

©Коллектив авторов

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ПОВРЕЖДЕНИИ РОГОВИЦЫ

Д.В. Чистяков^{1}, Н.В. Азбукина¹, С.В. Горяинов², В.В. Чистяков², О.С. Ганчарова¹, В.В. Тюлина¹, В.Е. Бакиев¹, Е.Н. Иомдина³, П.П. Филиппов¹, М.Г. Сергеева¹, И.И. Сенин¹, Е.Ю. Зерний^{1,4**}*

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40; *эл. почта: chistyakof@gmail.com

²Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

³Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

⁴Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8; **эл. почта: zerni@belozersky.msu.ru

Повреждения поверхности глаза экспериментальных животных (кроликов), индуцированные ультрафиолетовым (УФ) излучением (ультрафиолет В), включают полную дезэпителизацию роговицы, апоптоз кератоцитов и отёк стромы этой ткани. Указанные изменения сопровождаются развитием клинически и гистологически детектируемой воспалительной реакции в роговице, а также нейтрофильной инфильтрацией и экссудацией передней камеры глаза. По данным масс-спектрометрического анализа, УФ-индуцированные повреждения роговицы ассоциированы с выраженными изменениями липидного состава слезы, включающими снижение количества арахидоновой кислоты и простагландина E_2 , увеличение концентраций простагландина D_2 и его производного 15d-PGJ₂, а также изменение уровней гидроксизикозатетраеновых кислот 12-НЕТЕ (снижение) и 5-НЕТЕ (повышение). Это указывает на активацию метаболических путей с участием 5-липоксигеназы, 12-липоксигеназы, циклооксигеназы 1 и 2, и простагландин-D-синтазы. Результаты работы расширяют понимание механизмов развития УФ-индуцированного кератита, а также свидетельствуют о перспективности использования селективной противовоспалительной терапии для ускорения регенерации роговицы после ятрогенных повреждений, вызванных УФ-излучением.

Ключевые слова: УФ-индуцируемые повреждения роговицы; апоптоз кератоцитов; кератит; слезная плёнка; эйкозаноиды; простагландин E_2 ; простагландин D_2 ; 15d-PGJ₂; 5-НЕТЕ; 12-НЕТЕ

DOI: 10.18097/PBMC20196501033

ВВЕДЕНИЕ

Глаз человека часто подвержен воздействию природного и антропогенного ультрафиолетового (УФ) излучения, которое оказывает негативное воздействие, являясь патогенетическим фактором ряда офтальмологических заболеваний. Основным источником подобного излучения является солнечный свет, однако зачастую воздействие ультрафиолета на ткани глаза происходит при облучении, полученном от бытовых и промышленных источников, а также в процессе проведения некоторых медицинских процедур. Основным защитным барьером зрительной системы от ультрафиолета является роговица (в первую очередь, её эпителий), которая поглощает это излучение, не позволяя ему достичь хрусталика и сетчатки. Однако продолжительное воздействие ультрафиолета связано с риском развития повреждений облучённых тканей глаза [1].

Одним из примеров воздействия УФ-излучения на зрительный аппарат являются широко распространённые офтальмологические операции с использованием УФ-лазеров различных длин волн. Лазеры дальнего УФ-спектра (150-200 нм) могут использоваться для создания разрезов в роговичном эпителии и строме и при этом не вызывают термических повреждений окружающей ткани. В связи

с этим они широко применяются для хирургической коррекции зрения в ходе таких операций, как лазерный кератомилез (LASIK) и фоторефракционная кератэктомия (ФРК) [2]. Более длинноволновые эксимерные лазеры (до 350 нм) в настоящее время реже используются для операций на роговице, однако находят применение в других областях офтальмологии, таких как, например, хирургическое лечение открытоугольной глаукомы [3]. Распространёнными осложнениями кераторефракционных операций, выполняемых с использованием эксимерных УФ-лазеров, являются длительно заживающие и необратимые повреждения роговицы. Так, у значительной части пациентов (до 30%), перенёсших такие операции, сохраняются эрозивные повреждения и помутнения стромы (хейзы) роговицы, которые негативно сказываются на её светопропускании и светопреломляющих свойствах. Продолжительное заживление эрозий не только сопровождается интенсивным болевым синдромом, но и может приводить к необратимым изменениям в эпителии этой ткани, и, как следствие, нарушениям зрения [4]. В связи с этим на фоне растущей популярности операций с применением эксимерной лазерной абляции, особую актуальность приобретает выявление механизмов ятрогенных УФ-повреждений роговицы, а также факторов, затрудняющих её регенерацию [5].

* - адресат для переписки

Благодаря присутствию в роговице соответствующих фотосенсибилизаторов, УФ-свет является непосредственным триггером повреждения этой ткани [5-7]. Так, облучение запускает сигнальный ответ клеток (так называемый УФ-ответ), включающий экспрессию специализированных генов. Более того, интенсивное воздействие ультрафиолета вызывает окислительный стресс, а также повреждение ДНК, что в совокупности индуцирует апоптоз клеток роговицы [5]. Однако не менее важную роль в развитии повреждений роговицы и затруднении её регенерации играют локальные воспалительные процессы. В норме острый воспалительный ответ в роговице подавлен за счёт отсутствия антиген-презентирующих клеток и кровеносных сосудов, а также содержания ряда иммуносупрессорных агентов [7]. Однако УФ-облучение стимулирует накопление провоспалительных цитокинов в клетках эпителия роговицы [6], что создает цитотоксичную среду, нарушает упорядоченность слоев роговицы, замедляет регенеративные процессы и повышает вероятность её рубцевания и неоваскуляризации [7].

Примечательно, что воспалительные реакции проявляются не только в самой роговице, но и в омывающей её слезной пленке, которая из-за отсутствия в роговице кровеносных сосудов играет ключевую роль в регуляции локального иммунного ответа. Так, слеза осуществляет транспорт провоспалительных (интерлейкин-1, интерлейкин-6, TNF- α [7, 8]) и противовоспалительных (интерлейкин-4, интерлейкин-10 [7, 8]) цитокинов. Помимо этого, слеза содержит воспалительные маркеры липидной природы, такие как продукты метаболизма

полиненасыщенных жирных кислот, в первую очередь, арахидоновой кислоты [9]. Ферментативная трансформация последней генерирует сигнальные липиды группы эйкозаноидов, включая простагландины (циклооксигеназный путь), лейкотриены, липоксины, HETE (гидроксиэйкозатетраеновые кислоты): 5-HETE и 12-HETE (липоксигеназный путь), а также 19-HETE и 20-HETE (эпоксигеназный путь) (рис. 1). Указанные метаболиты запускают как про-, так и противовоспалительные процессы [10]. Показано, что высвобождение арахидоновой кислоты и образование различных эйкозаноидов происходит при некоторых травмах роговицы, сопровождаемых воспалительной реакцией [11]. В то же время, какая-либо информация о воспалительных метаболитах арахидоновой кислоты в слезной жидкости при УФ-индуцированном повреждении роговицы на сегодняшний день отсутствует.

Целью настоящей работы была идентификация в слезной жидкости липидных маркеров воспаления, сопровождающего повреждение роговицы под действием УФ излучения (ультрафиолет В, 312 нм). Для достижения этой цели с использованием экспериментальных животных (кроликов) были определены клинические и гистологические характеристики УФ-повреждения роговицы, выявлены признаки ассоциированной воспалительной реакции, а также с использованием разработанной ранее методики масс-спектрометрического определения сигнальных липидов [12, 13] определены изменения содержания эйкозаноидов в образцах слезы животных, происходящие в условиях УФ-индуцированного воспаления.

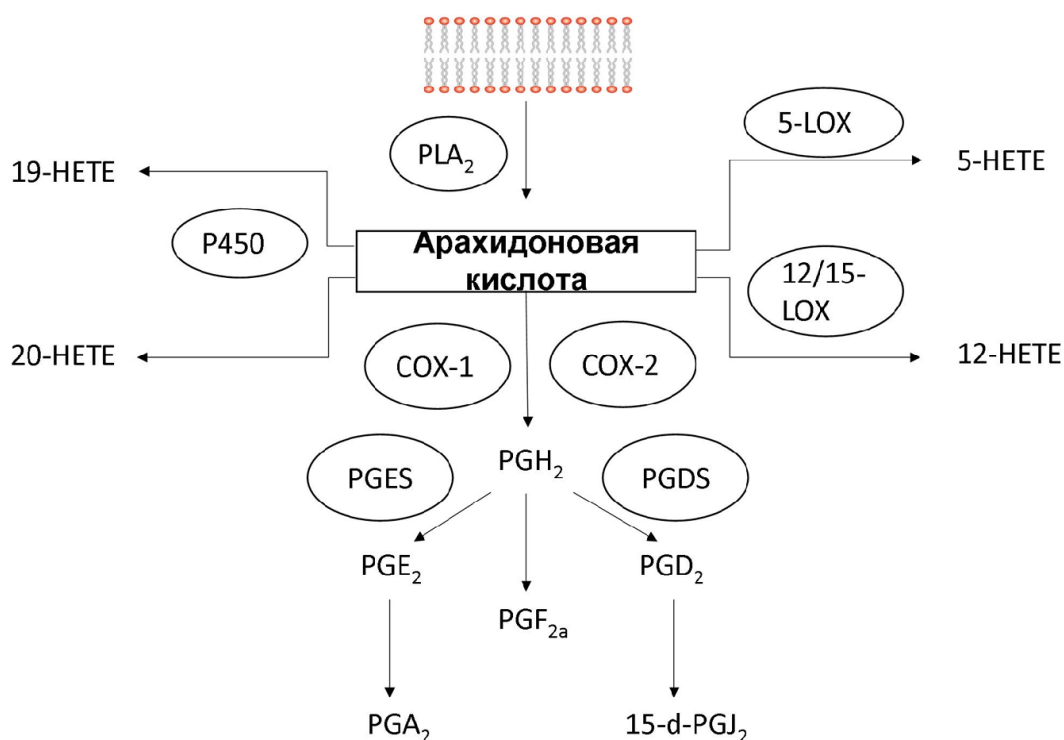


Рисунок 1. Схема синтеза эйкозаноидов. Обозначения: PLA₂ – фосфолипаза A₂, 5-LOX – 5-липоксигеназа, 12/15-LOX – 12/15-липоксигеназа, COX-1 – циклооксигеназа 1, COX-2 – циклооксигеназа 2, P450 – цитохром P450-зависимая монооксигеназа, HETE – гидроксиэйкозатетраеновые кислоты; PG – простагландины.

МЕТОДИКА

Исследования проведены на 24 пигментированных кроликах-самцах породы Советская Шиншилла (возраст 6 месяцев, вес 2,3-3 кг), приобретённых на сертифицированной ферме (“Крол-Инфо”, Московская область). Перед началом эксперимента животных содержали в течение 7 дней в индивидуальных клетках в условиях 12-часового цикла темнота/свет при 22-25°C и нормальной влажности (50-60%) со свободным доступом к пище и воде.

В работе использовали четыре группы экспериментальных животных по шесть особей в каждой, включая контрольную группу (№1) и три экспериментальных группы (№ 2-4). Для индукции УФ-повреждений роговицы животных экспериментальных групп помещали в ограничительное устройство и погружали их в состояние общей анестезии путём внутримышечной инъекции раствора, содержащего смесь тилетамин/золазепам (50 мг/мл) и ксилазина гидрохлорид (20 мг/мл) в соотношении 1:2. Глаза животных облучали галогеновой УФ-лампой с длиной волны 312 нм с расстояния 40 см на протяжении 20 мин [14]. Процедуру повторяли ежедневно в течение 4 дней. До проведения эксперимента и через 1 сутки после последнего сеанса облучения у животных из групп №1 и №2 отбирали слезу для масс-спектрометрического анализа путём введения под нижнее веко тест-полосок Ширмера, как описано в предыдущих работах [15-17]. У особей из групп №1, №3 и №4 оценивали клиническую картину УФ-повреждений с помощью флуоресцеинового теста до проведения эксперимента (группы №1, №3 и №4), а также на 6-й ч (группы №3 и №4), 24-й ч (группы № 3 и 4) и 72-й ч (группа № 4) после последнего сеанса облучения. Животных групп №1, №3 и №4 подвергали эвтаназии до проведения эксперимента (группа №1), а также через одни сутки (группа №3) или трое суток (группа №4) после облучения, после чего производили энуклеацию глазных яблок и выполняли гистологический анализ роговицы.

Флуоресцеиновый тест выполняли, как описано в предыдущих работах [8, 15-17]. Для этого животным проводили инстилляцию 2 мкл 1%-ного флуоресцеина натрия под нижнее веко, после чего краситель равномерно распределяли по поверхности роговицы движениями, имитирующих моргание глаза. Оценку результатов теста проводили с помощью щелевой лампы с синим фильтром. Суммарный размер повреждений роговицы оценивали по флуоресцеиновой шкале (ФШ) от 1 (<12,5% площади роговицы) до 6 (>90% площади роговицы).

Гистологический анализ роговицы был выполнен в соответствии с методикой, описанной ранее [8]. Глаза энуклеировали *post mortem* и немедленно фиксировали в 10% растворе формалина на PBS (pH 7,4) в течение суток, либо в жидкости Карнуа (60% этанол, 30% хлороформ, 10% ледяная уксусная кислота) в течение 3 ч при комнатной

температуре. Роговицы выделяли из зафиксированных глазных яблок, подвергали дегидратации, стандартной гистологической этанольной проводке и заливали в парафин, формируя парафиновые блоки. Из каждого образца получали 8 срезов с шагом 300 мкм вдоль назотемпоральной оси (каждый срез толщиной 3 мкм). Срезы окрашивали гематоксилином Карацци и эозином и анализировали с использованием микроскопов Axio Scope.A1 (“Carl Zeiss”, Германия) и Leica DM400 (“Leica”, Германия). Микрофотографии получали с помощью цветной камеры AxioCam MRc 5 (“Carl Zeiss”) и обрабатывали с использованием программного обеспечения AxioVision v.3.0 (“Carl Zeiss”) и Photoshop CS3 (“Adobe Systems”, США).

Масс-спектрометрический анализ эйкозаноидов слёзной жидкости проводили следующим образом. Липидные компоненты слезы элюировали метанолом (1 мл метанола на 15 мм полоски Ширмера), после чего из полученных элюатов экстрагировали липидные соединения методом твердофазной экстракции на колонках Oasis HBL 3cc согласно рекомендациям производителя. Анализ проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040 (“Shimadzu”, Япония), оборудованного системой ультра ВЭЖХ Nexera, с использованием колонки Phenomenex C8 (2,1 мм × 150 мм × 2,6 мкм). Регистрацию липидов осуществляли методом мониторинга множественных реакций, как описано ранее [12, 13]. Для количественного определения липидов использовали дейтерированные стандарты следующих соединений: арахидоновая кислота, 15d-PGJ₂, PGA₂, 19-HETE, 20-HETE, 12-HETE, 5-HETE, PGF2α, PGE₂, PGD₂ (“Cayman Chemical”, США). Обработку спектров осуществляли с помощью программного обеспечения Shimadzu lipid mediator method package Ver. 2. Достоверность различий между группами с уровнем значимости не менее 95% оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведение 4 сеансов УФ-облучения глаз экспериментальных животных продолжительностью 20 мин каждый приводило к развитию клинически выраженных повреждений роговицы, детектируемых как на первый, так и на третий день послеоперационного периода. Так, уже через 6 ч после финального облучения повреждения достигали в среднем 5-6 баллов по ФШ и сохранялись таковыми в течение суток. На третий день наблюдали признаки регенерации роговицы: глубина повреждения на этом этапе соответствовала 2-3 баллам по ФШ. В то же время, офтальмологический осмотр выявлял выраженные симптомы кератита и кератоконъюнктивита, которые, наоборот, усиливались на этом этапе послеоперационного периода. В частности, на первые сутки после облучения у животных сохранялась реакция на свет, однако наблюдалось интенсивное слезотечение и покраснение глаз, отёк и опалесценция роговицы, а также хемоз конъюнктивы. При этом на третий день к указанным

симптомам добавлялась неоваскуляризация роговицы. Таким образом, клинические данные указывали на протекание активного процесса регенерации роговицы, который, однако, сопровождался развитием локального воспалительного ответа.

Сделанные наблюдения были подтверждены с помощью гистологического анализа роговицы экспериментальных животных. Так, через 1 сутки после облучения в области повреждения наблюдалось полное отсутствие эпителия и выраженный отёк стромы (рис. 2Б). Кроме того, обнаруживался тотальный кариопикноз и кариорексис ядер кератоцитов стромы, указывающие на то, что подавляющая часть этих клеток находилась в разных стадиях гибели путём апоптоза. У части эндотелиоцитов выявлен пикноз; отмечено общее снижение клеточности эндотелия. Наконец, на этом этапе в передней камере глаза начинал формироваться воспалительный экссудат (рис. 2Б). В целом, через сутки после облучения в роговице происходила гибель большинства клеточных элементов, а также проявлялись первые признаки воспалительной реакции. Воспаление принимало развёрнутую форму к третьим суткам послеоперационного периода (рис. 2В). Так, в центральных областях роговицы вслед за гибелью кератоцитов наблюдался резко выраженный кератит, детектируемый по накоплению сегментоядерных клеток в строме этой ткани (пунктирные стрелки на рис. 2В). Воспалительная инфильтрация роговицы сопровождалась наполнением передней камеры глаза гнойным экссудатом (так называемый гипопион). В совокупности полученные гистологические данные указывают на то, что УФ-повреждения роговицы сопровождаются развитием кератита.

Результаты масс-спектрометрического анализа (рис. 3) слезной жидкости УФ-облучённых животных также свидетельствовали в пользу развития локального воспалительного ответа. Так, в образцах слезы, полученных на третий день послеоперационного периода, был обнаружен ряд метаболитов арахидоновой кислоты, являющихся продуктами различных путей её ферментативной трансформации.

Как видно, в результате воздействия УФ-излучения на поверхность глаза в слезной жидкости происходит снижение уровня арахидоновой кислоты и PGE_2 с одновременным увеличением содержания PGD_2 и его метаболита 15-d-PGJ_2 (рис. 3А,В). При этом анализ содержания гидроксиэйкозатетраеновых кислот показал отсутствие изменения содержания 19-НЕТЕ и 20-НЕТЕ, снижение концентрации 12-НЕТЕ, а также значительное увеличение количества 5-НЕТЕ, которое выросло более чем в 10 раз (рис. 3Б,Г). Таким образом, были зафиксированы разнонаправленные изменения уровней метаболитов арахидоновой кислоты в слезе, в целом, свидетельствующие о развитии локального воспалительного ответа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного клинического и гистологического анализа показали, что облучение глаз экспериментальных животных (кроликов) ультрафиолетовым светом с длиной волны 312 нм по схеме 4 дня по 20 мин/день индуцирует развитие выраженных повреждений роговицы. В частности, проведённое облучение вызывает апоптоз кератоцитов, запускаемый, как правило, в результате УФ-индуцированного окислительного стресса, и являющийся одним из наиболее значимых патологических процессов, замедляющих реэпителизацию и потенциально вызывающих необратимые изменения в роговице после воздействия эксимерного лазера [18]. Однако, что не менее важно, УФ-В повреждение роговицы сопровождается развитием локального воспалительного ответа, детектируемого как клинически, так и гистологически. Таким образом, экспериментальная модель, используемая в данной работе, является оптимальной для исследования механизмов развития кератита, сопровождающего УФ-повреждения роговицы, и также существенно осложняющего её регенерацию, например, после проведения эксимерлазерных операций.

В норме роговица лишена кровеносных сосудов, поэтому ключевую роль в регуляции иммунитета этой ткани играет омывающая её слёзная пленка [7].

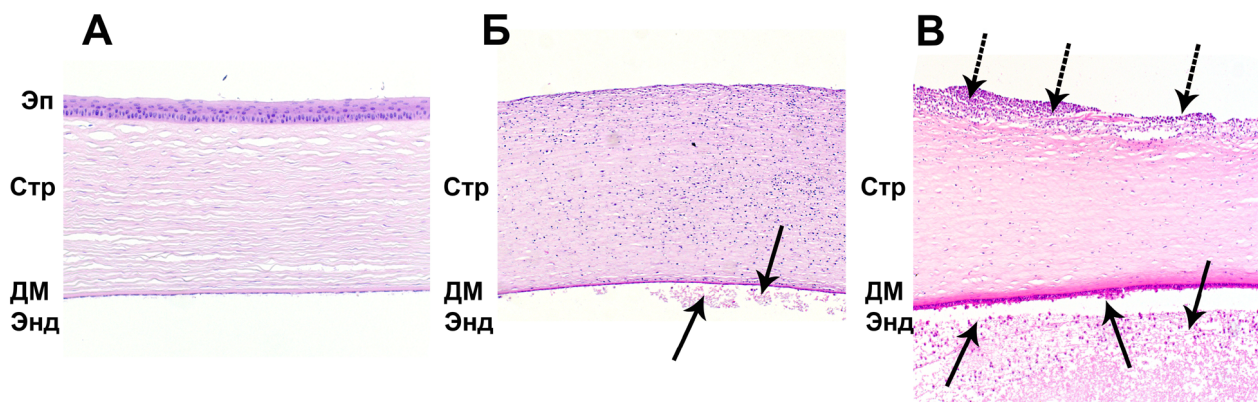


Рисунок 2. Изменения морфологии роговицы экспериментальных животных (кроликов) на фоне УФ-облучения. А – роговица интактного животного; Б, В – роговица на 1 и 3 сутки после воздействия УФ-излучения (20 мин/сутки, 4 суток). Пунктирными стрелками обозначен воспалительный инфильтрат в роговице. Сплошными стрелками отмечен воспалительный экссудат в передней камере глаза. Эп – эпителий, Стр – строма, ДМ – Десцemetова мембрана, Энд – эндотелий. Увеличение $\times 200$.

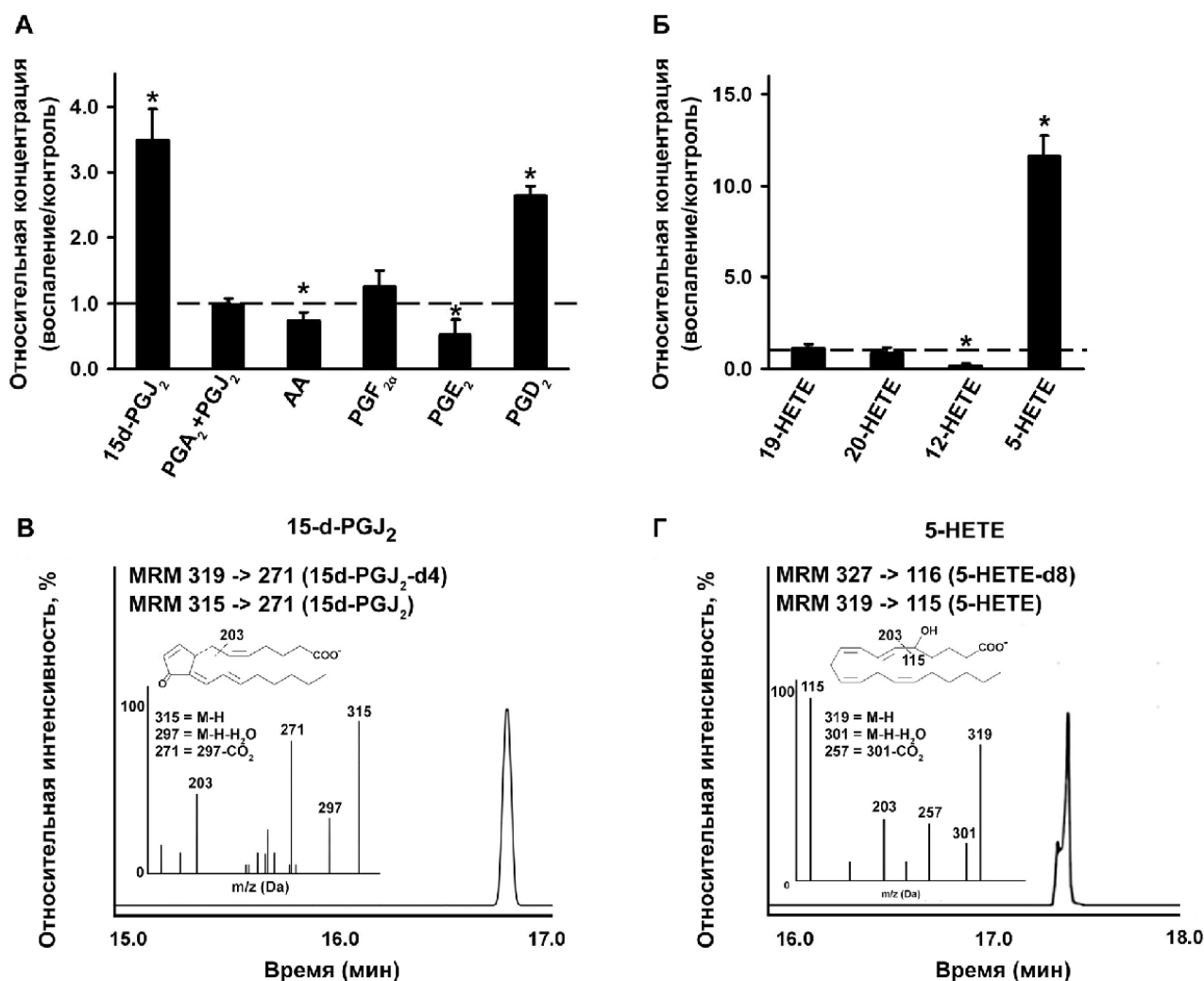


Рисунок 3. Изменения содержания эйкозаноидов в слезной пленке экспериментальных животных (кроликов), ассоциированные с УФ-индуцированным повреждением роговицы. Показаны соотношения концентраций исследуемых соединений в слезе облученных (А) и интактных (Б) животных, а также репрезентативные хроматограммы и МС/МС спектры, полученные в режиме мониторинга множественных реакций 15d-PGJ₂ (В) и 5-HETE (Г). * - статистически достоверные различия по сравнению с нестимулированными образцами (p<0,05).

Так, слеза не только обеспечивает снабжение роговицы питательными веществами и кислородом, но и осуществляет транспорт сигнальных молекул воспаления, таких как интерлейкин-1, интерлейкин-10, интерлейкин-4 и TNF-α [7, 8]. Однако помимо белков воспаления, слеза содержит воспалительные маркеры липидной природы, в частности, продукты метаболизма полиненасыщенных жирных кислот [9]. Задачей настоящей работы была характеристика паттерна таких соединений в слезе УФ-облученных животных, проявляющих признаки кератита. При этом основной акцент был сделан на эйкозаноиды, являющиеся наиболее показательными маркерами воспалительного ответа в тканях глаза при различных офтальмологических заболеваниях. К подобным соединениям можно отнести простагландины, липоксины, лейкотриены, а также гидроксикоикозатетраеновые кислоты [19]. Несмотря на то, что к моменту настоящей работы существовал

ряд исследований, связывающих изменения уровней эйкозаноидов в слезной жидкости с развитием некоторых офтальмологических патологий [11, 20, 21], данные, касающиеся содержания этих соединений в слезе при УФ-повреждениях роговицы, в литературе отсутствовали.

Анализ образцов слезной жидкости УФ-облученных животных показал снижение уровня арахидоновой кислоты и PGE₂ с одновременным увеличением содержания PGD₂ и 15-d-PGJ₂. Ранее было показано, что при индукции интраокулярного воспаления с помощью эндотоксина происходит увеличение концентрации PGE₂ в водянистой влаге животных [22]. В совокупности эти наблюдения обнаруживают различия в протекании внутриглазных воспалительных процессов разного генеза. Увеличение концентраций PGD₂ и 15d-PGJ₂ при УФ-повреждении роговицы указывает на активацию метаболической ветви с участием циклооксигеназ (COX-1 и COX-2, рис. 1),

и простагландин-D-синтазы (PGDS, рис. 1). Сопоставление этих данных с выявленным уменьшением концентрации PGE_2 , синтезируемого простагландин-Е-синтазой (PGES, рис. 1), позволяет предположить, что регуляция уровней обоих простагландинов при облучении ультрафиолетом происходит на уровне процессирования их предшественника, простагландина H_2 (PGH_2 , рис. 1), с участием ферментов PGDS и PEDS.

Следует отметить, что метаболит 15-d-PGJ₂ относится к группе циклопентеноновых простагландинов, в целом обладающих противовоспалительными свойствами [13, 19]. Например, подобная активность этого метаболита показана на модели воспалительной реакции клеток пигментного эпителия сетчатки, активированной липополисахаридом. В этом случае воспаление подавляется за счёт ингибирования фосфорилирования киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK), и активации ядерного транскрипционного фактора NF-κB [23]. Обнаруженное нами увеличение синтеза 15d-PGJ₂ при стимуляции воспалительного процесса в тканях глаза показано впервые, и вопрос о том, отражает ли его рост проявление противовоспалительных процессов в системе, пока остаётся открытым.

Неожиданным феноменом, обнаруженным в рамках настоящей работы, является снижение концентрации 12-НЕТЕ в слезе УФ-облучённых животных. Действительно, у человека интраокулярное воспаление, наоборот, сопровождается повышением концентрации 12-НЕТЕ в слёзной жидкости [24]. Известно, что этот метаболит может образовываться как по липоксигеназному пути (с помощью фермента 12-липоксигеназы (12-LOX, рис. 1)), так и по эпоксигеназному пути (с помощью цитохрома P450 (P450, рис. 1)) [19]. Ранее на модели гипоксии роговицы было показано, что увеличение синтеза 12-НЕТЕ происходит по эпоксигеназному пути [25]. Однако по нашим данным, при УФ-индуцированном воспалении роговицы концентрация других метаболитов эпоксигеназного пути (19-НЕТЕ и 20-НЕТЕ) в слезе остаётся неизменной, указывая на то, что он, скорее всего, не задействован в данном случае. Таким образом, снижение концентрации метаболита 12-НЕТЕ, по-видимому, происходит по специализированному механизму и является специфическим компонентом воспалительного процесса, вызванного УФ-излучением.

Наконец, ещё одним наблюдением, сделанным в настоящей работе, является драматическое увеличение количества 5-НЕТЕ в слёзной жидкости кроликов в результате УФ-облучения. Этот метаболит относится к семейству провоспалительных сигнальных липидов, являясь продуктом действия 5-липоксигеназы (5-LOX, рис. 1) [19]. Исходя из этого можно предположить, что использование ингибиторов 5-LOX будет эффективным способом подавления воспалительных процессов, связанных с УФ-повреждениями роговицы. Одним из подобных ингибиторов является Зилеутон

(N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина) – препарат, принятый к использованию в медицинской практике [10]. Зилеутон показан для профилактики и лечения бронхиальной астмы. Однако возможность применения этого препарата для купирования воспалительных процессов в роговице остаётся неизученной и требует дальнейших исследований.

Необходимо отметить, что выявленные изменения липидного состава слезы могут быть связаны не только с развитием УФ-индуцированного воспалительного процесса в роговице, но и с эффектом ультрафиолета на слёзопродуцирующие железы. Так, изменения липидома слезы были обнаружены при дисфункции мейбомиевых желез, которые отвечают за формирование внешнего слоя слёзной плёнки, предохраняющего её от высыхания [20]. Подобные эффекты могут являться дополнительным фактором риска для роговицы, защищаемой и питаемой за счёт соединений, содержащихся в слёзной плёнке.

В целом, результаты настоящей работы не только расширяют понимание механизмов развития УФ-индуцированного кератита, но и позволяют определить направления селективной противовоспалительной терапии при УФ-повреждениях роговицы различного генеза. В работе охарактеризованы изменения всего спектра метаболитов арахидоновой кислоты в слезе облучённых животных, что очень важно, поскольку детекция отдельных эйкозаноидов обычно малоинформативна ввиду наличия как специфических (например, через рецепторы, сопряжённые с G-белками), так и неспецифических (например, через ядерные рецепторы PPAR) регуляторных путей [19, 20]. Большинство противовоспалительных препаратов, используемых в настоящее время, являются ингибиторами отдельных ветвей трансформации полиненасыщенных жирных кислот [19]. В связи с этим, понимание, какие именно сигнальные липиды синтезируются при УФ-повреждениях роговицы и сопутствующих этим повреждениям воспалительных процессах позволит в дальнейшем эффективно подбирать противовоспалительную терапию для ускорения регенерации роговицы, например, после широко распространённых офтальмологических операций, проводимых с использованием эксимерных лазеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе охарактеризована модель УФ-повреждения роговицы кроликов и показано, что патологический процесс, индуцируемый УФ излучением, сопровождается развитием клинически и гистологически детектируемого воспалительного ответа. На основе анализа ассоциированных изменений липидного состава слезы предсказаны метаболические пути, обеспечивающие развитие воспалительной реакции. Результаты работы расширяют понимание механизмов УФ-индуцированного кератита, а также позволяют определить направления селективной противовоспалительной терапии для ускорения регенерации роговицы после ятрогенных УФ-повреждений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00255 (постановка модели УФ-повреждений роговицы экспериментальных животных (кроликов), клинический и гистологический анализ состояния нормальной и повреждённой роговицы, получение и обработка образцов слёзной жидкости экспериментальных животных, и идентификация присутствующих в ней метаболитов арахидоновой кислоты, анализ полученных данных) и программы РУДН “5-100” (разработка методики масс-спектрометрического анализа метаболитов арахидоновой кислоты в слёзной жидкости кроликов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными проведены в соответствии с рекомендациями 8-го издания “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the National Research Council, а также “Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research” of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (“ARVO”). Протокол настоящего исследования был утверждён комитетом по биоэтике НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ (протокол № 1/2016).

ЛИТЕРАТУРА

1. Cejkova J., Stipek S., Crkovska J., Ardan T., Platenik J., Cejka C., Midelfart A. (2004) *Physiol. Res.*, **53**, 1-10.
2. Trokel S.L., Srinivasan R., Braren B. (1983) *Am. J. Ophthalmol.*, **96**, 710-715.
3. Glaucoma Laser Trial Research Group (1995) *Am. J. Ophthalmol.*, **120**, 718-731.
4. Carlson K.H., Bourne W.M., McLaren J.W., Brubaker R.F. (1988) *Exp. Eye Res.*, **47**, 27-41.
5. Zinflou C., Rochette P.J. (2017) *Free Radic. Biol. Med.*, **108**, 118-128, DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.022.
6. Ibrahim O.M., Kojima T., Wakamatsu T.H., Dogru M., Matsumoto Y., Ogawa Y., Ogawa J., Negishi K., Shimazaki J., Sakamoto Y., Sasaki H., Tsubota K. (2012) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**, 2403-2413, DOI:10.1167/iiov.11-6863.
7. Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Yani E.V., Philippov P.P., Senin I.I. (2017) *Curr. Med. Chem.*, DOI:10.2174/0929867324666170609080920.
8. Zernii E.Y., Gancharova O.S., Baksheeva V.E., Golovastova M.O., Kabanova E.I., Savchenko M.S., Tiulina V.V., Sotnikova L.F., Zamyatnin A.A., Jr., Philippov P.P., Senin I.I. (2017) *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 9281519, DOI:10.1155/2017/9281519.
9. Walter S.D., Gronert K., McClellan A.L., Levitt R.C., Sarantopoulos K.D., Galor A. (2016) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**, 2472-2478, DOI:10.1167/iiov.16-19131.
10. Funk C.D. (2001) *Science*, **294**, 1871-1875, DOI:10.1126/science.294.5548.1871.
11. Tripathi T., Alizadeh H. (2014) *Inflamm. Cell Signal.*, **1**, e301, DOI: 10.14800/ics.301.
12. Chistyakov D.V., Azbukina N.V., Astakhova A.A., Goriainov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G. (2018) *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, DOI:10.3390/ijms19092793.
13. Chistyakov D.V., Grabeklis S., Goriainov S.V., Chistyakov V.V., Sergeeva M.G., Reiser G. (2018) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **500**, 204-210, DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.040.
14. Tiulina V., Zernii E., Baksheeva V., Gancharova O., Kabanova E., Sotnikova L., Zamyatnin A., Philippov P., Senin I. (2018) *FEBS Open Bio*, **8**, 215-215.
15. Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Kabanova E.I., Tiulina V.V., Golovastova M.O., Gancharova O.S., Savchenko M.S., Sotnikova L.F., Zamyatnin A.A., Philippov P.P., Senin I.I. (2018) *Bull. Exper. Biol. Med.*, **165**, 269-271, DOI:10.1007/s10517-018-4145-3.
16. Zernii E.Y., Golovastova M.O., Baksheeva V.E., Kabanova E.I., Ishutina I.E., Gancharova O.S., Gusev A.E., Savchenko M.S., Loboda A.P., Sotnikova L.F., Zamyatnin A.A., Philippov P.P., Senin I.I. (2016) *Biochemistry-Moscow*, **81**, 1549-1557, DOI: 10.1134/S0006297916120166.
17. Zernii E.Y., Gancharova O.S., Ishutina I.E., Baksheeva V.E., Golovastova M.O., Kabanova E.I., Savchenko M.S., Serebryakova M.V., Sotnikova L.F., Zamyatnin A.A., Philippov P.P., Senin I.I. (2017) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **11**, 186-193, DOI:10.1134/S1990750817020123.
18. Shimamura S., Masumizu T., Nakai Y., Urayama K., Shimazaki J., Bissen-Miyajima H., Kohno M., Tsubota K. (1999) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 1245-1249.
19. Сергеева М.Г., Варфоломеева А.Т. (2006) Каскад арахидоновой кислоты, Народное образование, Москва, ISBN:5-87953-228-3.
20. Ambaw Y.A., Chao C., Ji S., Raida M., Torta F., Wenk M.R., Tong L. (2018) *Sci. Rep.*, **8**, 11296, DOI:10.1038/s41598-018-29568-3.
21. Doucette L.P., Walter M.A. (2017) *Ophthalmic Genet.*, **38**, 108-116, DOI:10.3109/13816810.2016.1164193.
22. Csukas S., Paterson C.A., Brown K., Bhattacharjee P. (1990) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**, 382-387.
23. Jung W.K., Lee C.M., Lee D.S., Na G., Lee D.Y., Choi I., Park S.G., Seo S.K., Yang J.W., Choi J.S., Lee Y.M., Park W.S., Choi I.W. (2014) *Int. J. Mol. Med.*, **33**, 449-456, DOI:10.3892/ijmm.2013.1588.
24. Miyaal P.A., Dunn M.W., Schwartzman M.L. (2001) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 328-332.
25. Mastuyugin V., Aversa E., Bonazzi A., Vafaes C., Miyaal P., Schwartzman M.L. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 1611-1619.

Поступила в редакцию: 16. 11. 2018.
После доработки: 31. 01. 2019.
Принята к печати: 04. 02. 2019.

INFLAMMATORY METABOLITES OF ARACHIDONIC ACID IN TEAR FLUID
IN UV-INDUCED CORNEAL DAMAGE

D.V. Chistyakov^{1}, N.V. Azbukina¹, S.V. Goriainov², V.V. Chistyakov², O.S. Gancharova¹, V.V. Tiulina¹,
V.E. Baksheeva¹, E.N. Iomdina³, P.P. Philippov¹, M.G. Sergeeva¹, I.I. Senin¹, E.Yu. Zernii^{1,4***}*

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1-40 Leninskiye Gory, Moscow, 119992 Russia; *e-mail: chistyakov@gmail.com

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

³Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062 Russia

⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine,
Moscow, 119991 Russia; ***e-mail: zernii@belozersky.msu.ru

The ultraviolet (UV) B-induced damage of the eye surface of experimental animals (rabbits) includes loss of corneal epithelium, apoptosis of keratocytes and stromal edema. These changes are accompanied by clinically and histologically manifested corneal inflammation, neutrophil infiltration, and exudation of the anterior chamber of the eye. According to mass spectrometric analysis, UV-induced corneal damage is associated with pronounced changes in the lipid composition of tears, including a decrease in the amount of arachidonic acid and prostaglandin E₂ and an increase in the concentrations of prostaglandin D₂ and its derivative 15d-PGJ₂. In addition, it is accompanied by an alteration in the levels of hydroxyeicosate tetraenic acid derivatives, namely upregulation of 12-HETE and downregulation of 5-HETE. The revealed changes indicate the activation of metabolic pathways involving 5-lipoxygenase, 12-lipoxygenase, cyclooxygenase 1 and 2, and prostaglandin-D-synthase. These findings contribute to understanding mechanisms of UV-induced keratitis and point on feasibility of selective anti-inflammatory therapy for improving corneal regeneration after iatrogenic UV damage.

Key words: UV-induced corneal damage; keratocyte apoptosis; keratitis; tear film; eicosanoids; prostaglandin E₂; prostaglandin D₂; 15d-PGJ₂; 5-HETE; 12-HETE