

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ А.И. ЕВДОКИМОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

КОМОВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА

**«НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ
РЕТИНАЛЬНОЙ НЕОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ»
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3 – патологическая физиология

3.1.5 – офтальмология

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор К.Г. Гуревич;
доктор медицинских наук,
профессор Н.А. Гаврилова

Москва 2022г

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
I. 1. Механизмы васкуляризации в постнатальном периоде.....	12
I. 2. Роль факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) в ангиогенезе.....	16
I. 3. Пролиферативная диабетическая ретинопатия, посттромботическая ретинопатия и анти-VEGF терапия.....	18
I. 4. Ретинопатия недоношенных и анти-VEGF терапия.....	23
I. 5. Резистентность к анти-VEGF-терапии и перспективные терапевтические подходы.....	27
I. 6. TNF- α , как ингибитор ангиогенеза, роль в развитии патологии сетчатки.....	31
I. 7. Инфликсимаб - ингибитор TNF- α при патологии сетчатки.....	37
I. 8. Агонисты PPAR рецепторов, как ингибиторы неоангиогенеза.....	39
I. 9. Лазерная коагуляция сетчатки и ретинальная экспрессия генов ангиогенеза.....	47
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
II. 1. Изучение роли TNF-α в процессе формирования ретинальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией (первый раздел).....	51
II. 1.1. Характеристика экспериментального материала.....	51
II. 1.2. Способ интравитреального введения препаратов	53
II. 1.3. Методы исследования.....	53
II. 2. Изучение роли PPAR рецепторов в механизме регуляции ретинального неоангиогенеза у животных с кислород-индуцированной ретинопатией (второй раздел)	56
II. 2.1. Характеристика экспериментального материала.....	56
II. 2.2. Способ получения фенофибратной композиции.....	57
II. 2.3. Методы исследования.....	57
II.3. Возможность и эффективность коррекции	

VEGF - индуцированных изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза в результате применения лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах (третий раздел).....	59
II.3.1. Характеристика экспериментального материала.....	59
II.3.2. Методы исследования.....	60
ГЛАВА III. Результаты по изучению роли TNF-а в процессе формирования ретинальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией	62
ГЛАВА IV. Результаты по изучению роли PPAR рецепторов в механизме регуляции ретинального неоангиогенеза у животных с кислород-индуцированной ретинопатией	69
ГЛАВА V. Влияние лазерного излучения 577 нм на ретинальную экспрессию генов, участвующих в регуляции ангиогенеза.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ.....	93
СПИСОК ТЕРМИНОВ И СОКРАЩЕНИЙ.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень ее разработанности.

Неоваскулярная патология сетчатки (диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных (РН), ретинальная венозная окклюзия, возрастная макулярная дегенерация (ВМД) и др.) является одной из наиболее частых причин слепоты и слабовидения в мире.

В России по данным Госрегистра на 01 января 2021 года зарегистрировано 4 799 млн. человек с сахарным диабетом (СД), распространенность диабетической ретинопатии составляет 31,7 и 13,5% у пациентов с СД 1-го и 2-го типа, соответственно [Дедов И.И. с соавт., 2021]. Окклюзия вен сетчатки стоит на втором месте по распространенности сосудистых заболеваний глаз после диабетической ретинопатии, и на пятом месте среди причин, вызывающих монокулярную слепоту [Бойко Э.В., 2013; Кабардина Е.В., 2019]. Ежегодно в мире у 28 300–45 600 новорожденных диагностируются необратимые нарушения зрения вследствие ретинопатии недоношенных [Катаргина Л.А., 2020]. В России ВМД страдают от 14 до 46% лиц старше 65 лет, в ближайшие годы прогнозируется дальнейшее увеличение заболеваемости [Коняев Д. А., 2020]. В связи с этим, изучение механизмов ретинального неоангиогенеза является актуальной задачей патологической физиологии и офтальмологии.

Одним из ключевых механизмов формирования ретинальной неоваскуляризации является VEGF-зависимый механизм ангиогенеза, и в настоящее время при данной патологии достаточно широко используется анти-VEGF терапия. Однако, при ее проведении не всегда может быть достигнут максимально возможный положительный клинический результат, а в ряде случаев наблюдается рефрактерность к проводимой терапии и связано это, вероятно, с тем, что процесс формирования ретинальной неоваскуляризации является многофакторным [Fernández-Robredo P. et al, 2014; Daniel E. et al, 2014; Lally DR et, 2012; Kim M et al, 2016; Amoaku W.M. et al., 2015]. В последние годы в развитии ретиноваскулярной патологии выявлена роль некоторых факторов, обладающих, как про-, так и антиангиогенными свойствами, и с целью повышения

эффективности антиангиогенной терапии проводится поиск новых возможностей регуляции ретинального неоангиогенеза.

В регуляции ретинальной неоваскуляризации безусловный интерес может представлять TNF- α -блокада. TNF- α является членом большого суперсемейства цитокинов. TNF- α активирует пролиферацию в эндотелиальных клетках сосудов сетчатки и участвует в формировании нейродегенеративных процессов сетчатки и зрительного нерва, вызывает воспаление, активирует экспрессию адгезивных молекул, усиливает пролиферацию, индуцирует апоптоз в эндотелиальных клетках сосудов сетчатки [Bodmer J.L. et al., 2002; Mathew S.J et al., 2009; Ahmed F. et al., 2004]. Однако на сегодняшний день TNF- α -индуцированный механизм ретинального неоангиогенеза остается до конца не изученным. Известно, что клеточные эффекты TNF- α могут зависеть от типа рецепторов, типа и функционального состояния клеток, от концентрации и продолжительности воздействия TNF- α и от одновременно оказываемого на клетку воздействия цитокинов, даже от их временной последовательности воздействия [Giraud E. et al., 1998]. Понимание молекулярных и клеточных TNF-опосредованных эффектов в сетчатке представляет интерес в связи с возможностью развития новых эффективных терапевтических направлений при различной патологии сетчатки.

Еще одной из возможных терапевтических мишеней при патологии сетчатки, связанной с формированием неоваскуляризации, могут являться PPARs – ядерные рецепторы активируемые пероксисомным пролифератором, которые экспрессируются во всех слоях сетчатки [Herzlich A.A. et al., 2009]. В клетках пигментного эпителия выявлены представители всех типов PPARs – PPAR α , PPAR β /61, PPAR β /62, PPAR γ 1 и PPAR γ 2 [Dwyer M.A. et al., 2011]. В эндотелиальных клетках PPARs регулируют процессы клеточной пролиферации, ангиогенеза, адгезии, агрегации и воспаления. PPAR α и PPAR γ обладают преимущественно антиангиогенными, PPAR β / δ – проангиогенными свойствами [Bishop-Bailey D. et al., 2011]. Роль PPAR рецепторов в механизме регуляции ретинального неоангиогенеза на сегодняшний день также не установлена.

К основным и наиболее эффективным методам лечения целого ряда патологии глазного дна, таких как, ДР, РВО, ВМД и др. относятся лазерные методы лечения [Дога А.В. с соавт., 2013; Качалина Г.Ф. с соавт., 2013]. Известно, что важную роль

в достижении биологических эффектов лазерного воздействия играет модуляция ретиальной экспрессии генов [Wilson A.S., 2003; Martin G., 2018]. Проведение исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов воздействия на сетчатку лазерного излучения с длиной волны 577 нм с использованием microarray transcription analysis позволит идентифицировать ключевые регуляторные факторы и/или реакции, отвечающие за клинический эффект, расширить показания к его применению, определить наиболее оптимальные стратегии и повысить эффективность лазерного лечения целого ряда патологий глазного дна.

Таким образом, на сегодняшний день остается актуальным поиск новых подходов для блокирования нескольких ключевых регуляторов ретиального ангиогенеза.

Цель работы

Изучить возможности регуляции ангиогенеза при ретиальной неоваскулярной патологии.

Задачи:

1. Определить роль TNF- α в процессе формирования ретиальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией и определить механизм реализации его действия.
2. Провести сравнительный анализ эффективности TNF- α , VEGF и TNF- α -VEGF блокады в регуляции неоангиогенеза у животных с кислород-индуцированной ретинопатией.
3. Оценить роль PPAR рецепторов в механизме регуляции ретиального неоангиогенеза и эффективность применения PPAR α и PPAR γ агонистов у животных с кислород-индуцированной ретинопатией.
4. Провести анализ VEGF-индуцированных изменений ретиальной экспрессии генов ангиогенеза в эксперименте.
5. Оценить возможность и эффективность коррекции VEGF-индуцированных изменений ретиальной экспрессии генов ангиогенеза в результате применения лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме.

6. Оценить возможность и эффективность коррекции VEGF-индуцированных изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза в результате применения лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме.

Научная новизна:

1. На экспериментальной модели кислород-индуцированной ретинопатии установлено, что TNF- α является индуктором VEGF-зависимого процесса формирования ретинальной неоваскуляризации – чем выше уровень содержания TNF- α в ткани сетчатки, тем выше уровень VEGF и больше площадь ретинальной неоваскуляризации.
2. Определена динамика изменений уровня содержания TNF- α и VEGF в процессе формирования патологии при кислород-индуцированной ретинопатии и выявлены сроки их пиковых значений.
3. Установлена эффективность применения ингибитора TNF- α при кислород-индуцированной ретинопатии и выявлено наличие оптимальных сроков его использования.
4. Установлено, что комбинированное применение ингибитора TNF- α с анти-VEGF-препаратом или с фактором пигментного эпителия (PEDF) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией позволяет более эффективно снизить уровень содержания VEGF в ткани сетчатки и предотвратить формирование неоваскуляризации.
5. Разработана фенофибратная композиция. Патент RU 2652342
6. Установлена эффективность применения агонистов PPAR рецепторов при кислород-индуцированной ретинопатии и, таким образом, доказано, что в результате активации PPAR α рецепторов блокируется ретинальная неоваскуляризация.
7. Выявлены изменения ретинальной экспрессии генов ангиогенеза при интравитреальном введении 50 нг/мл рекомбинантного VEGF165.
8. Изучены механизмы регуляции ретинальной экспрессии генов ангиогенеза в результате воздействия на сетчатку лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах при интравитреальном введении 50 нг/мл рекомбинантного VEGF165.

Теоретическая и практическая значимость.

1. Дополнены имеющиеся представления о механизме формирования ретинального неоваскулогенеза – установлено, что TNF- α является прямым, и VEGF – опосредованным индуктором неоваскулогенеза.
2. Установлено наличие целесообразности применения при ретинальной неоваскулярной патологии комбинированной TNF- α -VEGF блокады с использованием ингибиторов в определенные установленные сроки.
3. Установлено наличие целесообразности применения при ретинальной неоваскулярной патологии агонистов PPAR рецепторов.
4. С целью увеличения экспрессии генов с антиангиогенными свойствами и снижения экспрессии генов с проангиогенными свойствами при ретинальной неоваскулярной патологии установлено наличие целесообразности применения лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах.

Методология и методы исследования

Работа имеет экспериментальный характер. Для решения поставленных задач был проведен иммуноферментный анализ с целью определения уровней содержания VEGF, ICAM1, TNF- α в гомогенатах сетчатки; Вестерн-блот анализ для определения содержания белков клеточных контактов – окклюдина, клаудина-1, -2 и -5; приготовление тотальных препаратов сетчатки с последующим их иммуногистохимическим окрашиванием и компьютерным анализом цифровых изображений сосудов сетчатки; транскрипционный анализ образцов тканей (Microarray transcription analysis). Объект исследования – крысы линии albino Wistar с моделью кислород-индуцированной ретинопатии, мыши линии C57BL/6J с моделью VEGF-индуцированной ретинопатии; предмет исследования – роль TNF- α , PPAR рецепторов в процессе формирования ретинальной неоваскуляризации; возможность и эффективность коррекции VEGF-индуцированных изменений ретинальной экспрессии генов. Достоверность полученных данных подтверждена стандартными методами статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. TNF- α является индуктором VEGF-зависимого процесса формирования ретинальной неоваскуляризации при кислород-индуцированной ретинопатии. Комбинированное применение ингибиторов TNF- α с анти-VEGF препаратами или с PEDF в сроки до максимальной ретинальной экспрессии TNF- α и VEGF, соответственно, более эффективно, чем изолированная VEGF-блокада.
2. Применение PPAR α и PPAR γ агонистов при кислород-индуцированной ретинопатии позволяет эффективно снизить уровень содержания TNF- α и VEGF в ретинальной ткани и предотвратить формирование ретинальной неоваскуляризации.
3. При лазерном воздействии с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме осуществляется коррекция развивающихся при интравитреальном введении VEGF165 изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза – снижается экспрессия генов с проангиогенными свойствами, увеличивается экспрессия генов с антиангиогенными свойствами и нормализуется экспрессия генов ингибиторов неоваскуляризации.
4. При лазерном воздействии с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме осуществляется разнонаправленная регуляция развивающихся при интравитреальном введении VEGF165 изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза – экспрессия генов с анти- и проангиогенными свойствами, как увеличивается, так и снижается, что следует учитывать при использовании данного вида воздействия.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использования методов исследования, адекватных поставленным задачам и применением современных методов статистического анализа.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены в рамках XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения - 2018» 21-22 июня 2018 г., г. Москва; IX Всероссийской

научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» 18 июня 2014 г., Москва.

Личный вклад автора в исследование

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна исследования, анализе отечественных и зарубежных источников литературы, научного материала, в статистическом анализе результатов исследования, в написании статей по теме исследования, а также написал диссертацию и автореферат.

Автором лично проведено создание модели кислород-индуцированной ретинопатии у крыс, инстилляций и интравитреальное введение препаратов, энуклеация, приготовление тотальных препаратов сетчатки, проведение компьютерного анализа цифровых изображений сетчатки (у всех экспериментальных животных).

Специальность, которой соответствует диссертация

Областью исследования представленной научной работы является изучение механизмов развития и исходов патологических процессов. Указанное соответствует специальности 3.3.3. Патологическая физиология. Исследование включает изучение патологии глаза, разработку методов лечения глазных заболеваний, изучение влияния консервативной терапии на орган зрения, совершенствование методик, что соответствует специальности 3.1.5. Офтальмология.

Внедрение в практику

Результаты диссертационной работы используются в лекционных курсах для клинических ординаторов, аспирантов кафедры глазных болезней лечебного факультета и для студентов, аспирантов кафедры патологической физиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 5 - в рецензируемых научных изданиях и приравненных к ним публикациях. Получен патент на изобретение РФ.

Структура и объем диссертации.

Текст диссертации изложен на 130 страницах, содержит 12 таблиц и 7 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, 4 глав, включающих материалы и методы исследования, результаты исследования, а также из заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и терминов, списка литературы. Список литературы включает 310 источников, из которых 45 отечественных и 265 иностранных.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Механизмы васкуляризации в постнатальном периоде

В настоящее время выделяют три механизма формирования сосудов при любой ишемической патологии: ангиогенез, васкулогенез и артериогенез [Xu K. et al., 2011; Carmeliet P. et al., 2011].

Ключевую роль в формировании васкуляризации в постнатальном периоде играет *ангиогенез* — это процесс формирования новых капилляров из ранее существующих путем миграции и пролиферации дифференцированных эндотелиальных клеток. Протекает данный процесс в несколько последовательных этапов - активация эндотелиальных клеток и экспрессия в них протеаз, растворение базальной мембраны, миграция эндотелиальных клеток из сосудистой стенки через периваскулярную ткань по направлению к ангиогенному стимулу, образование первичных высокопроницаемых сосудистых структур, стабилизация и «взросление» этих структур за счет привлечения перицитов и гладкомышечных клеток и организация их в сложную трехмерную сосудистую сеть [Повещенко О. В. с соавт. 2012; Folkman J. et al., 2006].

В процессе ангиогенеза между собой взаимодействуют клетки, компоненты клеточного матрикса, про - и антиангиогенные факторы (VEGF, TNF- α , TGF- β , FGF, HGF, Notch-1, ангиопоэтин-1, тромбоспондин, TIMPs и др.).

К основным стимулам ангиогенеза в патологических условиях относятся индуцированные в условиях гипоксии факторы HIF (HIF-1, HIF-2 и HIF-3), состоящие из постоянно экспрессируемой HIF- β субъединицы и одной из трех кислород - зависимых субъединиц (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) [Fong G.H. et al., 2009; Semenza G.L. et al., 2012]. В состоянии гипоксии HIF- α субъединицы перемещаются в ядро, гетеродимеризуются с HIF- β и активируют экспрессию HIF-зависимых ангиогенных факторов [Semenza G.L. et al., 2014]. Возрастающая под влиянием гипоксии продукция ангиогенных факторов запускает процессы пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, они становятся способными к формированию первичных тубулярных структур, являющихся основой будущего капилляра.

При гипоксии в периваскулярной зоне интенсивно протекают процессы протеолиза, приводящие к деградации базальной мембраны, отделению перицитов от сосудистой стенки и разрушению межклеточных контактов между эндотелиальными клетками. Увеличение проницаемости приводит к тому, что из кровотока в ткань, окружающую дестабилизированный сосуд, выходят белки, которые формируют «временный» матрикс для миграции клеток [Eliceiri B.P et al., 1999]. Помимо механической дестабилизации сосуда в повышении сосудистой проницаемости важную роль играют секретируемые гладкомышечными клетками и эндотелием ангиогенные факторы роста [Senger D.R. et al., 1994].

Активное участие в сосудистом формировании принимает внеклеточный матрикс (ВКМ). При протеолизе ВКМ высвобождаются входящие в его состав ангиогенные факторы роста [Stepanova V. et al., 1999], связываются с рецепторами на поверхности эндотелиальных, гладкомышечных и стромальных клеток и создают «вторую волну» стимула для формирования сосуда или стабилизации первичного отростка.

По мере увеличения длины отростка в новом сосуде появляются первые признаки формирования просвета. Регуляция диаметра просвета происходит под влиянием про- и антиангиогенных цитокинов - под действием ангиопоэтина-1 может происходить его увеличение, под влиянием тромбоспондина и белка tubedown-1 формируются сосуды меньшего диаметра [Fischer C. et al., 2006]. В дальнейшем морфология сосудов может претерпевать значительные изменения под воздействием механических факторов - гидростатического давления, напряжения сдвига и др. [Jones E.A. et al., 2006].

Финальный этап ангиогенеза характеризуется «выключением» активированного фенотипа «ведущей» клетки при ее контактном взаимодействии с перицитами. Резко снижается экспрессия MMP [Fischer C. et al., 2006] и увеличивается продукция тканевых ингибиторов протеаз – TIMP - 2 и -3 [Plekhanova O.S. et al., 2008; Tkachuk V.A. et al., 2009]. Увеличивается активность Dll4-Notch1, за счет чего уменьшается вероятность активации новой «ведущей» клетки под воздействием ангиогенных факторов роста [Hellstrom M. et al., 2007]. Кроме того, при

реверсивном изменении фенотипа эндотелия падает продукция большинства факторов роста, участвующих в активации эндотелиальных клеток и повышается секреция стабилизирующих белков (PDGF, ангиопоэтина-1, TGF- β 1) [Chung A.S. et al., 2010]. Стабилизация сосуда осуществляется за счет взаимодействия эндотелиальных клеток с перицитами, гладкомышечными клетками и белками матрикса. На начальных этапах его структура поддерживается, в основном, плотными клеточными контактами и адгезивными взаимодействиями между эндотелиальными клетками [Iruela-Arispe M.L. et al., 2009]. Затем происходит таксис перицитов и гладкомышечных клеток за счет наличия на них рецепторов для ангиопоэтина-1, изоформ PDGF [Lindblom P. et al., 2003]. В результате уменьшается фенестрированность эндотелиального слоя, снижается его проницаемость, формируется сосудистая стенка и начинается наработка перицитами белков ВКМ.

В настоящее время доказано, что новые сосуды в постнатальном периоде могут образовываться не только из ранее существующих сосудов, но и *de novo* из гематопоетических клеток, этот процесс называется *васкулогенез*. Важнейшую роль в процессе васкулогенеза играют эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), которые представляют собой гетерогенную популяцию, характеризующуюся экспрессией различных маркеров - клеток гематопоетического (CD14, CD34, CD133) и эндотелиального (VEGFR2, CD31, CD144, фактор Виллебранда) ряда. Источниками ЭПК являются костный мозг, мезенхимальные предшественники, тканевые резидентные клетки. При возникновении ишемии или повреждении эндотелия ЭПК могут быть мобилизованы в кровоток. Стимуляторами мобилизации ЭПК из костного мозга выступают гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующие факторы (G-CSF и GM-CSF), VEGF, ангиопоэтин-1, эритропоэтин и другие регуляторы. Поступившие в кровоток ЭПК мигрируют в зону повреждения, накапливаются в ней и дифференцируются в эндотелиоциты. Сеть эндотелиальных клеток, создаваемая васкулогенезом, в дальнейшем служит

каркасом для ангиогенеза [Schattelman G.C. et al., 2006; Goligorsky M.S. et al., 2009; Poveshchenko A.F. et al., 2010; Konenkov V.I. et al., 2012].

Третьим процессом, обеспечивающим поддержание адекватного кровотока и его восстановление, является *артериогенез* - увеличение просвета сосуда и толщины его стенки под влиянием возросшего напряжения сдвига и механического растяжения стенки сосуда. Артериогенез играет ведущую роль в компенсации потерь кровоснабжения при стенозах или полных окклюзиях сосудов и приводит к формированию коллатерального кровотока [Persson A.B. et al., 2011].

Основным стимулом артериогенеза является изменение гемодинамических условий в сосудистом русле, связанное с окклюзией или выраженным стенозом [Schaper W. et al., 1996]. При возникновении затруднения для кровотока формируются две зоны - высокого (преокклюзивная) и низкого (постокклюзивная область) давления. Объем кровотока через сосуды, отходящие от преокклюзивной зоны, резко увеличивается, что приводит к их растяжению, деформации мембран эндотелиальных клеток и увеличению напряжения сдвига на их поверхности. Увеличение напряжения сдвига воспринимается эндотелиальными клетками с помощью поток-чувствительных K^+ и Cl^- каналов [Nakao M. et al., 1999] и связанных с ними g-белков [Gudi S.R. et al., 1996]. При их активации запускается фосфорилирование MAP-киназ (ERK1/2 и др.), растет активность факторов транскрипции [Tzima E. et al., 2005], увеличивается продукция интегринов и ряда ангиогенных факторов [Schaper W. et al., 2009]. Активированные напряжением сдвига эндотелиальные клетки обладают способностью вовлекать в периваскулярное пространство моноциты за счет продукции MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) и ряда других цитокинов. Вторая ключевая молекула в этом процессе - ICAM-1, которая экспонируется на поверхности эндотелиальных клеток и участвует в формировании адгезивного фенотипа, характеризующегося способностью захватывать лейкоциты из кровотока за счет «роллинга» [Hillmeister R. et al., 2008]. Рекрутированные моноциты и их дифференцированные формы - макрофаги и дендритные клетки - участвуют в протеолизе ВКМ. Как и при ангиогенезе в деградации матрикса ключевыми являются MMP различных типов и

урокиназный активатор плазминогена (uPA) uPA участвует в протеолизе белков базальной мембраны сосудов (фибронектина, ламинина и др.), вызывает повышение экспрессии самих MMP и активирует ангиогенные молекулы - изоформы VEGF и HGF [Tkachuk V. et al., 1996; 2009]. Кроме того, клетки моноцитарного звена участвуют в активации гладкомышечных клеток, повышая их способность к делению, гипертрофии и миграции, в результате чего толщина меди, возрастает иногда в несколько раз, а вся коллатераль может увеличиваться в объеме от 2 до 20 раз [Plekhanova O. et al. 2001; Parfyonova Y.V. et al., 2002]. Помимо этого, моноциты продуцируют широкий спектр ангиогенных факторов роста [Jaipersad A.S. et al., 2014].

По мере расширения кровеносного русла происходит снижение градиента давления, устраняется основной стимул, который запускал артериогенез, а также снижается продукция эндотелием хемоаттрактантов. Экстравазация моноцитарных клеток прекращается, а тканевые макрофаги теряют протеолитический потенциал и прекращают продуцировать факторы, активирующие клетки сосуда. При стабилизации артериальной коллатерали значительно возрастает продукция белков матрикса, формируются гладкомышечная оболочка, базальная мембрана и адвентиция сосуда.

I.2. Роль факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) в ангиогенезе

Активность ангиогенеза в ткани зависит от баланса стимулирующих и ингибирующих факторов.

К стимуляторам неоангиогенеза относятся: васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующие факторы роста α (TGF- α) и β (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), NO, интерлейкин-8 и неспецифические факторы, такие, как матриксные металлопротеиназы (MMPs).

Ингибиторами неоангиогенеза являются: эндостатин, растворимые рецепторы VEGF (sVEGFR), тромбоспондин, ангиостатин (фрагмент плазминогена), вазостатин, рестин, ингибиторы MMP (TIMP-1, TIMP-2).

Ключевой сигнальной системой, которая регулирует пролиферацию и миграцию клеток эндотелия, формирующих основу любого сосуда, являются фактор роста эндотелия сосудов VEGF. В семейство VEGF входит 5 белков: VEGF-A (более известный как VEGF, или VEGF-1), VEGF-B, VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D и плацентарный фактор роста (PlGF).

Важную роль в регуляции клеточного ответа играет экспрессия различных форм VEGF-A, образующихся в результате альтернативного сплайсинга (процесс, позволяющий одному гену производить несколько мРНК и, соответственно, белков) - VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ и обладающих различными функциями [Ferrara N. et al., 2003].

На ранних этапах ангиогенеза и артериогенеза, сопровождающихся, как сказано выше, увеличением пролиферативной и миграционной активности эндотелиальных клеток, увеличением сосудистой проницаемости и протеолизом ВКМ ключевым триггером является VEGF₁₆₅ [Dor Y. et al., 2002]. Продуцируется VEGF₁₆₅ эндотелиальными, гладкомышечными клетками, моноцитами, макрофагами, клетками костного мозга и глиии, и, кроме ангиогенных, обладает нейротрофическими и нейропротективными свойствами [Storkebaum E. et al., 2004; Holmes D.I. et al., 2005; Nowak D.G. et al., 2008].

Реализуют свое биологическое действие факторы роста семейства VEGF благодаря взаимодействию с рецепторами, расположенными на мембранах клеток эндотелия. На настоящий момент идентифицировано три типа тирозинкиназных рецепторов VEGF - VEGF-R1, VEGF-R2 и VEGF-R3 [Koch S. et al., 2011].

Несмотря на то, что VEGF-R1 был идентифицирован первым, полной ясности в отношении его функций на сегодняшний день нет. Существует предположение, что основной функцией VEGF-R1 является негативная регуляция действия VEGF-A на клетки эндотелия сосудов [Park J.E. et al., 1994]. Установлено, что при дефиците растворимой формы VEGF-R1 интенсивно развивается васкуляризация [Bandello

E.F. et al., 2010]. Структурной особенностью VEGF-R1 является существование двух форм - полноразмерной мембранно-связанной (mVEGF-R1) и растворимой (sVEGF-R1) [Kendall R.L. et al., 1993]. В растворимой форме отсутствует тирозинкиназный домен и соответственно передавать сигнал она не способна, но способна связываться с VEGF-A, предотвращая его взаимодействие с рецептором VEGF-R2 [Distler J.H. et al., 2003]. Кроме того, VEGF-R1, образуя гетеродимерные комплексы с VEGFR2, модулирует их активность [Cudmore M.J. et al., 2012].

Основным медиатором биологического действия VEGF-A является VEGF-R2, его активация на эндотелиальных клетках приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки и запуску процессов пролиферации, миграции и дифференцировки [Bandello E.F. et al., 2010].

I.3. Проллиферативная диабетическая ретинопатия, посттромботическая ретинопатия и анти-VEGF терапия

Диабетическая ретинопатия (ДР) — одно из тяжелых осложнений сахарного диабета, развивающихся вследствие микроангиопатии. По данным ВОЗ, на ДР приходится 2,6% случаев слепоты в мире [Bourne R.R.A. с соавт., 2013].

Согласно одобренной ВОЗ классификации ДР (1991г Е. Kohner и М. Porta) выделяют непролиферативную, препролиферативную и пролиферативную стадии. В клинических исследованиях используется Международная клиническая шкала тяжести ДР — ICDRDSS (International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale).

В основе развития ДР лежит хроническая гипергликемия, приводящая к эндотелиальному стрессу с образованием продуктов гликирования белков, окислению глюкозы за счет активизации полиолового пути, активации протеинкиназы, повышению уровня свободных радикалов, усилению агрегации элементов крови, активация факторов коагуляции, окклюзии капилляров и ретинальной ишемии, активизация провоспалительных цитокинов, ангиогенных и антиангиогенных факторов роста, которые запускают процесс неоваскуляризации сетчатки [Bosma E.K., 2019; Distler J. W., 2003].

Развитие и прогрессирование ДР определяется равновесием между проангиогенными и антиангиогенными факторами [Grant M. B., 2004].

По мере развития заболевания тяжелая непролиферативная ДР с 50-процентной вероятностью в течение 1 года прогрессирует до ПДР в связи с аномальным ростом сосудов, опосредованным в основном VEGF, в результате усиления гипоксии, окислительного стресса и воспаления.

Одним из основных методов лечения ПДР является панретиальная лазерная коагуляция (ПРЛК). Однако, этот метод не обеспечивает долгосрочного повышения остроты зрения и может приводить к снижению других зрительных функций таких как контрастная чувствительность, сумеречное зрение и сужению полей зрения [Heng L.Z., 2013].

С появлением анти-VEGF препаратов расширились показания для их применения, в том числе и в качестве терапии при ПДР, поскольку они воздействуют на основную патофизиологическую мишень - неоваскуляризацию. По результатам мировых клинических исследований применение анти-VEGF препаратов показало свою эффективность в лечении ПДР в качестве монотерапии, а также в сочетании с панретиальной лазерной коагуляцией.

Тромбоз вен сетчатки — это распространенное сосудистое заболевание, сопровождающееся нарушением кровоснабжения сетчатки глаза и высоким риском последующей потери зрения из-за массивных ретинальных геморрагий развития макулярного отека и неоваскулярных осложнений на фоне ишемии.

Окклюзия вен сетчатки стоит на втором месте по распространенности сосудистых заболеваний глаз после диабетической ретинопатии и на пятом месте среди причин, вызывающих монокулярную слепоту [Бойко Э.В., 2013; Кабардина Е.В., 2019]. Примерно 16,4 млн взрослого населения имеют данную патологию. Распространённость тромбозов ретинальных вен (ТРВ) составляет около 2,14 на 1000 человек в возрасте старше 40 лет и 5,36 на 1000 в группе старше 64 лет. Отмечается тенденция к «омоложению патологии» [Тульцева С.Н., Астахов Ю.С., 2010].

В 1983 г. S.S.Hayreh разделил окклюзию ЦВС на два типа: ишемический тип (геморрагическая ретинопатия) и неишемический тип (ретинопатия венозного стаза).

При неишемическом типе ретинальной окклюзии существует большая вероятность реканализации просвета сосуда с восстановлением ретинальной перфузии. Вследствие ишемического тромбоза на фоне полной обтурации просвета вены прекращается ретинальная перфузия и развивается выраженная ишемия сетчатки. При этом значительно (до 70-90%) повышается вероятность развития постокклюзионной ретинопатии и увеличивается выраженность ее симптомов [Rogers S., 2010].

В 21% всех случаев тромбоза ветви ЦВС через 15 месяцев от момента окклюзии выявляется неоваскуляризация различных отделов глаза, причем при ишемическом тромбозе новообразованные сосуды встречаются в 12,5 раз чаще, чем при неишемическом (92% и 7,4% соответственно). В подавляющем большинстве неоваскуляризация локализуется в заднем сегменте глазного яблока (96,3%) [Танковский В.Э., 2000].

Посттромботическая ретинопатия — это ишемическая ретинопатия, сопровождающаяся нарушением капиллярной перфузии сетчатки и развитием внутриглазной неоваскуляризации. Ишемия и гипоксия сетчатки индуцирует образование ангиогенных факторов, в том числе сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), активирующего эндотелиоциты и стимулирующего их миграцию и пролиферацию.

Экспрессия VEGF стимулируется множеством проангиогенных факторов, включая эпидермальный ростовой фактор, основной фибробластный ростовой фактор, тромбоцитарный ростовой фактор и интерлейкин-1. Кроме того, уровень VEGF зависит от pH, давления и концентрации кислорода в окружающих тканях. VEGF, связываясь с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1 VEGF и рецептором-2 VEGF) и активируя их, влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка). Указанные

рецепторы экспрессируются эндотелиоцитами кровеносных сосудов. Связывание VEGF с этими рецепторами запускает сигнальный каскад, который, в конечном итоге, стимулирует рост эндотелиальных клеток сосуда, их выживание и пролиферацию. Эндотелиальные клетки участвуют в таких разнообразных процессах, как вазоконстрикция и вазодилатация, презентация антигенов, а также служат очень важными элементами всех кровеносных сосудов — как капилляров, так и вен или артерий. Таким образом, стимулируя эндотелиальные клетки, VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза. VEGF увеличивает проницаемость мелких кровеносных сосудов. Повышенная проницаемость ведет к просачиванию белков плазмы через стенку сосуда и формированию экстравазального фибринового геля. Этот гель представляет собой подходящую среду для роста клеток эндотелия. В присутствии высоких концентраций VEGF, характерных для ишемической ретинопатии, сосуды приобретают чрезвычайно высокую проницаемость, приводя к формированию отека сетчатки. Следствием этого является высокое интерстициальное давление, дополнительно снижающее перфузионное давление в капиллярной сети, тем самым дополнительно усиливая гипоксию окружающих тканей. Так формируется «порочный круг».

Неоваскуляризация сетчатки часто появляется на границе перфузируемой и неперфузируемой зон. Площадь отсутствия капиллярной перфузии коррелирует с риском развития неоваскулярных осложнений. Проллиферативные процессы при посттромботической ретинопатии обычно имеют четкую стадийность:

- рост новообразованных сосудов по поверхности задней гиалоидной мембраны стекловидного тела;
- задняя отслойка стекловидного тела;
- тракции новообразованных сосудов приводят к преретинальным и витреальным геморрагиям;
- прогрессирование задней отслойки стекловидного тела и пролиферация глиальных клеток по задней гиалоидной мембране в зонах плотных витреоретинальных сращений (по сосудистым аркадам);
- тракционная отслойка сетчатки.

Дальнейшие вазопротиферативные процессы могут привести к появлению новообразованных сосудов в радужной оболочке и в углу передней камеры [Тульцева С.Н., 2010].

«Золотым» стандартом лечения неоваскулярных осложнений тромбоза ретинальных вен является панретиальная лазеркоагуляция. Ее проводят с целью коагуляции сетчатки в зонах, соответствующих отсутствию капиллярной перфузии для снижения выброса вазопротиферативных факторов. Монотерапия анти-VEGF препаратами оказывает лишь временный эффект на неоваскуляризацию, поэтому в настоящее время применяют сочетание интравитреального введения анти-VEGF-препаратов и панретиальной лазерной коагуляции в борьбе с неоваскулярными осложнениями после тромбоза ретинальных вен [Будзинская М.В., 2015].

При неоваскулярной ВМД, ДМО, макулярном отеке при РВО проводится лечение с использованием ингибиторов ангиогенеза - анти -VEGF препаратов [Гальбинур Т.П. с соавт, 2012; Кулагина А.В., 2017; Файзрахманов Р.Р., 2018].

В настоящее время широко применяются:

Ранибизумаб («Луцентис») - Fab-фрагмент гуманизированного рекомбинантного моноклонального антитела к эндотелиальному фактору роста, который с высокой степенью сродства связывает и нейтрализует все изоформы VEGF-A [Охотимская Т.Д. с соавт., 2017], эффективно подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, неоваскуляризацию сетчатки и уменьшает проницаемость сосудов.

Афлиберцепт («Эйлеа») рекомбинантный фьюжн-белок (молекулярный вес 110 кД), содержащий части внеклеточных доменов человеческих рецепторов VEGFR1 и VEGFR2, соединенных с Fc-фрагментом IgG1 [Белянина С.И. с соавт., 2017]. Афлиберцепт действует как белок-ловушка, связывающий все свободные изоформы VEGF-A, VEGF-B и PlGF.

Эффективность и безопасность препаратов была доказана в масштабных клинических исследованиях MARINA, ANCHOR [Brown D.M. et al., 2006; Rosenfeld P.J. et al., 2006], RISE и RIDE [Nguyen Q.D. et al., 2012], VIEW 1 и VIEW 2 [Алпатов С.А. с соавт. 2015].

I.4. Ретинопатия недоношенных и анти-VEGF терапия

Ретинопатия недоношенных (РН) - вазопролиферативное заболевание глаз недоношенных детей, в основе которого лежит незрелость структур глаза, в частности сетчатки, к моменту преждевременного рождения ребенка.

Процесс нормального развития сосудов сетчатки включает две фазы: васкулогенез и ангиогенез. В результате васкулогенеза (16 - 21-22 неделя гестации) в пределах центральной зоны сетчатки из эндотелиальных клеток-предшественников (ангиобластов) формируются четыре сосудистые аркады [Осипова Н.А., 2016; Rajendran P. et al., 2013]. В процессе ангиогенеза осуществляется процесс периферической васкуляризации поверхностных слоев сетчатки, формирование наружного сплетения и радиальных перипапиллярных капилляров (завершение васкуляризации с назальной стороны - 32 неделя гестации, с темпоральной - 40-42 неделя).

У недоношенных детей процесс ангиогенеза не завершен. Ребенок после рождения из условий внутриутробной относительной гипоксии попадает в условия гипероксии, степень которой увеличивается при проведении кислородотерапии, которая используется у недоношенных детей.

В условиях гипероксии (фаза незавершенной васкуляризации) снижается уровень VEGF, IGF (insulin-like growth factor 1 – инсулино - подобный фактор роста 1) и разрушается HIF – фактор, процесс ангиогенеза в результате этого замедляется или блокируется. Развивается выраженный ангиоспазм, так как система ауторегуляции сосудов сетчатки еще незрелая [Сидоренко Е.И. с соавт., 1990, 1999, 2007, 2015, 2017; Николаева Г.В. с соавт. 2015], в результате этого увеличивается гипоксия в васкуляризированной зоне сетчатке. Одновременно на границе с аваскулярной зоной сетчатки развивается гиперплазия веретенообразных, мезенхимальных клеток и астроцитов, формируется вал, препятствующий нормальному росту сосудов.

В условиях повышения метаболических потребностей развивающейся сетчатки и нарастающей гипоксии увеличивается концентрация

гипоксииндуцирующих факторов HIF - 1,2, которые стимулируют выработку VEGF, IGF и других ангиогенных факторов - вазопротрофативная фаза.

На сегодняшний день к официально рекомендованным методам лечения РН относятся крио – и лазерная коагуляция (ЛК) аваскулярных зон сетчатки, в результате чего снижается уровень VEGF [Young T.L., et al., 1997].

При «классическом» течении РН проведенная в пороговой стадии ЛК останавливает прогрессирование заболевания в 98–100 %, при плюс-болезни I зоны и задней агрессивной ретинопатии недоношенных (ЗАРН) эффективность ЛК не превышает 55–77 % [Yoon J.M. et al., 2017]. Однако, после проведения ЛК у пациентов с тяжелыми формами РН формируются обширные рубцовые изменения сетчатки, поле зрения сужено и развивается миопия высокой степени.

В мировой практике при РН off-label более 10 лет используется антиVEGF-терапия. Первым крупным рандомизированным исследованием при РН стало исследование BEAT-ROP (Bevacizumab Eliminates Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity), результаты которого опубликованы в 2011 г. [Mintz-Hittner H.A. et al., 2011]. В исследование были включены 150 детей с III стадией плюс-болезни в I или II зоне, в 75 случаях в оба глаза интравитреально вводили бевацизумаб в дозировке 0,625 мг и в 75 случаях проводили традиционную лазерную коагуляцию сетчатки на обоих глазах. В результате проведения исследования установлено, что при РН с незавершенной васкуляризацией в I зоне частота прогрессирования заболевания в группе пациентов с использованием бевацизумаба составила 6 %, в группе пациентов с ЛК сетчатки - 42 %; при РН с незавершенной васкуляризацией во II зоне достоверных отличий выявлено не было.

Одно из наиболее значимых крупных исследований эффективности и безопасности антиVEGF-терапии у детей с активной РН - проспективное рандомизированное открытое интервенционное исследование применения ранибизумаба RAINBOW. Ранибизумаб (Луцентис®) представляет собой Fab-фрагмент гуманизированного рекомбинантного моноклонального антитела к эндотелиальному фактору роста, который с высокой степенью сродства связывает и нейтрализует все изоформы VEGF-A, эффективно подавляет пролиферацию

эндотелиальных клеток, неоваскуляризацию сетчатки и уменьшает проницаемость сосудов.

Исследование RAINBOW [Stahl A. Et al., 2019] включало 225 недоношенных детей с РН с двусторонней активной РН I, II или III стадии с плюс-болезнью в зоне I, с РН III стадии с плюс-болезнью в зоне II или задней агрессивной РН (ЗАРН). Проводился сравнительный анализ эффективности ранибизумаба (интравитреальное введение в дозе 0,1 и 0,2 мг) и ЛК аваскулярных зон сетчатки. При применении ранибизумаба в дозе 0,2 мг был получен наиболее высокий терапевтический эффект - отсутствие активной РН и неблагоприятных структурных изменений через 24 недели было выявлено 80 % случаев, при использовании ранибизумаба в дозе 0,1 мг - в 75 %, ЛК - в 66 % случаев ($p = 0,051$). В 75 % случаев при применении 0,2 мг ранибизумаба было достигнуто разрешение плюс-болезни в течение 8 дней, после проведения ЛК сетчатки подобный эффект развивался в течение 22,5 дней.

Полученные результаты позволили рекомендовать ранибизумаб к применению у детей с активной РН. Согласно инструкции, у недоношенных детей препарат показан для лечения РН I+, II+, III или III+ стадии в зоне I, III+ стадии в зоне II и ЗАРН. Рекомендуемая доза препарата Луцентис® у недоношенных детей составляет 0,2 мг, что соответствует 0,02 мл раствора, в виде интравитреальной инъекции. Лечение РН начинают с введения одной дозы, при этом инъекции можно проводить в оба глаза в один день. В течение 6 месяцев после начала лечения при признаках активности заболевания может быть проведено до 3 инъекций в каждый глаз. В клинических исследованиях большинству пациентов (78 %) было произведено однократное введение препарата в каждый глаз. Проведение более 3 инъекций в один глаз не изучалось. Промежуток между введениями двух доз в один глаз должен составлять не менее 4 недель [Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Луцентис® ЛСР-004567/8 от 15.06.2020]. Таким образом, в инструкции ранибизумаба отражена возможность повторного введения препарата в случае рецидива РН.

Однако, на сегодняшний день тактика лечения рецидивов РН после антиVEGF - терапии является предметом активной дискуссии. Повторное введение антиVEGF-препарата блокирует продолжающуюся васкуляризацию сетчатки, в связи с этим его применение может быть целесообразно только при наличии высокой сосудистой активности по типу ЗАРН или росте экстраретинальной пролиферации с локализацией процесса в центральной зоне глазного дна. Повторные инъекции антиVEGF-препаратов для лечения реактивации заболевания используются [Gonzales J.M.G. et al, 2018; Wallace D.K. et al., 2018], но большинство исследователей предпочитают все-таки проводить ЛК аваскулярных зон сетчатки [Lyu J. et al., 2016; Gonzales J.M.G. et al., 2018; Chan J.J. et al., 2016; Moshfeghi D.M. et al., 2018]. Сочетание этих методов используется при очень высокой сосудистой активности, сопровождающей реактивацию заболевания [Chan J.J. et al., 2016]. При рецидивах с локализацией демаркации на периферии глазного дна более целесообразно проведение ЛК аваскулярных зон сетчатки [Катаргина Л.А. с соавт., 2020].

Кроме того, в ряде исследований отмечается наличие более высокой частоты рецидивов РН после интравитреального введения Ранибизумаба, чем после проведения ЛК сетчатки. В проспективном рандомизированном исследовании, проведенном Zhang G. с соавт., рецидив РН при монотерапии ранибизумабом в дозе 0,3 мг был выявлен в 13 случаях (26 глаз), при проведении ЛК - у одного ребенка (2 глаза) [Zhang G. et al., 2017]. Еще в одном исследовании на большом клиническом материале (629 глаз 331 пациента) после введения 0,25 мг ранибизумаба реактивация заболевания отмечена в 39 % случаев [Feng J. et al., 2017].

В настоящее время проводится нерандомизированное открытое исследование RAINBOW, направленное на оценку долгосрочной безопасности и эффективности применения ранибизумаба у пациентов с РН. Ключевым показателем эффективности в данном исследовании является острота зрения лучше видящего глаза, кроме этого, оцениваются: частота развития нежелательных явлений, острота зрения глаза с более низким зрением, отсутствие активной РН и

офтальмологических структурных изменений, и наличие рецидивов РН в анамнезе. Завершение исследования планируется к концу 2022 г. (US National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov. NCT02640664).

Таким образом, антиVEGF-терапия открывает новые возможности в лечении строго определенных форм РН. К несомненным достоинствам антиVEGF-терапии конечно следует отнести более высокую клиническую эффективность лечения РН I типа с локализацией в заднем полюсе глаза и ЗАРН, отсутствие «блокады» периферической сетчатки с возможностью продолжения роста сосудов и созревания сетчатки, менее частое развитие миопии высокой степени, возможность проведения лечения пациентов с трудностью визуализации глазного дна и соматически отягощенных пациентов, которым противопоказан наркоз, применяемый для проведения ЛК [Катаргина Л.А. с соавт., 2020].

Однако, следует иметь ввиду, что при применении антиVEGF-препаратов в постпороговых стадиях заболевания существуют повышенные риски прогрессирования пролиферации и развития отслойки сетчатки, недоношенные дети с регрессом ретинопатии после проведения антиVEGF-терапии требуют увеличения длительности регулярного частого наблюдения до 70 недель ПКВ в связи с риском развития рецидива и экстраретинальной пролиферации в отдаленные сроки. Предметом активной дискуссии на сегодняшний день остается тактика лечения рецидивов РН после антиVEGF - терапии.

В связи с этим на сегодняшний день остается актуальным поиск новых подходов для блокирования нескольких ключевых регуляторов ангиогенеза.

I.5. Резистентность к анти-VEGF-терапии и перспективные терапевтические подходы.

Ответ на проведение анти-VEGF-терапии в зависимости от функциональных и морфологических изменений может быть оптимальный (хороший), слабый или отсутствовать [Amoaku W.M. et al., 2015]. Резистентность может развиваться на любом этапе проведения анти-VEGF-терапии, как после первой инъекции, так и после успешного проведения первого этапа лечения и обусловлена может быть

различными патогенетическими механизмами развития патологии. В частности, установлено, что лечебный эффект бевацизумаба после трех инъекций снижается вдвое [Schaal S., et al., 2008; Egghoj M.S. et al., 2011].

При снижении ответа на лекарственный препарат после его введения рекомендуется временное прекращение терапии с последующим переключением на аналогичный препарат [Westfall T.C. et al., 2011]. В подавляющем большинстве случаев на сегодняшний день осуществляется переключение с бевацизумаба на ранибизумаб, с ранибизумаба на бевасцизумаб [Kent J.S. et al., 2012; Aslankurt M. et al., 2013; Ehlken C. E et al., 2014] и с бевасцизумаба/ранибизумаба на афлиберцепт [Ho V.Y. et al., 2013; Messenger W.B. et al., 2014; Cho H et al., 2013].

Предполагаемый механизм, обуславливающий увеличение эффективности терапии при переключении между двумя анти-VEGF-препаратами бевацизумабом и ранибизумабом, обусловлен различной молекулярной массой и ассоциированными с ней особенностями транспорта молекул через сетчатку в субретинальное пространство. Ранибизумаб определяли диффузно во всей сетчатке после интравитреальной инъекции, что связано с его меньшей молекулярной массой. Бевацизумаб также может достигать субретинального пространства с различным распределением препарата в сетчатке после интравитреальной инъекции [Gaudreault J. et al., 2007]. Афлиберцепт - ингибитор VEGF с высокой эффективностью связывания и более широким спектром активности по сравнению с бевацизумабом и ранибизумабом [Stewart M.W. et al., 2012]. В четырнадцати мультицентровых исследованиях показано, что у пациентов, резистентных к ранибизумабу или бевацизумабу, после переключения на афлиберцепт отмечался терапевтический и анатомический эффект [Fassnacht-Riederle H. et al., 2014; Singh R.P. et al., 2014].

На сегодняшний день продолжается поиск и проводятся исследования новых препаратов с анти-VEGF механизмом действия.

В 2019 г. FDA был одобрен новый анти-VEGF препарат для лечения неоваскулярной ВМД – бролицизумаб (Beovu), который представляет собой фрагмент гуманизированного одноцепочечного антитела с молекулярной массой

26 кДа. Эффективность бролицизумаба была продемонстрирована при неоваскулярной ВМД в двух идентично спроектированных исследованиях HAWK и HARRIER (фаза III) [Dugel P.U. et al., 2020]. В данных исследованиях пациентам производилось интравитреальное введение бролицизумаба в дозе 3 мг (только исследование HAWK) и 6 мг, пациентам в группе сравнения вводили афлиберцепт 2 мг. Производились три ежемесячные загрузочные инъекции бролицизумаба затем инъекции делали каждые 12 или 8 недель (в зависимости от активности процесса); инъекции афлиберцепта производились каждые 8 недель. Динамика зрительных функций на 48-й неделе была одинаковая при использовании бролицизумаба и афлиберцепта. При использовании бролицизумаба в дозе 6 мг в 50% случаев до 48-й недели исследования удавалось сохранить 12-недельный интервал между введениями. По данным оптической когерентной томографии (ОКТ) более значительно уменьшилась толщина сетчатки в фовеа при применении бролицизумаба 6 мг, чем при использовании афлиберцепта - в исследовании HAWK (-172,8 мкм и -143,7 мкм; $p = 0,001$), в исследовании HARRIER (-193,8 мкм против -143,9 мкм; $p < 0,001$).

«Allergan» (Ирландия) завершила клинические испытания SEQUOIA и CEDAR (фаза III) - интравитреальное введение препарата Абисипар для лечения неоваскулярной ВМД. Абисипар представляет собой белок с анкириновыми повторами, связывающий все изоформы VEGF-A. В обоих исследованиях пациентам 3 групп вводили: абисипар 2 мг в 1-й день, на 4-й и 8-й неделе, далее каждые 8 недель; абисипар 2 мг в 1-й день, на 4-й и 12-й неделе, далее каждые 12 недель или ранибизумаб каждые 4 недели. Результаты исследования были представлены на совещании Американской академии офтальмологии в 2018 г. [Khurana R.N. et al, 2019]. По завершении 12 месяцев лечения в обоих исследованиях были получены аналогичные результаты – Абисипар, при его 6 и 8 кратном введении, был настолько же эффективен, как Ранибизумаб при его 13 кратном введении. Однако, в группах пациентов с использованием Абисипара, по результатам двух исследований, была значительно выше частота случаев интраокулярного воспаления. На основании полученных результатов исследования

«Allergan» усовершенствовала технологический процесс изготовления Абисипара, что позволило, согласно результатам исследования MAPLE, снизить частоту случаев интраокулярного воспаления до 8,9% [Dugel P.U., 2019].

Компания «Chengdu Kanghong Biotech Co.» (Китай) завершила клиническое исследование PHOENIX (фаза III) - интравитреальное введение препарата Конберцепт у пациентов с неоваскулярной ВМД [Liu K. Et al, 2019]. Данный препарат был одобрен для использования Китайским управлением по контролю за продуктами и лекарствами (China Food and Drug Administration, CFDA) в 2013г. Конберцепт является рекомбинантным гибридным белком, который состоит из второго Ig-домена VEGFR1 и третьего, и четвертого Ig-доменов VEGFR2 на Fc человеческого IgG1. Конберцепт связывает VEGF-A, VEGF-B, PlGF. В исследовании PHOENIX пациентам интравитреально вводили Конберцепт 0,5 мг и placebo. МКОЗ через 3 месяца от начала исследования увеличилась в группе конберцепта на +9,20 букв, в группе placebo на +2,02 буквы ($p < 0,001$); через 12 месяцев - на +9,98 букв и +8,81 букв, ($p = 0,64$), соответственно. В настоящее время фармкомпанией проводятся исследования PANDA-1 и PANDA-2 (фаза III), в которых предполагается сравнить эффективность Конберцепта (0,5 мг и 1,0 мг) и Афлиберцепта (2,0 мг).

Компания «Opthea» (Канада) завершила сравнительное клиническое исследование (фаза IIb) комбинированного применения препарата OPT-302 (0,5 мг и 2 мг), связывающего VEGF-C и VEGF-D с ранибизумабом 0,5 мг. В группе пациентов, где проводилась комбинированная терапия с 2 мг OPT-302, наблюдалось более значительное повышение МКОЗ, по сравнению с группой пациентов, где проводилась монотерапия ранибизумабом ($p = 0,01$); наблюдалось более выраженное снижение толщины сетчатки в фовеа, уменьшение количества субретинальной жидкости, интравитреальных кист и площади неоваскуляризации [Mettu P.S., 2019].

Несмотря на достаточно высокую эффективность, широкое применение анти-VEGF терапии в клинической практике максимальный положительный клинический результат не всегда может быть достигнут в связи с тем, что анти-

VEGF - зависимый механизм ангиогенеза не всегда является основным [Fernández-Robredo P. et al, 2014; Daniel E. et al, 2014; Kim M et al, 2016; Yang S, et 2016].

Патогенетический механизм формирования полипoidalной хориоидальной васкулопатии (ПХВ) и ретинальной ангиоматозной пролиферации (РАП) при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, например, менее VEGF - зависимый, чем механизм формирования хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ). В связи с этим, у пациентов с ПХВ и РАП наблюдается более слабый ответ на проводимую анти-VEGF-терапию [Wong T.Y. et al., 2007; Freund K.B. et al., 2008; Yannuzzi L.A et al., 2008].

В последние годы в развитии ретиноваскулярной патологии сетчатки, помимо семейства VEGF, установлена роль еще целого ряда индукторов неоангиогенеза и широко проводятся экспериментальные и клинические исследования применения препаратов с различными ингибирующими неоваскуляризацию свойствами.

Увеличение экспрессии таких проангиогенных факторов, как TNF, FGF, TGF, ИЛ, PDGF и PlGF может запускать VEGF-независимую неоваскуляризацию и вызывать резистентность к анти-VEGF-препаратам. Установлено, что у пациентов с генетической предрасположенностью к развитию ВМД более высокий уровень изменений воспалительного характера, которые способствуют быстрому прогрессированию заболевания, обуславливают слабый терапевтический ответ и рецидив неоваскуляризации [Фурсова А.Ж. с соавт., 2018].

I.6. TNF- α , как ингибитор ангиогенеза, роль в развитии патологии сетчатки.

TNF- α является членом большого суперсемейства цитокинов, состоящего из более чем 20 пептидов, которое включает в себя группу медиаторов: лимфотоксин (LT), FAS лиганд (FasL), лиганды к дифференцировочным антигенам клеток гемопоэтического ряда (лиганды CD40, CD30, CD27), APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию), TRAIL (TNF-связанный апоптозиндуцирующий лиганд), TWEAK (TNF-подобный индуктор апоптоза), BlyS (стимулятор В-

лимфоцитов), BAFF (фактор, активирующий В-клетки) и RANK лиганд (рецептор - активатор NF- κ B) [Bodmer J.L. et al., 2002].

Члены суперсемейства TNF, главным образом, вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации и апоптоза, некоторые из них, включая TNF- α , LT, FasL, CD30L и CD40L, обладают еще и провоспалительными свойствами, реализуемыми, как было сказано выше, через индукцию ядерного фактора транскрипции NF- κ B [Bazzoni F. et al. 1996; Bodmer J.L. et al., 2002; Mathew S.J et al., 2009].

Существуют две формы TNF- α : трансмембранная (про-TNF) и растворимая (секреторная, зрелая). Первоначально цитокин представляет собой мономер, встроенный в клеточную мембрану и состоящий из 233 аминокислотных остатков (26 кД). Это так называемая трансмембранная форма, которая обуславливает паракринные эффекты TNF- α . Растворимая форма TNF- α образуется путем протеолитического отщепления внеклеточного домена трансмембранной формы за счет действия TACE (TNF-конвертирующего фермента), члена класса трансмембранных протеолитических ферментов, имеющих в своем составе домен матричной металлопротеиназы [Schottelius A.J.G. et al., 2004]. Растворимая форма TNF- α содержит три совершенно идентичных полипептидных цепи, состоящих из 157 аминокислотных остатков (17,3 кД), которые олигомеризуются с образованием активного гомотримера. По своей биологической активности растворимая форма во многом превосходит трансмембранную, и именно с помощью этой формы TNF- α реализует свои основные функции [Schottelius A.J.G. et al., 2004].

Продуцировать TNF- α могут многие клетки организма: В- и Т-лимфоциты, базофилы, эозинофилы, нейтрофилы, тучные клетки, кератиноциты, астроциты, фибробласты, клетки глиии, клетки пигментного эпителия сетчатки, нейроны, основными же источниками синтеза TNF- α являются моноциты и тканевые макрофаги [Bazzoni F. et al. 1996].

Биологическая функция TNF- α реализуется путем связывания лигандов с рецепторами клеток-мишеней. Существуют два типа структурно и функционально различных рецепторов: тип I (TNF-RI; p55; CD120a) и тип II (TNF-RII; p75; CD120b), представляющих собой трансмембранные гликопротеиды. TNF-RI более

широко распространены и одинаково представлены на всех клетках организма, а TNF-RII преимущественно экспрессируются на эндотелиальных клетках и клетках гемопоэтического ряда [Al-Lamki R.S. et al., 2011].

Связь TNF- α с TNF-RI прочная, практически необратимая в связи с очень медленной скоростью диссоциации, сродство TNF- α с TNF-RII значительно ниже. При низкой концентрации TNF- α TNF-RII может выступать в роли депо цитокина, задерживая его в организме и обеспечивая, в случае необходимости, передачу сигнала на TNF-RI [Al-Lamki R.S. et al., 2011].

Через TNF-RI реализуются апоптотический и провоспалительный сигнальные пути, запуск которых осуществляется в результате последовательного взаимодействия ряда белков-посредников. К ним относится RIP (взаимодействующий с рецептором белок), передающий сигнал TRADD (белку домена смерти), с которого непосредственно начинаются апоптотический и провоспалительный сигнальные пути. TNF-RI активирует тот же апоптотический путь, что и FAS (основной путь реализации апоптоза), общим этапом при этом является активация FADD (Fas - ассоциированного белка домена смерти). Провоспалительный путь реализуется путем взаимодействия TRADD с TRAF-1 и TRAF-2 и активации ядерного фактора κ B (NF- κ B) (Bouwmeester T. et al., 2004). Третий сигнальный путь, реализуется через TNF-RII, посредством этого пути осуществляется контроль межклеточных взаимодействий, пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток. Индукция этого сигнального пути осуществляется с помощью активации TRAF-2, запускающего процесс последовательного фосфорилирования MAPK (активированной митогеном протеинкиназы) с последующей активацией транскрипционного AP1 (белок-активатор 1) [Zhao Y. et al., 2007; Al-Lamki R.S. et al., 2011].

В последнее время в офтальмологии появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что нейродегенеративные процессы в области сетчатки и зрительного нерва развиваются в результате взаимодействия TNF- α с рецептором смерти TNF-1 (TNF-R1).

Tezel G. с соавт. (2001) выявили, что у пациентов с глаукомой во внутренних слоях сетчатки (постмортальный материал) достоверно более высокие уровни содержания белка и экспрессии генов TNF- α (глиальные клетки) и TNF-R1 (ганглиозные клетки).

Увеличение уровня содержания TNF- α в глиальных клетках в преламинарной и ламинарной областях головки зрительного нерва и TNF-R1 в ганглиозных клетках в преламинарной области у пациентов с глаукомой (постмортальный материал) выявили в своем исследовании Yan X. С соавт. (2000). Повышенная экспрессия генов TNF- α и TNF-R1 выявлена также в сетчатке животных с экспериментальной моделью глаукомы [Ahmed F. et al., 2004].

Для того, чтобы оценить специфическую роль передачи сигналов с TNF-R1 в индукции смерти ганглиозных клеток сетчатки было проведено исследование с использованием экспериментальной модели повреждения зрительного нерва у нокаутных мышей TNF-R1 [Tezel et al., 2004]. Считается, что механизм дегенерации зрительного нерва при его компрессии в определенной степени имитирует нейродегенеративные процессы при глаукоме. Подсчет ганглиозных клеток сетчатки и их аксонов через 6 недель после травмы продемонстрировал, что их потеря была значительно меньше у мышей с нокаутом TNF-R1 по сравнению с контролем. Аналогичные данные были получены при использовании ингибитора c-Jun N-терминальной протеинкиназы (JNK) у не нокаутных мышей. Полученные данные свидетельствуют о том, что передача сигналов с TNF-R1 индуцирует гибель ганглиозных клеток сетчатки при участии JNK.

На лазер - индуцированной экспериментальной модели глаукомы у животных и при интравитреальном введении TNF- α интактным животным было выявлено увеличение уровня содержания TNF- α в ткани сетчатки с последующей дегенерацией сначала олигодендроцитов зрительного нерва, затем ганглиозных клеток. При использовании анти-TNF- α -нейтрализующего антитела снижение количества олигодендроцитов не наблюдалось. При этом при воспроизведении экспериментальной модели глаукомы у нокаутных мышей по TNFR1 - / - и TNFR2 - / - потеря олигодендроцитов и ганглиозных клеток сетчатки наблюдалась только

у мышей нокаутных по TNFR1 - / -. Таким образом индуцированная дегенерация олигодендроцитов и потеря ганглиозных клеток сетчатки обусловлена TNF- α , взаимодействующим с TNFR2. [Nakazawa T. et al., 2006].

Увеличение уровня содержания TNF- α было выявлено в ткани сетчатки у крыс при цисплатин-индуцированном повреждении сетчатки [Karakurt Y. et al., 2018].

Установлено, что TNF- α играет важную роль в функциональном и морфологическом повреждении сетчатки при ее ишемическом - реперфузионном повреждении (экспериментальная модель). Максимальный уровень его экспрессии наблюдается через 12 - 24 часа после повреждения, через 72 часа уровень резко снижается. По данным ЭРГ через 7 дней после ишемического - реперфузионного повреждения при интравитреальном введении рекомбинантного TNF- α через 48 часов после реперфузии наблюдается выраженное функциональное повреждение сетчатки, при введении через 2 часа - незначительное, а при ингибировании TNF- α до или сразу после повреждения функции сетчатки сохраняются. Как уже было сказано выше, биологическая функция TNF- α реализуется при его связывании с определенными рецепторами клеток-мишеней - TNF-RI или TNF-RII и активации тех или иных сигнальных путей. Авторы высказали предположение, что повреждающий эффект TNF- α в определенный период времени после повреждения (48 часов) связан с запуском определенных путей реализации его эффектов [Berger S. et al., 2008].

TNF- α является эффективным модулятором функции эндотелиальных клеток, но проявление его биологических эффектов также зависит от определенных условий.

В зависимости от состояния сосудов TNF- α может вызывать воспаление путем индуцирования выживания и активации эндотелиальных клеток или, наоборот, некроз путем индуцирования апоптоза.

После инициации воспалительной реакции TNF- α , как и многие другие цитокины, индуцирует коагуляцию, активирует экспрессию адгезивных молекул в клетках эндотелия сосудов и повышает проницаемость кровеносных сосудов.

При кратковременном повышении уровня содержания TNF- α усиливается пролиферация эндотелиальных клеток, при высоком уровне его содержания в течение длительного периода времени, наоборот, блокируется [Giraud E. et al., 1998].

У недоношенных детей с доклинической стадией РН, переходящей впоследствии в пороговую, в отличие от детей с РН с самопроизвольным регрессом в сыворотке крови выявлен более высокий уровень провоспалительных цитокинов - TNF- α , IL-18, IL-8, IL-5, IL-1 β с одновременной тенденцией к более частому их обнаружению [Катаргина Л.А., с соавт.2015].

У недоношенных детей, которые впоследствии лечились по поводу РН в плазме пуповинной крови через 24 часа после рождения была выявлен более высокий уровень содержания TNF- α и IL-6 ($p < 0,05$); достоверно более высокий уровень IL-6 сохранялся у детей с РН в течение 12 недель после рождения, уровень TNF- α в более поздний постнатальный период у детей с РН был незначительно выше, чем у детей без РН [Hellgren G. et al., 2018].

В то же время Sato T. с коллегами [Sato T. et al., 2009] проанализировали уровень цитокинов в стекловидном теле 19 пациентов с IV стадией РН и пришли к выводу, что уровень VEGF в значительно большей степени коррелирует с сосудистой активностью в глазах детей с РН, чем про- и противовоспалительные цитокины.

Таким образом, TNF- α в отношении клеток сетчатки обладает выраженным повреждающим эффектом, в эндотелиальных клетках сосудов сетчатки может вызывать воспаление, активировать экспрессию адгезивных молекул, усилить пролиферацию и индуцировать апоптоз. Клеточные эффекты TNF- α зависят от типа рецепторов, типа и функционального состояния клеток, от концентрации и продолжительности воздействия TNF- α и от одновременно оказываемого на клетку воздействия цитокинов (даже от их временной последовательности воздействия). Понимание молекулярных и клеточных TNF-опосредованных эффектов в сетчатке безусловно представляет определенный интерес в связи с возможностью развития

в дальнейшем новых эффективных терапевтических направлений при различной патологии сетчатки.

I.7. Инфликсимаб - ингибитор TNF- α при патологии сетчатки

Применение ингибиторов TNF- α при патологии сетчатки, связанной с формированием неоваскуляризации, может быть целесообразно, как в качестве альтернативы, так и в комбинации с проводимой анти-VEGF терапией. В качестве альтернативы ингибиторы TNF- α могут быть использованы при резистентности или наличии противопоказаний к анти-VEGF терапии. Комбинированное применение анти-VEGF и анти-TNF- α терапии может позволить усилить антиангиогенный эффект анти-VEGF препаратов, сократить количество их применения и предотвратить возможные неблагоприятные эффекты, связанные с неселективной блокадой VEGF.

На сегодняшний день группа препаратов, блокирующих биологическую активность TNF- α , представлена большим количеством генно-инженерных препаратов - специфических моноклональных антител: инфликсимаб (ремикейд), адалимумаб (хумира), голимумаб (симпони), сертолизумаб пэгол (симзия).

Инфликсимаб - химерное моноклональное антитело с высокой специфичностью, блокирующее как циркулирующий, так и фиксированный на клеточных мембранах TNF- α является родоначальником среди ингибиторов TNF- α .

На экспериментальной модели лазерного повреждения было установлено, что инфликсимаб при интравитреальном введении позволяет блокировать формирование хориоидальной неоваскуляризации, обладая дозозависимым эффектом; при использовании препарата в дозе 1,5 и 15 мг формирование хориоидальной неоваскуляризации, по данным авторов, сокращалось на 11% и 68% ($P < 0,01$), соответственно [Olson J.L. et al., 2007].

На экспериментальной модели пролиферативной витреоретинопатии было выявлено, что при интравитреальном введении инфликсимаба снижается уровень содержания в сетчатке цитокинов - TNF- α , IL-1, IL-6 и трансформирующего фактора роста -TGF- β [Savur F. et al., 2020].

Regatieri C.V. с соавт. (2009) на модели лазер-индуцированной хориоидальной неоваскуляризации выявили, что при интравитреальном введении инфликсимаба в дозах 10-40 мкг в сетчатке снижается уровень содержания ангиогенных факторов (VEGF, TGF- β), а при использовании препарата в высоких дозах (320 мкг) развивается цитотоксический эффект - на 20% сокращается жизнеспособность клеток пигментного эпителия сетчатки.

Theodossiadis P.G. с соавт. (2009) также выявили, что при интравитреальном введении инфликсимаба в дозе 5 мг и выше у животных (кролики) развивается диффузный отек сетчатки, степень выраженности которого увеличивается по мере увеличения дозы препарата. Giansanti F. с соавт. (2008) установили, что при интравитреальном введении 3,3 мг инфликсимаба развивается выраженный отек волокон зрительного нерва и не формируется при использовании препарата в дозах 1 и 1,7 мг.

Период полувыведения инфликсимаба при интравитреальном введении составляет 6,5 - 8,5 дней [Giansanti F. et al., 2008, 2009], бевацизумаба для сравнения - 4,3 дня [Bakri S.J. et al., 2007].

Theodossiadis P.G. с соавт. (2009) в связи с отсутствием положительных результатов лечения трех пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и субретинальной неоваскулярной мембраной при применении Луцентиса использовали инфликсимаб. Препарат вводили дважды интравитреально с интервалом 2-3 месяца, у всех пациентов в результате проведения лечения повысилась острота зрения и уменьшилась толщина сетчатки в макулярной зоне, никаких осложнений и побочных эффектов у пациентов выявлено не было.

Arias L. с соавт. (2010) также провели исследование по изучению эффективности и безопасности применения инфликсимаба у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией, резистентных к анти-VEGF терапии (бевацизумаб или ранибизумаб) при его интравитреальном введении (2 мг/0,05 мл). По результатам визометрии, ОКТ и ФАГ ни у одного из четырех пациентов, по данным авторов, не наблюдалось положительной динамики.

Giganti M. с соавт. (2010) провели исследование применения инфликсимаба у 2 пациентов с диабетическим макулярным отеком при его интравитреальном введении. Через 3 месяца по данным ОКТ у пациентов сохранялся макулярный отек.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать предположение, что Инфликсимаб - ингибитор TNF- α может являться реальным претендентом на применение его в офтальмологии в качестве ингибитора ангиогенеза. Установлено, что эффект при его использовании может быть положительным (антиангиогенным и противовоспалительным), дозозависимым, слабым и отсутствовать. Остается вопрос от каких факторов зависит результат, существуют ли “предикторы” того или иного ответа на проведение лечения.

Для того, чтобы получить ответ необходимо проведение более детальных и всесторонних исследований, направленных на изучение влияния ингибиторов TNF- α на процесс развития ретинального патологического ангиогенеза в зависимости от дозы и условий его применения.

I.8. Агонисты PPAR рецепторов, как ингибиторы неоваскуляризации.

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что еще одной из возможных терапевтических мишеней при патологии сетчатки, связанной с формированием неоваскуляризации, могут являться PPARs.

PPARs - ядерные рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором, которые регулируют экспрессию генов. Идентифицировано 3 изоформы PPARs: альфа, гамма и дельта (бета) с различным числом аминокислотных остатков, обладающих различными функциями [Auboeuf D. et al., 1997]. Экспрессируются PPARs в тканях с высоким уровнем митохондриального окисления жирных кислот - в печени, почках, сердце, скелетных мышцах и сетчатке, присутствуют в моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках [Auboeuf D. et al., 1997; Cano M. et al., 2008]. В сетчатке PPARs интенсивно экспрессируются во всех слоях [Herzlich A.A. et al., 2009], только в клетках

пигментного эпителия выявлены представители всех типов PPARs - PPAR α , PPAR β /61, PPAR β /62, PPAR γ 1 и PPAR γ 2 [Dwyer M.A. et al., 2011].

В эндотелиальных клетках PPAR α , PPAR β / δ и PPAR γ регулируют процессы клеточной пролиферации, ангиогенеза, адгезии, агрегации и воспаления. PPAR α и PPAR γ обладают преимущественно антиангиогенными свойствами (увеличивают экспрессию антиангиогенных и ингибируют экспрессию проангиогенных факторов). PPAR β / δ обладают проангиогенными свойствами, участвуют в процессах клеточной пролиферации, ангиогенеза и воспаления [Bishop-Bailey D. et al., 2011].

К PPAR α -агонистам относятся препараты фармакологической группы фибраты - Фенофибрат, Трайкор и др. с основным гиполипидемическим механизмом действия.

В результате проведения двух крупных рандомизированных контролируемых клинических исследований Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) (9795 пациентов) и Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Study Affect Diabetic Retinopathy (The ACCORD Eye Study) (10251 пациентов) было установлено, что у пациентов с СД 2 типа при использовании фенофибрата (производное фиброевой кислоты) течение диабетической ретинопатии носит более благоприятный характер, снижается частота прогрессирования патологии по шкале ETDRS и, в связи с этим, реже проводится лазерное лечение [Keech A.C. et al., 2007; Group A.S. et al., 2010].

Полученные результаты обусловлены плеiotропными эффектами PPAR- α -агониста фенофибрата - гиполипидемическим, противовоспалительным, антиангиогенным и антиапоптотическим [Noonan J.E. et al., 2013].

Пути реализации указанных эффектов различные, основным из которых является супрессия нуклеарного фактора каппа В (NF- κ B), который участвует в транскрипционном контроле генов, кодирующих множество биологических процессов.

Под транскрипционным контролем NF- κ B находится категория генов, кодирующих такие факторы роста, как фактор роста нервов (NGF), фактор роста

эндотелия сосудов (VEGF), протеин, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP), костный морфогенетический белок (BMP), фактор роста фибробластов (FGF) [Kiriakidis S. et al., 2003].

Под его контролем находится большинство генов, кодирующих синтез биологически активных веществ, участвующих в иммунном ответе и воспалительных реакциях. К ним относятся цитокины (TNF- α , IL-1 β , IL-2, 3, 6, 12 и др.), белки острой фазы (С-реактивный белок), хемокины (моноцитарный хемотактический протеин 1 (MCP-1) и молекулы адгезии (молекула межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1), Е-селектина и молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1)) [Саамайо J. et al., 2002; Verma S. et al., 2003; Tripathi P. et al., 2006; Chen Y. Et al., 2007; Колпакова А.Ф., с соавт., 2009; Sprague A.H., et al., 2009; Tilstra J.S. et al., 2011].

К еще одной биологической функции NF- κ B относится регуляция процессов апоптоза - регуляция транскрипции как проапоптозных, (Bim, Bax, Fas и каспазы 11), так и антиапоптозных (X-сцепленного белка апоптоза (XIAP), Bcl-2, cFlip) генов [Kaltschmidt B. et al., 2000].

Подтверждением наличия указанных эффектов у PPAR α -агонистов, к которым относятся препараты группы фибратов, являются проведенные в последние годы исследования.

Установлено, что в результате активации PPAR α блокируется VEGF - индуцированная пролиферация эндотелиальных клеток пупочной вены человека за счет снижения экспрессии VEGFR2 - рецептора VEGF [Meissner M. et al., 2004], блокируется неоваскуляризация роговицы за счет повышения продукции антиангиогенных факторов (тромбоспондин-1, эндостатин) и ингибирования фактора роста фибробластов, обладающего проангиогенными свойствами [Panigrahy D. et al., 2008].

В рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании было установлено, что в результате проведения терапии фенофибратом в течение 12 недель у пациентов снижается уровень маркеров эндотелиальной дисфункции и

провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF- α), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1 (IL-1) [Ryan K.E. et al., 2006].

При пероральном использовании фенофибрата у животных со стрептозотоциновым диабетом было выявлено, что снижается уровень содержания в сетчатке NF- κ B, моноцитарного хемотактического протеина 1 (MCP-1) и растворимого ICAM-1 (sICAM-1), в результате чего отмечалось уменьшение проницаемости и лейкостаза в сосудах сетчатки [Chen Y. et al., 2013].

При интравитреальном введении 3-5 мкл (125 мкмоль/л) фенофибрата экспериментальным животным со стрептозотоциновым диабетом и кислород-индуцированной ретинопатией (КИР) также было выявлено снижение проницаемости сосудов сетчатки. У животных с КИР в ткани сетчатки на 16 сутки уровни содержания ишемического фактора HIF-1 α , VEGF и площадь неоваскуляризации сетчатки были значительно меньше, чем в контроле [Chen Y. et al., 2013].

При использовании фенофибрата у нокаутных PPAR α -/- животных со стрептозотоциновым диабетом проницаемость сосудов сетчатки у них не отличалась от контрольных животных, у животных с КИР - уровень VEGF в ткани сетчатки не отличался от контроля, что свидетельствует о том, что основные эффекты фенофибрата реализуются путем активации PPAR α [Chen Y. et al., 2013].

В развитии ангиопатии важную роль играет апоптоз эндотелиальных клеток. Выявлено, что фенофибрат снижает активность процессов апоптоза в культуре гломерулярных эндотелиальных клеток [Staels B. et al., 1998], регулирует выживаемость эндотелиальных клеток в сетчатке и предотвращает их гибель от апоптоза [Kim J. et al., 2007]. Фенофибрат также может подавлять апоптоз перицитов. Установлено, что специфическая активация АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) предотвращает липотоксичность перицитов сетчатки крупного рогатого скота [Cacicedo J.M. et al., 2011].

Deng G. с соавт. (2017) провели исследование применения нового агониста PPAR α - Y-0452 и выявили, что он индуцирует транскрипционную активность PPAR α и усиливает экспрессию PPAR α в клетках, экспрессирующих PPAR α - PPRE

(PPAR Response Element); увеличивает уровень экспрессии PPAR α и ингибирует NF- κ B путь в клетках линии R28 (получена из предшественников фоторецепторов); блокирует миграцию эндотелиальных клеток. При его применении в течение 1 месяца у животных с стрептозотоциновым диабетом и у животных с КИР в возрасте от 12 до 16 суток (ежедневные внутрибрюшинные инъекции Y-0452 10 мг/кг/день) уменьшалась потеря перicyтов, снижалась проницаемость и лейкостаз сосудов сетчатки, блокировался апоптоз клеток сетчатки; у животных с КИР площади зон сосудистой облитерации и неоваскуляризации были достоверно меньше, чем в контроле. У нокаутных мышей PPAR α -/- при использовании Y-0452 площадь зон сосудистой облитерации и неоваскуляризации не отличалась от контроля, что также свидетельствует о том, что основные эффекты фенофибрата реализуются путем активации PPAR α [Deng G. et al., 2017].

Tomita Y. С соавт. (2019) в своем исследовании продемонстрировали, что патологический ангиогенез у мышей с КИР еще более эффективно, чем фенофибрат блокировал селективный модулятор PPAR α (SPPARM α) пемафибрат (ежедневно, 12 – 16 сутки, через желудочный зонд).

Установлено, что фенофибрат может дополнительно защищать от повреждения сосудистые клетки сетчатки за счет уменьшения образования модифицированных частиц ЛПНП, токсичных для эндотелиальных клеток и перicyтов капилляров сетчатки [Wu M. et al., 2008]. Окисленные ЛПНП были обнаружены в образцах сетчатки пациентов с диабетической ретинопатией, они увеличивают проницаемость ретинальных сосудов за счет снижения экспрессии тканевого ингибитора MMP-3 в перicyтах [Barth J.L. et al., 2007; Wu M. et al., 2008].

Фенофибрат снижает проницаемость пигментного эпителия сетчатки. При культивировании клеток ARPE-19 (линия клеток человека RPE) в присутствии высокого уровня глюкозы и IL-1 β в результате активации AMPK развиваются процессы, которые приводят к индуцированной дезорганизации белков плотных контактов, нарушению плотности клеточного монослоя, его гиперпроницаемости и разрушению клеток [Villarreal M. et al., 2011]. Фенофибриновая кислота предотвращает активацию AMPK и формирование индуцированной

гиперпроницаемости [Kim J. et al., 2007]. В еще одном исследовании также установлено, что фенофибриновая кислота в клетках ARPE-19, культивируемых с высоким содержанием глюкозы и IL-1 β , снижает проницаемость монослоя и сверхэкспрессию компонентов базальной мембраны фибронектина и коллагена IV [Trudeau K. et al., 2011]. Кроме того, установлено, что в клетках ARPE-19, культивируемых в присутствии высокого уровня глюкозы и условиях гипоксии, увеличивается продукция активных форм кислорода и повышается уровень стрессовых и апоптотических клеточных маркеров. Фенофиброевая кислота ингибировала эти изменения и усиливала передачу сигналов выживания рецептора IGF-1 [Miranda S. et al., 2012].

Кроме того, установлено, что фенофибрат обладает еще одним механизмом действия, который также может представлять интерес - ингибирование сигнального пути Wnt (Wingless/Integrated), молекулы которого передают «приказы» клеток-«начальников» клеткам-«подчиненным». Для того чтобы воздействовать на клетку-мишень, Wnt должен связаться с клеточными рецепторами - трансмембранным белком Фрайзлед Frizzled (Fz) и липопротеидами низкой плотности LRP5/LRP6. Механизмы воздействия Wnt на клетку подразделяют на: канонический (β -катенин -зависимый) путь, который, контролирует программы генной экспрессии [Amerongen R., 2009] и неканонические (β -катенин -независимые) пути [Amerongen R., 2012], которые регулируют полярность клетки, стимулируя реорганизацию цитоскелета [May-Simera H.L. et al., 2012] и метаболизм кальция [Cadigan K.M. et al., 2012].

В эндотелиальных клетках сетчатки фенофибрат ингибирует передачу сигналов Wnt, через трансмембранный белок Фрайзлед Frizzled (Fz) и липопротеиды низкой плотности LRP5/LRP6, в результате чего в цитоплазме не накапливается β -катенин и не активируется транскрипция проангиогенных факторов [Chen Y. et al., 2011].

Таким образом, фенофибрат, как PPAR α -агонист, обладает антиангиогенными, противовоспалительными антиапоптотическими и гиполипидемическими свойствами. При пероральном и интравитреальном

способах его применения у экспериментальных животных со стрептозотоцинзависимым сахарным диабетом и КИР снижаются показатели потери перицитов и проницаемости сосудов сетчатки, уменьшаются лейкостаз в сосудах сетчатки и площадь формирующихся зон сосудистой облитерации, блокируются апоптоз клеток сетчатки и неоваскуляризация, снижается проницаемость пигментного эпителия сетчатки. При применении фенофибрата у пациентов с СД снижается уровень маркеров эндотелиальной дисфункции и провоспалительных цитокинов, течение диабетической ретинопатии носит более благоприятный характер - снижается частота прогрессирования патологии. Полученные результаты позволяют предположить, что фенофибрат и его аналоги могут быть более широко использованы в клинической практике при патологии сетчатки и прежде всего в качестве ингибиторов неоангиогенеза. Однако, для этого необходимо найти наиболее оптимальный способ его применения.

В исследовании Lu В. с соавт. (2014) было установлено, что при использовании фенофибрата в инстилляциях его концентрация и концентрация его активного метаболита - фенофибровой кислоты, активирующей рецепторы PPAR α , была значительно выше, чем при пероральном применении. Авторами было также установлено, что применение фенофибрата в инстилляциях является безопасным и эффективным. Роговица остается прозрачной, слезная пленка сохраняет свои физико-химические свойства, активность апоптоза в клетках сетчатки не отличается от контроля. Установлено также, что при инстилляциях фенофибрата в течение 4 недель у крыс со стрептозотоциновым диабетом достоверно ниже уровень лейкостаза в сосудах сетчатки и их проницаемость.

Таким образом, применение фенофибрата в инстилляционной форме безусловно представляет интерес, но для того, чтобы выяснить эффективность его применения в такой лекарственной форме необходимо проведение дальнейших детальных исследований.

Определенный интерес на сегодняшний день представляет препарат **пиоглитазон** из группы тиазолидиндионов (глитазонов) - селективных агонистов ядерных рецепторов PPAR γ .

На экспериментальной модели индуцированной хориоидальной неоваскуляризации выявлено, что пиоглитазон, активируя экспрессию PPAR γ в сетчатке животных, блокирует проангиогенные эффекты bFGF (фактора роста фибробластов) и предотвращает активное формирование неоваскуляризации [Aljada A. et al., 2008]. При применении пиоглитазона на модели кислород-индуцированной ретинопатии было выявлено, что уменьшаются площадь неоваскуляризации и площадь облитерированных сосудов сетчатки и увеличивается площадь физиологической васкуляризации [Higuchi A. et al., 2010].

При индуцированном подавлении экспрессии PPAR γ в сетчатке, развивающейся у животных с экспериментальным диабетом и кислород-индуцированной ретинопатией, наоборот, нарушается барьерная функция эндотелия и активно начинается формироваться неоваскуляризация [Wang F. et al., 2008; Tawfik A. et al., 2009].

У экспериментальных крыс BBZDR/Wor с сахарным диабетом 2 типа было выявлено, что при внутрибрюшинных инъекциях пиоглитазона в дозе 25 мг/кг в течение 2 месяцев в сетчатке достоверно более низкий уровень TNF- α (снижение фосфорилирования IRS-1^{Ser-307}) и более высокие уровни PPAR γ и антиапоптатических маркеров, чем у не леченных животных, что сопровождается более высокой функциональной активностью сетчатки, по данным ЭРГ [Jiang Y. et al., 2014].

При ишемическом - реперфузионном повреждении (экспериментальная модель) пиоглитазон (парабульбарное или внутрибрюшинное введение) ингибирует сигнальный путь NF- κ B, блокирует индуцируемое увеличение экспрессии GFAP и апоптоз в нейрональных клетках сетчатки [Zhang X.-Y. et al., 2013].

Кроме того, PPAR γ обладают нейропротективным действием, предотвращая накопление жирных кислот в сетчатке [Ershov A.V. et al., 2000]. При активации PPAR γ повышается экспрессия и активируются ферменты антиоксидантной системы - супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза [Bordet R. et al., 2006].

При диабетической ретинопатии пиоглитазон корректирует дисбаланс между NO и эндотелином [Kim J. et al., 2005; Omae T., et al., 2011].

Однако, данный препарат пациентам с сахарным диабетом 2 типа рекомендуется назначать с осторожностью в связи с возможностью формирования отека макулы. По результатам исследования одних авторов макулярный отек в группах пациентов с сахарным диабетом 2 типа использующих тиазолидиндионы в комплексном лечении развивается в 1,3%, не использующих тиазолидиндионы - в 0,2% случаев [Fong D.S. et al., 2009; Idris I. et al., 2012]. По результатам другого исследования наличие связи между макулярным отеком у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и применением тиазолидиндионов выявлено не было [Ambrosius W.T. et al., 2010].

Полученные результаты позволяют предположить, что данные препараты могут являться реальными претендентами на роль ингибиторов неоангиогенеза в офтальмологии. Для подтверждения этого предположения необходимо провести более детальные, всесторонние исследования.

1.9. Лазерная коагуляция сетчатки и ретинальная экспрессия генов ангиогенеза.

Лазерные методы лечения на сегодняшний день относятся к основным и наиболее эффективным методам лечения целого ряда патологии глазного дна, таких как, диабетическая ретинопатия, окклюзии вен сетчатки, возрастная макулодистрофия и др. [Дога А.В. с соавт., 2013; Качалина Г.Ф. с соавт., 2004, 2013].

Известно, что важную роль в достижении биологических эффектов лазерного воздействия играет модуляция ретинальной экспрессии генов [Wilson A.S., 2003; Martin G., 2018].

Так, при аргон-лазерной коагуляции у мышей было выявлено увеличение ретинальной экспрессии гена рецептора ангиотензина 2 типа (**Agtr2**) - ингибитора экспрессии VEGF и VEGF-индуцированного ангиогенеза и снижение экспрессии гена, кодирующего интерлейкин-1 β , который индуцирует выработку VEGF

эндотелиальными клетками сосудов, снижение экспрессии генов, кодирующих факторы роста фибробластов (*Fgf 14 u 16*) и ингибитор активатора плазминогена 2 (*Pai2*), активирующих эндотелиальную пролиферацию [Wilson Ann S. et al., 2003], снижение экспрессии генов, кодирующих липидфосфатазу 3 (*Ppar2b*) и тромбосподин 1 (*Tsp1*) – регуляторов ангиогенеза [Binz N. et al., 2006].

При воздействии порогового лазерного излучения 577 нм на сетчатку мышей было выявлено увеличение экспрессии генов VEGF-A и VEGFR2 в 1,5 и 2,3 раза соответственно. При воздействии субпорогового излучения в микроимпульсном режиме - увеличение в 6 раз экспрессии аквапарина 3 (*Aqp*) - стимулятора ангиогенеза (повышение эндотелиальной инвазии) и снижение экспрессии промоутеров ангиогенеза CLR рецептора ангиопоэтина-1 и адреномедулина в 0,6 и 0,5 раза, соответственно [Hirabayashi K. et al., 2020].

Субпороговые микроимпульсные режимы лазерного воздействия с желтым спектром излучения (577 нм) в последние годы все более широко используются в клинической практике.

К преимуществам лазерного излучения с длиной волны 577 нм относятся: минимальная степень его поглощения ксантофильным макулярным пигментом (максимальная – оксигемоглобином), что делает его применение относительно более безопасным - минимальная ретиальная фототоксичность, особенно вблизи фовеа [Scholz P. et al., 2017]; минимальное рассеивание при прохождении через преломляющие среды глаза по сравнению с лазерными излучениями с длинами волн зеленого спектра (532 нм) и другими длинами волн желтого спектра (561 и 568 нм) [Yadav N.K. et al., 2014; 2015]; возможность использования более низкого уровня мощности по сравнению с лазерными излучениями зеленого (длина волны от 521 до 532 нм) спектра для обеспечения воздействия на сетчатку [Sramek, C.K. et al., 2012] и снижение в связи с этим болевых ощущений и дискомфорта у пациентов [Murtaza K. et al., 2018].

При микроимпульсном режиме воздействия равномерное лазерное излучение разделяется на серию повторяющихся ультракоротких микросекундных импульсов, что позволяет достичь контролируемого повышения температуры в

клетках-мишенях (меланопротеиновые гранулы ретинального пигментного эпителия), избежать их необратимого повреждения, индуцировать экспрессию цитокинов ретинального пигментного эпителия и достичь минимального повреждения окружающих тканей [Luttrull J.K. et al., 2012; Vujoyevic S et al., 2013, 2015; Duh E.J. et al., 2002; Sohn H.J. et al., 2011; James G. et al., 2017]. Точные же биологические эффекты лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме на сегодняшний день остаются не до конца изученными [Vujoyevic S. et al., 2015].

Microarray transcription analysis в офтальмологии на сегодняшний день используется достаточно широко, в связи с тем, что позволяет изучать основы офтальмопатологии с молекулярно-генетической точки зрения, разрабатывать новые способы лечения и оценивать результаты их применения [Yoshida S. 2002; Yoshimura N., 2003; Vazquez-Chona, F., 2004; Chen L., 2004; Ahmed F. et al., 2004; Gerhardinger C., 2005; Rattner A., 2005; Chiha W., 2018; Ono A., 2018; Martin G., 2018]. Проведение исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов воздействия на сетчатку лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме с использованием microarray transcription analysis позволит идентифицировать ключевые регуляторные факторы и/или реакции, отвечающие за клинический эффект, расширить показания к его применению, определить наиболее оптимальные стратегии и повысить эффективность лазерного лечения целого ряда патологий глазного дна.

В связи с тем, что в формировании каждой из указанных выше патологий глазного дна важную роль играет васкулоэндотелиальный фактор роста (Vascular endothelial growth factor - VEGF) [Fujikawa M, 2013; Gardner T. W., 2002; Penn J. S., 2008; Shin E. S., 2014; Tarr J.M., 2013] изучение молекулярно-генетических механизмов влияния микроимпульсного режима лазерного воздействия с длиной волны 577 нм на сетчатку целесообразно проводить в условиях повышенного уровня VEGF и VEGF - индуцированного патологического состояния. Установлено, что через сутки после однократного интравитреального введения животным 50 нг/мл VEGF увеличивается сосудистая проницаемость более, чем в 3

раза и развивается отек сетчатки [Scheppke L., 2008; Suarez S., 2014; Xu Q., 2001], а в период времени с 3 по 7 сутки (3,5 мкг VEGF) активно развивается неоваскуляризация сетчатки [Золотых О.В., 2013].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа состояла из трех экспериментальных разделов. Первый раздел – Изучение роли TNF-а в процессе формирования ретинальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией и механизма реализации его действия. Оценка эффективности TNF- α , VEGF и TNF- α -VEGF блокады в регуляции неоангиогенеза у животных с кислород-индуцированной ретинопатией.

Второй раздел – Роль PPAR рецепторов в механизме регуляции ретинального неоангиогенеза и эффективность применения PPAR α и PPAR γ агонистов у животных с кислород-индуцированной ретинопатией.

Третий раздел – Возможность и эффективность коррекции VEGF - индуцированных изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза в результате применения лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах.

II.1. Изучение роли TNF-а в процессе формирования ретинальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией (первый раздел)

II.1.1 Характеристика экспериментального материала

Работа по первому разделу проведена на 127 крысах линии albino Wistar, выращенных в питомнике лабораторных животных «Столбовая» Российской Академии Медицинских Наук. Исследования проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных (National Academy press, 1996).

Albino Wistar – это аутбредная линия крыс, выведенных в Институте Вистар в 1947. Это генетически контролируемая закрытая колония нелинейных крыс.

На протяжении всего периода эксперимента животные находились в стандартных условиях вивария вместе с кормящими матерями с соблюдением этических норм обращения с лабораторными животными (Страсбург, 1986 г., Приказ МЗ РФ № 267 от 2003 года).

Для создания модели кислород-индуцированной ретинопатии с 7 по 12 день жизни животные вместе с кормящими самками находились в условиях гипероксии - в инкубаторе, подключенном к кислородному концентратору Atmung 5L-I с непрерывной подачей 100% кислорода под давлением (насыщенность кислорода в инкубаторе составляла $75 \pm 5\%$). Для предотвращения формирования респираторного дистресс - синдрома у самок производилась их замена; с этой целью, для подкорма и проведения очистительных работ инкубатор ежедневно открывался не более чем на 5 минут. На 12 день жизни животные переводились в комнатные условия - условия относительной гипоксии (содержание кислорода 21%) (Рис. 1).

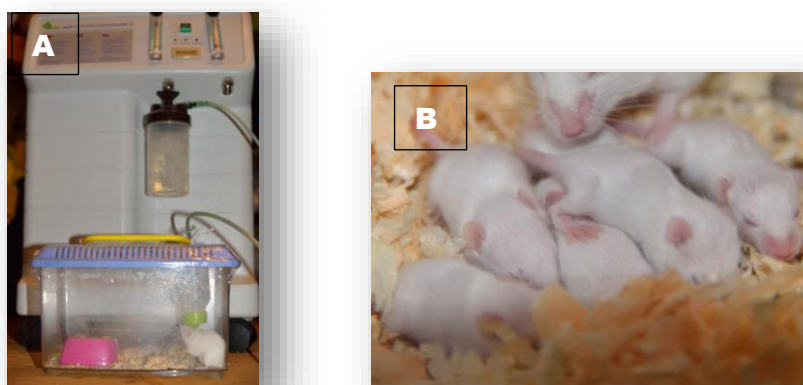


Рисунок 1. А -Кислородный концентратор Atmung 5L-I подключенный к инкубатору; В – 10-дневные крысята, находящиеся в инкубаторе вместе с кормящей самкой

Работа в первом разделе состояла из двух экспериментальных фрагментов.

Первый экспериментальный фрагмент - анализ уровня содержания TNF- α и VEGF на 13-18 постнатальные сутки (18 животных с кислород-индуцированной ретинопатией и 18 интактных животных) и площади ретиальной неоваскуляризации - на 18 сутки (по 5 животных с КИР и интактных животных).

Второй экспериментальный фрагмент - анализ уровня содержания TNF- α , VEGF и площади ретиальной неоваскуляризации у животных с экспериментальной моделью кислород-индуцированной ретинопатии при интравитреальном введении рекомбинантного PEDF, Инфликсимаба, Ранибизумаба на 12 или 14 сутки жизни животного, а также комбинированном

применении Инфликсимаба на 12 сутки и рекомбинантного PEDF или Ранибизумаба на 14 сутки жизни. Анализ уровня содержания TNF- α и VEGF проводился на 13, 15 и 18 постнатальные сутки, площади ретиальной неоваскуляризации - на 18 сутки; при изолированном применении Инфликсимаба, PEDF и Ранибизумаба в каждую из 3 опытных групп было включено 21 животное - 3 животных на каждый день исследования (12 животных при применении препаратов на 12 сутки, 9 животных при применении препаратов на 14 сутки); при комбинированном применении Инфликсимаба с PEDF и Ранибизумабом в каждую из групп (2 опытные группы) было включено 9 животных - по 3 животных на каждый день исследования.

II.1.2. Способ интравитреального введения препаратов

Сроки для интравитреального введения препаратов и проведения исследований были установлены на основании полученных результатов исследования в первом фрагменте. Инфликсимаб в дозе 40 μg , PEDF - 0,5 μg и Ранибизумаб - 50 μg вводили интравитреально с помощью микрошприца «Hamilton» (серия 750LT) после предварительной инстилляции в конъюнктивальную полость 0,5% раствора алкаина, после введения препарата в конъюнктивальную полость закапывали 0,25% раствор левомицетина (Рис.2).



Рисунок 2. Этапы подготовки к интравитреальному введению. А- Крыса, зафиксированная на штативе; В – Приспособление для расширения век; С – Установка микрошприца «Hamilton» в штатив

II.1.3. Методы исследования

Для проведения исследований животные были подвергнуты эвтаназии согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных,

используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986). Энуклеация проводилась по стандартному протоколу.

Определение уровней содержания VEGF и TNF- α в ткани сетчатки проводилось иммуноферментным методом с использованием наборов Rat VEGF DuoSet ELISA kit и Rat TNF-alpha ELISA kit, фирмы R&D Systems, Inc., USA, соответственно.

Методика приготовления и исследования тотальных препаратов сетчатки.

После энуклеации глаза препарировали под бинокулярным микроскопом. Вскрытие глазного яблока проводилось по модифицированному протоколу Kretc et al., 2007. по следующей схеме: энуклеированный глаз в бессывороточной среде DMEM вскрывали скальпелем и микроножницами удаляли роговицу; пинцетом удаляли хрусталик и радужку; движениями пинцетов в трех плоскостях, при фиксации глазного нерва, изымали стекловидное тело и отслаивали сетчатку от подлежащего пигментного эпителия. Извлеченную сетчатку фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение суток при температуре +4°C. После тщательной промывки в фосфатном буфере сетчатку погружали в раствор биотинилированного изолектина B4 Griffonia simplicifolia (Vector Laboratories США) в разведении 1:100 в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) pH 7,2-7,4 в течение 12 часов при +4°C. В дальнейшем сетчатку погружали в раствор стрептавидина, конюгированного с флуоресцентными красителями Cy3 или FITC (Jackson ImmunoResearch, Великобритания) на 1 час при комнатной температуре для визуализации сосудистой сети. После трехкратной промывки в фосфатном буфере, сетчатку помещали на предметное стекло, покрывали глицерином и покровным стеклом.

Компьютерный анализ цифровых изображений сосудов сетчатки.

Производили компьютерный анализ изображений сетчатки, полученных с помощью инвертированного микроскопа Olimpus KX-100 с цифровой фотокамерой Olimpus DP72 и объективами 10x, 20x, 40x в свете флуоресценции Cy3 и FITC.

С помощью автоматизированного программного обеспечения SWIFT_NV была проведена количественная оценка средней площади васкуляризации в пределах поверхностного ретинального слоя.

SWIFT_NV состоит из набора макросов, которые были разработаны для работы на платформе ImageJ. Макросы вместе с подробным руководством были предоставлены А. Stahl (Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Children's Hospital Boston, Fegan 4, 300 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. University Eye Hospital Freiburg, Killianstr. 5, 79106 Freiburg, Germany).

В программе SWIFT_NV открывали исследуемое изображение сосудистой сети сетчатки. SWIFT_NV автоматически изолировала красный канал и разбивала изображение на четыре квадранта. Разделение изображения имеет важное значение, так как четыре квадранта зачастую имеют различную интенсивность окрашивания и поэтому обрабатывать их возможно только по отдельности. Программа также удаляет фоновую флуоресценцию, для четкой визуализации неоваскуляризации на фоне флуоресценции нормальной сосудистой сети. Исключение фонового свечения на этом этапе позволяло определять пороговое значение флуоресценции, соответствующее неоваскуляризации. С помощью ползунка в каждом конкретном квадранте в SWIFT_NV устанавливали порог флуоресценции, соответствующий структурам неоваскуляризации, но не нормальным сосудам. В ручном режиме исключали из количественной оценки площади неоваскуляризации различные артефакты, такие как остатки гиалоидных сосудов, клеток гиперфлуоресцентного края сетчатки глаза.

После удаления всех артефактов и, выбрав правильный порог флуоресценции, SWIFT_NV анализировала все пиксели изображения, которые лежали выше заданного порогового значения. Вышеуказанные шаги повторялись для остальных трех квадрантов. Затем программа SWIFT_NV объединяла все четыре полученных изображения в одно и выдавала результат количественного определения для всей сетчатки, как «общая площадь» (Рис.3).

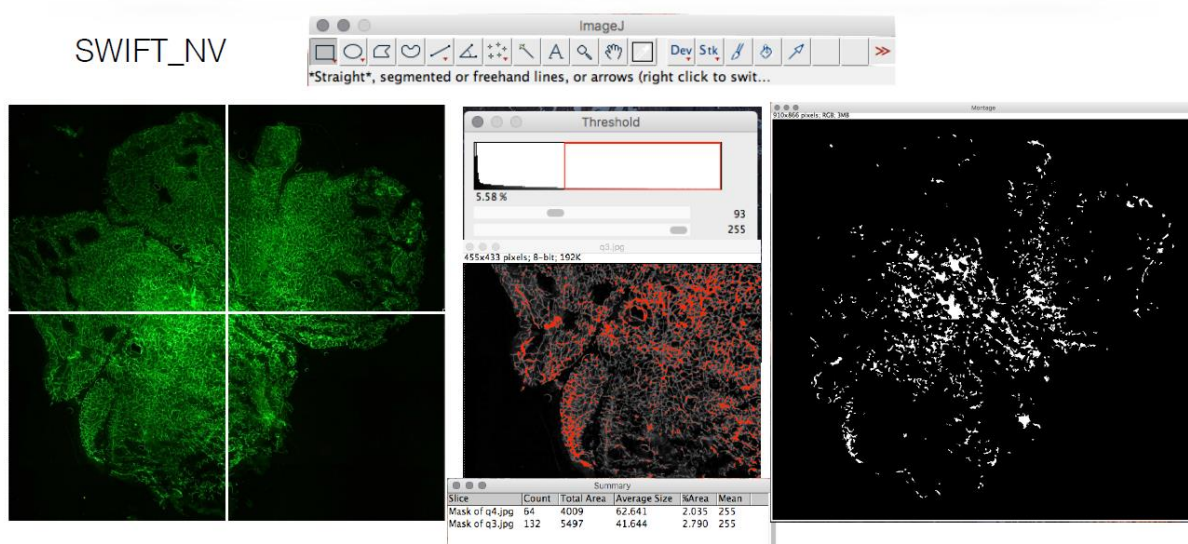


Рисунок 3 Анализ цифровых изображений сосудов сетчатки, выполненный в программном обеспечении SWIFT_NV

II.2. Изучение роли PPAR рецепторов в механизме регуляции ретинального неоваскулогенеза у животных с кислород-индуцированной ретинопатией (второй раздел)

II.2.1 Характеристика экспериментального материала

Работа по второму разделу проведена на 120 крысах (240 глаз) линии albino Wistar, выращенных в питомнике лабораторных животных Филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных (National Academy press, 1996).

Животные были разделены на 6 групп (20 животных в каждой группе) - группа интактных животных и 5 групп экспериментальных животных с кислород-индуцированной ретинопатией. Первая экспериментальная группа животных с кислород-индуцированной ретинопатией. Во 2 экспериментальной группе животным производились инстилляций фенофибратной композиции четыре раза в день (с интервалом 6 часов) в течение 6 дней (с 12 по 17 день жизни включительно), в 3 группе производилось интравитреальное введение 0,2 мкл (100 мкмоль/л) пиоглитазона (растворяли в 0,1% диметилсульфоксиде -ДМСО) на 12 сутки жизни, в 4 группе - на фоне инстилляций фенофибратной композиции (четыре раза в день,

с интервалом 6 часов) в течение 6 дней (с 12 по 17 день жизни включительно) производилось интравитреальное введение 0,2 мкл (100 мкмоль/л) пиоглитазона на 12 сутки, в 5 группе производилось интравитреальное введение ранибизумаба на 12 сутки жизни.

Режим закапывания был определен в связи с данными, полученными Lu B. с соавт. - максимальная концентрация фенофибровой кислоты - активного метаболита фенофибрата в сетчатке авторами была зарегистрирована в интервале времени 4-6 часов после закапывания, через 12 часов ее концентрация была минимальной.

II.2.2. Способ получения фенофибратной композиции.

В стеклянном стакане смешиваются глицерин, касторовое масло, колифор EL и витамин Е. В полученную смесь вводится фенофибрат, перемешивание продолжается в течение 10 минут. В несколько приемов добавляется соевый лецитин, перемешивание осуществляется в течение 30 минут. Добавляются бензалкония хлорид и физиологический раствор, производится гомогенизация до получения однородной суспензии.

Содержание композиции (масс %): глицерин - 0,5-2,5, касторовое масло - 1,0-8,0, соевый лецитин -5,0-10,0, колифор EL - 0,5-4,5, витамин Е 0,001-0,002, фенофибрат 0,5-5,0, бензалкония хлорид 0,005-0,01, физиологический раствор - остальное.

II.2.3. Методы исследования

Для проведения исследования животные были подвергнуты эвтаназии согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986). Энуклеация проводилась по стандартному протоколу.

Определение уровней содержания TNF- α , ICAM1 и VEGF в гомогенатах сетчатки проводилось иммуноферментным методом с использованием наборов Rat TNF-alpha ELISA kit, Rat ICAM1 ELISA kit, Rat VEGF DuoSet ELISA kit и, фирмы R&D Systems, Inc., USA в соответствии с инструкциями изготовителя. Общую

концентрацию белка в гомогенатах сетчатки определяли с помощью анализа Брэдфорда.

Анализ уровня содержания TNF- α , ICAM-1 и VEGF проводился на 15 и 18 постнатальные сутки, уровня содержания мембранных белков плотных контактов и площади ретиальной неоваскуляризации - на 18 сутки.

Для определения содержания белков клеточных контактов – окклюдина, клаудина -1, -2 и -5 проводили Вестерн-блот анализ с использованием крысиных антител (Zymed Laboratories, США) к белкам плотных контактов, клаудину - 5 (1:5000), окклюдину и клаудину-1 (1:2000) и клаудину-2 (1:1000). Денситометрический анализ Вестерн- блот сигналов проводили с использованием программного обеспечения ImageJ.

Вестерн-блот анализ.

Для проведения метода приготавливали клеточные лизаты опытных и контрольных образцов при помощи Reporter Lysis Buffer. После обработки лизирующим раствором чашки помещали в жидкий азот на несколько секунд, а потом в термостат при +37 на 10 мин. Полученный лизат центрифугировали и наносили на полиакриламидный гель (ПААГ) с раствором для прокрашивания:

50 mM Tris(PH=6,8)	1мл
50% глицерин	5мл
15% SDS	1,5мл
15 β -меркаптоэтанол	1,5мл
0,01% BPB	1мл

Для переноса на мембрану использовали режим переноса 2мА/см² (стабилизация по току) 2 часа и напряжение не более 20В. Затем мембрану окрашивали Ponceau Red 3-5 минут на шейкере, чтобы проконтролировать наличие белка на мембране. Затем отмывали мембрану в буфере TBST 3 раза по 5 минут. Мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами (anti-von Willibrand Faktor разведение 1:1000) в 15 мл TBST ночь при +4°C. Затем мембрану

отмывали 15 минут в TBST буфере 2 раза по 10 минут на шейкере. После этого мембрану инкубировали с вторичными антителами (antirabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена; разведение 1:10000) 1,5 мл на 15 мл TBST ночь при +4°C. Мембрану промывали в 20 мл TBST (15 минут два раза по 10 минут на шейкере). Белки визуализировали с использованием ECL-набора по инструкции производителя (GE Healthcare).

Правильность нанесения порций белка на дорожки контролировали при помощи визуализации актина на мембране. Мембрану инкубировали с первичными антителами (actin c-2, разведение 1:1000) по методике, описанной выше. Затем со вторичными антителами (антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена; в разведении 1:10000) и проявляли по методике, описанной выше.

Подробное описание методики приготовления и исследования тотальных препаратов сетчатки и компьютерного анализа цифровых изображений сосудов сетчатки представлено в пункте II.1.3.

II.3. Возможность и эффективность коррекции VEGF - индуцированных изменений ретиальной экспрессии генов ангиогенеза в результате применения лазерного воздействия с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах (третий раздел)

II.3.1 Характеристика экспериментального материала

Исследования проводили на 4-5 недельных самцах мышей линии C57BL/6J, выращенных в питомнике лабораторных животных Филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. C57BL / 6J является наиболее широко используемым инбредным штаммом и первым, геном которого был секвенирован.

Результаты исследования генотипа мыши свидетельствуют о том, что 80% генов этого животного и человека идентичны и 99% генов очень похожи, длина генетического кода мыши меньше, чем человека всего лишь на 14%

[Chinwalla A. T., 2002]. В связи с этим лабораторные мыши являются основной моделью для проведения молекулярно-генетических исследований.

Группы животных

- 1 группа - интравитреальное введение PBS (15 животных, 15 глаз);
- 2 группа - интравитреальное введение VEGF (15 животных, 15 глаз);
- 3 группа - интравитреальное введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в микроимпульсном режиме (15 животных, 15 глаз);
- 4 группа - интравитреальное введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в непрерывном режиме (15 животных, 15 глаз).

Для того, чтобы исключить любые возможные двусторонние биологические эффекты при введении VEGF и лазерном воздействии контрлатеральные глаза животных оставались интактными и в исследование не включались [Gallego B.I., 2012; Rojas B., 2014; de Hoz R., 2018].

Интравитреальное введение VEGF, режимы лазерного воздействия

Интравитреальное введение рекомбинантного VEGF₁₆₅ (R & D Systems) 50 нг/мл в 2 мкл фосфатно-солевого буферного раствора PBS и 2 мкл PBS было произведено под общим наркозом. Воздействие лазерного излучения 577 нм на сетчатку было произведено через сутки после интравитреального введения VEGF, воздействие производилось в микроимпульсном и непрерывном режимах.

Параметры микроимпульсного режима - мощность лазера 100 мВт, диаметр пятна 100 мкм, длительность одного микроимпульса 100 мкс, длительность пакета импульсов 100 мс, скважность 5%. Параметры непрерывного режима - мощность лазера 100 мВт, диаметр пятна 100 мкм, длительность импульса 0,1 с. Лазерные аппликаты наносились по всей сетчатке и были распределены концентрически вокруг диска зрительного нерва.

II.3.2 Методы исследования

Транскрипционный анализ образцов тканей (Microarray transcription analysis)

Образцы тканей (нейроэпителий, пигментный эпителий) для транскрипционного анализа у животных первой группы были выделены через двое суток после введения VEGF, у животных второй и третьей групп через сутки после воздействия на сетчатку лазерного излучения.

Суммарную РНК из выделенных образцов тканей экстрагировали с помощью реагента TRIzol (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Количество полученной общей РНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop (NanoDrop Technologies, США) в соответствии с протоколом производителя. Качество РНК проверяли с помощью чипа Agilent Total RNA Nano 6000 (Agilent Technologies, США). По 400 нг общей РНК каждого образца амплифицировали с помощью Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit (Ambion, США). Амплифицированную РНК гибридизовали с MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips (Illumina) в соответствии с протоколом Illumina. Анализ полученных данных проводился с помощью программного обеспечения GenomeStudio (Illumina, США), модуля экспрессии генов. Для интерпретации результатов транскрипционного анализа использовали транскрипты с параметром Detection_Pval <0,01.

Статистическая обработка результатов исследования

выполнялась в соответствии со стандартными алгоритмами вариационной статистики с использованием статистических программ Microsoft Excel, STATISTICA 10.0.

Статистический анализ включал сравнительный анализ изучаемых показателей в группах, сформированных в соответствии с задачами исследования (критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни). Количественные показатели представлены средним арифметическим значением и ошибкой среднего арифметического в виде $M \pm m$. Для оценки силы корреляционной взаимосвязи изучаемых показателей вычисляли коэффициенты корреляции по Пирсону и Спирмену.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ РОЛИ TNF- α В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ РЕТИНАЛЬНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ У ЖИВОТНЫХ С КИСЛОРОД-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ

Сравнительный анализ уровня содержания TNF- α и VEGF и площади ретиальной неоваскуляризации у крыс с КИР и интактных животных.

Уровень содержания TNF- α в ткани сетчатки в течение всего периода наблюдения в группе животных с КИР был значительно выше, чем в группе интактных животных ($p < 0,05$). Наиболее высокий уровень его содержания был на 13 сутки (в 10 раз выше, чем в контроле), на 15 и 18 сутки уровень его содержания снижался в 2,6 и 1,7 раза ($p < 0,05$), но оставался выше, чем в контроле в 3,8 и 2,3 раза, соответственно ($p < 0,05$). Уровень содержания TNF- α между 13 - 14 и 15 - 17 днями достоверно не отличался. (Табл. 1).

Таблица 1.

Уровень содержания TNF- α у интактных и экспериментальных животных

Сутки наблюдения	Уровень содержания TNF- α (пг/мг)	
	Интактные животные (контроль)	Животные с КИР
13	55,14 $\pm$ 10,28	546,15 $\pm$ 15,34*
14	54,34 $\pm$ 7,11	496,43 $\pm$ 12,21*
15	54,53 $\pm$ 8,08	207,19 $\pm$ 18,32*†
16	53,34 $\pm$ 8,23	212,15 $\pm$ 15,36*
17	53,32 $\pm$ 7,45	199,17 $\pm$ 17,34*
18	53,02 $\pm$ 9,91	121,31 $\pm$ 10,12*†

* $p < 0,05$ - достоверность различий с контролем

† $p < 0,05$ - достоверность различий последующей и предыдущей групп по сроку жизни

Увеличение уровня содержания TNF- α было также было выявлено в ткани сетчатки у крыс при ишемическом - реперфузионном [Berger S. et al., 2008] и цисплатин-индуцированном [Karakurt Y. et al., 2018] повреждениях сетчатки. При ишемическом - реперфузионном повреждении максимальный уровень его экспрессии наблюдался через 12 - 24 часа после повреждения и через 72 часа резко снижался [Berger S. et al., 2008], как и в нашем исследовании. При интравитреальном введении рекомбинантного TNF- α через 48 часов после

реперфузии наблюдался более выраженный повреждающий эффект (по данным ЭРГ), чем при введении через 2 часа, что, по мнению авторов, связано с запуском определенных путей реализации его эффектов. При ингибировании же TNF- α до или сразу после повреждения функции сетчатки сохранялись [Berger S. et al., 2008].

Таким образом, в группе животных с КИР достоверно выше, чем в группе интактных животных, уровень содержания TNF- α в ткани сетчатки, при этом максимальный уровень его содержания наблюдается на 13 сутки, в этот период времени, вероятно, и реализуются его основные эффекты.

Уровень содержания VEGF в ткани сетчатки в группе интактных животных с 13 по 15 день жизни незначительно увеличивался, на 16 и 17 день жизни снижался ($p > 0,05$), достоверное его снижение наблюдалось на 18 сутки. В группе животных с КИР, в каждый из дней исследования уровень содержания VEGF был достоверно более высокий, чем в контрольной группе. Максимальный уровень его содержания наблюдался на 15 сутки, затем уровень достоверно снижался. Уровень содержания VEGF между 13 и 14 днями достоверно не отличался (Табл.2).

Таблица 2.

Уровень содержания VEGF у интактных и экспериментальных животных

Сутки наблюд ения	Уровень содержания VEGF (пг/мг)	
	Интактные животные (контроль)	Экспериментальные животные
13	$8,94 \pm 0,84$	$30,12 \pm 2,34^*$
14	$9,54 \pm 0,43$	$33,58 \pm 1,56^*$
15	$10,05 \pm 1,08$	$37,15 \pm 1,64^{*\dagger}$
16	$9,41 \pm 1,08$	$26,42 \pm 1,56^{*\dagger}$
17	$9,23 \pm 1,08$	$18,17 \pm 1,15^{*\dagger}$
18	$3,53 \pm 0,09^\dagger$	$6,07 \pm 1,10^{*\dagger}$

* $p < 0,05$ - достоверность различий с контролем

$^\dagger p < 0,05$ - достоверность различий последующей и предыдущей групп по сроку жизни

Увеличение уровня содержания VEGF и мРНК VEGF в супернатантах сетчатки мышей с кислород - индуцированной ретинопатией было выявлено в целом ряде работ, однако все исследования, в основном проводились только на 17 день жизни животных [Lei Chun-Tao et al., 2015; Pisani F. et al., 2018; Wang S. et al., 2019; Zhang W. et al., 2019; Jung E. et al., 2020].

Среднее значение площади ретиальной неоваскуляризации в группе животных с КИР на 18 сутки составляло $2,91 \pm 0,21\%$.

Между уровнем экспрессии TNF- α , VEGF и площадью неоваскуляризации выявлено наличие положительной корреляционной зависимости: TNF- α - VEGF ($r = 0,72$; $p < 0,05$); VEGF, TNF- α и площадь васкуляризации ($r = 0,86$; $0,64$; $p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в группе животных с КИР уровень содержания TNF- α и VEGF в ткани сетчатки выше, чем в группе интактных животных ($p < 0,05$); максимальный уровень их содержания наблюдается на 13 и 15 сутки, соответственно; показатель площади ретиальной неоваскуляризации находится в прямой корреляционной зависимости от уровня VEGF ($r = 0,86$; $p < 0,05$) и TNF- α ($r = 0,72$; $p < 0,05$), уровень VEGF тем выше, чем выше TNF- α ($r = 0,72$; $p < 0,05$). TNF- α , по всей вероятности, может являться еще одной терапевтической мишенью при неоваскулярной патологии сетчатки.

Сравнительный анализ уровня содержания TNF- α , VEGF и площади ретиальной неоваскуляризации у животных с КИР при интравитреальном введении PEDF, Инфликсимаба, Ранибизумаба, а также комбинированном применении Инфликсимаба с PEDF или с Ранибизумабом.

При введении Инфликсимаба на 12 и 14 сутки жизни животного уровень содержания TNF- α при исследовании на 13 и 15 сутки был ниже, чем в группе животных с КИР ($p < 0,05$). При введении препарата на 12 сутки уровень содержания TNF- α на 15 сутки был в 1,5 раза ниже, чем при его введении на 14 сутки ($p < 0,05$). На 18 сутки уровень содержания TNF- α при введении Инфликсимаба на 12 сутки достоверно не отличался от уровня его содержания в группе интактных животных и был ниже, чем при введении на 14 сутки ($p < 0,05$).

На экспериментальной модели пролиферативной витреоретинопатии также было установлено, что при интравитреальном введении Инфликсимаба в сетчатку снижается уровень содержания TNF- α [Savur F. et al., 2020].

При введении PEDF на 12 сутки уровень содержания TNF- α независимо от срока исследования был ниже, чем в группе экспериментальных животных ($p < 0,05$). При его введении на 14 сутки уровень TNF- α достоверно не отличался от контроля и при всех сроках введения при исследовании на 15 и 18 сутки был выше, чем в группах животных с введением Инфликсимаба ($p < 0,05$). Между группами с введением Инфликсимаба на 12 сутки и Инфликсимаба + PEDF достоверных отличий по уровню содержания TNF- α выявлено не было. На 18 сутки уровень содержания TNF- α при введении Инфликсимаба + PEDF достоверно не отличался от уровня его содержания в группе интактных животных (Табл.3).

Таким образом, Инфликсимаб и комбинированное его применение с PEDF у животных с кислород-индуцированной ретинопатией позволяет значительно снизить уровень содержания TNF- α в ткани сетчатки на 15 и 18 сутки ($p < 0,05$).

Таблица 3.

Уровень содержания TNF- α у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при изолированном и комбинированном интравитреальном введении Инфликсимаба, PEDF и Инфликсимаба + PEDF

Инфликсимаб, PEDF, пг/мг	Сутки наблюдения	Сутки и/в введения	
		12	14
Инфликсимаб	13	315,22 $\pm$ 14,21* α	-
	15	89,21 $\pm$ 6,23* α	130,30 $\pm$ 8,13* $\dagger\alpha$
	18	58,12 $\pm$ 3,21*	86,23 $\pm$ 4,23* $\dagger\alpha$
PEDF	13	331,12 $\pm$ 10,12* α	-
	15	166,33 $\pm$ 10,26* $\alpha\vee$	204,42 $\pm$ 11,34 $\dagger\alpha\vee$
	18	98,23 $\pm$ 9,13* $\alpha\vee$	128,42 $\pm$ 10,31 $\dagger\alpha\vee$
		Сутки и/в введения 12 + 14	
Инфликсимаб + PEDF	15	82,23 $\pm$ 7,23* α	
	18	56,24 $\pm$ 7,23*	

* $p < 0,05$ - достоверность различий с животными с КИР

α $p < 0,05$ - достоверность различий с ИЖ

$\dagger$ $p < 0,05$ - достоверность различий между группами по сроку введения

$\vee$ $p < 0,05$ - достоверность различий между группами Инфликсимаб и PEDF

Уровень содержания VEGF на 13 и 15 сутки во всех группах животных был достоверно ниже, чем в группе животных с КИР. Снижение уровня содержания VEGF в сетчатке при интравитреальном введении инфликсимаба на модели лазер-

индуцированной хориоидальной неоваскуляризации было выявлено Regatieri C.V. с соавт. (2009).

При введении препаратов и PEDF на 12 сутки уровень содержания VEGF в ткани сетчатки на 15 сутки ниже, чем при их введении на 14 сутки ($p<0,05$). В группах с применением Инфликсимаб + PEDF и Инфликсимаб + Ранибизумаб уровень содержания VEGF на 15 сутки был ниже, чем в группах с изолированным их введением на 12 сутки ($p<0,05$) и ниже, чем в группе животных с КИР в 2,6 и 2,8 раза, соответственно.

На 18 сутки были выявлены аналогичные результаты - во всех группах, кроме группы с введением Инфликсимаба, уровень содержания VEGF был достоверно ниже, чем в экспериментальной группе. При введении препаратов и PEDF на 12 сутки уровень содержания VEGF в ткани сетчатки на 18 сутки был ниже, чем при введении их на 14 сутки ($p<0,05$). В группах с применением Инфликсимаб + PEDF и Инфликсимаб + Ранибизумаб уровень содержания VEGF был ниже, чем при изолированном их введении на 12 сутки ($p<0,05$) и ниже, чем в группе экспериментальных животных в 2,5 и 2,7 раза, соответственно (Табл.4, Рис.4).

Таблица 4.

Уровень содержания VEGF (пг/мг) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при интравитреальном введении Инфликсимаба, PEDF и Ранибизумаба

Препараты и PEDF, пг/мг	Сутки наблюдения	Сутки и/в введения препаратов и PEDF	
		12	14
PEDF	13	19,54±0,61 *	-
	15	20,54 ± 0,75*	25,32 ± 0,34*†
	18	3,14 ± 0,04*	3,91 ± 0,08*†
Инфликсимаб	13	22,11 ±0,83 *	-
	15	23,22 ± 1,34*	28,50 ± 1,23*†
	18	3,42 ± 0,06*	5,53 ± 0,07†
Ранибизумаб	13	18,03 ±0,24 *	-

	15	$19,12 \pm 0,15^*$	$24,05 \pm 0,13^{*\dagger}$
	18	$2,93 \pm 0,05^*$	$4,01 \pm 0,02^{*\dagger}$
		Сутки и/в введения 12 + 14	
Инфликсимаб + PEDF	15	$14,38 \pm 1,23^{*\vee}$	
	18	$2,0 \pm 0,03^{*\vee}$	
Инфликсимаб + Ранибизумаб	15	$13,03 \pm 1,34^{*\vee}$	
	18	$1,8 \pm 0,05^{*\vee}$	

* $p < 0,05$ - достоверность различий с ЭЖ

$\dagger p < 0,05$ - достоверность различий между группами по сроку введения препаратов и PEDF

$\vee p < 0,05$ - достоверность различий между группами Инфликсимаб + PEDF и Инфликсимаб + Ранибизумаб с изолированным их введением на 12 сутки

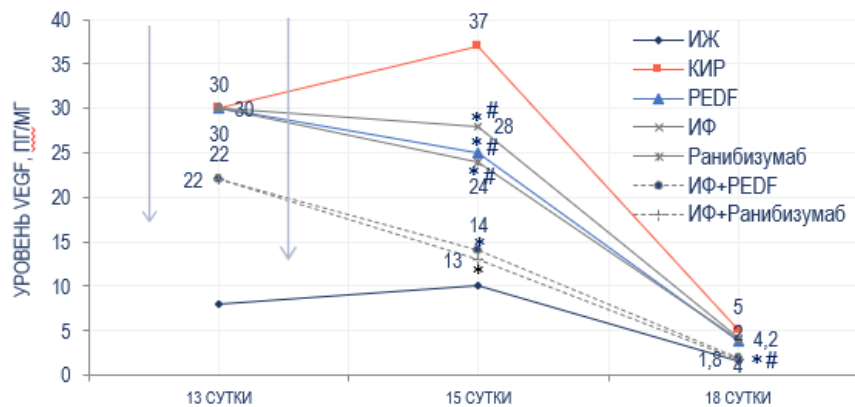


Рисунок 4. Уровень содержания VEGF у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при интравитреальном введении Инфликсимаба, PEDF и Ранибизумаба

Примечание: * $p < 0,05$ - достоверность различий с группой КИР

* # $p < 0,05$ - достоверность различий между группами по сроку введения

Площадь ретиальной неоваскуляризации в группах Инфликсимаб + PEDF и Инфликсимаб + Ранибизумаб была достоверно меньше, чем в группах с изолированным их введением на 14 и 12 сутки (Табл.5).

Таблица 5.

Площадь ретинальной неоваскуляризации (в %) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при и/в введении Инфликсимаба, PEDF, Ранибизумаба и комбинированном их применении (18 сутки)

Препараты и PEDF	Сутки и/в введения препаратов и PEDF	
	12	14
PEDF	$0,91 \pm 0,03^{*\dagger}$	$1,15 \pm 0,03^*$
Инфликсимаб	$1,22 \pm 0,09^{*\dagger}$	$1,81 \pm 0,07^*$
Ранибизумаб	$0,72 \pm 0,04^{*\dagger}$	$1,2 \pm 0,02^*$
	Сутки и/в введения 12 + 14	
Инфликсимаб + PEDF	$0,26 \pm 0,06^{*\vee}$	
Инфликсимаб + Ранибизумаб	$0,19 \pm 0,02^{*\vee}$	

* $p < 0,05$ - достоверность различий с группой животных с КИР

$\dagger p < 0,05$ - достоверность различий между группами по сроку введения препаратов и PEDF

$\vee p < 0,05$ - достоверность различий между группами Инфликсимаб + PEDF и Инфликсимаб + Ранибизумаб с изолированным их введением на 12 сутки

Результаты этого этапа исследования были опубликованы в «Вестнике Тамбовского университета» в 2015г [Гаврилова Н.А. Анализ результатов применения инфликсимаба, PEDF и ранибизумаба на модели кислород-индуцированной ретинопатии / Широков В.Е., Комова О.Ю., Бантыш О.Б., Сабурин И.Н., Ревущин А.В., Павлова Г.В. // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. - 2015. - Т. 20. - № 3. - С. 539-544].

Таким образом, комбинированное применение Инфликсимаба с Ранибизумабом или PEDF у животных с кислород-индуцированной ретинопатией позволяет более значительно, чем изолированное их применение, снизить уровень содержания VEGF в ткани сетчатки ($p < 0,05$), особенно в наивысшей точке его содержания - 15 сутки, и обеспечить более корректное его последующее снижения до 18 суток.

Комбинированное применение Инфликсимаба с Ранибизумабом или PEDF у животных с кислород-индуцированной ретинопатией позволяет предотвратить формирование неоваскуляризации более эффективно, чем изолированное их применение ($p < 0,05$).

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ РОЛИ PPAR РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМЕ РЕГУЛЯЦИИ РЕТИНАЛЬНОГО НЕОАНГИОГЕНЕЗА У ЖИВОТНЫХ С КИСЛОРОД-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ

В группе животных с КИР выявлено достоверное снижение уровня содержания мембранных белков плотных контактов - окклюдина, клаудина -1, -2 и -5, что свидетельствует о нарушении проницаемости гематоретинального барьера. В группах животных с применением фенофибратной композиции и комбинированным ее применением с пиоглитазоном уровень содержания белков плотных контактов был выше ($p < 0,05$), чем в экспериментальной группе; в группе с комбинированным применением препаратов уровень клаудина - 5 составлял $89 \pm 3,2\%$, окклюдина - $85 \pm 4,3\%$, клаудина - 2 и клаудина -1 - $78 \pm 7,2\%$ и $74 \pm 6,1\%$, соответственно (Рис.5).

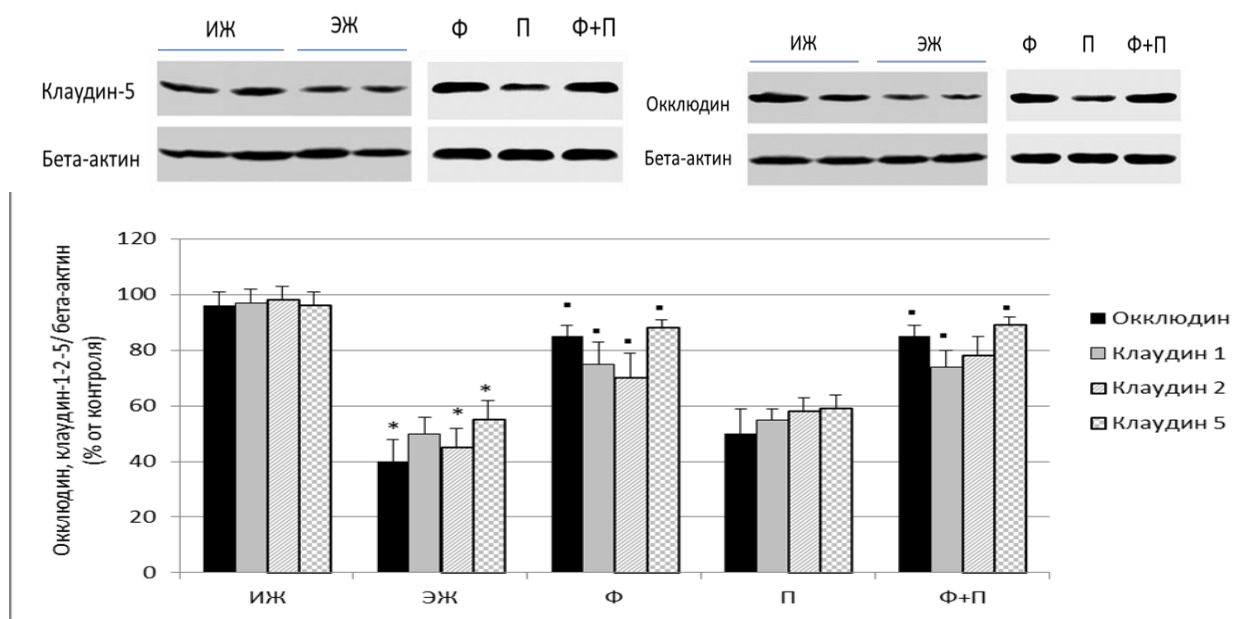


Рисунок 5. Мембранные белки плотных контактов (окклюдин, клаудин -1-2-5) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при инстилляции фенофибратной композиции и интравитреальном введении пиоглитазона

Примечание: * $p < 0,05$ - достоверность различий в группах с КИР и ИЖ

■ $p < 0,05$ - достоверность различий с группой КИР

Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что применение фенофибрата в используемой композиции позволяет предотвратить резкое нарушение проницаемости гематоретинального барьера.

Уровень содержания TNF- α на 15 сутки во всех группах животных с использованием фенофибратной композиции и пиоглитазона был достоверно ниже, чем в группе животных с КИР в 1,7 и 1,8 раз, соответственно; в группе с комбинированным применением препаратов его уровень был снижен в 2,8 раза и достоверно отличался от групп с изолированным применением. Уровень содержания TNF- α на 18 сутки при использовании фенофибратной композиции и комбинированного применения препаратов достоверно не отличался от уровня его содержания в интактной группе и был достоверно ниже, чем в группе с интравитреальным введением пиоглитазона (Табл.6).

Таблица 6.

Уровень содержания TNF- α (пг/мг) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при инстилляциях фенофибратной композиции и интравитреальном введении пиоглитазона

Группы животных	Сутки наблюдения	
	15	18
Фенофибрат	115,4 $\pm$ 4,17*	68,13 $\pm$ 1,23*
Пиоглитазон	145,3 $\pm$ 5,21*	82,23 $\pm$ 4,23*†
Фенофибрат + Пиоглитазон	75,21 $\pm$ 6,23*†	61,12 $\pm$ 3,23*
Животные с КИР	207,19 $\pm$ 18,32	121,31 $\pm$ 10,12
Интактные животные	54,53 $\pm$ 8,08	53,02 $\pm$ 9,91

*p<0,05 - достоверность различий с группой животных с КИР

†p<0,05 - достоверность различий между группами с применением препаратов

Во всех группах животных с использованием фенофибрата и пиоглитазона на 15 и 18 сутки уровень содержания молекулы клеточной адгезии ICAM-1 был достоверно ниже, чем в группе животных с КИР, достоверной разницы между группами выявлено не было (Табл.7).

Таблица 7.

Уровень содержания ICAM-1 (пг/мг) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при инстилляциях фенофибратной композиции и интравитреальном введении пиоглитазона

Группы животных	Сутки наблюдения	
	15	18
Фенофибрат	241,4 ± 7,37*	215,4 ± 6,37*
Пиоглитазон	251,1 ± 6,65*	230,3 ± 9,21*
Фенофибрат + Пиоглитазон	243,5 ± 5,48*	225,2 ± 7,27*
Животные с КИР	309,2 ± 6,13	280,8 ± 5,23
Интakтные животные	165,1 ± 4,45	150,9 ± 4,27

*p<0,05 - достоверность различий с группой животных с КИР

Уровень содержания VEGF на 15 и 18 сутки во всех группах был достоверно ниже, чем в группе животных с КИР, на 15 сутки в группе животных с комбинированным применением был ниже, чем при изолированном применении (p<0,05) и во всех группах достоверно выше, чем в группе сравнения с интравитреальным введением Ранибизумаба (Табл.8).

Таблица 8.

Уровень содержания VEGF (пг/мг) у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при инстилляциях фенофибратной композиции и интравитреальном введении пиоглитазона

Группы животных	Сутки наблюдения	
	15	18
Фенофибрат	28,32 ± 0,34* [∨]	3,65 ± 0,08*
Пиоглитазон	25,78 ± 1,23* [∨]	3,21 ± 0,07*
Фенофибрат + Пиоглитазон	23,31 ± 0,18* ^{†∨}	3,12 ± 0,02*
Ранибизумаб	19,12 ± 0,15*	2,93 ± 0,05*
Животные с КИР	37,15 ± 16,45	5,0 ± 0,04
Интakтные животные	10,05 ± 1,08	2,53 ± 0,09

*p<0,05 - достоверность различий с группой животных с КИР

[†]p<0,05 - достоверность различий между группами с применением препаратов

[∨]p<0,05 - достоверность различий с группой сравнения

Площадь ретиальной неоваскуляризации в группах с изолированным и комбинированным применением фенофибратной композиции и пиоглитазона была достоверно меньше, чем в группе животных с КИР, достоверной разницы между группами выявлено не было (Табл.9, Рис.6).

Таблица 9.

Площадь ретиальной неоваскуляризации у животных с кислород-индуцированной ретинопатией при инстилляциях фенофибратной композиции и интравитреальном введении пиоглитазона (18 сутки)

Группы животных	Площадь ретиальной неоваскуляризации (%)
Фенофибрат	$1,6 \pm 0,03^*$
Пиоглитазон	$1,8 \pm 0,03^*$
Фенофибрат + Пиоглитазон	$1,3 \pm 0,02^*$
Ранибизумаб	$1,7 \pm 0,04^*$
Животные с КИР	$4,9 \pm 0,21^*$

* $p < 0,05$ - достоверность различий с группой животных с КИР

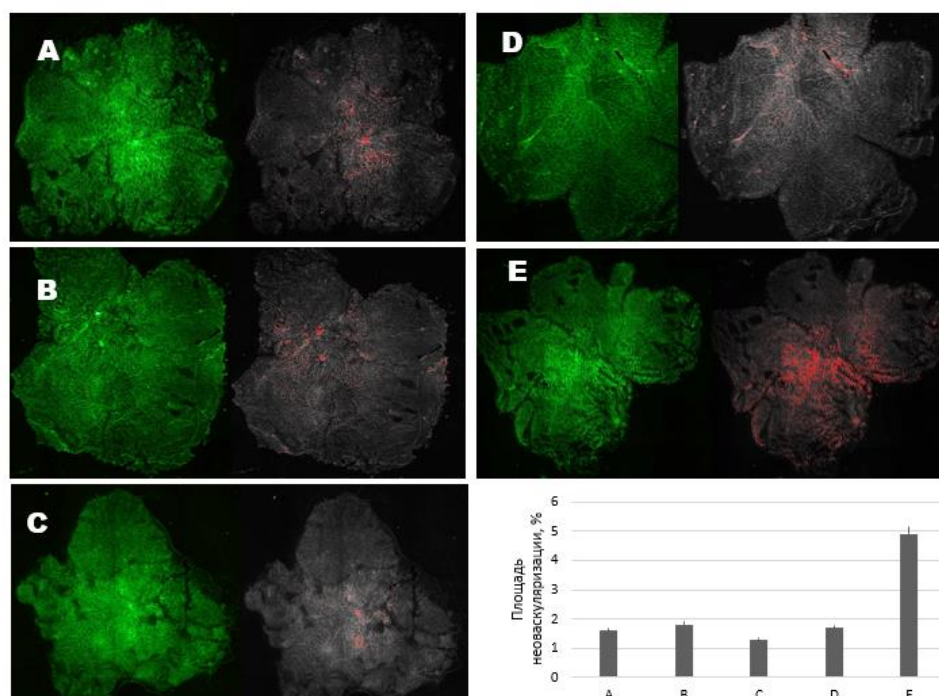


Рисунок 6. Микрофотографии препаратов сетчатки крыс с кислород-индуцированной ретинопатией в свете флуоресценции Cy3 и FITC (слева) и при компьютерном анализе (правые снимки) при **А** - инстилляциях фенофибратной композиции; **В** – и/в введении пиоглитазона; **С** – инстилляциях фенофибрата + и/в введения пиоглитазона; **Д** – и/в введения ранибизумаба; **Е** – без введения (группа экспериментальных животных)

Между уровнем содержания TNF- α , VEGF и площадью ретинальной неоваскуляризации при использовании препаратов агонистов PPAR α и PPAR γ выявлено наличие средней корреляционной зависимости ($r = 0,54$; $p < 0,05$ и $r = 0,61$; $p < 0,05$, соответственно), что свидетельствует о наличии у представителей этих групп препаратов других ангиогенных механизмов.

Результаты этого этапа исследования были опубликованы в журнале «Современные проблемы науки и образования» в 2016 г. [Гаврилова Н.А. Результаты применения агонистов PPAR α и PPAR γ при моделировании кислород-индуцированной ретинопатии / Гаджиева Н.С., Комова О.Ю., Карамышева Е.И. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. - № 3. - С. 130].

Таким образом, на данном этапе исследования было показано:

1. При использовании фенофибратной композиции в виде инстилляций у животных с кислород-индуцированной ретинопатией сохраняется более высокий ($p < 0,05$), чем в группе животных с КИР, уровень содержания мембранных белков плотных контактов – окклюдина и клаудина-1, -2 и -5 в ретинальной ткани, что свидетельствуют о предотвращении резкого нарушения проницаемости гематоретинального барьера.

2. При использовании фенофибратной композиции и пиоглитазона у животных с кислород-индуцированной ретинопатией достоверно снижается уровень содержания TNF- α , наиболее выраженный результат ($p < 0,05$) наблюдается на 15 сутки при комбинированном их применении.

3. При изолированном и комбинированном применении фенофибрата и пиоглитазна без достоверной разницы у животных с кислород-индуцированной ретинопатией на 15 сутки снижается ($p < 0,05$) уровень содержания ICAM-1.

4. Уровень содержания VEGF на 15 и 18 сутки во всех группах животных с применением фенофибрата и пиоглитазона достоверно ниже, чем в группе животных с КИР, наиболее выраженный результат наблюдается в группе животных с комбинированным их применением на 15 сутки. Во всех группах животных на 15 сутки уровень содержания VEGF достоверно выше, чем в группе с интравитреальным введением Ранибизумаба.

5. Площадь ретиальной неоваскуляризации в группах с изолированным и комбинированным применением фенофибратной композиции и пиоглитазона достоверно меньше, чем в группе животных с КИР.

6. Между уровнем содержания $\text{TNF-}\alpha$, VEGF и площадью ретиальной неоваскуляризации при использовании препаратов агонистов $\text{PPAR}\alpha$ и $\text{PPAR}\gamma$ наблюдается наличие средней корреляционной зависимости, что свидетельствует о наличии у представителей этих групп препаратов других ангиогенных механизмов.

Наличие при использовании фенофибрата и пиоглитазона более высокого уровня содержания VEGF, чем при применении ранибизумаба может иметь определенное положительное значение. При их применении одновременно с анти-VEGF препаратами, количество использования последних может быть ограничено и могут быть предотвращены, соответственно, их возможные неблагоприятные эффекты - апоптоз эндотелиальных клеток и ишемия (используемые на сегодняшний день анти-VEGF препараты не являются селективными).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности и эффективности применения агонистов $\text{PPAR}\alpha$ и $\text{PPAR}\gamma$ при патологии, связанной с формированием патологической неоваскуляризации, с целью уточнения механизмов их действия необходимо проведение дальнейших исследований.

ГЛАВА V. ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ 577 НМ НА РЕТИНАЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА.

Экспрессия генов сетчатки при интравитреальном введении VEGF₁₆₅.

Увеличилась экспрессия генов ***Rhbdf1*** в 1,5 раза и ***Psen2*** - в 325 раз. ***Rhbdf1*** принадлежит к семейству сериновых протеиназ (ромбоидов), расщепляющих белки, аналогичные эпидермальному фактору роста и, в связи с этим, обладает антиангиогенными свойствами. ***Psen2*** - пресенилин-2 относится к семейству аспартатных протеиназ, расщепляющих внутримембранные рецепторные белки 1 типа и тоже обладает антиангиогенными свойствами, участвуя в реализации эффектов Notch сигнального пути, блокирующего ангиогенез. Установлено, что при повышении активности Notch сигнального пути формирование лазер-индуцированной хориоидальной неоваскуляризации блокируется и, наоборот, при его ингибировании активируется [Ahmad I. et al., 2011]. На модели кислород-индуцированной ретинопатии установлено, что в сетчатке увеличивается уровень экспрессии ***Psen2*** и ***Rhbdf1*** [Ishikawa K. et al., 2010].

Увеличилась экспрессия ***Tsp1*** в 1,2 раза. Тромбоспондин-1 - белок внеклеточного матрикса, ингибирует эндотелиальную клеточную пролиферацию, миграцию и ангиогенез. На модели кислород-индуцированной ретинопатии было установлено, что в период активного формирования неоваскуляризации в эндотелии ретинальных сосудов экспрессия ***TSP-1*** увеличивается; при дополнительной VEGF стимуляции наблюдается сначала снижение его экспрессии, затем, наоборот, увеличение в 3 раза по принципу отрицательной обратной связи.

Повысилась экспрессия гена ***Igfbp4*** – ИФР – связывающего белка, типа 4 в 1,24 раза. ***Igfbp4***, образует комплекс с инсулиноподобным фактором роста 1 и не позволяет ему связаться с «родными» рецепторами на клетках-мишенях, блокируя тем самым его эффект - стимулировать неоангиогенез. На экспериментальной модели кислород-индуцированной ретинопатии различными авторами было выявлено увеличение экспрессии в сетчатке различных типов ИФР - связывающих

белков. Одни авторы выявили увеличение экспрессии Igfbp2, Igfbp4 и Igfbp5 на фоне низкой экспрессии Igfbp3 и Igfbp6 [Wesolowski E., 1997], другие - увеличение в областях формирования неоваскуляризации более чем в 5 раз экспрессии Igfbp3 [Lofqvist C. et al., 2009]. У пациентов с непролиферативной и пролиферативной диабетической ретинопатией в стекловидном теле выявлено увеличение концентрации Igfbp2 и Igfbp3 в 1,5 и 13 раз, соответственно [Spranger J. et al., 2000].

Снизилась экспрессия гена **Irs2**, кодирующего субстрат инсулинового рецептора 2 и участвующего в реализации физиологических функций инсулина и факторов роста [Xianjin Y. et al., 2005].

Снизилась экспрессия **Egr1**, участвующего в передаче сигналов VEGF-A/VEGFR2 и регуляции пролиферативных процессов в эндотелии, при его блокаде, с использованием NAB2, VEGF-индуцированная экспрессия генов в эндотелиальных клетках снижается и ангиогенез ингибируется [Lucerna M. et al., 2003].

Увеличилась экспрессия уридин-фосфорилазы 1 (**Upp1**) в 2,6 раза. Уридин-фосфорилаза входит в состав класса пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз, катализирует реакцию расщепления гликозидной связи в уридине и обладает выраженными проангиогенными свойствами. Установлено, что в результате блокады уридин - фосфорилазы блокируется лазериндуцированная хориоидальная неоваскуляризация [Yanagi Y. et al., 2003].

Результаты этого этапа исследования были опубликованы в журнале «Российская детская офтальмология» в 2017г [Гаврилова Н.А. Изменения экспрессии генов в сетчатке при интравитреальном введении VEGF в эксперименте / Борзенко С.А., Обрубов С.А., Гаджиева Н.С., Комова О.Ю. // Российская детская офтальмология. - 2017. - № 1. - С. 25-34].

Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза, при интравитреальном введении VEGF₁₆₅ и в результате воздействия лазерного излучения в непрерывном и микроимпульсном режимах

При введении VEGF₁₆₅ увеличилась экспрессия гена с проангиогенными свойствами - *Upp1*. В результате лазерного воздействия, как при непрерывном, так и при микроимпульсном режимах излучения уровень его экспрессии снизился по сравнению с экспрессией при введении VEGF ($p<0,01$).

При введении VEGF₁₆₅ увеличилась экспрессия генов с антиангиогенными свойствами- *Rhbdf1* и *Igfbp4* ($p<0,01$). В результате лазерного воздействия уровень экспрессии *Rhbdf1* снизился, при непрерывном режиме более значительно ($p<0,01$), но остался незначительно выше, чем в контроле. Уровень экспрессии *Igfbp4* еще больше увеличился, особенно при непрерывном режиме ($p<0,01$)(Рис.4).

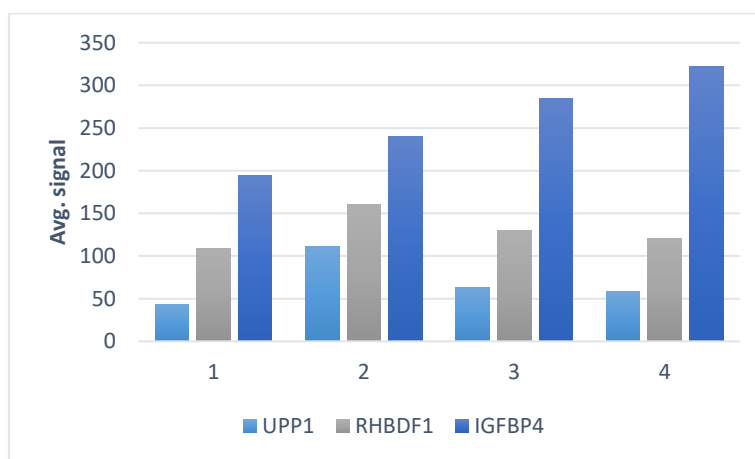


Рисунок 7. Изменение уровня экспрессии генов ангиогенеза по группам 1 – и/в введение PBS; 2 – и/в введение VEGF; 3 – и/в введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в микроимпульсном режиме; 4 – и/в введение VEGF и воздействие лазерного излучения 577 нм в непрерывном режиме

При лазерном воздействии изменился уровень экспрессии ряда генов, уровень экспрессии которых не изменился после введения VEGF. При лазерном воздействии в микроимпульсном режиме увеличилась экспрессия генов с антиангиогенными свойствами *Vldlr*, *Ankrd23*, *Mir-16* ($p<0,01$) и снизилась экспрессия генов с проангиогенными свойствами *Vezf1* и *Ifitm1* ($p<0,01$), *Atf4*, *Ets-1* ($p>0,01$). При лазерном воздействии в непрерывном режиме из указанных генов наблюдалось менее значительное, чем при лазерном воздействии в микроимпульсном режиме снижение *Ifitm1* ($p<0,01$) и, наоборот, более значительное, но недостоверное снижение *Atf4* (Табл. 11).

Экспрессия гена с проангиогенными свойствами *Acta2* при микроимпульсном режиме лазерного воздействия снизилась ($p < 0,01$) при непрерывном, наоборот, увеличилась ($p < 0,01$). Экспрессия проангиогенного гена *VegfA* снизилась при непрерывном режиме лазерного воздействия и увеличилась при микроимпульсном ($p < 0,01$). Разнонаправленное изменение экспрессии наблюдалось в отношении гена *Sgpp1*, блокирующего механизм регуляции ангиогенеза, - увеличилась его экспрессия при микроимпульсном режиме лазерного воздействия, уменьшилась при непрерывном.

Результаты исследований размещены в Национальном центре биотехнологической информации (The National Center for Biotechnology Information), регистрационный номер GSE131046,

ссылка: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE131046>

Таблица 10 .

Сравнительный анализ экспрессии генов ангиогенеза в сетчатке мышей линии C57BL/6J при лазерном воздействии в микроимпульсном и непрерывном режимах ($p < 0,01$)

Название (символ) гена	Соотношение между группами (Ratio)		
	1 группа 2-1	2 группа 3-2	3 группа 4-2
Uridine Phosphorylase 1 (Upp1)	2,576	-0,566	-0,523
Rhomboid 5 Homolog 1(Rhbdf1)	1,463	-0,809	-0,754
Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4 (Igfbp4)	1,236	1,187	2,095

Таблица 11.

Сравнительный анализ экспрессии генов ангиогенеза при лазерном воздействии в микроимпульсном режиме ($p < 0,01$).

Аббревиатура	Наименование гена	Accession №	Соотношение между группами (2/3)
ANKRD23	Ankyrin Repeat Domain 23	NM_153502.3	1.641
VLDLR	Very Low Density Lipoprotein Receptor	NM_013703.1	1.395
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	NM_009505.3	1.359
MIR16	MicroRNA 16	NM_019580.3	1.165

IFITM1	Interferon Induced Transmembrane Protein 1	NM_026820.2	-0.374
ACTA2	Actin, Alpha 2, Smooth Muscle, Aorta	NM_007392.2	-0.753
VEZF1	Vascular Endothelial Zinc Finger 1	NM_016686.3	-0.816

Уридин-фосфорилазы 1 - ***Upp1*** входит в состав класса пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз, катализирует реакцию расщепления гликозидной связи в урдине и обладает выраженными проангиогенными свойствами. В результате лазеркоагуляции, таким образом, блокируется проангиогенная активность ***Upp1***. Установлено, что в результате блокады уридин - фосфорилазы блокируется лазериндуцированная хориоидальная неоваскуляризация [Yanagi Y., 2003].

Экспрессия генов ***Rhbdf1*** и ***Igfbp4*** с антиангиогенными свойствами при введении VEGF₁₆₅ увеличилась вероятно компенсаторно. ***Rhbdf1*** принадлежит к семейству сериновых протеиназ (ромбоидов), расщепляющих белки, аналогичные эпидермальному фактору роста и в связи с этим обладает антиангиогенными свойствами. На модели кислород-индуцированной ретинопатии также было выявлено увеличение уровня экспрессии ***Rhbdf1*** [Ishikawa K. et al., 2015]. ***Igfbp4*** – ИФР – связывающий белок типа 4, образует комплекс с инсулиноподобным фактором роста 1 и не позволяет ему связаться с «родными» рецепторами на клетках-мишенях, блокируя тем самым его эффект - стимулировать неоангиогенез. На экспериментальной модели кислород-индуцированной ретинопатии различными авторами было выявлено увеличение экспрессии в сетчатке различных типов ИФР - связывающих белков. Одни авторы выявили увеличение экспрессии ***Igfbp2***, ***Igfbp4*** и ***Igfbp5*** на фоне низкой экспрессии ***Igfbp3*** и ***Igfbp6*** [Wilson A.S., 2003], другие - увеличение экспрессии ***Igfbp3*** более чем в 5 раз в областях формирования неоваскуляризации [Lofqvist C., 2009]. У пациентов с непролиферативной и пролиферативной диабетической ретинопатией в стекловидном теле выявлено увеличение концентрации ***Igfbp2*** и ***Igfbp3*** в 1,5 и 13 раз, соответственно [Spranger J., 2000].

В результате лазерного воздействия, как при непрерывном, так и при микроимпульсном режимах излучения уровень экспрессии ***Rhbdf1*** снизился, но остался выше, чем в контроле, а уровень экспрессии ***Igfbp4*** увеличился (больше при непрерывном режиме), т.е. уровень экспрессии обоих антиангиогенных факторов увеличился и стал выше, чем в контроле.

Ген ***Vldlr*** кодирует рецептор липопротеинов очень низкой плотности. До недавнего времени считалось, что его основная роль - участие в метаболизме липопротеинов очень низкой плотности, на сегодняшний день установлено, что он принимает активное участие в процессе ангиогенеза сетчатки. ***Vldlr*** экспрессируется в эндотелиальных клетках капилляров и мелких артериол, клетках пигментного эпителия, Мюллеровых клетках. Установлено, что у *vldlr*^{-/-} мышей развивается неоваскуляризация сетчатки и процесс этот аналогичен процессу формирования ретинальной ангиоматозной пролиферации при возрастной макулярной дегенерации у людей с образованием ретинально-хориоидальных анастомозов [Hu W. et al, 2008; Chen Y. et al, 2009], т.е. ***Vldlr*** обладает антиангиогенными свойствами.

Ген ***Ankrd23*** кодирует анкиринподобный белок, содержащий анкириновые повторы. На основе использования белка, содержащего один анкириновый повторный домен разработан способ получения композиции с антиангиогенными свойствами для применения в офтальмологии и онкологии, данная композиция позволяет заблокировать связывание VEGF-A165 с VEGFR-2 [Binz N., 2006].

Mir-16 - предшественник микроРНК из семейства генов *mir-15*. Установлено, что в клеточной линии носоглоточной карциномы *miR-16* подавляет экспрессию VEGF фактора [Hua Z. et al., 2006; Ye W. et al., 2008].

Ген ***Vezf1*** - сосудистый эндотелиальный цинковый палец 1. Установлено, что при кислород-индуцированной ретинопатии ***Vezf1*** способствует формированию неоваскуляризации [Gerald D. et al., 2013].

Ген ***Ifitm1*** кодирует интерферон-индуцированный трансмембранный белок 1, который принимает участие в ангиогенезе и обеспечивает плотный контакт между

эндотелиальными клетками сосудистой стенки в процессе ангиогенеза [Popson S.A. et al., 2014].

Экспрессия гена с проангиогенными свойствами *Acta2* при микроимпульсном режиме лазерного воздействия снизилась, при непрерывном, наоборот, увеличилась, возможно, это был кратковременный эффект.

Acta2 - альфа-актина2 (α -SMA - альфа-гладкомышечный актин) - одной из шести различных изоформ актина. Установлено, что уровень содержания Acta2 (α -SMA) в сетчатке увеличивается в процессе формирования сосудистой сети [Ehling M. et al., 2013] и при пролиферативной витреоретинопатии [Si Y. et al., 2013].

Экспрессия проангиогенного гена *VegfA* снизилась при непрерывном режиме лазерного воздействия и увеличилась при микроимпульсном, возможно это также был кратковременный эффект, так Itaya M. с соавт. (2007) было установлено, что уровень VEGF после лазеркоагуляции сетчатки у мышей через 1 день увеличивается, достигает максимума на 3-й день, совпадая с пиковой инфильтрацией макрофагами и затем, с 3 по 5 день, быстро снижается.

Разнонаправленное изменение экспрессии наблюдалось в отношении гена *Sgpp1*, блокирующего механизм регуляции ангиогенеза, - увеличилась его экспрессия при микроимпульсном режиме лазерного воздействия и уменьшилась при непрерывном и стала ниже, чем в контроле. *Sgpp1* дефосфорилирует сфингозин-1-фосфат (S1P) до сфингозина. S1P является биоактивным производным сфингомиелина, через специфические рецепторы на эндотелии сосудов регулирует процесс ангиогенеза, как в физиологических, так и в патологических условиях – активирует через рецепторы S1P1 и S1P3, ингибирует через рецептор S1P2 [Takuwa Y. et al., 2010]. Установлено, что S1P1-селективный антагонист ингибирует VEGF-индуцированный ангиогенез [Yonesu K. et al., 2009]. При дефосфорилировании S1P блокируется весь механизм регуляции ангиогенеза. В связи с этим оценить является полученный результат по данному гену положительным или отрицательным не представляется возможным, мы можем только констатировать произошедшие изменения экспрессии.

Таким образом, при лазерном воздействии осуществляется коррекция, изменений ретинальной экспрессии генов ангиогенеза, развивающихся при интравитреальном введении VEGF₁₆₅, - снижается экспрессия гена *Upp1*, обладающего проангиогенными свойствами, нормализуется экспрессия компенсаторно повышенного уровня генов *Rhbdf1* и *Igfbp4*, являющихся ингибиторами неоваскуляризации (при микроимпульсном режиме излучения), увеличивается экспрессия *Igfbp4* (при непрерывном режиме лазерного излучения). При лазерном воздействии в микроимпульсном режиме при отсутствии изменений экспрессии в результате интравитреального введения VEGF₁₆₅ увеличивается экспрессия генов с антиангиогенными свойствами (*Vldlr*, *Ankrd23*, *Mir-16*) и снижается экспрессия генов с проангиогенными свойствами (*Vezf1*, *Ifitm*, *Acta2*).

Изменение ретинальной экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза, при лазерном воздействии с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме после введения VEGF₁₆₅.

Наблюдалось достоверное изменение в экспрессии генов, участвующих в регуляции функций эндотелиального барьера и ангиогенеза: экспрессия генов с антиангиогенными свойствами как повысилась (*TKT* – нормализовалась после снижения при введении VEGF, и *IGFBP4*, $p < 0,01$), так и снизилась (*RAB6B*, *CTNNA1*, *F11R*, *EIF4A1*, *EIFH4*, $p < 0,01$), экспрессия генов с проангиогенными свойствами также повысилась (*CSF1R*, *MGP*, *FGF1*, *OLFML3*, *PTN*, $p < 0,01$) и снизилась (*HSP90B1*, *SDCBP*, *XBP1*, *S100A10*, *LTF*, $p < 0,01$) (Табл. 12).

Таблица 12.
Сравнительный анализ экспрессии генов ангиогенеза при лазерном воздействии в непрерывном режиме

Аббревиатура	Наименование гена	Accession №	Соотношение между группами (2/1) * - $p < 0,01$	Соотношение между группами (4/2) $p < 0,01$
LTF	Lactotransferrin	NM_008522.2	3,8*	-0,3

HSP90B1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	NM_011631.1	1,5	-0,6
SDCBP	Syndecan Binding Protein	NM_001098227.1	1,3	-0,7
S100A10	S100 Calcium Binding Protein A10	NM_009112.2	1,3	-0,7
XBP1	X-Box Binding Protein 1	NM_013842.2	1,2	-0,5
IGFBP4	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4	NM_010517.3	1,2*	1,3
RAB6B	RAB6B, Member RAS Oncogene Family	NM_173781.3	1,2	-0,8
CTNNA1	Catenin Alpha 1	NM_009818.1	1,1	-0,8
F11R	F11 Receptor	NM_172647.2	1,1	-0,6
CCNG1	Cyclin G1	NM_009831.2	1,1	-0,4
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	NM_008302.3	1,0	-0,8
PTN	Pleiotrophin	NM_008973.2	1,0	1,3
EIFH4	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4H	NM_033561.1	1,0	-0,9
PRDX1	Peroxiredoxin 1	NM_011034.2	1,0	-0,7
TKT	Transketolase	NM_009388.2	-0,5	2,2
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	NM_001037859.2	-0,7	1,8
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1	NM_010197.3	-0,8	1,5
JMJD6	Jumonji Domain Containing 6, Arginine Demethylase And Lysine Hydroxylase	NM_033398.2	-0,8	-0,7
MGP	Matrix Gla Protein	NM_008597.3	-0,9	1,6
OLFML3	Olfactomedin Like 3	NM_133859.2	-0,9	1,5
EIF4A1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1	NM_144958.2	-1,0	-0,8

После снижения при введении VEGF нормализовалась экспрессия гена *TKT*, кодирующего белок с транскетотазной активностью. Установлено, что у животных с стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в результате активации *TKT* при использовании бенфотиамина (жирорастворимое производное тиамин)

блокируются все пути образования метаболитов глюкозы, предотвращается развитие сосудистых патологических изменений и диабетической ретинопатии [Hammes H.P. et al, 2003]. При проведении аргонлазерной коагуляции сетчатки мышей C75Bl/6J экспрессия гена *TKT* остается повышенной в течение длительного времени (90 дней); авторы считают, что этот ген может являться потенциальным геном-мишенью в отношении предотвращения развития диабетической ретинопатии и неоваскуляризации [Binz N. et al., 2005].

Повысилась экспрессия гена *IGFBP4*, который является членом семейства белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBP) и кодирует белки с доменом IGFBP и доменом тиреоглобулина типа I. *IGFBP-4* ингибирует FGF-2- и IGF-1-индуцируемый ангиогенез, но не способен ингибировать VEGF-индуцированный ангиогенез [Contois L.W. et al, 2012].

После снижения при введении VEGF увеличилась экспрессия гена *CSF1R*, белковым продуктом которого является рецептор колониестимулирующего фактора 1 из семейства тирозин специфичных протеинкиназ, участвующий в процессах дифференцировки и регуляции работы макрофагов и моноцитов. В то же время на экспериментальной модели лазерной индуцированной хориоидальной неоваскуляризации было выявлено, что при использовании селективного ингибитора CSF-1R - PLX5622 (Plexxikon, Berkeley, CA) площадь развивающейся неоваскуляризации достоверно меньше, чем в контрольной группе [Schwarzer P. et al., 2019].

После снижения при введении VEGF повысилась экспрессия гена *MGP* – матричного глиального белка, в соответствии с генетической базой данных по глазным тканям наиболее высокая его экспрессия отмечается в RPE и сосудистой оболочке. Установлено также, что *MGP* экспрессируется в эндотелиальных клетках; было показано, что *MGP* стимулирует экспрессию VEGF посредством увеличения активности трансформирующего фактора роста - бета1 (TGF-бета1) в эндотелиальных клетках аорты [Boström K. et al., 2004].

После снижения при введении VEGF увеличилась экспрессия гена *FGF1*, кодирующего белок из семейства факторов роста фибробластов (FGF),

участвующих в ангиогенезе. FGF1 и FGF2 являются более мощными ангиогенными факторами, чем факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и тромбоцитов (PDGF) [Vlodavsky C.R. et al., 2003]. Установлено, что высокий уровень продукции FGF1 клетках RPE коррелирует с активностью процесса пролиферативной витреоретинопатии [Malecaze F. et al., 1993]. Li D. et al (2016) считают, что комбинированная блокада FGF-2 и VEGF может быть более эффективна в отношении патологического ангиогенеза глаза, чем блокада VEGF.

Повысилась экспрессия гена ***PTN***, кодирующего белок, принадлежащий к семейству гепарин-связывающих факторов роста и обладающего проангиогенной активностью. Zhu X. et al (2015) было установлено, что у пациентов с ПДР в стекловидном теле концентрация PTN выше, чем в контроле и выявлена его высокая концентрация в фиброваскулярных мембранах. Авторы считают, что PTN у пациентов с ПДР играет определенную роль в развитии неоангиогенеза в результате регуляции секреции VEGF и активации ERK 1/2. Ding X. et al (2017) также было выявлена экспрессия PTN в пролиферативных мембранах у пациентов с пролиферативной витреоретинопатией, дефицит PTN ингибировал TGF- β 1 и развитие пролиферативной витреоретинопатии.

После снижения повысилась экспрессия гена ***OLFML3***, кодирующего гликопротеин внеклеточного матрикса с С-концевым ольфактомединовым доменом, который облегчает белковые, межклеточные взаимодействия и клеточную адгезию. ***OLFML3*** является проангиогенным фактором, который взаимодействует с BMP4 и способствует ангиогенезу [Miljkovic-Licina M. et al., 2012]. Предполагается, что он может участвовать в развитии неоваскулярных заболеваний сетчатки и переднего отдела глаза. В 2010 году для использования при лечении заболеваний с неоваскулярной патологией были запатентованы антитела к ***OLFML3*** в качестве ингибиторов ангиогенеза (WIPO. WO/2010/065437. WIPO Patent application. 2010).

Снизилась экспрессия генов ***HSP90B1*** и ***HSP90AB1***, кодирующих молекулярный шаперон. Установлено, что ***HSP90B1*** принимает участие в процессах ангиогенеза. Wu W.C. et al. (2007) было установлено, что при

использовании ингибитора HSP90 в клетках ретинального пигментного эпителия в условиях экспериментальной гипоксии снижается экспрессия VEGF и выдвинуто предположение, что ингибиторы HSP90 могут рассматриваться в качестве антиангиогенных средств, используемых при офтальмопатологии, сопровождающейся неоваскуляризацией. Снизилась экспрессия гена еще одной изоформы семейства молекулярных шаперонов. *HSP90AB1* стабилизирует мРНК VEGF-A-индуцированного проангиогенного белка BAZF и участвует в регуляции ангиогенеза [Haase M. and Fitze G., 2016].

Уменьшилась экспрессия *XBP1*, кодирующего X-box-связывающий белок 1, являющийся транскрипционным фактором. Предполагается, что в условиях ишемии VEGF активирует сигнальный путь IRE1 α /XBP1, в результате чего в тканях развивается патологический ангиогенез [Zeng L. et al., 2013]. По результатам исследования Zeng L. et al (2013), блокада *XBP1* у мышей (*XBP1*еско) приводит к устранению VEGF-индуцированной пролиферации эндотелиальных клеток.

Произошло уменьшение экспрессии гена *SDCBP* - синтенина-1, связывающего С-концы трансмембранных белков. Синтенин стимулирует передачу сигналов VEGF в эндотелиальных клетках посредством PDZ-зависимого взаимодействия с эфрином-B2 [Tae N. et al., 2017]. При нокдауне синтенина уменьшается сосудистая проницаемость, снижается активность процессов пролиферации и миграции в эндотелиальных клетках, опосредованных VEGF, снижается продукция оксида азота.

Снизилась экспрессия гена *PRDX1*, кодирующего антиоксидантный фермент пероксиредоксин-1. Установлено, что PRDX1 стимулирует экспрессию и миграцию VEGF в эндотелиальных клетках сосудов мыши посредством TLR-4 зависимого взаимодействия HIF-1 с элементом гипоксического ответа в промоторе VEGF [Riddell J.R. et al., 2012].

Экспрессия гена *JMJD*, кодирующего ядерный белок с доменом JmjC, снизилась. Установлено, что угнетение экспрессии (молчание) *JMJD6* нарушает ангиогенную функцию эндотелия и ингибирует ангиогенез путем модулирования

сплайсинга VEGF-рецептора 1 (Flt1) и увеличения уровня растворимой формы Flt1, связывающейся с VEGF и PlGF [Boeckel J.N. et al., 2011].

Снизилась экспрессия **S100A10**, являющегося членом семейства белков S100. Белки семейства S100 представляют собой маленькие молекулы (10-12 кДа), связывающие ионы кальция. Роль S100A10 установлена в регуляции процессов фибринолиза и ангиогенеза. S100A10 (2 субъединицы) образует гетеротетрамёрный комплекс с аннексином A2 (2 субъединицы), комплекс является рецептором плазминогена и t-PA и обеспечивает нетромбогенность эндотелия. В эксперименте, на модели кислород-индуцированной ретинопатии было выявлено, что развитие сосудисто-пролиферативной реакции в области сетчатки связано с увеличением S100A10 и что у животных AnxA2 - / - неоангиогенный ответ сетчатки ингибируется в 50% случаев. Авторы высказали предположение, что при офтальмопатологии, связанной с неоваскуляризацией может быть целесообразным дополнительно с анти-VEGF терапией производить блокаду A2 [Hedhli N. et al., 2012].

Снизилась экспрессия гена **CCNG1**, кодирующего белок циклин G1, участвующего в регуляции клеточного цикла посредством изменения активности циклин-зависимых протеинкиназ. Установлено, что подавление экспрессии **CCNG1** приводит к ингибированию пролиферации гладкомышечных клеток сосудов и препятствию образования неоинтимы у крыс с рестенозом сонных артерий после повреждения балонным катетером [Zhu N.L. et al., 1997].

Снизилась экспрессия гена **LTF**, кодирующего железосвязывающий гликопротеин - лактоферрин. Лактоферрин относят к системе врожденного иммунитета, существуют данные о том, что лактоферрин опосредованно вовлечен в процессы клеточного иммунитета. Главные биологические функции белка — это связывание и транспорт ионов железа, но, кроме этого, лактоферрин обладает антибактериальной, противовирусной, различными каталитическими активностями, иммуномодулирующим действием и участвует в процессе ангиогенеза. Установлено, что лактоферрин стимулирует VEGF-A-опосредованную миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC)

посредством регуляции в эндотелиальных клетках экспрессии одного из рецепторов VEGF - KDR/Flk-1 [Kim C.W. et al., 2006]. *LTF* экспрессируется в сосудистой оболочке, сетчатке, в области диска зрительного нерва, пигментном эпителии.

Уменьшилась экспрессия гена ***RAB6B***, кодирующего RAS-связанный белок Rab-6B, который участвует в везикулярном транспорте и была ниже, чем в контроле (после введения VEGF экспрессия была увеличена в 2 раза). Установлено, что при нокдауне *RAB6B* повышается секреция VEGF в клеточной линии ретинального пигментного эпителия мышей (B6-RPE07). Предполагается, что *RAB6B* в ретинальном пигментном эпителии контролирует удержание VEGF-содержащих везикул в аппарате Гольджи в ожидании сигнала, позволяющего везикулам продвигаться по секреторному пути [Rodrigues I.P., 2013].

Наблюдалось снижение экспрессии гена ***F11R*** (уровень экспрессии был ниже, чем в контроле, после введения VEGF экспрессия была увеличена в 1,17 раза), кодирующего молекулу адгезии JAM-1(A). JAM-A является сигнальной молекулой, относящейся к мембранным белкам I типа суперсемейства иммуноглобулинов Ig-SF, экспрессируется в сосудистом эндотелии, участвует в формировании плотных эндотелиальных контактов и регуляции барьерной функции сосудистой стенки [Kuznik B.I. et al., 2015]. Установлено, что в эндотелиальных клетках сетчатки, подвергнутых воздействию высоких доз глюкозы, снижается экспрессия JAM-A. На основании этого авторы высказали предположение, что увеличение проницаемости эндотелиальных клеток сетчатки, вероятно, связано с селективным уменьшением экспрессии белков плотных контактов (JAM-A), что приводит к увеличению трансклеточной проницаемости [Saker S. et al., 2014]. В то же время JAM-A регулирует моторику эндотелиальных клеток, их направленное движение и формирует фокальный контакт в процессе ангиогенеза. JAM-A участвует в регуляции барьерной функции и ретинального пигментного эпителия. Выявлено, что антитела к JAM-A приводят к увеличению проницаемости монослоя ARPE-19 [Mandell K.J. et al., 2007]. JAM-A участвует в процессах ангиогенеза в эмбриональной сетчатке [Daniel L.L. et al., 2007].

Установлено, что у отрицательных JAM-A (JAM-A^{-/-}) животных, в отличие от положительных JAM-A (JAM-A^{+/+}) в аортальном кольце не развивается сосудистая сеть [Cooke V.G. et al., 2006]. Naik M.U. et al (2012) продемонстрировано, что блокировка внеклеточного домена JAM-A ингибирует индуцированную bFGF пролиферацию и ангиогенез эндотелиальных клеток. Повышение экспрессии F11R и усиление васкуляризации сетчатки наблюдается у мышей с дефицитом гена JAM-C (Jam3) [Díaz-Coránguez M. et al., 2019].

Снизилась экспрессия гена **CTNNA1**, кодирующего белок клеточной адгезии α-катенин 1, уровень экспрессии был ниже, чем в контроле. Продemonстрировано SPARC-опосредованное (SPARC – кислый секретируемый протеин, богатый цистеином, играющий важную роль в патогенезе диабетической ретинопатии) снижение экспрессии CTNNA1 в эндотелиальных клетках капилляров сетчатки человека после воздействия среды с высоким содержанием глюкозы [Fu Y. et al., 2019].

Уменьшение экспрессии генов **EIF4A1** и **EIFH4**, кодирующих факторы инициации трансляции, произошло в 1,2 и 1,15 раза, соответственно. Зарегистрировано снижение экспрессии EIF4A1 в сетчатке PlGF^{-/-} (плацентарный фактор роста) мышей с сахарным диабетом [Lennikov M.S. et al., 2018].

Таким образом, при использовании непрерывного режима лазерного воздействия с длиной волны 577 нм изменилась экспрессия генов, которые помимо своих основных функций, обладают про- или антиангиогенными свойствами.

Увеличилась экспрессия генов, как с антиангиогенными – **TKT** – нормализовалась, **IGFBP4**, так и проангиогенными свойствами - **CSF1R**, **MGP**, **FGF1**, **OLFML3**, **PTN**, и снизилась экспрессия, как с проангиогенными - **HSP90B1**, **SDCBP**, **XBP1**, **S100A10**, **LTF**, **HSP90AB1**, **PRDX1**, **JMJD**, **CCNG1**, так и с антиангиогенными свойствами - **RAB6B**, **CTNNA1**, **F11R**, **EIF4A1** и **EIFH4**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологическая неоваскуляризация в современной офтальмологии обуславливает высокую практическую значимость изучения и разработки новых подходов, направленных на коррекцию патологических механизмов новообразования сосудов и нейроретинальных повреждений. Увеличение экспрессии таких проангиогенных факторов, как TNF, FGF, TGF, ИЛ, PDGF и PIGF может запускать VEGF-независимую неоваскуляризацию и вызывать резистентность к анти-VEGF-препаратам.

В настоящей работе была исследована роль ингибитора TNF- α , агонистов PPAR рецепторов и лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном и непрерывном режимах в регуляции ангиогенеза при ретинальной неоваскулярной патологии.

В первом разделе исследования полученные данные сравнительного анализа уровня содержания TNF- α и VEGF и площади ретинальной неоваскуляризации у крыс с КИР и интактных животных свидетельствуют о том, что в группе животных с КИР уровень содержания TNF- α и VEGF в ткани сетчатки выше, чем в группе интактных животных, показатель площади ретинальной неоваскуляризации находится в прямой корреляционной зависимости от уровня VEGF и TNF- α , уровень VEGF тем выше, чем выше TNF- α . TNF- α , по всей вероятности, может являться еще одной терапевтической мишенью при неоваскулярной патологии сетчатки. Ингибитор TNF- α Инфликсимаб и комбинированное его применение с PEDF у животных с кислород-индуцированной ретинопатией позволяет значительно снизить уровень содержания TNF- α и VEGF в ткани сетчатки, а также приводит к уменьшению площади ретинальной неоваскуляризации.

При исследовании роли агонистов PPAR рецепторов при применении фенофибратной композиции было выявлено, что уровень содержания белков плотных контактов был выше, чем в группе животных с КИР. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что применение фенофибрата в

используемой композиции позволяет предотвратить резкое нарушение проницаемости гематоретинального барьера. Площадь ретиальной неоваскуляризации, а также уровень содержания TNF- α и VEGF на 15 сутки во всех группах животных с использованием фенофибратной композиции и пиоглитазона был достоверно ниже, чем в группе животных с КИР. Между уровнем содержания TNF- α , VEGF и площадью ретиальной неоваскуляризации при использовании препаратов агонистов PPAR α и PPAR γ выявлено наличие средней корреляционной зависимости, что свидетельствует о наличии у представителей этих групп препаратов других ангиогенных механизмов.

В третьем разделе исследования в результате интравитреального введения VEGF наблюдалось увеличение экспрессии генов - ингибиторов неоваскуляризации, снижение экспрессии генов, стимулирующих ангиогенез и увеличение экспрессии гена Upp1, обладающего проангиогенными свойствами. Было выявлено, что при лазерном воздействии осуществляется коррекция, изменений ретиальной экспрессии генов ангиогенеза, развивающихся при интравитреальном введении VEGF, - снижается экспрессия гена Upp1, нормализуется экспрессия компенсаторно повышенного уровня генов Rhbdf1 и Igfbp4, являющихся ингибиторами неоваскуляризации (при микроимпульсном режиме излучения), увеличивается экспрессия Igfbp4 (при непрерывном режиме лазерного излучения).

Было выявлено, что при лазерном воздействии в микроимпульсном режиме при отсутствии изменений экспрессии в результате интравитреального введения VEGF увеличивается экспрессия генов с антиангиогенными свойствами (Vldlr, Ankrd23, Mir-16) и снижается экспрессия генов с проангиогенными свойствами (Vezf1, Ifitm, Acta2).

При лазерном воздействии в непрерывном режиме наблюдалось достоверное изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции функций эндотелиального барьера и ангиогенеза: экспрессия генов с антиангиогенными свойствами как повысилась (ТКТ – нормализовалась после снижения при введении VEGF, и

IGFBP4, $p < 0,01$), так и снизилась (RAB6B, CTNNA1, F11R, EIF4A1, EIFH4, $p < 0,01$), экспрессия генов с проангиогенными свойствами также повысилась (CSF1R, MGP, FGF1, OLFML3, PTN, $p < 0,01$) и снизилась (HSP90B1, SDCBP, XBP1, S100A10, LTF, $p < 0,01$). Полученные данные следует иметь в виду при выборе режимов лазерного излучения с длиной волны 577нм.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований агонистов PPAR α и PPAR γ , а также ингибиторов TNF- α при патологии, связанной с формированием патологической неоваскуляризации в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. TNF- α является прямым и VEGF - опосредованным индуктором неоваскуляризации при кислород-индуцированной ретинопатии (КИР); динамическое изменение уровня содержания TNF- α и VEGF в ткани сетчатки в процессе формирования КИР происходит в соответствии с определенными выявленными закономерностями - максимальный уровень их содержания наблюдается на 13 и 15 сутки, соответственно. Площадь ретинальной неоваскуляризации находится в прямой корреляционной зависимости от VEGF ($r = 0,86$; $p < 0,05$) и TNF- α ($r = 0,72$; $p < 0,05$), уровень VEGF тем выше, чем выше уровень TNF- α ($r = 0,78$; $p < 0,05$).

2. TNF- α - блокада, при проведении на 12 сутки жизни, позволяет эффективно снизить уровень содержания TNF- α в ткани сетчатки у животных с КИР; комбинированная TNF- α - VEGF блокада, при проведении ее на 12 и 14 сутки соответственно, позволяет более эффективно, чем изолированная VEGF - блокада, снизить уровень содержания VEGF в ткани сетчатки, избежать значительных его перепадов и предотвратить формирование неоваскуляризации.

3. Применение PPAR α и PPAR γ агонистов у животных с КИР позволяет эффективно снизить уровень содержания TNF- α и VEGF в ткани сетчатки и предотвратить формирование ретинальной неоваскуляризации.

4. VEGF - индуцированные изменения экспрессии генов ангиогенеза - компенсаторное увеличение экспрессии генов - ингибиторов неоваскуляризации - Psen2, Rhbdf1, Tsp1, Igfbp4, снижение экспрессии генов, стимулирующих ангиогенез - Irs2 и Egr1 и увеличение экспрессии гена Upp1, обладающего проангиогенными свойствами

5. При лазерном воздействии с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме осуществляется коррекция VEGF - индуцированных изменений экспрессии генов ангиогенеза - снижается экспрессия гена Upp1 с проангиогенными свойствами и нормализуется экспрессия генов Rhbdf1 и Igfbp4 - ингибиторов неоваскуляризации; увеличивается экспрессия генов с антиангиогенными свойствами - Vldlr, Ankrd23, Mir-16 и снижается экспрессия генов с проангиогенными свойствами - Vezf1, Ifitm, Acta2.

6. При лазерном воздействии с длиной волны 577 в непрерывном режиме осуществляется коррекция VEGF - индуцированных изменений экспрессии генов ангиогенеза - снижается экспрессия гена *Upp1* с проангиогенными свойствами, нормализуется экспрессия компенсаторно повышенного уровня гена *Rhbdf1* - ингибитора ангиогенеза и увеличивается экспрессия гена *Igfbp4* – ингибитора ангиогенеза; увеличивается экспрессия генов, как с антиангиогенными – *TKT*, так и проангиогенными свойствами - *CSF1R*, *MGP*, *FGF1*, *OLFML3*, *PTN*, и снижается экспрессия, как с проангиогенными - *HSP90B1*, *SDCBP*, *XBP1*, *S100A10*, *LTF*, *HSP90AB1*, *PRDX1*, *JMJD*, *CCNG1*, так и с антиангиогенными свойствами - *RAB6B*, *CTNNA1*, *F11R*, *EIF4A1* и *EIFH4*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

ВМД	Возрастная макулярная дегенерация
ВКМ	Внеклеточный матрикс
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДМО	Диабетический макулярный отек
ДР	Диабетическая ретинопатия
ЗАРН	Задняя агрессивная ретинопатия недоношенных
КИР	Кислород-индуцированная ретинопатия
ЛК	Лазерная коагуляция
ЛПНП	Липопротеины низкой плотности
МКОЗ	Максимальная коррекция остроты зрения
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
ОКТ	Оптическая когерентная томография
ПДР	Пролиферативная диабетическая ретинопатия
ПХВ	Полипоидная хориоидальная васкулопатия
РВО	Ретинальная венозная окклюзия
РН	Ретинопатия недоношенных
СД	Сахарный диабет
ФАГ	Флуоресцеиновая ангиография
ХНВ	Хориоидальная неоваскуляризация
ЦВС	Центральная вена сетчатки
ЭПК	Эндотелиальные прогениторные клетки
ЭРГ	Электроретинография
FGF	Фактор роста фибробластов
EGF	Эпидермальный фактор роста
JNK	Jun N-терминальные киназы
HGF	Фактор роста гепатоцитов
HIF	Фактор, индуцируемый гипоксией
ICAM-1	Молекула клеточной адгезии
IGF-1	Инсулиноподобный фактор роста 1

IL	Интерлейкин
LT	Лимфотоксин
MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа
MMP	Матриксные металлопротеиназы
NGF	Фактор роста нервов
PDGF	Фактор роста тромбоцитов
TGF- α , β	Трансформирующие факторы роста α и β
PIGF	Плацентарный фактор роста
PEDF	Фактор пигментного эпителия
PPARs	Ядерные рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором
TIMP	Тканевой ингибитор металлопротеиназы
TNF- α	Фактор некроза опухоли альфа
VEGF	Эндотелиальный сосудистый фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алпатов С.А. Блокаторы ангиогенеза в лечении глазных заболеваний // РМЖ. «Клиническая офтальмология». – 2015. – Т.15. – № 4. – С. 196–200.
2. Беянина С.И. Эйлеа (Афлиберцепт) в лечении возрастной макулярной дегенерации // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2017. – Т. 3. – №4 (19) – С.20-23.
3. Бикбов М.М. Исследования в офтальмологии / М.М. Бикбов, Р.Р. Файзрахманов // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 2. – С. 216-222.
4. Бикбов М.М. Особенности антивазопролиферативной терапии у пациентов с активной фиброваскулярной мембраной при возрастной макулярной дегенерации / М.М. Бикбов, Р.Р. Файзрахманов // Медицинский альманах. – 2015. – т. 36. – № 1. – С. 93- 95.
5. Бикбов М.М. Влияние интравитреального имплантата с дексаметазоном на параметры фовеолярной зоны при окклюзии центральной вены сетчатки / М.М. Бикбов, Р.Р. Файзрахманов, Т.Р. Гильманшин [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2016. – т. 132. – № 2. – С.21-25.
6. Бикбов М.М. Макулярный отек как проявление диабетической ретинопатии / М.М. Бикбов, Р.Р. Файзрахманов, Р.М. Зайнуллин [и др.] // Сахарный диабет. – 2017. – т. 20. – № 4. – С. 263-269.
7. Бойко Э.В. Антиангиогенная терапия в офтальмологии / Э.В. Бойко, С.В. Сосновский, Р.Д. Березин [и др.] // СПб.: ВМедА имени С.М. Кирова. – 2013. – 292 с.
8. Будзинская М.В. Алгоритм ведения пациентов с РВО. Сообщение 2 / М.В. Будзинская, Н.К. Мазурина, А.Е. Егоров [и др.] // Макулярный отек. – 2015. – т. 131. - № 6. – С. 57- 66.
9. Гаврилова Н.А. Анализ результатов применения инфликсимаба, PEDF и ранибизумаба на модели кислород-индуцированной ретинопатии / В.Е. Широков, О.Ю. Комова, О.Б. Бантыш [и др.] // Вестник Тамбовского

- университета. Серия: Естественные и технические науки. - 2015. - Т. 20. - № 3. - С. 539-544.
10. Гаврилова Н.А. Результаты применения агонистов PPAR α и PPAR γ при моделировании кислород-индуцированной ретинопатии / Н.С. Гаджиева, О.Ю. Комова, Е.И. Карамышева // Современные проблемы науки и образования. – 2016. - № 3. - С. 130.
 11. Гаврилова Н.А. Изменения транскриптома сетчатки в эксперименте при интравитреальном введении VEGF / Н.С. Гаджиева, О.Ю. Комова, Э.В. Филиппова [и др.] // Научное обозрение. Медицинские науки. - 2016. - № 6. - С. 36-47.
 12. Гаврилова Н.А. Изменения экспрессии генов в сетчатке при интравитреальном введении VEGF в эксперименте / С.А. Борзенко, С.А. Обрубов, Н.С. Гаджиева, О.Ю. Комова // Российская детская офтальмология. - 2017. - № 1. - С. 25-34.
 13. Гаврилова Н.А. Анализ ретинальной экспрессии генов после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме на сетчатку / С.А. Борзенко, Н.С. Гаджиева, О.Ю. Комова [и др.] // Лазерная медицина. - 2019. - Т. 23. - № S3. - С. 69-70.
 14. Гаврилова Н.А. Анализ ретинальной экспрессии генов, участвующих в регуляции ангиогенеза и функций эндотелиального барьера после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в непрерывном режиме на сетчатку / К.Г. Гуревич, О.Ю. Комова, А.В. Зиновьева // Человек и его здоровье. - 2021. - Т. 24. - № 2. - С. 37-45.
 15. Гальбинур Т.П. Эффективность анти-VEGF-препаратов у пациентов с неоваскулярной формой возрастной макулярной дегенерации и низкой остротой зрения / Т.П. Гальбинур, Е.А. Новикова // Альманах клинической медицины. – 2012. – № 26. – С. 73-74.
 16. Дедов И.И. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным федерального регистра сахарного диабета на 01.01.2021 / Дедов И.И.,

- Шестакова М.В., Викулова О.К. [и др.] // Сахарный диабет. – 2021. – т. 24. – № 3. – С. 204-221.
17. Дога А.В. Перспективы применения микроимпульсного лазерного воздействия при макулярном отеке после хирургического удаления эпиретинальной мембраны / А.В. Дога, Г.Ф. Качалина, И.М. Горшков [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – Т. 4. – № 153. – С. 71-74.
 18. Дога А.В. Современные аспекты диагностики и лечения полипоидной хориоидальной васкулопатии / А.В. Дога, Е.К. Педанова, П.Л. Володин [и др.] // Офтальмохирургия. – 2017. - № 1. – С. 88-92.
 19. Золотых О.В. Моделирование неоваскуляризации и изучение влияния ангиостатина на глазной ангиогенез // дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Оксана Владимировна Золотых; – М., 2013. – 186 с.
 20. Кабардина Е.В. Современные представления о тромбозах вен сетчатки / Е.В. Кабардина, И.П. Шурыгина // Кубанский научный медицинский вестник. – 2019. – № 1. – С. 187-195.
 21. Катаргина Л.А. Роль системного дисбаланса цитокинов в патогенезе ретинопатии недоношенных / Л.А. Катаргина, О.С. Слепова, Е.Н. Демченко [и др.] / Рос. педиатр. офтальмол. –2015. – № 4. – С. 16–20.
 22. Катаргина Л.А., Демченко Е.Н. Новые возможности в ведении пациентов с ретинопатией недоношенных (обзор литературы и анализ собственных данных) // Российский офтальмологический журнал. –2020. – Т. 13, №4 – С. 70-74.
 23. Качалина Г.Ф. Субпороговая аргоновая коагуляция сетчатки в лечении очаговой диабетической макулопатии / Г.Ф. Качалина, Е.С. Павлова // Офтальмохирургия. – 2004. – № 3. – С. 43-46.
 24. Качалина Г.Ф. Морфофункциональные результаты лечения центральной серозной хориоретинопатии в субпороговом микроимпульсном режиме лазерного воздействия длиной волны 577 нм (предварительное сообщение) /

- Г.Ф. Качалина, Е.К. Педанова, В.А. Соломин [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – Т. 4. – № 153. – С. 127-130
25. Колпакова А.Ф. Транскрипционный фактор NF-κB играет ключевую роль в регуляции генов, участвующих в воспалительных и иммунных реакциях / А.Ф. Колпакова, Р.Н. Шарипов, Ф.А. Колпаков // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – Т. 3. – № 57. – С. 7-12.
 26. Кулагина А.В. Эффективность афлиберцепта в клинической практике. Офтальмохирургия. – 2017. – № 2. – С. 11-16.
 27. Лямина С.В. Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза неоваскуляризации сетчатки / О.Ю. Комова, Н.А. Гаврилова, И.Ю. Малышев // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2015. - № 9-2. - С. 288-292.
 28. Нероев В.В. Состояние медицинской помощи пациентам с диабетической ретинопатией в Российской Федерации по результатам оценки в рамках программы ВОЗ “TADDS” / В.В. Нероев, Л.А. Катаргина, О.В. Зайцева [и др.] // Российский офтальмологический журнал. – 2016. – Т. 9. – № 2. – С. 5–10.
 29. Нероев В.В., Катаргина Л.А. / Ретинопатия недоношенных // Москва: ИКАР. - 2020.
 30. Николаева Г.В. Роль изменения кровотока в глазной артерии в патогенезе ретинопатии недоношенных / Г.В. Николаева, Е.И. Сидоренко // Российская детская офтальмология. – 2015. – С. 20-25.
 31. Осипова Н.А. Клинико-экспериментальное изучение патогенеза ретинопатии недоношенных: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Наталья Анатольевна Осипова; М., 2016. – 103 с.
 32. Охоцимская Т.Д. Афлиберцепт в лечении заболеваний сетчатки. Обзор клинических исследований / Т.Д. Охоцимская, О.Д. Зайцева // Российский офтальмологический журнал. – 2017. – № 2. – С. 103-111.
 33. Повещенко О. В. Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза / О. В. Повещенко, А. Ф. Повещенко, В. И. Коненков // Успехи физиол. Наук. – 2012. – т. 43. – № 3. – С.48-61.

34. Сидоренко Е.И. Офтальмопатия (ретинопатия) недоношенных – проблема на всю жизнь / Е.И. Сидоренко // Таврический медико-биологический вестник. – 2015. – т. 18. – № 1. – С. 117-119.
35. Сидоренко Е.И. Особенности органа зрения недоношенного ребенка / Е.И. Сидоренко, М.Р. Гусева, И.И. Аксенова // Вестник офтальмологии. – 1999. – № 4. – С. 11-14.
36. Сидоренко Е.И. Проблемы и перспективы оксигенотерапии в офтальмологии. Возрастные особенности органа зрения в норме и патологии у детей / Е.И. Сидоренко, О.С. Комаров // М., 1990. – С. 128-132.
37. Сидоренко Е.И. Биохимическая ауторегуляция сосудов глазного дна и ЦНС как фактор риска развития РН / Е.И. Сидоренко, Г.В. Николаева // Российская педиатрическая офтальмология. – 2007. – № 4. – С. 7-10.
38. Сидоренко Е.И. Новые аспекты патогенеза ретинопатии недоношенных с позиции гомеостаза стекловидного тела / Е.И. Сидоренко, Г.В. Николаева, Л.И. Амханицкая [и др.] // Российский офтальмологический журнал. – 2012. – Т. 5. – № 3. – С. 53-56.
39. Сидоренко Е.И. Причина высокой токсичности кислорода для сетчатки недоношенных детей / Е.И. Сидоренко, Г.В. Николаева, Л.И. Амханицкая [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2017. – Т. 20. – № 2. – С. 108-112.
40. Танковский В.Э. Тромбозы вен сетчатки / В.Э. Танковский // М.: Воениздат, 2000. – 262 с.
41. Тульцева С.Н. Окклюзии вен сетчатки (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение) / С.Н. Тульцева, Ю.С. Астахов // СПб.: Н-Л, 2010. – 112 с.
42. Тульцева С.Н. Опыт использования анти-VEGF-препарата в лечении посттромботической неоваскулярной глаукомы / С.Н. Тульцева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9. – № 4. – С. 53-57.

43. Файзрахманов Р.Р. Режимы назначения анти-VEGF-препаратов при терапии неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации / Р.Р. Файзрахманов // Вестник офтальмологии. – 2018. – Т. 134. – № 6. – С.107-115.
44. Фурсова А.Ж. Возрастная макулярная дегенерация и глаукома. Эпидемиологические и клинико-патогенетические аспекты сочетанного течения / А.Ж. Фурсова, О.Г. Гусаревич, М.С. Тарасов [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – т. 38. – № 5. – С. 83-91.
45. Фурсова А.Ж. Прогностические факторы эффективности антиангиогенной терапии при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации / А.Ж. Фурсова, Н. В. Чубарь, М.С. Тарасов [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2018. – т. 134. – № 1. – С. 48-55.
46. Adamis A.P. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals / A.P. Adamis, M. Altaweel, N.M. Bressler [et al.] // Ophthalmology. – 2006. – Vol. 113. – P. 23-28.
47. Ahmad I. Regulation of Ocular Angiogenesis by Notch Signaling: Implications in Neovascular Age-Related / I. Ahmad, S. Balasubramanian, B. Carolina [et al.] // Macular Degeneration Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2011. Vol. 52, № 6. – P. 2868-2878.
48. Ahmed F. Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure / F. Ahmed, K.M. Brown, D.A. Stephan [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2004. – Vol. 45. – P. 1247–1258.
49. Aljada A. PPAR γ ligands, rosiglitazone and pioglitazone, inhibit bFGF- and VEGF-mediated angiogenesis / A. Aljada, L. O'Connor, Fu Y. Y. [et al.] // Angiogenesis. – 2008. – Vol. 11, № 4. – P. 361-367.
50. Al-Lamki R.S. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants / R.S. Al-Lamki, J. Wang, J.N. Skepper [et al.] // Lab. Invest. – 2001. – Vol. 81, №11. – P. 1503-1515.

51. Ambrosius W.T. Lack of association between thiazolidinediones and macular edema in type 2 diabetes: the ACCORD eye substudy / W.T. Ambrosius, R.P. Danis, D.C. Goff [et al.] // *Archives of Ophthalmology*. – 2010. – Vol. 128, № 3. – P. 312-318.
52. Amerongen R. van. Towards an integrated view of Wnt signaling in development / R. van Amerongen, R. Nusse // *Development*. – 2009. – Vol. 136. – P. 3205-3214.
53. Amerongen R. van. Alternative Wnt Pathways and Receptors // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2012. – Vol. 4. – P. 007914.
54. Amoaku W.M. Defining response to antiVEGF therapies in neovascular AMD / W.M. Amoaku, U. Chakravarthy, R. Gale [et al.] // *Eye [Lond]*. – 2015. – Vol. 29, № 6 – P. 721-731.
55. Arias L. Intravitreal infliximab in patients with macular degeneration who are nonresponders to antivasular endothelial growth factor therapy / L. Arias, J.M. Caminal, M.B. Badia [et al.] // *Retina*. – 2010. – Vol. 30, №10. – P. 1601-8.
56. Aslankurt M. The results of switching between 2 anti-VEGF drugs, bevacizumab and ranibizumab, in the treatment of neo vascular age-related macular degeneration / M. Aslankurt, L. Aslan, A. Aksoy [et al.] // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 23, № 4 – P. 553-557.
57. Auboeuf D. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients / D. Auboeuf, J. Rieusset, L. Fajas // *Diabetes*. – 1997. – Vol. 46, № 8. – P. 1319-1327.
58. Bandello E.F. Anti-VEGF. / E.F. Bandello, M.B. Parodi // *Developments in Ophthalmology*. – 2010. – Vol. 46. – P. 144.
59. Bakri S.J. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin) / S.J. Bakri, M.R. Snyder, J.M. Reid, J.S. Pulido [et al.] // *Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 114, № 5. – P 855-9.
60. Barth J.L. Oxidised, glycated LDL selectively influences tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene expression and protein production in human retinal capillary pericytes / J.L. Barth, Y. Yu, W. Song [et al.] // *Diabetologia*. – 2007. – Vol. 50 – P. 2200-2208.

61. Bazzoni F. The tumor necrosis factor ligand and receptor families / F. Bazzoni, B. Beutler // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – Vol. 334. – P. 1717-1725.
62. Berger S. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury / S. Berger, S.I. Savitz, S. Nijhawan, M. Singh [et al.] // *Invest. Ophth. Vis. Sci.* – 2008. – Vol. 49. – P. 3605-3610.
63. Bikbov M.M. Effektivnost' patternoi lazernoi koagulyatsii setchatki pri retinopatii nedonoshennih [Effectiveness of the retina patternlaser coagulation in retinopathy of prematurity] / M.M. Bikbov, G.H. Zainutdinova, R.L. Valyamov, A.S. Faizullina // *Rossiiskaya detskaya oftal'mologiya.* – 2013. – № 3. – P. 26-27.
64. Binz N. Long-term effect of therapeutic laser photocoagulation on gene expression in the eye. / N. Binz, C.E. Graham, Ken Simpson [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 2. – P. 383-5.
65. Bishop-Bailey D. PPARs and angiogenesis // *Biochemical Society Transactions.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1601–1605.
66. Bodmer J.L. The molecular architecture of the TNF superfamily / J.L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp // *Trends. Biochem. Sci.* – 2002. – Vol. 27. – P. 19-26.
67. Boeckel J.N. Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1 / Boeckel, J.N., Guarani, V., Koyanagi, M., Roexe, T. [et al.]. // *PNAS.* – 2011. – Vol. 108, №8. – P. 3276-3281.
68. Bordet R. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases / R. Bordet, T. Ouk, O. Petrault [et al.]. // *Biochemical Society Transactions.* – 2006. – Vol. 34, № 6. – P. 1341–1346.
69. Bosma E.K. Microvascular Complications in the Eye: Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Clinical Aspects / E.K. Bosma, C.J.F. van Noorden, I. Klaassen [et al.] // *Springer.* – 2019. – P.305-321.
70. Boström, K. Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells / K. Boström, A.F. Zebboudj, Y. Yao [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 51. – P. 52904-52913.

71. Bouwmeester T. A physical and functional map of the human TNF α /NF- κ B signal transduction pathway / T. Bouwmeester, A. Bauch, H. Ruffner [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2004. – Vol. 6, № 2. – P. 97-105.
72. Bourne R.R.A. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic review / R.R.A. Bourne, G.A. Stevens, R.A. White [et al.] // Lancet Global Health. – 2013. – Vol. 1, № 6. – P. 339–349.
73. Brown D.M. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration / D.M. Brown, P.K. Kaiser, Michels M. [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355, № 14. – P.1432–1444.
74. Brown D.M. CRUISE Investigators. Ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion: six –month primary end point of a phase III study / D.M. Brown, P.A. Campochiaro, R.P. Singh [et al.] // Ophthalmology. – 2010. – Vol.117., № 6. – P. 1124-1133.
75. Caamaño J. Family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions / J. Caamaño, C.A. Hunter // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, №3. – P. 414-429.
76. Cacicedo J.M. Activation of AMP-activated protein kinase prevents lipotoxicity in retinal pericytes / J.M. Cacicedo, S. Benjachareonwong, E. Chou [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52. – P. 3630–3639.
77. Cadigan K.M. TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus / K.M. Cadigan, M. L. Waterman // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2012. –Vol. 4. –P. 007906.
78. Campochiaro P.A. Ranibizumab for macular edema due to retinal vein occlusions: implication of VEGF as a critical stimulator / P.A. Campochiaro, G. Hafiz, S.M. Shah [et al.] // Molecular therapy. – 2008. – Vol.16. – №4. – P.791-799.
79. Campochiaro P.A. Ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: six-month primary end point results of a phase III study / P.A. Campochiaro, J.S. Heier, L. Feiner [et al.] // Ophthalmology. – 2010. – Vol.117. – P.1102-1112.

80. Cano M. del V. PPAR- α ligands as potential therapeutic agents for wet age-related macular degeneration / M. del V. Cano, P. L. Gehlbach // PPAR Research – 2008. – Vol. 2008. – P. 821592.
81. Carmeliet P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / P. Carmeliet, R.K. Jain // Nature. – 2011. – T. 473, № 7347. – P. 298-307.
82. Carmeliet P. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases / P. Carmeliet, R.K. Jain // Nat. Rev. Drug Discov. – 2011. – T. 10, № 6. – P. 417-427.
83. Chan J.J. Risk of recurrence of retinopathy of prematurity after initial intravitreal ranibizumab therapy / J.J. Chan, C.P. Lam, M.K. Kwok [et al.] // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 27082.
84. Chen L. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression / L. Chen, W. Wu, T. Dentchev [et al.] // Exp. Eye Res. – 2004. – T. 79. – P. 239–47.
85. Chen Y., Hu Y., Mott R., et al. Mechanisms for the therapeutic effect of fenofibrate on diabetic retinopathy in type 1 diabetes models. Presented at the 71st Scientific Sessions of the American Diabetes Association, Y. Chen, Y. Hu, R. Mott [et al.] 24–28 J 2011, San Diego, California
86. Chen Y. Therapeutic effects of PPARalpha agonists on diabetic retinopathy in type 1 diabetes models / Y. Chen, Y. Hu, M. Lin [et al.] // Diabetes. – 2013. – Vol. 62, № 1. – P. 261–272.
87. Chen Y. Very low-density lipoprotein receptor, a negative regulator of the wnt signaling pathway and choroidal neovascularization / Y. Chen, Y. Hu, K. Lu [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 34420–34428.
88. Chen Y. Photoreceptor degeneration and retinal inflammation induced by very low-density lipoprotein receptor deficiency / Y. Chen, Yang Hu, G. Moiseyev [et al.] // Microvasc. Res. – 2009. – Vol. 78, № 1. – P. 119–127.
89. Chiha W. Retinal genes are differentially expressed in areas of primary versus secondary degeneration following partial optic nerve injury / W. Chiha, C.J. LeVaillant, C.A. Bartlett [et al.] // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. 0192348.

90. Chinwalla A.T. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome / A.T. Chinwalla, L.L. Cook, K.D. Delehaunty [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 420. – P. 520-562.
91. Cho H. Aflibercept for exudative AMD with persistent fluid on ranibizumab and/or bevacizumab / H. Cho, C.P. Shah, M. Weber [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 97, № 8. – P. 1032– 1035.
92. Chung A. S. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis / A. S. Chung, J. Lee, N. Ferrara // *Nat. Rev. Cancer*. – 2010. – T. 10, № 7. – P. 505-514.
93. Contois L. W. Insulin-like growth factor binding protein-4 differentially inhibits growth factor-induced angiogenesis / L. W. Contois, D. P. Nugent, J. M. Caron [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 3. – P. 1779-1789.
94. Cooke V.G. Fibroblast Growth Factor-2 Failed to Induce Angiogenesis in Junctional Adhesion Molecule-A-Deficient Mice / V.G. Cooke, M.U. Naik, U.P. Naik // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2005-2011.
95. Cudmore M. J. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis / M.J. Cudmore, P.W. Hewett, S. Ahmad [et al.] // *Nat. Commun.* – 2012. – T. 3. – P. 972.
96. Daniele L.L. Novel distribution of junctional adhesion molecule-C in the neural retina and retinal pigment epithelium / L.L. Daniele, R.H. Adams, D.E. Durante [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2007. – Vol. 505, № 2. – P. 166-176.
97. de Hoz R. Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension / R. de Hoz, A.I. Ramírez, R. González-Martín [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2018. – Vol. 171. – P. 12-29.
98. Deng G. Therapeutic Effects of a Novel Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha for the Treatment of Diabetic Retinopathy / G. Deng, E.P. Moran, R. Cheng [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2017. – Vol. 58, № 12. – P. 5030-5042.
99. Díaz-Coránguez M. Tight Junctions in Cell Proliferation / M. Díaz-Coránguez, X. Liu, D.A. Antonetti // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 23. – P. e5972.

100. Ding X. The effects of pleiotrophin in proliferative vitreoretinopathy / X. Ding, Y. Bai, X. Zhu [et al.] // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 255, № 5. – P. 873-884.
101. Distler J.H. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis / J.H. Distler, A. Hirth, M. Kurowska-Stolarska [et al.] // *Q. J. Nucl. Med.* – 2003. – T. 47, №3. – P.149-161.
102. Dor Y. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and proangiogenic therapy / Y. Dor, V. Djonov, R. Abramovitch [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – T. 21, № 8. – P.1939-1947.
103. Dugel P.U. HAWK and HARRIER: Phase 3, multicenter, randomized, double-masked trials of brolucizumab for neovascular age-related macular degeneration / P.U. Dugel, A. Koh, Y. Ogura [et al.] // *Ophthalmology.* – 2020. – Vol. 127, № 1. – P. 72-84.
104. Duh E.J. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth / E.J. Duh, H.S. Yang, I. Suzuma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – Vol. 43 – P. 821–9.
105. Dwyer M.A. Research resource: nuclear receptor atlas of human retinal pigment epithelial cells: potential relevance to age-related macular degeneration / M.A. Dwyer, D. Kazmin, P. Hu [et al.] // *Molecular Endocrinology.* – 2011. – Vol. 25, № 2, – P. 360–372.
106. Egghoj M.S. Tachyphylaxis during treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab / M.S. Egghoj, T.L. Sorensen // *Brit. J. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 96. – P. 21–23.
107. Ehling M. Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence / M. Ehling, Adams S., Rui Bedito [et al.] // *Development.* – 2013. – Vol. 140 – P. 3051-3061.
108. Ehlken C. Switch of anti-VEGF agents is an option for nonresponders in the treatment of AMD / C. Ehlken, S. Jungmann, D. Böhringer [et al.] // *Eye.* – 2014. – Vol. 28. – P. 538–545.

109. Eliceiri B.P. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability / B.P. Eliceiri, R. Paul, P.L. Schwartzberg [et al.] // *Mol. Cell.* – 1999. – T. 4, № 6. – P. 915-924.
110. Ershov A.V. Photoreceptor phagocytosis selectively activates PPARgamma expression in retinal pigment epithelial cells / A.V. Ershov, N.G. Bazan // *Journal of Neuroscience Research* – 2000. – Vol. 60. – P. 328–337.
111. Evans K. Neovascular complications after central retinal vein occlusion / K. Evans, P.K. Wishart, J.N. McGalliard // *Eye (Lond).* – 1993. – Vol. 7, Pt 4. – P. 520-4.
112. Fasnacht-Riederle H. Effect of aflibercept in insufficient responders to prior anti-VEGF therapy in neovascular AMD / H. Fasnacht-Riederle, M. Becker, N. Graf // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2014. – T. 252, № 11. – P. 1705–1709.
113. Feng J. Efficacy of primary intravitreal ranibizumab for retinopathy of prematurity in China / J. Feng, J. Qian, Y. Jiang [et al.] // *Ophthalmology.* – 2017. – T. 124, № 3. – P. 408–9.
114. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H.P. Gerber, J. Le Couter // *Nat. Med.* – 2003. – T. 9, № 6. – P. 669-676.
115. Fernández-Robredo P. Current treatment limitations in age-related macular degeneration and future approaches based on cell therapy and tissue engineering / P. Fernández-Robredo, A. Sancho, S. Johnen [et al.] // *Journal of Ophthalmology.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 13.
116. Fischer C. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis / C. Fischer, M. Schneider, P. Carmeliet // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2006. – № 176, Pt 2. – P.157-212.
117. Folkman J. Angiogenesis / J. Folkman // *Annu. Rev. Med.* – 2006. – Vol. 57. – P. 1–18.
118. Fong D.S. Glitazone use associated with diabetic macular edema / D.S. Fong, R. Contreras // *American Journal of Ophthalmology.* – 2009. – Vol. 147, № 4. – P. 583.e1–586.
119. Fong G.H. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms / G.H. Fong // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2009. – T. 87, №6. – P. 549-560.

120. Freund K.B. Type 3 neovascularization: the expanded spectrum of retinal angiomatous proliferation / K.B. Freund, Ho IV, I.A. Barbazetto [et al.] // *Retina*. – 2008. – T. 28, № 2. – P. 201-211.
121. Fu Y. Glucose affects cell viability, migration, angiogenesis and cellular adhesion of human retinal capillary endothelial cells via SPARC / Y. Fu, M. Tang, X. Xiang [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2019. – T. 17 № 1. – P. 273-283.
122. Fujikawa M. Correlation between vascular endothelial growth factor and nonperfused areas in macular edema secondary to branch retinal vein occlusion / M. Fujikawa, O. Sawada, T. Miyake [et al.] // *Clin. Ophthalmol.* – 2013. – T. 7. – P. 1497–1501.
123. Gallego B.I. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma / B.I. Gallego, J.J. Salazar, R. de Hoz [et al.] // *J. Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 14, № 9. – P. 92.
124. Gardner T.W. Diabetic retinopathy: more than meets the eye / T.W. Gardner, D.A. Antonetti, A.J. Barber [et al.] // *Survey of Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 47, № 2. – P. S253–S262.
125. Gaudreault J. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits / J. Gaudreault, D. Fei, J.C. Beyer [et al.] // *Retina*. – 2007. – Vol. 27, № 9. – P. 1260–1266.
126. Gavrilova N.A. Molecular genetic mechanisms of influence of laser radiation with 577 nm wavelength in a microimpulse mode on the condition of the retina / S.A. Borzenok, N.S. Gadzhieva, O.U. Komova [et al.] // *Experimental Eye Research*. – 2019. – T. 185. – C. 107650.
127. Gerald D. RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription / D. Gerald, Adini Irit, Shechter Sharon [et al.] // *Nat. Commun.* – 2013. – T. 4. – P. 2824.

128. Gerhardinger C. Expression of acute-phase response proteins in retinal Muller cells in diabetes / C. Gerhardinger, M.B. Costa, M.C. Coulombe [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – T. 46. – P. 349–57.
129. Giansanti F. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model / F. Giansanti, M. Ramazzotti, L. Vannozzi [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – Vol. 49, №3. – P. 1151-6.
130. Giansanti F. Intravitreal infliximab clearance in a rabbit model: different sampling methods and assay techniques / F. Giansanti, M. Ramazzotti, M. Giuntoli [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. – Vol. 50, № 11. – P. 5328-35.
131. Giganti M. Adverse events after intravitreal infliximab (Remicade) / M. Giganti, P.M. Beer, N. Lemanski [et al.] // Retina. – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 71-80.
132. Giraudo E. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells / E. Giraudo, L. Primo, E. Audero [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 22128–22135.
133. Goligorsky M.S. Review article: endothelial progenitor cells in renal disease / M.S. Goligorsky, M.C. Kuo, D. Patschan [et al.] // Nephrology (Carlton). – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 291-297.
134. Gonzales J.M.G. Prophylactic peripheral laser and fluorescein angiography after bevacizumab for retinopathy of prematurity / J.M.G. Gonzales, L. Snider, M. Blair [et al.] // Retina. – 2018. – Vol. 38, №4. – P. 764–72.
135. Grant M.B. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy / M.B. Grant, A. Afzal, P. Spoerri [et al.] // Expert. Opin. Investig. Drugs. – 2004. – Vol. 13. – P. 1275-1293.
136. ACCORD Study Group Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes / ACCORD Study Group, ACCORD Eye Study Group, E.Y. Chew [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363, № 3. – P. 233-44.
137. Gudi S.R. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction / S.R. Gudi, C.B. Clark, J.A. Frangos // Circ. Res. – 1996. – T. 79, №4. – P.834-839.

138. Haase M. HSP90AB1: Helping the good and the bad / M. Haase, G. Fitze // *Gene*. – 2016. – T. 575. – P. 171-186.
139. Hammes H.P. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy / H.P. Hammes, X. Du, D. Edelstein [et al.] // *Nat Med*. – 2003. – T. 9. – P. 294-299.
140. Hedhli N. The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms / N. Hedhli, D.J. Falcone, B. Huang [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – T. 2012. – P. 406273.
141. Hellgren G. Increased postnatal concentrations of pro-inflammatory cytokines are associated with reduced IGF-I levels and retinopathy of prematurity / G. Hellgren, C. Löfqvist, I. Hansen-Pupp [et al.] // *Growth Horm. IGF Res.* – 2018. – T. 39 – P. 19–24.
142. Hellstrom M. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis / M. Hellstrom, L.K. Phng, J.J. Hofmann [et al.] // *Nature*. – 2007. – T. 445, № 7129. – P.776-780.
143. Heng L.Z. Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments / L.Z. Heng, O. Comyn, T. Peto [et al.] // *Diabetic Medicine*. – 2013 – Vol. 30, № 6. – P. 640–650.
144. Herzlich A.A. Peroxisome proliferator-activated receptor expression in murine models and humans with age-related macular degeneration / A.A. Herzlich, X. Ding, D. Shen [et al.] // *The Open Biology Journal*. – 2009. – Vol. 2. – P. 141–148.
145. Higuchi A. Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retina via an adiponectin-dependent mechanism / A. Higuchi, K. Ohashi, R. Shibata [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 46–53.
146. Hillmeister P. Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain / P. Hillmeister, K.E. Lehmann, A. Bondke [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2008. – T. 28, № 11. – P. 1811-1823.

147. Hirabayashi K. Share Investigation of the therapeutic mechanism of subthreshold micropulse laser irradiation in retina / K. Hirabayashi, S. Kakihara, M. Tanaka [et al.] // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2020. – Vol. 258, № 5. – P. 1039-1047.
148. Ho V.Y. Short-term outcomes of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in eyes previously treated with other vascular endothelial growth factor inhibitors / V.Y. Ho, S. Yeh, T.W. Olsen [et al.] // Am. J. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 156, № 1. – P. 23–28.
149. Holmes D.I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease / D.I. Holmes, I. Zachary // Genome Biol. – 2005. – T. 6, № 2. – P. 209.
150. Hu W. Expression of VLDLR in the retina and evolution of subretinal neovascularization in the knockout mouse model's retinal angiomatous proliferation / W. Hu, Jiang Aihua, Liang Jing [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis Sci. – 2008. – T. 49. – P. 407-415.
151. Hua Z. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia / Z. Hua, Q. Lv, W. Ye [et al.] // Plos One. – 2006. – T. 1, № 1. – P. e116.
152. Huang L. Therapeutic Effects of Fenofibrate Nano-Emulsion Eye Drops on Retinal Vascular Leakage and Neovascularization / L. Huang, W. Liang, K. Zhou [et al.] // Biology. - 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 1328.
153. Idris I. Association between thiazolidinedione treatment and risk of macular edema among patients with type 2 diabetes / I. Idris, G. Warren, R. Donnelly // Archives of Internal Medicine. – 2012. – Vol. 172, № 13. – P. 1005–1011.
154. Iruela-Arispe M.L. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation / M.L. Iruela-Arispe, G.E. Davis // Dev. Cell. – 2009. – T. 16, № 2. – P. 222-231.
155. Ishikawa K. Gene Expression Profile of Hyperoxic and Hypoxic Retinas in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy / K. Ishikawa, S. Yoshida, K. Kadota [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis Sci. – 2010. – Vol. 51. – P. 4307-4319.

156. Ishikawa K. Microarray analysis of gene expression in fibrovascular membranes excised from patients with proliferative diabetic retinopathy / K. Ishikawa; Yoshida Shigeo; Kobayashi Yoshiyuki [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56. – P. 932-946.
157. Itaya M. Upregulation of VEGF in Murine Retina via Monocyte Recruitment after Retinal Scatter Laser Photocoagulation / M. Itaya, Sakurai Eiji, Nozaki Miho [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2007. – Vol. 48. – P. 5677-5683.
158. Jaipersad A.S. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis / A.S. Jaipersad, G.Y. Lip, S. Silverman [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – T. 63, №1. – C. 1-11.
159. James G. Yellow pattern 577-nm micropulse laser: treatment of macular edema from radiation retinopathy – a case report / B.C. James, G. Wonga, T.H. Nguyen Trang // *Case Rep. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 81–86.
160. Jiang Y. Pioglitazone normalizes insulin signaling in the diabetic rat retina through reduction in tumor necrosis factor α and suppressor of cytokine signaling 3 / Y. Jiang, S. Thakran, R. Bheemreddy [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 38. – P. 26395-405.
161. Jones E.A. What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics / E.A. Jones, F. le Noble, A. Eichmann // *Physiology (Bethesda)*. – 2006. – T. 21. – C.388-395.
162. Jung E. Aucuba japonica extract inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy, with its bioactive components preventing VEGF-induced retinal vascular hyperpermeability / E. Jung, Jung Woo Kwon, Park Su-Bin [et al.] // *Food Sci. Nutr.* – 2020. – Vol. 8, № 6. – P. 2895–2903.
163. Kaltschmidt B. The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus / B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, T.G. Hofmann [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – Vol. 267, № 12. – P. 3828-3835.
164. Karakurt Y, Uçak T, Tasli N, Ahiskali I, Şipal S, Kurt N, Süleyman H. The effects of lutein on cisplatin-induced retinal injury: an experimental study / Y. Karakurt, T. Uçak, N. Tasli [et al.] // *Cutan Ocul. Toxicol.* – 2018. – Vol. 37, № 4. – P. 374-379.

165. Keech A.C. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): A randomised controlled trial / A.C. Keech, P. Mitchell, P.A. Summanen [et al.] // *Lancet*. – 2007. – T. 370. – P. 1687–1697.
166. Kendall R.L. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor / R.L. Kendall, K.A. Thomas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – Vol. 90. – P. 10705–10709.
167. Kent J.S. Comparison of outcomes after switching treatment from intravitreal bevacizumab to ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration / J.S. Kent, Y. Iordanous, A. Mao [et al.] // *Can. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 159–164.
168. Khurana R.N. Abicipar for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results from CEDAR and SEQUOIA phase 3. Presented at: American Academy of Ophthalmology annual meeting; October 11-15, 2019; San Francisco.
169. Kim M. Angiogenesis in glaucoma filtration surgery and neovascular glaucoma: A review / M. Kim, C. Lee, R. Payne [et al.] // *Surv Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 60, № 6. – P. 524-535.
170. Kim J. Fenofibrate regulates retinal endothelial cell survival through the AMPK signal transduction pathway / J. Kim, J.-H. Ahn, J.-H. Kim [et al.] // *Exp. Eye Res.* – 2007. – Vol. 84, № 5. – P. 886–893.
171. Kim J. Troglitazone reverses the inhibition of nitric oxide production by high glucose in cultured bovine retinal pericytes / J. Kim, Y.S. Oh, S.H. Shinn // *Experimental Eye Research*. – 2005. – Vol. 81, № 1. – P. 65–70.
172. Kim C.W. Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration / C.W. Kim, K.N. Son, S.Y. Choi [et al.] // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, №18. – P. 4332-4336.
173. Kiriakidis S. VEGF expression in human macrophages is NF- κ B-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF- κ B inhibitor I κ B α and a kinase-defective form of the I κ B kinase 2 / S. Kiriakidis, E. Andreacos, C. Monaco // *Journal of Cell Science*. – 2003. – Vol. 116, № 4. – P. 665-674

174. Koch S. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors / S. Koch, S. Tugues, X. Li [et al.] // *Biochem. J.* – 2011. – T. 437, № 2. – С.169-183.
175. Konenkov V.I. Limfologiya / V.I. Konenkov, Yu.I. Borodin, M.S. Lyubarskiy // Novosibirsk: Izdatel'skiy dom «Manuskript»; 2012. Pp. 205-215, 238-265.
176. Kuznik B.I. Adhesion molecule JAM-A, it's function and mechanism of epigenetic regulation / B.I. Kuznik, V. Kh. Khavinson, S.I. Tarnovskaya [et al.] // *Adv. Geront.* – 2015. – Vol. 28, № 4. – P. 656-668.
177. Lei Chun-Tao Time-dependent expression of PEDF and VEGF in blood serum and retina of rats with oxygen-induced retinopathy / Chun-Tao Lei, Xiao-Ling Wu, Peng Jie [et al.] // *J. of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences).* – 2015. – Vol. 6. – P. 135-139.
178. Lennikov M.S. Proteomics reveals ablation of placental growth factor inhibits the insulin resistance pathways in diabetic mouse retina / M.S. Lennikov, A. Lennikov, S. Tang [et al.] // *bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/338368>*
179. Lindblom P. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall / P. Lindblom, H. Gerhardt, S. Liebner [et al.] // *Genes Dev.* – 2003. – T. 17, №15. – P. 1835-1840.
180. Liu K. Conbercept for Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration: Results of the Randomized Phase 3 PHOENIX Study / K. Liu, Y. Song, G. Xu [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2019. – T.197. – P. 156-167.
181. Lofqvist C. Quantification and localization of the IGF/insulin system expression in retinal blood vessels and neurons during oxygen-induced retinopathy in mice / C. Lofqvist, K.L. Willett, O. Aspegren [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2009. – Vol. 50, № 4. – P. 1831-1837.
182. Lu B. Therapeutic Potential of Topical Fenofibrate Eyedrops in Diabetic Retinopathy and AMD Rat Models / B. Lu, Y. Gao, W. Shen [et al.] // *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 2-9.
183. Lucerna M. NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells / M.

- Lucerna, D. Mechtcheriakova, A. Kadl [et al.] // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 28, Vol. 278 (13). – P. 11433-40 .
184. Luttrull J.K. Subthreshold diode micropulse laser photocoagulation (SDM) as invisible retinal phototherapy for diabetic macular edema: a review / J.K. Luttrull, G. Dorin // *Curr. Diabetes Rev.* – 2012. – Vol. 8. – P. 274–284.
 185. Lyu J. Recurrence of retinopathy of prematurity after intravitreal ranibizumab monotherapy: timing and risk factors / J. Lyu, Q. Zhang, C.L. Chen [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2017. – T. 58. – P. 1719–25.
 186. Malecaze F. Fibroblast growth factor receptor deficiency in dystrophic retinal pigmented epithelium / F. Malecaze, F. Mascarelli, K. Bugra [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 1993. – Vol. 154, №3. – P. 631-642.
 187. Mandell K.J. Expression of JAM-A in the human corneal endothelium and retinal pigment epithelium: localization and evidence for role in barrier function / K.J. Mandell, L. Berglin, E.A. Severson [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2007. – Vol. 48, №9. – P. 3928-3936.
 188. Martin G. Gene expression profiling in a mouse model of retinal vein occlusion induced by laser treatment reveals a predominant inflammatory and tissue damage response / G. Martin, D. Conrad, B. Cakir [et al.] // *Plos one.* – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. e0191338.
 189. Mathers C.D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 / C.D. Mathers, D. Loncar // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3, № 11. – P. e442.
 190. Mathew S.J., Haubert D., Krönke M., Leptin M. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway / S.J. Mathew, D. Haubert, M. Krönke [et al.] // *Journal of Cell Science.* – 2009. – T. 122. – P.1939-1946.
 191. May-Simera Helen L. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton / Helen L. May-Simera, W. Kelley Matthew // – *Cilia.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 7.
 192. Meissner M. PPAR α activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation / M.

- Meissner, M. Stein, C. Urbich [et al.] // *Circulation Research*. – 2004. – Vol. 94, № 3. – P. 324–332.
193. Messenger W.B. Injection frequency and anatomic outcomes 1 year following conversion to aflibercept in patients with neovascular age-related macular degeneration / W.B. Messenger, J.P. Campbell, A. Faridi [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 98, № 9. – P. 1205–1207.
 194. Mettu P.S. What might the future of wet AMD therapy look like? / P.S. Mettu // *Retina Today. The Neovascular AMD Pipeline*. – 2019. – Vol. 14, № 80. – P. 25-28.
 195. Miljkovic-Licina M. Targeting olfactomedin-like 3 inhibits tumor growth by impairing angiogenesis and pericyte coverage / M. Miljkovic-Licina, P. Hammel, S. Garrido-Urbani [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2012. – Vol. 11, № 12. – P. 2588-2599.
 196. Mintz-Hittner H.A. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity / H.A. Mintz-Hittner, K.A. Kennedy, A.Z. Chuang [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364, № 7. – P. 603–15.
 197. Miranda S. Beneficial effects of fenofibrate in retinal pigment epithelium by the modulation of stress and survival signaling under diabetic conditions / S. Miranda, Á. González-Rodríguez, M. García-Ramírez [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2012. – T. 227. – P. 2352–2362.
 198. Moshfeghi D.M. Systemic solutions in retinopathy of prematurity / D.M. Moshfeghi // *Am. J. Ophthalmol.* – 2018. – T. 193. – P. xiv-xviii.
 199. Murtaza K. Adam Patient comfort with yellow (577 nm) vs. green (532 nm) laser panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy / K. Adam Murtaza, M. Weinstock Brett, K. Kasi Sundeep [et al.] // *Ophthalmology Retina*. – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 91-95.
 200. Naik M.U. JAM-A protects from thrombosis by suppressing integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -dependent outside-in signaling in platelets / M.U. Naik, T.J. Stalker, L.F. Brass [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, №14. – P. 3352-3360.

201. Nakao M., Ono K., Fujisawa S., Iijima T. Mechanical stress-induced Ca²⁺ entry and Cl⁻ current in cultured human aortic endothelial cells / M. Nakao, K. Ono, S. Fujisawa [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1999. – T. 276, № 1, Pt 1. – P. C238-249.
202. Nakazawa T. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma / T. Nakazawa, C. Nakazawa, A. Matsubara [et al.] // *J. Neurosci.* – 2006. – T. 26. – P. 12633–12641.
203. Nguyen Q.D. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE / Q.D. Nguyen, D.M. Brown, D.M. Marcus [et al.] // *Ophthalmology.* – 2012. – Vol. 119. – P.789-801.
204. Nguyen Q.D. Dose-ranging evaluation of intravitreal siRNA PF-04523655 for diabetic macular edema (the DEGAS study) / Q.D. Nguyen, R.A. Schachar, C.I. Nduaka [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – T.15. – Vol. 53, № 12. – P. 7666-74.
205. Nguyen Q.D. Evaluation of the siRNA PF-04523655 versus ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (MONET Study) / Q.D. Nguyen, R.A. Schachar, C.I. Nduaka [et al.] // *Ophthalmology.* – 2012. – Vol. 119, № 9. – P. 1867-73.
206. Noonan J.E. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes / J.E. Noonan, A.J. Jenkins, J.X. Ma [et al.] // *Diabetes.* – 2013. – T. 62. – P. 3968-3975.
207. Novartis Pharma AG. 2013 Lucentis® Prescribing Information.
208. Nowak D.G. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors / D.G. Nowak, J. Woolard, E.M. Amin [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2008. – T. 121, № 20. – P. 3487-3495.
209. Olson J.L. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model / J.L. Olson, R.J. Courtney, N. Mandava // *Arch. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 125, № 9. – P. 1221-4.
210. Omae T. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, induces dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and

- potassium channels / T. Omae, T. Nagaoka, I. Tanano [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2011. – Vol. 52, № 9. – P. 6749–6756.
211. Ono A. Gene expression changes in the retina after systemic administration of aldosterone / A. Ono, K. Hirooka, Y. Nakano [et al.] // *Jpn. J. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 62, № 4. – P. 499-507.
 212. Panigrahy D. PPAR α agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition / D. Panigrahy, A. Kaipainen, S. Huang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – T.105. – P. 985–990.
 213. Parfyonova Y.V. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis / Y.V. Parfyonova, O.S. Plekhanova, V.A. Tkachuk // *Biochemistry (Mosc)*. – 2002. – T. 67, №1. – P.119-134.
 214. Park J.E. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR / J.E. Park, H.H. Chen, J. Winer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 41. – P. 25646-25654.
 215. Penn J. S. Vascular endothelial growth factor in eye disease / J. S. Penn, A. Madan, R. B. Caldwell [et al.] // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2008. – Vol. 27, № 4. – P. 331–371.
 216. Persson A.B. Vascular growth in health and disease / A.B. Persson, I.R. Buschmann // *Front Mol. Neurosci.* – 2011. – T. 4. – P. 14.
 217. Pisani F. Potential role of the methylation of VEGF gene promoter in response to hypoxia in oxygen-induced retinopathy: beneficial effect of the absence of AQP4 / F. Pisani, M. Cammalleri, M.D. Monte [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2018. – Vol. 22, № 1. – P. 613–627.
 218. Plekhanova O. Urokinase plasminogen activator augments cell proliferation and neointima formation in injured arteries via proteolytic mechanisms / O. Plekhanova, Y. Parfyonova, R. Bibilashvily [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2001. – T. 159, №2. – P. 297-306.

219. Plekhanova O.S. Urokinase stimulates inflammatory response in damaged vascular wall during in vivo arterial remodeling / O.S. Plekhanova, M.Y. Menshikov, M.A. Solomatina [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – T. 145, №1. – P.10-14.
220. Popson S.A. Interferon-induced transmembrane protein 1 regulates endothelial lumen formation during angiogenesis / S.A. Popson, Mary E. Ziegler, Chen Xiaofang [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2014. – Vol. 34, № 5. – P. 1011–1019.
221. Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Mechanisms and Factors of Angiogenesis / A.F. Poveshchenko, V.I. Konenkov // Uspekhi fiziol. Nauk. – 2010. – Vol. 41, № 2. – P. 68-89.
222. Rajendran P. The vascular endothelium and human diseases / P. Rajendran, T. Rengarajan, J. Thangavel [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2013. – Vol. 9, № 10. – P. 1057-1069.
223. Rattner A. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia / A. Rattner, J. Nathans // J. Neurosci. – 2005. – Vol. 25. – P. 4540–9.
224. Regatieri C.V. Dual role of intravitreal infliximab in experimental choroidal neovascularization: effect on the expression of sulfated glycosaminoglycans / C.V. Regatieri, J.L. Dreyfuss, G.B. Melo [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2009. – Vol. 50, № 11. – P. 5487-94.
225. Riddell J.R. Peroxiredoxin 1 stimulates endothelial cell expression of VEGF via TLR4 dependent activation of HIF-1a / J.R. Riddell, P. Maier, S.N. Sass [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e50394.
226. Rodrigues, I.P., 2012. New roles of Rab GTPases on eye diseases: targeting VEGF secretion.
227. Rogers S. The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia and Australia / S. Rogers, R.L. McIntosh, N. Cheung [et al.] // Ophthalmology. – 2010. – Vol. 117, № 2. – P.313-319.

228. Rojas B. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers / B. Rojas, B.I. Gallego, A.I. Ramírez [et al.] // J. Neuroinflammation. – 2014. – Vol. 26, № 11. – P. 133.
229. Rosenfeld P.J. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration / P.J. Rosenfeld, D.M. Brown, J.S. Heier [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355, № 14. – P. 1419-1431.
230. Ryan K.E. Fenofibrate and pioglitazone improve endothelial function and reduce arterial stiffness in obese glucose intolerant men / K.E. Ryan, D.R. McCance, L. Powell [et al.] // Atherosclerosis. – 2006. – Vol. 194. – P. 123–130.
231. Saker S. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells / S. Saker, E. A. Stewart, A. C. Browning [et al.] // Exp. Eye Res. – 2014. – Vol. 121. – P. 161–167.
232. Sato T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity / T. Sato, S. Kusaka, H. Shimojo [et al.] // Ophthalmology. – 2009. – Vol. 116. – P. 2165–9.
233. Savur F. The effect of infliximab and octreotide on cytokine levels experimental proliferative vitreoretinopathy / F. Savur, O. Aydemi, N. İlhan // Cutan. Ocul. Toxicol. – 2020. – Vol. 39, № 1 – P. 61-66.
234. Schaal S. Is there tachyphylaxis to intravitreal anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy in age-related macular degeneration? / S. Schaal, H.J. Kaplan, T.H. Tetzlaff // Ophthalmology. – 2008. – Vol. 115. – P. 2199–2205.
235. Schaper W. Collateral circulation: past and present / W. Schaper // Basic Res. Cardiol. – 2009. – T. 104, №1. – P. 5-21.
236. Schaper W. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth / W. Schaper, W.D. Ito // Circ Res. – 1996. – T. 79, №5. – P. 911-919.
237. Schatteman G.C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors / G.C. Schatteman, M. Dunnwald, C. Jiao // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 292, №1. – P. H1-18.

238. Scheppke L. Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits / L. Scheppke, E. Aguilar, R.F. Gariano [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, № 6. – P. 2337–2346.
239. Scholz P. Review of Subthreshold Micropulse Laser for Treatment of Macular Disorders / P. Scholz, L. Altay, S.A. Fauser // *Adv. Ther.* – 2017. – Vol. 34, №7. – P. 1528–1555.
240. Schottelius A.J.G. Biology of tumor necrosis factor- α implications for psoriasis / A.J.G. Schottelius, L.L. Moldawer, C.A. Dinarello [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2004. – T.13. – P. 193-222.
241. Schwarzer P. Effect of Inhibition of Colony-Stimulating Factor 1 Receptor on Choroidal Neovascularization in Mice / P. Schwarzer, D. Kokona, A. Ebnetter [et al.] // *The American Journal of Pathology.* – 2020. – Vol. 190, №2. – P. 412-425.
242. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine / G.L. Semenza // *Cell.* – 2012. – T. 148, №3. – P. 399-408.
243. Semenza G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology / G.L. Semenza // *Annu Rev. Pathol.* – 2014. – T. 9. – P. 47-71.
244. Senger D.R. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation / D.R. Senger, L.F. Brown, K.P. Claffey [et al.] // *Invasion Metastasis.* – 1994. – T. 14, №1-6. – P.385-394.
245. Shin E. S. Diabetes and retinal vascular dysfunction / E.S. Shin, C.M. Sorenson, N. Sheibani // *Journal of Ophthalmic and Vision Research.* – 2014. – Vol. 9, №3. – P. 362–373.
246. Si Y. Platelet-derived growth factor induced alpha-smooth muscle actin expression by human retinal pigment epithelium cell / Y. Si, J. Wang, J. Guan [et al.] // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 29, №3. – P. 310-8.
247. Singh R.P. A single arm, investigator-initiated study of the efficacy, safety and tolerability of intravitreal aflibercept injection in subjects with exudative age-related macular degeneration, previously treated with ranibizumab or bevacizumab: 6-month interim analysis / R.P. Singh, S. Srivastava, J.P. Ehlers [et al.] // *Br. J. Ophthalmol.* – 2014. – T. 98, № 1. – P. i22–i27.

248. Sohn H.J. Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema / H.J. Sohn, D.H. Han, I.T. Kim [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2011. – T.152. – P. 686–94.
249. Spranger J. Systemic levels contribute significantly to increased intraocular IGF-I, IGF-II and IGFBP3 [correction of IFG-BP3] in proliferative diabetic retinopathy / J. Spranger, J. Buhnen, V. Jansen [et al.] // *Hormone Metab. Res.* – 2000. – T. 32. – P. 196–200.
250. Sprague A.H. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease / A.H. Sprague, R.A. Khalil // *Biochemical pharmacology.* – 2009. – Vol. 78, № 6. – P. 539-552.
251. Sramek C.K. Therapeutic window of retinal photocoagulation with green (532-nm) and yellow (577-nm) lasers / C.K. Sramek, L.-S.B. Leung, Y.M. Paulus [et al.] // *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging.* – 2012. – T. 43. – P. 341–347.
252. Staels B. Activation of human aortic smooth-muscles is inhibited by PPAR α but not PPAR γ activators / B. Staels, W. Koenig, A. Habib [et al.] // *Nature.* – 1998. – Vol. 393. – P.790–793.
253. Stahl A. Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial / A. Stahl, D. Lepore, A. Fielder [et al.] // *The Lancet.* – 2019. – T. 394. – P. 1551-9.
254. Stepanova V. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptordependent and proteolysis-dependent mechanisms / V. Stepanova, S. Mukhina, E. Kohler [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 1999. – T. 195, № 1-2. – P.199-206.
255. Stewart M.W. Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye) / M.W. Stewart, P.J. Rosenfeld P.J., F.M. Penha [et al.] // *Retina.* – 2012. – Vol. 32, №3. – P. 434–457.

256. Storkebaum E. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection / E. Storkebaum, D. Lambrechts, P. Carmeliet // *Bioessays*. – 2004. – T. 26, №9. – P. 943-954.
257. Suarez S. Modulation of VEGF-induced retinal vascular permeability by peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ / S. Suarez, G.W. McCollum, C.A. Bretz [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – T. 55. – P. 8232–8240.
258. Tae N. Syntenin promotes VEGF-induced VEGFR2 endocytosis and angiogenesis by increasing ephrin-B2 function in endothelial cells / N. Tae, S. Lee, O. Kim [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8. – P. 38886-38901.
259. Takuwa Y. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis / Y. Takuwa, W. Du, X. Qi [et al.] // *World J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 1, №10. – P. 298-306.
260. Tarr J.M. Pathophysiology of diabetic retinopathy / J.M. Tarr, K. Kaul, M. Chopra [et al.] // *ISRN Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 13.
261. Tawfik A. Suppression of retinal peroxisome proliferator-activated receptor γ in experimental diabetes and oxygen-induced retinopathy: role of NADPH oxidase / A. Tawfik, T. Sanders, K. Kahook [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – Vol. 50, № 2. – P. 878–884,
262. Tezel G. Wax MB. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes / G. Tezel, L.Y. Li, R.V. Patil // *Invest. Ophth. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – P. 1787–1794.
263. Tezel G. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro / G. Tezel, X. Yang // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45. – P. 4049-4059.
264. Theodossiadis P.G. Intravitreal administration of the anti-TNF monoclonal antibody infliximab in the rabbit / P.G. Theodossiadis, V.S. Liarakos, P.P. Sfikakis [et al.] // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 247, № 2. – P. 273-81.
265. Theodossiadis P.G. Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration / P.G. Theodossiadis, V.S. Liarakos, P.P. Sfikakis [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 147, №5. – P. 825-30.

266. Tilstra J.S. NF- κ B in aging and disease / J.S. Tilstra, C.L. Clauson, L.J. Niedernhofer [et al.] // *Aging and Disease*. – 2011. – Vol. 2, № 6. – P. 449-465.
267. Tkachuk V. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling / V. Tkachuk, V. Stepanova, P.J. Little [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1996. – T. 23, №9. – P.759-765.
268. Tkachuk V.A. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator / V.A. Tkachuk, O.S. Plekhanova, Y.V. Parfyonova // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – T. 87, №4. – P. 231-251.
269. Tomita Y. Pemaifibrate prevents retinal pathological neovascularization by increasing FGF21 Level in a murine oxygen-induced retinopathy mode / Y. Tomita, N. Ozawa, Y. Miwa [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – T. 20, № 23. – P. 5878.
270. Tripathi P. NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response / P. Tripathi, A. Aggarwal // *Current Science*. – 2006. – T. 90, № 4. – P. 519-531.
271. Trudeau K. Fenofibric acid reduces fibronectin and collagen type IV overexpression in human retinal pigment epithelial cells grown in conditions mimicking the diabetic milieu: functional implications in retinal permeability / K. Trudeau, S. Roy, W. Guo [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – T. 52. – P. 6348–6354.
272. Tzima E. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress / E. Tzima, M. Irani-Tehrani, W.B. Kiosses [et al.] // *Nature*. – 2005. – T. 437, №7057. – P.426-431.
273. US National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov. NCT02640664. Rainbow Extension Study (Rainbow Ext). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02640664>
274. Vazquez-Chona F. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina / F. Vazquez-Chona, B.K. Song, E.E. Geisert // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – T. 45. – P. 2737–46.
275. Verma S. C-reactive protein activates the nuclear factor- κ B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and

- restenosis / S. Verma, M.V. Badiwala, R.D. Weisel [et al.] // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2003. – Vol. 126, № 6. – P. 1886-1891.
276. Villarroel M. Fenofibric acid prevents retinal pigment epithelium disruption induced by interleukin-1 β by suppressing AMP-activated protein kinase (AMPK) activation / M. Villarroel, M. Garcia-Ramírez, L. Corraliza [et al.] // Diabetologia. – 2011. – T. 54. – P. 1543–1553.
277. Vlodavsky C.R. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2 / C.R. Vlodavsky, E. Brakenhielm, R. Pawliuk [et al.] // Nature Med. – 2003. – Vol. 9, №5. – P. 604-613.
278. Vujosevic S., Martini F, Convento E, et al. Subthreshold laser therapy for diabetic macular edema: metabolic and safety issues / S. Vujosevic, F. Martini, E. Convento [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2013. – T. 20. – P. 3267–3271.
279. Vujosevic S. Subthreshold micropulse yellow laser versus subthreshold micropulse infrared laser in center-involving diabetic macular edema: morphologic and functional safety / S. Vujosevic, F. Martini, E. Convento // Retina. – 2015. – Vol. 35, № 8. – P. 1594-603.
280. Wallace D.K. A dosing study of bevacizumab for retinopathy of prematurity / D.K. Wallace, T.W. Dean, M.E. Hartnett [et al.] // Ophthalmology. – 2018. – Vol. 125, № 12. – P. 1961–6.
281. Wang F. Tissue-specific expression of PPAR mRNAs in diabetic rats and divergent effects of cilostazol / F. Wang, L. Gao, B. Gong [et al.] // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2008. – Vol. 86, № 7. – P. 465–471.
282. Wang S. Oxidative stress, autophagy and pyroptosis in the neovascularization of oxygen-induced retinopathy in mice / S. Wang, Ji Li-Yang, Li Li [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2019. – Vol. 19, № 2. – P. 927–934.
283. Wesolowski E. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) genes in a mouse model of retinal neovascularization / E. Wesolowski, V.K. Han // Pediatric Research. – 1997. – Vol. 41. – P. 187–187.

284. Wilson Ann S. Argon Laser Photocoagulation–Induced Modification of Gene Expression in the Retina / A.S. Wilson, B.G. Hobbs, W.Y. Shen [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – Vol. 44. – P. 1426–1434.
285. Wilson A.S. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina / A.S. Wilson, B.G. Hobbs, W.Y. Shen [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – Vol. 44, № 4. – P. 1426-34.
286. Wong T.Y. Clinical update: new treatments for age-related macular degeneration / T.Y. Wong, G. Liew, P. Mitchell // Lancet. – 2007. – T. 370, № 9583. – P. 204-206.
287. Wu M. Intraretinal leakage and oxidation of LDL in diabetic retinopathy / M. Wu, Y. Chen, K. Wilson [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – Vol. 49. – P. 2679–2685.
288. Wu W.C. Geldanamycin, a HSP90 inhibitor, attenuates the hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in retinal pigment epithelium cells in vitro / W.C. Wu, Y.H. Kao, P.S. Hu [et al.] // Exp. Eye Res. – 2007. – Vol. 85, №5. – P. 721-731.
289. Xianjin Y. Insulin Receptor Substrate 2 Is Essential for Maturation and Survival of Photoreceptor Cells / Y. Xianjin, M. Schubert, N. S. Peachey [et al.] // The Journal of Neuroscience. – 2005. – Vol. 25, № 5. – P. 1240-1248.
290. Xu K. Tubulogenesis during blood vessel formation / K. Xu, O. Cleaver // Semin. Cell Dev. Biol. – 2011. – T. 22, №9. – P. 993-1004.
291. Xu Q. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue / Q. Xu, T. Qaum, A.P. Adamis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2001. – Vol. 42, № 3. – P. 789-94.
292. Yadav N.K., Jayadev C., Mohan A., et al. Subthreshold micropulse yellow laser (577 nm) in chronic central serous chorioretinopathy: safety profile and treatment outcome / N.K. Yadav, C. Jayadev, A. Mohan [et al.] // Eye (Lond). – 2015. – Vol. 29, № 2. – P. 258-64.

293. Yadav N.K. Recent developments in retinal lasers and delivery systems / N.K. Yadav, C. Jayadev, A. Rajendran [et al.] // Indian. J. Ophthalmol. – 2014. – Vol. 62. – P. 50-4.
294. Yan X. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head / X. Yan, G. Tezel, M.B. Wax [et al.] // Arch. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 118. – P. 666–673.
295. Yannuzzi L.A. Review of retinal angiomatous proliferation or type 3 neovascularization / L.A. Yannuzzi, K.B. Freund, B.S. Takahashi // Retina. – 2008. – Vol. 28, №3. – P. 375-384.
296. Yanagi Y. Subconjunctival Doxifluridine Administration Suppresses Rat Choroidal Neovascularization through Activated Thymidine Phosphorylase / Y. Yanagi, Y. Tamaki, Y. Inoue [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2003. – Vol. 44. – P. 751-754.
297. Yang S. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review / S. Yang, J. Zhao, X. Sun // Drug Des. Devel. Ther. – 2016. – T.10 – P.1857-67.
298. Ye W. The effect of central loops in miRNA: MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation / W. Ye, Q. Lv, C.K. Wong // PLOS ONE. – 2008. – T. 3, №3. – P. e1719.
299. Yonesu K. Involvement of sphingosine-1-phosphate and S1P1 in angiogenesis: analyses using a new S1P1 antagonist of non-sphingosine-1-phosphate analog / K. Yonesu, Y. Kawase, T. Inoue [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2009. – T. 77, №6. – P. 1011-20.
300. Yoon J.M. Outcomes after laser versus combined laser and bevacizumab treatment for type 1 retinopathy of prematurity in zone 1 / J.M. Yoon, D.H. Shin, S.J. Kim [et al.] // Retina. – 2017. – Vol. 37, №1. – P. 88–96.
301. Yoshida S. Microarray analysis of gene expression in the aging human retina / S. Yoshida, B.M. Yashar, S. Hiriyanna [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – Vol. 43, № 8. – P. 2554-60.

302. Yoshimura N. Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury / N. Yoshimura, T. Kikuchi, S. Kuroiwa [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – T. 44. – P. 2211–20.
303. Young T.L. Histopathology and vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity / T.L. Young, D.C. Antony, E. Pierce [et al.] // *J. AAPOS.* – 1997. – Vol. 1, №2. – P. 105–10.
304. Zeng L. Vascular Endothelial Cell Growth–Activated XBP1 Splicing in Endothelial Cells Is Crucial for Angiogenesis / L. Zeng, Q. Xiao, M. Chen [et al.] // *Circulation.* – 2013. – T. 127. – P. 1712–1722.
305. Zhang G. Comparison of intravitreal injection of ranibizumab versus laser therapy for zone ii treatment-requiring retinopathy of prematurity / G. Zhang, M. Yang, J. Zeng [et al.] // *Retina.* – 2017. – Vol. 37, № 4. – P. 710–7.
306. Zhang W. β -elemene inhibits oxygen-induced retinal neovascularization via promoting miR-27a and reducing VEGF expression / W. Zhang, L. Chen, J. Geng [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2019. – Vol. 19, № 3. – P. 2307–2316.
307. Zhang Xiao-Yan Protective effect of pioglitazone on retinal ischemia/reperfusion injury in rats / Zhang Xiao-Yan; Yi-Qin Xiao; Yu Zhang [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2013. – Vol.54. – P. 3912-3921.
308. Zhao Y. Tumor necrosis factor receptor 2 signalling induces selective c-IAP1—dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signalling / Y. Zhao, D.B. Conze, J.A. Hanover [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 11. – P. 7777-7782.
309. Zhu N.L. Downregulation of cyclin G1 expression by retrovirus-mediated antisense gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation / N.L. Zhu, L. Wu, P.X. Liu [et al.] // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96, № 2. – P. 628-635.
310. Zhu X. The effects of pleiotrophin in proliferative diabetic retinopathy / X. Zhu, Y. Bai, W. Yu [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. e0115523.