

DOI: 10.34921/amj.2022.4.022

Musayev P.İ.¹, Markitantova Yu.V.², Babayev X.F.³,
Ryabtseva A.A., Əkbərova S.İ.⁴**GÖZ ALMASI TOXUMALARINDA HİPOKSIYA İLƏ
İNDUKSIYA OLUNMUŞ APOPTOZ**¹Azərbaycan Tibb Universitetinin Oftalmologiya kafedrası, Bakı, Azərbaycan;²REA Koltsov adına İnkişaf Biologiyası İnstitutu, Moskva, RF;³Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası A.İ. Qarayev ad. Fiziologiya İnstitutu, Bakı, Azərbaycan;⁴“MedKvadrat” Tibb Klinikası, Moskva, RF

Xülasə. Məqalədə kəskin hipoksik hipoksiyanın və kəskin hipobarik hipoksiyanın göz toxuması hüceyrələrinə təsirini öyrənmək məqsədilə aparılmış tədqiqat işi haqqında məlumat verilmişdir.

Wistar xəttindən olan erkək siçovullardan istifadə edilmişdir (hər qrupda 8 heyvan, cəmi 24 siçovul), tədqiqat obyektləri üç qrupa ayrılmışdır: I qrup – intakt (control), II qrup – hipoksiyadan 1 saat sonra, III qrup – hipoksiyadan 3 saat sonra. Göz toxumalarında apoptotik hüceyrələrin identifikasiyası dondurulmuş göz alması kəsiklərində TUNEL metodu ilə aparılaraq, sonradan Hoechst 33342 nüvə flüoressent boyası ilə əlavə boyanılmışdır. Zədələnmiş hüceyrələrdə flüoressensiyanın lokalizasiyası və intensivliyi Image J kompyuter programından istifadə edilərək flüoressent mikroskop altında müşahidə edilmişdir.

Tədqiqat göstərmişdir ki, heyvanlar kəskin hipobarik hipoksiyaya məruz qaldıqda, yalnız konyunktiva hüceyrələrində və buynuz qişanın ön epitelində ilkin apoptotik zədələnmə törənir. Ancag modelləşdirilmiş kəskin hipoksik hipoksiya şəraitində konyunktivanın, buynuz qişa epitelinin, həmçinin xorioid və tor qişanın fotoreseptor təbəqəsinin də apoptotik zədələnməsi müşahidə edildi.

Beləliklə, müxtəlif üsullarla törədilmiş hipoksiya zamanı yetkin siçovullarda gözün müxtəlif hissələrində göz toxumasının hüceyrələri apoptotik zədələnməyə fərqli həssaslıqla cavab verir.

Açar sözlər: kəskin hipoksiya, göz, apoptoz

Ключевые слова: острая гипоксия, глаз, апоптоз

Key words: acute hypoxia, eye, apoptosis

Мусаев П.И.¹, Маркитантова Ю.В.², Бабаев Х.Ф.³,
Рябцева А.А., Акберова С.И.⁴**ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ В ТКАНЯХ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА**¹Азербайджанский медицинский университет, кафедра офтальмологии, г. Баку,
Азербайджан;²Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва, РФ;³Институт физиологии им. А.И.Караева национальной академии наук Азербайджана, Баку,
Азербайджан;⁴Медицинская клиника «МедКвадрат», Москва, РФ

Представлены результаты экспериментального исследования проведенного с целью изучения влияния острой гипоксической гипоксии и острой гипобарической гипоксии на клетки тканей глаза у взрослых крыс.

В каждом эксперименте с острой гипоксической гипоксии и острой гипобарической гипоксии было использовано 24 (в каждой группе по 8 животных) самцов крыс линии Wistar (в каждом эксперименте 16 глаза, всего 48 глаз), разделенных на 3 групп: I группа – интактный контроль, II группа – через 1 час после гипоксии, III группа – через 3 часа после гипоксии. Идентификацию апоптотических клеток в тканях глаза проводили методом TUNEL на замороженных срезах глаза с дополнительным окрашиванием ядерным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Локализацию

и интенсивность флуоресцентного свечения в поврежденных клетках анализировали под флуоресцентным микроскопом с использованием компьютерной программы Image J.

Исследование показало, что при воздействии острой гипобарической гипоксии обнаружено избирательное первичное апоптотическое повреждение клеток конъюнктивы и переднего эпителия роговицы. А в условиях моделируемой острой гипоксической гипоксии наблюдалось апоптотическое поражение конъюнктивы, эпителия роговицы, хориоидеи и фоторецепторного слоя сетчатки.

Клетки различных отделов глаза взрослых крыс характеризуются разной чувствительностью в отношении апоптотического повреждения при моделируемой острой гипоксии.

Гипоксия стоит в ряду серьезных факторов внешней среды повреждающих органа зрения, с которыми современный человек сталкивается в повседневной жизни. Это связано, прежде всего, с негативным влиянием некоторых производств, последствием природных катастроф и антропогенных факторов. Гипоксия играет важную роль в патогенезе синдрома сухого глаза, наследственных, дистрофических, ишемических, воспалительных, инфекционных и других заболеваний глазного яблока [1,2]. При гипоксии нарушаются условия поддержания нормального метаболизма и функционирования клеток, что может приводить к их гибели. При многих заболеваниях глаза у человека: глаукоме, катаракте, диабетической ретинопатии, дистрофии сетчатки наблюдается гибель клеток по механизму апоптоза [3-5].

Экспериментальные исследования влияния гипоксии на апоптотический гибель клеток проводились на отдельных тканях глаза, в условиях *in vitro*. Так, в культуре очищенных ганглиозных клеток сетчатки крыс, а также кератоцитах роговицы показано, гипоксия индуцирует апоптоз в этих клетках [6,7].

Цель работы – исследование влияния острой гипоксической гипоксии и острой гипобарической гипоксии на ткани глаза взрослых крыс при разных экспериментальных моделях гипоксии *in vivo*.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 24 половозрелых самцах крыс *Wistar*, в возрасте 3-4 месяцев. В каждом эксперименте использовано 8 крыс (16 глаз): I группа – интактный контроль (8 крыс); II группа – после гипоксии через 1 час (8 крыс); III – группа (8 крыс) – после гипоксии через 3 часа. Контрольные животные (8 крыс) действительно гипоксии не подвергались. Глаза животных опытных групп исследовали через 1 и 3 часа после гипоксии.

Экспериментальное моделирование острой гипоксической гипоксии. В опыт-

ной группе животных подвергали однократному воздействию острой гипоксической гипоксии. Гипоксия достигалась путем замещения воздуха азотом в герметической камере объемом 0,12 м³, где помещались подопытные животные, в течение 7-10 минут – до возникновения судорог. Глаза животных из опытной группы анализировали через три часа после гипоксического воздействия. Контрольная группа животных, не подвергавшихся гипоксии, содержалась в условиях комнатной температуры. Животных из обеих групп выводили из эксперимента, путем наркотизации в эфире, после чего у крыс из обеих групп энуклировали глаза, проводили их гистологическое исследование, а также анализировали распределение в тканях глаза апоптотических клеток.

Экспериментальное моделирование острой гипобарической гипоксии. В опытной группе животные были подвергнуты однократному действию острой гипоксии, которая достигалась путем откачивания воздуха в течении 1 мин до достижения давления в барокамере 180 мм ртутного столба. В этих условиях крысы находились в течении 3 мин до появления судорог. Результаты опытов регистрировали через 3 ч после гипоксии. Животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (“Riedel-de-Haen”, Германия) с последующей евтаназией парами эфира до выхода животных из наркоза. У подопытных и контрольных крыс энуклировали глаза.

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. Для выявления апоптоза в тканях глаза применяли традиционный метод TUNEL (Terminal desoxynucleotidyl

transferase – mediated desoxyuridine triphosphate (UTP) – nick end – labeling), используя набор реагентов «DeadEnd Fluorometric TUNEL System» (Promega Corporation, USA).

Гистологическое исследование. Материал для световой микроскопии обрабатывался общепринятыми гистологическими методами. Для гистологического анализа глаза крыс фиксировали в жидкости Буэна, заливали в парафин и использовали для приготовления срезов согласно стандартному протоколу [8]. Срезы толщиной 7 мкм приклеивали на стекла с адгезивным покрытием (Silane-Prep Slides, Sigma) и после депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты исследовали под световым микроскопом фирмы Leica (Германия).

Подготовка материала и проведение реакции мечения ДНК по методу TUNEL.

Глаза фиксировали в 4%-ном нейтральном формалине, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 4 ч. Затем образцы отмывали в фосфатном буфере, в трех сменах фосфатного буфера с 5% сахарозой, трех сменах фосфатного буфера с 10% сахарозой, затем 20% сахарозой (в каждом растворе по 15 минут) и оставляли на ночь в фосфатном буфере с 20% сахарозой при 4°C. После замораживания глаз в специальной среде (Tissue-Tec OCT, Leica, Германия), с помощью криостата (Leica M1900, Германия), были получены поперечные срезы глазного яблока и отобраны для анализа. Толщина срезов составляла 12 мкм.

Мечение фрагментированной ДНК по методу TUNEL проводили по протоколу фирмы-производителя. Перед проведением энзиматической реакции, срезы отмывали в 0,1 М PBS, фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 5 минут, затем отмывали от фиксатора в 0,1 М PBS трижды в течение 5 минут. Реакцию проводили в течение часа при температуре 37°C, затем реакцию останавливали путем отмывания срезов в 2-х кратном растворе SSC. Для подтверждения специфичности реакции, также проводили стандартную контрольную реакцию в отсутствие фермента rTdT. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342, разведенном в 0,1 М PBS (1:1000, Leica, Германия), в течение двух минут. После окрашивания

срезы отмывали в нескольких сменах 0,1 М PBS, по 15 минут в каждом растворе, и заключали в специальную среду для препаратов с флуоресцентной меткой – Vectashield (Vector, США).

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

Результаты исследования. Просмотр отобранных поперечных срезов для выявления апоптотических клеток в тканях глаза отчетливо показал, что в условиях острой гипоксической гипоксии, первичное поражение происходит во всех слоях конъюнктивы, в переднем эпителии роговицы, собственной хориоиде, также в фоторецепторном слое сетчатки (рис.). В динамике отмечается нарастание повреждение клеток путем апоптоза, т. е. через 3 часа после гипоксии отмечается более интенсивное свечение поврежденных клеток, чем через 1 час.

Показано, что моделируемые условия гипоксии, вызывают выраженную реакцию клеток конъюнктивы, в переднем эпителии роговицы и в фоторецепторном слое сетчатки, что приводит к апоптотической гибели значительную их части. Окраска красителем ДНК Hoechst 33342 подтверждает локализацию апоптоза в ядрах клеток. В других тканях глаза – хрусталике, радужке, цилиарном теле, апоптотические клетки отсутствовали при данном типе поражения (рис.). На всех изученных глазах наблюдали одинаковую картину. В исследуемых тканях глаза животных из контрольной группы (без воздействия гипоксии) встречались лишь единичные апоптотические клетки в конъюнктиве и в переднем эпителии роговицы. В контрольной группе животных в хрусталике, радужке, цилиарном теле и сетчатке апоптотические клетки отсутствовали. В контрольных препаратах, служивших отрицательным контролем для

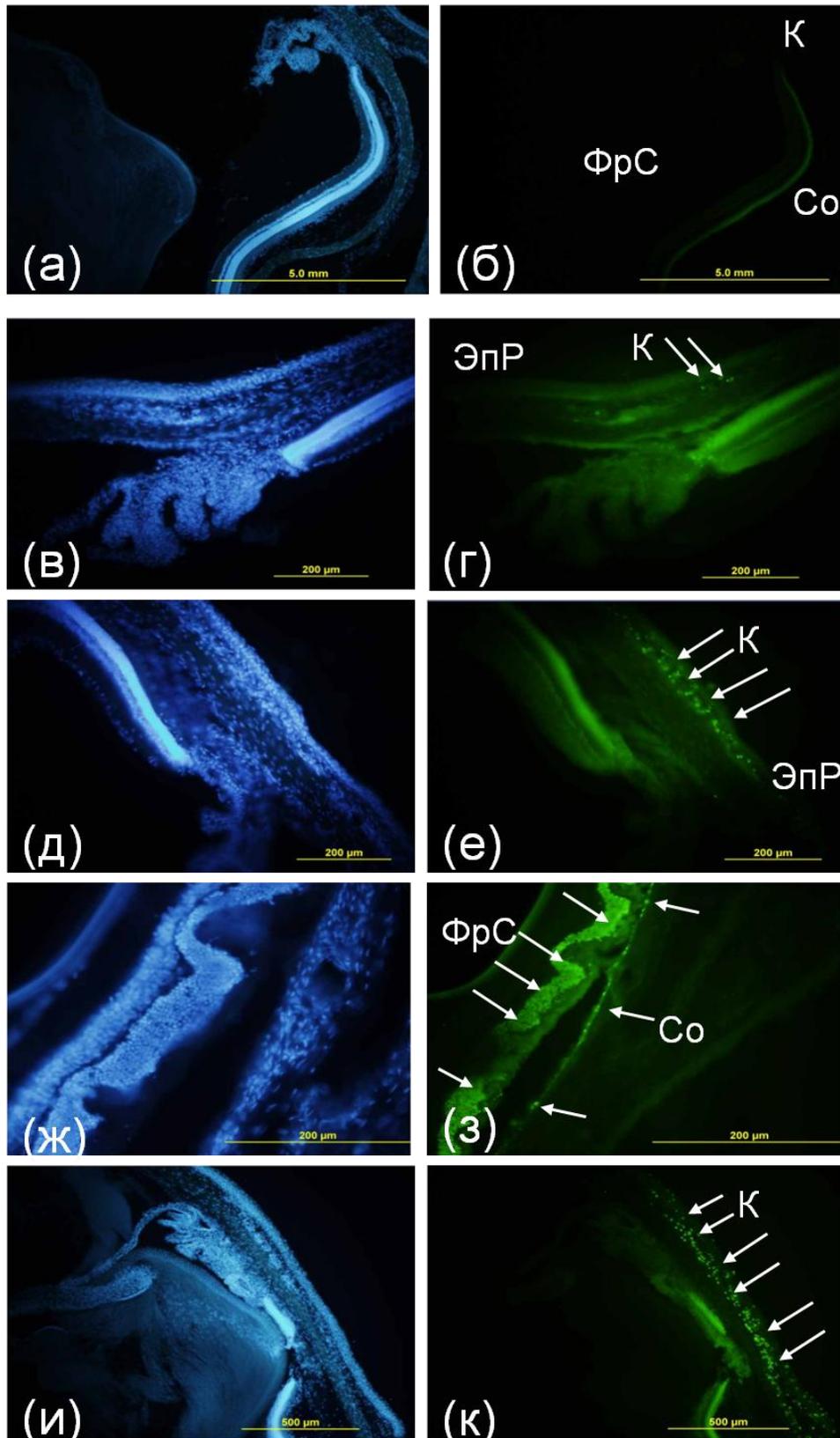


Рис. Апоптотические клетки в тканях глаза крыс в норме и после экспериментальной гипоксии. Стрелки – TUNEL-положительные клетки в конъюнктиве и эпителии роговицы. Ядра окрашены Hoechst33342. Интактный отрицательный контроль: (а,б); интактный контроль конъюнктивы (в,г); фиксация после однократной гипоксии: через 1 ч конъюнктивы (д,е), сетчатки (ж,з); фиксация через 3 ч, конъюнктивы (и,к). ЭпР – эпителий роговицы, К – конъюнктивы; ФрС – фоторецепторный слой сетчатки; Со – сосудистая оболочка (хориоидея). Масштаб: 200 (а-е), 500 мкм (ж-з).

подтверждения специфичности реакции в опыте, меченых клеток не наблюдали (рис.).

Таким образом, при острой гипоксической гипоксии в моделируемых в настоящей работе условиях вызывает интенсивный процесс фрагментации ДНК и апоптоза в клетках тканей передней поверхности глаза, собственной хориоидеи и фоторецепторном слоя сетчатки.

При острой гипобарической гипоксии мы обнаружили однотипную, избирательную локализацию клеток с поврежденной ДНК переднем эпителии роговицы и в конъюнктиве (рис.). Эти клетки были подвергнуты апоптозу, что было подтверждено окрашиванием срезов глаза флюоресцентным ДНК-связывающим красителем Hochest 33342. В динамике отмечается нарастание повреждение клеток путем апоптоза, т. е. через 3 часа после гипоксии отмечается более интенсивное свечение поврежденных клеток, чем через 1 час.

В исследуемых тканях глаза животных из контрольной группы (без воздействия гипоксии) встречались лишь единичные апоптотические клетки. В хрусталике, радужке, цилиарном теле, хориоидеи и сетчатке апоптотические клетки отсутствовали, как в опытной так и в контрольной группе. В контрольных препаратах, служивших отрицательным контролем для подтверждения специфичности реакции в опыте, меченых клеток не наблюдали (рис.).

Обсуждение. Острая гипоксия моделируемые в настоящей работе вызывает интенсивный процесс фрагментации ДНК и апоптоза в клетках тканей передней поверхности глаза – конъюнктивы и переднем эпителии

роговицы. В отличие от острой гипобарической гипоксии, при гипоксической гипоксии также происходит апоптотическое поражение собственной хориоидеи и сетчатки. Острая гипоксия в условиях настоящих экспериментов в хрусталике, радужке, цилиарном теле не происходит апоптотические изменения клеток, т. е. они остаются не поврежденными. Таким образом, клетки различных отделов глаза взрослых крыс характеризуются разной чувствительностью к моделируемой в настоящем исследовании гипоксии.

Полученные нами результаты открывают дальнейшие перспективы экспериментальных исследований механизмов патологии тканей глаза, в условиях гипоксии разного генеза. Учитывая роль апоптоза в патогенезе патологий поверхности глаза и сетчатки, на данных экспериментальных моделях возможно исследование фундаментальных механизмов эффективности определенных лекарственных препаратов в лечении заболеваний глаза.

ВЫВОДЫ

1. Острая гипобарическая гипоксия вызывает интенсивный процесс фрагментации ДНК и апоптоза только в клетках тканей передней поверхности глаза – конъюнктивы и переднем эпителии роговицы;
2. Острая гипоксическая гипоксия вызывает интенсивный процесс фрагментации ДНК и апоптоза в клетках тканей передней поверхности глаза – конъюнктивы и переднем эпителии роговицы, хориоидеи и сетчатке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chao H.M., Chuang M.J., Liu J.H., Liu X.Q., Ho L.K., Pan W.H., Zhang X.M., Liu C.M., Tsai S.K., Kong C.W., Lee S.D., Chen M.M., Chao F.P. Baicalein protects against retinal ischemia by antioxidation, antiapoptosis, downregulation of HIF-1 α , VEGF, and MMP-9 and upregulation of HO-1 // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2013. V. 29. № 6. P. 539-549
2. Xu H., Chen M., Forrester J.V. Para-inflammation in the aging retina // *Prog. Retin. Eye Res.* 2009. V. 28. P. 348-368
3. Cervellati F., Cervellati C., Romani A., Cremonini E., Sticozzi C., Belmonte G., Pessina F., Valacchi G. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells // *Free Radic. Res.* 2014. V. 48. № 3. P. 303-312
4. Kaur C., Foulds W.S., Ling E.A. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage // *Clinic. Ophthalmol.* 2008. V. 2. № 4. P. 879-889.
5. Saccà S.C., Izzotti A. Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye // *Prog. Brain Res.* 2008. V. 173. P. 385-407
6. Unterlauff J.D., Claudepierre T.M., Müller K., Yafai Y., Wiedemann P., Reichenbach A., Eichler W. Enhanced

survival of retinal ganglion cells is mediated by Müller glial cell-derived PEDF // Exp. Eye. Res. 2014. V. 127. P. 206-214

7. Yang X., Wei A., Liu Y., He G., Zhou Z., Yu Z. IGF-1 protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by activating the Erk-1/2 and Akt pathways // Mol. Vis. 2013. V. 19. P. 1901-1912
8. Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O. Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Retinal Apoptosis in Ischemic Proliferative Retinopathy // The J. of Neuroscience. 2002. 22. № 10. P. 3987-3993

**Musaev P.I.¹, Markitantova Y.V.², Babaev Kh.F.³,
Ryabtseva A.A., Akberova S.I.⁴**

HYPOXIA-INDUCED APOPTOSIS IN THE TISSUES OF EYEBALL

¹*Azerbaijan Medical University, Department of Ophthalmology, Baku*

²*Institute of Developmental Biology named after N.K.Koltsova RAS,*

³*Institute of Physiology named after A.I.Karaev of the National Academy of Sciences of Azerbaijan,*

⁴*Medical clinic "MedKvadrat"*

Summary. The article provides information about the study of the effects of acute hypoxic hypoxia and acute hypobaric hypoxia on eye tissue cells in rats. In each experiment with acute hypoxic hypoxia and acute hypobaric hypoxia (24 eyes in each experiment, 48 eyes in total), 16 male Wistar rats (8 animals in each group, 24 rats in total) were used and divided into 3 groups: Group I - intact control, group II - 1 hour after hypoxia, group III - 3 hours after hypoxia. Identification of apoptotic cells in the eye's tissues was performed by the TUNEL method on frozen eye sections with additional staining with nuclear fluorescent dye Hoechst 33342. The localisation and intensity of fluorescent emission in damaged cells were analysed under a fluorescent microscope using Image J software.

When exposed to acute hypobaric hypoxia, selective primary apoptotic damage to the conjunctiva cells and the cornea's anterior epithelium was found. But under conditions of simulated acute hypoxic hypoxia, apoptotic damage to the conjunctiva, corneal epithelium, choroid and photoreceptor layer of the retina was observed. Cells of different parts of the eye of adult rats are characterised by different sensitivity to apoptotic damage in acute hypoxia modelled in this study.

Автор для корреспонденции:

Акперова Севиндж Исмаил кызы, Медицинская клиника «МедКвадрат», Москва

E-mail: seving_@mail.ru