействия (ув. $\times 10$) — конъюнктура (К); ж, з — гипоксический контроль через 1 час после воздействия (ув. $\times 20$) — фоторецепторный слой сетчатки (ФрС); и, к — гипоксический контроль через 3 часа после воздействия (ув. $\times 20$) — конъюнктура (К). Зеленое свечение — окрашивание TUNEL. Голубое свечение — окрашивание красителем Hoechst33342

Fig. 1. Apoptotic cells in rat eye tissues in norma and after experimental hypoxia. Photo а, б — intact control (zoom lens $\times 5$) — conjunctiva (К), choroid (Со), retina photoreceptor layer (ФрС); в, г — intact conjunctival control (К) ($\times 10$); д, е — fixation conjunctiva after 1 h from hypoxia ($\times 10$); ж, з — fixation of the retina photoreceptor layer (ФрС) after 1 hour from hypoxia ($\times 20$); и, к — fixation of conjunctiva (К) after 3h from hypoxia ($\times 20$). Green glow — TUNEL painted cells. Blue glow — kernels are painted with Hoechst33342

реакции срезы отмывали в 0,1-м PBS (phosphate buffered saline), фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, трижды отмывали от фиксатора в 0,1-м PBS (phosphate buffered saline). Реакцию проводили при температуре 37°C в течение часа, затем останавливали отмыванием срезов в 2-кратном растворе SSC (saline-sodium citrate).

Для подтверждения специфичности реакции мечения фрагментированных участков ДНК, образовавшихся в клетках глаза, подвергшихся апоптозу, проводили обработку контрольных срезов реакционной смесью рекомбинантной терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы без использования фермента, так называемый отрицательный контроль. Положительным контролем служила реакция после предварительной обработки срезов глаза ДНКазой I. Для выявления клеток с поврежденной ДНК, находившихся на разных стадиях апоптоза, дополнительно проводили окрашивание срезов глаза ядерным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. После реакции TUNEL и окрашивания препаратов Hoechst 33342 срезы глаз отмывали в 0,1М фосфатном буфере и заключали в среду Vectashield (Vector, США). Результат подтверждали в трех повторных реакциях.

Локализацию флуоресцентного свечения и его интенсивность в меченых клетках тканей глаза анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия) с передачей изображения на компьютерную приставку, оснащенную программой Leica for Windows. Изображения обрабатывали с помощью компьютерной программы Image J.

Для статистической оценки области локализации апоптотических клеток в конъюнктиве в ее эпителии измеряли интенсивность флуоресцентного свечения в зонах локализации TUNEL-позитивных клеток. Для оценки степени выраженности флуоресцентного сигнала использовали коэффициент интенсивности иммунореактивности, определяемый с помощью программы Image J [21]. Характеристика «интенсивности флуоресцентного свечения» (ИФС) включает: количество, плотность расположения и яркость свечения

апоптотических клеток в стандартном поле зрения на единичную площадь среза. Для каждой группы опытов рассчитывали ИФС в конъюнктиве по усредненным данным 10 измерений, проводимых для каждого анализируемого участка глаза. Данные интенсивности свечения вносили в программу Microsoft Excel, где вычисляли среднее значение интенсивности свечения для каждой из исследуемых экспериментальных групп животных. Статистическую значимость различий между попарно сравниваемыми выборками (группами) определяли по методу Манна — Уитни. Статистическая значимость различий между двумя сравниваемыми группами признавалась, если полученное эмпирическое значение ($U_{\text{э}}$) для каждого сравнения оказывалось меньше или равно табличному критическому ($U_{\text{к}}$) значению (при $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе интактного контроля (I группа) в конъюнктиве и в переднем эпителии роговицы встречались немногочисленные, одиночные апоптотические клетки, что не выявлялось в тканях глаза животных других групп (рис. 1в, г; рис. 3а, б). Специфичность апоптотического поражения клеток подтверждена в контрольной реакции без использования фермента терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (отрицательный контроль), в случаях, когда TUNEL-положительных клеток в тканях глаза не наблюдали (рис. 1а, б).

При моделировании острой гипоксической гипоксии (II и III группа) наблюдалось поражение тканей передней поверхности глаза (конъюнктивы и переднего эпителия роговицы), где выявилось множество TUNEL-положительных апоптотических клеток (рис. 1д, е; рис. 3в, г). Следует отметить, что аналогичные изменения клеток выявлялись в хориоиде и фоторецепторном слое сетчатки (рис. 1ж, з) и нарастали с увеличением времени наблюдения после гипоксического повреждения (рис. 1и, к). В нашем исследовании более детально были изучены ткани передней поверхности глаза.

На рисунке 1 отражена интенсивность апоптоза при гипоксическом поражении. При анализе результатов гипоксического контроля через 1 ч после воздействия (группа II) (рис. 1д, е) и гипоксического контроля через 3 ч после воздействия (группа III) (рис. 1и, к) в конъюнктиве были обнаружены обширные зоны апоптотических клеток на всех срезах.

Количественная оценка по степени свечения TUNEL-положительных клеток

показала, что во II группе количество клеток в конъюнктиве было на 67 % больше, чем в I группе. При этом статистических отличий между группой I и группой II (рис. 4) не выявлено. В группе III поражение было более выражено (на 120 %) и по сравнению с нормой (группа I), при этом статистические различия были значимыми ($p < 0,05$). В эпителии роговицы в группе интактного контроля у животных (I группа) были выявлены единичные TUNEL-положительные клетки, количество которых увеличилось после гипоксии (рис. 3в, г).

При исследовании действия ПАБК на конъюнктиву результат анализировали через три часа после гипоксии, а препарат вводили через час после нее (IV группа) (рис. 2а, б). Интенсивность флуоресцентного свечения скоплений апоптотических клеток в группе IV статистически не отличалась от группы II, но была достоверно ниже, чем в группе III (рис. 4). В роговице IV группы картина распределения TUNEL-положительных клеток была сравнима со II группой. Таким образом, ПАБК предотвращает развитие патологического процесса в конъюнктиве и эпителии роговицы.

При изучении эффективности ПАБК за 24 часа до гипоксического воздействия с целью профилактики развития апоптоза не было обнаружено достоверных отличий в апоптотической активности по показателям степени

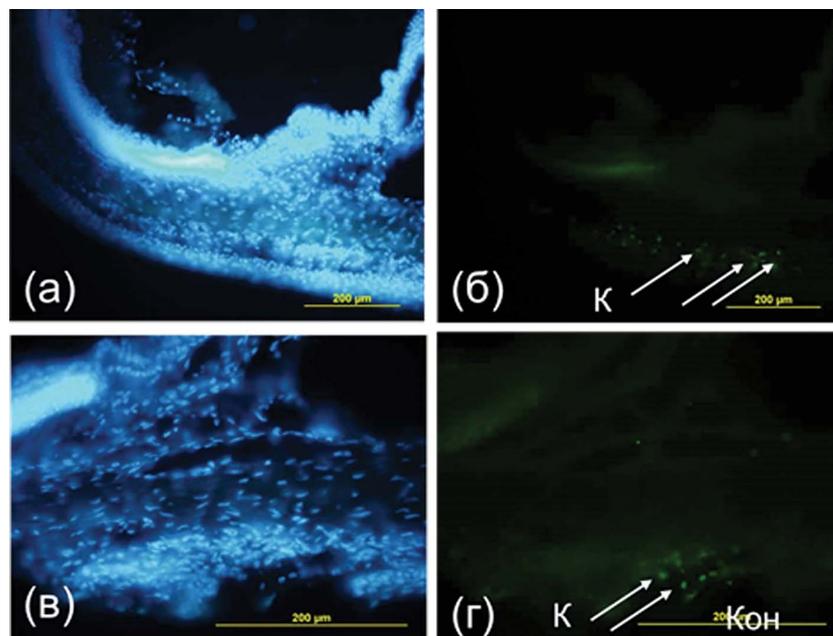


Рис. 2. Апоптотические клетки (указаны стрелками) в конъюнктиве глаза крысы после экспериментальной гипоксии и введения 0,007 % ПАБК: а, б — введение 0,007 % ПАБК через 1 ч после гипоксии (увеличение $\times 20$) — конъюнктура (К); в, г — введение 0,007 % ПАБК за 24 часа до гипоксии (ув. $\times 20$) — конъюнктура (К). Зеленое свечение — TUNEL окрашивание. Голубое свечение — окрашивание красителем Hoechst33342

Fig. 2. Apoptotic cells in the conjunctiva of rat eye cells after injection 0/007 % PABA after hypoxia: а, б — conjunctiva (K) after therapeutic injection of 0.007 % PABA 1h after hypoxia (zoom lens $\times 20$); в, г — conjunctiva (K) after prophylactic injection of 0.007 % PABA 24 hours before hypoxia ($\times 20$). Green glow — TUNEL-positive cells in the conjunctiva and corneal epithelium. Blue glow — nucleus are painted with Hoechst33342

свечения в клетках конъюнктивы V группы по сравнению с интактным контролем (рис. 2в, г).

Полученный результат позволяет заключить, что ПАБК предупреждает развитие апоптотического процесса в клетках конъюнктивы (рис. 1в, г; рис. 4). В роговице картина распределения TUNEL-позитивных клеток была сопоставима с интактным контролем (рис. 3д, е).

Количественную оценку изменений конъюнктивы и переднего эпителия роговицы глаза проводили с помощью программы Image J, при которой были получены значения интенсивности флуоресценции апоптотически поврежденных клеток, представленные в виде

гистограммы (рис. 4). Интенсивность флуоресцентного свечения (ИФС) клеточных скоплений была принята в качестве эталона для сравнительной количественной оценки интенсивности апоптотической активности во всех экспериментальных группах

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На протяжении многих лет широко обсуждается роль различных типов гипоксии в развитии патологии глаза. Гипоксия играет важную роль в патогенезе дистрофических, ишемических, воспалительных и инфекционных заболеваний глазного яблока [24, 25]. Ранее было показано, что гипоксия индуцирует апоптотическую гибель ганглиозных клеток сетчатки *in vivo*, а также в культуре ганглиозных клеток сетчатки и кератоцитов роговицы. [26, 27]. Большинство известных способов нацелено на моделирование ретиальной ишемии или гипоксии, что, как правило, сужает область возможных исследований в отношении последствий воздействия повреждающих факторов на глаз, затрудняя оценку жизнеспособности и процессов клеточной гибели в других тканях глаза, таких как конъюнктив и передний эпителий роговицы.

Известно, что в структурах конъюнктивальной оболочки глаза и в эпителии роговицы имеются обновляющиеся клеточные популяции, в которых процессы пролиферации и апоптоза являются строго уравновешенными. При нарушении баланса между этими процессами в результате действия различных повреждающих факторов могут возникать патологические изменения передней поверхности глаза [23]. Нами был разработан способ моделирования гипоксического поражения тканей глаза с активацией апоптоза, заключающийся в воздействии физического фактора на экспериментальное животное. В исследовании изучали все ткани глаза, анализируя целиком глазное яблоко. Получены гистологические образцы тканей глаза, в которых выявлены клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. Особо значительные зоны поражения найдены в структурах передней поверхности глазного яблока.

Ранее было доказано, что общее действие острой экспериментальной гипоксии на организм взрослых крыс *in vivo* в условиях помещения животных в барокамеру вызывает избирательное

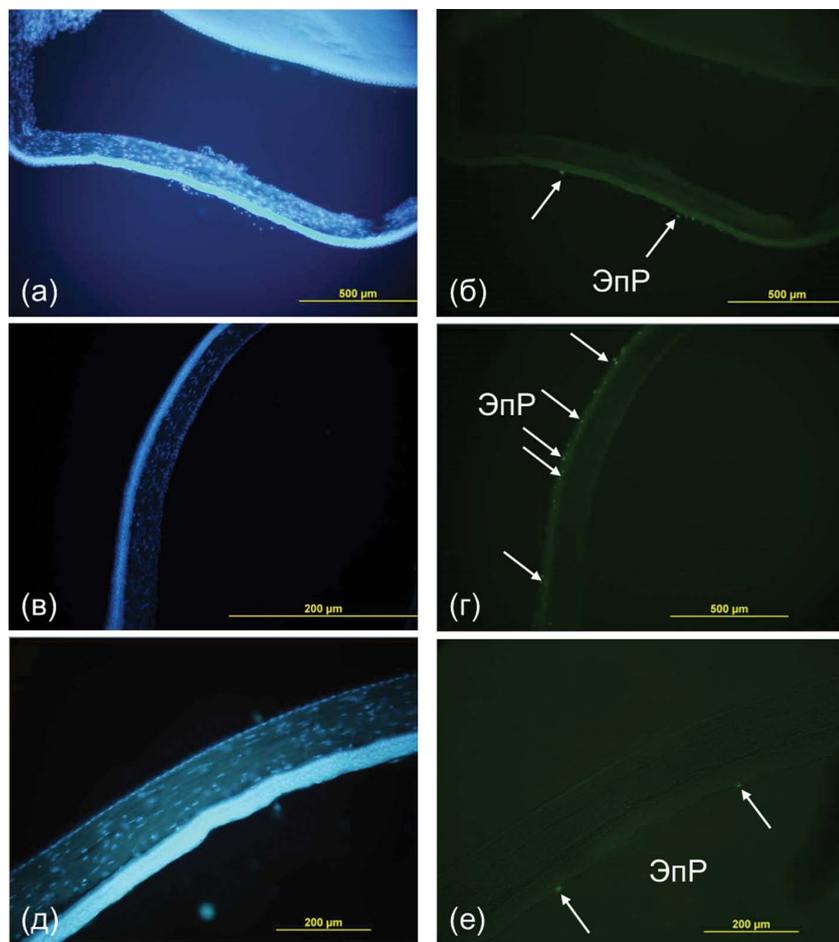


Рис. 3. Апоптотические клетки (указаны стрелками) в переднем эпителии роговицы глаза крыс в норме и после экспериментальной гипоксии при использовании 0,007 % ПАБК: а, б — интактный контроль — передний эпителий роговицы (ЭпР) (увеличение $\times 10$); в, г — гипоксический контроль через 3 ч — передний эпителий роговицы (ЭпР) (ув. $\times 10$); д, е — введение 0,007 % ПАБК за 24 часа до гипоксии (ув. $\times 20$) — передний эпителий роговицы (ЭпР). Зеленое свечение — TUNEL окрашивание апоптоз-позитивных клеток в эпителии роговицы (ЭпР). Голубое свечение — окрашивание красителем Hoechst33342

Fig. 3. Apoptotic cells in anterior cornea epithelium of rat eyes after experimental hypoxia in norma and after injection 0.007 % PABA: а, б — intact control of cornea (ЭпР) (zoom lens $\times 10$); в, г — hypoxic control after 3 hours from exposure ($\times 10$) — anterior cornea epithelium; д, е — prophylactic injection of 0.007 % PABA ($\times 20$) — anterior cornea epithelium; Green glow — TUNEL-positive cells in the conjunctiva and corneal epithelium. Blue glow — stained with Hoechst33342

первичное апоптотическое поражение клеток конъюнктивы и эпителиальных клеток роговицы при отсутствии изменений в других тканях глаза. Такая модель гипоксии может рассматриваться в качестве экзогенного фактора, ответственного за развитие синдрома сухого глаза [20]. Нами на модели острой гипоксической гипоксии, полученной с помощью газообразного азота в герметично закрывающейся камере¹, выявлено аналогичное избирательное поражение клеток конъюнктивы и переднего эпителия роговицы и, помимо этого, определено апоптотическое изменение фоторецепторного слоя сетчатки и хориоидеи. При таком способе моделирования гипоксического поражения тканей глаза с индукцией клеточной гибели имеются возможности изучения активации апоптотических процессов как в тканях поверхности глаза, так и в сетчатке. Способ моделирования является простым, доступным, с возможностью селективного действия моделируемых условий гипоксии как на ткани поверхности глаза (конъюнктив, передний эпителий роговицы), так и на сетчатку, а также позволяет изучать роль гипоксии в числе факторов, которые могут вызывать синдром сухого глаза.

Выбор раствора ПАБК как лекарственного препарата был основан на ранее проведенных экспериментальных и клинических исследованиях по изучению различных механизмов действия 0,007 % раствора парааминобензойной кислоты (Актипол®), в том числе противовоспалительного эффекта, предотвращающего и стабилизирующего гибель клеток в обновляющихся клеточных популяциях передней поверхности глазного яблока при гипоксии [22].

Таким образом, совокупность результатов по изучению действия 0,007 % ПАБК на клетки

¹ Патент RU 2614937, 12.04.16.

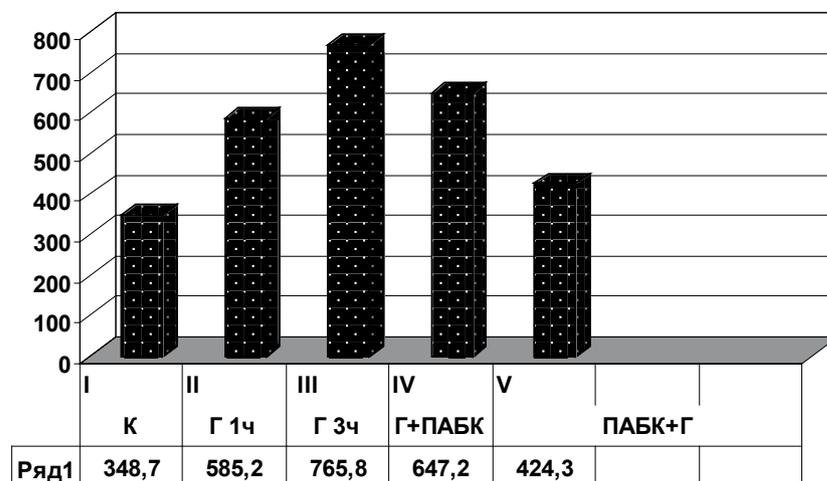


Рис. 4. Интенсивность флуоресцентного свечения (ИФС) TUNEL-позитивных клеток (ИФС) в конъюнктиве глаза крысы в норме и после экспериментальных воздействий. I — интактный контроль (ИФС 348,7), II — гипоксический контроль через 1 ч (ИФС, 585,2), III — гипоксический контроль через 3 ч (ИФС, 765,8), IV — введение ПАБК после гипоксии (ИФС, 637,2), V — введение ПАБК до гипоксии (ИФС, 424,3)

Fig. 4. The intensity of fluorescence (IFS) of TUNEL-positive cells (IFS) in the conjunctiva of the rat eye is normal even after experimental exposure. I — intact control (IFS 348.7), II — hypoxic control after 1 h (IFS, 585.2), III — hypoxic control after 3 hours (IFS, 765.8), IV — injection of para-aminobenzoic acid after hypoxia (IFS, 637.2), V — injection para-aminobenzoic acid before hypoxia (IFS, 424.3)

передней поверхности глазного яблока в условиях экспериментальной модели острой гипоксической гипоксии доказывает наличие защитного лечебного и профилактического эффекта препарата при гипоксия-индуцированном апоптозе клеток конъюнктивы и роговицы *in vivo*. Представленные результаты позволяют рекомендовать лекарственный препарат Актипол® при заболеваниях передней поверхности глазного яблока, в том числе при синдроме сухого глаза, в качестве профилактического и лечебного средства.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Рябцева А.А. — окончательное одобрение варианта статьи для опубликования; Акберова С.И. — концепция и дизайн исследования, написание текста; Али-заде Г.Х. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста; Бабаев Х. — организация и проведение эксперимента; Маркитантова Ю.В. — сбор и обработка материала, проведение TUNEL-анализа, написание текста, подготовка иллюстраций.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Latkany R. Dry eyes: etiology and management. *Curr Opin Ophthalmol.* 2008;19:287–289. DOI: 10.1097/ICU.0b013e3283023d4c
- Fox R.I. Stern M., Michelson P. Update in Sjogren syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:391–398. DOI: 10.1097/00002281-200009000-00007
- Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *British Journal of Ophthalmology* 1992;76(3):157–158. DOI: 10.1136/bjo.76.3.157
- Егоров Е.А. Особенности терапии синдрома «сухого глаза». *РМЖ «Клиническая офтальмология»*. 2018;3:146–149. [Egorov E.A. Features of dry eye syndrome treatment. *Russian Medical Journal. Clinical Ophthalmology = Rossijskiy medicinskiy zhurnal. Klinicheskaya oftalmologiya*. 2018;3:146–149 (In Russ.).]
- Tsubota K., Fukagawa K., Fujihara T. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:28–34
- De Paiva C.S., Pflugfelder S.S. Rational for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arg Bras Oftalmol.* 2008;71 (suppl.):89–95.
- Gayton J. L. Etiology, prevalence and treatment of dry disease. *Clinical ophthalmology.* 2009;3:405–412. DOI: 10.2147/oph.s5555
- Craig J.P., Nichols K.K., Akpek E.K., Caffery B., Dua H.S., Joo C.K. TFOS DEWS II definition and classification report *Ocul Surf.* 2017;15:276–283. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.008
- Schaumberg D.A., Sullivan D. A., Buring J.E., Dana R. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003;136(2):318–326. DOI: 10.1016/s0002-9394(03)00218-6
- Schaumberg D.A., Dana R., Buring J.E., Sullivan D. A. Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians Health Studies. *Arch Ophthalmol* 2009;127(6):363–368. DOI: 10.1001/archophthol.2009.103
- Caffery B., Srinivasan S., Reaume C.J., Fischer A., Cappadocia D., Siffel C., Chan C.C. Prevalence of dry eye disease in Ontario, Canada: A population-based survey. *Ocul Surf.* 2019 Feb 27. PII: S1542-0124(18)30147-2. DOI: 10.1016/j.jtos.2019.02.011
- Бржецкий В.В. Синдром «сухого глаза» у людей молодого возраста: нерешенная проблема современности. *Современная оптометрия*. 2007;2(2):38–43. [Brzheskiy V.V. Dry eye syndrome in young people: unsolved problem of the modern time. *Modern optometry = Sovremennaya optometriya* 2007;2(2):38–43 (In Russ.).]
- O'Brien P.D., Collum L.M. Dry Eye: diagnosis and current treatment strategies. *JAMA.* 2004;4(4):314–319. DOI: 10.1007/s11882-004-0077-2
- Ichino M., Yokoi N., Ichino Y., Dogru M., Kawashima M., Komuro A., Sonomura Y., Kato U., Kinoshita Sh., Schaumberg D.A., Tsubota K. Prevalence of dry eye

- disease and nits risk factors in visual display terminal users. *Am J Ophthalmol.* 2013;156(4):759–766. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.05.040
15. Строева О.Г., Панова И.Г. Регуляция митотической активности в роговице крыс при защитном и лечебном действии парааминобензойной кислоты в опытах с рентгеновским облучением. *Известия РАН. Серия Биологическая.* 1999;5:613–616. [Stroeva O.G., Panova I.G. Regulation of mitotic activity in the cornea of rats with the protective and therapeutic effects of para-aminobenzoic acid in experiments with X-ray irradiation, Proceedings of the RAS. ser. Biological = *Izvestija RAN. ser. Biologicheskaja.* 1999;5:613–616 (In Russ.).]
 16. Сологуб А.А., Панова И.Г., Строева О.Г. Влияние парааминобензойной кислоты на уровень пролиферативной активности в регенерирующей роговице взрослых крыс. *Онтогенез.* 1994;25(6):54–59. [Sologub A.A., Panova I.G., Stroeva O.G. The influence of para-aminobenzoic acid on the level of proliferative activity in the regenerating cornea of adult rats. *Ontogenesis = Ontogenez.* 1994;25(6):54–59 (In Russ.).]
 17. Акберова С.И., Мусаев-Галбинур П.И. Новый индуктор интерферона — актипол в лечении герпетических кератитов. *Вестник офтальмологии.* 2000;2:16–18. [Akberova S.I., Musaev-Galbinur P.I. A new interferon inducer — actipol in the treatment of herpetic keratitis. *Annals of Ophthalmology = Vestnik oftal'mologii* 2000;2:16–18 (In Russ.).]
 18. Акберова С.И., Тазулахова Э.Б., Мусаев Галбинур П.И., Мамедова В.М. Влияние парааминобензойной кислоты на продукцию интерлейкина-6 у больных герпетическими кератитами. *Вестник офтальмологии.* 2006;5:23–26. [Akberova S.I., Tazulakhova E.B., Musaev Galbinur P.I., Mamedova V.M. Effect of para-aminobenzoic acid on the production of interleukin-6 in patients with herpetic keratitis. *Annals of Ophthalmology = Vestnik oftal'mologii* 2006;5:23–26 (In Russ.).]
 19. Магомедов Н.М., Мусаев Галбинур П.И., Акберова С.И., Строева О.Г. Парааминобензойная кислота — биоантиоксидант. *Онтогенез.* 2000;31(4):264–265. [Magomedov N.M., Musaev Galbinur P.I., Akberova S.I., Stroeva O.G. Para-aminobenzoic acid — bio-antioxidant. *Ontogenesis = Ontogenez.* 2000;31(4):264–265 (In Russ.).]
 20. Акберова С. И., Маркитантова Ю. В., Рябцева А. А., Строева О. Г. Гипоксия как патогенный фактор, затрагивающий ткани глаза: избирательное апоптотическое поражение конъюнктивы и переднего эпителия роговицы. *Доклады АН (биохимия, биофизика и молекулярная биология).* 2016; 467(6):718–720. [Akberova S.I., Markitantova Yu.V., Ryabtseva A.A., Stroeva O.G. Hypoxia as a pathogenic factor affecting eye tissue: selective apoptotic damage to the conjunctiva and anterior corneal epithelium. Reports of the Academy of Sciences (biochemistry, biophysics and molecular biology) = *Doklady AN (biohimiya, biofizika i molekularnaja biologija).* 2016;467(6):718–720 (In Russ.).] DOI: 10.7868/S0869565216120240
 21. Leuba G., Kraftsik R., Saini K. Quantitative Distribution of Parvalbumin, Calretinin, and Calbindin D-28k Immunoreactive Neurons in the Visual Cortex of Normal and Alzheimer Cases. *Exp. Neurology.* 1998;152:278–291. DOI: 10.1006/exnr.1998.6838
 22. Маркитантова Ю.В., Акберова С.И., Рябцева А.А., Строева О.Г. Влияние парааминобензойной кислоты на процессы апоптоза в конъюнктиве и эпителии роговицы взрослых крыс *in vivo*, после действия гипобарической гипоксии. *Известия РАН. Серия биологическая.* 2018;3:257–266. [Markitantova Yu.V., Akberova S.I., Ryabtseva A.A., Stroeva O.G. The effect of para-aminobenzoic acid on apoptosis processes in the conjunctiva and cornea epithelium of adult rats *in vivo* after the action of hypobaric hypoxia. Proceedings of the RAS. ser. Biological = *Izvestija RAN. ser. Biologicheskaja.* 2018;3:257–266 (In Russ.).]
 23. Haskjold E., Refsum S.B., Bjerknes R. Cell renewal of the rat corneal epithelium. A method to compare corresponding corneal areas from individual animals. *Acta Ophthalmologica.* 1988;66:533–537. DOI: 10.1111/j.1755-3768.1988.tb04376.x
 24. Blasiak J., Petrovski G, Vereb Z., Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed. Res. Int.* 2014;768026. DOI: 10.1155/2014/768026
 25. Каламкаргов Г.Р., Цепенко И.В., Зуева М.В., Иванов А.Н. Экспериментальная модель острой ишемии сетчатки глаза у крыс. *Биолетень экспериментальной биологии и медицины.* 2008;6:634–638. [Kalamkarov G.R., Tsapenko I.V., Zueva M.V., Ivanov A.N. An experimental model of acute retinal ischemia in rats. *Experimental Biology and Medicine = Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny.* 2008;6:634–638 (In Russ.).]
 26. Kaur C. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage, *Clinic. Ophthalmol.* 2008;2(4):879–889. DOI: 10.2147/oph.s3361
 27. Peng Y. Neuroprotective effect of protease-activated receptor-2 in the hypoxia-induced apoptosis of rat RGC-5 cells, *J. Mol. Neurosci.* 2013;50(1):98–108. DOI: 10.1007/s12031-012-9876-4
 28. Buchi E.R. Pressure induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica.* 1991;203(3):138–147. DOI: 10.1159/000310240

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского»
Рябцева Алла Алексеевна
заслуженный врач России, доктор медицинских наук, профессор
ул. Щепкина, 61/2, Москва, 129110, Российская Федерация

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского»
Али-заде Гюнель Хагановна
младший научный сотрудник офтальмологического отделения отдела «Голова и шея»
ул. Щепкина, 61/2, Москва, 129110, Российская Федерация

Медицинский центр «Медквадрат»
Акберова Севиндж Исмаил кызы
доктор медицинских наук, офтальмолог
Каширское шоссе, 74, корп. 1, Москва, 115409, Российская Федерация

Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджана
Бабаев Ханага Физули оглы
главный научный сотрудник, заведующий лабораторией
ул. Шариф-заде, 2, Баку, AZ1100, Азербайджан

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
Маркитантова Юлия Владимировна
кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией проблем регенерации
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Institute
Ryabtseva Alla A.
Honored Doctor of Russia, MD, Professor
Shchepkina str., 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Institute
Ali-zade Giunel Khaganovna
Research Assistant at the Ophthalmology Department of the Head and Neck Department
Shchepkina str., 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

Medical center “Medkvadrat”
Akberova Sevinj I. kyzy
MD, Ophthalmologist
Kashirskoye highway, 74/1, Moscow, 115409, Russian Federation

A.I. Karaev Institute of Physiology National Academy of Sciences of Azerbaijan
Babaev Hanaga Fizuli oglu
the chief researcher, head of the laboratory
Sharif-zadeh str., 2, Baku, AZ1100, Azerbaijan

N.K. Koltsov Institute of Development Biology RAS Russian Federation
Markitantova Julia V.
Cand. Biol. Sciences, Chief Researcher, Head of the Regeneration Problems Laboratory
Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russian Federation