УДК 617.7-001.15

ФОТОПОВРЕЖДЕНИЕ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Фахранурова Л.И.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино, e-mail: LFakhranurova@gmail.com

Проведено исследование действия однократного облучения в ультрафиолетовой и синей части спектра на жизнеспособность эпителиальных клеток роговицы глаза кролика в условиях ***in vitro***. Проведенное нами исследование показало, что даже небольшая доза облучения приводит к ингибированию внутриклеточных процессов и понижению регенеративных возможностей клеток, что выражается в уменьшении жизнеспособности клеток по данным МТТ-теста. При наибольших дозах происходит угнетение всех жизненных функций клеток, что отражается не только в данных МТТ-теста, но и полученных доказательствах дисфункции митохондрий. Выяснилось, что при облучении в синей и УФ части спектра происходит выработка АФК, что подтверждает данные об угнетении функций митохондрий. Были получены доказательства того, что необходимо защищать ткани глаза от малых доз облучения в этой части спектра.

Ключевые слова: роговица глаза, световое повреждение, клеточная выживаемость, активные формы кислорода

PHOTODAMAGE OF THE CORNEA CELLS IN VITRO

Fakhranurova L.I.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Puschino, e-mail: LFakhranurova@gmail.com

The effect of single irradiation in the ultraviolet and blue parts of the spectrum on the viability of epithelial cells of the cornea of the rabbit eye in vitro was studied. Our study showed that even a small dose of irradiation leads to inhibition of intracellular processes and a decrease in the regenerative capacities of cells, which is expressed in a decrease in the viability of cells according to the MTT test. At the highest doses, all vital functions of the cells are suppressed, which is reflected not only in data of MTT test, but also in the evidence of mitochondrial dysfunction. It was found that irradiation in the blue and UV part of the spectrum produced ROS, which confirms data on the inhibition of mitochondrial functions. Evidence has been obtained that it is necessary to protect the eye tissues from small doses of radiation in this part of the spectrum.

Keywords: cornea cells, photodamage, cell viability, reactive oxygen species

Роговица – часть наружной капсулы глаза, она подвергается воздействию всех неблагоприятных факторов внешней среды [3]. Вероятность повреждения роговицы резко возрастает при воздействии излучений с длиной волны короче 400 и длиннее 1200 нм, т.е. в УФ и ИК частях спектра. Повреждение УФ-излучением в естественных условиях встречается у альпинистов, жителей высоких широт и горных областей при длительном пребывании или передвижении по местности, покрытой снегом. В этом случае увеличивается риск развития снежной офтальмии [1].

Глаз особенно уязвим для окислительного стресса, поскольку он не содержит защитных слоев кератина, которые присутствуют в коже. В частности, роговица и конъюнктива подвергаются более высоким уровням УФ и более высоких парциальных давлений кислорода, чем большинство других тканей. Ассортимент заболеваний, связанных с УФ-излучением, включает окулярную плоскоклеточную неоплазию, катаракту и птеригиум. Иногда на основе птеригиума может развиваться окулярная поверхностная плоскоклеточная неоплазия и инвазивная плоскоклеточная карцинома. Птеригиум считается потенциально предраковым состоянием, сходным с состоянием солнечного кератоза кожи, которое может прогрессировать до плоскоклеточной карциномы [10].

Действие УФ при длине волны равной 270 нм связано с поглощением нуклеиновых кислот. У эпителиальных клеток роговицы УФ-А ингибирует митоз, вызывает ядерную фрагментацию [6–8].

Согласно данным статистики, из всех больных, приходящих на амбулаторный прием, у каждого четвертого имеется заболевание роговицы. Социальное значение болезней роговицы объясняется не только высокой частотой развития, но и длительностью лечения, частыми рецидивами, а также снижением остроты зрения.

Несмотря на большое количество работ, посвященных влиянию УФ-радиации, до сих пор остаются не раскрытыми молекулярные механизмы и механизмы влияния на отдельные функции клетки. В своей работе мы рассмотрели влияние облучения в УФ и синей части спектра на жизнеспособность эпителиальных клеток роговицы.

Материалы и методы исследования

Исследование *in vitro* проводили с использованием клеточной линии SIRC – культуры эпителиальных клеток роговицы кролика (из российской коллекции клеточных культур позвоночных). Клетки культивировали в среде ДМЕМ/F12 (1:1) (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO_2. Наблюдение за морфологией, подсчет клеток и микрофотосъемка проведены с использованием инвертированного микроскопа LEITZ DMIL (Германия) и люминесцентного микроскопа «Axiovert» 200 (Германия).

Облучение клеток

Клеточная культура облучалась через сутки после посева. Предварительно перед облучением происходила замена среды на среду без сыворотки. Облучение клеток проводилось с помощью лабораторного осветителя ДРШ (Россия) (100 мВт/см^2), излучение которого составляет в области 300–600 нм.

Спектральные характеристики светофильтров и световые потоки, получающиеся при их использовании, определяли с помощью автоматизированного спектрометрического комплекса на базе монохроматора МДР-41 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия) в диапазоне от 200 нм до 1000 нм, а энергетические характеристики определяли с помощью пиранометра CMP-3 (Kipp & Zonen, Нидерланды), обладающего постоянной спектральной чувствительностью в диапазоне от 310 нм до 2800 нм.

МТТ-тест

Определение жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде (ДМСО). Количество образовавшегося формазана, определяемое колориметрическим методом после его растворения в ДМСО, характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов в клеточных культурах.

Через сутки после облучения вносили по 10 мкл эффектора – раствора МТТ (5мг/мл в растворе DMEM/F12). После инкубирования в темноте в течение 3 часов при 37ºС в увлажненной атмосфере 5% CO2 жидкость удаляли, вносили по 100 мкл ДМСО. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм в лунках 96-луночного планшета с помощью фотометра (BIO-RAD, США).

Наблюдение за конфлюентностью клеток

Ежедневно измерялась конфлюентность клеток – метод оценки клеточного роста (Система Cloneselect™ Imager, BioVitrum).

Измерение внутриклеточных активных форм кислорода (АФК)

После облучения клетки отмывали PBS, далее в каждую лунку вносили эффектор – раствор H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate acetyl ester; Molecular Probes) (2 мкл H2DCFDA на 10 мл PBS). После инкубирования в течение 45 мин измерялась флуоресценция с помощью Tecan (Япония).

Анализ влияния на митохондриальный потенциал

Через сутки после облучения митохондриальный потенциал был проанализирован с помощью окраски JC1.

Анализ клеточной выживаемости

Клеточная жизнеспособность была проанализирована с помощью набора LIVE/DEAD Kit (Molecular Probes). Флуоресценция живых/мертвых клеток была зарегистрирована на люминесцентном микроскопе «Axiovert» 200 (Германия).

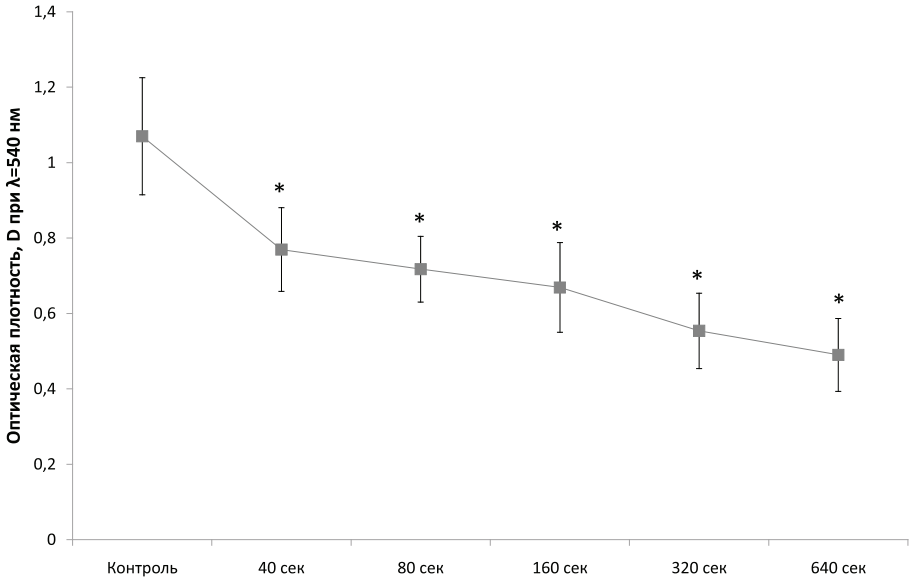


Рис. 1. Результаты выживаемости клеток SIRC по данным МТТ-теста в зависимости от продолжительности облучения. M ± sem, p ≤ 0,05 t-test

Результаты исследования и их обсуждение

Облучение культивируемых клеток роговицы влияет на жизнеспособность клеток по данным МТТ-теста (рис. 1). Как оказалось, даже кратковременное облучение приводит к снижению жизнеспособности клеток на 28 %. Почти наполовину (на 54 %) падают показатели жизнеспособности при наибольшей временной экспозиции.

Известно, что эпителиальные клетки роговицы должны размножаться с достаточной скоростью, чтобы заменить умирающие или поврежденные клетки [5]. Облучение культивируемых эпителиальных клеток роговицы влияло на плотность клеточной культуры в течение всего периода наблюдений (рис. 2). Во всех временных экспозициях наблюдалось ингибирование роста клеток. Облучение даже незначительной дозой облучения заметно ингибировало деление клеток. При облучении свыше 160 с рост клеток так и не возобновился в течение всего наблюдаемого времени. В клетках роговицы имеется эффективный механизм репарации, световые повреждения редко долговременны, поэтому данное наблюдаемое ингибирование роста клеток скорее всего устранялось после периода наблюдений [2].

Внешний вид клеток, облученных солнечным светом в присутствии и в отсутствие фильтров, представлен на рис. 3. Флуоресцентный краситель SYTO 9 окрашивает все клетки в зеленый цвет, иодид пропидия окрашивает ядра погибших клеток в красный цвет, что позволяет подсчитать процент гибели клеток под воздействием облучения.

Облучение максимальной временной экспозицией приводит к повреждению клеток. Изменяется морфология клеток, клетки становятся более «ошаренными», большое количество клеток имеет перфорированные поврежденные мембраны (рис. 3, левая колонка), по сравнению с контролем.

Известно, что коротковолновый свет в диапазоне от 400 до 480 нм максимально поглощается хромофорами, расположенными в митохондриях [9]. Облучение клеток приводило к дисфункции митохондрий (рис. 4). Митохондриальный мембранный потенциал является важным показателем метаболической активности клеток. Отличительной особенностью ранних стадий запрограммированной клеточной смерти является нарушение активных митохондрий. Нарушение функций митохондрий включает в себя изменения мембранного потенциала и изменения окислительно-восстановительного потенциала митохондрий.

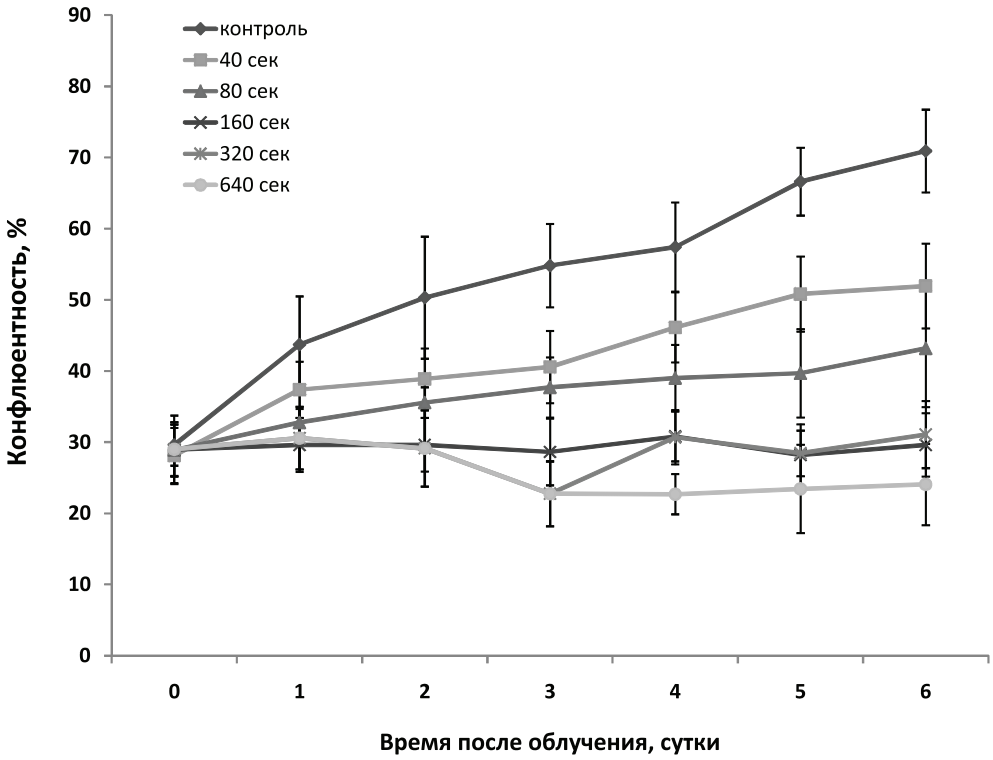
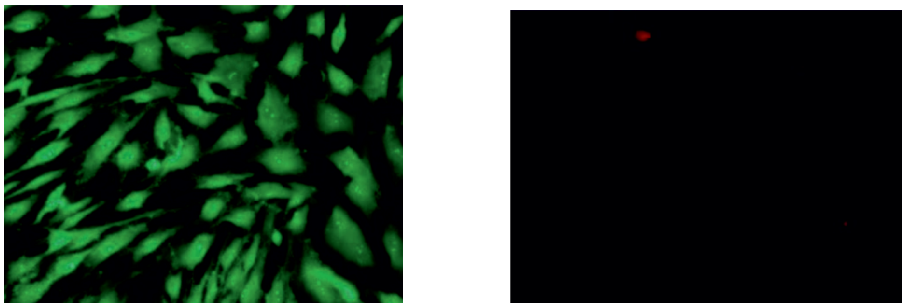


Рис. 2. Результаты конфлюентности клеток SIRC в зависимости от продолжения облучения. M ± sem, p ≤ 0,05 t-test

контроль



640 с

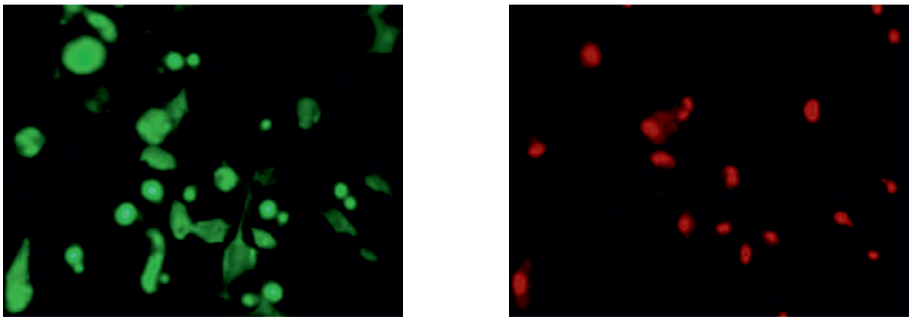
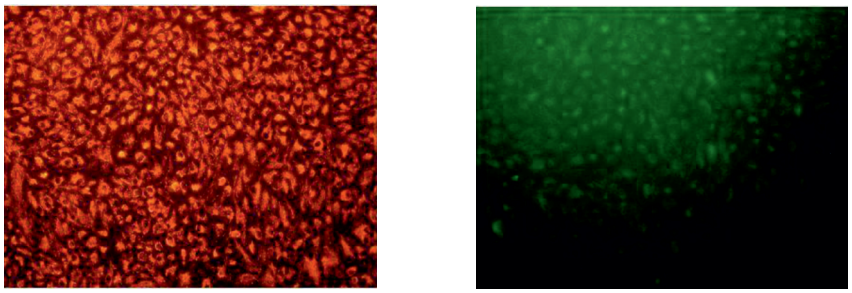


Рис. 3. Окрашивание CYTO эпителиальных клеток роговицы. Левая колонка – зеленым светятся живые клетки, правая колонка – красным светятся мертвые ядра

контроль



640 с

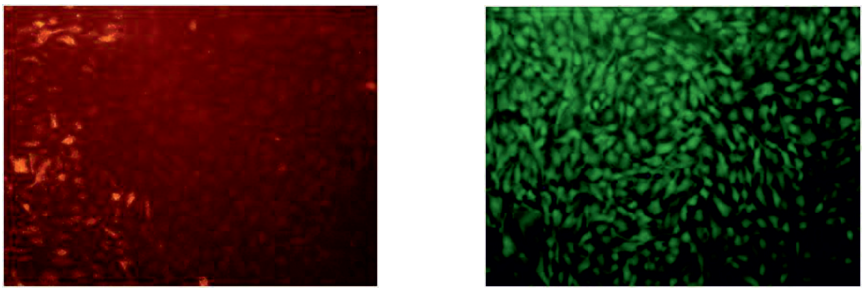


Рис. 4. Результаты окрашивания JC1 эпителиальных клеток роговицы. Левая колонка – области высокой митохондриальной поляризации отмечены красной флуоресценцией, обусловленной образованием J-агрегатов красителем. Правая колонка – деполяризованные области обозначены зеленой флуоресценцией мономеров JC-1. Представлены контроль и наибольшая временная экспозиция (640 с)

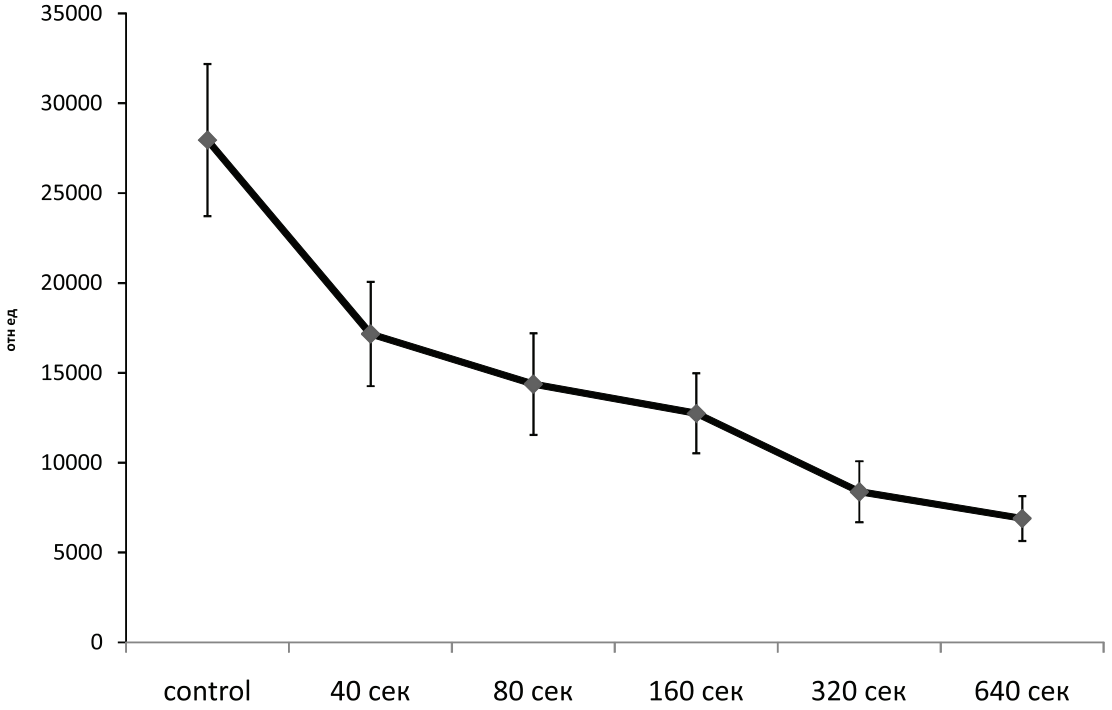


Рис. 5. Результаты облучения на генерацию АФК. M ± sem, p ≤ 0,05 t test

Источником АФК при нормальных условиях могут быть различные процессы, к которым можно отнести побочные продукты деятельности дыхательной цепи, НАДФН оксидазы, ксантин оксидазы и оксигеназы арахидоновой кислоты [4]. При облучении клеток добавляется еще один источник свободных радикалов – это радиолиз воды. Однако, по мнению многих исследователей, самым значительным из них является митохондриальная дыхательная цепь.

Как видно из рис. 5, генерация АФК с увеличением временной экспозиции падает. Несмотря на то, что образование АФК зависит от митохондриального мембранного потенциала и очевидно, что с его увеличением количество АФК генерируемых митохондрий должно увеличиваться. Однако мы получили обратные результаты, что подтверждает наши данные, что при облучении происходит гибель клеток (см. рис. 1).

Заключение

Таким образом, облучение в УФ и синей части спектра вызвало угнетение жизненно важных функций клеток эпителия роговицы. Насущной является задача изыскания средств защиты глаз от светового повреждения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Московской области в рамках научного проекта № 17-44-500740 и Гранта Президента МК-1880.2017.7.

Список литературы

1. Преображенский П.В., Шостак В.И., Балашевич Л.И. Световые повреждения глаз. – Л.: Медицина, 1986. – 200 с.

2. Dillon J. The photophysics and photobiology of the eye // J. Photochem. Photobiol. B.: Biol. – 1991. – № 10. – P. 23–40.

3. Huo YN, Chen W, Zheng XX. ROS, MAPK/ERK and PKC play distinct roles in EGF-stimulated human corneal cell proliferation and migration // Cell Mol Biol. – 2015. Nov 8;61(7). – P. 6–11.

4. Gendron S.P., Mallet J.D., Bastien N., Rochette P.J. Mitochondrial DNA common deletion in the human eye: A relation with corneal aging // Mech. Ageing Dev. 133. – 2012. – P. 68–74.

5. Gillardon F., Zimmermann M., Uhlmann E. Expression of c-Fos and c-Jun in the cornea, lens, and retina after ultraviolet irradiation of the rat eye and effects of topical antisense oligodeoxynucleotides // British J of Opth. – 1995. – № 79. – P. 277–281.

6. Kolozsvari L., Nogradi A., Hopp B., Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400- nm range // Inv Opth & Vis Sci. – 2002. – vol. 43. № 7. – P. 2165–2169.

7. Moriyama M., Moriyama H., Uda J., Kubo H., Nakajima Y., Goto A., Morita T., Hayakawa T. BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis // Cell Death and Disease. – 2017. – № 8. e2576.

8. Schein O.D. Phototoxicity and the cornea // J Natl Med Assoc. – 1992 Jul; 84(7): 579–83.

9. Schon E.A., Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction // J Clin Invest. 2003. Feb;111(3). 303–12.

10. Wlodarczyk J., Whyte P., Cockrum P., Taylor H. Pterygium in Australia: a cost of illness study // Clin Exp Ophthalmol. 2001. Dec; 29(6). 370-5.