

ВЛИЯНИЕ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА В КОНЬЮНКТИВЕ И ЭПИТЕЛИИ РОГОВИЦЫ ВЗРОСЛЫХ КРЫС *in vivo*, ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

© 2018 г. Ю. В. Маркитантова^{1*}, С. И. Акберова², А. А. Рябцева³,
О. Г. Строева¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

119334 Москва, ул. Вавилова, 26

²Медицинский центр “Медквадрат”, 115409 Москва, Каширское ш., 74, корп. 1

³Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского,

129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2

*E-mail: yuliya.mark@gmail.com

Поступила в редакцию 25.05.2017 г.

Изучены начальные процессы апоптотического поражения в обновляющихся клеточных популяциях глаза — конъюнктиве и эпителии роговицы взрослых крыс *in vivo* в моделируемых условиях острой гипобарической гипоксии — и действие парааминобензойной кислоты (ПАБК) в форме лекарственного препарата Актипола (0.007%-ная ПАБК). При двукратных сеансах гипоксии обнаружено усиление апоптотического поражения ДНК клеток, которое сопровождалось интенсификацией восстановительных процессов, оцениваемых по экспрессии маркера митотических клеток — фосфорилированного гистона рН3 — и маркера репарации ДНК — фосфорилированного гистона γ -H2AX. Установлено, что парабубарная инъекция Актипола за 24 ч до гипоксии купирует в конъюнктиве развитие апоптотического процесса, сохраняя его на уровне физиологической нормы, тем самым оказывая защитное действие в условиях гипоксии.

DOI: 10.7868/S0002332918030025

Один из фундаментальных разделов биологической науки — проблема взаимодействия организма и среды, в частности повреждающего действия внешних факторов на живые организмы. XX век породил такие области знания, как радиационный и химический мутагенез. При этом были не только изучены механизмы разрушительного действия этих физических и химических факторов на генетический аппарат клеток, но и найдены пути их полезного использования. В настоящее время ввиду возрастающего экологического неблагополучия внимание исследователей сосредоточилось на факторах внешней среды, затрагивающих структуру и функции организмов на эпигенетическом уровне, один из которых — гипоксия. Наряду с изучением влияния различных условий гипоксии осуществляется поиск средств защиты от ее повреждающего действия. Вследствие многообразия аспектов этой проблемы (Lou *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2010; Grimm, Willmann, 2012) многие вопросы остаются без ответов. Необходимо знать, имеются ли различия в повреждении одного и того же органа при действии гипоксии разного типа, все

ли свойства реагирующей системы, проявляющиеся при патологии или последующей репарации, нам известны. Глаз позвоночных животных весьма чувствителен к неблагоприятным отклонениям от нормальных условий среды и поэтому удобен для решения этих задач.

Ранее на взрослых крысах *in vivo* было показано, что общее воздействие гипоксии этого типа вызывает избирательное в глазу апоптотическое поражение только клеток глазной поверхности, а именно эпителия конъюнктивы и роговицы (Акберова и др., 2016). Нами была предпринята попытка понять причины такой избирательности. Во-первых, в экспериментальной проверке нужно было предположение о том, что поражения эпителия роговицы и конъюнктивы обусловлены меньшей устойчивостью последних к гипоксии по сравнению с другими тканями глаза. В случае справедливости этого предположения увеличение дозы повреждающего воздействия должно было бы вызвать апоптотическое повреждение и в клетках заднего отдела глаза. Во-вторых, необходимо было проверить, не

связано ли различие в чувствительности передних и задних структур глаза взрослых животных к действию гипоксии с их различными пролиферативными статусами. Поэтому была проанализирована динамика появления апоптотических и пролиферирующих клеток после однократного и двукратного воздействия гипоксии в серийных срезах глаза контрольной и опытных групп. В-третьих, испытывалось защитное и лечебное действие параминобензойной кислоты (ПАБК) в форме лекарственного препарата Актипола на ткани глаза в условиях гипоксии данного типа.

Цель работы — изучение начальных изменений глазной поверхности в условиях острой гипобарической гипоксии, анализ специфичности поражения тканей глаза при увеличении дозы гипоксического воздействия, попытка объяснить причины избирательного поражения переднего отрезка глаза в ответ на действие гипоксии, а также исследование возможности защитного и лечебного действия Актипола на ткани передней поверхности глаза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект. Работа выполнена на 33 половозрелых самцах крыс Wistar в возрасте 3–4 мес. массой 350–400 г из питомника лабораторных животных “Пушино”. Контрольные животные — “интактный контроль” (группа I, $n = 12$, где n — число животных в каждой экспериментальной группе) — содержались в стандартных лабораторных условиях в течение всего опыта.

Моделирование острой гипобарической гипоксии. Животных помещали в барокамеру конструкции Полежаева (Полежаев, 2000), понижали давление в камере от 760 до 180 мм рт. ст., создавая условия, соответствующие таковым на высокогорье. В этих условиях животные находились в течение 3 мин. Были выполнены три серии экспериментов. Часть животных подвергали однократному воздействию гипоксии, после чего результаты анализировали через 1 ч (группа II, $n = 6$) и через 3 ч (группа III, $n = 9$). Другую часть животных подвергали двукратному действию гипоксии (группа VII, $n = 6$) с интервалом 1 ч. Материал для исследования брали через 3 ч после первого сеанса гипоксии. Сроки повреждающего воздействия для последующего анализа были заимствованы из предшествующих работ по защите глаз от других повреждающих воздействий (Строева, Панова, 1999; Акберова и др., 2001). Эксперименты проводили в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных и положениями Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей и Комитета по биоэтике ИБР РАН. Крыс выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции

хлоралгидрата (800 мг/кг) (Riedel-de-Haen, Германия).

Профилактическое и лечебное действие ПАБК в форме лекарственного препарата Актипола. Применение Актипола, содержащего 0.007%-ную ПАБК как лечебного и профилактического средства, было описано в работах, выполненных на других модельных системах (Строева, Панова, 1999; Акберова и др., 2001). Для изучения возможности предотвращения апоптотических изменений в тканях глаза, индуцированных сеансами гипобарической гипоксии, Актипол вводили путем парабулбарной инъекции (0.1 мл) за 24 ч до гипоксии, а через 3 ч после гипоксии (группа IV, $n = 5$) материал анализировали. При изучении лечебного действия Актипол инъецировали в том же объеме через 1 ч после гипоксии, и результат также регистрировали через 3 ч после гипоксии (группа V, $n = 7$). В опыте комбинированного воздействия (группа VI, $n = 5$) Актипол вводили за 24 ч до и повторно через 1 ч после гипоксии. Как и в большинстве других групп, результат регистрировали через 3 ч после гипоксии.

Для приготовления замороженных срезов для последующего анализа методом TUNEL и иммунохимического исследования энуклеированные глаза крыс фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4. Образцы отмывали последовательно в трех сменах фосфатного буфера с 5%-ной сахарозой, в трех сменах фосфатного буфера с добавлением 10%- и 20%-ной сахарозы (длительность процедуры каждой отмывки 15 мин) и оставляли на ночь в фосфатном буфере с добавлением 20%-ной сахарозы при 4 °C. После замораживания глаз в среде Tissue-Tec OCT (Leica, Германия) с помощью криостата Leica M1900 (Leica) получали горизонтальные срезы глазного яблока толщиной 10 мкм.

Эпителии роговицы и конъюнктивы принадлежат к типу обновляющихся клеточных популяций. При этом по интенсивности пролиферации клеток в эпителии роговицы и конъюнктивы крысы региональные различия практически не были выявлены (Haskjold *et al.*, 1988). Исходя из этого топографические различия исследуемых образцов ткани нами не учитывались.

Идентификация апоптоза методом TUNEL. Результаты исследования апоптотического поражения эпителия конъюнктивы в каждой группе опытов были получены на основе анализа срезов глаза, с особым вниманием к зоне лимба. Для выявления апоптотических клеток применяли метод TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl transferase mediated desoxyuridine triphosphate (UTP) nick end labeling), который обнаруживает разрывы ДНК, характерные для начального этапа развития апоптоза. В основе

метода лежит каталитическое присоединение меченого 12-dUTP-флуоресцеина к 3'-ОН-концам разрывов в ДНК с помощью рекомбинантной терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы. Использовали набор реагентов DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, США). Для подтверждения специфичности реакции меченых фрагментированных участков ДНК проводили контрольные опыты в соответствии с рекомендациями производителя набора. Реакция TUNEL без фермента терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы служила отрицательным контролем, а обработка срезов ДНКазой I – положительным контролем. Кроме того, для визуализации клеток с поврежденной ДНК, подвергающихся апоптозу, применяли дополнительное окрашивание ядерным маркером, флуоресцентным красителем Hoechst 33342, специфичным для ДНК (Leica). После энзиматической реакции и окрашивания Hoechst 33342 срезы глаз отмывали в нескольких сменах 0.1 М фосфатного буфера (по 15 мин в каждом растворе) и заключали в среду Vectashield (Vector, США). Результаты подтверждали в трех сериях повторных опытов.

Идентификация клеток с двухцепочечными разрывами ДНК и клеток в фазе митоза методом флуоресцентной иммунохимии. Повреждение ДНК в клетках конъюнктивы и эпителии роговицы, связанное с образованием двухцепочечных разрывов ДНК, регистрировали по локализации фосфорилированного гистона γ -H2AX (anti-gamma H2A.X phospho S139) – специфического маркера, участвующего в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Использовали поликлональные антитела кролика к белку γ -H2AX с рабочим разведением 1 : 500 (Abcam, Великобритания).

Для выявления клеток, находящихся в фазе митоза, изучали внутриклеточную локализацию фосфорилированного гистона pH3 (H3-phospho S10) – высокоспецифичного маркера этой фазы клеточного цикла. Использовали поликлональные антитела кролика к белку pH3, рабочее разведение которых составило 1 : 500 (Abcam).

В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa 488 в разведении 1 : 2000 (Molecular Probes, США). Для визуализации ядер использовали Hoechst 33342 (Leica). Для контроля неспецифического связывания антител проводили стандартную реакцию без первичных антител (негативный контроль). Срезы заключали в среду Vectashield (Vector). Специфичность локализации исследуемых белков подтверждали в трех повторных сериях экспериментов.

Локализацию TUNEL-позитивных клеток, а также γ -H2AX- и H3-phospho S10-позитивных клеток на замороженных срезах глаз анализировали с помощью микроскопа DM RXA2 (Leica),

снабженного набором фильтров для регистрации флуоресценции и программой Leica для визуализации изображений.

Статистическая оценка зон апоптотического поражения конъюнктивы. В эпителии конъюнктивы проводили количественную оценку интенсивности флуоресцентного свечения (ИФС) зон поражения. Для оценки степени выраженности иммуногистохимической реакции использовали коэффициент интенсивности иммунореактивности, определяемый в программе Image J (Leuba *et al.*, 1998). ИФС отражает число, плотность расположения и яркость свечения апоптотических клеток в стандартном поле зрения среза. Для каждой группы опытов ИФС в конъюнктиве оценивалась с помощью усредненных данных, полученных для каждого исследуемого участка глаза животного. Данные измерений ИФС, полученные с помощью программы Image J, вносили в программу Microsoft Excel, после чего вычисляли среднее значение для каждой экспериментальной группы. Статистическую значимость различий между попарно сравниваемыми группами определяли с использованием непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Если полученное эмпирическое значение (U_e) для каждого сравнения оказывалось меньше или равно табличному критическому (U_k) значению (при $p < 0.05$), то различия между двумя сравниваемыми группами признавались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты анализа семи групп животных показали, что при острой гипобарической гипоксии избирательное первичное поражение происходит в конъюнктиве и эпителии роговицы. Это поражение связано с массовым появлением в конъюнктиве и эпителии роговицы TUNEL-позитивных апоптотических клеток при полном их отсутствии во всех остальных тканях глаза в анализируемые сроки регистрации результата. При этом в других тканях глаза TUNEL-позитивные клетки не были зарегистрированы во всех экспериментальных группах.

Встречаемость TUNEL-позитивных клеток в тканях глаза интактных животных. Изучение срезов глаза взрослых крыс в группе интактного контроля (группа I) показало, что в конъюнктиве в зоне лимба и эпителии роговицы присутствуют немногочисленные одиночные неравномерно расположенные апоптотические клетки, полностью отсутствующие во всех остальных тканях глаза (рис. 1а, б). ИФС в конъюнктиве контрольных животных была принята в качестве эталона для сравнительной количественной оценки интенсивности апоптотической активности во всех экспериментальных группах. Специфичность реакции TUNEL была

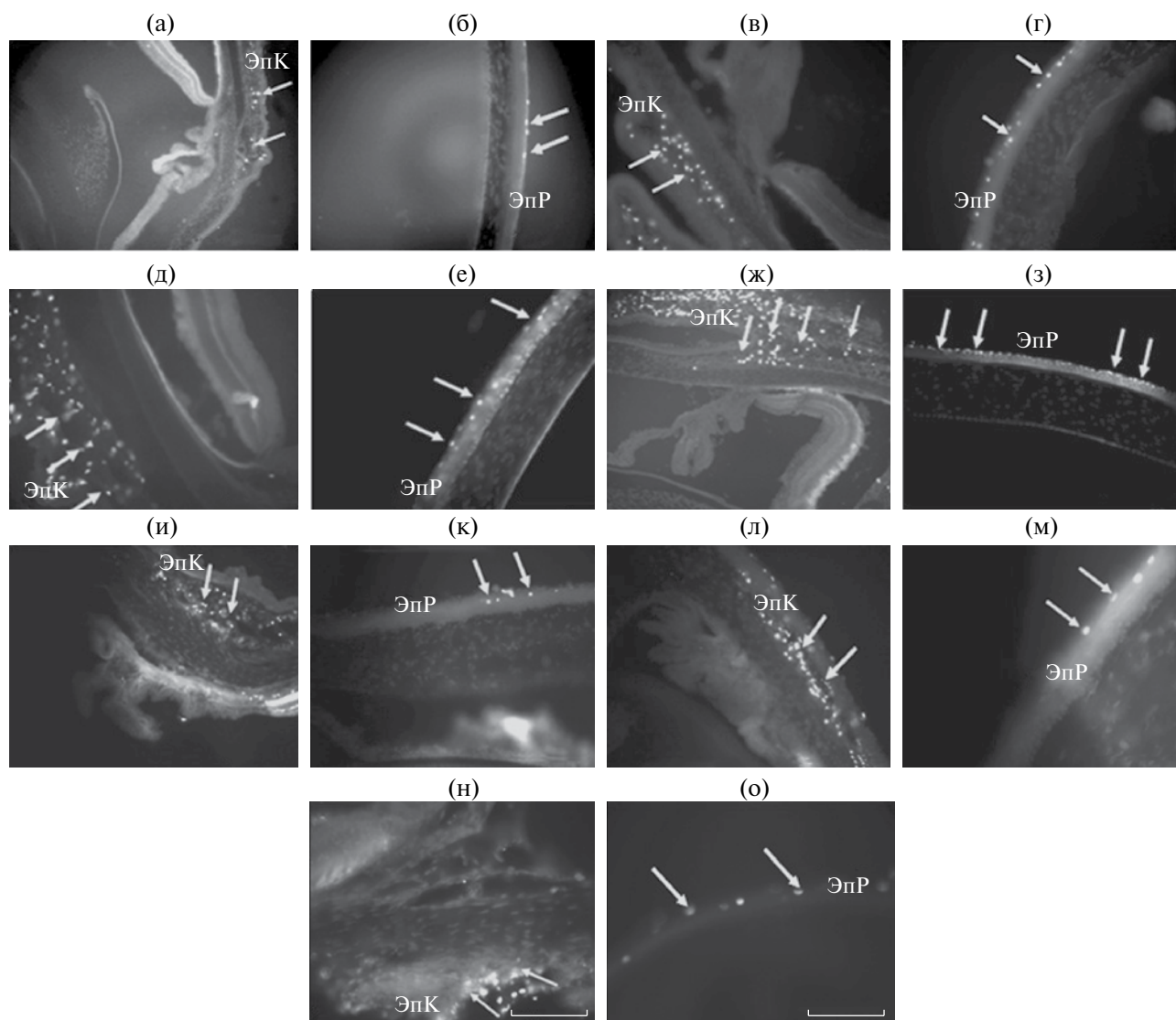


Рис. 1. Апоптотические клетки в конъюнктиве и эпителии роговицы крыс в норме и после экспериментальных воздействий. Стрелки – TUNEL-позитивные клетки в конъюнктиве и эпителии роговицы. Ядра окрашены Hoechst33342. Интактный контроль (а – конъюнктура, б – эпителий роговицы); фиксация после однократной гипоксии: через 1 ч (в – конъюнктура, г – роговица); через 3 ч (д – конъюнктура, е – роговица); двойная гипоксия, фиксация через 3 ч (ж – конъюнктура, з – роговица); профилактическое введение Актипола за 24 ч до гипоксии (и – конъюнктура, к – роговица); лечебное введение Актипола через 1 ч после гипоксии (л – конъюнктура, м – роговица); комбинированное введение Актипола за 24 ч до и через 1 ч после гипоксии (н – конъюнктура, о – роговица). ЭпР – эпителий роговицы, ЭпК – эпителий конъюнктивы; для рис 1, 2, 4. Масштаб: 500 (а, ж) и 200 мкм (б–е, з–о).

подтверждена в опытах с контрольными реакциями на срезах глаза. В реакции, проведенной после предварительной обработки срезов глаза ДНКазой I (положительный контроль), повреждение ДНК (флуоресцентное свечение) наблюдалось во всех тканях глаза: эпителиях роговицы, хрусталика, конъюнктивы, строме, эндотелии роговицы, цилиарном теле глаза, наружном и внутреннем ядерных слоях сетчатки, слое ганглиозных клеток (рис. 2а–г). В то же время в другой контрольной реакции

(отрицательный контроль) без участия фермента терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы TUNEL-позитивных клеток ни в одной из тканей глаза не наблюдали (рис. 2д, е). Полученные с помощью программы Image J средние значения интенсивности флуоресцентного свечения, характерные для каждой группы животных, представлены в виде гистограммы (рис. 3).

Интенсивность апоптоза после однократного сеанса гипоксии. При регистрации результатов че-

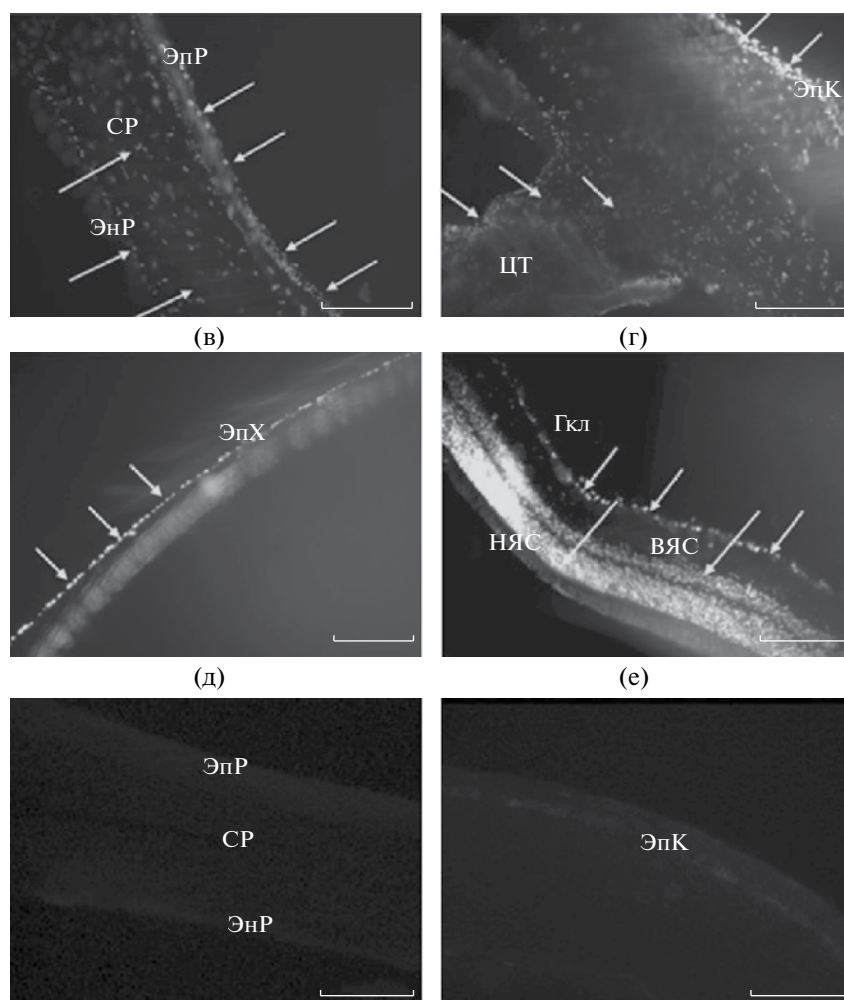


Рис. 2. Локализация апоптотических клеток в тканях глаза крысы в контрольных опытах при оценке методом TUNEL. Стрелки – TUNEL-положительные клетки. а–г – обработка срезов глаза ДНКазой I (положительный контроль): а – роговица, б – конъюнктив, в – хрусталик, г – сетчатка. д–е – TUNEL-реакция без фермента терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (отрицательный контроль): д – роговица, е – конъюнктив. СР – строма роговицы, ЭнР – эндотелий роговицы, ЦТ – цилиарное тело, ЭпХ – эпителий хрусталика, Гкл – ганглиозные клетки сетчатки, НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой сетчатки. Масштаб: 200 мкм.

рез 1 ч (группа II) (рис. 1в, г) и через 3 ч (группа III) (рис. 1д, е) после повреждающего воздействия в конъюнктиве были обнаружены обширные зоны апоптотических клеток на всех срезах. При количественной оценке по степени свечения TUNEL-положительных клеток не было найдено статистических различий между интактной контрольной группой I и группой II (рис. 3). Однако между группами I и III статистические различия были значимыми ($p < 0.05$) (рис. 3). В отличие от конъюнктивы в эпителии роговицы в обеих подопытных группах увеличенное число апоптотических клеток обнаруживалось не на всех серийных срезах. Возможно, это связано с более поздним по сравнению с конъюнктивой вступлением клеток роговицы в апоптоз.

Профилактическое защитное действие ПАБК на конъюнктиву. При парабульбарном введении

Актипола за 24 ч до однократного сеанса гипоксии и регистрации результата через 3 ч после гипоксии (группа IV) апоптотическая активность в клетках конъюнктивы по степени свечения достоверно не отличалась от таковой в интактном контроле (рис. 3). Этот результат позволяет заключить, что Актипол оказывает профилактическое защитное действие, сохраняя состояние апоптотического процесса в клетках конъюнктивы на уровне, характерном для интактного контроля (рис. 1и, к; рис. 3).

Лечебное действие ПАБК на конъюнктиву. При исследовании лечебного действия Актипола на конъюнктиву (группа V) препарат вводили через 1 ч после однократного сеанса гипоксии, а результат регистрировали через 3 ч после повреждающего воздействия (рис. 1л, м). Согласно оценке степени

ИФС TUNEL + клеток, отн. ед.

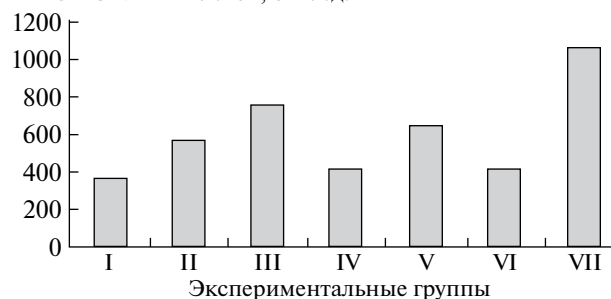


Рис. 3. Интенсивность флуоресцентного свечения (ИФС) в клетках конъюнктивы крысы в норме и после экспериментальных воздействий.

I – контроль (ИФС 362.5), II – гипоксия, фиксация через 1 ч (ИФС, 565.6), III – гипоксия, фиксация через 3 ч (ИФС, 750.8), IV – введение парааминобензойной кислоты: до гипоксии (ИФС, 415.8), V – после гипоксии (ИФС, 650.3), VI – до и после гипоксии (ИФС 407.5), двойная гипоксия (ДГ, ИФС 1060.5).

свечения апоптотических клеток группа V статистически не отличается от группы II, но ее значение достоверно ниже такового в группе III (рис. 3). Этим подтверждается вывод о протекторном действии Актипола, останавливающего дальнейшее накопление апоптотических клеток на стадии его введения в организм.

Исследование комбинированного защитного и лечебного действия ПАБК на конъюнктиву. В этом опыте Актипол вводили за 24 ч до однократного воздействия гипоксии. Через 1 ч после воздействия гипоксии животным повторно вводили Актипол (группа VI). Результаты регистрировали через 3 ч после воздействия гипоксии (рис. 1н, о). Оценка по степени свечения апоптотических клеток в конъюнктиве показала, что между группой интактного контроля (группа I) и группой с комбинированным действием Актипола (группа VI) нет статистически достоверных различий (рис. 3). На основе этих результатов закономерен вывод, что наибольшее эффективное защитное действие в условиях гипобарической гипоксии оказывает профилактическое введение Актипола.

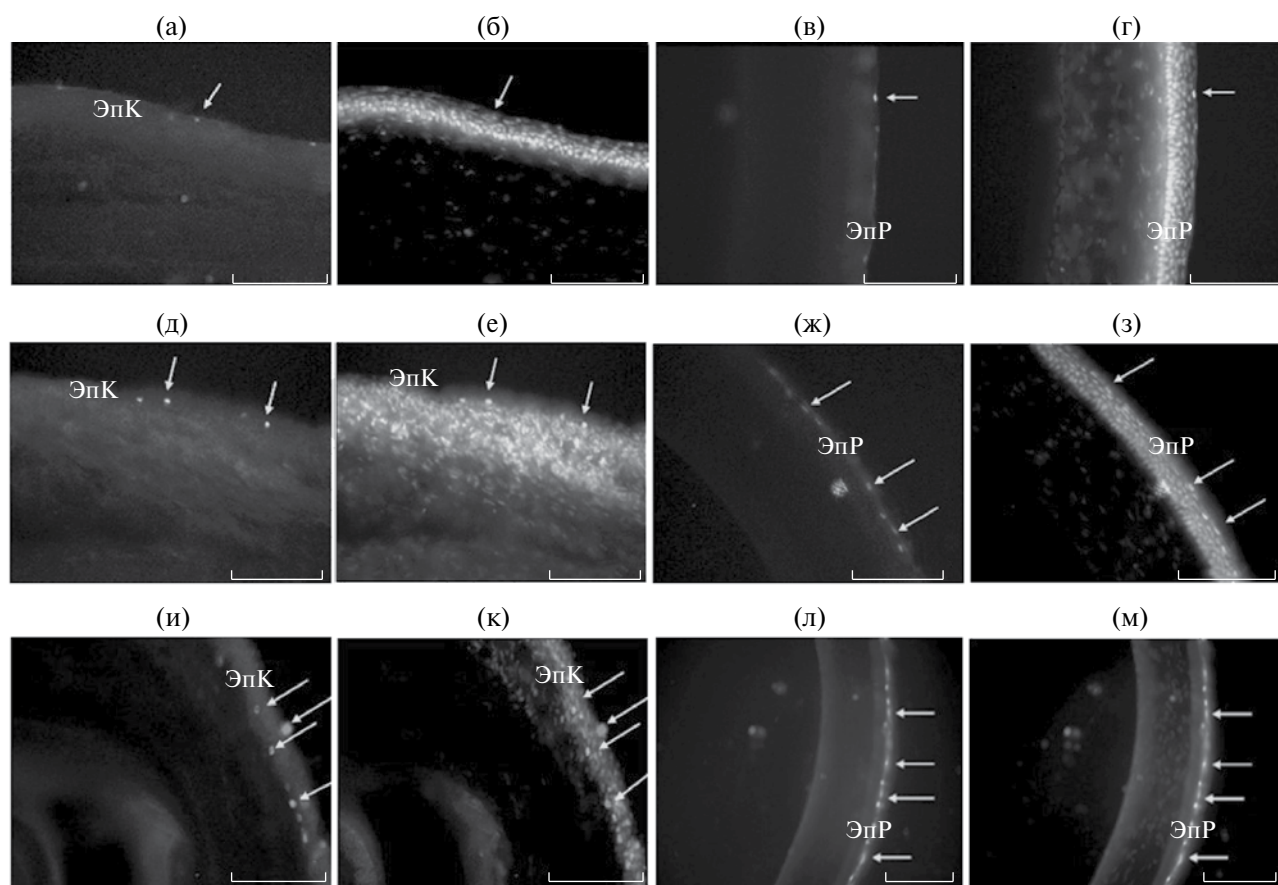


Рис. 4. Локализация фосфорилированного гистона pH3 в эпителиях конъюнктивы (а, б) и роговицы (в, г) крысы в норме и после сеансов гипоксии. Стрелки – pH3-позитивные клетки. а, в, д, ж, и, л – иммунофлуоресцентная реакция; б, г, е, з, к, м – с окрашиванием ядер Hoechst 33342. а, б, а также в, г – соответственно конъюнктив и роговица в интактном контроле; д, е, а также ж, з – через 3 ч после однократной гипоксии; и, к, а также л, м – через 3 ч после двукратной гипоксии. Масштаб: 500 (а–к) и 200 мкм (л, м).

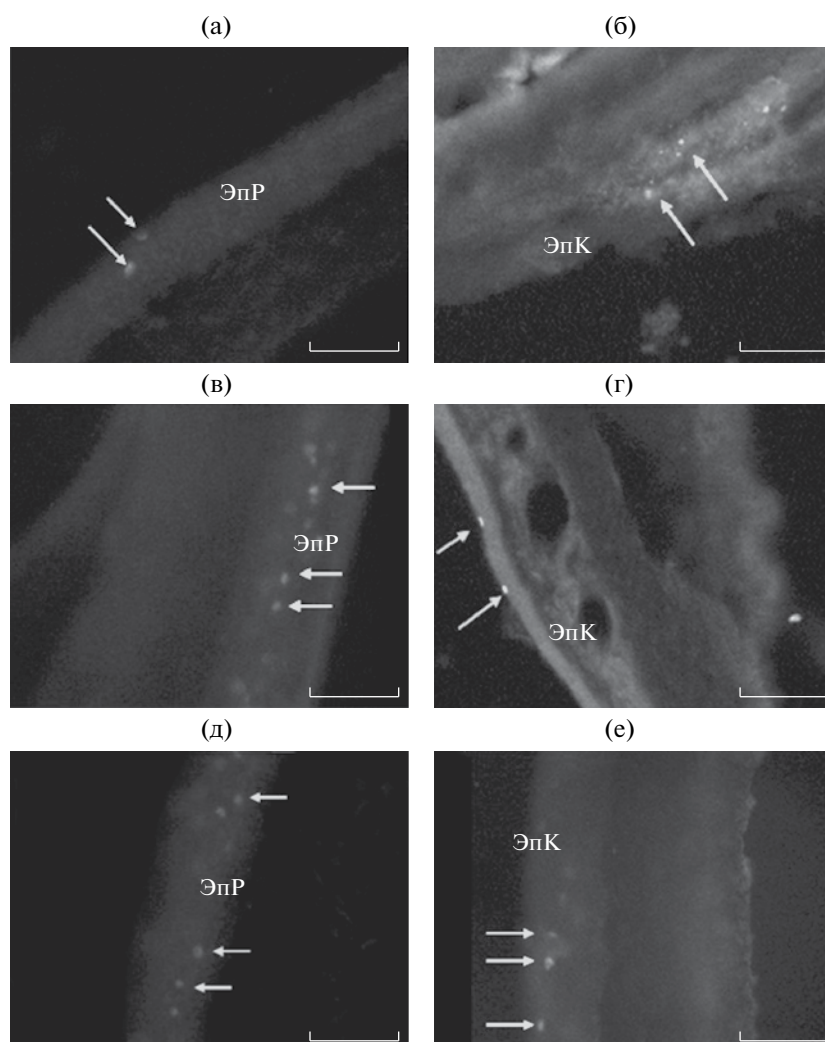


Рис. 5. Локализация фосфорилированного гистона γ -H2AX в эпителиях конъюнктивы (б) и роговицы (а) глаза крысы в норме, после однократной гипоксии (в, г), и после двукратной гипоксии (д, е). Стрелки – γ -H2AX-позитивные клетки. Масштаб: 500 мкм.

Двукратный сеанс гипоксии. В этой группе опытов дополнительный сеанс гипоксии был осуществлен через 1 ч после первого сеанса (группа VII). В результате был подтвержден феномен избирательного поражения покровных тканей переднего отрезка глаза. В конъюнктиве при двойном сеансе гипоксии интенсивность свечения TUNEL-позитивных клеток резко возросла (рис. 1ж) по сравнению с таковой в интактном контроле и при однократной гипоксии (рис. 1а, в, д; рис. 3). В эпителии роговицы после однократного сеанса гипоксии TUNEL-позитивные клетки встречались только на отдельных срезах, а при двойной гипоксии ярко светящиеся TUNEL-позитивные клетки обнаруживались на всем протяжении эпителия роговицы, на всех срезах. При этом апоптотическое поражение в эпителиальных клетках роговицы сопровождалось усилением митотической активности,

выявляемой по локализации рНЗ (рис. 4). В роговице наблюдали заметное возрастание числа рНЗ-позитивных клеток после двукратной гипоксии по сравнению с нормой.

Интенсификация восстановительных процессов в эпителии роговицы не ограничивалась повышением пролиферативной активности. Изменения, вызванные двойной гипоксией, затрагивали также восстановление двухцепочечных разрывов ДНК, выявляемых по локализации фосфорилированного гистона γ -H2AX (рис. 5). В роговице наблюдали возрастание по сравнению с нормой числа γ -H2AX-позитивных клеток после действия гипоксии.

Итак, двойное действие гипоксии, увеличивая фракцию TUNEL-позитивных апоптотических клеток в эпителии роговицы, также влечет за собой заметную интенсификацию восстановительных

процессов, в первую очередь клеточной пролиферации. Увеличение числа иммунопозитивных рНЗ-клеток в эпителии роговицы при действии двойной гипоксии четко контрастирует с их низким содержанием в интактном контроле и в опытах с однократной гипоксией. Обнаруженные различные реакции клеток конъюнктивы и эпителиальных клеток роговицы по времени вступления в апоптоз и цикл пролиферации позволяют предположить различный статус кинетики клеточных популяций в этих обновляющихся системах. Этот феномен, однако, нуждается в дальнейшем изучении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было показано, что тотальное действие острой гипобарической гипоксии *in vivo* у взрослых крыс вызывает избирательное первичное поражение клеток конъюнктивы и эпителиальных клеток роговицы при отсутствии апоптотических клеток в других тканях глаза (Акберова и др., 2016).

Предположение о том, что увеличение дозы гипобарической гипоксии (группа IV) при воздействии на крыс *in vivo* может вызвать массовое появление апоптотических клеток также в тканях заднего отдела глаза, не подтвердилось. Однако увеличение дозы гипоксии интенсифицировало степень апоптотического поражения в конъюнктиве и эпителии роговицы, но не привело к появлению апоптотических клеток в тканях заднего отрезка глаза. Это позволяет сделать вывод, что избирательное первичное повреждение тканей переднего отдела глаза — специфическая характеристика данного типа гипоксии.

Различная чувствительность тканей переднего и заднего отрезков глаза к действию острой гипобарической гипоксии в данной работе подтвердилась, но то, что связано это только с их различным пролиферативным статусом в настоящее время, утверждать преждевременно. Эпителий конъюнктивы и роговицы относится к типу обновляющихся клеточных популяций, в которых процессы пролиферации и апоптоза в норме представляют собой строго уравновешенную систему, обеспечивающую поддержание нормальной структуры и функции органа зрения (Haskjold *et al.*, 1988). Известно, что гибель клеток по пути апоптоза может приводить к активации систем, направленных на восстановительные процессы (Herz *et al.*, 2006), что мы и наблюдали в роговице крысы в опыте с двойным действием гипоксии (группа VII). Нарушение такого баланса при более длительном и жестком повреждении может стать причиной развития различных патологий.

Полученные результаты выводят проблему за рамки первоначально поставленных задач, привлекая внимание к изучению молекулярных механизмов соотношения процессов пролиферации и апоптоза на данной модели в анализируемых условиях гипоксии. Примеры апоптозиндуцируемой пролиферации были обнаружены в эволюционном ряду от планарий до млекопитающих (Kawamoto *et al.*, 2016; Fogarty, Bergmann, 2017). Показано, что апоптозиндуцируемая пролиферация может оказаться критической для активации стволовых клеток при регенерации тканей (Li *et al.*, 2010; Ryoo, Bergmann, 2012; Mollereau *et al.*, 2013). В реализацию процесса апоптозиндуцируемой пролиферации вовлечены белки стресса (Kim *et al.*, 2006; Portt *et al.*, 2011), секретируемые погибающими клетками проапоптотические белки — каспазы (Fan, Bergmann, 2008; Smith-Bolton *et al.*, 2009), протеинкиназы (Matsuzawa, Ichijo, 2005).

Подвергающиеся апоптозу клетки глаза как в нормальном онтогенезе, так и при патогенезе высвобождают ряд митогенов, активирующих постмитотические клетки. В качестве кандидатов митогенных сигнальных белков, продуцируемых клетками, подвергающимися апоптозу, рассматриваются SHH, VEGF, TGF- β , PGE, JNK, WNT, BMP (Fan, Bergmann, 2008; Bianchi *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014). Важную роль в запуске каскада сигнальных путей и активации факторов транскрипции, регулирующих апоптоз и апоптозиндуцируемую пролиферацию клеток, играют реактивные формы кислорода (Diwanji, Bergmann, 2017). Так, индуцируемый УФ-облучением апоптоз в эпителии конъюнктивы человека, сопровождающийся повышением активности генов комплекса AP-1 (*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*), приводит к продукции реактивных форм кислорода, которые активируют интерлейкины, в частности интерлейкин-11 (IL-11). Это приводит к возрастанию уровня экспрессии в клетках эпителия конъюнктивы МАРК-киназы-38 (Mitogen-Activated Protein Kinase). Разворачивающиеся на этом фоне молекулярные процессы в конечном итоге реализуются в компенсаторной пролиферации на фоне гибели эпителиальных клеток (Tomoyori *et al.*, 2015). Однако развитие компенсаторной пролиферации, вероятно, характеризуется селективностью действия в разных условиях, что зависит от типа ткани, кинетики клеточного цикла. Как клетки-мишени “распознают” специфический клеточный и молекулярный контекст и оперируют различными пролиферативными механизмами в ответ на апоптотический стресс, пока остается неизвестным. Однако реактивация клеточного цикла требует согласованной работы сигнальных путей и регуляторных факторов, стимулированных апоптотическими клетками, и зависит от условий гипоксии. Исследования роли регуляторных

факторов в решении проблемы гипоксия—глаз заслуживают пристального внимания, особенно с учетом данных об участии гипоксии в патогенезе и регенерации тканей глаза.

Задача исследования, связанная с поиском средства защиты глаза от повреждающего воздействия гипоксии, была успешно решена. Удалось показать, что Актипол купирует процесс дальнейшего развития апоптоза на стадии введения лекарственного препарата. При предварительном введении Актипол предотвращает процесс развития апоптоза, сохраняя его на уровне интактного контроля. При этом стабилизация оказывается настолько “прочной”, что гипоксия через 24 ч после введения препарата не увеличивает степень апоптотического поражения. Результаты исследования позволяют предполагать, что механизмы защитного и лечебного действия Актипола надо искать в его взаимодействии с разными этапами развития апоптотического процесса в связи с проблемой апоптоз-индуцируемой пролиферации, что заслуживает дальнейшего изучения.

Полученные результаты в совокупности с имеющимися в литературе данными (Строева, Панова, 1999; Акберова и др., 2001) приводят к заключению, что ПАБК в форме лекарственного препарата Актипола выступает в качестве эпигенетического регулятора восстановительных процессов в обновляющихся клеточных популяциях. Применение Актипола как защитного и лечебного средства предоставляет возможность оптимизировать состояние поверхностных тканей глаза в повреждающих условиях гипоксии, поддерживая его на уровне физиологической нормы.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБР РАН при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-01114).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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 // Докл. РАН. 2016. Т. 467. № 6. С. 718–720.
- Акберова С.И., Мусаев Галбинур П.И., Строева О.Г., Магомедов Н.М., Бабаев Н.Ф., Галбинур А.П. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксипина в роговице и хрусталике (экспериментальные исследования) // Вестн. офтальмологии. 2001. № 4. С. 25–29.
- Полежаев Л.В. Факторы регенерации нерегенерирующих органов и тканей // Вестн. РАН. 2000. Т. 70. № 7. С. 597–603.
- Строева О.Г., Панова И.Г. Регуляция митотической активности в роговице крыс при защитном и лечебном действии парааминобензойной кислоты в опытах с рентгеновским облучением // Изв. РАН. Сер. биол. 1999. № 5. С. 613–616.
- Bianchi E., Scarinci F., Grande C., Plateroti R., Plateroti P., Plateroti A.M., Fumagalli L., Capozzi P., Feher J., Artico M. Immunohistochemical profile of VEGF, TGF- β and PGE in human pterygium and normal conjunctiva: experimental study and review of the literature // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2012. V. 25. P. 607–615.
- Diwanji N., Bergmann A. The beneficial role of extracellular reactive oxygen species in apoptosis-induced compensatory proliferation // Fly. 2017. V. 11. № 1. P. 46–52.
- Fan Y., Bergmann A. Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye // Dev. Cell. 2008. V. 14. P. 399–410.
- Fan Y., Wang S., Hernandez J., Yenigun V.B., Hertlein G., Fogarty C.E., Lindblad J.L., Bergmann A. Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in *Drosophila* // PLoS Genet. 2014. 10(1): e1004131. doi: org/10.1371/journal.pgen.1004131
- Fogarty C.E., Bergmann A. Killers creating new life: caspases drive apoptosis-induced proliferation in tissue repair and disease // Cell Death Diff. Adv. 2017. doi: 10.1038/cdd.2017.47.
- Grimm Ch., Willmann G. Hypoxia in the eye: A two-sided coin // High Altitude Med. Biol. 2012. V. 13. № 3. P. 169–175.
- 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 Ophthalmol. 1988. V. 66. P. 533–537.
- Herz H.M., Chen Z., Scherr H., Lackey M., Bolduc C., Bergmann A. VPS25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis // Development. 2006. V. 133. P. 1871–1880.
- Ishikawa K., Yoshida S., Kadota K., Nakamura T., Niino H., Arakawa S., Yoshida A., Akashi K., Ishibashi T. Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. P. 4307–4319.
- Kawamoto Y., Nakajima Yu.-I., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 2144. doi:10.3390/ijms17122144.
- Kim E.-K., Park J.D., Shim S.-Y., Kim H.-S., Kim B.I., Choi J.-H., Kim J.E. Effect of chronic hypoxia on proliferation, apoptosis, and HSP70 expression in mouse bronchiolar epithelial cells // Physiol. Res. 2006. V. 55. P. 405–411.
- 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. Neurol.* 1998. V. 152. P. 278–291.
- Li F., Huang Q., Chen J., Peng Y., Roop D.R., Bedford J.S., Li C.Y. Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration // *Sci. Signal.* 2010. V. 3: ra13.
- Liu J., Narasimhan P., Lee Y.-S., Song Y.S., Endo H., Yu F., Chan P.H. Mild hypoxia promotes survival and proliferation of SOD2-deficient astrocytes via c-Myc activation // *J. Neurosci.* 2006. V. 26 (16). P. 4329–4337.
- Lou Y., Oberpriller J.C., Carlson E.C. Effect of hypoxia on the proliferation of retinal microvessel endothelial cells in culture // *Anat. Rec.* 1997. V. 248. № 3. P. 366–373.
- Matsuzawa A., Ichijo H. Stress-responsive protein kinase in redox-regulated apoptosis signaling // *Antioxidant Redox Signal.* 2005. V. 7. № 3 (4). P. 472–481.
- Mollereau B., Perez-Garijo A., Bergmann A., Miura M., Gerlitz O., Ryoo H.D., Steller H., Morata G. Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification // *Cell Death Diff. Adv.* 2013. V. 20. № 181. doi:10.1038/cdd.2012.82.
- Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T. Anti-apoptosis and cell survival: A review // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2011. V. 1813 (1). P. 238–259.
- Ryoo H.D., Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer // Cold Spring Harbor Press. *Perspect Biol.* 2012. 4: a008797.
- Smith-Bolton R.K., Worley M.I., Kanda H., Hariharan I.K. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. P. 797–809.
- Tomoyori E., Uda Y., Tsuji M., Sasaki A., Kizaki J., Oyama H., Toju A., Tsuchiya H., Murayama M., Kudo Y., Oguchi K. Apoptosis-induced proliferation in UV-irradiated human conjunctival epithelial cells // *J. Med. Sci.* 2015. V. 27. № 3. P. 193–203.

The Effect of Paraaminobenzoic Acid on the Processes of Apoptosis in the Conjunctiva and Epithelium of the Cornea of the Adult Rats *in vivo*, after Hypobaric Hypoxia

Yu. V. Markitantova^{1*}, S. I. Akberova², A. A. Ryabtseva³, O. G. Stroeveva¹

¹Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, ul. Vavilova, 26

²Medical Center “MEDKVADRAT”, 115409 Moscow, Kashirskoe sh., 74 korp. 1

³Moskovsky Regional Clinical Research Institute, 129110 Moscow, ul. Schepkina, 61/2

*E-mail: yuliya.mark@gmail.com

The initial processes of apoptotic damage in the renewing cell populations of the conjunctiva and epithelium of the cornea in adult rats under experimental conditions of acute hypobaric hypoxia *in vivo* and the effect of para-aminobenzoic acid in the form of the drug Actipol (0.007% ПАБК) on this process were studied. Under double hypoxia sessions, an increase of apoptotic DNA damage in cells was observed. It was accompanied by an intensification of restorative processes evaluated on the expression of phosphorylated histone pH3 – marker of mitotic cells and phosphorylated histone γ H2AX – DNA repair marker. It was established that parabolbar injection of Actipol 24 hours before hypoxia arrested the development of the apoptotic process in the conjunctiva have been keeping it at the physiological normal level, thereby providing a protective effect under conditions of hypoxia.