

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

На правах рукописи

Жданкина Анна Александровна
Морфологические закономерности изменений сетчатки при ретинопатиях различного генеза и их коррекция антиоксидантами (экспериментальное исследование)

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук,
профессор С.В. Логвинов

доктор биологических наук,
профессор М.Б. Плотников

Томск – 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Диабетическая ретинопатия. Эпидемиология, этиология, морфологические нарушения и перспективы лечения.....	13
1.2. Повреждающее воздействие видимого света на сетчатку глаз. Патогенез и структурные особенности.....	26
1.3. Возрастная хориоретинальная дегенерация. Эпидемиология, этиология, патоморфогенез и перспективы лечения.....	33
1.4. Патогенетические аспекты острой ишемической ретинопатии в контексте поиска адекватной профилактики и лечения.....	50
1.5. Антиоксиданты. Механизмы действия и области применения экранированных фенолов.....	56
Глава 2. Общая характеристика экспериментального материала и методы исследования.....	64
2.1. Материал исследования и описание экспериментальных моделей.....	64
2.2. Методы исследования.....	68
2.2.1. Световая микроскопия.....	68
2.2.2. Иммуногистохимический анализ	68
2.2.3. Электронно-микроскопическое исследование	69
2.2.4. Хемилюминесцентный метод исследования свободнорадикального окисления	71
2.2.5. Методы оценки гемореологических показателей	73
2.2.6. Статистическая обработка результатов.....	73

Глава 3. Результаты исследования.....	75
3.1. Изменения хориоретинального комплекса белых беспородных крыс, подвергшихся освещению интенсивностью 6000 лк, на фоне коррекции тиюфаном и диборнолом.....	75
3.2. Изменения хориоретинального комплекса белых беспородных крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции тиюфаном и диборнолом.....	114
3.3. Изменения хориоретинального комплекса крыс линии OXYS с возрастной хориоретинальной дегенерацией на фоне коррекции тиюфаном и диборнолом.....	143
3.4. Изменения хориоретинального комплекса крыс, подвергшихся тотальной транзиторной ишемии головного мозга с последующей реперфузией на фоне коррекции диборнолом.....	183
Глава 4. Обсуждение полученных результатов.....	205
Выводы.....	240
Библиографический список.....	243

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК - активные формы кислорода
- ВМД - возрастная макулярная дегенерация
- ВЯС - внутренний ядерный слой
- ДР – диабетическая ретинопатия
- ИГМ – ишемия головного мозга
- КГ – комплекс Гольджи
- НК - нейросенсорная клетка
- НЯС - наружный ядерный слой
- ОАО – общая антиоксидантная активность
- ПОЛ - перекисное окисление липидов
- ПЦ - пигментоцит
- СД – сахарный диабет
- ЭПС - эндоплазматическая сеть
- PEDF – фактор пигментного эпителия
- VEGF - фактора роста сосудистого эндотелия

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ в мире насчитывается 285 миллионов людей с различными нарушениями зрительных функций, из которых 39 миллионов слепых [Pascolini D., Mariotti S.P., 2012]. Серьезную угрозу для зрения несут диабетическая ретинопатия (ДР), возрастная хориоретинальная дегенерация, острая ишемическая ретинопатия, ретинопатии, вызванные разнообразными физическими факторами [Либман Е.С., Шахова Е.В., 2003]. В настоящее время учеными во всем мире прилагаются усилия по выявлению структурных основ формирования слепоты, вызванной, в том числе, и дегенерацией сетчатой оболочки глаз [Rózanowska M. et al., 2012; Girmens J.F. et al., 2013; Yuzawa M. et al., 2013; Xiao J. et al., 2012]. Понимание клеточных и молекулярных механизмов откроет новые возможности терапии, повысив ее эффективность и снизив побочные эффекты.

Диабетическая ретинопатия – наиболее тяжёлое осложнение сахарного диабета, которое развивается уже на начальных его стадиях при поражении сосудов сетчатой оболочки глазного яблока [Cheung K.H. et al., 2005; Myint E. et al., 2006; El-Remessy A.B. et al., 2006]. По некоторым оценкам, почти 51 млн. больных сахарным диабетом угрожает слепота [Kowluru R.A., 2013].

Длительное или интенсивное световое воздействие на зрительный анализатор приводит к увеличению спектральной энергии после фотохимических реакций в сетчатке, активации свободнорадикального окисления, что вызывает острые и хронические, зачастую необратимые, повреждения ее структур [Логвинов С.В. и соавт., 2003; Варакута Е.Ю. и соавт., 2003; Reme C. et al., 1996; Macarez R. et al., 2007; Hunter J.J. et al., 2012; Rózanowska M. et al., 2012].

Инволюционная центральная хориоретинальная дистрофия – одна из важнейших причин снижения зрения в зрелом и старческом возрасте [Азнабаев Р.А. и соавт., 2007; Oshinskie L.J., 1996; Ding X. et al., 2009; Girmens J.F. et al., 2013; Yuzawa M. et al., 2013]. Заболевание характеризуется

преимущественно поражением хориокапиллярного слоя сосудистой оболочки глаза, мембраны Бруха и пигментоцитов (ПЦ) сетчатки, что ведет к снижению и потере зрительных функций [Кацнельсон Л.А. и соавт., 1990; Будзинская М.В., Гурова И.В., 2006; Панова И.Е. и соавт., 2007].

В последние десятилетия острые сосудистые заболевания головного мозга занимают одно из лидирующих мест [Суслина З.А., Пирадова М.А., 2008]. В ряде случаев, когда нарушения кровообращения затрагивают систему внутренней сонной и глазничной артерий, возникает угрожающее зрению состояние: глазной ишемический синдром или острая ишемическая ретинопатия [Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Древаль А.А. и соавт., 2004; Xiao J. et al., 2012]. На различных моделях ишемии головного мозга (ИГМ) показано, что в сетчатках экспериментальных животных происходит разрушение фотосенсорного слоя, дегенерация мюллеровских глиоцитов с накоплением в них глиального фибриллярного белка, гибель амакринных, горизонтальных и ганглионарных нейронов как путем апоптоза, так и некроза, явления стаза форменных элементов крови и дилатации сосудов хориоидеи [Kaja S. et al., 2003; Xiao J. et al., 2012].

Общим звеном патогенеза перечисленных выше заболеваний является окислительный стресс – нарушение баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК). Впервые идею о связи развития некоторых заболеваний с повреждающим действием неконтролируемых свободнорадикальных реакций в 1954 году высказал Д. Харман [Harman D., 1956]. Спустя 40 лет эта теория стала ведущей, объясняя причины возникновения и развития более 60 видов различных патологий, так называемых свободнорадикальных заболеваний [Harman D., 2000; Cai X., 2012; Nowak J.Z., 2013]. К ним, среди прочих, относятся: возрастная хориоретинальная дегенерация, сахарный диабет и его осложнения, ИГМ, заболевания, вызванные разнообразными физическими факторами.

Значительный интерес в качестве перспективных протекторов повреждения клеток при патологиях, сопровождающихся увеличением образования АФК, представляют препараты антиоксидантной группы. Они способствуют замедлению прогрессирования заболеваний, улучшению электрофизиологических показателей сетчатки [Бобырева Л.Д., 1998; Хазанов В.А. и соавт., 1999; Балаболкин М.И., 2003; Nowak J.Z., 2012]. Среди ингибиторов свободно-радикального окисления органических и биоорганических субстратов антиоксиданты фенольного типа занимают ведущие позиции [Озерова И.Б., 2000; Зенков Н.К. и соавт., 2003; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Бизунок Н.А. и соавт., 2011].

Селективное ортоалкилирование различных фенолов камфеном привело к получению новых высокоэффективных антиоксидантов [Чукичева И.Ю. и соавт., 2003; 2010]. Одним из них является производное орто-изоборнилфенола диборнол (4-метил-2,6-диизоборнилфенол), обладающий антиоксидантными свойствами, гемореологической, антитромбоцитарной и антитромбогенной активностью [Плотников М.Б. и соавт., 2007, 2009]. В настоящее время активно ведется изучение диборнола при различных патологиях, сопровождающихся повышенным содержанием активных форм кислорода.

В Новосибирском институте органической химии СО РАН на основе омега-(4-гидроксиарил)-галогеналканов был получен тиофан (бис-[3,5-дитрет-бутил-4-гидроксифенил-пропил]сульфид). Антиоксидантная активность тиофана включает обрыв цепи и нейтрализацию гидроперекисей [Бахтина И.А. и соавт., 2000; Просенко А.Е. и соавт., 2004]. Эффективность тиофана доказана при тканевых гипоксиях, заболеваниях печени, воспалительных процессах [Душкин М.И. и соавт., 2003; Агеев А.С. и соавт., 2005; Зайдман А.М. и соавт., 2005; Сахаров А.В. и соавт., 2005].

Уточнение и открытие новых фундаментальных знаний о структурных особенностях формирования ретинопатий различного генеза позволит апробировать новые фармакотерапевтические подходы к лечению

нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в частности, оценить эффективность диборнола и тиофана в качестве ретинопротекторов. Влияния данных препаратов на морфологические проявления повреждения и компенсаторно-приспособительные изменения сетчатки при ретинопатиях не изучены.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучить морфологические закономерности повреждения и особенности адаптации сетчатки глаза при ретинопатиях различного генеза и их коррекции антиоксидантами группы пространственно затрудненных фенолов в эксперименте.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Выявить структурные изменения различных клеточно-тканевых элементов сетчатки при фотодегенерации, стрептозотоциновом диабете, возрастной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS, острой тотальной транзиторной ишемии головного мозга;
2. Оценить гемореологические показатели у животных при экспериментальных ретинопатиях различного генеза;
3. Определить интенсивность свободнорадикального окисления в гомогенате сетчатки глаз крыс при экспериментальных ретинопатиях различного генеза;
4. Разработать общую схему патоморфогенеза хориоретинального комплекса глаз крыс при ретинопатиях различного генеза;
5. Оценить возможное модифицирующее влияние диборнола и тиофана на сетчатку при экспериментальных ретинопатиях различного генеза, сравнить ретинопротекторные эффекты изучаемых препаратов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. В работе впервые дополнены, уточнены и получены новые фундаментальные знания о морфологических и ультраструктурных изменениях хориоретинального комплекса крыс с фотодегенерацией сетчатки, инволюционной хориоретинальной дегенерацией, острой ишемической ретинопатией, ДР, базирующиеся на изменениях некоторых гемореологических и биофизических параметров, в

результате чего составлена общая схема патоморфогенеза хориоретинального комплекса крыс при ретинопатиях различного генеза на фоне коррекции антиоксидантами группы пространственно затрудненных фенолов диборнола и тиофана с учетом литературных данных. Доказано, что изменения сетчатки при ДР, инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс OXYS, фотодегенерации сетчатки и острой ишемической ретинопатии имеют общие закономерности.

Выявлены адаптивные изменения, реализуемые в сетчатке в ответ на экспериментальные воздействия: во всех экспериментальных группах в сохранившихся ПЦ активируются процессы фагоцитоза, разрастание склеральных отростков радиальных глиоцитов в наружном ядерном слое способствует заполнению пространства между нейронами первого порядка, восстанавливая глионейрональные взаимодействия. Компенсаторно-приспособительные процессы синаптического звена сетчатки всех групп характеризуются сохранностью синапсов с длиной активной зоны контакта (АЗК) от 200 до 500 мкм. У крыс со стрептозотоциновым диабетом и острой ишемической ретинопатией зафиксировано появление гипертрофированных контактов с усложнением геометрии синапса и несколькими активными зонами контакта.

Установленные взаимосвязи формирования нарушений сетчатки при нескольких редокс-зависимых ретинопатиях позволили на доклиническом уровне апробировать и обосновать новые фармакотерапевтические способы коррекции. Выявлена ретинопротекторная активность антиоксидантов группы пространственно затрудненных фенолов - диборнола и тиофана. Оба исследуемых препарата способствуют защите мембранных органелл от развития неконтролируемых свободно-радикальных реакций, тем самым ограничивая дегенерацию ПЦ, снижая процент дегенеративно измененных нейронов, повышая способность к адаптации синаптических контактов. Диборнол по эффективности ретинопротекторного действия превосходит тиофан. В группе животных после тотального светового воздействия

интенсивностью 6000 лк диборнол предотвращает образование очагов поражения сетчатки. Во всех группах под влиянием диборнола, в отличие от тиофана, отмечается ограничение процесса тромбообразования в сосудах хориоретинального комплекса, повышение адаптации нейронов и радиальной глиии к повреждающим факторам. Механизм ретинопротекторного действия диборнола включает антиоксидантную, гемореологическую, антиагрегантную, антигипоксическую активность.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ. Полученные фундаментальные знания о ретинопротекторных свойствах антиоксидантов группы экранированных фенолов позволят на их основе разработать новый эффективный метод профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки, что может найти широкое применение в эндокринологии, клинической фармакологии, ангиологии, неврологии, геронтологии.

По результатам диссертационной работы получен патент № 2406487 “Средство, обладающее ретинопротекторной активностью”.

ВНЕДРЕНИЕ. Результаты исследования используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами лечебного и педиатрического факультетов на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии в разделе «Органы чувств. Сетчатая оболочка глаза», а также на кафедре морфологии и общей патологии в разделе «Органы чувств» Сибирского государственного медицинского университета.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. В сетчатках крыс после высокоинтенсивного светового воздействия, ишемии/реперфузии головного мозга, на фоне стрептозотоцинового диабета и возрастной хориоретинальной дегенерации развиваются процессы деструкции нейронов, пигментоцитов и радиальных глиоцитов, реализуемые путем некроза и апоптоза. Морфологические изменения сетчатки закономерно сопровождаются уменьшением общей

численной плотности межнейронных контактов и их реорганизацией. Вовлеченность той или иной структуры хориоретинального комплекса в процесс деструкции и развитие адаптации зависит от вида повреждающего фактора.

2. В формирование морфологических изменений сетчатки при диабетической ретинопатии, острой ишемической ретинопатии и возрастной хориоретинальной дегенерации существенный вклад вносит синдром повышенной вязкости крови, сопровождающийся нарушениями микроциркуляции в сосудах хориоретинального комплекса. Развитие ретинопатии под влиянием высокоинтенсивного светового воздействия происходит, прежде всего, на фоне активации свободно-радикального окисления, что обуславливает значительное повреждение мембранных структур сетчатки.

3. Использование диборнола и тиофана снижает морфологические проявления повреждения и активирует компенсаторно-восстановительные процессы в структурах хориоретинального комплекса глаз животных с ретинопатиями различного генеза, что сопровождается снижением деструкции пигментцитов, нейронов, частичным восстановлением межнейронных связей.

4. Ретинопротекторная активность диборнола превосходит таковую тиофана, что связано с его выраженными гемореологическими и антигипоксическими свойствами.

АПРОБАЦИЯ ДИССЕРТАЦИИ. Материалы диссертации доложены и обсуждены на всероссийской конференции с международным участием (2007, Москва), IX конгрессе международной ассоциации морфологов (2008, Бухара, Республика Узбекистан), X конгрессе международной ассоциации морфологов (Самара, 2009), международном конгрессе по геронтологии и гериатрии (World Congress of Gerontology and Geriatrics, 2009, Paris, Франция), Российском общенациональном офтальмологическом форуме (2009, Москва), четвертой всероссийской научно-практической конференции

с международным участием "Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов" (2009, Новосибирск), X конгрессе международной ассоциации морфологов (Ярославль, 2010). Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-98034 "Исследование патоморфогенетических основ развития диабетической ретинопатии и инволюционной хориоретинальной дегенерации как платформы для поиска и внедрения новых средств профилактики и лечения".

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам работы опубликованы 35 печатных работ, из них 28 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 297 страницах машинописного текста и состоит из четырех глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов) и выводов. Работа иллюстрирована 123 рисунками и содержит 57 таблиц. Библиографический список включает 500 источников, из них 131 на русском и 369 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ДИАБЕТИЧЕСКАЯ РЕТИНОПАТИЯ. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ЭТИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ

Сахарный диабет (СД) - хроническое нарушение обмена веществ, является быстрорастущей глобальной проблемой с огромными социальными, медицинскими и экономическими последствиями. В 1998 году ожидалось, что к 2010 году распространенность СД в мире составит около 215 млн. человек [Кондратьев, Я.Ю. и соавт., 1998]. В 2010 году зарегистрировано 285 млн. человек (около 6,4% взрослого населения), страдающих от этого заболевания. Это число, по оценкам, за следующее десятилетие увеличится до 430 миллионов в отсутствие лучшего контроля, профилактики и лечения. Приведенные выше статистические данные распространённости СД среди населения планеты ярко свидетельствуют об отсутствии должных тактик профилактики и лечения. Старение населения и ожирение являются двумя основными причинами увеличения заболеваемости [Kaul K. et al., 2012].

Диабетическая ретинопатия - наиболее тяжёлое осложнение СД, которое развивается при поражении сосудов сетчатой оболочки глазного яблока. Она является основной причиной слепоты у лиц трудоспособного возраста. Так, по некоторым оценкам, почти 51 млн. больных СД угрожает слепота [Kowluru R.A., 2013]. Важнейшими факторами, влияющими на возникновение и прогрессирование ретинопатии, является длительность СД и уровень гликемического контроля [Трахтенберг Ю.А. и соавт., 2006].

В настоящее время в большинстве европейских стран используется классификация, предложенная E. Kohner и M. Porta (1991). Согласно этой классификации выделяются три основные формы (стадии) ДР:

I. Непролиферативная ДР глаз характеризуется наличием в сетчатке патологических изменений в виде микроаневризм, кровоизлияний, отека сетчатки, экссудативных очагов.

II. Препролиферативная ДР характеризуется появлением венозных и интравитреальных микрососудистых аномалий, большим количеством твердых и ватообразных экссудатов, множеством крупных ретинальных геморрагий. Выраженность этих изменений напрямую связана с риском развития пролиферации.

III. Пропролиферативная ДР характеризуется двумя видами пролиферации – сосудистой и фиброзной и завершаются тракционной отслойкой сетчатки и развитием слепоты [Kohner E. M., Porta M., 1992].

Скорость перехода одной стадии в другую зависит от длительности диабета и степени компенсации. Многократное введение инсулина и хороший гликемический контроль замедляют прогрессирование ретинопатии слабой и средней степени [The DCCT Research Group, 1993; White N.H. et al., 2008].

Однако гликемический контроль не может предотвратить долгосрочные осложнения сетчатки. Прием инсулина часто связан со значительным увеличением риска прогрессирования ретинопатии и нарушений зрения. Инсулин имеет решающее значение для регуляции обмена веществ, однако роль его в сетчатке является спорной. Так, лечение инсулином мышей с диабетом приводит к увеличению проницаемости гематоретинального барьера и росту новообразованных сосудов через экспрессию бетацеллюлина - сильного митогена в отношении многих типов клеток, включая ПЩ сетчатки и гладкомышечные клетки сосудов [Sugimoto M. et al., 2013].

На сегодняшний день нет четких доказательств генетической составляющей развития и прогрессирования ДР, однако многими учеными продемонстрированы ассоциации заболевания с генами альдозоредуктазы (ALR2) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [Lee S.C. et al., 2001; Qing Li., Donald G., 2002; dos Santos K.G. et al., 2006; Gerald Liew M.D. et al., 2009].

Патогенетические механизмы ДР достаточно многообразны и напрямую или опосредованно связаны с гипергликемией. Она запускает целый спектр различных патофизиологических, биохимических и молекулярно-генетических механизмов, приводящих к поражению сетчатки [Вербовая Н.И., Лебедева Е.А., 1997; Булатова О.С. и соавт., 1999; Борисова, С.А., Коломойцева Е.М., 2003; Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000; Wolff S.P. et al., 1991; Bek T., Ledet T., 1996].

Повышенная концентрация глюкозы в клетках в присутствии фермента альдозоредуктазы обуславливает развитие ее метаболизма по полиоловому пути с образованием фруктозы и сорбитола. Показано, что у крыс при 10-недельном стрептозотоциновом диабете наблюдается увеличение ретинального уровня сорбитола и фруктозы, четырехкратное увеличение числа апоптотически гибнущих нейронов по сравнению с недиабетическими крысами. Клетки, находящиеся в апоптозе иммунореактивны для альдозоредуктазы, а сорбитол, ее ингибитор, предотвращает патологические изменения. Таким образом, полиоловый путь метаболизма глюкозы вызывает развитие апоптоза в нейронах внутренних слоев сетчатки [Asnaghi V., 2003]. Фруктоза и сорбитол накапливаются внутри клетки, способствуют повышению осмотического давления, что приводит к отеку, нарушению структуры и функции перицитов и капиллярного эндотелия [Балаболкин М.И. и соавт., 2005].

Перициты укрепляют механическую структуру капилляра, участвуют в ауторегуляции капиллярного кровотока. Потеря перицитов способствует атонии капилляров и образованию микроаневризм.

Эндотелий ретинальных сосудов является главной структурой в системе гематоретинального барьера, на местном уровне поддерживает гемоциркуляцию, регулирует активность тромбоцитов, предупреждает пристеночное отложение фибрина и образование внутрисосудистых тромбов, приводящее к активации противосвертывающей системы [Bek T., Ledet T., 1996]. При этом стенки артерий становятся хрупкими, проницаемыми, что

способствует образованиям точечных кровоизлияний и микроаневризм. Через проницаемые сосуды в сетчатку выходит жидкая часть крови, что приводит к отеку сетчатки и снижению зрения.

В ответ на длительное гипоксическое повреждение в клетках сетчатки повышается внутриклеточная концентрация специфического белка HIF-1, который приводит к усилению транскрипции гена VEGF. VEGF, выделяясь в межклеточный матрикс, влияет на эпителий, обеспечивая регенерацию, а также стимулируя образование новых сосудов. Однако из-за быстрого роста эти новообразованные сосуды несовершенны, образованы только одним слоем эндотелия, и становятся источниками новых кровотечений [Ермакова Н.А. соавт., 2008; Нероев В.В. и соавт., 2009; White F.C. et al., 1997].

Повреждение гематоретинального барьера, наблюдаемое уже на 2-ой неделе экспериментального стрептозоцинового диабета, приводит к реактивным изменениям глии. Мюллеровская глия подвергается гиперплазии, в цитоплазме происходит увеличение гликогена, лизосом, фагосом, хроматин в ядре диспергируется, чему предшествует увеличение в клетках глиального фибриллярного кислого белка. Микроглия активизируется, а астроциты подвергаются регрессу [Bek T., Ledet T., 1996]. Этот же факт доказан в других независимых исследованиях. Функциональная целостность клеток сетчатки попадает под угрозу уже через короткие промежутки времени после начала экспериментального СД у крыс. Так, в течение первых 5 недель после развития стрептозотоцинового диабета у крыс экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в диабетических сетчатках не отличается от контрольных. GFAP определяется только в астроцитах в витреоретинальной границе. Через 6-7 недель диабета, экспрессия GFAP в сетчатке диабетических крыс обнаруживается в мюллеровских глиоцитах, а при дальнейшем прогрессировании диабета, распространяется по всей длине клетки Мюллера [Li Q. Et al., 2002]. Таким образом, уже на начальных стадиях развития экспериментального диабета

функциональная целостность нейронов сетчатки подвержена патологическим изменением [Lieth-Alistair E.S. et al.,1998].

Еще одной из активируемых при диабете ветвей обмена является диацилглицерол-протеинкиназный путь. Повышение диацилглицерола приводит к уменьшению активности протеинкиназы C в цитоплазме и активации ее в мембранах клеток, вызывая при этом активацию Ca^{2+} -каналов и увеличение содержания внутри клеточного Ca^{2+} , что, вероятно, может способствовать развитию апоптоза клеток сетчатки [Ferris F.L. et al., 1999]. Возрастание концентрации цитозольного Ca^{2+} приводит в действие Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaMKII) [De Koninck P., Schulman H., 1998]. Активированная CaMKII является важным медиатором апоптоза клетки сетчатки у больных СД [Kim Y.H. et al., 2010; 2011]. Эндоплазматическая сеть (ЭПС) является критической внутриклеточной органеллой, которая имеет несколько жизненно важных функций, таких как синтез белка [Shimoke K., Utsumi T., Kishi S., et al. 2004], транспорт белков [Palade G., 1975] и выступает в качестве резервуара Ca^{2+} [Nielsen S.P., Petersen O.H., 1972]. Нарушение гомеостаза Ca^{2+} гомеостаза активирует реакцию ЭПС на стресс [Lindholm D. et al., 2006; Rao R.V. et al., 2004]. При этом стресс ЭПС активирует несколько путей гибели клеток, включая каскад каспаза-9 зависимого апоптоза, митохондриального пути апоптоза, регулируемого C-Jun N-концевой киназы (JNK), каспаза-12-зависимого пути [Nakagawa T. et al. 2000], митохондриальной ветви апоптоза посредством регулирующей киназы 1 (ASK1) [Nishitoh H. et al. 2002]. Было показано, что CaMKII является необходимым ферментом, индуцирующим развитие стресса ЭПС. Стресс ЭПС является важной особенностью СД 2 типа и его хронических осложнений, таких как ДР [Cui Y. et.al., 2006; Li B. et al., 2011].

В 2001 году американским ученым Браунли выдвинута гипотеза о механизме, объединяющем все возможные пути сосудистого повреждения вследствие гипергликемии [Brownlee M., 2005]. Отличительной чертой, общей для всех типов клеток, которые были повреждены гипергликемией,

является повышенная продукция АФК [Du X.L. et al., 2000; Clark RJ. et al., 2001]. Хотя гипергликемия была связана с окислительным стрессом еще в начале 1960-х годов [Giugliano D. et al., 1996], ни механизмов, лежащих в основе этого, ни его последствий для путей гипергликемического повреждения не было известно. В последствие было установлено, что митохондрии под действием глюкозы являются источником супероксидных радикалов. Белки, кодируемые мтДНК, становятся дефектными и способствуют дисфункции системы электронного транспорта и транспортных белков в митохондриях. Эти нарушения продолжают даже при стабилизации гипергликемического профиля больных, что способствует прогрессированию ДР. Так, в клетках с высокой концентрацией глюкозы в цикле трикарбоновых кислот окисляется большее количество глюкозы, чем в норме. Это вовлекает повышенное количество доноров электронов (NADH и FADH₂) в цепь переноса электронов, градиент напряжения через митохондриальные мембраны возрастает до критической точки, а перенос электронов внутри комплекса III заблокирован, в результате чего коэнзим Q отдает электроны молекулярному кислороду, тем самым генерируя супероксидный радикал (O₂[•]). Поток O₂[•]-радикалов приводит к окислительной активации поли-(аденозинфосфат-рибозы)-полимеразы (PARP), которая ингибирует гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) [Korshunov S.S. et al., 1997].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – ключевой фермент, участвующий в регуляции активности всех промежуточных метаболитов глюкозы. Снижение активности этого фермента вызывает восходящее нарушение регуляции метаболизма глюкозы с активизацией основных боковых путей ее превращения: альдозоредуктазного пути с накоплением сорбитола в клетках, гексозаминового пути, который приводит к истощению запасов клеточного глутатиона; активацию протеинкиназы C и активацию редокс-сенситивного транскрипционного фактора NfκB, который стимулирует транскрипцию и экспрессию провоспалительных цитокинов,

таких как TNF α ; глицеральдегид-3-фосфата в трифосфатоксоальдегид и далее в конечные продукты гликирования (КПГ) [Brownlee M., 2001].

КПГ участвуют в механизме развития поздних осложнений диабета. Быстрое образование внутриклеточных КПГ способствует нарушению функций внутриклеточных белков. Японские ученые показали, что количество КПГ в гемоглобине эритроцитов может служить объективным маркером гликозилирования в тканях. КПГ сравнительно быстро накапливаются в эндотелиальных клетках, где они выявляются в комплексе с факторами роста фибробластов, принимающих участие в клеточном цикле и функции клеток, способствуют поражению сосудистой стенки генерализованного характера [Yamagishi S. et al., 2002]. Внутриклеточное увеличение КПГ снижает каталитическую активность альдегидредуктазы, что ускоряет дополнительное образование КПГ из реактивных дикарбонильных метаболитов [Schleicher E.D. et al., 1997]. Также КПГ принимают непосредственное участие в экспрессии генов, ответственных за образование различных белков, принимающих участие в развитии патологических изменений клеточных структур. КПГ связываются со специфическими КПГ-рецепторами, локализованными на моноцитах, эндотелиальных и других клетках, которые опосредуют трансдукцию этого сигнала посредством увеличения образования свободных радикалов кислорода. Последние в свою очередь активируют транскрипцию ядерного NF- κ B фактора – регулятора экспрессии многих генов иммунного ответа, клеточного цикла, апоптоза. Нарушение его регуляции вызывает воспаление и аутоиммунные заболевания [Schmidt AM et al., 2000]. Доказана активация в клетках сетчатки протеаз, факторов роста, цитокинов и хемокинов, таких как протеин-1 хемоаттрактант моноцитов (MCP-1), интерлейкин-8 (IL-8), молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), фактор стромальных клеток 1 α (SDF-1 α), циклооксигеназа-2 (COX-2) и простагландин E₂, VEGF, матриксные металлопротеиназы (MMP) и фактор роста соединительной ткани. Они взаимодействуют друг с другом и активируют несколько

сигнальных путей запуска неоангиогенеза и фиброза в сетчатке [Abu El-Asrar A.M. et al., 2006; 2007; 2011]. В последнее время открыт новый конечный продукт неферментативного гликирования пентозидин. Увеличение концентрации пентозидина у людей, как полагают авторы, играет ключевую роль в формировании диабетических осложнений [Morales S. et al., 2011]. Одним из этиопатогенетических факторов, способствующих развитию ДР, является развитие аутоиммунного ответа с повышением уровня «агрессивных» антител и циркулирующих иммунных комплексов. Они осаждаются на клетках и тканях, и, приводя к активации перекисного окисления липидов, повреждают стенки капилляров, приводят к изменению структуры гематоретинального барьера, способствуют развитию гипоксии сетчатки [Балашова И.С. и соавт., 2000; Жабоедов Г.Д. и соавт., 2000].

Метаболические сдвиги, происходящие в сетчатке при развитии ДР, такие как гипергликемия, ишемия ткани сетчатки, аутооксидация глюкозы, снижение активности Na, K-АТФ-азы ведут к уменьшению активности антиоксидантной системы – окислению глутатиона, снижению активности глутатионпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы и увеличению образования свободно-радикальных соединений. Это приводит к усилению процессов пероксидации липидов и изменению качественных характеристик липопротеидов. Модифицированные липопротеиды принимают участие в повреждении эндотелиальных клеток, способствуя развитию микроангиопатии [Булатова О.С. и соавт., 1999].

С целью поиска новых эффективных методов профилактики и лечения в последнее время становятся известны все новые патогенетические пути развития и прогрессирования ДР. Так, стала известна роль матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов в патогенезе ДР [Giebel S.J. et al., 2005; Kłysik A.B. et al., 2010; Mohammad G., Kowluru R.A., 2010; Kowluru R.A. et al., 2011;]. ММП представляют собой большое семейство цинк-зависимых эндогенных протеолитических ферментов. В настоящее время существует более 24 известных ММП, которые

подразделяются на коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, и ММП мембранного типа. [Szarvas T. et al., 2011]. Тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП) в норме специфически связываются, ингибируют активацию ММП и блокируют разрушение экстрацеллюлярного матрикса [Kähäri V.M., Saarialho-Kere U., 1999]. Таким образом, нарушение равновесия ММП и ТИМП привести к ремоделированию ткани. Различные исследования также показали, что внеклеточный матрикс и клетка, взаимодействуя, влияют на регуляцию генов, структуру цитоскелета, дифференцировку и многие аспекты роста клеток. Таким образом, баланс между деградацией и регенерацией внеклеточного матрикса являются важными для существования и выживания клеток [Cruz-Munoz W., Khokha R., 2008]. Изменение активности ММП регистрируется при многих патологических состояниях, в том числе при СД и ДР [Nagase H., Woessner J.F., 1999; Uemura S. et al., 2001; Kadoglou N.P. et al., 2005]. При диабете среди всех ММП, наиболее вероятными участниками развития ДР являются коллагеназа IV типа, MMP-2 (72 кДа), MMP-9 (92 кДа), MMP-10 (стромелизин-2) и желатиназа-B. Результаты недавних исследований показывают, что ММП-2 и -9 в сетчатке ингибируют клеточную пролиферацию, дифференцировку и ускоряют апоптоз [Kowluru R.A., Odenbach S., 2004; Beránek M. et al., 2008; Yang R. et al., 2007]. Показано, что ингибирование ММП-2 и -9 в сетчатке при гипергликемии способно предотвратить развитие апоптоза клеток. Кроме того, доказано, что высокий уровень глюкозы способствует перемещению MMP-2 и -9 в митохондрии и индуцирует дисфункцию митохондрий [Yang R. et al., 2007, Kowluru R.A. et al., 2011; Mohammad G, Kowluru R.A., 2010, 2011, 2012]. Активации MMP-2 и -9 при гипергликемии способствует окислительный стресс [Kowluru R.A., Kanwar M., 2009; Mohammad G., Kowluru R.A., 2010, 2012].

Доказано, что диабет вызывает увеличение активности аргиназы в эндотелии сосудов, которая способствует прогрессированию ДР путем снижения NO и усиления окислительного стресса. На модели

стрептозотоцинового диабета у крыс методом Вестерн-блоттинга показано увеличение активности обеих изоформ аргиназы. Снижение NO сопровождается лейкостазом, развитием окислительного стресса и эндотелиальной дисфункцией [Patel C. et al., 2013].

Таким образом, при стойкой гипергликемии в тканях сетчатки, еще до развития клинически обнаруживаемых микрососудистых изменений или параллельно с ними, развивается дисбаланс между нейротоксическими и нейроретинопротекторными факторами, что способствует развитию апоптотической гибели нейронов и глиии [Villarroel M. et al., 2010; Antonetti D.A. et al., 2010; Barber A.J. et al., 2011]. Патогенез ДР многогранен, однако, несмотря на достигнутые успехи, учеными всего мира продолжают исследования в этой области, т.к. нет общепринятых практических рекомендаций по медикаментозной профилактике и лечению диабетической ретинопатии.

Основой профилактики и лечения непролиферативной ДР является оптимальная компенсация углеводного обмена. Современные представления о диабетическом поражении сетчатки позволяют выделить следующие основные подходы в консервативной терапии диабетической ретинопатии:

1. Ингибиторы альдозоредуктазы. В настоящее время нет препаратов этой группы, зарегистрированных для клинического применения, однако поиск их продолжается [Wilkinson-Berka J.L., Miller A.G., 2008; Obrosova I.G., Kador P.F., 2011]. Так, применение гесперидина, ингибитора альдозоредуктазы, в дозе 100 и 200 мг / кг в сутки в течение 12 недель у крыс со стрептозотоциновым диабетом способствует увеличению толщины слоев сетчатки, снижению уровня глюкозы и альдозоредуктазы в крови, снижению антирадикальной активности сетчатки и снижению уровней TNF- α , ICAM-1, VEGF, IL-1 β . Кроме того, при лечении с гесперидином отмечено снижение уровня малонового диальдегида (МДА), повышение активности СОД [Shi X. et al., 2012]. Ингибитор альдозоредуктазы фидарестат способен

предотвращать окислительный стресс и избыточную экспрессию VEGF, снижать лейкостаз в сетчатке диабетических крыс [Hattori T. et al., 2010].

2. Ингибиторы протеаз. При высоких концентрациях глюкозы изоформы фермента протеинкиназы C активируются, переносятся к клеточной мембране и способствует выбросу фактора роста эндотелия эндотелина-1, который приводит к увеличению проницаемости и ангиогенезу. Поэтому поиск эффективных ингибиторов протеаз откроет новые перспективы в лечении и профилактике пролиферативной ДР. Клинически не зарегистрировано ни одного препарата данной группы, однако ведутся многочисленные исследования [Nakamura J. et al., 1999; Budhiraja S., Singh J., 2008]. Так, применение специфического ингибитора (LY333531) протеинкиназы C у крыс со стрептозотоциновым диабетом ингибирует образование мРНК рецептора протеазы в сетчатке, что открывает перспективу его дальнейшего использования в лечении ДР [Yokota T. et al., 2003]. Другое обширное исследование было выполнено в отношении фактора Ха и тромбина на выработку цитокинов и факторов роста ПЦ в сетчатке диабетических животных. Доказано, что фактор Ха и тромбин регулируют продукцию цитокинов и факторов роста (в том числе GM-CSF, IL-6, IL-8, MCP-3, PDGF-AA, PDGF-BB, TIMP-1 и TGF- α), которые участвуют в патогенезе многих витреоретинальных заболеваний [Bastiaans J. et al., 2013].

3. Ингибиторы неферментного гликирования являются предметом интенсивных научных исследований в офтальмологии. Многочисленные исследования показали, что встречающиеся в природе имидазол-содержащие пептидомиметики обладают сильными и специфическими свойствами антиоксидантов, путем предотвращения и сокращения накопления окисленных продуктов, полученных из перекисного окисления липидов в биологических мембранах. Было показано, что L-карнозин в качестве конкурентного ингибитора неферментативного гликозилирования белков может предотвратить образование конечных продуктов гликирования, чьи

накопления в тканях играют непосредственную роль в этиологии и патогенеза ДР [Babizhayev M.A., Kasus-Jacobi A., 2009].

4. Блокаторы ангиогенеза достаточно широко применяются при неоваскулярной форме ВМД [Щадричев Ф.Е. и соавт., 2011; Jennifer L. et al., 2008; Stewart M.W., 2012]. В последние годы был проведен ряд исследований, в которых изучались возможности применения анти-VEGF препаратов (пегаптаниб, бевацизумаб, ранибизумаб) для лечения диабетического отека макулы [Cunningham E.T. et al., 2005; Dejneka N.S., 2008; Roh M.I. et al., 2008; Aiello L.P., 1998; Googe J. et al., 2011]. Пегаптаниб (Макуген, Pfizer, США) - аптамер РНК из 28 нуклеотидов, обладает высокой специфичностью в отношении наиболее активной изоформы VEGFA (VEGF165) и неактивен в отношении VEGF 121, однако, при его применении отмечается подъем внутриглазного давления [Cunningham E.T.Jr. et al., 2005]. Вторым препаратом - бевацизумаб (авастин, Hoffmann-La Roche, Швейцария) является рекомбинантным моноклональным антителом, имеет молекулярный вес 149 кДа и блокирует все изоформы VEGF [Haritoglou C. et al., 2006; Roh M.I. et al., 2008; Goyal S. et al., 2011]. В большинстве случаев при терапии авестином через 3 недели после инъекции толщина сетчатки начинает стабилизироваться. Среди системных побочных явлений препарата были отмечены 2 (на 185 инъекций) случая острого инфаркта миокарда и 1 случай эндофтальмита [Scott I.U. et al., 2007]. Ранибизумаб (Луцентис, Novartis Pharma, Швейцария) является человеческим моноклональным фрагментом антител к VEGF-A с молекулярным весом 48 кДа, экспрессируется рекомбинантным штаммом *E. coli* и блокирует все изоформы VEGF-A. Ранибизумаб официально разрешен во всем мире и в России для интравитреального введения, в том числе при диабетическом отеке макулы. Серьезных местных побочных эффектов при его применении не выявлено [Mitchell P. et al., 2011; Nguyen Q.D. et al., 2010; Googe J. et al., 2011]. В настоящее время проходит клинические испытания препарат афлиберцепт (VEGF Trap-Eye) – «ловушка» для VEGF, связывающий все изоформы VEGF

[Stewart M.W., 2012], исследуется эффективность бевасируниба, блокирующего синтез VEGF через инактивацию его мРНК [Dejneka N.S. et al., 2008]. Таким образом, препараты – ингибиторы ангиогенеза эффективно воздействуют на одно из основных звеньев патогенеза пролиферативной ДР.

5. Средства, влияющие на реологические свойства крови, показывают свою эффективность в связи с выраженными микрососудистыми изменениями при ДР. Зарегистрированным препаратом для клинического использования является тиклопидин. Тиклопидин улучшает способность эритроцитов к деформации, снижает агрегацию тромбоцитов, уровень фибриногена, тем самым, уменьшая повышенную вязкость крови. Однако, положительный эффект от применения тиклопидина может быть получен только у пациентов с инсулинотерапией [Фетцер Д.В. и соавт., 2009].

6. Антиоксиданты. Окислительный стресс при ДР с увеличением перекисного окисления липидов и истощением механизмов антиоксидантной защиты, является и причиной, и следствием губительного нарушения гомеостаза клеток сетчатки и внеклеточного матрикса. Поиск новых стратегий восстановления этого гомеостаза может служить одним из потенциальных методов остановки развития и прогрессирования ДР [Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000]. В разные годы различными авторами предлагались различные антиоксидантные препараты для лечения больных ДР: токоферол [Евграфов В.Е., 1996], глазные пленки с эмоксипином [Смирнова Н.Б., 1998], эйконол [Сорокин Е.Л., 2001], танакан (Бородай А.В. и соавт., 2000), мексидол [Галилеева В.В. и Киселева О.М., 2000], диквертин, относящийся к группе витамина Р и обладающий антиоксидантной активностью [Скуратова Т.М., 1999; Скуратова Т.М. и соавт., 2000], который, в сочетании с аскорбиновой кислотой, показал выраженный ретинопротекторный эффект на структуры сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию на фоне аллоксанового диабета [Логвинов С.В. и соавт., 2006]. Показано, что применение в течение 10 дней экстрактов коры белой ивы и гинко билоба, содержащие карнозин

(C₉H₁₄O₃N₄, дипептид (β-аланилгистидин), состоящий из аминокислот (β-аланина и L-гистидина) и α-липоевую кислоту у крыс со стрептозотоциновым диабетом приводит к снижению уровня цитокинов, TNF-α, VEGF, угнетению перекисного окисления липидов, что повышает сохранность структур сетчатки [Мошетова Л.К., 2006; Vucolo C. et al., 2013]. Признавая принципиальную оправданность применения антиоксидантов при ДР, необходимо отметить, что E.J. Mayer–Davis и соавторы (1998) привели данные об отсутствии положительного эффекта приема витаминов С, Е и бета–каротинов в отношении изменений глазного дна. Тем не менее, поиск эффективных антиоксидантов, а также препаратов, влияющих на другие звенья патогенеза, способных ограничивать и блокировать проявления диабетических осложнений сетчатки продолжается учеными всего мира с целью снизить до минимума риск возникновения заболевания и улучшить качество жизни больных.

1.2. ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВИДИМОГО СВЕТА НА СЕТЧАТКУ ГЛАЗ. ПАТОГЕНЕЗ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Световая нагрузка на зрительный анализатор людей всех возрастных групп значительна, что связано с ежедневной инсоляцией, с применением в быту и на производстве мощных источников света, а также накоплением с возрастом фотосенсибилизатора липофусцина, который ухудшает защиту сетчатки от воздействия сине-зеленого света [Boulton M. et al., 2001; Roberts J.E., 2001; Margrain T.H. et al., 2004; Macarez R. et al., 2007; Hunter J.J. et al., 2012]. Как известно, глаз человека и животных имеет внутренний потенциал защиты от фотохимических повреждений, вызванных превращением хромофоров. Длительное или интенсивное световое воздействие приводит к увеличению спектральной энергии после фотохимических реакций в сетчатке, активацию свободнорадикального окисления, что вызывает острые и хронические изменения, а также необратимые повреждения ее структур [Reme C. et al., 1996; Boulton M. et al., 2001].

Говоря о воздействии света на сетчатку, можно выделить два класса фотоповреждений. Первый класс – длительное воздействие низкоинтенсивного света (от дней до недель), второй – фотоповреждения гораздо более высоких световых интенсивностей длительностью от секунд до нескольких часов. В первом случае повреждаются, в основном, фоторецепторы, во втором – в первую очередь, ПЦ сетчатки, а затем нейроны сетчатки. Максимум спектра действия для первого класса фотоповреждений соответствует спектру поглощения родопсина, т.е. наиболее эффективна сине-зеленая область видимого спектра, для второго – спектр действия находится в УФ и синей областях спектра [Kremers J.J., van Norren D., 1989; Hargrave P., 2001; van Norren D., Gorgels T.G., 2011]. Также несколькими авторами независимо друг от друга установлен кумулятивный эффект светового воздействия на сетчатку и сходство между моделью световой макулопатии и изменениями в глазах человека больных атрофической возрастной макулярной дегенерацией. Так, офтальмоскопическое, ангиографическое и гистологическое исследования заднего полюса глаз макак-резусов показали, что после однократного высокоинтенсивного точечного светового воздействия появились очаговые атрофические изменения ПЦ сетчатки, причем, в очаге поражения ПЦ были гипопигментированы. После нескольких световых экспозиций были зафиксированы полное отсутствие ПЦ и частичная потеря наружных сегментов фоторецепторов, которые со временем регенерировали. После неоднократных освещений наружные сегменты разрушались и не подвергались восстановлению даже через 6-8 месяцев после последней экспозиции. Пятикратное световое воздействие на глаза в течение 60 минут привело к полному отсутствию нейросенсорных клеток (НК), а внутренний ядерный слой (ВЯС) был соединен с мембраной Бруха [Borges J. et al., 1990]. Grimm С. с соавторами (2001) показали, что освещение крыс синим светом длиной волны 403 нм в течение 30 минут вызывает вакуольное перерождение мембранных дисков наружных сегментов фоторецепторов, в течение 60

минут появляются пикнотичные ядра и апоптотические тельца в наружном ядерном слое (НЯС), число которых растет с увеличением времени экспозиции. Спустя 120 минут после облучения наружные сегменты НК практически отсутствуют.

Наибольшую опасность для зрения представляет свет в ультрафиолетовой и синей областях спектра [Sloney D.H., 2006]. Цитотоксический эффект синего света сильно зависит от длины волны. Так, при облучении клеток сетчатки *in vitro* синим светом с длиной волны 411nm, наблюдается снижение метаболической активности клеток и трансмембранного потенциала митохондрий, активация антиоксидантной системы глутатиона, увеличение уровня каспазы-3, что указывает на апоптоз, вызванный прямым повреждением митохондрий и усилением окислительного стресса. Значительных изменений в вышеупомянутых параметрах не наблюдалось, когда клетки облучали светом 471nm [Knels L. et al., 2011]. Однако другими авторами не зарегистрировано тонких отличий в спектре синего цвета. Wasowicz W. С соавторами утверждают, что экспозиция крыс синим светом интенсивностью 500 лк, вовлекая кислород-зависимые процессы, затрагивает НК и ПЦ [Wasowicz W. et al., 2002]. При воздействии на сетчатку синим светом с длиной волны от 400 до 480 нм, происходит накопление гранул с липофусцином. Липофусцин повреждает клеточную ДНК, липопротеины, и другие структуры сетчатой оболочки, которые запускают апоптоз [West S. et al, 1992; Sparrow J.R. et al., 2000]. По данным Wu J. et al. облучение крыс синим светом с длиной волны 400-480 нм в течение 6 часов приводит к активации каспаз в НЯС, ВЯС и ганглионарном слое сетчатки [Wu J. et al., 2002]. В основе такого рода повреждения лежат фотохимические реакции сенсibilизированного свободно радикального окисления. Эффективность этих реакций определяется тремя факторами: наличием поглощающих свет фотосенсibilизаторов, субстратов окисления и присутствием кислорода [Зуева М.В. и соавт., 1987; Островский М.А., Федорович И.Б., 1994; Hargrave P., 2001]. К эндогенным

фотосенсибилизаторам сетчатки, кроме ретиналя, относятся продукты его превращения и липофусциновые гранулы. Накопление липофусцина в ПЦ сетчатки является признаком старения глаза. Наиболее хорошо охарактеризован основной флуорофор липофусцина: N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E). В тканях глаза A2E образуется из-за неспособности ПЦ полностью трансформировать весь транс-ретиаль в 11-цис-ретиаль. Дополнительным источником A2E являются мембранные диски наружных сегментов НК, которые путем фагоцитоза попадают в ПЦ сетчатки и под действием фаголизосом превращаются в A2E. A2E имеет пиридиновую бисретиноидную структуру, которая, однажды образовавшись, не может быть подвержена ферментативному разрушению. Высокие концентрации A2E повреждают клеточные мембраны, нарушают функционирование лизосом и способствуют высвобождению проапоптотических белков из митохондрий. A2E повышает чувствительность ПЦ сетчатки к наиболее опасному синему свету. Продукты окисления A2E разрушают макромолекулы клеток, ингибируют цитохромоксидазу, что приводит к прерыванию цепи переноса электронов, снижает эффективность энергетического обмена веществ и ведет к увеличению АФК [Островский, М.А. и соавт., 1991; Островский М.А. Федорович И.Б., 1994; Hong L. et al., 2006; Ablonczy Z. et al., 2013; Anderson O.A. et al., 2013]. Так, облучение синим светом ПЦ, нагруженных A2E, изменяет транскрипцию генов, принадлежащих к различным функциональным путям, включая стресс, апоптоз и иммунный ответ [van der Burght B.W. et al., 2013].

Биологические мембраны являются главной мишенью повреждающего действия света в присутствии сенсибилизаторов [Raya J.C. et al., 2001]. Поскольку главными компонентами биологических мембран являются липиды и белки, характер фотосенсибилизируемых процессов в мембране определяется в значительной мере чувствительностью белков и липидов к сенсибилизированным фотоповреждениям. В липидах большую чувствительность к сенсибилизированному фотоокислению проявляют

ненасыщенные жирные кислоты, насыщенные же жирнокислотные цепи практически не подвергаются фотоокислению. Легко фотоокисляется также другой вид липидов - холестерин. Процессы фотоокисления сходны с процессами, протекающими при перекисном окислении липидов [Landry R.J. et al., 2011]. Сенсибилизированные фотоповреждения липидов и белков мембран приводят к снижению их барьерных свойств, подавлению активностей мембраносвязанных ферментов и транспортных систем, что способствует изменению внутриклеточного состава и гибели клетки [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981]. Так, уже при низкоинтенсивном световом воздействии 65-130 лк наблюдается дегенерация некоторых дисковых мембран на концах наружных сегментов НК, дезагрегация рибосом, исчезновение аппарата Гольджи, набухание митохондрий [Williams R.A. et al., 1985]. Экстремальные условия освещения здоровой и особенно ослабленной сетчатки приводят к повреждению мембранных дисков наружных сегментов НК, так как антирадикальная защита не справляется со своей задачей [Taylor H.R. et al., 1990]. При воздействии света интенсивностью 800 лк в течение 15 мин в сетчатке крыс обнаруживаются расширение и везикулез мембранных дисков в колбочковых наружных сегментах и набухание митохондрий ПЦ сетчатки [Reme C.E. et al., 2003]. У крыс, которые были облучены люминесцентными лампами интенсивностью 3550 лк в течение 48 часов, встречаются участки сетчатки, лишенные ПЦ и НК, наблюдается сокращение площади наружного плексиформного слоя и снижение общей численной плотности синаптических контактов внутреннего плексиформного слоя [Потапов А.В., Логвинов С.В., 1999; Потапов А.В., 2004]. Повреждение синапсов высокоинтенсивным светом определяется особенностями их строения – высоким содержанием в синаптических мембранах полиненасыщенных жирных кислот, которые повреждаются в результате активации перекисного окисления липидов сильнее, чем мембраны других участков нейронов [Razdan B., et al., 1993].

На сегодняшний день большинство исследователей доказывают ведущую роль апоптоза в гибели клеток при фотоповреждении сетчатки, не исключая, развития некротических изменений [Krishnamoorthy R.R. et al., 1999; Chen L. et al., 2004; Sasaki M. et al., 2012]. Яркий видимый свет является мощным повреждающим стимулом, способным вызвать нерепарируемые или плохо репарируемые повреждения хромосом в виде многочисленных разрывов ДНК, нарушений ее конформации, сшивок между цепями. Происходит запуск апоптоза, который осуществляется через внутриклеточные и внеклеточные сигналы. Часто пусковым моментом являются повреждения внутриклеточных мембран, особенно митохондрий, в результате перекисного окисления липидов. Повреждения структуры мембран происходят при образовании больших количеств окиси азота, супероксидных радикалов. Особое значение имеет дефицит факторов роста. Внеклеточные сигналы осуществляют свое действие через рецепторы клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза. Сигнал воспринимается рецептором и подвергается анализу. Далее через рецепторы или их сочетания полученный сигнал последовательно передается молекулам-посредникам различного порядка и в конечном итоге достигает ядра, где и происходит включение программы клеточного самоубийства [Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. 2003.].

Одним из важных моментов апоптоза является активация гена p53. Дальнейшее прохождение апоптотического сигнала этого типа происходит через активацию проапоптотических генов семейства Bcl2 (Bax и Bid). Белки, являющиеся продуктами этих генов, вызывают повышение проницаемости мембраны митохондрий и выход в цитозоль цитохрома C, dATP, апоптоз-индуцирующего фактора Aif и ДНКазы. Цитохром C вместе с dATP активирует находящийся в цитозоле белок APAF-1, образуя апоптосому, в которой происходит активация каспазы-9, которая активирует каспазу-3. Вслед за этим активируются другие каспазы, протеазы и ДНКазы. Высвобожденные из митохондрий Aif и ДНКазы выполняют дополнительный

внекаспазный путь апоптоза, реализуют свою активность непосредственно в ядре [Новиков Н.С., 1996].

Ключевым геном, приводящим в основном к апоптозу НК сетчатки при световой экспозиции различной интенсивности, по мнению многих авторов, является *c-fos* ген. В нормальных условиях при дневном свете он выражен в ВЯС и ганглионарном слое, в течение темнового периода – в НЯС [Chen L. et al., 2004; Wenzel A. et al., 2000]. После поглощения света чрезмерно высокой интенсивности, разрушительный стимул преобразовывается во внутриклеточный сигнал, приводящий к активации *c-fos* гена, кодирующего транскрипционный фактор – белок AP-1 – молекулярный медиатор апоптотической смерти клетки, который модулирует экспрессию ряда проапоптотических генов в сетчатке [Gu D. et al., 2009; Kubota S. et al., 2010; Rutar M., 2011].

В последнее время доказана роль внутриклеточного Ca^{2+} в апоптотической гибели клеток сетчатки под действием высокоинтенсивного света. Увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} , связанного с активацией Ca^{2+} -зависимых каналов в наружных сегментах фоторецепторов приводит к развитию окислительного стресса и активации NO-синтазы, усиливающих действие друг друга. Увеличение содержания в клетке оксида азота, катализирующего образование цГМФ из ГТФ приводит к открытию цГМФ-зависимых Ca^{2+} каналов в митохондриях. Деполяризация мембран митохондрий является пусковым механизмом активации митохондриальной ветви апоптоза [Reme C.E., et al., 2000].

Таким образом, с помощью многочисленных экспериментов на животных было показано, что интенсивный свет вызывает различной степени нарушения всех структур сетчатки, которые зависят от спектрального состава светового пучка, усугубляются с увеличением интенсивности и длительности воздействия.

Поиск новых средств профилактики и лечения световых повреждений сетчатки продолжается и периодически пополняется новыми

экспериментальными исследованиями. Интраперитонеальное введение фенил-N-трет-butylnitron (PBN) – перехватчика свободных радикалов, крысам, подвергшимся тотальному высокоинтенсивному световому воздействию, приводит к сохранности толщины наружного ядерного слоя и защищает фоторецепторы от разрушительного воздействия видимого света [Ranchon I., 2001]. В одной из последних работ в качестве терапевтического продукта для предотвращения фотоповреждений сетчатки предлагается лютеин - антиоксидант из группы каротиноидов. Лютеиновая диета мышей, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию, приводит к увеличению амплитуды В-волны на электроретинограмме, снижает выраженность апоптотической гибели фоторецепторов путем репарации ДНК, уменьшает выраженность индуцированного стрессом окислительного стресса [Sasaki M. et al., 2012].

1.3. ВОЗРАСТНАЯ ХОРИОРЕТИНАЛЬНАЯ ДЕГЕНЕРАЦИЯ. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ЭТИОЛОГИЯ, ПАТОМОРФОГЕНЕЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ

Старение - неизбежный процесс, сущность которого сводится к появлению признаков дегенерации как отдельных органов и тканей, так и организма в целом. Старость — заключительный этап индивидуального развития организма. Началом её у человека условно считают возраст после 75 лет — это так называемая физиологическая старость. Но и при этом состоянии могут сохраняться умственные и физические силы, определенная работоспособность, общественная или социальная активность, интерес к окружающему миру. Процесс старения начинается в разных органах и тканях не одновременно и протекает с разной интенсивностью. Во многом интенсивность старения зависит от врожденных, генетически детерминированных свойств тканей. В настоящее время существует несколько главенствующих альтернативных теорий, которые отчасти противоречат друг другу, а отчасти — дополняют.

1. Свободнорадикальная теория утверждает, что старение и связанные с возрастом нарушения – это результат кумулятивного повреждения, возникающего вследствие реакций с активными формами кислорода (АФК). Эта теория объясняет множество обусловленных возрастом феноменов, таких как взаимосвязь долгожительства и скорости основного метаболизма, скопление дегенеративных заболеваний в конце жизни, благотворное воздействие теплового ограничения на продолжительность жизни и большую продолжительность жизни у женщин [Harman D., 2009]. Обнаружено ассоциированное с возрастом окислительное повреждение коллагена, эластина, мукополисахаридов, а также нуклеарной и митохондриальной ДНК, отмечено содействие липидной пероксидации липофусциногенезу [Cortopassi G.A. et al., 1992; David R. et al., 2011]. Более того, существует возрастной подъем системной окислительной нагрузки, а связанная с возрастом заболеваемость ассоциирована с низким уровнем антиоксидантной защиты [Rózanowska M. et al., 1995; Kritchevsky S B. et al., 1997; Paolisso G. et al., 1998]. Известно, что окислительный стресс способствует или является причиной все большего числа болезней, таких как сердечно-сосудистые заболевания, некоторые виды онкологических заболеваний, нейродистрофические процессы, катаракта и макулярная дегенерация [Vina J. et al., 2013; Gutowski M. et al., 2013].

2. Митохондриальная теория представляет собой частный случай свободнорадикальной теории. Она основана на четырех принципах [Beckman K.B., Ames B.N., 1998]. Во-первых, из-за своего расположения в митохондриальном матриксе, мтДНК подвержена сильному воздействию свободных радикалов. Во-вторых, в отличие от ядерной ДНК, мтДНК депротеинизирована, то есть, не покрыта защитными структурными белками, такими как гистоны. Согласно третьему допущению, митохондрии лишены способности восстанавливать повреждения ДНК, вызванные окислением. Исходя из этих трех допущений, постоянная базовая нагрузка окислительных повреждений на мтДНК значительно выше, чем на ядерную ДНК [Muller F.L.

et al., 2007]. Воздействие АФК на мтДНК способствует формированию продуктов окислительного повреждения оснований ДНК, таких как 8-гидрокси-2'-диоксигуанозин, а также разрывов цепочек. Доказано, что уровень 8-гидрокси-2'-диоксигуанозина в мтДНК и максимальная продолжительность жизни млекопитающих обратно пропорциональны, что свидетельствует о возрастзависимом характере накопления повреждений ДНК [Klungland A. et al., 1999]. Мутации в мтДНК играют огромную роль в повреждении таких постмитотических клеток, как нейроны, и возникновении нейродегенеративных заболеваний. Митохондрии обеспечивают энергию, необходимую для функционирования синапсов, по которым передаются сигналы. Повреждение мтДНК в конечном итоге приводит к нарушению биоэнергетической составляющей нейрона. Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов. При нейродегенеративных заболеваниях обнаруживаются мутации мтДНК и связанные с ними нарушения биоэнергетики [Kang D, Hamasaki N., 2005]. Некоторые компоненты митохондриальной цепи переноса электронов закодированы в мтДНК. Таким образом, четвертым допущением, лежащим в основе митохондриальной свободно-радикальной теории старения, является то, что повышенный уровень мутаций мтДНК еще больше увеличивает количество АФК, тем самым способствуя дальнейшему накоплению мутаций посредством нарушения целостности цепи переноса электронов [Bandy B., Davison A.J., 1990]. В настоящее время проводится большое количество исследований, связанных с митохондриями, окислительным стрессом и старением [Maranzana E. et al., 2013].

3. Молекулярно-генетическая теория

- Теломерная теория. В 1961 году американский геронтолог Л. Хейфлик установил, что фибробласты (клетки соединительной ткани), изъятые из организма и помещенные в полноценную среду, способны лишь к ограниченному числу делений (предел Хейфлика), после чего культура гибнет [Hayflick L., Moorhead P.S., 1961]. «В пробирке» фибробласты – могут

делиться не более 50 раз. В 1971 году научный сотрудник Института биохимической физики РАН А.М. Оловников предложил гипотезу, по которой «предел Хейфлика» объясняется тем, что при каждом клеточном делении укорачиваются теломеры – концевые участки хромосом. В какой-то момент они укорачиваются настолько, что клетка уже не может делиться и теряет жизнеспособность. Подтверждением теории Оловникова стало открытие в 1985 году фермента теломеразы, достраивающего укороченные теломеры в половых клетках и клетках опухолей, обеспечивая их бессмертие [Greider C.W., Blackburn E.H., 1985]. Предел в 50–60 делений справедлив далеко не для всех клеток: раковые и стволовые клетки теоретически могут делиться бесконечно долго даже в культуре, в живом организме стволовые клетки могут делиться тысячи раз, но связь старения клеток с укорочением теломер является общепризнанной [Anisimov V.N. et al., 2006].

- Элевационная (онтогенетическая) теория. В начале 1950-х годов отечественный геронтолог В.М. Дильман выдвинул и обосновал идею о существовании единого регуляторного механизма, определяющего закономерности возрастных изменений различных гомеостатических систем организма [Dilman V.M., 1994]. По гипотезе Дильмана, основным звеном механизмов, как развития, так и последующего старения организма является гипоталамус – «дирижер» эндокринной системы. Главная причина старения – это возрастное снижение чувствительности гипоталамуса к регуляторным сигналам, поступающим от нервной системы и желез внутренней секреции. Снижение регулятивной роли гипоталамуса ведет к возрастному угнетению функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система контролирует выработку корой надпочечников глюкокортикоидных гормонов, называемых «гормонами стресса». Постоянное нарастание этих гормонов в крови заставляет организм постепенно адаптироваться к состоянию стресса. Это состояние Дильман назвал «гиперадаптозом» или «болезнью старения».

- Стохастическая (вероятностная) теория. Старение – это следствие накопления случайных мутаций в хромосомах, ошибок при копировании ДНК во время деления клеток и изнашивания механизмов репарации ДНК. Многие мутации не являются летальными и сохраняются у делящихся клеток. Повреждение ДНК влияет на экспрессию генов, предотвращает транскрипцию ДНК в РНК, в результате появляется аномальный белок, который не может нормально функционировать [Bohr V.A., Anson R.M., 1995].

Старение организма в настоящее время невозможно предотвратить, но исследование патогенеза и причин его развития позволит регулировать время появления болезней старения, превратив старость не в мучительный, полный болезней и страданий, длительный 20-25 летний период, а в красивый отрезок человеческого пути.

Старение является крупнейшим фактором риска для возрастной макулярной дегенерации, основной причиной слепоты у пожилых людей. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные возрастной макулярной дегенерации (ВМД), этиопатогенез которой, как и многих других возраст-зависимых заболеваний остается до настоящего времени окончательно не выясненным. ВМД относится к многофакторным заболеваниям. Выявлению факторов риска развития данного заболевания было посвящено много различных работ. Помимо главного фактора риска – возраста, существуют дополнительные факторы, такие как, генетическая предрасположенность, атеросклероз, артериальная гипертензия, курение, а также воздействие ультрафиолетового излучения и несбалансированное питание [Xu W. et al., 2010; Киселева, Т.Н., 2006]. В ряде исследований была установлена связь между уровнем потребления жиров с пищей и развитием поздней стадии ВМД. Риск развития данной патологии выше у людей, которые употребляют в пищу больше насыщенных жиров и холестерина, а также при повышенном индексе массы тела, и ниже у тех, в чьем пищевом

рационе имеется достаточное количество омега–3 длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот [Gale C.R. et al., 2003].

В разных исследованиях рассматривались и другие факторы, включая гормональный статус, экспозицию воздействия солнечных лучей, употребление алкоголя. Существует связь развития ВМД с определенными нейрогуморальными нарушениями, а также с изменениями вегетосимпатической активности [Егоров Е.А., Романенко И.А., 2009].

Классификация ВМД строится в основном на этапах развития дистрофического процесса. Л.А. Кацнельсон с соавт. различают 3 формы заболевания [Clemons T.E. et al., 2005]:

1. Неэкссудативная (сухая) форма: ретинальные друзы, дефекты ПЦ, перераспределение пигмента, атрофия ПЦ и хориокапиллярного слоя.
2. Экссудативная (влажная) форма: стадия экссудативной отслойки ПЦ; неоваскулярная стадия; стадия экссудативно–геморрагической отслойки ПЦ.
3. Рубцовая стадия.

Другие авторы предлагают выделять раннюю и позднюю стадию ВМД [Ding X. et al., 2009]. В ранней стадии отмечаются фокальные друзы и неравномерность пигментации ПЦ сетчатки. Для поздней стадии характерны отслойка и разрыв ПЦ, хориоидальная неоваскуляризация, дисковидный (фиброваскулярный) рубец, географическая атрофия ПЦ.

Американская академия офтальмологии рекомендует классификацию, разработанную в ходе исследования возрастной глазной патологии (Age–Related Eye Disease Study – AREDS) [Ehrlich R. et al., 2009]:

- Отсутствие ВМД (категория 1 AREDS) – отсутствие или небольшое количество твердых друз (диаметр <63 микрон).
- Ранняя стадия ВМД (категория 2 AREDS) – множественные твердые друзы, небольшое число мягких друз (диаметр от 63 до 124 микрон) или изменения ПЦ

- Промежуточная стадия ВМД (категория 3 AREDS) – множество мягких друз, по крайней мере, одна сливная друза (диаметр - 125 микрон) или географическая атрофия, не затрагивающая центральной ямки.

- Поздняя стадия ВМД (категория 4 AREDS) характеризуется наличием одного или нескольких признаков: географическая атрофия ПЦ и хориокапиллярного слоя в области центральной ямки сетчатки; неоваскулярная макулопатия: хориоидальная неоваскуляризация, серозная и/или геморрагическая отслойка ПЦ, липидные отложения, субретиальная и субпигментная неоваскуляризация, образование дисковидного рубца.

Подсчитано, что в течение 5 лет приблизительно в 22% парных глаз у пациентов с поздней стадией ВМД могут появиться неоваскулярные изменения или географическая атрофия в области центральной ямки [Ehrlich R. et al., 2009].

Несмотря на очевидный прогресс в диагностике, полной ясности в патогенезе заболевания нет. В настоящее время интенсивно изучается роль наследственных факторов в возникновении возрастной хориоретиальной дегенерации. Многие исследователи склоняются к аутосомно–доминантному типу наследования. Установлено трехкратное возрастание риска развития болезни, если она встречается у родственников в первом поколении [Мошетьова Л.К., 2007]. Возникновение ВМД связывают с мутациями в генах ARMD1 [1q25–q31], FBLN6 [1q24–q25], ARMD3 [14q32.1] [Fuse N. et al., 2006; Fisher SA. et al., 2007].

Развитие инволюционной центральной хориоретиальной дегенерации связывают с нарушением капиллярного кровообращения в области желтого пятна. У большей части больных установлено также ослабление регионального кровоснабжения. В исследованиях с использованием метода импульсно–волновой доплерографии выявлено значительное снижение объемной скорости кровотока в системе задних коротких цилиарных артерий. Показана также тенденция к снижению гемодинамических показателей по мере прогрессирования дистрофического процесса [Либман,

Е.С. и соавт., 2006]. В результате этих процессов происходит дегенерация колбочковых НК, гибель которых опосредована повреждениями ПЦ сетчатки [Zarbin MA., 2003; 2004].

Наиболее известные ранние изменения ПЦ – дисфункция митохондрий, угнетение в них процессов окислительного фосфорилирования, повреждение митохондриальной ДНК, гипертрофия и дедифференцировка совпадают с активизацией MTOR сигнального пути (mammalian target of rapamycin), функционирующего в клетке как сенсор уровня питательных веществ, энергии, окислительно-восстановительного статуса, аутофагии [Rattner A. et al., 2008; Zoncu R. et al., 2011]. По теории М. Благосклонного, гиперактивация митоген-стимулируемых путей, особенно пути TOR, приводит к возникновению гипертрофического фенотипа с остановкой клеточного цикла. При этом стареющая клетка растет, но не делится. На сегодняшний день известно, что TOR-киназа связана с возраст-зависимыми болезнями, такими как атеросклероз, гипертония, остеопороз, болезни Паркинсона и Альцгеймера, ожирение, дегенерация сетчатки [Blagosklonny M.V., 2013]. В недавних исследованиях было показано, что введение мышам дикого типа сильного окислителя приводит к активации MTOR в ПЦ, вызывает дедифференцировки с глубокими негативными последствиями для фоторецепторов. MTOR сигнальный путь усиливает действие проапоптотического белка p53 и ингибирует p73, которые являются антагонистами в регуляции процесса аутофагии: p53 подавляет аутофагию, а p73 - активирует аутофагию и различные ассоциированные с ней гены, подавляющие mTOR, причем доказано, что в нервной системе p73 блокирует проапоптотическую функцию p53, играя тем самым большую роль в клеточной дифференцировке всех клеточных элементов нервной системы. Аутофагия является частью процесса распада белков и органелл на клеточном уровне. В ходе клеточного старения эффективность аутофагии уменьшается, что приводит к накоплению продуктов разложения. Недавние исследования показали, что аутофагию регулируют те же самые сигнальные

факторы, что и старение. Это говорит о большой роли аутофагии в регулировании процессов старения и возрастных дегенеративных заболеваний [Anguiano J. et al., 2013; Rodríguez-Muela N. et al., 2013].

Существенный вклад в развитие ВМД вносит гипоксия, причины которой могут быть различны: недостаточность сосудов, в том числе связанная с развитием атеросклероза, изменения в мембране Бруха, наличие друз [Klein R. et al., 2013]. Изменения мембраны Бруха и сосудистой оболочки, сопровождающие развитие этого заболевания, выявлены у 75% больных атеросклерозом [Fernandez A.B. et al., 2012]. Поражение фиброзно-эластических тканей глаза и мембраны Бруха идентичны характеру атеросклеротического поражения в стенках артерий мышечно-эластического типа. Происходит инфильтрация липидами сосудистой стенки, мембраны Бруха с дальнейшим образованием друз и кальцинозом, формированием субретинальной атеросклеротической бляшки [Curcio C.A. et al., 2013].

Друзы являются своего рода маркерами ВМД, так как первыми определяются при офтальмологическом обследовании глаз пациента. Они представляют собой депонированное аморфное вещество, находящееся между ПЦ и внешней коллагеновой зоной мембраны Бруха. Причиной образования друз могут быть изменения в мембране Бруха, которые препятствуют транспорту веществ из ПЦ в подлежащие сосуды. На основании формы и размеров различают две группы: твердые и мягкие. Твердые друзы характеризуются небольшими размерами (63-125 мкм) и четкой видимой границей [Algvere P.V. et al., 2003]. Мягкие друзы имеют больший размер по сравнению с твердыми (>125 мкм) и при офтальмологическом обследовании имеют размытые границы. Наличие больших мягких друз (>125-250 мкм) с нарушениями пигментации на границе друз является основным фактором риска для развития влажной формы ВМД, включая неоваскуляризацию и экссудацию [Miks A. et al., 2006].

Было показано, что дегенеративные изменения НК и ПЦ происходят над друзами любых размеров с тенденцией к простираанию в латеральном направлении [Algvere P.V., Seregard S., 2003].

Друзогенез является комплексным и многофакторным процессом, который занимает годы. Первичный материал друзы вызывает иммунную реакцию, привлекает макрофаги и моноциты. Многочисленные исследования выявили в составе друз, помимо остатков ПЦ, большое количество иммуноассоциированных элементов и молекул: иммуноглобулинов, антигенов второго класса и компонентов каскада комплемента (активаторов и ингибиторов), мембранных атакующих комплексов (МАС, C5b-9). Последний является летальным не только для инородных патогенов, но и для самих ПЦ, фоторецепторов и мембраны Бруха через механизмы местного воспаления и активацию каскада комплемента. Секретируемые моноцитами и макрофагами различные ростовые факторы, включая VEGF, могут приводить к запуску и развитию хориоидальной неоваскуляризации [Crabb J.W. et al., 2002; Kijlstra A. et al., 2005].

В условиях недостатка кислорода происходит активация индуцируемого гипоксией фактора транскрипции HIF-1, который и приводит к усилению экспрессии гена VEGF и других ангиогенных факторов. Новообразованные сосуды, врастающие со стороны хориоидеи через дефекты мембраны Бруха, приводят к образованию субретинальной неоваскулярной мембраны. Во многих работах показана ведущая роль фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в этом процессе [Aiello L.P. et al., 1994; Adamis A.P. et al., 1996; Ferrara N. et al., 2003; Fine S.L. et al., 2000; Tranos P. et al., 2013]. Под действием VEGF-A происходит разрушение базальной мембраны и миграция клеток эндотелия, а также экспрессия интегринов на поверхности клеток [Ferrara N., Alitalo K., 1999]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* VEGF повышает жизнеспособность эндотелиальных клеток, вызывает их пролиферацию и образование сосудов. Повышенный уровень VEGF может играть роль в предрасположенности к

хориоретинальной неоваскуляризации. Сверхэкспрессия VEGF в НК и ПЦ вызывает у крыс развитие неоваскулогенеза в сетчатке [Wang F. et al., 2003].

Дефицит ингибиторов ангиогенеза также может становиться причиной заболевания [Koss M.J. et al., 2011]. Главным ингибитором роста сосудов в сетчатке является фактор пигментного эпителия (PEDF) [Bhutto I.A. et al., 2006]. Последние работы показывают, что его сверхэкспрессия приводит к замедлению развития хориоидальной неоваскуляризации. Дисбаланс между VEGF и, секретируемым ПЦ сетчатки, PEDF вносит решающий вклад в активации процессов неангиогенеза при ВМД с развитием «влажной» формы ВМД [Yoshida T., 2007]. Показано, что VEGF вызывает аутокринное повышение экспрессии PEDF через рецептор VEGFR-1. Это говорит о наличии некой обратной связи между этими системами, которая поддерживает гомеостаз кровеносных сосудов в сетчатке. Нарушение этой связи или экспрессии факторов может привести к развитию «влажной» (неоваскулярной) формы ВМД. Перекись водорода, гипоксия являются факторами, снижающими экспрессию PEDF. В настоящее время ведутся активные исследования по применению PEDF в качестве препарата от ВМД и неоваскуляризации. Внутриглазные инъекции PEDF, упакованного в аденовирусный вектор, ингибируют развитие неоваскулогенеза в сетчатке различных моделей мышей [Mori K. et al., 2002]. С возрастом, при отложении липофильных веществ и развитии уплотнений в мембране Бруха, VEGF-A не способен диффундировать сквозь мембрану Бруха, в результате чего наступает нарушение трофики сосудов [Holz F.G., 1994]. Экспериментальное разрушение ПЦ также приводит к атрофии сосудов [Korte G.E. et al., 1984]. В результате этих изменений в наружных слоях сетчатки развивается гипоксическое состояние, что вызывает развитие окислительного стресса и повышенную продукцию VEGF-A, его аккумуляцию на мембране Бруха со стороны ПЦ. [Wang F. et al., 2003]. Согласно современным представлениям, факторами, провоцирующими развитие хориоретинальной неоваскуляризации, становятся воспаление и активация иммунной системы,

которые создают структурные, клеточные и молекулярные предпосылки для преобладания ангиогенных факторов. Нейтрофилы, макрофаги, тучные клетки, активированная микроглия способны продуцировать и представлять массив проангиогенных факторов, включая VEGF [Nowak J.Z. et al, 2006].

Таким образом, VEGF является основным фактором развития хориоретинальной неоваскуляризации, на котором сходятся два пути патогенеза ВМД: гипоксия и воспаление. При этом универсальным повреждающим механизмом является окислительный стресс.

Сетчатка - ткань с высоким обменом веществ и высоким потреблением кислорода на единицу веса всех человеческой ткани [Yu D.Y. et al., 2005]. Кислород и питательные вещества в сетчатку поставляются двумя независимыми системами кровообращения: сосудами сетчатки и сосудами хориоидеи. Интравитреальные сосуды обеспечивают кислородом и питательными веществами внутренние две трети сетчатки. Наружная треть сетчатки физиологически аваскулярна и получает необходимые питательные вещества и кислород с помощью хориокапилляров. Высокая скорость перфузии крови в хориоидальной системе обеспечивает достаточное количество кислорода и питательных веществ для нормального функционирования ПЦ и НК, при этом есть доказательства того, что система хориоидеи может обеспечить питание всех слоев сетчатки [Yu D.Y. et al., 2005]. Высокое напряжение кислорода в ткани сетчатки, высокий уровень освещенности, высокие уровни полиненасыщенных жирных кислот способствуют производству свободных радикалов, ведущих к окислительному стрессу, и делают сетчатку особенно восприимчивой к повреждению свободными радикалами, активирующими перекисное окисление липидов [Jarret S.G., Boulton M.E., 2012; Cai J. et al., 2000; Klettner A., 2012; Roberts J.E., 2001; Salomon R.G. et al., 2011]. В здоровой сетчатке существует мощная система защиты от повреждающего влияния свободных радикалов [Wiktorowska-Owczarek A., Nowak J.Z., 2006; Kijlstra A. et al., 2012; Ozawa Y. et al., 2012].

Потеря зрения при ВМД происходит в связи с повреждением фоторецепторов желтого пятна, патологией ретинальных ПЦ и мембраны Бруха. В ПЦ происходит накопление липофусциновых гранул, которое существенно усиливается при развитии патологических состояний. Липофусцин – комплекс соединений нестабильного состава. Гранулы состоят в основном из белков (50%) и липидов (44%). Содержимое гранул представляет собой остатки неполной деградации компонентов внешних сегментов фоторецепторов, которые фагоцитируются ПЦ. Причиной этого может быть фагоцитарная и метаболическая недостаточность клеток ПЦ. Основной компонент гранул A₂E способен фотоактивироваться и становиться источником АФК. A₂E представляет собой бисретиноидный флюорохром, состоящий из двух цепей ретиноида [Sparrow J.R., Boulton M., 2005]. Этот флюорохром способен поглощать энергию в синей области светового спектра, и продуцировать АФК, которые могут быть источниками различных окислительных повреждений в клетках [Warburton S. et al., 2005]. Накопление A₂E активирует микроглию и снижает ее нейропротекторные свойства в отношении фоторецепторов. Повышенное накопление A₂E также снижает количество рецепторов хемокинов на микроглии и подавляет хемотаксис микроглиоцитов, активирует систему комплемента в сетчатке [Ma W. et al., 2013].

За последнее время совершен крупный прорыв в лечении неоваскулярной формой ВМД с помощью антиангиогенных (анти-VEGF) препаратов. Тем не менее, для лечения сухой атрофической формы заболевания адекватной терапии до сих пор нет. Принципы медикаментозного лечения ВМД основаны на изучении структурных и молекулярных основ развития ВМД, направлены на улучшение микроциркуляции и обменных процессов, изучаются инновационные стратегии генной, клеточной терапии, нейропротекторные нанотехнологии с целью предотвращения снижения зрения в зрелом, пожилом и старческом

возрасте [Киселева Т.Н. и соавт., 2006; Klein R. et al., 2002; Girmens J.F. et al., 2013; Yuzawa M., 2013].

Для улучшения кровоснабжения макулярной области используют препараты, которые обладают сосудорасширяющим действием, избирательно и интенсивно усиливают кровоток, уменьшают проницаемость сосудистой стенки, значительно улучшают микроциркуляцию (тормозят агрегацию тромбоцитов и уменьшают повышенную вязкость крови). Препаратами выбора в данном случае являются фезам, кавинтон, пикамилон, вазобрал, танакан [Киселева Т.Н. и соавт., 2006].

Для улучшения микроциркуляции и трансапиллярного обмена применяют пентоксифиллин, который тормозит агрегацию тромбоцитов, улучшает реологические свойства крови, подавляет тромбообразование и нормализует микроциркуляцию.

В терапии неэкссудативных форм ВМД и при высоком риске развития заболевания с целью нормализации обменных процессов в сетчатке рекомендуют проводить курсы антиоксидантной терапии [Snow K.K., 1999]. Доказано, что заболеваемость ВМД снижается при высоком потреблении с пищей антиоксидантов [Ho L. et al., 2011]. Антиоксидантные препараты способствуют снижению проницаемости капилляров, укреплению сосудистой стенки, стабилизации клеточных мембран [Dobreanu M., Módy E., 1997; Ehrlich R. et al., 2009]. Антиоксиданты являются средством для повышения плотности макулярного пигмента и возможности предупреждения развития патологических изменений в центральной зоне сетчатки. Так, лютеин осуществляет антиоксидантную защиту, выполняет функцию светофильтра, поглощая до 40% коротковолнового синего излучения, таким образом, предохраняя ПЦ от светового повреждения [Sommerburg O. et al., 1998; Trieschmann M. et al., 2007]. Для описания долгосрочных (10 лет) эффектов применения высоких доз пищевых добавок из антиоксидантов С, Е, β -каротина и цинка на прогрессирование возрастной макулярной дегенерации (ВМД) было проведено многоцентровое,

рандомизированное, плацебо контролируемое клиническое испытание 4757 участников с различной степени тяжести ВМД. У всех участников было выявлено значимое ограничение развития сухой формы ВМД, причем положительный эффект препаратов сохранялся пять лет после окончания клинических испытаний, чего не прослеживалось в группе больных с влажной формой макулярной дегенерации [Chew E.Y., 2013].

Недавно появился новый класс анитоксидантов, способных проникать и накапливаться в митохондриях. Эффективным соединением этого класса оказался SkQ1 – катионный аналог хинона, составленный из пластохинона, принимающего катиона и деканового линкера. Препарат является антиоксидантом многократного действия, так как легко восстанавливается в дыхательной цепи митохондрий [Pletjushkina O.Y. et al., 2008]. SkQ1 обладает высоким профилактическим эффектом и лечебным потенциалом в отношении катаракты и возрастной макулярной дегенерации крыс линии OXYS, что выражается в нормализации кровотока, восстановлении пигментного эпителия и экспрессии генов VEGF в хориоретинальном комплексе и альфа-кристаллинов в хрусталиках [Колосова Н.Г. и соавт., 2007; 2008; Румянцева Ю.В. и соавт., 2008; Rumyantseva Yu.V. et al., 2008; Snytnikova O.A. et al., 2008].

В комплексной терапии ВМД также применяют витаминные препараты с микроэлементами цинка и селена [Evans J.R., Lawrenson J.G., 2012]. Доказано, что поражение фибро–эластических тканей глаза и мембраны Бруха идентичны характеру атеросклеротического поражения в стенках мышечно–эластических артерий, поэтому необходимо применять противосклеротические препараты.

Помимо перечисленных существует большое множество препаратов, которые применяются для лечения и профилактики дистрофических заболеваний сетчатки, однако стойкого улучшения зрения, как правило, получить не удастся. Консервативная терапия эффективна лишь на ранних стадиях процесса и результаты ее нестабильны. Разработка эффективных

способов терапии и профилактики возрастной хориоретинальной дегенерации - актуальная задача, решение которой во многом связано с успехами фундаментальных исследований, направленных на раскрытие структурных, молекулярно-генетических и биохимических механизмов развития и прогрессирования заболевания.

У людей ВМД – одно из проявлений старения и её развитие, как правило, сопряжено с комплексным развитием изменений, сопровождающих старение. Создание моделей, воспроизводящих такую ситуацию, является сложной задачей. Полноценной моделью преждевременного старения и связанных с ним заболеваний служит линия крыс OXYS, созданная в 70-е годы под руководством Р.И. Салганика в Институте цитологии и генетики СО РАН. Данная линия крыс - результат селекции и инбридинга крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. Крыс Вистар помещали на богатый галактозный рацион, вследствие чего в их печени вначале повышалась активность галактокиназы, позднее возрастала активность галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы и в последнюю очередь - активность уридинфосфатгалактозо-4-эпимеразы [Салганик Р.И., 1975]. Таким образом, у животных имела место последовательная индукция ферментов, превращающих галактозу в глюкозу, что позволило предположить, что гены, программирующие такие ферменты, не входят в состав одного оперона, а образуют связанные метаболитами временные сочетания. При скормливания крысам в течение 7-15 дней богатой галактозой пищи, последовательная индукция этих ферментов в печени животных сменялась падением их активности ниже исходного уровня. При более продолжительном введении животным галактозы на фоне нарушения способности к индукции этих ферментов происходило повышение содержания галактозы в крови, и развивались типичные признаки галактоземии: катаракта, дегенеративные изменения клеток печени, задержка роста животных [Салганик Р.И., 1975]. В популяции крыс наблюдалась гетерогенность животных по чувствительности их к индукционному и

галактоземическому эффекту галактозы. У некоторых животных признаки галактоземии развивались на 8-12 день после начала кормления богатым галактозой рационом, у других они появлялись только через месяц и более, а у остальных животных признаки галактоземии наблюдались в различные сроки между этими крайними точками. Путем многократного инбридинга крыс, у которых катаракта развивалась в самые ранние сроки, ученые под руководством проф. Р.И. Салганика получили линию крыс, в последствие названную OXYS. Крысы OXYS обладают комплексом признаков старения: ускоренной инволюцией тимуса, сниженной реактивностью клеточного звена иммунной системы, повышенным артериальным давлением, ранним развитием остеопороза и изменениями в когнитивной и эмоциональной сферах. Сначала эта линия была зарегистрирована как W/SSM [Салганик Р.И. и соавт., 1994], а после выявления в их тканях высокого уровня генерации кислородных радикалов линию её зарегистрировали как OXYS, и наследственно повышенное радикалообразование стало её ключевой характеристикой. Генетически обусловленный дефект метаболизма, выражающийся в повышенной чувствительности крыс OXYS к окислительному стрессу, приводит к таким изменениям в их организме, которые могут рассматриваться как синдром ускоренного старения [Фурсова А.Ж. и соавт., 2004.]. Его проявлениями стали сниженная на 28% по сравнению с исходной линией крыс Вистар продолжительность жизни и раннее развитие фенотипических проявлений старения. Проведенный на протяжении последних 14 поколений углубленный отбор по признаку ранней катаракты привел к тому, что изменения хрусталиков появляются у крыс OXYS к 2 мес., в 6 мес. обнаруживаются у 100% животных (у крыс Вистар – 5%), в 12 мес. катарактой поражаются оба глаза. По данным офтальмоскопических, биомикроскопических и морфологических исследований, катаракта у крыс OXYS по характеру соответствуют сенильной катаракте у людей [Колосова Н.Г. и соавт., 2004].

Установлено, что наряду с катарактой у крыс OXYS развиваются дистрофические изменения сетчатки, по клиническим проявлениям аналогичные выявляемым при ВМД у людей [Фурсова А.Ж. и соавт., 2003; Колосова Н.Г. и соавт., 2004]. Относительно недавние исследования показали, что манифестация катаракты и ВМД у крыс OXYS совпадает по времени с другими проявлениями преждевременного старения этих животных и происходит на фоне ранней инволюции тимуса, снижения активности Т-клеточного звена иммунной системы, опережая развитие дисбаланса в редокс-регуляции и накопление маркеров окислительного стресса [Kolosova N.G. et al., 2006].

Предполагается, что ведущую роль в патогенезе преждевременного старения крыс OXYS играют нарастающие с возрастом нарушения структуры и функций митохондрий — изменение соотношения цитохромов внутренней мембраны, снижение активности F_1F_0 -АТФ-синтетазы, дыхательного контроля и скорости фосфорилирования, снижение объёмной и поверхностной плотности митохондрий, появление митохондрий с лизисом матрикса и деструкцией крист [Колосова Н.Г. и соавт., 2001]. Линия крыс OXYS отличается от других генетических моделей комплексной манифестацией признаков преждевременного старения и используется для изучения патогенеза остеопороза, артериальной гипертензии, катаракты, дегенеративных изменений сетчатки, возрастных изменений в когнитивной и эмоциональной сферах, для экспресс-оценки эффективности способов лечения целого ряда возрастных заболеваний и профилактики преждевременного старения [Гусаревич О.Г. и соавт., 2003; Фурсова А.Ж. и соавт., 2005; 2007; Румянцева Ю.В. и соавт., 2007.; Нероев В.В. и соавт., 2008; Kolosova N.G. et al., 2007].

1.4. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОСТРОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ В КОНТЕКСТЕ ПОИСКА АДЕКВАТНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), инсульт занимает третье место, после болезней сердца и онкологических заболеваний, среди причин смерти взрослого населения планеты. Его средняя частота встречаемости в развитых странах составляет около 2500 случаев на 1 млн. населения в год, смертность - 1 случай на 1000 населения в год. Летальность в остром периоде инсульта в России достигает 35%, увеличиваясь на 12-15% к концу первого года после перенесенного инсульта. Постинсультная инвалидизация занимает первое место среди всех причин инвалидизации и составляет 3,2 на 10000 населения [Исмагилов М.Ф., 2005]. Ишемия головного мозга часто связана с потерей зрительных функций, т.к. мелкие сосуды сетчатки являются уязвимыми для подобных факторов риска [Xiao J. et al., 2012]. С помощью спектрально-оптической когерентной томографии головного мозга больных с односторонним тромбозом задней мозговой артерии обнаружено снижение толщины ганглиозных клеток макулярной области сетчатки [Yamashita T. et al., 2012]. У пациентов с острым ишемическим инсультом по результатам когерентной компьютерной томографии выявляется узкий калибр артерий, широкий калибр вен, редкий и извилистый сосудистый рисунок микрососудистой сети сетчатки [Ong Y.T. et al., 2013].

Временная или постоянная потеря зрения на один или на оба глаза является ранним общим и отличительным проявлением окклюзионных сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз или тромбоз внутренних сонных артерий, снабжающих кровью, в том числе, орган зрения. Ранняя диагностика заболевания, правильная тактика профилактики и лечения может защитить пациента от серьезных угрожающих жизни осложнений, таких как инсульт [Gallego Culleré J. et al., 2008].

В ряде случаев, когда нарушения кровообращения затрагивают систему внутренней сонной и глазничной артерий, возникает угрожающее зрению состояние: глазной ишемический синдром или острая ишемическая

ретинопатия [Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Древаль А.А. и соавт., 2004; Xiao J. et al., 2012].

В литературе также встречаются сообщения о возникновении острой ишемической ретинопатии без развития ишемии головного мозга. Так, после операций на сердце под искусственным кровообращением нередко развивается потеря зрения из-за микроэмболии сосудов затылочной области. Это может быть связано с низким уровнем гематокрита, гипоксией и предоперационным использованием адреналина и амринона, развитием воспалительной реакции и высокими уровнями эндогенных катехоламинов [Blauth C.I. et al., 2010; Vishnu D. et al., 2012].

Окклюзия центральной артерии сетчатки часто отмечается после косметических лицевых инъекций гиалуроновой кислоты, коллагена и особенно собственного жира в области носогубной складки. У таких пациентов снижается острота зрения, происходит истончение сосудистой оболочки глаз [Park S.W. et al., 2012].

Учитывая общность происхождения и системы кровоснабжения, патогенетические механизмы развития нейродегенерации в условиях тотальной ишемии головного мозга, справедливы и для ткани сетчатки [Гундорова, Р.А. и соавт., 2008].

Несмотря на многочисленные исследования в области патогенеза ишемических нарушений коры, а также процессов репарации и нейрогенеза в отдаленный период после острой недостаточности кровоснабжения мозговых структур, стандарты лечения остаются неудовлетворительными и требуют дальнейшего изучения закономерностей структурно-функциональной реорганизации и функционирования поврежденного мозга [Хлуновский А.Н., Старченко А.А., 1999; Ruppin E. et al., 1999; Cho S. et al., 2007; Whitehead S.N. et al., 2007; Chen Y.T. et al., 2012; Zhang P. et al., 2013].

При снижении уровня мозгового кровотока до 55 мл на 100 г в 1 минуту развивается первая реакция мозга в виде угнетения белкового синтеза и активации анаэробного гликолиза. При снижении этого показателя

до 20 мл на 100 г в 1 минуту формируется энергетическая недостаточность, наблюдается дестабилизация мембран нейронов и выброс нейротрансмиттеров. Развивающиеся энергетический дефицит и лактат-ацидоз способствуют глиальной активации; при дальнейшем снижении кровотока формируется инфаркт мозга – некроз и апоптоз клеток в очаге ишемии [Гусев Е. И. и соавт., 1999]. Ключевым фактором постишемического и реперфузионного повреждения на сегодняшний день является окислительный стресс. Неисправность в дыхательной цепи митохондрий нейронов, активация цитоплазматических оксидаз приводит к генерации АФК, которые не могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами клеток. Активные формы кислорода изменяют структуру ДНК, РНК, белков и липидов. Это приводит к сверхэкспрессии ряда проапоптотических белков p53, Вах, каспазы-3, запускающих апоптоз нейронов, а также PDCD5 и NF- κ B - известных регуляторов апоптоза и аутофагии при ишемической гибели клеток в поврежденных нейронах [Li W.L. et al., 2013]. Причем, показано, что в зубчатой извилине гиппокампа при локальной транзиторной ишемии, каспаза-3-опосредованным апоптозом множественно гибнут нейрогенные клетки, ограничивая, тем самым, процессы нейрогенеза [Bingham B. et al., 2005].

Доказано, что после ишемического повреждения развиваются множественные структурные и функциональные повреждения коры большого мозга на разных уровнях. Так, на монгольских песчанках показано, что в первую неделю после ишемии с реперфузией снижается среднее количество митохондрий, увеличивается частота дефектных митохондрий в пресинаптических окончаниях СА1 и СА3 областей гиппокампа. Авторы показали, что распределение митохондрий в пресинаптических окончаниях областей СА1 и СА3 может быть индикатором метаболической дисфункции гиппокампа и синаптической пластичности [Radenovic L. et al., 2011].

Судьба нейронов при ишемическом инсульте тесно связана с другими клетками мозга, такими как эндотелиальные клетки, астроциты, микроглия,

поэтому в последнее время сместился акцент исследования с изолированных нейронов к сосудисто-нервному блоку [Godínez-Rubí M. et al., 2013]. Острая тотальная ишемия с реперфузией приводит к пролиферации и миграции микроглии, эндотелиальной дисфункции, снижению объемной скорости кровотока [Ji S. et al., 2009]. Астроглия – основной источник поддержания гомеостаза в коре. Мозг может противостоять мощному повреждающему эффекту окислительного стресса благодаря нейропротекторным свойствам астроглии, в которой, при определенных благоприятных условиях (повышенная концентрация глюкозы *in vitro*), активируется NFR-2 транскрипционный фактор – цитопротектор, стимулирующий транскрипцию более 200 генов, играющих решающую роль в метаболизме лекарств, токсинов, защиты от окислительного стресса и воспаления, в устойчивости белков и в удалении поврежденных белков через протеасомную деградацию или аутофагию. В связи с чем, астроглиальная дисфункция может определять ход и результат острого гипоксически-ишемического повреждения мозга [Segev-Amzaleg N. et al., 2013].

Доказано, что спустя несколько часов и до нескольких дней после начала фокальной ишемии в зоне, пограничной ишемии, в различных типах клеток (астроциты, эндотелиальные клетки и макрофаги, микроглия) наблюдается индукция VEGF-A [Li Y. et al., 2008; Shin Y.J. et al., 2008; Du H. et al., 2010]. VEGF-A проявляет прямое нейротрофическое [Sondell M. et al., 1999], нейропротекторное действие [Jin K.L. et al., 2000], уменьшает размер участка инфаркта при экспериментальном остром нарушении кровообращения мозга [Hayashi T. et al., 1998] и вовлечен в постишемическое ремоделирование мозга [Stowe A.M. et al., 2007].

На различных моделях ишемии головного мозга показано, что в сетчатках экспериментальных животных наблюдаются разрушение фотосенсорного слоя, дегенерация мюллеровских глиоцитов с накоплением в них глиального фибриллярного белка, гибель амакринных, горизонтальных и ганглионарных нейронов как путем апоптоза, так и некроза, явления

гемостаза и дилатации сосудов хориоидеи [Древаль А.А. и соавт., 2004; Kaja S. et al. 2003; Stelle E.C. Jr. et al., 2008]. 90-минутное лигирование центральной артерии сетчатки у крыс приводит к дегенерации ганглионарных и ассоциативных нейронов. Спустя 1 час после реперфузии в сетчатке регистрируется повышение мРНК C-FOS и c-jun по всему внутреннему ядерному слою, однако изменения нейронов обнаруживаются только спустя 7 дней после реперфузии [Otori Y. et al., 1997].

Окклюзия центральной артерии сетчатки при остром ишемическом инсульте вызывает ишемическое повреждение сетчатки. Это состояние успешно коррегируется внутривенным введением рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (RT-PA) в течение 4,5 часов после развития первых симптомов заболевания [Nowak R.J. et al., 2012].

Свободнорадикальное окисление является универсальным патофизиологическим феноменом при многих патологических состояниях. Нервная ткань особо чувствительна к гиперпродукции свободных радикалов и окислительному стрессу. Поэтому применение антиоксидантной терапии является патогенетически обоснованным при многих цереброваскулярных заболеваниях [Cai X. et al., 2012; Nowak J.Z., 2013].

Ишемия сетчатки, вызванная повышением внутриглазного давления выше систолического артериального давления в течение 45 мин, вызывает значительное снижение альфа- и бета-волновых амплитуд ЭРГ, истончение слоя ганглиозных клеток сетчатки и слоя фоторецепторов, увеличение мРНК и белка каспазы-3 мРНК, каспазы-8 и GFAP в сетчатке, а также уменьшение NO-синтазы, потерю ГАМК-иммунореактивных ганглионарных нейронов. Антиоксидант эпигаллокатехингаллат, флавоноид, полученный из зеленого чая, защищает нейроны сетчатки на месте ишемии, снижая уровень апоптоза [Zhang B. et al., 2007].

Внутрибрюшинное введение альфа-липоевой кислоты, обладающей антиоксидантными свойствами, при аналогичной модели ишемии-

реперфузии защищает сетчатку в целом и ганглионарные нейроны в частности, от ишемии и реперфузии [Chidlow G. et al., 2002].

Таким образом, поиск адекватной терапии с учетом основных звеньев структурных нарушений и постишемического моделирования нейроглиального комплекса коры больших полушарий и, в частности, сетчатки, при ишемическом повреждении головного мозга представляется важным с позиции улучшения качества жизни больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

1.5. АНТИОКСИДАНТЫ. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫХ ФЕНОЛОВ

Исследования академика Н. М. Эмануэля, его сотрудников и многочисленных последователей позволили установить, что окислительный стресс является следствием дисбаланса про- и антиоксидантных систем клетки и выражается в избыточном образовании и накоплении в клетке АФК. Он может являться причиной повреждения ДНК, белков и липидов, приводя к клеточной смерти. Многие причины образования свободных радикалов неустраняемы, однако, учеными всего мира предпринимаются попытки свести к минимуму их губительное действие. В 60-х годах XX века Эмануэль и его сотрудники обратили внимание на роль антиоксидантов – ловушек для свободных радикалов в клетке. Детальное исследование ингибиторов свободно-радикальных окислительных процессов на химическом и биохимическом уровне позволило изучить молекулярную природу оксидативных процессов и окислительного стресса; исследовать процессы перекисного окисления липидов; разработать методы количественной оценки активности антиоксидантов. В результате были найдены способы регуляции оксидативных процессов [Эммануэль Н.М., 1956; Эммануэль Н.М. и соавт., 1965].

Впервые идею о связи развития некоторых заболеваний с повреждающим действием неконтролируемых свободнорадикальных

реакций в 1954 году высказал американский ученый Денхим Харман [Harman D., 1956]. Спустя 40 лет эта теория стала ведущей, объясняя причины возникновения и развития более 60 видов различных патологий, так называемых свободнорадикальных заболеваний [Nowak J.Z., 2013; Cai X. et al., 2012]. К ним среди прочих относятся: возраст-зависимые заболевания, СД и его осложнения, ишемия головного мозга, заболевания, вызванные разнообразными физическими факторами (воздействие высокоинтенсивного света, радиации, микроволновое излучение и т.д.). В связи с чем, значительный интерес в качестве перспективных протекторов повреждения клеток при патологиях, сопровождающихся появлением АФК, представляют препараты антиоксидантной группы. Они способствуют замедлению прогрессирования заболеваний, улучшению электрофизиологических показателей сетчатки [Хазанов В.А. и соавт., 1999; Бобырева Л.Д., 1998; Балаболкин М.И., 2003; Nowak J.Z., 2012].

Препараты антиоксидантного типа действия составляют особую фармакологическую группу в огромном множестве классов лекарственных средств. Установлена высокая эффективность их в медицинской практике, однако, активность каждого антиоксиданта существенно зависит от среды и условий его функционирования. В разных экспериментальных системах выявляемые антиоксидантные свойства соединений различны, что зависит как от типа окислительных реакций, так и от условий их протекания. Антиоксидантов, обладающих абсолютным защитным действием в условиях развития окислительного стресса, не существует. Антиоксидантные или прооксидантные свойства соединений необходимо рассматривать во взаимосвязи со средой и характером развития радикальных окислительных реакций [Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. Так, введение нитрозогруппы в 4-положении в фенольное кольцо классических фенольных антиоксидантов 2,6-диизопропилфенола и 2,6-диметилфенола почти полностью удаляет их антиоксидантные свойства. Нитрозирование ароматического кольца антиоксидантных молекул с последующей потерей антиоксидантных свойств

можно рассматривать как состояние, потенциально происходящее в естественных условиях, так как оксид азота и его производные непрерывно образуются в биологических системах [Rigobello MP. et al., 2004].

Антиоксидантная система организма человека – сложная многоуровневая система, компонентами которой являются ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза и др.), хелаторы металлов с переходной валентностью (альбумин, ферритин, церулоплазмин) и низкомолекулярные антиоксиданты. Некоторые антиоксиданты являются эндогенными (мелатонин, аминокислоты, глутатион, некоторые витамины) и синтезируются в организме человека. Многие антиоксиданты поступают в организм извне (экзогенные) делятся на природные и синтетические, так называемые пищевые добавки и фармацевтические препараты [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Федин А.И., Румянцева С.А., 2002.]. Природные антиоксиданты в основном используются в профилактических целях. Наиболее изученный природный антиоксидант – альфа-токоферол (витамин Е), хотя его антиоксидантные свойства слабее других представителей класса. Убихинон и коэнзимы обладают более выраженным антирадикальным действием. Убихинон рекомендуют для нормализации обмена веществ, укрепления иммунной системы, профилактики преждевременного старения. Коэнзимы используются в комплексной терапии больных ишемической болезнью сердца, при инфаркте миокарда. Из синтетических антиоксидантов наиболее исследованы ионол, пробукол, статины, эмоксипин, мексидол, фенозан. Ионол обладает выраженной антиоксидантной активностью и применяется местно при ожогах, обморожениях, язвах, при лечении рака мочевого пузыря. Он хорошо всасывается с поверхности кожи, накапливается в богатых липидами тканях и определяется в очаге поражения в концентрациях, достаточных для проявления терапевтического эффекта [Филипенко П.С. и соавт., 2004]. Пробукол и статины применяют для снижения уровня холестерина. Доказано их противоишемическое действие [Du Y. et al., 2012]. Эмоксипин – ретинопротективное и антиоксидантное

средство, обладающее антигипоксической, ангиопротекторной, антиагрегационной активностью. Применяется в офтальмологической практике, а также рекомендован в комплексной терапии инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии, нарушениях мозгового кровообращения [Egorov E.A. et al., 1989; Shvedova A.A. et al., 1989; Shpak N.I. et al., 1989]. Мексидол – антиоксидант, церебропротектор, ноотроп, транквилизатор, адаптоген, нашел свое применение при нарушениях мозгового кровообращения, дисциркуляторной энцефалопатии, атеросклеротических нарушениях и, интоксикации нейролептиками, панкреатите, панкреонекрозе, перитоните, воздействии различных экстремальных факторов [Volchegorskiĭ I.A. et al., 2013; Savenkov A.A. et al., 2013; Egorov E.A., 2013].

Перспективными в настоящее время являются гибридные соединения, которые сочетают антиоксидантную активность с адресной доставкой и способностью к структурным взаимодействиям с биосистемой. К их числу относятся ИХФАНЫ [Perevozkina M.G. et al., 2005]. В их структуру включены два фрагмента, обеспечивающие антиоксидантную и антихолинэстеразную активность [Молочкина Е.М. и соавт., 1999]; кроме того, они имеют боковой алкильный заместитель с различным содержанием углеродных атомов в алифатической цепи, обуславливающий гидрофобные свойства производных этого ряда. Такие антиоксиданты содержат в своей структуре гидроксифенольный фрагмент и заряженную якорную группировку с липофильным заместителем – «поплавком». Наличие в гибридной молекуле положительно заряженного атома азота позволяет удерживать антиоксидант на поверхности клеточных мембран. Химический дизайн ИХФАНов, по мнению ряда авторов, позволяет рассматривать их в качестве перспективных препаратов для лечения болезни Альцгеймера [Molotchkina E.M. et al., 2002], также они обнаруживают широкий спектр биологической активности – антимикробную, противовирусную, анальгетическую и др. [Паршина Е.Ю., 2006].

Среди многочисленных классов антиоксидантных соединений одними из наиболее перспективных являются синтетические соединения на основе экранированных фенолов. Они могут обладать антиоксидантной и противовоспалительной активностью, а также иметь антигипертензивные, антиаллергические, кардиопротекторные или антимикробные свойства. Уже более ста лет известны в качестве противомикробных средств гидроксилсодержащие ароматические соединения с гидроксильной группой у бензольного ядра. С развитием каменноугольной промышленности ряд этих веществ под общим названием "фенолы" стал особенно легко доступным, количество его производных сейчас составляет несколько тысяч и продолжает интенсивно увеличиваться. Число известных фенольных соединений превышает 20000. В значительных количествах они встречаются во всех живых растительных организмах, составляя 1–2% биомассы и более и выполняя разнообразные биологические функции. Благодаря высокой эффективности антиокислительного действия при высокой термической стойкости, низкой токсичности и дешевизне синтетические замещенные фенолы занимают отдельную нишу среди различных по назначению и химической структуре антиоксидантов [Зенков Н.К. и соавт., 2003; Озерова И.Б., 2000].

Механизм действия фенольных антиоксидантов (ArOH) заключается во взаимодействии с гидроперекисными радикалами, при котором исчезновения свободной валентности не происходит, а осуществляется замена гидроперекисного радикала $\text{RO}_2\cdot$ на феноксильный $\text{ArO}\cdot$. Он стабилен и практически не участвует в реакциях продолжения цепей. Высокая стабильность фенольных радикалов обусловлена делокализацией электронной плотности неспаренного электрона: чем больше степень делокализации, тем стабильнее радикал. Способность фенольных антиоксидантов тормозить радикальные процессы окисления обеспечивается фенольной гидроксильной группой. Обобщенная система π -электронов ароматического кольца смещает отрицательный заряд на кислород, в

результате отрыв атома водорода от гидроксила становится достаточно легким и образуются разные формы феноксильного радикала [Зенков Н.К. и соавт., 2003].

Фенолы растительного происхождения – эффективные антиоксиданты, мощные радио- и гепатопротекторы, также известно, что алкилрезорцин и алкилпирокатехин проявляют ювенильногормональные и противоопухолевые свойства. Они способствуют уменьшению скорости перекисного окисления липидов и белков, а также обладают антигипоксической и гемореологической активностью [Зенков Н.К. и соавт., 2003; Семенов А.А., 2000]. Фенозан – антиоксидант из класса пространственно-затрудненных фенолов препятствует окислению липидов клеточных мембран и используется при эпилепсии и у больных с умственными отклонениями [Сердюк Н.Б., 2006]. Наибольшее распространение в мире получил бутилокситолуол или ионол [Ansar S., 2013]. Высокие ингибирующие свойства проявляет флавоноид дигидрокверцетин, однако этот класс фенольных ингибиторов на современном этапе пока еще остается малодоступным, поскольку для получения высокоэффективных реагентов требуется реализация многостадийных технологий по селективному разрыву эфирных связей для высвобождения фенольных гидроксильных групп [Ansar S., 2013; Ansar S. et al., 2013]. Антиоксидантные свойства фенолов зависят от количества гидроксильных групп, их положения и степени экранирования. Наибольшим разнообразием химических свойств и биологической активности отличаются фенольные соединения с двумя и более гидроксильными группами в бензольном ядре. Пространственно-затрудненные двухатомные фенолы гидрохинон, пирокатехин нашли наибольшее применение как антиокислители, обладающие высокой эффективностью, термической стабильностью, низкой токсичностью и дешевизной [Сорокина И.В. и соавт., 1997]. Эти классы фенольных соединений в физиологических условиях образуют буферную окислительно-восстановительную систему.

Результаты некоторых исследований уже подтвердили, что сочетание в молекуле функционально-замещенного фрагмента и пространственно-затрудненной фенольной группы может привести к созданию новых соединений, обладающих комплексом полезных свойств, в том числе проявляющих биологическую активность.

Фенольные соединения, содержащие в молекуле изопреноидный фрагмент, представляют интерес в плане изучения их биологической активности [Кузаков Е.В., Шмидт Э.Н., 2000]. Терпенофенолы являются важным и весьма распространенным в природе классом соединений. Введение терпенового заместителя в ароматическое ядро фенолов обычно осуществляется взаимодействием фенолов с терпеновыми углеводородами, спиртами или галоидпроизводными терпеноидов в присутствии катализаторов кислотного характера. По своему типу эти реакции являются разновидностями реакции Фриделя-Крафтса [Чукичева И.Ю., Кучин А.В., 2004].

В лаборатории лесохимии Института химии Коми НЦ УрО РАН был разработан метод, позволяющий селективно получать изоборнилфенолы из соответствующих фенолов и бициклического природного терпеноида камфена [Чукичева И.Ю. и соавт., 2003]. Среди низкотоксичных и высокоактивных антиоксидантов из группы терпенофенолов соединение 4-метил-2,6-диизоборнилфенол выбрано как наиболее активное, проявляющее выраженные антиоксидантные, и гемореологические свойства, превосходящие ионол [Плотников М.Б. и соавт., 2007; 2009]. Внутривенное введение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола крысам с ишемией головного мозга в дозе 100 мг/кг в течение 5 дней препятствует повышению содержания диеновых и триеновых конъюгатов и ограничивает нарастание оснований Шиффа в мозговой ткани. На основе 4-метил-2,6-диизоборнилфенола найдена новая лекарственная субстанция – диборнол, проявляющая антиоксидантную, эндотелийпротекторную, церебропротекторную активность на моделях патологических состояний:

неполной и тотальной ишемии головного мозга, СД и возраст-зависимых заболеваниях. Выраженность отдельных видов активности сопоставима или превосходит используемый в медицинской практике пентоксифиллин, который внесен в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств в РФ [Иванов И.С. и соавт., 2008; Плотников М.Б. и соавт., 2009].

В НИИ химии антиоксидантов НГПУ за последние годы на основе омега-(4-гидроксиарил)-галогеналканов был получен широкий спектр синтетических фенольных антиоксидантов, различающихся числом фенольных и серосодержащих фрагментов, степенью пространственного экранирования фенольной ОН-группы, длиной углеводородной цепи, разделяющей арильный и серосодержащий фрагменты, строением серосодержащего фрагмента [Пинко П.И. и соавт., 2002; Просенко А.Е. и соавт., 2003]. Наиболее эффективным антиоксидантом этой группы соединений оказался тиофан (бис-[3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропил]сульфид). Являясь и фенольным, и серосодержащим соединением, тиофан не только устраняет свободные радикалы, но и нейтрализует гидроперекиси [Просенко А.Е. и соавт., 2001]. Он малотоксичен и превосходит по антиоксидантной активности ионол, пробукол, а-токоферол, кверцетин и убихинон, что обусловлено синергическим сочетанием антирадикальной активности его фенольных фрагментов с противопероксидным действием сульфидной группы. Доказано, что тиофан вызывает нормализацию важнейших биохимических показателей крови, обладает гепатопротекторными, противоопухолевыми, иммуностимулирующими и антиатерогенными эффектами [Воевода Т.В. и соавт., 2000; Просенко А.Е. и соавт., 2001].

Таким образом, дальнейшее изучение препаратов на основе экранированных фенолов является перспективным направлением в профилактике и лечении различных заболеваний, сопровождающихся усилением свободнорадикальных процессов и нарушением микроциркуляции.

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ

Эксперименты проведены на 300 крысах: 220 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г, полученных из Вивария СибГМУ и вивария НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск); 20 половозрелых крысах-самцах аутбредной линии Вистар, и 60 крысах-самцах линии OXYS в возрасте 6 месяцев, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Работа соответствует положениям Федерального Закона «О защите животных от жестокого обращения», введенным в действие 01.01.1997 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе (мясокостная мука, злаки, овощи, мясной бульон). Материалом исследования явились хориоретинальные комплексы задней стенки глаз крыс. Взятие материала осуществляли после умерщвления крыс декапитацией под эфирным наркозом, проводили энуклеацию глазного яблока с пересечением наружных мышц глаза и зрительного нерва. После энуклеации из глазного яблока удаляли роговицу и хрусталик, далее заднюю стенку глаза разрезали на 4 части и помещали в 10% нейтральный формалин для световой микроскопии и в 2,5 % раствор глютаральдегида на какодилатном буфере для электронной микроскопии.

Были выбраны четыре различные экспериментальные модели дегенерации сетчатки (табл. 1):

1. Моделирование ретинопатии под влиянием высокоинтенсивного белого света. Контрольной группой животных (n=20) служили интактные крысы, которых содержали с экспериментальными животными в идентичных условиях вивария. Световой режим 12 ч – день, 12 ч – ночь, дневная освещенность – 25 лк.

Таблица 1.

Распределение животных по сериям эксперимента

№	Экспериментальные группы	Количество животных	Сроки взятия материала
1. Моделирование ретинопатии под влиянием высокоинтенсивного белого света			
1.1	Группа животных со световым воздействием	20	На 7 сут после освещения
1.2	Группа животных с освещением на фоне коррекции диборнолом	20	На 7 сут после освещения
1.3	Группа животных с освещением на фоне коррекции тиофаном	20	На 7 сут после освещения
1.4	Контрольная группа (интактные животные)	20	Соответственно экспериментальным
2. Моделирование диабетической ретинопатии (как осложнение экспериментального стрептозотоцинового диабета длительностью 2 месяца)			
2.1	Группа животных со стрептозотоциновым диабетом	20	Через 60 суток после введения стрептозотоцина
2.2	Группа животных со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом	20	Через 60 суток после введения стрептозотоцина
2.3	Группа животных со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции тиофаном	20	Через 60 суток после введения стрептозотоцина
2.4	Контрольная группа (интактные животные)	20	Соответственно экспериментальным
3. Возрастная хориоретинальная дегенерация с использованием биологической модели (крысы линии OXYS)			
3.1	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес	20	Через 45 суток после начала эксперимента
3.2	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес на фоне коррекции диборнолом	20	Через 45 суток после начала эксперимента
3.3	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес на фоне коррекции тиофаном	20	Через 45 суток после начала эксперимента
3.4	Контрольная группа (крысы породы Вистар в возрасте 6 мес)	20	Соответственно экспериментальным
4. Моделирование острой ишемической ретинопатии (как осложнение тотальной транзиторной ишемии головного мозга)			
4.1	Группа животных с тотальной транзиторной ишемией головного мозга	20	На 7 сутки после моделирования ишемии
4.2	Группа животных с тотальной транзиторной ишемией головного мозга на фоне коррекции диборнолом	20	На 7 сутки после моделирования ишемии
4.3	Контрольная группа (ложнооперированные животные)	20	Соответственно экспериментальным

Животных первой группы (n=20) помещали в специальную установку с вмонтированными люминесцентными лампами ЛБ-40 с максимумом облучения в желто-зеленой области спектра, освещая клетку с пяти сторон. Освещенность составила 6000 лк, длительность воздействия 6 часов. Перед

освещением проводили атропинизацию и дикаинизацию глаз животных. Через 7 суток после освещения крыс выводили из эксперимента.

Животным второй и третьей групп ежедневно в течение 14 суток перорально вводили диборнол (вторая группа, n=20) и тиофан (третья группа, n=20) в концентрации 100 мг/кг массы тела, растворенных в 1 мл 1% крахмальной слизи. Первое введение препарата осуществляли за 7 суток до освещения. Животные группы сравнения для чистоты эксперимента по аналогичной схеме получали эквивалентное количество крахмальной слизи. На 7-е сутки после первого введения препарата крыс освещали по приведенной выше схеме. Через 7 суток после освещения животных всех групп выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом.

2. Моделирование диабетической ретинопатии, как осложнения экспериментального стрептозотоцинового диабета длительностью 2 месяца. Крысам первых трех групп (n=60) вводили стрептозотацин в дозе 15 мг/100 г массы тела. Критерием тяжести заболевания служили концентрация глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены животных (>15 ммоль/л) на третьи сутки после введения стрептозотацина. Через 30 суток проводили повторное измерение глюкозы, после чего все животные были разделены на три группы – без введения препарата (n=20), на фоне коррекции диборнолом (n=20), на фоне коррекции тиофаном (n=20).

Второй группе животных на фоне стрептозотоцинового диабета начиная с 31 суток развития диабета, ежедневно перорально в течение 30 суток вводили диборнол в концентрации 100 мг/кг массы тела, растворенного в 1 мл крахмальной слизи (животные первой группы получали эквивалентное количество крахмальной слизи без препарата по аналогичной схеме).

Третьей группе животных на фоне стрептозотоцинового диабета начиная с 31 суток развития диабета, ежедневно перорально в течение 30 суток вводили тиофан в концентрации 100 мг/кг массы тела, растворенного в 1 мл крахмальной слизи.

Контрольной группой животных (n=20) служили интактные крысы, которых содержали с экспериментальными животными в идентичных условиях вивария.

Через 60 суток после введения стрептозотоцина животных всех групп выводили из эксперимента.

3. Возрастная хориоретинальная дегенерация с использованием биологической модели (крысы линии OXYS). Первая группа (n=20) – крысы линии OXYS в возрасте 6 месяцев, которые содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе в течение полутора месяцев. Световой режим 12 ч – день, 12 ч – ночь, дневная освещенность – 25 лк.

Животным второй (n=20) и третьей (n=20) групп ежедневно на протяжении 45 суток перорально вводили диборнол и тиофан в дозе 100 мг/кг массы тела каждый препарат, растворенных в 1 мл крахмальной слизи. Животные первой группы для чистоты эксперимента по аналогичной схеме получали эквивалентное количество крахмальной слизи.

Контрольной группой служили 20 животных породы Вистар в возрасте 6 месяцев.

Через 45 суток после начала эксперимента животных всех групп умерщвляли способом декапитации под эфирным наркозом.

4. Модель тотальной транзиторной ишемии головного мозга (ИГМ) по методу W.A. Pulsinelli [Pulsinelli W.A. et al., 1979]. Животных первой и второй группы (беспородные крысы-самцы массой 180-200 г, n=30) за сутки до ИГМ наркотизировали этаминалом-натрия в дозе 60 мг/кг массы тела и производили термокоагуляцию обеих вертебральных артерий на уровне первого шейного позвонка. ИГМ воспроизводили под эфирным наркозом путем пережатия общих сонных артерий течение 30 мин. Состоятельность модели оценивали по побледнению видимой части сосудистой оболочки глаза, расширению зрачков, развитию гипервентиляции. Реперфузию проводили снятием окклюдеров, после чего рану ушивали. Крысы первой группы (n=15) получали 1 мл 1% крахмальной

слизи, животные второй (опытной) группы (n=15) – получали внутривентрикулярно диборнол в дозе 100 мг/кг в 1 мл крахмальной слизи один раз в сутки в течение 7 дней. Первое введение осуществляли через 1 час после создания модели ишемии. Контрольной группой служили ложнооперированные животные (n=10), которых содержали в идентичных с экспериментальными условиях вивария.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. Световая микроскопия

Для исследования материала с помощью световой микроскопии заднюю стенку глаз течение 1 суток фиксировали в растворе 10 %-ного нейтрального забуференного формалина (pH 7,4-7,6), затем в течение нескольких часов отмывали в проточной воде, обезвоживали, уплотняли и заливали в парафин по стандартной методике. С помощью ротационного микротомы готовили отвесные срезы задней стенки глаз толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр и фотографирование полутонких срезов производили на микроскопе Carl Zeiss AxioStar plus. На полученных снимках при помощи программы Carl Zeiss AxioVision 8.0 при увеличении 10x100 производили подсчет удельной площади очагов поражения сетчатки крыс, подвергшихся тотальному высокоинтенсивному световому воздействию.

2.2.2. Иммуногистохимический анализ

Для проведения иммуногистохимического анализа материал фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном формалине (pH 7,4-7,6) в течение 24 ч при комнатной температуре, затем заливали в парафин по стандартной методике [Эллиниди В.Н. и соавт., 2002]. После приготовления серийных срезов толщиной 4-6 мкм, проводили иммуногистохимическое окрашивание, для чего на депарафинированные срезы наносили блокирующую сыворотку (Horse Serum, Novocastra, Великобритания), инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и промывали в двух сменах дистиллированной воды, затем в трис-буфере (pH 7,2). Далее на

срезы раскапывали первичные антитела, инкубацию с которыми проводили в течение ночи при +4°C. После этого срезы промывали в двух порциях буферного раствора и наносили вторичные антитела (Biotinylated Uuniversal Secondary-RTU, Novocastra, Великобритания). Затем, после инкубации в течение 30 мин при +25°C снова промывали в двух порциях буферного раствора. Для выявления окрашивания на срезы наносили водный раствор хромогена (AEC Chromogen/Substrate Kit, Novus Biologicals, США), через 10 мин инкубации при +25°C промывали в двух порциях водопроводной воды и докрашивали гематоксилином Майера. Иммуногистохимическую реакцию оценивали как положительную при выявлении красновато-коричневого окрашивания в цитоплазме или на мембране изучаемых клеток.

Для иммуногистохимического окрашивания срезов использовали кроличьи поликлональные антитела (Novus Biologicals, США) в следующем рабочем разведении: Caspase-3 – 1:100, окрашивание цитоплазматическое/ядерное; Caspase-9 – 1:500, окрашивание мембранное; Bcl-2 – 1:100, окрашивание мембранное/цитоплазматическое; P53 DINP1 – 1:100, окрашивание цитоплазматическое/мембранное; PEDF – 1:200, окрашивание цитоплазматическое; VEGF – 1:50, окрашивание мембранное, цитоплазматическое, внеклеточного матрикса.

2.2.3. Электронно-микроскопическое исследование

Для проведения ультраструктурного анализа заднюю стенку глаз крыс всех экспериментальных групп в течение 2 часов фиксировали в растворе 2,5% глютаральдегида, приготовленном на основе 0,2 М какодилатного буфера (pH 7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия на холоде в течение 3 часов, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, ацетоне и заливали в смесь смол – эпон-аралдит.

На ультратоме LKB-4 (Швеция) готовили отвесные полутонкие срезы задней стенки глаз в области центральных отделов сетчатки, окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего. Просмотр и фотографирование полутонких срезов производили на микроскопе Carl Zeiss AxioStar plus. На

полученных снимках при помощи программы Carl Zeiss AxioVision 8.0 при увеличении 10x100. На срезах определяли удельную площадь слоя пигментоцитов и сосудов хориоидеи (открытых, а также со сладжем, стазом эритроцитов и тромбозом), количество слоев и численную плотность ядер нейросенсорных клеток в наружном ядерном слое в окулярной рамке на площади 1 мм² с 5 срезов каждой сетчатки. Производили подсчет нейросенсорных клеток с пикнозом ядра на 1000 фоторецепторов с каждой сетчатки, пикноморфных радиальных глиоцитов, горизонтальных, амакринных, биполярных нейронов внутреннего ядерного слоя, пикноморфных ганглионарных нейронов и ганглионарных нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом на 200 соответствующих клеток с каждой сетчатки, глионейрональный индекс – отношение числа радиальных глиоцитов к ассоциативным нейронам.

Ультратонкие серебристые и бледно-золотистые срезы помещали на медные сетки. Осмированные препараты докрашивали уранилацетатом и цитратом свинца [Reynolds E.S., 1963], изучали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A. На ультратонких срезах производили подсчет удельной площади митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети (гранулярной ЭПС) и комплекса Гольджи (КГ) в биполярных и ганглионарных нейронах при увеличении 30000 на 100 клеток каждой сетчатки при помощи сетки Автандилова.

Для количественного изучения синаптического пула на этапе дегидратации без предварительного осмирования, задние стенки глаз в течение 3-х часов контрастировали в 5% растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК). ФВК, взаимодействуя с белками, способна “окрашивать” активную зону пресинаптической мембраны, постсинаптическую мембрану и субсинаптические компоненты. Это позволяет проводить количественное исследование синаптической популяции [Боголепов Н.Н., 1976].

Для оценки изменений синаптоархитектоники фотографировали по 15 случайно выбранных полей зрения внутреннего сетчатого слоя с 5 срезов

каждой сетчатки при стандартном увеличении 8500. При конечном увеличении 30000, полученном с помощью фотоувеличения, определяли количество межнейронных контактов (площадь поля зрения – 50 мкм²) и высчитывали численную плотность синапсов на 100 мкм² нейропиля.

Выявленные ФВК-позитивные контакты в зависимости от плоскости среза подразделяли на ряд категорий. Анализировали только те контакты, в которых четко были видны все элементы субсинаптических единиц (ССЕ): электронноплотный материал пресинаптической зоны, синаптической щели и постсинаптической части. В плоскость среза контактов неопределенного вида попадала только часть ССЕ. Подсчитывали количество определенных контактов с асимметричной и симметричной организацией ССЕ. Для асимметричных контактов характерно дискретное расположение ФВК-позитивного материала пресинаптической зоны в виде плотных проекций (ПП) пресинаптической решетки, а в симметричных контактах электронно-плотный материал пресинаптической зоны не организован в отдельные филаментозные образования.

Асимметричные контакты, в свою очередь, по степени выраженности ПП дифференцировали на типы: А, В, С [Семченко В.В. и соавт., 1995]. В контактах типа А высота ПП пресинаптической решетки, представляющих материал пресинаптической зоны, была больше 60 нм, в контактах типа В соответствовала 50-60 нм, а контактах типа С – меньше 50 нм. Длину активной зоны контакта (АЗК), которая на ФВК-контрастированном материале соответствовала всему синаптическому профилю, определяли с помощью тестовой решетки с шагом 3 мкм. По протяженности АЗК все контакты делили на очень мелкие (<100 нм), мелкие (100-200 нм), малые (200-300 нм), средние (300-500 нм), крупные (500-700 нм) и очень крупные (>700 нм).

2.2.4. Метод исследования свободнорадикального окисления

Свободно-радикальные процессы в гомогенате сетчатки и их антиоксидантную активность определяли методом люминолзависимой

хемилюминесценции. Исследования проводились на хемилюминометре Lumat LB9507 (торговая марка Berthold Technologies), работающем в режиме счета фотонов. Величину хемилюминесценции выражали в относительных единицах света (RLU).

Хемилюминесценцию проводили в следующей последовательности: в кювету хемилюминометра наливали 2 мл дистиллированной воды, добавляли 100 мкл гомогената сетчатки, тщательно перемешивали и затем, непосредственно, перед регистрацией свечения пробы в кювету добавляли 250 мкл 0,01Н раствора люминола в фосфатном буфере. Хемилюминесценцию гомогената сетчатки регистрировали в течение двух минут. Количественную величину свободно-радикальной активности гомогената сетчатки вычисляли по формуле: $ХЛ = J \cdot n/t$, где J – количество регистрируемых единиц RLU, n – разведение пробы в кювете хемилюминометра, t – время экспозиции, и выражали в (RLU*мл)/сек.

Антиоксидантную активность гомогената сетчатки определяли методом ингибирования пробой люминолзависимой хемилюминесценции в присутствии ионов металлов переменной валентности и перекиси водорода. Измерения проводили в следующей последовательности: в две кюветы хемилюминометра наливали реагирующую смесь, в состав которой входили – 2,5 мл дистиллированной воды, 50 мкл 0,05М раствора сернокислого железа, 50 мкл 0,01Н раствора люминола в фосфатном буфере и 25 мкл перекиси водорода. Затем кюветы помещали в блок измерения прибора и регистрировали уровень свечения обоих стандартных растворов. Далее в первую кювету (контроль) добавляли 10 мкл дистиллированной воды, а во вторую – 10 мкл гомогената сетчатки. Уровень свечения контрольной и опытной пробы регистрировали в течение 5 минут. Показатели свечения снимали в течение первых пяти минут через каждую минуту. Количественную величину антиоксидантной активности гомогената сетчатки вычисляли по формуле: $АОА = (J^0 - J) \cdot n/t$, где J^0 – количество регистрируемых единиц RLU контрольной пробы, J – количество регистрируемых единиц

RLU опытной пробы, n – разведение пробы в кювете хемилуминометра, t – время экспозиции, и выражали в (RLU/мл)/сек.

2.2.5. Методы оценки гемореологических показателей

Исследование гемореологических показателей крови животных проводилось на базе лаборатории фармакологии кровообращения ФГБУ “НИИ фармакологии” СО РАМН совместно с к.м.н. В.И. Смольяковой и к.м.н. И.С. Ивановым. Была оценена вязкость цельной крови и плазмы, гематокрит, спонтанная агрегация эритроцитов и их деформируемость.

Вязкость цельной крови (η) оценивали на ротационном вискозиметре АКР-2 в диапазоне скоростей сдвига от 3 до 300 с^{-1} , плазмы - 300 с^{-1} [Парфенов А.С. и соавт., 1994].

Гематокрит определяли центрифугированием и выражали в % [Балуда В.П. и соавт., 1980].

Эффективность доставки кислорода в ткани (коэффициент Штольца) оценивали по величине отношения гематокрита к вязкости крови (Ht/η) [Stoltz J.E., 1982].

Спонтанную агрегацию эритроцитов исследовали с помощью метода силлектометрии. Критерием агрегационной активности эритроцитов служил полупериод агрегации $T_{1/2}$ — время (с), за которое величина фотометрического сигнала снижается в два раза [Плотников М.Б. и соавт., 1995].

Деформируемость эритроцитов оценивали методом лазерной дифрактометрии (эктацитометрии). Способность эритроцитов к деформации выражали в виде индекса, который рассчитывали как отношение $(L-N)/(L+N)$, где L и N - соответственно больший и меньший диаметры первого дифракционного максимума [Evans E., Mohandas N., 1986].

2.2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы STATISTICA 6.0 методами вариационной статистики. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин

использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Корреляционную связь – прямую (положительное значение критерия) и обратную (отрицательное значение критерия) – определяли при помощи ранговой корреляции Спирмена. Тесноту связи оценивали как слабую при коэффициенте корреляции (r) от 0,10 до 0,50, умеренную – при r от 0,51 до 0,70 и сильную – при r более 0,71. Различия считались достоверными при $p < 0,05$ [Автандилов Г.Г. и др., 1990].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. ИЗМЕНЕНИЯ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ОСВЕЩЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ 6000 ЛК НА ФОНЕ КОРРЕКЦИИ ТИОФАНОМ И ДИБОРНОЛОМ

На 7-е сутки после светового воздействия изменения сетчатки носят очаговый характер со значительной деструкцией пигментоцитов (ПЦ) и нейросенсорных клеток (НК) в очагах поражения (рис. 1).

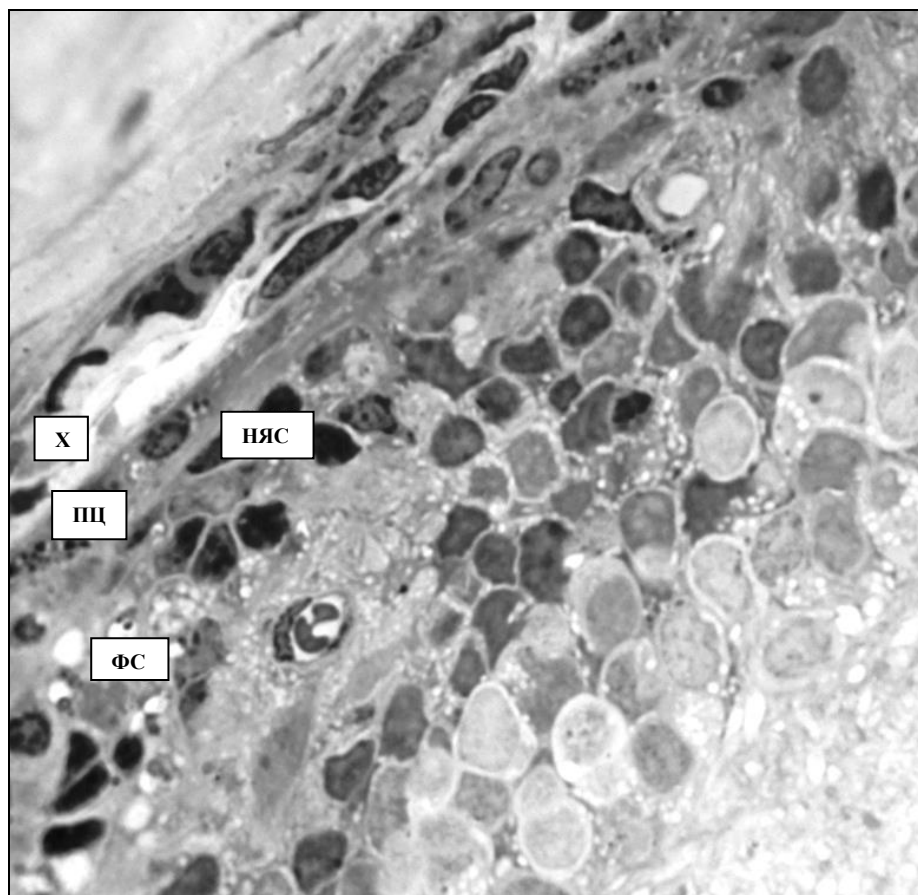


Рис. 1. Изменение хориоретинального комплекса белых крыс через 7 суток после высокоинтенсивного освещения в очаге поражения. НЯС – наружный ядерный слой. ПЦ – пигментоциты; ФС – фотосенсорный слой; Х – хориоидея. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Такой мозаичный характер повреждения при высокоинтенсивном световом воздействии, возможно, связан, с изначально различной функциональной активностью сосудов микроциркуляторного русла и

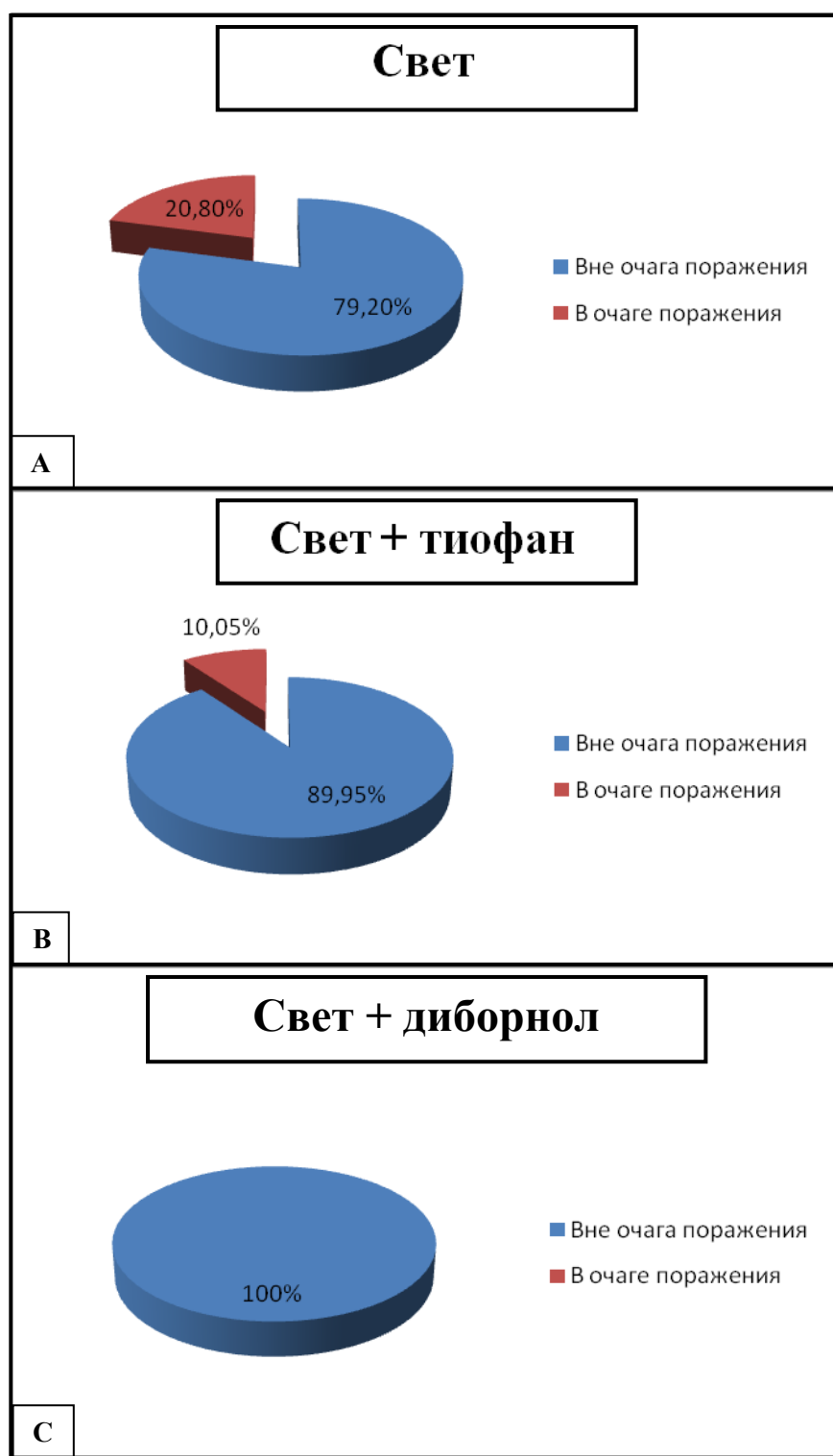


Рис. 2. Удельная площадь очагов поражения сетчатки животных при световом воздействии (А), освещении на фоне коррекции тиофаном (В), освещении на фоне коррекции диборнолом (С).

ПЦ сетчатки. В группе со световым воздействием удельная площадь очагов повреждения достигает $20,8 \pm 1,12\%$. Курсовое введение тиофана уменьшает деструкцию, вызванную высокоинтенсивным светом, что выражается в снижении удельной площади очагов до $10,05 \pm 0,32\%$ ($p < 0,05$). Применение

диборнола препятствует развитию очагов поражения (рис. 2). В очагах повреждения групп без использования антиоксидантной терапии и с курсовым введением тиофана большинство ПЦ уменьшаются в размерах, уплощаются. Ядра таких клеток уплотнены, хроматин конденсирован, цитоплазма резко вакуолизирована, апикальные микроворсинки подвергаются деструкции, исчезает базальная исчерченность. К ним вплотную приближаются ядра НК (рис. 3, 4).

Вне очагов поражения сетчаток глаз всех исследуемых групп происходит активация фагоцитарной активности ПЦ, что на светооптическом уровне выражается повышением количества фагосом – интенсивно окрашенных базофильных гранул различной величины (рис. 5). При ультрамикроскопическом исследовании наблюдается гипертрофия апикальных микроворсинок и усиление процессов фагоцитоза (рис. 6).

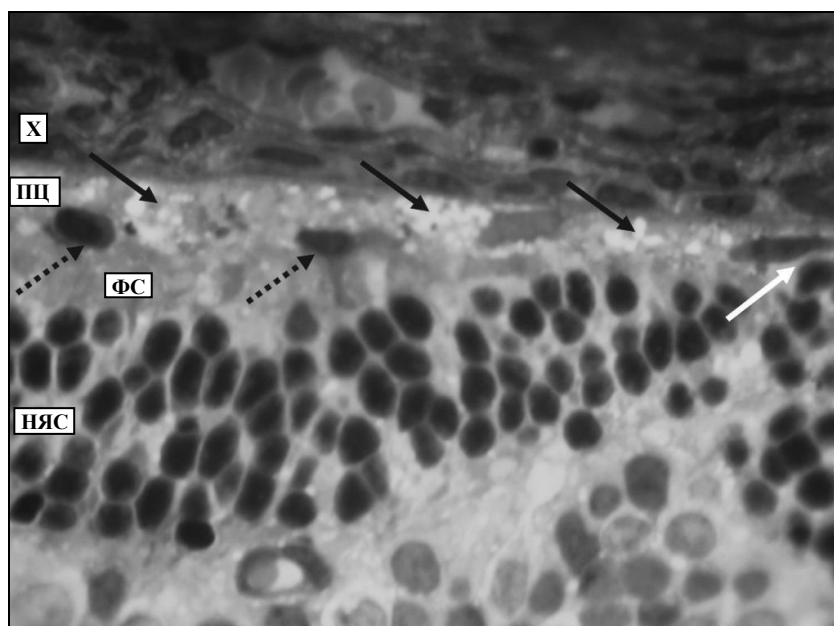


Рис. 3. Слой пигментцитов и наружный ядерный слой сетчатки белых крыс через 7 суток после освещения в очаге поражения. Пигментциты вакуолизированы (черные стрелки), контакт пигментцита с ядром нейросенсорной клетки (белая стрелка). Пикноз ядер пигментцитов (пунктирные стрелки). НЯС – наружный ядерный слой. НЯС – Наружный ядерный слой. ПЦ – слой пигментцитов. ФС – фотосенсорный слой. X – хориоидея. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

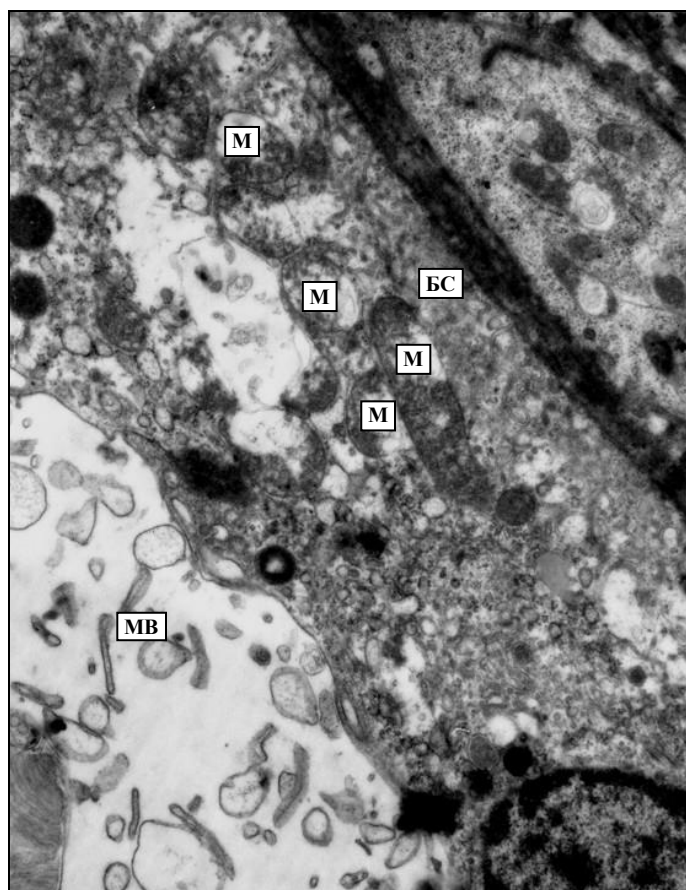


Рис. 4. Пигментоцит сетчатки белой беспородной крысы на 7 сутки после высокоинтенсивного светового воздействия в очаге поражения. Деструкция митохондрий (М), микроворсинок (МВ), исчезновение базальной складчатости (БС). Электронограмма. Ув. 3500

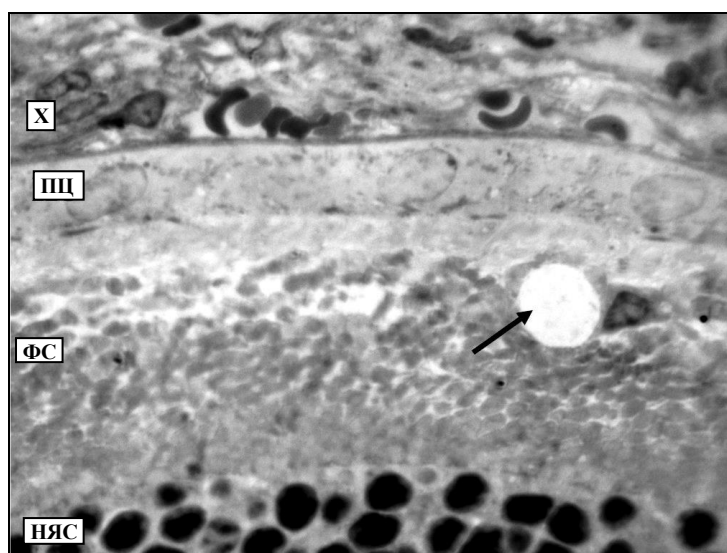


Рис. 5. Гипертрофия пигментоцитов сетчатки крыс на 7 сутки после освещения на фоне коррекции тиофаном вне очага поражения. НЯС – наружный ядерный слой; ПЦ – пигментоциты; фагосома – стрелка; ФС – фотосенсорный слой; Х – хориоидея. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

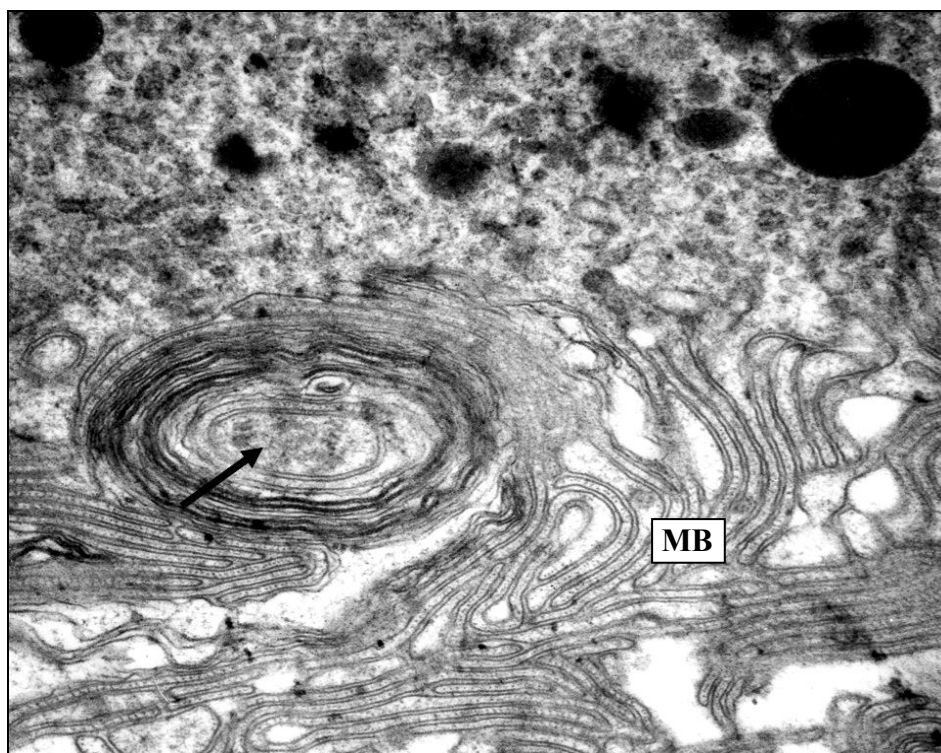


Рис. 6. Гипертрофия апикальных микроворсинок (MB) пигментоцита сетчатки белых беспородных крыс на 7 сутки после высокоинтенсивного светового воздействия на фоне коррекции диборнолом. Фагоцитоз фрагмента погибшей клетки (стрелка). Ув. 6000

Количественно на 7 сутки после высокоинтенсивного светового воздействия в срезе сетчатки наблюдается значимое снижение удельной площади слоя ПЦ в 2,6 раза в очагах и в 1,5 раза вне очагов поражения относительно значений аналогичного показателя контрольной группы ($p < 0,05$; табл. 2).

Таблица 2.

Количественный анализ слоя пигментоцитов сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному освещению, на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

Серии эксперимента	Удельная площадь слоя пигментоцитов сетчатки (%)	
	очаг	вне очага
Контроль	-	5,43±0,10
Свет	2,09±0,25*	3,55±0,25*
Свет-диборнол	-	3,71±0,19*
Свет-тиофан	2,75±0,33*	4,04±0,29

Примечание (здесь и далее по тексту): * - уровень статистической значимости различий ($p < 0,05$) при сравнении с показателями у крыс контрольной группы; + - уровень статистической значимости различий ($p < 0,05$) при сравнении с показателями у крыс группы без коррекции; # - уровень статистической значимости различий ($p < 0,05$) при сравнении между группами животных с коррекцией тиофаном и диборнолом.

В группе с коррекцией тиофаном количественные изменения удельной площади слоя ПЦ в очагах поражения относительно всей площади сетчатки в срезе аналогичны наблюдаемым в группе сравнения, однако вне очагов поражения значения исследуемого показателя достоверно не отличаются от такового в контрольной группе. Применение диборнола ограничивает грубые дегенеративные изменения ПЦ, однако количественно значимого изменения показателя удельной площади слоя ПЦ в срезе сетчатки относительно аналогичного показателя интактных животных не наблюдается (табл. 2).

Таким образом, изменения ПЦ при световом воздействии, а также при использовании тиофана, в качестве предполагаемого протектора повреждений сетчатки, носят очаговый характер. В очагах обеих групп пигментные клетки сетчатки подвергаются выраженным деструктивным изменениям. Использование диборнола, вероятно, повышает адаптацию сетчатки к высокоинтенсивному световому воздействию, препятствуя развитию очагов поражения, увеличивая функциональную активность ПЦ.

Наряду с ПЦ сетчатки, неотъемлемым звеном гематоретинального барьера, защищающего от повреждения нижележащие слои сетчатки, являются эндотелий хориокапилляров и мембрана Бруха. После светового воздействия просвет большинства сосудов хориоидеи во всех исследуемых группах сужен, причем одни из них не имеют форменных элементов, в других наблюдаются явления стаза, сладжа форменных элементов (рис. 7) и тромбоза (рис. 8). Ядра эндотелиоцитов и перицитов зачастую резко базофильны (рис. 9). При исследовании ультраструктуры выявляется неравномерное утолщение и расслоение базальной мембраны эндотелиоцитов, низкая электронная плотность цитоплазмы, вакуолизация и дегенерация митохондрий (рис. 10). Базальный комплекс сетчатки всех экспериментальных групп в местах значительного повреждения слоя пигментоцитов утолщен (рис. 11), местами разволокнен до потери

целостности. В этих областях отмечается миграция мононуклеарных фагоцитов в очаг поражения (рис. 12).

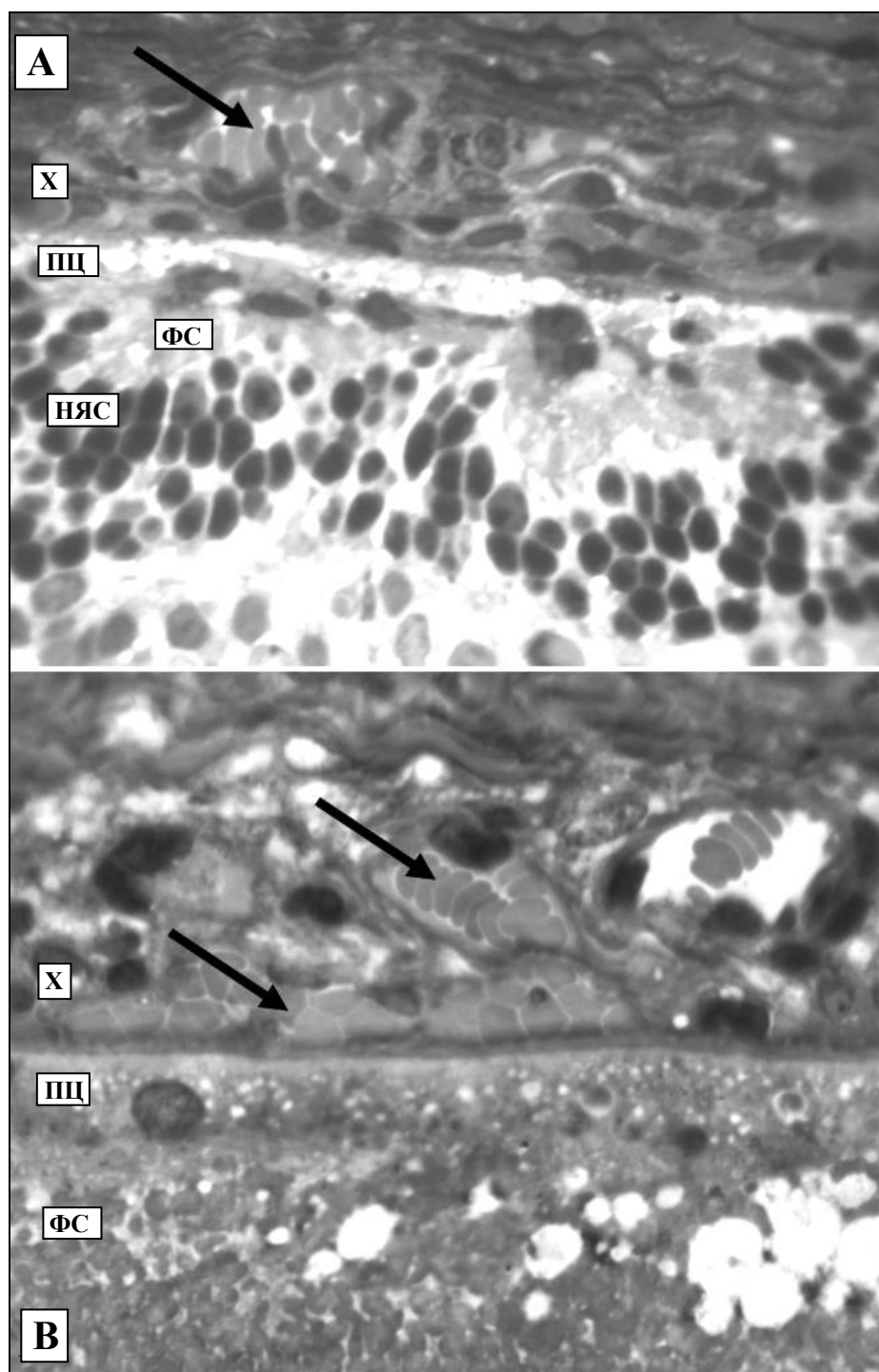


Рис. 7. Стаз форменных элементов (стрелка) в капиллярах хориоидеи сетчатки после высокоинтенсивного освещения в очаге поражения (А) и вне очага поражения (В). НЯС – наружный ядерный слой; ПЦ – пигментциты; ФС – фотосенсорный слой; Х – хориоидея. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

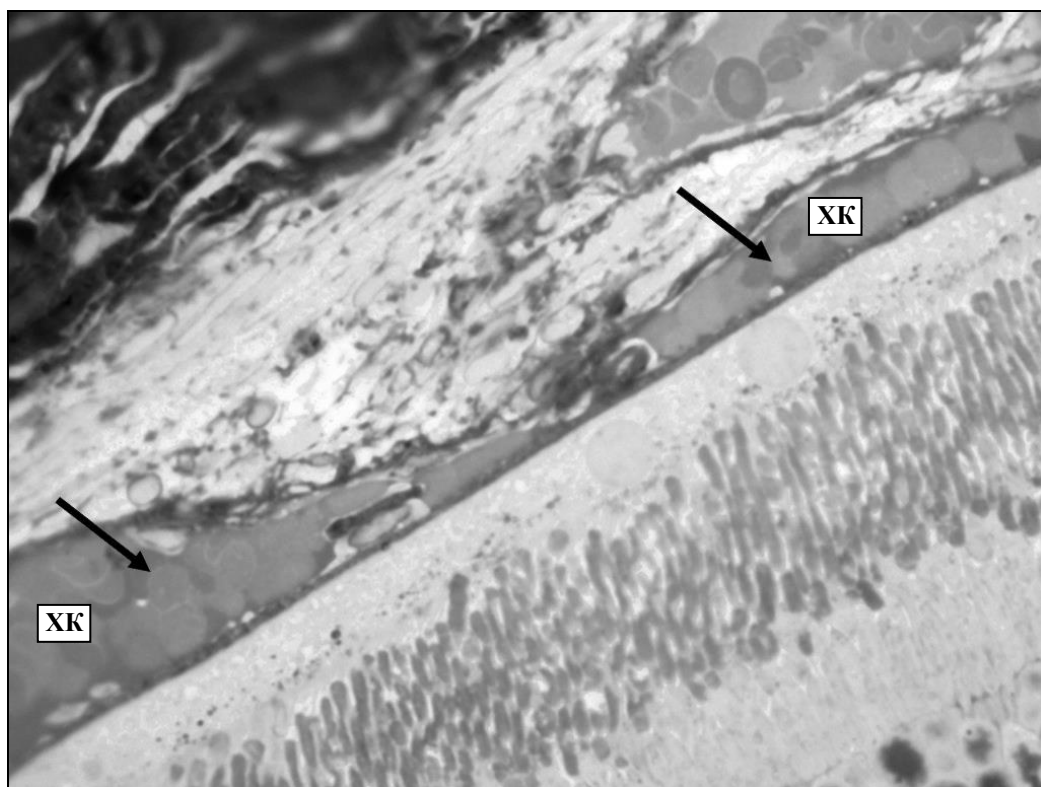


Рис. 8. Тромбоз хориокапилляров (ХК) после высокоинтенсивного освещения вне очага поражения. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900

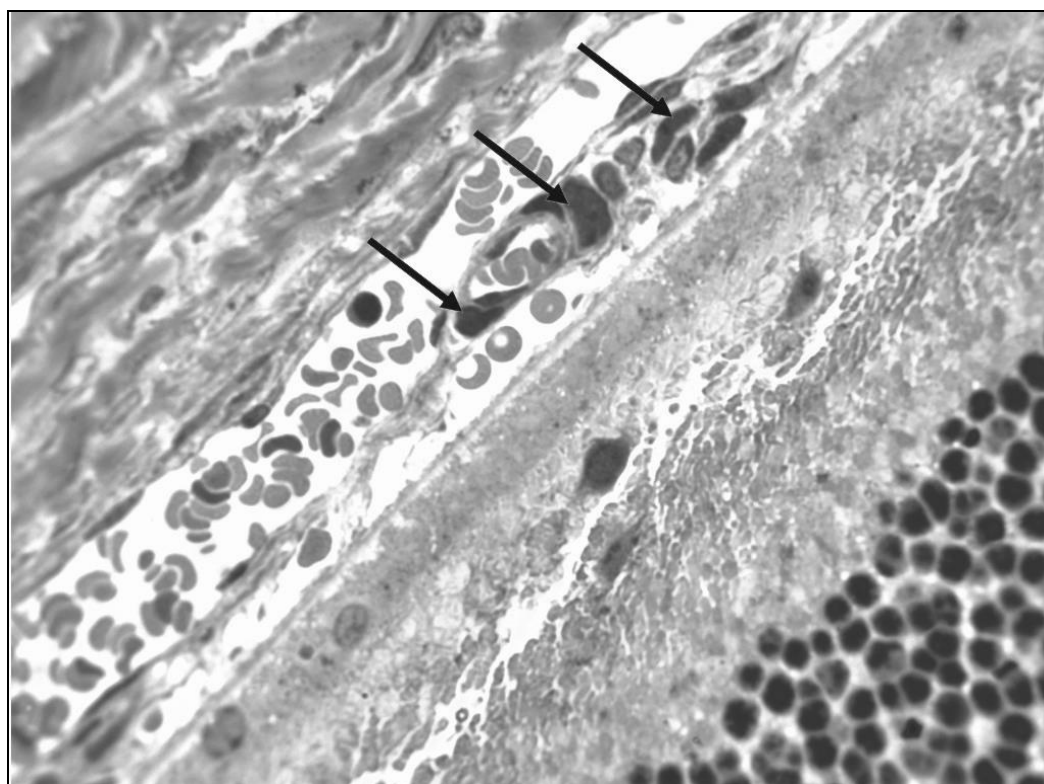


Рис. 9. Расширение хориокапилляров в хориоиде белых беспородных крыс после высокоинтенсивного освещения вне очага поражения. Резкая базофилия эндотелиоцитов и перицитов стенок сосудов (стрелки). Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900

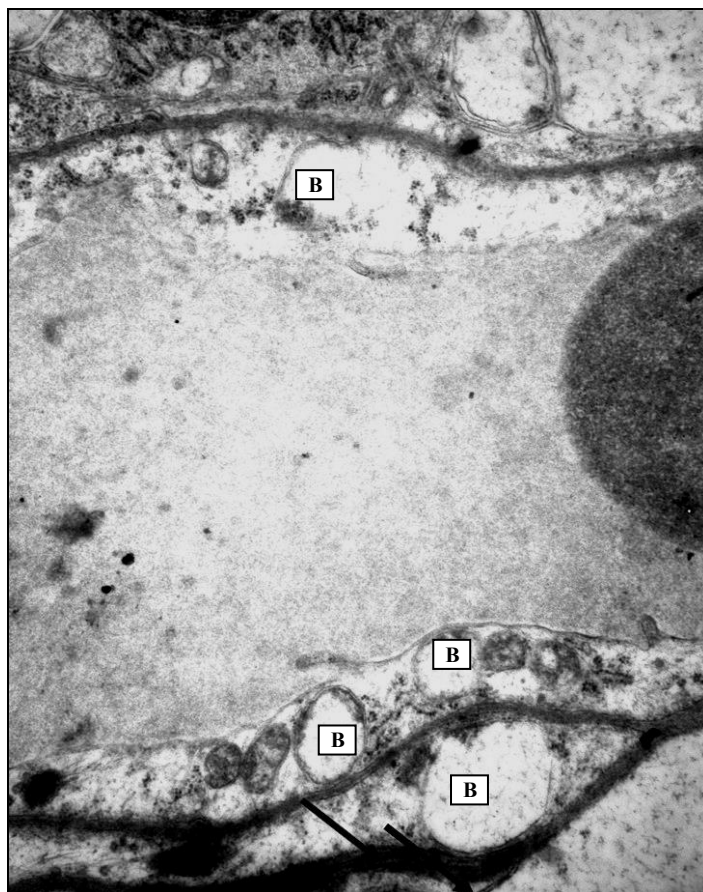


Рис. 10. Капилляр в хориоиде белых беспородных крыс после высокоинтенсивного освещения вне очага поражения. Расслоение базальной мембраны эндотелиоцитов (стрелки), низкая электронная плотность и вакуолизация (В) цитоплазмы, дегенерация митохондрий. Электронограмма. Ув. 3000

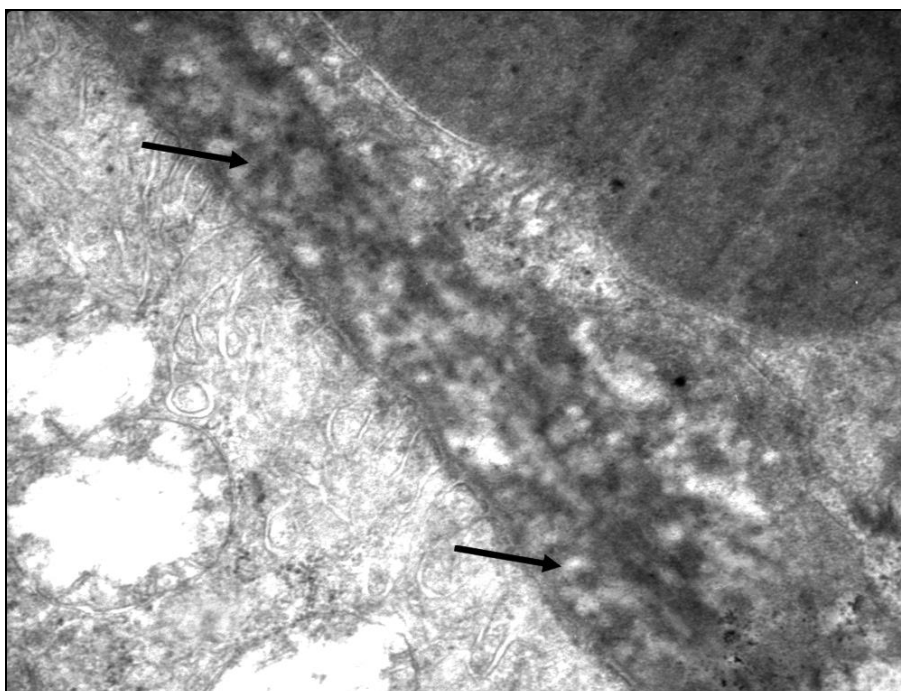


Рис. 11. Деструкция наружного гематоретинального барьера сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия. Утолщение мембраны Бруха (стрелка). Ув. 4000

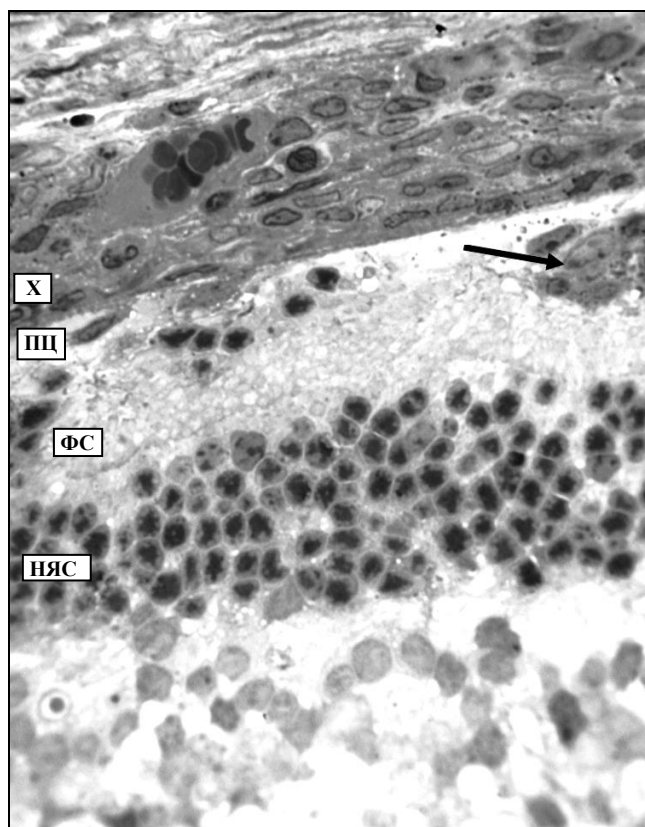


Рис. 12. Сетчатка белых крыс через 7 суток после высокоинтенсивного освещения в очаге поражения. Миграция мононуклеарных фагоцитов в фотосенсорный слой в месте поражения наружного гематоретинального барьера (стрелка). НЯС – наружный ядерный слой. ПЦ – пигментциты. ФС – фотосенсорный слой. Х – хориоидея. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Дегенеративные изменения наружного гематоретинального барьера белых беспородных крыс после высокоинтенсивного светового воздействия протекают на фоне выраженного нарушения гемодинамики в сосудах хориоидеи. По данным количественного анализа в группе животных, подвергшихся освещению, наблюдается снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов хориоидеи в 5,4 раза в очагах и 3,3 раза вне очагов поражения ($p < 0,05$). Эти изменения происходят на фоне значимого увеличения удельной площади хориоидальных сосудов со стазом, сладжем или тромбозом в 7,2 раза в очагах поражения и в 2 раза вне очагов поражения ($p < 0,05$, табл. 3).

Применение тиофана и диборнола оказывает существенное влияние на состояние гемодинамики у крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию. Вне очагов поражения в обеих исследуемых группах отмечается повышение сохранности открытых функционирующих сосудов

относительно опытной группы на 65% ($p < 0,05$). Ограничение образования сосудов со сладжем, стазом форменных элементов или тромбозом на 27% относительно группы со световым воздействием наблюдается только на фоне терапии диборнолом. В очагах поражения группы с коррекцией тиофаном значимых изменений исследуемых показателей не выявлено (табл. 3).

У крыс спустя 7 суток после тотального высокоинтенсивного освещения отмечают лишь некоторые сдвиги микрореологических параметров крови: увеличивается вязкость крови на низкой скорости сдвига (3с^{-1}) на 33% и снижается полупериод клеточной агрегации на 25% по сравнению с аналогичными показателями интактного контроля ($p < 0,05$, табл. 4). Повышение вязкости крови контроля на низкой скорости сдвига при неизменном уровне гематокрита, приводит к достоверному снижению индекса Штольца на 56% ($p < 0,05$, табл. 4). Диборнол и тиофан не оказывают выраженных системных гемореологических эффектов (табл. 4).

Высокоинтенсивное световое воздействие напрямую и опосредовано через изменение структуры наружного гематоретинального барьера, ПЦ, а также нарушения в системе микроциркуляции способствует развитию дегенеративных изменений НК – световоспринимающего звена трехнейронной цепи сетчатки. Эти изменения также носят очаговый характер. Очаги деструкции НК совпадают по локализации с очагами поражения в слое ПЦ сетчатки. Наружные сегменты НК подвергаются фрагментации и вакуольной дегенерации (рис. 13). Внутренние сегменты изменяются по светлому или темному типу (рис. 14). Встречаются места с массовой гибелью фоторецепторов и ПЦ, фотосенсорный слой полностью отсутствует, наружный ядерный слой (НЯС) вплотную приближен к базальному комплексу (рис. 15).



Рис. 13. Субретинальное пространство в очаге поражения после высокоинтенсивного светового воздействия. Фрагментация и вакуолярная дегенерация наружного сегмента нейросенсорных клеток (стрелка), светлый тип деструкции внутреннего сегмента (ВС) – отек, вакуолизация, деструкция крист митохондрий, растворение гранулярной ЭПС. Ув. 8000

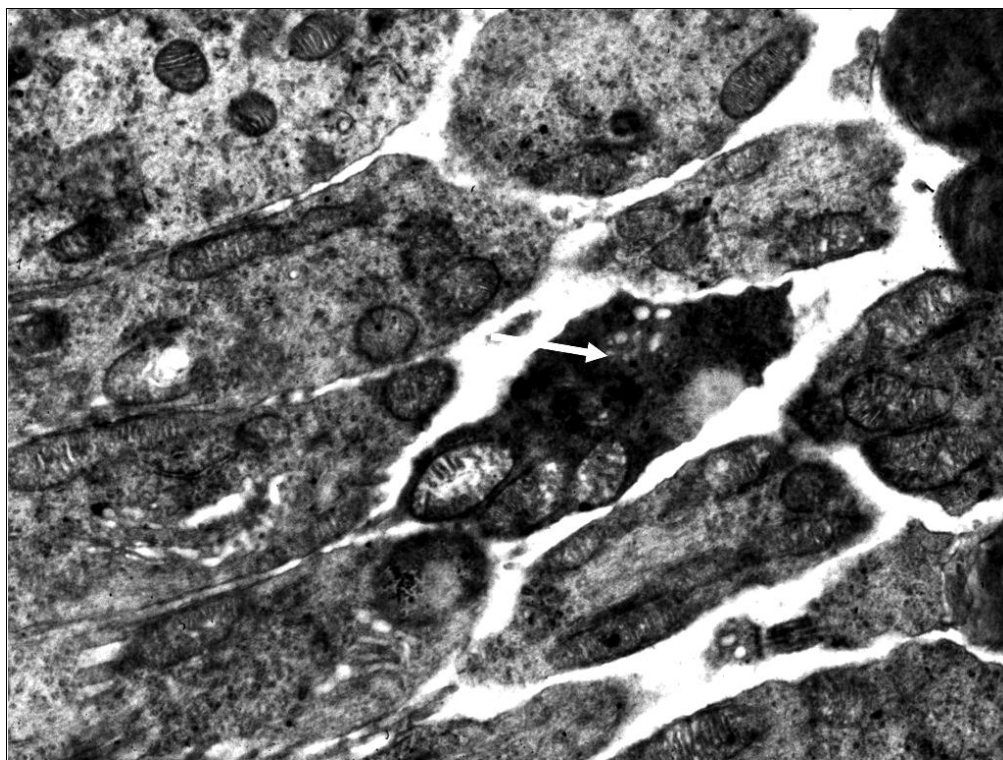


Рис. 14. Внутренние сегменты нейросенсорных клеток сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия в очаге поражения. Деструкция по темному типу (стрелка). Ув. 7200

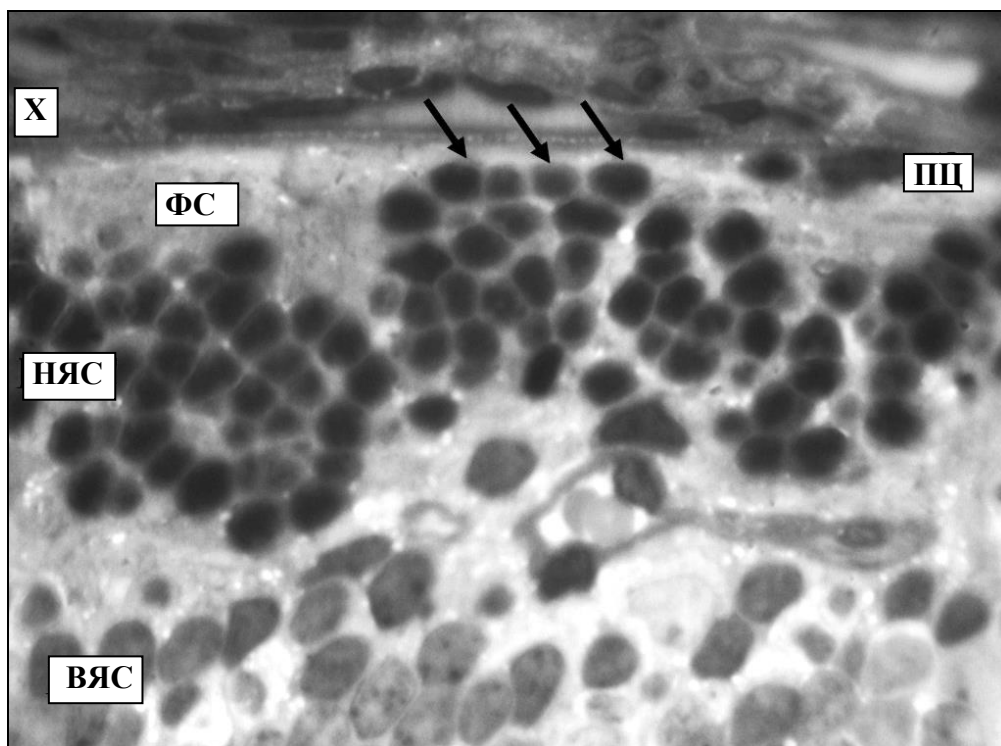


Рис. 15. Деструкция пигментоцитов и фотосенсорного слоя. Контакт ядер нейросенсорных клеток с базальным комплексом в сетчатке крыс после светового в очаге поражения (стрелки). ВЯС – внутренний ядерный слой; НЯС – наружный ядерный слой; ПЦ – пигментоциты; ФС – фотосенсорный слой. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900

Вне очагов поражения во всех экспериментальных группах изменения фотосенсорного слоя менее значительны. Большинство наружных и внутренних сегментов имеет нормальное строение, однако встречаются участки с фрагментацией, расслоением мембранных дисков наружных сегментов и деструкцией митохондрий внутренних сегментов нейросенсорных клеток.

Изменения ядросодержащей части НК как в группе без коррекции, так и в группах с антиоксидантной терапией носят схожий характер. Перикарионы НК различного размера, у некоторых клеток наблюдается деформация ядер, увеличивается содержание пикнотичных ядер НК, характеризующихся повышением осмиофилии ядра и цитоплазмы (рис. 16, 17).

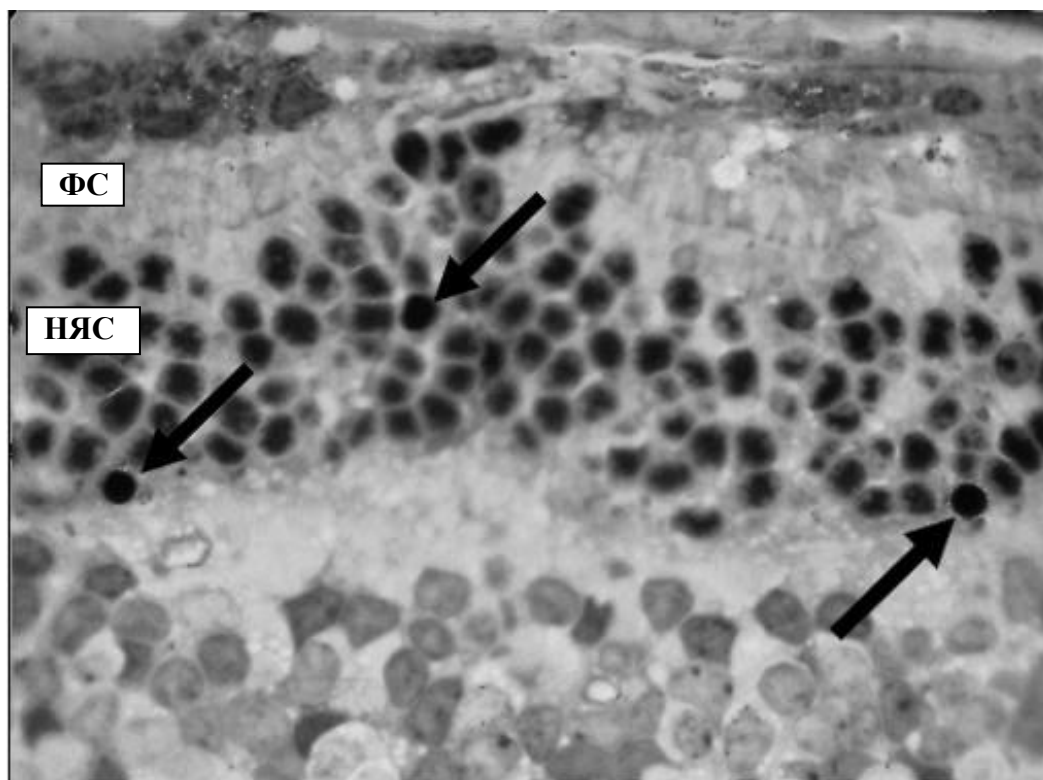


Рис. 16. Пикноз ядер нейросенсорных клеток (стрелки) в наружном ядерном слое сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового облучения на фоне коррекции тиофаном в очаге поражения. НЯС – наружный ядерный слой; ФС – фотосенсорный слой. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

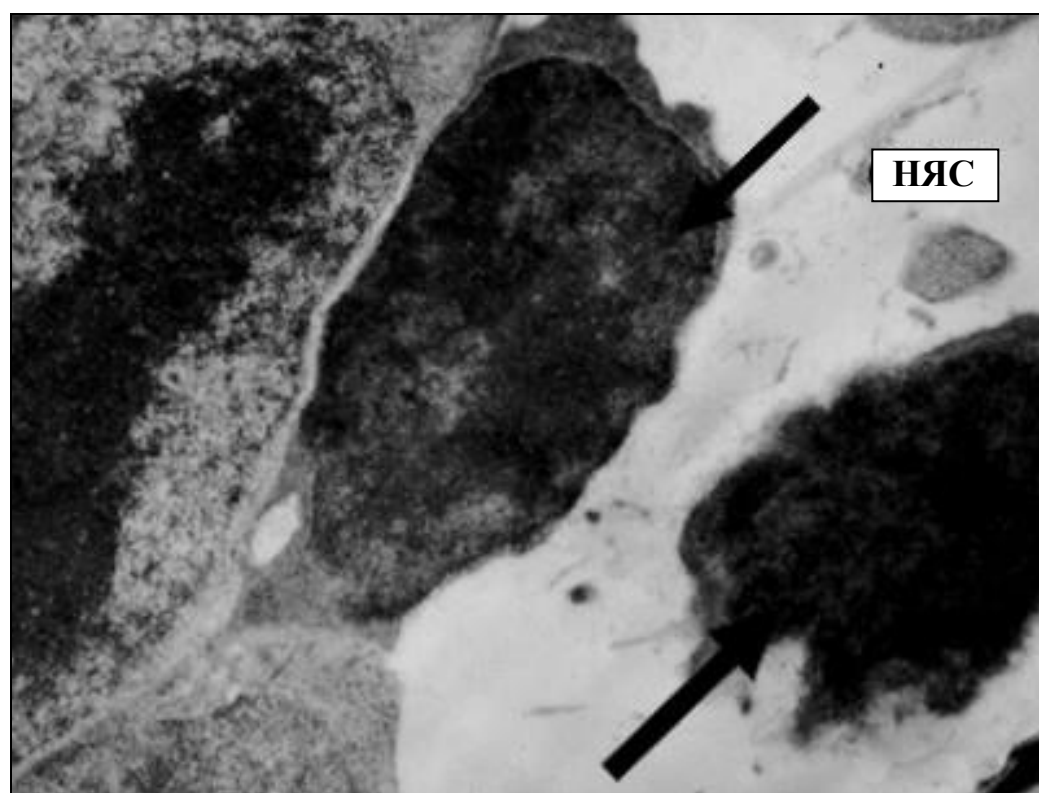


Рис. 17. Пикноз ядер нейросенсорных клеток (стрелки) в наружном ядерном слое сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового облучения в очаге поражения. Проплиферация и отек склеральных отростков радиальной глии (ОРГ). Электронограмма. Ув. 6000

Количественный анализ показал, что в очагах поражения всех групп НЯС состоит преимущественно из 4-6 слоев клеток, из которых в среднем 3% НК подвержены кариопикнозу, что в 15 раз выше контрольных значений ($p < 0,05$, табл. 5). Между ядрами отмечается выраженная пролиферация и отек глиальных отростков (рис. 17). Это в сочетании с гибелью НК приводит к достоверному снижению показателя численной плотности ядер НК как в группе без коррекции, так и с коррекцией тиюфаном относительно контрольных значений на 24% и 37% соответственно ($p < 0,05$, табл. 5).

Терапия диборнолом приводит к повышению сохранности НК, о чем свидетельствует снижение дегенерации ядер НК относительно аналогичного показателя группы без коррекции на 41 %, при этом численная плотность ядер НК в 1 мм² среза соответствует значениям интактных животных. В группе с тиюфаном вне очагов поражения процент пикноза ядер НК остается достоверно выше значений группы сравнения (свет+диборнол) и группы без лечения в 1,4 и 4,6 раза соответственно ($p < 0,05$; табл. 5).

После освещения во внутреннем ядерном слое (ВЯС) сетчаток крыс, как в очагах, так и вне очагов поражения, деструктивным изменениям подвергаются биполярные и амакринные нейроны. Появляется большое количество гиперхромных, пикноморфных и отечных нейронов с деструкцией органелл, вакуолизацией цитоплазмы и увеличением числа лизосом (рис. 18, 19).

Электронномикроскопически в цитоплазме многих ассоциативных нейронов митохондрии выглядят набухшими, с просветлённым матриксом, частично фрагментированными и кристами. Также можно было наблюдать появление мембранных комплексов и большое количество вакуолей (рис. 20).

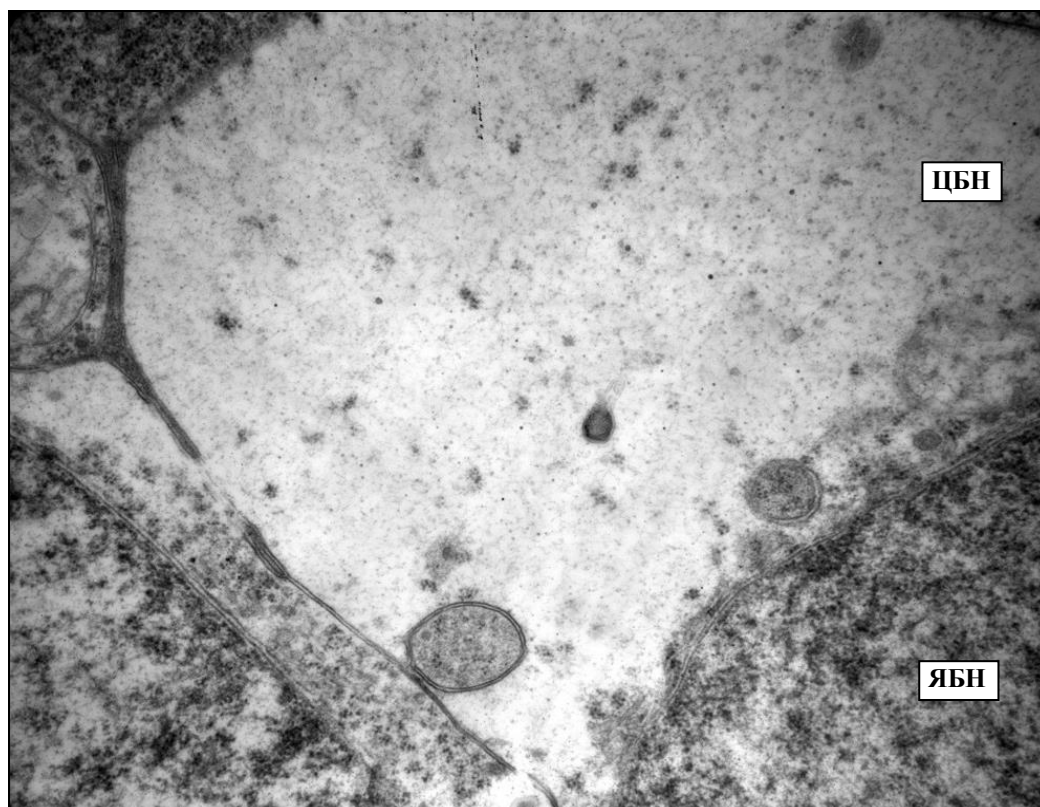


Рис. 19. Отек цитоплазмы и деструкция органелл биполярного нейрона во внутреннем ядерном слое сетчатки крысы на 7 сутки после высокоинтенсивного светового воздействия. ЯБН – ядро биполярного нейрона, ЦБН – цитоплазма биполярного нейрона. Электронограмма. Ув. 2000

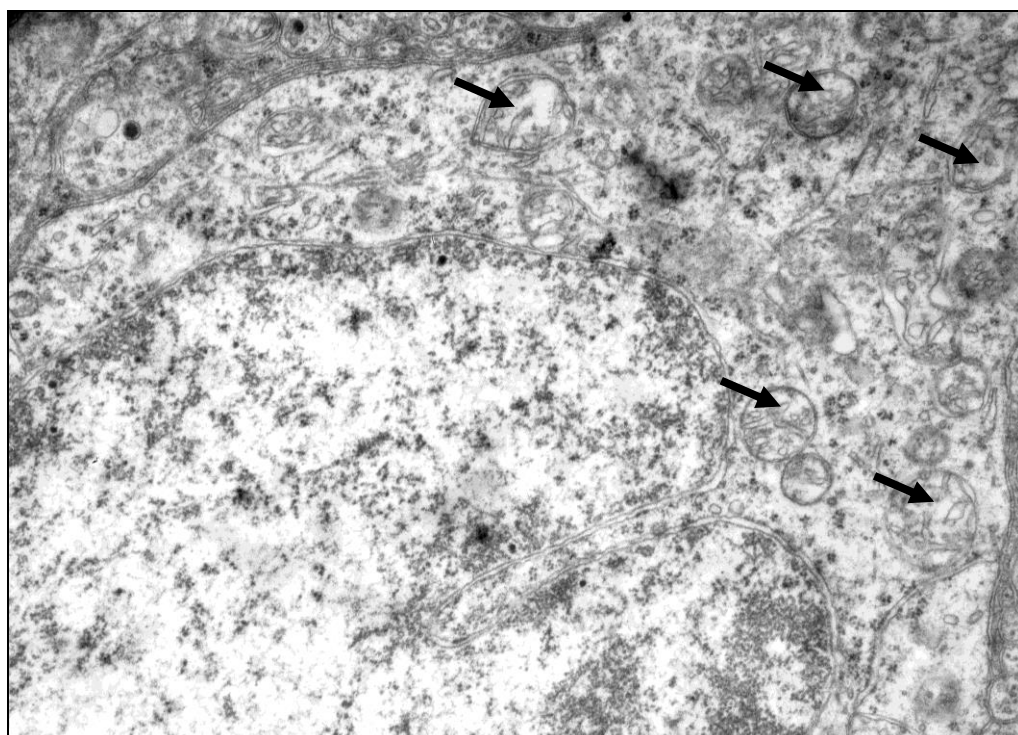


Рис. 20. Амакринный нейрон внутреннего ядерного слоя сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия. Набухание митохондрий, фрагментация крист (стрелки). Электронограмма. Ув. 2000

Количественный анализ ВЯС показал, что после светового воздействия горизонтальные нейроны остаются интактными, возрастает процент гиперхромных пикноморфных амакринных нейронов в 6,5 раза в очагах и 4,1 раза вне очагов поражения и биполярных нейронов в 16,3 и 9,3 раза соответственно относительно значений аналогичных показателей контрольной группы ($p < 0,05$; табл. 6). Ультраструктурный анализ выявил снижение удельной плотности митохондрий, КГ и гранулярной ЭПС в цитоплазме ассоциативных нейронов в 4, 3 и 2 раза соответственно ($p < 0,05$; табл. 7).

Введение тиюфана не оказывает положительного влияния на изменение показателя процента пикноморфных и гиперхромных ассоциативных нейронов ВЯС в очагах поражения сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию, однако вне очагов, как в группе с коррекцией тиюфаном, так и диборнолом, наблюдается полное ограничение деструкции биполярных и амакринных нейронов, и процент гиперхромных и пикноморфных нейронов остается на уровне значений интактного контроля (табл. 6). Этому, вероятно, способствует достоверное, относительно аналогичных показателей опытных групп, повышение в цитоплазме ассоциативных нейронов удельной площади митохондрий в 3 раза, КГ в 2 раза и гранулярной ЭПС на 20%, при этом контрольных значений изучаемые показатели не достигают ($p < 0,05$; табл. 7).

Для установления формы гибели ассоциативных нейронов сетчатки при высокоинтенсивном световом воздействии, было проведено иммуногистохимическое исследование (рис. 21), выявившее индукцию р53-зависимой и митохондриальной ветвей апоптоза в ассоциативных нейронах. При этом в клетках начинает экспрессироваться антиапоптотический белок bcl-2, однако этот процесс не сбалансирован и процент клеток, иммунопозитивных к bcl-2 в 2 раза ниже процента клеток, иммунопозитивных к р 53 (табл. 8).

Таблица 8.

Иммуногистохимическое исследование сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

группы	анти- тела	ассоциативные нейроны (%)	анти- тела	ассоциативные нейроны (%)	анти- тела	ассоциативные нейроны (%)
Контроль	p 53	0	casp. 9	0	VEGF	0
	bcl-2	0	casp. 3	0	PEDF	36,33±1,90
Свет	p 53	1,04±0,17*	casp. 9	0,25±0,08*	VEGF	1,74±0,34*
	bcl-2	0,07±0,03*	casp. 3	0,05±0,02	PEDF	16,99±2,07*
Свет+ диборнол	p 53	0,20±0,09*+	casp. 9	0,13±0,05	VEGF	0,19±0,09*
	bcl-2	0,83±0,11+	casp. 3	0	PEDF	25,92±2,62*+
Свет+ тиофан	p 53	0,53±0,12*+	casp. 9	0,07±0,01	VEGF	0,08±0,02
	bcl-2	0,66±0,02+	casp. 3	0	PEDF	23,60±1,69*+

На 7-е сутки после освещения зарегистрирован, вероятно, начальный этап апоптотических изменений нейронов, так как выявлена экспрессия только инициирующей каспазы-9, тогда как экспрессии эффекторной каспазы-3 в исследуемых нейронах не наблюдается (табл. 8).

Диборнол и тиофан, проявляя антиоксидантные свойства и, тем самым, повышая способность клетки утилизировать свободные радикалы, способствуют восстановлению баланса про- и антиапоптотических регуляторов апоптоза (табл. 8).

Мультиполярные нейроны ганглионарного слоя в ответ на световое повреждение подвергаются различной степени выраженности хроматолитическим изменениям и изменениям по “темному типу” с деформацией, повышением осмиофилии ядра и редукцией органелл в цитоплазме (рис. 22). Хроматолиз нейронов характеризуется снижением содержания цистерн гранулярной эндоплазматической сети, утратой у оставшихся правильной параллельной организации, фрагментацией, расширением некоторых цистерн, которые могут служить местом образования вакуолей. Наблюдается снижение содержания в цитоплазме рибосом и полисом, деструкция митохондрий (рис. 23).

Количественно в группе с освещением без коррекции процент ганглионарных нейронов с “темным типом деструкции” в очаге и вне очага поражения возрастает по отношению к контролю в 2,5 и 1,8 раза соответственно ($p<0,05$, табл. 9). Количество нейронов с очаговым

хроматолизом в группе с освещением без коррекции увеличивается в среднем в 3,3 и 2,2 раза соответственно ($p < 0,05$).

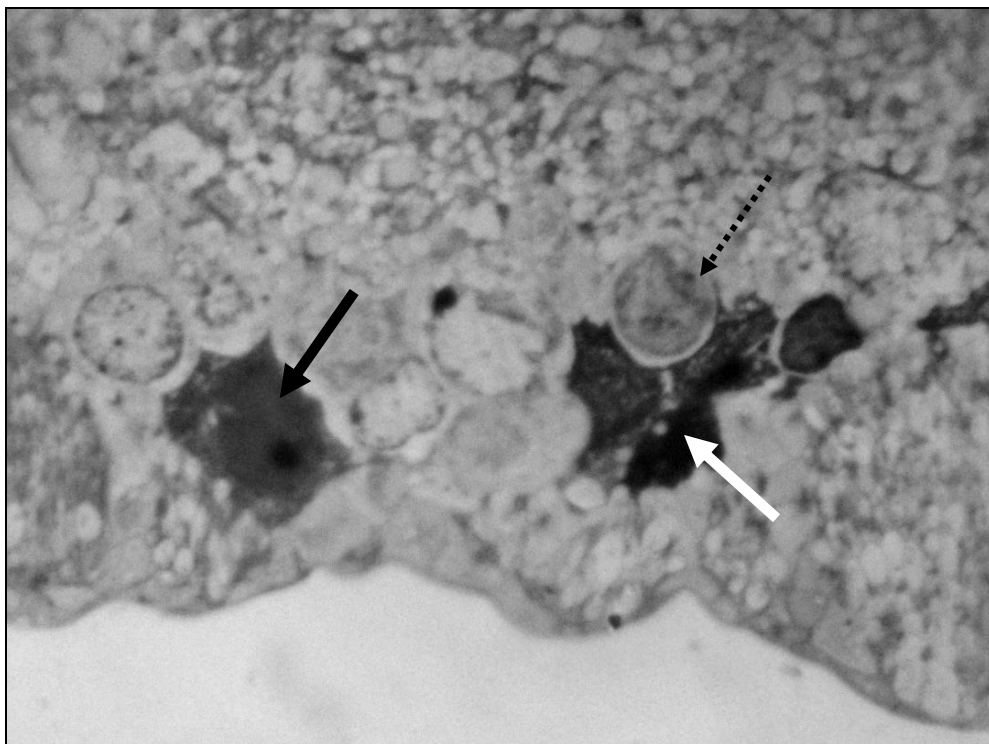


Рис. 22. Пикноморфный ганглионарный нейрон (стрелка) и ганглионарный нейрон с тотальным хроматолизом (пунктирная стрелка), дегенерация астроцитов по темному типу (белые стрелки) после светового воздействия. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

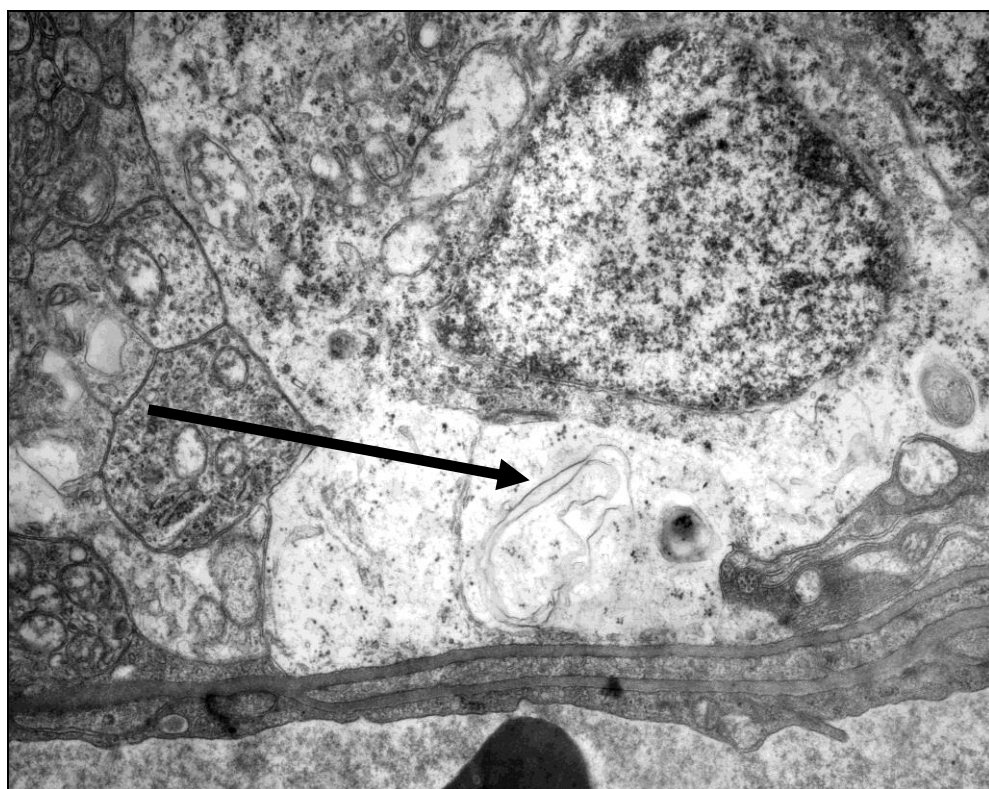


Рис. 23. Очаговый хроматолиз ганглионарного нейрона сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия (стрелка). Ув. 5000

Таблица 9.

Количественная характеристика деструктивно-измененных структурных элементов ганглионарного слоя сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному освещению на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

Группы эксперимента	Ганглионарные нейроны с пикнозом ядра (%)		Ганглионарные нейроны с очаговым хроматолизом (%)		Ганглионарные нейроны с тотальным хроматолизом (%)	
	очаг	вне очага	очаг	вне очага	очаг	вне очага
Контроль	-	2,53±0,19	-	3,55±0,23	-	0,8±0,19
Свет	6,20±0,97*	4,5±0,76*	11,60±0,69*	7,63±1,05	1,40±0,75*	1,88±0,77*
Свет-диборнол	-	3,60±0,65**	-	5,27±0,42**	-	1,47±0,13
Свет-тиофан	4,45±0,23*	3,89±0,44**	7,30±0,29*	5,55±0,45**	1,44±0,09	1,06±0,12

Процент клеток с тотальным хроматолизом повышается в 1,8 и 2,4 раза соответственно ($p<0,05$, табл. 9). Курсовое введение тиофана в очагах поражения не приводит к значимому улучшению структурной организации ганглионарных нейронов сетчатки. Вне очагов поражения, как тиофан, так и диборнол, препятствуют развитию некротических и хроматолитических изменений, при этом процент пикноморфных нейронов ниже, чем в световой группе на 20% и 14% соответственно ($p<0,05$), процент нейронов с очаговым хроматолизом у обеих групп меньше такового аналогичной группы без коррекции в среднем в 1,5 раза. Значения показателя нейронов с тотальным хроматолизом в группе с коррекцией тиофаном и диборнолом вне очагов поражения не превышают значений интактного контроля ($p<0,05$, табл. 9).

Подсчет удельной площади органелл в цитоплазме ганглионарных нейронов (табл. 10) показал, что после высокоинтенсивного светового воздействия удельная площадь митохондрий во всех экспериментальных группах не подвергается изменениям и сравнима с контрольными значениями, тогда как удельная площадь гранулярной ЭПС и КГ достоверно снижается относительно контроля в 2 и 5 раз соответственно ($p<0,05$). В аналогичных группах с коррекцией эти показатели значимо не превышают контрольных значений. Таким образом, введение диборнола и тиофана увеличивает сохранность гранулярной ЭПС и КГ в цитоплазме ганглионарных нейронов, способствуя повышению их трофических и

энергетических ресурсов, что, в свою очередь, усиливает клеточную репарацию и является препятствием на пути развития процесса дегенерации.

Таблица 10.

Удельная площадь органелл (%) в цитоплазме ганглионарных нейронов сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному облучению, без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиофаном

Группы эксперимента	Удельная площадь митохондрий (%)	Удельная площадь грЭПС (%)	Удельная площадь КГ (%)
Контроль	17,64±1,36	52,19±2,34	2,99±0,45
Свет	11,07±0,89*	28,17±2,00*	0,63±0,18*
Свет-диборнол	14,89±1,66	45,65±2,49#	1,95±0,42#
Свет-тиофан	12,67±1,01	44,25±2,60#	1,94±0,38#

Иммуногистохимический анализ популяции ганглионарных нейронов сетчатки крыс, подвергшихся тотальному высокоинтенсивному освещению (табл. 11), выявил повышение содержания, по сравнению с контролем, p 53-, и bcl-2-положительных нейронов. При этом процент мультиполярных нейронов сетчатки крыс со световым воздействием, иммунопозитивных к проапоптотическому фактору p 53 значимо выше процента нейронов, иммунореактивных к антиапоптотическому фактору bcl-2. Одновременно с этим происходит активация каспазы-9 и каспазы-3 (рис. 21, 24), что свидетельствует о запуске протеолитических процессов в ядрах части ганглионарных нейронов сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному освещению. В группах с коррекцией и диборнолом, и тиофаном процент p 53-, каспаза-3- и каспаза-9-иммунопозитивных ганглионарных нейронов значимо ниже аналогичных показателей группы без лечения ($p < 0,05$, табл. 11).

Таким образом, наряду с некротическими изменениями нейронов, можно косвенно судить об определенной роли митохондриального пути апоптоза в реализации гибели ганглионарных и ассоциативных нейронов сетчатки после высокоинтенсивного светового воздействия, т.к. применение антиоксидантных препаратов предотвращает появление данных видов нейронов, иммунопозитивных к проапоптотическим факторам и повышает антиапоптотическое звено защиты против запрограммированной клеточной гибели.

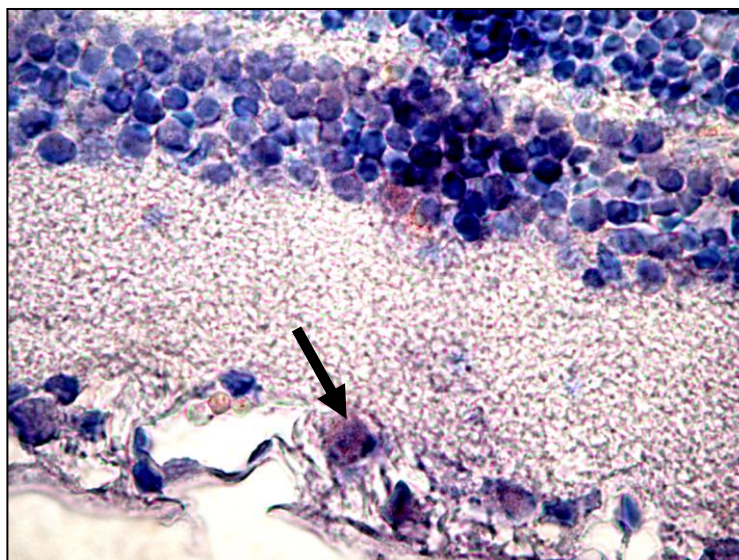


Рис. 24. Каспаза-3-иммунопозитивный ганглионарный нейрон с признаками деградации ядра в сетчатке белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию. Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

Таблица 11.

Иммуногистохимическое исследование сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

группы	анти- тела	ганглионарные нейроны (%)	анти- тела	ганглионарные нейроны (%)	анти- тела	ганглионарные нейроны (%)
Контроль	p 53	0	casp. 9	0	VEGF	3,28±0,74
	bcl-2	0	casp. 3	0	PEDF	37,35±1,80
Свет	p 53	2,73±0,41*	casp. 9	0,22±0,08*	VEGF	2,83±0,90
	bcl-2	0,10±0,03*	casp. 3	0,22±0,04*	PEDF	14,62±1,70*
Свет+ диборнол	p 53	0,94±0,09*+	casp. 9	0,13±0,04	VEGF	2,67±0,50
	bcl-2	0,98±0,09*+	casp. 3	0,05±0,02*#	PEDF	40,10±3,43+
Свет+ тиофан	p 53	1,36±0,29*+	casp. 9	0,16±0,04	VEGF	3,08±0,42
	bcl-2	0,91±0,20*+	casp. 3	0,05±0,02*#	PEDF	37,40±3,78+

Через 7 суток после светового воздействия радиальные глиоциты ВЯС сетчатки подвергаются значительной деструкции цитоплазмы и ядра. Грубые дегенеративные изменения митохондрий, цистерн ЭПС и комплекса Гольджи способствуют вакуольному перерождению цитоплазмы. Ядра характеризуются неровностью контуров кариолеммы и высокой степенью конденсации хроматина. Такие клетки зачастую окружают отечные и ассоциативные нейроны (рис. 25). Склеральные отростки радиальных глиоцитов гипертрофированы и отечны, в их цитоплазме содержатся лизосомы, фагосомы с частицами фоторецепторных элементов, вакуоли (рис. 26).

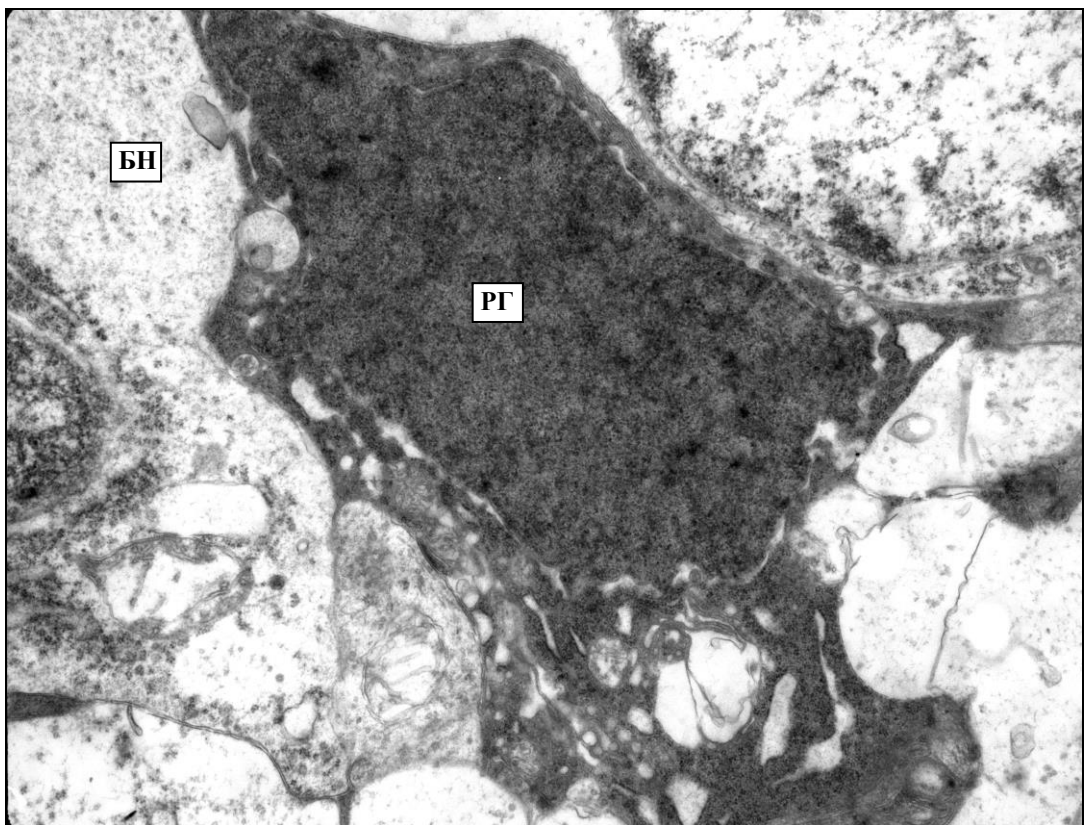


Рис. 25. Гиперхромный пикноморфный радиальный глиоцит (РГ) рядом с отчетным и вакуолизированным биполярным нейроном (БН) во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия (стрелка). Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 6000

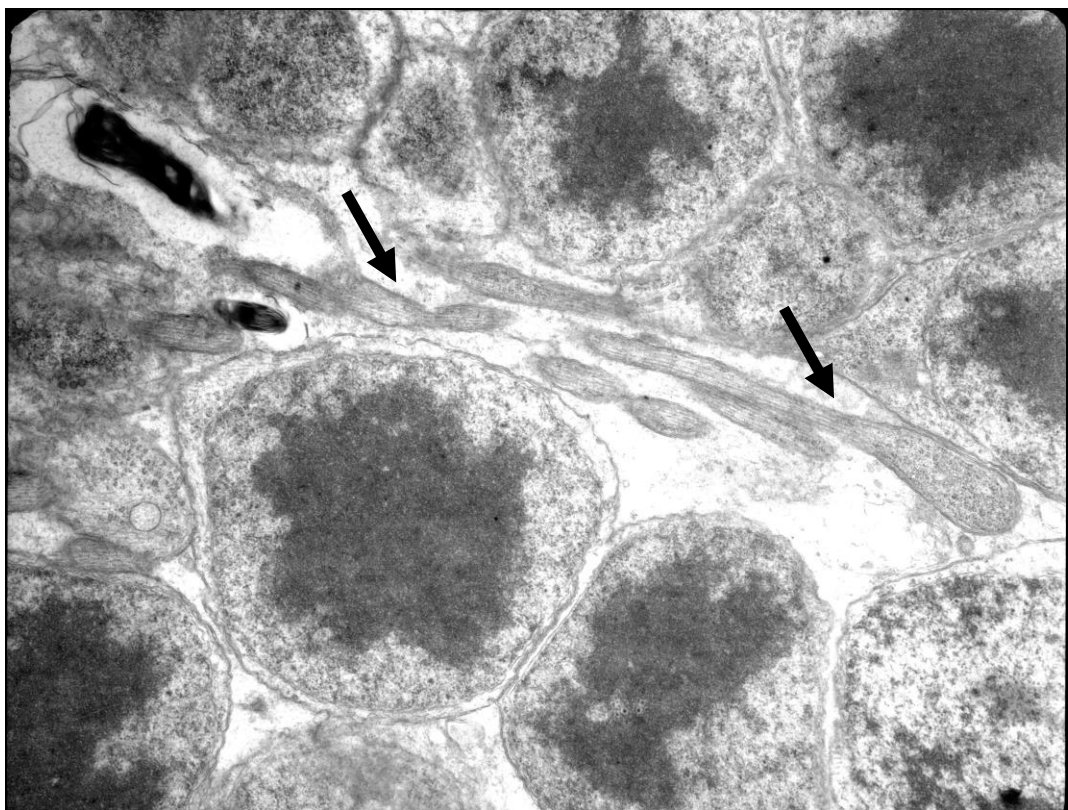


Рис. 26. Отек и пролиферация склеральных отростков радиальной глии в наружном ядерном слое (стрелки) сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия. Ув. 5000

Наружная пограничная мембрана утолщается, местами нарушается ее целостность и наблюдается прорастание в субретинальное пространство гипертрофированных глиальных микроворсин. Витреальные отростки радиальных глиоцитов гипертрофированы и отечны.

Количественно в результате светового воздействия значительно повышается процент гиперхромных и пикноморфных радиальных глиоцитов в очаге поражения сетчатки в 4,6 раза относительно контрольных значений ($p < 0,05$, табл. 12), при этом наблюдается снижение глионейронального индекса на 27% ($p < 0,05$, табл. 12), что является следствием дегенеративных изменений Мюллеровских глиоцитов. Тиофан и диборнол способствуют снижению деструкции глиоцитов вне очагов поражения на 46 и 25% ($p < 0,05$, табл. 12).

Таблица 12.

Количественная характеристика деструктивно-измененных структурных элементов внутреннего ядерного слоя сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному освещению на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

Группы эксперимента	Радиальная глия (%)		Глионейрональный индекс (ГНИ)	
	очаг	вне очага	очаг	вне очага
Контроль	-	2,20±0,29	-	0,37±0,01
Свет	10,10±0,50*	9,10±4,12	0,27±0,02	0,30±0,02
Свет-диборнол	-	6,90±0,82*+	-	0,29±0,02
Свет-тиофан	5,60±0,52*	4,90±0,23*+	0,26±0,01	0,27±0,02

После высокоинтенсивного светового воздействия в единичных радиальных глиоцитах сетчатки активируются процессы апоптотической гибели, о чем свидетельствует появление каспаза-9-иммунопозитивных клеток. Однако в отличие от нейронов, в клетках радиальной глии преобладают антиапоптотические процессы защиты, что на морфологическом уровне проявляется в виде увеличения процента bcl-2-иммунопозитивных клеток относительно значений данного показателя у интактных животных. На фоне коррекции диборнолом и тиофаном процент таковых повышается в 2,3 и 1,8 раза соответственно ($p < 0,05$; табл. 13).

Таблица 13.

Иммуногистохимическое исследование сетчатки крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

группы	анти- тела	Радиальные глиоциты (%)	анти- тела	Радиальные глиоциты (%)	анти- тела	Радиальные глиоциты (%)
Контроль	p 53	0	casp. 9	0	VEGF	0
	bcl-2	0	casp. 3	0	PEDF	36,33±1,90
Свет	p 53	0	casp. 9	0,19±0,08*	VEGF	1,74±0,34*
	bcl-2	0,28±0,06*	casp. 3	0,27±0,10*	PEDF	16,99±2,07*
Свет+ диборнол	p 53	0	casp. 9	0,10±0,03	VEGF	0,19±0,09*
	bcl-2	0,64±0,14 [#]	casp. 3	0,09±0,03*	PEDF	25,92±2,62 ^{*#}
Свет+ тиофан	p 53	0	casp. 9	0	VEGF	0,08±0,02
	bcl-2	0,49±0,09 [#]	casp. 3	0	PEDF	23,60±1,69 ^{*#}

Внутренний гематоретинальный барьер в сетчатках крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию, также подвергается структурным нарушениям. Большинство сосудов расширены, лишены форменных элементов, сосудистая стенка истончена (рис. 27).

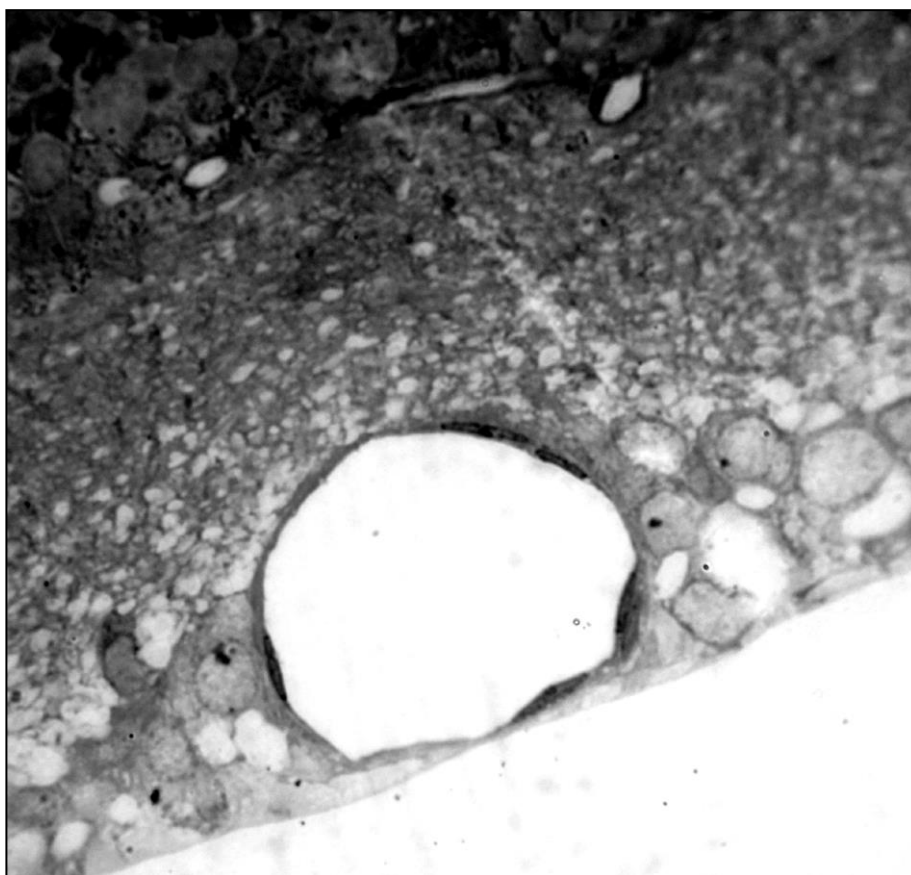


Рис. 27. Расширение интравитреального сосуда (стрелка), истончение сосудистой стенки, вакуолизация эндотелиоцитов в слое нервных волокон сетчатки после высокоинтенсивного светового облучения. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Значительная часть астроцитарной глии в слое нервных волокон подвергается изменениям по темному типу с пикнозом ядра, деструкцией органелл и вакуолизацией цитоплазмы (рис. 28).

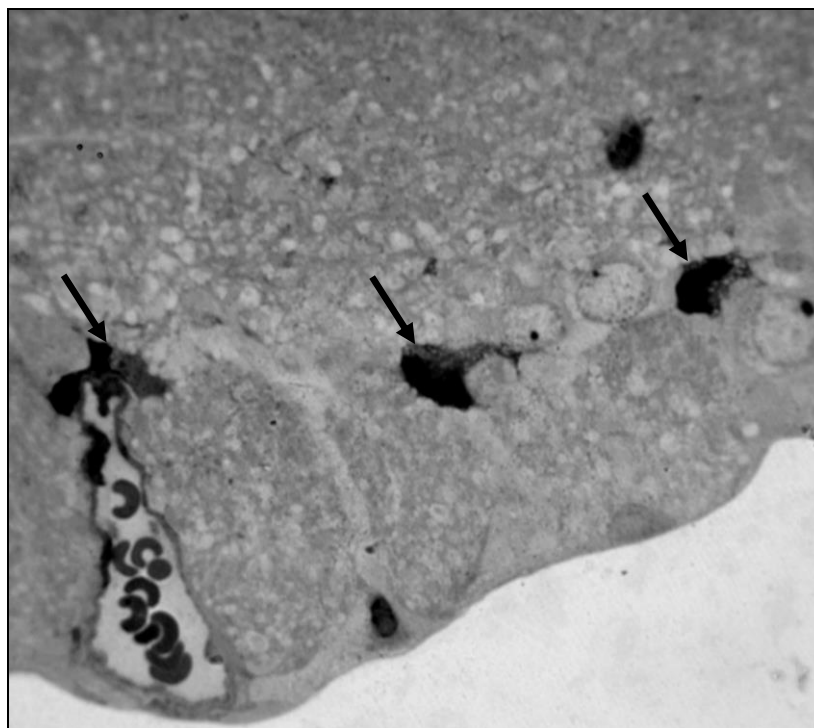


Рис. 28. Деструкция астроцитов сетчатки после высокоинтенсивного светового облучения на фоне введения диборнола. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900.

Исследование экспрессии ростовых факторов VEGF и PEDF в клетках сетчатки белых беспородных крыс показало, что у интактных животных наблюдается преобладание PEDF-положительных структур (табл. 14). Иммунопозитивными к ростовым факторам в сетчатке крыс всех групп оказались эндотелий интратретиальных сосудов, ассоциативные и ганглионарные нейроны, радиальные глиоциты (рис. 29, 30). Световое воздействие вызывает активацию VEGF-фактора в эндотелиоцитах и угнетение активности PEDF, что, вероятно, связано с дегенерацией ретинальных пигментоцитов. Так, в срезе сетчатки количество срезов сосудов, в стенке которых обнаруживаются VEGF-иммунопозитивные эндотелиальные клетки (рис. 29), возрастает на 54% относительно интактного контроля ($p < 0,05$, табл. 14). Это происходит на фоне снижения процента сосудов с PEDF-иммуноположительными эндотелиоцитами в 2,6 раза, что может свидетельствовать в пользу активации процессов

неоангиогенеза. Диборнол способствует сохранению баланса VEGF/PEDF в сетчатке. Под влиянием тиюфана не происходит значимого повышения процента сосудов с эндотелиоцитами, иммунопозитивными к VEGF, однако, процент сосудов с PEDF-иммунопозитивным эндотелием остается значимо ниже значений контроля на 36% ($p < 0,05$, табл. 14).

Таблица 14.

Количественная оценка иммунопозитивных к VEGF и PEDF структурных элементов хориоретинального комплекса белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию, на фоне коррекции диборнолом и тиюфаном

группы	антитела	интратетинальные сосуды (%)	ассоциативные нейроны (%)	ганглионарные нейроны (%)
Интатные	VEGF	4,25±0,66	0	3,28±0,74
	PEDF	8,32±0,80	36,33±1,90	37,35±1,80
Свет	VEGF	6,57±0,80*	1,74±0,34*	2,83±0,90
	PEDF	3,17±0,70*	16,99±2,07*	14,62±1,70*
Свет+диборнол	VEGF	4,36±0,74	0,19±0,09*	2,67±0,50
	PEDF	7,00±0,85[#]	25,92±2,62^{*#}	40,10±3,43[#]
Свет+тиюфан	VEGF	4,83±0,15	0,08±0,02	3,08±0,42
	PEDF	5,36±0,80*	23,60±1,69^{*#}	37,40±3,78[#]

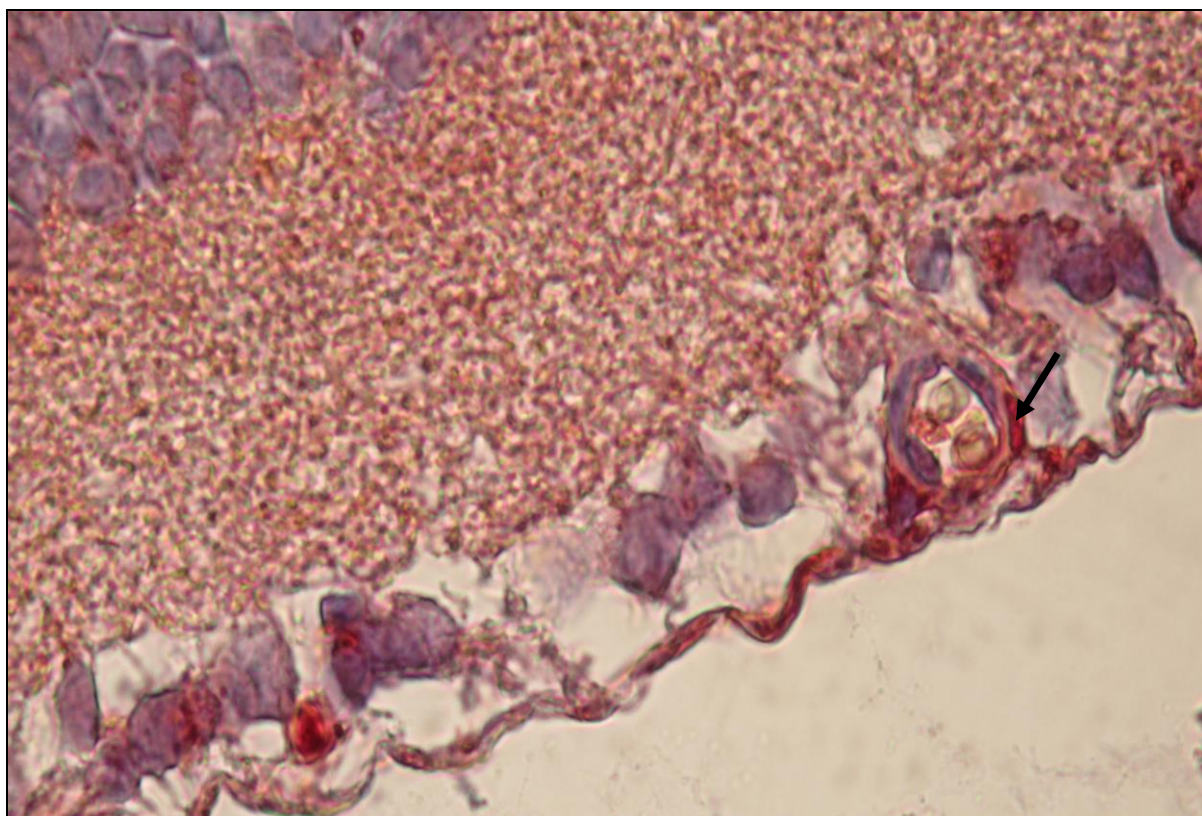


Рис. 29. VEGF-иммунопозитивный эндотелиоцит стенки интратетинального сосуда сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию. Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

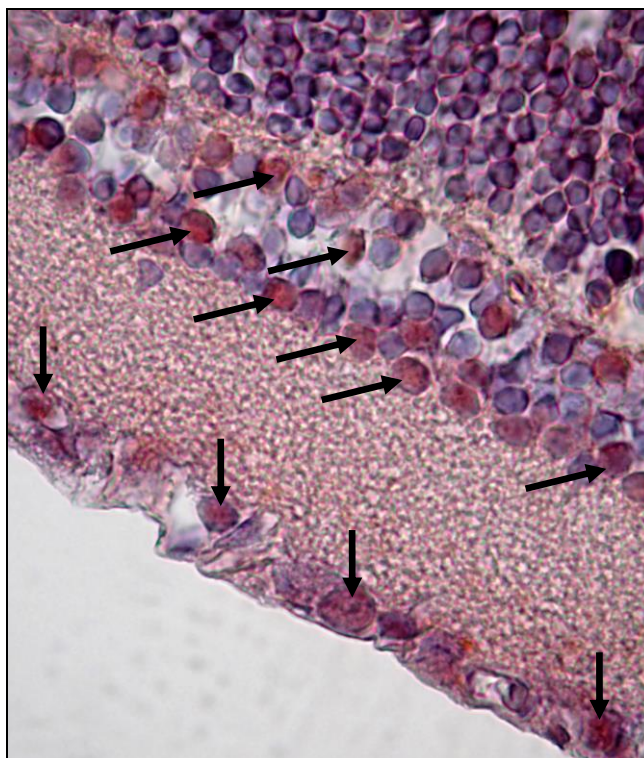


Рис. 30. PEDF-иммунопозитивные структурные элементы сетчатки белых беспородных крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию на фоне коррекции тиофаном. Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

Высокоинтенсивное световое воздействие приводит к значительным изменениям синаптических структур сетчатки. В очагах поражения из-за выраженной деструкции НЯС, наружный сетчатый слой практически отсутствует (рис. 31) и представлен редкими дегенеративно измененными синапсами. Вне очагов часть центральных отростков изменена по темному и светлому типу с явлениями отека, дегенерацией митохондрий, вакуолизацией, фрагментами деградации органелл в цитоплазме (рис. 32).

Во внутреннем сетчатом слое растет число деструктивно измененных контактов по “светлому” типу (рис. 33). Наблюдается снижение численной плотности синапсов, нарастают признаки дегенерации как пре-, так и постсинаптических отделов. В пресинаптической части уменьшается число синаптических везикул, происходит деструкция органелл и появление большого количества вакуолей. В постсинаптической части отмечается снижение электронной плотности, появление мембранных комплексов и мультивезикулярных телец.

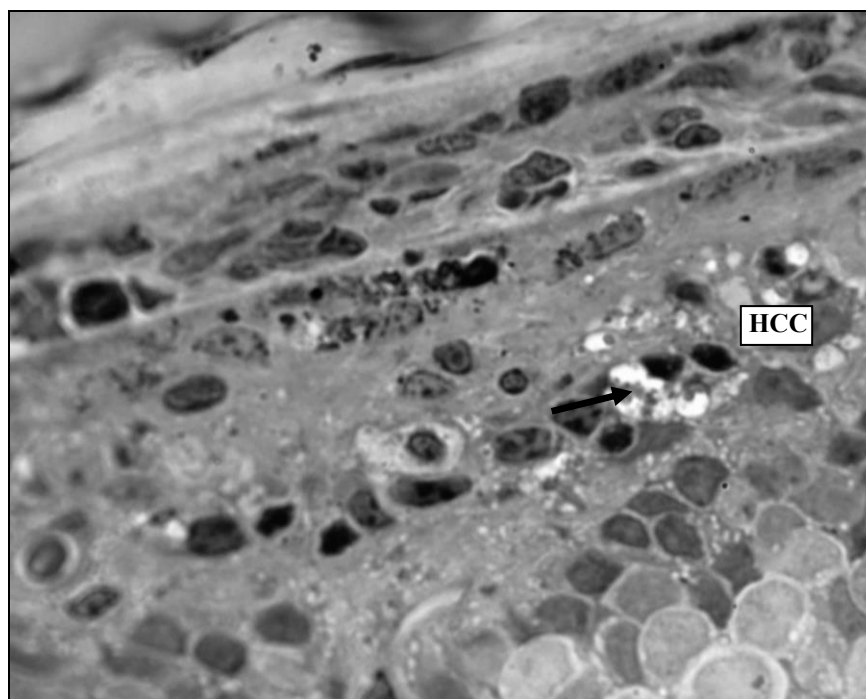


Рис. 31. Истончение наружного плексiformного слоя сетчатки (стрелка) после высокоинтенсивного светового воздействия в очаге поражения. НСС – наружный сетчатый слой. Ув. 1000

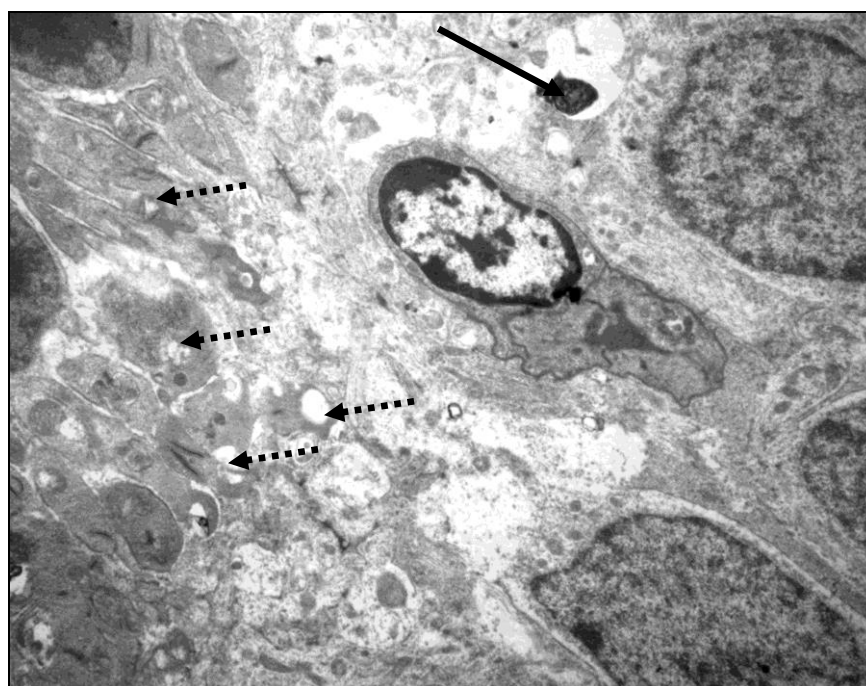


Рис. 32. Наружный плексiformный слой сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия вне очага поражения. Вакуолизация центральных отростков, фрагменты деградации органелл (стрелка). Ув. 2500.

Ультраструктурные изменения синаптических контактов в группах с коррекцией идентичны наблюдаемым изменениям в группе без лечения, однако степень поражения несколько ниже (рис. 34).

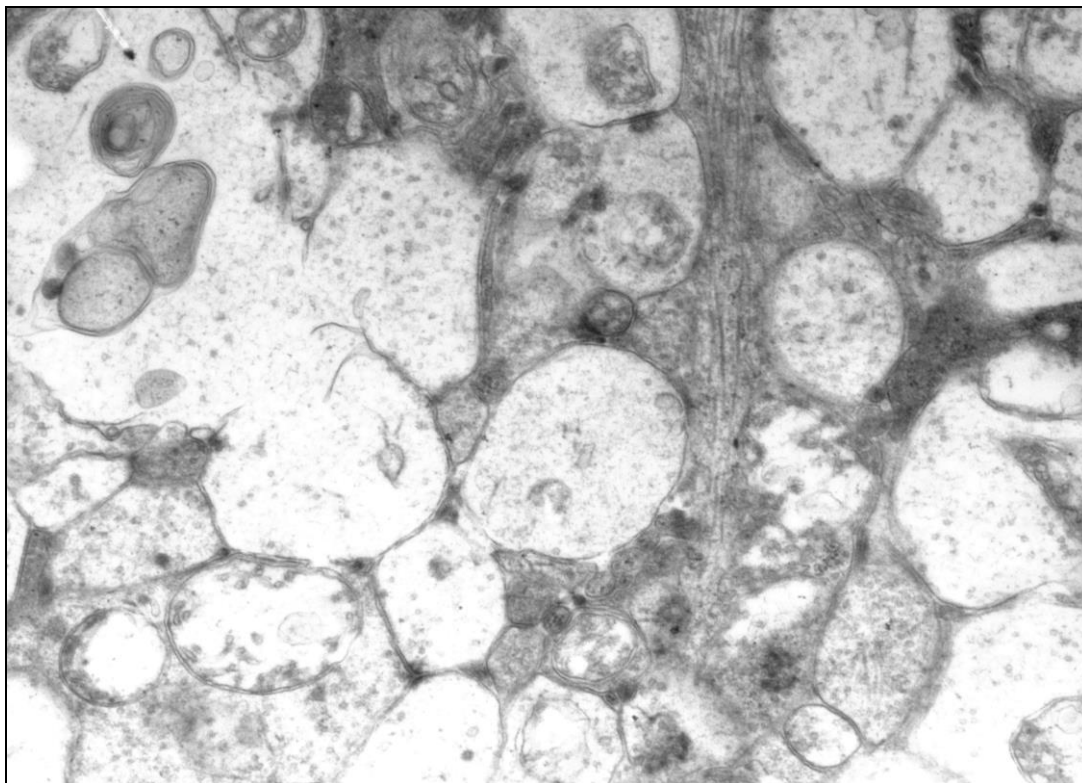


Рис. 33. Внутренний плексiformный слой сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия в очаге поражения. Дегенерация синапсов по «светлому» типу Ув. 10000.

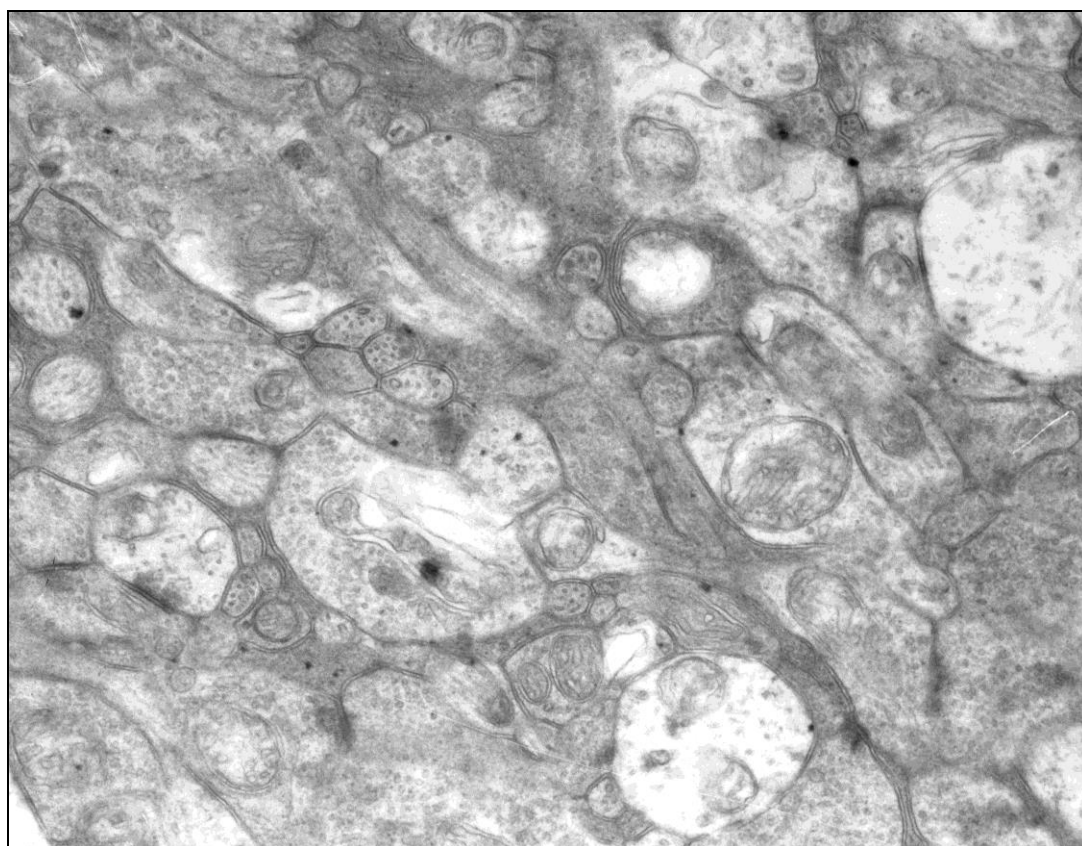


Рис. 34. Внутренний плексiformный слой сетчатки крыс после высокоинтенсивного светового воздействия на фоне коррекции диборнолом. Ув. 10000.

На 7-е сутки после освещения отмечается достоверное снижение общей численной плотности синапсов внутреннео плексиформного слоя сетчатки крыс в 1,8 раза относительно аналогичного значения интакного контроля ($p < 0,05$, табл. 15), при этом количество симметричных синапсов снижается в 1,5 раза, количество асимметричных синапсов - в 2 раза ($p < 0,05$). В наибольшей степени деструкции подвержены искривленные активно функционирующие “+” и “-” изогнутые синапсы, численная плотность которых уменьшается в 2,3 и 2 раза соответственно ($p < 0,05$, табл. 15).

Необходимо отметить, что дегенерация синапсов происходит вне зависимости от длины активной зоны контакта (АЗК) и высоты плотных проекций (табл. 16 и 17), однако среди сохранившихся преобладают синапсы с длиной АЗК 100-200 мкм, 200-300 мкм и 300-500 мкм. Это является их компенсаторно-приспособительной реакцией на повреждение.

Курсовое введение диборнола и тиофана препятствует дегенерации симметричных синапсов. Так, значение численной плотности симметричных синапсов на 100 мкм^2 нейропиля под влиянием обоих препаратов не превышает контрольных. Однако лишь диборнол приводит к сокращению процента общей численной плотности синапсов на 28 % ($p < 0,05$, табл. 15), оказывая синаптопротекторный эффект вне зависимости от длины активной зоны контакта (табл. 16).

В отношении асимметричных контактов ни один из используемых в качестве коррекции фотодегенерации сетчатки препаратов не оказывает протективного эффекта, и численная плотность асимметричных синапсов с различной высотой плотных проекций значимо не отличается от значений световой группы (табл. 17).

Исследование индуцированной люминолом хемилюминесценции гомогената сетчатки показывает уровень свободных радикалов в данном объекте. Динамика изменений свечения образцов во всех экспериментальных группах однонаправленная. На нулевой минуте уровень свободных радикалов максимален, за 2 последующие минуты он падает до минимальных

значений и выходит на плато (рис. 35). Уровень спонтанной хемилюминесценции гомогената сетчатки животных, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию достоверно выше значений интактного контроля (рис. 35). В группах с коррекцией уровень спонтанной хемилюминесценции во все временные периоды значимо ниже значений группы без лечения, а начиная со второй минуты регистрации свечения, достигает значений интактного контроля.

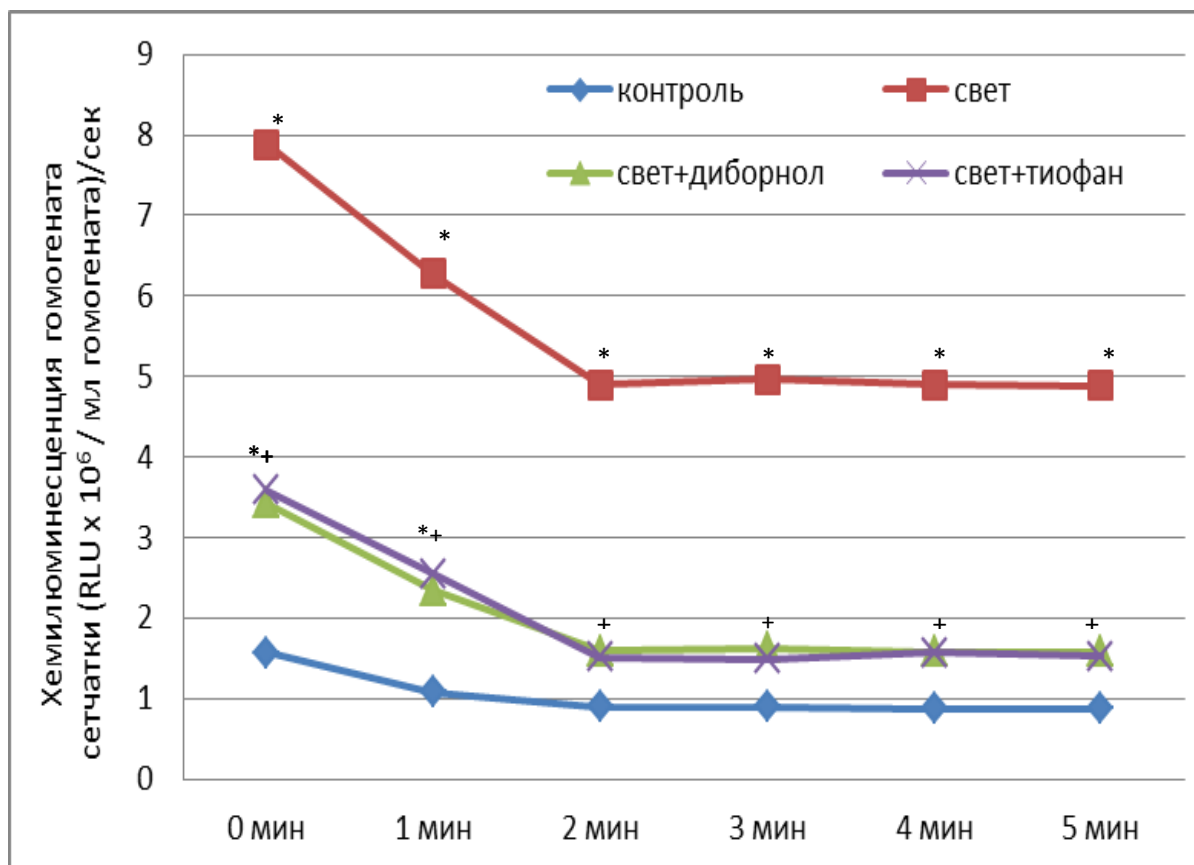


Рис. 35. Уровень индуцированной люминолом хемилюминесценции гомогената сетчатки крыс после высокоинтенсивного освещения на фоне коррекции диборнолом и тиюфаном.

Антиоксидантную активность гомогената сетчатки определяли методом ингибирования пробой люминолзависимой хемилюминесценции в присутствии ионов металлов переменной валентности и перекиси водорода. Антиоксидантная активность гомогенатов сетчаток крыс, подвергшихся освещению без коррекции снижена во все исследуемые промежутки времени, о чем свидетельствует минимальный показатель светосуммы под временной кривой хемилюминесценции ($p < 0,05$, рис. 36). В группах с коррекцией

исследуемый показатель значимо выше аналогичного группы без лечения ($p < 0,05$), однако не достигает контрольных значений (рис. 36).

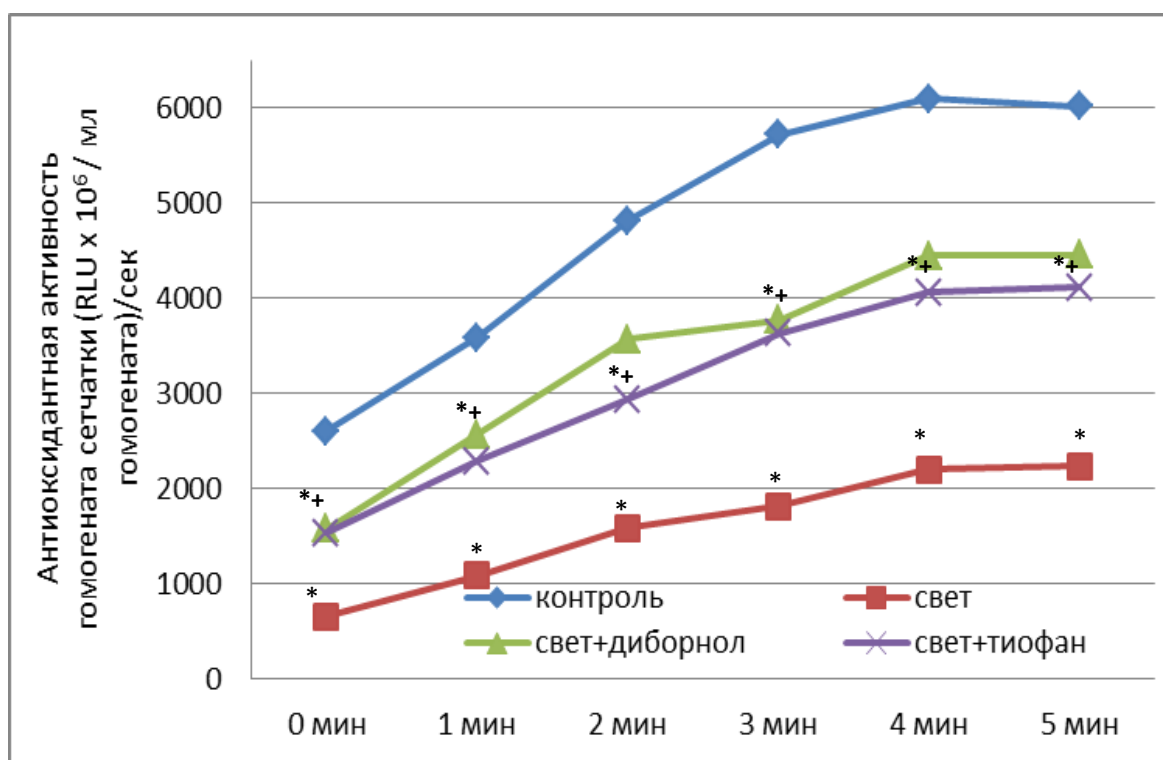


Рис. 36. Уровень антиоксидантной активности гомогената сетчатки крыс после высокоинтенсивного освещения на фоне коррекции диборнолом и тиофаном.

Таким образом, хемилюминесцентный анализ выявил высокий уровень радикалообразования на фоне угнетения антиоксидантной активности в сетчатках крыс, подвергшихся высокоинтенсивному световому воздействию.

На основании проведенного исследования можно заключить, что тотальное высокоинтенсивное световое воздействие вызывает очаговое поражение сетчатки с выраженной дегенерацией в очагах пигментоцитов, нейросенсорных клеток, биполярных, амакриновых нейронов и радиальных глиоцитов. Преобладает некротическая гибель клеточных элементов сетчатки, однако, иммуногистохимически доказана также активация p53-зависимой и митохондриальной ветвей апоптотической гибели ассоциативных и ганглионарных нейронов. Гибель нейронов, нарушение глионейрональных взаимодействий, а также активация свободнорадикальных реакций в сетчатке приводит к изменению синаптоархитектоники сетчатки.

Деструкции подвергаются в основном функционально активные “+” и “-” изогнутые синапсы. Отмечено появление значительных ультраструктурных изменений сосудистых элементов, застойных явлений в микрососудах, что привело к нарушению структуры гематоретинального барьера. Эти явления, вероятно, усиливают деструктивные изменения ПЦ и наружных сегментов НК, которые первыми вовлекаются в процесс фотодегенерации и, приводя к активации процессов свободнорадикального окисления в сетчатке, способствуют поражению ее внутренних слоев. Развивающееся мощное окислительное повреждение хориоретинального комплекса, является, вероятно, следствием индуцированного светом каскадного образования высокорективных гидропероксидов при повреждении мембран и развитии синдрома липидной пероксидации. Эти процессы настолько сильны, что антиоксидантная система сетчатки не справляется с защитой ее мембранных образований и развивается фотоповреждение всех структур. И диборнол, и тиофан проявляют ретинопротекторные свойства в отношении всех структур сетчатки, что объясняется выраженными антиоксидантными свойствами препаратов.

Антиоксидантная терапия диборнолом и тифаном повышает адаптацию сетчатки к высокоинтенсивному световому воздействию, снижая образование свободных радикалов в хориоретинальном комплексе, тем самым оказывая ретинопротекторные свойства в отношении всех структур сетчатки. Так, налицо ограничение дегенерации ПЦ, НК, высокая сохранность синаптического пула. Однако лишь диборнол способствует полному ограничению очаговых повреждений сетчатки, достоверному сокращению хориоретинальных сосудов с признаками стаза, сладжа и тромбоза, что позволяет сделать вывод о его ангиопротекторных свойствах в отношении сосудов хориоретинального комплекса крыс на местном уровне в обход системных гемодинамических параметров.

3.2. ИЗМЕНЕНИЯ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ НА ФОНЕ КОРРЕКЦИИ ТИОФАНОМ И ДИБОРНОЛОМ

Через 60 дней после введения стрептозотоцина у животных контрольной группы уровень глюкозы в крови составил $24,5 \pm 2,1$ ммоль/л, при этом в сетчатках животных отмечаются морфологические признаки дегенерации хориоретинального комплекса. Отличительной особенностью изменений сосудистого русла при стрептозотоциновом диабете является его отрицательное влияние на сосудистую стенку. Эндотелиоциты характеризуется деформацией ядер, вакуолизацией цитоплазмы, на поверхности клеток появляются многочисленные выросты цитоплазмы – цитоподии, увеличивающие поверхность всасывания, что является, вероятно, компенсаторным механизмом защиты эндотелия от стойкой гипергликемии, способствуя нормализации транспортных функций эндотелиоцитов и повышая его трофику (рис. 37).

Наряду с сужением просвета интравитреальных сосудов и хориокапилляров за счет набухания ядродержащей части и выбухания ее в просвет сосуда (рис. 38), наблюдается аневризматическое расширение части сосудов, что связано с деструкцией перицитов (рис. 39).

В просвете хориоидальных и интравитреальных сосудов встречаются моноциты, которые мигрируют в интерстициальную ткань сетчатки, где могут превращаться в макрофаги (рис. 40).

Морфоколичественный анализ сетчаток показал, что у животных контрольной группы по отношению к интактным крысам происходит достоверное снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов в 7,9 раза ($p < 0,05$) и увеличение удельной площади сосудов со стазом и сладжем форменных элементов в 4,7 раза ($p < 0,05$, табл. 18, рис. 41).

Эти результаты коррелируют с данными гемореологических показателей крови контрольных животных, которые свидетельствуют о том, что у крыс за два месяца течения стрептозотоцинового диабета развивается синдром

повышенной вязкости крови: повышение вязкости крови на низких (от 3 до 10 с^{-1}) и на высоких ($50\text{--}300 \text{ с}^{-1}$) скоростях сдвига на 69–79% и 22–46% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с интактными животными (табл. 19), что на фоне неизменного показателя гематокрита косвенно свидетельствует о снижении эффективности доставки кислорода тканям.

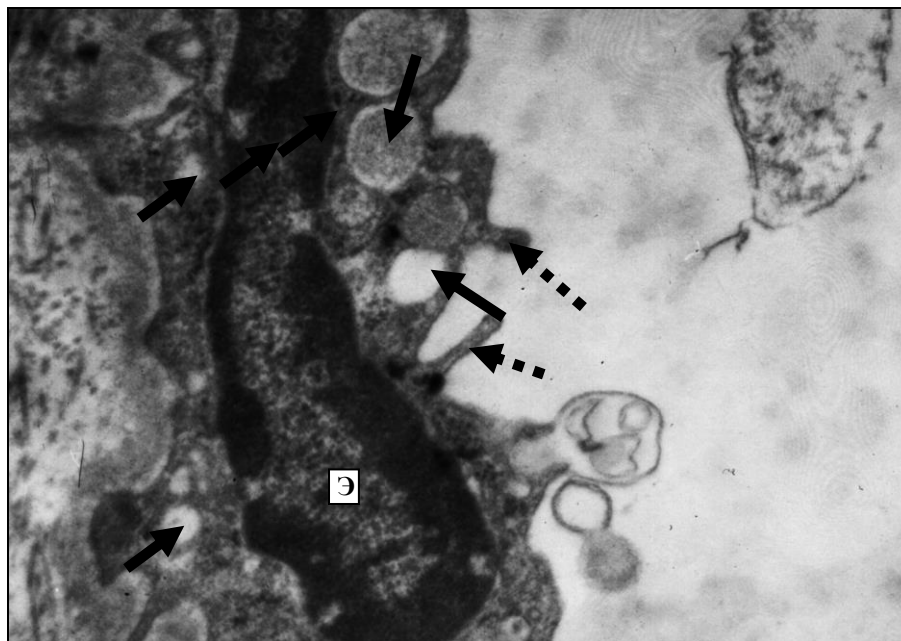


Рис. 37. Эндотелий хориокапилляра (Э). Вакуолизация цитоплазмы, дегенерация органелл (стрелки), появление цитоподий (пунктирные стрелки). Электронограмма. Ув. 5000

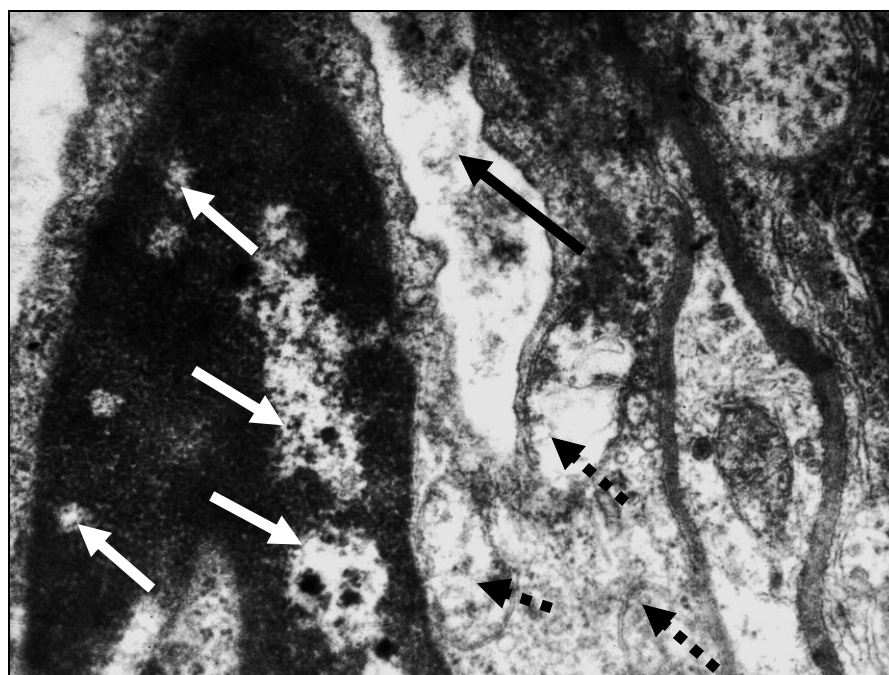


Рис. 38. Плазматический интратетинальный капилляр крыс со стрептозотоциновым диабетом. Отек, дегенерация органелл (пунктирные стрелки), начальный этап ядерного лизиса эндотелиоцита (белые стрелки). Просвет сосуда (черная стрелка). Электронограмма. Ув. 9000

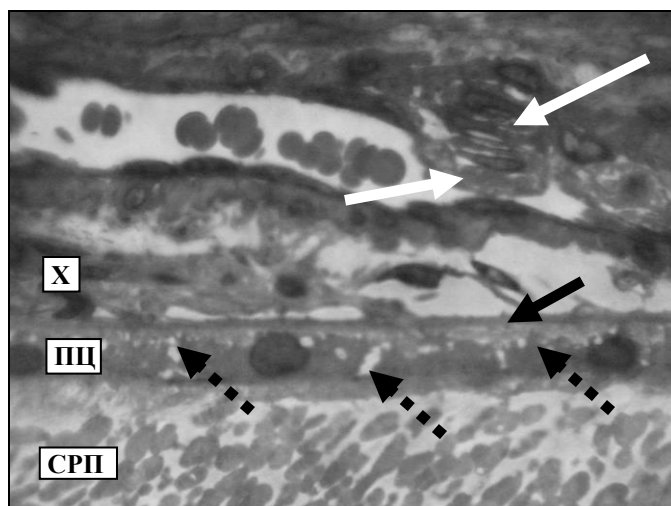


Рис. 39. Хориоидея (Х), пигментциты (ПЦ), субретинальное пространство (СРП) сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Расширение, истончение стенки хориокапилляра (черная стрелка). Проплиферация и выбухание в просвет сосуда эндотелиоцита (белая стрелка). Вакуолизация пигментцитов (пунктирная стрелка). Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

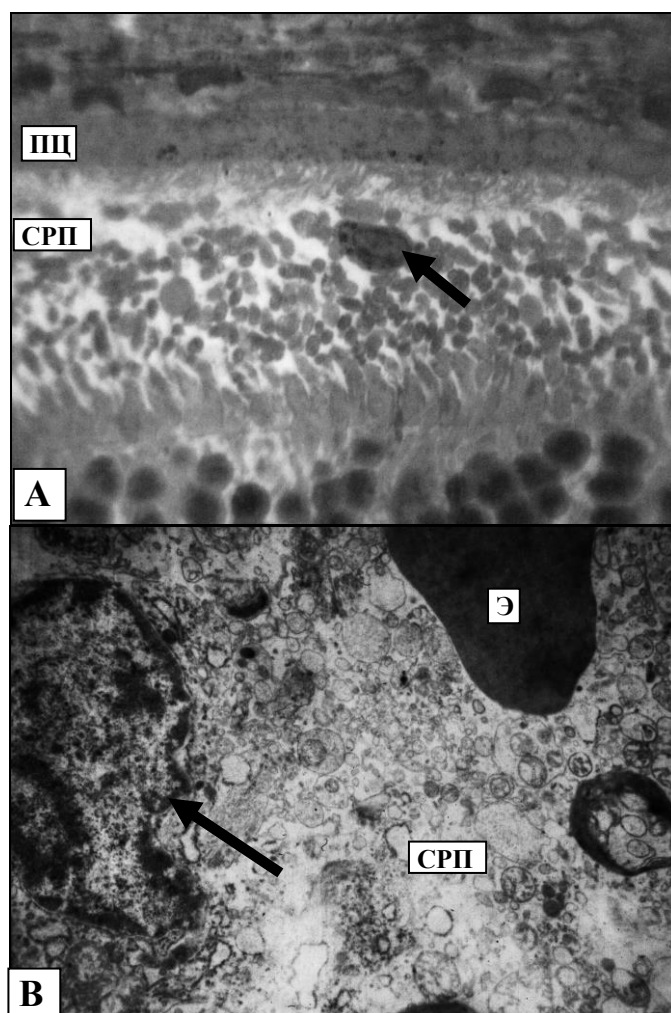


Рис. 40. Макрофаг (стрелка) в субретинальном пространстве (СРП) сетчатки крысы со стрептозотоциновым диабетом. ПЦ – слой пигментцитов; Э – эритроцит. А. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000; В. Электронограмма. Ув. 4000

Таблица 18.

Количественный анализ хориокапилляров сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции

Группы эксперимента	Удельная площадь открытых сосудов хориоидеи (%)	Удельная площадь сосудов хориоидеи со сладжем эритроцитов и тромбозом (%)
контроль	36,00±0,70	1,52±0,09
диабет	4,58±1,16*	7,81±1,03*
диабет-диборнол	12,51±1,27* ⁺	2,6±0,10* ⁺
диабет тиофан	12,83±4,37* ⁺	5,54±0,97* ^{+#}

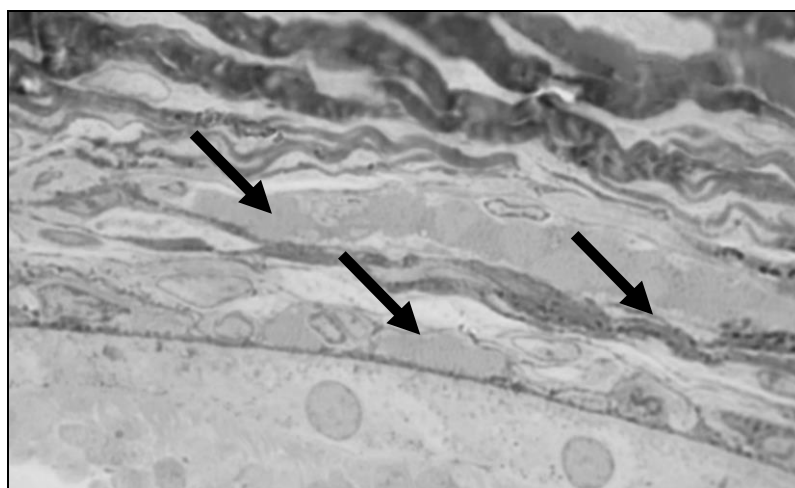


Рис. 41. Тромбоз хориокапилляров (стрелки) сосудистой оболочки глаза крысы со стрептозотоциновым диабетом. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Выраженный характер носят изменения микрореологических параметров крови (табл. 20). Так, возрастает агрегационная активность эритроцитов, проявляющаяся в сокращении полупериода клеточной агрегации в 4 раза по сравнению с интактными животными ($p<0,05$). Ухудшается деформируемость эритроцитов, о чем свидетельствует снижение индекса деформируемости во всем в исследуемом диапазоне скоростей сдвига на 28–38% относительно показателей группы интактных крыс ($p<0,05$).

Выбранные в качестве коррекции указанных выше нарушений хориоретинального комплекса препараты диборнол и тиофан не оказывают влияния на состояние гипергликемии, т.к. уровень глюкозы в крови животных получавших их в качестве коррекции составляет $22,9\pm2,2$ ммоль/л в группе с диборнолом и $20,5\pm3,1$ ммоль/л в группе с тиофаном (контроль, $24,5\pm2,1$ ммоль/л). Таким образом, все выявленные нами ретинопротекторные эффекты диборнола и тиофана в большей или меньшей

степени являются результатом их антиоксидантной и гемореологической активностей.

Курсовое внутрижелудочное введение диборнола уменьшает выраженность синдрома повышенной вязкости крови. При равных значениях гематокрита в опытной и контрольной группах, у животных, получавших диборнол, вязкость крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига ниже на 11–25% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями в контрольной группе (табл. 19). Под влиянием диборнола происходит отчетливое улучшение показателей микрореологии, о чем свидетельствует снижение агрегационной способности эритроцитов, отражающееся в повышение полупериода агрегации эритроцитов на 28%, а также улучшении их деформируемости, что проявляется в увеличении индекса деформируемости эритроцитов на 11–25% по сравнению с контролем (табл. 19 и 20).

Таким образом, диборнол способен проявлять выраженные гемореологические эффекты при стрептозотоциновом диабете у крыс, в том числе, за счет воздействия на клеточные факторы реологии крови – деформируемость и агрегацию эритроцитов. Это на морфологическом уровне проявляется в снижении удельной площади сосудов хориоидеи со стазом, сладжем или тромбозом в 2,8 раза ($p < 0,05$, табл. 25) и увеличении удельной площади открытых сосудов хориоидеи в 2,6 раза ($p < 0,05$, табл. 18).

Курсовое введение тиофана не оказывает закономерного влияния на реологические свойства крови животных с экспериментальным диабетом. Отмечается лишь тенденция к улучшению вязкости крови в диапазоне низких скоростей сдвига (от 3 до 10 с^{-1}) на 10–25%. Это согласуется с улучшением агрегации эритроцитов: полупериод период агрегации возрастает в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой. Также отмечается лишь тенденция к снижению вязкости плазмы крови и содержания фибриногена (табл. 19 и 20).

Полученные результаты объясняют отсутствие положительного влияния тирофана на показатель удельной площади сосудов со стазом, сладжем и тромбозом, который в исследуемой группе достоверно не отличается от контроля и выше значений аналогичного показателя у животных, получавших диборнол в 2,1 раза ($p < 0,05$, табл. 18).

Снижение кислородного напряжения в сетчатке вследствие развития синдрома повышенной вязкости крови и усиления процессов тромбообразования у крыс со стрептозотоциновым диабетом длительностью 2 месяца, вероятно, способствует значительному повреждению ПЦ.

Некоторые ПЦ подвергаются дегенерации по темному типу – вакуолизации, осмиофилии митохондрий с размытием контуров, гидропической деструкции микроворсинок (рис. 42). Местами можно наблюдать лизис ПЦ с замещением их коллагеновыми волокнами, дегенерацию базального комплекса в области гибели клеток (рис. 43). Наряду с некротическими изменениями, встречаются апоптотически измененные ПЦ с фрагментацией хроматина в ядре на фоне уплотненной цитоплазмы (рис. 44). Однако с помощью иммуногистохимического анализа не удалось зафиксировать вовлеченные в апоптоз ПЦ, так как во всех экспериментальных группах и при любом моноклональном антителе выявляется неспецифическое иммуногистохимическое окрашивание ядра и цитоплазмы ПЦ.

Цитоплазма большинства ПЦ сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом вакуолизирована, рисунок базальной складчатости нечеткий, однако микроворсинки гипертрофированы, что говорит об адаптации сетчатки в виде активно идущих процессов фагоцитоза наружных сегментов НК (рис. 45).

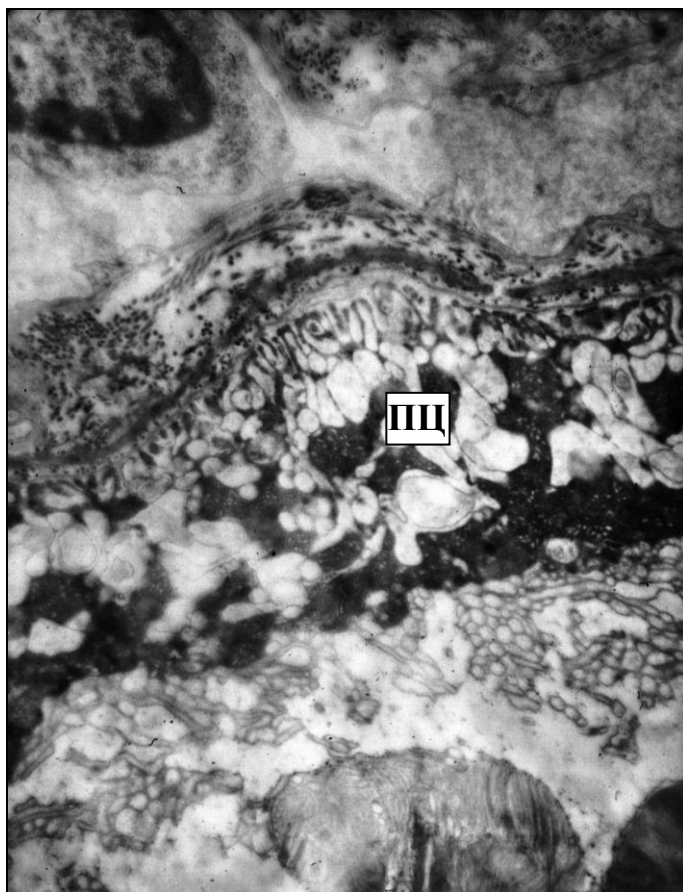


Рис. 42. Некроз пигментоцитов (РЩ) сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Вакуолизация цитоплазмы, дегенерация органелл. Электронограмма. Ув.4000

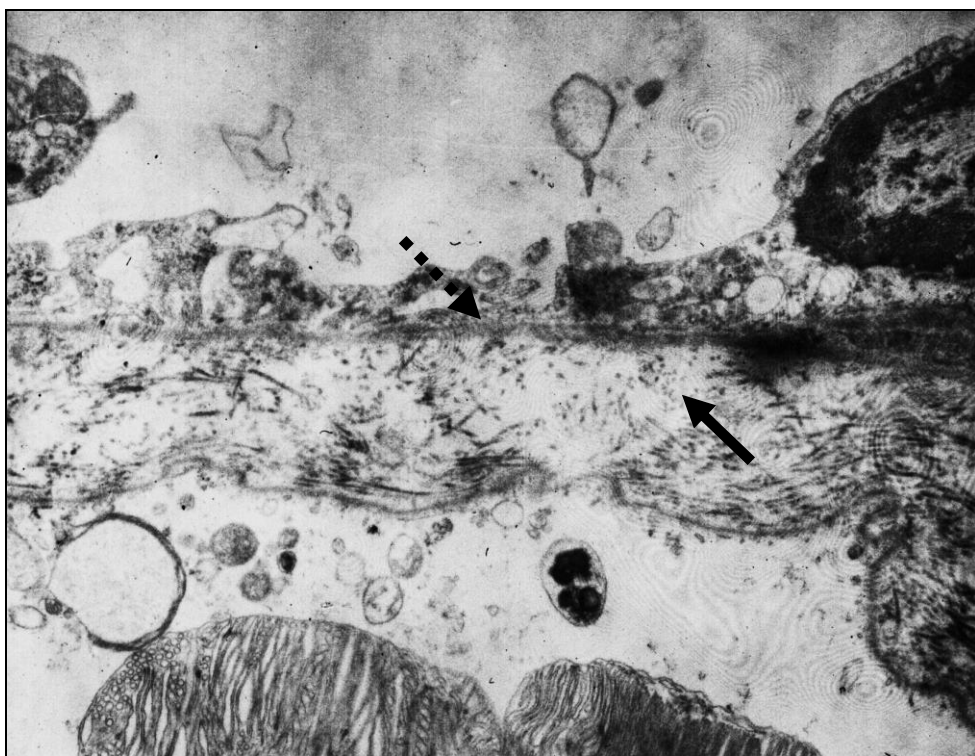


Рис. 43. Лизис пигментоцитов с замещением их коллагеновыми волокнами (стрелка), истончение базального комплекса (пунктирная стрелка) сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув.4000

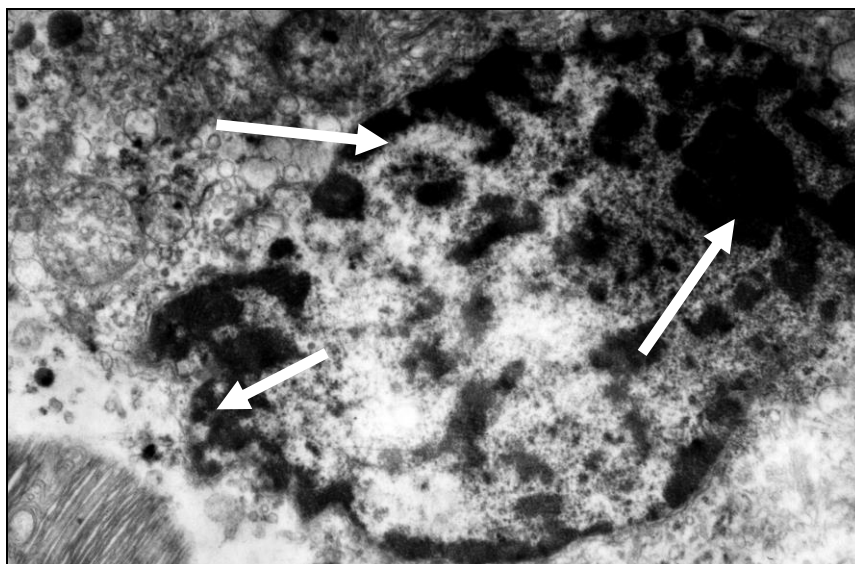


Рис. 44. Начальные признаки апоптотической гибели пигментоцита сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув.6000. Прикраевая конденсация хроматина в ядре (стрелки).

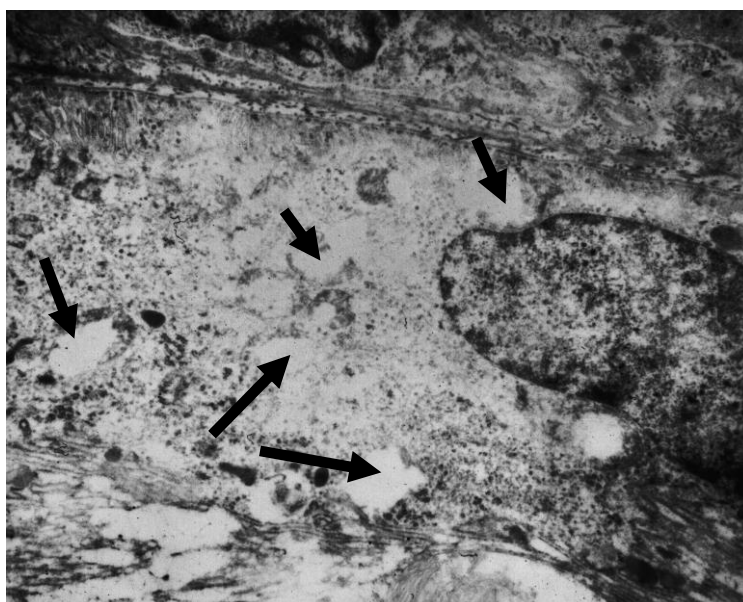


Рис. 45. Вакуолизация цитоплазмы пигментоцита, дегенерация митохондрий, истончение базальной складчатости (БС) сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув.4000

Количественный анализ иммунопозитивных к ростовым факторам элементов сетчатки показал дисбаланс про- и антиангиогенных факторов VEGF и PEDF в интратретиальных сосудах. В хориоидальных сосудах активации процессов ангиогенеза по данным иммуногистохимического анализа не наблюдается. Иммунопозитивными к VEGF и PEDF являются ассоциативные и ганглионарные нейроны (рис. 46, 47).

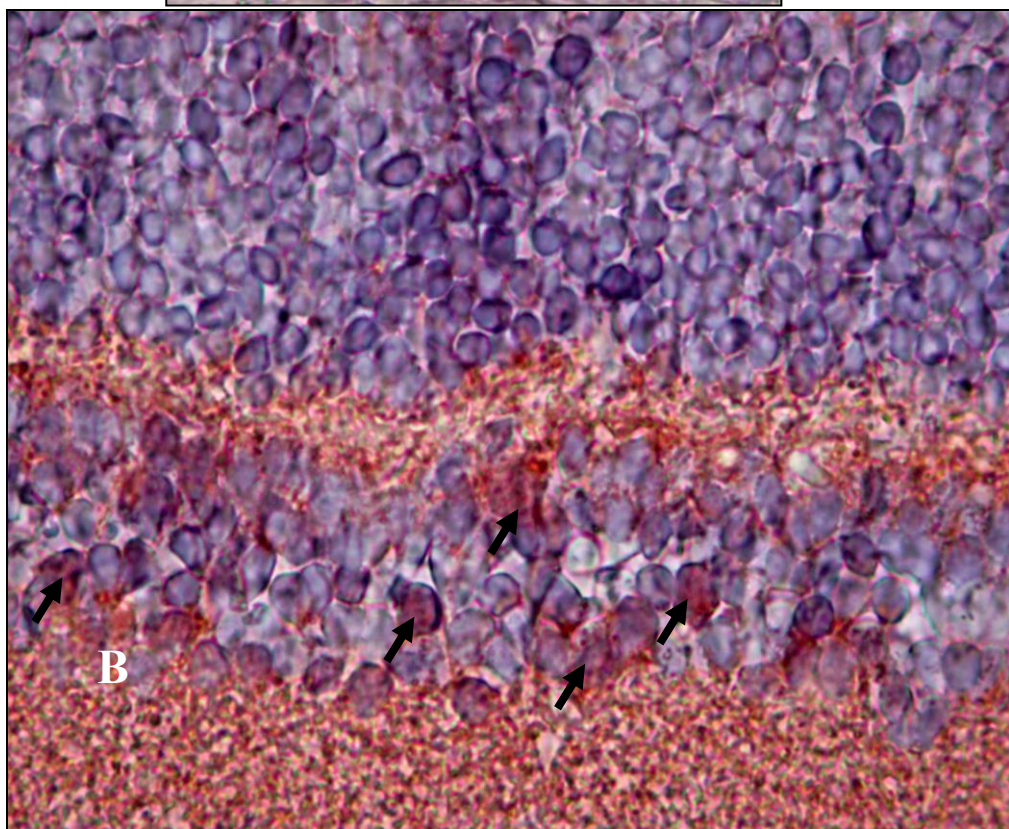
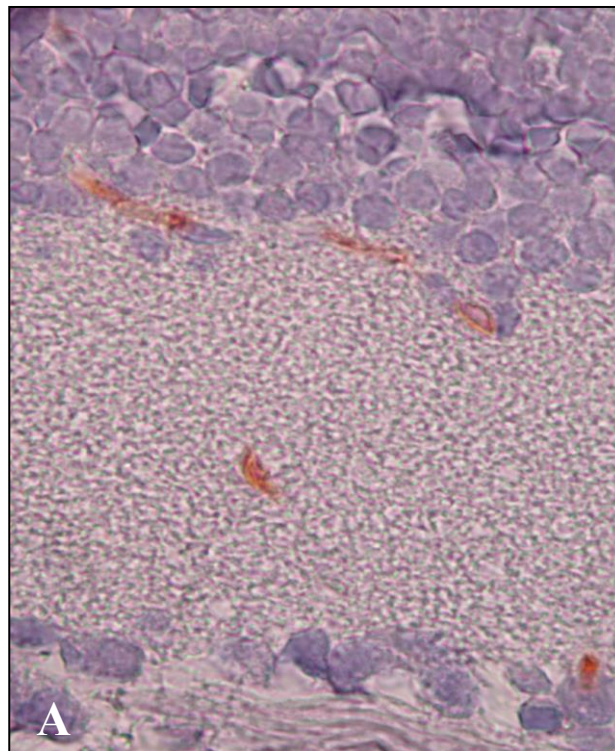


Рис. 46. Иммунопозитивные к VEGF клеточные элементы сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом (стрелки) А. Отрицательный контроль реагентов. В. Иммуноокрашивание с VEGF. Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

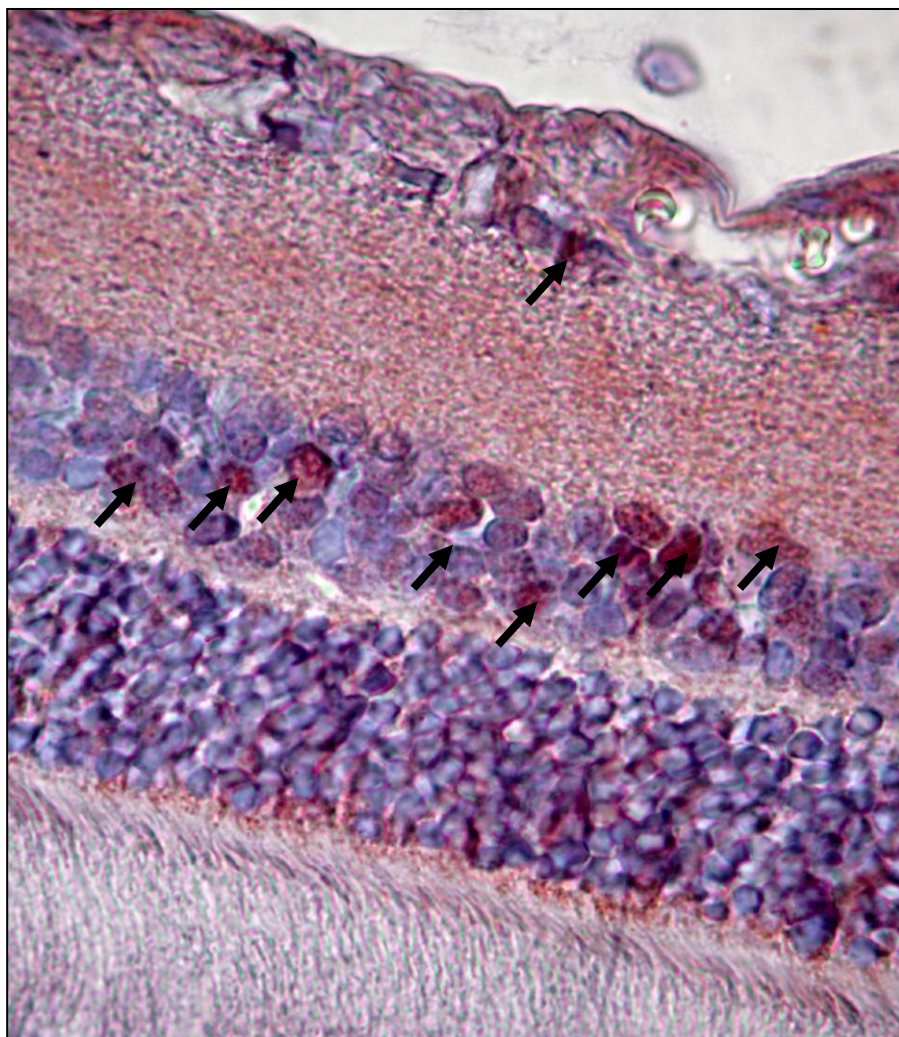


Рис. 47. Сетчатка крыс со стрептозотоциновым диабетом. Ассоциативные нейроны, иммунопозитивные к PEDF (стрелки). Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

При стрептозотоциновом диабете длительностью 2 месяца наблюдается повышение процента ассоциативных и ганглионарных нейронов, иммунопозитивных к VEGF в 3 раза и снижение процента упомянутых видов нейронов, иммунопозитивных к PEDF в 2 раза (табл. 21), что, возможно, связано с развивающейся гипоксией сетчатки и дегенерацией ПЦ. Так, количественно наблюдается снижение удельной площади ПЦ в 1,4 раза относительно контрольных значений ($p < 0,05$, табл. 22).

В слое ПЦ сетчаток крыс с коррекцией диборнолом и тиофаном также встречаются небольшие участки деструкции, однако изменения затрагивают лишь цитоплазму клеток, что говорит о потенциальной возможности

Таблица 21.

Количественная оценка иммунопозитивных к VEGF и PEDF структурных элементов хориоретинального комплекса крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом и тиофаном

группы	антитела	инtrarетинальные сосуды (%)	ассоциативные нейроны (%)	ганглионарные нейроны (%)
Интakтные	VEGF	4,25±0,66	0	3,28±0,74
	PEDF	8,32±0,80	36,33±1,90	37,35±1,80
Диабет	VEGF	6,48±1,22	2,95±0,11*	11,21±1,23*
	PEDF	5,60±0,78*	18,51±0,75*	17,33±0,40*
Диабет+диборнол	VEGF	5,83±0,74	0 ⁺	4,53±0,76 ⁺
	PEDF	7,61±0,80	30,44±2,50⁺	39,51±2,39
Диабет+тиофан	VEGF	6,63±0,84	0 ⁺	10,89±1,06 [#]
	PEDF	6,54±1,39	34,2±2,50⁺	32,45±3,57[#]

Таблица 22.

Количественный анализ пигментцитов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции антиоксидантами

	Удельная площадь пигментцитов сетчатки (%)
Контроль	5,43±0,1
Диабет	3,21±0,2 ⁺⁺
Диабет -диборнол	4±0,5 [*]
Диабет - тиофан	5,32±0,47 ^{*+##}

регенерации ПЦ, сохранности гематоретинального барьера и ограничению неоангиогенеза. Количественно тиофан полностью предупреждает развитие дегенеративных изменений ПЦ, о чем говорит отсутствие достоверных различий с показателем удельной площади ПЦ интактных животных, тогда как значение удельной площади слоя ПЦ в срезе сетчатки крыс, получавших диборнол, остается в 1,4 раза меньше контрольных значений ($p < 0,05$, табл. 22). Это согласуется с результатами иммуногистохимического окрашивания VEGF и PEDF-иммунопозитивных клеточных элементов сетчатки. Так, в группе с коррекцией диборнолом процент PEDF- и VEGF-иммунопозитивных ассоциативных и ганглионарных нейронов был на уровне контрольных значений, что говорит, вероятно, о функциональной активности ПЦ и снижении гипоксии в сетчатке. В группе животных, леченых тиофаном, наблюдается аналогичная картина, однако процент иммунопозитивных к VEGF ганглионарных нейронов остается все же в 3,3 раза выше значений контроля (табл. 21).

Через 2 месяца течения стрептозотоцинового диабета развиваются деструктивные изменения НК. Часть наружных сегментов подвергаются

вакуолизации и разрыву (рис. 48), часть фрагментируется и теряет связь с внутренними сегментами. Часть внутренних сегментов сохраняет нормальное строение, в части отмечаются набухание и отек митохондрий, исчезновение крист (рис. 49). Перикарионы НК различного размера, у некоторых клеток наблюдается деформация ядер, между которыми разрастаются гипертрофированные склеральные отростки радиальной глии, увеличивается содержание пикнотичных ядер НК, характеризующихся повышением осmioфилии ядра и цитоплазмы, встречаются клетки с выраженным отеком цитоплазмы (рис. 50).

Наблюдается смещение одиночных погибших ядер НК в фотосензорный и наружный ядерный слой (рис. 51).

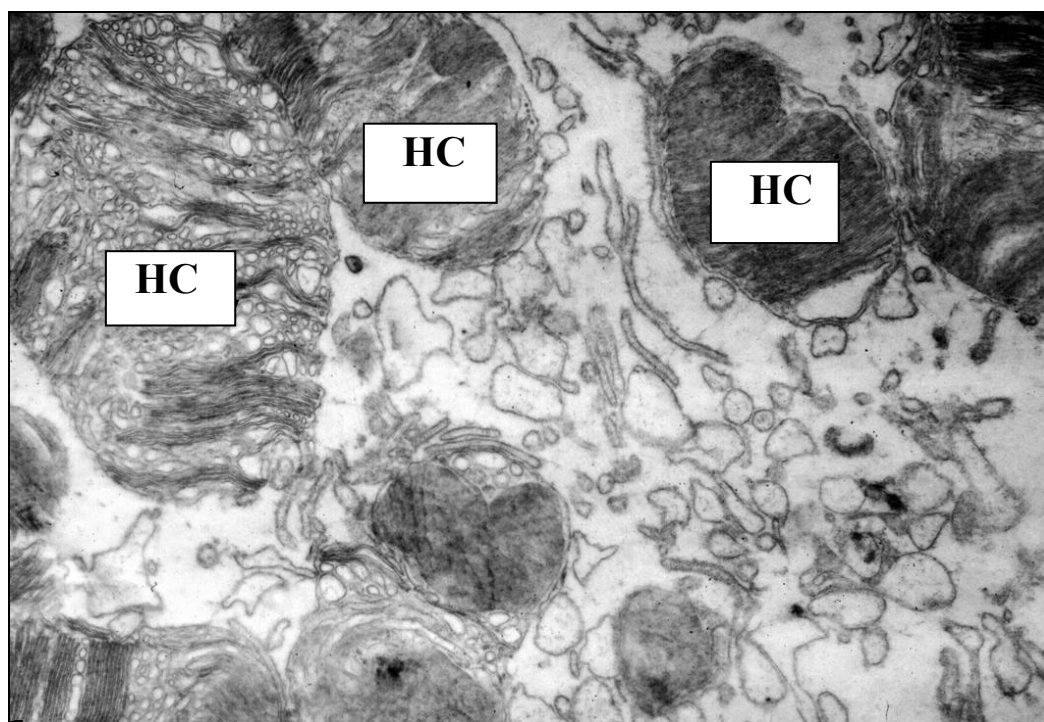


Рис. 48. Расслоение, фрагментация, вакуолярная дегенерация мембран наружных сегментов фоторецепторов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. НС – наружные сегменты. Электронограмма. Ув 6500.

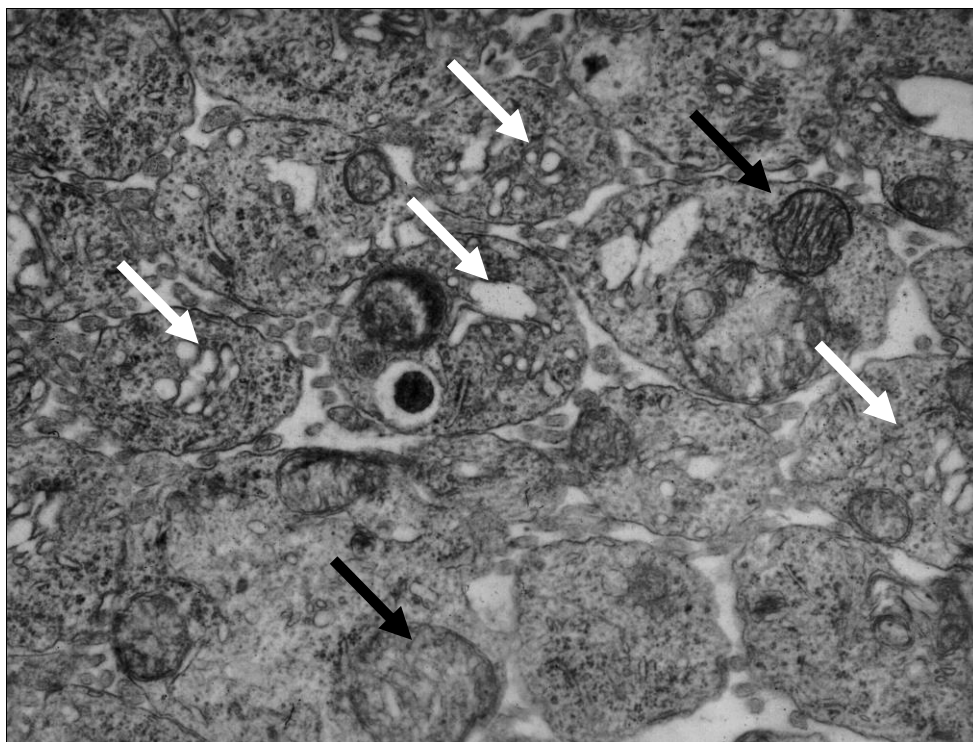


Рис. 49. Внутренние сегменты нейросенсорных клеток сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Отек и расширение крист митохондрий (стрелки), расширение цистерн эндоплазматической сети (белая стрелка), которые служат местом образования вакуолей. Частичное растворение эллипсоида. Электронограмма. Ув. 3500

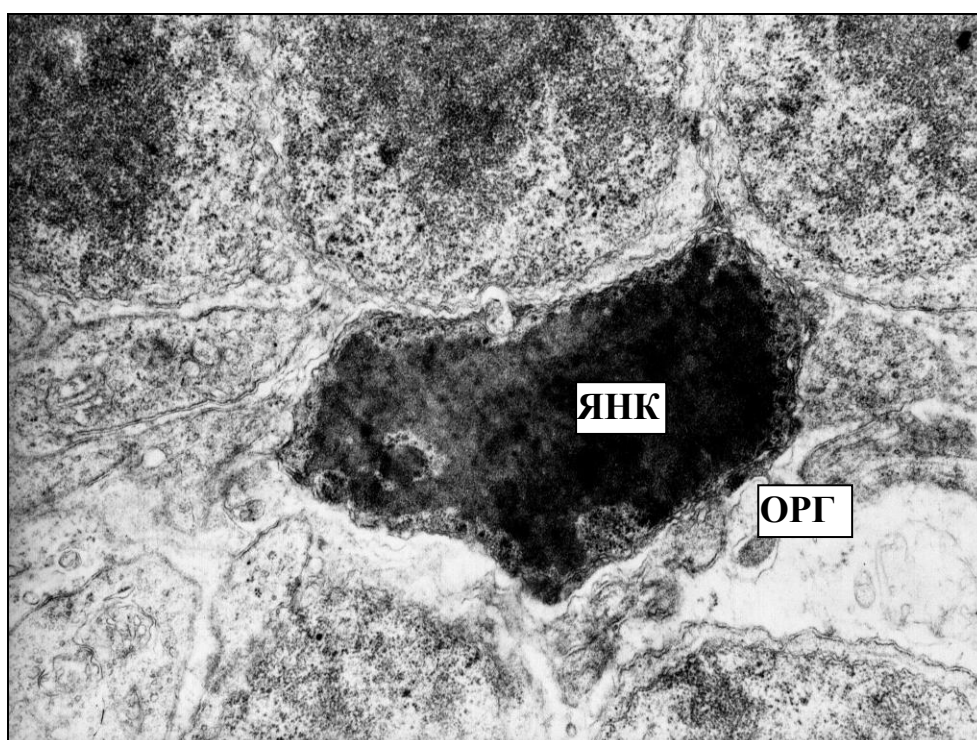


Рис. 50. Пикноз ядра нейросенсорной клетки (ЯНК), гипертрофия склеральных отростков радиальных глиоцитов (ОРГ) сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув 3500.

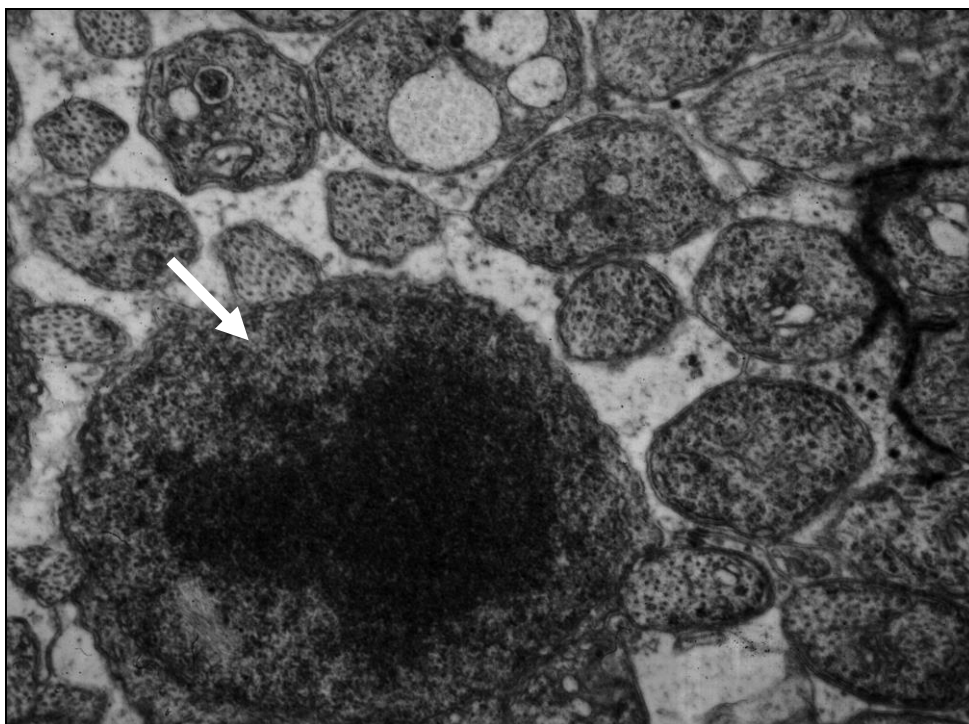


Рис. 51. Миграция нейросенсорной клетки в фотосенсорный слой сетчатки крысы со стрептозотоциновым диабетом (стрелка). Электронограмма. Ув 3500.

На светооптическом и электронномикроскопическом уровне встречаются клетки, вероятно, подвергающиеся апоптотической гибели с конденсацией и маргинацией хроматина в ядре, однако р-53-иммунопозитивных клеток в НЯС сетчатки не обнаружено.

Морфоколичественный анализ НЯС сетчатки контрольных животных выявил достоверное увеличение НК с пикнозом ядра в 3 раза ($p < 0,05$), значимое снижение численной плотности распределения ядер в НЯС в 1 мм^2 среза в 1,5 раза (табл. 23, $p < 0,05$), что говорит о значительной дегенерации НК как за счет гипоксии, так и развития окислительного стресса.

Применение диборнола предотвращает деструкцию НК, снижая пикноз ядер до значений контроля, что, вероятно, связано напрямую с проявлением антиоксидантных и гемореологических свойств препарата, и опосредованно через потенцирование защитных свойств функционально активных ПЦ по отношению к НК.

Таблица 23.

Показатели деструкции наружного ядерного слоя сетчаток крыс со стрептозотоциновым диабетом

Группы эксперимента	Пикноз ядер НК (%)	Численная плотность ядер НК на 900 мкм ² среза	Количество рядов ядер НК в НЯС
Контроль	0,2±0,02	35989,72±454,52	13,1±0,35
Диабет	0,63±0,06*	24209,96±2478,5*	6,70±0,15*
Диабет+диборнол	0,24±0,04 ⁺	24528,48±1982,15*	9,09±0,67* ⁺
Диабет+тиофан	0,75±0,15* [#]	32484,1±1189,58* [#]	9,28±0,19* ⁺

Численная плотность ядер НК в 1 мм² среза сетчатки не отличается от значений контроля, что свидетельствует, вероятно, о реактивных изменениях склеральных отростков радиальных глиоцитов в виде гипертрофии. При применении тиофана в качестве корректора нарушений сетчатки при стрептозотоциновом диабете процент пикнотически измененных НК остается в 3,6 раз выше аналогичного показателя группы с коррекцией диборнолом ($p<0,05$, табл. 23).

Исследование люминол-зависимой хемилюминесценции в ткани сетчатки у крыс со стрептозотоциновым диабетом показало, что во всем временном диапазоне уровень свечения гомогената сетчатки достоверно выше значений интактных животных, что свидетельствует об избыточной генерации свободных радикалов кислорода ($p<0,05$). Пик кривой приходится на 1 минуту измерения, при этом уровень хемилюминесценции в 8 раз выше значений контроля ($p<0,05$, контроль: $1,16\pm0,19$ (RLU/мл/сек)* 10^6). После курсового введения диборнола и тиофана в гомогенатах сетчаток наблюдается угнетение интенсивности хемилюминесценции в 1,7 на 1,2,3 минутах регистрации свечения и в 2,3 раза на 4 и 5 минутах по отношению к значениям опытной группы ($p<0,05$, рис. 52), не достигающее, однако, значений интактного контроля (рис. 52).

В последующих экспериментах была изучена кинетика Fe^{+2} -индуцированной хемилюминесценции гомогенатов сетчаток крыс всех экспериментальных групп (рис. 53). Определение антиоксидантной активности (АОА) ткани оценивалось по ее способности подавлять генерацию радикалов в гомогенате сетчатки при добавлении в нее источника

свободных радикалов – сернокислого железа и перекиси водорода, и химического усилителя свечения радикалов - люминола.

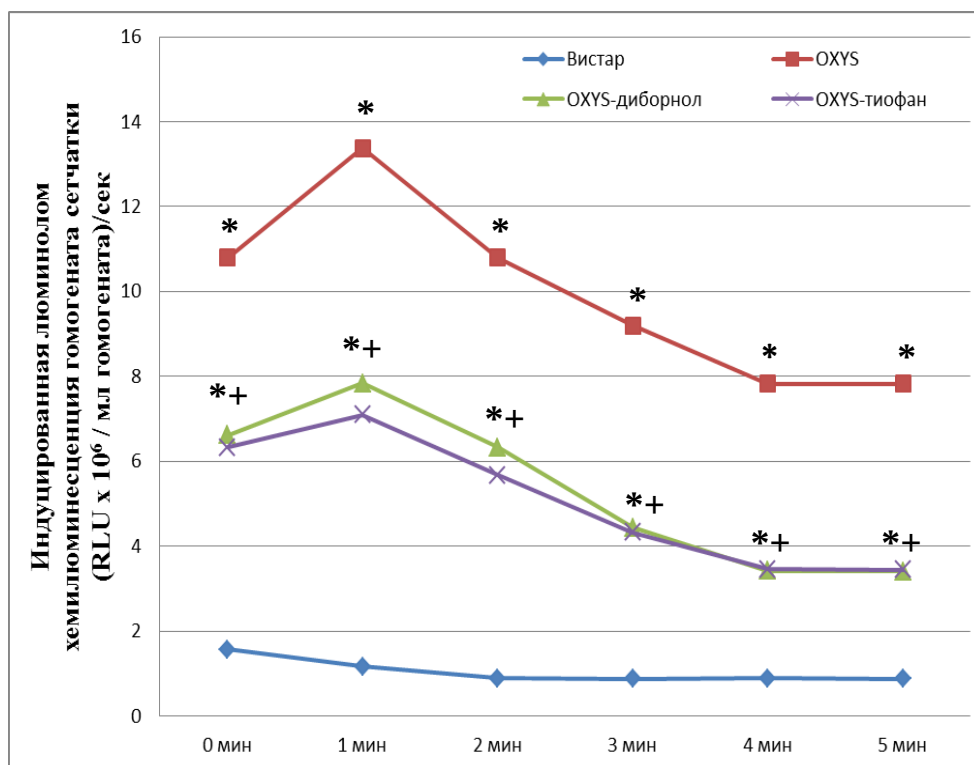


Рис. 52. Уровень, индуцированной люминолом, хемилюминесценции гомогената сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом и тиофаном.

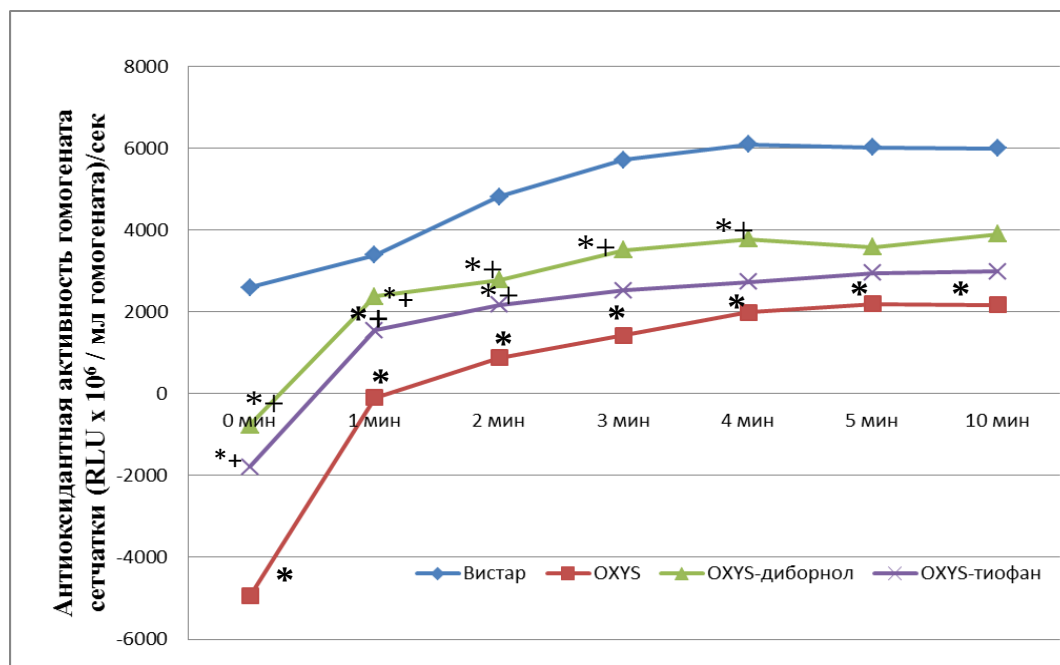


Рис. 53. Уровень антиоксидантной активности гомогената сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом и тиофаном.

Установлено, что уровень АОА в ткани сетчатки у крыс со стрептозотоциновым диабетом достоверно ниже контрольной группы на

всем временном диапазоне измерений, причем, на нулевой минуте фиксируются минимальные значения (рис. 53). Это говорит о развитии синдрома липидной пероксидации в мембранных структурах сетчаток исследуемых животных и преобладании проантиоксидантной над антиоксидантной активностью в них. В группах с коррекцией тиюфаном и диборнолом на нулевой минуте регистрации свечения разница между нулевой (без добавления в пробу гомогената сетчатки) и опытной пробами также отрицательная. Тем не менее, начиная с нулевой по 4 минуту измерений в группе животных, леченых диборнолом и с нулевой по 2 минуту в группе животных, леченых тиюфаном, значения антиоксидантной активности тканей сетчаток достоверно выше группы без коррекции. Однако, на всем временном промежутке измерений они остаются значимо ниже значений интактного контроля (рис. 53). Таким образом, при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 месяцев в тканях сетчатки происходит усиление образования кислородных радикалов, в том числе гидроперекисей, свидетельствующих о развитии синдрома липидной пероксидации. Антиоксиданты диборнол и тиюфан ограничивают процессы липопероксидации в тканях сетчатки, тем самым защищая ее структуры от последствий длительной некомпенсированной гипергликемии.

Через 2 месяца после введения стрептозотоцина изменения ассоциативных нейронов носят реактивный характер. На светооптическом уровне наблюдается отек перикарионов ассоциативных нейронов (рис. 54), что на ультрамикроскопическом уровне выражается в уменьшении числа полисом, фрагментации и набухании цистерн гранулярной ЭПС, деструкции митохондрий (рис. 55, табл. 24). Редко встречаются нейроны с гиперхромией и пикнозом ядер. На основании количественного анализа показано, что нейроны внутреннего ядерного слоя при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 месяца остаются относительно интактны (табл. 25).

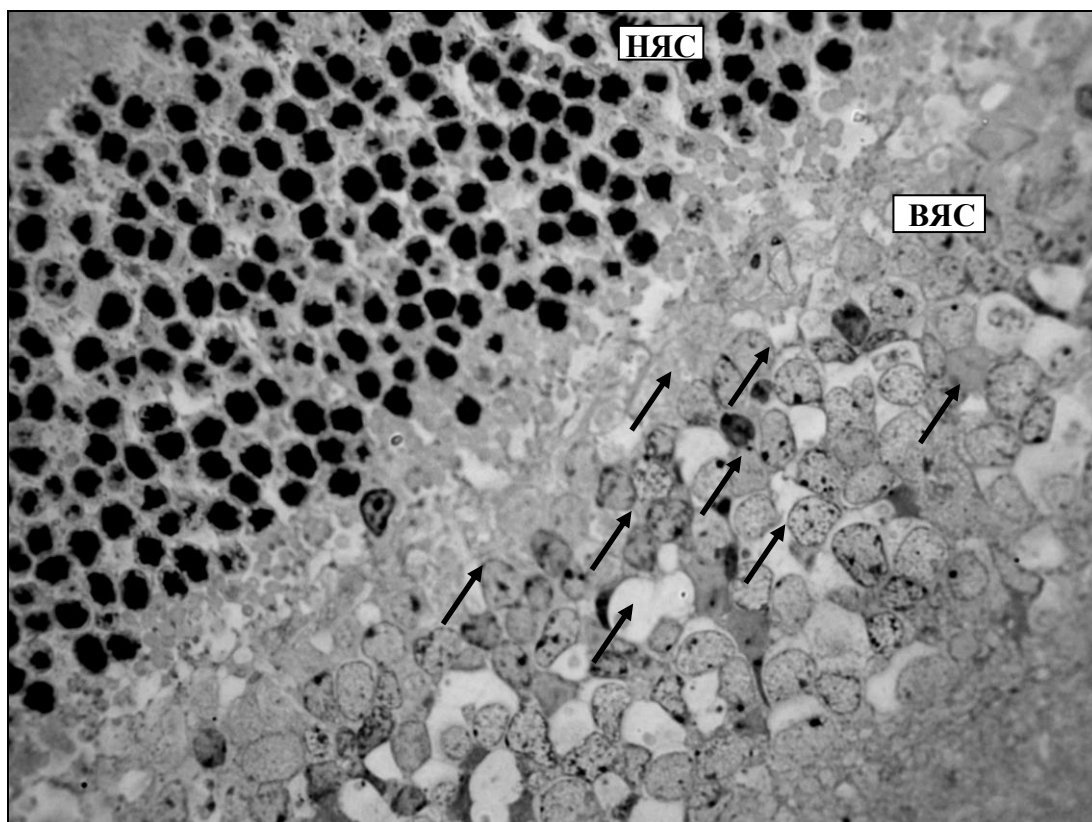


Рис. 54. Сетчатка крыс со стрептозотоциновым диабетом. Отек ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки (стрелки). ВЯС – внутренний ядерный слой, НЯС – наружный ядерный слой.

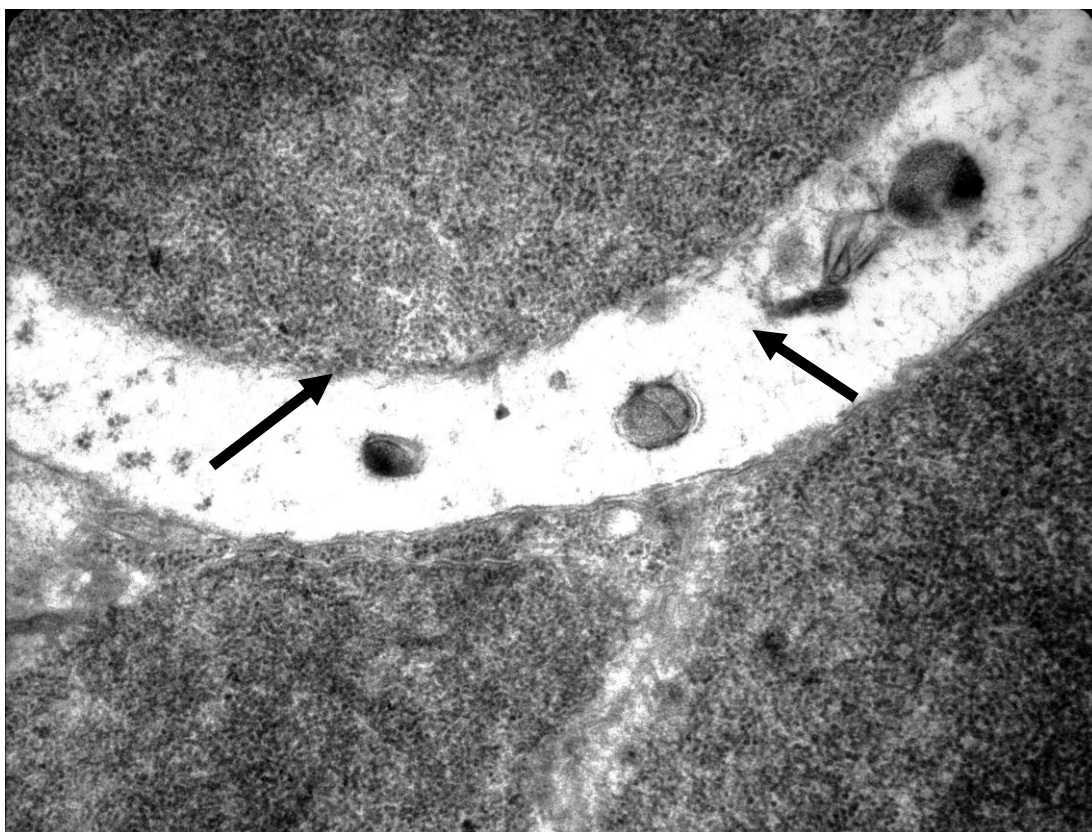


Рис. 55. Отек и деструкция органелл (стрелки) биполярного нейрона внутреннего ядерного слоя сетчатки крысы со стрептозотоциновым диабетом. Ув. 800

Таблица 24.

Удельная площадь органелл в цитоплазме ассоциативных нейронов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции антиоксидантами

Группы эксперимента	митохондрии (%)	гранулярная ЭПС (%)	комплекс Гольджи (%)
Контроль	16,02±1,33	42,53±3,85	0,61±0,12
Диабет	2,23±0,16*	10,56±0,76*	0,07±0,01*
Диабет-диборнол	4,27±0,50* ⁺	17,62±1,23* ⁺	0,41±0,17* ⁺
Диабет-тиофан	3,23±0,22*	14,08±1,19*	0,11±0,02* [#]

Таблица 25.

Количественный анализ внутреннего ядерного слоя сетчаток крыс со стрептозотоциновым диабетом

Группы эксперимента	Гиперхромные и пикноморфные ассоциативные нейроны (%)	Гиперхромные и пикноморфные радиальные глиоциты (%)	Глионейрональный индекс (ГНИ)
Контроль	0,85±0,27	2,1±0,33	0,37±0,01
Диабет	0,96±0,56	4,22±0,42*	0,21±0,02*
Диабет-диборнол	0,8±0,32	2,9±0,21 ⁺	0,3±0,02
Диабет-тиофан	0,89±0,11	4,39±0,76 [#]	0,24±0,03

На фоне стрептозотоцинового диабета возрастает количество реактивно измененных радиальных глиоцитов, характеризующихся снижением электронной плотности, вакуолизацией цитоплазмы, отеком склеральных отростков. Наряду с реактивными изменениями, преимущественно на границе между наружным сетчатым и внутренним ядерным слоями, наблюдаются деструктивные изменения мюллеровских глиоцитов в виде повышения электронной плотности цитоплазмы и пикноза ядра. Большое количество радиальных глиоцитов подвержены грубым дегенеративным изменениям митохондрий, цистерн ЭПС и КГ, что способствует вакуольному перерождению цитоплазмы. Ядра характеризуются неровностью контуров кариолеммы и высокой степенью конденсации хроматина (рис. 56). Склеральные отростки радиальных глиоцитов гипертрофированы и отечны, в их цитоплазме содержатся лизосомы, фагосомы с частицами фоторецепторных элементов, вакуоли. Число пикноморфных радиальных глиоцитов относительно интактного контроля увеличивается в 2 раза ($p<0,05$), что сопровождается снижением глионейронального индекса на 43% ($p<0,05$; табл. 25). Таким образом,

радиальные глиоциты сетчатки обладают большей чувствительностью к длительной гипергликемии, чем окружающие их ассоциативные нейроны.

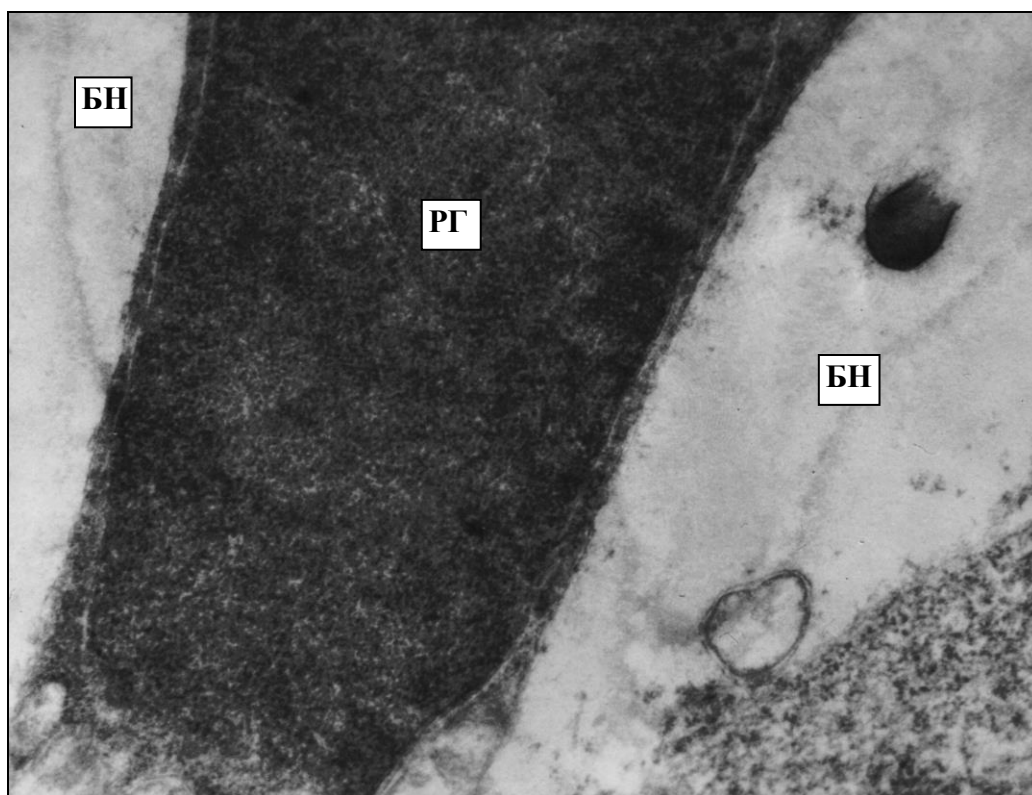


Рис. 56. Гиперхромный пикноморфный радиальный глиоцит (РГ) между отечными биполярными нейронами (БН) во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув. 10000

Курсовое введение диборнола восстанавливает значения изучаемых показателей глии до исходного уровня, тогда как в группе с коррекцией тиюфаном процент пикноморфных радиальных глиоцитов выше значений группы сравнения в 1,5 раза ($p < 0,05$; табл. 25).

Иммуногистохимический анализ некоторых маркеров апоптоза в ассоциативных нейронах и радиальных глиоцитах сетчатки при стрептозотоциновом диабете выявил активацию апоптотической гибели небольшой части клеток и реализацию ее с помощью каспазного механизма, однако значимых изменений изучаемых показателей между группами выявлено не было (табл. 26, 27).

Таблица 26.

Количественная оценка структурных элементов хориоретинального комплекса крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом и тиофаном, иммунопозитивных к каспазе-9 и каспазе-3

группы	антитела	ассоциативные нейроны	радиальные глиоциты	ганглионарные нейроны
Интактные	caspase 9	0	0	0
	caspase 3	0	0	0
Диабет	caspase 9	0,38±0,21	0,08±0,08	5,10±0,39*
	caspase 3	0	0	0
Диабет+диборнол	caspase 9	0,22±0,13	0	3,64±1,84
	caspase 3	0,01±0,01	0	0,20±0,20
Диабет+тиофан	caspase 9	0,06±0,01	0,07±0,03	1,97±0,26*
	caspase 3	0	0	0

Таблица 27.

Количественная оценка структурных элементов хориоретинального комплекса крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции диборнолом и тиофаном, иммунопозитивных к p 53 и bcl-2

группы	антитела	ассоциативные нейроны (%)	радиальные глиоциты (%)	ганглионарные нейроны (%)
Интактные	p 53	0	0	0
	bcl-2	0,04±0,02	0	0,06±0,03
Диабет	p 53	0,09±0,05	0,05±0,05	4,93±2,21*
	bcl-2	0	0,02±0,02	0,82±0,35
Диабет+диборнол	p 53	0,06±0,06	0	0,50±0,27
	bcl-2	0,13±0,05	0,08±0,05	1,41±0,22*+
Диабет+тиофан	p 53	0,88±0,59	0,08±0,03	4,71±1,58
	bcl-2	0,12±0,04	0,07±0,02	1,44±0,24*+

Изменения мультиполярных нейронов сетчатки животных со стрептозотоциновым диабетом характеризуются в основном различной степени выраженности хроматолизом. Ультрамикроскопически наблюдаются изменения со стороны гранулярной и агранулярной ЭПС, цистерны которых изогнуты и фрагментированы, некоторые резко расширены и служат местом образования вакуолей. Отмечается снижение содержания в цитоплазме рибосом, деструкция митохондрий с исчезновением крист (рис. 57). Встречается также “темный тип” изменения ганглионарных нейронов с деформацией, повышением осмиофилии ядра и редукцией органелл в цитоплазме (рис. 58).

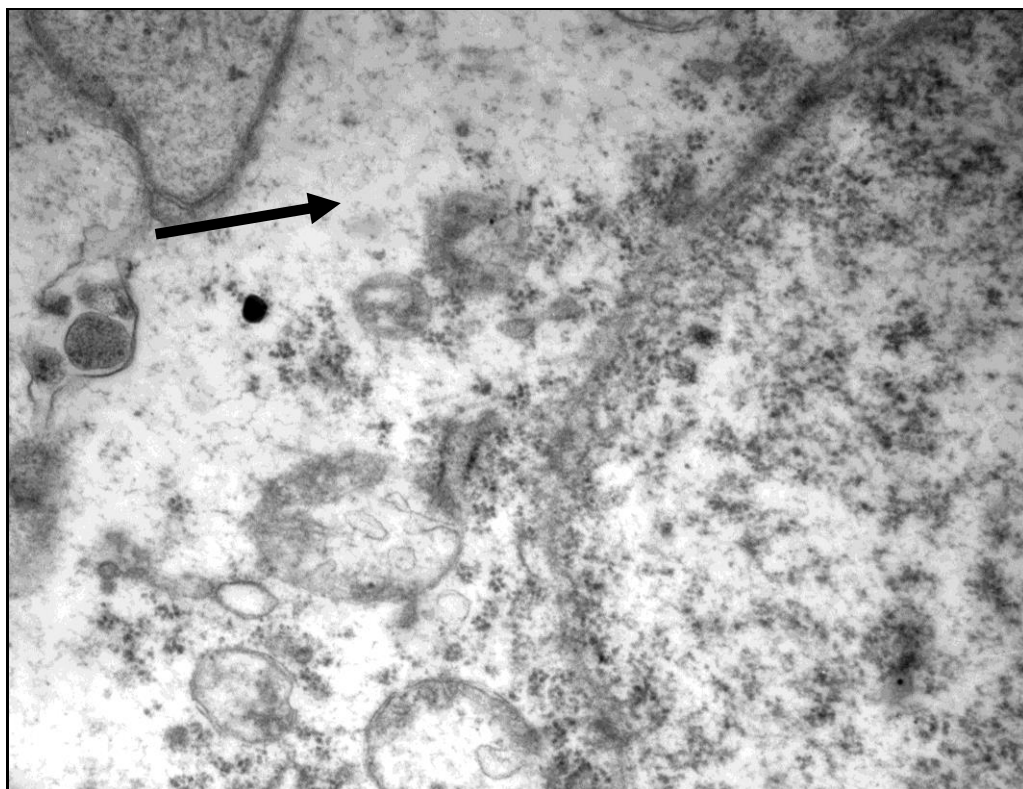


Рис. 57. Очаговый хроматолиз (стрелка) ганглионарного нейрона сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Электронограмма. Ув. 3500

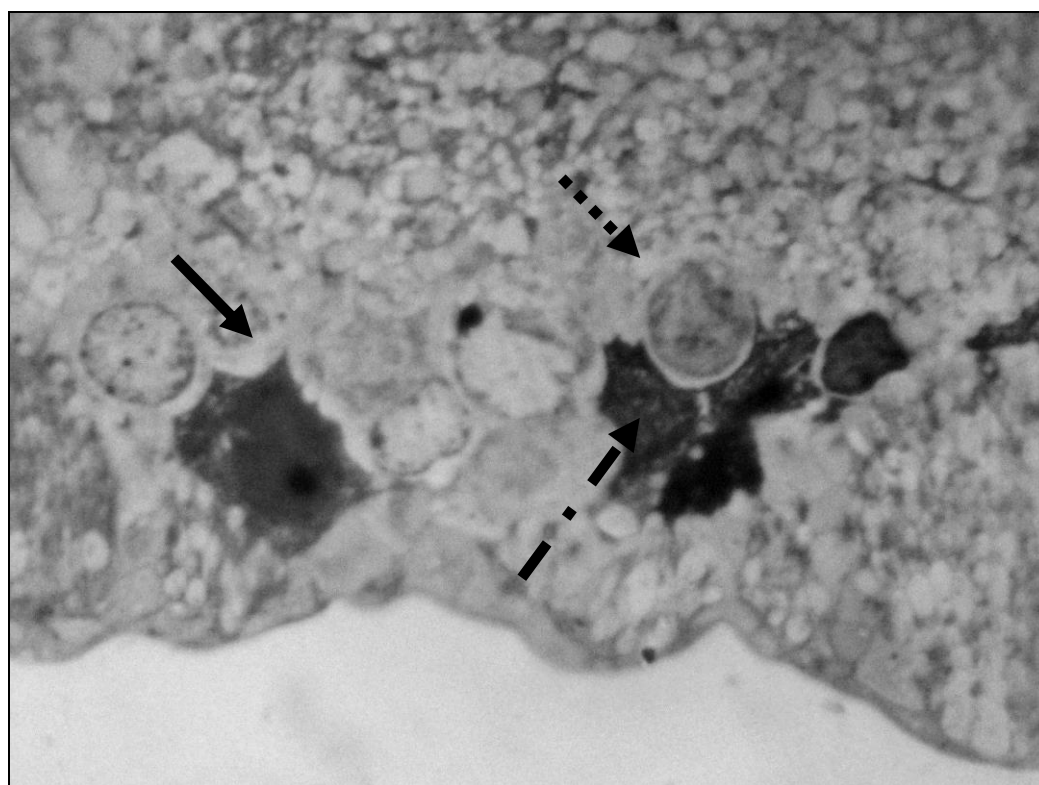


Рис. 58. Внутренние слои сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. Пикноморфный ганглионарный нейрон (стрелка), нейрон с тотальным хроматолизом (пунктирная стрелка) и, окружающие его, пикноморфные астроглициты (стрелка точка-пунктир). Полутонкий срез. Ув. 1000

Количественно у крыс контрольной группы наблюдается увеличение процента ганглионарных нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом в среднем в 10 раз ($p < 0,05$), в 3,8 раз увеличивается число пикноморфных ганглионарных нейронов ($p < 0,05$, табл. 28), происходит значимое снижение удельной площади митохондрий, гранулярной ЭПС и КГ в 2 раза, 3 раза и 4 раза соответственно ($p < 0,05$, табл. 29). Проведенный иммуногистохимический анализ некоторых маркеров апоптотической гибели клеток выявил пятикратное возрастание p 53- и каспаза-9-иммунопозитивных ганглионарных нейронов (табл. 26, 27), что говорит о неотъемлемой роли апоптоза в деструкции мультиполярных нейронов сетчатки при стрептозотоциновом диабете.

Введение диборнола приводит к достоверному снижению всех показателей деструкции ганглионарных нейронов сетчатки крыс с экспериментальной диабетической ретинопатией, однако контрольных значений достигает лишь показатель изменения ганглионаров по “темному типу”. Тиофан оказывает аналогичное диборнолу влияние на хроматолитические процессы в ганглионарных нейронах, однако процент пикноморфных мультиполярных нейронов остается выше значений группы с диборнолом в 3,5 раза ($p < 0,05$; табл. 28). Этот факт, возможно, объясняется значительной дегенерацией митохондрий в цитоплазме изучаемого вида нейронов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции тиофаном. Так, показатель удельной площади митохондрий под влиянием тиофана остаётся на уровне значений группы без лечения, вместе с тем, остальные показатели обеих групп с коррекцией достоверно выше опытной группы и не отличаются от значений контроля (табл. 29). При коррекции обоими антиоксидантами имеет место ограничение p53-зависимого апоптоза в виде значимого снижения процента p53-иммунореактивных ганглионаров и увеличения процента bcl-2-иммунопозитивных мультиполярных нейронов (табл. 27).

Таблица 28.

Количественный анализ ганглионарного слоя сетчатки крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом

Группы эксперимента	Ганглионарные нейроны с пикнозом ядра (%)	Ганглионарные нейроны с очаговым хроматолизом (%)	Ганглионарные нейроны с тотальным хроматолизом (%)
Контроль	1,53±0,34	3,55±0,23	0,80±0,18
Диабет	5,87±0,47*	37,02±5,79*	8,5±1,22*
Диабет - диборнол	1,24±0,69+	24,34±2,58*+	3,48±0,41*+
Диабет - тиофан	4,38±0,74*#	26,20±2,25*+	4,45±0,49*+

Таблица 29.

Удельная площадь органелл в цитоплазме ассоциативных нейронов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции антиоксидантами

Группы эксперимента	митохондрии (%)	гранулярная ЭПС (%)	комплекс Гольджи (%)
Контроль	14,49±0,72	50,03±1,62	0,84±0,12
Диабет	7,14±0,67*	16,22±1,37*	0,21±0,04*
Диабет-диборнол	12,50±0,70*+	41,28±2,60*+	0,61±0,09+
Диабет-тиофан	8,67±0,46*#	38,69±1,37*+	0,62±0,10+

В группе со стрептозотоциновым диабетом отмечается миграция со стороны стекловидного тела макрофагов, что говорит о воспалении (рис. 59).

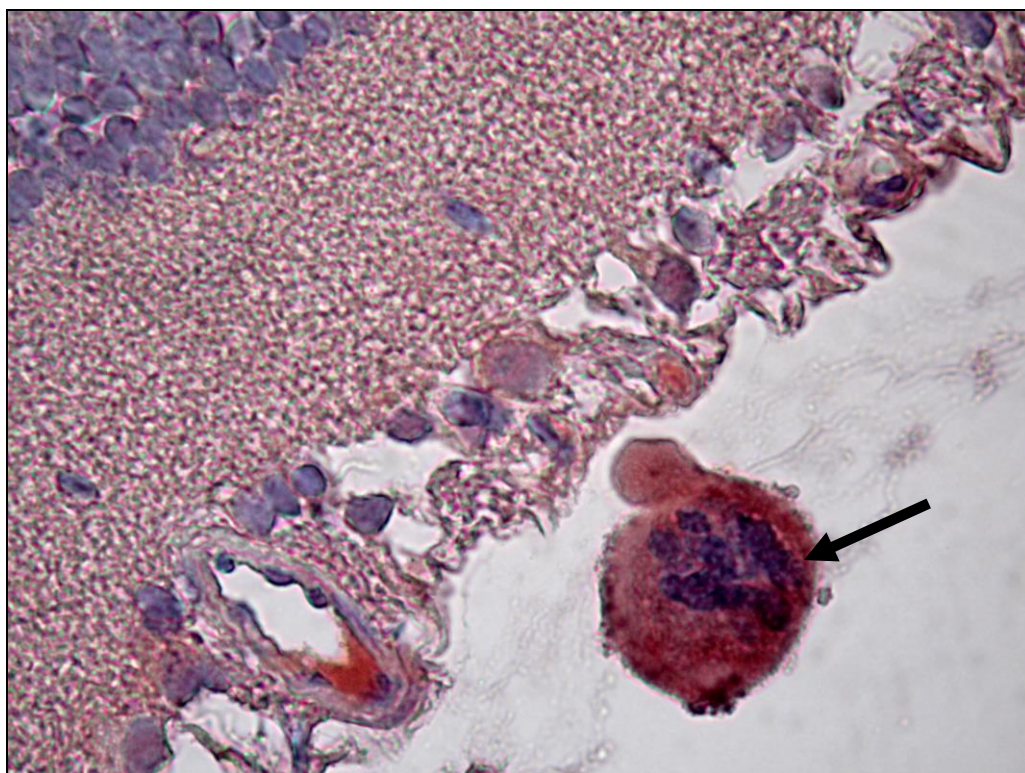


Рис. 59. Миграция гигантского макрофага (стрелка) в витреальное пространство глаза крыс со стрептозотоциновым диабетом. Иммуногистохимическая реакция на выявление каспазы-3, докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

Первоначальная реакция синапсов на любое воздействие проявляется в виде изменений контактов по светлому типу с набуханием отростков, дезагрегацией синаптических везикул, отеком митохондрий, что мы наблюдали в сетчатке крыс всех экспериментальных групп (рис. 60).

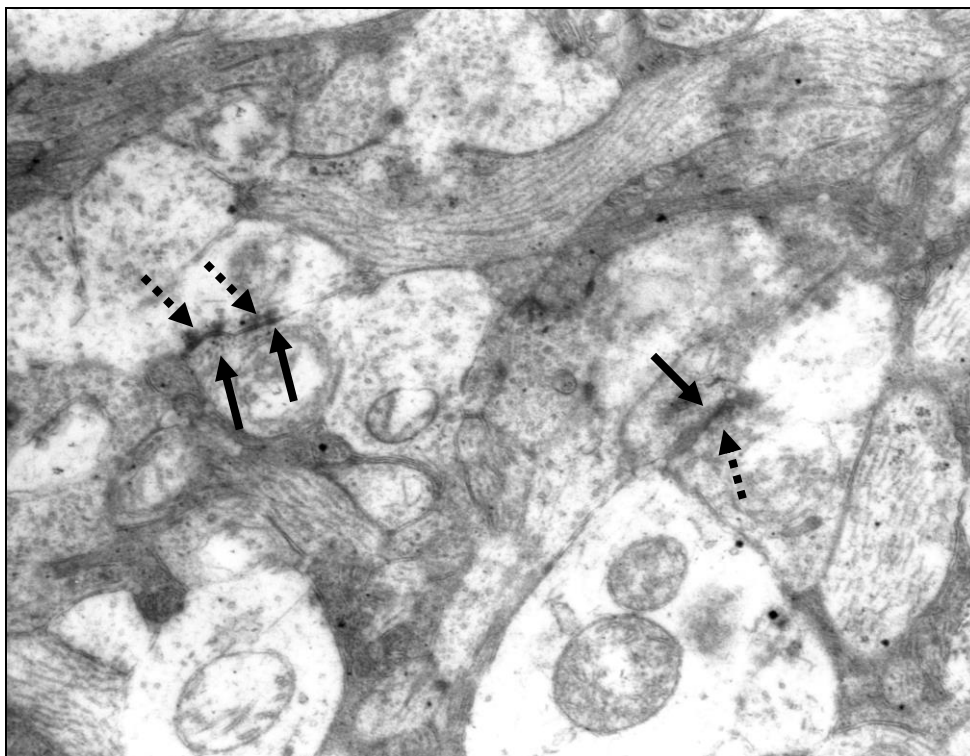


Рис. 60. Просветление цитоплазмы, отек, дегенерация митохондрий (М), уменьшение числа синаптических пузырьков (пунктирные стрелки), их агглютинация в пресинаптической части синапсов во внутреннем сетчатом слое сетчатки крысы. Увеличение протяженности активной зоны контакта перфорированного синапса (стрелки). Электронограмма. Ув. 15000

При стрептозотоциновом диабете происходит значительное снижение общей численной плотности синапсов в 4 раза, как за счет симметричных, так и асимметричных синапсов ($p < 0,05$, табл. 30). Причем, на фоне дегенерации синапсов с малой длиной АЗК, в 2,7 раза возрастает число синапсов с длиной АЗК 500-700 мкм ($p < 0,05$, табл. 31). Геометрия таких гипертрофированных синапсов усложняется наличием нескольких активных зон выделения медиатора, синапсы из простых неперфорированных превращаются в сложные перфорированные, что является компенсаторной реакцией на длительную гипоксию ткани сетчатки при гипергликемии. Изменениям подвергается и система субсинаптических единиц асимметричных межнейрональных контактов внутреннего сетчатого слоя сетчатки крыс (рис. 61), которые становятся размытыми. Значимо снижается

содержание функционально активных синапсов с различной высотой ПП типа А, В и С в 1,9 раза, 2 раза и 1,7 раза соответственно ($p < 0,05$, табл. 32).

Диборнол и тиофан оказывают положительное влияние на синаптоархитектуру сетчатки при стрептозотоциновом диабете: в обеих группах отмечается сохранность общей популяции синапсов в среднем на 77% относительно показателя у животных без коррекции. Все же общая численная плотность синапсов на 100 мкм^2 нейропиля остается значимо выше значений интактного контроля ($p < 0,05$, табл. 30). Сохранность синапсов обеспечивается главным образом за счет асимметричных плоских синапсов со средней АЗК 200-300 и 300-500 мкм и высотой плотных проекций до 60 нм ($p < 0,05$, табл. 31, 32), что способствует улучшению нейрональных взаимодействий в сетчатке и частично препятствует их гибели.

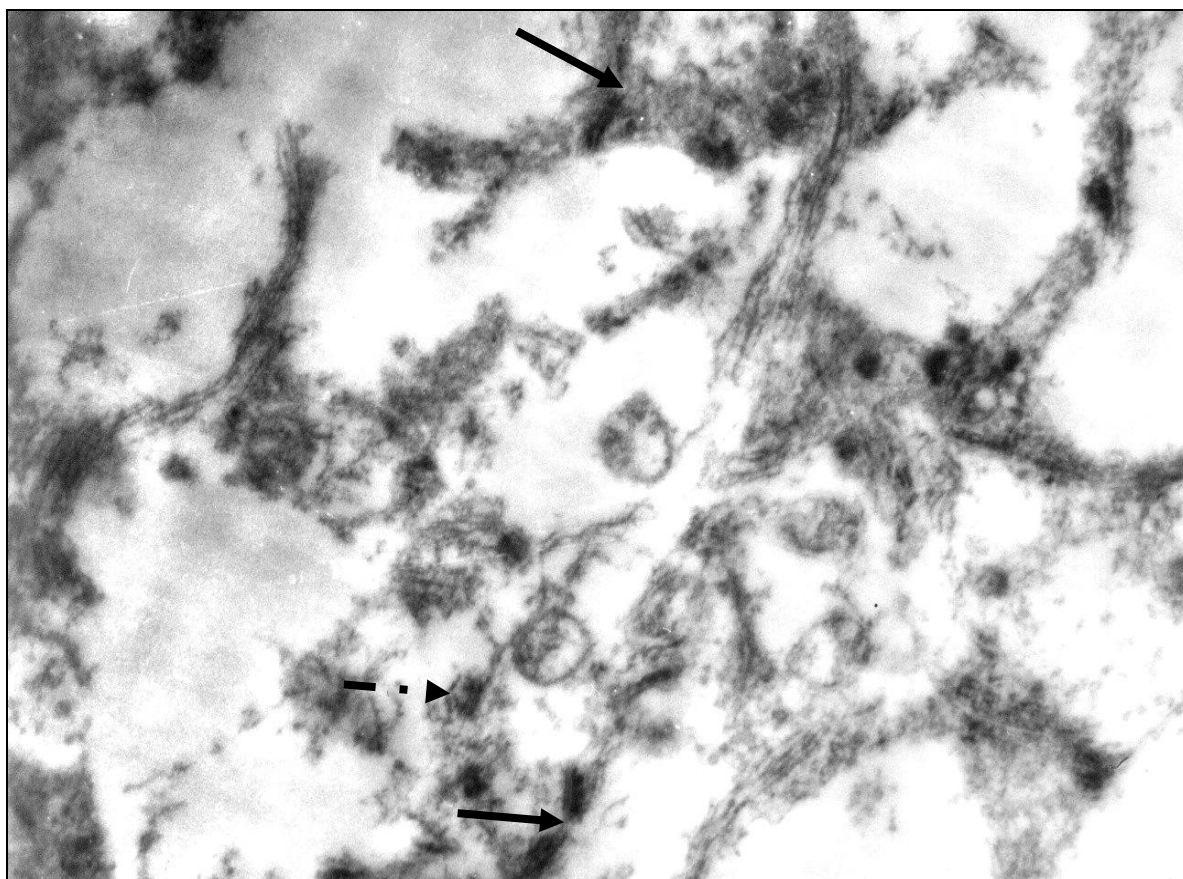


Рис. 61. Межнейрональные контакты внутреннего ядерного слоя сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом. “++”-изогнутый перфорированный синапс (стрелка). Положительно изогнутый синапс с неравномерным прокрашиванием плотных проекций. Симметричный синапс (пунктирная стрелка). Электронограмма. Контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой. Ув. 15000

Таким образом, стойкая гипергликемия длительностью 2 месяца напрямую и опосредованно через развитие синдрома повышенной вязкости крови и повышение окислительного напряжения в тканях, способствует дегенерации эндотелиоцитов и перицитов хориокапилляров, мембраны Бруха, ПЦ, входящих в наружный гематоретинальный барьер, что приводит к развитию гипоксии сетчатки, усилению тромбообразования, отрицательным сдвигам в системе про- и антиангиогенеза. Это вызывает дегенеративные изменения НК, ганглионарных нейронов, синаптических контактов и радиальной глии. Преобладает некротическая форма гибели клеток, однако встречаются и другие формы - апоптоз и аутофагия.

Исследуемые препараты диборнол и тиофан проявляют разные по силе ретинопротекторные свойства. Диборнол обладает гемореологической и антиоксидантной активностями, снижая показатели вязкости крови, уменьшая агрегацию эритроцитов и уровень спонтанной и индуцированной хемилюминесценции в сетчатке животных со стрептозотоциновым диабетом, что на морфологическом уровне способствует повышению адаптационных свойств сетчатки: увеличению удельной площади открытых функционирующих сосудов, снижению удельной площади сосудов со стазом, сладжем или тромбозом, снижению дегенерации НК, ганглионарных нейронов, радиальной глии, частичному восстановлению площади синаптических связей контактирующих нейронов. Тиофан, проявляя лишь антиоксидантные свойства, ограничивает дегенерацию ПЦ, в некоторой степени способствует защите структур ганглионарных нейронов и синаптических контактов от повреждающего влияния гипергликемии.

3.3. ИЗМЕНЕНИЯ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА КРЫС ЛИНИИ OXYS С ВОЗРАСТНОЙ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ НА ФОНЕ КОРРЕКЦИИ ТИОФАНОМ И ДИБОРНОЛОМ

Совместные исследования, предшествующие настоящей работе, проведенные в институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск) под руководством проф. Н.Г. Колосовой, показали, что параллельно с катарактой у крыс линии OXYS развиваются клинические проявления хориоретинальной дистрофии, аналогичные наблюдаемым при возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей. Первые признаки ХРД у крыс линии OXYS регистрируются в возрасте 5-6 недель и достигают выраженных стадий к 12-14 месяцам. К возрасту 6 месяцев клинические признаки поражения сетчатки регистрируются у 100% крыс линии OXYS. При этом изменений сетчатки у крыс линии Вистар обнаружено не было. Морфологический и ультраструктурный анализ сетчатой оболочки глаз крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3, 6, 18 и 24-х месяцев выявил определенные закономерности развития хориоретинальной дегенерации у крыс OXYS. Поражение структурных компонентов сетчатки у OXYS и Вистар неспецифичны, однако возраст манифестации морфологических изменений и скорость развития ретинопатии резко отличаются. У OXYS дегенеративные изменения в ПЦ и нарушения микроциркуляции начинаются с 20-дневного возраста и усугубляются к 3-6 месяцам, соответствуя в этот период 17-24-месячным крысам Вистар. Поэтому для дальнейшего детального изучения возрастной хориоретинальной дегенерации крыс OXYS и оценки лечебного эффекта препаратов были выбраны животные 6-ти месячного возраста с ярко выраженной клинической и морфологической картиной заболевания.

Как в центральных, так и в периферических отделах хориоретинальных комплексов крыс линии OXYS в возрасте 6 мес наблюдаются ярко выраженные морфологические изменения со стороны сосудов хориоидеи и

интратретиальных сосудов, в большинстве из которых встречаются конгломераты форменных элементов, а также развивается тромбоз (рис. 62, 63), тогда как у крыс Вистар той же возрастной группы видимых сосудистых нарушений не обнаружено (рис. 64). Также в хориоиде крыс OXYs отмечается пролиферация фибробластоподобных клеток вокруг плазматических капилляров (рис. 65). Количественный анализ сосудистой пластинки сетчатки крыс OXYs выявил достоверное снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов в 2,5 раза и увеличение удельной площади сосудов со сладжем, стазом эритроцитов и тромбозом 16,5 раз по сравнению со значениями у крыс Вистар (табл. 33).

Таблица 33

Количественный анализ хориокапилляров сетчатки крыс OXYs при коррекции диборнолом и тиофаном.

Группы эксперимента	Удельная площадь открытых сосудов хориоидеи (%)	Удельная площадь сосудов хориоидеи со сладжем эритроцитов и тромбозом (%)
Вистар	35,99±3,33	1,52±0,44
OXYs	14,43±0,98*	25,09±1,99*
OXYs-диборнол	29,38±2,01*+	5±1,15+
OXYs-тиофан	4,15±1,19*+ #	17,29±2,08*+ #

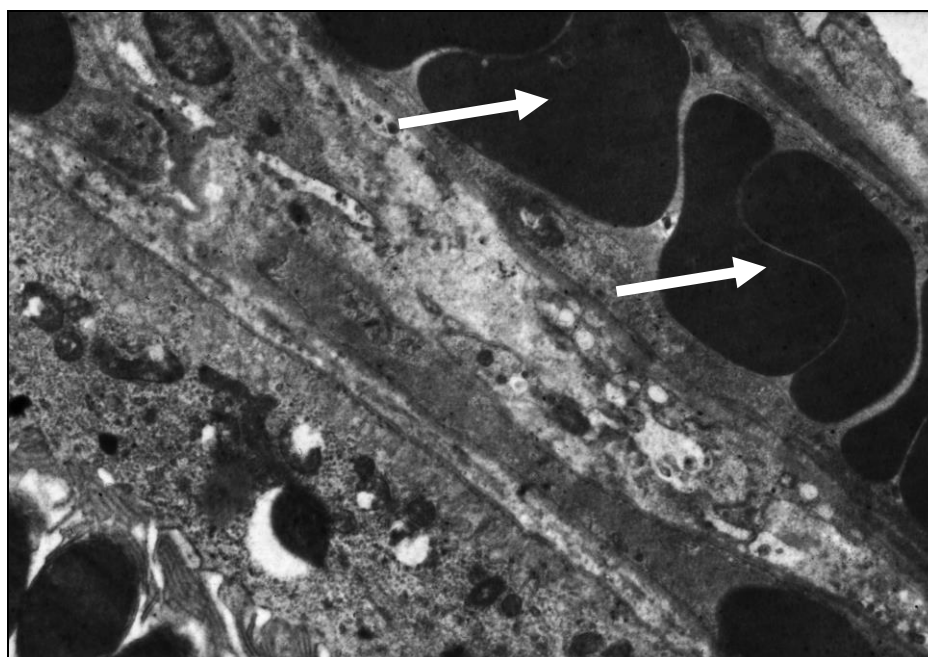


Рис. 62. Стаз форменных элементов в хориокапилляре крысы OXYs в возрасте 6 месяцев (белые стрелки). Электронограмма. Ув. 4800

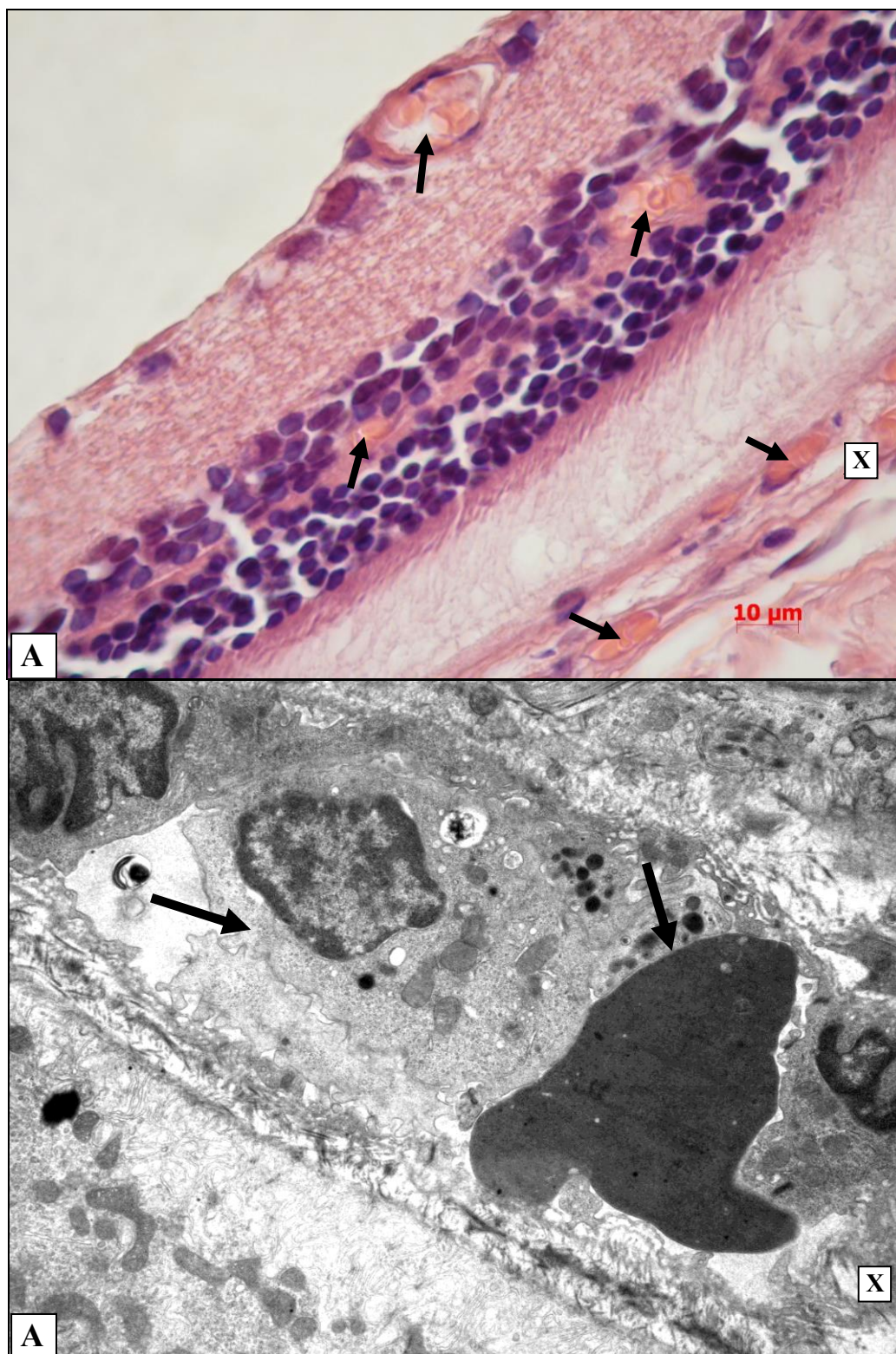


Рис. 63. Явления сладжа и тромбоза (стрелки) капилляров хориоретинального комплекса крыс линии OXYS. А. Окр. гематоксилин и эозин. Ув. 1000.; В. Электронограмма. Ув. 3000.

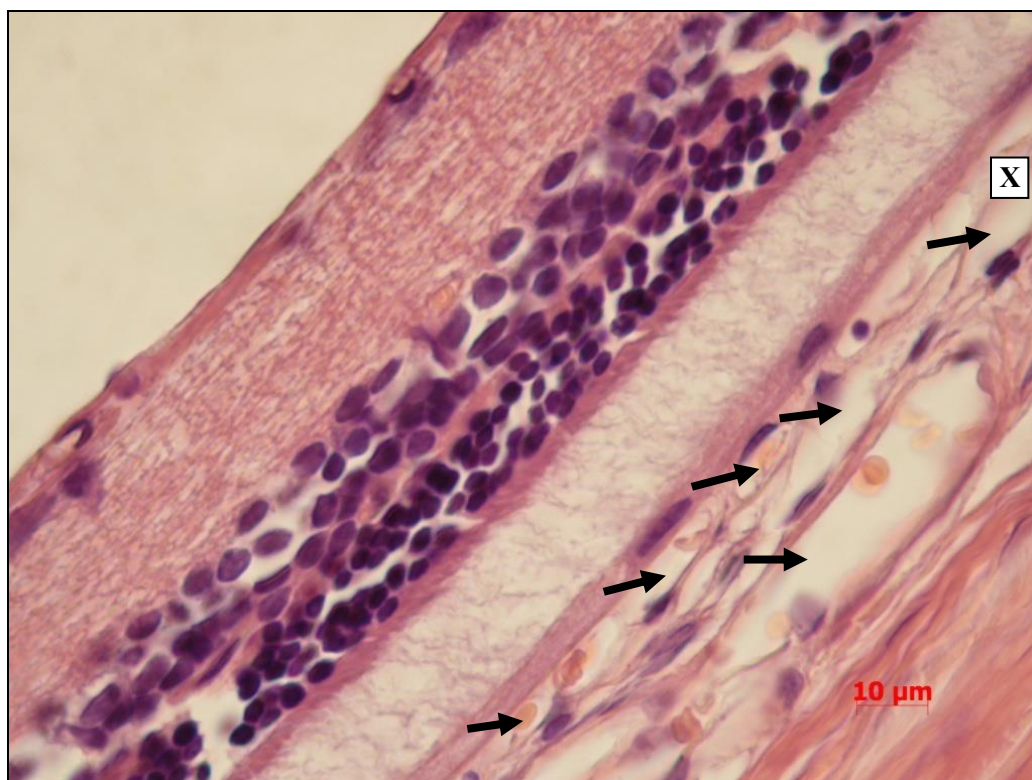


Рис. 64. Хориокапиллярный комплекс крыс Вистар в возрасте 6 мес. Хорио- и интратретиальные капилляры открыты с небольшим количеством форменных элементов (стрелки). Окр. гематоксилин и эозин. Ув. 1000

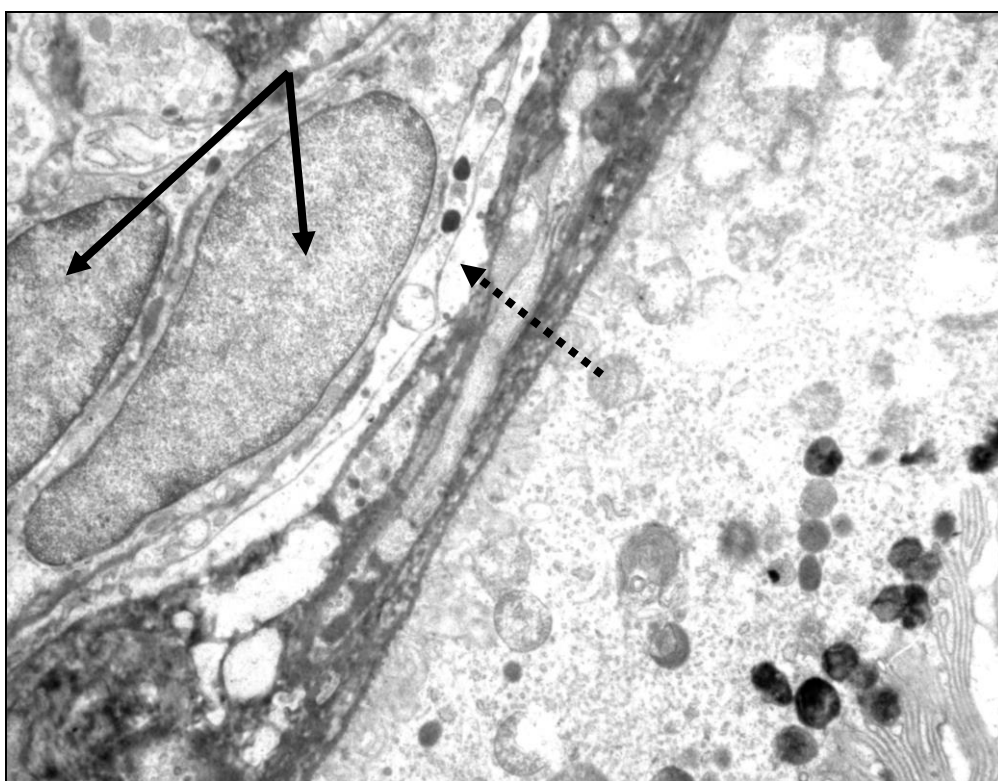


Рис. 65. Фибробластоподобные клетки (стрелки) в хориоиде крыс OXYS около плазматического капилляра. Просвет капилляра (пунктирная стрелка). Электронограмма. Ув. 2500

Со стороны интратретиальных сосудов сетчатки крыс OXYS значимых различий между исследуемыми группами не обнаруживается, однако светомикроскопически в части из них отмечаются явления стаза и сладжа эритроцитов, утолщение базальной мембраны.

Поскольку реологические свойства крови в значительной мере определяют ее транспортный потенциал, то их изменение может стать важным патогенетическим механизмом возрастной хориоретинальной дегенерации. Анализ макро- и микрореологических показателей крови и плазмы крыс OXYS показал, что при равных значениях гематокрита и вязкости плазмы крыс Вистар и OXYS, у последних отмечается повышение вязкости крови на низких скоростях сдвига на 20-17% ($p < 0,05$), снижение полупериода агрегации эритроцитов на 40% и индекса деформируемости эритроцитов во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига на 33-27% ($p < 0,05$) (табл. 34 и 35). Таким образом, для гемореологического профиля крыс OXYS характерным является повышение вязкости крови при низких скоростях сдвига, сочетающееся с выраженной агрегацией и снижением деформируемости эритроцитов, что ведет к снижению доступности кислорода для тканей, замедлению кровотока и последующей активации тромбообразования в микрососудах.

Нарушения гемодинамики закономерно сопровождаются выраженными обратимого характера реактивными и дегенеративными изменениями эндотелия и гематоретинального барьера. Эндотелиоциты синусоидных капилляров хориоидеи крыс OXYS характеризуются снижением электронной плотности цитоплазмы, уменьшением содержания органелл, появлением деформированных ядер, при этом базальная мембрана их утолщена и вакуолизирована (рис. 66, 67). Эта картина дополняется неравномерным утолщением базального комплекса вследствие пролиферации волокнистого компонента (рис. 68).

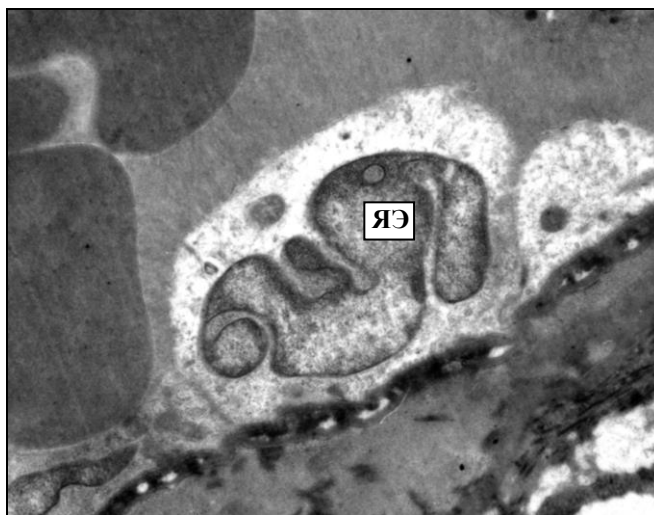


Рис. 66. Деформация ядра и снижение электронной плотности цитоплазмы эндотелиоцита (ЯЭ) хориокапилляра крыс линии OXYS в возрасте 6 мес. Ув. 5000

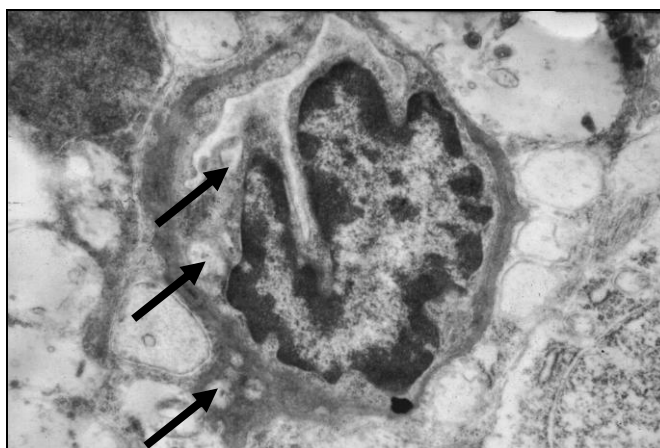


Рис. 67. Плазматический интратетинальный капилляр в наружном сетчатом слое сетчатки крыс линии OXYS. Вакуолизация цитоплазмы эндотелиоцита. Электронограмма. Ув. 9000

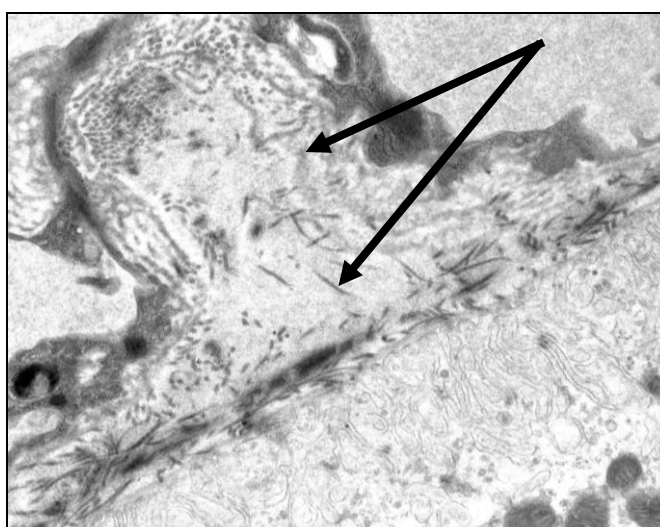


Рис. 68. Неравномерное утолщение базального комплекса (стрелка) крыс линии OXYS в возрасте 6 мес. Электронограмма. Ув. 7500

Подобного характера, но менее выраженные изменения выявляются и со стороны компонентов внутреннего гематоретинального барьера.

В просвете сосудов, в окружающей соединительной ткани и ПЦ встречаются вакуоли липидной природы, которые, вероятно, являются отложением липофусцина (рис. 69), также наблюдается появление большого количества мононуклеарных фагоцитов, отмечена их адгезия с сосудистой стенкой и миграция в околососудистое пространство (рис. 70).

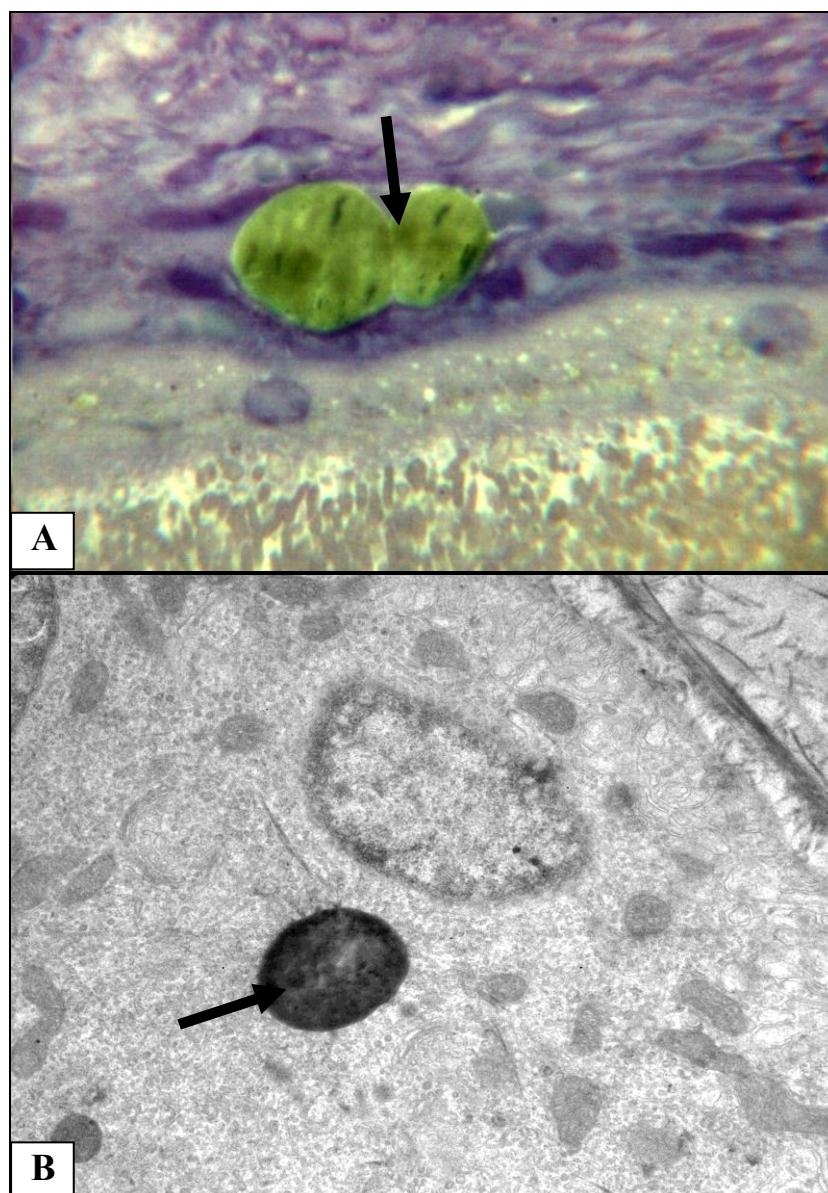


Рис. 69. Отложение гранул липофусцина (стрелка) в хориоиде сетчатки крыс OXYS (A) и пигментном эпителии (B). A. Полутонкий срез. Окр. толуидиновым синим. Ув. 1000. B. Электронограмма. Ув. 4000

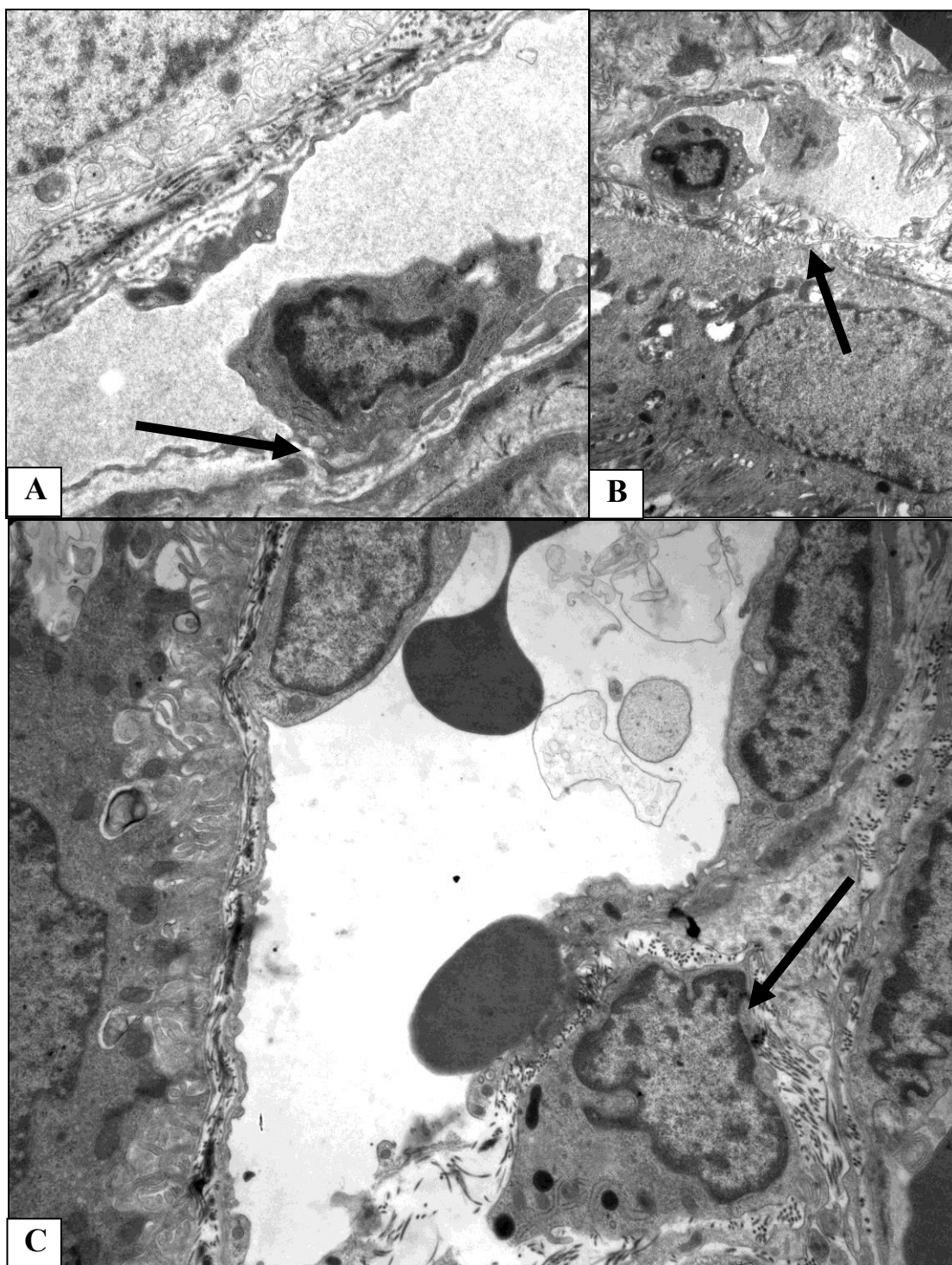


Рис. 70. Этапы миграции мионуклеарного фагоцита из сосудистого русла в интерстициальную ткань хориоидеи крысы линии OXYS в возрасте 6 мес. А. Адгезия моноцита с сосудистой стенкой (стрелка). Электронограмма. Ув. 4000. В. Нарушение целостности мембраны эндотелия хоиркапилляра (стрелка). Электронограмма. Ув. 2000. С. Процесс миграции фагоцита (стрелка). Ув. 5000

Введение диборнола курсом в течение 45 дней улучшает реологические свойства крови. При равных значениях гематокрита, вязкости плазмы крыс групп без лечения и на фоне коррекции, у животных, получавших диборнол, вязкость крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига ниже на 10–

23% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями в группе животных, не получавших препарат (табл. 34). Нормализация показателя вязкости крови крыс OXYS на фоне лечения диборнолом при неизменном показателе гематокрита значительно увеличивает индекс Штольца, что свидетельствует о повышении доступности кислорода для тканей. Под влиянием диборнола происходит снижение агрегации эритроцитов (период полуагрегации эритроцитов выше на 40%); улучшение деформируемости эритроцитов, отражающееся в увеличении индекса деформируемости эритроцитов на 21–34% по сравнению с контролем (табл. 35).

Корреляционный анализ позволил установить, что вязкость крови на низких скоростях сдвига (3, 5, 7 и 10 c^{-1}) у животных, получавших диборнол, взаимосвязана с полупериодом агрегационной активности эритроцитов ($r = -0,74, -0,70, -0,70, -0,66$ соответственно, $p < 0,05$); вязкость крови на скорости сдвига 300 c^{-1} коррелирует с индексом деформируемости эритроцитов на скорости сдвига 90 c^{-1} ($r = -0,95, p = 0,01$), а также с индексом деформируемости эритроцитов на скорости сдвига 180 c^{-1} ($r = -0,91, p = 0,01$) и с индексом деформируемости эритроцитов на скорости сдвига 360 c^{-1} ($r = -0,84, p = 0,02$); вязкость крови на скорости сдвига 100 и 300 c^{-1} коррелирует с индексом деформируемости эритроцитов на 890 c^{-1} ($r = -0,83, p = 0,02$ и $r = -0,89, p = 0,01$ соответственно).

Проведенное исследование гемореологии крыс OXYS полностью нашло подтверждение при морфологической оценке сетчатой оболочки глаз крыс этой группы. Курсовое введение диборнола оказывает мощный положительный эффект на состояние сосудов хориоидеи крыс OXYS, что на уровне количественного анализа выражается в достоверном увеличении удельной площади открытых функционирующих сосудов в 2 раза и снижении сосудов со сладжем или тромбозом в 5 раз. В группе же с коррекцией тиофаном протекторный эффект ограничивается сокращением удельной площади сосудов со стазом сладжем или тромбозом в 1,5 раза относительно группы сравнения (табл. 33).

Известно, что снижение общей антиокислительной и антирадикальной активности крови и тканей при многих зависимых от возраста заболеваниях, приводит к дисбалансу различных показателей прооксидантной и антиоксидантной систем. Крысы OXYS являются экспериментальной моделью преждевременного старения организма, поэтому патофизиологические и морфологические изменения, происходящие в крови и органах крыс OXYS, должны подчиняться канонам старения. При оценке свободных радикалов в гомогенате сетчатки крыс OXYS методом индуцированной люминолом хемилюминесценции выявлено, что площадь светосуммы под кривой хемилюминесценции максимальна и достоверно отличается от значений интактного контроля Вистар ($p < 0,05$, рис. 71).

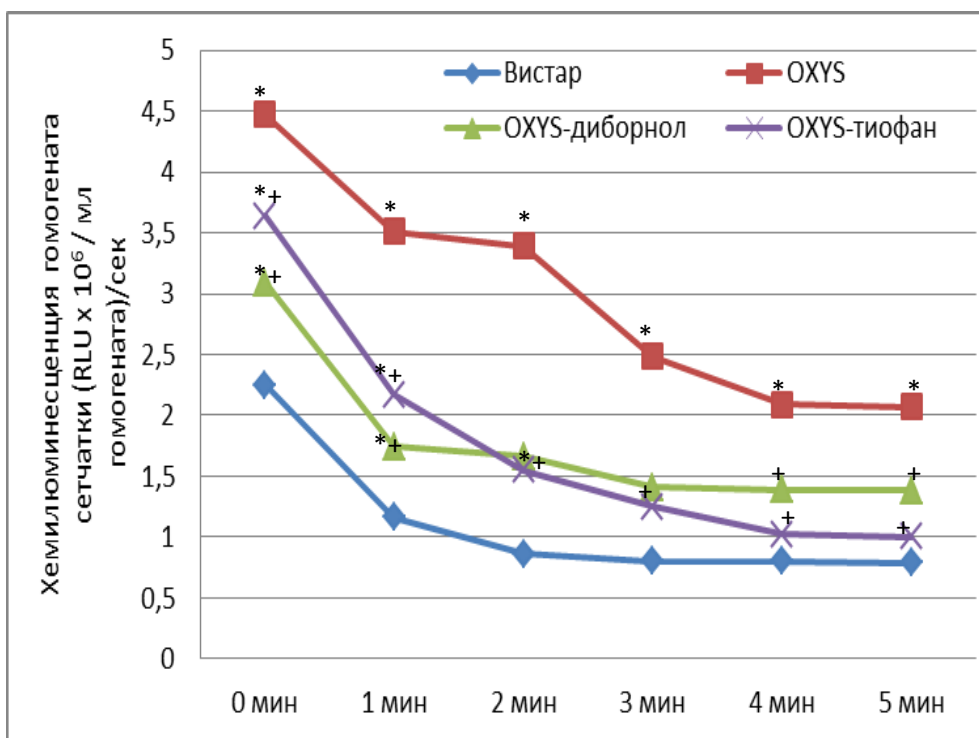


Рис. 71. Уровень индуцированной люминолом хемилюминесценции гомогената сетчатки крыс OXYS на фоне коррекции диборнолом и тиофаном.

При этом кривая хемилюминесценции имеет несколько иную направленность, чем в группах сравнения: интенсивность свечения падает медленнее и выходит на плато только на 4 минуте регистрации. Это связано, вероятно, с интенсивно идущими процессами образования радикалов кислорода в тканях сетчатки крыс OXYS. Уровень общей антиоксидантной активности (АОА) в тканях сетчатки крыс OXYS также значительно ниже

значений интактной группы на всем временном промежутке измерений ($p < 0,05$, рис. 71). Таким образом, в сетчатке крыс линии OXYS в возрасте 6 месяцев растет способность к радикалообразованию и теряется способность противостоять деструктивному влиянию гидроперекисей. Это, наряду с сосудистыми изменениями, вероятно, способствует поражению всех структурных элементов сетчатки. Применение препаратов диборнола и тиофана приводит к ограничению радикалообразования в сетчатке, причем на 3, 4 и 5 минутах регистрации хемилюминесценции исследуемых проб исследуемый показатель значимо не отличается от контроля Вистар (рис. 71, 72). Антиоксидантная активность гомогенатов сетчаток крыс OXYS с коррекцией и диборнолом, и тиофаном достоверно выше значений группы без коррекции, однако не достигает показателей Вистар (рис. 71, 72).

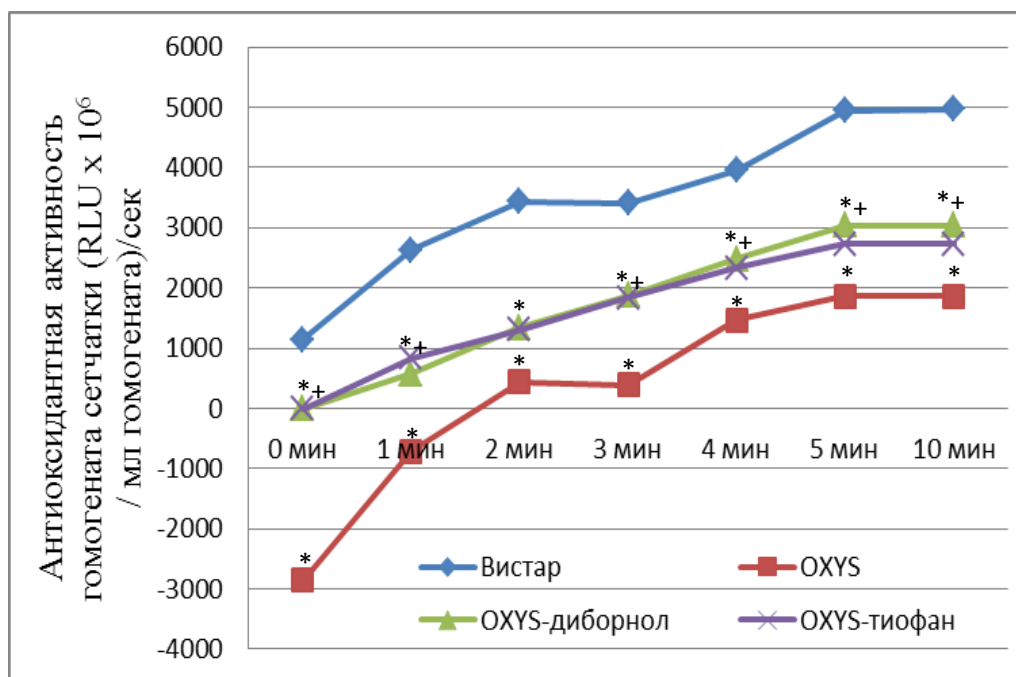


Рис. 72. Уровень антиоксидантной активности гомогената сетчатки крыс OXYS на фоне коррекции диборнолом и тиофаном.

Изменения ПЦ сетчатки у крыс OXYS проявляются в виде деструкции микроворсинок (рис. 73), сглаживания базальной складчатости цитолеммы, набухания и деструкции крист митохондрий, появления в цитоплазме большого числа вакуолей и микровезикул (рис. 74), отмечаются очаговые деструктивные изменения клеток в виде уменьшения в объеме и повышения электронной плотности ядра цитоплазмы (рис. 75).

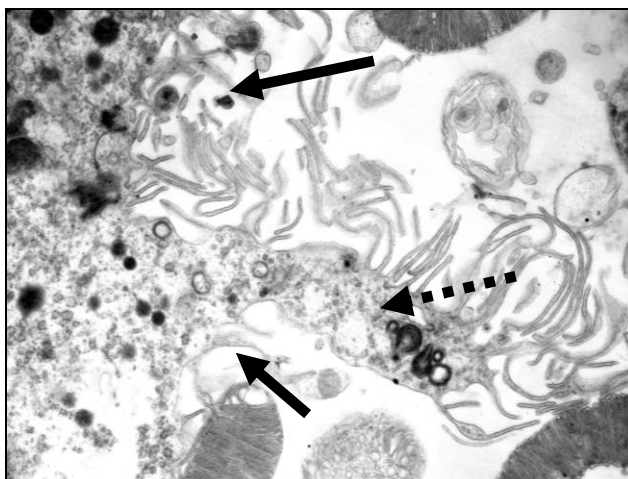


Рис. 73. Деструкция микроворсинок пигментоцита сетчатки крыс линии OXYS (стрелки), пальцевидный вырост цитоплазмы с микроворсинками (пунктирная стрелка). Электронограмма. Ув. 2500

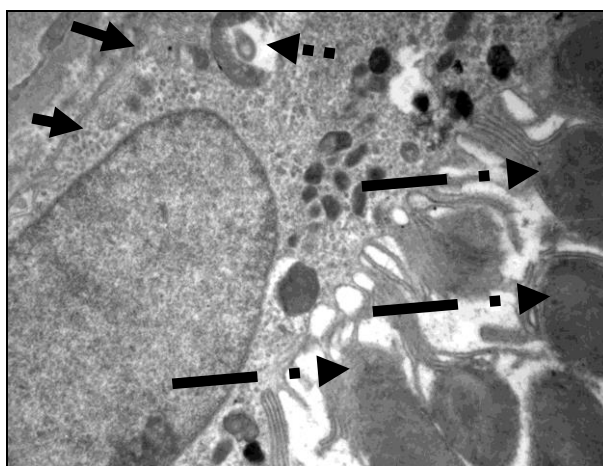


Рис. 74. Пигментоцит в сетчатке крыс OXYS. Сглаживание базальной складчатости (стрелки), деструкция митохондрий с образованием вакуолей (пунктирная стрелка), многочисленный захват микроворсинками мембранных дисков нейросенсорных клеток (стрелка “точка-пунктир”). Электронограмма. Ув. 4000

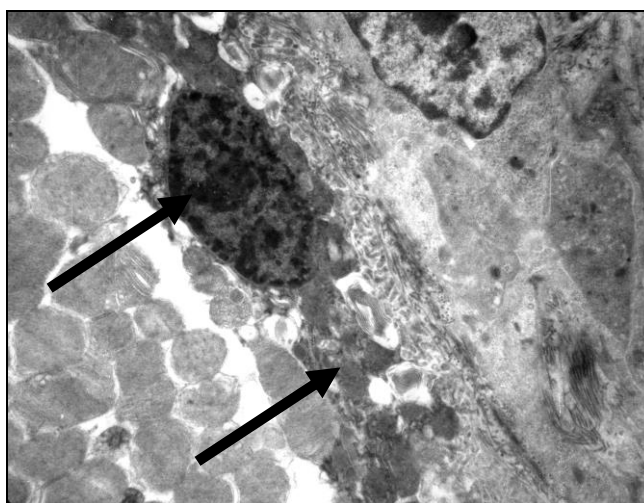


Рис. 75. Пикноморфный пигментоцит (стрелки) в сетчатке крыс OXYS. Электронограмма. Ув. 3500

Количественно при сравнении с крысами Вистар наблюдается значимое снижение средней площади цитоплазмы и ядра ПЦ в срезе сетчатки в 1,5 раза и на 14% соответственно, при этом показатель ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) возрастает на 25% ($p<0,05$, табл. 36).

Таблица 36

Количественный анализ слоя пигментцитов в срезе сетчатки крыс OXYS при коррекции диборнолом и тиофаном.

Группа животных	Средняя площадь пигментцита (мкм ²)	Средняя площадь ядра пигментцита (мкм ²)	Показатель ядерно-цитоплазматического отношения
Вистар	297,54±10,51	34,23±1,35	0,12±0,004
Контроль OXYS	196,04±4,37*	29,34±0,91*	0,15±0,006*
OXYS-диборнол	224,21±8,56 ⁺	35,04±1,05 ⁺	0,17±0,007*
OXYS-тиофан	289,99±9,33 ⁺	42,43±1,58 ⁺	0,15±0,004*

Диборнол и тиофан проявляют однонаправленный положительный эффект в отношении ПЦ сетчатки. У крыс групп с коррекцией отмечается появление морфологических признаков функциональной активности ПЦ: гипертрофия микроворсинок и активный захват ими отработанных мембранных дисков наружных сегментов НК, усиление рисунка базальной складчатости, стабилизация мембран митохондрий, достоверное увеличение удельной площади цитоплазмы и ядра ПЦ на срезе сетчатки по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы OXYS (табл. 36).

Проведенное иммуногистохимическое исследование хориоретинальных комплексов крыс показало, что во всех исследуемых группах иммунопозитивными для VEGF являются ПЦ, цитоплазма эндотелиоцитов интратретинальных и хориоидальных сосудов, НЯС и ВЯС, а также цитоплазма ганглионарных нейронов. PEDF выявляется во всех перечисленных выше структурах сетчатки и перикарионах ассоциативных нейронов, кроме сосудов.

Проведенный корреляционный анализ показал, что в сетчатке крыс Вистар существует тесная отрицательная корреляционная связь между показателями процентного содержания VEGF- и PEDF-иммунопозитивных ганглионарных нейронов ($r=-0,90$, $p<0,04$). У крыс линии OXYS корреляционная связь оказалась незначительна. Вероятно, данный факт

связан с дисбалансом в системе про- и антиангиогенеза, о чем свидетельствует увеличение процента VEGF-положительных ганглионарных нейронов в 2 раза и снижение показателя процентного содержания PEDF-иммунопозитивных клеток в 3 раза ($p<0,05$, табл. 37). В 2 и 3 раза соответственно возрастает процентное содержание сечений интратретиальных и хориоидальных сосудов в срезе сетчатки крыс OXYS, эндотелиоциты которых иммунопозитивны к VEGF ($p<0,05$, табл. 37) и могут стать отправной точкой активации неоангиогенеза (рис. 76, 77, 78).

Таблица 37.

Количественная оценка иммунореактивных к VEGF и PEDF структурных элементов хориоретинального комплекса крыс Вистар и OXYS без коррекции на фоне коррекции диборнолом и тиофаном (%) от общего количества в срезе сетчатки.

Группы животных	антитела	Интра-ретиальные сосуды	сосуды хориоидеи	ассоциативные нейроны	ганглионарные нейроны
Вистар	VEGF	15,45±1,32	0,84±0,52	0	13,43±0,45
	PEDF	0	0	36,72±1,24	37,11±1,73
OXYS	VEGF	31,70±2,80*	2,77±2,80*	0	26,11±1,01*
	PEDF	0	0	11,33±0,76*	11,99±1,85*
OXYS+диборнол	VEGF	14,02±2,60 ⁺	1,23±0,32 ⁺	0	15,22±1,20 ⁺
	PEDF	0	0	35,25±1,28 ⁺	36,27±1,47 ⁺
OXYS+тиофан	VEGF	22,22±2,17	1,69±0,48	0	15,22±1,54 ⁺
	PEDF	0	0	35,13±1,67 ⁺	35,21±1,67 ⁺

Применение антиоксидантов тиофана и диборнола препятствует возникновению дисбаланса в системе про- и антиангиогенеза в сетчатке крыс OXYS, что, вероятно, связано с ограничением деструкции и повышением функциональной активности ПЦ, снижением гипоксии в сетчатке при возрастной хориоретинальной дегенерации. Диборнол способен ограничивать появление VEGF-позитивных интратретиальных и хориоидальных сосудов в срезе сетчатки до значений группы Вистар. В группе с коррекцией тиофаном анти-VEGF эффект выражен несколько слабее (табл. 37). Среди нейрональной популяции в обеих группах с коррекцией обращает на себя внимание достоверное снижение процента VEGF-иммунопозитивных ганглионарных нейронов и увеличение процента PEDF-иммунопозитивных мультиполярных нейронов до значений аналогичных показателей группы контроля ($p<0,05$; табл. 37).

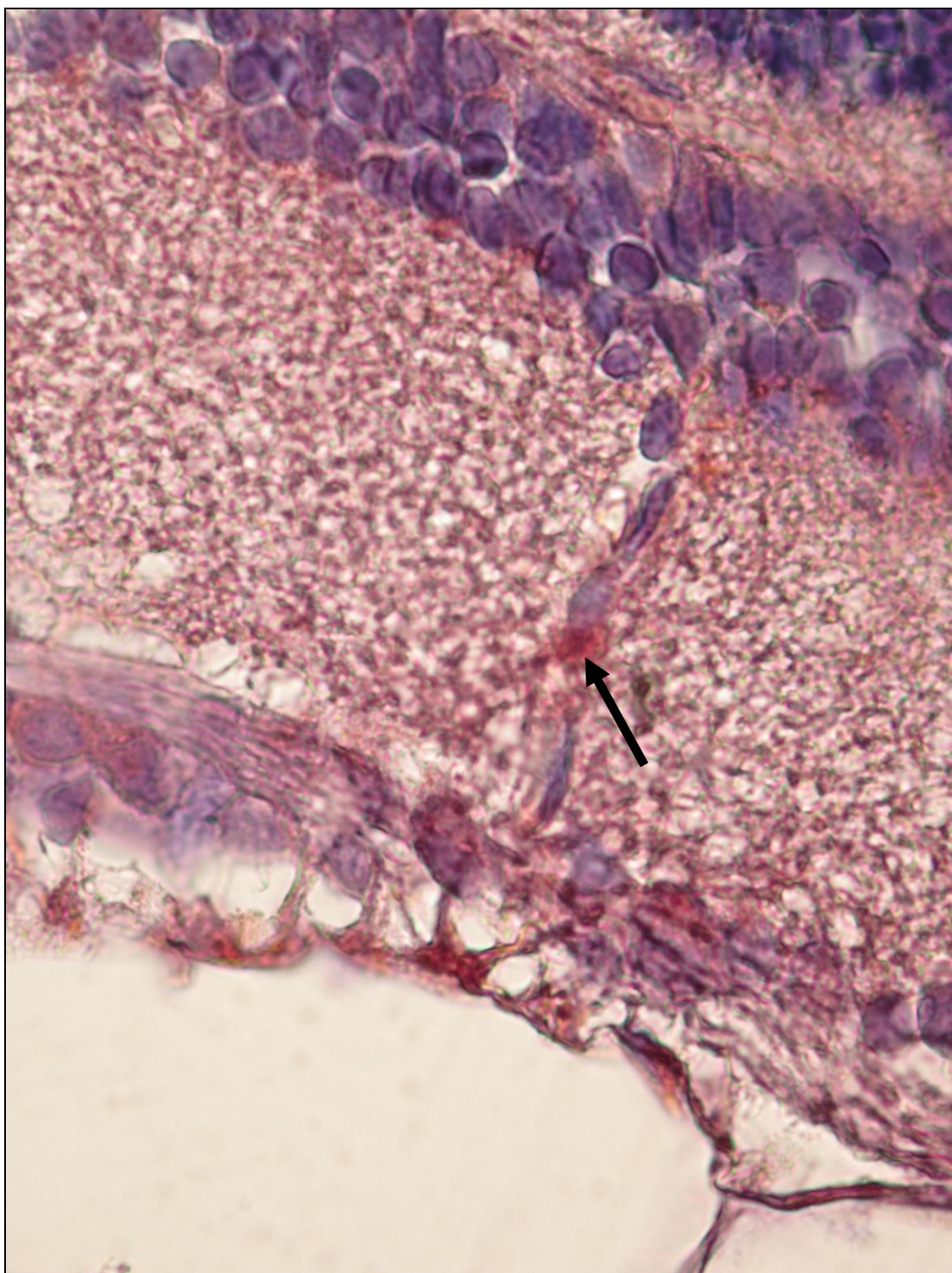


Рис. 76. VEGF-иммунопозитивный эндотелиоцит в стенке интратретиального капилляра сетчатки крыс OXYS. Докраска ядер гематоксилином. Ув. 1000

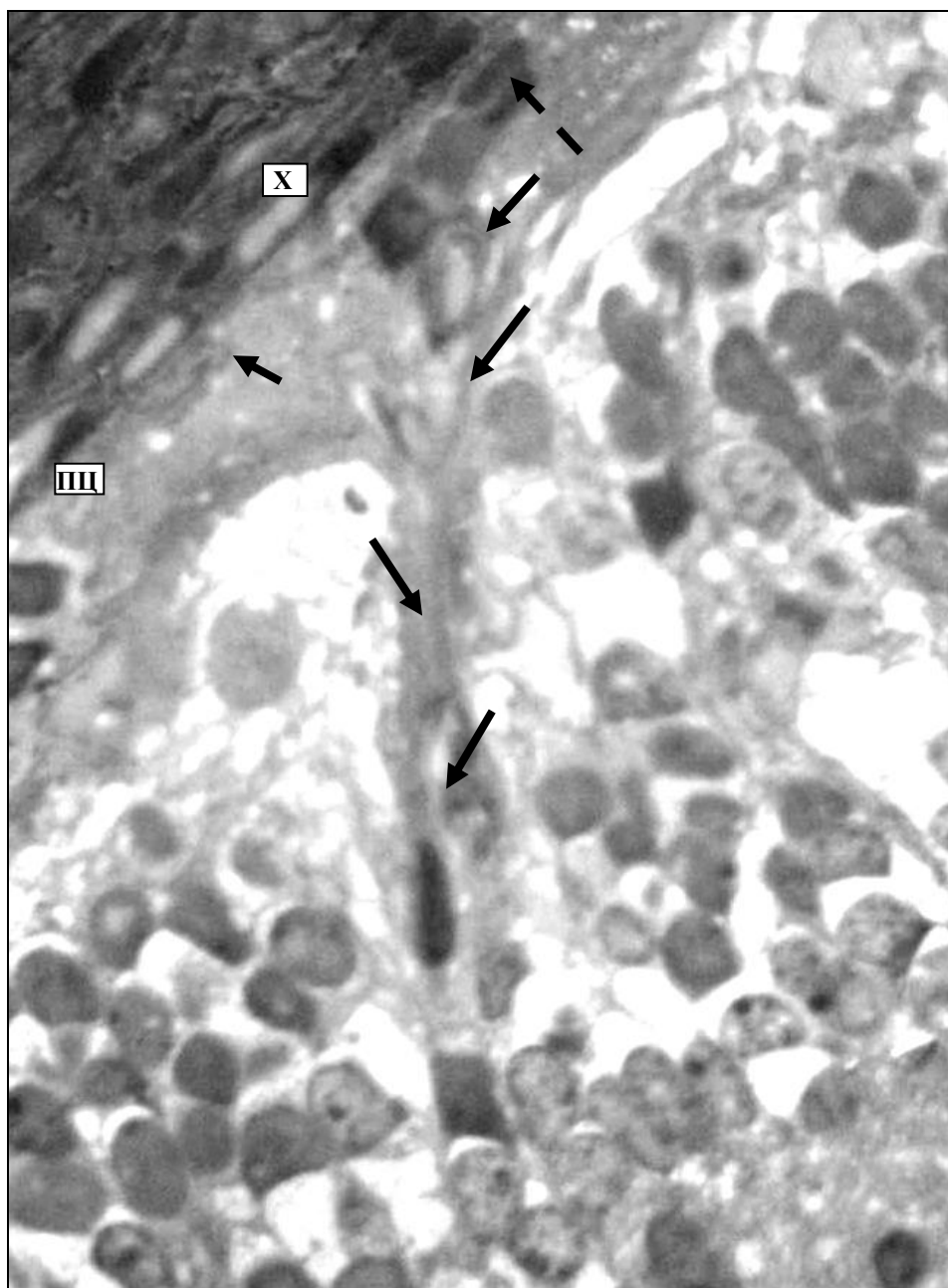


Рис. 77. Единичный случай неоваскуляризации из сосудов хориоидеи (стрелки). Сетчатка крысы OXYS в возрасте 6 мес. Деструкция пигментоцитов (пикнотичные ядра показаны пунктирными стрелками), мембраны Бруха, фотосенсорного и наружного ядерного слоев. ПЦ – пигментоциты. X – хориоидея. Окр. толуидиновым синим. Полутонкий срез. Ув. 1000.

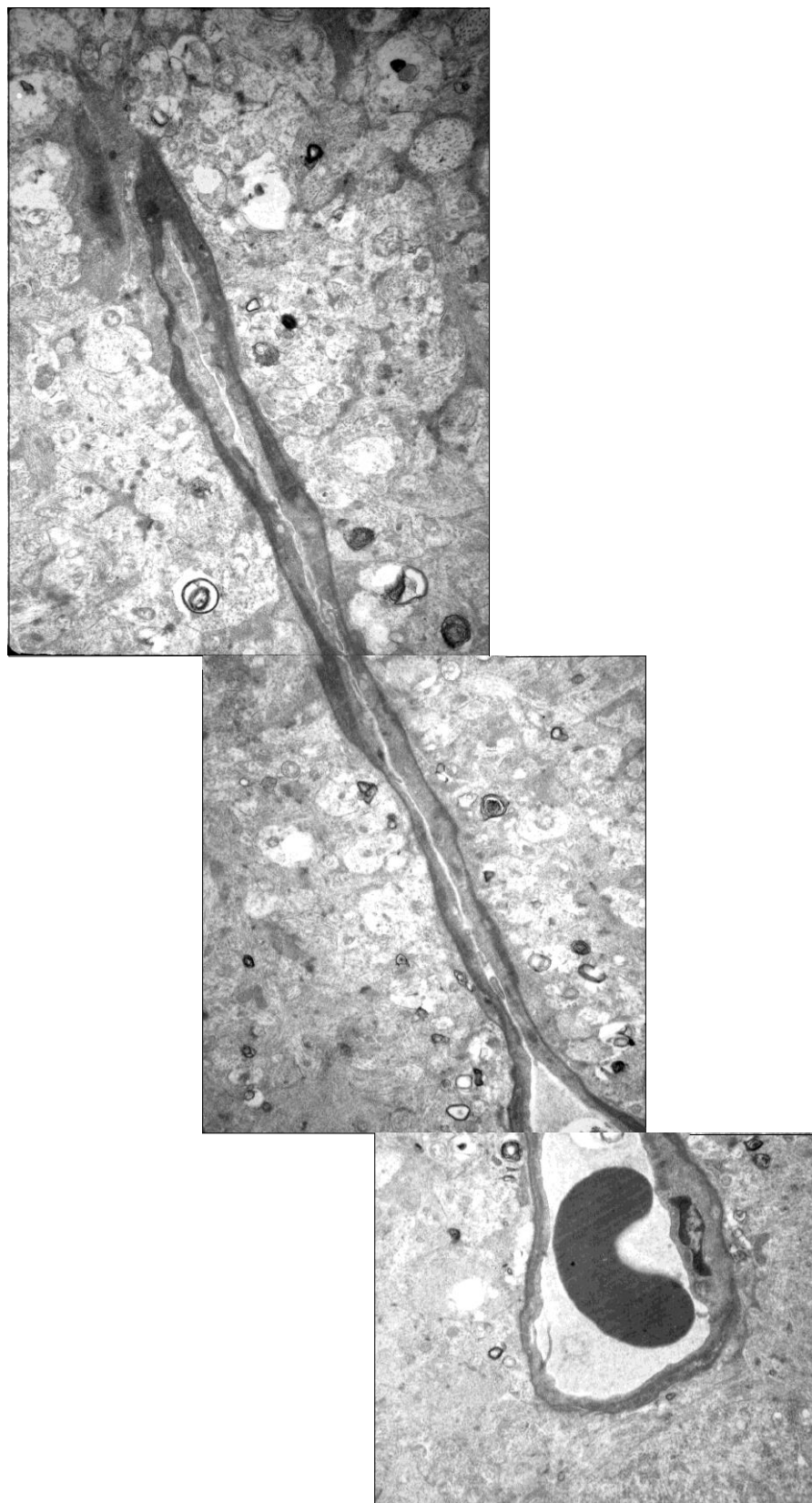


Рис. 78. Рост интратетинального капилляра во внутреннем сетчатом слое сетчатки крысы линии OXYS. Электронограмма. Ув. 2500

Послойное изучение НК сетчатки контрольных крыс OXYS свидетельствует об усилении деструктивных процессов в дистальных, проксимальных участках наружных сегментов, а также ядросодержащей части и центральных отростках. Наружные сегменты НК подвергаются фрагментации, вакуольной дегенерации, потери связи с внутренними сегментами (рис. 79). Единичные внутренние сегменты подвергаются дегенерации по темному типу, в остальных наблюдается дегенерация митохондрий, расширение цистерн эндоплазматической сети (рис. 80). Нарушения митохондрий полиморфны: встречаются набухание, гомогенизация матрикса, вакуолизация, заполнение мелкогранулярным содержимым или миелиноподобными структурами (рис. 81, 82).

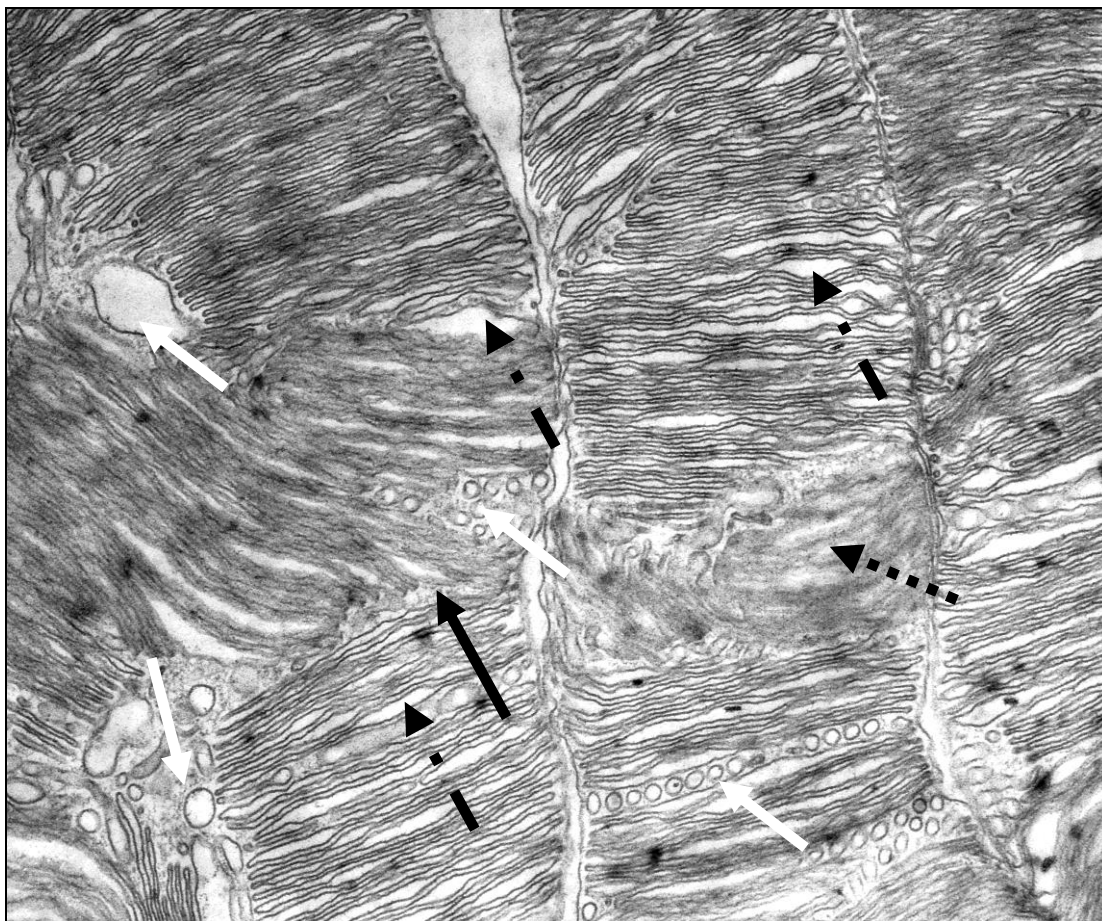


Рис. 79. Наружные сегменты нейросенсорных клеток сетчатки крыс линии OXYS. Расширение межмембранных пространств (стрелка “точка-пунктир”), нарушение параллельной ориентации и гомогенизация мембран (пунктирная стрелка), начальный этап фрагментации (стрелка), вакуольная дегенерация (белая стрелка) наружных сегментов фоторецепторов сетчатки крыс OXYS. Электронограмма. Ув. 6500

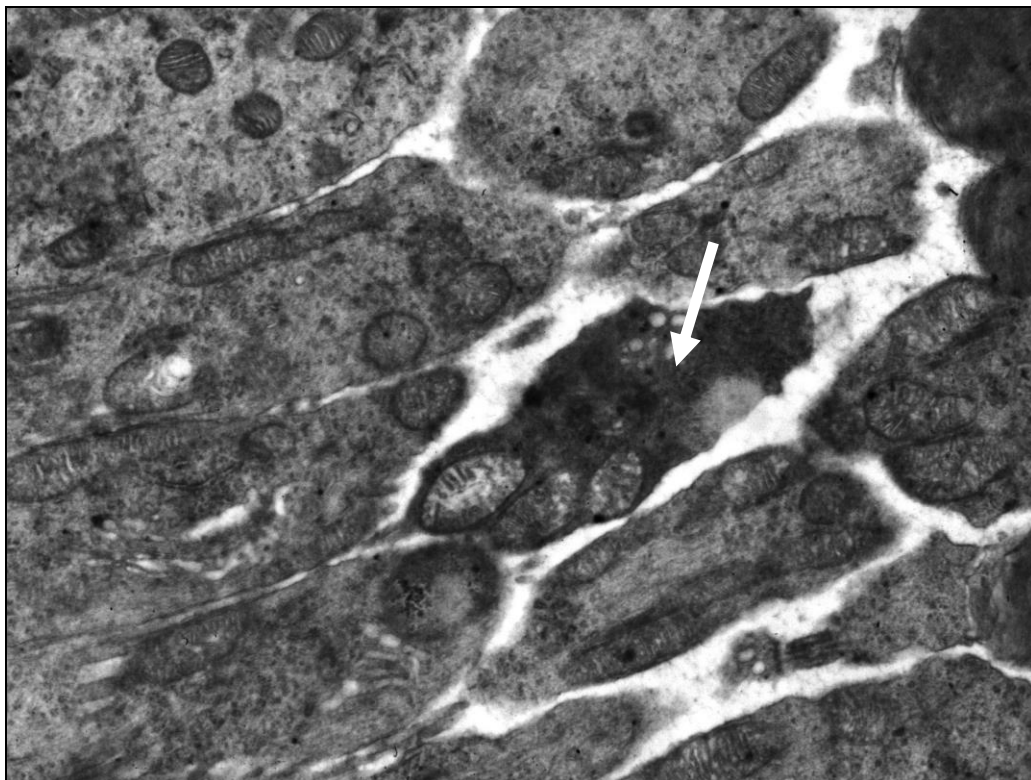


Рис. 80. Изменение внутреннего сегмента нейросенсорной клетки сетчатки крысы OXYS по темному типу (стрелка). Электронограмма. Ув. 3500

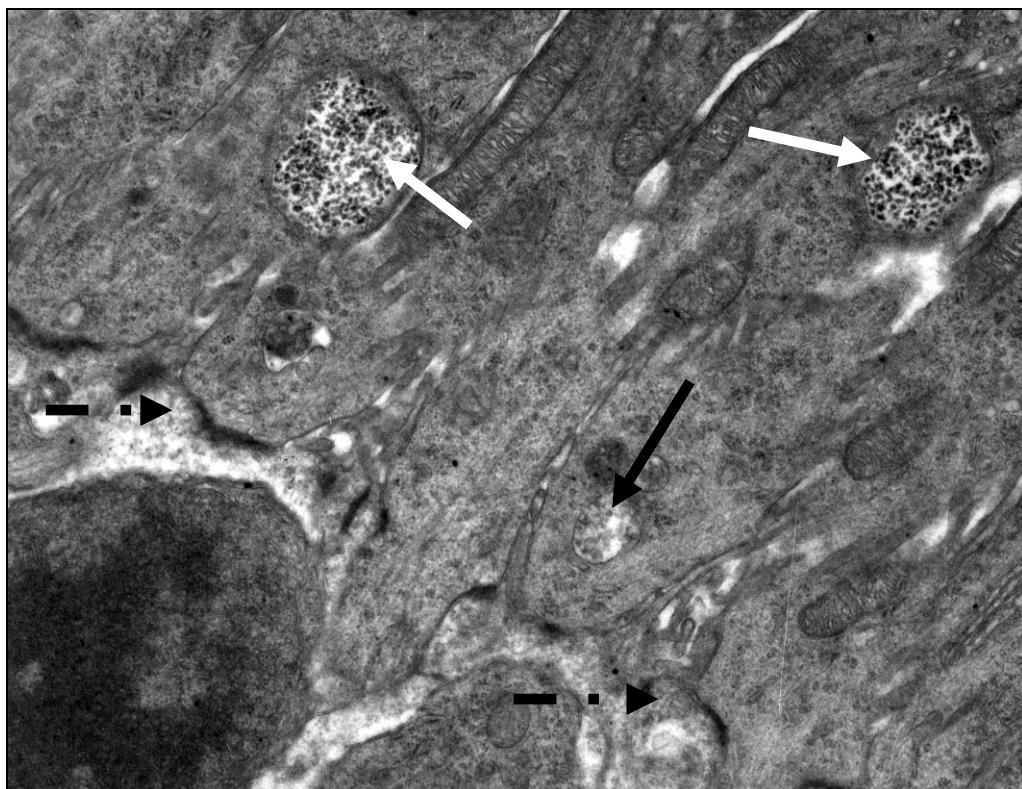


Рис. 81. Нейросенсорные клетки сетчатки крысы линии OXYS. Дегенерация митохондрий внутренних сегментов: отек и разрушение крист (черная стрелка), заполнение митохондрии мелкогранулярным содержимым (белые стрелки). Отек склеральных отростков радиальных глиоцитов вблизи наружной глиальной пограничной мембраны (стрелки “точка-пунктир”). Электронограмма. Ув. 4000

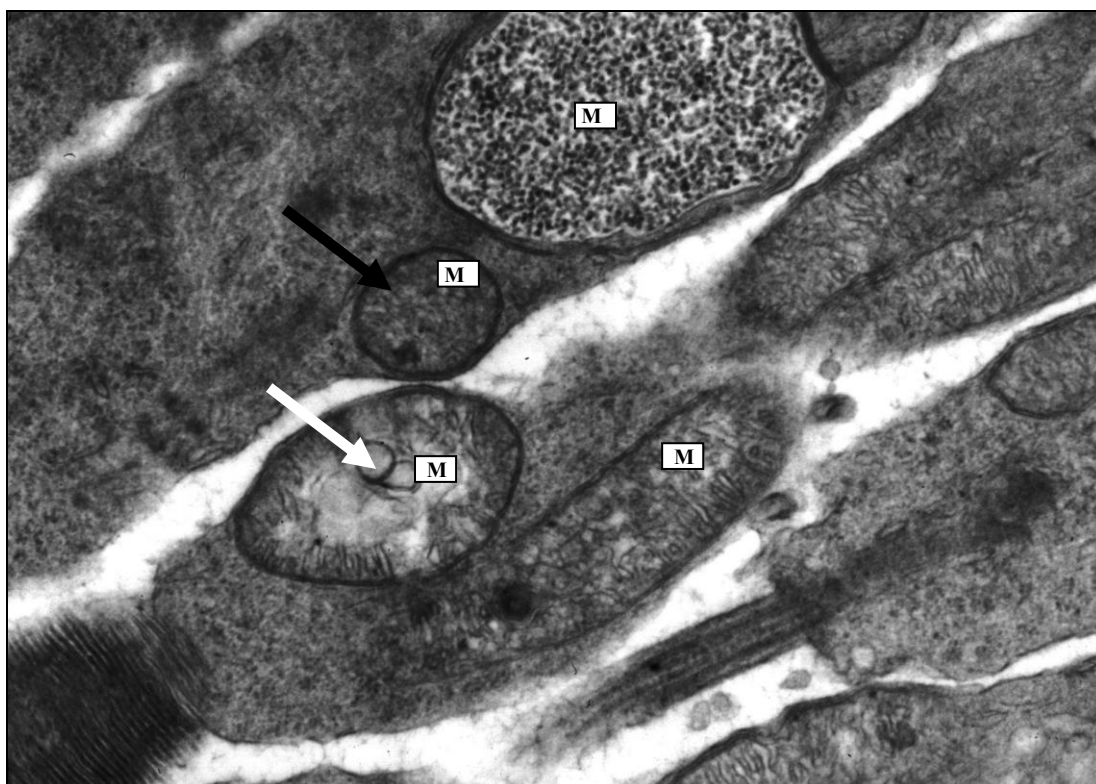


Рис. 82. Внутренние сегменты нейросенсорных клеток сетчатки крыс OXYS. Набухание митохондрий, дегенерация внутренней мембраны с образованием вакуолей (белая стрелка). Осмиофилия и гомогенизация митохондриального содержимого (стрелка). Электронограмма. Ув. 14000

НЯС у крыс OXYS состоит из 7-8 рядов ядер НК, что на 30% меньше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$, табл. 38).

Таблица 38

Показатели деструкции нейросенсорных клеток сетчатки крыс контрольных групп Вистар и OXYS при коррекции диборнолом и тиофаном.

Группы животных	Пикноз ядер НК (%)	Численная плотность ядер НК на 900 мкм ² среза	Количество рядов ядер НК в наружном ядерном слое
Вистар	0,4±0,02	39601,088±2720,95	10,6±0,68
OXYS	1,53±0,27*	29804,26±415,16*	7,39 ±0,36*
OXYS-диборнол	0,43±0,04 ⁺	35819,75±899,37+	10,22±0,43+
OXYS-тиофан	0,88±0,05+#	33656,5±457,46	8,76±0,28#

Встречается большое количество клеток с пикнозом ядра и отеком перикариона, которые подвергаются фагоцитозу склеральными отростками радиальной глии (рис. 83, 84). Выявляется смещение одиночных ядер в фотосенсорный слой и НЯС.

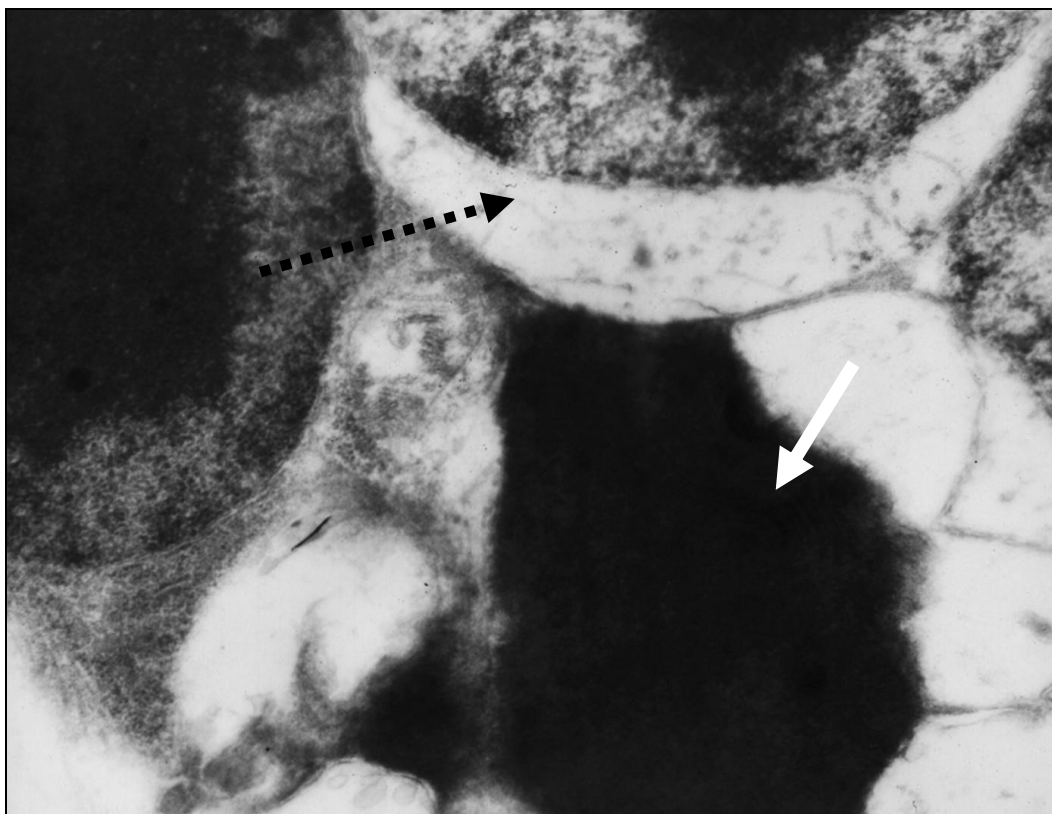


Рис. 83. Наружный ядерный слой сетчатки крысы OXYS. Пикноз ядра нейросенсорной клетки (белая стрелка). Отек перинуклеарного пространства (пунктирная стрелка). Электронограмма. Ув. 9000

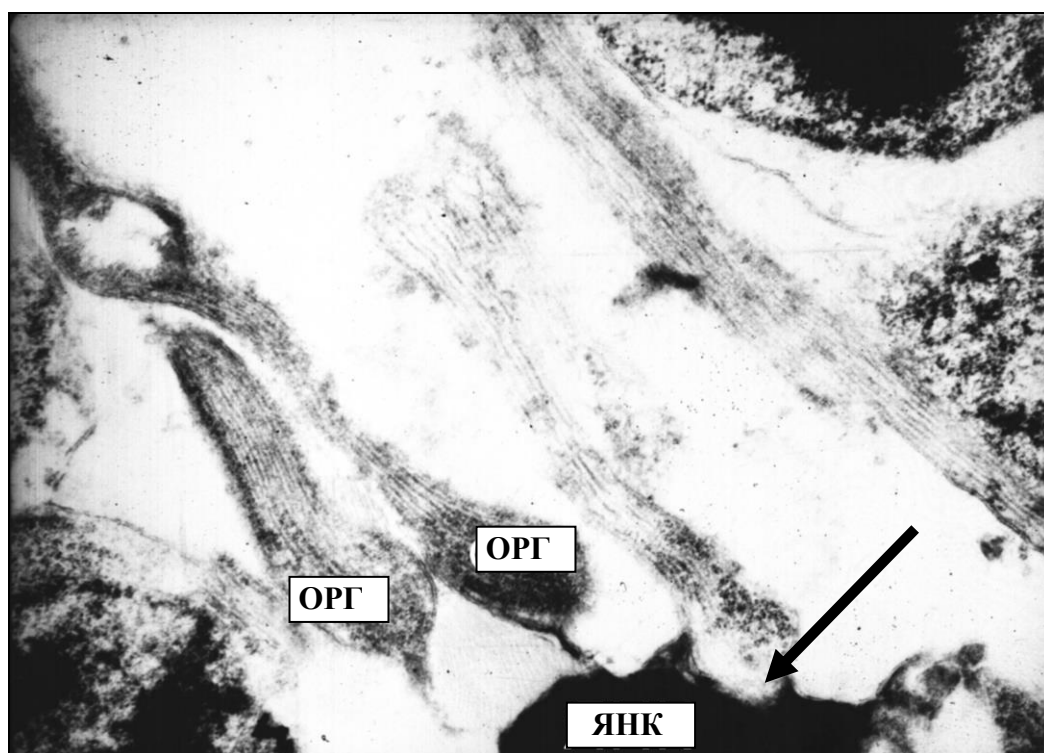


Рис. 84. Проплиферация склеральных отростков радиальной глии (ОРГ) и фагоцитоз ими деструктивно измененных перикарионов нейросенсорных клеток (стрелка). ЯНК – ядро нейросенсорной клетки. Электронограмма. Ув. 5000.

Количественный анализ показал достоверное увеличение процента НК с пикнозом ядра по отношению к аналогичному показателю Вистар в 3,8 раза, а также снижение количества рядов ядер НК в 1,4 раза и численной плотности ядер фоторецепторов в 1,8 раза ($p < 0,05$, табл. 38).

В группе с коррекцией тиюфаном происходит значимое ограничение деструкции НК. По сравнению с аналогичными показателями животных, не получавших антиоксидантной терапии, в исследуемой группе наблюдается сохранность рядов ядер НК на 19% на фоне повышения численной плотности ядер НК в 1 мм^2 среза, а также снижение процента пикнотичных ядер НК в 1,7 раза, однако данные показатели не достигают значений контрольной группы Вистар ($p < 0,05$, табл. 38).

В группе с коррекцией диборнолом процент пикноза НК, количество рядов и численная плотность ядер в 1 мм^2 среза достоверно не отличаются от аналогичных в группе Вистар (табл. 38). Большинство наружных сегментов НК сетчаток крыс OXYS на фоне курсового лечения диборнолом изменены реактивно с неравномерным расширением межмембранного пространства. Отмечен протективный эффект диборнола на митохондрии внутренних сегментов, которые сохраняют свою правильную организацию, что, вероятно, ограничивает продукцию активных форм кислорода (АФК) внутри клетки, способствует восстановлению внутриклеточной передачи сигналов, блокирует выход проапоптотических митохондриальных белков и развитие апоптоза. В группе с коррекцией тиюфаном во внутренних сегментах и центральных отростках НК сохраняется отек митохондрий.

Нейроны ВЯС сетчатки контрольных крыс OXYS в значительной мере подвергаются как реактивным, так и деструктивным изменениям. Деструкция характеризуется появлением большого числа пикноморфных и гиперхромных ассоциативных нейронов (рис. 85, 86), что подтверждает проведение количественного анализа, выявившего трехкратное увеличение нейронов с некротическими нарушениями ядра и цитоплазмы (табл. 39). Большой вклад в формирование данного показателя вносят биполярные

нейроны, тогда как амакринные и горизонтальные нейроны остаются относительно интактны. Выявлены единичные клетки с деформацией ядер (рис. 87).

Реактивные изменения ассоциативных нейронов, имеющие обратимый характер, характеризуются отеком цитоплазмы и нерезко выраженными нарушениями тинкториальных свойств цитоплазмы и ядра. Ультраструктурный анализ выявил набухание митохондрий, расширение цистерн ЭПС, появление вакуолей, мультивезикулярных телец, мембранных комплексов (рис. 88).

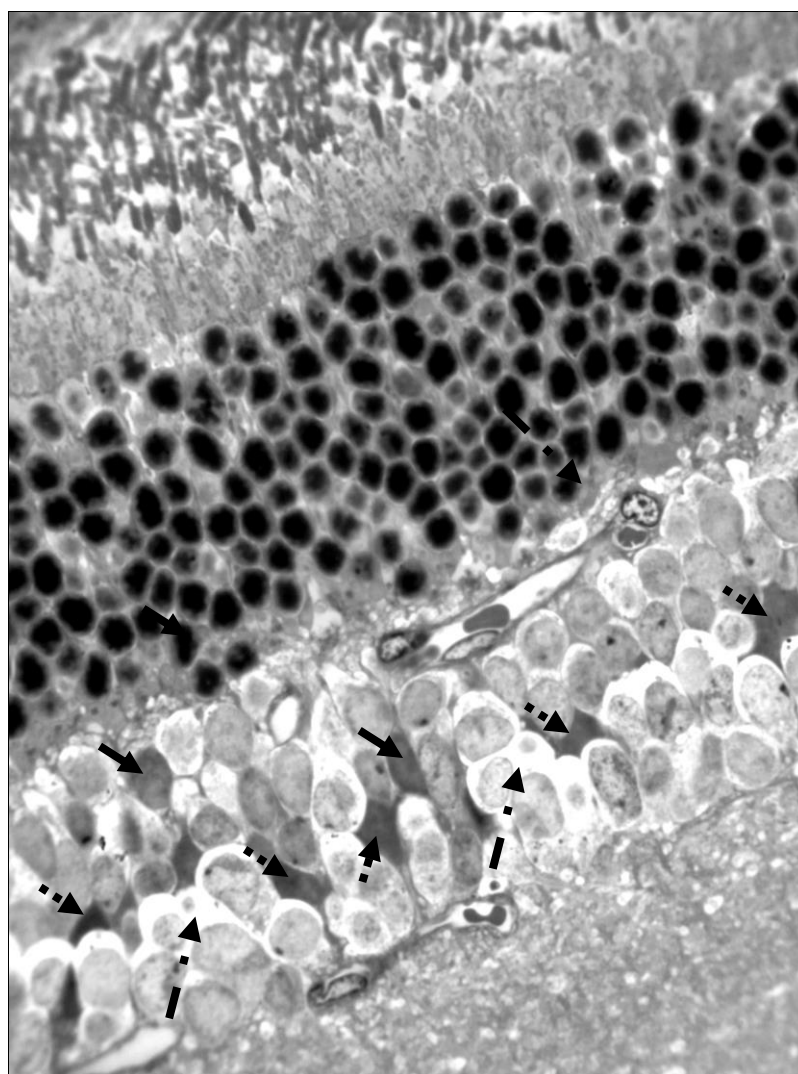


Рис. 85. Сетчатка крыс OXY в возрасте 6 мес. Гиперхромные и пикноморфные биполярные нейроны (стрелки). Гиперхромные и пикноморфные радиальные глиоциты (пунктирные стрелки). Отек ассоциативных нейронов (стрелка "точка-пунктир"). Окр. толуидиновым синим. Ув. 1000

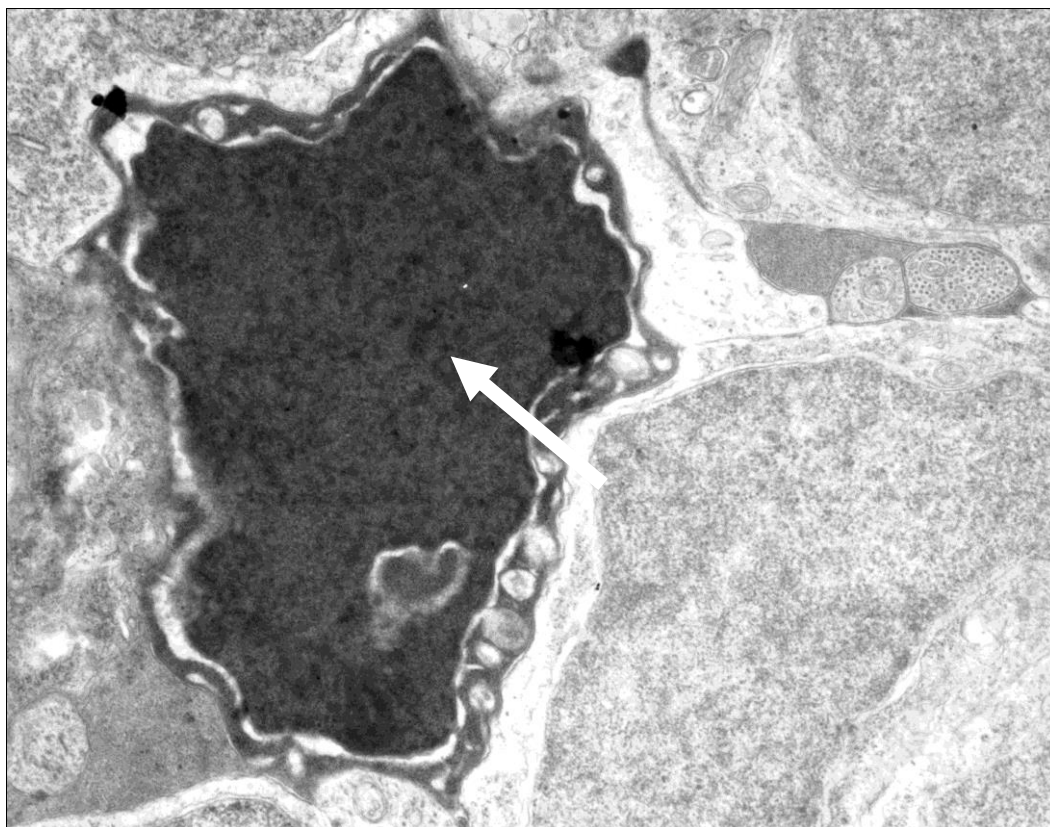


Рис. 86. Пикноморфный ассоциативный нейрон с осмиофилией и сморщиванием ядра и цитоплазмы во внутреннем ядерном слое крысы OXY5. Электронограмма. Ув. 5000

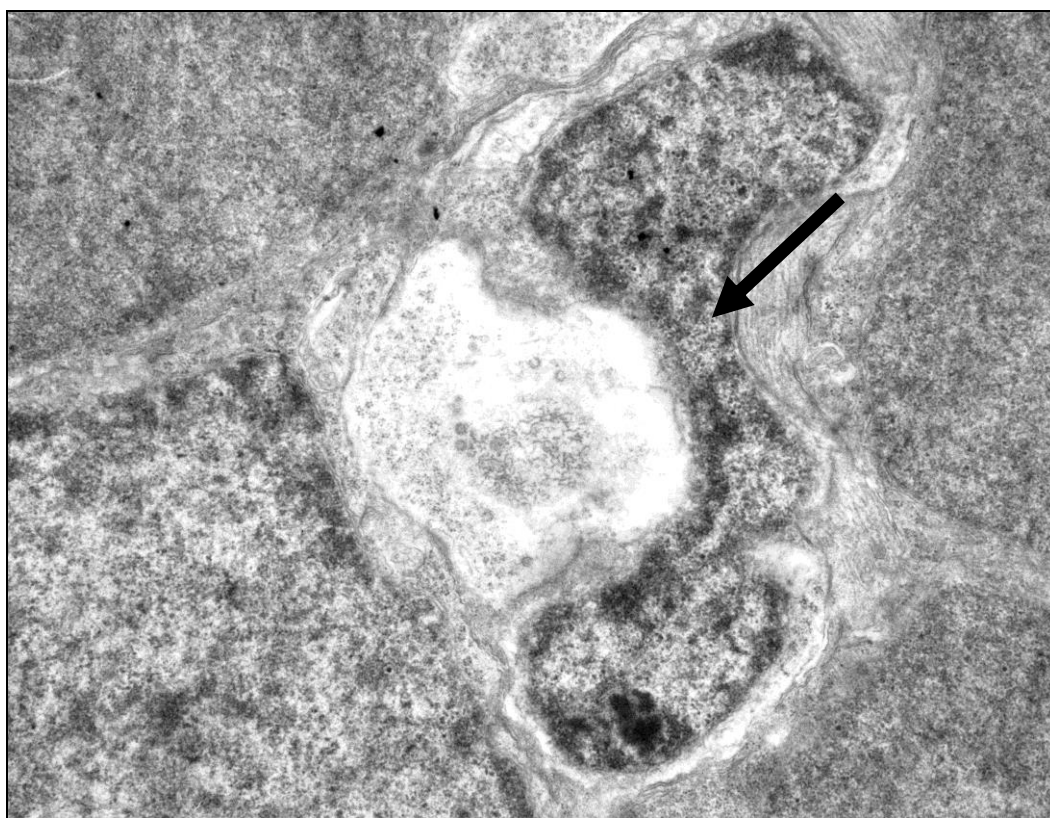


Рис. 87. Деформация ядра ассоциативного нейрона сетчатки крысы OXY5. Просветление цитоплазматического матрикса, исчезновение органелл. Электронограмма. Ув. 5000

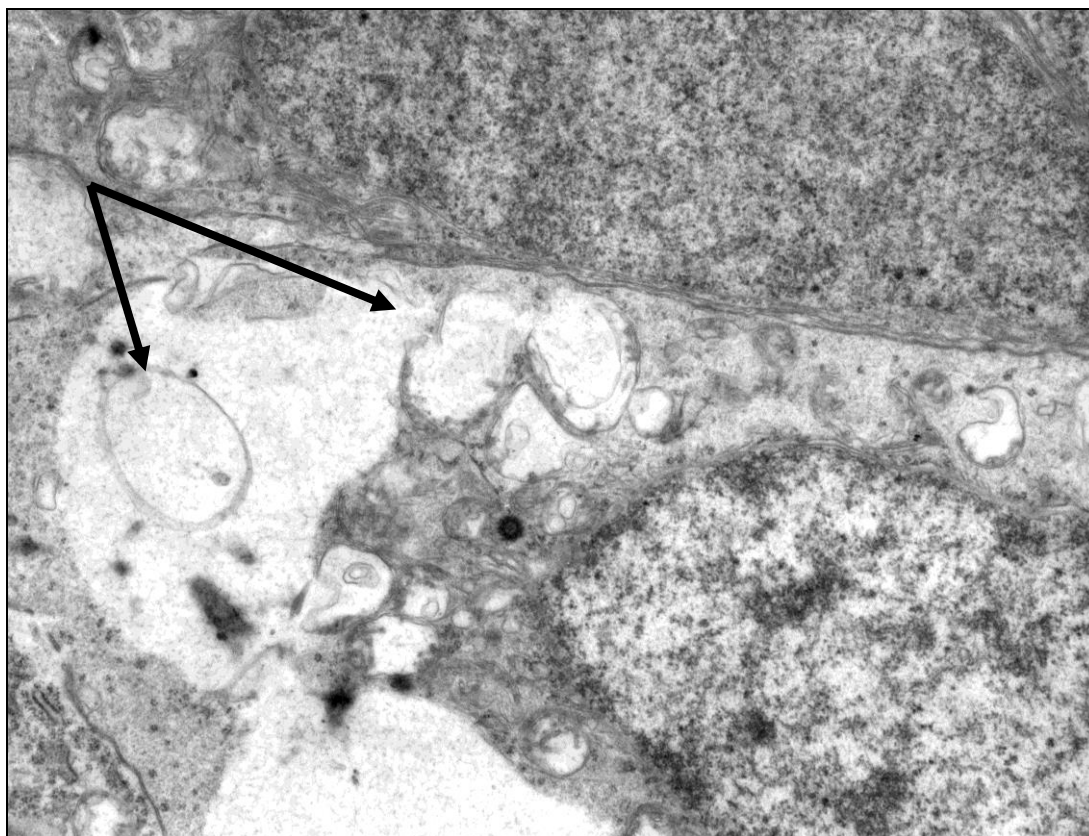


Рис. 88. Отек, вакуолизация, деструкция органелл биполярного нейрона внутреннего ядерного слоя сетчатки крысы OXYS. Электронограмма. Ув. 5500

Таблица 39.

Процентное содержание пикноморфных и гиперхромных ассоциативных нейронов и радиальных глиоцитов сетчатки крыс OXYS на фоне коррекции антиоксидантами

Группы животных	Ассоциативные нейроны нейроны (%)	Радиальная глия (%)
Вистар	0,60±0,12	0
OXYS	1,75±0,27*	4,22±0,42*
OXYS-диборнол	0,43±0,05 ⁺	2,1±0,77 ⁺⁺
OXYS-тиофан	0,64±0,08 ⁺	2,63±0,8 ⁺⁺

Количественно выявлено значимое снижение удельной площади митохондрий и гранулярной ЭПС в 5 раз, КГ - в 10 раз относительно значений аналогичных показателей крыс Вистар ($p < 0,05$, табл. 40).

Применение антиоксидантов диборнола и тиофана оказывает выраженный нейропротекторный эффект в отношении ассоциативных нейронов. В обеих группах наблюдается высокая сохранность органелл в цитоплазме нейронов (табл. 40), однако значения удельной площади

органелл цитоплазмы ассоциативных нейронов в сетчатках крыс OXYS после лечения тиюфаном остаются достоверно ниже аналогичных в группе с коррекцией диборнолом. Повышенная сохранность органелл на светомикроскопическом уровне сопровождается закономерным ограничением образования пикноморфных ассоциативных нейронов при применении диборнола в 7,8 раза, тиюфана - в 6,6 раза относительно группы без коррекции ($p < 0,05$, табл. 39). В группе с введением тиюфана сохраняется отек ассоциативных нейронов, что, вероятно, нашло отражение в значимо более низких значениях показателя удельной площади органелл.

Таблица 40

Удельная площадь органелл (%) в цитоплазме ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки крыс OXYS без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиюфаном

Группа животных	Удельная площадь митохондрий	Удельная площадь грЭПС	Удельная площадь КГ
Вистар	14,13±0,78	46,14±2,46	0,70±0,13
OXYS	3,22±0,33*	9,34±0,37*	0,07±0,02*
OXYS-диборнол	11,27±0,70*+	20,20±1,81*+	0,46±0,07*+
OXYS-тиюфан	5,40±0,88*#	14,92±1,65*+#	0,28±0,06*+#

Изменения мультиполярных нейронов ганглионарного слоя сетчатки крыс линии OXYS характеризуются хроматолизом различной степени выраженности, который является показателем реактивных изменений нервных клеток и отражает нарушения обмена функциональных и структурных белков, изменением формы ядер при сохранности органелл в цитоплазме (рис. 89), дегенерацией клеток по “темному типу” с деформацией, повышением осмиофилии ядра и редукцией органелл в цитоплазме (рис. 90).

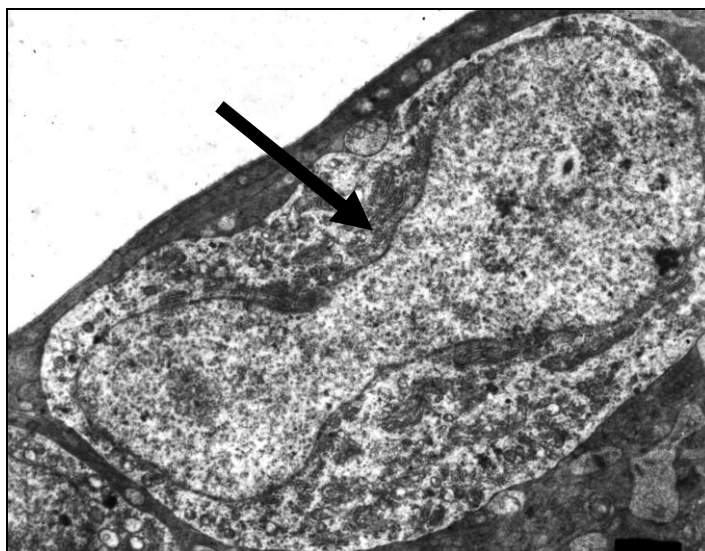


Рис. 89. Гантелеобразное ядро ганглионарного нейрона сетчатки крыс OXYS. Электронограмма. Ув. 4800

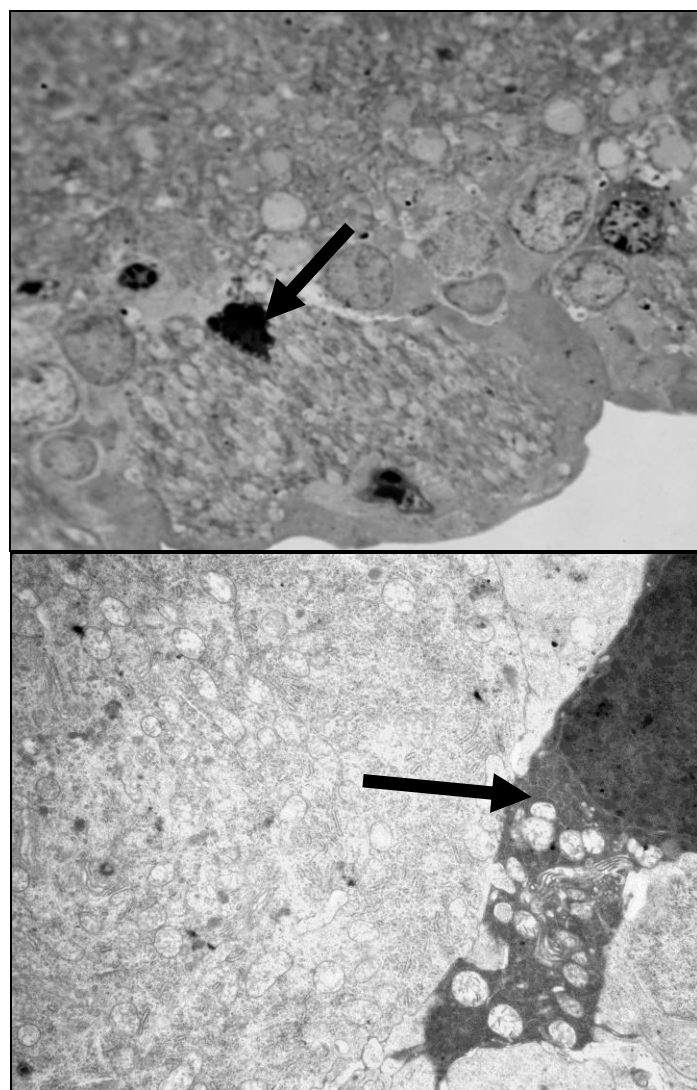


Рис. 90. Пикноморфный ганглионарный нейрон со сморщиванием ядра и цитоплазмы (стрелка) в сетчатке крысы OXYS. А. Полутонкий срез. Окр. толуидиновым синим. Ув. 1000; В. Электронограмма. Ув. 5000

Количественно у крыс OXYS по сравнению с Вистар происходит увеличение процента ганглионарных нейронов с очаговым, тотальным хроматолизом и пикноморфных в 4, 2 и 3 раза соответственно ($p<0,05$; табл. 41).

Таблица 41

Количественный анализ показателей деструкции ганглионарного слоя сетчатки крыс OXYS без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиофаном

Группы животных	Пикноморфные (%)	Очаговый хроматолиз (%)	Тотальный хроматолиз (%)
Вистар	1,18±0,15	2,75±0,40	0
OXYS	3,15±0,55*	7,39±0,82*	4±0,66*
OXYS-диборнол	0,88±0,07 ⁺	1,13±0,13 ⁺	0,25±0,02 ⁺
OXYS-тиофан	0,9±0,07 ⁺	7,07±0,41 ^{*#}	3,69±0,28 ^{*#}

Ультрамикроскопически в цитоплазме мультиполярных нейронов сетчатки крыс линии OXYS значимо снижается удельная площадь митохондрий, гранулярной ЭПС и КГ в среднем в 2 раза относительно значений вистар ($p<0,05$, табл. 42).

Таблица 42

Удельная площадь органелл (%) в цитоплазме ганглионарных нейронов сетчатки крыс OXYS без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиофаном

Группы животных	митохондрии	гранулярная ЭПС	Комплекс Гольджи
Вистар	12,84±0,54	45,79±2,36	0,44±0,07
OXYS	5,99±0,56*	17,99±2,89*	0,28±0,08*
OXYS-диборнол	10,68±0,65 ⁺	25,71±1,67 ^{*+}	0,50±0,11 ⁺
OXYS-тиофан	8,82±0,60*	19,47±1,46*	0,35±0,08 [#]

Применение тиофана ограничивает образование пикноморфных ганглионарных нейронов, однако, содержание нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом при этом не отличается от значений группы без коррекции, что согласуется с данными по удельной площади гранулярной ЭПС в данной группе, которая не превышает значений крыс OXYS без коррекции. Диборнол ограничивает развитие деструктивных изменений мультиполярных нейронов, при этом их количественные показатели не отличаются от значений в контрольной группе Вистар (табл. 41).

Любые реактивные и дегенеративные изменения нейронов закономерно должны сопровождаться изменениями синаптической передачи

в цепи нейронов. Проведенный анализ показал, что по сравнению с контрольными крысами Вистар, у крыс OXYS отмечается снижение удельной площади наружного плексиформного слоя в срезе сетчатки, относительно аналогичного показателя крыс Вистар, в 2 раза ($p < 0,05$; табл.43, рис. 91).

Таблица 43

Удельная площадь наружного и внутреннего сетчатого слоя сетчатки у крыс OXYS (%) без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиофаном

Удельная площадь	Наружный сетчатый слой	Внутренний сетчатый слой
Вистар	$4,34 \pm 0,24$	$22,44 \pm 1,62$
OXYS	$2,07 \pm 0,24^*$	$20,95 \pm 1,26$
OXYS+ диборнол	$3,46 \pm 0,33$	$26,83 \pm 1,05$
OXYS+ тиофан	$2,21 \pm 0,20^{*#}$	$22,06 \pm 0,56^{\#}$

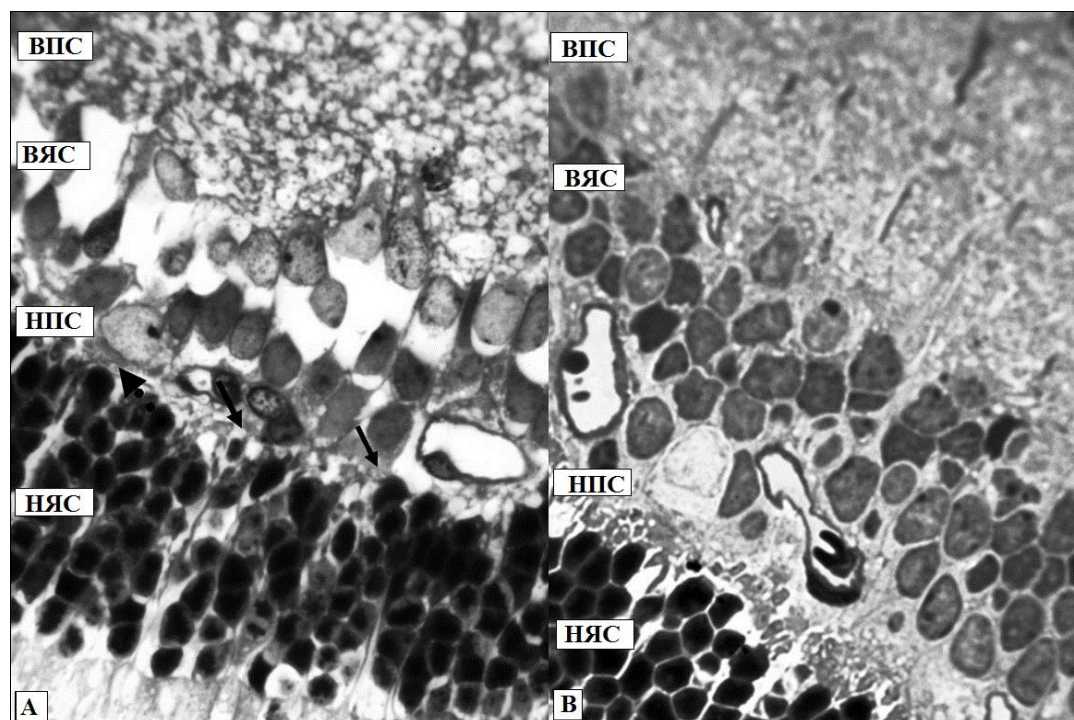


Рис. 91. Сетчатка крыс OXYS без коррекции (А) и OXYS с коррекцией тиофаном (В). Истончение наружного плексиформного слоя (НПС) сетчатки крыс OXYS (стрелки), контакт нейросенсорной клетки и ассоциативного нейрона (пунктирная стрелка). НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, ВПС – внутренний плексиформный слой. Окраска толуидиновым синим. Ув. 1000

Местами можно наблюдать контакт перикарионов НК и ассоциативных нейронов (рис. 92).

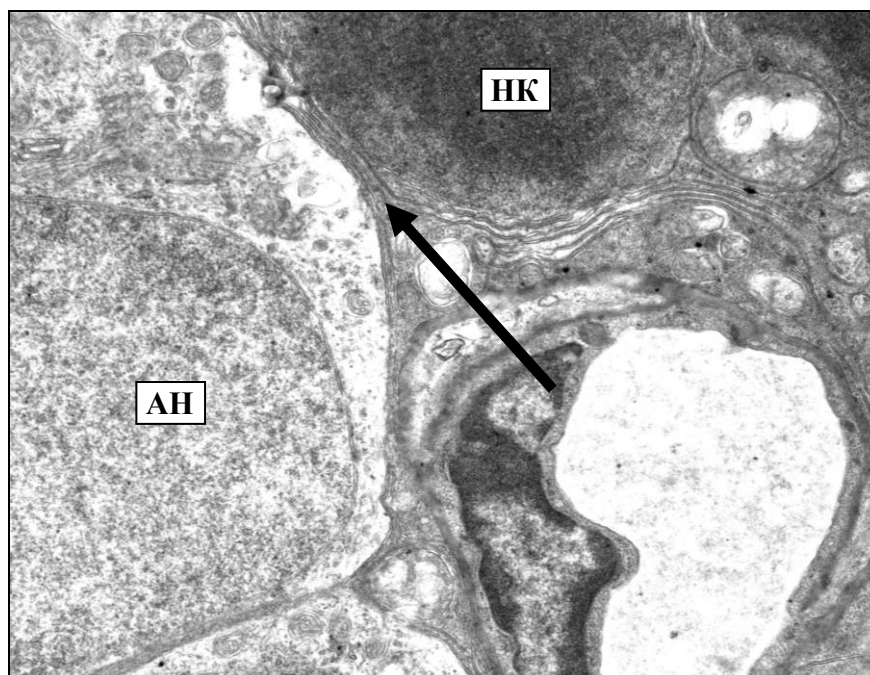


Рис. 92. Деструкция наружного сетчатого слоя сетчатки крыс линии OXYs. Место контакта нейросенсорной клетки (НК) и ассоциативного нейрона (АН) (стрелка). Электронограмма. Ув. 4500

Наружный плексиформный слой представлен преимущественно ленточными синапсами — электронно-плотными трехламеллярными структурами, тесно связанными с инвагинирующими постсинаптическими элементами биполярных и горизонтальных нейронов. В сохранившихся контактах наружного сетчатого слоя изменения синаптических комплексов минимальны. Дегенерации подвергаются в основном митохондрии центральных отростков НК, которые характеризуются набуханием, деструкцией наружной и внутренней мембран (рис. 93).

Некоторые синаптические ленты отличаются размытостью контуров, утратой характерной трехламеллярной ультраструктуры, агглютинацией везикул. Немногочисленные обычные синапсы наружного плексиформного слоя претерпевают изменения по светлому типу.

Внутренний плексиформный слой сетчатки позвоночных, в том числе и крыс, во много раз толще наружного плексиформного слоя, наиболее сложно организован и содержит большую часть всех синапсов сетчатки. Изучение изменений структурной организации синапсов внутреннего плексиформного слоя и их способности к пластичности позволили установить степень

нарушения межнейронных взаимодействий в сетчатке крыс OXYS. При этом выявлены реактивные изменения синаптических контактов по светлomu типу с набуханием отростков, дезагрегацией синаптических везикул и отеком митохондрий, появлением гигантских митохондрий (рис. 94, 95).

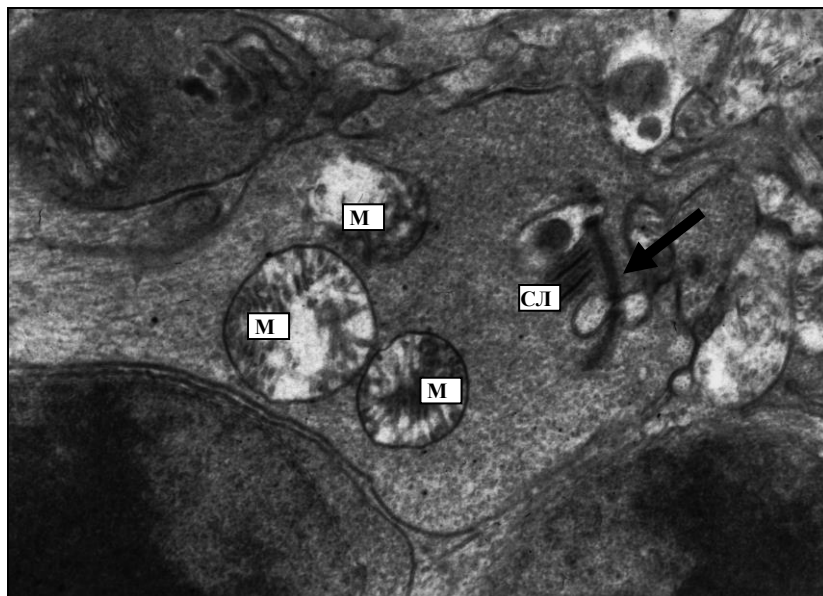


Рис. 93. Центральный отросток нейросенсорной клетки сетчатки крысы OXYS. Отек митохондрий (М), дегенерация крист. Синаптический комплекс не изменен (стрелка). Синаптические ленты (СЛ).

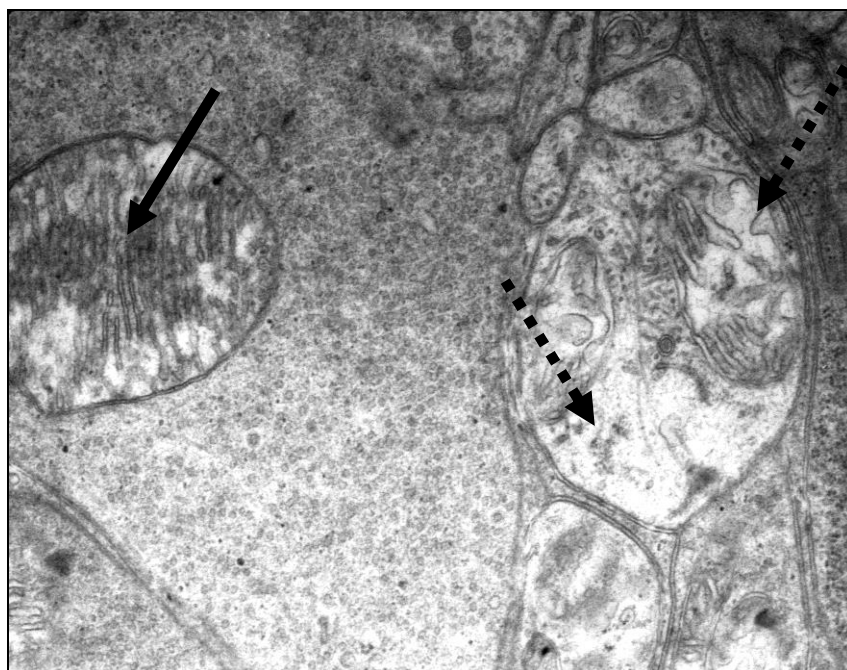


Рис. 94. Внутренний плексиформный слой сетчатки крыс OXYS. Гигантская митохондрия в центральном отростке биполярного нейрона (стрелка). Аутолитические изменения митохондрий – разрыв и лизис наружной и внутренней мембран (пунктирная стрелка). Электронограмма. Ув. 15000

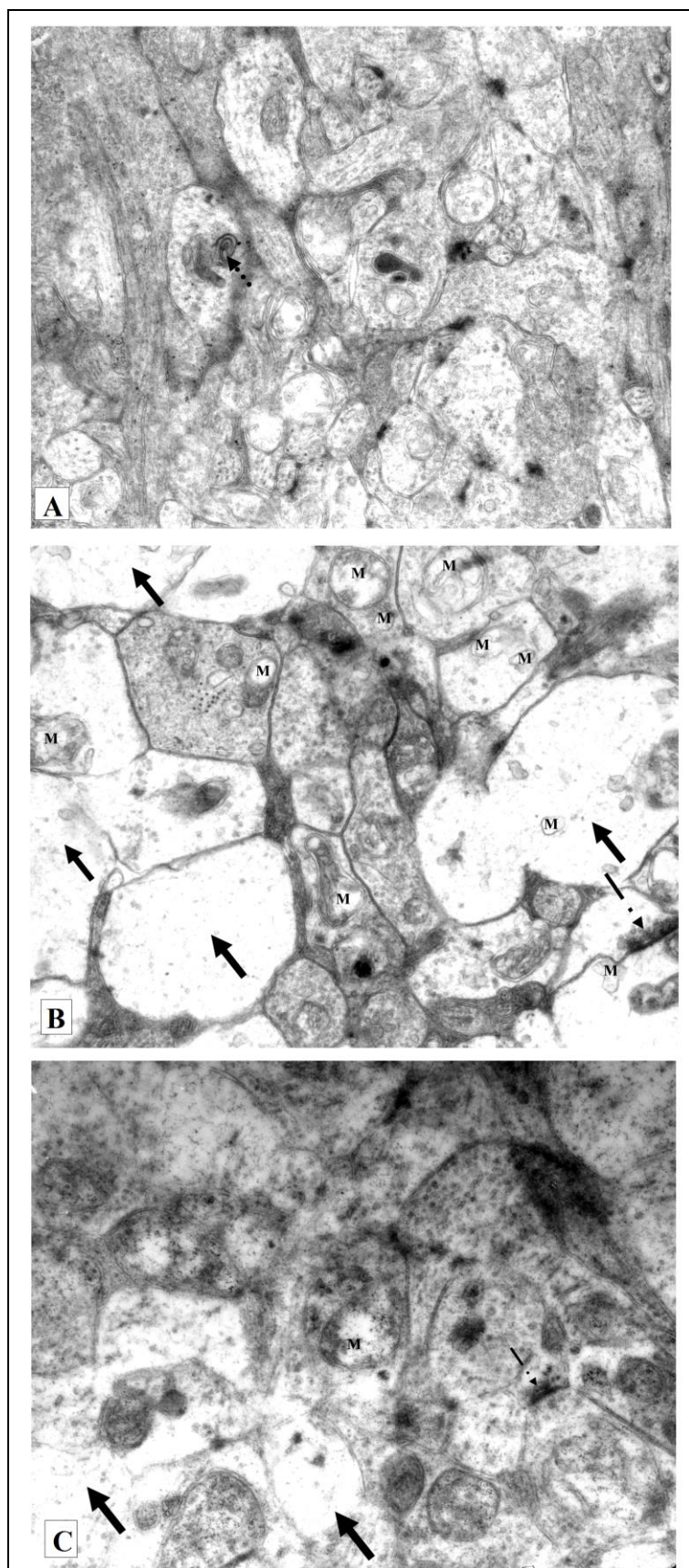


Рис. 95. Внутренний плексиформный слой сетчатки крыс линии Вистар (А), ОХУС без лечения (В) и ОХУС на фоне коррекции диборнолом (С). Миелиноподобные тельца (пунктирная стрелка), разрушение крист митохондрий (М). В. Изменение отростков по светлому типу (стрелки), дезориентация и агглютинация синаптических везикул (стрелка “точка-пунктир”). Электронограммы. Ув. 8500

Количественный анализ внутреннего плексiformного слоя сетчатки показал, что у крыс OXYS численная плотность синаптических контактов в 2,8 раз меньше, чем у контрольных крыс Вистар. При этом снижается количество как симметричных (незрелых синапсов), так и асимметричных функционально зрелых контактов в 2,2 и 3,3 раза соответственно ($p < 0,05$; табл. 44). Среди асимметричных синапсов число плоских неактивных синапсов сокращается вдвое, а количество положительно (синапсов, находящихся в стадии экзоцитоза) и отрицательно (синапсов, соответствующих фазе восстановления) искривленных - в 4,8, и 4,5 раз ($p < 0,05$; табл.44).

Важной частью синаптического контакта является участок пресинаптической мембраны, где происходит выброс медиатора в синаптическую щель - активная зона синапса, обеспечивающая подход синаптических пузырьков к пресинаптической мембране и выделение их содержимого в синаптическую щель. Морфометрический анализ активной зоны контактов у крыс OXYS выявил значимое снижение количества синапсов с длиной активной зоны < 100 , 100-200, 200-300, 300-500 и 500-700 мкм и < 700 мкм (табл. 45). На внутренней поверхности мембраны активной зоны расположены многочисленные филаментозные утолщения, образующие правильную гексагональную решетку – плотные проекции синапса, влияющие на движение органелл и синаптических пузырьков в терминали. Высота плотных проекций также отражает его функциональное состояние. У крыс OXYS наблюдается снижение количества синапсов с высотой плотных проекций типа А (более 60нм) - в 3,4 раза, типа В (50-60нм) - в 7,4 раза и типа С (менее 50 нм) - в 2 раза (табл. 46). Морфологически отмечается снижение интенсивности и неравномерность прокрашивания плотных проекций (рис. 96).

Таблица 46

Содержание асимметричных синапсов внутреннего плексиформного слоя сетчатки с различной высотой плотных проекций (на 100 мкм^2) у крыс OXYS без коррекции и на фоне лечения диборнолом и тиофаном

Группы эксперимента	>50нм	50-60нм	<60нм
Вистар	$4,82 \pm 0,20$	$5,18 \pm 0,19$	$1,14 \pm 0,14$
OXYS	$2,4 \pm 0,15^{\sim}$	$0,7 \pm 0,13^{\sim}$	$0,34 \pm 0,09^{\sim}$
OXYS + диборнол	$4,22 \pm 0,15^{\sim\#}$	$2,68 \pm 0,16^{\sim\#}$	$0,62 \pm 0,10$
OXYS + тиофан	$4,30 \pm 0,19^{\sim\#}$	$2,48 \pm 0,23^{\sim\#}$	$0,74 \pm 0,12$

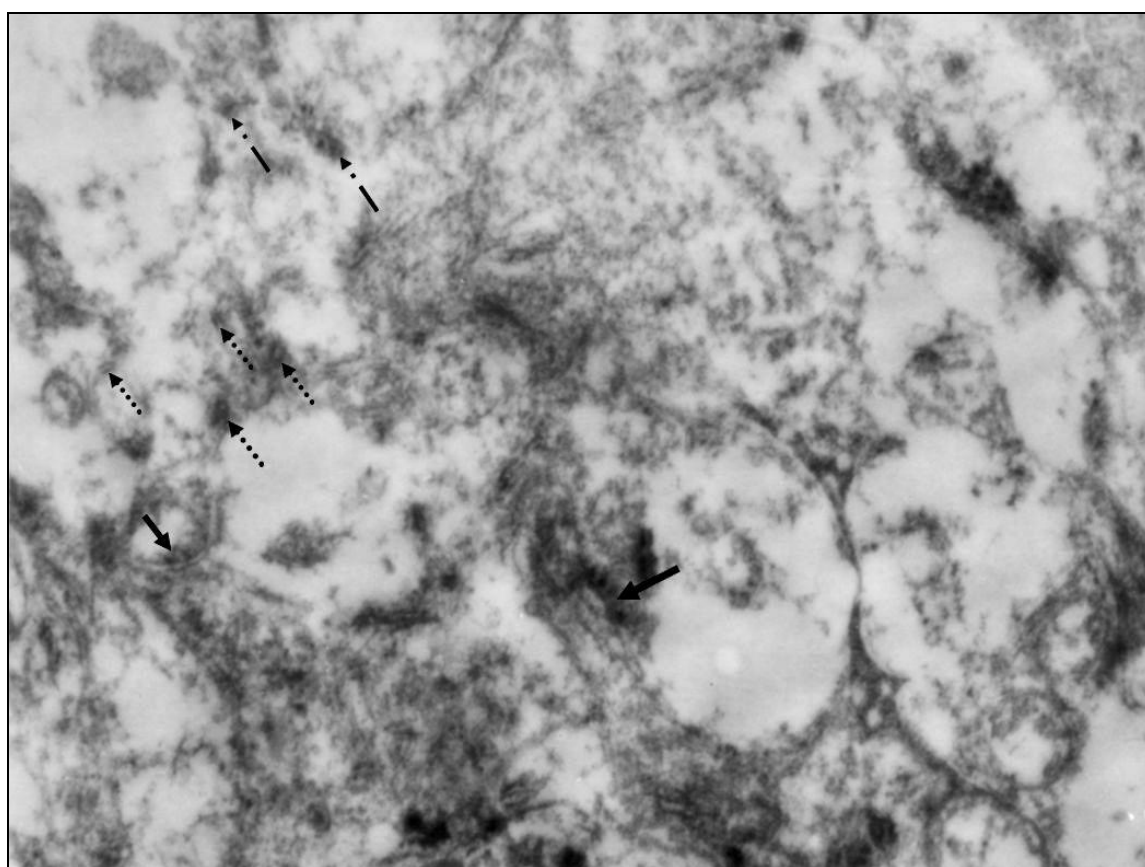


Рис. 96. Внутренний плексиформный слой сетчатки крыс OXYS в возрасте 6 мес, получавших диборнол в качестве коррекции хориоретинальной дегенерации. Неравномерность прокрашивания плотных проекций асимметричных положительно и отрицательно изогнутых синапсов (стрелки). Симметричные синапсы (пунктирная стрелка), асимметричные синапсы ювенильного типа (стрелка “точка-пунктир”). Электронная микрофотография. Контрастирование ФВК. Ув. 8500

Курсовое введение антиоксидантов группы экранированных фенолов диборнола и тиофана ограничивает дегенеративные изменения структур синаптических контактов сетчатки крыс OXYS. Причем оба препарата проявляют одинаковую степень и направленность воздействия на синаптический аппарат сетчатки. В обеих группах с коррекцией общая

численная плотность контактов превышает значения контрольной группы OXYS в 1,8 раза. Однако эти показатели все же остаются на 37% ниже аналогичных значений, зарегистрированных у крыс Вистар ($p < 0,05$; табл. 44).

Сохранность синаптической популяции и синаптической передачи между ассоциативными и ганглионарными нейронами в сетчатке крыс OXYS, получавших диборнол и тиюфан, обеспечивается в основном за счет ассиметричных положительно и отрицательно изогнутых синапсов с высотой плотных проекций < 50 и $50-60$ нм (табл. 44 и 46). На фоне приёма тиюфана и диборнола наблюдается высокая сохранность контактов с длиной АЗК < 100 , $100-200$ и $200-300$ мкм ($p < 0,05$; табл. 45), что, на наш взгляд, является признаком активации неосинаптогенеза у крыс OXYS.

Реактивные и деструктивные изменения радиальной глии – неотъемлемое событие, предшествующее и сопровождающее гибель нейронов. Так, у крыс OXYS наблюдаются как реактивные изменения радиальных глиоцитов в виде пролиферации и отека склеральных отростков радиальной глии, которые фагоцитируют погибшие НК (рис. 82, 83), так и дегенеративные изменения с повышением осмиофилии ядра, дегенерацией органелл и вакуолизацией цитоплазмы (рис. 97).

Изменяются глионейрональные контакты, что проявляется локальным расширением межклеточных щелей, образованием инвагинатов цитоплазмы. Отмечается отек, либо повышение осмиофилии и вакуолизация склеральных и витреальных отростков радиальных глиоцитов в месте формирования наружной и внутренней глиальных пограничных мембран (рис. 80, 98).

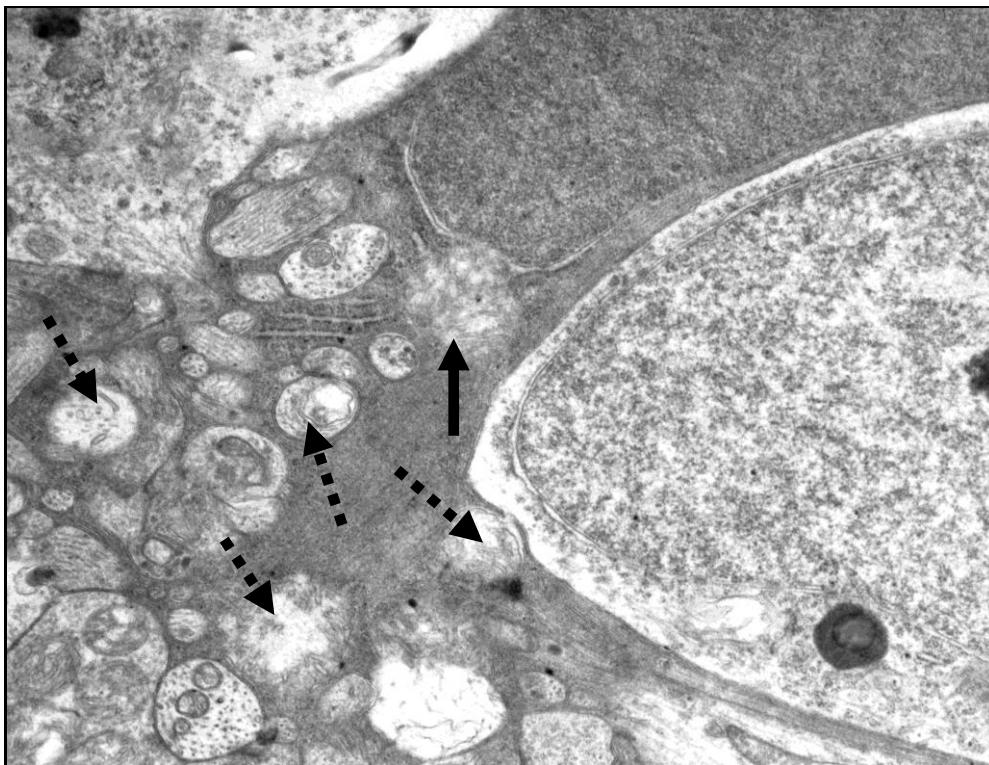


Рис. 97. Гиперхромный радиальный глиоцит во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс OXYs. Дегенерация митохондрий (пунктирные стрелки), расширение и вакуолизация цистерн комплекса Гольджи (стрелка). Электронограмма. Ув. 3500



Рис. 98. Осмиофилия, гомогенизация, вакуолярная дегенерация (стрелки) витреальных отростков радиальных глиоцитов, формирующих внутреннюю глиальную пограничную мембрану, сетчатки крыс OXYs. Электронограмма. Ув. 4500

В настоящем исследовании были изучены некоторые, характерные для клеток сетчатки, маркеры апоптотической гибели: каспаза-3 и каспаза-9, ядерный белок p-53 и антиапоптотический митохондриальный фактор bcl-2. В популяции НК, иммуноположительных к какому-либо из изучаемых антител, не выявлено. Среди ассоциативных и ганглионарных нейронов встречаются каспаза-9-, p 53- и bcl-2-позитивные клетки, однако статистически значимых отличий между контрольной и опытной группами не выявлено. Каспаза-3-иммунопозитивных клеточных элементов в сетчатках всех исследуемых групп не обнаружено. На свето- и ультрамикроскопическом уровнях в сетчатках крыс ОХУС чаще встречаются клетки с морфологическими признаками некроза: кариорексисом, кариолизисом (рис. 99), выявляются структуры, похожие на апоптотические тельца (рис. 100).

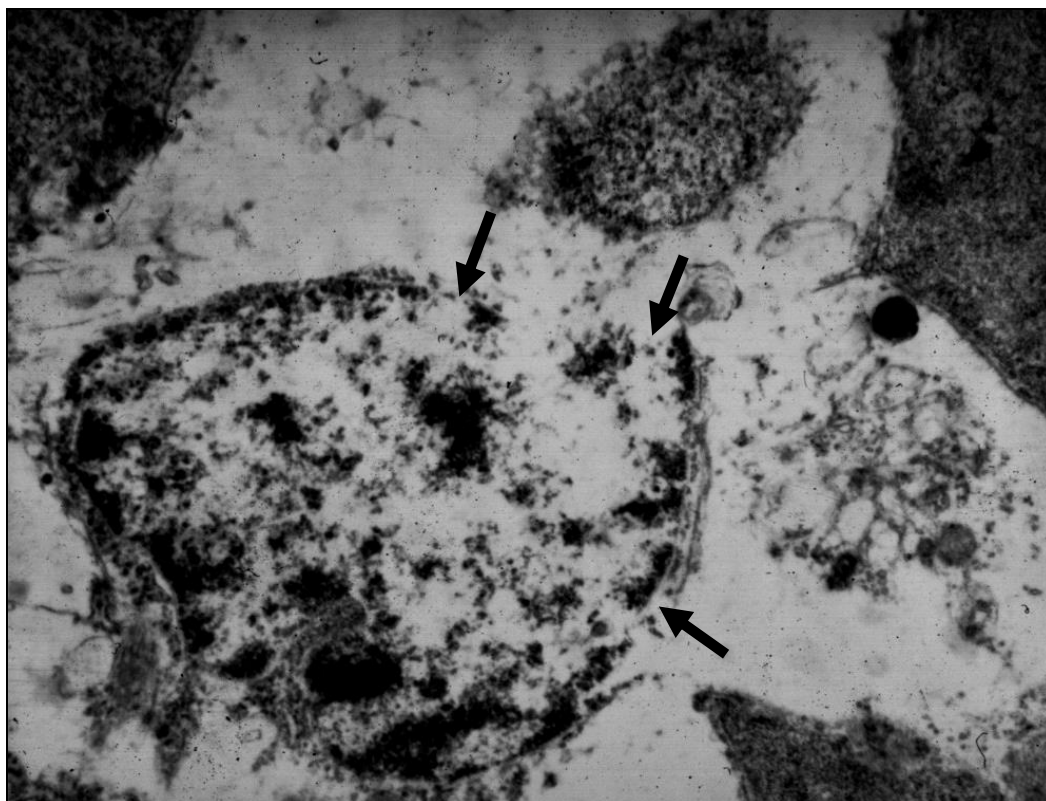


Рис. 99. Кариолизис биполярного нейрона во внутреннем ядерном слое сетчатки крысы линии ОХУС. Фрагментация ядерной мембраны (стрелки). Электронограмма. Ув. 4000

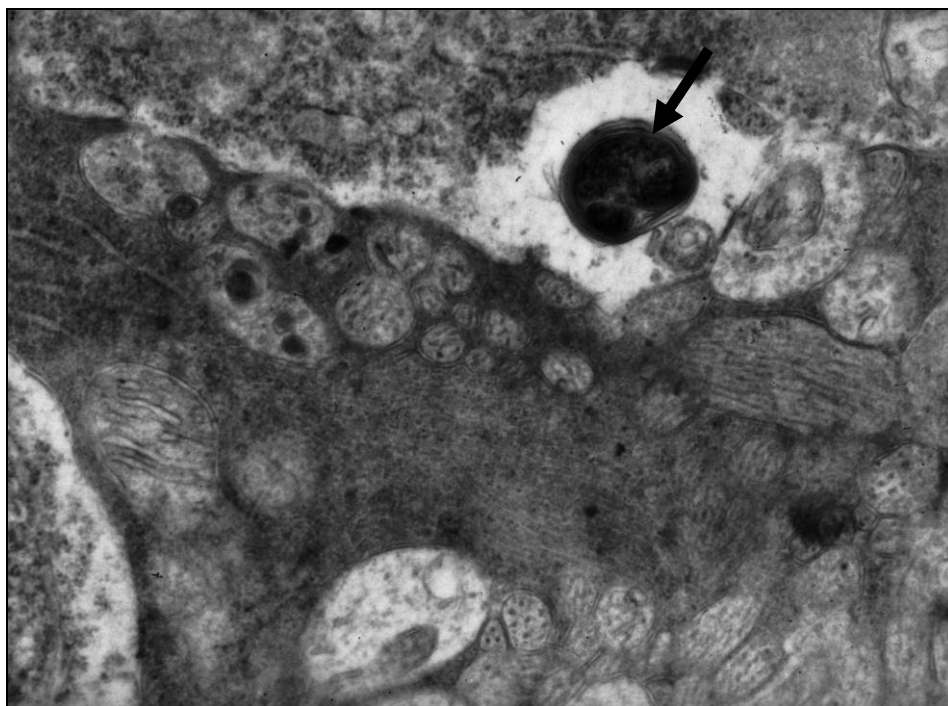


Рис. 100. Апоптотное тельце, покрытое многослойными глиальными пластинами во внутреннем ядерном слое сетчатки крысы линии OXYS. Электронограмма. Ув. 14000

Таким образом, у крыс OXYS в возрасте 6 месяцев микрососудистые изменения в хориоидее, развивающиеся вследствие синдрома повышенной вязкости крови, снижения агрегационной и деформационной способности эритроцитов крыс OXYS приводят к гипоксии. Параллельно с этими процессами развивается накопление окислительных повреждений макромолекул и снижение эффективности работы системы антиоксидантной защиты, что подтверждается проведенным хемилюминесцентным анализом гомогената сетчатки глаз крыс OXYS. Миграция мононуклеарных фагоцитов из сосудистого русла в хориоидею говорит о неотъемлемой роли иммунопатологических нарушений в патогенезе возрастной хориоиретинальной дегенерации крыс OXYS. Эти события влекут за собой выработку ПЦ сетчатки VEGF – ростового фактора, ответственного за активацию процессов неоангиогенеза, увеличение проницаемости сосудов, миграцию моноцитов в очаг поражения и нарушение равновесия в системе про- и антиангиогенеза, однако развивающиеся дегенеративные изменения ПЦ, вероятно, ограничивают чрезмерную выработку VEGF, что свидетельствует о развитии у крыс OXYS “сухой” формы возрастной

хориоретинальной дегенерации. Окислительный стресс, дегенеративные изменения ПЦ, гипоксия, приводят к деструкции НК и синаптических контактов, нейронов внутренних слоев сетчатки. Основным путь гибели клеточных структур сетчатки, вероятно - некротические нарушения на фоне дегенерации митохондрий, выраженной макрофагальной реакции. При этом, не отрицается вовлечение каспаза- и p-53-сигнальных путей апоптоза, однако они не являются определяющими в развитии нейродегенерации.

Исследуемые препараты диборнол и тиофан обладают в равной степени выраженными антиоксидантными свойствами. Вместе с тем, диборнол, в отличие от тиофана, проявляет гемореологические свойства: нормализует микроциркуляцию в сетчатке, приводит к снижению гипоксии, ограничению образования VEGF, снижению проницаемости сосудов и миграции мононуклеарных фагоцитов из кровеносного русла. Это способствует более выраженному ретинопротекторному эффекту диборнола с защитным влиянием на НК, ассоциативные и ганглионарные нейроны сетчатки.

3.4. ИЗМЕНЕНИЯ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ТОТАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕПЕРФУЗИЕЙ НА ФОНЕ КОРРЕКЦИИ ТИОФАНОМ И ДИБОРНОЛОМ

Отсутствие у тиофана выраженных гемореологических свойств, показанное нами на моделях стрептозотоцинового диабета, возрастной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS, а также косвенно на модели фотодегенерации сетчатки показало нецелесообразность его использования в качестве корректора нарушений хориоретинального комплекса на модели ишемии/реперфузии головного мозга крыс.

Тотальная транзиторная ишемия головного мозга (ИГМ) с последующей реперфузией у крыс приводит к мощным дегенеративным изменениям структурных компонентов хориоретинального комплекса. Она

сопровождается синдромом повышенной вязкости крови и избыточной активацией в тканях сетчатки реакций свободнорадикального окисления.

Анализ основных показателей гемореологии показал, что у крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии головного мозга на системном уровне развиваются значительные нарушения реологии крови: увеличение вязкости крови на низких скоростях сдвига (от 3 с^{-1} до 10 с^{-1}) в среднем в 1,6 раза ($p < 0,05$) и агрегационной активности эритроцитов, о чем свидетельствует сокращение полупериода клеточной агрегации в 2,3 раза по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$, табл. 47). Величина индекса Штольца при неизменном показателе гематокрита в контрольной и опытной группах зависит от изменения показателя вязкости крови. Достоверное повышение вязкости крови у крыс с тотальной транзиторной ИГМ на низких скоростях сдвига, по сравнению с аналогичными показателями крови ложнооперированных животных, свидетельствует о снижении индекса Штольца, а, следовательно, о снижении доступности кислорода для тканей у ишемизированных крыс.

Диборнол способствует нормализации вязкости крови на скоростях сдвига от 5 с^{-1} до 10 с^{-1} , что говорит в пользу его антигипоксического эффекта при ишемии головного мозга, при этом полупериод агрегации эритроцитов становится длиннее на 2,23 с ($p < 0,05$), однако все же остается значимо ниже контрольных значений (табл. 47).

Таблица 47.

Основные показатели реологии крови крыс после тотальной транзиторной ишемии головного мозга на фоне внутрижелудочного введения диборнола (100 мг/кг/сут)

Группы	Вязкость крови, мПа·с							T _{1/2} Э, с	Ht
	3	5	7	10	50	100	300		
контроль	8,70± 0,27	8,01± 0,31	7,48± 0,31	6,80± 0,28	4,81± 0,19	4,20± 0,10	3,93± 0,07	13,10± 1,75	45,83± 1,30
ишемия	15,03± 1,27*	13,05± 1,47*	12,10± 1,55*	10,55± 1,35*	6,38± 0,51	5,10± 0,23	4,48± 0,15	5,65± 0,48*	45,50± 1,11
ишемия+ диборнол	10,19± 0,46*+	9,49± 0,47+	8,54± 0,40+	7,89± 0,36+	4,97± 0,18	4,39± 0,11	4,07± 0,09	7,88± 0,77*+	45,85± 1,45

С помощью хемилюминесцентного анализа зарегистрировано увеличение содержания свободных радикалов и снижение общей

антиоксидантной активности гомогенатов сетчаток животных, подвергшихся ишемии-реперфузии головного мозга по сравнению с контрольной группой во все временные промежутки, о чем говорят достоверно более высокие значения спонтанной хемилюминесценции и минимальные значения разницы хемилюминесценции нулевой пробы без добавления гомогената сетчатки и пробы с гомогенатом (рис. 101, 102). В группе с коррекцией исследуемые показатели, начиная со второй минуты измерения свечения, находятся на уровне значений ложнопериоперированных животных (рис. 101, 102).

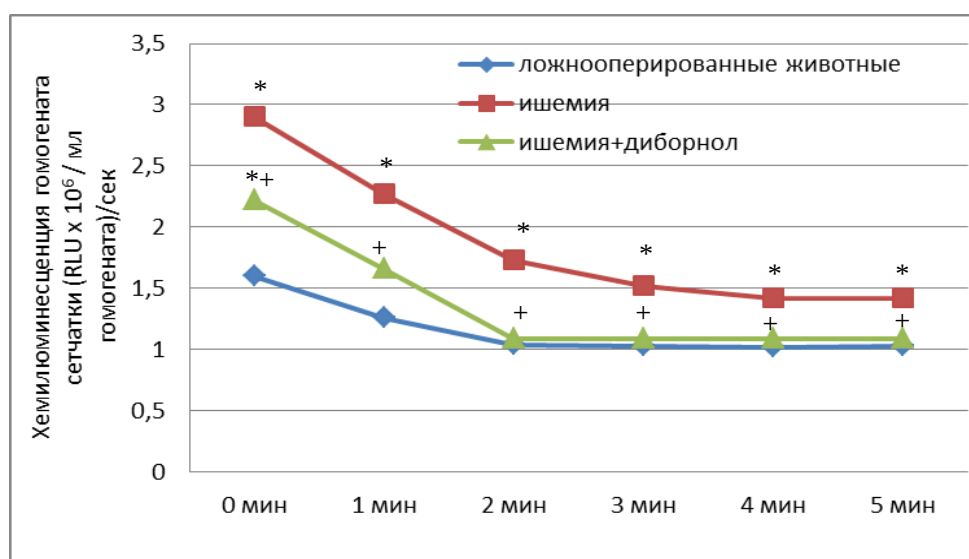


Рис. 101. Динамика изменений хемилюминесцентной активности гомогената сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии на фоне коррекции диборнолом.

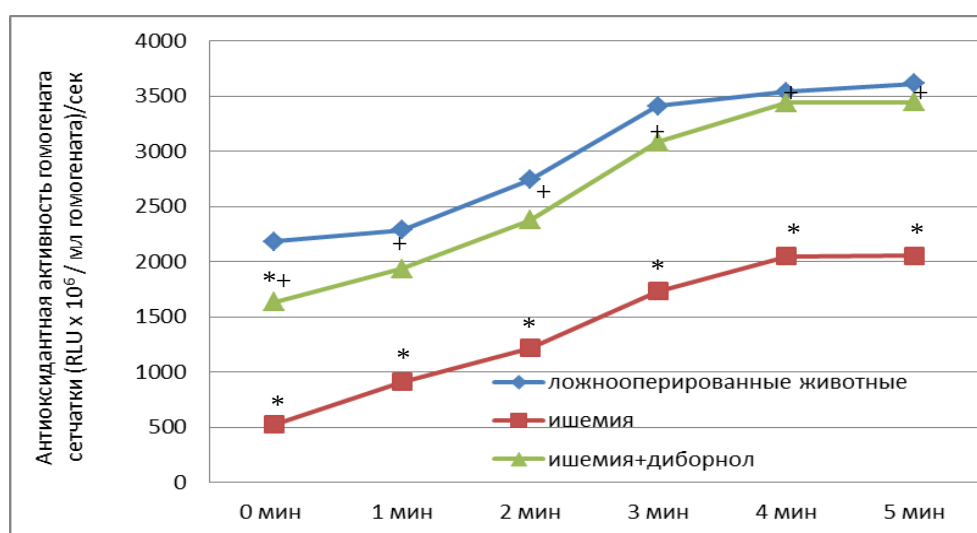


Рис. 102. Динамика изменений антиоксидантной активности гомогената сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии на фоне коррекции диборнолом.

Морфологический анализ показал, что большинство сосудов собственной сосудистой оболочки имеют закрытый просвет. В части хориокапилляров отмечаются явления стаза, сладжа, тромбоза, появление гемолиза эритроцитов (рис. 103). Цитоплазма эндотелиоцитов хориокапилляров вакуолизирована в основном за счет дегенерации митохондрий, базальная мембрана несколько утолщена (рис. 104). В околососудистом пространстве отмечается появление большого числа фибробластоподобных отростчатых клеток, коллагена (рис. 105). Базальный комплекс утолщается, деструктурируется, теряет фибриллярный компонент, гомогенизируется, что свидетельствует о нарушении проницаемости гематоретинального барьера (рис. 106).

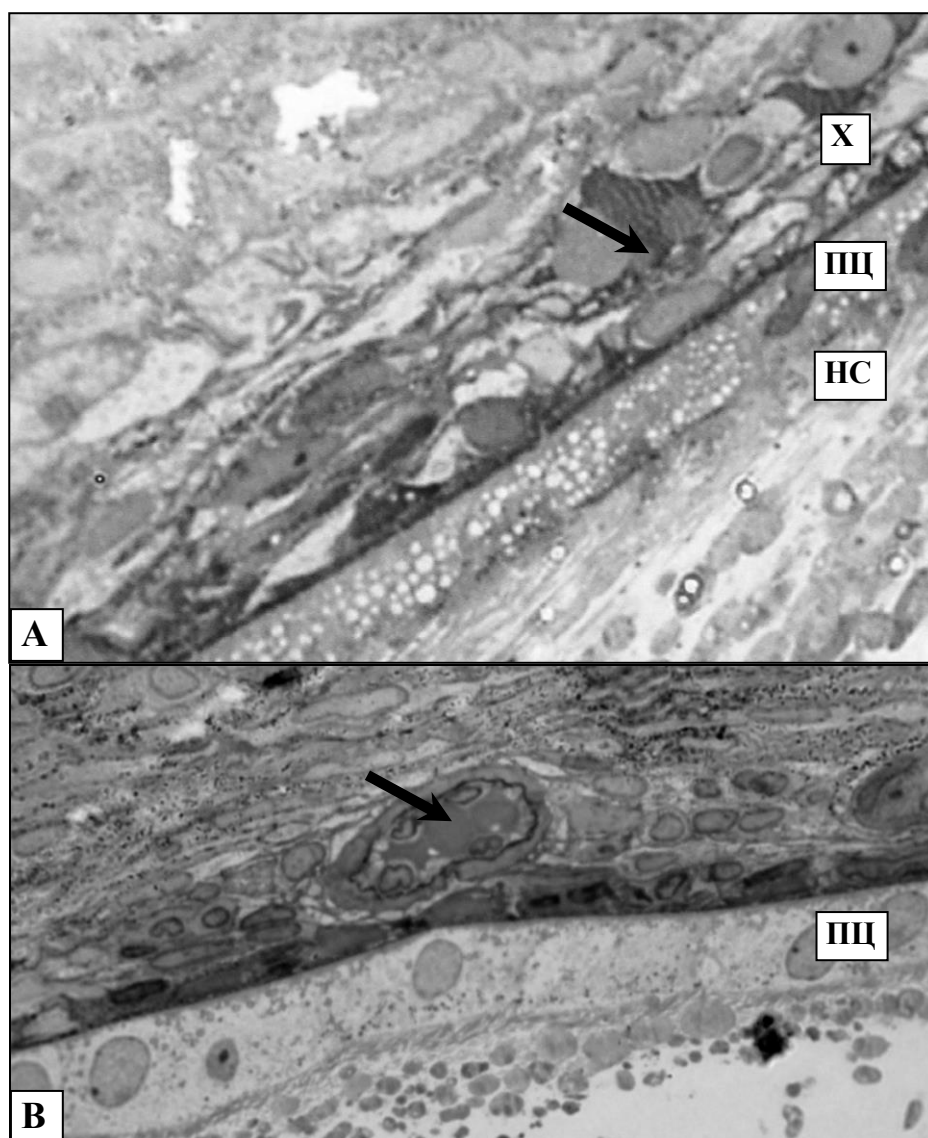


Рис. 103. Хориоидея (X), пигментциты (ПЦ), и наружные сегменты нейросенсорных клеток (НС) крыс, подвергшихся тотальной транзиторной ишемии с последующей реперфузией головного мозга крыс. Отсутствие открытых функционирующих капилляров, тромбоз с явлениями гемолиза эритроцитов в сосуде (стрелка). Окраска толудиновым синим. Ув. 1000

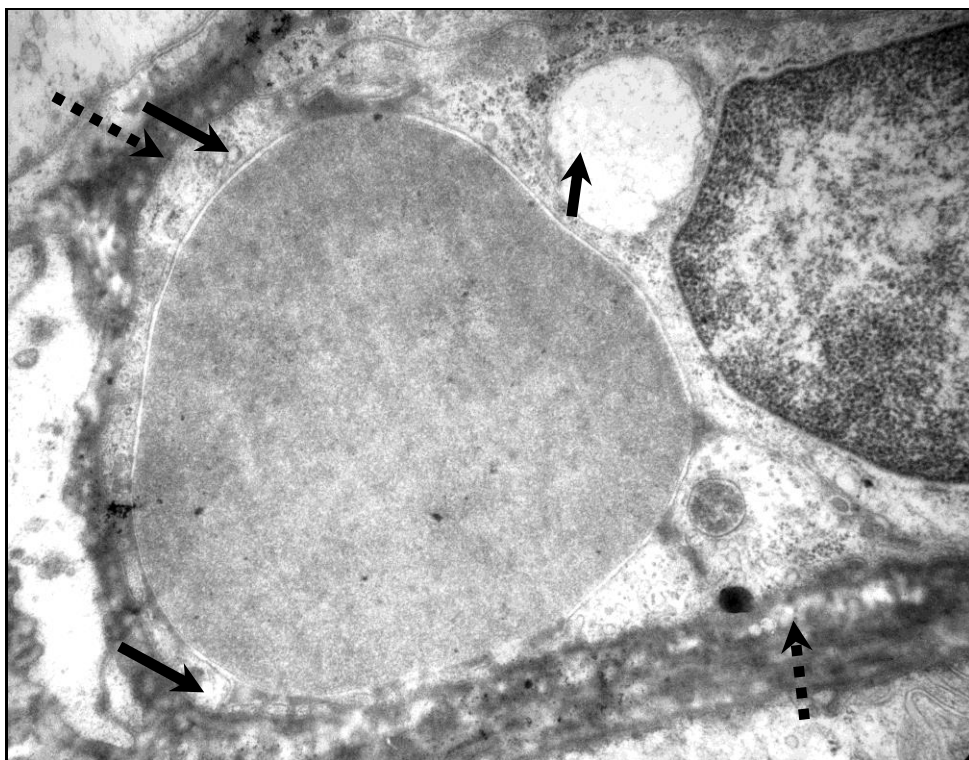


Рис. 104. Хориокапилляр в хориоиде крыс после тотальной транзиторной ишемии с реперфузией. Вакуолизация цитоплазмы (стрелка) и утолщение базальной мембраны (пунктирная стрелка) эндотелиоцита. Электронограмма. Ув. 3500

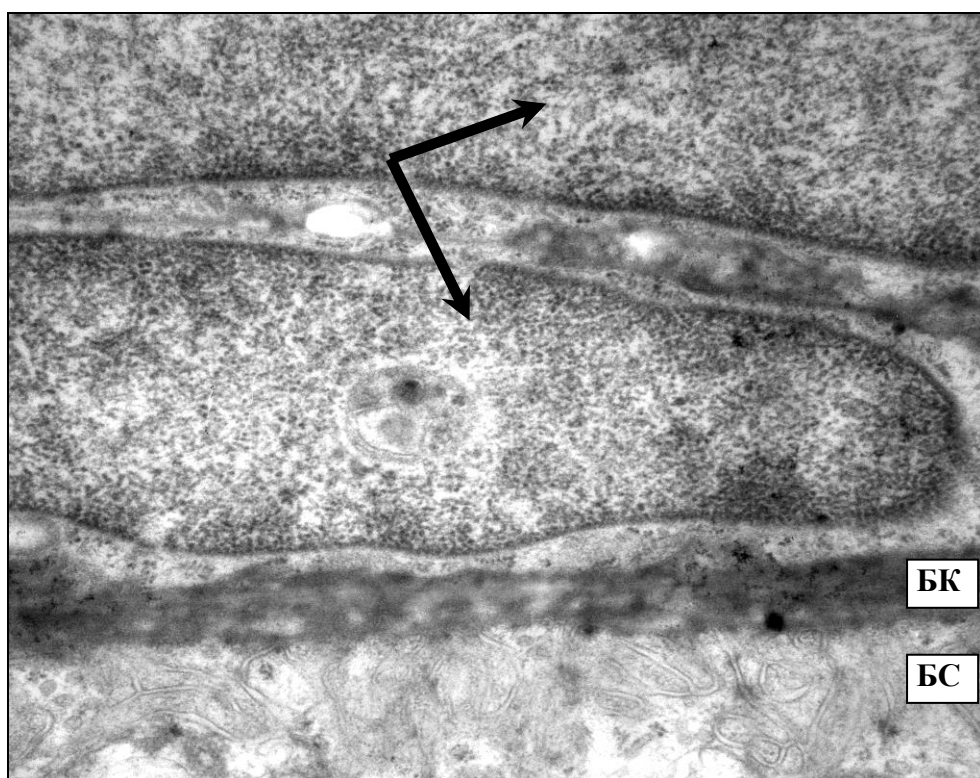


Рис. 105. Фибробластоподобные клетки (стрелки) на месте капилляров хориоидеи крыс после тотальной транзиторной ишемии с реперфузией. БК – базальный комплекс, БС – базальная складчатость пигментоцитов сетчатки. Электронограмма. Ув. 3500

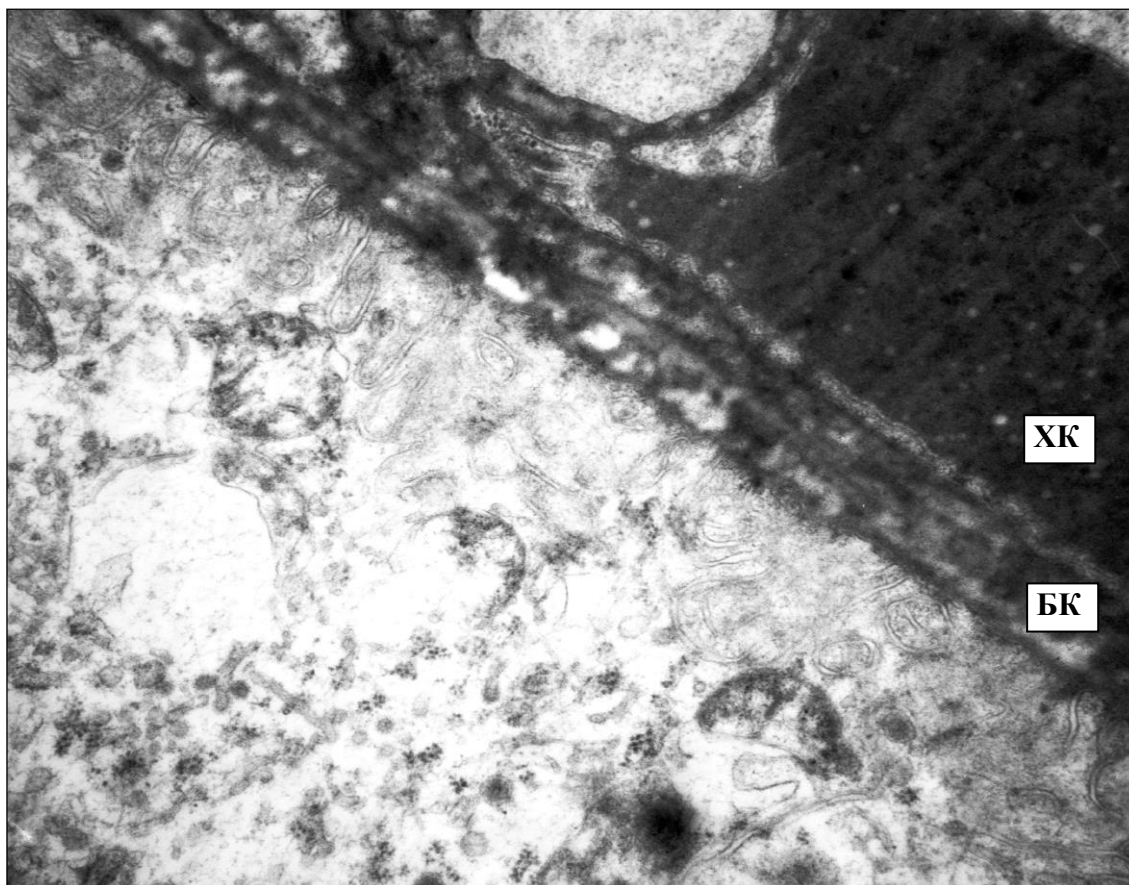


Рис. 106. Утолщение, гомогенизация, базального комплекса (БК) хориоидеи крыс после тотальной транзиторной ишемии с реперфузией. Тромбоз хориокапилляра (ХК). Электронограмма. Ув. 3500

Дегенеративным изменениям подвергается еще один компонент гематоретинального барьера – ПЦ. Значительная часть ПЦ вакуолизируется (рис. 103 А). Повреждаются внутренние и наружные мембраны крист митохондрий, отмечается очаговое сглаживание базальной складчатости (рис. 107).

При проведении терапии диборнолом, электронномикроскопически прослеживается высокая сохранность органелл в ПЦ (рис. 108).

Морфологическая картина изменений структур наружного гематоретинального барьера крыс, получавших диборнол, также имеет ряд значительных отличий от группы сравнения: четко выражена ламинарная структура базального комплекса, развит фибриллярный компонент (рис. 108).

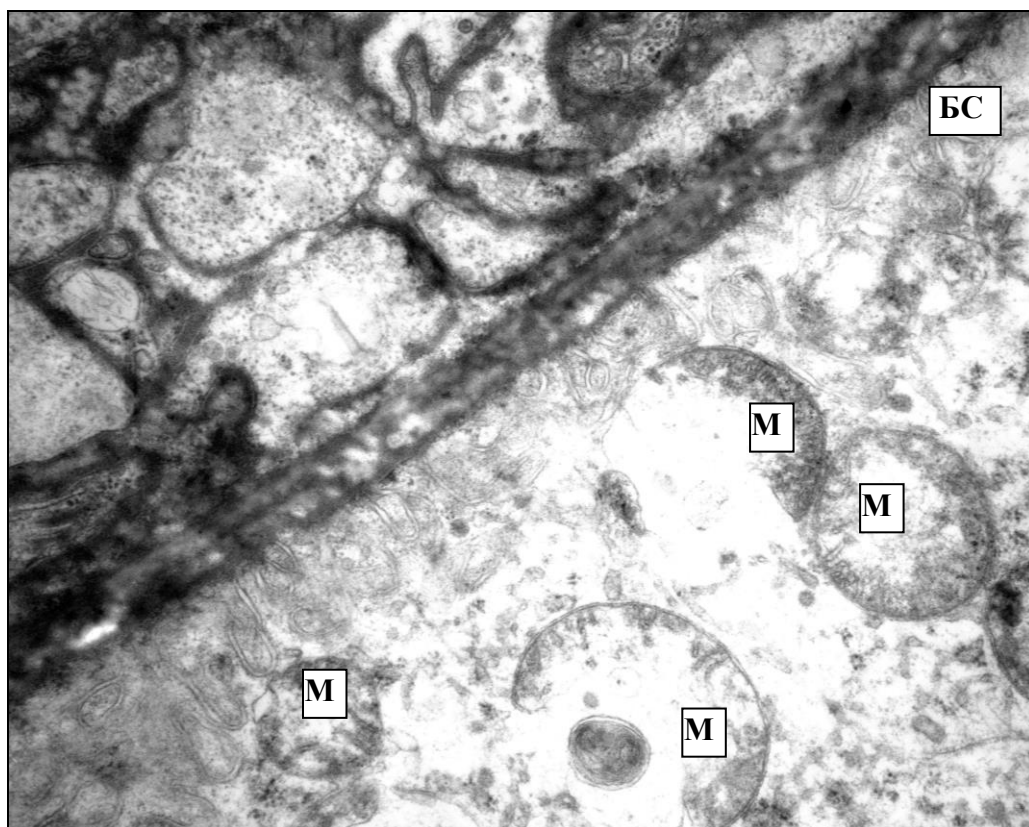


Рис. 107. Дегенерация митохондрий (М), сглаживание базальной складчатости (БС) пигментцитов сетчатки крыс после тотальной ишемии и реперфузии головного мозга. Ув. 3500

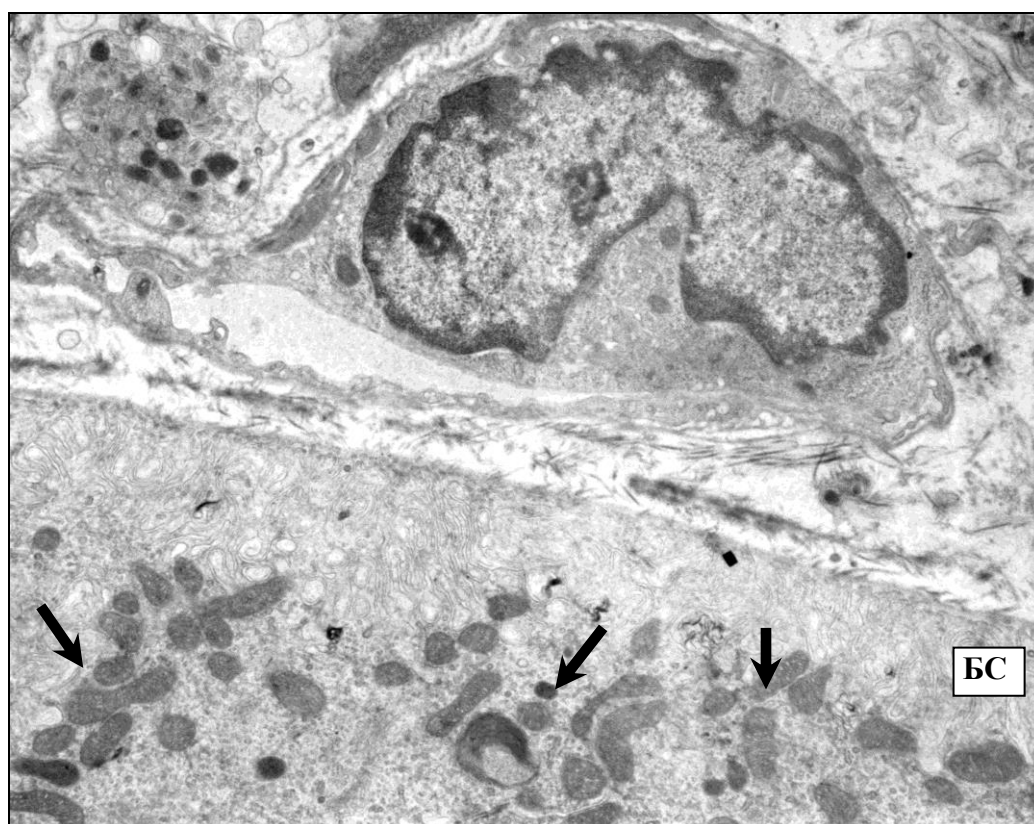


Рис. 108. Цитоплазма пигментцита сетчатки крысы после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии головного мозга на фоне коррекции диборнолом. Митохондрии (стрелки) имеют правильную структурную организацию, базальная скаладчатость (БС) четко оформлена. Ув. 2500

В группе с ишемией-реперфузией зарегистрировано статистически значимое увеличение удельной площади тромбированных сосудов со стазом, сладжем форменных элементов или тромбозом в 6,4 раза и снижение удельной площади открытых сосудов в 7,8 раз (табл. 48). Диборнол сокращает тромбообразование в сосудах хориоидеи сетчатки при ишемии головного на 22% ($p<0,05$). Этот факт согласуется с данными гемореологических показателей в данной экспериментальной группе (табл. 47).

Таблица 48.

Количественный анализ изменений сосудов хориоидеи и пигментцитов сетчатки крыс с тотальной ишемией головного мозга

Группы эксперимента	Удельная площадь открытых сосудов хориоидеи (%)	Удельная площадь сосудов хориоидеи со сладжем эритроцитов и/или тромбозом (%)	Удельная площадь пигментцитов (%)
Контроль	$36,0 \pm 0,7$	$1,52 \pm 0,09$	$5,43 \pm 0,1$
Ишемия	$4,63 \pm 0,68^*$	$9,66 \pm 1,24^*$	$3,82 \pm 0,44^*$
Ишемия+диборнол	$5,16 \pm 0,74^*$	$7,51 \pm 0,92^{*+}$	$4,18 \pm 0,54^*$

Острая ишемия головного мозга с последующей реперфузией приводит к снижению удельной площади слоя ПЦ в срезе сетчатки относительно значений ложнооперированных 30% ($p<0,05$), в группе с диборнолом - на 23% (табл. 48). В цитоплазме ПЦ всех групп содержатся крупные вакуоли с фрагментами наружных сегментов НК, мембранные диски которых имеют признаки деструкции – расслоение, склеивание и дезориентацию (рис. 109).

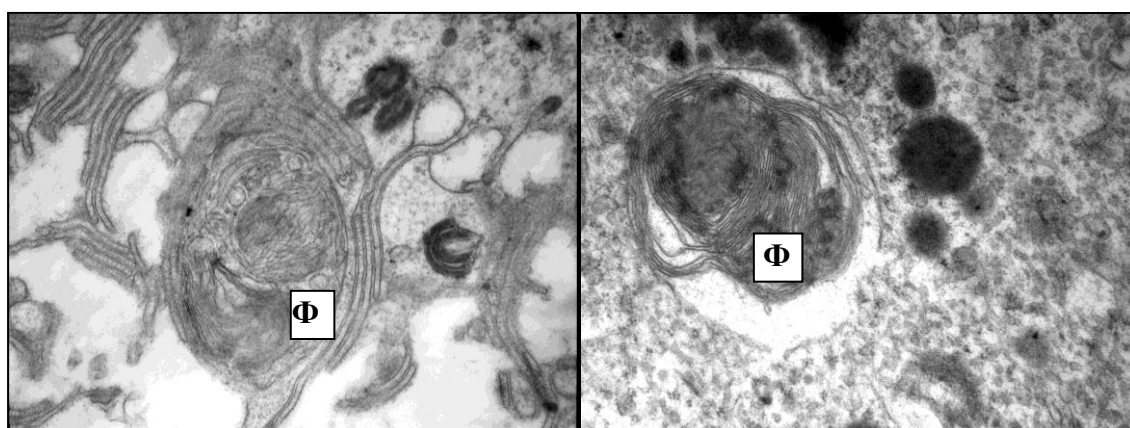


Рис. 109. Фагосома (Ф) с фрагментом мембранных дисков наружного сегмента нейросенсорной клетки в цитоплазме пигментцита сетчатки крыс с тотальной ишемией головного мозга. Электронограмма. Ув. 4500

Аналогичные изменения структуры наружных сегментов НК обнаруживаются и в фотосенсорном слое сетчатки группы без лечения.

Нарушение структуры гематоретинального барьера приводит к диапедезу эритроцитов в фотосенсорный слой (рис. 110).

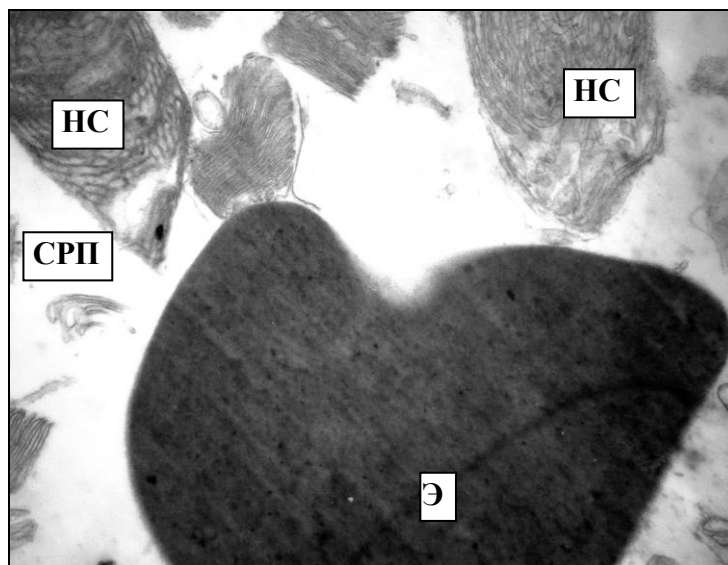


Рис. 110. Субретинальное пространство (СРП) сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии головного мозга. Эритроцит (Э). Деструкция наружных сегментов нейросенсорных клеток (НС). Электронограмма. Ув. 4000

Некоторые внутренние сегменты осмиофильны, в них отмечается отек и разрушение крист митохондрий, появление мелкогранулярного осмиофильного материала, что является признаками острой гипоксии (рис. 111).

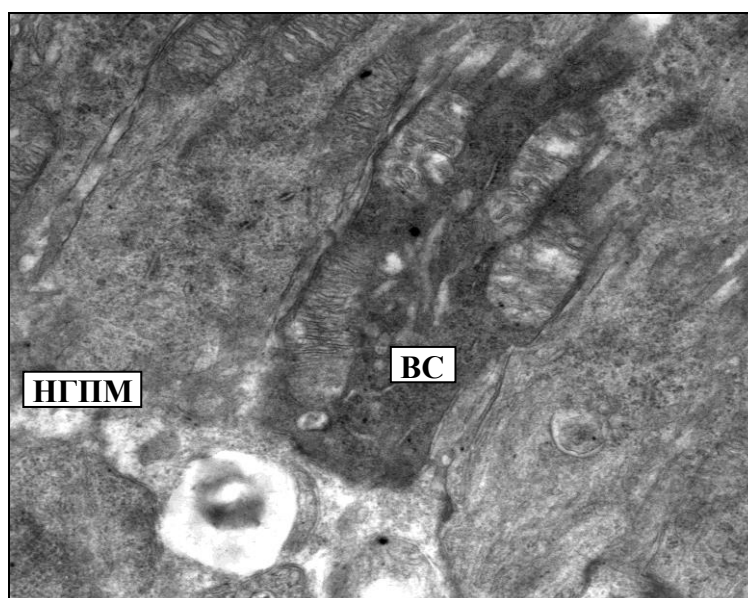


Рис. 111. Изменение внутреннего сегмента (ВС) нейросенсорной клетки сетчатки крыс после ишемии/реперфузии головного мозга по темному типу – осмиофилия, набухание и разрушение крист митохондрий. Отек и вакуолизация склеральных отростков радиальной глии вблизи наружной глиальной пограничной мембраны (НГПМ). Электронограмма. Ув. 2500

Изменения ядросодержащей части НК представлены, главным образом, отеком перикариона, пикнозом и сморщиванием ядер (рис. 112, 113 А). Между телами НК располагаются отечные и гипертрофированные склеральные отростки радиальной глии, которые фагоцитируют деструктивно измененные нейроны (рис. 113 В).

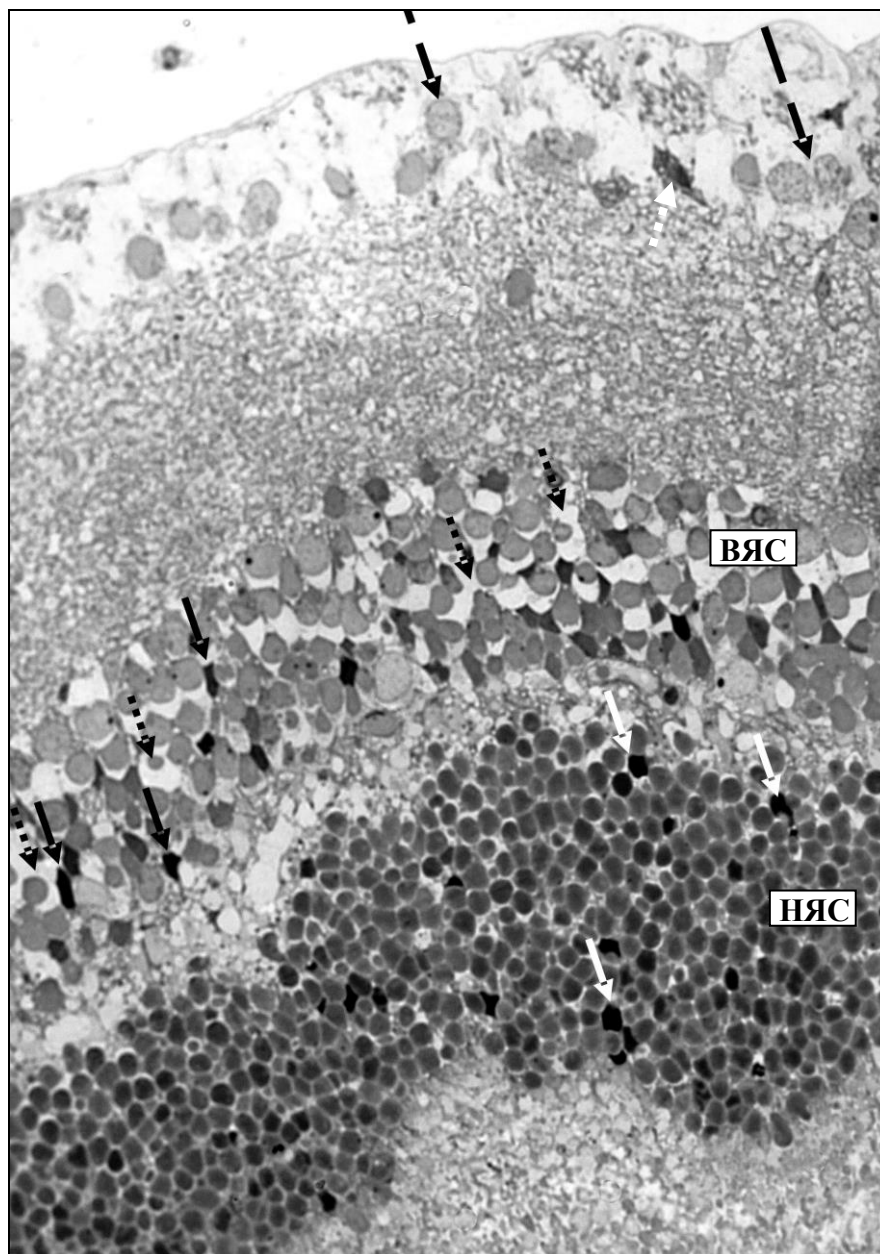


Рис. 112. Сетчатая оболочка крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга. Пикноз ядер нейросенсорных клеток (белые стрелки) в наружном ядерном слое (НЯС), пикноморфные радиальные глиоциты (черные стрелки) и отек ассоциативных нейронов (стрелки с мелким пунктиром) внутреннего ядерного слоя (ВЯС), очаговый хроматолиз ганглионарных нейронов (стрелки с широким пунктиром), гиперхромный пикноморфный нейрон (белая пунктирная стрелка). Полутонкий срез. Окр. толуидиновый синий. Ув. 400

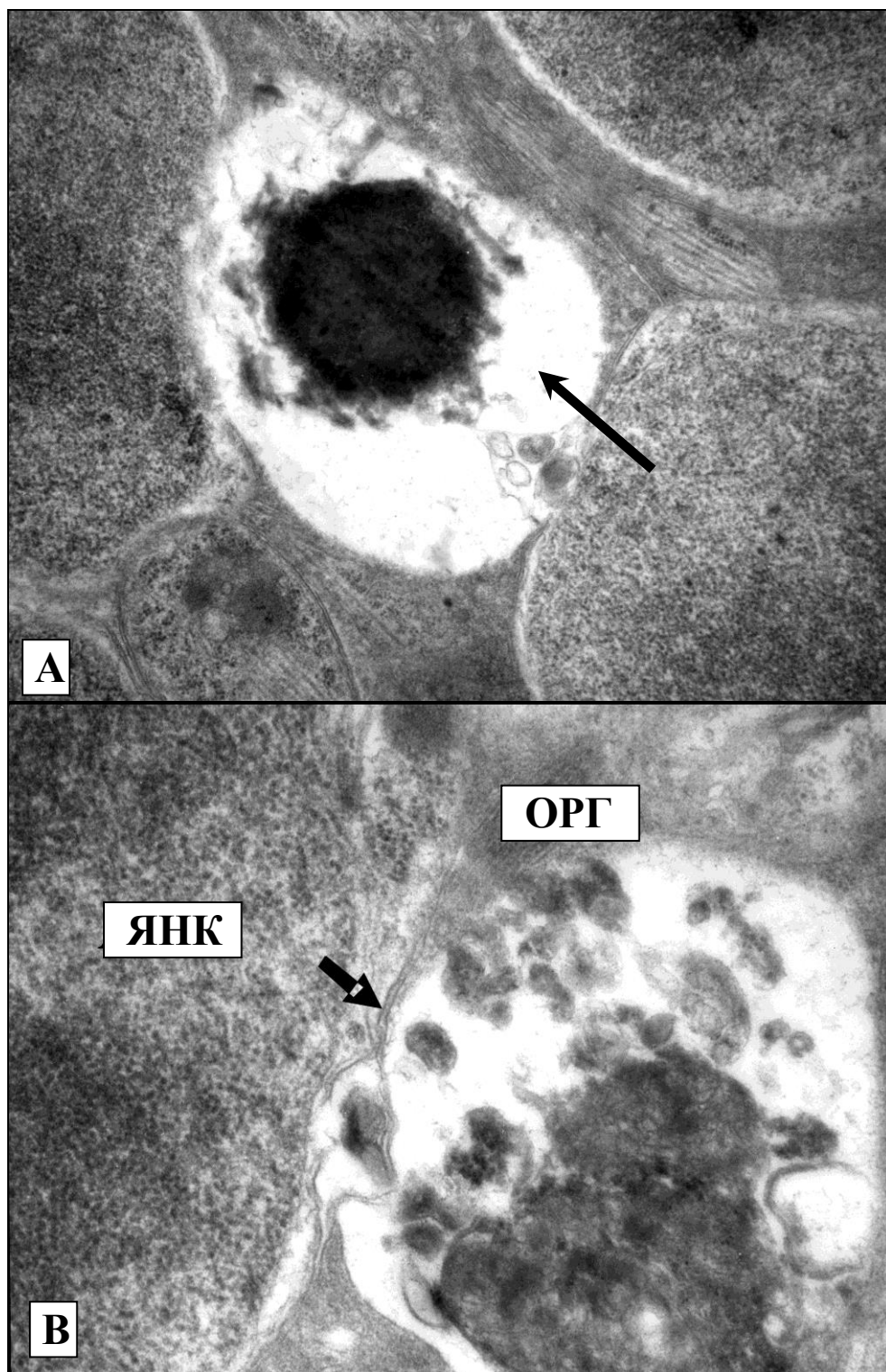


Рис. 113. Изменения наружного ядерного слоя сетчатки крыс с тотальной ишемией головного мозга.

А. Отек перикариона, пикноз нейросенсорной клетки (стрелка) Ув. 2000

Б. Фагоцитоз склеральными отростками радиальной глии (ОРГ) деструктивно измененного перикариона нейросенсорной клетки (стрелка). ЯНК – ядро нейросенсорной клетки. Ув. 5000

Процент пикноморфных НК возрастает в 11 раз, что сопровождается значимым снижением численной плотности и количества рядов ядер НК на 30 и 27% соответственно ($p < 0,05$, табл. 49).

Таблица 49.

Количественный анализ показателей деструкции наружного ядерного слоя сетчаток крыс с тотальной ишемией головного мозга

Группы эксперимента	Пикноз ядер нейросенсорных клеток (%)	Численная плотность ядер нейросенсорных клеток на 1 мм ² среза	Количество рядов ядер нейросенсорных клеток в НЯС
Контроль	0,2±0,02	35989,72±454,52	13,1±0,35
Ишемия	2,19±0,33*	26420,38±1632,65*	9,25±0,43*
Ишемия+диборнол	0,49±0,05**	33588,75±767,75 ⁺	9,13±0,18*

Применение диборнола с первых часов развития тотальной ишемии головного мозга существенно снижает негативные последствия гипоксии в ткани сетчатки. Большинство наружных и внутренних сегментов НК остаются относительно интактными, сохраняется связь между ними. В части митохондрий происходит разрушение крист, часть – обнаруживает лишь расширение межмембранного пространства между кристами (рис. 114).

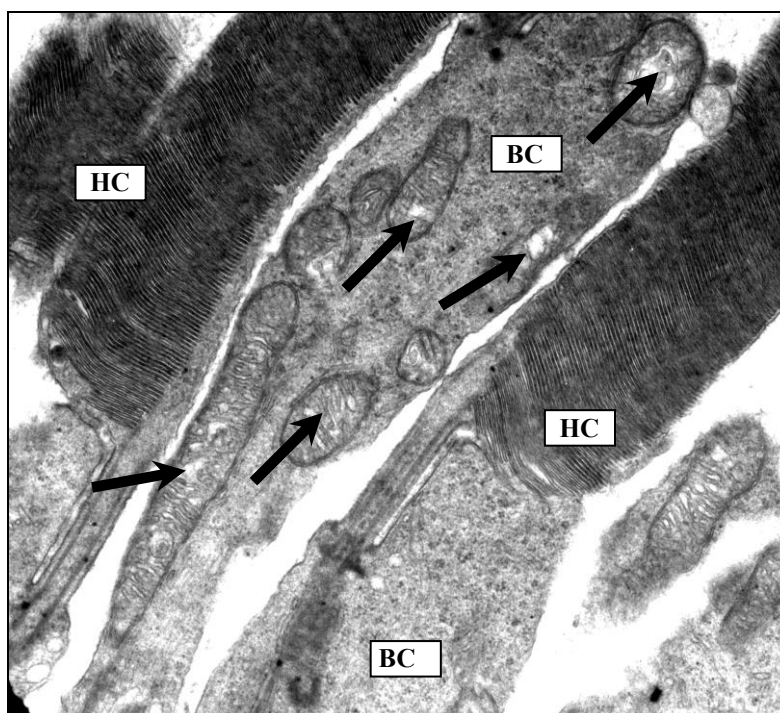


Рис. 114. Наружные (НС) и внутренние сегменты (ВС) нейросенсорных клеток крыс после тотальной транзиторной ишемии с реперфузией на фоне коррекции диборнолом. Мембраны наружных сегментов не изменены. Дезориентация внутренних мембран, неравномерное расширение внутреннего межмембранного пространства митохондрий в эллипсоиде (стрелки). Сохранность гранулярной структуры миоида. Электронограмма. Ув. 4000

На фоне приема диборнола отмечается выраженная сохранность ядросодержащей части НК, о чем говорят достоверно более низкое (в 4,5 раза относительно группы без коррекции, $p < 0,05$) значение показателя пикнотично измененных ядер и более высокое (на 21% выше, чем в группе без коррекции, $p < 0,05$) значение показателя численной плотности ядер НК, которое значимо не отличается от значений аналогичного показателя у ложнооперированных крыс (табл. 49).

Радиальная глия подвергается как прогрессивно-пролиферативным, так и деструктивным изменениям. В пользу первого утверждения свидетельствует гипертрофия и пролиферация склеральных отростков радиальных глиоцитов в НЯС (рис. 115).

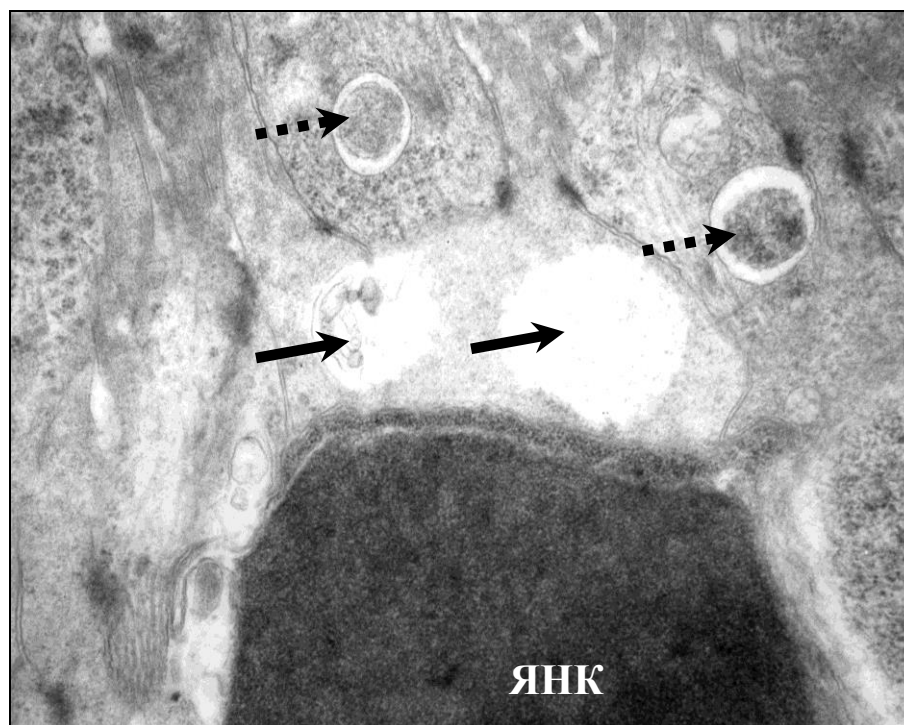


Рис. 115. Отек и пролиферация склеральных отростков радиальной глии в наружном ядерном слое. Вакуолизация (стрелки), остаточные тельца (пунктирные стрелки) в цитоплазме. Пикноз ядра нейросенсорной клетки (ЯНК). Электронограмма. Ув. 3000

Деструктивные изменения касаются в основном ядер глиоцитов, часть из которых характеризуется повышенной электронной плотностью, цитоплазма около ядра отечна, вакуолизирована, лишена органелл, в ней встречаются миелиноподобные тельца (рис. 115, 116, 117).

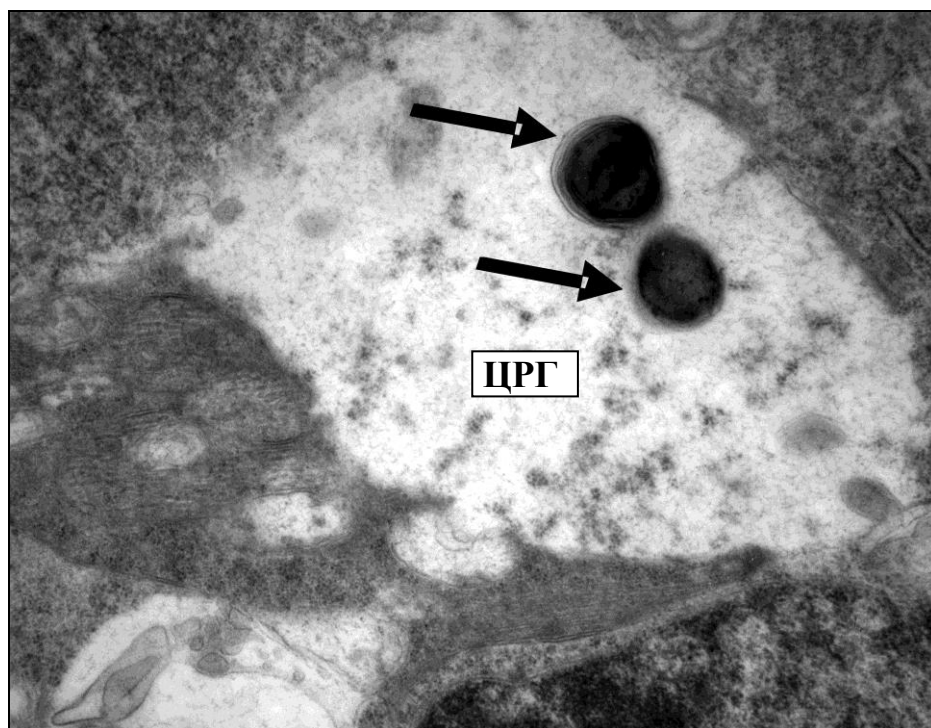


Рис. 116. Отек цитоплазмы радиального глиоцита (ЦРГ) в сетчатке крыс с тотальной ишемией головного мозга. Миелиноподобные тельца (стрелки). Электронограмма. Ув. 2000

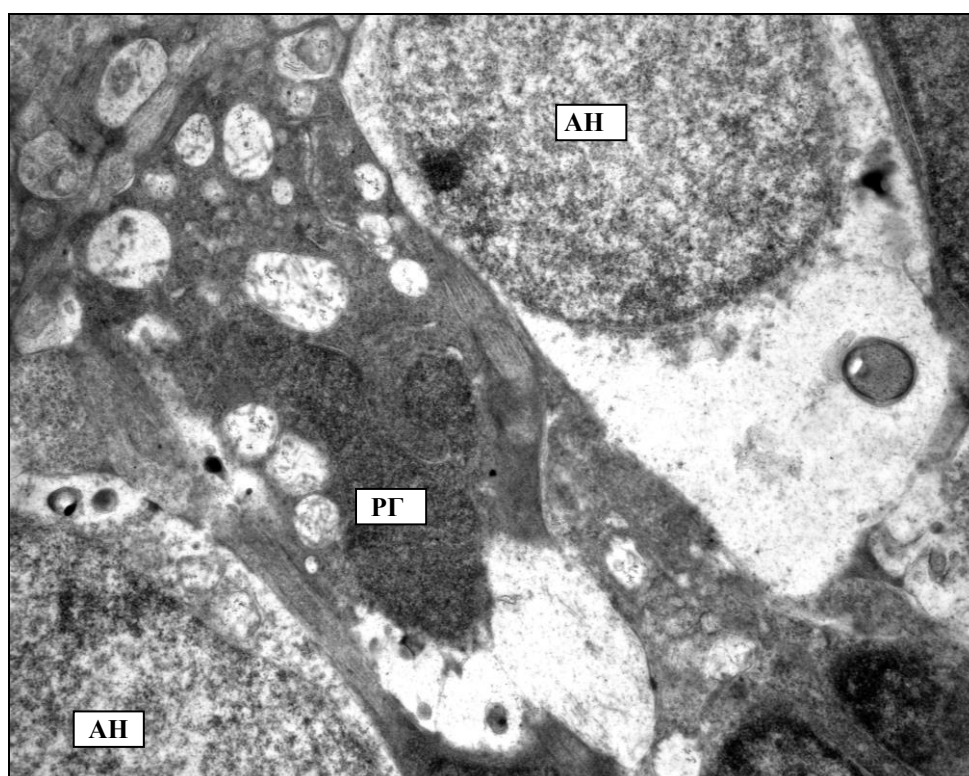


Рис. 117. Гиперхромный пикноморфный радиальный глиоцит (РГ) между отечных ассоциативных нейронов (АН) во внутреннем ядерном слое сетчатки крыс с тотальной ишемией головного мозга. Электронограмма. Ув. 2000

По результатам количественного анализа в сетчатке крыс с ИГМ произошло достоверное увеличение процента пикноморфных радиальных глиоцитов в 3,4

раза и снижение глионейронального индекса в 1,32 раза ($p < 0,05$). Применение диборнола полностью ограничивает дегенерацию мюллеровских глиоцитов и процент пикноморфных клеток значимо не превышает контрольных значений (табл. 50).

Таблица 50.

Количественный анализ показателей деструкции радиальной глии сетчаток крыс с тотальной ишемией головного мозга

Группы эксперимента	Пикноморфные радиальные глиоциты (%)	Глионейрональный индекс
Контроль	$2,1 \pm 0,33$	$0,37 \pm 0,01$
Ишемия	$7,16 \pm 0,93^*$	$0,28 \pm 0,02^*$
Ишемия+диборнол	$3,13 \pm 0,55^+$	$0,34 \pm 0,04$

Изучение ультраструктуры нейронов внутренних слоев позволило выявить в части из них реактивные и деструктивные изменения. Так, встречались биполярные нейроны с отеком цитоплазмы, деструкцией крист митохондрий, расширением цистерн ЭПС, погибшие нейроны (клетки-тени) (рис. 112, 118).

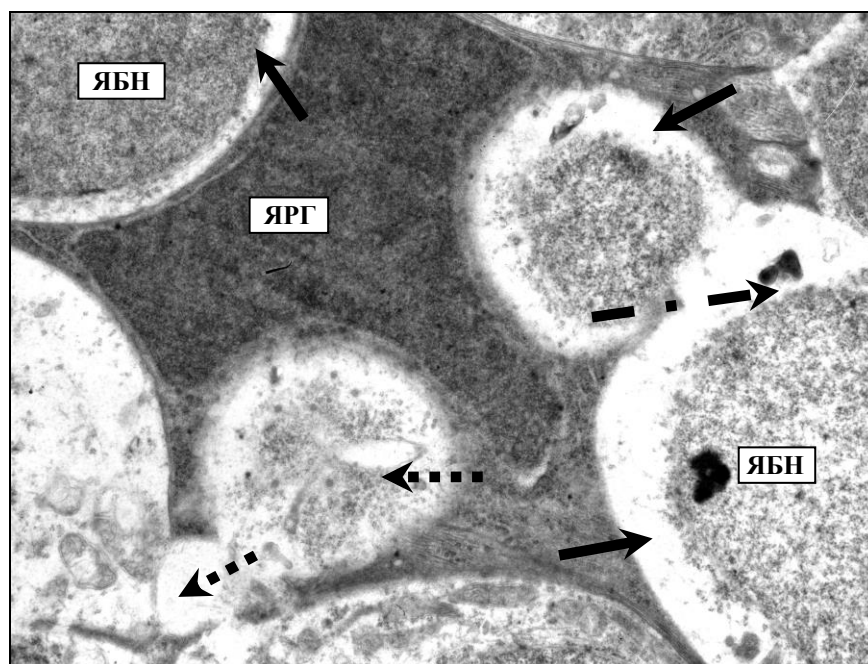


Рис. 118. Фрагмент внутреннего ядерного слоя крыс после тотальной транзиторной ишемии с реперфузией головного мозга. Отек (стрелки), вакуолизация (пунктирная стрелка), дегенерация органелл, миелиноподобные тельца (стрелка точка-пунктир) в цитоплазме ассоциативных нейронов. ЯРГ – ядро радиального глиоцита; ЯБН – ядро биполярного нейрона. Электронограмма. Ув. 3500

Морфоколичественный анализ показал, что наиболее поражаемыми нейронами при ишемии являются биполярные нейроны. Процент

гиперхромных пикноморфных ассоциативных нейронов в результате данного экспериментального воздействия увеличивается на 72% ($p<0,05$, табл. 51). При этом удельная площадь митохондрий в цитоплазме ассоциативных нейронов снижается в 7 раз, гр. ЭПС и КГ – в 4,5 раза ($p<0,05$, табл. 52). На фоне коррекции диборнолом процент ассоциативных нейронов, измененных по темному типу достоверно не превышает контрольных значений (табл. 51). Показатель удельной площади митохондрий и гр. ЭПС значимо ниже значений в группе ложнооперированных животных, однако в 2,3 и 1,3 раза соответственно выше значений опытной группы без коррекции ($p<0,05$). Удельная площадь КГ в группе с коррекцией соответствует контролю ($p<0,05$, табл. 52).

Таблица 51.

Количественный анализ показателей деструкции структурных элементов внутреннего ядерного слоя сетчаток крыс с тотальной ишемией головного мозга

Группы эксперимента	Гиперхромные и пикноморфные ассоциативные нейроны
Ложнооперированные	$1,78 \pm 0,25$
Ишемия	$3,06 \pm 0,38^*$
Ишемия+диборнол	$2,11 \pm 0,19$

Таблица 52.

Удельная площадь органелл (%) в цитоплазме ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга без коррекции и на фоне лечения диборнолом

Удельная площадь (%)	Ложно-оперированные	Ишемия	Ишемия + диборнол
Митохондрии	$14,54 \pm 1,28$	$2,06 \pm 0,14^*$	$4,77 \pm 0,56^{*+}$
ЭПС	$39,89 \pm 3,80$	$8,79 \pm 0,52^*$	$11,42 \pm 0,74^{*+}$
КГ	$0,49 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,04^*$	$0,38 \pm 0,18^+$

Поражение ганглионарных нейронов сетчатки при тотальной транзиторной ишемии с реперфузией головного мозга неспецифично и встречается в двух формах - хроматолиз и повышение осмиофилии ядра и цитоплазмы со сморщиванием (пикноморфные нейроны) (рис. 112, 119, 120).

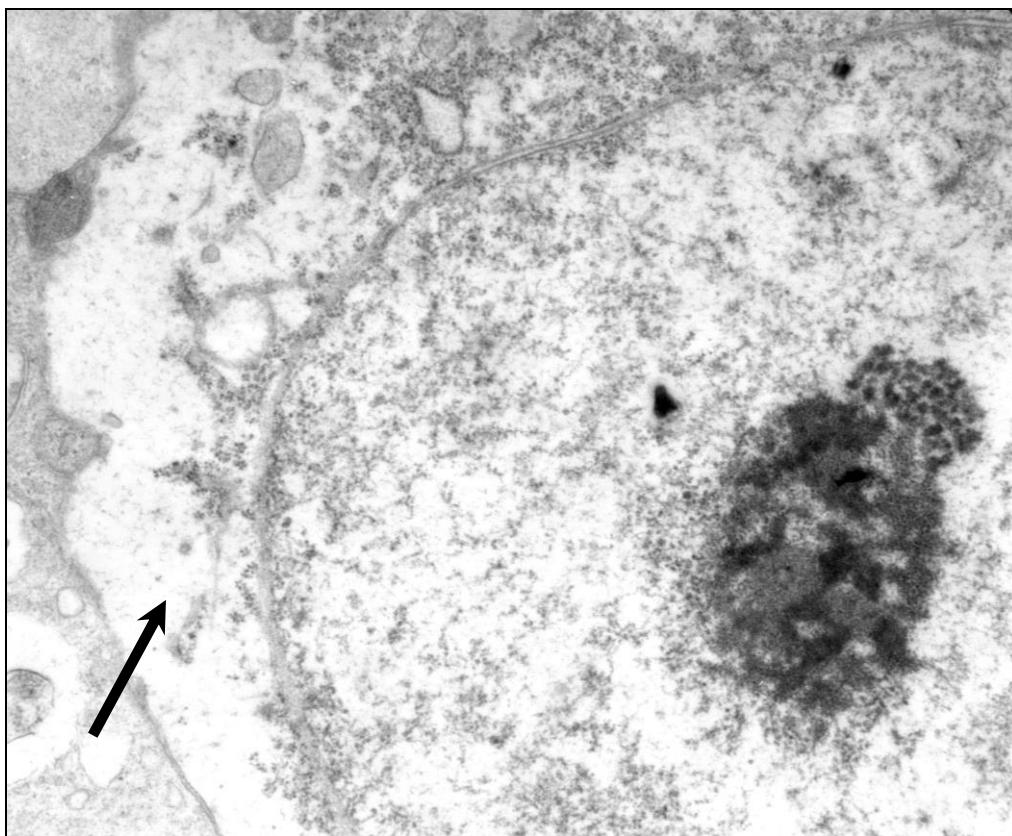


Рис. 119. Очаговый хроматолиз (стрелка) ганглионарного нейрона сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии. Электронограмма. Ув. 2000

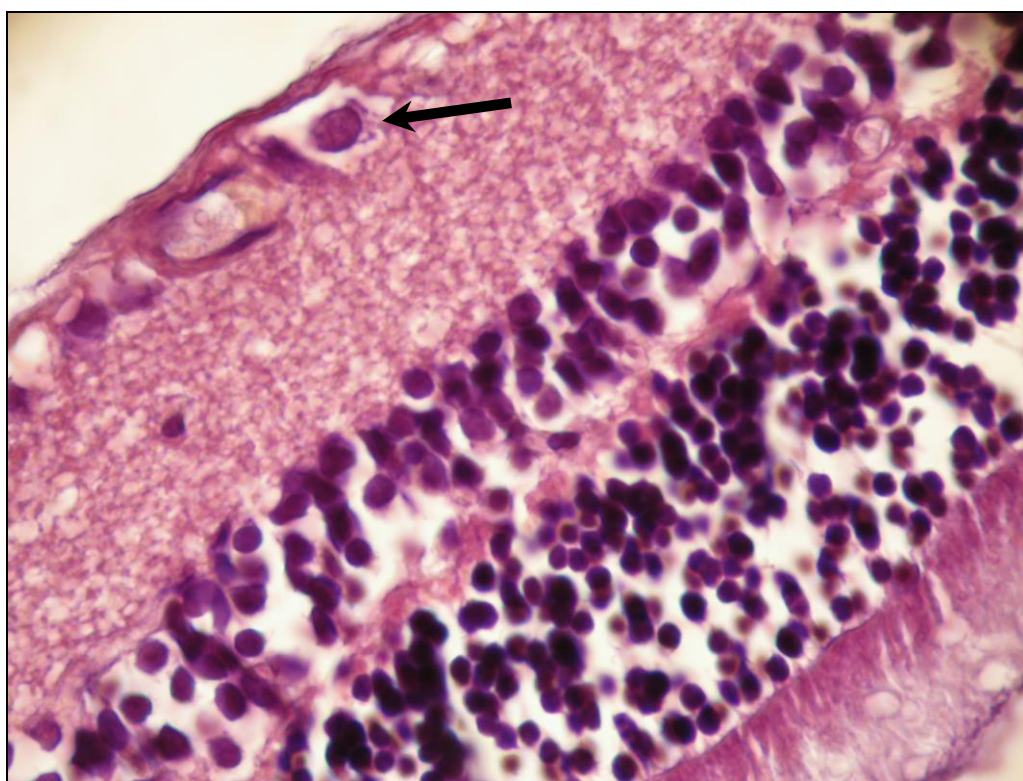


Рис. 120. Тотальный хроматолиз ганглионарного нейрона сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии. Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 1000

Наблюдается появление ганглионарных нейронов с морфологическими признаками апоптотической гибели: краевая маргинация хроматина в ядре, дегенерация внутренних мембран митохондрий в цитоплазме клеток (рис. 121).

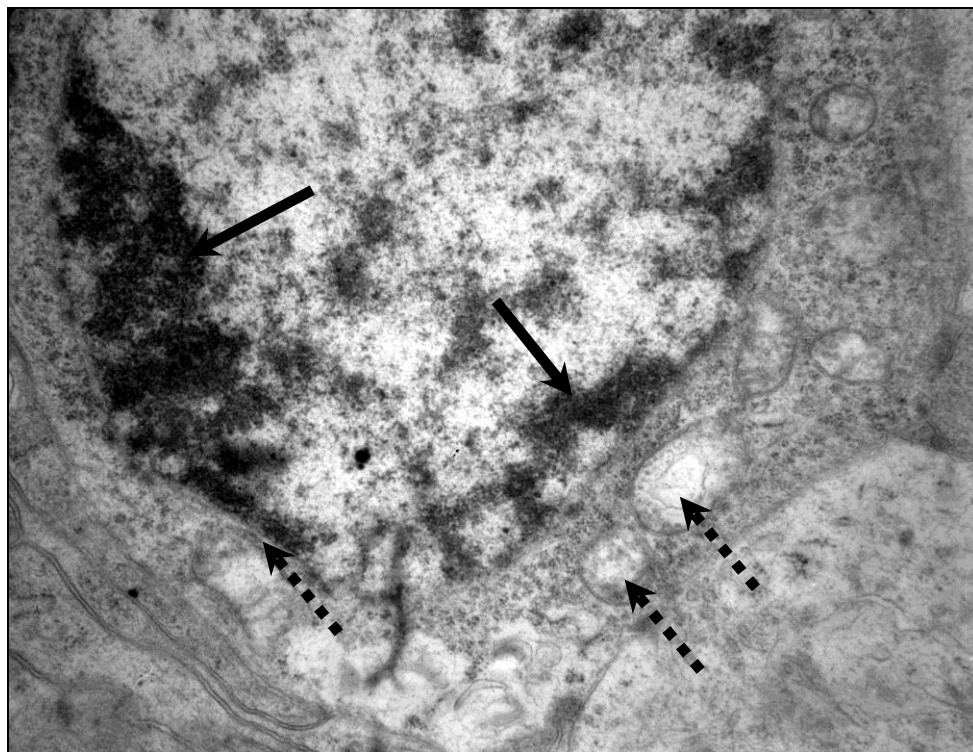


Рис. 121. Начальные признаки апоптоза ганглионарного нейрона сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии. Прикраевая конденсация хроматина в ядре (стрелки), дегенерация внутренних мембран митохондрий в цитоплазме (пунктирные стрелки). Электронограмма. Ув. 2000

Количественный анализ показателей деструкции ганглионарных нейронов в сетчатке крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга показал достоверное увеличение процента нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом и пикноморфных нейронов в 4,5 раза, 12,5 раза и 5,3 раза соответственно ($p < 0,05$, табл. 53). Наряду с этим, электронномикроскопически установлено снижение в цитоплазме ганглионарных нейронов удельной площади митохондрий, гранулярной ЭПС и КГ в 4,6 раза, 2,4 раза и 2,8 раза ($p < 0,05$, табл. 54). Диборнол, оказывая нейропротекторный эффект в отношении ганглионарных нейронов, ограничивает образование пикноморфных нейронов и нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом в 2, 2,2 и 3 раза соответственно ($p < 0,05$,

табл. 53), что вероятно является следствием высокой сохранности органелл в цитоплазме указанного вида нейронов ($p < 0,05$, табл. 54).

Таблица 53.

Количественный анализ показателей деструкции ганглионарных нейронов сетчатки крыс с тотальной ишемией головного мозга

	Пикноморфные (%)	Очаговый хроматолиз (%)	Тотальный хроматолиз (%)
Контроль	1,7±0,47	3,55±0,23	0,8±0,18
Ишемия	8,99±0,84 [*]	15,91±0,23 [*]	10,00±0,93 [*]
Ишемия+диборнол	4,19±0,61 ^{*+}	7,41±0,75 ^{*+}	3,26±0,68 ^{*+}

Таблица 54.

Удельная площадь органелл (%) в цитоплазме ганглионарных нейронов сетчатки крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга без коррекции и на фоне лечения диборнолом

Удельная площадь	Ложно-оперированные	Ишемия	Ишемия + диборнол
Митохондрии	12,65±0,51	2,75±0,13 [*]	8,18±0,77 ^{*+}
ЭПС	46,17±2,20	19,55±1,97 [*]	37,83±2,70 ^{*+}
КГ	0,47±0,07	0,17±0,06 [*]	0,21±0,07 ^{*+}

Большую роль в развитии структурных изменений сетчатки при любом экспериментальном воздействии имеет повреждение межнейрональных связей, так как степень повреждения синаптического пула, а также способность к восстановлению поврежденных и образованию новых синаптических контактов во многом определяет сохранность нейронной популяции сетчатки.

Наружный сетчатый слой крыс после тотальной ишемии несколько истончен, в отростках наблюдаются изменения по светлomu типу: отек, деструкция митохондрий и гранулярной ЭПС, дезагрегация синаптических везикул (рис. 122). Аналогичные изменения наблюдаются и во внутреннем плексиформном слое.

Изучение изменений структурной организации синапсов внутреннего плексиформного слоя и их способности к пластичности позволило установить степень нарушения межнейронных взаимодействий в сетчатке крыс после тотальной транзиторной ишемии головного мозга.

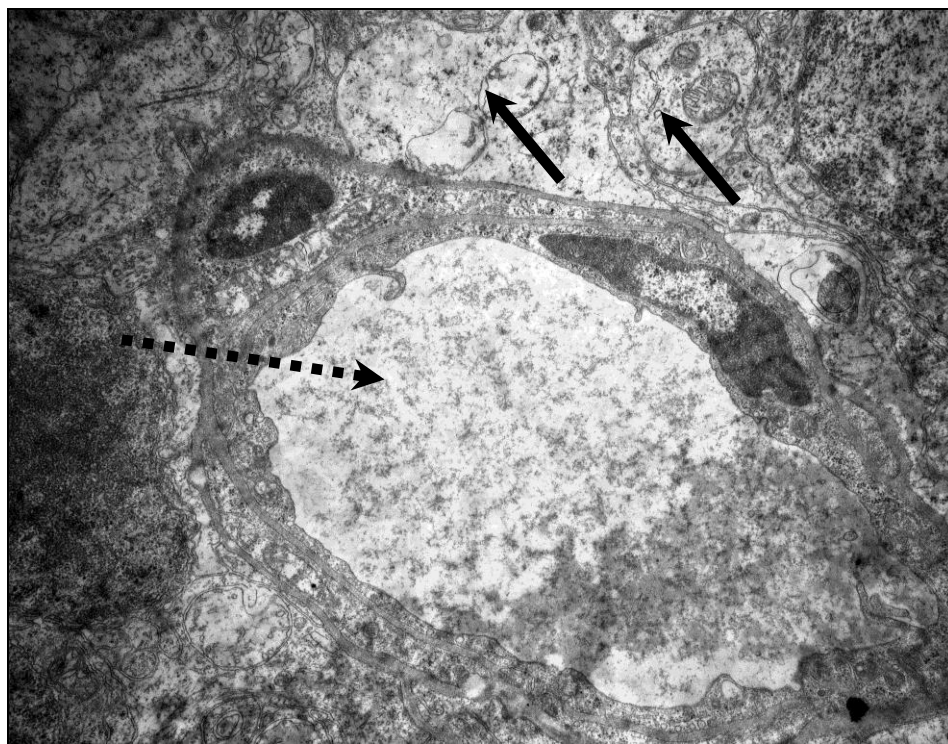


Рис. 122. Наружный плексиформный слой сетчатки крыс после тотальной транзиторной ишемии и реперфузии. Изменение отростков нейронов по светлomu типу (стрелки). Открытый интравитреальный капилляр (пунктирная стрелка). Электронограмма. 3500

Спустя 5 суток после тотальной транзиторной ишемии головного мозга происходит снижение численной плотности синапсов в 2,2 раза, как за счет симметричных, так и асимметричных синапсов типа А, В и С с различной высотой плотных проекций ($p < 0,05$, табл. 55, 56). На фоне значимого снижения численной плотности синапсов с длиной активной зоны контакта >100 мкм, 100-200 мкм, 200-300 мкм, 300-500 мкм, наблюдается компенсаторное шестикратное увеличение численной плотности синапсов с длиной АЗК <700 мкм ($p < 0,05$, табл. 57). Это происходит, вероятно, за счет слияния мелких синапсов для поддержания информационного потока в сетчатке при выраженной гипоксии (рис. 57). Диборнол проявил синаптопротекторные свойства, ограничив снижение численной плотности синапсов при ишемии в 2 раза ($p < 0,05$, табл. 55). Защитное влияние диборнола выявлено по отношению и к симметричным, и к асимметричным синапсам, количество которых на единицу площади нейропиля не отличается от контрольных значений (табл. 55).

Таблица 55

Количественная характеристика ФВК позитивных синапсов внутреннего плексiformного слоя сетчатки крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга без коррекции и на фоне лечения диборнолом

Возраст животных	Численная плотность синапсов	Симметричные синапсы	Асимметричные синапсы			
			Общее число	Плоские синапсы	“+” изогнутые синапсы	“-” изогнутые синапсы
Ложно-оперированные	10,38±0,32	4,12±0,26	6,26±0,15	1,52±0,07	3,18±0,15	1,56±0,13
Ишемия	4,76±0,07*	1,80±0,10*	1,90±0,10*	0,96±0,12*	1,50±0,10*	1,00±0,10
Ишемия + диборнол	8,60±0,29**	3,16±0,30 ⁺	5,44±0,24 ⁺	1,64±0,19 ⁺	2,50±0,15 ⁺	1,30±0,14

Таблица 56

Содержание асимметричных синапсов внутреннего плексiformного слоя сетчатки с различной высотой плотных проекций (на 100 мкм²) у крыс с тотальной транзиторной ишемией головного мозга без коррекции и на фоне лечения диборнолом

Группы эксперимента	<50нм	50-60нм	>60нм
Ложно-оперированные	2,26±0,12	2,82±0,12	1,22±0,12
Ишемия	1,56±0,13*	1,48±0,10*	0,88±0,08*
Ишемия + диборнол	1,96±0,13	2,50±0,17	1,12±0,13

Таблица 57

Содержание синапсов внутреннего плексiformного слоя сетчатки с различной длиной АЗК у крыс Вистар с тотальной транзиторной ишемией головного мозга без коррекции и на фоне лечения диборнолом

Группы эксперимента	>100 мкм	100-200мкм	200-300мкм	300-500мкм	500-700 мкм	<700 мкм
Ложно-оперированные	0,38±0,09	2,34±0,15	3,52±0,16	2,82±0,10	1,14±0,11	0,14±0,05
Ишемия	0,02±0,02*	0,30±0,09*	0,84±0,14*	1,44±0,13*	1,34±0,13	0,82±0,12*
Ишемия + диборнол	0,14±0,05**	0,30±0,11	1,90±0,20**	3,42±0,22**	1,48±0,21	0,24±0,07**

Интраретинальные сосуды сетчатки при тотальной транзиторной ишемии и реперфузии головного мозга, в отличие от сосудов хориоидеи, зияют. Отмечается развитие эндотелиальной дисфункции - вакуолизация цитоплазмы эндотелиоцитов и дегенерация митохондрий (рис. 123).

Таким образом, тотальная транзиторная ишемия вызывает синдром повышенной вязкости крови, что отражается на микроциркуляторном русле хориоидеи, часть сосудов которой переходит в закрытое неактивное

состояние и кровоток по ним прекращается, а в части сосудов наблюдается стаз, сгустки и явления тромбоза либо отсутствие форменных элементов при этом также препятствует нормальному кровотоку. Это способствует нарушению обмена веществ между сетчаткой и хориоидеей, развитию гипоксии и нарастанию дегенеративных процессов в ПЦ и НК, развитию внутриклеточного отека на уровне всех типов нейронов, а также радиальных глиоцитов. Нарушение фагоцитарной активности ПЦ в связи с митохондриальной дисфункцией при массовой деструкции мембран наружных сегментов НК, миграция фагоцитов в хориоретинальный комплекс, вероятно, способствуют активации процессов свободнорадикального окисления на фоне снижения антиоксидантной активности в сетчатке, что усугубляет гипоксию, способствуя гибели нейронов. Диборнол, проявляя антиоксидантные свойства и снижая проявления синдрома повышенной вязкости крови, способствует большей сохранности структуры ПЦ, радиальной глии и улучшению глионейрональных и нейрональных взаимодействий в сетчатке и, следовательно, обладает выраженным нейропротекторным эффектом при острой ишемической ретинопатии в эксперименте.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Любой вид ретинопатии рано или поздно приводит к глубокой и необратимой потере зрения, что является результатом нейродегенеративных процессов в сетчатке, так как она тесно интегрирована со структурами мозга и эмбриологически в ходе развития глаза формируется как выпячивание вентро-латеральной области переднего мозга. Следовательно, патоморфогенез структур сетчатки и включение механизмов защиты при различных видах ретинопатий должны иметь общие черты и подчиняться законам функционирования нервной ткани. Проведенное исследование подтвердило данное предположение. Изучение структуры хориоретинальных комплексов глаз крыс при ретинопатиях, вызванных тотальным световым воздействием, стрептозотоциновым диабетом, тотальной транзиторной ишемией с реперфузией головного мозга и преждевременным старением на светооптическом и ультрамикроскопическом уровнях, позволило заключить, что независимо от вида дегенерации в сетчатке развиваются деструктивные изменения пигментоцитов и нейроглиального аппарата. Тяжесть поражения сетчатки во многом зависит от степени расстройства микроциркуляции, т.к., сетчатка, как представитель нервной ткани, чувствительна к гипоксии. Постоянный и непрерывный приток глюкозы и кислорода из кровеносного русла является необходимым условием энергетического обеспечения нервных клеток. Даже при кратковременной гипоксии в нервной ткани резко падает образование АТФ, и следствием этого является быстрое развитие необратимых изменений в ткани мозга [Боголепов Н.Н., 1979].

Выраженные расстройства микроциркуляции в системе сосудов хориоидеи и центральной артерии сетчатки сопутствуют всем рассматриваемым в настоящем исследовании экспериментальным патологиям сетчатой оболочки глаз крыс. Тотальное воздействие на животных белым светом интенсивностью 6000 лк в течение 6-ти часов приводит к неодинаковому кровоснабжению отдельных зон сетчатки и ее

очаговому поражению, что выражается в снижении удельной площади открытых функционирующих сосудов хориоидеи в очагах поражения в 5 раз и увеличении удельной площади хориоидальных сосудов со стазом, сладжем или тромбозом в 7 раз. Механизм избирательной окклюзии сосудов может быть связан с фототоксическим повреждением эндотелиальных клеток сосудов, что приводит к стазу и агрегации клеток крови с последующим закрытием просвета сосуда [Барышников А.Ю. и соавт., 2004; Белый Ю.А. и соавт., 2006; Kessel D. et al., 1997]. Изменения хориоретинального комплекса крыс при тотальном световом воздействии следует рассматривать как результат прямого повреждающего влияния света и активации свободно-радикального окисления мембранных структур сетчатки. Свободные радикалы и продукты ПОЛ способствуют увеличению ригидности мембран эритроцитов и снижению их деформируемости, что приводит к их задержке в микроциркуляторном русле [Плотников М.Б. и соавт., 2007]. В литературе имеются работы, описывающие фотоиндуцированную модель тромбозов ветвей вен сетчатки [Danis R.P. et al., 1993; Shen W. et al., 1996].

Расстройства микроциркуляции ярко выражены у крыс OXYS в возрасте 6 месяцев. Повышение вязкости крови при низких скоростях сдвига, сочетающееся с выраженной агрегацией и снижением деформируемости эритроцитов ведут к замедлению кровотока и последующей активации тромбообразования в микрососудах, что на уровне хориоретинального комплекса выражается в 17-кратном увеличении удельной площади сосудов со стазом, сладжем или тромбозом по сравнению с крысами Вистар. Это утяжеляется склерозированием хориоидеи в виде пролиферации фибробластоподобных клеток вокруг плазматических капилляров.

Нарушения гемодинамики всегда сопровождаются развитием эндотелиальной дисфункции. Эндотелиоциты синусоидных капилляров хориоидеи крыс OXYS характеризуются снижением электронной плотности цитоплазмы, уменьшением содержания органелл, появлением деформированных ядер, утолщением либо истончением базальной

мембраны, при этом межэндотелиальные соединения местами теряют свою целостность, что приводит к диапедезу и миграции клеточных элементов в околососудистое пространство. Эндотелиальная дисфункция способствует адгезии моноклеарных фагоцитов с сосудистой стенкой, это, наряду со снижением деформируемости и повышением агрегации эритроцитов, является дополнительным пусковым механизмом тромбообразования. Выявленные морфологические изменения сосудистого русла хориоретинальных комплексов крыс линии OXYS подтверждаются параллельными исследованиями глазного дна крыс линии OXYS, проведенными д.м.н. А.Ж. Фурсовой. Так, к 6-месячному возрасту 31% крыс OXYS имеют дисциформную стадию, 3% крыс - рубцовую стадию заболевания, остальной процент животных – предисциформную стадию с перераспределением пигмента, мягкими экссудативными очагами неправильной формы с нечёткими контурами, единичными петехиальными кровоизлияниями, признаками атрофии хориокапиллярного слоя и пигментного эпителия. С возрастом тяжесть заболевания все больше прогрессирует. Возможно, это связано с тем, что развитие мозга у крыс OXYS происходит на фоне гипоксии, обусловленной задержкой формирования микроциркуляторного русла из-за сниженной митотической активности эндотелиальных клеток сосудов пинальной оболочки больших полушарий мозга крыс OXYS в раннем постнатальном периоде. К концу первого месяца жизни различия в скорости пролиферации эндотелия сосудов сглаживаются, но при этом развиваются свойственные для адаптации к тканевой гипоксии изменения энергетического метаболизма: накопление фосфокреатина и его повышенный расход на синтез АТФ. С возрастом адаптивные резервы истощаются, и у годовалых крыс OXYS методами магниторезонансной томографии выявляются признаки хронической гипоксии, характерные для хронической ишемии церебрального кровотока, в том числе – в глазных артериях [Sergeeva S. et al., 2006]. Аналогичные изменения реологических свойств крови наблюдаются и людей с возрастной

макулярной дегенерацией. Доказательством их неотъемлемой роли в патогенезе нейродегенерации сетчатки при ВМД служит успешная апробация реофереза в качестве нового варианта лечения пациентов с сухой формой ВМД. Ликвидация определенного спектра высокомолекулярных белков из плазмы крови человека, включая фибриноген, холестерин, фактор фон Виллебранда и альфа-2-макроглобулин приводит к снижению вязкости крови и плазмы, а также агрегации эритроцитов и тромбоцитов, вызывая устойчивое улучшение микроциркуляции и восстановление функций сетчатки [Klingel R. et al., 2002].

В патогенезе острой ишемии головного мозга лежит нарушение потребления кислорода и глюкозы, приводящее к развитию ишемического каскада: внутриклеточного ацидоза, глутаматной токсичности, увеличению внутриклеточного кальция, синтеза оксида азота и образования свободных радикалов, что во много раз усугубляется реперфузией [Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Суслина З.А., Пирадова М.А., 2008]. Перечисленные механизмы в условиях тотальной ишемии головного мозга, учитывая общность происхождения и системы кровоснабжения, справедливы и для тканей сетчатки [Гундорова, Р.А. и соавт., 2008]. Это нашло подтверждение на ультраструктурном и морфологическом уровне. Пусковым механизмом в развитии дегенерации сетчатки при тотальной ишемии головного мозга являются сосудистые нарушения. Известно, что 85% всего кровотока в заднем полюсе сетчатки осуществляется через хориокапилляры. Тотальная транзиторная ишемия головного мозга с последующей реперфузией у крыс Вистар приводит к выраженным дегенеративным изменениям структурных компонентов хориоретинального комплекса. Она сопровождается синдромом повышенной вязкости крови и избыточной активацией реакций свободнорадикального окисления в сетчатке. Морфологический анализ показал, что большинство сосудов собственной сосудистой оболочки крыс группы с ишемией-реперфузией закрыты, причем наблюдаются начальные признаки фиброза сосудистой оболочки. Это подтверждают популяционные исследования 652

пациентов с тяжелыми цереброваскулярными патологиями, по данным которых 89% больных имеют на глазном дне резкое сужение артериол [De Silva D.A. et al., 2011]. Прекращение кровоснабжения приводит к спазму более крупных сосудов хориоидеи, застойным явлениям в капиллярном русле, нарушению ультраструктуры сосудистой стенки, что способствует развитию тромбоза, снижая шансы возобновления нормального кровотока после реперфузии. Так, в значительной части открытых хориокапилляров отмечаются явления стаза, сладжа, тромбоза, появление гемолиза эритроцитов, при этом количественно зарегистрировано статистически значимое увеличение удельной площади тромбированных сосудов со стазом, сладжем форменных элементов или тромбозом в 7 раз и снижение удельной площади открытых сосудов в 8 раз. Аналогично двум предыдущим моделям, при ишемии также развивается дегенерация части эндотелиальных клеток, что усугубляет гемореологические расстройства и влечет за собой увеличение проницаемости гематоретинального барьера. Данный факт отмечают в своих исследованиях австралийские ученые из Центра исследования зрения [Liew G. et al., 2012].

Постулировано, что диабет весомо влияет на микроциркуляцию, крупные артерии, а иногда и на большие и малые вены, вызывая склероз стенки сосуда. В большинстве тканей это не вызывает серьезных проблем, а три структуры необычайно восприимчивы к нарушению - сетчатка, корковое вещество почек и периферические нервы. У больных сахарным диабетом в сетчатке развивается закрытие капилляров, появление интравитреальных микроаневризм, лейкостаз и утолщение базальной мембраны эндотелиоцитов. Эти изменения постепенно влияют на целостность капилляров сетчатки и приводят к разрушению гематоретинального барьера, кровотечениям и неоваскулогенезу [McMillan D.E., 1984; Ezquer F., 2013]. Полученные в ходе диссертационного исследования данные показали, длительно текущий стрептозотоциновый диабет оказывает отрицательное влияние на стенки сосудов хориоидеи и интравитреальных сосудов сетчатки.

Развивается деформация ядер эндотелиоцитов на фоне вакуолизации цитоплазмы и деградации митохондрий, отмечается миграция лейкоцитов, макрофагов в околосоудистое пространство хориоидеи, а также в субретинальное пространство, что говорит о нарушении структуры гематоретинального барьера и развитию местного воспаления.

Известно, что в норме сосудистый эндотелий поддерживает нетромбогенную и невоспалительную поверхность. Одной из особенностей эндотелиальных клеток является наличие у них поверхностных молекул, обеспечивающих нормальное движение крови по сосудам. Эти клеточно-ассоциированные молекулы, находящиеся как на циркулирующих клетках, так и на эндотелиоцитах, ответственны также за миграцию клеток в окружающие ткани и образование тромбов. Циркулирующие лейкоциты и тромбоциты способны прилипать к эндотелиоцитам в субэндотелиальной зоне, образуя слой, быстро реагирующий на повреждение ткани. Это мультиклеточное взаимодействие является ведущим в префазу воспаления. Такая же, но неконтролируемая связь этих лейкоцитов с эндотелиальными клетками, приводит к тромбообразованию и поддерживает провоспалительные процессы [Капланская И.Б. и соавт., 2005]. Отмечена также деструкция перицитов и связанное с ней аневризматическое расширение части хориоидальных и интаретинальных сосудов. Оклюзия капилляров хориоретинального комплекса крыс при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 месяца преобладает над процессами тромбообразования, хотя они также имеют место быть, что подтверждается данными гемореологического анализа: развивается генерализованный синдром повышенной вязкости крови на низких и на высоких скоростях сдвига, возрастает агрегационная активность и ухудшается деформируемость эритроцитов.

По данным литературы существует тесная корреляционная связь между развитием микрососудистых осложнений СД и изменениями белков мембран эритроцитов [Petroopoulos I.K. et al., 2007]. Хроническая гипергликемия

приводит к неферментативному гликозилированию мембранных белков эритроцитов, что снижает отрицательный поверхностный электрический заряд и способствует ускоренному старению красных кровяных клеток [Baba Y. et al., 1978; Mazzanti L. et al., 1992]. Низкий отрицательный заряд эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом также коррелирует с поломкой гематоретинального барьера при диабетической ретинопатии и повышением его проницаемости [Budak Y. et al., 2004; D'Amico D.J., 1994]. В нормальных клетках млекопитающих отрицательно заряженный фосфатидилсерин располагается только во внутреннем слое плазматической мембраны [Zwaal R.F., Schroit A.J., 1997]. При увеличении окислительного стресса внутри клеток теряется асимметричное распределение фосфатидилсерина и он может перемещаться на наружную поверхность мембраны клеток, формируя тромбогенную поверхность, активируя фагоцитарную активность макрофагов, усиливая коагуляцию эритроцитов и лейкоцитов [Miyamoto M. et al., 1990; Neidlinger N.A. et al., 2006]. Кроме того, по данным Н. Setiadi с коллегами (1987), моноциты больных диабетом обладают повышенной способностью к адгезии к эндотелиальным клеткам сосудов благодаря повышенной экспрессии на них фибронектина и рецепторов к моноцитам, что приводит к повреждению сосудистой стенки и развитию микроангиопатий.

В 1992 году учеными Салми и Ялканен был открыт сосудистый белок-1 адгезии (VAP-1) [Salmi M, Jalkanen S., 1992], обладающий моноаминоксигеназной активностью и участвующий в каскаде вербовки лейкоцитов при воспалении [Airenne T.T., et al., 2005; Ernberg K., et al., 2010; Salmi M. et al., 1993]. В тканях глаза человека и крыс VAP-1 локализуется на эндотелиальных клетках сетчатки и хориоидеи [Noda K., Miyahara S., Nakazawa T., et al. 2008; Noda K. et al., 2008; 2009; Almulki L. et al., 2010]. В нормальных условиях VAP-1 в основном отсутствует на поверхности эндотелиальных клеток и хранится в внутриклеточных гранулах, в то время как при воспалении, он быстро перемещается к поверхности эндотелиальных

клеток и облегчает набор лейкоцитов в воспаленную ткань вместе с другими молекулами адгезии лейкоцитов [Salmi M. et al., 1997; Noda K., et al., 2008]. Доказано, что VAP-1 участвует и в лейкостазе при диабетической ретинопатии [Noda K., et al., 2008], причем он способствует воспалению не только в качестве молекулы адгезии, но и через его функцию фермента, вызывая образование цитотоксических молекул, таких как перекись водорода, альдегиды и аммиак [Yu PH. et al., 2003; Izuta H. et al., 2010; Belkhir A. et al., 1997]. Их торможение, например, с помощью антиоксидантов, восстанавливает целостность гематоретинального барьера [Duynndam MCA. et al., 2001]. Другим патогенетическим механизмом развития микрососудистых осложнений у пациентов с сахарным диабетом является активация протеинкиназы C, также играющей ключевую роль в развитии микрососудистых осложнений диабета, в частности, изменении проницаемости сосудов и ишемии сетчатки [Clarke M., 2007].

Таким образом, проведенные исследования показали, что различные виды экспериментальных ретинопатий приводят к развитию микрососудистых осложнений в сетчатке. Они, вероятно, способствуют гипоксии сетчатки, и являются одной из причин структурных повреждений ее клеточных структур. Факт развития гипоксии у крыс с изучаемыми ретинопатиями нашел свое косвенное подтверждение: снижение вязкости крови экспериментальных животных на низких скоростях сдвига, на фоне неизменного показателя гематокрита, приводит к снижению индекса Штольца, а, следовательно, демонстрирует снижение доступности кислорода для тканей. Наибольшие значения данного показателя зафиксированы в группах со стрептозотоциновым диабетом и при ишемии/реперфузии. В условиях гипоксии в тандеме взаимодействуют окислительный стресс, нарушение баланса про- и антиангиогенных факторов, нарушение транспорта метаболитов и обратного транспорта в клетках ПЦ, эксайтотоксичность, клеточный ацидоз, воспаление, и другие механизмы, способствующие дегенерации структур сетчатки [Suk-Yee Li. et al., 2012; Rejdak R. et al., 2012;

Yamashiro K. et al., 2003; Neroev V.V. et al., 2010]. Ишемические процессы в сетчатке приводят к классическому развитию окислительного стресса, а именно дисбалансу между производством АФК и способностью к поглощению их эндогенными антиоксидантными системами. Причем, повышенное содержание липидов из-за обилия полиненасыщенных жирных кислот в наружных сегментах фоторецепторов и синаптических мембранах, делает сетчатку склонной именно к перекисному окислению липидов [Li S.Y. et al., 2012]. Данный факт был подтвержден в рамках настоящего диссертационного исследования в отношении диабетической ретинопатии, фотодегенерации сетчатки, острой ишемической ретинопатии и возрастной хориоретинальной дегенерации у крыс. В гомогенатах сетчатки животных всех исследуемых групп методом индуцированной люминолом ХЛ был зарегистрирован повышенный уровень свободных радикалов и снижение антиоксидантной активности, что, говорит о развитии окислительного стресса. Это, наряду с сосудистыми изменениями, способствует дегенеративному поражению всех структурных элементов сетчатки. Причем, максимально высокий уровень свободных радикалов в тканях сетчатки зарегистрирован в группах животных со стрептозотоциновым диабетом и тотальным световым воздействием, далее по убыванию: преждевременно стареющие крысы линии OXYS и крысы с острой ишемической ретинопатией. Расчетный показатель общей антиоксидантной активности гомогенатов сетчатки крыс OXYS и крыс со стрептозотоциновым диабетом длительностью 2 месяца во все временные периоды измерений снижается относительно значений интактных животных. Это объясняется, во-первых, хронической гипоксией, во-вторых, вероятно, деструкцией пигментоцитов при этих видах ретинопатий. В группах с фотодегенерацией сетчатки и острой тотальной транзиторной ишемией значения общей антиоксидантной активности гомогенатов сетчаток значимо выше двух предыдущих групп, что свидетельствует, вероятно, об отсутствии хронизации процесса, а также о

высоких компенсаторных возможностях сетчатки при данных видах патологий.

В группе со стрептозотоциновым диабетом наблюдается наиболее длительно текущее ишемическое состояние, связанное с закрытием около 70% сосудов хориоидеи. Помимо классического пути развития окислительных реакций, в сетчатке диабетических животных образование свободных радикалов индуцируют и конечные продукты глубокого гликирования и аутоокисление глюкозы. При возрастной макулярной дегенерации развитию заболевания способствуют окислительные метаболиты фотодинамических процессов, которые, как считается, уже происходят с раннего детства, воспалительных реакций, а также нарушение экспрессии факторов роста [Augustin A.J., 2010]. Ранее преждевременное старение крыс OXYS связывали с «врожденной гиперпродукцией свободных радикалов», которая явилась ключевой характеристикой линии при регистрации ее в международной базе данных «Rat genome». Однако относительно недавние исследования показали, что манифестация катаракты и ВМД у крыс OXYS совпадает по времени с другими проявлениями преждевременного старения этих животных и происходит на фоне ранней инволюции тимуса и снижения активности Т-клеточного звена иммунной системы, опережая развитие дисбаланса в редокс-регуляции и накопление маркеров окислительного стресса [Kolosova N.G. et al., 2006]. Однако, ухудшение хориоидального кровообращения, сужение просвета сосудов, пролиферация эндотелия провоцируют усиление генерации АФК в ходе патологически измененного зрительного цикла. В норме в палочконесущих НК в процессе фотопревращения родопсина транс-ретиаль в комплексе с фосфатидилэтаноламином переносится через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента и далее - в пигментцит. Своевременно не выведенный из фоторецепторной мембраны диска ретиаль накапливается, а затем взаимодействует с фосфатидилэтаноламином, в результате чего в мембране образуется бис-ретиалиден-фосфатидилэтаноламин (A2E-PE),

являющийся предшественником бис-ретиналиден-этанолamina (A2E) - основного флуорофора липофусциновых гранул. Однако, по данным Ablonczy Z. (2013) не было найдено корреляции между распределением A2E и липофусцина в пигментоцитах сетчатки, уровни A2E были высоки и на периферии сетчатки, тогда как липофусцин располагался преимущественно в центральной части ПЦ. В нашем исследовании на крысах OXYS в возрасте 6 месяцев также установлено, что дегенерация сетчатки развивается не только в центральной ее части, что характерно для возрастной макулярной дегенерации, а также и на периферии. Липофусциновые гранулы отводятся от клеток палочек и накапливаются в ПЦ [Sun H., Nathans J., 2001; Nowak J.Z., 2005; Warburton S. et al., 2005; Wiktorowska-Owczarek A., Nowak J.Z., 2006; Mehdizadeh M., Nowroozzadeh M.H., 2009;]. Как показали исследования Л.Т. Архиповой с соавт. (2008), у крыс OXYS липофусцин, накапливаясь в ПЦ, и будучи фототоксичным, является генератором АФК и способствует развитию нарушений зрительного цикла. Настоящее исследование подтвердило наличие в цитоплазме ПЦ сетчатки крыс OXYS различных по размерам и форме гранул липидной природы, по структуре напоминающих включения липофусцина.

Экспериментальное воздействие высокоинтенсивного света на сетчатку приводит к глубокому обесцвечиванию ретиналя и развитию процессов окисления в наружных сегментах и мембранах органелл внутренних сегментов фоторецепторов. При этом, ПЦ, находясь в тесном контакте с наружными сегментами НК, подвергаются атаке свободными радикалами и при повреждении становятся мощными индукторами АФК [Островский М.А., Федорович И.Б., 1994; Плотников М.Б. и соавт., 2007].

Окислительный стресс на сегодняшний день является ключевым фактором постишемического и реперфузионного повреждения головного мозга и сетчатки. Неисправность в дыхательной цепи митохондрий нейронов, активация цитоплазматических оксидаз приводит к генерации АФК, которые не могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами

клеток. АФК изменяют структуру ДНК, РНК, белков и липидов. Это приводит к сверхэкспрессии ряда проапоптотических белков p53, Bax, каспазы-3, запускающих апоптоз нейронов, а также PDCD5 и NF- κ B - известных регуляторов апоптоза и аутофагии при ишемической гибели клеток в поврежденных нейронах [Li W.L., 2013].

Таким образом, в сетчатках крыс с диабетической ретинопатией, возрастной хориоретинальной дегенерацией, фотодегенерацией сетчатки и острой ишемической ретинопатией на фоне дисбаланса системы редокс-регуляции сетчатки развивается каскад окислительных реакций, которые усугубляют гипоксическое состояние, приводя к деструкции всех структурных компонентов сетчатки.

Наиболее мощные дегенеративные изменения при всех исследуемых экспериментальных патологиях испытывают ПЦ сетчатки, представляющие собой монослой полярно ориентированных клеток и отделяющие нейроны сетчатки от сосудистой оболочки. ПЦ образуют вместе с мембраной Бруха и эндотелием хориокапилляров высоко избирательный наружный гематоретинальный барьер. В сетчатках животных всех групп наблюдается достоверное снижение удельной площади слоя ПЦ в срезе сетчатки, а также встречаются ПЦ с классическими признаками некроза с повышением осмиофилии ядра и цитоплазмы, митохондриального матрикса, мощной вакуолизацией, лизированные ПЦ с замещением их коллагеновыми волокнами и дегенерацией базального комплекса в области погибших клеток. Это, вероятно, является закономерным событием при гипоксии, т.к. в опытах *in vitro* гипоксия с последующей реоксигенацией культивируемых ПЦ сетчатки человека вызывает увеличение экспрессии фактора роста соединительной ткани (CTGF), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), коллагена типа IV (Кол. IV) и фибронектина (Fn). В связи с чем, процесс гипоксии/реоксигенации в ПЦ может приводить к накоплению внеклеточного матрикса в ПЦ сетчатки и мембране Бруха [Fuchshofer R. et al., 2009]. В настоящем исследовании ПЦ с морфологическими и

ультраструктурными признаками апоптоза также имели место быть. Известно, что гипоксия способна индуцировать апоптоз ПЦ. Так, в условиях 72 часовой гипоксии сетчатки методом ПЦР обнаруживается высокий уровень экспрессии генов p 53 и каспазы-8, при этом экспрессия Bax, каспазы-3, каспазы-4, каспазы-7 и FAS не увеличена. N-ацетил-цистеин предотвращает развитие апоптоза в ПЦ сетчатки, следовательно применение антиоксидантов может быть полезным превентивным подходом в защите ПЦ сетчатки от последствий хронического кислородного стресса на фоне таких заболеваний, как возрастная дегенерация желтого пятна, диабет и других [Gerona G. et al., 2010].

Наиболее значительные изменения ПЦ наблюдаются в очагах сетчаток группы с высокоинтенсивным тотальным световым воздействием, где встречаются участки с полной деструкцией ПЦ и нарушением структуры мембраны Бруха, причем в этих местах зачастую активизируются процессы неоангиогенеза в виде миграции эндотелиоцитов в окружающую интерстициальную ткань, что является следствием активации VEGF в эндотелиоцитах и угнетения активности PEDF. При этом, вне очагов поражения происходит активация фагоцитарной активности ПЦ. На светооптическом уровне это выражается в повышении количества фагосом и фаголизосом, а при ультрамикроскопическом исследовании наблюдается гипертрофия апикальных микроворсинок и усиление процессов фагоцитоза. Полученные данные согласуются с результатами многочисленных исследований, постулирующих, что ПЦ сетчатки особенно подвержены окислительному стрессу из-за высокой концентрации полиненасыщенных жирных кислот в наружных сегментах фоторецепторов и воздействия видимого света [Flieler S.J., Anderson R.E., 1983; Gaillard E.R., Atherton-Eldred G., Dillon J., 1995; Rózanowska M. et al., 1998; Chiou G.C.Y., 2001; Sparrow J.R. et al., 2002; Sparrow J.R. et al., 2003].

Цитоплазма большинства ПЦ сетчаток крыс со стрептозотоциновым диабетом, возрастной хориоретинальной дегенерацией и острой

ишемической ретинопатией вакуолизирована, с нечетким рисунком базальной складчатости, деструкцией крист митохондрий, поломкой микроворсинок, что в совокупности ведет к нарушению процесса фагоцитоза отработанных мембранных дисков. Нарушение целостности митохондриальных мембран индуцирует высвобождение цитохрома С, что, по данным многих исследователей, приводит к апоптозу клеток [Elahi M.M. et al., 2009; Tsutsui H. et al., 2009; Greco T. et al., 2011]. Отличительной особенностью изменений ПЦ сетчатки крыс всех групп является появление остаточных телец с непереваденными остатками органелл и мембран наружных сегментов НК, что говорит о нарушении взаимодействия фагоцитоза и аутофагии в условиях повышенной деградации наружных сегментов НК. Как известно, фагоцитоз и деградация наружных сегментов фоторецепторов пигментными клетками сетчатки имеет фундаментальное значение для зрения. Процесс аутофагии несет ответственность за деградацию объемных клеточных компонентов, но его роль в деградации наружных сегментов НК пока не до конца ясна. Однако, по данным Kim J.Y. с коллегами (2013), утренний взрыв фагоцитоза ПЦ сетчатки совпадает с Atg5- и Beclin1-зависимым превращением белка аутофагии LC3 в его липидированную форму. Этот процесс важен потому, что в сетчатках Atg5-дефицитных мышей происходит нарушение лизосомальной обработки в ПЦ, снижение ответов фоторецепторов на световое воздействие, снижение уровней хромофора. Ими отмечено также, что нормальный процесс аутофагии нарушается при недостатке энергии АТФ [Kim JY. et al., 2013].

Гипертрофия микроворсинок вне очагов поражения сетчатки при световом воздействии, а также в сохранившихся ПЦ сетчаток крыс с другими экспериментальными моделями свидетельствует об адаптивных возможностях сетчатки глаз.

Изменение ПЦ сетчаток крыс OXYS характеризуется появлением различных по величине гранул липидной природы, которые, по-видимому, являются отложениями липофусцина. В ПЦ крыс OXYS происходит распад

единой митохондриальной сети на отдельные, изолированные друг от друга органеллы, о чем говорит сглаженность базальной складчатости, увеличение числа и размеров митохондриальных кластеров, разрушение митохондрий в виде деструкции крист, вакуолизации, а также разрушения наружной митохондриальной мембраны. Такие поврежденные митохондрии не могут выполнять свои функции, становятся источником повышенного образования АФК [Bodrova ME. et al., 2003] и, по мнению В.П. Скулачева, самоликвидируются «митоптозом» [Скулачев В.П. 1989]. В дополнение, косвенным доказательством в поддержку окислительного стресса, как патогенного фактора в дегенерации ПЦ, является эффективная коррекция антиоксидантами. Применение H_2O_2 и $NaIO_3$ в качестве окислителей вызывает дегенерацию ПЦ. При этом применение флавоноидов способно предотвратить окислительные повреждения ПЦ [Zhuang P., Shen Y., Chiou G.C., 2010].

ПЦ сетчатки выполняют разнообразные метаболические и поддерживающие функции, которые имеют жизненно важное значение для фоторецепторов, включая гематоретинальный барьер, участие в визуальном цикле (поглощение, обработка, транспорт и выпуск производных витамина А), фагоцитарном поглощении и деградации постоянно обновляющихся апикальных наружных сегментов фоторецепторов [Strauss O., 2005]. Недостаточность функции ПЦ является ранним и важным событием на пути, ведущим к развитию нейродегенерации сетчатки [Nowak J.Z., 2005; Sparrow J.R., Boulton M., 2005; Warburton S., et al., 2005; Chiba C., 2013].

Таким образом, можно полагать, что при всех изучаемых в рамках диссертационного исследования видах экспериментальных ретинопатий гипоксия сетчатки, связанная с нарушением кровотока в сосудах хориоидеи, глубокая деструкция части ретинальных ПЦ приводят к ее повреждению. Деструкции подвергаются как НК и нейроны внутренних слоев, так и синаптические контакты.

Одним из замечательных достижений фундаментальных нейробиологических наук является открытие единых механизмов повреждения нейрона при различных патологических состояниях, а именно эксайтотоксичности и окислительного стресса. Они способны дополнять и стимулировать друг друга [Гусев Е.И., 1992; Gerfen C.R., et al., 1988]. Теория эксайтотоксичности заключается в том, что избыточное высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров глутамата и аспартата при повреждении синаптического аппарата является ключевым звеном патогенеза многих заболеваний ЦНС. В настоящее время большинство исследователей высказывают мнение о включении феномена эксайтотоксичности в патогенез поражения мозга при ишемии и церебральных дегенерациях [Qin Z.H. et al., 1996]. Одним из начальных звеньев в цепи биохимических нарушений при эксайтотоксичности является дестабилизация клеточных мембран и встроенных в них рецепторов под влиянием АФК. На моделях экспериментальной церебральной ишемии показана важная роль глутаматных NMDA-рецепторов во включении нейрохимических механизмов острого нарушения мозгового кровообращения [Sádecký E. et al., 1975]. Показано, что при ишемии, гипо- и гипергликемии, травме головного мозга высокие уровни глутамата и аспартата в синаптической щели вызывают острую гибель нейронов по типу некроза [Sauer D., Fagg G.E. 1992; Mattson M.P., 2002]. Настоящее исследование также показало, что у животных со всеми четырьмя видами экспериментальных ретинопатий развиваются в основном некротические изменения нейронов сетчатки и первого, и второго порядка, что, является косвенным подтверждением важной роли эксайтотоксичности и окислительного стресса в развитии нейродегенерации сетчатой оболочки глаза. При этом при острой ишемической ретинопатии и фотодегенерации сетчатки наиболее повреждаемыми оказались НК, что, вероятно, является следствием острой гипоксии и быстрого лавинообразного нарастания окислительного повреждения сетчатки. В сетчатках этих групп зарегистрированы

максимальные показатели процентного содержания пикнотично измененных ядер НК, причем, в некоторых из них наблюдались признаки лизиса, выраженная дегенерация наружных сегментов фоторецепторов в виде разрыва и вакуольного перерождения, потери связи с внутренними сегментами. Между сохранившимися ядрами НК наблюдается пролиферация глиальных отростков, что является отражением адаптационных механизмов. Дегенерация НК ведет к истончению наружного плексиформного слоя, контакту перикарионов НК и ассоциативных нейронов, что свидетельствует в пользу блока синаптической передачи между нейронами I и II порядка. При этом, сохранившиеся синапсы характеризуются правильностью структурной организации.

В группе с ретинопатией, вызванной стрептозотоциновым диабетом длительностью 2 месяца, напротив, максимальные дегенеративные изменения наблюдаются в ганглионарном слое и, как результат, во внутреннем сетчатом слое, где происходят наиболее мощные изменения синаптоархитектоники с деградацией большого количества синапсов, причем как асимметричных, так и симметричных. Процент нейронов с тотальным хроматолизом увеличен десятикратно, наряду с чем, проведенный иммуногистохимический анализ некоторых маркеров апоптотической гибели клеток выявил пятикратное увеличение p 53- и каспаза-9-иммунопозитивных ганглионарных нейронов, что говорит о значимой роли нескольких путей апоптоза в деструкции мультиполярных нейронов сетчатки при стрептозотоциновом диабете. Это согласуется с данными различных научных исследований, которые рассматривают нейродегенеративные процессы в сетчатке диабетических крыс как раннее событие в патогенезе ДР, происходящее наравне с микроангиопатией и воспалением и во многом связанное со срывом антиоксидантной защиты, потерей нейропротекторных факторов и нарушением регуляции глутамата. Многими авторами подтверждается, что морфологическим изменениям при сахарном диабете подвергаются преимущественно ганглионарные нейроны, так как они

наиболее чувствительны к ишемии, которая и определяет их ранние структурные и функциональные нарушения при многих связанных с ишемией заболеваниях сетчатки [Neroev V.V. et al., 2010; Ezquer F. et al., 2013; Gardner T.W., 2013; Jung K.I. et al., 2013; Stem M.S., Zhang X. et al., 2013].

Окислительный стресс, дегенеративные изменения ПЦ, гипоксия, сетчатки крыс OXYS в возрасте 6 мес приводят к деструкции НК и синаптических контактов, а также нейронов внутренних слоев сетчатки. При этом, основной путь гибели клеточных структур сетчатки, на наш взгляд, некротические нарушения на фоне выраженной макрофагальной реакции и деградации мембранных органелл. Так, проведенный количественный ультраструктурный анализ удельной площади митохондрий, гранулярной ЭПС и КГ в цитоплазме ассоциативных и ганглионарных нейронов, показал достоверное снижение всех исследуемых показателей относительно крыс Вистар. При этом, не отрицается вовлечение каспазы- и p-53-сигнальных путей апоптоза, однако эти пути не являются определяющими в развитии нейродегенерации. Недавние исследования нормального старения 120 самцов и самок крыс Вистар (в возрасте от 1 мес до 42 мес) показали, что в возрасте 30 и 42 месяцев у крыс обоих полов отмечаются выраженные дефекты всех слоев сетчатки, особенно мембран наружных сегментов НК, ганглионарных нейронов и ПЦ. У крыс отмечается снижение нейротрансмиттеров, антиоксидантных ферментов (каталазы и супероксиддисмутазы), фрагментации ДНК, однако выраженных изменений каспазы-3 и -7 не наблюдается [El-Sayyad H.I. et al., 2013].

Повреждение митохондрий в цитоплазме нейронов сетчатки крыс линии OXYS имеет ряд особенностей по сравнению с другими группами. Помимо набухания и деструкции крист, отмечается также гомогенизация матрикса, вакуолизация, заполнение мелкогранулярным содержимым или миелиноподобными структурами. Большое количество исследований в области старения посвящено именно митохондриальной дисфункции, что

вылилось в митохондриальную теорию старения. Так, анализ посмертных глаз больных ВМД наглядно демонстрирует накопление изменений и мутаций в митохондриальной ДНК, которые объясняются накоплением свободных радикалов [Bianchi E. et al., 2013; Feher J. et al., 2006; Karunadharma P.P. et al., 2010]. По всей вероятности, такой окислительный стресс имеет как цитоплазматическое, так и митохондриальное происхождение, что совместно приводит к необратимым изменениям в митохондриальной ДНК, морфологической структуры мембран митохондрий, дополнительному образованию свободных радикалов, снижению митохондриальной дыхательной функции, и растущей необходимости усиления аутофагии для удаления поврежденных митохондрий, однако процессы аутофагии при старении подавлены. Это вызывает постепенную деградацию всех клеточных структур сетчатки [Sayak K Mitter et al., 2012].

Еще одним патоморфогенетическим механизмом поражения сетчатки при экспериментальных ретинопатиях различного генеза является изменение структуры радиальной глии, что неотвратимо влечет за собой нарушение ее функционирования в сетчатке. Специфика изменений функциональной активности нейроглии в значительной степени определяет характер пролиферативно-дистрофического процесса в сетчатке и реакцию организма на воздействие факторов среды различной природы. В настоящем исследовании во всех случаях, наряду с дегенеративными изменениями радиальных глиоцитов в виде повышения осмиофилии ядра и цитоплазмы и вакуольной деградации органелл, в сетчатках экспериментальных животных развивались и прогрессивно-пролиферативные изменения в виде гипертрофии и пролиферации склеральных отростков радиальных глиоцитов, активно фагоцитирующих погибшие НК. В норме глионейрональное взаимодействие обеспечивает нормальную аксональную проводимость, надежность синаптической передачи и процессы обработки и передачи информации, что необходимо для нормальной работы мозга и зрительной

системы в течение всей жизни, поэтому анализ глио-нейрональных взаимодействий играют значительную роль в выяснении тяжести и прогноза заболеваний сетчатки наследственной, сосудистой, травматической и иной природы [Нероев В.В. и соавт., 2004; Зуева М.В., 2004; Зуева М.В., Цапенко И.В., 2004]. При ДР, возрастной хориоретинальной дегенерации, фотодегенерации сетчатки и острой ишемической ретинопатии значимых изменений ГНИ по отношению к интактному контролю не выявлено, что следует рассматривать, вероятно, как отражение прогрессивно-пролиферативных возможностей сохранившихся клеток Мюллера на фоне дегенерации нейронов II порядка.

Снижение напряжения кислорода активизирует ответ сетчатки на гипоксическое состояние. Кульминацией этого состояния служит активация процессов неоангиогенеза через индуцируемый гипоксией фактор транскрипции HIF-1, вызывающий повышение экспрессии VEGF и других факторов роста. Эти процессы ведут к гибели нейронов сетчатки и потере зрения [Adamis A.P. et al., 1996; Aiello L.P. et al., 2000; Fine S.L. et al., 2000; Ferrara N. et al., 2002; Tranos P. et al., 2013]. В противоположность этому, на начальных стадиях гипоксии рассматриваемые процессы не разрушительны для сетчатки, а, напротив, вызывают молекулярный ответ, который обеспечивает защиту нейронов [Grimm C., Willmann G., 2012]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) существует в двух изоформах VEGF-A165a и VEGF-A165b. Эти изоформы имеют противоположные действия на проницаемость сосудов и ангиогенез. VEGF-A165a-изоформа обладает выраженными проангиогенными свойствами, что ограничивает его нейропротекторные свойства по отношению к сетчатке и гиппокампу [Wang F. et al., 2003]. Под действием VEGF-A происходит разрушение базальной мембраны и миграция клеток эндотелия, а также экспрессия интегринов на поверхности клеток [Ferrara N, Alitalo K., 1999]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* VEGF вызывает пролиферацию эндотелиальных клеток, образование сосудов и повышает жизнеспособность эндотелиальных клеток.

Повышенный уровень VEGF может играть роль в предрасположенности к хориоретинальной неоваскуляризации. Сверхэкспрессия VEGF в клетках фоторецепторов и ПЦ сетчатки вызывает у крыс развитие неоваскулогенеза в сетчатке [Wang F. et al., 2003]. В противоположность этому доказано нейропротекторное действие эндогенного VEGF-A165b на нейроны при нейродегенеративных патологиях. Рекомбинантный человеческий VEGF-A165b эффективно защищает как периферические, так и центральные нейроны, в том числе и сетчатки, при ряде нейродегенеративных патологий: глаукоме, ДР, периферической нейропатии, глутаматной эксайтотоксичности при химиотерапии, при ишемии-реперфузии, а также принимает участие в ингибировании индукции каспазы-3 [Beazley-Long N. et al., 2013].

В 90-х годах прошлого столетия был открыт фактор пигментного эпителия (PEDF), который стал потенциально важным эндогенным ингибитором глазной неоваскуляризации. Он является членом семейства ингибитора сериновых протеаз [Becerra S.P. et al., 1995; Becerra S.P. et al., 1993; Steele F.R. et al., 1993]. Было также обнаружено, что PEDF имеет нейропротекторную активность [Taniwaki T. et al., 1995; Araki T., 1998; DeCoster M.A. et al., 1999; Bilak M.M. et al., 1999; Cao W. et al., 1999; Houenou L.J., D'Costa A.P., Li L. et al., 1999] и способен защищать фоторецепторы от дегенерации [Cayouette M. et al., 1999; Jablonski M.M. et al., 2000; Cao W. et al., 2001]. PEDF ингибирует рост новых сосудов в роговице и стекловидном теле [Dawson D.W. et al., 1999; Wu Y.Q., Becerra S.P., 1996; Stellmach V. et al., 2001]. Его активность снижается при гипоксии [Dawson D.W., et al., 1999].

Проведенное иммуногистохимическое исследование хориоретинальных комплексов крыс показало, что во всех исследуемых группах иммунопозитивными для VEGF являются ПЦ, цитоплазма эндотелиоцитов интравитреальных и хориоидальных сосудов, НЯС и ВЯС, а также цитоплазма ганглионарных нейронов. PEDF выявляется во всех перечисленных выше структурах сетчатки и перикарионах ассоциативных нейронов, кроме клеточных элементов стенок сосудов. Проведенный

корреляционный анализ показал, что в сетчатке здоровых животных (беспородных белых крыс в возрасте 3 месяцев и крыс Вистар в возрасте 6 месяцев) существует тесная отрицательная корреляционная связь между показателями процентного содержания VEGF- и PEDF-иммунопозитивных ганглионарных нейронов. В группе с возрастной хориоретинальной дегенерацией у крыс OXYS корреляционная связь между VEGF- и PEDF-иммунопозитивными клеточными элементами сетчатки не выявлена, что, вероятно, связано с дисбалансом в системе про- и антиангиогенеза, увеличением процента VEGF-положительных ганглионарных нейронов в 2 раза. Аналогично возрастает процент интравитреальных и хориоидальных срезов сосудов в сетчатке животных, эндотелиоциты которых иммунопозитивны к VEGF и могут стать отправной точкой активации неоангиогенеза. Однако случаи неоангиогенеза в сетчатке крыс OXYS в возрасте 6 месяцев единичные, что является доказательством развития у крыс OXYS в этом возрастном периоде сухой формы возрастной хориоретинальной дегенерации. Это объясняет, вероятно, высокий уровень экспрессии в сетчатках крыс OXYS PEDF. Как показали наши совместные с А.М. Марковцом исследования [Markovets A.M. et al., 2011], содержание белка VEGF в сетчатке крыс OXYS одинаково с Вистар в возрасте 20 дней, снижается к 3 мес., а затем растет и достигает максимальных значений у двухгодовалых животных. Причем, снижение уровня мРНК гена VEGF-A сопровождается накоплением его белкового продукта, что может являться важной предпосылкой развития ретинопатии, так как известно, что поздние стадии ВМД ассоциированы с повышенным уровнем VEGF. Количественный анализ иммунопозитивных к ростовым факторам элементов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом также показал дисбаланс про- и антиангиогенных факторов VEGF и PEDF в интравитреальных сосудах. В хориоидальных сосудах активации процессов ангиогенеза по данным иммуногистохимического анализа не наблюдается. Так же, как и у крыс линии OXYS, при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 месяца

отмечается повышение процента ассоциативных и ганглионарных нейронов, иммунопозитивных к VEGF в 3 раза, а также снижение процента аналогичных видов нейронов, иммунопозитивных к PEDF в 2 раза, что, может быть связано с гипоксией сетчатки и дегенерацией ПЦ.

Световое воздействие вызывает активацию VEGF и угнетение активности PEDF в эндотелиоцитах, что, вероятно, связано с дегенерацией ПЦ. Так, в срезе сетчатки количество срезов сосудов, в стенке которых обнаруживаются VEGF-иммунопозитивные эндотелиальные клетки, возрастает на 54% относительно интактного контроля. Это происходит на фоне снижения процентного содержания сечений сосудов с PEDF-положительными эндотелиоцитами в 2,6 раза, что может говорить в пользу активации процессов неоангиогенеза, начальные признаки которого наблюдаются в очагах поражения на месте субретинального слоя сетчатки крыс со световым воздействием. И все же, полученные данные неоднозначны, так как при повышении экспрессии проангиогенного фактора VEGF во всех случаях не было зафиксировано ярко выраженных ангиогенных процессов. Это, вероятно, связано с тем, что на сегодняшний день VEGF и его физиологическая активность вызывают огромный интерес и создают множество противоречий. Этот фактор чрезвычайно важен для формирования адекватной функционирующей сосудистой системы уже в период эмбриогенеза и в ранний постнатальный период. Уровень экспрессии VEGF в сыворотке человека прогрессивно уменьшается после рождения и минимален в большинстве тканей взрослых, за исключением мест активного ангиогенеза, таких как ovarии, матка и кожа (рост волос). Однако экспрессия VEGF реиндуцируется во время патологического ангиогенеза при ишемии миокарда, сетчатки, воспалении, прогрессировании атеросклеротических бляшек и опухоли). Уровень VEGF непосредственно регулируется такими факторами окружающей среды, как pH, давление и концентрации кислорода [Капланская И.Б. и соавт., 2005; Namiki A. et al., 1995; Couffinhal T. et al, 1997]. Общее влияние этих внешних факторов заключается в опосредованной

через VEGF стимуляции важных для ангиогенеза факторов, включая антиапоптотические белки, молекулы клеточной адгезии и металлопротеиназы [Tsutsumi Y., Losordo D.W., 2005]. VEGF играет важную регуляторную роль, способствуя экспрессии эндотелиальных адгезивных факторов и модулируя адгезию лейкоцитов и тромбоцитов, тем самым он регулирует миграцию эндотелиальных клеток и экспрессию матриксных металлопротеиназ [Писаржевский С.А., 2006; Rutanen J., Leppanen P., Tuomisto T.T. et al., 2003]. При этом следует подчеркнуть, что физиологические функции VEGF зависят от определенных его уровней. На экспериментальных моделях было показано, что защитными свойствами обладают низкие уровни VEGF. Направление действия VEGF зависит от многих факторов, в частности, от места действия, специфики заболевания или особенностей терапевтических вмешательств, а также от уровня экспрессии других цитокинов в ответ на патологический процесс [Zachary I., Mathur A. et al., 2000; Tsutsumi Y., Losordo D.W., 2005]. Повышенные уровни экспрессии VEGF-A в структурах сетчатки, зарегистрированные в настоящем исследовании, вероятно, во-первых, являются своеобразной защитой сетчатки на фоне ишемии, во-вторых, сбалансированы антиангиогенным фактором PEDF, что до определенных пор не дает толчок к развитию процессов патологической неоваскуляризации.

Знание механизмов повреждения ЦНС, в частности, путей формирования окислительного стресса, позволяет апробировать новые фармакотерапевтические подходы к лечению нейродегенеративных заболеваний. Однако на сегодняшний день большинство используемых препаратов в терапии глазных патологий, сопровождающихся повышенным радикалообразованием, имеют ограниченный спектр действия, в связи с чем, поиск эффективных антиоксидантов с дополнительным спектром биологических активностей, проникающих через гематоретинальный барьер, является актуальной проблемой. Наиболее перспективными в этом отношении являются фенольные антиоксиданты (ArOH). Их механизм

действия заключается во взаимодействии с гидроперекисными радикалами, при котором исчезновения свободной валентности не происходит, а осуществляется замена гидроперекисного радикала $RO_2\bullet$ на феноксильный $ArO\bullet$. Он стабилен и практически не участвует в реакциях продолжения цепей. Высокая стабильность фенольных радикалов обусловлена делокализацией электронной плотности неспаренного электрона: чем больше степень делокализации, тем стабильнее радикал. Способность фенольных антиоксидантов тормозить радикальные процессы окисления обеспечивается фенольной гидроксильной группой. Обобщенная система π -электронов ароматического кольца смещает отрицательный заряд на кислород, в результате отрыв атома водорода от гидроксила становится достаточно легким и образуются разные формы феноксильного радикала [Зенков Н.К. и соавт., 2003].

В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка влияния полусинтетических экранированных фенольных антиоксидантов диборнола и тиофана на процессы развития дегенераций сетчатки. Диборнол является терпенофенолом, что определяет его выраженную антиоксидантную и гемореологическую активность [Плотников М.Б. и соавт., 2007; 2009]. Тиофан сочетает в себе свойства фенолов и серосодержащих соединений, способствуя нейтрализации гидроперекисей [Просенко А.Е. и соавт., 2001]. Для каждого вида изучаемой экспериментальной ретинопатии был принят определенный протокол введения препаратов, согласно результатам морфологических исследований хориоретинальных комплексов аналогичных групп без коррекции. Для группы животных с фотодегенерацией сетчатки была избрана стратегия совмещения профилактики и лечения. Препараты вводили перорально за 7 суток до освещения и в течение 7 суток после освещения, так как именно в этот период отмечается максимум дегенеративных изменений сетчатки и возникает очаговость поражения структур сетчатки. Длительность коррекции оправдана результатами предшествующих исследований, в ходе которых отмечено, что

профилактический прием антиоксидантов до начала острого эксперимента, в частности тотального высокоинтенсивного светового воздействия, способствует большей сохранности структуры сетчатки. Для лечения диабетической ретинопатии и возрастной хориоретинальной дегенерации была избрана тактика ограничения развития нейродегенерации. Так, у экспериментальных животных спустя месяц после развития стрептозотоцинового диабета изменения сетчатки были минимальны и касались лишь нарушений микроциркуляции, у крыс OXYS наблюдалось лавинообразное вовлечение в патологический процесс всех структур сетчатки в период между 3 и 5 месяцами жизни. Поэтому для серии животных с диабетической ретинопатией началом антиоксидантной терапии послужил срок 30 дней от развития стойкой гипергликемии и выбрана длительность лечения 30 суток, так как после этого критического периода наблюдался массовый падеж ослабленных некомпенсированным диабетом животных. У крыс OXYS – первое введение препарата начинали в возрасте 4,5 месяцев и заканчивали в возрасте 6 мес, когда по нашим данным и данным коллег из ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) ретинопатия развивается у 100% животных. Для крыс с тотальной транзиторной ишемией была выбрана обычная тактика лечения лавинообразно развивающихся нарушений сетчатки в течение 7 дней с началом введения препарата спустя 1 час после ишемии/реперфузии. Сроки лечения продиктованы наличием в литературе данных, утверждающих, что спустя 1 час после реперфузии в сетчатке регистрируется повышение мРНК C-FOS и c-jun, при этом изменения нейронов обнаруживаются лишь спустя 7 дней после реперфузии [Otori Y. et al., 1997].

Избранные тактики лечения оправдали себя, причем, выявлены определенные закономерности влияния диборнола и тиофана на патоморфогенез сетчатки при всех видах изучаемых патологиях.

Главным отличием, определяющим эффективность проводимой терапии изучаемыми препаратами, является их влияние на систему

микроциркуляции. Введение диборнола животным со стрептозотоциновым диабетом, острой транзиторной ишемией головного мозга и возрастной хориоретинальной дегенерацией улучшает реологические свойства крови, снижая ее вязкость на низких скоростях сдвига, улучшая деформируемость эритроцитов, что, на фоне постоянства показателя гематокрита, свидетельствует об улучшении эффективности доставки кислорода тканям сетчатки и характеризует диборнол как эффективный антигипоксикант. Проведенное исследование гемореологии экспериментальных крыс нашло подтверждение при морфологической оценке хориоретинальных комплексов глаз крыс этой группы. Курсовое введение диборнола животным всех перечисленных экспериментальных групп ограничивает образование сосудов со стазом, сладжем или тромбозом и приводит к большей сохранности открытых функционирующих сосудов. Известно, что некоторые полифенольные соединения обнаруживают способность к снижению стимуляции тромбоином агрегации тромбоцитов при сахарном диабете II типа, а, следовательно, они предотвращают тромботические осложнения при микроангиопатиях и становятся базой для развития антиагрегантной терапевтической стратегии. Такую активность, к примеру, показывают фенольные антиоксиданты леуропейн и циклооливил [Olas B. et al., 2008; Zbidi H. et al., 2009].

При тотальном высокоинтенсивном световом воздействии системные гемореологические сдвиги незначительны, однако на уровне хориоретинального комплекса применение диборнола способствует ограничению тромбообразования в микрососудах и очагового поражения сетчатки, что может косвенно свидетельствовать о высокой биодоступности диборнола для тканей сетчатки.

Введение тиофана не приводит к улучшению реологических свойств крови экспериментальных животных. У животных всех групп, получавших тиофан, вязкость крови в исследуемом диапазоне скоростей сдвига, агрегация эритроцитов, деформируемость эритроцитов не отличается от

значений групп контроля. Светомикроскопически в сосудистой оболочке глаз экспериментальных животных всех серий эксперимента, леченых тиофаном, не выявлено снижение показателя удельной площади сосудов со стазом, сладжем или тромбозом относительно аналогичного в группе без лечения.

Методами спонтанной и индуцированной хемилюминесценции выявлено наличие антирадикальной и антиоксидантной активностей диборнола и тиофана. Применение препаратов приводит к ограничению радикалообразования в сетчатке всех экспериментальных групп и способствует повышению способности тканей сетчатки противостоять разрушительному влиянию гидроперекисей. Это нашло свое отражение при морфологическом анализе: ограничение дегенерации ПЦ с активацией их фагоцитарной активности, повышение адаптации НК, ассоциативных, ганглионарных нейронов и синаптических контактов к повреждающим факторам. Диборнол, в отличие от тиофана, является более эффективным ретинопротектором, что определяется, вероятно, его положительным влиянием на микрореологические показатели крови.

При фотодегенерации главным преимуществом диборнола над тиофаном является полное ограничение образования очагов поражения сетчатки. Тиофан приводит к сокращению удельной площади очагов поражения в 2 раза. В очагах поражения сетчатки групп с коррекцией тиофаном деструктивные изменения исследуемых структур сопоставимы с группой без лечения. Вне очагов поражения сетчатки значения всех исследуемых показателей достоверно не отличаются от аналогичных группы с диборнолом.

В группе со стрептозотоциновым диабетом под влиянием диборнола происходит увеличение удельной площади слоя ПЦ, процент пикнотичных ядер НК, гиперхромных пикноморфных ГН и радиальных глиоцитов не отличается от аналогичных показателей интактных животных. Ограничение хроматолитических процессов в ГН происходит лишь частично. Тиофан

оказывает аналогичное диборнолу влияние на хроматолитические процессы в ганглионарных нейронах, однако процент пикноморфных мультиполярных нейронов остается выше таковых значений в группе с диборнолом. Этот факт, возможно, объясняется значительной дегенерацией митохондрий в цитоплазме изучаемого вида нейронов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции тиофаном. Вместе с тем, показатели удельной площади гранулярной ЭПС и КГ в цитоплазме ганглионарных нейронов сетчатки крыс обеих групп с коррекцией достоверно выше аналогичных в опытной группе и не отличаются от значений интактного контроля. На фоне коррекции и диборнолом, и тиофаном имеет место ограничение р53-зависимого апоптоза нейронов внутренних слоев. Оба препарата проявляют одинаковое по эффективности защитное действие в отношении синаптических контактов внутреннего плексiformного слоя с длиной АЗК от 200 до 500 мкм.

При возрастной хориоретинальной дегенерации у крыс OXYS диборнол, эффективнее, чем тиофан, защищает НК от развития деструктивных процессов: процент пикноза, численная плотность и количество рядов ядер НК в этой группе не отличаются от значений крыс Вистар. И тиофан, и диборнол в равной степени приводят к ограничению развития темного типа деструкции ганглионарных нейронов, что, вероятно, происходит вследствие высокой сохранности митохондрий. Однако процент нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом на фоне сниженного показателя удельной площади гранулярной ЭПС в группе с коррекцией тиофаном не отличается от значений аналогичных показателей группы без коррекции. Диборнол и тиофан оказывают однонаправленное и в одинаковой степени выраженное положительное влияние на синаптоархитектонику сетчатки при стрептозотоциновом диабете. Сохранность синапсов обеспечивается, главным образом, за счет асимметричных плоских синапсов со средней АЗК 200-300 и 300-500 мкм и высотой ПП до 60 нм, что

способствует улучшению нейрональных взаимодействий в сетчатке и, в некоторой степени, препятствует их гибели.

Отсутствие у тиюфана выраженных гемореологических свойств, показанное нами на моделях стрептозотоцинового диабета, возрастной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS, а также косвенно на модели фотодегенерации сетчатки показало нецелесообразность его использования в качестве корректора нарушений хориоретинального комплекса на модели ишемии/реперфузии головного мозга крыс.

Применение диборнола с первых часов развития ишемии/реперфузии головного мозга способствует высокой сохранности органелл в ПЦ сетчатки. Диборнол снижает негативные последствия гипоксии в нервной ткани сетчатки. Большинство наружных и внутренних сегментов НК остаются интактными, сохраняется связь между ними. В части митохондрий происходит разрушение крист, часть – обнаруживает лишь расширение межмембранного пространства между кристами. Со стороны ядродержащей части НК отмечается их высокая сохранность. Применение диборнола полностью ограничивает дегенерацию мюллеровских глиоцитов и ассоциативных нейронов. Диборнол, оказывая нейропротекторный эффект в отношении ганглионарных нейронов, частично ограничивает образование пикноморфных нейронов и нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом, что, вероятно, является следствием высокой сохранности органелл в цитоплазме ганглионарных нейронов. Препарат напрямую, проявляя антиоксидантные свойства и опосредованно, через повышение адаптации нейронов к гипоксии оказывает выраженные синаптопротекторные свойства по отношению к симметричным и асимметричным контактам.

По результатам настоящего диссертационного исследования составлена общая схема патоморфогенеза сетчатки хориоретинального комплекса крыс при фотодегенерации, ДР, возрастной хориоретинальной дегенерации и тотальной транзиторной ишемии на фоне коррекции антиоксидантами группы пространственно затрудненных фенолов диборнола

и тифана с учетом литературных данных (рис. 123). Несмотря на полиэтиологичность перечисленных заболеваний, их патоморфогенез на уровне сетчатой оболочки сходен и связан, прежде всего, с развитием микрососудистых изменений и окислительных повреждений в сетчатке и хориоиде. Эти факторы являются пусковым механизмом запуска процессов дегенерации хориоретинального комплекса вообще и нейродегенерации в частности. Однако есть некоторые особенности, которые определяют степень вовлеченности той или иной структуры сетчатки в патологический процесс.

Фотоповреждение сетчатки запускает процессы свободнорадикального окисления, индуктором которых становятся ПЦ и наружные сегменты фоторецепторов, в связи с чем, они же являются наиболее поражаемыми при световом воздействии. Усугубляет процесс фотоиндуцированное закрытие микрососудов, способствующее очаговому поражению сетчатки, редокс-зависимое развитие поражения эндотелия, повышение агрегационной способности эритроцитов. Это способствует замыканию порочного круга, а именно, нарушение обмена веществ между сетчаткой и хориоиде способствует большему нарастанию дегенеративных процессов в ПЦ и НК, нарушению баланса в системе про- и антиангиогенеза, нейроглиальных взаимодействий, усиливающих процесс дегенерации нейронов второго и третьего порядка с блоком синаптической передачи.

При ДР стойкая некомпенсированная гипергликемия определяет процесс дегенерации сетчатки. Каскад биохимических превращений способствует повреждению эндотелия в виде набухания и дегенерации органелл, воспалительных реакций в сосудистой стенке с оседанием на ней лейкоцитов, макрофагальной реакции с миграцией их из кровеносного русла, развития синдрома повышенной вязкости крови, диapedезу эритроцитов сквозь неполноценные контакты эндотелиоцитов. Это способствует дегенерации ПЦ с нарушением их фагоцитарной активности, массовой дегенерации мембран наружных сегментов НК, что, наряду с присутствием большого числа фагоцитов в сетчатке, провоцирует активацию процессов

свободнорадикального окисления на фоне снижения антиоксидантной активности. Отмечается массовая гибель ганглионарных нейронов, закономерно нарушаются межнейрональные взаимодействия в виде нарушений синаптической передачи, которые, однако, частично компенсируются высокой сохранностью синапсов с длиной АЗК 500-700мкм с наличием нескольких активных зон выделения медиатора.

Крыс OXYS отличает раннее поражение микрососудов с развитием в них эндотелиальной дисфункции, синдрома повышенной вязкости крови, снижения агрегационной и деформационной способности эритроцитов. Увеличение вязкости плазмы на фоне неизменного показателя гематокрита свидетельствует о снижении эффективности доставки кислорода в ткани и развитии гипоксии. Она ведет к поражению ПЦ, НК, запуску окислительного стресса в сетчатке, накоплению окислительных повреждений макромолекул и снижению эффективности работы системы антиоксидантной защиты, что вновь замыкает порочный круг, усугубляя нейродегенерацию. В дополнение, миграция мононуклеарных фагоцитов из сосудистого русла в хориоидею свидетельствует о неотъемлемой роли иммунопатологических нарушений в патогенезе возрастной хориоретинальной дегенерации крыс OXYS. Эти события влекут за собой выработку ПЦ и фагоцитами VEGF, увеличение проницаемости сосудов, миграцию моноцитов в очаг поражения и нарушение равновесия в системе про- и антиангиогенеза. Развивающиеся дегенеративные изменения ПЦ, вероятно, ограничивают чрезмерную выработку VEGF, что говорит о развитии у крыс OXYS “сухой” формы возрастной хориоретинальной дегенерации. Окислительный стресс, дегенеративные изменения ПЦ, гипоксия, приводят к деструкции нейросенсорных клеток и синаптических контактов, нейронов внутренних слоев сетчатки. При этом, основной путь гибели ее клеточных структур - некротические нарушения на фоне значительной деградации митохондрий, выраженных макрофагальных реакций.

Тотальная транзиторная ишемия вызывает синдром повышенной вязкости крови, что отражается на микроциркуляторном русле хориоидеи, часть сосудов которой переходит в закрытое неактивное состояние и кровоток по ним прекращается, а в части сосудов наблюдается стаз, сдвиг и явления тромбоза либо отсутствие форменных элементов, что также препятствует нормальному кровотоку. Это способствует нарушению обмена веществ между сетчаткой и хориоидеей, гипоксии и нарастанию дегенеративных процессов в ПЦ и НК, развитию внутриклеточного отека на уровне всех типов нейронов, а также радиальных глиоцитов.

Нарушение фагоцитарной активности ПЦ в связи с митохондриальной дисфункцией при массовой дегенерации наружных мембран НК, миграция и активация фагоцитов в хориоретинальном комплексе, вероятно, способствуют активации процессов свободнорадикального окисления на фоне снижения антиоксидантной активности в сетчатке, что усугубляет гипоксию, способствуя гибели нейронов.

Диборнол и тиофан, проявляя антиоксидантные свойства, способствуют различной степени выраженности снижению деструкции ПЦ, НК, ассоциативных и ганглионарных нейронов, синаптических контактов в сетчатках крыс с ретинопатиями различного генеза. На основании полученных различий влияния диборнола и тиофана на гемореологические показатели крови и состояние стенки сосудов микроциркуляторного русла хориоретинальных комплексов крыс, а также различий в эффективности терапии изучаемых дегенераций сетчатки, можно предположить, что развитие окислительного стресса в патогенезе микроангиопатий сетчатки вторично и является следствием гипоксии, вызванной замедлением хориоретинального кровотока. Тиофан, возможно, проявляет лишь выраженные антиоксидантные свойства. Механизм действия диборнола выходит за рамки антиоксидантной активности, так как налицо проявление им антитромбогенных и антигипоксических свойств, что способствует

прерыванию порочного круга структурно-функциональных нарушений сетчатки.

Таким образом, в работе показана высокая эффективность антиоксиданта группы экранированных фенолов диборнола в лечении экспериментальных ретинопатий, в патогенезе которых лежат нарушения микроциркуляции, гемореологических свойств крови и окислительный стресс. Это является потенциалом для дальнейшего исследования диборнола в качестве ретинопротектора в офтальмологической практике

ВЫВОДЫ

1. В сетчатках крыс после высокоинтенсивного светового воздействия, ишемии/реперфузии головного мозга, на фоне стрептозотоцинового диабета и возрастной хориоретинальной дегенерации развиваются масштабные процессы деструкции нейронов, пигментоцитов и радиальных глиоцитов, реализуемые путем некроза и апоптоза. Деструктивные изменения закономерно сопровождаются реорганизацией сетчатки в виде снижения численной плотности и уменьшения рядов ядер нейросенсорных клеток, разрастания склеральных отростков радиальных глиоцитов в наружном ядерном слое, сокращения общей численной плотности межнейронных синапсов.

2. У крыс линии OXYs в возрасте 6 месяцев деструктивные изменения структур хориоретинального комплекса развиваются на фоне выраженного тромбообразования в интравитреальных и хориоидальных сосудах. Митохондрии нейронов сетчатки крыс OXYs являются наиболее поражаемыми органеллами, характеризуются разнообразием ультраструктурных нарушений, значительным сокращением удельной площади в цитоплазме.

3. Ишемия головного мозга белых крыс вследствие термокоагуляции обеих вертебральных артерий, 30-минутного пережатия общих сонных артерий с последующей реперфузией вызывает переход части открытых сосудов хориоидеи в закрытые нефункционирующие, тромбообразование, дегенерацию эндотелия, отек нейронов и изменения их по темному типу, сопровождающиеся снижением удельной площади митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи в цитоплазме. Деструкция значительной части межнейронных контактов в сетчатке глаз крыс с острой ишемической ретинопатией частично компенсируется появлением гипертрофированных синапсов.

4. Стрептозотоциновый диабет длительностью 2 месяца способствует развитию ретинопатии с преимущественным поражением сосудов хориоретинального комплекса, пигментоцитов, дегенерацией части

нейросенсорных клеток, ганглионарных нейронов, синаптических контактов, а также реактивными изменениями большинства ассоциативных нейронов. Высокий процент p-53- и каспаза-9-иммунопозитивных ганглионарных нейронов свидетельствует в пользу апоптотической формы гибели наряду с некрозом. Проявлением адаптации сетчатки является появление гипертрофированных синапсов с усложнением их геометрии и наличием нескольких активных зон контакта.

5. Характерной особенностью развития изменений структурных компонентов хориоретинального комплекса у крыс, подвергшихся тотальному 6-ти часовому воздействию белым светом интенсивностью 6000 лк, является поражение клеточных и внутриклеточных мембран на фоне высоких значений индуцированной люминолом хемилюминесценции гомогената сетчатки. Это способствует выраженной деструкции нейронов, синаптических контактов, пигментоцитов, радиальных глиоцитов, гематоретинального барьера с развитием процессов неоангиогенеза.

6. Гемореологические расстройства у крыс с возрастной хориоретинальной дегенерацией, диабетической ретинопатией и острой ишемической ретинопатией зафиксированы на системном уровне в виде развития синдрома повышенной вязкости крови, повышения полупериода агрегации и снижения индекса деформируемости эритроцитов, что способствует снижению доставки кислорода тканям.

7. Методом хемилюминесценции в гомогенатах сетчаток животных с ретинопатиями различного генеза выявлено повышение радикалообразования. Максимальный уровень активных форм кислорода зафиксирован у крыс со стрептозотоциновым диабетом и после тотального высокоинтенсивного светового воздействия, что коррелирует с высокой поражаемостью структурных компонентов сетчатки.

8. Антиоксиданты группы экранированных фенолов диборнол и тиофан обладают ретинопротекторными свойствами. Их использование снижает степень повреждения и приводит к активации компенсаторно-

восстановительных процессов хориоретинального комплекса. Это проявляется в повышении адаптации пигментоцитов, сохранности процесса утилизации отработанных и поврежденных мембранных дисков наружных сегментов, уменьшении количества деструктивно измененных нейронов и синапсов, восстановлении межнейронных связей.

9. Диборнол по эффективности превосходит тиофан. Механизм действия диборнола, помимо антиоксидантной активности, основан на улучшении микроциркуляции, увеличении доступности кислорода для тканей, что ограничивает развитие порочного круга структурно-функциональных нарушений сетчатки.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов.- М.: Медицина, 1990. - 381 с.;
2. Азнабаев, Р.А. Этиопатогенез сенильной макулярной дегенерации / Р.А. Азнабаев, М.М. Бикбов, А.Ш. Мухамедьянова // Вестник офтальмологии. - 2007. - № 2. - С. 43-45;
3. Александрова, В.К. Особенности диабетической ретинопатии в детском возрасте / В.К. Александрова, Т.М. Миленская // Сахарный диабет. - 2005. - № 1. - С. 28-34.
4. Алкилирование гидрохинона камфеном / И.Ю. Чукичева, А.В. Кучин, Л.В. Спирихин, Е.У. Ипатова // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. - 2003. - №. 1. - С. 16-19;
5. Аналит. обзор. СО РАН; ГПНТБ. Новосиб. Ин-т орган.химии / И.В. Сорокина, А.П. Крысин, Т.Б. Хлебникова и др. – Новосибирск, 1997. – 68 с.;
6. Антиоксидантная защита тканей пародонта при экспериментальной хирургической травме / А.В. Сахаров, А.С. Агеев, А.Е. Просенко и др. // Всероссийская научно-практическая конференция «Современные проблемы фармакологии и фармации»: сб. научных трудов. - Новосибирск, НГМА, 2005. – С. 126-127;
7. Антиоксидантный потенциал серосодержащих производных фенола на модели фагоцитарной генерации активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.И. Полозов и др. // Вести НАН Беларуси (серия медицинских наук). - 2011. - № 3. - С. 83-88;
8. Антиоксидантный потенциал серосодержащих структурных аналогов α -токоферола на модели респираторного взрыва фагоцитов/ Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Медицинский журнал. - 2011. - № 2. - С. 6-12;
9. Антитела к коллагену II и IV типов, фактор некроза опухоли и циркулирующие иммунные комплексы в слезе и сыворотке крови у больных

с различными стадиями диабетической ангиоретинопатии / Л.М. Балашова, И.С. Зайцева, Л.Е. Теплинская и др. // Вестник офтальмологии. - 2000. - Т. 116, № 3. - С. 31-35;

10. Астахов, Ю.С. Возрастная макулярная дегенерация / Ю.С. Астахов, А.Б. Лисочкина, Ф.Е. Шадричев // Клинические рекомендации. Офтальмология / под ред. Л.К. Мошетовой, А.П. Нестерова, Е.А. Егорова. - М.: ГЭОТАР-Медиа. - 2006. - С. 164-188;

11. Балаболкин, М.И. Диабетология / М.И. Балаболкин. - М.: Медицина, 2000. - 470 с.;

12. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений. / Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. - М.: 2005. - 511 с.;

13. Балаболкин, М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. - 2000. - Т.46., № 6. - С. 29-34;

14. Балаболкин, М.И., Клебанова Е.М. Роль инсулинорезистентности в патогенезе СД типа 2 / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Терапевтический архив. - 2003. - №1.- С. 72-77;

15. Бобырева, Л.Е. Антиоксиданты в комплексной терапии диабетических ангиопатий / Л.Е. Бобырева // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1998. - Т. 61, № 1. - С. 74-80;

16. Боголепов, Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н.Н. Боголепов. - М.: Медицина, 1976. - 72 с.;

17. Боголепов, Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии / Н.Н. Боголепов. - М.: Медицина, 1979. - 168 с.;

18. Богоявленский, В.Ф. Микроциркуляция и реологические свойства крови при атеросклерозе / В.Ф. Богоявленский // Врачебное дело. - 1981. - № 8. - С. 26-28;

19. Борисова, С.А. Апоптоз: патогенетические и биорегуляторные механизмы гибели клетки в норме и при глазной патологии / С.А. Борисова, Коломойцева Е.М. // Вестник офтальмологии. - 2003. - № 2. - С. 50-54;

20. Бородай, А.В. Танакан в лечении диабетических микроангиопатий / А.В. Бородай, Г.Ш. Сабурова, А.М. Ишунина // VII съезд офтальмологов России: тезисы докладов Ч. 1. - М., 2000. - С. 304;
21. Будзинская, М.В. Субретинальная неоваскулярная мембрана при возрастной макулярной дегенерации / М.В. Будзинская, И.В. Гурова // Вестник офтальмологии. - 2006. - № 4. - С. 49-54;
22. Вербовая, Н.И. Роль гликозилированных продуктов метаболизма в формировании сосудистых осложнений сахарного диабета / Н.И. Вербовая, Е.А. Лебедева // Проблемы эндокринологии. - 1997. - Т. 43, № 1. - С. 43-45;
23. Влияние антиоксиданта «тиофан» на параметры окислительного стресса при ишемической болезни сердца / И.А. Бахтина, Е.В. Антипова, А.Е. Просенко и др. // Бюл. СО РАМН. - 2000. - № 3-4. - С. 24-29;
24. Влияние антиоксиданта тиофан на индукцию цитохромов P-450 печени крыс / М.И. Душкин, А.Е. Просенко, Н.В. Кандалинцева, В.В. Ляхович // Науч. вестник Тюмен. мед. академии. - 2003. - Т. 23, № 1. - С. 11-13;
25. Влияние антиоксиданта тиофана на течение воспалений и посттравматическую регенерацию костей при дефектах нижней челюсти / А.С. Агеев, А.В. Сахаров, А.Е. Просенко, Т.А. Агеева // Всероссийская научно-практическая конференция патологоанатомов «Актуальные вопросы патологической анатомии»: сб. научных трудов - Орел, 2005. - С. 13-15;
26. Влияние асковертина на изменения синаптоархитектоники сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при высокоинтенсивном световом воздействии / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, Е.Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2006. - Т. 130, № 5. - С. 59;
27. Галилеева В.В., Киселева О.М. Применение антиоксиданта мексидола у больных с диабетической ретинопатией / В.В. Галилеева, О.М. Киселева // VII съезд офтальмологов России. Тез. докл. Ч. 2. - М., 2000. - С. 425-426;

28. Гусаревич, О.Г. Изучение влияния Офтан Катахрома на развитие макулярной дегенерации сетчатки (экспериментальное исследование) / О.Г. Гусаревич, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова // Клиническая офтальмология. - 2003. - № 4. - С. 186-190;
29. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И., Гусев, В.И. Скворцова. - М.: Медицина, 2001. - 328 с.;
30. Действие ресвератрола, производных бензойной и коричной кислот на генерацию активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро и др. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. - 2012. - № 1. - С. 48-53;
31. Динамика структурно-функциональных изменений митохондрий гепатоцитов преждевременно стареющих крыс линии OXYS / Н.Г. Колосова, С.В. Айдагулова, Г.И. Непомнящих и др. // Бюл. exper. биол. - 2001. - Т. 132, № 8. - С. 235-240;
32. Евграфов, В.Ю. Диабетическая ретинопатия: патогенез, диагностика, лечение: Автореф. дис. ... докт. мед. наук / В.Ю. Евграфов; Науч. центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева Рос. АМН. - М., 1996. - 47 с.
33. Егоров, Е.А. Возрастная макулярная дегенерация. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения / Е.А. Егоров, И.А. Романенко // Клиническая офтальмология (Б-ка РМЖ). - 2009. - № 3. - С. 84-86;
34. Жабоедов, Г.Д. Иммунопатологические процессы в сетчатке при развитии диабетической ретинопатии / Г.Д. Жабоедов, Р.Л. Скрипник, М.В. Сидорова // Вестник офтальмологии. - 2000. - № 6. - С. 36-39;
35. Зуева, М.В. Зональная ЭРГ: глио-нейрональный профиль сетчатки / М.В. Зуева, И.В. Цапенко // Российский физиологический журнал им. Сеченова. - 2004. - Т.90, № 8. - С. 436-437;
36. Зуева, М.В. Каналы передачи зрительной информации в структуре нейронной сети сетчатки человека / М.В. Зуева // Известия ТРТУ. - 2004. - № 3. - С. 222-226;

37. Зуева, М.В. Клетки Мюллера: спектр и профиль глио-нейрональных взаимодействий в сетчатке / М.В. Зуева, И.В. Цапенко // Российский физиологический журнал им. Сеченова. - 2004. - Т. 90, № 8. - С. 435-436;
38. Зуева, М.В. Структурно-функциональная организация клеток Мюллера: роль в развитии и патологии сетчатки / М.В. Зуева, И.В. Цапенко // Клиническая физиология зрения. Очерки / Под ред. проф. Шамшиновой А.М., М.: НМФ МБН, - 2006. - С. 144-205;
39. Иванов, И.С. Влияние производного орто-изоборнлфенола на показатели перекисного окисления липидов в тканях головного мозга при ишемии у крыс / И.С. Иванов, В.И. Смольякова // Науки о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. - Томск: СибГМУ, 2008. - С. 111-112;
40. Изменения физико-химических характеристик и экспрессии генов α -кристаллинов в хрусталиках крыс OXYS при развитии катаракты / Ю.В. Румянцева., А.Ж. Фурсова, Л.А. Федосеева, Н.Г. Колосова // Биохимия. - 2008. - Т. 73, вып. 11. - С. 1467 – 1475;
41. Изучение токсического действия нового фенольного антиоксиданта СО-3 в субхроническом эксперименте / Т.В. Воевода, Т.Г. Толстикова, И.В. Сорокина и др.// Эксперим. и клинич. фармакология. - 2000. - Т. 63, № 4. - С. 57-60;
42. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. З.А. Суслиной, М.А. Пирадова. - М.: МЕДпресс-информ, 2008. - 288 с.;
43. Исмагилов, М.Ф. Ишемический мозговой инсульт: терминология, эпидемиология, принципы диагностики, патогенетические подтипы, терапия острого периода заболевания / М.Ф. Исмагилов // Неврологический вестник. - 2005. - Т. XXXVII, № 1-2. - С. 67-76;
44. Исследование оптического поглощения сенсibilизаторов в биологических тканях / А.Ю. Барышников, В.Б. Лощенов, З.С. Смирнова и др. // Российский биотерапевтический журнал. - 2004. - № 3. - С. 37-42;

45. Капланская, И.Б. Ангиогенез, межклеточные контакты и стромально-паренхиматозные взаимоотношения в норме и патологии / Капланская И.Б., Гласко Е.Н., Франк Г.А. // Рос. онкол. журн. - 2005. - № 4. - С. 53-57;
46. Кацнельсон, Л.А. Сосудистые заболевания глаза / Л.А. Кацнельсон, Т.И. Фарафонова, А.Я. Бунин. - М.: Медицина, 1990. - 272 с.;
47. Киселева, Т.Н. Роль вазоактивных препаратов в терапии неэкссудативной возрастной макулярной дегенерации / Т.Н. Киселева, Ю.М. Лагутина, Е.А. Кравчук // Рефракционная хирургия и офтальмология. - 2006. - Т. 6, № 2. - С. 41-45;
48. Колосова, Н.Г. Макулодистрофия и катарактогенез у преждевременно стареющих крыс OXYS, их связь с окислительным стрессом / Н.Г. Колосова, А.Ж. Фурсова, П.А. Лебедев, О.Г. Гусаревич // Офтальмологический журнал. - 2004. - № 3. - С. 237-242;
49. Колосова, Н.Г. Преждевременно стареющие крысы OXYS как модель сенильной катаракты человека / Н.Г. Колосова, П.А. Лебедев, А.Ж. Фурсова и др. // Успехи геронтологии. - 2003. - Т. 12. - С. 143-147;
50. Кондратьев, Я.Ю. Полиморфные генетические маркеры и сосудистые осложнения сахарного диабета / Я.Ю. Кондратьев, В.В. Носиков, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. - 1998. - Т. 44, № 1. - С.43-52;
51. Крысы OXYS – универсальная модель старения органа зрения / А.Ж. Фурсова, П.А. Лебедев, О.Г. Гусаревич, Колосова Н.Г. // Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные и клинические аспекты: тезисы Всероссийской научно-практической конференции.- Новосибирск, 2004. - С. 311-312;
52. Кузаков, Е.В. Синтез терпенофенолов прямым алкилированием фенолов терпеноидами / Е.В. Кузаков, Э.Н. Шмидт // Химия природных соединений. - 2000. - №3. - С.198-207;
53. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг и др. – Томск, 1980. - 314 с.

54. Либман, Е.С. Слепота, слабовидение и инвалидность по зрению в Российской Федерации / Е.С. Либман, Е.В. Шахова // Ликвидация устранимой слепоты. Всемирная инициатива ВОЗ. Мат. Рос. межрегион. симпозиума. - Уфа, 2003. - С. 38–42;
55. Либман, Е.С. Эпидемиологическая характеристика инвалидности вследствие основных форм макулопатий / Е.С. Либман, Р.А. Толмачев, Е.В. Шахова // Мат-лы II Всероссийского семинара «Макула», круглый стол / под ред. Ю.А. Иванишко. - Ростов н/Д., 2006. - С 15-22;
56. Логвинов, С.В. Поражение клеток нейральной сетчатки и ретинального пигментного эпителия глаз крыс при воздействии высокоинтенсивного света на фоне аллоксанового диабета / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов // Радиационная биология, радиоэкология. - 2005. - № 6. - С. 732-736;
57. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, А.В. Коваленко, М.А. Соколов // Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. - 1999. - Т. 99, № 2. - С. 65-70;
58. Механизмы фотоповреждения сетчатки / М.В. Зуева, Л.А. Кармолин, И.Б. Федорович, М.А. Островский // Патоморфология и биохимия глаза. - 1987. - С. 38-42;
59. Митохондриально направленный антиоксидант SkQ1 в профилактике преждевременного старения крыс OXYS / Н.Г. Колосова, Т.Г. Амстиславская, Н.А. Стефанова, А.Ж. Фурсова // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов: сб. научных трудов. - Новосибирск, 2008. - С.333;
60. Модель ишемии сетчатки: клинико-функциональное и гистологическое исследование / Р. А. Гундорова, Н.Е. Швецова, А.Н. Иванов и др. // Вестник офтальмологии. - 2008. - №3. - С. 14-19;
61. Молочкина, Е.М. Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах

клеток головного мозга / Е.М. Молочкина, И.Б. Озерова, Е.Б. Бурлакова // Российский химический журнал. - 1999. - Т. XLIII, № 5. - С. 63-71;

62. Морфологические изменения клеточных элементов сетчатки глаза при длительном низкоинтенсивном световом воздействии / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов и др. // Бюл. сибирской медицины. - 2006. - № 3. - С. 31-36;

63. Морфологические проявления наследственной гипертонической кардиомиопатии у крыс линии W/SSM / Р.И. Салганик, Н.А. Соловьева, Л.М. Непомнящих, Д.Е. Семенов // Бюлл. exper. биол. - 1994. - № 8. - С. 203-207;

64. Морфологический метод исследования некомпетентных органов при стимуляции репаративной регенерации кости тиюфаном и «плазмаралом» / А.М. Зайдман, Д.В. Жуков, А.В. Сахаров и др. // Всероссийская научно-практическая конференция патологоанатомов «Актуальные вопросы патологической анатомии»: сб. научных трудов. - Орел, 2005. - С. 174-176;

65. Мошетова, Л.К. Клинические рекомендации. Офтальмология / Л.К. Мошетова, А.П. Нестерова, Е.А. Егорова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 256 с.

66. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мед. инф. агентство (МИА), 2003. - 544 с.;

67. Нейропротекторные эффекты диборнола и механизмы действия при ишемии головного мозга / М.Б. Плотников, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова и др. // Вестн. РАМН. - 2009. - № 11. - С. 12–17;

68. Нероев, В.В. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста в патогенезе диабетической ретинопатии / В.В. Нероев, О.И. Сарыгина, О.А. Левкина // Вестник офтальмологии. - 2009. - № 2. - С. 58–60;

69. Нестеров, А.П. Диабетические нарушения органа зрения / А.П. Нестеров // Проблемы эндокринологии. - 1997. - Т. 43, № 3. - С. 16-19;

70. Новиков, В.С. Программированная клеточная гибель / В.С. Новиков. - СПб.: Наука, 1996. - 276 с.;

71. Озерова, И.Б. Новые антиоксиданты экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы *in vivo* и *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / И.Б. Озерова. - М., 2000. - 25с.;
72. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. - М.: Фирма "Слово", 2006. - 553 с.;
73. Окислительный стресс: Клинико-метаболические показатели и полиморфный маркер гена каталазы при развитии ретинопатии у больных сахарным диабетом второго типа / О.С. Булатова, Я.Ю. Кондратьева, Т.М. Миленькая и др. // Проблемы эндокринологии. - 1999. - Т. 45, № 4. - С. 3-8;
74. Опыт использования препарата черники для лечения центральной хориоретинальной дегенерации / А.Ж. Фурсова, О.Г. Гусаревич, А.М. Гончар, Н.Г. Колосова // Бюллетень СО РАМН. - 2007. - №1. - С. 92-96;
75. Опыт применения препарата диквертин в клинической практике у больных с диабетической ангиопатией / Т.М. Скуратова, В.Г. Ульданов, В.В. Золотавин, В.З. Пьянков // Офтальмология Якутии на рубеже веков: материалы науч.-практ. конф. офтальмологов, посвященной 75-летию службы. – Якутск, 2000.– С. 130–131;
76. Островский, М.А. Исследование про- и антиоксидантных свойств липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека / М.А. Островский, А.Е. Донцов, М. Боултон // Биологические мембраны. - 1991. - Т. 8, № 11. - С. 1198-1200;
77. Островский, М.А. Механизмы повреждающего действия света на фоторецепторы сетчатки глаза / М.А. Островский, И.Б. Федорович // Физиология человека. - 1982. - Т. 8, № 4. - С. 572-577;
78. Островский, М.А. Ретиналь как сенсibilизатор фотоповреждения ретинальсодержащих белков сетчатки глаза / М.А. Островский, И.Б. Федорович // Биофизика. - 1994. - Т. 39, № 1. – С. 13-15;

79. Парфенов, А.С. Анализатор крови реологический АКР-2. Определение реологических свойств крови / А.С. Парфенов, А.В. Пешков, Н.А. Добровольский // Методические рекомендации. М., 1994. - 19 с.;
80. Паршина, Е.Ю. Особенности взаимодействия новых гибридных антиоксидантов - ихфанов с эритроцитарной мембраной: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е.Ю. Паршина. - Москва, 2006. - 21 с.;
81. Писаржевский С.А. Проницаемость эндотелия и атеросклероз // www.Medlinks.ru. Раздел кардиология. – 12.05.2005.,
82. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю. Средство, обладающее гемореологической, антитромбоцитарной и антитромбогенной активностью / Патент № 234756, 2009.
83. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю. «Средство, увеличивающее мозговой кровоток», Патент № 2351321, 2007.
84. Плотников, М.Б. Модификация микроколориметра МКМФ-1 для регистрации агрегации эритроцитов / М.Б. Плотников, О.И. Алиев, Ф.В. Попель // Клиническая лабораторная диагностика. - 1995. - № 3. – С. 457-458;
85. Плотников, М.Б. Смольякова В.И., Иванов И.С. и др. // “Гемореология и микроциркуляция”: Материалы международной конференции. - Ярославль: Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2007. - С.160;
86. Потапов, А.В. Изменения синапсов внутреннего плексиморфного слоя сетчатой оболочки глаза при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света высокой интенсивности / А.В. Потапов, С.В. Логвинов // Морфологические науки практике здравоохранения и ветеринарии. - Омск, 1999. - С. 44-45;
87. Потапов, А.В. Реакция нейронов сетчатки на фотоповреждение / А.В. Потапов // Актуальные проблемы мед. и биол. - Томск, 2004. – вып. 3, № 1-3. - С. 118;

88. Применение антиоксидантов флавоноидного ряда в лечении диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2 типа / М.И. Балаболкин, Л.В. Недосугова, И.А. Рудько и др. // Проблемы эндокринологии. - 2003. - №3. - С. 3-6;

89. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Связанные с возрастом заболевания глаз. SkQ возвращает зрение слепым животным / Л.Т. Архипова, М.М. Архипова, Л.Е. Бакеева и др. // Биохимия. - 2008. - Т. 73, № 12. - С. 1641–1654;

90. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Связанные с возрастом заболевания глаз. SkQ возвращает зрение слепым животным / В.В. Нероев, М.М. Архипова, Л.Е. Бакеев и др. // Биохимия. - 2008. - Т. 73, № 12. - С. 1641–1654;

91. Профилактика и лечение катаракты и дистрофии сетчатки у крыс OXYS митохондриально направленным антиоксидантом SkQ1 / Н.Г. Колосова, А.Ж. Фурсова, Н.А Трофимова, В.П. Скулачёв // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: материалы 5-й национальной конференции. – Смоленск, 2007. – С. 395-397;

92. Роль фактора роста эндотелия сосудов в развитии диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 1–го типа / Н.А. Ермакова, О.Н. Сыроедова, М.Б. Анциферов и др. // Вестник офтальмологии. - 2008. - № 1. - С. 25–28;

93. Румянцева, Ю.В. Снижение экспрессии генов α -кристаллинов в хрусталиках предшествует манифестации окислительного стресса при развитии катаракты у крыс OXYS / Ю.В. Румянцева, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: материалы 5-й национальной конференции. – Смоленск, 2007. – С. 397-399;

94. Салганик, Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей / Р.И. Салганик // Генетика. - 1975. - Т. 18, N 5. - С.63-71;

95. Семенов, А.А. Очерк химии природных соединений / А.А. Семенов. - Новосибирск: Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 2000. – 664 с.;

96. Семченко, В.В. Синаптоархитектоника коры большого мозга (морфометрические аспекты) / В.В. Семченко, Н.Н. Боголепов, С.С. Степанов.- Омск: ИПК "Омич", 1995. - 168 с.;

97. Сердюк, Н.Б. Особенности когнитивных расстройств при парциальной эпилепсии и их медикаментозная коррекция (роль нейропептида АКТГ 4-10 как модулятора регресса когнитивного дефицита): дис. ... канд. мед. наук / Н.Б. Сердюк; ГОУВПО "Пермская государственная медицинская академия". - Пермь, 2006. - 154 с.;

98. Серосодержащий фенольный антиоксидант тио-фан как перспективный лекарственный препарат. / А.Е. Просенко, Е.И. Терах, Н.В. Кандалинцева и др. // Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты: материалы Всероссийской конф.– Новосибирск: Сибвузиздат, 2004. - С. 391-392;

99. Синтез и исследование антиокислительных свойств бис-[?-(3,5-диалкил-4-гидроксифенил)алкил]сульфидов / А.Е. Просенко, Е.И. Терах, Е.А. Горох и др. // Журн. прикл. химии.- 2003. - Т. 76, № 2. - С. 256-260;

100. Синтез и исследование антиокислительных свойств новых серосодержащих производных пространственно-затрудненных фенолов / А.Е. Просенко, Е.И. Терах, Н.В. Кандалинцева и др. // Журнал прикладной химии. – 2001. – № 11(74). – С. 1839-1843;

101. Синтез несимметричных сульфидов на основе ω-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)алканолов и исследование их противоокислительных свойств / П.И. Пинко, Е.И. Терах, Е.А. Горох и др. // Журн. прикл. химии. - 2002.- Т. 75, № 10. - С. 1694-1698;

102. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. - М.: Наука, 1989. - 288 с.;
103. Скуратова, Т.М. Использование препарата диквертин для лечения диабетической ангиопатии / Т.М. Скуратова // Вопросы офтальмоэндокринологии и сосудистой патологии глаз: материалы науч.– практ. конф. офтальмологов и эндокринологов. – Красноярск, 1999. – С.38–39;
104. Смирнова, Н.Б. Прогноз и лечебная тактика на ранних стадиях диабетической ретинопатии: автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Н.Б. Смирнова. - М., 1998. - 29 с.;
105. Современная антиоксидантная терапия диабетической ретинопатии / Л.К. Мошетова, Г.Ш. Аржиматова, И.А. Строков, Г.А. Яровая // Клиническая офтальмология. – 2006. - Т. 7, № 1. - С. 36-38;
106. Сорокин, Е.Л. Оптимизация лечения манифестных форм диабетической ретинопатии / Е.Л. Сорокин // Материалы II Евро–Азиатской конференции по офтальмохирургии. Ч. 1, разд. 1–5. - Екатеринбург, 2001. - С.184–185;
107. Состояние локальной гемодинамики при начальной стадии возрастной макулярной дистрофии / И.Е. Панова, А.Ю. Кинзерский, М.Ю. Прокопьева, Э.Р. Садретдинова // Рефракционная хирургия и офтальмология. - 2007. - № 4. - С. 32-35;
108. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей - основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Ф. Почерняева, С.Г. Стародубцев, Л.Е. Бобырева и др. // Эксперим и клин. фармакол. - 1994. - Т. 57, № 1. - С. 47-54;
109. Сравнение нейропротекторных свойств ретиналамина и эмоксипина / А.А. Древаль, Е.А. Егоров, М.Х. Кадырова и др. // РМЖ.- 2004.- Т. 5, № 3.- С. 108-112.;

110. Структура и функции биологических мембран: учеб. пособие для биол. фак. ун-тов. / П.Г. Богач, М.Д. Курский, Н.Е. Кучеренко, В.К. Рыбальченко. - Киев: Вища школа, 1981. - 335 с.;
111. Структурные изменения пигментного эпителия и нейросенсорных клеток сетчатки глаза при воздействии высоко- и низкоинтенсивного света / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // Материалы V съезда по радиационным исследованиям. - Москва, 2006. – Т. 3. - С. 115;
112. Тиенопиридины в лечении и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Часть I. Тиклопидин / Д.В. Фетцер, Д.В. Преображенский, Т.А. Батыралиев и др. // Кардиология. – 2009. - № 4.;
113. Трофимова, С.В. Эффективность биорегуляторов при лечении диабетической ретинопатии / С.В. Трофимова, В.Х. Хавинсон // Вест. офтальмол. - 2001. - № 3. - С. 35;
114. Факторы риска диабетической ретинопатии / Ю.А. Трахтенберг, Т.М. Миленская, А.С. Ахметов, Т.Ю. Демидова // Сахарный диабет. – 2006. - №3. - С. 19-22;
115. Федин, А.И. Избранные вопросы базисной интенсивной терапии нарушений мозгового кровообращения: Метод.указания / А.И. Федин, С.А. Румянцева. - М.: Интермедика, 2002.;
116. Федин, А.И. Оксидантный стресс и применение антиоксидантов в неврологии / А.И. Федин // Неврология. - 2008. - <http://medinfo.ru/article/22/118336/>.;
117. Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин и др. - Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.;
118. Филипенко, П.С. Влияние ионола на процессы перекисного окисления липидов в печени собак с острым панкреатитом / П.С. Филипенко, М.В. Титоренко, Г.В. Потапов // Современные наукоемкие технологии.- 2004.- № 3.- С. 95;

119. Флюоресцентно-ангиографические критерии фотодинамического повреждения сосудистой системы заднего отрезка глаза в эксперименте / Ю.А. Белый, А.В. Терещенко, П.Л. Володин и др. // Рефракционная хирургия и офтальмология. - 2006. - № 1. - С. 38-40;
120. Функциональная диагностика ретинальной ишемии: 1 – реакция клеток Мюллера на ранних стадиях диабетической ретинопатии / В.В. Нероев, М.В. Зуева, И.В. Цапенко и др. // Вестник офтальмологии. - 2004. - № 6. - С. 11-13;
121. Фурсова, А.Ж. Экспериментальная макулодистрофия и катарактогенез у преждевременно стареющих крыс ОХУС на фоне окислительного стресса / А.Ж.Фурсова, О.Г Гусаревич, Н.Г. Колосова // Тезисы межрегиональной конференции офтальмологов. – Красноярск, 2003. – С. 58-59;
122. Хазанов, В.А. Церебро-протекторные свойства флавоноидсодержащих препаратов растительного происхождения / В.А. Хазанов, Н.Б. Смирнов, Р.Р. Сайфутдинов // Акт. проблемы фармакологии и поиск новых лекарственных препаратов. – Томск, 1999.;
123. Хлуновский, А.Н. Поврежденный мозг: Концепция болезни / А.Н. Хлуновский, А.А. Старченко. - СПб: "Лань", 1999. - 256 с.;
124. Черницкий, Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. - М.: Наука, 1981. - 215 с.;
125. Чукичева, И.Ю. Природные и синтетические терпенофенолы / И.Ю. Чукичева, А.В. Кучин // Рос. хим. журн. – 2004. – Т. 48, № 3. – С. 21-38;
126. Чукичева, И.Ю. Селективное алкилирование фенолов терпеноидами как перспективный путь синтеза новых практически важных соединений / И.Ю. Чукичева, И.В. Федорова, А.В. Кучин // Известия Коми НЦ УрО РАН. - 2010. - № 2.;
127. Щадричев, Ф.Е. Использование анти-VEGF терапии в лечении диабетического макулярного отека / Ф.Е. Щадричев, Е.Б. Шкляров, Н.Н. Григорьева // Офтальмологические ведомости. - 2011. – Т.IV, № 1. - С. 83–92;

128. Экстракт черники в профилактике макулярной дегенерации и катаракты у крыс OXYS / А.Ж. Фурсова, О.Г. Гусаревич, А.М Гончар и др. // Успехи геронтологии. - 2005. - Вып. 16. - С. 76-79;
129. Эллиниди, В.Н. Практическая иммуногистохимия (методические рекомендации) / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникеева, Н.А. Максимова. - СПб., 2002. - 136 с.;
130. Эмануэль, Н.М. Цепные реакции / Н.М. Эмануэль. - М., 1956.;
131. Эмануэль, Н.М. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе / Н. М. Эмануэль, Е.Т. Денисов, З.К. Майзус. - М., 1965.;
132. A new crystal form of human vascular adhesion protein 1 / K. Ernberg, A.P. McGrath, T.S. Peat et al. // Acta Crystallographica F.- 2010.- Vol. 66, part. 12.- P. 1572–1574.
133. A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36 / S. Cho, H.H. Szeto, E. Kim et al. // J. Biol. Chem.- 2007.- Vol. 282, № 7.- P. 4634-4642.;
134. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema / E.T. Jr. Cunningham, A.P. Adamis, A.P. Altaweel et al. // Ophthalmology.- 2005.- Vol. 122., № 10.- P. 1747–1757.;
135. A protein kinase C-beta-selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats / J. Nakamura, K. Kato, Y. Hamada et al. // Diabetes.- 1999.- Vol. 48, № 10.- P. 2090-2095.
136. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat / V. Asnaghi, C. Gerhardinger, T. Hoehn et al. // Diabetes. – 2003. - Vol. 52, № 2. - P. 506-511.;
137. A2E accumulation influences retinal microglial activation and complement regulation / W. Ma , S. Coon , L. Zhao et al. // Neurobiol. Aging.- 2013.- Vol. 34, № 3.- P. 943-960.;

138. A2E Induces IL-1 β Production in Retinal Pigment Epithelial Cells via the NLRP3 Inflammasome / O.A. Anderson, A. Finkelstein, D.T. Shima // PLoS One.- 2013.- Vol. 8, № 6.- Epub ahead of print.;
139. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation / J.R. Sparrow, H.R. Vollmer-Snarr, J. Zhou et al. // J. Biol. Chem.- 2003.- Vol. 278.- P. 18207–18213.;
140. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat / F. Wang, K.G. Rendahl, W.C. Manning et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2003.- Vol. 44, № 2.- P. 781-790.;
141. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization / K. Mori , P. Gehlbach , S. Yamamoto et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43, № 6. P. 1994-2000.;
142. Abu El-Asrar, A.M. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and the protein products of its target genes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes / A.M. Abu El-Asrar, L. Missotten, K. Geboes, // Br. J. Ophthalmol.- 2007.- № 91.- P. 822–826.;
143. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage / A. Klungland, I. Rosewell, S. Hollenbach et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1999.- Vol. 96, № 23.- P. 13300-13305.;
144. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome / S. Ji, G. Kronenberg, M. Balkaya et al. // Exp Neurol.- 2009.- Vol. 216, № 2.- P. 321-328.;
145. Age-dependent photoionization thresholds of melanosomes and lipofuscin isolated from human retinal pigment epithelium cells / L. Hong, J. Garguilo, L. Anzaldi et al. // Photochem. Photobiol.- 2006.- Vol. 82, № 6.- P. 1475-1481.;
146. Age-related macular degeneration and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis / A.B. Fernandez, T.Y. Wong, R. Klein et al. // Ophthalmology.- 2012.- Vol. 119№4. P. 765-770.;

147. Age-related ocular vascular changes / R. Ehrlich, N.S. Kheradiya, D.M. Winston et al. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.- 2009.- Vol. 247, № 5.- P. 583-591.;
148. Aiello, L.P. Diabetic Retinopathy – Over Third of Diabetic Patients Don't Follow Vision Care Guidelines, Health & Medicine Week / L.P. Aiello // Diabetes Care.- 1998.- Vol. 21, № 1.- P. 143–156.;
149. Algvere, P.V. Drusen maculopathy: a risk factor for AMD. Can we prevent visual loss? // P.V. Algvere, S. Seregard // Acta Ophthalmol. Scand.- 2003.- Vol. 81, № 5.- P. 427-429.;
150. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion / G. Chidlow, K.G. Schmidt, J.P. Wood et al. // Neuropharmacology.- 2002.- Vol. 43, № 6.- P. 1015-1025.;
151. Analysis of complement expression in light-induced retinal degeneration: synthesis and deposition of C3 by microglia/macrophages is associated with focal photoreceptor degeneration / Rutar M, Natoli R, Kozulin P. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2011.- Vol. 52, № 8. – P. 5347-5358.;
152. Anderson, J.M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability / J.M. Anderson, C.M. van Itallie // 2005.- Am. J. Physiol.- Vol. 269.- P. 467-475.;
153. Ansar, S. Antioxidant effect of butylated hydroxytoluene on ferric nitrilotriacetate induced renal hyper proliferation and injury in rats / S. Ansar // Food. Chem. Toxicol.- 2013.- Vol. 58.- P. 530-535.;
154. Antioxydant nutrient intake and diabetic retinopathy. The San Luis Valley Diabetes Study / E.J. Mayer-Davis, R.A. Bell, B.A. Reboussin et al. // Ophthalmology. - 1998. - Vol.105.- P. 480-489.;
155. Antonetti, D. A. Diabetic retinopathy / D. A. Antonetti, R. Klein, and T. W. Gardner // N. Engl. J. Med.- 1998.- Vol. 366, № 13.- P. 1227–1239.;
156. Arginase as a mediator of diabetic retinopathy / C. Patel , M. Rojas , S..Priya Narayanan et al. // Front. Immunol.- 2013.- Vol. 4.- P. 173.;

157. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats / H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Tobiume, et al. // *Genes Dev.*- 2002.- Vol. 16.- P. 1345–1355.;
158. Association of retinopathy with a microsatellite at 5' end of the aldose reductase gene in Chinese patients with late-onset Type 2 diabetes / S.C. Lee, Y. Wang, G.T. Ko et al. // *Ophthalmic. Genet.*- 2001.- Vol. 22, № 2.- P. 63–67.;
159. Association of risk factors for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with decreased foveolar choroidal circulation / W. Xu, J.E. Grunwald, T.I. Metelitsina et al. // *Am. J. Ophthalmol.*- 2010.- Vol. 150, № 1. P. 40-47.;
160. Augustin, A.J. Oxidative tissue damage / A.J. Augustin // *Klin. Monbl. Augenheilkd.*- 2010.- Vol. 227, № 2.- P. 90-98.;
161. Autophagy in the Retina: A Potential Role in Age-Related Macular Degeneration / S.K. Mitter, H.V. Rao, X. Qi et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.*- 2012.- Vol. 723.- P. 83–90.;
162. Babizhay, M.A. State of the art clinical efficacy and safety evaluation of N-acetylcarnosine dipeptide ophthalmic prodrug. Principles for the delivery, self-bioactivation, molecular targets and interaction with a highly evolved histidyl-hydrazide structure in the treatment and therapeutic management of a group of sight-threatening eye diseases / M.A. Babizhay, A. Kasus-Jacobi // *Curr. Clin. Pharmacol.*- 2009.- Vol. 4, № 1.- P. 34-37.;
163. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis / N. Rodríguez-Muela, H. Koga, L. García-Ledo, et al. // *Aging Cell.*- 2013.- Vol. 12, № 3.- P. 478-488.;
164. Bandy, B. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? / B. Bandy, A.J. Davison // *Free Radic Biol Med.* - 1990.- Vol. 8, № 6.- P. 523-539.;
165. Barber J. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy / J. Barber, T.W. Gardner, S.F. Abcouwer //

Investigative Ophthalmology and Visual Science. - 2011.- Vol. 52, № 2 .- P. 1156–1163.;

166. Beckman, K.B. Mitochondrial aging: open questions / K.B. Beckman, B.N. Ames // Ann N. Y. Acad. Sci.- 1998.- Vol. 20, № 854.- P. 118-127.;

167. Bek, T. Vascular occlusion in diabetic retinopathy . A qualitative and quantitative histopathological study / T. Bek, T. Ledet // Acta Ophthalmol. Scand. – 1996. – Vol. 74, № 1. – P. 36-40.;

168. Bignami, A. Isolation of GFA protein from normal brain--a comment / A. Bignami, D. Dahl // J. Histochem. Cytochem.- 1979.- Vol. 27, № 2.- P. 693-696.;

169. Bignami, A. The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein / A. Bignami, D. Dahl // Exp Eye Res.- 1979.- Vol. 28, № 1.- P. 63-69.;

170. Bingham, B. Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells / B. Bingham, D. Liu, A. Wood, S. Cho // Brain Res.- 2005.- Vol. 5.- P. 1058-1060.;

171. Biological role of lutein in the light-induced retinal degeneration / M. Sasaki , K. Yuki , T. Kurihara et al. // J. Nutr. Biochem.- 2012.- Vol. 23, № 5.- P. 423-429.;

172. Blagosklonny, M.V. M(o)TOR of aging: MTOR as a universal molecular hypothalamus / M.V. Blagosklonny // Aging (Albany NY).- 2013.- Vol. 5, №7.- P. 490-494.;

173. Blagosklonny, M.V. MTOR-driven quasi-programmed aging as a disposable soma theory: Blind watchmaker vs. intelligent designer / M.V. Blagosklonny // Cell Cycle.- 2013.- Vol. 12, № 12.- P. 1842-1847.;

174. Blue light stress in retinal neuronal (R28) cells is dependent on wavelength range and irradiance / L. Knels, M. Valtink, C. Roehlecke et al. // Eur. J. Neurosci.- 2011.- Vol. 34, № 4.- P. 548-558.;

175. Blue light-induced reactivity of retinal age pigment / M. Rózanowska, J. Jarvis-Evans, W. Korytowski et al. // *J. Biol. Chem.*- 1995.- Vol. 270, № 32.- P. 18825-18830.;
176. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media / M. Rózanowska, J. Wessels, M. Boulton et al. // *Free Radic. Biol. Med.*- 1998.- Vol. 24.- P. 1107–1112.;
177. Bohr, V.A. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging / V.A. Bohr, R.M. Anson // *Mutat. Res.*- 1995.- Vol. 338, № 1-6.- P. 25-34.
178. Borges, J. Effects of repeated photic exposures on the monkey macula / J. Borges, Z.Y. Li, M.O. Tso // *Arch Ophthalmol.*- 1990.- Vol. 108, № 5.- P. 727-733.
179. Boulton, M. Retinal photodamage / M. Boulton, M. Rozanowska, B. Rozanowski // *J. Photochem. Photobiol.*- 2001.- Vol. 64.- P.144–161.;
180. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. / M. Brownlee // *Nature*. – 2001.- Vol. 73.- P. 41-63.;
181. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // *Diabetes*.- 2005.- Vol. 54, № 6, P. 1615-1625.
182. Bucolo, C., Fortified extract of red berry, Ginkgo biloba, and white willow bark in experimental early diabetic retinopathy / C. Bucolo, G. Marrazzo, C.B. Platania et al. // *J. Diabetes Res.*- 2013/- doi: 10.1155/2013/432695. Epub 2013 May 23.
183. Budak, Y., Demirci H, Akdogan M, Yavuz D. Erythrocyte membrane anionic charge in type 2 diabetic patients with retinopathy / Y. Budak, H. Demirci, M. Akdogan, D. Yavuz // *B.M.C. Ophthalmol.* 2004.- Vol. 4.- P. 14.;
184. Budhiraja, S. Protein kinase C beta inhibitors: a new therapeutic target for diabetic nephropathy and vascular complications / S. Budhiraja, J. Singh // *Fundam. Clin. Pharmacol.*- 2008.- Vol. 22, № 3.- P. 231-240.;
185. Cai, X. Oxidative stress: the Achilles' heel of neurodegenerative diseases of the retina / X.Cai, J.F. McGinnis // *Front. Biosci.*- 2012.- Vol. 17.- P. 1976–1995.;

186. Case-control genetic association study of fibulin-6 (FBLN6 or HMCN1) variants in age-related macular degeneration (AMD) / S.A. Fisher, A. Rivera, L.G. Fritsche et al. // Hum. Mutat.- 2007.- Vol. 28, № 4.- P. 406-413.;
187. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta / T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima et al. // Nature.- 2000. - Vol. 3.- P. 98-103.;
188. Cayouette, M. Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations / M. Cayouette, S.B. Smith, S.P. Becerra, C. // Gravel. Neurobiol. Dis.- 1999.- Vol. 6.- P. 523-532.;
189. Cerebral Ischemic Injury through Inhibiting Neuron Apoptosis in Cortex in Rats / P. Zhang, Y. Zhang, J. Zhang et al. // Early Exercise Protects against.- 2013.- Vol. 14, № 3. P. 6074-6089.;
190. Cerebral microembolism during cardiopulmonary bypass: Retinal microvascular studies in vivo with fluorescein angiography / C.I. Blauth, J.V. Arnold, W.E. Schulenberg et al.// J. Thorac.Cardiovasc. Surg.- 1988.- Vol. 5.- P. 668-676.;
191. C-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors / A. Wenzel, C. Grimm, A. Marti et al. // J. Neurosci.- 2000.- Vol. 20, № 1.- P. 81-88.;
192. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study / M. Trieschmann, S. Beatty, J.M. Nolan et al. // Exp. Eye Res.- 2007.- Vol. 84, № 4.- P. 718-728.;
193. Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives / J. Anguiano, T.P. Garner, M. Mahalingam et al. // Nat. Chem. Biol.- 2013.- Vol. 9, № 6.- P. 374-382.;
194. Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy / Abu El-Asrar A.M., Struyf S., Kangave D. et al. // Eur. Cytokine Netw.- 2006/- № 17.- P. 155-165.;

195. Chiba, C. TRP Eretinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration / C. Chiba // *Exp. Eye Res.*- 2013.- doi: 10.1016/j.exer.2013.07.009. Epub ahead of print.;
196. Chiou, G.C.Y. Review: effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment / G.C.Y. Chiou // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*- 2001.- Vol. 17. P. 189–198.
197. Clarke, M. PKC inhibition and diabetic microvascular complications / Clarke, M.// *P.M.Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*- 2007.- Vol. 21, № 4.- P. 573-586.
198. Comparative ultrastructural analysis of mitochondria in the CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells following global ischemia in Mongolian gerbils / L. Radenovic, A. Korenic, G. Maleeva et al. // *Anat. Rec. (Hoboken)*.- 2011.- Vol. 294, №6.- P. 1057-1065.
199. Cortopassi, G.A. Arnheim A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues/ G.A. Cortopassi, D. Shibata, N.W. Soong, N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 1992.- Vol. 89, № 16.- P. 7370-7374.;
200. Couffinhal T., Kearney M., Witzenbichler B. et al. VEGF/VPF in normal and atherosclerotic human arteries // *Amer. J. Pathol.* – 1997. – Vol. 150. – P. 1673-1685.;
201. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program / R.V. Rao, H.M. Ellerby, D.E. Bredesen // *Cell Death. Differ.*- 2004.- Vol. 11.- P. 372–380.;
202. Cruz-Munoz, W. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis / W. Cruz-Munoz, R. Khokha // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*- 2008.- Vol. 45.- P. 291–338.;
203. Crystal structure of the human vascular adhesion protein-1: unique structural features with functional implications / T.T. Airenne, Y. Nymalm, H. Kidron et al. // *Protein Science.*- 2005.- Vol. 14, № 8. P. 1964–1974.;

204. Cyclosporin A-sensitive decrease in the transmembrane potential across the inner membrane of liver mitochondria induced by low concentrations of fatty acids and Ca^{2+} / M.E. Bodrova, I.V. Brailovskaya, G.I. Efron et al. // Biochemistry.- 2003.- Vol. 68, № 4.- P. 391–398.;
205. D'Amico, D.J. Diseases of the retina / D.J. D'Amico // N. Engl. J. Med.- 1994.- Vol. 331, № 2.- P. 95–106.
206. Dahl, D. Astroglial and axonal proteins in isolated brain filaments. I. Isolation of the glial fibrillary acidic protein and of an immunologically active cyanogen bromide peptide from brain filament preparations of bovine white matter / D. Dahl, A. Bignami // Biochim. Biophys. Acta.- 1979.- Vol. 578, № 2. P. 305-316.;
207. Danis, R.P. Preretinal and optic nerve head neovascularization induced by photodynamic venous thrombosis in domestic pigs / R.P. Danis, Y. Yang, S.J. Massicotte, H.C. Boldt // Arch. Ophthalmol.- 1993.- Vol. 111, № 4.- 539-543.;
208. De Koninck, P. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations / P. De Koninck, H. Schulman // Science.- 1998.- Vol. 279.- P. 227–230.
209. Deaminated UV filter 3-hydroxykynurenine O-beta-D-glucoside is found in cataractous human lenses / O.A. Snytnikova, A.Zh. Fursova , E.I. Chernyak // Exp. Eye Res. -2008. - № 86(6).- P.951-956.;
210. De Coster, M.A. Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons / M.A. DeCoster, E. Schabelman, J. Tombran-Tink, N.G. Bazan // J. Neurosci. Res. 1999.- Vol. 56.- P. 604–610.;
211. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation / R.J. Clark, P.M. McDonough, E. Swanson et al. // J. Biol. Chem.- 2000.- Vol. 278.- P. 44230–44237.;

212. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress / S. Uemura, H. Matsushita, W. Li, A.J. Glassford et al. // *Circ Res.*- 2001.- Vol. 88. P. 1291–1298.;
213. Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process / L. Mazzanti, E. Faloia, R.A. Rabini et al. // *Clin. Biochem.*- 1992.- Vol. 25, № 1.- P. 41–46.;
214. Diabetic retinopathy: Neuron protection as a therapeutic target / X. Zhang, N. Wang, G.R. Barile et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*- 2013.- Vol. 45, № 7.- P. 1525-1529.;
215. Differential regulation of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia / Y.J. Shin, J.S. Choi, J.Y. Lee et al. // *Acta Neuropathol.*- 2008.- Vol. 116.- P. 517–527.;
216. Dilman, V.M. Aging, rate of aging and cancer. A search for preventive treatment / V.M. Dilman // *Ann N.Y. Acad.Sci.*- 1994.- Vol. 719.- P. 454-455.
217. Ding, X. Molecular pathology of age-related macular degeneration / X. Ding, M. Patel, C.C. Chan // *Prog. Retin. Eye Res.* - 2009. - Vol. 28. -№ 1. - P. 1-18.;
218. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? / T.H. Margrain, M. Boulton, J. Marshall et al// *Prog. Retin. Eye. Res.*- 2004.- P. 23523–23531.;
219. Dobreanu, M. Influence of natural antioxidants on in vitro lipoprotein oxidation / M. Dobreanu, E. Módy // *Rom. J. Intern. Med.*- 1997.- Vol. 35, № 1-4.- P. 55-62.
220. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration/ J.W. Crabb, M. Miyagi, X. Gu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 2002.- Vol. 99, № 23. P. 14682-14687.;
221. Early changes in gene expression induced by blue light irradiation of A2E-laden retinal pigment epithelial cells / B.W. van der Burght, M. Hansen, J.

Olsen et al. // *Acta Ophthalmol.*- 2013.- doi: 10.1111/aos.12146. Epub ahead of print.;

222. Effects of triflusal and aspirin in a rat model of cerebral ischemia / S.N. Whitehead, N.A. Bayona, G. Cheng et al. // *Stroke.*- 2007.- Vol. 38, № 2.- 3. 381-387.;

223. Egorov, E.A. Antioxidant agents in neuroprotection treatment of glaucoma / E.A. Egorov, A.A. Gvetadze, N.G. Davydova / *Vestn. Oftalmol.*- 2013.- Vol. 129, № 2.- P. 69-70.;

224. Egorov, E.A. The results of research on the antioxidant emoksipin in clinical eye diseases / E.A. Egorov, A.A. Shvedova, I.A. Obraztsova // *Vestn. Oftalmol.*- 1989.- Vol. 105, № 5.- P. 52-55.;

225. Elahi, M.M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease / M.M. Elahi, Y.X. Kong, B.M. Matata // *Ox. Med. and Cell. Long.*- 2009.- Vol. 2, № 5.- P. 259–269.;

226. El-Sayyad, H.I. Analysis of fine structure and biochemical changes of retina during aging of Wistar albino rats / H.I. El-Sayyad, S.A. Khalifa, F.I. El-Sayyad // *Clin. Experiment. Ophthalmol.*- 2013.- doi: 10.1111/ceo.12123. Epub ahead of print.;

227. Evaluation of the antioxidant properties of propofol and its nitrosoderivative. comparison with homologue substituted phenols / M.P. Rigobello, R. Stevanato, F. Momo et al. // *Free Radic. Res.*- 2004.- Vol. 38, № 3.- P. 315-321.;

228. Evans, J.R. Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration / J.R. Evans, J.G. Lawrenson // *Cochrane Database Syst. Rev.*- 2012.- doi: 10.1002/14651858.;

229. Examining the proteins of functional retinal lipofuscin using proteomic analysis as a guide for understanding its origin / S. Warburton, K. Southwick, R.M. Hardman et al. // *Mol. Vis.*- 2005.- Vol. 11.- P. 1122-1134.;

230. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen

species in diabetic retinopathy / Y. Cui, X. Xu, H. Bi et al. // Exp. Eye. Res.- 2006.- Vol. 83.- P. 807–816.;

231. Expression of angiogenic and fibrogenic factors in proliferative vitreoretinal disorders / Abu El-Asrar A.M., Steen P.E., Al-Amro S.A. et al. // Int. Ophthalmol.- 2007.- № 27.- P.11–22.;

232. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat / Y. Otori , S. Shimada , H. Morimura et al. // Surv. Ophthalmol.- 1997.- Vol. 42.- P. 96-104.;

233. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection / Y.T. Chen, X.F. Zang, J. Pan et al. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.- 2012.- Vol. 39, № 9.- P. 751-758.;

234. Ezquer, F. Could donor multipotent mesenchymal stromal cells prevent or delay the onset of diabetic retinopathy? // F. Ezquer, M. Ezquer, M. Arango-Rodriguez, P. Conget // Acta Ophthalmol.- 2013.- doi: 10.1111/aos.12113. Epub ahead of print.;

235. Factor Xa and thrombin stimulate proinflammatory and profibrotic mediator production by retinal pigment epithelial cells: a role in vitreoretinal disorders? / J. Bastiaans, J.C. van Meurs , C. van Holten-Neelen et al. // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – Vol. 251, № 7.- P. 1723-1733.;

236. Ferrara, N. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors / N. Ferrara, K. Alitalo // Nat. Med.- 1999.- Vol. 5, №12.- P. 1359-1364.;

237. Ferrara, N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H.P. Gerber, J. Lecouter // Nat. Med.- 2003.- Vol. 9.- P. 669–676.;

238. Ferris, F.L. Treatment of diabetic retinopathy / F.L. Ferris, M.D. Davis, L.M.Aiello // N. Engl. J. Med.- 1999.- Vol. 341.- P. 667–678.;

239. Fine, S.L. Age-related macular degeneration / S.L. Fine, J.W. Berger, M.G. Maguire, A.C. Ho // N. Engl. J. Med.- 2000.- Vol. 342.- P. 483–492.;

240. Flieler, S.J. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina / S.J. Flieler, R.E. Anderson // *Prog. Lipid. Res.*- 1983.- Vol. 22, P. 79–131.;
241. Gaillard, E.R. Dillon Photophysical studies on human retinal lipofuscin / Gaillard E.R., G. Atherton-Eldred // *J. Photochem. Photobiol.* 1995.- Vol. 61. P. 448–453.;
242. Gale, C.R. Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration / C.R. Gale, N.F. Hall, D.I. Phillips, C.N. Martyn // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2003.- Vol. 44, № 6. P. 2461-2465.
243. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy / M. Beránek, P. Kolar, S. Tschoplova et al. // *Mol Vis.*- 2008.- Vol. 14.- P. 1114–1121.;
244. Gerfen, C.R. Phospholipase C I and II brain isozymes: Immunohistochemical localization in neuronal systems in rat brain / C.R. Gerfen, W.C. Choi, P.G. Sub, S.G. Rhee // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*- 1988.- Vol. 85.- P. 3208-3212.;
245. Gerona, G. Antioxidant N-acetyl-cysteine protects retinal pigmented epithelial cells from long-term hypoxia changes in gene expression / G. Gerona, D. López, M. Palmero, V. Maneu // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2010.- Vol. 26, № 4.-* P. 309-314.;
246. Giebel, S.J., Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier / S.J. Giebel, G. Menicucci, P.G. McGuire, A. Das // *Lab. Invest.*- 2005.- Vol. 85.- P. 597–607.;
247. Girmens, J.F. Therapeutic innovation in AMD and other retinal diseases / J.F. Girmens, S. Picaud, J.A. Sahel // *Rev. Prat.*- 2013.- Vol. 63, № 1.- P. 68-73.;
248. Giugliano, D. Oxidative stress and diabetic vascular complications / D. Giugliano, A. Ceriello, G. Paolisso // *Diabetes Care.*- 1996.- Vol. 19.- P. 257–267.;

249. Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment / P.A. Erickson, S.K. Fisher, C.J. Guerin et al. // *Exp. Eye Res.*- 1987.- Vol. 44.- P. 37–48.;
250. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy / E. Lieth, A.J. Barber, B. Xu et al. // *Diabetes.*- 1998.- Vol. 47.- P. 815–820.;
251. New systematic review methodology for visual impairment and blindness for the 2010 Global Burden of Disease study / R. Bourne, H. Price, H. Taylor et al. // *Ophthalmic Epidemiol.*- 2013.- Vol. 20, № 1.- P. 33-39.;
252. Godínez-Rubí, M. Nitric Oxide Donors as Neuroprotective Agents after an Ischemic Stroke-Related Inflammatory Reaction / M. Godínez-Rubí, A.E. Rojas-Mayorquín, D. Ortuño- Sahagún // *Oxid. Med. Cell Longev.*- 2013.- doi: 2013:297357.;
253. Goyal, S. Meta-analysis and review on the effect of bevacizumab in diabetic macular edema / S. Goyal, M. Lavalley, M.L. Subramanian // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*- 2011.- Vol. 249, № 1.- P. 15–27.;
254. Greco, T. Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress / T. Greco, J. Shafer, G. Fiskum // *Free Rad. Biol. & Med.*- 2011.- Vol. 51.- P. 2164–2171.;
255. Greider, C.W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts / C.W. Greider, E.H. Blackburn // *Cell.*- 1985. – 43.- P. 405-413.;
256. Grimm, C. Hypoxia in the eye: a two-sided coin / Grimm C, Willmann G. // *High. Alt. Med. Biol.*- 2012.- Vol. 13, № 3.- P. 169-175.;
257. Growth factors / F.C. White, A. Bcnehacene, J.S. Schell. et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 14. – P. 199-212.;
258. Guidry, C. Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration / C. Guidry, N.E. Medeiros, C.A. Curcio // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2002.- Vol. 43.- P. 267–273.;

259. Gutowski, M. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance/ M. Gutowski, S. Kowalczyk // *Acta. Biochim. Pol.*- 2013.- Vol. 60, № 1.- P. 1-16
260. Hargrave P. Rhodospin: structure, function and topography / P. Hargrave // *Invest. Ophthalmol.* –. 2001.- Vol. 42. – P. 3–9.;
261. Harman, D. About "Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009" / D. Harman // *Biogerontology*.- 2009.- Vol. 10, № 6.- P. 783.
262. Harman, D. Aging – a theory based on free-radical and radiation-chemistry / D. Harman // *J. Gerontol.*- 1956.- Vol. 11. P. 298–300.;
263. Harman, D. Antioxidant supplements: Effects on disease and aging in the United States population / D. Harman // *J. Am. Aging. Assoc.*- 2000.- Vol. 23, № 1.- P. 25–31.;
264. Hattori, T. Aldose reductase inhibitor fidarestat attenuates leukocyte-endothelial interactions in experimental diabetic rat retina in vivo / T. Hattori, A. Matsubara, K. Taniguchi, Y. Ogura // *Curr. Eye Res.*- 2010.- Vol. 35, № 2.- P. 146-54.;
265. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Exp. Cell. Res.*- 1961.- Vol. 25.- P. 585-621.;
266. Hesperidin prevents retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats / X. Shi, S. Liao, H. Mi et al. // *Molecules*.- 2012.- Vol. 17, № 11.- P. 12868-12881.;
267. High-mobility group box-1 and biomarkers of inflammation in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy / A.M. Abu El-Asrar, M.I. Nawaz, D. Kangave et al. // *Mol. Vis.*- 2011.- № 17.- P. 1829–1838.;
268. Hrabec Intraocular matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy / A.B. Kłysik, J. Naduk-Kik, Z. et al. // *Arch. Med. Sci.*- 2010.- Vol. 6. P. 375–381.;

269. Humphrey, M.F. A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit / M.F. Humphrey, I.J. Constable, Y. Chu, S. // J. Comp. Neurol.- 1993.- Vol. 334.- P. 545–558.;
270. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction / N.A. Neidlinger, S.K. Larkin, A. Bhagat et al. // J. Biol. Chem.- 2006.- 281, № 2.- P. 775–781.;
271. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation / X.L. Du, D. Edelstein, L. Rossetti et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2000.- Vol. 97.- P. 12222–12226.;
272. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells / A. Namiki, E. Brogi, M. Kearney et al. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 31189-31905.
273. Hypoxia/reoxygenation induces CTGF and PAI-1 in cultured human retinal pigment epithelium cells / R. Fuchshofer, A.L. Yu, H.H. Teng et al. // Exp. Eye Res.- 2009.- Vol. 88, № 5.- P. 889-899.;
274. Iatrogenic retinal artery occlusion caused by cosmetic facial filler injections / S.W. Park, S.J. Woo, K.H. Park et al. // Am. J. Ophthalmol.- 2012.- Vol. 154, № 4.- P. 653-662.;
275. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma / L. Wang, G.A. Cioffi, G. Cull et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43.- P. 1088–1094.;
276. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor / W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2001.- Vol. 42.- P. 1646–1652.;
277. Increased adhesion to fibronectin and Mo-1 expression by diabetic monocytes / H. Setiadi, J.L. Wautier, A. Courillon-Mallet et al. // J. Immunol.- 1987.- Vol. 138, № 10.- P. 3230-3234.;

278. Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H₂O₂ exposure / A. Belkhir, C. Richards, M. Whaley et al. // Laboratory Investigation.- 1997.- Vol. 77, № 5.- P. 533–539.
279. Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1 α protein by the oxidative stressor arsenite / M.C.A. Duyndam, T.M. Hulscher, D. Fontijn et al. // J. Biol. Chem.- 2001.- Vol. 276, № 51.- P. 48066–48076.;
280. Inhibition of EGF Signaling Protects the Diabetic Retina from Insulin-Induced Vascular Leakage.- M. Sugimoto, A. Cutler, B. Shen et al. // Am. J. Pathol.- 2013.- doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.017. Epub ahead of print.;
281. Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis / K. Noda, S. Miyahara, T. Nakazawa, et al. // The FASEB Journal.- 2008.- Vol. 22, № 4.- P. 1094–1103.;
282. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate / Adamis A.P., Shima D.T., Tolentino M.J. et al. // Arch. Ophthalmol.- 1996.- № 114.- P. 66–71.;
283. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema / C. Haritoglou, D. Kook, A. Neubauer et al. // Retina.- 2006.- Vol. 26, № 9.- P. 999–1005.;
284. Introduction to diabetes mellitus / K. Kaul, J.M. Tarr, S.I. Ahmad et al. // Adv. Exp. Med. Biol.- 2012.- Vol. 771.- P. 1-11.;
285. Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure / J. Wu, A. Gorman, X. Zhou et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43, №10.- P. 3349-3354.;
286. Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE / J.R. Sparrow, J. Zhou, S. Ben-Shabat et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43.- P. 1222–1227.;
287. Irreversible loss of vision in a paediatric patient due to occipital infarction after cardiopulmonary bypass / V. Datt, S.Virman, I. Malik et al. // Annals of cardiac anaesthesia.- 2012.- Vol. 15, № 1.- P. 88-90.;

288. Jablonski, M.M. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal / M.M. Jablonski, J. Tombran-Tink, D.A. Mrazek, A. Iannaccone // *J. Neurosci.*- 2000.- Vol. 20.- P. 7149–7157.;
289. Jarret, S.G. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration / S.G. Jarret, M.E. Boulton // *Mol. Aspects Med.*- 2012.- Vol. 33. P. 399–417.;
290. Jin, K.L. Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal / K.L. Jin, X.O. Mao, D.A. Greenberg // *J. Molec. Neurosci.*- 2000.- Vol. 14. P. 197–203.;
291. Jung, K.I. Neuroprotective effects of cilostazol on retinal ganglion cell damage in diabetic rats / K.I. Jung, J.H. Kim, H.Y. Park, C.K. Park // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*- 2013.- Vol. 345, № 3.- P. 457-463.;
292. Kadoglou, N.P. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications / N.P. Kadoglou, S.S. Daskalopoulou, D. Perrea, C.D. Liapis // *Angiology.*- 2005.- Vol. 56.- P. 173–189.;
293. Kähäri, V.M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion / V.M. Kähäri, U. Saarialho-Kere // *Ann. Med.*- 1999.- Vol. 31.- P. 34–45.;
294. Kaja, S. Estrogen Protects the Inner Retina from Apoptosis and ischemia-Induced Loss of Vesl-1L/Homer 1c Immunoreactive Synaptic Connections / S. Kaja, S. Yang, J. Wei et al. // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*- 2003.- Vol. 44.-P. 3155-3162.;
295. Kang, D. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer / D. Kang, N. Hamasaki // *Curr. Med. Chem.*- 2005.- Vol. 12, № 4.- 429-441.;
296. Karunadharma, P.P. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration / P.P. Karunadharma, C.L. Nordgaard, T.W. Olsen, D.A. Ferrington // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2010.- Vol. 51, № 11.- P. 5470-5479.;

297. Kenney Cleavage of human corneal type VI collagen alpha 3 chain by matrix metalloproteinase-2 / E. Myint; D.J Brown; A.V. Ljubimov et al. // Cornea.- 1996.- Vol. 15, № 5.- P. 490-496.;
298. Kijlstra, A. Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration / A. Kijlstra, E. La Heij, F. Hendrikse //Ocul. Immunol. Inflamm.- 2005.- Vol. 13, № 1. P. 3-11.;
299. Kijlstra, A. Lutein: more than just a filter for blue light / A. Kijlstra, Y. Tian, E.R. Kelly, T.T.J.M. //Berendschot Prog. Retin. Eye. Res.- 2012.- Vol. 31.- P. 303–315.;
300. Klettner, A. Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells / A. Klettner // Front. Biosci. (Schol Ed).- 2012.- Vol. 4.- P. 392–411.;
301. Kohner, E.M. Screening for diabetic retinopathy in Europe: a field Guide-Book? Copenhagen: who, regional office for Europe / E.M. Kohner, M. Porta // Diabetic Med.-1992.- P.9.- Vol. 16.- P. 20-22.;
302. Kolosova, N.G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 as therapeutic approach for cataract and retinal dystrophy / N.G.. Kolosova, A.J.Fursova, N.A. Trofimova, V.P. Skulachev // «Basic science for medicine»: 3 Intern. Conference. – Novosibirsk, 2007. – P. 33.;
303. Korshunov, S.S. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria / S.S. Korshunov, V.P. Skulachev, A.A. Starkov // FEBS Lett.- 1997.- Vol. 416.- P. 15–18.;
304. Korte, G.E. RPE destruction causes choriocapillary atrophy / G.E. Korte, V. Reppucci, P. Henkind // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1984.- Vol. 25, № 10.- P. 1135-1145.;
305. Koss, M.J. Subthreshold diode laser micropulse photocoagulation versus intravitreal injections of bevacizumab in the treatment of central serous chorioretinopathy / M.J. Koss, I. Beger, F.H. Koch // Eye (Lond).- 2012.- Vol. 26, № 2.- P. 307-314.;
306. Kowluru, R.A. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage /

Kowluru RA, Mohammad G, Santos JM, Zhong Q.// Diabetes.- 2011.- Vol. 60.- P. 3023–3033.;

307. Kowluru, R.A. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats / R.A. Kowluru, S. Odenbach // Diabetes.- 2004.- Vol. 53.- P. 3233–3238.;

308. Kowluru, R.A. Mitochondria Damage in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy and in the Metabolic Memory Associated with its Continued Progression / R.A. Kowluru // Curr. Med. Chem.- 2013.- Epub ahead of print.;

309. Kowluru, R.A. Oxidative stress and the development of diabetic retinopathy: contributory role of matrix metalloproteinase-2 / R.A. Kowluru, M. Kanwar // Free Radic. Biol. Med.- 2009.- Vol. 46. P. 1677–1685.;

310. Kremers, J.J. Retinal damage in macaque after white light exposures lasting ten minutes to twelve hours / J.J. Kremers, D. van Norren // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1989.- Vol. 30, № 6.- P. 1032-1040.;

311. Kritchevsky, S.B, Oxidative stress and ageing: still a hypothesis / S.B. Kritchevsky, M.F. Muldoon // J. Am. Geriatr. Soc.- 1996.- Vol. 44. P. 873-875.;

312. Lack of correlation between the spatial distribution of A2E and lipofuscin fluorescence in the human retinal pigment epithelium / Z. Ablonczy, D. Higbee, D.M. Anderson // Crouch R.K. Invest Ophthalmol. Vis. Sci.- 2013.- № 13. Epub ahead of print.;

313. Li, Q. Diabetes-Induced Dysfunction of the Glutamate Transporter in Retinal Muller Cells / Q. Li, D.G. Puro // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43, № 9.- P. 3109-3116.;

314. Li, Q. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations / Q. Li, E. Zemel, B. Miller, I. Perlman // Exp. Eye. Res.- 2002.- Vol. 74, № 5.- P. 615-625.

315. Li, S.-Y. Hypoxia-Induced Oxidative Stress in Ischemic Retinopathy / S.-Y. Li, Z.J. Fu, A.C.Y. Lo // Oxid. Med.Cell. Longev.- 2012.- Vol. 42.- P. 67-69.

316. Lieth-Alistair, E.S. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short. Term experimental diabetic retinopathy / E.S. Lieth-Alistair, B Barber, C.D. Xu // Diabetes. - 1998. - Vol. 47, № 5. – P. 815-823.;
317. Liew, G. The Role of Genetics in Susceptibility to Diabetic Retinopathy / G. Liew, R. Klein, T.Y. Wong // Int. Ophthalmol. Clin.- 2009.- Vol. 49, № 2.- P. 35–52.;
318. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression / L. Chen, W. Wu, T. Dentchev et al. // Exp. Eye Res.- 2004.- Vol. 79, № 2.- P. 239-247.;
319. Light damage revisited: converging evidence, diverging views? / C. Reme, J. Reinboth, M. Clausen et al. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.- 1996.- Vol. 2342. P. 11.;
320. Lindholm, D. ER stress and neurodegenerative diseases / Lindholm, D., Wootz H, Korhonen L. // Cell Death. Differ.- 2006.- Vol. 13.- P. 385–392.;
321. Localization of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in the human eye / L. Almulki, K. Noda, S. Nakao et al. // Ex. Eye Res.- 2010/- Vol. 90, № 1.- P. 26–32.;
322. Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats / M. Wasowicz, C. Morice, P. Ferrari et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2002.- Vol. 43, № 3. P. 813-820.;
323. Long-Term Effects of Vitamins C and E, β -Carotene, and Zinc on Age-Related Macular Degeneration: AREDS Report No. 35 / E.Y. Chew, T.E. Clemons, E. Agrón et al. // Ophthalmology.- 2013.- doi: 10.1016/j.ophtha.2013.01.021. Epub ahead of print.;
324. Macarez, R. Optical coherence tomography follow-up of a case of solar maculopathy / R. Macarez , M. Vanimschoot , P. Ocamica , J.L. Kovalski // J. Fr. Ophtalmol.- 2007.- Vol. 30, № 3.- P. 276-280.;
325. Macular drusen. Changes in the retinal pigment epithelium and angiographic characteristics as prognostic markers / F.G. Holz, T.J. Wolfensberger, B. Piguet et al. // Ophthalmology.- 1994.- Vol. 91, № 6.- P. 735-740.;

326. Mattson, M.P Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease / M.P Mattson // J. NeuroVir.- 2002.- Vol. 8.- P. 539–550,;
327. McMillan DE. The microcirculation in diabetes. Microcirc Endothelium Lymphatics. 1984 Feb;1(1):3-24;
328. Mechanisms of blood coagulation induced by latex particles and the roles of blood cells / M. Miyamoto, S. Sasakawa, T. Ozawa et al. // Biomaterials.- 1990.- Vol. 11, № 6.- P. 385–388.;
329. Mehdizadeh, M. Refractive error and age-related lipofuscin accumulation-mediated retinal phototoxicity / M. Mehdizadeh, MH. Nowroozzadeh // J. Cataract. Refract. Surg.- 2009.- Vol. 35, № 7.- P. 1321-1322.;
330. Microvascular Structure and Network in the Retina of Patients With Ischemic Stroke / Y.T. Ong, D.A. De Silva, C.Y. Cheung et al. // Stroke.- 2013. Epub ahead of print.;
331. Miks, J. Influence of total reflection on the imaging quality of optical systems: reply to comment / J. Miks, J. Novak, P. Novak // J. Opt. Soc. Am. A.- 2006.- Vol. 23.- P. 148-149.;
332. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration / J. Feher, I. Kovacs, M. Artico et al. // Neurobiol. Aging.- 2006.- Vol. 27, № . P. 983-993.;
333. Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex / I. E. Maranzana, G. Barbero, A.I. Falasca et al. // Antioxid. Redox. Signal.- 2013. Epub ahead of print.;
334. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1: therapeutic approach for cataract and its connection with elevation of crystalline genes expression/ Yu.V Rumyantseva., A.J.Fursova, N.G Kolosova. // Ageing and individual life history : 6th European Congress of Biogerontology. - Netherlands, Noordwijkerhout, 2008. - P.30.;
335. Mizutani, M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy / M. Mizutani, C. Gerhardinger, M. Lorenzi // Diabetes.- 1998.- Vol. 47.- P. 445–449.;

336. Mohammad, G. Diabetic retinopathy and signaling mechanism for activation of matrix metalloproteinase-9 / G. Mohammad, R.A. Kowluru // J. Cell. Physiol.- 2012.- Vol. 227.- P. 1052–1061.;
337. Mohammad, G. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction / G. Mohammad, R.A. Kowluru // Lab. Invest.- 2010.- Vol. 90.- P. 1365–1372.;
338. Mohammad, G. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy / G. Mohammad, R.A. Kowluru // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2011.- Vol. 52.- P. 3832–3841.;
339. Molotchkina, E.M. "ICHFAN" new antioxidant drug for the treatment of Alzheimer's disease / Molotchkina E.M., Ozerova I.B., Burlakova E.B. // Free Radical Biology and Medicine.- 2002.- V.33.- № 2.- P. S229-S230.;
340. Morales, S., Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications / S. Morales, J.A. García-Salcedo, M. Muñoz-Torres // Med. Clin. (Barc).- 2011.- Vol. 136, №7.- P. 298-302.;
341. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase / R. Zoncu, L. Bar-Peled, A. Efeyan et al. // Science.- 2011.- Vol. 4.-P. 678-683.
342. Müller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat / D.A. DiLoreto, M.R. Martzen, C. Del Cerro et al. / Brain Res.- 1995.- Vol. 698.- P. 1–14.;
343. Müller cells in the preconditioned retinal ischemic injury rat / T. Nishiyama, S. Nishikawa, H. Tomita et al. // J. Exp. Med.- 2000.- Vol. 191.- P. 221–232.;
344. Multi-Centre Retinal Stroke Study Group. Differing associations of white matter lesions and lacunar infarction with retinal microvascular signs / G. Liew, M.L. Baker, T.Y. Wong et al. // Int. J. Stroke.- 2012.- doi: 10.1111/j.1747-4949.;

345. Multi-Centre Retinal Stroke Study Group. Retinal microvascular changes and subsequent vascular events after ischemic stroke / D.A. De Silva, J.J. Manzano, E.Y. Liu et al. / *Neurology*.- 2011.- Vol. 77, № 9.- P. 896-903.;
346. Nagase, H. Matrix metalloproteinases / H. Nagase, J.F. Woessner // *J. Biol. Chem.* 1999. – Vol. 274. – P. 21491–21494.;
347. Neroev, V.V. Molecular mechanisms of retinal ischemia / V.V. Neroev, M.V. Zueva, G.R. Kalamkarov // *Vestn. Oftalmol.*- 2010.- Vol. 126, № 3.- P. 59-64.;
348. Nestin, a new marker, expressed in Müller cells following retinal injury / L. Xue, P. Ding, L. Xiao et al. // *Can. J. Neurol. Sci.*- 2010.- Vol. 37, № 5.- P. 643-649.;
349. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes / A.B. El-Remessy, M. El-Shabrawey, Y. Khalifa et al. // *Am. J. Pathol.*- 2006.- Vol. 168, № 1.- P. 235-244.;
350. Neuroprotective effects of lutein in the retina / Y. Ozawa, M. Sasaki, N. Takahashi et al. // *Curr. Pharm. Des.*- 2012.- Vol. 18.- P. 51–56.;
351. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle / J.Y. Kim, H. Zhao, J. Martinez et al. // *Cell.*- 2013.- Vol. 154, № 2.- P. 365-376.;
352. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): Formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell / O.Y. Pletjushkina, K.G. Lyamzaev, O.K. Nepryakhina et al. // *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics.*- 2008.- Vol. 1777.- P. 57.;
353. Nowak, J.Z. Acute central retinal artery occlusion treated with intravenous recombinant tissue plasminogen activator / J.Z. Nowak, H. Amin, K. Robeson, J.L. Schindler // *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.*- 2012.- Vol. 21, № 8.- p. 913-918.;
354. Nowak, J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): a critical appraisal of diet and dietary supplements as therapeutic modalities / J.Z. Nowak // *Mil. Pharm. Med.*- 2012.- Vol. 4.-P. 1–16.;

355. Nowak, J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy / J.Z. Nowak // Pharmacol. Rep.- 2006.- Vol.58, № 3.- P. 353-363.;
356. Nowak, J.Z. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration / J.Z. Nowak // Pharmacol Rep.- 2013.- Vol. 65, № 2.- P. 288-304.;
357. Nowak, J.Z. Role of lipofuscin in pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) / J.Z. Nowak // Mag. Okul.- 2005.- 2.- P. 103–114.
358. Obrosova, I.G. Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy / I.G. Obrosova, P.F. Kador // Curr. Pharm. Biotechnol.- 2011.- Vol. 12, № 3.- P. 373-385.;
359. Obrosova, I.G. Role for poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy / I.G. Obrosova, U.A. Julius // Curr. Vasc. Pharmacol.- 2005.- Vol. 3, № 3.- P. 267-283.;
360. Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes / N.S. Dejneka, S. Wan, O.S. Bond et al. // Mol Vis.- 2008.- Vol. 14.- P. 997–1005.;
361. Okada, M. Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin / M. Okada, M. Matsumura, N. Ogino, Y. Honda // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.- 1990.- Vol. 228.- P. 467–474.;
362. Olas, B. D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets / B. Olas, J. Saluk-Juszczak, B. Wachowicz // Cell Biol. Toxicol.- 2008.- Vol. 24, № 2.- P. 189-199.;
363. Osborne, N.N. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells / N.N. Osborne, F. Block, K.H. Sontag // Vis. Neurosci.- 1991.- Vol. 7.- P. 637–639.;
364. Oshinskie, L.J. Age-related macular degeneration / L.J. Oshinskie // Optom. Clin. — 1996. — Vol. 5. — № 1. — P. 25-23.

365. Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in *Escherichia coli*: a functionally active neurotrophic factor / S.P. Becerra, I. Palmer, A. Kumar et al. // *J Biol Chem.*- 1993.- Vol. 268.- P. 23148–23156.;
366. Oxidative damage and protection of the RPE / J. Cai, K.C. Nelson, M. Wu et al. // *Prog. Retin. Eye Res.*- 2000.- Vol. 19.- P. 205–221.;
367. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians / G. Paolisso, M.R. Tagliamonte, M.R. Rizzo et al. // *J. Am. Geriatr. Soc.*- 1998.- Vol. 46.- P. 833-838;
368. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis / Palade G. // *Science*/- 1975.- Vol. 189.- P. 867.;
369. Park CaMKII regulates pericyte loss in the retina of early diabetic mouse / Y.H. Kim, Y.S. Kim, S.Y. et al. // *Mol.Cells.*- 2011.- Vol. 31. P. 289–293.;
370. Pascolini, D. Global estimates of visual impairment / D. Pascolini, S.P. Mariotti // *Br J Ophthalmol.*- 2012.- Vol. 96, № 5. P. 614-618.;
371. Pathogenic mechanisms in ischemic damage: a computational study / E. Ruppín, E. Ofer, J.A. Reggia et al. // *Comput .Biol. Med.*- 1999.- Vol. 29, № 1.- P. 39-59.;
372. Perevozkina, M.G. The interrelation of chemical structure and inhibiting action of the sterically hindered phenols of ichfan groups / M.G. Perevozkina, N.M. Storozhok, G.A. Nikiforov // *Biomed. Khim.*- 2005.- Vol. 51, №4.- P. 413-423.;
373. Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells / Krishnamoorthy R.R., Crawford M.J., Chaturvedi M.M. et al. // *J. Biol. Chem.*- 1999.- Vol. 274, № 6.- P. 3734-43.
374. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase / P.H. Yu, S. Wright, E.H. Fan et al. // *Biochim. et Biophys. Acta.*- 2003.- Vol. 1647 (1-2). P. 193–199.;
375. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular

degeneration / I.A. Bhutto, D.S. McLeod, T. Hasegawa et al. // Exp. Eye Res.- 2006.- Vol. 82, № 1. – P. 99-110.;

376. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death / T. Araki, T. Taniwaki, S.P. Becerra et al. // J. Neurosci. Res.- 1998.- Vol. 53.- P. 7–15.;

377. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration / M.M. Bilak, A.M. Corse, S.R. Bilak // J. Neuropathol. Exp. Neurol.- 1999.- Vol. 58.- P. 719–728.;

378. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin: neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop / S.P. Becerra, A. Sagasti, P. Spinella, V. Notario // J Biol Chem.- 1995.- Vol. 270.- P. 25992–25999.;

379. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons/ L.J. Houenou, A.P. D’Costa, L. Li, et al. // J. Comp. Neurol.- 1999.- Vol. 412.- P. 506–514.;

380. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death / W. Cao, J. Tombran-Tink, W. Chen et al. // J. Neurosci. Res.- 1999.- Vol. 57.- P.789–800.;

381. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-induced injury through its antioxidative properties / S. Yamagishi, Y. Inagaki, S. Amano et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 2002.- Vol. 296, № 4.- P. 877-882.;

382. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis / D.W. Dawson, O.V. Volpert, P. Gillis et al. // Science.- 1999.- Vol. 285.- P. 245–248.;

383. Polymorphisms in Complement Factor H and Hemicentin-1 genes in a Japanese population with dry-type age-related macular degeneration / N. Fuse, A. Miyazawa, M. Mengkegale et al. // Am. J. Ophthalmol.- 2006.- Vol. 142, № 6.- P. 1074-1076.;

384. Prevention of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons / K. Shimoke, T. Utsumi, S. Kishi, et al. // *Brain Res.*- 2004.- Vol. 1028.- P. 105–111.;
385. Probucol and atorvastatin in combination protect rat brains in MCAO model: upregulating Peroxiredoxin2, Foxo3a and Nrf2 expression / Y. Du, X. Zhang, H. Ji et al. // *Neurosci. Lett.*- 2012.- Vol. 509, № 2.- P. 110-115.;
386. Proliferative diabetic retinopathy and relations among antioxidant activity, oxidative stress, and VEGF in the vitreous body / H. Izuta, N. Matsunaga, M. Shimazawa et al. // *Molecular Vision.*- 2010.- Vol. 16.- P. 130–136.;
387. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial / N.H. White, W. Sun, P.A. Cleary et al. // *Arch Ophthalmol.*- 2008.- Vol. 20, № 12.- P. 1707–1715.;
388. Protection against chronic hypoperfusion-induced retinal neurodegeneration by PARP inhibition via activation of PI-3-kinase Akt pathway and suppression of JNK and p38 MAP kinases / L. Mester, A. Szabo, T. Atlasz et al. // *Neurotox. Res.*- 2009.- Vol. 16, № 1.- P. 68-76.;
389. Protective effect of butylated hydroxytoluene on ferric nitrilotriacetate induced hepatotoxicity and oxidative stress in mice / S. Ansar, H. Tabassum, N. Al Jameil // *Hum. Exp. Toxicol.*- 2013.- Vol. 32, № 5.- P. 513-521.;
390. Pulsinelli, W.A. et al. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat / W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley // *Strok.* – 1979.-Vol.10, №3.-P.267-272.
391. Qin, Z.H. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors induces apoptosis in rat brain / Qin Z.H., Wang Y., Chase T.N. // *Brain Res.*- 1996.- Vol. 725, № 2.- P. 166-176.;
392. Ranchon, I. Systemic administration of phenyl-N-tert-butyl nitrone protects the retina from light damage / I. Ranchon, S. Chen, K. Alvarez, R.E. Anderson // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 2001.- Vol. 42, № 6.- P. 1375-1379.;

393. Randomized trial evaluating short-term effects of intravitreal ranibizumab or triamcinolone acetonide on macular edema after focal/grid laser for diabetic macular edema in eyes also receiving panretinal photocoagulation // Googe J., Brucker A.J., Bressler N.M. et al. // *Retina*.- 2011.- Vol. 31, № 6.- P. 1009–1027.;
394. Raya, J.C. Purification and characterization of a probable light receptor with kinase activity from beet root plasma membranes / J.C. Raya, L.E. González de la Vara // *Planta*.- 2001.- Vol. 213, № 5. P. 802-810.;
395. READ-2 Study Group. Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the mAcula in diabetes (READ-2) study / Q.D. Nguyen, S.M. Shah, A.A. Khwaja et al. // *Ophthalmology*.- 2010.- Vol. 117, № 11.- P. 2146–2151.;
396. Reduced retinal ganglion cell complex thickness in patients with posterior cerebral artery infarction detected using spectral-domain optical coherence tomography / T. Yamashita, A. Miki, Y. Iguchi et al. // *Jpn. J. Ophthalmol.*- 2012.- Vol. 56, № 5.- P. 502-510.;
397. Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and ω -3 fatty acids: the Rotterdam study / L. Ho, R. van Leeuwen, J.C. Witteman et al. // *Arch. Ophthalmol.*- 2011.- Vol. 129, № 6.- P. 758-766.;
398. Resistance to antivascular endothelial growth factor treatment in age-related macular degeneration / P. Tranos, A. Vacalis, S. Asteriadis, S. Koukoura et al. // *Drug. Des. Devel. Ther.*- 2013.- Vol. 7.- P. 485-490.;
399. Resveratrol inhibits neuronal apoptosis and elevated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity in diabetic mouse retina / Y.H. Kim, Y.S. Kim, S.S. Kang et al. // *Diabetes*.- 2010.- Vol. 59.- P. 1825–1835.;
400. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation / S. Kubota, T. Kurihara, M. Ebinuma et al. // *Am. J. Pathol.*- 2010.- Vol. 177, № 4.- P. 1725-1731.;

401. Retinal degenerative diseases--mechanisms and perspectives of treatment / R. Rejdak, M. Szkaradek, M. Czepita et al. // *Klin. Oczna.*- 2012.-Vol. 114, № 4.- P. 301-307.;
402. Retinal phototoxicity: a review of standard methodology for evaluating retinal optical radiation hazards / R.J. Landry, R.G. Bostrom, S.A. Miller et al. // *Health. Phys.*- 2011.- Vol. 100, № 4.- P. 417-434.;
403. Retinal pigment epithelium, age-related macular degeneration and neurotrophic keratouveiti / E. Bianchi, F. Scarinci, G. Ripandelli et al. // *Int. J. Mol. Med.*- 2013.- Vol. 31, №1.- P. 232-242.;
404. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // – *J. Cell Biol.* – 1963. – Vol. 17, № 2. – P. 208-210.;
405. Rheopheresis for age-related macular degeneration: a novel indication for therapeutic apheresis in ophthalmology / R. Klingel, C. Fassbender, J. Pulido et al. // *Ther. Apher.*- 2002.- Vol. 6, № 4.- P. 271-81.;
406. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching / C. Grimm, A. Wenzel, T. Williams et al. // *Invest. Ophthalmol .Vis. Sci.*- 2001/- Vol. 42, № 2.- P. 497-505.;
407. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. Age-Related Eye Disease Study Research Group / T.E. Clemons, R.C. Milton, R. Klein et al. // *Ophthalmology.*- 2005.- Vol. 112, № 4.- P. 533-539.
408. Roberts, J.E: Ocular phototoxicity / J.E. Roberts // *J. Photochem. Photobiol.* - 2001.- Vol. 64.- P. 136–143.;
409. Roh, M.I. Repeated intravitreal injection of bevacizumab for clinically significant diabetic macular edema / M.I. Roh, S.H. Byeon, O.W. Kwon // *Retina.*- 2008.- Vol. 28, №9.- P. 1314–1318.;
410. Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary

pericytes / T. Yokota, R.C. Ma, J.Y. Park et al. // Diabetes.- 2003.- Vol. 52, № 3.- P. 838-845.;

411. Roque, R.S. Müller cell changes precedes vascularization of the pigment epithelium in the dystrophic rat retina / R.S. Roque, R.B. Caldwell // Glia.- 1990.- Vol. 3.- P. 464–475.;

412. Sádecký, E. Immunization against Q-fever of naturally infected dairy cows / E. Sádecký, R. Brezina, J. Kazár, J. Urvölgyi // Acta Virol.- 1975.- Vol. 19, № 6.- P. 486-488.;

413. Salmi, M. A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans / M. Salmi, S. Jalkanen // Science.- 1992.- Vol. 257.- P. 1407–1409.;

414. Salmi, M. Homing of mucosal leukocytes to joints: distinct endothelial ligands in synovium mediate leukocyte-subtype specific adhesion / M. Salmi, P. Rajala, S. Jalkanen // J. Clin. Invest.- 1997.- Vol. 99, № 9.- P. 2165–2172.;

415. Salmi, M. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation / M. Salmi, K. Kalimo, S. Jalkanen // J. Exp. Med.- 1993.- Vol. 178, № 6.- P. 2255–2260.;

416. Salomon, R.G. Discovery of carboxyethylpyrroles (CEPs): critical insights into AMD, autism, cancer, and wound healing from basic research on the chemistry of oxidized phospholipids / R.G. Salomon, L. Hong, J.G. Hollyfield // Chem. Res. Toxicol.- 2011.- Vol. 24.- P. 1803–1816.;

417. Sauer, D., Fagg, G.E. Excitatory aminoacids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders // Excitatory Amino Acid Receptors / P. Krogsgaard Lassen, J.J. Hansen (ed.). - NY: Ellis Horwood. - 1992. - P. 13-34.

418. Savenkov, A.A. Nootropics and antioxidants in the complex therapy of symptomatic posttraumatic epilepsy / A.A. Savenkov, O.L. Badalian, G.N. Avakian // Zh. Nevrol. Psikhiatr.- 2013.- Vol. 113, № 6.- P. 26-34.;

419. Schleicher, E.D. Nerlich Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging /

E.D. Schleicher, E. Wagner, A.G. // J. Clin. Invest.- 1997.- Vol. 99, № 3.- P. 457-468.;

420. Schmidt, A.M. Hyperinsulinemia and vascular dysfunction: the role of nuclear factor-kappaB, yet again / A.M. Schmidt, D.M. Stern // Circ. Res.- 2000.- Vol. 87, № 9.- P. 722-724.

421. Scott, I.U. A phase II randomized clinical trial of intravitreal bevacizumab for diabetic macular edema / I.U. Scott, A.R. Edwards, R.W. Beck, et al. // Ophthalmology.- 2007.- Vol. 114, № 10.- P. 1860–1867.;

422. Segev-Amzaleg, N. Preconditioning to mild oxidative stress mediates astroglial neuroprotection in an IL-10-dependent manner / N. Segev-Amzaleg, D. Trudler, D. Frenkel // Brain Behav. Immun.- 2013.- Vol. 30.- P. 176-185.;

423. Selektiviti of cinaptocomal membrane function to cerebral cortical hipoxia in newborn piglets / B. Razdan, P.J. Marro, O. Tamella et al. // Brain Res. – 1993. – Vol. 600, № 3. – P. 308-314.;

424. Sell, D.R. Aging of Long-Lived Proteins: Extracellular Matrix (Collagens, Elastins, Proteoglycans) and Lens Crystallins / D.R. Sell, V.M. Monnier // Com. Physiol.- 2011.- Vol. 9, № 2.- 235–305.

425. Sergeeva, S. Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism / S. Sergeeva, E. Bagryanskaya, E. Korbolina, N. Colosova // Exp.Gerontol.- 2006.-Vol. 41, № 2.-P. 141-150.;

426. Shen, W. Preretinal neovascularisation induced by photodynamic venous thrombosis in pigmented rat / W. Shen, S. He, S. Han, Z. Ma // Aust. N. Z. J. Ophthalmol.- 1996.- Vol. 24. P. 50-52.;

427. Shpak, N.I. Taufon and emoksipin in the combined treatment of sclerotic macular dystrophies / N.I. Shpak, N.I. Naritsyna, N.V. Konovalova // Oftalmol. Zh.- 1989.- Vol. 8. P. 463-465.;

428. Shvedova, A.A. The action of émoksipin on the basal activity of cyclic nucleotide phosphodiesterase and on the late receptor potential of the

isolated retina / A.A. Shvedova, N.B. Polianskiĭ, G.Kh. Akopian, A.I. Dzhaferov // Biull. Eksp. Biol. Med.- 1989.- Vol. 108, № 9.- P. 289-291.;

429. Sliney, D.H. Risks of occupational exposure to optical radiation / D.H. Sliney // Med. Lav.- 2006.- Vol. 97, № 2.- P. 215-220.;

430. Snow, K.K. Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents? / K.K. Snow, J.M. Seddon // Ophthalmic. Epidemiol.- 1999.- Vol. 6, № 2. P. 125-143.;

431. Sommerburg, O. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes / O. Sommerburg, J.E. Keunen, A.C. Bird, F.J. van Kuijk // Br. J. Ophthalmol.- 1998.- Vol. 82, № 8.- P. 907-910.;

432. Sondell, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system / M. Sondell, G. Lundborg, M. Kanje // J. Neurosci.- 1999.- Vol. 19.- P. 5731- 5740.;

433. Sparrow, J.R. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology / J.R. Sparrow, M. Boulton // Exp. Eye. Res.- 2005.- Vol. 80, № 5, P. 595-606.;

434. Sparrow, J.R. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells / J.R. Sparrow, K. Nakanishi, C.A. Parish // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – Vol. 41, № 7. – P. 1981-1989.;

435. Steele, F.R. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family / F.R. Steele, G.J. Chader, L.V. Johnson, J. Tombran-Tink // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1993.- Vol.- 90.- P. 1526–1530.

436. Stelle, E.C. Jr. Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice / E.C. Jr. Stelle, Q. Guo, S. Namura et al. // Stroke. – 2008.-Vol.39.- P.2099-2104.;

437. Stellmach, V. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor / V.

Stellmach, S.E. Crawford, W. Zhou, N. Bouck // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2001.- Vol. 98.- P. 2593–2597.;

438. Stem, M.S. Neurodegeneration in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications / M.S. Stem, T.W. Gardner // Curr. Med. Chem.- 2013. Epub ahead of print.;

439. Steroids do not prevent photoreceptor degeneration in the light-exposed T4R rhodopsin mutant dog retina irrespective of AP-1 inhibition / D. Gu, W.A. Beltran, S. Pearce-Kelling et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2009.- Vol. 50, № 7.- P. 3482-3494.;

440. Stewart, M.W. The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology / M.W. Stewart // Mayo. Clin. Proc.- 2012.- Vol. 87, № 1.- P. 77–88.;

441. Stoltz, J.E. Main determinants of red blood cell deformability, clinical and pharmacological application / J.E. Stoltz // Clin. Hemorheol. - 1982. - Vol. 2. - P. 163-173.

442. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function / O. Strauss // Physiol Rev.- 2005. – Vol. 85.- P. 845–881.;

443. Structural alterations of the erythrocyte membrane proteins in diabetic retinopathy / I.K. Petropoulos, P.I. Margetis, M.H. Antonelou et al. // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.- 2007.- Vol. 245, № 8.- P. 1179–1188.;

444. Subretinal drusenoid deposits in non-neovascular age-related macular degeneration: morphology, prevalence, topography, and biogenesis model / C.A. Curcio, J.D. Messinger, K.R. Sloan et al. // Retina.- 2013.- Vol. 33, № 2.- 3. 265-276.;

445. Sun, H. The challenge of macular degeneration / H. Sun, J. Nathans // Sci. Am.- 2001.- Vol. 285, № 4.- P. 68-75.;

446. Szarvas, T. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer / T. Szarvas, F. Dorp, S. Ergün, H. Rübber // Nat. Rev. Urol.- 2011.- Vol. 8.- P. 241–254.

447. Taniwaki, T. Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture / T. Taniwaki, S.P. Becerra, G.J. Chader, J.P. Schwartz / *J. Neurochem.*- 1995.- Vol. 64.- P. 2509–2517.;
448. The -106CC genotype of the aldose reductase gene is associated with an increased risk of proliferative diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians with type 2 diabetes / K.G. dos Santos, L.H. Canani, J.L. Gross et al. // *Mol. Genet. Metab.*- 2006.- Vol. 8, № 3.- P. 280-284.
449. The activated form of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 is associated with diabetic vitreous hemorrhage / F.J. Descamps, E. Martens, D. Kangave et al. // *Exp. Eye Res.*- 2006.- Vol. 83.- P. 401–407.;
450. The association of cataract and cataract surgery with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study / Klein R., Klein B.E., Wong T.Y. et al. // *Arch. Ophthalmol.*- 2002.- Vol. 120, № 11.- P. 1551-1558.;
451. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.*- 1993.- Vol. 20, № 14. P. 977–986.;
452. The free radical theory of aging revisited. The cell signaling disruption theory of aging / J. Vina, C. Borras, K. Mohamed et al. // *Antioxid. Redox. Signal.*- 2013. Epub ahead of print.;
453. The genomic response of the retinal pigment epithelium to light damage and retinal detachment / A. Rattner, L. Toulabi, J. Williams et al. // *J. Neurosci.*- 2008.- Vol. 28, № 39.- P. 9880-9889.;
454. The German Aortic Valve Registry (GARY): in-hospital outcome / C.W. Hamm, H. Möllmann, D. Holzhey et al. // *Eur. Heart. J.*- 2013.- Sep 10. Epub ahead of print.;
455. The lower levels of erythrocyte surface electric charge in diabetes mellitus / Baba Y., Kai M., Setoyama S., Otsuji S. et al. // *Clin. Chim. Acta.*- 1978.-Vol. 84, № 1.-P. 2247–2249.;

456. The regulatory role of NF- κ B in autophagy-like cell death after focal cerebral ischemia in mice / W.L. Li, S.P. Yu, D. Chen et al. // *Neuroscience*.- 2013.- Vol. 244.- P. 16-30.;
457. The relationship of atherosclerosis to the 10-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam studies / R. Klein, K.J. Cruickshanks, C.E. Myers et al. // *Ophthalmology*.- 2013.- Vol. 120, № 5.- P. 1012-1019.;
458. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema / P. Mitchell, F. Bandello, U. Schmidt-Erfurth et al. // *Ophthalmology*.- 2011.- Vol. 118, № 4.- P. 615–625.;
459. The role of endoplasmic reticulum stress in the early stage of diabetic retinopathy / B. Li, H.S. Wang, G.G. Li et al. // *Acta. Diabetol.*- 2011.- Vol. 48. P. 103–111.;
460. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy / D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng et al. // *J. Photochem. Photobiol.*- 1997.- Vol. 65, № 3.- P. 422-426.;
461. The susceptibility of the retina to photodamage from visible light / J.J. Hunter, J.I.W. Morgan, W.H. Merigan et al. // *Prog. Retin. Eye Res.*- 2012.- Vol. 31.- P. 28–42.;
462. Transient cortical blindness after heart surgery in a child patient-A case report / Y.D. Shin, S.W. Lim, J.H. Bae et al. // *Korean. J. Anesthesiol.*- 2010.- Vol. 59.- P. 61-64.;
463. Trends in oxidative aging theories / F.L. Muller, M.S. Lustgarten, Y. Jang et al. // *Free Radic. Biol. Med.*- 2007.- Vol. 43, № 4.- P. 477-503.;
464. Tsutsui, H. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling / H. Tsutsui, S. Kinugawa, S. Matsushima // *Cardiovasc. Res.*- 2009.- Vol. 81, № 3.- P. 449–456.;
465. Tsutsumi, Y. Double face of VEGF / Y. Tsutsumi, D.W. Losordo // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – P. 1248-1250.;

466. Unilateral cerebral ischemia inhibits optomotor responses of the ipsilateral eye in mice / J. Xiao, X. Zhou, T. Jiang et al. // J. Integr .Neurosci.- 2012.- Vol. 11, 2. P. 193-200.;
467. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma / H. Tanihara, M. Hangai, S. Sawaguchi et al. // Arch. Ophthalmol.- 1997.- Vol. 115.- P. 752–756.;
468. Van Norren, D. The action spectrum of photochemical damage to the retina: a review of monochromatic threshold data / D. van Norren, T.G. Gorgels // Photochem Photobiol.- 2011.- Vol. 87, № 4.- P. 747-753.;
469. Vascular adhesion protein-1 blockade suppresses choroidal neovascularization / K. Noda, H. She, T. Nakazawa et al. // The FASEB Journal.- 2008.- Vol. 22, № 8.- P. 2928–2935.;
470. Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes / K. Noda, S. Nakao, S. Zandi et al. // Exp. Eye Res.- 2009.- Vol. 89, № 5.- P. 774–781.;
471. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders / L.P. Aiello, R.L. Avery, P.G. Arrigg et al. // N. Engl. J. Med.- 1994.- Vol. 331.- P. 1480–1487.;
472. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model / H. Du, P. Li, Y. Pan et al. // Brain Res.- 2010.- Vol. 1357.- P. 1–8.;
473. VEGF protein associates to neurons in remote regions following cortical infarct / A.M. Stowe, E.J. Plautz, I. Eisner- Janowicz et al. // J. Cereb. Blood. Flow. Metab.- 2007.- Vol. 27.- P. 76–85.;
474. VEGF-A165b Is an Endogenous Neuroprotective Splice Isoform of Vascular Endothelial Growth Factor A in Vivo and in Vitro / Beazley-Long N., Hua J., Jehle T., Hulse R.P. et al. // Am J. Pathol.- 2013. Epub ahead of print.;
475. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rat / Y. Li, F. Zhang, N. Nagai et al. // J. Clin. Invest.- 2008.- Vol. 118.- P. 913–923.;

476. VEGF–D expression in human atherosclerotic lesions / J. Rutanen, P. Leppanen, T.T. Tuomisto et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 59. – P. 971-979.;
477. Villarroel, M. Neurodegeneration: an early event of diabetic retinopathy / M. Villarroel, A. Ciudin, C. Hernandez, R. Simo // *World Journal of Diabetes.* – 2010. – Vol. 1. – P. 57–64.;
478. Visible light and risk of age-related macular degeneration / H.R. Taylor, B. Muñoz, S. West, et al. // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 1990. – Vol. 88. P. 163-173.;
479. Volchegorskiĭ, I.A. Cerebroprotective effect of 3-oxypyridine and succinic acid derivatives in experimental diabetes mellitus / I.A. Volchegorskiĭ, L.M. Rassokhina, I.I. Miroshnichenko // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im S.S. Korsakova.* – 2013. – Vol. 113, № 6. – P. 50-61.;
480. Wang, X. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma / X. Wang, S.S. Tay, Y.K. Ng // *Exp. Brain Res.* 2000. – Vol. 132. – P. 476–484.;
481. West, S. The Long Term Effects of Visible Light on the Eye. / S. West, B. Munoz, F.S. Rosenthal, et al. // *Arch. Ophthalmol.* – 1992. – Vol. 110, № 99. – P. 104.;
482. Why study rod cell death in retinal degenerations and how? / C.E. Remé, C. Grimm, F. Hafezi et al. // *Doc. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 1. – P. 25-29.;
483. Wiktorowska-Owczarek, A. Oxidative damage in age-related macular degeneration (AMD) and antioxidant protection as a therapeutic strategy / A. Wiktorowska-Owczarek, J.Z Nowak // *Pol. J. Environ. Stud.* – 2006. – Vol. 15. – P. 69–72.;
484. Wilkinson-Berka, J.L. Update on the Treatment of Diabetic Retinopathy / J.L. Wilkinson-Berka, A.G. Miller // *Sc.World J.* – 2008. – Vol. 8. – P. 98-120.;

485. Williams, R.A. Retinal injury on pigmented and albino rats exposed to low intensive cyclic light after unique mydriatic influence / R.A. Williams, A.G. Howard, T.P. Williams // *Curr.Eye.Res.* – 1985. – Vol. 4, № 2. – P. 97-102.
486. Wolff, S.P. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing / S.P. Wolff, Z.Y. Jiang, J.V. Hunt // *Free Radic. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 10, № 5. – P. 339-352.
487. Wu, Y.Q., Becerra SP. Proteolytic activity directed toward pigment epithelium-derived factor in vitreous of bovine eyes: implications of proteolytic processing / Y.Q. Wu, S.P. Becerra // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*- 1996.- Vol. 37.- P. 1984–1993.;
488. Yamashiro, K. Suppressive effects of selectin inhibitor SKK-60060 on the leucocyte infiltration during endotoxin induced uveitis / K. Yamashiro, J. Kiryu, A. Tsujikawa // *Invest. Ophthalmol.*- 2003.- Vol. 87, № 4.- P. 476 - 480.;
489. Yang, R. Matrix metalloproteinase-2 expression and apoptogenic activity in retinal pericytes: implications in diabetic retinopathy / R. Yang, H. Liu, I. Williams, B. Chaqour // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*- 2007.- Vol. 1103.- P. 196–201.;
490. YeastHub: a semantic web use case for integrating data in the life sciences domain / K.H. Cheung et al. // *Bioinformatics.*- 2005.- Vol. 21. P. 85-96.
491. Yoshida, T. Molecular mechanism of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration / T. Yoshida // *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.*- 2007.- Vol. 111, № 11.- P. 881-891.;
492. Yu, D.Y. Retinal degeneration and local oxygen metabolism / D.Y. Yu, S.J. Cringle // *Exp. Eye. Res.*- 2005.- Vol. 80.- P. 745–751.;
493. Yuzawa, M. Assessing quality of life in the treatment of patients with age-related macular degeneration: clinical research findings and recommendations for clinical practice / M. Yuzawa, K. Fujita, E. Tanaka, E.C. Wang // *Clin. Ophthalmol.*- 2013.- Vol. 7.- P. 1325-1332.;
494. Zachary, I. Vascular protection: a novel nonangiogenic cardiovascular role for VEGF / I. Zachary, A. Mathur, S. Yla-Herttuala, J. Martin // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 1512-1520.;

495. Zarbin, M.A. Analysis of retinal pigment epithelium integrin expression and adhesion to aged submacular human Bruch's membrane / M.A. Zarbin // Trans. Am. Ophthalmol. Soc.- 2003.- Vol. 101.- P. 499-520.;

496. Zarbin, M.A. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration / M.A. Zarbin // Arch. Ophthalmol.- 2004.- Vol. 122, № 4.- P. 598-614.;

497. Zbidi, H. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties / H. Zbidi, S. Salido, J. Altarejos // Blood Cells Mol. Dis.- 2009.- Vol. 42, № 3.- P. 279-285.

498. Zhang, B. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion / B. Zhang, R. Safa, D. Rusciano, N.N. Osborne // Brain Res.- 2007.- Vol. 1159.- P. 40-53.;

499. Zhuang, P. Effects of flavone on the oxidation-induced injury of retinal pigment epithelium cells / P. Zhuang, Y. Shen, G.C. Chiou // Int. J. Ophthalmol.- 2010.- Vol. 3, № 2.- P. 99-103.;

500. Zwaal, R.F. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells / Zwaal, R.F., Schroit A.J. // Blood.- 1997.- Vol. 89, № 4.- P. 1121-1132.