

На правах рукописи

КРИВОШЕИНА ОЛЬГА ИВАНОВНА

**КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ
ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.00.16 – патологическая физиология
14.00.08 – глазные болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2004

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук

Хлусов Игорь Альбертович

доктор медицинских наук,

профессор Запускалов Игорь Викторович

Официальные оппоненты:

академик РАМН, доктор медицинских наук,

профессор Дыгай Александр Михайлович

доктор медицинских наук

Рязанцева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук,

профессор Раткина Наталья Николаевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Новосибирская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Защита диссертации состоится «___» _____ 2004 года

в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Автореферат разослан «___» _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Г.А. Суханова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В современной офтальмологии один из научно-познавательных акцентов связан с изучением патогенетических механизмов пролиферативной витреоретинопатии (ПВР), осложняющей течение различных патологических процессов в заднем полюсе глазного яблока (Антелава Н.Д., 1998; Гундорова Р.А. и др., 1986; Киселева О.А., 1992; Шишкин М.М., 2000).

В основе ПВР лежит эпи- и субретинальное разрастание фиброваскулярной ткани, обладающей контрактивными свойствами, что вызывает складчатость сетчатки с ее последующей ретракционной отслойкой (Балашова Л.М. и др., 2000; Сдобникова С.В. и др., 2002; Хорошилова-Маслова И.п. и др., 1998; Campochiaro P.A., 1997; Sano T. et al., 1991; Tang S. et al., 1993; Weller M. et al., 1989).

Интенсивное развитие витреоретинальной хирургии тесно связано с клинико-морфологическими исследованиями периретинальной пролиферации, чему посвящены многие работы отечественных и зарубежных авторов (Балашова Л.М., 1999; Краснов М.М. и др., 1998; Махачева З.А., 1996; Сдобникова С.В., 2002; Хорошилова-Маслова И.П. и др., 2002; Campochiaro P.A., 1997; Dunker S. et al., 1997; Harbour J.W. et al., 1996; Limb G.A. et al., 1994). Однако, на наш взгляд, имеющиеся знания не позволяют с исчерпывающей полнотой объяснить патогенез пролиферативного процесса.

Так, согласно публикациям последних лет, развитие витреоретинальной пролиферации во многом определяется анатомо-физиологическими особенностями строения сетчатки и стекловидного тела, в частности, задней гиалоидной мембраной и ее свойствами (Киселев А.В., 1999; Краснов М.М. и др., 1998; Сдобникова С.В., 1999; Malcaze F., 1984; Sebag J., 1989). Роль данной структуры в патогенезе ПВР неоднозначна. С одной стороны, частичная отслойка задней гиалоидной мембраны ведет к прогрессированию пролиферативного процесса и способствует возникновению кровоизлияний в стекловидное тело (Гаджиев Р.В., 1992; Евграфов В.Ю., 1995). Полная заднегиалоидная отслойка предотвращает развитие витреоретинальной пролиферации и стабилизирует течение патологического процесса (Сдобникова С.В. и др., 2002).

Экспериментальные и клинические исследования указывают также на важность локальных изменений гомеостаза с развитием метаболического ацидоза, обусловленного активацией свободнорадикальных процессов, интенсификацией перекисного окисления липидов (Глинчук Я.И., 1986; Евграфов В.Ю., 1995; Etherington D., 1981). Продукты метаболизма, накапливаясь в витреальной полости, оказывают повреждающее действие на клеточные структуры внутренних оболочек глаза (Травкин А.Г., 2002; Grierson I., 1980; Klemen U.M., 1981).

Изменения локального иммунитета, выявляемые у больных ПВР различной этиологии, свидетельствуют о формировании и персистенции очага хронического воспаления в заднем полюсе глазного яблока (Балашова Л.М., 2000;

Зайцева Н.С. и др., 1986; Сергиенко А.Н., 2002; Хорошилова-Маслова И.П. и др., 1997; Baudouin C., 1989; Ma L.Q., 1987). Наличие дисбаланса системных иммунорегуляторных механизмов усугубляет течение патологического процесса.

Существенная роль в развитии ПВР отводится биологически активным веществам (факторам роста), стимулирующим миграцию клеток, их адгезию и пролиферацию, продукцию других активаторов роста, а также неоваскулогенез (Camprochiaro P.A., 1996; Folkman J. et al., 1987; Forrester J.V. et al., 1993; Sebag J. et al., 1986; Vinoses S.A. et al., 1995; Yamamoto S. et al., 2000).

Новообразование сосудов, согласно теории ангиогенеза, происходит за счет митоза эндотелиоцитов предсуществующих сосудов с формированием «почек роста» (Гурина О.Ю. и др., 1985; Куприянов В.В. и др., 1993; Diaz-Flores L. et al., 1994; Kimura H. et al., 1995; Sholley M. et al., 1984; Weber M.L. et al., 1989). Основу формирования фиброзных мембран составляют те же репаративные процессы, что наблюдаются при заживлении раны: клеточный хемотаксис и митоз, синтез экстрацеллюлярного матрикса, процессы ремоделирования в новообразованной рубцовой ткани (Хорошилова-Маслова И.П. и др., 1997; Baudouin C. et al., 1989; Vinoses S.A. et al., 1990; Weller M. et al., 1990).

Однако, в целом, тактика и динамика научных исследований патогенеза ПВР на современном этапе характеризуются неоднородностью и отсутствием систематизированного, конструктивного подхода к изучению явлений, лежащих в основе формирования пролиферативной ткани в полости глазного яблока. Обилие конкретной информации привело к тому, что в ней стала теряться концептуальность проблемы. Множество сведений о деталях, несомненно важных, отнюдь не отменяет необходимость осмысления законов инициации, развития и фазовых смен основных патогенетических событий при формировании пролиферативной ткани в полости глазного яблока.

Кроме того, перед исследователями, изучающими механизмы развития ПВР, стоит много вопросов. Прежде всего необходимо выяснить, каким образом происходит формирование массивных периретинальных мембран за столь короткий, согласно клиническим наблюдениям, период времени (Войно-Ясенецкий В.В., 1979; Морозова И.В. и др., 1991; Хорошилова-Маслова И.П. и др., 1998; Чичуа Г.А. и др., 1999; Camprochiaro P.A., 1997; Frank R.N., 1990; Weller M. et al., 1990). Этот общий вопрос разбивается на ряд частных. Например, только ли фибробластическая популяция, являясь ключевой фигурой репаративного процесса, обладает способностью к коллагенообразованию? Ограничивается ли реализация фиброгенной функции мононуклеаров крови в полости глазного яблока лишь стимуляцией миграции и пролиферации фибробластов при нарушении целостности витреоретинальных структур? Каковы функциональные возможности мононуклеарных клеток после миграции в витреальную полость в отношении синтеза и секреции коллагена? Каковы природа и сущность факторов микроокружения, оказывающих модулирующее влияние на морфофункциональное состояние мононуклеаров?

Безусловно, этим перечнем не ограничивается круг вопросов о патогенетических механизмах ПВР, имеющих сложный и разноплановый характер. Од-

нако поставленные вопросы позволяют с новых позиций подойти к изучению данной проблемы.

Все вышеизложенное создает предпосылки для формулирования ряда научно-исследовательских задач, направленных на изучение клеточных механизмов развития фиброваскулярной пролиферации в полости глазного яблока.

Цель исследования – изучить клеточные механизмы инициации и развития пролиферативной витреоретинопатии.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель пролиферативной витреоретинопатии путем интравитреального введения моноклеаров крови.
2. Изучить особенности возникновения и динамики развития пролиферативной витреоретинопатии при интравитреальном введении моноклеаров крови в условиях нормо- и гипергликемии; провести сравнительный анализ морфогенеза экспериментальной пролиферативной витреоретинопатии в зависимости от уровня гликемии.
3. Разработать новый способ культивирования моноклеаров периферической крови человека *in vitro*.
4. Исследовать влияние направленного движения жидкости на морфофункциональное состояние моноклеаров периферической крови человека *in vitro*.
5. Изучить морфологический состав периретинальных мембран у больных пролиферативной витреоретинопатией различной этиологии.
6. Разработать концептуальную схему целостной картины патогенеза пролиферативной витреоретинопатии с позиций системного анализа.

Научная новизна

Впервые разработана экспериментальная модель пролиферативной витреоретинопатии, основанная на индукции патологического процесса интравитреальным введением моноклеаров крови.

Впервые создана модель пролиферативной витреоретинопатии, индуцированная интравитреальным введением моноклеаров крови на фоне экспериментального сахарного диабета. Обнаружено, что развитие пролиферативной витреоретинопатии на фоне экспериментального сахарного диабета характеризуется формированием значительно больших по объему фиброваскулярных мембран с усилением дегенеративных изменений структуры сетчатки. Установлено, что моноклеарные клетки крови в условиях экспериментальной гипергликемии резко ускоряют патологические процессы в тканях глазного яблока.

Впервые разработано устройство, позволяющее *in vitro* моделировать клеточные механизмы развития пролиферативной витреоретинопатии в условиях движения питательной среды, сходного с движением жидкости в полости глазного яблока.

Впервые выявлено, что при культивировании *in vitro* моноклеаров периферической крови человека в условиях направленного движения питательной среды, в клетках отмечается значительное повышение активности внутрикле-

точных ферментативных систем. В динамических условиях ускоряется процесс дифференцировки моноцитов крови в макрофагальные клетки, а циркулирующих предшественников фибробластов – в зрелые формы, продуцирующие коллаген. Эти процессы являются патогенетической основой развития и прогрессирования пролиферативной витреоретинопатии.

Установлено, что периретинальные пролиферативные мембраны у больных пролиферативной витреоретинопатией различной этиологии характеризуются сходным морфологическим строением. Это патоморфологическое сходство свидетельствует об общих закономерностях развития пролиферативной ткани в полости глазного яблока при различных заболеваниях.

Предложена оригинальная концепция патогенеза пролиферативной витреоретинопатии при различных заболеваниях в аспекте общих механизмов клеточно-структурных взаимодействий.

Практическая значимость

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых российских ученых за 2003-2004 гг. (№ МК – 2697.2003.04), а также в соответствии с планом проблемной комиссии Межведомственного научного совета при Президиуме РАМН «Структурно-функциональные основы организации мозга в норме и патологии» № 44.01.

Разработанные экспериментальные модели ПВР позволили получить новые данные о патогенезе фиброваскулярной пролиферации. Понимание динамики межклеточных и клеточно-структурных взаимодействий при ПВР, особенно на начальных стадиях, способствует более полному и глубокому познанию сущности данного процесса. Экспериментальное моделирование открывает перспективы для разработки патогенетически обоснованных методов лечения и профилактики ПВР. Получен патент РФ на изобретение № 2182369 от 10.05.2002 «Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии».

Результаты культивирования *in vitro* мононуклеаров периферической крови человека в условиях направленного движения питательной среды позволили существенно расширить представления о влиянии факторов микроокружения на морфофункциональное состояние изучаемых клеток и реализацию их фиброгенного потенциала. Полученные результаты дают возможность с новых позиций подойти к изучению клеточных механизмов развития фиброваскулярной пролиферации в полости глазного яблока. Получен патент РФ на изобретение № 2221039 от 10.01.2004 «Способ культивирования мононуклеаров крови *in vitro*».

Предложенная с позиций системного подхода концепция патогенеза ПВР создает основу для разработки практических рекомендаций с учетом клеточно-структурных взаимодействий в патологическом очаге.

Материалы работы используются в программе лекционного курса и практических занятий на кафедрах патологической физиологии; офтальмологии Сибирского государственного медицинского университета; в практике офтальмологической клиники Сибирского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Интравитреальное введение мононуклеарных клеток крови в эксперименте индуцирует развитие пролиферативной витреоретинопатии, приводящей к формированию фиброваскулярной пролиферативной ткани и к тракционной отслойке сетчатки с последующей субатрофией глазного яблока. В условиях экспериментального сахарного диабета мононуклеары крови обуславливают более выраженные (по скорости и амплитуде) деструктивно-пролиферативные изменения в полости глазного яблока.

2. Моделирование клеточных механизмов пролиферативной витреоретинопатии *in vitro* в условиях направленного движения питательной среды, сходного с движением внутриглазной жидкости, показывает (в сравнении со стационарной культурой клеток) повышение активности внутриклеточных ферментативных систем мононуклеаров периферической крови человека. При этом ускоряется процесс дифференцировки моноцитов в макрофагальные клетки, а циркулирующих фибробластоподобных клеток – в зрелые, коллагенсинтезирующие формы.

3. Периретинальные пролиферативные мембраны у больных пролиферативной витреоретинопатией различной этиологии характеризуются сходным морфологическим строением, что позволяет говорить об общих механизмах их формирования в полости глазного яблока.

4. Изучение патогенеза пролиферативной витреоретинопатии с позиций системного подхода указывает на формирование в полости глазного яблока сложной системы, главным патогенетическим фактором которой являются мигрирующие из крови мононуклеарные элементы (моноциты, фибробластоподобные клетки), способствующие инициации и усилению развития фиброваскулярных пролиферативных мембран.

Апробация работы

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на Томской областной конференции офтальмологов (1999 г., 2000 г., 2003 г.); межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию со дня рождения акад. И.П. Павлова (Томск, 1999 г.); региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы офтальмоэндокринологии и сосудистой патологии глаз» (Красноярск, 1999 г.); научно-практической конференции «Актуальные вопросы диабетологии» (Томск, 1999 г.); Международной научной конференции The Association for Research in Vision and Ophthalmology (Florida, USA, 2000); I, III, IV, V Международном конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2000 г., 2002 г., 2003 г., 2004 г.); II Всероссийском симпозиуме «Хроническое воспаление» (Новосибирск, 2000 г.);

I и II Международной научно-практической конференции «Пролиферативный синдром в офтальмологии» (Москва, 2000 г., 2002 г.); Восточно-Сибирской региональной конференции «Патогенетически обоснованные технологии профилактики, лечения и реабилитации в офтальмохирургии» (Иркутск, 2000 г.); межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 20-летию Красноярского областного центра микрохирургии, «Вопросы офтальмологии» (Красноярск, 2001 г.); 2-й Всероссийской конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Москва, 2002 г.); IV Съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002 г.); юбилейной научно-практической конференции «Вопросы офтальмологии» (Омск, 2002 г.); Всероссийской конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные и клинические аспекты» (Новосибирск, 2002 г.); III научном семинаре «Биомеханика глаза» (Москва, 2002 г.); межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии», посвященной 60-летию Кемеровской области (Кемерово, 2003 г.); юбилейном научном симпозиуме «Актуальные проблемы офтальмологии», посвященном 30-летию образования ГУ НИИ глазных болезней РАМН (Москва, 2003 г.); юбилейной научно-практической конференции «Боевые повреждения органа зрения», посвященной 185-летию основания первой в России кафедры офтальмологии (С.-Петербург, 2003 г.); межрегиональной конференции офтальмологов, посвященной 40-летию детской глазной службы Красноярского края (Красноярск, 2003 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Лечение посттравматической патологии заднего отрезка глаза у пострадавших в экстремальных ситуациях с применением приборов и медикаментов» (Москва, 2004 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Современные возможности в диагностике и лечении витреоретинальной патологии» (Москва, 2004 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликована 52 работы, в том числе 9 в центральной печати, получено 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 251 странице машинописного текста и состоит из введения, 6 глав собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка литературы. Работа иллюстрирована 18 таблицами, 56 рисунками. Библиографический список включает 479 источников, из них 225 на русском языке и 254 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинические исследования

Клинический раздел научно-исследовательской работы выполнен на базе офтальмологической клиники СибГМУ. Материалом исследований служили образцы периретинальных мембран, полученные в ходе трансклиарной витрэктомии у 65 пациентов с ПВР различной этиологии.

Распределение больных по основным группам заболеваний представлено следующим образом:

- диабетическая пролиферативная витреоретинопатия - 22 больных. Из них у 14 человек был сахарный диабет I типа, у 8 человек - сахарный диабет II типа. При этом давность заболевания составляла 17-20 лет у больных сахарным диабетом I типа и 20-25 лет у больных сахарным диабетом II типа. Все обследованные пациенты находились в фазе субкомпенсации.
- регматогенная отслойка сетчатки, осложненная ПВР – 22 больных.
- центральная атеросклеротическая хориоретинопатия, далеко зашедшая стадия – 21 больной.

Обследование органа зрения всем больным проводили по общепринятой методике. В комплекс обследования входили: визометрия, периметрия, биомикроскопия переднего отрезка глаза, обратная бинокулярная офтальмоскопия, тонография, эхобиометрическое исследование, электроокулография.

Образцы пролиферативных мембран, полученных в ходе оперативного вмешательства, фиксировали для световой и электронной микроскопии.

Экспериментальные исследования

Моделирование пролиферативной витреоретинопатии в условиях нормо- и гипергликемии

Нами разработана новая экспериментальная модель ПВР, основанная на индукции патологического процесса интравитреальным введением моноклеаров крови, в условиях нормо- и гипергликемии.

Выполнена серия экспериментов на 60 половозрелых крысах-самцах породы Wistar с первоначальной массой 200-250 г, полученных из вивария СибГМУ. Перед экспериментом всех животных выдерживали на протяжении двухнедельного карантинного срока в условиях вивария на обычном пищевом рационе.

В первой серии экспериментов у животных 1-й группы (n=25) воспроизводили оригинальную модель ПВР посредством одномоментного введения моноклеаров крови в стекловидное тело. Под эфирным наркозом каждому животному выполнялись интравитреальные инъекции: через плоскую часть цилиарного тела в один глаз вводилось 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия, содержащего моноклеары из расчета $3,0 \cdot 10^6 / \text{мм}^3$, во второй глаз для контроля вводилось 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия. Моноклеары, взятые из крови экспериментального животного, выделяли с помощью градиента фиколл-верографин. Чистота моноклеаров составила 96-98%. Процедура выделения моноклеаров проводилась на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) СибГМУ (директор – д.м.н., профессор А.Н. Байков), в отделе иммунологии, в группе культуры тканей.

Во второй серии экспериментов у животных 2-й группы (n=25) предварительно моделировали сахарный диабет. Сахарный диабет воспроизведен после 24 ч голодания путем внутривентрального введения аллоксана в дозе 15,0 мг/100 г веса. Критерием тяжести заболевания служили уровень гипергликемии, потеря массы тела, выраженность полиурии, полифагии. Уровень глюкозы

в крови экспериментальных животных определялся орто-толуидиновым методом 1 раз в 1 неделю на базе ЦНИЛ СибГМУ, в отделе биохимии. Средний уровень глюкозы составил $23,47 \pm 0,35$ ммоль/л, при колебаниях от 19,21 ммоль/л до 23,91 ммоль/л. Инсулин животные не получали. С целью контроля проводилась непрямая офтальмоскопия 1 раз в 2 недели. Общая продолжительность эксперимента составила 9 недель.

Через 6,5 недель после введения аллоксана и развития экспериментального сахарного диабета у животных воспроизводили модель ПВР, аналогичную таковой у животных 1-й группы.

В качестве контроля использовали 10 интактных животных, которых содержали в идентичных с экспериментальными животными условиях вивария. Средний уровень глюкозы в крови у них составил 5,0-6,0 ммоль/л.

В ходе экспериментов проводилась непрямая офтальмоскопия на 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки после инъекции в условиях медикаментозного мидриаза (инстилляции S.Tropicamidi 1%). После каждой офтальмоскопии, за исключением 1-х суток, под эфирным наркозом декапитировали по 5 животных из экспериментальных групп и по 2 животных из контрольной группы. Выполнялась энуклеация обоих глаз. Полученный материал фиксировался для световой и электронной микроскопии.

Все исследования во время экспериментов и взятие материала осуществляли в одно и тоже время суток – с 10 до 12 часов.

Моделирование механизма пролиферативной витреоретинопатии в условиях культивирования мононуклеаров крови in vitro

Нами разработано оригинальное устройство, позволяющее in vitro моделировать движение питательной среды, сходное с движением жидкости в полости глазного яблока. Устройство (рис.1) представляет собой замкнутую систему с камерой (2), содержащей полупроницаемый фильтр (3). Система предварительно с помощью емкости (1) заполнялась питательной средой, содержащей 80% среды McCoу 5А, 20% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицин (из расчета 0,02 мл на 10,0 мл среды). В качестве объекта исследования были выбраны мононуклеарные клетки периферической крови человека. Кровь, взятую в количестве 4,0-5,0 мл из локтевой вены здоровых доноров-добровольцев, помещали в стерильную пробирку, содержащую 1,0 мл раствора гепарина. Мононуклеары выделяли методом фракционирования в градиенте плотности (1,067-1,077 г/мл) на разделяющем растворе фиколл-верографин. Полученные клетки доводили питательной средой до конечной концентрации $3 \cdot 10^6$ нуклеаров/мл. Клеточный материал вводили в камеру (2) через клапанное отверстие (4) и помещали на фильтр (3). Камера (2) соединялась с емкостью (1) через роликовый насос (6), например, аппарата «Аспиратор - 01» (5), снабженного поддерживающим клапаном (7).

После включения роликового насоса (6) в замкнутой системе благодаря его работе создавалось равномерное направленное движение питательной среды со скоростью 2,1-2,4 мм³/мин. Первичную клеточную культуру инкубировали

ли при постоянном движении жидкой питательной среды с соблюдением условий культивирования.

В качестве контроля изучаемые клетки культивировали на полупроницаемом фильтре, помещенном в чашку Петри с необходимой питательной средой, при строгом соблюдении температурного режима (37° С), содержания CO₂ (5-7%) и уровня влажности (100%).

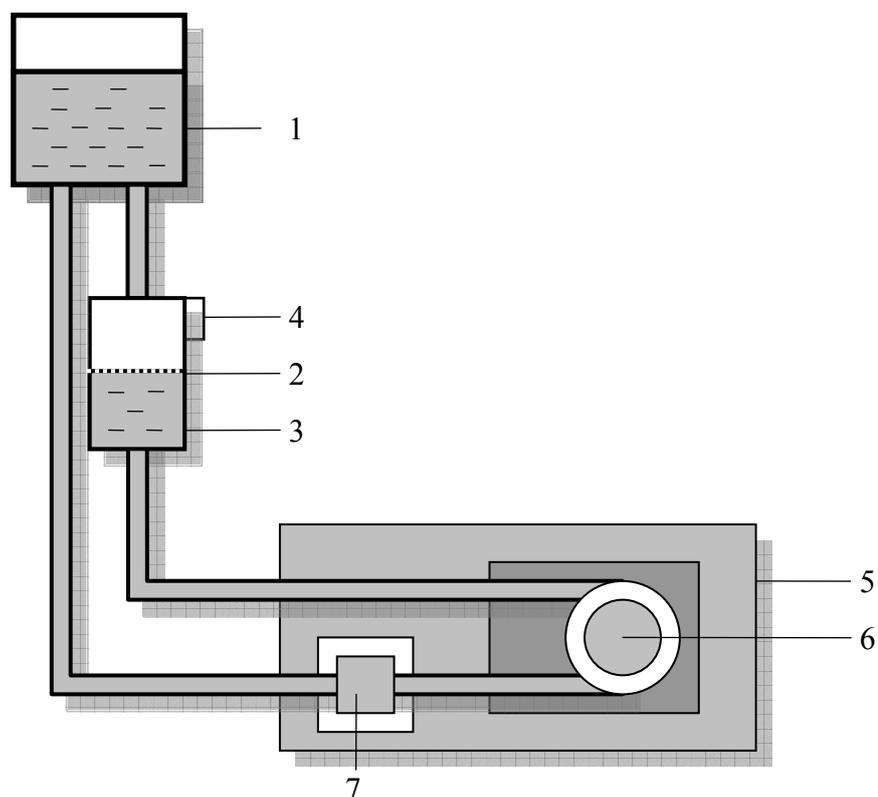


Рис. 1. Устройство для культивирования мононуклеаров крови *in vitro*.

1 – емкость с питательной средой, 2 – камера, 3 – полупроницаемый фильтр, 4 – клапанное отверстие, 5 – аппарат «Аспиратор-01», 6 – роликовый насос, 7 – поддерживающий клапан

Длительность культивирования составила 24, 48 и 72 часа. По окончании экспериментов клеточный материал, находящийся на полупроницаемом фильтре, исследовали с помощью цитохимических и гистологических методов. Просмотр и фотографирование клеточного материала производили с помощью рабочего места морфолога, включающего персональный компьютер IBM PC Pentium, цифровой фотоаппарат EPSON и микроскоп фирмы Karl Zeiss- Yena.

Морфофункциональные исследования

Гистологические методы

При подготовке материала для световой микроскопии в качестве фиксирующей смеси использовалась жидкость Карнуа. После приготовления парафи-

новых срезов препараты окрашивали: гематоксилином и эозином, по методу Браше и по методу ван Гизона.

При подготовке материала для электронной микроскопии полученные образцы с целью фиксации помещались в 2,5% раствор глутаральдегида, забуференного на 0,2 М какодилатном буфере (рН=7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия на холоду в течение 3 часов, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в эпон.

Просмотр и фотографирование полутонких срезов производили на световом микроскопе «Люмам И1». Ультратонкие срезы помещали на медные сетки, осмированные препараты изучали в электронном микроскопе JEM –7А.

Цитохимические методы

Клеточную культуру, полученную при культивировании *in vitro* мононуклеаров периферической крови человека, окрашивали на α -Нафтил-AS- ацетатэстеразу, в том числе с ингибированием фторидом натрия, и на щелочную фосфатазу.

Морфометрический анализ

На полутонких срезах внутренних оболочек глаз экспериментальных животных, окрашенных 0,5% раствором толуидинового синего, производили подсчет нейросенсорных клеток с кариопикнозом на 1000 фоторецепторов с каждой сетчатки. Определяли количество слоев и плотность распределения ядер в наружном ядерном слое сетчатки. В пролиферативных мембранах производили подсчет фибробластов и новообразованных сосудов. Подсчет производили в окулярной рамке на площади 900 мкм² при увеличении 10×90.

На срезах пролиферативных мембран, взятых в ходе оперативного вмешательства у больных ПВР различной этиологии, определяли процент фибробластов, макрофагов, лимфоцитов.

Методом компьютерной морфометрии цифровых изображений определяли оптическую плотность адгезированных к фильтру мононуклеарных клеток при помощи программы Adobe PhotoShop 6.0 согласно статистике серых уровней (Lee et al., 1999).

Цифровой материал обработан общепринятыми методами статистики (Лакин Г.Ф., 1990; Юнкеров В.И. и др., 2002). Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни (p_U) и T-критерий Уилкоксона (p_T). Статистическая обработка проведена при помощи программы STATISTICA for Windows Release 4.3. на компьютере IBM PC Pentium.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

КЛИНИЧЕСКАЯ ПАТОМОРФОЛОГИЯ ПЕРИРЕТИНАЛЬНЫХ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ МЕМБРАН РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Лечение ПВР на современном этапе осуществляется с помощью трансклиарной витрэктомии (Глинчук Я.И., 1987; Сдобникова С.В., 2002; Федоров С.Н., 1998), которая в нашей работе была выполнена 65 пациентам, составившим 3 группы наблюдения:

- диабетическая ПВР. До операции острота зрения у больных, в среднем, составляла 0,02; суммарная величина поля зрения - 394°.
- регматогенная отслойка сетчатки, осложненная ПВР. Острота зрения – 0,03; поле зрения - 374°.
- центральная атеросклеротическая хориоретинопатия, далеко зашедшая стадия. Острота зрения – 0,015; поле зрения - 126°.

Послеоперационный период у большинства больных протекал гладко, со слабо выраженной воспалительной реакцией в виде легкой или умеренной инъекции сосудов конъюнктивы склеры в области операционных разрезов. Клиническая картина нормализовалась к 3-7 дню после хирургического вмешательства.

В послеоперационном периоде у больных всех 3 групп отмечалось постепенное повышение остроты зрения и суммарной величины поля зрения по сравнению с показателями до оперативного лечения ($p_U < 0,01$). Низкие зрительные функции у больных центральной атеросклеротической хориоретинопатией, по сравнению с пациентами других групп, как до, так и после операции обусловлены поражением сетчатки макулярной области.

Морфогенез периретинальных пролиферативных мембран

Разные варианты фиброваскулярной пролиферации, осложняющей течение того или иного патологического процесса в заднем полюсе глазного яблока, во многом определяются особенностями его этиологии и патогенеза. Однако, результаты морфологических исследований периретинальных мембран позволяют по иному взглянуть на проблему развития пролиферативной ткани.

Основными клеточными элементами, образующими фиброваскулярные мембраны, являются фибробласты, макрофаги, лимфоциты. Межклеточное вещество представлено коллагеновыми волокнами различной толщины и плотности расположения. Количественное соотношение тех или иных типов клеток в швартках варьирует (табл. 1), равно как и выраженность самих пролиферативных мембран

Таблица 1

Количественное соотношение клеточных элементов в пролиферативных мембранах в 1 мм² среза у больных пролиферативной витреоретинопатией (ПВР) различной этиологии, X

Группа больных	Количество клеток		
	Фибробласты	Макрофаги	Лимфоциты
Диабетическая пролиферативная витреоретинопатия	475,89 87% n=25	43,73 8% n=25	27,35 5% n=25
Регматогенная отслойка сетчатки с ПВР	449,86 83% n=25	65,04 12% n=25	27,12 5% n=25
Центральная атеросклеротическая хориоретинопатия	478,72 88% n=25	43,52 8% n=25	21,76 4% n=25

Примечание: n – количество срезов пролиферативных мембран.

Тем не менее, существенных различий в строении эпи- и субретинальных шварт у больных ПВР, развившейся на фоне принципиально различных заболеваний, не выявлено. Это патоморфологическое сходство позволяет думать об общих закономерностях развития пролиферативной ткани в полости глазного яблока.

Различные этиологические и патогенетические факторы, определяя своеобразие картины на этапе инициации пролиферативного процесса, в дальнейшем ведут к близким морфологическим проявлениям. Реализуется это за счет реакций, имеющих воспалительную и регенераторную направленность и являющихся компонентами единой системы гуморально-клеточных взаимодействий, нацеленных на стабилизацию внутренней среды (Ерохин И.А. и др., 1989). Сущность отношений между воспалительной и регенераторной реакциями (рис. 2) определяется кооперативными взаимодействиями различных видов клеток (моноциты, лимфоциты, фибробласты, клетки пигментного эпителия, эндотелий микрососудов) между собой и с внеклеточным матриксом (коллаген, протеогликаны, и др.) посредством прямых и обратных связей (Маянский Д.Н., 1991; Серов В.В., 1984). При различных видах патологии в заднем полюсе глазного яблока клеточная кооперация моноцитов, лимфоцитов и фибробластов, постоянно меняющаяся, в итоге направлена на репарацию тканевого дефекта с минимальными функциональными потерями (Чичуа Г.А., 1997; Weller M., 1990).

Реализация воспалительной и регенераторной реакций во многом определяется величиной и длительностью действия повреждающих факторов в патологическом очаге. При непрекращающемся действии факторов тканевой деструкции нарушаются взаимосвязи между воспалением и регенерацией, вследствие чего утрачивается их защитно-приспособительный характер (Пикуза О.И., 1993). Воспаление становится хроническим, а фибропластический процесс, являющийся неотъемлемой частью репаративной регенерации, ведет к неадекватному фиброгенезу.

Динамика развития пролиферативной ткани, осложняющая течение различных патологических процессов в заднем полюсе глазного яблока, свидетельствует о срыве гомеостатических механизмов в условиях декомпенсированного повреждения. Несовместимость повреждения с компенсаторными возможностями гомеостаза на разных уровнях регуляции (клеточном, тканевом, органном) ведет к клинически значимым последствиям с развитием периретинальных пролиферативных мембран и необратимыми функциональными изменениями витреохориоретинальных структур.

Таким образом, морфологическое изучение фиброваскулярной пролиферации при различных видах патологии в заднем отрезке глаза, наряду с этиологической и патогенетической спецификой, позволяет установить общую последовательность изменений при формировании пролиферативной ткани в полости глазного яблока. Это дает возможность рассматривать в неразрывном единстве клинические, функциональные и морфологические проявления патологического процесса.

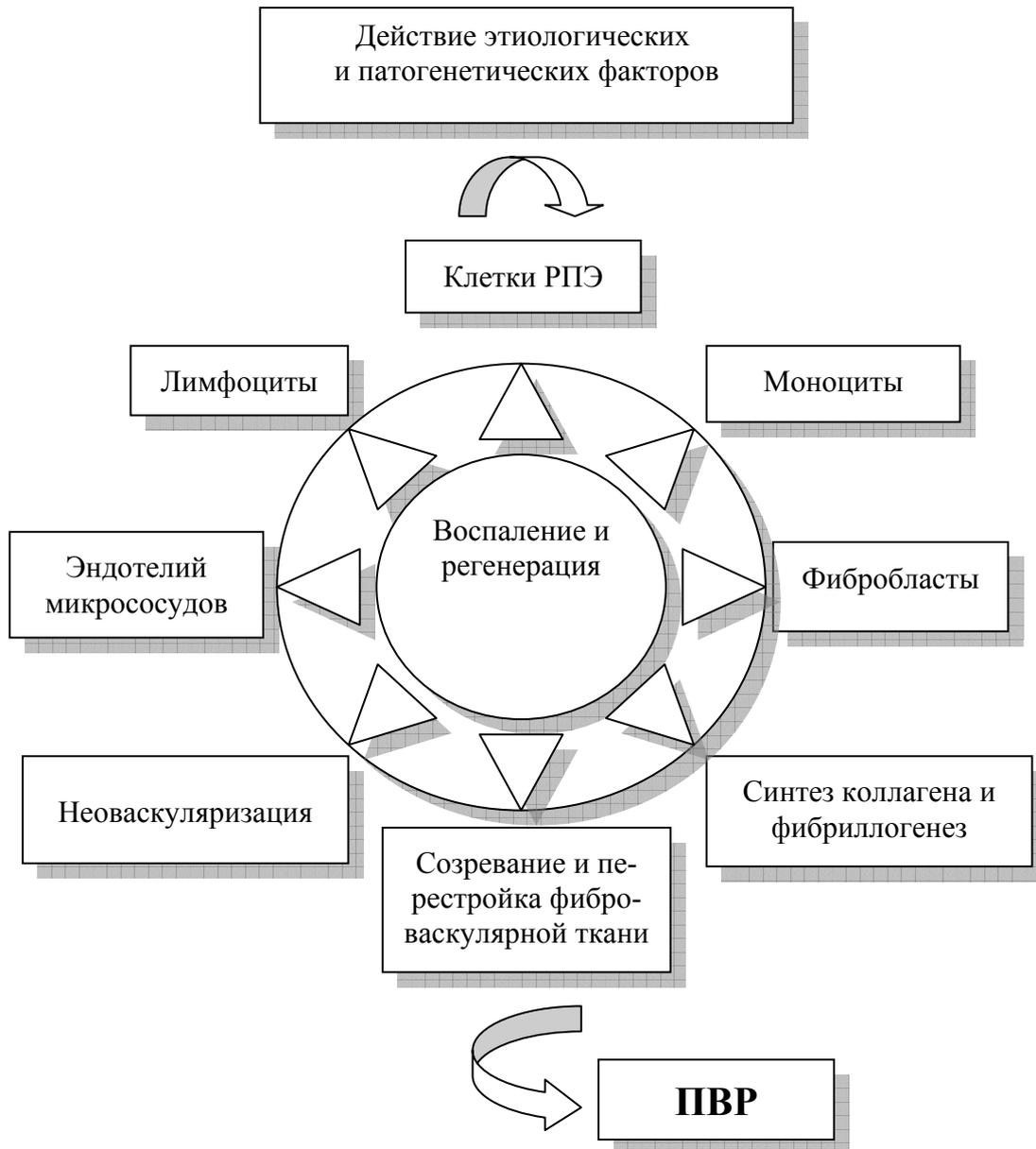


Рис. 2. Сущность воспалительной и регенераторной реакций в патогенезе пролиферативной витреоретинопатии (ПВР)

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ
ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ В УСЛОВИЯХ НОРМО- И ГИПЕРГЛИКЕМИИ**
**Динамика развития пролиферативной витреоретинопатии в эксперименте
при интравитреальном введении моноклеаров крови**

При проведении непрямой офтальмоскопии у здоровых животных в глазах с введенными моноклеарами выявлены следующие изменения. На 3-и сутки после инъекции у всех животных в центральных отделах стекловидного тела отмечены локальные малоподвижные помутнения серовато-белого цвета, сетчатка не изменена. На 5-7-е сутки офтальмоскопия затруднена из-за ограниченных фиксированных помутнений в стекловидном теле. На 14-е сутки у 3 животных отмечено помутнение задних отделов хрусталика, препятствующее офтальмоскопии; в глазах остальных животных – обширное, грубое, фиксированное помутнение в преретинальных и центральных отделах стекловидного тела, что затрудняло оценку состояния сетчатки. На 21-е сутки у всех животных рефлекс с глазного дна отсутствует из-за развития катаракты. В контрольных глазах с инъекцией изотонического раствора хлорида натрия изменений не выявлено.

При подготовке материала для гистологических исследований макроскопически в глазах с введенными моноклеарами, начиная с 14-х суток, обнаружены признаки субатрофии экспериментальных глаз (у 3 животных переднезадний размер составил 5-6 мм, в норме - 7-8 мм). На 21-е сутки - во всех экспериментальных глазах у подопытных крыс отмечена субатрофия.

В ходе морфологических исследований глаз с введенными моноклеарами выявлены следующие изменения. На 3-и сутки после интравитреальной инъекции в стекловидном теле обнаруживаются многочисленные клетки моноклеарного ряда. В слое нервных волокон сетчатки, по ходу артерий и вен наблюдается клеточная инфильтрация. В стекловидном теле среди моноклеаров обнаруживаются клетки веретенообразной формы с овальным или продолговатым ядром. Цитоплазма описываемых клеток обладает умеренной пиронинофилией. Строение стекловидного тела заметно изменено. В нем выявляются оксифильные, фибриллярные структуры, не обладающие фуксинофилией. Сетчатка сохраняет связь с хориоидеей, отслойки не обнаружено.

На 5-е сутки начинаются процессы образования соединительнотканых волокон, наиболее отчетливо выраженные в области слепой части сетчатки. Различной толщины оксифильные волокна формируют сеточку. В ней, наряду с моноклеарами, обнаруживаются фибробластоподобные клетки отростчатой формы с базофильной цитоплазмой. Формирование интравитреальных шварт, местами контактирующих с сетчаткой, наблюдается и в других отделах заднего полюса. Отмечаются изменения сосудов сетчатки в виде пролиферации эндотелия артерий и вен, периваскулярной клеточной инфильтрации.

На 7-е сутки значительная часть моноклеаров имеет вакуолизованную цитоплазму. Более многочисленными становятся фибробласты, формируются витреоретинальные шварты. Описываемые клетки имеют отростчатую и веретенообразную форму, базофильную и пиронинофильную цитоплазму, крупные ядрышки в кариоплазме. В швартах обнаруживаются также монокле-

леары. Нарастают дегенеративные изменения в стекловидном теле. По краю сетчатки выявляются новообразованные гемокапилляры, просвет которых заполнен эритроцитами. Вблизи них идет активное волокнообразование, выявляются клетки фибробластического ряда.

На 14-е сутки сформированы витреоретинальные шварты, местами с локальной тракционной отслойкой сетчатки. Из клеточных элементов в швартах преобладают зрелые фибробласты со всеми характерными для них морфологическими особенностями. Обнаруживаются многочисленные клетки мононуклеарного ряда. Наблюдается образование соединительнотканых волокон, в швартах встречаются новообразованные сосуды. Имеет место выраженная клеточная пролиферация по ходу артерий и вен сетчатки, и явления ретинальной неоваскуляризации.

На 21-е сутки в стекловидном теле отмечены грубые фиброваскулярные шварты с тракционной отслойкой сетчатки, кровоизлияния в стекловидное тело и сетчатку.

Динамика развития пролиферативной витреоретинопатии при интравитреальном введении мононуклеаров крови на фоне экспериментального сахарного диабета

При непрямой офтальмоскопии, проводившейся животным с экспериментальным сахарным диабетом до интравитреального введения мононуклеаров крови, не было отмечено изменений на глазном дне.

После введения мононуклеаров при непрямой офтальмоскопии у животных с экспериментальным сахарным диабетом выявлены следующие изменения. На 3-и сутки после инъекции у всех крыс в центральных отделах стекловидного тела отмечены локальные помутнения серовато-белого цвета, сетчатка не изменена. На 5-7-е сутки офтальмоскопия затруднена из-за ограниченных неподвижных помутнений в стекловидном теле. На 14-е сутки у 4 животных наблюдалось помутнение задних отделов хрусталика, препятствующее офтальмоскопии; в глазах остальных животных – обширное, грубое, фиксированное помутнение в преретинальных и центральных отделах стекловидного тела, что затрудняло оценку состояния сетчатки. На 21-е сутки у всех крыс рефлекс с глазного дна отсутствует из-за развития катаракты. В контрольных глазах с инъекцией изотонического раствора хлорида натрия изменений не выявлено.

При взятии материала для гистологических исследований макроскопически в глазах с введенными мононуклеарами, начиная с 14-х суток, обнаружены признаки субатрофии экспериментальных глаз (у 4 животных передне-задний размер составил 5-6 мм). На 21-е сутки - во всех экспериментальных глазах наблюдалась субатрофия.

В ходе морфологических исследований глаз у крыс с сахарным диабетом после интравитреальной инъекции мононуклеаров выявлены следующие изменения. На 3-и сутки после введения клеток в стекловидном теле обнаруживаются многочисленные элементы мононуклеарного ряда. Некоторые из них подвержены выраженным изменениям, проявляющимся нарушениями тинкториальных свойств цитоплазмы и пикнозом ядра. Среди мононуклеаров встреча-

ются клетки веретенообразной и отростчатой формы, с овальным или продолговатым ядром и пирониофильной цитоплазмой. В стекловидном теле выявляется оксифильная фибриллярная структура. По ходу артерий и вен в сетчатке наблюдается клеточная инфильтрация. Часть фоторецепторов подвержена пикнотическим изменениям. Сетчатка сохраняет связь с хориоидеей, отслойки не обнаружено.

На 5-е сутки в стекловидном теле и преретинально начинаются процессы образования соединительнотканых волокон. Клеточные элементы представлены моноклеарами и фибробластоподобными клетками. Интратретинально обнаруживаются новообразованные сосуды, исходящие из хориоидеи. В сетчатке наблюдаются деструктивные нарушения в стенках венозных сосудов, сопровождаемые различной величины кровоизлияниями. Часть нейросенсорных клеток характеризуется пикнозом. Отмечается расслоение мембранных дисков в наружных сегментах фоторецепторов. Изменения внутренних сегментов характеризуются набуханием митохондрий, расширением цистерн эндоплазматической сети. В клетках пигментного эпителия наблюдается удлинение и утолщение апикальных отростков, активизация фагоцитарной активности.

На 7-е сутки среди обширных клеточных скоплений в стекловидном теле и преретинально значительно увеличивается количество фибробластов с типичной ультраструктурой. Формируются витреоретинальные шварты. Прогрессируют дегенеративные изменения сетчатки, что проявляется деструкцией нейросенсорных клеток и значительным очаговым истончением наружного ядерного слоя. Весьма интенсивно выражена пролиферация эндотелия ретинальных сосудов.

На 14-е сутки в результате слияния отдельных, изолированных преретинальных мембран формируется довольно мощная витреоретинальная шварта с локальной тракционной отслойкой сетчатки. Обнаруживаются крупные кровоизлияния в стекловидное тело и сетчатку, что связано с наличием новообразованных сосудов как в самой сетчатке, так и в шварте. Прогрессируют деструктивные изменения в сетчатке: очаговое истончение наружного ядерного слоя и его выпадение, пикноз сохранившихся нейросенсорных клеток, деструкция в слое палочек и колбочек, резкое расширение субретинального пространства. Наряду с указанным наблюдаются деструктивные процессы и в других слоях сетчатки, но они менее выражены.

На 21-е сутки обнаруживаются грубые изменения в виде массивных интравитреальных мембран, а также развитие преретинальной и интратретинальной фиброваскулярной ткани. Хориоидея фиброзно изменена.

Сравнительный анализ морфогенеза экспериментальной пролиферативной витреоретинопатии в условиях нормо- и гипергликемии

Сравнительный анализ результатов непрямой офтальмоскопии у здоровых животных и крыс, больных сахарным диабетом, не выявил существенной разницы в динамике развития ПВР после интравитреальной инъекции моноклеаров крови.

Анализ результатов морфологических исследований позволил установить важные отличительные особенности ПВР в условиях нормо- и гипергликемии. В первую очередь, обращает на себя внимание развитие деструктивных изменений в сетчатке у животных с экспериментальным сахарным диабетом до интравитреальной инъекции моноклеаров. Спустя 6 недель после введения аллоксана, приводящего к развитию сахарного диабета, количество нейросенсорных клеток с пикнозом возрастает до 6,38% (контроль 2,0%; $p_U < 0,05$).

После интравитреального введения моноклеаров крови, деструктивные изменения в фоторецепторах прогрессируют (рис. 3). Введение моноклеаров крови в полость глазного яблока животных с экспериментальным сахарным диабетом статистически значимо ($p_T < 0,05$) увеличивает число деструктивных нейросенсорных клеток сетчатки, по сравнению со здоровыми крысами, на протяжении всего периода наблюдений. Более того, резко нарастает скорость и амплитуда накопления признака, особенно в ранние сроки (в 3-6 раз на 3-7-е сутки) по сравнению с данными у животных без диабета и фоном (до введения моноклеаров) (рис. 3). Обнаруживаются также прогрессирующее истончение наружного ядерного слоя и его выпадение, гипертрофия и отек отростков радиальной глии, деструкция в слое палочек и колбочек.

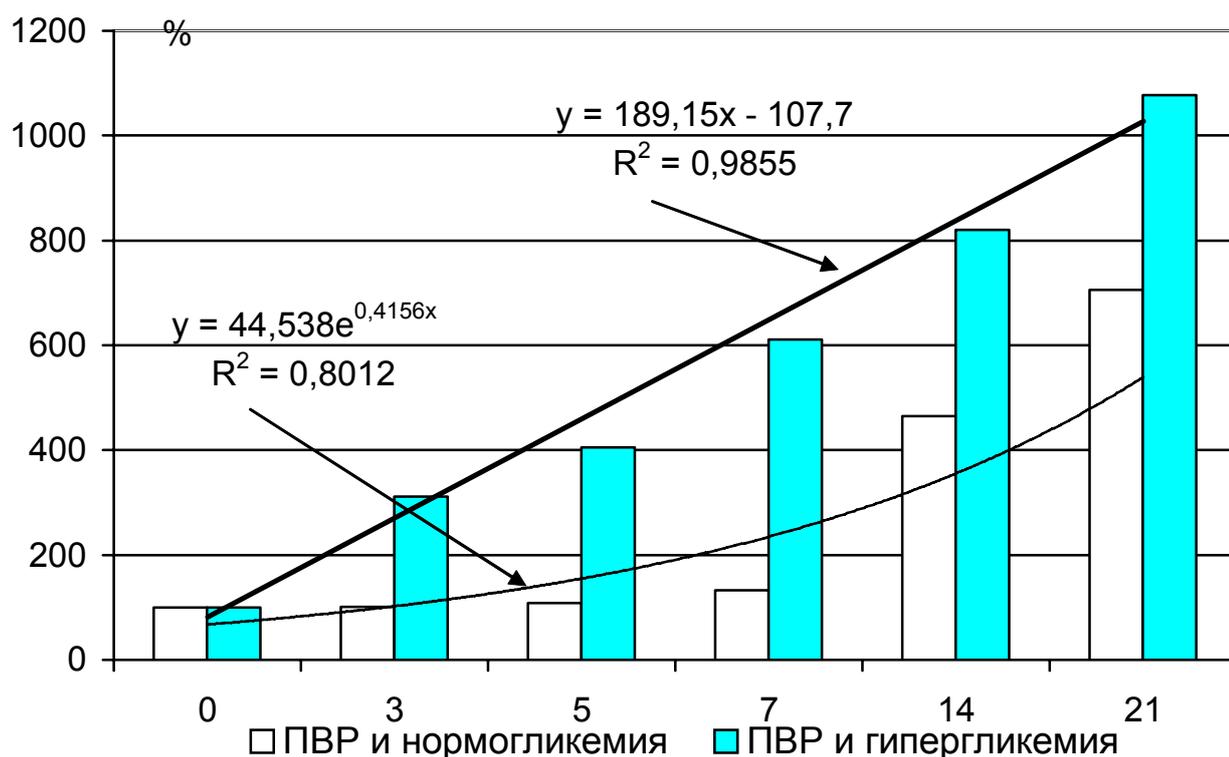


Рис. 3. Количество деструктивно измененных нейросенсорных клеток сетчатки в динамике развития пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) у здоровых животных и крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

По оси абсцисс – сроки эксперимента, сутки; по оси ординат – количество клеток в % от фона (день 0).

У животных контрольной группы слои сетчатки имели обычную толщину. Пикнозу были подвержены лишь единичные нейросенсорные клетки (2,0%). Численная плотность ядер в наружном ядерном слое сетчатки составляет 3491 в 1 мм² среза.

В ранние сроки после интравитреального введения моноклеаров крови у животных обеих групп обнаруживаются также дегенеративные изменения стекловидного тела с образованием оксифильных фибриллярных структур. В них выявляются моноклеары и фибробластоподобные клетки отростчатой и веретенообразной формы. Со стороны ретинальных сосудов отмечается пролиферация эндотелиоцитов, периваскулярная клеточная инфильтрация.

Однако, выраженность и объем дегенеративных изменений существенно больше у животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Формирующиеся в дальнейшем пролиферативные мембраны у животных обеих групп характеризуются сходным морфологическим строением. Клеточные элементы представлены фибробластами, макрофагами, лимфоцитами. Внеклеточный матрикс состоит из коллагеновых волокон различной толщины. По мере разрастания и организации соединительнотканного компонента происходит слияние отдельных пролиферативных мембран. Наличие витреоретинальных фиброзных шварт обуславливает появление тракционной отслойки сетчатки.

Объем и выраженность пролиферативных процессов в полости глазного яблока оказались более выраженными у животных с аллоксановым диабетом. В течение всего периода наблюдений число фибробластов в 2 раза превышало ($p_T < 0,05$) таковое у здоровых крыс.

Весьма интенсивно у них выражены и явления неоваскулогенеза: новообразованные сосуды в сетчатке обнаруживаются уже на 5-е сутки после интравитреального введения моноклеаров крови, и статистически значимо ($p_T < 0,01$) превышают показатели у здоровых крыс на протяжении всего периода наблюдений.

Выявленные в ходе морфологических исследований деструктивные изменения в сетчатке у животных с аллоксановым диабетом соответствуют литературным данным о ранних гистологических изменениях в тканях глазного яблока на фоне индуцированного сахарного диабета (Bazan N.G et al., 1997; Kern T.S., 1996). Согласно сообщениям ряда авторов (Akagi Y. et al., 1986; Gordon W.C., 1997), в ранние сроки развития экспериментального сахарного диабета в сетчатке обнаруживаются деструктивные изменения на уровне нейросенсорных клеток и глии. Предполагается, что пусковым механизмом нейральной дегенерации является нарушение метаболизма глутамата (Kowluru R. et al, 1994; Lieth E., 1998). Поражение радиальной глии влечет за собой нарушение нейроглиальных взаимоотношений и способствует деструкции нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев сетчатки (Варакута Е.Ю., 2002). Патоморфологические изменения микроциркуляторного русла сетчатки характеризуются утолщением базальных мембран, пролиферацией эндотелиальных клеток и перипитов, явлениями плазматического пропитывания (Engerman R.L. et al., 1994). По мере прогрессирования основного процесса описанные изменения

нарастают и ведут к развитию диабетической ретинопатии (Байтерякова Л.С. и др., 1980; Akagi Y. et al., 1986; Patz A., 1972).

Выявленные в ходе морфологических исследований отличия в выраженности и объеме фиброваскулярных пролиферативных мембран у животных с индуцированным сахарным диабетом, вероятно, также обусловлены патогенетическими особенностями данного заболевания. Аллоксановый диабет характеризуется первичной абсолютной недостаточностью инсулина, и у животных отмечаются соответствующие специфические изменения метаболизма: нарушается гликолитический путь окисления глюкозы, усиливается гликогенолиз, увеличивается использование свободных жирных кислот в качестве источника энергии (Баранов В.Г., 1983). Характерны нарушения липидного и белкового обмена веществ, изменения реологических свойств крови с гиперкоагуляционными сдвигами в системе гемостаза.

Качественные и количественные нарушения метаболизма с развитием окислительного стресса усиливают деструктивные изменения в ткани сетчатки и микроциркуляторном русле. Многофакторность и полиорганность повреждения вызывают, по-видимому, истощение адаптационных возможностей организма. Следствием этого является нарушение и разобщение локальных (межклеточных, тканевых, органных) и общих (гуморальной, иммунной, нейротрофической) регуляторных систем. Формируется порочный патологический круг, в котором имеется сложный комплекс патохимических дефектов в общей системе контроля уровня сахара в крови, инсулиносекреции, гормональной рецепции и контринсулярных гормонов (Баранов В.Г., 1983; Frank R.N., 1994). Декомпенсация процесса усугубляет патоморфологические изменения в органах и тканях, способствуя прогрессированию заболевания и развитию осложнений.

Таким образом, сложные биохимические и патофизиологические нарушения на фоне экспериментального сахарного диабета обуславливают развитие выраженных деструктивно-пролиферативных изменений в полости глазного яблока. Интравитреальное введение мононуклеаров крови диабетическим животным значительно увеличивают темп и амплитуду патологических процессов.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ IN VITRO

В процессе культивирования *in vitro* мононуклеаров периферической крови, взятых от здоровых доноров-добровольцев, в условиях направленного движения питательной среды получены следующие результаты.

Спустя 24 ч от начала эксперимента культура мононуклеаров на фильтре представлена прочно адгезированными к субстрату клетками округлой формы, с крупным ядром, иногда с зубчатым впячиванием. Ядерно-цитоплазматическое отношение около 1. Цитоплазма базофильная. Цитохимически (табл. 2) в клетках отмечается высокая активность α -нафтилацетатэстеразы, блокируемая фторидом натрия. Это соответствует характеристике клеток

моноцитарно-макрофагальной линии (Хейхоу Ф.Г.Дж., 1983). Щелочная фосфатаза в культивируемых клетках не выявляется.

Спустя 48 ч (табл. 2) в клетках отмечается повышение активности α -нафтилацетатэстеразы ($p_U < 0,01$). При проведении реакции с фторидом натрия на фильтре обнаружены единичные элементы, в которых активность неспецифической эстеразы не подавляется. Исследование на щелочную фосфатазу выявило ее умеренную активность в некоторых клетках. По большинству морфологических параметров указанные клетки относятся к молодым формам фибробластической популяции.

Спустя 72 ч культуры клеток на фильтре состоят из макрофагов и лимфоцитов. Ядро почковидной или округлой формы, с зубчатым впячиванием. Ядерно-цитоплазматическое отношение менее 1. Среди лимфоцитов и макрофагов обнаружены единичные, крупных размеров клетки неправильной, веретенообразной формы. Они разбросаны по поверхности фильтра прочими клеточными элементами.

Таблица 2

Цитохимическая активность мононуклеаров крови при культивировании *in vitro* в условиях направленного движения жидкости (у.е.о.п.), X, p_U

Цитохимическая реакция	Сроки культивирования, часы		
	24	48	72
Неспецифическая эстераза	63,81	69,17 p_0	73,39 p_1
Фторид резистентная неспецифическая эстераза	0	64,93	71,45 p_0
Щелочная фосфатаза	0	40,17	69,07 p_0

Примечание: статистически значимые различия отмечены ($p_0 < 0,01$) при сравнении с исходными показателями; ($p_1 < 0,01$) при сравнении показателями в динамике.

Цитохимически в указанных клетках отмечается более высокая активность α -нафтилацетатэстеразы по сравнению с показателями через 48 ч культивирования ($p_U < 0,01$, табл. 2). Активность неспецифической эстеразы не подавляется фторидом натрия. В подобных клетках отмечается также повышение активности щелочной фосфатазы по сравнению с данными через 48 ч от начала эксперимента ($p_U < 0,01$, табл. 2).

Морфологические и цитохимические параметры указанных клеток соответствуют активно синтезирующим фибробластам. При исследовании полупроницаемого фильтра, на котором культивировались клетки, в его структурах выявлены соединительнотканые волокна в виде тонких длинных тяжей.

В процессе культивирования мононуклеаров периферической крови здоровых доноров-добровольцев в условиях стационарной культуры получены

следующие результаты. На протяжении всей серии экспериментов (24, 48, 72 ч) клеточная культура на фильтре представлена клетками округлой формы, с бобовидным или круглым ядром, с зубчатым впячиванием. Ядерно-цитоплазматическое отношение около или менее 1. Это соответствует характеристике клеток лимфоцитарной и моноцитарно-макрофагальной линий. Цитохимически в клетках отмечается умеренная активность α -нафтилацетатэстеразы, которая постепенно повышается в процессе культивирования ($p_U < 0,05$), что связано с дифференцировкой моноцитов в макрофагальные клетки. Активность неспецифической эстеразы ингибируется фторидом натрия. Щелочная фосфатаза в культивируемых клетках не выявляется.

Новый способ культивирования мононуклеаров крови *in vitro* характеризуется значительным сходством с природой и сущностью происходящих при кровоизлияниях в полость глазного яблока процессов, когда после адгезии к фибриллам стекловидного тела мононуклеары оказываются на пути движения внутриглазной жидкости. При культивировании в разработанном устройстве (рис. 1) мононуклеары крови после введения в камеру (2) адгезируют к волокнам полупроницаемого фильтра (3) и находятся на пути движения питательной среды, циркулирующей в одном направлении.

Как известно, структурные и функциональные возможности клеток реализуются в их метаболизме (Фаллер Дж., 2003). Показатели внутриклеточного обмена позволяют судить о состоянии клеток, направлении и интенсивности их деятельности.

Так, через 24 ч после эксплантации и культивирования клеток *in vitro* в различных условиях (направленное движение питательной среды, стационарная культура) результаты цитохимических исследований клеточного материала, независимо от условий эксперимента, соответствуют характеристике клеток моноцитарно-макрофагальной линии. Активность неспецифической эстеразы в клетках одинаково высокая.

Через 48 ч в мононуклеарах, культивируемых в динамических условиях (направленное движение питательной среды), отмечено повышение активности α -нафтилацетатэстеразы по сравнению с клетками, находящимися в стандартных условиях ($p_U < 0,01$). Среди мононуклеаров, культивируемых в разработанном устройстве, выявлены единичные клетки, характер цитохимических реакций в которых соответствует молодым элементам фибробластической популяции.

Через 72 ч активность α -нафтилацетатэстеразы в мононуклеарах, культивируемых в динамических условиях, также выше, чем в клетках, выращиваемых в стандартных (статических) условиях ($p_U < 0,01$). При этом выявлены единичные клетки, морфофункциональные особенности которых соответствуют активно синтезирующим фибробластам (активность неспецифической эстеразы, не блокируемая фторидом натрия; высокая активность щелочной фосфатазы). Подтверждением их функциональной активности служит и обнаружение на фильтре тонких соединительнотканых волокон.

При культивировании мононуклеаров крови в статических условиях цитохимически в них отмечена лишь высокая активность фторид-чувствительной α -нафтилацетатэстеразы, сохранявшаяся практически на одном уровне в течение всей серии экспериментов.

Важное значение для анализа и интерпретации полученных фактов имеют представления о циркуляции среди мононуклеаров крови клеток мезенхимальной природы, изложенные еще в теориях «мезенхимального резерва» А.А. Максимова и «клеточного камбия» А.А. Заварзина. По аналогии с организацией кроветворной ткани предполагается наличие в костном мозге и крови нескольких типов стромальных клеток – стволовых, коммитированных и клеток-предшественников (Хрущов Н.Г., 1988; Фриденштейн А.Я., 1980). Возможно, источником фибробластических клеток, обнаруженных на фильтре при культивировании мононуклеаров крови *in vitro* в разработанном устройстве, являются циркулирующие в крови мезенхимальные клетки различной степени дифференцировки. Известно, что 60-80% циркулирующих стволовых клеток находится в состоянии покоя (Гаврилов О.К., 1985). Вступление в митотический цикл обусловлено сопряжением между воздействующими на клетки сигналами, состоянием клеточной поверхности и внутренним ответом клеток. В качестве сигналов могут выступать факторы роста, гормоны, а также факторы микроокружения. Модулирующие факторы внеклеточной среды, контактируя с рецепторами клеточной поверхности, действуют как экзогенные регуляторные сигналы (Епифанова О.И., 1983). В условиях проводимых экспериментов подобным экзогенным сигналом для адгезированных к фильтру мононуклеаров крови может быть постоянное направленное движение питательной среды и внеклеточный матрикс.

Можно предположить, что после взаимодействия внешнего сигнала с клеточными рецепторами инициируется каскадный механизм определенных внутриклеточных процессов. В родоначальной мезенхимальной клетке, находящейся в периоде G_0 , происходят координированные метаболические и морфологические изменения, в результате чего она приобретает компетентность к делению и/или дифференцировке. Стволовая клетка коммитируется, т.е. становится детерминированной. Коммитирование клеток мезенхимальной природы, как и стволовых кроветворных клеток, по всей видимости, имеет стохастический (вероятностный) характер (Хрущов Н.Г., 1988). Образующиеся клетки-предшественники обладают морфологическими, цитохимическими или иными признаками превращения в зрелые клеточные формы и не способны переходить в период покоя.

Так, через 48 ч от начала эксперимента цитохимическая маркировка выявила в культуре мононуклеаров клетки фибробластической популяции, являющиеся, вероятнее всего, клетками-предшественниками фибробластов. Полученные результаты согласуются с данными А.Я. Фриденштейна с соавт. (1980) о том, что прекурсоры фибробластов вступают в синтетический период между 28 и 60 ч после эксплантации.

Однако в динамической культуре через 72 ч уже присутствуют отдельные клетки, фенотипически соответствующие зрелым фибробластам. В то же время

по данным А.Я. Фриденштейна (1980) в стационарной культуре колонии фибробластов, связанные с пролиферацией и дифференцировкой клеток, появляются только на 4-5 день клонирования.

Представляет интерес мнение Ю.Б. Вахтина (1980) о том, что наиболее благоприятным окружением для клеток является то, в котором максимально полно реализуются потенции клеток к дифференцировке, а не их способность пролиферировать.

Можно предположить, что в условиях проводимых экспериментов реализация, преимущественно, дифференцировочного потенциала клеток-предшественников *in vitro* в значительной степени опосредуется: 1. наличием направленного движения питательной среды; 2. полупроницаемым фильтром – субстратом, к которому адгезируются клетки; 3. высокой плотностью первоначальной культуры; 4. бедным составом питательной среды.

По-видимому, адгезированные к фильтру клетки-предшественники, находясь на пути движения питательной среды, претерпевают серию модификационных трансформаций, в ходе которых проявляется активность разных ферментных систем. Изменения внутриклеточного гомеостаза и гомеокинеза сопряжены с процессами блокирования-деблокирования различных наборов генов на субклеточном уровне. Вероятно, активация генов, кодирующих образование клеточных структур, специфичных для фибробластической популяции, и обеспечивает переход к цитодифференцировке. Как следствие, клетки-предшественники фибробластов при постоянном модулирующем влиянии факторов микроокружения в течение 3-х суток дифференцируются в зрелые формы, продуцирующие коллаген.

Таким образом, при культивировании мононуклеаров крови *in vitro* в условиях направленного движения питательной среды отмечается, повышение их внутриклеточной ферментативной активности. При модулирующем влиянии факторов микроокружения (направленный поток жидкости, внеклеточный матрикс) обнаруживаемые среди мононуклеаров молодые стромальные клетки дифференцируются в зрелые формы, продуцирующие коллаген.

ПРОБЛЕМА СТАНОВЛЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ВИТРЕОРЕТИНОПАТИИ С ПОЗИЦИЙ СИСТЕМНОГО ПОДХОДА

За последние годы накоплено большое число фактов и представлений, касающихся различных сторон этиологии и патогенеза ПВР. Современные сведения многочисленны, однако недостаточно сопряжены в понимании целостной картины данного процесса. В связи с этим назрела необходимость изучения закономерностей становления и развития фиброваскулярной пролиферации в полости глазного яблока на основе системного подхода, поскольку он «помогает четче фиксировать познание на различных объектах ..., изучении интегральных свойств и закономерностей целостных явлений и их комплексов, анализе многомерных ситуаций и зависимостей» (Кузьмин В.П., 1986).

Нарушение целостности витреоретинальных структур при развитии патологических процессов в заднем полюсе глазного яблока сопровождается миграцией форменных элементов крови, включая мононуклеары, в стекло-

видное тело. Подобные механизмы выхода клеток крови в разные ткани описаны при различной патологии (Бабаева А.Г., 1972). Возникающие при этом изменения способствуют инициации ряда патогенетических событий, которые наслаиваются друг на друга. В стекловидном теле создается микросреда со сложными межклеточными и клеточно-структурными взаимоотношениями и взаимодействиями.

В общем клеточном ансамбле, помимо эритроцитов, присутствуют тромбоциты, моноциты/макрофаги, лимфоциты, кроветворные и стромальные родоначальные клетки. При наличии ретинальных дефектов возрастает роль клеток пигментного эпителия и глии (Camprochiato P.A., 1996). Развитие пролиферативного процесса сопряжено с усложнением клеточного состава, обязательным участием в формировании периретинальных мембран фибробластов различной степени зрелости, а также коллагена, фибронектина и других компонентов внеклеточного матрикса.

В полости глазного яблока формируется сложная многокомпонентная система с клеточными и внеклеточными элементами, определяющая развитие и последовательность основных событий в патологическом очаге. Однако реализация патогенетического потенциала указанной системы – это не суммирование числа и возможностей ее компонентов, а их тесная взаимосвязь и активное взаимодействие.

Целью системы является устранение повреждения в заднем полюсе глазного яблока, т.е. максимальное анатомическое восстановление тканей с минимальными в данных условиях функциональными потерями. После установления клеточных коопераций динамика патогенетических событий определяется взаимодействиями клеток со структурными элементами оболочек в заднем полюсе глазного яблока (рис. 4). Происходит адгезия клеток на волокнах стекловидного тела и на поверхности сетчатки. Адгезия сопровождается функциональной перестройкой клеток, интенсивность которой имеет отношение к реализации их эффекторного заряда (Пикуза О.И., 1993). Секретируемые клетками цитокины, протеолитические ферменты оказывают повреждающее действие на ткань сетчатки и коллагеновые волокна стекловидного тела как непосредственно, так и через активацию кининогенеза и системы комплемента. Макрофаги в процессе утилизации кислорода способствуют его частичному восстановлению с образованием свободных радикалов. Биокислители оказывают цитотоксическое действие, инициируя реакции перекисного окисления липидов в биологических мембранах (Маянский Д.Н., 1991). Повышенный уровень синтеза свободных радикалов O_2 индуцирует также повреждение белков и нуклеиновых кислот. Модификации белков вызывают появление у них антигенных свойств, а образующиеся при этом иммунные комплексы, в свою очередь, стимулируют продукцию активированных форм кислорода.

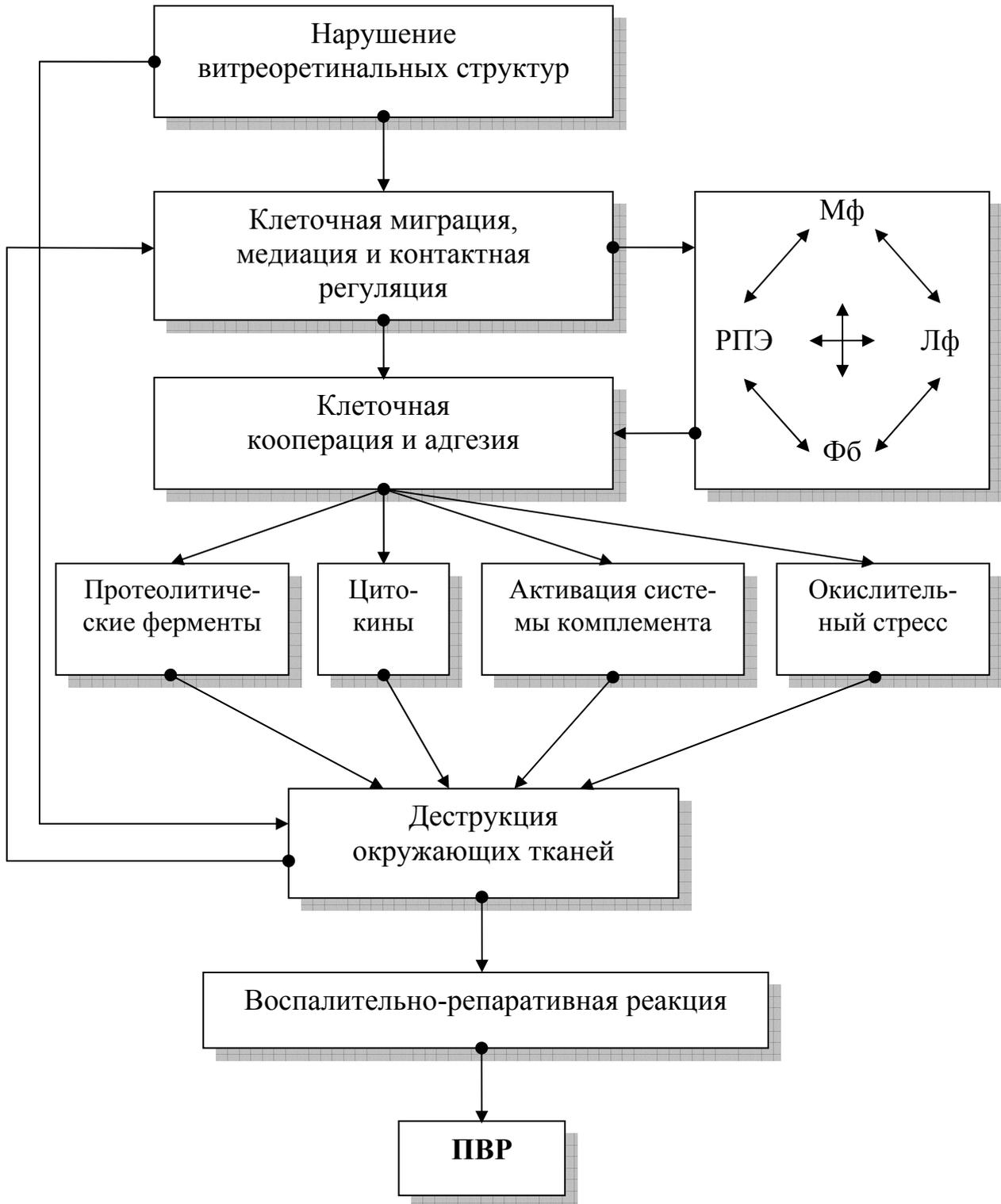


Рис. 4. Система клеточной кооперации – как главное звено патогенеза ПВР. (Мф – макрофаги, РПЭ – ретинальный пигментный эпителий, Лф – лимфоциты, Фб – фибробласты, ПВР – пролиферативная витреоретинопатия).

В результате замыкается порочный патологический круг, и развивается состояние, обозначаемое как «хронический окислительный стресс» (Зенков Н.К., 2000). На ранних этапах в участках локальной деструкции ткани сетчатки, образующихся вследствие повреждающего действия протеолитических ферментов и свободных радикалов O_2 , начинается активная пролиферация клеток пигментного эпителия и глиии с образованием эпиретинальной мембраны и появлением складчатости сетчатки (Хорошилова-Маслова И.П. и др., 2002; Camrroschiaro P.A., 1997). Продукты распада способствуют участию мононуклеаров (макрофагов) в фибропластическом процессе. Эти клетки рассматриваются в качестве истинных регуляторов фиброгенеза, оказывающих влияние на хемотаксис и функции фибробластов.

Современные представления о биологической роли мононуклеаров основываются на их функциональной гетерогенности, включающей фагоцитарные, регуляторные и эффекторные свойства, способности секретировать многочисленные продукты метаболизма, опосредующих функции данных клеток (Земсков В.М., 1993; Цырендоржиев Д.Д., 1999). Кроме того, среди мононуклеаров периферической крови присутствуют клетки гемопоэтической и мезенхимальной линий различной степени дифференцировки (Гаврилов О.К., 1985).

Несмотря на гетерогенность мононуклеарных клеток, неизменным остается их свойство функциональной полипотентности, т.е. способности реализовывать разные потенции генома в зависимости от регуляторных воздействий микроокружения (Фрейдлин И.С., 1984; Arenson E.V., 1980). Секреторный потенциал в сочетании с синтетическими ресурсами и функциональной полипотентностью значительно расширяют эффекторные возможности мононуклеаров, и способны внести существенные коррективы в систему клеточной кооперации и взаимодействий.

Так, после миграции в витреальную полость моноциты превращаются в макрофаги, которые адаптируются к среде их будущего обитания. Ход дифференцировочного процесса, равно как и степень активации клеток на каждом из его этапов, в значительной мере зависят от влияния факторов микроокружения (Ковальчук Л.В., 1991).

Микроокружение в полости глазного яблока складывается из взаимодействующего комплекса анатомо-физиологических особенностей и внестромальных компонентов регуляции. Анатомо-физиологические особенности определяются наличием направленного движения внутриглазной жидкости и фибриллярным строением стекловидного тела. Внестромальные компоненты представлены как клеточными элементами, мигрирующими в витреальную полость (лимфоциты, моноциты, фибробласты, тромбоциты, клетки пигментного эпителия и т.д.), так и гуморальными факторами (цитокины, факторы роста).

После попадания в стекловидное тело, моноциты адгезируются к волокнам его фибриллярного остова и оказываются на пути движения внутриглазной жидкости от цилиарного тела к ретинальным сосудам. Помимо собственно внутриглазной жидкости, в направленном движении принимают участие также потоки различных ионов, продуктов метаболизма и многих других факторов.

Наличие направленного движения жидкости способно вызвать биохимические, морфологические и функциональные сдвиги в моноцитарных клетках, ускоряя процесс их дифференцировки в макрофаги. Подтверждением этому служат результаты культивирования *in vitro* мононуклеаров крови в динамических условиях (табл. 2). При культивировании в стандартных условиях макрофагальные клетки обнаруживаются, как правило, на 7-е сутки (Ковальчук Л.В., 1991). В последующем макрофаги регулируют привлечение в полость глазного яблока новых моноцитарных клеток, их дифференцировку и активацию.

Гетерогенность мононуклеаров крови обусловлена и присутствием в популяции клеток мезенхимальной природы различной степени дифференцировки. По данным А.Я. Фриденштейна (1980), в крови среди мононуклеаров циркулируют клетки-предшественники фибробластов.

Результаты показывают (табл. 2), что вместе с мононуклеарами в витреальную полость поступают и молодые мезенхимальные (стромальные) клетки. При культивировании *in vitro* мононуклеаров крови в условиях направленного движения питательной среды в течение 72 часов молодые клетки дифференцируются в фенотипически зрелые фибробласты. При культивировании в стандартных условиях фибробласты в культуре выявляются на 4-5-е сутки (Фриденштейн А.Я., 1980).

Полученные результаты позволяют расширить представления о влиянии факторов микроокружения на реализацию пролиферативного и дифференцировочного потенциала клеток-предшественников фибробластов. Цитодифференцировка – процесс формирования у клеток при соответствующих (благоприятных) условиях окружения специализированных структур и функций (Вахтин Ю.Б., 1980). Возможно, такой благоприятной для реализации дифференцировочных потенций молодых мезенхимальных клеток средой и является микроокружение в полости глазного яблока. При постоянном влиянии направленного движения жидкости в адгезированных клетках-предшественниках происходит серия модификационных трансформаций, связанных с активацией дополнительных ферментных систем и новых механизмов биосинтеза. Так, при культивировании в динамических условиях отмечено постепенное повышение активности α -нафтилацетатэстеразы, не ингибируемой фторидом натрия, и выявлена щелочная фосфатаза, активность которой постепенно возростала (табл. 2).

Изменения внутриклеточных биохимических процессов сопряжены с активацией и инактивацией различных наборов генов, обеспечивающих клеточный гомеостаз и гомеокинез. Переход метаболизма клеток на качественно новый уровень неразрывно связан с определенной стадией их дифференцировки, каждая из которых в настоящее время рассматривается как компонент единой дифференцировочной программы (Хрущов Н.Г., 1988).

Изменение экспрессии генов, обусловленное внутриклеточными биохимическими сдвигами, по всей видимости, инициирует реализацию дифференцировочной программы в соответствующем направлении. В результате клетки-предшественники фибробластов при модулирующем влиянии факторов микроокружения (направленный поток жидкости, фибриллярный остов стекловидного тела) быстро дифференцируются в зрелые формы, продуцирующие коллаген.

Далее в патологическом очаге в соответствии с влиянием микроокружения и гуморальных стимулов фибробласты начинают процесс фиброгенеза. Синхронно с ростом фиброзных волокон отмечается и рост новообразованных сосудов, поскольку факторы, секретлируемые макрофагами, лимфоцитами и другими клетками, не только воздействуют на фибробласты, но и стимулируют неоваскулогенез (Гурина О.Ю., 1985; Schroder S., 1991).

Таким образом, клеточно-гуморальная кооперация в полости глазного яблока обуславливает быстрое развитие периретинальных пролиферативных мембран. В этом патологическом процессе, наряду с резидентными клетками, участвуют мононуклеары крови (рис. 2, 4), резко ускоряющие динамику заболевания.

В условиях длительного действия агрессивных факторов адаптивный характер миграции мононуклеаров крови в задний полюс глазного яблока, имеющий целью стабилизировать внутреннюю среду, утрачивает защитно-приспособительный характер и способствует хронизации воспаления. Сопряженная с воспалением репаративная реакция также теряет защитно-компенсаторные свойства, с помощью которых фибропластические процессы осуществляются при минимальной затрате гомеостатических ресурсов.

Происходит разобщение между воспалительной и репаративной реакциями, что усложняет систему межклеточных взаимодействий, меняя масштабы фиброгенеза в сторону неадекватного разрастания фиброваскулярной ткани в полости глазного яблока.

Таким образом, изучение механизмов ПВР с позиций системного подхода указывает на формирование в полости глазного яблока целостной системы, главным патогенетическим фактором которой являются мигрирующие из крови мононуклеарные элементы (моноциты, фибробластоподобные клетки). Целью системы является восстановление нарушенного динамического постоянства внутренней среды с минимальными функциональными потерями. Однако, развитие системы при модулирующем влиянии микроокружения сопровождается увеличением количества ее компонентов, усложнением их взаимосвязей и взаимодействий, способствуя тем самым прогрессированию патологического процесса. Возможно, подобная негативная динамика событий является общебиологической закономерностью, поскольку описана при других патологических процессах и в других системах организма (Гольдберг Е.Д. с соавт., 1997). Динамика основных патогенетических событий включает качественные преобразования системы и в дальнейшем характеризуется формированием в полости глазного яблока фиброваскулярных пролиферативных мембран.

ВЫВОДЫ:

1. Периретинальные фиброваскулярные мембраны у больных с различной патологией в заднем отрезке глаза (диабетическая пролиферативная витреоретинопатия; центральная атеросклеротическая хориоретинопатия, далеко зашедшая стадия; регматогенная отслойка сетчатки, осложненная пролиферативной витреоретинопатией) характеризуются сходным морфологическим строением, что свидетельствует об общем патогенезе пролиферативных изменений в полости глазного яблока.

2. Развитие экспериментальной пролиферативной витреоретинопатии, проявляющейся фиброваскулярной пролиферативной реакцией и тракционной отслойкой сетчатки с последующей субатрофией глазного яблока, индуцируется интравитреальным введением моноклеарных клеток крови.

3. На фоне экспериментального сахарного диабета моноклеары крови способствуют резкому прогрессированию некроза нейросенсорных клеток с очаговым выпадением соответствующих слоев сетчатки и разрастанием радиальной глии. При этом отмечается увеличение скорости и амплитуды пролиферативных изменений в полости глазного яблока, формирование массивных фиброзных шварт, тракционная отслойка сетчатки, интенсивный неоваскулогенез.

4. Культивирование *in vitro* моноклеаров периферической крови человека в условиях направленного движения питательной среды, моделирующего движение внутриглазной жидкости, вызывает последовательное повышение внутриклеточной ферментативной активности и ускорение (по сравнению со стационарной культурой) процесса дифференцировки моноцитов в макрофагальные клетки.

5. При проточном культивировании *in vitro* моноклеаров периферической крови человека, в отличие от стационарной культуры, выявлены клетки, цитохимический профиль которых соответствует молодым элементам фибробластической популяции. При этом молодые стромальные клетки быстро, в течение 3 суток, дифференцируются в зрелые формы, синтезирующие коллаген.

6. Системный анализ механизмов пролиферативной витреоретинопатии указывает на формирование в полости глазного яблока сложной системы, главным патогенетическим фактором которой являются мигрирующие из крови моноклеарные элементы (моноциты, фибробластоподобные клетки), способные инициировать и усиливать развитие фиброваскулярной ткани.

Практические рекомендации

1. С целью ограничения миграции мононуклеаров крови в полость глазного яблока и уменьшения их негативного влияния на витреоретинальные структуры у больных с различной патологией заднего отрезка глаза, патогенетически обоснованно назначение ангиопротекторов, антиоксидантов и противовоспалительных средств.
2. При кровоизлияниях в стекловидное тело необходимо проведение своевременной, по возможности, ранней, трансцилиарной витрэктомии.
3. При появлении эпиретинальной пролиферативной ткани на начальной стадии развития ПВР целесообразно интравитреальное введение коллагенолитических препаратов с последующей витрэктомией и удалением пролиферативных мембран.
4. Вариант клеточной терапии заболеваний с местным введением сингенных мононуклеарных лейкоцитов может иметь негативные последствия, связанные с инициацией и ускорением фиброваскулярных пролиферативных реакций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Локальные механизмы взаимосвязи коллоидно-осмотического давления и офтальмотонуса у больных сахарным диабетом // Вестн. офтальмол.-1998.- № 2.- С. 43-44. (Соавт. Запускалов И.В., Цыров Г.И.)
2. Патогенетические аспекты диабетических изменений сетчатки с позиций механики кровообращения // Акт. проблемы клинич. офтальмологии: Тез. докл. науч. конф.- Челябинск, 1999.- С.284-286. (Соавт. Запускалов И.В., Шилова О.Г.)
3. Роль мононуклеаров крови в развитии пролиферативной витреоретинопатии в эксперименте на крысах // Сб. науч. тр. ФУСа / Отв. ред. М.Н. Шписман.- Томск, 1999.- С. 103-104. (Соавт. Запускалов И.В.)
4. Осмотическое давление крови как фактор патогенеза диабетической ретинопатии // Там же.- С. 105-107. (Соавт. Шилова О.Г.)
5. Экспериментальная модель пролиферативной витреоретинопатии на крысах // Боевые повреждения органа зрения: Тез. докл. науч. конф., посвященной 100-летию со дня рождения Б.Л. Поляка.- С.-Петербург, 1999.- С. 97-98. (Соавт. Запускалов И.В., Березовская А.А.)
6. Мононуклеары крови - как фактор патогенеза пролиферативной витреоретинопатии (экспериментальное исследование) // Сб. науч. тр. межрегиональной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию со дня рождения акад. И.П. Павлова.- Томск, 1999.- С. 198-200. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В.)
7. Модель пролиферативной витреоретинопатии с использованием мононуклеаров крови (экспериментальное исследование) // Акт. вопросы офтальмоэндокринологии и сосудистой патологии глаз: Тез. докл. науч. конф.- Красноярск, 1999.- С. 13-14. (Соавт. Запускалов И.В.)
8. Роль осмотического давления крови в патогенезе диабетических изменений сетчатки // Вестн. офтальмол.- 2000.- № 2.- С. 32-34. (Соавт. Запускалов И.В., Филиппова С.В., Шилова О.Г.)
9. Experimental model of proliferative vitreoretinopathy with blood mononuclears in rats // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2000.- Vol. 41, № 4.- P. 344. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В., Запускалова О.Б.)

10. Функционально-морфологические проявления витреоретинальной пролиферации, вызванной мононуклеарами крови, на фоне экспериментального сахарного диабета // Сб. статей молодых ученых и специалистов «Науки о человеке».- Томск, 2000.- С. 16-17. (Соавт. Запускалова Ю.И.)
11. Клинико-морфологические проявления экспериментальной пролиферативной витреоретинопатии // Тез. докл. науч. конф., посвященной 125-летию со дня рождения В.П. Филатова.- Украина, Одесса, 2000.- С. 291-292. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В.)
12. Витреоретинальная пролиферация из мононуклеаров крови на фоне экспериментального сахарного диабета // Тез. докл. VII Съезда офтальмологов России.- Москва, 2000.- С. 452-453. (Соавт. Запускалов И.В.)
13. Индуцирование мононуклеарами крови витреоретинальной пролиферации у крыс // Тез. докл. II Всероссийского симпозиума «Хроническое воспаление».- Новосибирск, 2000.- С. 28. (Соавт. Запускалов И.В.)
14. Функционально-морфологические проявления пролиферативной витреоретинопатии, вызванной мононуклеарами крови // Мат-лы науч. конф., посвящ. 70-летию офтальмологич. Службы Республики Хакасия.- Абакан, 2000.- С. 102-103. (Соавт. Запускалов И.В.)
15. Моделирование витреоретинальной пролиферации мононуклеарами крови на фоне экспериментального сахарного диабета у крыс // Мат-лы I Международ. науч.-практ. конф. «Пролиферативный синдром в офтальмологии».- Москва, 2000.- С. 19-20. (Соавт. Запускалов И.В.)
16. Патогенетические аспекты пролиферативной витреоретинопатии, индуцированной мононуклеарами крови // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.- 2000.- № 4 (14).- С. 102- 104. (Соавт. Запускалов И.В.)
17. Морфологическая характеристика периретинальных мембран у больных пролиферативной витреоретинопатией различной этиологии // Мат-лы межрегионал. науч. конф «Вопросы офтальмологии».- Красноярск, 2001.- С. 138-139. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В.)
18. Динамика развития пролиферативной витреоретинопатии при интравитреальном введении мононуклеаров крови в эксперименте // Там же.- С. 139-140. (Соавт. Запускалов И.В., Екимов А.С.)
19. О патогенезе экссудативно-пролиферативных осложнений после экстракции катаракты // Мат-лы науч. конф. «Актуальные вопросы клинической медицины».- Северск, 2001.- С. 62-63. (Соавт. Запускалов И.В.)
20. Пролиферативная форма гипоксической ретинопатии // Там же.- С. 127-128. (Соавт. Селицкая Т.И., Теплякова Н.Л., Филиппова С.В.)
21. О морфогенезе пролиферативной витреоретинопатии различной этиологии // Сб. статей «Актуальные проблемы офтальмологии».- Кыргызстан, Бишкек, 2001.- С.48-50. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В.)
22. Стекловидное тело - как среда для культивирования клеток // ВНТИЦ, 2001.- Свидетельство № 72200100047 (Соавт. Запускалов И.В.)
23. О роли мононуклеаров крови в патогенезе экссудативно-пролиферативных осложнений после экстракции катаракты // Мат-лы Российской науч.-практ. конф. «Новые лазерные технологии в офтальмологии».- Калуга, 2002.- С. 12-13. (Соавт. Запускалов И.В.)
24. О патогенезе пролиферативной витреоретинопатии // Сб. статей «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии».- Москва, 2002.- С. 110-113. (Соавт. Запускалов И.В.)

25. Морфофункциональное состояние мононуклеаров крови в условиях однонаправленного движения жидкости // Сб. статей III Международ. конгресса молодых ученых «Науки о человеке».- Томск, 2002.- С. 176.
26. Строение эпи- и субретинальных пролиферативных мембран различной этиологии // Там же.- С. 81-82. (Соавт. Запускалова Ю.И.)
27. Новый подход к культивированию мононуклеаров крови *in vitro* // Тез. докл. IV Съезда физиологов Сибири.- Новосибирск, 2002.- С. 95.- (Соавт. Запускалов И.В.)
28. Движение внутриглазной жидкости как фактор перестройки мембранного аппарата мононуклеаров крови // Сб науч. статей «Современные методы лечения в офтальмологии».- Нальчик, 2002.- С. 39-41. (Соавт. Запускалов И.В.)
29. Закономерности развития пролиферативной витреоретинопатии с позиций функциональной морфологии // Мат-лы науч.- практ. конф. «Вопросы офтальмологии».- Омск, 2002.- С. 51-52.- (Соавт. Запускалов И.В.)
30. Патоморфологические особенности пролиферативной витреоретинопатии при интравитреальном введении мононуклеаров крови (экспериментальное исследование) // Вестн. офтальмол.- 2002.- № 5.- С. 39-42. (Соавт. Запускалов И.В., Логвинов С.В.)
31. Влияние однонаправленного движения жидкости на фенотип мононуклеаров крови // Мат-лы Всероссийской конф. «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные и клинические аспекты».- Новосибирск, 2002.- С. 29-30. (Соавт. Запускалов И.В.)
32. Архитектоника мембран мононуклеаров крови в условиях однонаправленного движения жидкости в полости глазного яблока // Мат-лы науч. семинара «Биомеханика глаза».- Москва, 2002.- С. 30-34. (Соавт. Запускалов И.В.)
33. Патоморфология периретинальных мембран различного генеза // Мат-лы II международн. науч.-практ. конференции «Пролиферативный синдром в офтальмологии».- Москва, 2002.- С.12-13.- (Соавт. Запускалов И.В.)
34. Пролиферативная витреоретинопатия: современное состояние проблемы // Мат-лы област. конф. офтальмологов «Актуальные вопросы офтальмологии».- Томск, 2003.- С. 51-54.
35. Значение клеточно-структурных взаимодействий в патогенезе пролиферативной витреоретинопатии // Тез. докл. «Актуальные проблемы офтальмологии», посв. 60-летию Кемеровской области.- Кемерово, 2003.- С. 121-122. (Соавт. Запускалов И.В.)
36. Концептуальные аспекты патогенеза пролиферативной витреоретинопатии с позиций функциональной морфологии // ВНИИЦ, 2003.- Свидетельство № 72200300011 (Соавт. Запускалов И.В.)
37. Синтез коллагена мононуклеарами крови в условиях однонаправленного движения жидкости // Сб. статей IV Международ. конгресса молодых ученых «Науки о человеке».- Томск, 2003.- С. 154 (Соавт. Запускалова Ю.И.)
38. Пролиферативная витреоретинопатия: основные направления исследований // Там же.- С. 19-20.
39. Изучение патогенеза пролиферативной витреоретинопатии с помощью нового метода культивирования клеток // Сб. статей 62-й науч. студенче-

- ской конф. им. Н.И. Пирогова.- Томск, 2003.- С. 301-302. (Соавт. Якушкина Ю.П.)
40. Проллиферативная витреоретинопатия: факторы патогенеза и закономерности развития // Вестн. офтальмол.- 2003.- № 3.- С. 47-50.
 41. Морфофункциональные особенности мононуклеаров крови и их роль в патогенезе пролиферативной витреоретинопатии // Сб. мат-лов науч.-практ. конф. «Патогенетически ориентированные подходы в диагностике, лечении и профилактике глазных заболеваний».- Хабаровск, 2003.- С. 317-318. (Соавт. Запускалов И.В.)
 42. Коллагенпродуцирующая функция мононуклеаров крови – как фактор патогенеза пролиферативной витреоретинопатии // Тез. докл. юбилейного симпозиума «Актуальные проблемы офтальмологии».- Москва, 2003.- С.365. (Соавт. Запускалов И.В.)
 43. Некоторые аспекты патогенеза пролиферативной витреоретинопатии // Мат-лы науч.-практ конф. «Боевые повреждения органа зрения».- С.-Петербург, 2003.- С. 121.
 44. Метод культуры клеток *in vitro* в изучении патогенеза пролиферативной витреоретинопатии // Мат-лы межрегионал. науч. конф., посвященной 40-летию детской глазной службы Красноярского края.- Красноярск, 2003.- С. 163. (Соавт. Запускалов И.В.)
 45. Локальные механизмы модификации мононуклеаров крови под влиянием однонаправленного движения внутриглазной жидкости // ВНИИЦ, 2003.- Свидетельство № 72200300057. (Соавт. Запускалов И.В.)
 46. Методологические аспекты проблемы патогенеза пролиферативной витреоретинопатии // Бюллетень сибирской медицины.- 2004.- № 1, приложение.- С. 30-32.
 47. Патогенез пролиферативной витреоретинопатии с позиции методологии // Сб. мат-лов Всероссийск. науч.- практ. конф. «Лечение посттравматической патологии заднего отрезка глаза у пострадавших в экстремальных ситуациях».- Москва, 2004.- С. 125-127. (Соавт. Запускалов И.В.)
 48. Ферментативный профиль мононуклеаров крови при культивировании *in vitro* в условиях направленного движения питательной среды // Сб. статей V Международ. конгресса молодых ученых «Науки о человеке».- Томск, 2004.- С. 283-285 (Соавт. Запускалова Ю.И.)
 49. Функциональная морфология как основа изучения клеточных механизмов развития пролиферативной витреоретинопатии // Сб. мат-лов Всероссийск. науч.- практ. конф. «Современные возможности в диагностике и лечении витреоретинальной патологии».- Москва, 2004.- С. 125-128. (Соавт. Запускалов И.В., Хлусов И.А.)
 50. Клеточная кооперация в механизмах развития пролиферативной витреоретинопатии // Сб. мат-лов науч.-практ. конф., посвященной 70-летию офтальм. службы Алтайского края.- Барнаул, 2004.- С. 144-145 (Соавт. Запускалов И.В.)

Патенты РФ на изобретение:

1. Способ моделирования пролиферативной витреоретинопатии // Патент РФ на изобретение № 2182369 от 05.2002. (Соавт. Запускалов И.В.)
2. Способ культивирования мононуклеаров крови *in vitro* // Патент РФ на изобретение № 2221039 от 10.01.2004. (Соавт. Запускалов И.В.)