

УДК 617.713

©Коллектив авторов

## МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПЕРИОПЕРАЦИОННЫХ ЭРОЗИЙ РОГОВИЦЫ: ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНОГО СОСТАВА СЛЁЗНОЙ ПЛЁНКИ

*Е.Ю. Зерний<sup>1\*</sup>, О.С. Ганчарова<sup>1</sup>, И.Е. Ишутина<sup>2</sup>, В.Е. Бакшеева<sup>1</sup>, М.О. Головастова<sup>1</sup>, Е.И. Кабанова<sup>2</sup>,  
М.С. Савченко<sup>1</sup>, М.В. Серебрякова<sup>1</sup>, Л.Ф. Сотикова<sup>2</sup>, А.А. Замятнин мл.<sup>1,3</sup>, П.П. Филиппов<sup>1</sup>, И.И. Сенин<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40; эл. почта: zerni@belozersky.msu.ru, senin@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

<sup>3</sup>Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8

Периоперационные эрозии роговицы (ПЭР) – распространённое офтальмологическое осложнение, выявляемое у пациентов, перенесших общую анестезию. В настоящей работе с использованием экспериментальной модели ПЭР животных (кроликов) установлена корреляция между развитием эрозий роговицы и изменениями протеомного состава слёзной плёнки. Показано, что процесс накопления патологических изменений в роговице начинается через 1 ч и приобретает клинически выраженную форму в течение последующих 3-6 ч пребывания животного в условиях общей анестезии. Развитие эрозий роговицы сопровождается разнонаправленными изменениями содержания основных белков слёзной плёнки. Результаты протеомного анализа слезы указывают на подавление функции слёзных желез в условиях общей анестезии, а также говорят о возможности использования белков серотрансферина, сывороточного альбумина и аннексина А1 в качестве маркеров исследуемого офтальмологического осложнения. Биохимические изменения в слёзной плёнке включают быстрое падение общей антиоксидантной активности и активности супероксиддисмутазы, а также снижение концентрации интерлейкина-4 и увеличение содержания интерлейкина-6, что говорит о развитии локальных окислительного и провоспалительного ответов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения антиоксидантной и противовоспалительной терапии для профилактики/лечения ПЭР. Выявленные эффекты общей анестезии должны учитываться при проведении любых исследований поверхностных структур глаза с использованием наркотизированных животных.

**Ключевые слова:** общая анестезия, эрозии роговицы, синдром сухого глаза, протеом слёзной плёнки, антиоксидантная активность, воспалительный ответ

DOI 10.18097/PBMC20166206683

### ВВЕДЕНИЕ

Применение общей анестезии является необходимым условием проведения различных инвазивных процедур, однако большинство анестезиологических подходов характеризуются высоким риском развития осложнений в интраоперационном и послеоперационном периодах [1]. Периоперационные эрозии роговицы (ПЭР) или периоперационный синдром сухого глаза (ССГ) является наиболее распространенным офтальмологическим осложнением у пациентов, подвергшихся общей анестезии. Частота встречаемости этого осложнения, по некоторым оценкам, может достигать 44% [2]. Основными симптомами ПЭР являются светобоязнь, ощущение инородного тела в глазу, а также нарушение зрительной функции [3]. Поскольку роговица является наиболее плотно иннервируемой тканью организма [4], её повреждение может привести к возникновению выраженного послеоперационного болевого синдрома.

Считается, что этиология различных разновидностей ССГ включает в себя изменения состава слёзной плёнки, которые могут приводить к нарушению её динамических свойств и тем самым подавлять эффективность её защитной функции

в отношении роговицы [5]. Прероговичная часть слёзной плёнки содержит три структурно и функционально различных слоя: внешний липидный слой, промежуточный водный слой и внутренний муциновый слой [5]. Тонкий внешний слой состоит из липидов, производимых мейбомиевыми железами, и регулирует испарение водного слоя. Внутренний муциновый слой содержит мукопротеины – биполярные молекулы, секретируемые бокаловидными клетками конъюнктивы, которые образуют гель, соединяющий водный слой прероговичной слёзной плёнки с эпителиальным гликокаликсом. Помимо структурной функции муциновый слой участвует в защите роговицы, захватывая и удерживая бактерии и инородные тела в муцине, содержащем иммуноглобулины и лизоцим. Водный слой, компоненты которого секретируются, в основном, слёзными железами, расположен в середине прероговичной части слёзной плёнки и составляет большую часть её объёма. Белки водного слоя играют ключевую роль в защите поверхности глаза от внешних воздействий. Так, лактопероксидаза, лизоцим, эластаза и лактоферрин обладают антимикробным действием. Иммуноглобулины слезы защищают роговицу от биологических и химических агентов, как за счёт собственной активности,

\* - адресат для переписки

так и в результате взаимодействия с клетками системы воспаления. Другие белки водного слоя, такие как матриксные металлопротеиназы, сериновые протеиназы, факторы роста и цитокины также участвуют в поддержании нормального состояния роговицы за счёт повышения её защитных механизмов.

В последнее время высказываются предположения, что при периоперационном ССГ (ПЭР) изменения состава (в том числе, белкового) и свойств слёзной плёнки в результате перенесенной общей анестезии являются одной из причин развития патологического процесса в роговице [6]. В этом случае для разработки эффективных методов профилактики и терапии ПЭР необходимо осуществлять мониторинг клинических проявлений этого осложнения с одновременной характеристикой изменений биохимических свойств слёзной плёнки.

В настоящей работе с использованием экспериментальной модели ПЭР животных (кроликов *Oryctolagus cuniculus*) показана взаимосвязь между продолжительностью общей анестезии и развитием патологических изменений в роговице, и выявлены ассоциированные изменения протеомного состава слёзной плёнки, впервые указывающие на снижение её антиоксидантных и противовоспалительных свойств.

## МЕТОДИКА

В исследовании было задействовано 50 здоровых пигментированных кроликов весом от 2,3 до 3 кг («КролИнфо», Россия). Животные содержались в условиях 12-часового цикла темнота/свет, при температуре 22-25°C и влажности 55-60%. Все процедуры с участием животных проводились в соответствии с рекомендациями [7, 8]. Протокол исследования получил одобрение комиссии по биоэтике института Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ (Протокол №1/2016). Для проведения исследований животные были разделены на 9 экспериментальных групп: группы 1-7, по 6 особей (мониторинг клинического состояния роговицы), группа 8, 4 особи (протеомный анализ слёзной жидкости) и группа 9, 4 особи (анализ общей антиоксидантной активности, активности супероксиддисмутазы и содержания маркеров воспаления).

Введение животных в условия общей анестезии осуществляли путём внутримышечных инъекций препарата, содержащего 50 мг/мл тилетамина и 50 мг/мл золазепам, из расчёта 16-24 мг препарата на 1 кг массы животного. По мере необходимости инъекции повторяли, с целью поддержания животных в состоянии наркотического сна в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч. Мониторинг развития повреждений эпителия роговицы осуществляли методом окрашивания флуоресцеином [9]. Для этого 2 мкл 1% раствора флуоресцеина натрия закапывали под нижнее веко животного и распределяли по роговице с помощью 2-3 движений, имитирующих моргание. Клинические признаки повреждения роговицы определяли при помощи щелевой лампы с синим кобальтовым фильтром. Степень

повреждения поверхности роговицы (клинический показатель) оценивали по флуоресцеиновой шкале от 0 до 4 баллов, в зависимости от размера окрашенной поверхности: нет окрашивания (0 баллов), окрашивание 0-12,5% поверхности (1 балл), окрашивание 12,5-25% поверхности (2 балла), окрашивание 25-50% поверхности (3 балла), окрашивание более 50% поверхности (4 балла) [9]. Средний клинический показатель для каждого времени анестезии рассчитывали, как отношение суммы показателей для всех глаз к их количеству  $\pm$  стандартное отклонение. Частоту встречаемости эрозий роговицы определяли, как процент глаз с повреждениями роговицы любой степени.

Слёзную жидкость экспериментальных животных собирали с помощью тестовых полосок Ширмера каждые 30 мин в течение общей анестезии, а также через 1 ч после выхода из наркоза. Образцы слёзной жидкости получали путём экстрагирования фрагментов тестовых полосок длиной 15 мм при помощи 150 мкл 20 мМ Трис-НСl-буфера (pH 8,0), содержащего 1% додецилсульфата натрия (ДСН). Концентрацию общего белка в полученных образцах измеряли спектрофотометрически методом с бицихониновой кислотой с использованием набора BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Электрофорез белков в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии ДСН проводили по методу Леммли с использованием стандартов молекулярных масс PageRuler™ Prestained Protein Ladder («Thermo Fisher Scientific»). Масс-спектрометрический анализ белков слёзы производили по ранее описанной методике [10], с использованием масс-спектрометра UltrafleXtreme™ MALDI-TOF/TOF («Bruker Daltonics», США), оборудованного лазером Smartbeam-II (Nd:YAG, 355 нм). Для анализа масс-спектров использовали программу FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics»). Идентификацию белков проводили методом поиска MS и MS/MS ионов в базах данных NCBI с использованием программного обеспечения Mascot («Matrix Science», США). Допускались варианты находок с окисленными остатками метионина, цистеинпропионамидной модификацией и одним пропущенным сайтом протеолиза. Значимыми считали находки со статистическим весом более 60. Содержание аннексина A1 в образцах слёзы оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», США). Комплекс антиген-антитело визуализировали в системе ChemiDoc™ MP System («Bio-Rad», США) методом усиленной хемилюминесценции. Содержание аннексина A1 в слёзной жидкости определяли по результатам иммуноблоттинга с помощью денситометрического анализа окрашенных полос, используя программу GelAnalyzer v.2010a (<http://gelanalyzer.com/>).

Общую антиоксидантную активность в образцах слёзной жидкости, полученных путём экстрагирования фрагментов тестовых полосок Ширмера при помощи 150 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), определяли в системе гемоглобин-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол

с использованием в качестве стандартов растворов, содержащих 1, 2, 4, 5 или 8 мкМ Тролокса в PBS. Хемилюминесценцию образцов измеряли при помощи люменометра Glomax-Multi Detection System ("Promega", США). Полученные данные анализировали в программе SigmaPlot11 ("SYSTAT Software", США). Общую антиоксидантную активность слезы выражали в эквиваленте Тролокса.

Активность супероксиддисмутазы в образцах слезной жидкости экспериментальных животных измеряли с помощью набора SOD Assay Kit-WST ("Sigma-Aldrich", США).

Содержание интерлейкинов-4 и -6 и интерферона- $\gamma$  определяли в образцах слезы, полученных для измерения антиоксидантной активности, с использованием наборов для иммуноферментного анализа Rabbit ELISA ("Cusabio Biotech", США). Интенсивность колориметрической реакции измеряли с помощью планшетного ридера MR-96A Microplate Reader ("Mindray", Китай).

Средние показатели, стандартное отклонение и статистическую значимость рассчитывали в программах SigmaPlot11 ("SYSTAT Software") и BioStat 2009 версии 5.8.3.0 ("AnalystSoft", Канада). Статистическую значимость показателей оценивали в соответствии с критерием Стьюдента для двух независимых выборок, при этом значимой считали вероятность ошибки (p-значение), не превышающую 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для индукции эрозии роговицы животных экспериментальных групп 1-6 вводили в состояние общей анестезии, продолжительностью от одного до шести часов, соответственно. Указанная продолжительность наркоза соответствовала условиям, при которых фиксировалось развитие ПЭР у хирургических больных [2]. Анализ данных, полученных для всех экспериментальных групп, показал увеличение частоты встречаемости ПЭР, которая достигала 100% при продолжительности анестезии 5-6 ч. Мониторинг клинического состояния роговицы у животных группы 7 подтвердил накопление повреждений роговицы, тяжесть которых варьировала от точечных эрозий (1 балл по флуоресцеиновой шкале)

после 1-2 ч наркоза до обширных сливных поражений (2-4 балла по флуоресцеиновой шкале), затрагивающих значительную часть поверхности ткани, по окончании 6-часовой анестезии (табл. 1).

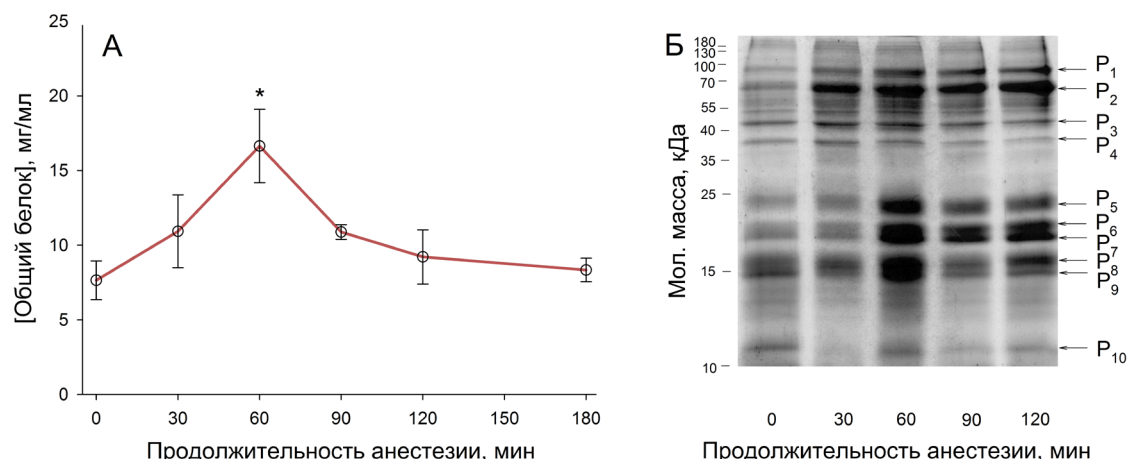
Поскольку развитие патологического процесса в роговице происходило уже в течение первых двух часов пребывания животного в условиях анестезии, последующий отбор проб для характеристики изменений протеомного состава и биохимических свойств слезной жидкости проводился каждые 30 мин в процессе 2-часовой анестезии, а также, с учётом средней продолжительности восстановления животного после наркоза (от 1 до 1,5 ч) – по истечении ещё одного (3-го) часа после первой инъекции анестетика. Анализ образцов четырех животных, наркотизированных по указанной схеме (группа 8), показал, что общая концентрация белка слезы увеличивалась с  $7,74 \pm 1,29$  мг/мл до  $16,65 \pm 2,45$  мг/мл в течение первых 60 мин анестезии ( $p < 0,05$ ), затем снижалась до  $9,23 \pm 1,76$  мг/мл в течение последующего часа ( $p < 0,05$ ) и далее оставалась практически постоянной в течение периода восстановления (рис. 1А). Примечательно, что изменение концентрации основных белков слезы ( $P_1$ - $P_{10}$  на рис. 1Б) в процессе анестезии имело разнонаправленный характер. Так, концентрация  $P_1$  (~75 кДа) и  $P_2$  (~68 кДа) увеличивалась, концентрация  $P_4$  (~30 кДа) уменьшалась, в то время как содержание  $P_5$ - $P_9$  изменялось аналогично общему белку слезы. Кроме того, интенсивность полосы, соответствующей 40 кДа ( $P_3$ ), оставалась практически неизменной в течение всего эксперимента. С использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии  $P_1$ - $P_4$  были достоверно (статистический вес  $>150$ ) идентифицированы как серотрансферрин (76,6 кДа), сывороточный альбумин (68,8 кДа), актин 1 (41,7 кД) и аннексин A1 (38,7 кДа), соответственно (табл. 2). С помощью дополнительного MS/MS анализа  $P_8$  был идентифицирован как гомолог пролактин-индуцируемого белка, в то время как идентифицировать  $P_6$  не удалось ни одним из методов. Наконец, MS/MS анализ  $P_5$  и  $P_7$ ,  $P_9$  и  $P_{10}$  выявил пептиды, соответствующие белкам семейства липокалинов (табл. 2).

Для характеристики изменений общей антиоксидантной активности (АОА) слезы 4 животных (группа 9) были подвергнуты двухчасовой анестезии,

Таблица 1. Степень тяжести повреждений роговицы животных в условиях общей анестезии

Анестезия, мин	Клинический показатель, баллы												Средний клинический показатель, баллы
	Животное 1		Животное 2		Животное 3		Животное 4		Животное 5		Животное 6		
	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,083±0,087
120	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0,583±0,202*
180	1	1	2	1	2	2	1	1	1	0	1	0	1,083±0,202*
240	2	3	2	2	3	2	2	1	2	0	1	1	1,750±0,261*
300	2	3	2	3	3	2	2	2	2	1	1	2	2,083±0,202*
360	2	4	3	3	3	4	2	2	3	2	2	4	2,833±0,252*

Примечание: \* -  $p < 0,05$ . OD - правый глаз (oculus dexter), OS - левый глаз (oculus sinister).



**Рисунок 1.** А) Динамика изменения концентрации общего белка в образцах слёзной жидкости экспериментальных животных в процессе 2-часовой анестезии и по истечении периода восстановления. \* -  $p < 0,05$ . Б) Репрезентативная электрофореграмма белков слёзной плёнки в процессе 2-часовой анестезии. Слева обозначены положения стандартов молекулярных масс (кДа). Полосы, соответствующие основным белкам слёзной плёнки, обозначены как P<sub>1</sub>-P<sub>10</sub>.

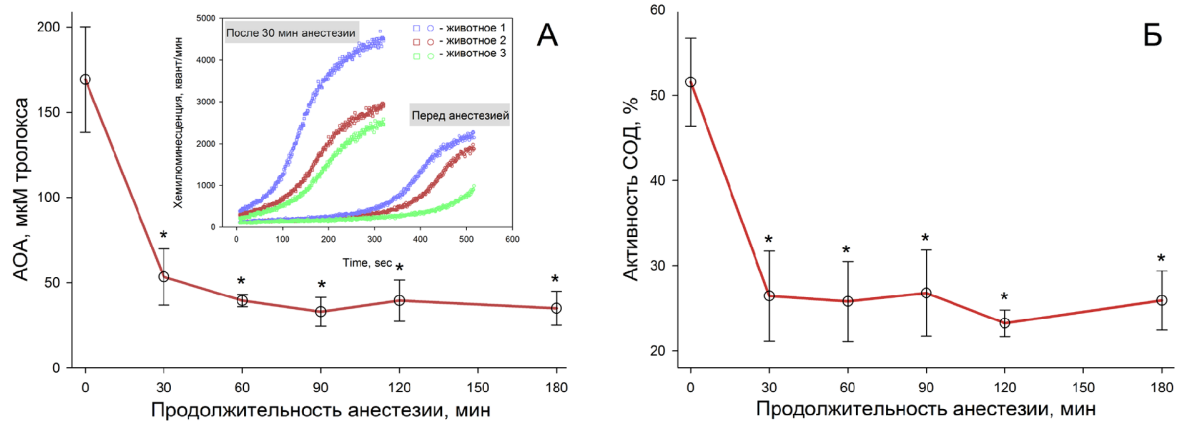
**Таблица 2.** Идентификация основных белков слёзной плёнки по данным масс-спектрометрического анализа

Полоса	Белок	Идентификационный номер	Молекулярная масса	Метод идентификации	Статистический вес	Количество пептидов	Доля покрытия последовательности
P <sub>1</sub>	Серотрансферрин	GI: 6175087	76621	MS	255	35	43%
P <sub>2</sub>	Сывороточный альбумин	GI: 44889024	68865	MS	192	23	32%
P <sub>3</sub>	Актин 1	GI:231506	41710	MS	75	10	28%
P <sub>4</sub>	Аннексин А1	GI:1703316	38711	MS	153	15	38%
P <sub>5</sub>	Липокалин 2	GI: 291413525	22927	MS/MS	171	2	15%
P <sub>7</sub>	Одорант-связывающий белок 2	GI: 476007214	1830	MS/MS	84	1	61%
P <sub>8</sub>	Гомолог пролактин-индуцируемого белка	GI:283837804	16860	MS/MS	75	1	8%
P <sub>9</sub>	Гомолог одорант-связывающего белка	GI:655901724	18484	MS/MS	256	2	25%
P <sub>10</sub>	Липофилин AL	GI:126722900	9755	MS/MS	60	1	12%

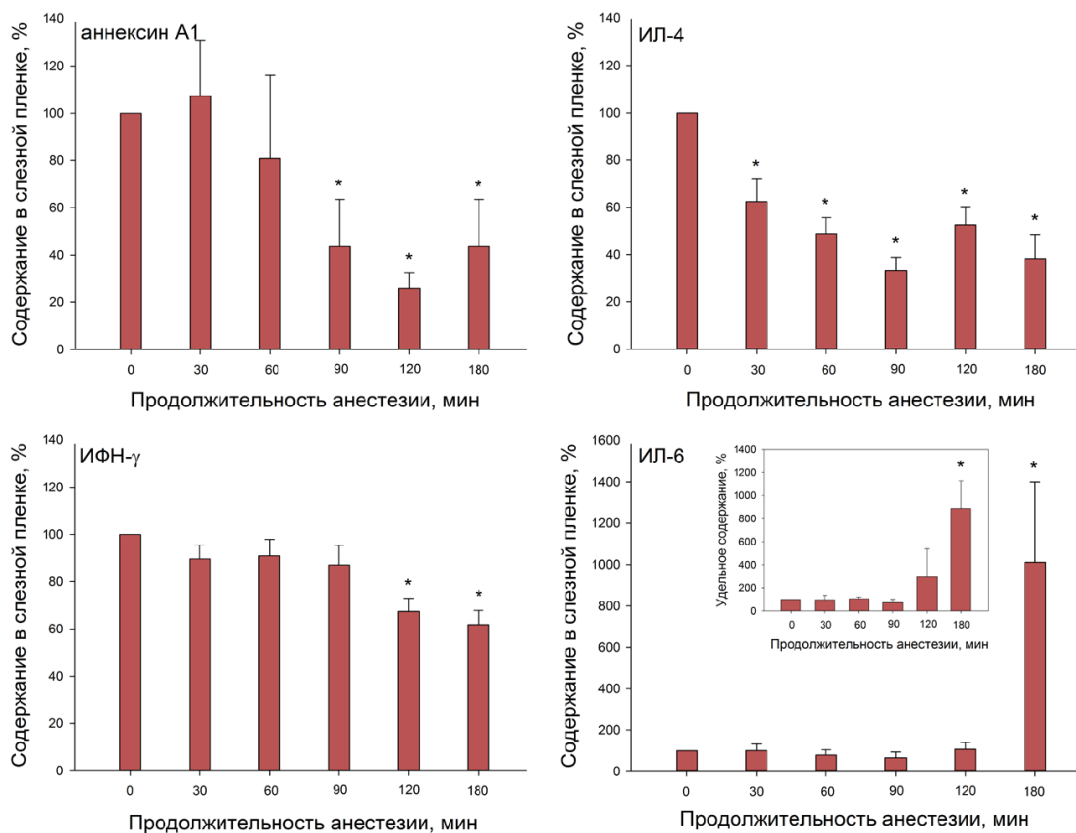
в процессе которой были собраны образцы слёзной жидкости по вышеописанной схеме (1 раз в 30 мин). Анализ полученных препаратов показал, что уже через 30 мин анестезии происходило значительное падение общей АОА слезы, на что указывало характерное увеличение темпа роста хемилюминесценции люминола (рис. 2А, вставка). В течение часа этот параметр снижался почти в 3 раза ( $p < 0,05$ ) и его низкий уровень оставался практически неизменным в течение следующих двух часов (рис. 2А). Поскольку выявленное падение АОА могло быть связано с пониженной концентрацией ферментов антиоксидантной защиты слезы, далее были проведены измерения активности супероксиддисмутазы (СОД) – основного фермента, отвечающего за нейтрализацию активных форм кислорода. Как и ожидалось, в течение первых 30 мин после инъекции анестетика происходило двукратное падение активности СОД ( $p < 0,05$ ) (рис. 2Б), что согласуется с изменением общей АОА слезы (снижение в 2,5 раза; рис. 2А).

Считается, что развитие окислительного стресса инициирует локальные воспалительные процессы,

что может привести к обострению повреждений роговицы [6]. Исходя из этого, на следующем этапе работы было охарактеризовано содержание в слезе животных трех белковых маркеров воспаления, а именно аннексина А1 (обнаружен в рамках настоящей работы, табл. 1), а также цитокинов интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерферона-гамма (ИФН-γ). По данным иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа образцов слёзной жидкости животных группы 9, концентрация аннексина А1, ИЛ-4 и ИФН-γ снижалась с увеличением продолжительности анестезии (рис. 3). Указанные эффекты сопровождалось отсроченным повышением секреции ИЛ-6, содержание которого незначительно увеличивалось к завершению второго часа анестезии (рис. 3, “ИЛ-6”, вставка) и демонстрировало десятикратный рост по истечении последующего восстановительного периода (рис. 3). Таким образом, пребывание животных в условиях общей анестезии инициирует быстрый окислительный, и отложенный провоспалительный ответы, детектируемые в образцах слёзной жидкости.



**Рисунок 2.** Динамика изменения общей антиоксидантной активности (А) и активности супероксиддисмутазы (Б) в образцах слезной жидкости экспериментальных животных в процессе 2-часовой анестезии и по истечении периода восстановления. Вкладка (А) демонстрирует характерное увеличение темпа роста хемилюминесценции люминола в присутствии образцов слезной жидкости, полученных через 30 мин после введения анестетика. \* -  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.** Динамика изменения относительного содержания аннексина А1, интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерферона-гамма (ИФН-γ) в образцах слезной жидкости экспериментальных животных, полученных в процессе 2-часовой анестезии и по истечении периода восстановления. Зависимость удельного содержания ИЛ-6 (на 1 мг общего белка слезы) от продолжительности анестезии представлена во вкладке. Во всех случаях за 100% принята концентрация маркера, измеренная до анестезии. \* -  $p < 0,05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эрозионные повреждения роговицы регулярно детектируются у пациентов, перенесших хирургические вмешательства в условиях длительной общей анестезии: частота встречаемости подобных осложнений по некоторым данным достигает 44% [2]. Для того, чтобы выяснить механизм развития ПЭР и определить стратегию профилактики этого осложнения, необходимо охарактеризовать как глубину

повреждения самой роговицы в условиях анестезии различной продолжительности, так и ассоциированные изменения свойств слезной пленки, обеспечивающей питание и выполняющей защитную функцию в отношении этой ткани. Проведение подобных экспериментов с участием пациентов затруднено из-за невозможности их офтальмологического обследования и взятия образцов слезной жидкости во время и сразу после хирургического вмешательства. С учётом этих ограничений возникла необходимость

в создании адекватной экспериментальной модели ПЭР. В настоящей работе в качестве экспериментальных животных были использованы кролики *Oryctolagus cuniculus*, поскольку размеры и анатомия глазного яблока, а также биомеханические и биохимические характеристики зрительной системы представителей этого вида имеют много общих черт с человеческими [11]. Применение экспериментальной модели ПЭР кроликов позволило на клиническом уровне наблюдать развитие эрозий эпителия роговицы в зависимости от времени, проведенного в условиях анестезии. Так, точечные повреждения роговицы детектировались у некоторых особей уже через 1 ч после инъекции анестетика, в то время как через 5-6 ч анестезии ПЭР развивались у всех животных. Эти наблюдения, в целом, соответствуют результатам, полученным ранее для хирургических пациентов [12], что указывает на адекватность выбранной животной модели заболевания.

По нашим данным, пребывание животных в условиях 2-часового наркоза приводило к изменениям общего содержания белка и протеомного состава слёзной плёнки. Примечательно, что концентрация общего белка изменялась в два этапа: в течение первого часа наблюдался рост этого параметра, который сменялся падением, длившимся следующие 60 мин. Первичное увеличение содержания белка может быть связано с повышенной секрецией базальной слезы вспомогательными железами на фоне сниженной активности основных слёзных желез (отвечающих за продукцию рефлекторной слезы) в условиях анестезии. С этим предположением согласуется тот факт, что отношение концентрации белка в базальной и рефлекторной слезе составляет 1,7 [13]. Вторая фаза может отражать ответ мейбомиевых желез, активность которых меняется при различных формах ССГ, что приводит к компенсаторному увеличению продукции липидов и активации систем деградации белка [14]. Таким образом, можно говорить о комплексном воздействии наркоза на активность слёзных желез, что подтверждается и результатами протеомных исследований. Идентифицированный нами набор белковых компонентов слезы (табл. 2) в целом совпал с литературными данными [15] (исследование не включало анализ минорных белков слезы, поскольку их вклад в общую концентрацию белка является незначительным). При этом динамика изменения концентрации выявленных белков в условиях анестезии существенно различалась. Так, например, содержание сывороточного альбумина и серотрансферрина возрастало, что согласуется с растущим вкладом компонентов базальной слезы в общий белок. Действительно, концентрация этих белков в базальной слезе превышает концентрацию в рефлекторной слезе в 3,5 и 2 раза, соответственно [13]. Напротив, содержание другого белка – аннексина А1, известного маркера ССГ в слезе [15] – снижалось в течение 2-х ч анестезии. Для ряда белков, включая гомолог пролактин-индуцируемого белка (Р<sub>8</sub>) и липокалина (Р<sub>5</sub>, Р<sub>7</sub>, Р<sub>9</sub>, Р<sub>10</sub>), концентрация достигала характерного пика после первых 60 мин. Таким

образом, именно эти белки осуществляют основной вклад в двухфазную картину изменений общего уровня белка слезы. Хотя выяснение роли слёзных желез и продуцируемых ими белков в механизме развития ПЭР требует дальнейших исследований, три белка, а именно серотрансферрин, сывороточный альбумин и аннексин А1 можно считать маркерами этого осложнения, мониторинг содержания которых в слёзной жидкости не представляет особой сложности [16, 17].

Ранее было показано, что патогенез ССГ в общем случае включает механизмы окислительного стресса, связанного с подавлением антиоксидантной защиты слезы [18]. Поскольку денервация слёзных желез обладает эффектом, сходным с воздействием анестетика на их активность, и способна вызывать ССГ [19, 20], можно предположить, что падение уровня антиоксидантной активности слезы играет важную роль и в механизме развития повреждений роговицы, вызванных общей анестезией. Действительно, в нашей модели воздействие анестезии на животных приводило к снижению как общей антиоксидантной активности слезы, так и активности СОД – основного фермента, отвечающего за нейтрализацию супероксид-радикалов [21]. Примечательно, что эти эффекты проявлялись сравнительно рано (в течение первых 30 мин анестезии), что делает окислительный стресс клеток поверхностных структур глаза одной из первых реакций на воздействие анестетика.

В ходе предыдущих исследований была установлена взаимосвязь между окислительным стрессом и воспалительным ответом, который является одной из главных причин развития некоторых разновидностей ССГ [6]. Накопление активных форм кислорода запускает стрессовые сигналы и секрецию провоспалительных цитокинов. Например, было показано, что принудительная десикация (высушивание) поверхности глаза приводит к повышению уровней провоспалительных цитокинов и развитию аутоиммунного ответа [22]. Для того, чтобы оценить влияние общей анестезии на развитие воспалительных реакций поверхности глаза, в настоящей работе было измерено содержание в слезе двух провоспалительных цитокинов, ИФН-γ и ИЛ-6. Известно, что ИФН-γ участвует в патогенезе ССГ, инициируя снижение количества муцинов и индуцируя апоптоз клеток эпителия роговицы, что приводит к утрате барьерной функции последнего [23]. Кроме того, возрастание концентрации ИФН-γ ассоциировано с повреждением слёзных желез и нарушением их секреторных свойств, которые наблюдались в мышинной модели синдрома Сьоргена [24]. В свою очередь, ИЛ-6 считается одной из ключевых молекул, принимающих участие в патогенезе ССГ. При этом заболевании уровень ИЛ-6 возрастает как в слезе, так и в конъюнктивальном эпителии [25]. Интересно, что в настоящем исследовании для этих цитокинов наблюдались противоположные паттерны роста, а именно: при анестезии содержание ИФН-γ в слезе несколько снижалось, а концентрация ИЛ-6 значительно

возрастала на позднем этапе наркоза и в течение периода восстановления. Несмотря на кажущееся несоответствие, эти эффекты согласуются с результатами недавнего детального исследования цитокинов слезы у пациентов с ССГ [25]. В нашем случае противоположную динамику изменений концентрации ИФН- $\gamma$  и ИЛ-6 можно объяснить различным действием анестезии на иммунные клетки, производящие указанные провоспалительные цитокины. Так, ИЛ-6 секретируется антигенпрезентирующими клетками, в то время как источником ИФН- $\gamma$  являются естественные клетки киллеры [26], активность которых подавляется анестетиками [27]. В любом случае, негативный эффект анестезии на ткани глаза включает в себя провоспалительный ответ, который наблюдается на поздней фазе наркоза или после него. Закономерно, что воздействие анестезии на животных снижает содержание в слезной плёнке аннексина A1 и ИЛ-4 (рис. 3), которые обладают противовоспалительной активностью [25, 28]. Действительно, падение уровня ИЛ-4 ранее наблюдалось у пациентов с ССГ различной степени тяжести [25]. С учётом всего вышеперечисленного, можно предположить биохимический механизм развития ПЭР, в рамках которого снижение экспрессии антиоксидантных ферментов в условиях анестезии приводит к развитию окислительного стресса клеток поверхностных структур глаза и последующей провоспалительной реакции, которая может далее усугублять течение заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые продемонстрировано, что пребывание экспериментальных животных в условиях общей анестезии приводит к изменениям протеомного состава слезной плёнки, которые указывают на развитие локального окислительного и провоспалительного ответов. Этот феномен предшествует развитию ПЭР и, таким образом, может вносить вклад в развитие патологического процесса в роговице. С учётом полученных данных, совместное применение противовоспалительных и антиоксидантных профилактических мер может рассматриваться в качестве перспективного подхода к предотвращению ПЭР. Выявленные побочные эффекты общей анестезии должны учитываться при проведении любых исследований поверхностных структур глаза с использованием наркотизированных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00255).

## ЛИТЕРАТУРА

- Harris M., Chung F. (2013) Clin. Plast. Surg., **40**, 503-513.
- Batra Y.K., Bali I.M. (1977) Anesth. Analg., **56**, 363-365.
- Wilson S.A., Last A. (2004) Am. Fam. Physician., **70**, 123-128.
- Muller L.J., Marfurt C.F., Kruse F., Tervo T.M. (2003) Exp. Eye. Res., **76**, 521-542.
- Braun R.J., King-Smith P.E., Begley C.G., Li L., Gewecke N.R. (2015) Prog. Retin. Eye Res., **45**, 132-164.
- Wakamatsu T.H., Dogru M., Tsubota K. (2008) Arq. Bras. Oftalmol., **71**, 72-79.
- National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), and National Academies Press (U.S.). (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press., Washington, D.C.
- (2016) Association for Research in Vision and Ophthalmology. Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research. [http://www.arvo.org/about\\_arvo/policies/statement\\_for\\_the\\_use\\_of\\_animals\\_in\\_ophthalmic\\_and\\_visual\\_research/](http://www.arvo.org/about_arvo/policies/statement_for_the_use_of_animals_in_ophthalmic_and_visual_research/)
- Wipperman J.L., Dorsch J.N. (2013) Am. Fam. Physician., **87**, 114-120.
- Zernii E.Y., Nazipova A.A., Gancharova O.S., Kazakov A.S., Serebryakova M.V., Zinchenko D.V., Tikhomirova N.K., Senin I.I., Philippov P.P., Permyakov E.A., Permyakov S.E. (2015) Free Rad. Biol. Med., **83**, 283-295.
- Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Iomdina E.N., Averina O.A., Permyakov S.E., Philippov P.P., Zamyatin A.A., Senin I.I. (2016) CNS Neurol. Disord. Drug Targets, **15**, 267-291.
- Grover V.K., Kumar K.V., Sharma S., Sethi N., Grewal S.P. (1998) Can. J. Anaesth., **45**, 575-577.
- Fullard R.J., Snyder C. (1990) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **31**, 1119-1126.
- Jester J.V., Parfitt G.J., Brown D.J. (2015) BMC Ophthalmol., **15 Suppl 1**, 156.
- Soria J., Duran J.A., Etzebarria J., Merayo J., Gonzalez N., Reigada R., Garcia I., Acera A., Suarez T. (2013) J. Proteomics, **78**, 94-112.
- Glazier M.A., Subbaraman L.N., Senchyna M., Jones L. (2008) Curr. Eye Res., **33**, 631-640.
- Samra Z., Lazarovich T., Sompolsky D. (1989) J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **27**, 505-509.
- Wakamatsu T.H., Dogru M., Matsumoto Y., Kojima T., Kaido M., Ibrahim O.M., Sato E.A., Igarashi A., Ichihashi Y., Satake Y., Shimazaki J., Tsubota K. (2013) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **54**, 201-210.
- Toshida H., Nguyen D.H., Beuerman R.W., Murakami A. (2007) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **48**, 4468-4475.
- Aicher S.A., Hermes S.M., Hegarty D.M. (2015) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **56**, 6981-6989.
- Behndig A., Svensson B., Marklund S.L., Karlsson K. (1998) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **39**, 471-475.
- Stern M.E., Schaumburg C.S., Pflugfelder S.C. (2013) Int. Rev. Immunol., **32**, 19-41.
- Albertsmeier A.C., Kakkassery V., Spurr-Michaud S., Beeks O., Gipson I.K. (2010) Exp. Eye Res., **90**, 444-451.
- Bian F., Barbosa F.L., Corrales R.M., Pelegrino F.S., Volpe E.A., Pflugfelder S.C., de Paiva C.S. (2015) Arthritis Res. Ther., **17**, 53.
- Na K.S., Mok J.W., Kim J.Y., Rho C.R., Joo C.K. (2012) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **53**, 5443-5450.
- Chen Y., Chauhan S.K., Saban D.R., Sadrai Z., Okanobo A., Dana R. (2011) J. Leukoc. Biol., **89**, 965-972.
- Kun L., Tang L., Wang J., Yang H., Ren J. (2014) Hepatogastroenterology, **61**, 1142-1147.
- Lim L.H., Pervaiz S. (2007) FASEB J., **21**, 968-975.

Поступила: 26. 10. 2016.  
Принята к печати: 07. 12. 2016.

MECHANISMS OF PERIOPERATIVE CORNEAL ABRASIONS:  
ALTERATIONS IN TEAR FILM PROTEOME

*E.Yu. Zernii<sup>1</sup>, O.S. Gancharova<sup>1</sup>, I.E. Ishutina<sup>2</sup>, V.E. Baksheeva<sup>1</sup>, M.O. Golovastova<sup>1</sup>, E.I. Kabanova<sup>2</sup>,  
M.S. Savchenko<sup>1</sup>, M.V. Serebryakova<sup>1</sup>, L.F. Sotnikova<sup>2</sup>, A.A. Zamyatnin Jr.<sup>1,3</sup>, P.P. Philippov<sup>1</sup>, I.I. Senin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1-40 Leninskiye gory, Moscow, 119992 Russia; e-mail: zerni@belozersky.msu.ru, senin@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup>Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472 Russia

<sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, Moscow, 119991 Russia

Perioperative corneal abrasion is an ophthalmic complication commonly found in patients underwent general anesthesia. In this study, correlations between development of corneal injury and proteomic changes in tear film during general anesthesia were examined using an animal (rabbit) model. Being started after 1-h anesthesia, the process of accumulation of pathological changes in the cornea unequivocally led clinically significant abrasions following 3-6 h of the narcosis. The corneal damage was associated with alterations in profiles of major proteins of the tear film. Analysis of the tear proteome pointed to depression of lachrymal glands function, and suggested serotransferrin, serum albumin and annexin A1 as potential tear markers of the complication. The tear film alterations included fast drop of total antioxidant activity and activity of superoxide dismutase, and decrease in interleukin-4 and increase in interleukin-6 content indicating development of oxidative and pro-inflammatory responses. These findings suggest antioxidant and anti-inflammatory therapy as prospective approach for prevention/treatment of perioperative corneal abrasions. The observed anesthesia-induced effects should be considered in any study of ocular surface diseases employing anesthetized animals.

**Key words:** general anesthesia, corneal abrasion, dry eye, tear proteome, antioxidant activity, pro-inflammatory response