

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

**Научные консультанты:**

Доктор медицинских наук,  
профессор

Логвинов Сергей Валентинович

Доктор биологических наук, профессор

Плотников Марк Борисович

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая кафедрой морфологии  
и общей патологии

Суходоло Ирина Владимировна

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России  
Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией  
нейробиологии

Солонский Анатолий Владимирович

ФГБУ НИИПЗ СО РАМН  
Доктор медицинских наук, профессор  
кафедры фармакологии

ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России

Зверев Яков Федорович

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_\_<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тр., 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКУТАЛЬНОСТЬ.** 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 тяжелое 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-ди-трет-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 пигментocyтах 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 пигментцитов, 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 глии 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, пигментцитов 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 публикации 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.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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). Световой режим 12 ч – день, 12 ч – ночь, дневная освещенность – 25 лк. Материалом исследования явились хориоретинальные комплексы задней стенки глаз крыс. Взятие материала осуществляли после декапитации под эфирным наркозом. После энуклеации из глазного яблока удаляли роговицу и хрусталик, заднюю стенку глаза помещали в 10% нейтральный формалин для световой микроскопии и в 2,5 % раствор глутаральдегида на какодилатном буфере для электронной микроскопии.

Для выяснения ретинопротекторных свойств диборнола и тиофана были выбраны четыре различные экспериментальные модели дегенерации сетчатки (табл. 1). Для каждой из экспериментальных моделей контрольной группой животных (n=20) служили интактные крысы, которых содержали с экспериментальными животными в идентичных условиях вивария

**1. Моделирование ретинопатии под влиянием высокоинтенсивного белого света.** 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 стрептозотин 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 стрептозотина.



Распределение животных по сериям эксперимента

№	Экспериментальные группы	Количество животных	Сроки взятия материала
<b>1. Моделирование ретинопатии под влиянием высокоинтенсивного белого света</b>			
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
<b>2. Моделирование диабетической ретинопатии (как осложнение экспериментального стрептозотоцинового диабета длительностью 2 месяца)</b>			
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
<b>3. Возрастная хориоретинальная дегенерация с использованием биологической модели (крысы линии OXYS)</b>			
3.1	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес	20	Через 30 суток после начала эксперимента
3.2	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес на фоне коррекции диборнолом	20	Через 30 суток после начала эксперимента
3.3	Группа крыс линии OXYS в возрасте 6 мес на фоне коррекции тиофаном	20	Через 30 суток после начала эксперимента
3.4	Контрольная группа (крысы аутбредной линии Вистар в возрасте 6 мес)	20	Соответственно экспериментальным
<b>4. Моделирование острой ишемической ретинопатии (как осложнение тотальной транзиторной ишемии головного мозга)</b>			
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

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, 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. 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 5 месяцев, которые содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе в течение полутора месяцев. 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 выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом.

**4. Модель тотальной транзиторной ишемии головного мозга по методу W.A. Pulsineli (1979).** Животных первой и второй группы (беспородные крысы-самцы массой 180-200 г, n=40) за сутки до ИГМ наркотизировали этаминаломнатрием в дозе 60 мг/кг массы тела и производили термокоагуляцию обеих позвоночных 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=20) получали 1 мл 1% крахмальной слизи, животные второй (опытной) группы (n=20) – получали внутривенно 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 ложнопериорированные животные (n=20), которых содержали в идентичных с экспериментальными условиями вивария.

Серии экспериментов 4 выполнены совместно с к.м.н. В.И. Смольяковой и к.м.н. И.С. Ивановым (лаборатория фармакологии кровообращения ФГБУ “НИИ фармакологии” СО РАМН).

### **Световая микроскопия**

Для исследования материала с помощью световой микроскопии заднюю стенку глаз течение 1 суток фиксировали в растворе 10 %-ного нейтрального забуференного формалина (рН 7,4-7,6) и заливали в парафин по стандартной методике. Отвесные срезы задней стенки глаз толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином [Ромейс Б., 1954]. 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.

### **Иммуногистохимический анализ**

После приготовления серийных парафиновых срезов толщиной 4-6 мкм, проводили депарафинирование, затем иммуногистохимическое окрашивание. На 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 три-буфере (рН 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 Universal 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.

### **Электронно-микроскопическое исследование**

Для проведения ультраструктурного анализа заднюю стенку глаз в течение 2 часов фиксировали в растворе 2,5% глутаральдегида, приготовленном на основе 0,2 М какодилатного буфера (рН 7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия 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 пигментцитов и сосудов хориоидеи (открытых, а также со сладжем, стазом эритроцитов и тромбозом), количество слоев и численную плотность ядер в наружном ядерном слое в окулярной рамке на площади 1 мм<sup>2</sup> с 5 срезов каждой сетчатки при увеличении 10x100. 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 (гр. ЭПС) и комплекса Гольджи (КГ) в цитоплазме биполярных и ганглионарных нейронов 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 мкм<sup>2</sup>) и высчитывали численную плотность синапсов на 100 мкм<sup>2</sup> 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 ССЕ: электронноплотный материал пресинаптической зоны, синаптической щели и постсинаптической части. 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 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).

#### **Хемилюминесцентный метод**

Свободно-радикальные процессы в гомогенате сетчатки и их антиоксидантную активность определяли методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ). Исследования проводились на хемилюминометре Lumat LB9507 (торговая марка Berthold Technologies), работающем в режиме счета фотонов. Величину ХЛ выражали в относительных единицах света (RLU).

ХЛ 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. ХЛ гомогената сетчатки регистрировали в течение пяти 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 (АОА) гомогената сетчатки определяли методом ингибирования пробой люминолзависимой ХЛ 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. Количественные величины АОА 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 хемилюминометра, t – время экспозиции, и выражали в (RLU/мл)/сек.

#### **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 ( $\eta$ ) оценивали на ротационном вискозиметре АКР-2 в диапазоне скоростей сдвига от 3 до 300  $\text{с}^{-1}$ , плазмы - 300  $\text{с}^{-1}$  [Парфенов А.С. и соавт., 1994].

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

Оценивали эффективность доставки кислорода в ткани (коэффициент Штольца) по величине отношения гематокрита к вязкости крови ( $Ht/\eta$ ) [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].

#### **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. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . 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 [Автандилов Г.Г. и др., 1990].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Изучение структуры хориоретинальных комплексов глаз крыс при ретинопатиях, вызванных тотальным световым воздействием, стрептозотоциновым диабетом, тотальной транзиторной ишемией с реперфузией головного мозга и дегенерации сетчатки крыс линии OXYS с преждевременным старением на светооптическом и ультрамикроскопическом уровнях, позволило заключить, что независимо от вида патологии в сетчатке развиваются деструктивные изменения пигментцитов и нейроглиального комплекса. Тяжесть поражения сетчатки во многом зависит от степени расстройства микроциркуляции, так как она 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, как на уровне сосудов хоиреоидеи и центральной артерии сетчатки, так и на системном уровне, сопутствуют экспериментальной диабетической ретинопатии, острой ишемической ретинопатии и возрастной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS. Морфоколичественный анализ сетчаток глаз крыс перечисленных выше групп выявил достоверное снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов соответственно в 7,9, 6,4 и 2,5 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $36,0 \pm 0,70\%$ ,  $35,99 \pm 3,33\%$  и  $36,0 \pm 0,70\%$  соответственно) и увеличение удельной площади сосудов со стазом и сладжем форменных элементов в 4,7, 7,8 и 16,5 раз по сравнению с показателями у интактных животных ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $1,52 \pm 0,09\%$ ,  $1,52 \pm 0,44\%$  и  $1,52 \pm 0,09\%$  соответственно). Эти результаты коррелируют с данными гемореологических показателей крови, свидетельствующими о сокращении полупериода клеточной агрегации, снижению индекса деформируемости эритроцитов, а также развитию синдрома повышенной вязкости крови у опытных животных ( $p < 0,05$ ). Снижение вязкости крови, зарегистрированное нами при всех видах ретинопатий, на фоне неизменного показателя гематокрита, приводит к снижению индекса Штольца ( $p < 0,05$ ), который является показателем доставки кислорода тканям, что свидетельствует в пользу развития гипоксии. Наибольшие значения данного показателя зафиксированы в группах со стрептозотоциновым диабетом и при ишемии/реперфузии. У крыс OXYS изменения микроциркуляции в хориоидее утяжеляются ее склерозированием в виде пролиферации фибробластоподобных клеток вокруг плазматических капилляров.

Нарушения гемодинамики при всех перечисленных экспериментальных моделях сопровождаются поражением эндотелия. 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 на сосудистой стенке, 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 А.Ж. Фурсовой (2009). Так, к 6-месячному возрасту 31% крыс OXYS имеют дисциформную стадию возрастной хориоретинальной дегенерации, 3% крыс – рубцовую стадию, остальной процент животных – предисциформную стадию с перераспределением пигмента, мягкими экссудативными очагами неправильной формы с нечёткими контурами, единичными петехиальными кровоизлияниями, признаками

атрофии хориокапиллярного слоя и пигментцитов. 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 пиальной 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 у людей с возрастной макулярной дегенерацией. Доказательством их неотъемлемой роли в патогенезе нейродегенерации сетчатки при возрастной макулярной дегенерации служит использование реофереза для лечения пациентов с сухой формой заболевания. Удаление фибриногена, холестерина, фактора фон Виллебранда и альфа-2-макроглобулина из плазмы крови человека 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].

При ишемической ретинопатии также развивается дегенерация части эндотелиальных клеток, что усугубляет гемореологические расстройства и влечет за собой увеличение проницаемости гематоретинального барьера. Это также отмечают в своих исследованиях австралийские ученые из Центра исследования зрения [Liew G. et al., 2012]. 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 ткани сетчатки [Гундорова, Р.А. и соавт., 2008].

Полученные в ходе диссертационного исследования данные морфологических изменений хориоретинального комплекса глаз крыс на фоне стрептозотоцинового диабета, свидетельствуют о нарушении структуры стенок интравитреальных и хориоидальных сосудов. Развивается деформация ядер эндотелиоцитов, вакуолизация цитоплазмы и деструкция митохондрий, отмечается миграция лейкоцитов, макрофагов в околососудистое пространство хориоидеи, а также в субретинальное пространство, что говорит о нарушении структуры гематоретинального барьера и развитии местного воспаления. 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 [Капланская И.Б. и соавт., 2005]. Нами отмечена также деструкция перицитов и связанное с ней аневризматическое расширение части хориоидальных и интаретинальных сосудов.

Тотальное воздействие на животных белым светом интенсивностью 6000 лк в течение 6-ти часов приводит к очаговому поражению сетчатки с практически полным исчезновением в очагах ПЦ, фотосенсорного и наружного ядерного слоя. Удельная площадь очагов поражения сетчатки достигает  $20,8 \pm 1,12\%$ , а удельная площадь слоя ПЦ в срезе сетчатки падает до  $2,09 \pm 0,25\%$  (контроль,  $5,43 \pm 0,10\%$ ;  $p < 0,05$ ). При этом в очагах поражения наблюдается значительное снижение удельной площади открытых функционирующих сосудов хориоидеи в 5 раз (контроль,  $36,00 \pm 0,70\%$ ;  $p < 0,05$ ) и увеличение удельной площади хориоидальных сосудов со стазом, сладжем или тромбозом в 7 раз (контроль,  $1,52 \pm 0,09\%$ ;  $p < 0,05$ ). Анализ гемореологических показателей крови показал, что световое воздействие на крыс не приводит к системным изменениям микроциркуляции, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий между показателями вязкости крови на низких и высоких скоростях сдвига животных, подвергшихся освещению и интактных животных. Вероятно, микроциркуляторные изменения хориоретинального комплекса при фотоповреждении сетчатки, являются вторичными, возникающими после активации свободно-радикального окисления в наружных сегментах нейросенсорных клеток (НК) и ПЦ. Вместе с тем, многие авторы полагают, что механизм избирательной окклюзии сосудов может быть связан с фототоксическим повреждением эндотелиальных клеток сосудов, приводящим 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].

Таким образом, проведенные исследования показали, что изучаемые виды экспериментальных ретинопатий приводят к развитию микрососудистых осложнений сетчатки, что способствует гипоксии. Гипоксия при ДР, возрастной хориоретинальной дегенерации и острой ишемической ретинопатии является одной из причин структурных повреждений ее клеточных структур, а при фотодегенерации сетчатки - усугубляет повреждение. В условиях гипоксии в тандеме взаимодействуют окислительный стресс, нарушение баланса про- и антиангиогенных факторов нарушение транспорта метаболитов и обратного транспорта в ПЦ, эксайтотоксичность, клеточный ацидоз, воспаление, и другие механизмы, способствующие дегенерации структур сетчатки [ Li S.Y. 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 активных форм кислорода (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 исследования в отношении диабетической ретинопатии, фотодегенерации сетчатки, острой ишемической ретинопатии и возрастной макулярной 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 ПЦ при этих видах ретинопатий. В группах с фотодегенерацией сетчатки и острой тотальной транзиторной ишемией значения общей антиоксидантной активности гомогенатов сетчаток значимо выше, чем в двух предыдущих группах, 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].

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 мощной атаке свободными радикалами и при повреждении сами становятся индукторами АФК [Островский М.А., Федорович И.Б., 1994; Плотников М.Б. и соавт., 2007].

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». В последствие было доказано, что манифестация катаракты и возрастной макулярной дегенерации, наряду с другими признаками преждевременного старения, у крыс OXYS наступает до развития дисбаланса в редокс-регуляции, совпадая по времени с ранней инволюцией тимуса и снижением активности Т-клеточного звена иммунной системы [Kolosova N.G. et al., 2006]. Однако показанное нами ухудшение хориоидального кровообращения, вызванное окклюзией сосудов, деструкция эндотелия, вероятно, провоцируют усиление генерации АФК в ходе патологически измененного зрительного цикла. В норме в палочконесущих НК в процессе фотопревращения родопсина транс-ретинол в комплексе с фосфатидилэтаноламином переносится через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента и далее - в ПЦ. Своевременно не выведенный из фоторецепторной мембраны диска ретинол накапливается и через ряд химических реакций превращается в бис-ретинолиден-этаноламин (А2Е) - основной флуорофор липофусциновых гранул – генераторов активных форм кислорода. По данным Z. Ablonczy и соавт. (2013) корреляция между распределением А2Е и липофусцина в ПЦ отсутствует. Настоящее исследование показало, что в цитоплазме пигментных клеток сетчатки преждевременно стареющих крыс OXYS в возрасте 6 месяцев на всем его протяжении располагаются различные по размерам и форме гранулы липидной природы, по структуре напоминающие включения липофусцина. Поражение сетчатки развивается не только в центральной ее части, что характерно для возрастной макулярной дегенерации, но и на периферии.

Окислительный стресс на сегодняшний день является ключевым фактором постишемического и реперфузионного повреждения головного мозга и сетчатки. Развивающиеся при этих состояниях нарушения в дыхательной цепи митохондрий нейронов, активация цитоплазматических оксидаз приводят к выходу из-под контроля генерации АФК, окислительным повреждениям ДНК, РНК, белков и липидов, сверхэкспрессии ряда проапоптотических белков p53, Вах, каспазы-3, запускающих апоптоз нейронов, а также PDCD5 и NF-κB - известных регуляторов апоптоза и аутофагии при ишемической гибели клеток в поврежденных нейронах [Li W.L., 2013].

Таким образом, в сетчатках крыс после светового воздействия, с ДР, возрастной хориоретиальной дегенерацией, острой ишемической ретинопатией на фоне дисбаланса системы редокс-регуляции развивается окислительный стресс, который усугубляет гипоксическое состояние и способствует деструкции всех структурных компонентов хориоретиального комплекса.

Выраженные дегенеративные изменения при всех исследуемых экспериментальных патологиях развиваются в ПЦ. Последние образуют вместе с мембраной Бруха и эндотелием хориокапилляров высоко избирательный наружный гематоретиальный барьер. Недостаточность функции ПЦ является ранним и важным событием на пути, ведущем к развитию нейродегенерации сетчатки [Nowak J.Z., 2005; Sparrow J.R., Boulton M., 2005; Warburton S., et al., 2005; Chiba C., 2013]. 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, вакуолизацией, лизированные клетки с замещением их коллагеновыми волокнами и дегенерацией базального комплекса, а также ПЦ с морфологическими признаками апоптоза.

Значительные изменения пигментных клеток наблюдаются в очагах сетчаток крыс, подвергшихся высокоинтенсивному тотальному световому воздействию, где встречаются участки с полной его деструкцией и нарушением структуры мембраны Бруха. В этих местах зачастую активизируются процессы неоангиогенеза в виде пролиферации и направленной миграции эндотелиоцитов, что является, в том числе, следствием усиления экспрессии VEGF и угнетения - PEDF в эндотелиальных клетках. При этом вне очагов поражения происходит усиление 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 особенно подвержены окислительному стрессу из-за высокой концентрации полиненасыщенных жирных кислот в наружных сегментах НК 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. Характерной особенностью ПЦ сетчатки крыс всех групп является появление остаточных телец с непереваженными остатками органелл и мембран наружных сегментов НК, что свидетельствует о нарушении взаимодействия фагоцитоза и аутофагии в условиях повышенной деградации наружных сегментов НК. Фагоцитоз и деградация наружных сегментов фоторецепторов ПЦ 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. Известно, что нормальный процесс аутофагии энергозависим и нарушается при дефиците энергии АТФ [Kim J.Y. et al., 2013].

Изменение ПЦ крыс OXYS характеризуется распадом 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].

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.

Настоящее исследование показало, что у животных со всеми четырьмя видами ретинопатий развиваются процессы нейродегенерации.

НК наиболее повреждаемы при острой ишемической ретинопатии и фотодегенерации сетчатки, что, вероятно, является следствием острой гипоксии и быстрого лавинообразного нарастания окислительного повреждения сетчатки. В сетчатках этих групп наблюдаются максимальные показатели процентного содержания пикнотично измененных ядер НК ( $3,04 \pm 0,54\%$  и  $2,19 \pm 0,33\%$ ; контроль,  $0,2 \pm 0,02\%$ ). Морфологически обнаруживаются признаки лизиса, выраженная дегенерация наружных сегментов фоторецепторов в виде разрыва и вакуольного перерождения, потери связи с внутренними сегментами, многие из которых изменены по темному типу. Между сохранившимися ядрами НК разрастаются склеральные отростки радиальных глиоцитов, что является отражением адаптационных механизмов. Дегенерация НК ведет к блоку синаптической передачи между нейронами I и II порядка, истончению наружного плексиформного слоя, контакту перикарионов НК и ассоциативных нейронов. Однако сохранившиеся синапсы характеризуются правильностью структурной организации.

Наибольшая степень деструкции ассоциативных нейронов (АН) наблюдается при световом воздействии. Процент пикноморфных гиперхромных АН в очаге поражения сетчатки крыс после светового воздействия по сравнению с таковым у интактных животных увеличивается в 12,4 раза ( $p < 0,05$ ), наряду с чем удельная площадь митохондрий в данных клетках снижается в 4 раза, гранулярной эндоплазматической сети (грЭПС) - в 2 раза, комплекса Гольджи (КГ) - в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $14,67 \pm 1,81\%$ ,  $44,10 \pm 4,63\%$ ,  $1,81 \pm 0,33\%$  соответственно). При всех других видах ретинопатий отмечаются преимущественно реактивные изменения данного вида нейронов. Под влиянием высокоинтенсивного светового воздействия наряду с некротической отмечается активация апоптотических форм гибели АН, о чем свидетельствует увеличение процента p53- и каспаза-9-иммунопозитивных ассоциативных нейронов с нуля до  $1,04 \pm 0,17\%$  и  $0,07 \pm 0,03\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ).

Изменения ганглионарных нейронов (ГН) сетчаток крыс всех исследуемых групп характеризуются различной степени выраженности хроматолизом, а также изменениями по темному типу на фоне снижения удельной площади митохондрий, грЭПС и КГ. Максимальные дегенеративные изменения ГН наблюдаются в группе с ретинопатией, вызванной стрептозотоциновым диабетом длительностью 2 месяца и острой ишемической ретинопатией, что связано с высокой чувствительностью мультиполярных нейронов сетчатки к ишемии [Ezquer F. et al., 2013; Stem M.S., Gardner T.W.,

2013; Jung K.I. et al., 2013; Zhang X. et al., 2013; Neroev V.V. et al., 2010]. В группе с диабетической ретинопатией процент нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом возрастает относительно аналогичных показателей интактной группы в 10 раз ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $3,55 \pm 0,23\%$  и  $0,80 \pm 0,18\%$  соответственно), пикноморфных нейронов – в 4 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $1,53 \pm 0,34$ ). Проведенный иммуногистохимический анализ некоторых маркеров апоптотической гибели клеток выявил пятикратное увеличение р 53- и каспаза-9-иммунопозитивных ГН, что говорит о значимой роли нескольких путей апоптоза в дегенерации мультиполярных нейронов сетчатки при стрептозотоциновом диабете. В группе с ишемией/реперфузией головного мозга гибель ГН сетчатки осуществляется прежде всего за счет хроматолиза, их процентное содержание, по сравнению с группой ложнооперированных животных, возрастает в 10 раз ( $p < 0,05$ ).

В сетчатке крыс OXYS наблюдаются увеличение процента пикнотично измененных НК и пикноморфных АН в 4 и 3 раза соответственно ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $0,4 \pm 0,02\%$  и  $0,60 \pm 0,12\%$  соответственно). Процент пикноморфных ГН увеличивается в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $1,18 \pm 0,15\%$ ), а нейронов с тотальным хроматолизом с нуля возрастает до  $4,00 \pm 0,66\%$  ( $p < 0,05$ ). Иммуногистохимически с помощью используемых в данном исследовании антител не удалось выявить вовлечение нейронов сетчатки в апоптоз. Ультраструктурный анализ органелл в цитоплазме АН и ГН показал достоверное снижение удельной площади митохондрий, грЭПС и КГ относительно аналогичных показателей крыс Вистар. Повреждение митохондрий в цитоплазме нейронов сетчатки крыс линии OXYS имеет ряд особенностей по сравнению с другими группами, а именно, помимо набухания и деструкции крист, отмечается также гомогенизация матрикса, вакуолизация, заполнение мелкогранулярным содержимым или миелиноподобными структурами, что не выявлено нами при трех других патологиях. Большое количество исследований в области старения посвящено именно митохондриальной дисфункции, что вылилось в митохондриальную теорию старения. Так, посмертное исследование выявило усиленное накопление мутаций в митохондриальной ДНК в сетчатке больных ВМД, вызванное усиленной генерацией АФК [Feher J. et al., 2006; Karunadharm R.P. et al., 2010; Bianchi E. et al., 2013]. Полагают, что причиной развития окислительного стресса при старении могут являться как митохондрии – основной источник АФК в клетках, так и цАФК цитоплазматического происхождения. Его следствием становятся необратимые изменения митохондриальной ДНК, структуры мембран митохондрий, которые приводят к дополнительному образованию свободных радикалов, снижению синтеза АТФ. При этом возникает необходимость усиления процессов аутофагии для удаления поврежденных митохондрий, однако при старении они подавлены. Развивающийся в результате дефицит энергии приводит к постепенной деградациии всех клеточных структур сетчатки [Mitter S.K. et al., 2012].

Первоначальная реакция синапсов сетчатки в ответ на изучаемые экспериментальные воздействия проявляется изменениями контактов по

светлому типу с набуханием отростков, дезагрегацией синаптических везикул, отеком митохондрий, что мы наблюдали в сетчатке крыс всех экспериментальных групп. Нарушения синаптоархитектоники проявляются деградацией большого количества синапсов, причем как асимметричных, так и симметричных. Численная плотность симметричных синапсов на  $100 \text{ мкм}^2$  нейропиля в группе с тотальным высокоинтенсивным световым воздействием, ишемией/реперфузией снижается в 2 раза, а у крыс со стрептозотоциновым диабетом и возрастной хориоретинальной дегенерацией – в 3 раза ( $p < 0,05$ ; контроль,  $5,56 \pm 0,31$ ). Асимметричные синапсы во всех группах, кроме группы животных с фотоповреждением сетчатки, поражаются в большей степени, чем симметричные, их число на указанную единицу площади при экспериментальной диабетической ретинопатии сокращается в 4 раза, а при ишемии и у крыс OXYS – в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ; контроль,  $11,14 \pm 0,31$ ). У крыс после светового воздействия численная плотность асимметричных синапсов уменьшается аналогично показателю симметричных контактов. Морфологически во всех группах отмечается снижение интенсивности и неравномерность прокрашивания ПП. Проявлением адаптации сетчатки следует считать появление гипертрофированных контактов с усложнением геометрии синапса, наличием нескольких АЗК в группах с ИГМ и со стрептозотоциновым диабетом. Их численная плотность относительно значений контрольной группы возрастает в 5,6 и 3 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

При изучении хориоретинальных комплексов глаз крыс фотодегенерацией сетчатки, острой ишемической ретинопатией, возрастной хориоретинальной дегенерацией и ДР на уровне световой и электронной микроскопии выявлено 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 развиваются и прогрессивно-пролиферативные изменения: гипертрофия и пролиферация склеральных отростков радиальных глиоцитов, активно фагоцитирующих погибшие НК. В норме глионейрональное взаимодействие обеспечивает аксональную проводимость, надежность синаптической передачи и процессы обработки и передачи информации, что необходимо для нормальной работы мозга и зрительной системы в течение всей жизни. Закономерно, анализ глионейрональных взаимодействий позволяет определить тяжесть поражения сетчатки и прогноз течения заболеваний наследственной, сосудистой, травматической и иной природы [Нероев В.В. и соавт., 2004; Зуева М.В., 2004; Зуева М.В., Цапенко И.В., 2004]. В рамках диссертационного исследования установлено, что при всех видах ретинопатий значимых изменений глионейронального индекса

(ГНИ) по отношению к аналогичному показателю группы интактного контроля не наблюдалось, что следует рассматривать, вероятно, как отражение прогрессивно-пролиферативных возможностей сохранившихся клеток Мюллера на фоне дегенерации нейронов II порядка.

Кульминацией гипоксического состояния сетчатки традиционно является 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 [Ferrara N. et al., 2002; Fine S.L. et al., 2000; Aiello L.P. et al., 2000; Adamis A.P. et al., 1996; 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) может существовать в изоформах VEGF-A165a, VEGF-A165b. Под действием VEGF-A165a происходит разрушение базальной мембраны и миграция клеток эндотелия, а также экспрессия интегринов на поверхности клеток, пролиферация эндотелия с повышением его жизнеспособности [Ferrara N, Alitalo K., 1999; Julien S. et al., 2008]. Сверхэкспрессия VEGF в клетках фоторецепторов и пигментоцитов 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. Было 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., Vecerra 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 пигментоциты, цитоплазма эндотелиоцитов интратретинальных и хориоидальных сосудов, наружный и внутренний ядерные слои сетчатки, а также цитоплазма ГН. PEDF выявляется во всех перечисленных выше структурах сетчатки и перикарионах АН, 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 ГН. 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 ГН в 2 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $13,43 \pm 0,45\%$ ). Аналогично возрастает процент интравитреальных и хориоидальных срезов сосудов, эндотелиоциты которых иммунопозитивны к VEGF и могут стать отправной точкой активации неоангиогенеза до  $31,70 \pm 2,80\%$  и  $2,77 \pm 2,80\%$  ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $15,45 \pm 1,32\%$  и  $0,84 \pm 0,52\%$ ). Однако случаи неоангиогенеза в сетчатке крыс OXYS были единичные, что является доказательством развития у крыс OXYS в этом возрастном периоде сухой формы хориоретинальной дегенерации. Это объясняет, вероятно, высокий уровень экспрессии PEDF в сетчатках крыс OXYS. Как показали наши совместные с А.М. Марковцом исследования [Markovets A.M., 2011], содержание белка VEGF в сетчатке крыс OXYS было одинаковым с таковым у крыс Вистар в возрасте 20 дней, снижалось к 3 мес., а затем росло и достигало 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 показал дисбаланс про- и антиангиогенных факторов VEGF и PEDF в интравитреальных сосудах. В хориоидальных сосудах активации процессов неоангиогенеза по данным иммуногистохимического анализа не наблюдается. Так же, как и у крыс линии OXYS, в сетчатках крыс со стрептозотоциновым диабетом длительностью 2 месяца отмечается повышение процента АН и ГН, иммунопозитивных к VEGF в 3 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $0\%$  и  $3,28 \pm 0,74\%$  соответственно), а также снижение аналогичных видов нейронов, иммунопозитивных к PEDF в 2 раза ( $p < 0,05$ ; интактный контроль:  $36,33 \pm 1,90\%$  и  $37,35 \pm 1,80\%$  соответственно), что может быть связано с гипоксией сетчатки и дегенерацией ПЦ. Исследование экспрессии ростовых факторов VEGF и PEDF в клетках сетчатки белых беспородных крыс показало, что у интактных животных наблюдается преобладание PEDF-положительных структур. Иммунопозитивными к ростовым факторам в сетчатках крыс всех групп являются эндотелий интравитреальных сосудов, АН, ГН, радиальные глиоциты. Световое воздействие вызывает активацию VEGF и угнетение активности PEDF в эндотелиоцитах сосудов, что, вероятно, связано с дегенерацией ПЦ. Так, в срезе сетчатки количество сечений сосудов, в стенке которых обнаруживаются VEGF-иммунопозитивные эндотелиальные клетки, возрастает на 54% относительно интактного контроля ( $p < 0,05$ ;  $4,25 \pm 0,66\%$ ). Это происходит на фоне снижения процентного содержания сечений сосудов с PEDF-положительными эндотелиоцитами в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ;  $8,32 \pm 0,80\%$ ), что

может свидетельствовать в пользу активации неангиогенеза, начальные признаки которой мы наблюдали в очагах поражения на месте субретинального слоя сетчатки крыс, подвергшихся тотальному высокоинтенсивному световому воздействию.

И все же полученные данные неоднозначны, т.к. при повышении экспрессии проангиогенного фактора VEGF при всех изучаемых патологиях не 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. VEGF 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 овариум, матка и кожа (рост волос). Однако экспрессия VEGF реиндуцируется во время патологического ангиогенеза при ишемии миокарда, сетчатки, воспалении, прогрессировании атеросклеротических бляшек и опухолях. 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 степени экспрессии других цитокинов в ответ на патологический процесс [Tsutsumi Y., Losordo D.W., 2005; Zachary I., Mathur A. et al., 2000]. Повышенная экспрессия VEGF-A в структурах сетчатки, зарегистрированная в настоящем исследовании, по-видимому, во-первых, является своеобразной защитой сетчатки на фоне ишемии, во-вторых, сбалансирована антиангиогенным фактором PEDF, что до определенных пор не дает толчок к развитию процессов патологической неоваскуляризации.

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. Так, 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, т.к. 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 [Варакута Е.Ю., 2008].

Для лечения ДР и возрастной хориоретинальной дегенерации была избрана тактика ограничения развития нейродегенерации. Скрининговые исследования показали, что у экспериментальных животных спустя месяц развития стрептозотоцинового диабета изменения сетчатки минимальны и касаются лишь нарушений микроциркуляции, у крыс ОХYS наблюдается лавинообразное вовлечение в патологический процесс всех структур сетчатки в период между 3 и 5 месяцами жизни. Поэтому для серии животных с ДР 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 ОХYS – первое введение препарата начинали в возрасте 4,5 месяцев и заканчивали в возрасте 6 мес, когда по нашим данным и данным А.Ж. Фурсовой (2009) 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 исследований, утверждающих, что спустя 1 час после реперфузии в сетчатке регистрируется повышение мРНК C-FOS и c-jun, при этом изменения нейронов обнаруживаются только спустя 7 дней после реперфузии [Otori Y. et al., 1997].

Избранные варианты лечения оправдали себя, причем выявлены определенные закономерности влияния диборнола и тиофана на патоморфогенез сетчатки при всех видах экспериментальных ретинопатий в рамках исследования. Главным отличием, определяющим эффективность проводимой терапии изучаемыми препаратами, является влияние их на систему микроциркуляции. Введение диборнола животным со стрептозотоциновым диабетом, острой транзиторной ишемией головного мозга и возрастной хориоретинальной дегенерацией улучшает реологические свойства крови, снижая вязкость крови, улучшая деформируемость эритроцитов, что на фоне постоянства показателя гематокрита свидетельствует об улучшении эффективности доставки кислорода тканям и характеризует диборнол как эффективный антигипоксикант. На морфологическом уровне во всех перечисленных экспериментальных группах удельная площадь сосудов со стазом, сладжем или тромбозом снижается. У животных с диабетом этот показатель составляет  $2,6 \pm 0,1\%$  ( $p < 0,05$ ; без коррекции:  $7,81 \pm 0,97\%$ ); с ишемией головного мозга –  $7,51 \pm 0,92\%$  ( $p < 0,05$ ; без коррекции:  $9,66 \pm 1,24\%$ ); у крыс линии ОХYS –  $5,0 \pm 1,15\%$  ( $p < 0,05$ ; без коррекции:  $17,29 \pm 2,08\%$ ). При тотальном высокоинтенсивном световом воздействии системные гемореологические сдвиги незначительны, однако на уровне хориоретинального комплекса применение диборнола способствует ограничению тромбообразования в микрососудах. Удельная площадь сосудов

со стазом, сладжем или тромбозом с учетом очагов поражения сокращается в 6 раз ( $p < 0,05$ ). Диборнол препятствует развитию очаговых изменений сетчатки при световом воздействии. В связи с чем, косвенно можно судить о высокой биодоступности диборнола для нервной ткани сетчатки. Введение же тиофана не приводит к улучшению реологических свойств крови экспериментальных животных. У животных всех групп, получавших тиофан, вязкость крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига, показатели агрегации и деформируемости эритроцитов не отличаются 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 зарегистрировано наличие антирадикальной и антиоксидантной активностей диборнола и тиофана. Применение препаратов приводит к ограничению радикалообразования в гомогенатах сетчаток всех экспериментальных групп и способствует повышению способности нервной ткани сетчатки противостоять разрушительному влиянию гидроперекисей. Это нашло свое отражение на светооптическом и ультрамикроскопическом уровнях: ограничение дегенерации ПЦ с активацией их фагоцитарной активности, повышение адаптации НК, АН, ГН 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 ( $p < 0,05$ ). В очагах поражения сетчатки глаз крыс групп с коррекцией тиофаном деструктивные изменения сопоставимы с группой без лечения. Вне очагов 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. Относительное количество ГН с очаговым хроматоллизом составляет  $24,34 \pm 2,58\%$  ( $p < 0,05$ ; без коррекции:  $37,02 \pm 5,79$ ), с тотальным хроматоллизом -  $3,48 \pm 0,41\%$  ( $p < 0,05$ ; без коррекции  $8,5 \pm 1,22\%$ ), что выше значений исследуемых показателей в группе интактного контроля в 6,9 раза и 4,4 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Тиофан оказывает аналогичное диборнолу влияние на хроматолитические процессы в ГН, однако процент пикноморфных мультиполярных нейронов остается выше, чем в группе с диборнолом в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ). Этот факт, возможно, объясняется значительной дегенерацией митохондрий в цитоплазме изучаемого вида нейронов сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом на фоне коррекции тиофаном, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий

между значениями показателя удельной площади митохондрий в цитоплазме ГН сетчатки крыс с коррекцией тиофаном и животных без коррекции. Вместе с тем, показатели удельной площади гранулярной ЭПС и КГ в цитоплазме ГН сетчатки крыс обеих групп с коррекцией достоверно выше аналогичных показателей опытной группы и не отличаются от значений интактного контроля. Сохранность митохондрий в цитоплазме АН и ГН сетчатки крыс со стрептозотоциновым диабетом выше на фоне применения диборнола. При коррекции обоими антиоксидантами имеет место ограничение р53-зависимого апоптоза в виде значимого снижения процента р53- и увеличения bcl-2-иммунореактивных ганглионарных нейронов ( $p < 0,05$ ). Диборнол и тиофан проявляют одинаковое по эффективности защитное действие в отношении синаптических контактов внутреннего ядерного слоя с длиной АЗК от 200 до 500 мкм ( $p < 0,05$ ). В 2,5 раза увеличивается численная плотность симметричных синапсов ( $p < 0,05$ ), в 1,5 раза – асимметричных ( $p < 0,05$ ).

При возрастной хориоретинальной дегенерации у крыс ОХУС применение диборнола препятствует развитию деструктивных изменений НК: процент пикноза, численная плотность и количество рядов ядер НК не отличаются от значений крыс Вистар. Прием тиофана также приводит к высокой сохранности НК: число пикнотичных ядер в этой группе выше аналогичной группы с коррекцией диборнолом в 2 раза ( $p < 0,05$ ), а количество рядов ядер снижается до  $8,76 \pm 0,28$  ( $p < 0,05$ ; диборнол:  $10,22 \pm 0,43$ ). Диборнол на светооптическом уровне ограничивает развитие деструктивных изменений ГН по темному типу и хроматолитических изменений, однако ультрамикроскопически удельная площадь грЭПС остается на уровне  $25,71 \pm 1,67\%$ , что в 1,8 раз ниже значений данного показателя в группе Вистар ( $p < 0,05$ ; Вистар:  $45,79 \pm 2,36\%$ ; ОХУС:  $17,99 \pm 2,89\%$ ). Удельная площадь митохондрий и КГ не отличается от значений интактного контроля. Тиофан способствует ограничению темного типа деструкции ГН, что, вероятно, происходит вследствие высокой сохранности митохондрий. Однако процент нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом на фоне сниженного показателя удельной площади грЭПС в этой группе 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. Так, общая численная плотность синапсов в группах с коррекцией выше относительно аналогичного показателя опытной группы в среднем на 77%, однако этот показатель остается значимо ниже значений интактного контроля ( $p < 0,05$ ). 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 ( $p < 0,05$ ), что способствует улучшению нейрональных взаимодействий в сетчатке и, в некоторой степени, препятствует их гибели.

Отсутствие у тиофана выраженных гемореологических свойств, показанное нами на моделях стрептозотоцинового диабета, возрастной хориоретинальной дегенерации крыс линии ОХУС, 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. Морфологическая картина изменений структур наружного гематоретинального барьера крыс, получавших диборнол, также имеет ряд значительных отличий от таковой в группе сравнения: четко выражена ламинарная структура базального комплекса и развит фибриллярный компонент. 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, о чем говорит достоверно более низкий (в 4,5 раза относительно значений группы без коррекции,  $p < 0,05$ ) процент пикнотично измененных ядер и более высокая (на 21% выше, чем в группе без коррекции,  $p < 0,05$ ) численная плотность ядер НК, которая значимо не отличается от значений ложнопериоперированных крыс. Применение диборнола полностью ограничивает дегенерацию мюллеровских глиоцитов, АН. 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 ( $p < 0,05$ ), что, вероятно, является следствием высокой сохранности органелл в цитоплазме ГН ( $p < 0,05$ ). Препарат оказывает выраженные синаптопротекторные свойства: общая численная плотность синапсов группы с коррекцией в 2 раза выше аналогичного показателя группы без лечения ( $p < 0,05$ ). Защитное влияние диборнола выявлено по отношению и к симметричным, и к асимметричным синапсам.

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 тиофана с учетом литературных данных (рис. 1). 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 хоиреодее. 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 хориоидеей 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, диапедезу 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 моноклеарных 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 дегградации митохондрий, выраженных макрофагальных реакций.

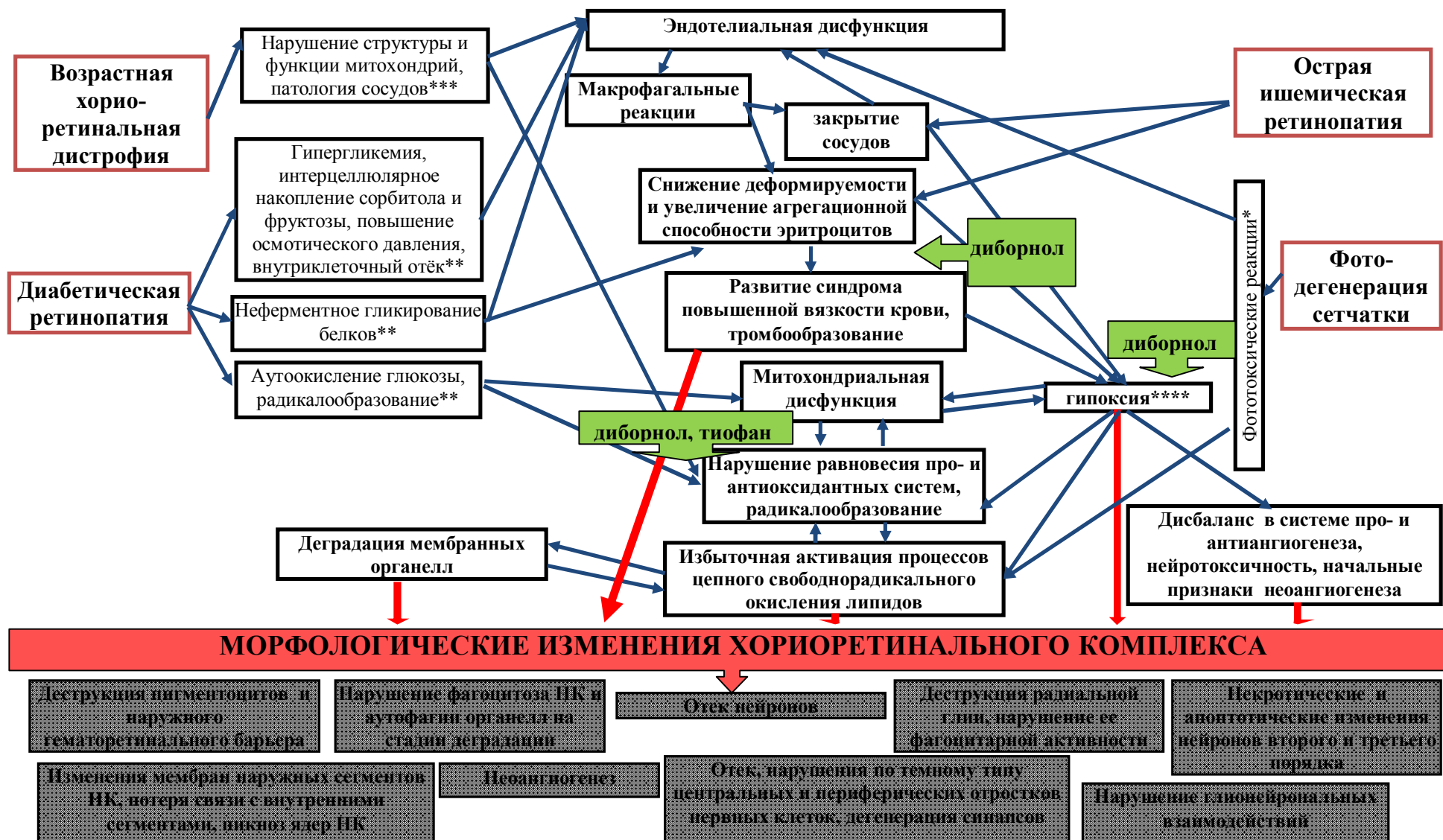
Тотальная транзиторная ишемия вызывает синдром повышенной вязкости крови, что отражается на микроциркуляторном русле хориоидеи, часть сосудов которой переходит в закрытое неактивное состояние и кровоток по ним прекращается, а в части сосудов наблюдается стаз, сладж и явления тромбоза либо отсутствие 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, АН, ГН, 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.





**Рис. 123.** Общая схема патоморфогенеза сетчатки при изучаемых экспериментальных воздействиях на фоне коррекции диборнолом и тиофаном. Примечание: \* - Барышников А.Ю. и соавт., 2004; Белый Ю.А. и соавт., 2006; \*\* - Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000; Bek T., Ledet T., 1996; Augustin A.J., 2010; \*\*\* - Sergeeva S. et al., 2006; Kolosova N.G. et al., 2006; \*\*\*\* - Li S.Y. et al., 2012; Rejda R. et al., 2012.

## 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, пигментцитов 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, пигментцитов, дегенерацией части нейросенсорных клеток, ганглионарных нейронов, синаптических контактов, а также реактивными изменениями большинства ассоциативных нейронов. Высокий процент р-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, пигментцитов, 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 пигментцитов, 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.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Влияние асковертина на структурные изменения ганглионарных нейронов сетчатки глаз крыс при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета [Текст] / Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов и др. // **Морфология.** - 2006. – Т. 129, № 4. – С. 29-30.

2. Изменения сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света [Текст] / С.В. Логвинов, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.** - 2006. – Т. 129, № 4. – С. 76.

3. Влияние асковертина на изменения синаптоархитектоники сетчатки глаза крыс с аллоксановым диабетом при высокоинтенсивном световом воздействии [Текст] / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.** - 2006. – Т. 130, № 5. – С. 59.

4. Изменения синапсов сетчатки при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и постоянного низкоинтенсивного света [Текст] / А.В. Потапов, С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.** - 2006. – Т. 130, № 5. – С. 72.

5. Морфологические изменения пигментного эпителия и нейросенсорных клеток сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при ярком

освещении и их коррекция каровертином [Текст] / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / ИЗПЦ «Информкнига» – Москва, 2006. - С. 165-168.

6. Реакция гематоретинального барьера на длительное фотоповреждение [Текст] / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / ИЗПЦ «Информкнига» – Москва, 2006. - С. 252-255.

7. Ретинопротекторные эффекты асковертина при световом воздействии в условиях гипергликемии [Текст] / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2007.-N 1.-С.39-44.

8. Реакция гематоретинального барьера на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и яркого света [Текст] / А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута, С. В. Логвинов, А.А. Жданкина и др. // **Бюллетень сибирской медицины.** - 2007. - № 2. - С. 42-46.

9. Влияние каровертина на реакцию пигментного эпителия и радиальной глии сетчатки при воздействии яркого света [Текст] / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2007.- Т. 144, № 7.- С. 112-114.

10. Морфологические изменения ассоциативных нейронов сетчатки при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета и их коррекция асковертином [Текст] / Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов и др. // Материалы VII Международной научно-практической конференции "Здоровье и образование в XXI веке" - Москва, 2007. - С. 99.

11. Структурные изменения компонентов гематоретинального барьера сетчатки крыс при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета и их коррекция асковертином [Текст] / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2007.- Т. 144, № 12.- С. 703-706.

12. Ультраструктурные изменения синапсов сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при длительном низкоинтенсивном освещении, коррекция каровертином [Текст] / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А.А. Жданкина и др. // Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / Изд-во ИКАР. – Москва, 2007. - С. 364-368.

13. Изменения синаптоархитектоники сетчатки при фотоповреждении и их коррекция антиоксидантами растительного происхождения [Текст] / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов // **Морфология.** - 2008 - Т. 133, № 1. - С. 48-50.

14. Закономерности фотодегенерации и адаптации сетчатки глаз в условиях гипергликемии и коррекции антиоксидантами [Текст] / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов, А.А. Жданкина // **Морфология.**- 2008.- Т. 133, № 2.- С. 78.

15. Морфологические изменения сетчатки глаза при воздействии лазерным излучением пороговой интенсивности и их коррекция синтетическим дипептидом ав-17 [Текст] / С.В. Логвинов, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута, Е.Ю. Аникина, Е.П. Михуля, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.**- 2008.- Т. 133, № 2.- С. 78.

16. Общие закономерности поражения сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света [Текст] / А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, и др. // **Морфология.** - 2008. - Т. 133, № 3. - С. 92.

17. Клинико-морфологические особенности хориоретинальной дегенерации у крыс линии OXYS [Текст] / А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова и С.В. Логвинов // **Морфология.** - 2008. - Т. 134, № 5. - С. 69.

18. Клинико-морфологические особенности хориоретинальной дегенерации у преждевременно стареющих крыс линии OXYS [Текст] / А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, С.В. Логвинов, Н.Г. Колосова // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.**- 2008.- Т. 146., № 10.- С. 435-438.

19. OXYS rat as animal model of age-related macular degeneration: potential for pathogenesis approach and elevation of treatment [Текст] / А.М. Марковец, А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова // J Nutrition, Health & Aging. - 2009. - Vol 13, Suppl 1. - 2009. P. 557. (World Congress of Gerontology and Geriatrics, taking place from July 5-9, 2009, in Paris, Франция).

20. Возрастные изменения экспрессии генов VEGF и PEDF и развитие клинико-морфологических проявлений хориоретинальной дегенерации у крыс OXYS [Текст] / А.М. Марковец, А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова // Сборник научных трудов Российского офтальмологического форума. - М. - 2009. - Т. 2. - С. 184-188.

21. Морфологические аспекты применения полусинтетического антиоксиданта диборнола при инволюционной центральной хориоретинальной дегенерации у крыс линии OXYS [Текст] / А.А. Жданкина, М.Б. Плотников, В.И. Смольякова и др. // **Бюллетень сибирской медицины.**- 2009.- Т. 8, № 3.- С. 27-32.

22. Морфологические особенности хориоретинальной дегенерации преждевременно стареющих крыс линии OXYS под влиянием 4-метил-2,6-диизоборнилфенола [Текст] / А.А. Жданкина, М.Б. Плотников, В.И. Смольякова и др. // **Морфология** – 2009. – Т. 136, № 4. – С. 57.

23. Закономерности структурных изменений сетчатки при экспериментальных ретинопатиях и их коррекция антиоксидантами [Текст] / С.В. Логвинов, Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.** – 2009. – Т. 136, № 4. – С. 89-90.

24. Морфологические изменения нейронов сетчатки глаза при стрептозотоциновом сахарном диабете и их коррекция производным

изоборнилфенола [Текст] / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, А.А. Жданкина // **Морфология.**- 2009.- Т. 136, № 5.- С. 42-45.

25. Перспективы использования митохондриально адресованного антиоксиданта SkQ1 в лечении дистрофических заболеваний сетчатки и связь его эффектов с нормализацией функций пигментного эпителия [Текст] / А.М. Марковец, А.А. Жданкина // Тезисы Четвертой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов". - Новосибирск. - 2009.

26. Средство, обладающее ретинопротекторной активностью [Текст] / А.А. Жданкина, С.В. Логвинов, М.Б. Плотников и др. // **Патент на изобретение** RUS 2406487 06.05.2009 Бюл. № 35.

27. Возрастные особенности хориоретинальной дегенерации у преждевременно стареющих крыс OXYS [Текст] / А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, А.М. Марковец и др. // **Морфология.** – 2010. – Т. 137, № 4. – С. 76.

28. Эффективность применения антиоксидантов группы пространственно затрудненных фенолов при фотодегенерации сетчатки [Текст] / Жданкина А.А., Плотников М.Б., Кон Г.А. и др. // **Бюллетень сибирской медицины.**- 2010.- Т. 9, № 5.- С. 32-38.

29. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats [Текст] / А.М. Markovets, V.B. Saprunova, А.А. Zhdankina et al. // **Аging.**- 2011.- V. 3, № 1.- С. 44-54.

30. Структурные нарушения хороидоретинального комплекса глаза при тотальной транзиторной ишемии головного мозга и их коррекция [Текст] / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, А.А. Жданкина и др. // **Морфология.**- 2011.- Т. 140, № 6.- С. 43-47.

31. Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by garamycin in rats [Текст] / N.G. Kolosova, N.A. Muraleva, А.А. Zhdankina // **American Journal of Pathology.**- 2012.- Т. 181.- С. 472-477.

32. Динамика изменения глионейронального комплекса сетчатки при фотоповреждении с использованием методов математического моделирования [Текст] / Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов, А.А. Жданкина и др. // **Бюллетень сибирской медицины.**,- 2012.- Т. 11, № 3.- С. 22-24.

33. Перспективы использования мелатонина для профилактики возрастной макулярной дегенерации: экспериментальное исследование [Текст] / Н.А. Стефанова, А.А. Жданкина, А.Ж. Фурсова, Н.Г. Колосова // **Успехи геронтологии.**- 2013.- Т. 26, № 1. С. 122-129.

34. Нарушения синаптоархитектоники сетчатки при развитии ретинопатии у крыс OXYS и их коррекция антиоксидантами группы экранированных фенолов [Текст] / А.А. Жданкина, Г.А. Кон, М.Б. Плотников, С.В. Логвинов // **Российский офтальмологический журнал.**- 2013.- №3.- С.85-90.

35. Исследование нейроретинопротекторной активности тиофана при инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS [Текст] / А.А. Жданкина, Г.А. Кон, М.Б. Плотников и др. // **Бюллетень сибирской медицины.**- 2013.- Т. 12, № 3.- С. 24-31.

### Список сокращений

АЗК – активная зона контакта  
АН – ассоциативный нейрон  
АОА – антиоксидантная активность  
АФК – активные формы кислорода  
ГН – ганглионарный нейрон  
грЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть  
ДР – диабетическая ретинопатия  
ИГМ – ишемия головного мозга  
КГ – комплекс Гольджи  
НК – нейросенсорная клетка  
ПП – плотные проекции  
ПЦ -пигментоцит  
ФВК – фосфорно-вольфрамовая кислота  
ХЛ – хемилюминесценция  
PEDF - pigment epithelium-derived factor (фактор пигментного эпителия).  
RLU – относительные единицы света  
VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста сосудистого эндотелия)

Подписано в печать 31.10.2013

Усл.печ.листов Печать на ризографе.

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ

634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08

Заказ № \_\_\_\_\_

Тираж \_\_\_\_\_ экземпляров