

# Влияние осмопротекторов на гиперосмолярный стресс в культуре эпителиальных клеток роговицы человека

*Rosa M. Corrales, MD, Lihui Luo, MD, Eliseu Y. Chang, MD,  
and Stephen C. Pflugfelder, MD*

**Цель.** Установлено, что повышенная осмолярность слезы при синдроме сухого глаза стимулирует продукцию воспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ в поверхностных эпителиальных клетках глаза. Прокариоты и клетки систем органов млекопитающих поддерживают нормальную функцию в гипертоических условиях путем синтеза или накопления веществ-осмопротекторов. В данном исследовании изучены эффекты осмопротекторов на состояние активации митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) в эпителиальных клетках роговицы человека, инкубированных в гиперосмолярных условиях.

**Методы.** Эпителиальные клетки роговицы человека инкубировали в средах с изотонической физиологической осмолярностью (300 мОсм) и гиперосмолярных (400 мОсм) в присутствии и отсутствии осмопротекторов, в том числе некоторых аминокислот (L-карнитина и бетаина), глицерина и полиола эритрита. Фосфорилированные (активированные) состояния с-Jun N-терминальных киназ (JNK) и p38 МАПК отслеживали с помощью Вестерн-блоттинга и методов иммуноанализа на гранулах.

**Результаты.** Гиперосмолярные состояния, достигнутые путем добавления хлорида натрия или сахарозы, повышали отношения фосфорилированных JNK и p38 к общему количеству JNK и p38. По сравнению с контролем добавление 10 мМ L-карнитина или 40 мМ эритрита значительно снижало уровни активированных МАПК при гиперосмолярном стрессе. Эти вещества также снижали отношения фосфорилированных киназ к общему содержанию киназ до едва различимого уровня в клетках, культивируемых в изотонических средах.

**Выводы.** Осмопротекторы L-карнитин и эритрит, отдельно или при их сочетании, защищали от стрессовой активации эпителиальные клетки роговицы, культивируемые в гиперосмолярных средах.

**Ключевые слова:** эпителиальные клетки роговицы, слезная пленка, гиперосмолярный стресс, L-карнитин, глицерин, полиолы, JNK, p38

Поступило для публикации 6 июня 2007 г., исправленный вариант получен 8 ноября 2007 г. Принято к публикации 15 декабря 2007 г. Статья представлена из Центра поверхности глаза, глазного института Куллена, офтальмологического отделения Бейлоровского медицинского колледжа, Хьюстон, штат Техас. Поддержано неограниченным грантом компании Allergan.

Адрес для запроса отписок: Stephen C. Pflugfelder, Ocular Surface Center, Cullen Eye Institute, Baylor College of Medicine, NC307, 6565 Fannin Street, Houston, TX 77030 (электронная почта: stevenp@bcm.tmc.edu). Авторские права © 2008 принадлежат Lippincott Williams & Wilkins.

**Key Words:** corneal epithelial cells, tear film, hyperosmolar stress, L-carnitine, glycerol, polyols, JNK, p38

(*Cornea* 2008;27:574–579)

Синдром сухого глаза – частое заболевание поверхности глаза – приводит к неровности поверхности роговицы и нечеткости зрения.<sup>1–3</sup> Пациенты жалуются на разнообразные ощущения раздражения или боли. При синдроме сухого глаза повышается число активированных Т-лимфоцитов и снижается число муцин-продуцирующих бокаловидных клеток в конъюнктиве.<sup>4–6</sup> В слезе пациентов с синдромом сухого глаза по сравнению со слезой здорового человека повышено количество провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также повышено содержание матриксной металлопротеиназы 9 (ММП-9).<sup>7–9</sup>

Слезка пациентов с синдромом сухого глаза также имеет значительно повышенную осмолярность, среднее значение которой составляет 343 мОсм (от 306 до 441 мОсм) по сравнению с 302 мОсм у здорового человека.<sup>10</sup> В экспериментальной модели синдрома сухого глаза у мышей стресс обезвоживания повышал среднюю осмолярность слезы до 559 мОсм и вызывал опосредованное Т-лимфоцитами воспаление конъюнктивы, роговицы и слезных желез.<sup>11,12</sup> В этой модельной системе стресс обезвоживания также повышал экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов интерлейкина (IL)-1 и фактора некроза опухолей (TNF)- $\alpha$ , а также мРНК ММП-9 в эпителии роговицы и конъюнктивы.<sup>13,14</sup> Стресс обезвоживания также повышал уровни активированных фосфорилированных форм с-Jun N-терминальных киназ (JNK)1/2, внеклеточных регулируемых киназ (ERK)1/2 и p38 у мышей, всех митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК).<sup>13,14</sup> JNK, ERK и p38 активируются стрессом и осмотическим шоком в других типах клеток.<sup>15–18</sup> Активированные МАПК в конечном счете активируют факторы транскрипции, что приводит к экспрессии воспалительных цитокинов, хемокинов и ММП.<sup>19,20</sup> Местное нанесение метилпреднизолона и доксициклина – препаратов, известных как эффективные лекарства при синдроме сухого глаза<sup>21,22</sup> – снижало экспрессию IL-1, TNF- $\alpha$  и ММП-9, а также снижало степень фосфорилирования JNK1/2, ERK1/2 и p38 у мышей с синдромом сухого глаза.<sup>14</sup>

Местное нанесение гиперосмолярного (500 мОсм) раствора мышам позволило установить, что повышенная осмолярность слезы может повысить уровни активированных

фосфорилированных JNK1/2, ERK1/2 и p38 по сравнению с нанесением изотонического солевого раствора с физиологической осмолярностью (305 мОсм). При этом также повышались уровни IL-1, TNF- $\alpha$  и ММП-9.<sup>23</sup> В эпителиальных клетках роговицы человека, культивируемых в изотонических и гиперосмолярных средах, уровни активированных фосфо-JNK1/2 и ММП, в том числе ММП-9, коррелировали с повышением осмолярности.<sup>24</sup> Повышение фосфо-JNK1/2 можно было заметить уже через 5 минут после добавления хлорида натрия к среде, что свидетельствует о том, что причиной активации JNK1/2 в эпителии человека было повышение осмолярности.<sup>24</sup> Специфический ингибитор JNK1/2 (SB202190) предотвращал повышение экспрессии ММП в гиперосмолярных средах, что указывало на то, что активированные JNK1/2 отвечают за повышение ММП при гиперосмолярной стимуляции.<sup>24</sup> Дальнейшие исследования на клетках эпителия области лимба глаза человека показали, что воздействие гиперосмолярных сред повышало уровни фосфорилированных JNK1/2 и ERK1/2, а также секрецию IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , и IL-8.<sup>25</sup> Такие феномены гиперосмолярно стимулированных повышений содержания провоспалительных цитокинов в клетках человека могли быть ослаблены добавлением специфических ингибиторов JNK1/2 и ERK1/2 (соответственно SB202190 и PD 98059) и добавлением доксициклина.<sup>25</sup>

Эти исследования показали, что гиперосмолярность, вызванная стрессом обезвоживания на модели у мышей, локальным нанесением гиперосмолярного раствора мышам или добавлением хлорида натрия к культуре клеток роговицы человека повышает степень фосфорилирования некоторых МАПК и одновременно усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также ММП. Специфические химические ингибиторы МАПК (т.е. SB202190 и PD 98059) или доксициклин (препарат, эффективный при синдроме сухого глаза) ослабляют эти реакции на гиперосмолярность. В данном исследовании мы изучали эффекты веществ-осмопротекторов на активацию JNK и p38 в культуре эпителиальных клеток роговицы человека гиперосмолярными средами. Осмопротективные эффекты L-карнитина, бетаина и глицерина были ранее показаны в экспериментах на бактериях и дрожжах в условиях осмотического стресса.<sup>26-29</sup> Наши эксперименты показали, что L-карнитин и эритрит также снижают активацию (фосфорилирование) этих МАПК в эпителиальных клетках роговицы человека в гиперосмотических условиях. Это открывает новые возможности для ослабления стимулированной продукции воспалительных медиаторов и протеаз эпителиальными клетками роговицы в условиях повышенной осмолярности внеклеточного окружения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Среда Игла в модификации Дульбекко, эмбриональная бычья сыворотка (FBS), буфер HEPES и среда F12 Хема от GIBCO-BRL (Grand Island, NY). Пластиковые принадлежности от Becton Dickinson (Lincoln Park, NJ). Субъединица А холерного токсина, гидрокортизон и все

другие реактивы для культуры клеток были от Sigma (St Louis, MO). Диметилтиазол дифенилтетразолия бромид (MTT) компании Trevigen (Gaithersburg, MD). Поликлональные кроличьи антитела против ERK и козлий противокроличий иммуноглобулин G, конъюгированной с пероксидазой хрена, от Cell Signaling (Beverly, MA). Кроличье антитело против JNK и моноклональные антитела (mAb) против фосфорилированных JNK (p-JNK) и p-ERK от Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

### Первичные культуры эпителиальных клеток роговицы человека

Ткани роговицы и склер человека от доноров в возрасте 16-59 лет были получены из Lions Eye Bank of Texas (Хьюстон, штат Техас). Эпителиальные клетки роговицы были выращены из лимбальных эксплантатов. Краткое описание: после удаления центральной части роговицы, остатков конъюнктивы и радужки, а также эндотелия роговицы, лимбальное кольцо рассекалось на 12 частей одинакового размера (каждый примерно 2x2 мм). Эти части по две располагали эпителиальной стороной вверх в каждой лунке шестилуночного планшета для культуры ткани, каждый эксплантат покрывали каплей FBS и оставляли на ночь. Эксплантаты культивировали при 37 °C при 5 % CO<sub>2</sub> и 95 %-ной влажности в среде SHERM, содержащей смесь 1:1 среды Игла в модификации Дульбекко и среды F12 Хема с добавлением 5 нг/мл эпидермального фактора роста, 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия, 0,5 мкг/мл гидрокортизона, 30 нг/мл холерного токсина А, 0,5 % диметилсульфоксида и 5 % FBS в течение 12-14 дней до достижения состояния субконфлюэнтности. Среда обновляла каждые 2-3 дня. Фенотип эпителия в этих культурах контролировали по характерной морфологии и иммунофлуоресцентному окрашиванию цитокератиновыми антителами (AE-1/AE-3; ICN, Irvine, CA).

### Инкубация клеток в изотонической и гиперосмолярной средах

Субконфлюэнтные культуры эпителиальных клеток роговицы (выращенные в течение 12-14 дней, примерно 4-5x10<sup>5</sup> клеток на лунку) отмывали три раза фосфатным буферным раствором и инкубировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (EBSS; 300 мОсм) в течение 24 ч перед обработкой. Эпителиальные клетки роговицы культивировали в течение 1 ч в среде EBSS, либо в среде EBSS, гиперосмолярность (400 мОсм) которой обеспечивали добавлением хлорида натрия до конечной концентрации 53 мМ, сахарозы до конечной концентрации 3,85 % или глицерина до конечной концентрации 0,9 %. Осмолярность сред измеряли осмометром парового давления (Model 3300; Advanced Instruments, MA) в основной клинической лаборатории отдела патологии Методической больницы (Хьюстон, штат Техас). В некоторых лунках к среде и клеткам добавляли внутреннюю соль L-карнитина, бетаина гидрохлорид или эритрит за 60 минут до добавления хлорида натрия или сахарозы. Конечный объем во всех культурах после различных добавок составил 2,0 мл.

Адгезивные клетки лизировали в течение 15 минут буфером Beadlyte Buffer B (входит в набор буферов Beadlyte Cell Signaling; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), содержащим таблетку смеси ингибиторов протеаз без ЭДТА (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Экстракты клеток центрифугировали при 12 000g в течение 15 минут при комнатной температуре, и супернатанты хранили при -80 °C до анализа методом Вестерн-блоттинга и Beadlyte Cell Signaling. Общую концентрацию белка в клеточном экстракте определяли с помощью набора для определения белков Micro BCA (Pierce, Rockford, IL).

### Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг выполняли согласно описанию, на каждую дорожку наносили по 50 мкг белка.<sup>13,23 25</sup> После переноса и блокирования полиэфирсульфоновые поливинилиденфторидные мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с кроличьими антителами против суммы JNK1 и JNK2 (разведение 1:1000) и фосфо-JNK1 и фосфо-JNK2 (разведение 1:100; Santa Cruz Biotechnology). Для детекции применяли козлийный противокроличий иммуноглобулин G, конъюгированный с пероксидазой хрена (разведение 1:2000; Cell Signaling) с помощью улучшенного хемилюминесцентного реактива (ECL; Amersham, Piscataway, NJ) с последующим получением и анализом цифрового изображения (Image Station Model 2000R; Eastman Kodak, New Haven, CT).

### Количественное определение фосфорилированных и общих МАПК

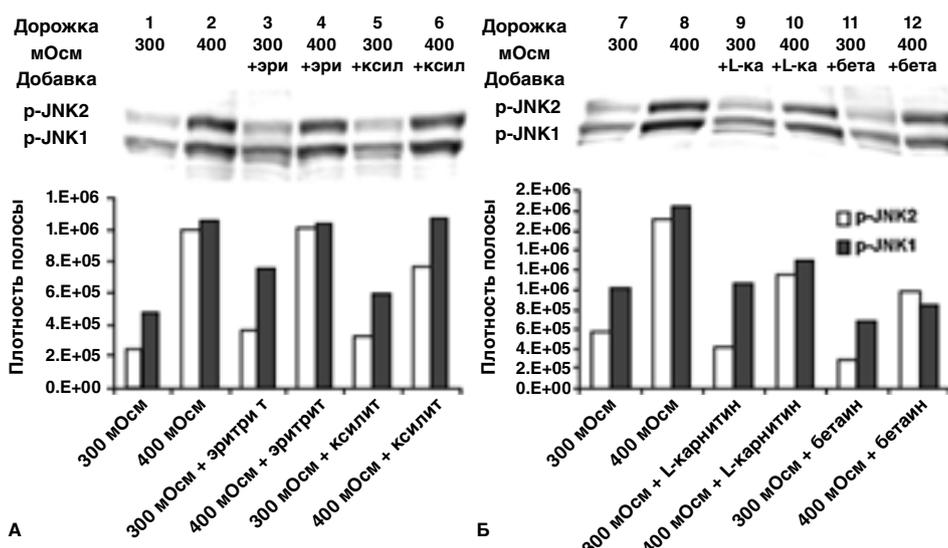
Уровни фосфорилированных МАПК и общих МАПК измеряли с помощью сэндвич-иммуноанализа на гранулах (Upstate Beadlyte Cell Signaling Luminex Assay; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Каждый образец экстракта

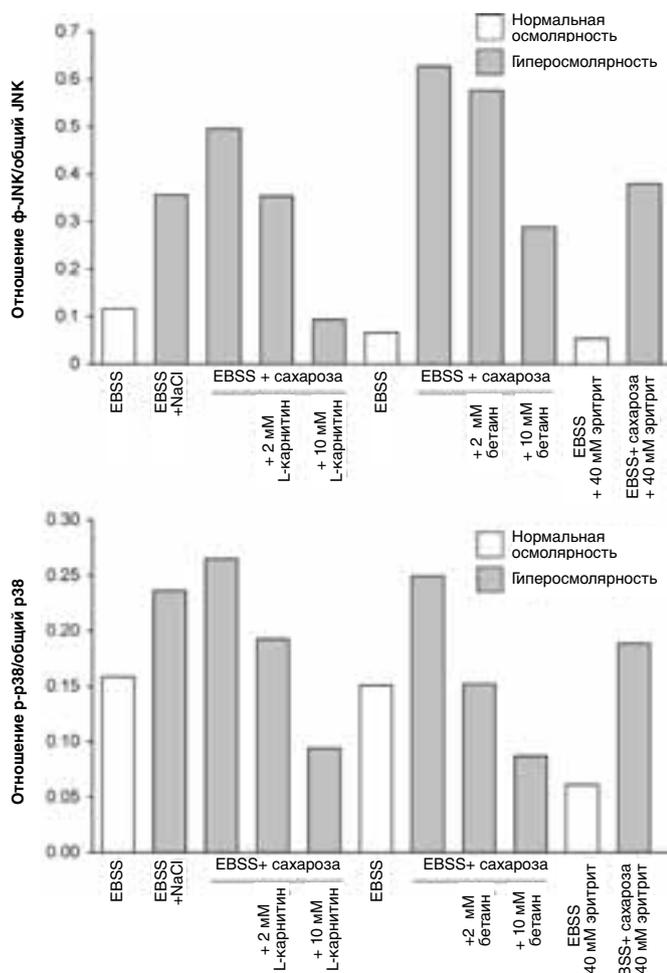
клеток (10 мкг белка в объеме 25 мкл) пипеткой переносили в лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение ночи с 25 мкл разведенных 5X гранул связанными с антителами, специфичными к фосфо-JNK, общим JNK, фосфо-ERK, общим ERK, фосфо-p38 или общим p38. Гранулы промывали и смешивали с биотинилированными репортерными антителами, а затем с стрептавидин-фикоэритрином. Количественное определение общих или фосфо-МАПК выполняли в системе Luminex 100 (Luminex, Austin, TX). Считывали по пятьдесят событий на гранулу. Данные, полученные от программного обеспечения Bio-Plex Manager, экспортировали для дальнейшего анализа в Microsoft Excel. Значения, полученные от холостых образцов, вычитали перед вычислением отношения фосфо-МАПК к общим МАПК. Статистическое сравнение относительных изменений между экспериментальными группами во множественных экспериментах выполняли путем дисперсионного анализа с применением post hoc теста Тьюки (GraphPad, San Diego, CA).

### Определение жизнеспособности клеток с МТТ

Эпителиальные клетки роговицы человека (пассаж 59), трансформированные SV40, высевали с плотностью 10<sup>4</sup> клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение 48 ч в дополнительной гормональной эпидермальной среде (SHEM). Исходную среду культивирования клеток заменяли средой, содержащей следующие осмопротекторы: L-карнитин (2 и 10 мМ), бетаин (2 и 10 мМ), эритрит (20 и 40 мМ), а также смесь L-карнитина и эритрита (10 и 20 мМ каждого) на 24 ч. Добавляли реактив МТТ и через 6 ч измеряли концентрацию формазана с помощью микропланшет-ридера VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

**РИСУНОК 1.** А. Наверху: Вестерн-блот фосфорилированных JNK1/2 из эпителиальных клеток роговицы человека, инкубированных в изотонической изосмолярной среде (300 мОсм) и гиперосмолярной среде (400 мОсм) с добавлением хлорида натрия до конечной концентрации 53 мМ при отсутствии и в присутствии полиолов, эритрита (Ery) или ксилита (Xyli) в конечных концентрациях 2 мМ. Внизу: графики плотностей полос фосфорилированных JNK2 и JNK1 в изображенном сверху Вестерн-блоте. Б, Вестерн-блот фосфорилированных JNK1/2 из эпителиальных клеток роговицы человека, инкубированных в среде с изотонической физиологической осмолярностью (300 мОсм) и средой, гиперосмолярность (400 мОсм) которой достигнута добавлением хлорида натрия до конечной концентрации 53 мМ, с добавлением и без добавления аминокислот L-карнитина и бетаина гидрохлорида до конечных концентраций 2 мМ. Внизу: графики плотностей полос фосфорилированных JNK2 и JNK1 в изображенном сверху Вестерн-блоте.





**РИСУНОК 2.** Отношения фосфорилированных к общим JNK (наверху) и p38 (внизу) МАПК из эпителиальных клеток роговицы человека по данным иммуноанализа на гранулах. Изотоническая физиологическая среда (EBSS) имела осмолярность 300 мОсм, а гиперосмолярная имела осмолярность 400 мОсм. Следует отметить, что шкалы осей ординат различны на разных графиках.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

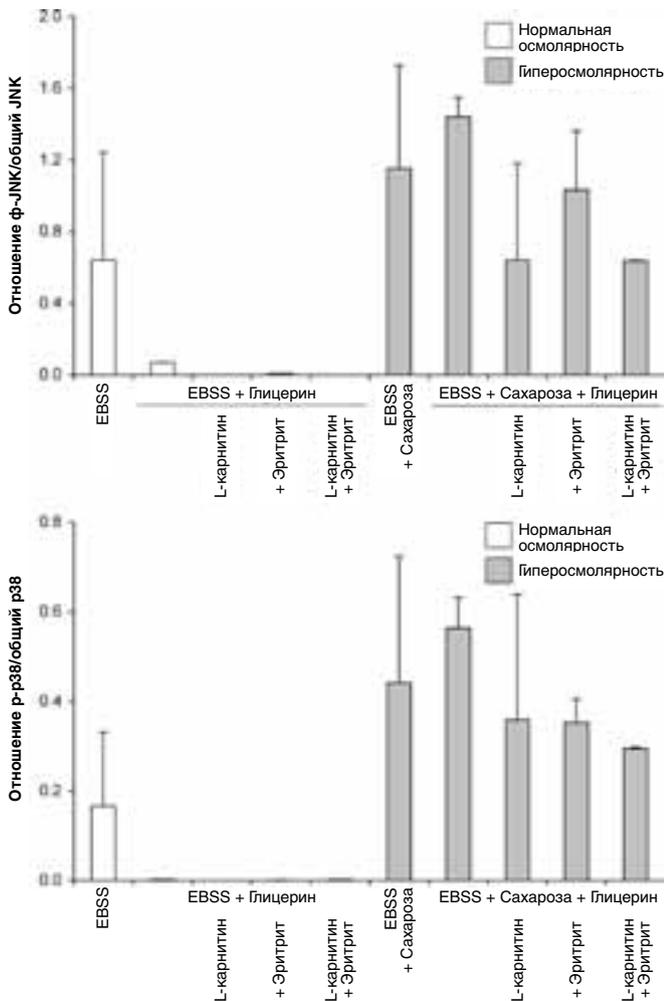
Эпителиальные клетки роговицы культивировали в среде EBSS при изотонической физиологической осмолярности (300 мОсм) или в гиперосмолярных условиях (400 мОсм), которые создавали добавлением хлорида натрия до конечной концентрации 53 мМ. Вестерн-блоттинг фосфорилированных состояний МАПК JNK1 и JNK2 показан на рисунке 1. Уровни нефосфорилированных JNK1 и JNK2 были одинаковыми в изотонической и гиперосмолярной средах (данные не показаны). В отличие от этого, уровни активированных фосфорилированных форм этих МАПК, p-JNK1 и p-JNK2 были значительно повышены в гиперосмолярной среде 400 мОсм по сравнению с изотонической средой 300 мОсм (рисунок 1, сравните дорожку 1 с дорожкой 2 и дорожку 7 с дорожкой 8). Добавление 2 мМ

эритрита или 2 мМ ксилита не приводило к существенным изменениям повышения уровней активированных p-JNK1 и p-JNK2 в гиперосмолярной среде (рис. 1, дорожки 3–6). Однако добавление 2 мМ L-карнитина или 2 мМ бетаина гидрохлорида подавляло фосфорилирование p-JNK1 и p-JNK2 по сравнению с контрольными культурами (рис. 1, сравните повышение от дорожки 9 к дорожке 10 и от дорожки 11 к дорожке 12 с повышением от дорожки 7 к дорожке 8). Добавление L-карнитина или бетаина не изменяло уровни нефосфорилированных JNK1 и JNK2 в изотонической или гиперосмолярной среде (данные не показаны).

Для количественного определения уровней фосфорилированных МАПК в культивируемых эпителиальных клетках роговицы мы применяли флуоресцентный иммуноанализ на гранулах. Результаты выражены в отношении концентраций фосфорилированных (активированных) форм к общим белкам МАПК JNK и p38 (рис. 2). Также исследовали активацию ERK осмолярностью, но уровни фосфорилирования были низкими и не повышались в гиперосмолярных средах (данные не показаны). Повышение осмолярности среды с физиологического уровня 300 мОсм до 400 мОсм добавлением хлорида натрия или сахарозы повышало отношения фосфорилированных к общим JNK и p38 (рис. 2). Добавление 2 мМ L-карнитина к среде 400 мОсм, содержащей сахарозу, снижало отношение фосфорилированных к общим белкам JNK и p38, а добавление 10 мМ L-карнитина снижало отношения фосфорилирования МАПК, JNK и p38 до уровней ниже отношений, обнаруженных в среде с изотонической физиологической осмолярностью (рис. 2). Аналогичным образом, добавление 10 мМ бетаина также снижало отношения фосфорилирования JNK и p38 до уровней ниже отношений, обнаруженных в среде с физиологической осмолярностью (рис. 2). Добавление 40 мМ эритрита к среде с физиологической осмолярностью снижало отношения фосфорилирования JNK и p38, а также снижало отношения фосфорилирования JNK и p38 в гиперосмолярной среде с добавлением сахарозы (рис. 2).

Мы также изучали эффекты глицерина на отношения фосфорилирования МАПК с помощью иммуноанализа на гранулах. Добавление 0,9 % глицерина к среде с физиологической осмолярностью без добавления эритрита и L-карнитина или с добавлением этих веществ снижало отношения фосфорилирования JNK и p38 до почти необнаружимых уровней (рис. 3). Однако добавление 0,9 % глицерина к содержащей сахарозу гиперосмолярной среде не снижало повышенные отношения фосфорилирования JNK и p38 и могло вызвать небольшое дальнейшее повышение (рис. 3).

Также были исследованы сочетания глицерина с эритритом и (или) L-карнитином (рис. 3). Эти вещества снижали активацию JNK и p38 ниже уровней, отмеченных в гиперосмолярных средах без добавок или в гиперосмолярной среде только с глицерином, что свидетельствует о возможном синергизме этих различных осмопротекторов. Было выполнено объединение и статистическое сравнение данных трех отдельных экспериментов с измерением относительного процентного изменения отношений фосфорилированных/общих JNK и p38 в эпителиальных клетках роговицы при



**РИСУНОК 3.** Отношение фосфорилированных/общих МАПК из эпителиальных клеток роговицы человека по результатам иммуноанализа на гранулах. Применяли среду изотонической физиологической осмолярности (EBSS) 300 мОсм и гиперосмолярную 400 мОсм. Глицерин добавляли до 0,9 % (97,7 мМ), L-карнитин до 15,5 мМ и эритрит до 20,5 мМ (указаны конечные концентрации). Представлены средние значения двух измерений или трех измерений для EBSS без добавок. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку. Следует отметить, что шкалы осей ординат различны на разных графиках.

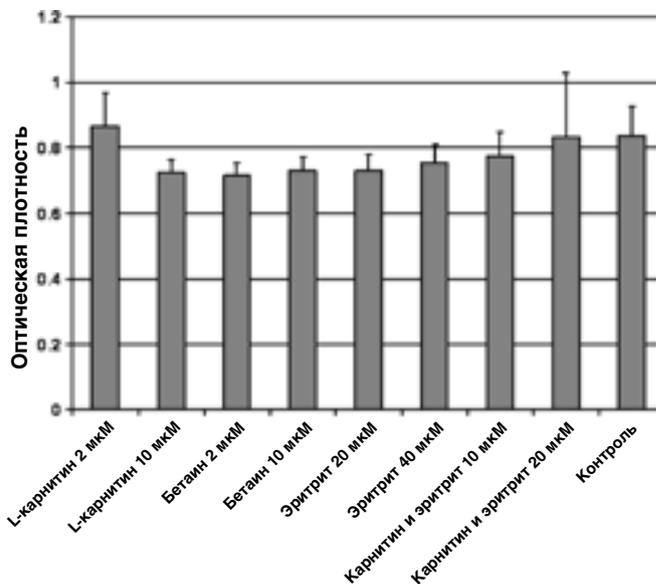
воздействии гиперосмолярных сред (EBSS + сахароза или EBSS + сахароза и глицерин) с добавлением и без добавления осмопротекторов эритрита и (или) L-карнитина. Добавление 20,5–40 мМ эритрита или 10–15 мМ L-карнитина к гиперосмолярной среде значительно снижало отношения фосфорилированных/общих JNK ( $P < 0,01$  в обоих случаях) и p38 ( $P < 0,01$  для эритрита) по сравнению с гиперосмолярной средой без осмопротекторов. Эти данные показали, что L-карнитин и эритрит по отдельности или их сочетание обладают осмопротективным действием на культуры клеток роговицы человека в гиперосмолярной среде.

Добавление осмопротекторов L-карнитина, бетаина или эритрита по отдельности или их сочетаний к супернатанту культуры не оказывало существенного влияния на жизнеспособность эпителиальных клеток роговицы в культуре (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Гиперосмолярность, достигнутая повышенными концентрациями натрия, повышает фосфорилирование (активацию) МАПК, продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также ММП клетками конъюнктивы и эпителиальными клетками роговицы.<sup>23–25</sup> В данном исследовании повышение осмолярности путем добавления сахарозы в культуральной среде повышало фосфорилирование JNK и p38 в эпителиальных клетках роговицы человека в той же степени, что и добавление хлорида натрия. Тот факт, что добавление как хлорида натрия так и сахарозы повышало отношения фосфорилирования JNK и p38 позволяет заключить, что активация этих МАПК была ответом на повышение осмолярности культуральной среды, а не следствием каких-либо других эффектов, которые эти молекулы с разными химическими и метаболическими свойствами могли вызвать в культивируемых эпителиальных клетках роговицы.

Как Вестерн-блоттинг, так и иммуноанализ на гранулах подтвердили, что аминокислота L-карнитин ослабляла повышение фосфорилирования JNK при воздействии гиперосмолярной среды независимо от того, была ли



**РИСУНОК 4.** Оценка жизнеспособности в тесте МТТ. Эпителиальные клетки роговицы человека помещали на 24 ч в среду SHEM без добавок или SHEM с осмопротекторами: L-карнитин (2 и 10 мМ), бетаин (2 и 10 мМ), эритрит (20 и 40 мМ), смесь L-карнитина и эритрита (10 и 20 мМ каждого). Измеряли концентрацию формазана в каждой лунке (ось ординат).

гиперосмолярность обусловлена добавлением хлорида натрия или сахарозы. L-Карнитин и бетаин являются цвиттерийными молекулами; они имеют заряженные группы, но количества положительных и отрицательных зарядов равны и результирующий заряд равен нулю. Цвиттерийными являются многие аминокислоты, но вследствие их активного участия в клеточном метаболизме внутриклеточные концентрации, способные сделать их эффективными осмопротекторами, недостижимы. В отличие от них L-карнитин и бетаин обычно не метаболизируются и играют роль осмопротекторов в различных системах млекопитающих и бактериях.<sup>26,27,29,30</sup> Предполагается, что L-карнитин и бетаин выполняют функцию осмопротекторов, стабилизируя поверхности белков, а возможно и других осмочувствительных макромолекул, помогая поддерживать функционирование белков, несмотря на гиперосмолярную внутриклеточную среду.<sup>31</sup> Такой механизм действия может объяснить, эффективность концентраций L-карнитина 2–10 мМ, которые значительно ниже концентраций молекул, использованных для повышения осмолярности.

Глицерин и такие полиолы, как эритрит в растворах нейтральны, имеют незаряженные, но слабо полярные молекулы, которые при некоторых обстоятельствах могут быть осмопротекторами. Клетки в гиперосмолярной среде могут терять воду по мере повышения внутриклеточной осмолярности до уровня среды. Однако захват глицерина или полиолов может восполнять потери объема клеток.<sup>28</sup> Поэтому для осмопротекции требуются более высокие концентрации глицерина и полиолов, чем таких цвиттерийных молекул, как L-карнитин и бетаин. В наших экспериментах добавление 0,9 % (98 мМ) глицерина к среде с изотонической физиологической осмолярностью приводило к снижению отношений фосфорилирования JNK и p38 до почти необнаружимых уровней, что свидетельствует о взаимодействии глицерина с этими путями в изотонических условиях. Однако при добавлении к гиперосмолярным средам, содержащим сахарозу, глицерин сам по себе слабо влиял на отношения фосфорилирования MAPK. Поскольку фосфорилированные молекулы, близкородственные глицерину, являются промежуточными продуктами гликолиза, возможно, что метаболизм сахарозы, присутствующей в среде в высокой концентрации, подавляет захват глицерина или вызывает его активное выведение из клеток. Добавление эритрита, по-видимому, не влияет на фосфорилирование при оценке Вестерн-блоттингом, однако количественный иммуноанализ на гранулах обнаружил статистически значимое снижение уровней активации JNK и p38 в ответ на осмотический стресс. Эритрит и L-карнитин в сочетании дают синергичный эффект, но статистического подтверждения этому не получено.

Таким образом, мы обнаружили, что вещества, обладающие осмопротективными свойствами в других биологических системах, также могут обладать осмопротективным действием на эпителиальные клетки роговицы человека в гиперосмолярной среде. С учетом важной роли повышенной осмолярности слезы при синдроме сухого глаза целесообразно дальнейшее исследование терапевтического потенциала осмопротективных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

- De Paiva CS, Lindsey JL, Pflugfelder SC. Assessing the severity of keratitis sicca with videokeratographic indices. *Ophthalmology*. 2003;110:1102–1109.
- Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, et al. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol*. 2002;133:181–186.
- Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998;17:38–56.
- Stern ME, Gao J, Schwalb TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2609–2614.
- Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol*. 2003;13:115–127.
- Rolando M, Barabino S, Mingari C, et al. Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes. *Cornea*. 2005;24:951–954.
- Afonso AA, Sobrin L, Monroy DC, et al. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 $\alpha$  concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2506–2512.
- Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, et al. Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1703–1709.
- Solomon A, Dursun D, Liu Z, et al. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2283–2292.
- Gilbard JP. Human tear film electrolyte concentrations in health and dryeye disease. *Int Ophthalmol Clin*. 1994;34:27–36.
- Stewart P, Chen Z, Farley W, et al. Effect of experimental dry eye on tear sodium concentration in the mouse. *Eye Contact Lens*. 2005;31:175–178.
- Niederhorn JY, Stern ME, Pflugfelder SC, et al. Desiccating stress induces T cell-mediated Sjogren's Syndrome-like lacrimal keratoconjunctivitis. *J Immunol*. 2006;176:3950–3957.
- Luo L, Li DQ, Doshi A, et al. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signalling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:4293–4301.
- De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res*. 2006;83:526–535.
- Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH, et al. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*. 1994;265:806–808.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369:156–160.
- Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*. 1996;274:1194–1197.
- Sheikh-Hamad D, Gustin MC. MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:F1102–F1110.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996;15:2760–2770.
- Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP. Integration of the NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*. 2000;12:1469–1479.

21. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren syndrome. *Ophthalmology*. 1999;106:811–816.
22. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:337–342.
23. Luo L, Li DQ, Corrales RM, et al. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens*. 2005;31:186–193.
24. Li DQ, Chen Z, Song XJ, et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:4302–4311.
25. Li DQ, Luo L, Chen Z, et al. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2006;82:588–596.
26. Peluso G, Barbarisi A, Savica V, et al. Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *J Cell Biochem*. 2000;80:1–10.
27. Wood JM, Bremer E, Csonka LN, et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130:437–460.
28. Mager WH, Siderius M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res*. 2002;2:251–257.
29. Canovas M, Bernal V, Sevilla A, et al. Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96:722–737.
30. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, et al. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. 1982;217:1214–1222.
31. Cayley S, Record MT Jr. Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of Escherichia coli to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry*. 2003;42:12596–12609.

 Wolters Kluwer | Lippincott  
Health Williams & Wilkins

*Reprinted in the EU*

This is a translation of the original English version of "*Effects of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells*" *Cornea*; 2008; 27(5):574-579, published by Lippincott Williams & Wilkins. The publisher is not responsible for any errors made during translation.